



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0034686
(43) 공개일자 2019년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7008184
(22) 출원일자(국제) 2017년08월22일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년03월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/048074
(87) 국제공개번호 WO 2018/039274
국제공개일자 2018년03월01일

(30) 우선권주장
62/378,102 2016년08월22일 미국(US)

(71) 출원인
초 파마 인크.
대만 타이페이 11503, 난강 디스트릭트, 파크 스트리트, 넘버 3, 에프 빌딩, 18층

(72) 발명자
린, 난-홍
미국 일리노이주 60061, 버논 힐즈, 웨스트 시카모어 스트리트 432
후양, 치우-첸
대만 타이페이 115, 난강 디스트릭트, 넘버 3. 파크 스트리트, 빌딩 에프, 18층, 초 파마 인크 내 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
김해중

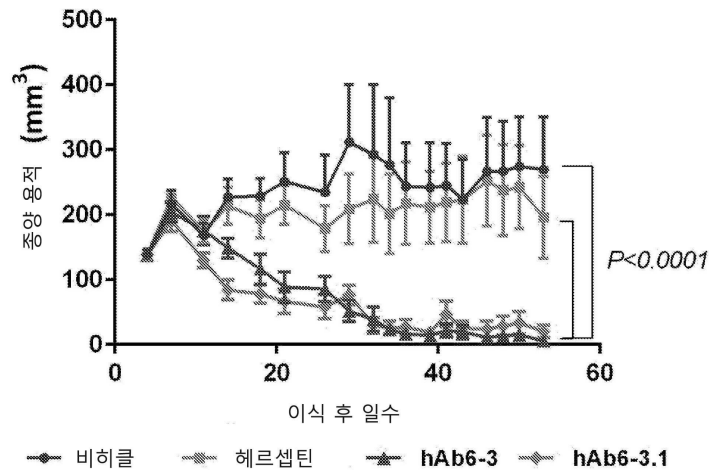
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 항체, 결합 단편 및 사용 방법

(57) 요약

본원의 개시내용은 SSEA4 분자, 및 유방암, 전립선암 및 신장암 세포와 같은 SSEA4-관련 발현 종양 세포에 고친화성으로 결합할 수 있는 특이적 상보성 결정 영역을 포함하는 항-SSEA4 항체 및 이의 결합 단편에 관한 것이다. 상기 항-SSEA4 항체 및 결합 단편은 표적화된 종양 세포에서 ADCC 또는 CDC 효과를 유도하고 암/종양 증식을 저해하고/하거나 감소시킨다. 본원의 개시내용은 또한 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서 항-SSEA4 항체 및 이의 결합 단편을 제공한다. 추가로, 항-SSEA4 항체 및 결합 단편은 암의 진단에 유용하다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

A61K 47/68 (2017.08)
G01N 33/57473 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/50 (2013.01)
G01N 2333/47 (2013.01)

(72) 발명자

첸, 치엔-위

대만 타이페이 115, 난캉 디스트릭트, 넘버 3. 파크 스트리트, 빌딩 에프, 18층, 초 파마 인크 내

추, 쿠오-칭

대만 타이페이 115, 난캉 디스트릭트, 넘버 3. 파크 스트리트, 빌딩 에프, 18층, 초 파마 인크 내

왕, 치-휴이

미국 캘리포니아 92067, 란초 산타페, 피오박스 8154

우, 한-충

대만 타이페이 115, 난캉 디스트릭트, 넘버 3. 파크 스트리트, 빌딩 에프, 18층, 초 파마 인크 내

명세서

청구범위

청구항 1

각 하기를 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- (i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택된 H-CDR1 또는 (i)의 80% 이상 보존된 서열 동족체;
- (ii) 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151 및 171로부터 선택된 H-CDR2 또는 (ii)의 80% 이상의 보존된 서열 동족체;
- (iii) 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택된 H-CDR3 또는 (iii)의 80% 이상의 보존된 서열 동족체;
- (iv) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택된 L-CDR1 또는 (iv)의 80% 이상의 보존된 서열 동족체;
- (v) 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택된 L-CDR2 또는 (v)의 80% 이상의 보존된 서열 동족체;
- (vi) 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157 및 177로부터 선택된 L-CDR3 또는 (vi)의 80% 이상의 보존된 서열 동족체.

청구항 2

하기를 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- (i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택된 H-CDR1 또는 5개 이만의 아미노산 치환을 함유하는 (i)의 보존된 서열 동족체;
- (ii) 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151 및 171로부터 선택된 H-CDR2 또는 5개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 (ii)의 보존된 서열 동족체;
- (iii) 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택된 H-CDR3 또는 5개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 (iii)의 보존된 서열 동족체;
- (iv) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택된 L-CDR1 또는 5개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 (iv)의 보존된 서열 동족체;
- (v) 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택된 L-CDR2 또는 5개 이만의 아미노산 치환을 함유하는 (v)의 보존된 서열 동족체;
- (vi) 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157 및 177로부터 선택된 L-CDR3 또는 5개 이만의 아미노산 치환을 함유하는 (vi)의 보존된 서열 동족체.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 중쇄 상의 A100R, N31S, T62A 중 하나 이상 및/또는 경쇄 상의 S52Y로부터 선택된 CDR 상에 아미노산 치환을 추가로 포함하는, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 중쇄 상의 V50A, G53A, S35T 중 하나 이상 및/또는 경쇄 상의 V30I/A, G91A, Y94F 중 하나 이상으로부터 선택된 CDR 상에 아미노산 치환을 추가로 포함하는, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

하기를 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(i) 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153 및 173으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 또는 이의 80% 이상 보존된 서열 동족체;

(ii) 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158 및 178로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체.

청구항 6

하기를 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(i) 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153 및 173으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체;

(ii) 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158 및 178로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체.

청구항 7

하기를 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택되는 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151 및 171로부터 선택되는 H-CDR2, 및 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택되는 H-CDR3을 추가로 각각 포함하는 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체, 및

(ii) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택되는 L-CDR2; 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157, 및 177로부터 선택되는 L-CDR3을 각각 추가로 포함하는 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체.

청구항 8

하기를 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택되는 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151, 및 171로부터 선택되는 H-CDR2, 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택되는 H-CDR3을 각각 추가로 포함하는 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체, 및

(ii) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156, 및 176로부터 선택되는 L-CDR2, 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157 및 177로부터 선택되는 H-CDR3을 각각 추가로 포함하는 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체.

청구항 9

하기를 각각 추가로 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(i) 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153 및 173으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인; 및

(ii) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156, 및 176로부터 선택되는 L-CDR2; 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157 및 177로부터 선택되는 H-CDR3을 각각 추가로 포함하는 서열번호 18,

28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체.

청구항 10

하기를 추가로 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택되는 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151, 및 171로부터 선택되는 H-CDR2; 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택되는 H-CDR3을 각각 추가로 포함하는 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체, 및

(ii) 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158 및 178로부터 선택된 경쇄 가변 도메인.

청구항 11

표 2A-2D에서 각각의 변이체에 제시된 바와 같이, 각각의 상응하는 V_H , V_L 및 각각의 H-CDR 및 L-CDR을 포함하는, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편이:

- a) 키메라 항체 또는 이의 단편; 또는
- b) 인간화된 항체 또는 이의 단편; 또는
- c) 인간 항체 또는 이의 단편; 또는
- d) Fab, Fab', Fv, scFv, dsFv, F(ab)₂, Fd 및 디아바디로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원 결합 단편인, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 IgG인, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 결합 또는 결합 단편 표적이 Neu5Ac α 2→3Gal β 1→3GalNAc β 1→3Gal α 1→4Gal β 1→4Glc β 1의 구조를 갖는 탄수화물 항원 SSEA4인, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 표적 세포에 결합시 CDC 및/또는 ADCC 유도 활성을 갖는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 16

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서, 하나 이상의 치료학적 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 치료학적 제제가 치료학적 항체, 화학치료학적 제제 또는 사이토킨으로부터 선택되는,

약제학적 조성물.

청구항 19

제 1항 내지 제 14항 중 어느 항의 항체 및 세포독성 제제를 포함하는 면역접합체.

청구항 20

제 19항에 있어서, 화학식 AB-(L-D)_p를 갖고, 여기서,

- (a) AB가 제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 항체이고;
- (b) L이 링커이고;
- (c) D가 적합한 세포독성 약물이고,
- (d) p가 1 내지 8의 범위인, 면역접합체.

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 약물이 MMAE 또는 MMAF인, 면역접합체 (ADC).

청구항 22

제 20항에 있어서, 상기 링커가 절단가능한 링커인, 면역접합체.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 절단가능한 링커가 알록시아민-절단가능한 링커인, ADC.

청구항 24

청구항의 면역접합체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형.

청구항 25

제 24항에 있어서, 추가의 치료학적 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 26

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 항체를 암호화하는 단리된 핵산 (cDNA).

청구항 27

제 26항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 28

항체가 생성되도록 제 27항의 숙주 세포를 배양함을 포함하는 항체를 생성하는 방법.

청구항 29

하기를 포함하는 단계에 의해 생성되는 항체:

- (a) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 및 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택되는 L-CDR2, 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157, 및 177로부터 선택되는 L-CDR3, 또는 5개 이하의 보존된 아미노산 치환을 갖는 각각의 L-CDR의 보존된 서열 동족체의 서열을 갖는 3VL 도메인 CDR을 암호화하는 핵산을 제공하는 단계;
- (b) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170로부터 선택되는 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151 및 171로부터 선택되는 H-CDR2, 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152, 및 172로부터 선택되는 H-CDR3, 또는 5개 이하의 보존된 아미노산 치환을 갖는 각각의 H-CDR의 보존된 서열 동족체의 서열을 갖는 3VH 도메인 CDR을 암호화하는 핵산의 레퍼토리를 조합하는

단계로서;

상기 핵산이 3VL 도메인 CDR을 암호화하여, 상기 3VL 도메인 CDR을 암호화하는 핵산의 생성물 레퍼토리 및 3VH 도메인 CDR의 레퍼토리를 제공하는 단계;

(c) 상기 생성물 레퍼토리의 핵산을 발현하는 단계;

(d) SSEA4에 특이적으로 결합하고 상기 생성물 레퍼토리의 핵산으로부터 발현되는 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 선택하는 단계; 및

(e) 상기 항원 결합 단편을 포함하는 항체를 생성하는 단계.

청구항 30

SSEA4-양성 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법이 제 16항, 제 17항, 제 18항, 제 24항 및 제 25항 중 어느 한 항의 유효량의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하는 방법.

청구항 31

제 30항에 있어서, 상기 SSEA4-양성 암이 뇌암, 폐암, 유방암, 경구암, 식도암, 위암, 간암, 담관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 자궁경관암, 난소암 및 전립선암으로부터 선택되는, 방법.

청구항 32

제 30항에 있어서, 개체에 하나 이상의 추가의 치료학적 양상 또는 제제를 조합하여 투여함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

제 32항에 있어서, 상기 조합된 치료 양상이 치료학적 항체, 세포 치료요법, 방사선, 사이토킨 또는 화학치료학적 제제로부터 선택되는, 방법.

청구항 34

SSEA4-양성 세포의 증식을 저해하는 방법으로서, 상기 방법이 상기 항체/단편/ADC의 탄수화물 항원을 발현하는 세포 표면 상에 SSEA4로의 결합을 허용하는 조건하에서 제 16항, 제 17항, 제 18항, 제 24항 및 제 25항 중 어느 한 항의 약제학적 제형에 상기 세포를 노출시켜 상기 세포의 증식을 저해함을 포함하는, 방법.

청구항 35

SSEA4-양성 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 SSEA4-양성 암이 제1 치료학적 제제에 내성이 있으며, 상기 방법이 제 16항, 제 17항, 제 18항, 제 24항 및 제 25항 중 어느 한 항의 유효량의 약제학적 제형을 개체에게 투여함을 포함하는 방법.

청구항 36

제 35항에 있어서, 상기 SSEA4-양성 암이 뇌암, 폐암, 유방암, 경구암, 식도암, 위암, 간암, 담관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 자궁경관암, 난소암 및/또는 전립선암인, 방법.

청구항 37

제 35항에 있어서, 상기 제1 치료학적 제제가 SSEA4 이외의 항원에 결합하는 제1 항체/결합 단편/ADC, 및/또는 방사선, 및/또는 화학치료학적 제제를 포함하는, 방법.

청구항 38

상기 생물학적 샘플을, 상기 항-SSEA4 항체의 천연적으로 존재하는 SSEA4로의 결합을 허용하는 조건하에서 제1 항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 항-SSEA4 항체와 접촉시키고 복합체가 상기 생물학적 샘플 중에서 상기 항-SSEA4 항체와 천연적으로 존재하는 SSEA4 간에 형성되는지의 여부를 검출함을 포함하는, 생물학적 샘플 중에 SSEA4를 검출하는 방법.

청구항 39

제 38항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 암 샘플인, 방법.

청구항 40

(i) 표지된 항-SSEA4 항체를 탄수화물 항원 발현 종양을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체에 투여하는 단계로서, 상기 표지된 항-SSEA4 항체가 제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 항-SSEA4 항체를 포함하는 단계, 및 (ii) 대상체에서 상기 표지된 항-SSEA4 항체를 검출하는 단계로서, 상기 표지된 항-SSEA4 항체의 검출이 대상체에서 SSEA4-양성 암을 지적하는 단계를 포함하는 SSEA4-양성 암을 검출하기 위한 방법.

청구항 41

(i) 표지된 항-SSEA4 항체를 탄수화물 항원 발현 종양을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체 기원의 샘플과 접촉시키는 단계로서, 상기 표지된 항-SSEA4 항체가 제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 항-SSEA4 항체를 포함하는 단계, 및 (ii) 상기 샘플에서 상기 표지된 항-SSEA4 항체를 검출하는 단계로서, 상기 표지된 항-SSEA4 항체의 검출이 상기 샘플에서 SSEA4-양성 암을 지적하는 단계를 포함하는 SSEA4-양성 암을 검출하기 위한 방법.

청구항 42

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 10^{-7} M 미만의 친화성 상수로 SSEA4에 특이적으로 결합하는, 단리된 항체.

청구항 43

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄인, 단리된 항체.

청구항 44

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 IgG_{1λ} 또는 IgG_{1κ}인, 단리된 항체.

청구항 45

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부가 1×10^{-7} M 이하의 K_D로 SSEA4에 결합하고 상기 K_D가 표면 플라즈몬 공명 (Biacore) 분석에 의해 측정되는, 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부.

청구항 46

제 45항에 있어서, 상기 결합 친화성이 < 50 nM인, 단리된 항-SSEA4 항체 또는 이의 결합 단편.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2016년 8월 22일자로 출원된 미국 가출원 일련 번호 제62/378,102호에 대한 우선권을 주장하고 이의 개시내용은 이의 전문이 참조로 인용된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본원의 개시내용은 암을 포함하는 증식성 장애의 치료에서 면역치료요법을 위한 항체 및 결합 단편 및 상기 증식성 장애에 대한 진단 방법에 관한 것이다. 특히, 본원의 개시내용은 면역원성 올리고사카라이드 SSEA4에 대한 항체 및/또는 결합 단편을 포함하는 탄수화물-관련된 면역치료요법 및 약제학적 조성물에 관한 것이다. 더욱이, 본원의 개시내용은 과증식성 병태 및 비정상 세포 상에서 발현되는 암학적으로 관련되거나 특이적 탄수화물의 검출 및/또는 진단에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 단계-특이적 배아 항원 4 (SSEA4)는 글로보-시리즈 글리코스핑고지질 (GSL)에 속하는 헥사사카라이드이고 Neu5Ac a2→3Gal β1→3GalNAc β1→3Gal a1→4Gal β1→4Glc β1의 구조를 포함한다. SSEA4는 1983년에 인간 기형 암종 세포로부터 처음으로 단리된 이후(Kannagi R, et al., 1983), 이것은 지금까지 인간 배아 줄기 세포 (hESC)를 한정하기 위한 표면 마커로서 광범위하게 사용되었다. 과거 수십년 동안에, 보다 많은 연구는 코어 구조 Gal β1→3GalNAc β1→3Gal a1→4Gal β1→4Glc β1 (SSEA3)을 SSEA4와 공유하는 GSL인 GloboH가 난소암, 위암, 전립선암, 폐암, 유방암 및 췌장암(Zhang S, et al., 1997)을 포함하는 많은 상피 암에서 과발현됨을 지적했다. 그리고, SSEA4의 고수준 발현은 신장 세포 암종(문헌참조: Saito S, et al., 1997) 및 다형성신경교아 종(문헌참조: Lou YW, et al., 2014)에서 관찰되었다. 보다 흥미롭게도, SSEA3 및 GloboH와 함께, SSEA4의 발현은 유방 종양 세포에서 뿐만 아니라 유방암 줄기 세포에서 발견되었다(문헌참조: Chang WW, et al., 2008; Huang YL, et al., 2013).

[0006] 그러나, 탄수화물 항원은 흔히 면역 시스템에 의해 관용성이어서 궁극적으로 약하거나 비-특이적 면역 반응을 유도한다(문헌참조: Stein KE, et al., 1992; Snapper CM, et al. 1996.). 상기 탄수화물 항원은 대식세포, B 세포 또는 수지상 세포와 같은 항원 제공 세포 (APC)에 의해 내재화될 수 없고 분해될 수 없음에 따라서 헬퍼 T (Th) 세포로 제공될 수 없는 것으로 제안된다. APC로부터 T-세포로의 시뮬레이션 부재는 항체 성숙화 및 이소형 스위칭의 부재를 유도한다. 따라서, 탄수화물 항원에 대한 저친화성 및 비-부류-스위칭 IgM 항체가 주로 생성된다(문헌참조: Musher DM, et al. 1990; Lortan JE, et al. 1993). 다양한 접근법은 결핍을 해소하기 위해 개발되었다. 면역원성을 개선하기 위한 탄수화물 항원과 캐리 단백질의 접합은 1950년 이후에 개발되었다(문헌참조: Lindberg AA, et al., 1999). 상기 종류의 고도로 면역원성의 단백질은 디프테리아 독소이드 (DT), 과상풍 독소이드 (TT), CRM197 (디프테리아 독소의 비독성 변이체), 및 엔. 메닝기티데스 (*N. meningitides*)로부터의 복합 체외막 단백질 (OMP) 혼합물을 포함한다(문헌참조: Ada G. et al., 1999). 상기 단백질의 고유 면역원성 성질에 추가로, 부스터 효과는 수용자가 이전에 이들 독소이드와 면역화된 경우 예상된다. 캐리어 단백질-탄수화물 항원 접합체는 MHC II 분자를 통한 APC에 의해 프로세싱되고 제공될 특정 탄수화물 항원과 접합된 펩타이드를 제공한다. Th 세포로부터 동시-시뮬레이션과 함께, 특정 탄수화물 항원에 대한 T 및 B 세포는 이어서 활성화된다. 항체 이소형-스위칭 및 성숙화에 이어서, 고친화성 및 특이성을 갖는 특정 탄수화물 항원에 대한 IgG 항체는 추가로 생성될 수 있다(문헌참조: Bazendale HE, et al., 2000). WO 2016029071은 링커를 통해 면역원성 캐리어 디프테리아 독소 교차-반응 물질 197(CRM 197)에 화학적으로 접합된 합성 SSEA4 유사체를 포함하는 탄수화물 기반 백신을 제공한다.

[0007] 탄수화물 백신화에서 캐리어 단백질이 면역원성을 개선하기 위한 해결책을 제공하지만, 상기 전략은 일부 새로운 및 기존의 문제점을 부과한다(문헌참조: Ingale S, et al., 2007). 첫번째로, 외래 캐리어 단백질 및 접착 링커는 강한 면역 반응을 유발함으로써 탄수화물 항원에 대한 항체 반응의 억제를 유도할 수 있다. 두번째로, 화학적 접합은 기본적으로 단백질 표면의 라이신 상에 있다. 실험 과정은 조절하기 어렵고 이종성 조성물 및 최종 구조를 유도한다. 모호한 조성물은 아마도 상이한 면역 반응을 유발한다. 세번째로, 세포 표면 상에 탄수화물 발현을 모방하기 위한 접합은 이상적이지 않음으로써 유도된 항체는 어느정도 탄수화물 클러스터를 인지하는데 실패한다. 탄수화물 폐결화 (PEGylation)와 같은 대안적 접근법(문헌참조: Giorgi ME. et al., 2014)은 남아있는 문제점을 극복하기 위해 연구한다.

[0008] 그럼에도 불구하고, 상기 언급된 활성 면역화 치료요법은 저면역성의 상태에 있는 암 환자에서 잘 수행되지 않는다. 후기-단계 암 환자 뿐만 아니라 화학치료요법 또는 방사선 치료요법을 받은 특정 환자들에서는 능동 면역 중재의 효능이 흔히 제한된다.

[0009] 이전의 기재 관점에서, 백신화 대신, 수동 면역을 채택하기 위해 암 탄수화물 에피토프에 대한 치료학적 항체를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0010] 본원의 개시내용은 예시적인 단리된 항-SSEA4 모노클로날 항체, 이의 결합 단편, 이들을 암호화하는 핵산, 및 상기 항체 및 이의 단편을 함유하는 조성물 및 종양 성장을 저해하고/하거나 감소시키고 암을 치료하는데 사용하는 방법을 제공한다. 본원에 제공된 예시적 모노클로날 항-SSEA4 항체 및 결합 단편은 SSEA4를 발현하는 종양 세포를 표적화하고 사멸시키기 위한 항체 의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존성 세포독성 (CDC) 활성을 매개할 수 있다. 추가로, 본원에 제공된 면역클로날 항-SSEA4 항체는 예시적 진단학적 적용에서

종양 샘플 및/또는 분절 내 SSEA4 발현 종양 세포를 검출하기 위해 사용될 수 있다.

- [0011] 따라서, 본원에서는 SSEA4 또는 이의 유도체 및 단편에 특이적으로 결합하는 신규한 제조항 항-SSEA4 항체, 및 암의 치료와 같은 항-종양 면역치료요법에서의 이의 사용 방법이 제공된다. 일단 암 항원에 결합되면, 항체는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성을 유도할 수 있고, 보체 시스템을 활성화시킬 수 있고 종양의 성장을 억제할 수 있다.
- [0012] 하나의 구현예에서, SSEA4는 뇌 종양 세포, 폐 종양 세포, 유방 종양세포, 경구 종양세포, 식도 종양 세포, 위 종양 세포, 간 종양 세포, 담관 종양 세포, 췌장 종양 세포, 결장 종양세포, 신장 종양 세포, 자궁경관 세포, 난소 종양 세포, 전립선 종양 세포를 포함하는, 다양한 종양 세포상에서 고도로 발현된다.
- [0013] 하나의 구현예에서, 모노클로날 항-SSEA4 항체는 SSEA4 분자 및 유도체에 특이적으로 결합한다.
- [0014] 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 항-SSEA4 항체를 포함하는 조성물은 항-암 치료요법에 유용하다. 특히, 본 발명의 구현예는 다양한 항-SSEA4 결합부에 사용될 수 있는, 특이적 항-SSEA4 항체의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 제공한다. 특히, 본 발명은 SSEA4 또는 이의 유도체에 결합할 수 있는 인간화된 항체 또는 키메라 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0015] 특정 구현예에서, CDR 서열은 캐뱃 방법에 의해 한정된다.
- [0016] 특정 구현예에서, 항-SSEA4 항체는 SSEA4-양성 또는 SSEA4 발현 세포에 결합시 종양 성장을 저해하는 활성을 갖는다.
- [0017] 특정 구현예에서, 단리된 항-SSEA4 항체는 모노클로날 항체이다. SSEA4에 대한 모노클로날 항체는 당업계 지식 또는 기술에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 이것은 인간 배아 암종 세포를 시험 대상체에 주사함에 이어서 목적하는 서열 또는 이의 기능적 특성을 갖는 항체를 발현하는 하이브리도마를 단리시킴에 의해 제조될 수 있다.
- [0018] 하나의 구현예에서, 본원의 개시내용은 표적 결합시 항체가 CDC 유도 활성을 갖는, SSEA4에 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공한다.
- [0019] 하나의 구현예에서, 본원의 개시내용은 표적 결합시 항체가 ACDC 유도 활성을 갖는, SSEA4에 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공한다.
- [0020] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다:
- [0021] (i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택된 H-CDR1, 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체;
- [0022] (ii) 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151 및 171로부터 선택된 H-CDR2, 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체;
- [0023] (iii) 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택된 H-CDR3, 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체;
- [0024] (iv) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택된 L-CDR1, 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체;
- [0025] (v) 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택된 L-CDR2, 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체, 및
- [0026] (vi) 각각 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157 및 177로부터 선택된 L-CDR3, 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체.
- [0027] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다:
- [0028] (i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택된 H-CDR1, 또는 5개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체;
- [0029] (ii) 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151 및 171로부터 선택된 H-CDR2, 또는 5개 미만의

의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체;

- [0030] (iii) 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택된 H-CDR3, 또는 5개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체;
- [0031] (iv) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택된 L-CDR1, 또는 5개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체;
- [0032] (v) 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택된 L-CDR2, 또는 5개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체;
- [0033] (vi) 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157 및 177로부터 선택된 L-CDR3, 또는 5개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체.
- [0034] 특정 구현예에서, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 상의 A100R, N31S, T62A 및/또는 경쇄 상의 S52Y 중 하나 이상으로부터 선택된 CDR 상에 아미노산 치환을 추가로 포함한다.
- [0035] 특정 구현예에서, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 상의 V50A, G53A, S35T의 하나 이상 및/또는 경쇄 상의 V30I/A, G91A, Y94F 중 하나 이상으로부터 선택된 CDR 상에 아미노산 치환을 추가로 포함한다.
- [0036] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다: (i) 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체; 및 (ii) 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체.
- [0037] 하나의 구현예에서, 청구항 1의 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 추가로 다음을 포함한다: (i) 각각 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택된 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151, 및 171로부터 선택되는 H-CDR2, 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택되는 H-CDR3을 추가로 포함하는 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체; 및 (ii) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 및 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택되는 L-CDR2, 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157, 및 177로부터 선택되는 L-CDR3을 추가로 포함하는 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체.
- [0038] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다: (i) 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 포함하는 보존된 서열 동족체; 및 (ii) 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체.
- [0039] 하나의 구현예에서, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 추가로 다음을 포함한다: (i) 각각 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택된 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151, 및 171로부터 선택되는 H-CDR2, 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택되는 H-CDR3을 추가로 포함하는 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 보존된 서열 동족체; 및 (ii) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 및 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택되는 L-CDR2, 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157, 및 177로부터 선택되는 L-CDR3을 추가로 포함하는 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 보존된 서열 동족체.
- [0040] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 추가로 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다: (i) 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선

택되는 중쇄 가변 도메인, 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체; 및 (ii) 서열 번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 및 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택되는 L-CDR2, 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157, 및 177로부터 선택되는 L-CDR3을 추가로 포함하는 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 보존된 아미노산 치환을 함유하는 이의 서열 동족체.

- [0041] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 추가로 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다: (i) 각각 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택된 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151, 및 171로부터 선택되는 H-CDR2, 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택되는 H-CDR3을 추가로 포함하는 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 보존된 서열 동족체, 및 (ii) 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체.
- [0042] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 표 2A-2D에서 각각의 변이체에 제시된바와 같은 각각의 상응하는 VH, VL 및 각각의 H-CDR 및 L-CDR을 포함하는, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0043] 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음과 같다:
- [0044] a. 키메라 항체 또는 이의 단편; 또는
- [0045] b. 인간화된 항체 또는 이의 단편; 또는
- [0046] c. 인간 항체 또는 이의 단편; 또는
- [0047] d. Fab, Fab', Fv, scFv, dsFv, F(ab)₂, Fd 및 디아바디로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원-결합 단편.
- [0048] 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 IgG이다.
- [0049] 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 구조 Neu5Ac α 2→3Gal β 1→3GalNAc β 1→3Gal α 1→4Gal β 1→4Glc β 1을 갖는 탄수화물 항원 SSEA4를 표적화한다.
- [0050] 특정 구현예에서, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서, 상기 항체는 표적 세포에 결합시 활성을 유도하는 CDC 및/또는 ADCC를 갖는다.
- [0051] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0052] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 하나 이상의 항-종양 제제를 추가로 포함한다.
- [0053] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물로서, 상기 항-종양 제제는 화학치료학적 제제이다.
- [0054] 특정 구현예에서, 면역접합체는 항체 및 세포독성제를 포함한다.
- [0055] 특정 구현예에서, 면역접합체는 화학식 AB-(L-D)_p를 갖고, 여기서: (a) AB는 청구항 1 내지 10 중 어느 한 항의 항체이고; (b) L은 링커이고; (c) D는 적합한 세포독성 약물이고, (d) p는 1 내지 8의 범위이다.
- [0056] 특정 구현예에서, 면역접합체로서, 여기서, 상기 약물은 MMAE이다.
- [0057] 특정 구현예에서, 면역접합체로서, 여기서, 상기 링커는 절단가능한 링커이다.
- [0058] 특정 구현예에서, ADC로서, 여기서, 상기 링커는 알록시아민-절단가능한 링커이다.
- [0059] 특정 구현예에서, 약제학적 제형은 청구항의 면역접합체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0060] 특정 구현예에서, 약제학적 제형은 추가의 치료학적 제제를 추가로 포함한다.
- [0061] 특정 구현예에서, 단리된 핵산 (cDNA)은 본원에 기재된 항체 또는 결합 단편을 암호화한다.
- [0062] 특정 구현예에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 항체 또는 결합 단편을 암호화하는 핵산을 포함한다.
- [0063] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 숙주 세포를 배양하여 항체가 생성되도록 함을 포함하는 항체를 생산하는

방법을 제공한다.

- [0064] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 하기를 포함하는 단계에 의해 생성되는 항체를 제공한다:
- [0065] (a) 각각 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 및 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택되는 L-CDR2, 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157, 및 177로부터 선택되는 L-CDR3의 서열을 갖는 3 VL 도메인 CDR을 암호화하는 핵산을 제공하는 단계;
- [0066] (b) 각각 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170로부터 선택되는 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151 및 171로부터 선택되는 H-CDR2, 및 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 172로부터 선택되는 H-CDR3의 서열을 갖는 3 VH 도메인 CDR을 암호화하는 핵산의 레퍼토리를 조합하는 단계로서, 상기 핵산은 3 VL 도메인 CDR을 암호화하여 3 VL 도메인을 암호화하는 핵산의 생성물 레퍼토리 및 3 VH 도메인 CDR의 레퍼토리를 제공하는, 단계;
- [0067] (c) 상기 생성물 레퍼토리의 핵산을 발현하는 단계;
- [0068] (d) SSEA4에 특이적으로 결합하고 상기 생성물 레퍼토리의 핵산으로부터 발현되는 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 단편을 선택하는 단계; 및
- [0069] (e) 상기 항원-결합 단편을 포함하는 항체를 생성하는 단계.
- [0070] 특정 구현예에서, 상기 본원의 개시내용은 SSEA4-양성 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 본원에 기재된 유효량의 약제학적 조성물을 투여함을 포함한다.
- [0071] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 SSEA4-양성 암이 뇌암, 폐암, 유방암, 경구암, 식도암, 위암, 간암, 담관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암 및 전립선암으로부터 선택되는 방법을 제공한다.
- [0072] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 조합된 추가의 치료학적 양상 또는 제제를 개체에게 투여함을 추가로 포함하는 방법을 제공한다.
- [0073] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 조합된 치료 양상이 치료학적 항체, 세포 치료요법, 방사선, 사이토킨, 및/또는 화학치료학적 제제로부터 선택되는 방법을 제공한다.
- [0074] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 SSEA4-양성 세포의 증식을 저해하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 항체/단편/ADC의, 탄수화물 항원을 발현하는 세포의 표면 상의 SSEA4로의 결합을 허용하는 조건하에서 본원에 기재된 바와 같은 약제학적 제형에 세포를 노출시켜 세포의 증식을 저해함을 포함한다.
- [0075] 특정 구현예에서, SSEA4-양성 암이 제1 치료학적 제제에 내성인, SSEA4-양성 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 개체에게 본원에 기재된 유효량의 약제학적 제형을 투여함을 포함한다.
- [0076] 특정 구현예에서, 상기 방법으로서, 여기서, SSEA4-양성 암은 뇌암, 폐암, 유방암, 경구암, 식도암, 위암, 간암, 담관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암 및/또는 전립선암이다.
- [0077] 특정 구현예에서, 상기 방법으로서, 여기서, 상기 제1 치료학적 제제는 SSEA4 이외의 다른 항원에 결합하는 제1 항체/결합 단편/ADC, 및/또는 방사선, 및/또는 화학치료학적 제제를 포함한다.
- [0078] 특정 구현예에서, 생물학적 샘플에서 SSEA4를 검출하는 방법은 항-SSEA4 항체의 천연적으로 존재하는 SSEA4로의 결합을 허용하는 조건하에서 상기 생물학적 샘플을 본원에 기재된 바와 같은 항-SSEA4 항체와 접촉시키고, 복합체가 상기 생물학적 샘플 중에서 상기 항-SSEA4 항체와 천연적으로 존재하는 SSEA4 간에 형성되는지를 검출함을 포함한다.
- [0079] 특정 구현예에서, 상기 방법으로서 여기서, 상기 생물학적 샘플은 암 샘플이다.
- [0080] 특정 양상에서, 본원의 개시내용은 (i) 표지된 항-SSEA4 항체를 탄수화물 항원 발현 중양을 갖는 대상체에게 투여하는 단계로서, 상기 표지된 항-SSEA4 항체가 본원에 기재된 항-SSEA4 항체를 포함하는, 단계 및 (ii) 대상체에서 표지된 항-SSEA4 항체를 검출하는 단계로서, 상기 표지된 항-SSEA4의 검출이 대상체에서 SSEA-4 양성 암을 지적하는 단계를 포함하는, SSEA4-양성 암을 검출하기 위한 방법을 제공한다.
- [0081] 특정 구현예에서, 상기 단리된 항체로서, 상기 항체는 10^{-7} M 미만의 친화성 상수로 SSEA4에 특이적으로 결합한다.

- [0082] 특정 구현예에서, 상기 단리된 항체로서, 상기 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4이다.
- [0083] 특정 구현예에서, 상기 단리된 항체로서, 상기 항체는 IgG1 λ , 또는 IgG1 κ 이다.
- [0084] 특정 구현예에서, 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부로서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 SSEA4에 결합하고, 상기 K_D 는 표면 플라즈몬 공명 (Biacore) 분석에 의해 측정된다..
- [0085] 특정 구현예에서, 단리된 항-SSEA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 결합 친화성은 < 50 nM이다.
- [0086] 본원의 개시내용은 본 발명의 양상/구현예 중 어느 하나에 따라 SSEA4에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 결합 단편에 관한 것이다. 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 표적 결합시 항체가 ADCC 유도 활성을 갖는, SSEA4에 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 결합 단편을 제공한다.
- [0087] 특정 구현예에 따라, 상기 항체는 모노클로날 항체이다.
- [0088] 특정 구현예에 따라, 상기 항체는 키메라 또는 인간화된 항체이다.
- [0089] 특정 구현예에 따라, 상기 항체는 이특이적 항체이다.
- [0090] 특정 구현예에 따라, 본 발명은 SSEA4에 선택적으로 결합하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 기재하였다. 상기 구현예에서, CAR은 가변 중쇄 (V_H) 및 가변 경쇄 (V_L)를 갖는 항원-결합 도메인을 포함할 수 있다.
- [0091] 하나의 양상에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 SSEA4에 대해 약 5, 10, 15, 20, 15, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250 나노-그램/mL의 EC_{50} 또는 ELISA 결합 검정에 의해 본원에 기재된 2개의 임의의 값들 사이의 값의 절반-최대 결합을 갖는다.
- [0092] 하나의 양상에서, 단리된 항-SSEA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 결합 친화성은 < 50 nM이다 (50 nM 미만). 특정 구현예에서, 결합 친화성은 < 5 , < 10 , < 15 , < 20 , < 25 , < 30 , < 35 , < 40 , < 45 , 또는 < 50 nM 범위일 수 있다.
- [0093] 본원의 개시내용의 하나의 구현예에 따라, 약제학적 조성물은 (1) 본원의 개시내용의 임의의 양상/구현예에 따른 치료학적 유효량의 항체 또는 항원 결합 단편, 및 임의로 (2) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0094] 하나의 양상에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 예시적 H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, 및 L-CDR3을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0095] 특정 구현예에서, 상기 약제학적 조성물은 암과 같은 과증식성 질환에 대한 치료에 유용하다. 예시적인 과증식성 질환은 예를 들어, 표 4에 열거된 종양 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0096] [표 4]
- [0097] **종양 세포주에서 글로보-시리즈 글리코스핑고지질의 발현**
- [0098] 글로보-시리즈 GSL의 발현은 유동 세포측정에 의해 결정하였다. 전체 세포 중 15% 초과가 유동 세포측정에서 양성인 세포주는 양성으로 표지한다.

Tumor origin	SSEA-4 ⁺	SSEA-3 ⁺	Globo H ⁺
Brain	12/17	9/17	6/17
Lung	13/20	5/20	13/20
Breast	17/23	6/23	14/23
Mouth	8/13	2/13	11/13
Esophagus	1/2	0/2	2/2
Stomach	4/6	3/6	6/6
Liver	6/10	4/10	9/10
Bile duct	2/5	1/5	3/5
Pancreas	8/8	3/8	6/8
Colon	5/7	0/7	6/7
Kidney	5/6	0/6	5/6
Cervix	3/4	2/4	1/4
Ovary	8/9	2/9	5/9
Prostate	4/4	1/4	1/4

[0099]

[0100]

Tumor origin: 종양 기원

[0101]

Brain: 뇌, Lung: 폐, Breast: 유방, Mouth: 입, Esophagus: 식도, Stomach: 위

[0102]

Liver: 간, Bile duct: 담관, Pancreas: 췌장, Colon: 결장, Kidney: 신장, Cervix: 자궁경관, Ovary: 난소, Prostate: 전립선

[0103]

표 4. 종양 세포주 상에서 글로보-시리즈 글리코스핑고지질 발현의 목록 뇌 종양 세포, 폐 종양 세포, 유방 종양 세포, 경구 종양 세포, 식도 종양 세포, 위 종양 세포, 간 종양 세포, 담관 종양 세포, 췌장 종양 세포, 결장 종양 세포, 신장 종양 세포, 자궁경관 세포, 난소 종양 세포, 전립선 종양 세포와 같은 많은 글로부-시리즈 글리코스핑고지질을 발현하는 다양한 종양 세포.

[0104]

특정 양상에서, 본원의 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 대표적인 약제학적 조성물을 대상체에게 투여함을 포함하고, 여기서, 투여된 항체는 상기 대상체에서 ADCC 또는 CDC 활성을 증진시킨다.

[0105]

특정 구현예에서, 제공된 방법은 뇌암, 폐암, 유방암, 경구암, 식도암, 위암, 간암, 담관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 골암, 피부암, 자궁경관암, 난소암 및 전립선암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 암을 치료한다.

[0106]

본원의 개시내용의 구현예에 따라, 방법은 항체를 포함하는 약제학적 조성물 및/또는 본원의 개시내용의 임의의 양상/구현예에 따른 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여함을 포함한다.

[0107]

특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 암을 진단하기 위한 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0108]

본원에 사용된 바와 같이 글리칸 및 관련 구조를 기재하기 위한 기호, 그래프 및 텍스트 명명법은 예를 들어, 문헌(참조: "*Symbols Nomenclatures for Glycan Representation*", Proteomics. 2009 December; 9(24): 5398-5399 by Ajit Varki et al)을 포함하는, 당업계에서 널리 확립되어 있고 이해된다.

도 1a-1f 1a: 대표적인 Ab6 항체 및/또는 결합 단편의 CDR 서열. 상기 CDR 서열은 각각 캐뱃, AbM, 초티아, 접촉, 및 IMGT 방법에 의해 정의된다. **도 1b:** CDR 변형을 갖는 항-SSEA4 항체의 입증. **도 1c:** 가변 도메인 변형을 갖는 항-SSEA4 항체의 입증. **도 1d.** 비-보존적 CDR 변형을 갖는 항-SSEA4 항체의 입증: hAb6-3, hAb6-3.1/2/3/4의 서열 정렬. **도 1e.** 보존적 CDR 변형을 갖는 항-SSEA4 항체의 입증: hAb6-3 및 hAb6-3.101/103/105/106/107/108/110의 서열 정렬.

도 2. 가변 도메인 내 6 또는 10개 아미노산 치환을 갖는 대표적인 인간화된 Ab6 서열. CDR 영역은 밑줄쳐져 있고 치환된 아미노산은 박스로 나타낸다.

도 3. chAb6 중쇄 가변 도메인의 캐뱃 번호.

도 4. chAb6 경쇄 가변 도메인의 캐뱃 번호.

도 5. 표면 플라즈몬 공명에 의한 예시적 키메라 및 인간화된 Ab6의 동력학적 결합 검정. hAb6-3.1, hAb6-3 및

chAb6의 항원 결합 친화성은 바이아코어 시스템 (Biacore system)을 사용하여 결정하였다. hAb6-3.1, hAb6-3 및 chAb6에 대해 계산된 Kd 값은 각각 23.1, 17.8 및 10.11 nM이다.

도 6a. ELISA에 의한 SSEA4에 대한 하나의 예시적 chAb6의 결합 친화성의 결정. 예시적 키메라 Ab6 (chAb6)은 용량-의존적 방식으로 SSEA4에 결합한다. SSEA4에 대한 chAb6의 결합 EC₅₀은 50 ng/mL이다.

도 6b. ELISA에 의한 SSEA4에 대한 다른 예시적 키메라 및 인간화된 Ab6의 결합 친화성의 결정. 용량-의존적 방식으로 SSEA4에 결합된 예시적 키메라 및 인간화된 Ab6. SSEA4에 대한 chAb6, hAb6-3 및 hAb6-3.1의 결합 EC₅₀은 각각 약 106, 125 및 98 ng/mL이다.

도 6c-6d. 도 6c는 비-보존적으로 변형된 아미노산 치환의 결합 친화성의 입증을 나타낸다. **도 6d**는 보존적으로 변형된 아미노산 치환의 결합 친화성의 입증을 나타낸다.

도 7. 글리칸 어레이 분석에 의한 SSEA4에 대한 예시적 chAb6의 결합 특이성. 다양한 올리고사카라이드에 대한 chAb6의 결합 특이성을 조사하였고 상기 결과는 chAb6가 SSEA4 (스팟 A) 및 SSEA4 유사체 SSEA4 Gc (SSEA4의 아민 그룹 상에 Gc 치환된 시알산, 스팟 B)에 결합함을 지적했다.

도 8a-8b. chAb6 및 인간화된 Ab6의 유방암 세포주로의 결합. 유동 세포측정 분석에 의한 (**도 8a**) MDA-MB-231 및 (**도 8b**) MCF-7에 결합하는 chAb6, hAb6s (hAb6-2, hAb6-3)의 특징 분석.

도 9a-9b: 예시적 chAb6 및 인간화된 Ab6의 유방암 세포주로의 결합. chAb6, hAb6-2 및 hAb6-3의 (**도 9a**) MDA-MB-231 및 (**도 9b**) MCF7 세포로의 결합은 유동 세포측정 분석에 의해 조사하였다. 염색을 위해 사용되는 항체 농도는 밀리리터 당 1 마이크로그램이다.

도 10a-10b. 유동 세포측정 분석에 의한 체장암 세포주 HPLC에 대한 예시적 chAb6의 결합 친화성의 결정. (**도 10a**) 예시적 키메라 Ab6 (chAb6, 20 µg/mL)은 (**도 10b**에 보여지는 바와 같이) 용량 의존적 방식으로 SSEA4의 고발현 수준을 갖는 예시적 체장 종양 세포주인 HPAC에 결합한다. HPAC 세포에 대한 결합 EC₅₀은 약 4 µg/mL이다.

도 11a-11b: 예시적 키메라 및 인간화된 Ab6의 유방 및 체장암 세포주로의 결합. chAb6, hAb6-3 및 hAb6-3.1의 (11a) MDA-MB-231 및 (11b) HPAC 세포로의 결합은 유동 세포측정 분석에 의해 조사하였다. 염색을 위해 사용되는 항체 농도는 밀리리터 당 5 마이크로그램이다.

도 11c-도 11d. 도 11c는 비-보존성 CDR 변형을 갖는 예시적 인간화된 Ab6의 MDA-MB-231 세포주로의 결합 입증이다. **도 11d**는 비-보존성 CDR 변형을 갖는 예시적 인간화된 Ab6의 MCF7 세포주로의 결합 입증이다.

도 11e-도 11f. 도 11e는 보존성 CDR 변형을 갖는 예시적 인간화된 Ab6의 MDA-MB-231 세포주로의 결합 입증이다. **도 11f**는 보존성 CDR 변형을 갖는 예시적 인간화된 Ab6의 MCF7 세포주로의 결합 입증이다

도 12. 체장 종양 세포주 HPAC에 대한 예시적 chAb6의 ADCC 활성의 입증. 대표적인 chAb6은 ADCC가 용량-의존적 방식으로 HPAC 세포를 사멸시키도록 유도한다. EC₅₀은 5 ng/mL이다. 인간 IgG1, 카파 (hIgG1, 카파)는 대조군으로서 사용한다.

도 13. MDA-MB-231 세포에 대한 예시적 chAb6 및 인간화된 Ab6의 ADCC 활성. 예시적 chAb6, hAb6들은 용량-의존성 방식으로 ADCC가 MDA-MB-231 세포를 사멸시키도록 매개한다. EC₅₀은 chAb6 및 hAb6들 각각에 대해 약 5 ng/mL 및 10 ng/mL이다.

도 14a-14b: 유방암 세포주 상의 예시적 인간화된 Ab6들의 ADCC 활성. 예시적 hAb6-3 및 예시적 hAb6-3.1 둘 다는 ADCC가 용량-의존적 방식으로 (**도 14a**) MDA-MB-231 및 (**도 14b**) MCF7 세포를 사멸시키도록 매개하였다. 본 연구에서, hAb6-3-매개된 ADCC가 MDA-MB-231 및 MCF7을 사멸시키는 EC₅₀은 각각 39.2 및 39.5 ng/mL였다. hAb6-3.1-매개된 ADCC가 MDA-MB-231 및 MCF7을 사멸시키기 위해 각각 32.6 및 38.9 ng/mL였다.

도 15a-15b. 15a: HPAC 세포에 대한 예시적 chAb6의 CDC 활성의 입증. 대표적인 chAb6은 CDC가 용량-의존적 방식으로 HPAC 세포를 사멸시키도록 유도한다. EC₅₀은 3 µg/mL이다. 인간 IgG1, 카파 (hIgG1, k)는 본 연구에서 음성 대조군으로서 사용한다. **15b: 유방암 세포주에 대한 예시적 인간화된 Ab6들의 CDC 활성의 입증.** 예시적 인간화된 항-SSEA4 항체 hAb6-3 and hAb6-3.1은 CDC가 용량 의존적 방식으로 MCF7 세포를 사멸시키도록 유도하

였다. EC₅₀은 hAb6-3 및 hAb6-3.1에 대해 각각 약 4.4 및 약 2.6 μg/mL이다.

도 16a-16b. HPAC 이종이식체 모델에서 대표적인 항-SSEA4 항체의 생체내 항종양 효능의 입증. 비히클 대조군 그룹과 비교하여, 종양의 성장은 마우스에서 항-SSEA4 항체 처리로 상당히 억제된다. 더욱이, 도에 나타난 바와 같이, chAb6으로 처리된 마우스에서 평균 종양 용적(도 16a) 및 중량(도 16b)은 hMC41로 처리된 것들 보다 유의적으로 작았고, 이는 상기 예시적 chAb6이 예상치 않게 놀라운 생체내 항-종양 활성을 가짐을 입증한다.

도 17. MDA-MB-231 오르토평 모델에서 예시적 인간화된 Ab6들의 생체내 항종양 효능의 입증. 생체내 종양 성장은 대조군 그룹 (비히클 및 헤르셉틴)과 비교하여 예시적 항-SSEA4 항체 hAb6-3 및 hAb6-3.1을 사용하여 종양-함유 마우스를 치료함에 의해 상당히 억제되었다. 헤르셉틴은 본 연구에서 대조군 항체로서 사용하였다.

도 18: 예시적 인간화된 Ab6 MCF7 오르토평 모델의 생체내 항종양 효능의 입증. 비히클 대조군 치료와 비교하여, 종양의 성장은 hAb6-3.1의 치료하에 용량 의존적 방식으로 상당히 억제되었다.

도 19. 진단학적 용도의 입증: 예시적 chAb6을 사용한 종양 조직에서 SSEA4 발현의 검출. 면역-조직화학 염색의 결과는 chAb6이 종양 샘플 중 SSEA4 발현을 검출하기 위해 적용될 수 있음을 보여주었다.

도 20. SDS-PAGE에 의한 당가공된 hAb6-3.1의 특징 분석. 레인 1, 포유동물 세포로부터 제조된 본래의 항체; 레인 2, 모노-GlcNAc를 갖는 항체; 레인 3-4, 30분 및 60분 후 생성된 글리오-가공된 hAb6-3.1; 레인 5, 정제된 당-가공된 항체.

도 21. 세포 유동 측정에 의한 당가공된 hAb6-3.1의 결합 성질. 당-가공된 항체 (적색선)는 SSEA4-발현 세포주 MDA-MB-231에 대해 본래의 항체 (청색선)와 유사한 결합 성질을 나타낸다. 상기 결과는 당가공이 hAb6-3.1의 항원 결합 성질에 영향을 미치지 않음을 지적했다.

도 22. Fc 감마 수용체 IIIA 결합. hAb6-3.1의 Fc 감마 수용체 IIIA로의 결합 (EC50)은 당가공에 의해 급격히 증진되었다. 본래의 항체 및 당-가공된 항체에 대한 EC50은 각각 0.84 및 0.047 μg (마이크로그램)/mL이다.

도 23. MDA-MB-231 세포에 대한 본래의 것 및 당-가공된 hAb6-3.1의 ADCC 활성. 본래의 것 및 당-가공된 hAb6-3.1은 ADCC가 용량-의존적 방식으로 MDA-MB-231 세포를 사멸시키도록 매개하였다. hAb6-3.1의 ADCC 활성은 당가공에 의해 유의적으로 개선되었다. 본래의 것 및 당-가공된 hAb6-3.1의 EC50은 각각 약 50.29 및 약 6.02 ng/mL였다.

도 24a. ADC 형성을 위한 Fc 글리칸상으로 약물의 옥스민 연결. **도 24b**는 ADC 복합체 형성의 SDS-PAGE 프로파일이다. 레인 1: 마커, 레인 2: hAb6-3.1의 케톤 태그된, 레인 3: hAb6-3.1-A01.

도 25a 및 25b. 도 25a는 유동 세포측정에 의한 hAb6-3.1-A01의 SSEA4-발현 세포로의 결합 능력이다. SSEA4-발현 세포주 MCF7 및 SKOV3은 PBS로 세척하였고 1x10⁵의 세포는 1시간 동안 병상에서 FACS 완충액 (2 % FBS 및 0.1 % NaN₃을 함유하는 PBS) 중에서 10 ug/mL의 hAb6-3.1 또는 hAb6-3.1-A01로 항온처리하였다. PBS로 세척 후, 세포는 Alexa-Fluor 488 표지된 항-인간 IgG 항체로 염색시키고 0.5시간 동안 병상에서 항온처리하였다. 항체의 세포 결합을 위한 신호는 유동 세포측정에 의해 검출하였다(도 XX11AB). 상기 결과는 SSEA4-발현 세포에 대한 hAb6-3.1-A01의 결합 성질이 모 항체 hAb6-3.1과 유사함을 지적하였다. **도 25b**는 hAb6-3.1 및 hAb6-3.1-A01의 세포 결합 성질의 비교이다.

도 26. SSEA4-발현 유방암 세포주 MCF7에 대한 세포 독성에서 hAb6-3.1-A01과 항체 hAb6-3.1의 효능 비교.

도 27. SSEA4-발현 난소 세포주 SKOV3에 대한 세포 독성에서 hAb6-A01-A01과 항체 hAb6-3.1의 효능 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0109] 따라서, 광범위한 암을 진단하고 치료하는데 사용하기 위한 마커에 지시된 항체 방법 및 조성물이 제공된다. 항-SSEA4 항체가 개발되었고 본원에 기재된다. 사용 방법은 제한 없이 암 치료요법 및 진단제를 포함한다. 본원에 기재된 항체는 광범위한 SSEA4-발현 종양 세포에 결합함으로써 암 진단 및 치료를 촉진시킬 수 있다. 항체에 의해 표적화될 수 있는 세포는 뇌암, 폐암, 유방암, 경구암, 식도암, 위암, 간암, 담관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 자궁경관암, 난소암, 전립선암 등에서의 것들과 같은 암종을 포함한다.

[0110] 정의

[0111] 본원에서 달리 정의되지 않는 경우, 본원에서 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이

해되고 사용되는 의미를 갖는다. 이와 관련하여 달리 요구되지 않는 경우, 단수의 용어는 동일한 것의 복수 형태를 포함하고 복수의 용어는 단수의 형태를 포함하는 것으로 이해된다. 구체적으로, 본원에 사용된 바와 같이 단수 형태 "a" 및 "an"은 명백히 다르게 언급되지 않는 경우 복수의 언급을 포함한다. 또한, 본원 및 청구항에 사용된 바와 같은 용어 "적어도 하나" 및 "하나 이상"은 동일한 의미를 갖고 1개, 2개, 3개 이상을 포함한다.

[0112] 본 발명의 광범위하게 제시된 수치 범위 및 파라미터가 대략적인 것임에도 불구하고, 특정 실시예에서 제시된 수치 값은 가능한 정확하게 보고된다. 그러나, 임의의 수치 값은 고유하게 각각의 시험 측정에서 발견되는 표준 편차로부터 필수적으로 비롯되는 특정 오차를 함유한다. 또한, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 일반적으로 소정의 값 또는 범위의 10%, 5%, 1%, 또는 0.5% 이내를 의미한다. 대안적으로, 용어 "약"은 당업자에 의해 고려되는 경우 평균의 허용되는 표준 오차내를 의미한다. 작동/작업 실시예 외에, 또는 달리 명백하게 특정되지 않는 경우, 본원에 기재된 물질의 양, 지속 시간, 온도, 작동 조건, 양의 비율 등에 대한 것들과 같은 모든 수치 범위, 양, 값 및 퍼센트는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 변형된 것으로서 이해되어야만 한다. 따라서, 반대로 지적되지 않는 경우, 본원 및 첨부된 청구항에 제시된 수치적 파라미터는 목적하는 바와 같이 다양할 수 있는 근사치이다. 매우 적어도, 각각의 수치 파라미터는 적어도 보고된 유의적 디지털(digit)의 수의 측면에서 및 통상의 라운딩 기술을 적용함에 의해 해석되어야만 한다.

[0113] 달리 특정되지 않는 경우, 표준 용법 및 협의에 따라, 본원에 사용된 폴리뉴클레오타이드 표기법에서, 좌측 방향은 5'-말단이고 우측 방향은 3'-말단이고; 본원에 사용된 펩타이드 표기법에서, 좌측 방향은 표준 아미노 말단(N-말단) 방향이고 우측 방향은 카복실 말단(C-말단) 방향이다.

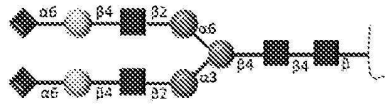
[0114] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 언급하고 DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다.

[0115] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 일반적으로 짧은 단일 가닥, 일반적으로 필연적으로는 아니지만 약 200 미만의 뉴클레오타이드 길이인 합성 폴리뉴클레오타이드를 언급한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 상기 기재는 균등하게 및 완전하게 올리고뉴클레오타이드에 적용될 수 있다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "벡터"는 이것이 연결되는 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 언급한다. 한가지 유형의 벡터는 추가의 DNA 분절이 연결될 수 있는 환형 이중가닥 DNA 루프를 언급하는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 파아지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이고, 여기서, 추가의 DNA 분절은 바이러스 게놈으로 연결될 수 있다. 특정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다(예를 들어, 세균 복제 오리진을 갖는 세균 벡터 및 에피솜성 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜성 포유동물 벡터)는 숙주 세포로의 도입시 숙주 세포의 게놈으로 통합될 수 있고 이로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 이들이 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 단순히 "재조합 벡터")로서 언급된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 사용되는 발현 벡터는 흔히 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 흔하게 사용되는 벡터 형태이기 때문에 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0117] 용어 "글리칸"은 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드를 언급한다. 글리칸은 또한 본원에서 당단백질, 당지질, 당펩타이드, 당프로테옴, 펩티도글리칸, 리포폴리사카라이드 또는 프로테오글리칸과 같은 당접합체의 탄수화물 부분을 언급하기 위해 사용된다. 글리칸은 일반적으로 모노사카라이드 사이에 유일하게 O-글리코시드 연결로 이루어진다. 글리칸은 모노사카라이드 잔기의 동종 또는 이종중합체일 수 있고 직쇄 또는 측쇄일 수 있다. 글리칸은 당단백질 및 프로테오글리칸에서와 같이 단백질에 부착되어 있는 것으로 발견될 수 있다. 이들은 일반적으로 세포의 외부 표면 상에서 발견된다. O- 및 N-연결된 글리칸은 진핵 세포에서 매우 통상적이지만 또한 덜 통상적이지만 원핵 세포에서 발견될 수 있다. N-연결된 글리칸은 연속서열에서 아스파라긴의 R-그룹 질소(N)에 부착되어 있는 것으로 밝혀졌다. 연속 서열은 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr 서열이고, 여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다.

[0118] 용어 "범용 글리칸"은 글리칸 서열 $Si_2(a2-6)Ga_1G1cNAc_2Man_3G1cNAc_2$ 를 언급한다.



[0119] 상기 구조는 이고, 여기서, 는 시알산(Sia)이고; 는 갈락토스 (Gal)이고; 는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이고; 는 만노스(Man)이다.

[0120] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원"은 면역 반응을 유발할 수 있는 물질로서 정의된다. 상기 면역 반응은 항체 생성, 또는 특이적 면역학적 적격 세포의 활성화, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.

[0121] 용어 "에피토프"는 면역글로불린 V_H/V_L 쌍에 의해 통상적으로 결합되는 구조 단위를 언급한다. 에피토프는 항체에 대한 최소 결합 부위를 한정하고, 따라서 항체 특이성의 표적을 나타낸다.

[0122] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "면역원"은 항체의 생성을 유도할 수 있는 항원을 언급한다.

[0123] 본원에 사용된 바와 같은 용어는 "면역원성"은 일반적으로 면역원 또는 항원이 면역반응을 자극하는 능력을 언급한다.

[0124] 용어 "백신"은 항원을 함유하는 제제를 언급하고, 이는 유기체가 유발하는 질환에 대한 면역력을 부여하기 위해 사용되는, 전체 질환-유발 유기체 (사멸되거나 약화된) 또는 상기 유기체의 성분들, 예를 들어, 단백질, 펩타이드, 또는 폴리사카라이드로 이루어진다. 백신 제제는 천연, 합성 또는 재조합 DNA 기술에 의해 유래된 것일 수 있다.

[0125] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원-특이적"은 특정 항원 또는 항원의 단편의 공급이 특이적 세포 증식을 유도하는 세포 집단의 성질을 언급한다.

[0126] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "특이적으로 결합하는"은 결합 쌍 (예를 들어, 항체 및 항원) 간의 상호작용을 언급한다. 다양한 경우에, 특이적으로 결합하는은 약 10⁻⁶ 몰/리터, 약 10⁻⁷ 몰/리터, 또는 약 10⁻⁸ 몰/리터 이하의 친화성 상수에 의해 구현될 수 있다. 추가의 또는 대안적 구현예에서, 항체의 이들의 각각의 항원으로서의 결합은 항체 특이성과 관련하여 특이적인 것으로 언급된다. 여기서 용어 "특이적"은 일반적으로 결합 쌍의 하나의 구성원이 특이적 결합 파트너(들) 이외의 다른 분자로의 임의의 유의적 결합을 보여주지 않는 상황을 언급하기 위해 사용되고, 예를 들어, 본원에 특정된 것들 이외의 임의의 다른 분자와 약 30%, 바람직하게 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1 % 미만의 교차-반응성을 갖는다.

[0127] 용어 "결합 친화성"은 일반적으로 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 간의 전체 총합의 비공유 상호작용의 강도를 언급한다. 달리 지적되지 않는 경우, 본원에 사용된 바와 같은, "결합 친화성"은 고유 결합 친화성을 언급하고, 이는 결합 쌍 (예를 들어, 항체 및 항원)의 구성원 간의 1:1 상호작용을 반영한다. 이의 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로 해리 상수 (K_d)로 나타낼 수 있다. 친화성은 본원에 기재된 것들을 포함하는, 당업계에서 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 낮은-친화성 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하고 용이하게 해리하는 경향이 있는 반면 고-친화성 항체는 일반적으로 항원에 보다 신속하게 결합하고 보다 길게 결합되어 잔류하는 경향이 있다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법은 당업계에 공지되어 있고, 이의 임의의 방법은 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0128] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "해리 상수(K_d)"는 복합체가 이의 성분 분자로 해체되는 경우에서와 같이 보다 큰 대상이 보다 작은 성분들로 가역적으로 해리되는 경향을 측정하는 특정 유형의 평형 상수이다. 반응 A_xB_y ⇌ xA + yB에 대해, 해리 상수는 K_d = [A]^x[B]^y/[A_xB_y]로 정의되고, 여기서, [A], [B], 및 [A_xB_y]는 각각 A, B, 및 A_xB_y의 농도이다. 특히, K_d 값은 바이오코어 표면 플라즈몬 공명 시스템 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정된다.

[0129] 본원에 사용된 바와 같은, "SSEA4에 특이적으로 결합하는 항체는 SSEA4에 1×10⁻⁷ M 이하, 보다 바람직하게 5×10⁻⁸ M 이하, 보다 바람직하게 1×10⁻⁸ M 이하, 보다 바람직하게 5×10⁻⁹ M 이하의 K_d로 결합하거나 SSEA-4에 1×10⁻⁸ M 내지 1×10⁻¹⁰ M 이하의 K_d로 결합하는 항체를 언급하는 것으로 의도된다.

- [0130] 본원에 사용된 바와 같은 용어 K_{assoc} 또는 " K_a "는 특정 항체-항원 상호작용의 결합율을 언급하는 것으로 의도되는 반면 본원에 사용된 바와 같은 용어 " K_{dis} " 또는 " K_d "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리율을 언급하는 것으로 의도된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 " K_D "는 해리 상수를 언급하는 것으로 의도되고, 이는 K_d 대 K_a (즉, K_d/K_a)의 비율로부터 수득되고 몰 농도 (M)로서 표현된다. 항체에 대한 K_D 값은 당업계에서 널리 확립된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 항체의 K_D 를 결정하기 위한 바람직한 방법은 표면 플라즈몬 공명을 사용하여, 바람직하게는 Biacore® 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하는 것이다.
- [0131] 본원에 사용된 바와 같은 IgG 항체에 대한 용어 "고친화성"은 특정 항원에 대해 10^{-8} M 이하, 보다 바람직하게는 10^{-9} M 이하 및 보다 더 바람직하게는 10^{-10} M 이하의 K_D 를 갖는 항체를 언급한다. 그러나, "고친화성" 결합은 다른 항체 이소형에 대해 다양할 수 있다. 예를 들어, IgM 이소형에 대한 "고친화성" 결합은 10^{-7} M 이하, 보다 바람직하게는 10^{-8} M 이하 및 보다 더 바람직하게는 10^{-9} M 이하의 K_D 를 갖는 항체를 언급한다.
- [0132] 용어 "최대 절반 유효 농도(EC_{50})"는 특정 노출 시간 후 기준선과 최대 값 사이의 중간 반응을 유도하는 약물, 항체 또는 독물의 농도를 언급한다. 이것은 약물의 효능의 척도로서 사용된다.
- [0133] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 광범위의 의미에서 상호교환적으로 사용되고 모노클로날 항체(예를 들어, 전장 또는 온전한 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 1가, 다가 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이특이적 항체)를 포함하고 또한 특정 항체 단편을 포함할 수 있다. 대부분의 항체는 동일한 구조적 특징을 갖는 당단백질이다: 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄. 경쇄는 가변 도메인 (V_L) 및 불변 도메인 (C_L)을 포함하고; 중쇄는 가변 도메인 (V_H) 및 3개의 불변 도메인 (총체적으로 C_H 로서 언급되는 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3})을 포함한다. 경쇄 (V_L) 및 중쇄(V_H) 둘 다의 가변 영역은 항원에 대한 결합 인지 및 특이성을 결정한다. V_H 및 V_L 영역은 추가로 골격 영역 (FR)으로 호칭되는 보다 보존된 영역과 상호 배치되어 있는 초가변 영역 (HVR)으로 호칭되는 초가변성 영역으로 세분될 수 있다. 경쇄 (C_L) 및 중쇄 (C_H)의 불변 영역 도메인은 항체 쇄 결합, 분비, 트랜스-태반 이동, 보체 결합 및 Fc 수용체 (FcR)로의 결합과 같은 중요한 생물학적 성질을 부여한다. 이들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 의존하여, 항체는 상이한 부류로 할당될 수 있다. 5개 주요 부류의 면역글로불린이 있다: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 및 이들 중 여러개는 아부류(이소형), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2로 추가로 세분될 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 이다. 상이한 부류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 구성은 널리 공지되어 있고 일반적으로 예르 들어, 문헌(Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (2000))에 기재되어 있다. 항체는 항체와 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩타이드의 공유 또는 비-공유 결합에 의해 형성되는 보다 큰 융합 분자의 일부일 수 있다. 항체는 키메라, 인간, 인간화된 및/또는 친화성 성숙화된 것일 수 있다.
- [0134] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 호칭되는 2개의 별개의 유형 중 하나에 할당될 수 있다. 하나의 구현예에서, 쇄는 카파 유형이다. 또 다른 구현예에서, 쇄는 람다 유형이다.
- [0135] 본원에 사용된 바와 같은 "가변 도메인"은 초가변 영역 (HVR), 및 골격 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄의 일부를 언급한다. 본원에 기재된 방법에 따라, HVR 및 FR에 할당되는 아미노산 위치는 캐벳 (문헌참조: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)에 따라 정의될 수 있다. 항체 또는 항체 결합 단편의 아미노산 넘버링은 또한 캐벳에 따른다.
- [0136] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "캐벳에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "캐벳에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 이의 변형은 문헌(참조: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))에서 항체 집단 (compilation)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 언급한다. 상기 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 이것으로의 삽입

에 상응하는 보다 적거나 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52번 이후 단일 아미노산 삽입체 (캐뱃에 따라 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82번 후 삽입된 잔기 (캐뱃에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 캐뱃 넘버링은 표준 캐뱃 넘버링된 서열과 항체의 서열 상동성 영역에서 정렬시킴에 의해 소정의 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0137] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "골격 영역" (FR) 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기이다.

[0138] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "초가변 영역" (HVR 또는 HV) 및 "상보성-결정 영역" (CDR)은 상호교환적으로 사용되고, 본원에서 사용되는 경우 서열 내 초가변적이고/이거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인 영역을 언급한다. 일반적으로, 항체는 6개 초가변 영역; V_H 내 3개(H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3), 및 V_L 내 3개 (L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3)를 포함한다. 다수의 초가변 영역 기술 방식이 사용 중에 있고 본원에 포함된다. 상기 캐뱃 상보성 결정 영역(CDR)은 서열 가변성을 기준으로 하고 가장 통상적으로 사용되고 있다(문헌참조: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia refers instead to the location of the structural loops (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). AbM 초가변 영역은 캐뱃 CDR과 초티아 구조적 루프 사이의 절충 영역을 나타내고 소프트웨어 (Oxford Molecular's AbM antibody modeling software)에 의해 사용된다. "접촉" 초가변 영역은 가용한 복합체 결정 구조의 분석을 기반으로 한다. "IMGT" (the international ImMunoGeneTics information system)는 면역글로불린 및 T 세포 수용체 가변 도메인 및 Ig 슈퍼패밀리 V형 도메인을 제공한다. 캐뱃, AbM, 초티아 및 접촉에 의해 정의되는 이들 초가변 영역 각각으로부터의 잔기는 하기에 나타내고; IMGT는 웹사이트 상에서 예측된다: <http://www.imgt.org/>

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24 -- L34	L24 -- L34	L24 -- L34	L30 -- L36
L2	L50 -- L56	L50 -- L56	L50 -- L56	L46 -- L55
L3	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L96
H1	H31 -- H35B	H26 -- H35B	H26 -- H32, .34	H30 -- H35B
	(Kabat Numbering)			
H1	H31 -- H35	H26 -- H35	H26 -- H32	H30 -- H35
	(Chothia Numbering)			
H2	H50 -- H65	H50 -- H58	H52 -- H56	H47 -- H58
H3	H95 -- H102	H95 -- H102	H95 -- H102	H93 -- H101

[0139]

[0140] Loop: 루프, Kabat: 캐뱃, Chothia: 초티아, Contact: 접촉

[0141] Numbering: 넘버링

[0142] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "전장 항체", "온전한 항체" 및 "전체 항체"는 하기 정의된 바와 같이 항체 단편이 아닌 이의 실질적으로 온전한 형태의 항체를 언급한다. 특히 상기 용어는 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 언급한다.

[0143] 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 단지 일부를 포함하고, 여기서, 상기 일부는 온전한 항체에 존재하는 경우 상기 일부와 정상적으로 관련된 기능들 중 적어도 하나 및 가능한한 많이 또는 전부를 보유한다. 하나의 구현예에서, 항체 단편은 온전한 항체의 항원 결합 부위를 포함하고 따라서 항원과 결합하는 능력을 보유한다. 또 다른 구현예에서, 항체 단편, 예를 들어, Fc 영역을 포함하는 하나는 온전한 항체에 존재하는 경우 Fc 영역과 정상적으로 관련된 생물학적 기능, 예를 들어, FcRn 결합, 항체 반감기 조절, ADCC 기능 및 보체 결합 중 적어도 하나를 보유한다. 하나의 구현예에서, 항체 단편은 온전한 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 상기 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암을 포함할 수 있다.

[0144] 본원에 사용된 바와 같은, 본원에서 용어 "Fc 영역"은 본래의 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는, 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 한정하기 위해 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 Cys226 위치에서의 아미노산 잔기로부터 또는 Pro230 잔기로부터 이의 카복시-말단까지 이르는 것으로 정의된다. Fc 영역의 C-말단 라이신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)

은 예를 들어, 항체의 생성 또는 정제 동안에 또는 항체의 중쇄를 암호화하는 핵산을 재조합 가공함에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 온전한 항체의 조성물은 모든 K447 잔기들이 제거된 항체 집단, 어떠한 K447 잔기들도 제거되지 않은 항체 집단 및 K447 잔기가 존재하고 부재인 항체들의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 본 발명의 항체에 사용하기 위한 적합한 본래의 서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0145] 본원에 사용된 바와 같이, 상기 용어 "Fv 영역"은 완전한 항원-인지 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 2개-쇄 Fv 중에서, 상기 영역은 단단히 비-공유 연합된 하나의 중쇄- 및 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 단일쇄 Fv 중에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은 유연한 펩타이드 링커에 의해 공유적으로 연결될 수 있어 경쇄 및 중쇄는 2개의 쇠 Fv 종에서의 것과 유사한 "이량체성" 구조로 연합될 수 있다. 상기 구성에서 각각의 가변 도메인의 CDR은 상호작용하여 V_H - V_L 이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 한정한다. 총체적으로, 6개 CDR은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 CDR을 포함하는 Fv의 절반)도 전체 결합 부위 보다는 낮은 친화성이지만 항원을 인지하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0146] 본원에 사용된 바와 같은, 상기 용어 "Fab 단편"은 Fv 영역, 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_{H1})을 함유한다. Fab' 단편은 항체의 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 C_{H1} 도메인의 카복시 말단에 몇개의 잔기들이 첨가됨에 의해 Fab 단편과는 상이하다.

[0147] 용어 "항원-결합 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 전장 또는 하나 이상의 단편을 언급한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 용어 "항원-결합 단편" 내에 포함되는 결합 단편의 예는 Fab 단편; Fv 단편; 단일쇄 Fv (scFv) 단편; 디아바디; 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올 그룹을 함유하는 Fab'에 대해 본원에서 지정된 Fab'-SH 단편; 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab)_2$ 단편; V_H 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 Fd 단편; V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward et al., 1989 *Nature* 341 :544-546); 유연한 링커 펩타이드에 의해 연결된 2개의 상이한 디설파이드-안정화된 Fv 항체 단편인 dsFv 단편; 및 분리된 상보성 결정 영역 (CDR); 또는 상기 항원-결합 단편을 포함하는 임의의 융합 단백질질을 포함한다.

[0148] 용어 "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하고, 여기서, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 쇠에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 V_H 및 V_L 도메인 간의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해 문헌 (Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994))을 참조한다.

[0149] 용어 "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 언급하고, 이러한 단편은 동일한 폴리펩타이드 쇠 (V_H - V_L)에서 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 동일한 쇠 상에서 2개의 도메인 사이에 쌍 형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함에 의해, 상기 도메인은 또 다른 쇠의 상보성 도메인과 쌍을 형성하고 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강제된다. 디아바디는 예를 들어, 문헌(EP 404,097; WO93/1161; and Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 6444-6448 (1993))에 보다 완전하게 기재되어 있다.

[0150] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체 (mAb)"는 실질적으로 균질의 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 언급하고, 예를 들어, 상기 집단을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연적으로 존재하는 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 별개의 항체들의 혼합물이 아닌 것으로서 항체의 특징을 지적한다. 상기 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 여기서, 상기 표적-결합 폴리펩타이드 서열은 다수의 폴리펩타이드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩타이드 서열의 선택을 포함하는 공정에 의해 수득되었다. 예를 들어, 선택 공정은 하이브리도마 클론, 파아지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀과 같은 다수의 클론으로부터 특유한 클론의 선택일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열이 예를 들어, 표적에 대한 친화성을 개선시키고, 표적 결합 서열을 인간화시키고, 세포 배양물에서 이의 생성을 개선시키고, 생체내 면역원성을 감소시키고, 다중특이적 항체를 생성하는 등의 것을 위해 변형될 수 있고 변형된 표적 결합 서열을 포함하는 항체는 또한 본 발명의 모노클로날 항체인 것으로 이해되어야만 한다. 상이한 에피토프에 대해 지시된 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로,

모노클로날 항체의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 에피토프에 대해 지시된다. 이들의 특이성에 추가로, 모노클로날 항체 제제는 이들이 전형적으로 다른 면역글로불린에 의해 오염되어 있지 않다는 점에서 유리하다. 수식이 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균일한 집단의 항체들로부터 수득된 것으로서의 항체의 특징을 지적하고 임의의 특정 방법에 의해 항체의 생성을 요구하는 것으로서 해석되지 말아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 예를 들어, 하이브리도마 방법을 포함하는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다[문헌참조: 예를 들어, Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), 재조합 DNA 방법 (문헌참조: 예를 들어, U.S. Pat. No. 4,816,567), 파아지 디스플레이 기술(문헌참조: 예를 들어, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)), 인간 면역글로불린 서열을 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자좌 또는 유전자들의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간형 항체를 제조하기 위한 기술(문헌참조: 예를 들어, WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); U.S. Pat. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks et al., *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) and Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)].

[0151] 용어 "키메라 항체"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇠(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체내 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이다. 특히, 본 발명에서 키메라 항체는 인간화된 항체일 수 있고, 여기서, 비-인간 항체의 상기 항원 결합 서열/가변 도메인은 인간 항체 골격 영역 상으로 접목하였다. 상기 항체는 목적하는 생물학적 활성을 나타낸다(문헌참조: 미국 특허 No. 4,816,567; and Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

[0152] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간화된 항체"는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 하나의 구현예에서, 인간화된 항체는 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이고, 여기서, 상기 수용자의 추가 변 영역으로부터의 잔기들은 목적하는 특이성, 친화성 및/또는 능력을 갖는, 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 추가 변 영역으로부터의 잔기들로 대체된다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 골격 영역 잔기들은 상응하는 비-인간 잔기들로 대체된다. 추가로, 인간화된 항체는 수용자 항체에서 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기들을 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체를 추가로 개조하기 위해 만들어진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 모두 적어도 하나 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 포함하고, 여기서, 모든 또는 실질적으로 모든 추가 변 루프는 비-인간 면역글로불린의 것들에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열을 갖는 것들이다. 인간화된 항체는 임의로 또한 면역글로불린 불변영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함한다. 추가의 세부사항을 위해, 다음 문헌을 참조한다: Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). 또한 여기에 인용된 하기의 논문 및 참조문헌을 검토한다: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

[0153] 용어 "인간 항체"는 인간에 의해 생성되는 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 소유하고/하거나 본원에 기재된 바와 같이 인간 항체를 제조하기 위한 임의의 기술을 사용하여 제조된 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의는 구체적으로 비-인간 항원 결합 잔기들을 포함하는 인간화된 항체를 제외한다.

[0154] "친화성 성숙화된 항체"는 변형(들)을 소유하지 않는 모 항체와 비교하여, 항원에 대한 항체의 친화성을 개선시키는 하나 이상의 HVR에서 하나 이상의 변형을 갖는 항체이다. 하나의 구현예에서, 친화성 성숙화된 항체는 표적 항원에 대해 나노-몰 또는 심지어 피코-몰 친화성을 갖는다. 친화성 성숙화된 항체는 당업계에 공지된 과정에 의해 제조된다. (문헌참조: Marks et al. *BioTechnology* 10:779-783 (1992) describes affinity maturation by V_H and V_L domain shuffling. Random mutagenesis of CDR and/or framework residues is described by: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995);

Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)).

- [0155] "단리된 항체"는 이의 천연 환경의 성분으로부터 동정되고 분리되고/되거나 회수된 항체이다. 이의 천연 환경의 오염 성분들은 항체에 대한 연구, 진단학적 또는 치료학적 사용을 방해하는 물질이고 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 항체는 (1) 예를 들어, 로우리 방법에 의한 결정시 90중량% 초과와 항체 및 일부 구현예에서 95중량%의 항체, (2) 예를 들어, 스피닝 컵 서열분석기의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 획득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 예를 들어, 쿠마시 블루 또는 실버 염색을 사용하여 환원 또는 비-환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의한 균일성으로 정제된다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 수 있기 때문에 재조합 세포 내 동일계 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조된다.
- [0156] "차단 항체" 또는 "길항제 항체"는 이것이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 저해하거나 감소시키는 항체이다. 특정 차단 항체 또는 길항제 항체는 실질적으로 또는 완전히 항원의 생물학적 활성을 저해한다.
- [0157] 본원에 사용된 바와 같은 "효능제 항체"는 목적하는 폴리펩타이드의 기능적 활성 중 적어도 하나를 보강하는 항체이다.
- [0158] 용어 "키메라 항원 수용체(CAR)"는 T-세포 신호전달 도메인에 연결된 항체의 항원-결합 도메인을 함유하는 인공적으로 작제된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩타이드이다. CAR의 특징은 모노클로날 항체의 항원-결합 성질을 활용하면서, 비-MHC 제한된 방식으로 T-세포 특이성 및 반응성을 선택적 표적 방향으로 재지시하는 능력을 포함한다. 상기 비-MHC-제한 항원 인지는 CAR을 발현하는 T-세포에게 항원 프로세싱과 무관하게 항원을 인지하는 능력을 부여함에 따라서 중앙 회피의 주요 기작을 우회한다. 더욱이, T-세포에서 발현되는 경우, CAR은 유리하게 내인성 T-세포 수용체 (TCR) 알파 및 베타 쇄와 이량체화하지 않는다.
- [0159] "장애"는 본 발명의 항체를 사용한 치료로부터 이득을 얻는 임의의 병태이다. 이것은 포유동물이 미지의 장애에 걸리기 쉬운 상기 병리학적 병태를 포함하는 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 본원에서 치료될 장애의 비제한적인 예는 암을 포함한다.
- [0160] 용어 "세포 증식성 장애" 또는 "증식성 장애"는 일부 정도의 비정상적 세포 증식과 관련된 장애를 언급한다. 하나의 양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.
- [0161] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "종양"은 악성이든 양성이든 상관 없이 모든 신생물 세포 성장 및 증식 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 언급한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식 장애", "증식 장애" 및 "종양"은 본원에 언급된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.
- [0162] 용어 "암" 또는 "암성"은 전형적으로 비조절된 세포 성장/증식을 특징하는 포유동물에서 생리학적 병태를 언급하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 상기 암의 보다 특정 예는 뇌암, 경구암, 편평세포 암, 소-세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경관암, 난소암, 위암, 담관암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 골암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종, 백혈병 및 다른 림프구증식성 장애 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.
- [0163] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "개체" 또는 "대상체"는 인간 또는 비-인간 동물을 포함하는 것으로 의도된다. 바람직한 대상체는 면역 및/또는 항-증식성 반응 및/또는 항-암 치료학적 반응의 증진을 필요로 하는 인간 환자를 포함한다. 상기 방법은 특히 생체내 암 세포의 치료를 위해 적합한 인간 환자를 치료하기 위해 적합하다.
- [0164] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료학적 제제"는 과증식성 질환을 감소시키고/시키거나 저해시킬 수 있는 임의의 제제를 특징으로 한다. 예시적인 치료학적 제제는 세포독성제, 화학치료학적 제제, 항-증식성 제제, 면역조절제, 호르몬 조절제, 사이토킨 및 다른 항암 물질 및/또는 방식을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.
- [0165] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포독성제"는 세포 기능을 억제하거나 차단하고/하거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 언급한다. 상기 용어는 방사능 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사능 동위원소), 화학치료학적 제제(예를 들어, 메토티렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 펠팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신

또는 다른 삽입성 제제, 효소 및 이의 단편, 예를 들어, 핵산용해 효소, 항생제, 및 독소, 예를 들어, 단편 및/또는 이의 변이체를 포함하는, 세균, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소적 활성 독소, 및 하기된 다양한 항종양 또는 항암제를 포함하는 것으로 의도된다. 다른 세포독성 제제는 아래에 기재된다. 본원에 사용된 바와 같은, 살종양 제제는 중앙 세포의 파괴를 유도한다. 세포독성 제제 및 화학치료학적 제제는 상호 배타적이지 않다.

[0166] 추가로 또는 대안적으로, 세포독소 또는 세포독성 제제는 세포에 해로운 (예를 들어, 사멸시키는) 임의의 제제를 포함할 수 있다. 이의 예는 탁술, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 푸로마이신 및 이의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 치료학적 제제는 예를 들어, 항대사물 (예를 들어, 메토틱세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제 (예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 사이클로포스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 플라티늄 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린 (예를 들어, 다우노루비신 (이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 다크티노마이신 (이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 및 항-유사분열제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 포함한다.

[0167] 용어 "화학치료학적 제제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학치료학적 제제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오에파 및 CYTOXAN[®] 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리에틸올로멜라민을 포함하는 메틸아멜라민; 알트레타민을 포함하는 아세토게닌 (특히 블라타신 및 블라타시논); 델타-9-테트라하이드로칸나비놀 (드로나비놀, MARINOL[®]); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베툴린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (HYCAMTIN[®]), CPT-11 (이리노테칸, CAMPTOSAR[®]), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카벨레신 및 비젤레신 합성 유사체); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 두오카마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CBI-TM1을 포함하는); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사코디틴; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 클로마파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어, 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라눔누스틴; 항생제, 예를 들어, 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가1(문헌참조: 예를 들어, Agnew, Chem. Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); 디네미신 A를 포함하는 디네미신; 에스페라미신; 및 네오카지노스타틴 발색단 및 관련 크로모단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 액티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, 크로로마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데투루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN[®] 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신을 포함하는), 에피루비신, 에소루비신, 다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투버시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대상물, 예를 들어, 메토틱세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 메토틱세이트, 프레로프테린, 트리메트렉세이트; 푸린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 프록스우리딘; 안드로젠, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨라톤; 항-아드레날, 예를 들어, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄, 폴산 보충제, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미딘; 엘립티니움 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈리움 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이딘; 마이탄시노이드, 예를 들어, 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 켈토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸하이dra지드; 프로카

바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테세네스(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신(ELDISINE®, FILDESIN®); 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 (Ara-C); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, TAXOL® 파클리탁셀 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), 파클리탁셀의 ABRAXANE™ 크레모포르-유리된, 알부민-가공된 나노입자 제형(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), 및 TAXOTERE® 독세탁셀 (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로란부실; 겐시타빈 (GEMZAR®); 6-티오구아닌; 머캅도푸린; 메토티렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴 (VELBAN®); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (ONCOVIN®); 옥살리플라틴; 류코보린; 비노렐빈 (NAVELBINE®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 저해제 RFS 2000; 디플루오로메틸로미틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티산; 카페시타빈 (XELODA®); 약제학적으로 허용되는 염, 상기 임의의 산 또는 유도체; 및 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 및 프레드니솔론의 조합 치료요법에 대한 약칭인 CHOP와 같은 상기 2개의 이상의 조합물, 및 FOLFOX, an 5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (ELOXATIN™)을 사용한 치료요법에 대한 약칭인 FOLFOX를 포함한다.

[0168] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "사이토킨"은 문헌[Kiefer et al. 2016, Immunol. Revs. 270:178-192]에 열거된 실시예를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적 적합한 사이토킨은 G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IFN α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-21, IL-23, 및 TNF를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0169] 하나의 구현예에서, 사이토킨은 라이신 잔기들 사이의 가교-연결을 통해 결합 도메인에 연결된다.

[0170] 용어 "치료학적 항체"는 질환의 치료에 유용한 항체이다. 치료학적 항체의 예는 에타라시주맵, 아틀리주맵, 토실리주맵, 타카투주맵 테트라세탄, 루플리주맵, 오파투무맵, 테피바주맵, 베바시주맵, 벨리무맵, 토시투모맵, 블론투베트맵, 메폴리주맵, 라베투주맵, 아시투모맵, 세르톨리주맵 페골, 라무시주맵, TRBS07, 세톡시맵, 비시로맵, 오비누투주맵, 트라스투주맵, 클리바투주맵 테트라세탄, 보투무맵, 자놀리무맵, 잘루투무맵, 아탈리무맵, 폰톨리주맵, 알투모맵 펜테테이트, 카나키누맵, 이고보맵, 트라스투주맵 엠탄신, 알렘투주맵, 로벨리주맵, 솔레소맵, 라니비주맵, FBTA05, 벡투모맵, 리톡시맵, 에폰구맵, 겐투주맵 오조가미신, 임시로맵, 파놀레소맵, 모타비주맵, 비실리주맵, 퍼투주맵, 니블루맵, 무로모납-cd3, 오레고보맵, 에드레콜로맵, 데노수맵, 카프로맵 펜테티드, 에팔리주맵, 인플릭시맵, 카투막소맵, 기렌톡시맵, 아브식시맵, 에르투막소맵, 베실레소맵, 골리무맵, 바실릭시맵, 에쿨리주맵, 우스테키누맵, 팔리비주맵, 탐투베트맵, 니모투주맵, 캄투모맵, 나탈리주맵, 파니투무맵, 노페투모맵 머펜탄, 오말리주맵, 이필리무맵, 다클리주맵, 이브리투모맵 티옥세탄이다.

[0171] 본원에 사용된 바와 같은 "치료"는 치료받는 개체 또는 세포의 천연 과정을 변화시키기 위한 시도에서 임상적 중재를 언급하고 임상적 병리학의 예방을 위해 또는 이 과정 동안에 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 질환의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 감소, 염증 및/또는 조직/기관 손상의 예방 또는 감소, 질환 진행율의 감소, 질환 상태의 개선 또는 경감 및 차도 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항체는 질환 또는 장애의 발병을 지연시키기 위해 사용된다.

[0172] 치료 목적을 위한 용어 "포유동물"은 인간, 가정용 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예를 들어, 개, 말, 고양이, 소 등을 포함하는 포유동물로서 분류되는 임의의 동물을 언급한다.

[0173] 용어 "유효량"은 목적하는 치료학적 또는 예방학적 결과를 성취하기 위해 필요한 투여 및 시간 동안 효과적인 양을 언급한다.

[0174] 본원에 사용된 바와 같은 용어 본 발명의 물질/분자의 "치료학적 유효량"은 질환 상태, 연령, 성별 및 개체의 체중 및 개체에서 목적하는 반응을 유발하는 물질/분자의 능력과 같은 인자에 따라 다양할 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 물질/분자의 임의의 독성 또는 해로운 효과가 치료학적으로 이로운 효과에 의해 능가되는 양이다. 용어 "예방학적 유효량"은 목적하는 예방학적 결과를 성취하기 위해 필요한 투여 및 시간 동안 효과적인 양을 언급한다. 전형적이지만 필수적인 것이 아닌, 예방학적 용량이 질환의 보다 이른 단계 전에 또는 단계

에서 사용되기 때문에, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량 보다 적다.

- [0175] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "예방학적 유효량"은 목적하는 예방학적 결과를 성취하기 위해 필요한 투여 및 시간 동안 효과적인 양을 언급한다. 전형적이지만 필수적인 것이 아닌, 예방학적 용량이 질환의 보다 이른 단계 전에 또는 단계에서 사용되기 때문에, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량 보다 적다.
- [0176] 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 합리적 이득/위험 비율에 상응하는, 과도한 부작용 효과 (예를 들어, 독성, 자극 및 알레르기 반응) 없이 대상체에 사용하기 위해 적합한 담체이다. 또한, 각각의 담체는 약제학적 조성물의 다른 성분들과 상용성이라는 측면에서 "허용되는"이어야만 한다. 상기 담체는 고체, 반-고체 또는 액체 희석제, 크림 또는 캡슐의 형태일 수 있다. 담체는 제형의 다른 성분과 상용성이라는 측면에서 "허용되는"이어야만 하고 활성제의 임의의 열화를 최소화하고 대사체에서 임의의 부작용을 최소화하기 위해 "허용되는"이어야만 한다.
- [0177] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로 유사한", "실질적으로 동일한", "균등한", 또는 "실질적으로 균등한"은 2개의 수치 값 (예를 들어, 분자와 연합된 하나 및 참조/비교 분자와 연합된 다른 하나) 사이의 충분히 고도의 유사성을 지칭하여 당업자는 2개의 값 간의 차이가 상기 값 (예를 들어, K_d 값, 항-바이러스 효과 등)에 의해 측정되는 생물학적 특징적 내용에서 거의 어떠한 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 없음을 고려한다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 예를 들어, 참조/비교 분자를 위한 값의 함수로서 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 및/또는 약 10% 미만이다.
- [0178] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 2개의 수치 값 (일반적으로 분자와 연합된 하나 및 참조/비교 분자와 연합된 다른 하나) 사이의 충분히 고도의 차이를 지칭하여 당업자는 2개의 값 간의 차이가 상기 값 (예를 들어, K_d 값)에 의해 측정되는 생물학적 특징적 내용에서 거의 어떠한 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 없음을 고려한다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 예를 들어, 참조/비교 분자를 위한 값의 함수로서 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과, 및/또는 약 50% 초과이다.
- [0179] 본원에 정의된 아미노산 서열과 관련하여 용어 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"은 서열을 정렬하고 최대 퍼센트 서열 동일성을 성취하기 위해 필요하다면 갭을 도입한 후, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않으면서, 특이적 폴리펩타이드 서열 내 아미노산 잔기들과 동일한 후보물 서열 내 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의된다. 퍼센트 서열 동일성을 결정하는 목적을 위한 정렬은 당업계의 기술 내에서 예를 들어, 공개적으로 가용한 컴퓨터 소프트웨어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 다양한 방식으로 성취될 수 있다. 당업자는 정렬을 측정하기 위한 적당한 파라미터를 결정할 수 있고, 이는 비교될 서열의 전장에 걸친 최대 정렬을 성취하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함한다. 본원의 목적을 위해, 2개의 아미노산 서열 간의 서열 비교는 온라인으로 기관(Nation Center for Biotechnology Information (NCBI))에 의해 제공된 컴퓨터 프로그램 Blastp (단백질-단백질 BLAST)에 의해 수행하였다. 구체적으로, 소정의 아미노산 서열 B에 대한 소정의 아미노산 서열 A의 퍼센트 아미노산 서열 동일성 (이는 대안적으로 소정의 아미노산 서열 B에 대한 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖는 소정의 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있다)은 다음과 같은 식으로 계산된다:
- [0180] $(X \div Y) \times 100 \%$.
- [0181] 여기서, X는 A 및 B의 상기 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 BLAST에 의한 동일한 매치로서 스코어되는 아미노산 잔기의 수이고, 여기서, Y는 어느 것이 보다 짧은, A 또는 B에서의 아미노산 잔기의 총 수이다.
- [0182] 특정된 아미노산 서열과의 서열 동일성 또는 상동성은 본원에서 서열을 정렬하고 최대 퍼센트 상동성을 성취하기 위해 필요하다면 갭을 도입한 후, 및 서열의 동일성 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않으면서 특정 잔기와 동일한 후보 서열 중 아미노산 잔기의 퍼센트로서 본원에 정의된다. N-말단, C-말단 또는 내부 연장, 결실 또는 특정 서열로의 삽입의 어떠한 것도 상동성에 영향을 미치지 않는 것으로 해석된다. 본 발명을 위해 요구되는 모든 서열 정렬은 상기 최대 상동성 정렬이다. 본원에 논의된 바와 같이, 단백질/폴리펩타이드의 아미노산 서열에서 최소의 변형은 본원에 기재되고 청구된 본 발명의 개념(들)에 의해 포함되는 것으로서 고려되고, 아미노산 서열 내 변형은 적어도 80%, 예를 들어, 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%를 유지한다.
- [0183] "보존적으로 변형된 아미노산 치환"이 고려된다. 보존적 변형된 아미노산 치환은 이들의 측쇄에서 관련된 아미노산의 패밀리 내에서 일어나는 치환이다. 유전학적으로 암호화된 아미노산은 일반적으로 패밀리로 나누어진다:

- [0184] (1) 산성: 아스파르테이트 (D), 글루타메이트 (E);
- [0185] (2) 염기성: 라이신 (K), 아르기닌 (R), 히스티딘 (H);
- [0186] (3) 비극성: 글라이신 (G), 알라닌 (A), 발린 (V), 류신 (L), 이소류신 (I), 프롤린 (P), 페닐알라닌 (F), 메티오닌 (M), 트립토판 (W); 및
- [0187] (4) 비하전된 극성: 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q), 시스테인 (C), 세린 (S), 트레오닌 (T), 티로신 (Y).
- [0188] 보다 바람직한 패밀리는 다음과 같다:
- [0189] (3-1) 지방족: 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신;
- [0190] (3-2) 방향족: 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신;
- [0191] (4-1) 지방족-하이드록실: 세린 및 트레오닌;
- [0192] (4-2) 아미드-함유: 아스파라긴 및 글루타민.
- [0193] 예를 들어, 류신의 이소류신 또는 발린으로의 단리된 치환, 아스파르테이트의 글루타메이트로의 단리된 치환, 트레오닌의 세린으로의 단리된 치환. 또는 아미노산의 구조적으로 관련된 아미노산으로의 유사한 대체는 특히 치환이 골격 부위 내에 아미노산을 포함하지 않는 경우 수득한 분자의 결합 또는 성질에 대한 주요 효과를 갖지 않을 것으로 예측하는 것이 합리적이다. 아미노산 변화가 기능성 펩타이드를 유도할지의 여부는 폴리펩타이드 유도체의 특이적 활성을 검정함에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 단백질/폴리펩타이드의 단편/유사체는 당업자에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 단편 또는 유사체의 바람직한 아미노- 및 카복실-말단은 기능성 도메인의 경계선 근처에 존재한다. 아미노산의 추가의 그룹은 또한 예를 들어, 문헌(참조: Creighton (1984) Proteins:Structure and Molecular Properties (2d Ed. 1993), W.H. Freeman and Company)에 기재된 원리를 사용하여 제형화될 수 있다.
- [0194] 특정 구현예에서, 보존된 아미노산 치환은 참조 서열 (예를 들어, CDR, VH, VL, 골격, 전장 등)과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 개 이상의 치환된 아미노산 잔기까지 상이한 서열 동족체를 포함할 수 있다.
- [0195] 유도체
- [0196] 본원의 개시내용은 또한 SSEA4에 특이적인 항체를 수득하기 위한 방법을 제공한다. 상기 항체 내 CDR은 표 2 및 본원의 다른 곳에서 확인된 V_H 및 V_L 의 특정 서열로 제한되지 않고 SSEA4에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 이들 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 상기 변이체는 당업계에 널리 공지된 기술을 사용하여 당업자에 의해 하기에 열거된 서열 및 이의 보존적 치환으로부터 유래할 수 있다.

본래의 잔기	예시 치환	전형적 치환
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Glu (E)	Asp	Asp
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala, Gly	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4-디아미노-부티르산, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala, Gly	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 노르류신	Leu

[0197]

[0198]

특정 구현예에서, 본 발명의 항체는 H-CDR1, H-CDR2 및 H-CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 L-CDR1, L-CDR2 및 L-CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 이들 CDR 서열 중 하나 이상은 본원에 기재된 바람직한 항체를 기준으로 특정 아미노산 서열, 또는 이의 보존성 변형을 포함하고, 상기 항체는 본 발명의 항-SSEA4 항체의 목적하는 기능성 성질을 보유한다. 따라서, 본 발명은 H-CDR1, H-CDR2, 및 H-CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 L-CDR1, L-CDR2, 및 L-CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부, 및 보존된 아미노산 치환된 이의 변이체 및 모든 3개의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR을 포함하는 동족체를 제공한다.

[0199]

가공되고 변형된 항체

[0200]

본 발명의 항체는 변형된 항체를 가공하기 위한 출발 물질로서 본원에 기재된 V_H 및/또는 V_L 서열 중 하나 이상을 갖는 항체를 사용하여 추가로 제조될 수 있고, 상기 변형된 항체는 상기 출발 항체로부터 변형된 성질을 가질 수 있다. 항체는 하나 또는 둘 다의 가변 영역 (즉, V_H 및/또는 V_L) 내, 예를 들어, 하나 이상의 CDR 영역 내 및/또는 하나 이상의 골격 영역 내 하나 이상의 잔기를 변형시킴에 의해 가공될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 항체는 예를 들어, 항체의 이펙터 기능(들)을 변형시키기 위해, 불변 영역(들) 내 잔기를 변형시킴에 의해 가공될 수 있다.

[0201]

수행될 수 있는 가변 영역 가공의 한가지 유형은 CDR 접목이다. 항체는 주로 6개 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR)에 위치한 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유 때문에, CDR 내 아미노산 서열은 CDR의 외부 서열 보다는 개별 항체 간에 다양하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호작용에 관여하기 때문에, 상이한 성질을 갖는 상이한 항체로부터 기원하는 골격 서열 상으로 접목된 특이적 천연적으로 존재하는 항체 기원의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 작제함에 의해 특이적 천연적으로 존재하는 항체의 성질을 모방하는 재조합 항체를 발현할 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; U.S. Pat. No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen et al.)

[0202]

따라서, 본 발명의 또 다른 구현예는 H-CDR1, H-CDR2, 및 H-CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 L-CDR1, L-CDR2, 및 L-CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 모노클로날 항체 이의 항원-결합부에 관한 것이다. 따라서, 상기 항체는 본원에 기재된 모노클로날 항체의 V_H 및 V_L CDR 서열을 함유하지만 이들 항체와는 상이한 골격 서열을 함유할 수 있다.

[0203]

상기 골격 서열은 생식선 항체 유전자 서열을 포함하는 공중의 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참조로부터 수득

될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식선 DNA 서열은 "VBase" 인간 생식선 서열 데이터베이스에서 찾을 수 있다(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 인터넷 상에서 가용한, 및 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; 이의 각각의 내용은 명백히 본원에 참조로 인용된다). 또 다른 예로서, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식선 DNA 서열은 GenBank 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 예를 들어, HCo7 HuMAb 마우스에서 발견되는 하기의 중쇄 생식선 서열은 첨부된 GenBank 승인 번호: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 및 BC070333), 3-33 (NG_0010109 및 NT_024637) 및 3-7 (NG_0010109 및 Nt_024637)에서 가용하다. 또 다른 예로서, HCo12 HuMAb 마우스에서 발견되는 하기의 중쇄 생식선 서열은 첨부된 GenBank 승인 번호: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 및 BC070333), 5-51 (NG_0010109 및 NT_024637) 및 4-34 (NG_0010109 및 NT_024637), 3-30.3 (AJ556644) 및 3-23 (AJ406678)에서 가용하다.

[0204] CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열은 이로부터 골격 서열이 유래하는 생식선 면역글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 서열을 갖는 골격 영역 상으로 접목될 수 있거나, CDR 서열은 생식선 서열과 비교하여, 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 골격 영역 상으로 접목될 수 있다. 예를 들어, 특정 경우에 항체의 항원 결합 능력을 유지하거나 증진시키기 위해 골격 영역 내 잔기를 돌연변이시키는 것이 이루어질 수 있는 것으로 밝혀졌다(문헌참조: 예를 들어, U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen et al).

[0205] 또 다른 유형의 가변 영역 변형은 목적하는 항체의 하나 이상의 결합 성질 (예를 들어, 친화성)을 개선시키기 위해 각각의 중쇄 및 경쇄 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내 아미노산 잔기를 돌연변이시키는 것이다. 부위-지시된 돌연변이 발 또는 PCR-매개된 돌연변이 유발은 돌연변이(들)을 도입하기 위해 수행될 수 있고 항체 결합 또는 목적하는 기능성 성질에 대한 효과는 본원에 기재되고 실시예에 제공된 바와 같은 시험관내 또는 생체내 검정에서 평가될 수 있다. 바람직하게 보존성 변형 (상기 논의된 바와 같이)이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 첨가 또는 결실일 수 있지만 바람직하게 치환이다. 더욱이, 전형적으로 CDR 영역 내 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 잔기는 변형된다.

[0206] 본 발명의 가공된 항체는 예를 들어, 항체의 성질을 개선시키기 위해 V_H 및/또는 V_K 내 골격 잔기가 변형된 것들을 포함한다. 전형적으로 상기 골격은 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 변형시킨다. 예를 들어, 하나의 접근법은 하나 이상의 골격 잔기를 상응하는 생식선 서열을 상응하는 생식선 서열로 "복귀돌연변이"시키는 것이다. 보다 구체적으로, 체세포 돌연변이를 진행한 항체는 항체가 유래하는 생식선 서열과 상이한 골격 잔기들을 함유할 수 있다. 상기 잔기들은 항체가 유래된 생식선 서열과 항체 골격 서열을 비교함에 의해 동정될 수 있다.

[0207] 골격 또는 CDR 영역 내 가해진 변형에 추가로 또는 이의 대안으로, 본 발명의 항체는 전형적으로 항체의 하나 이상의 기능성 성질, 예를 들어, 혈청 반감기, 보체 고정화, Fc 수용체 결합, 및/또는 항원-의존성 세포 세포독성을 변화시키기 위해 Fc 영역 내 변형을 포함하도록 가공될 수 있다. 추가로, 본 발명의 항체는 화학적으로 변형될 수 있거나 (예를 들어, 하나 이상의 화학적 모이어티는 항체에 접촉될 수 있다) 이의 당화를 변화시키고 다시 항체의 하나 이상의 기능성 성질을 변화시키기 위해 변형될 수 있다.

[0208] 여전히, 또 다른 구현예에서, 항체의 당화는 변형된다. 예를 들어, 비당화된 항체를 제조할 수 있다(즉, 상기 항체는 당화가 없다). 당화는 예를 들어, 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시키기 위해 변화될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 변화된 당화 유형을 갖는 항체, 예를 들어, 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 낮게 푸코실화된 항체 또는 증가된 양분된 GlcNac 구조를 갖는 항체. 상기 변화된 당화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다.

[0209] 본 발명에 의해 고려되는 본원의 항체의 또 다른 변형은 폐길화(PEGylation)이다. 항체는 예를 들어, 항체의 생물학적 (예를 들어, 혈청) 반감기를 증가시키기 위해 폐길화될 수 있다. 항체를 폐길화하기 위해, 항체 또는 이의 단편은 전형적으로 하나 이상의 PEG 그룹이 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건 하에서 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데하이드 유도체와 같은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)와 반응시킨다. 바람직하게, 폐길화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 모노 (C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸

렌 글리콜-말레이미드와 같이, 다른 단백질을 유도하기 위해 사용된 PEG의 임의의 형태를 포함하도록 의도된다. 특정 구현예에서, 폐길화될 항체는 당화되지 않은 항체이다. 단백질을 폐길화시키기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있고 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어, 문헌(EP 0 154 316 by Nishimura et al. 및 EP 0 401 384 by Ishikawa et al)을 참조한다.

[0210] 본 발명의 가공 항체의 방법의 특정 구현예에서, 돌연변이는 항-PD-1 항체 암호화 서열 전부 또는 일부를 따라 무작위로 또는 선택적으로 도입될 수 있고 수득한 변형된 항-SSEA4 항체는 본원에 기재된 바와 같은 결합 활성 및/또는 다른 기능성 성질에 대해 스크리닝될 수 있다. 돌연변이 방법은 당업계에 기재되어 있다. 예를 들어, 쇼트 (Short)에 의한 PCT 공개공보 WO 02/092780는 포화 돌연변이유발, 합성 연결 어셈블리 또는 이의 조합을 사용하여 항체 돌연변이를 생성하고 스크리닝하기 위한 방법을 기재하고 있다. 대안적으로, 라자르 등 (Lazar et al)에 의한 PCT 공개공보 WO 03/074679는 항체의 생리화학적 성질을 최적화하기 위한 컴퓨터 스크리닝 방법을 사용하는 방법을 기재하고 있다.

[0211] **본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자**

[0212] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 핵산은 전체 세포에서, 세포 용해물에서 또는 부분적으로 정제되거나 실질적으로 순수 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 알칼린/SDS 처리, CsCl 밴딩, 칼럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당업계 널리 공지된 기타 다른 것들을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어, 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제되는 경우 "단리되거나" 실질적으로 순수하게 된다"(문헌참조: F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York). 본 발명의 핵산은 예를 들어, DNA 또는 RNA일 수 있고 인트론 서열을 함유할 수 있거나 함유하지 않을 수 있다. 바람직한 구현예에서, 핵산은 cDNA 분자이다. 특정 구현예에서, 핵산은 벡터에 의해 발현된다.

[0213] 본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 수득될 수 있다. 하이브리도마 (예를 들어, 추가로 하기에 기재된 바와 같이 인간 면역글로불린 유전자를 수행하는 유전자전이 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현되는 항체에 대해, 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 수득될 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리로부터 수득된 (예를 들어, 파아지 디스플레이 기술을 사용하여) 항체에 대해, 상기 항체를 암호화하는 핵산은 라이브러리로부터 회수될 수 있다.

[0214] 본 발명의 예시적 핵산 분자는 예시적 Ab6 모노클로날 항체의 V_H and V_L 아미노산 서열을 암호화하는 것트이다 (표 2A-2D 참조).

[0215] 골격 영역 (FR) 상에 예시적 아미노산 치환을 갖는 서열은 표 2B에 나타낸다. SSEA4로 및 SSEA4-발현 세포로의 결합 활성의 확인은 실험부에 도해된 바와 같은 결합 검정에 의해 입증된다. 본원 발명자는 결합 친화성 기능이 각각의 예시적 경쇄 및 중쇄의 골격 상에 3/5 까지의 아미노산 치환을 갖는 예시적 변이체에서도 보존되고 유지됨을 확인하였다.

[0216] CDR 상에 예시적 비-보존적으로 변형된 아미노산 치환을 갖는 서열은 표 2C에 나타낸다. SSEA4로 및 SSEA4-발현 세포로의 결합 활성의 확인은 실험부에 도해된 바와 같은 결합 검정에 의해 입증된다. 본원 발명자는 결합 친화성 및 기능이 예를 들어 이에 제되지 않지만 중쇄: **A100R, N31S, T62A**. 경쇄: **S52Y**와 같은 경쇄 및 중쇄의 CDR 상의 비제한적 예시적 아미노산 치환을 갖는 예시적 변이체에 보존되고 보유됨을 확인하였다.

[0217] CDR 상에 예시적 보존적으로 변형된 아미노산 치환을 갖는 서열은 표 2D에 나타낸다. SSEA4로 및 SSEA4-발현 세포로의 결합 활성의 확인은 실험부에 도해된 바와 같은 결합 검정에 의해 입증된다. 본원 발명자는 결합 친화성 및 기능이 예를 들어 이에 제되지 않지만 중쇄: **V50A, G53A, S35T**. 경쇄: **V30I/A, G91A, Y94F**와 같은 경쇄 및 중쇄의 CDR 상의 비제한적 예시적 아미노산 치환을 갖는 예시적 변이체에 보존되고 보유됨을 확인하였다.

[0218]

[표 2A]

예시적 모 항체

chAb6 서열 (No. 01x)

항체/서열	서열번호:	아미노산 또는 핵산 서열
H-CDR1	No. 10	NYGVS
H-CDR2	No. 11	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No. 12	PGAGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No. 13	QVQLKESGPGLVAPSQLSITCTVSGFSLKNYGVS WVRQPPGKLEWL GVIWGDGSTNYHSTLRSRLTISKDN SKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKP GAGYAMDYWGQTSVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No. 14	Caggatgcagctgaaggagt caggacctGgcctgg ggcgccctcacagagcctg Tccatcacatgactgtctcagggttctca Ttaaaaaactatgggtgaagctgggttcg Ccagcctccaggaagggtctggagtg Gctgggagtaatatggggtgacgggag Cacaaat taccattcaactctcagatcca Gactgaccatcagcaaggataattccaa Gagccaactttcttaaaactgaacagac Tgcaaaactgatgacacagccactacta Ctgtgccaaacctggggcgggttatgcta Tggactactggggtcaaggaaacctcagtc accgtctcctca
L-CDR1	No. 15	SASSSVSYMH
L-CDR2	No. 16	DTSKLT
L-CDR3	No. 17	FQSGGYPLT
경쇄 가변 도메인	No. 18	QIVLTQSPA IMSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWY QQKSSTSPKL WIYDTSKLTSGVPRFSGSGSGN SYSLTSSMEAEVDATYYCFQSGG YPLTFGGGTKLEIKR
경쇄 뉴클레오타이드	No. 19	Caaattgttctcaccagctctcagcaatcatgtc tgtatatccaggggaaaaggt Caccatgacctgcagtgcagctcaag Tgtaagttacatgactggtaccagcag Aagtaagcactccccaaactctgga Tttatgacacatccaaactgactctgg Agtcccaggtcgttcagtggcagtggg Tctggaaactcttactctctcagatcag Cagcatggaggctgaagatgttgccactt Attactgttttcaggggagtggtacca Ctcacgttcggaggggggaccaagctg Gaaataaacgg

[0219]

[0220] [표 2B]

골격 영역 내 변형을 갖는 예시적 항체 구현예

hAb6-2 서열 (No.02x)

중쇄 가변 도메인	No.23	QVQLKESGPGLVAPSQTLSTCTVS GFSLKNYGVSWVRQPPGKLEWI GVIWGDGSTNYHSTLRSRVTISKD NSKSQFLKLNRLQDDTATYYCAK PGAGYAMDYWGQGTSTVTVSS
경쇄 가변 도메인	No.28	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSVSYMHW YQQKSSTSPKLWIYD TSKLTSGVPGRFSGSGSGNSYTLTIS SMEAEDVATYYCFQGSYPLTFGG GTKLEIKR

hAb6-3 서열 (No.03x)

중쇄 가변 도메인	No.33	QVQLQESGPGLVAPSQTLSTI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSLF LKLNRLQDDTATYYCAKPG AGYAMDYWGQGTSTVTVSS
경쇄 가변 도메인	No.38	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSVSYMHW YQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQGSYPLTFGG LTFGGGTKVEIKR

[0221]

[0222] [표 2C]

CDR 내 비-보존성 변형을 갖는 예시적 항체 구현예

hAb6-3.1 서열 (No.04x, H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No.40	NYGVS
H-CDR2	No.41	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No.42	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No.43	QVQLQESGPGLVAPSQTLSTCTVSGFSLKNGVSWVR Q PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGTLVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No.44	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGACCAGGACTGGTGGC TCCCAGCCAGACCCGTGCT ATCACCTGCACAGTGTCTGGCTTCTCCCTG AAGAAGTACGGCGTGAGCTGGGTGAGAC AGCCACCTGGCAAGGACTGGAGTGGAT CGGCGTGATCTGGGGCAGCGGCTTACC AATTACTACTCCACACTGAGGAGCCGGG TGACCATCTCCAAGGATAACTCCAAGAG CCAGCTGTTCTGAAGCTGAATCGCCTG CAGACAGACGATACCGCCACATACTATT GGCTAAGCCAGGCCGGGCTACGCTA TGGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC
L-CDR1	No.45	SASSSVSYMH
L-CDR2	No.46	DTSKLT
L-CDR3	No.47	FQGSYPLT
경쇄 가변 도메인	No.48	EIVLTQSPA IQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQK SSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRPSGSGSGNSY TLTISSMEAEATAATYYCFQGSYPL LTFGGGTKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No.49	GAGATCGTGTGACCCAGTCTCCTGCCATCCAGTCCGT GTACCCAGGCGAGAAGG TGACCATGACATGTTCCGCTTCTTCCAG CGTGAGCTACATGCATTGGTATCAGCAG AAGTCTTCCACATCTCCAAGCTGTGGA TCTACGACACCTCTAAGCTGACATCCGG AGTGCCTGGCAGGTTCTCTGGATCCGGA AGCGGCAACAGCTATACCCTGACAATCA GCTCTATGGAGGCTGAGGATGCCGCTAC CTACTATTGTTTCCAGGGCTCTGGCTATC CCCTGACCTTTGGCGGGCACAAGG TGGAGATCAAGCGT

[0223]

hAb6-3.2 서열 (No.05x, H-CDR1:N31S 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No.50	SYGVS
H-CDR2	No.51	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No.52	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No.53	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKSYGVS#VVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKQLF LKLNRLLQDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No.54	
L-CDR1	No.55	SASSSVSYMH
L-CDR2	No.56	DTSKLS
L-CDR3	No.57	FQGSYPLT
경쇄 가변 도메인	No.58	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGNSY TLTISSMEAEAAIYYCFQGSYYP LTFGGGTKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No.59	

[0224]

hAb6-3.3 서열 (No.06x, H-CDR2:T62A 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No. 60	NYGVS
H-CDR2	No. 61	VIWGDGSTNYHSALRS
H-CDR3	No. 62	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No. 63	QVQLQESGPGLVAPSQLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSALRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No. 64	
L-CDR1	No. 65	SASSSVSYMH
L-CDR2	No. 66	DTSKLS
L-CDR3	No. 67	FQGGGYPLT
경쇄 가변 도메인	No. 68	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEADAATYYCFQGGGYP LTFGGGTKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No. 69	

hAb6-3.4 서열 (No.07x, L-CDR2:S52Y 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No. 70	NYGVS
H-CDR2	No. 71	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No. 72	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No. 73	QVQLQESGPGLVAPSQLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No. 74	
L-CDR1	No. 75	SASSSVSYMH
L-CDR2	No. 76	DTYKLS
L-CDR3	No. 77	FQGGGYPLT
경쇄 가변 도메인	No. 78	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQQKSSTSPKLW IYDITYKLTSGVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEADAATYYCFQGGGYP LTFGGGTKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No. 79	

[0225]

[0226] [표 2D]

CDR 내 보존성 변형을 갖는 예시적 항체 구현예

hAb6-3.101 서열 (No.08x, H-CDR2:V50A 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No.80	NYGVS
H-CDR2	No.81	AIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No.82	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No.83	QVQLQESGPGLVAPSQTLTI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGAIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKQLF LKL.NRL.QTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No.84	
L-CDR1	No.85	SASSSVSYMH
L-CDR2	No.86	DTSKLT
L-CDR3	No.87	FQGSGYPLT
경쇄 가변 도메인	No.88	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGNSY TLTISSMEAEADAATYYCFQGSY LTFGGGKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No.89	

hAb6-3.103 서열 (No.10x, H-CDR2:G53A 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No.100	NYGVS
H-CDR2	No.101	VIWADGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No.102	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No.103	QVQLQESGPGLVAPSQTLTI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWADGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKQLF LKL.NRL.QTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No.104	
L-CDR1	No.105	SASSSVSYMH
L-CDR2	No.106	DTSKLT
L-CDR3	No.107	FQGSGYPLT
경쇄 가변 도메인	No.108	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGNSY TLTISSMEAEADAATYYCFQGSY LTFGGGKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No.109	

[0227]

hAb6-3.105 서열 (No.12x, H-CDR1:S35T 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No. 120	NYGVT
H-CDR2	No. 121	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No. 122	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No. 123	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKNYGVTVWRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No. 124	
L-CDR1	No. 125	SASSSVSYMH
L-CDR2	No. 126	DTSKLT
L-CDR3	No. 127	FQGGGYPLT
경쇄 가변 도메인	No. 128	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGGNSY TLTISSMEAEADAATYYCFQGGGYP LTFGGGTKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No. 129	

hAb6-3.106 서열 (No.13x, L-CDR1:V30I 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No. 130	NYGVS
H-CDR2	No. 131	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No. 132	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No. 133	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No. 134	
L-CDR1	No. 135	SASSSISYMH
L-CDR2	No. 136	DTSKLT
L-CDR3	No. 137	FQGGGYPLT
경쇄 가변 도메인	No. 138	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSISYMHW YQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGGNSY TLTISSMEAEADAATYYCFQGGGYP LTFGGGTKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No. 139	

[0228]

hAb6-3.107 서열 (No.14x, L-CDR1:V30A 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No.140	NYGVS
H-CDR2	No.141	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No.142	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No.143	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLTVTVSS

중쇄의 뉴클레오타이드	No.144	
L-CDR1	No.145	SASSASYMH
L-CDR2	No.146	DTSKLS
L-CDR3	No.147	FQGGGYPLT
경쇄 가변 도메인	No.148	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSASYMHW YQKKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEADAATYYCFQGGGYP LTFGGGTKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No.149	

hAb6-3.108 서열 (No.15x, L-CDR3:G91A 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No.150	NYGVS
H-CDR2	No.151	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No.152	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No.153	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLTVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No.154	
L-CDR1	No.155	SASSVSYMH
L-CDR2	No.156	DTSKLS
L-CDR3	No.157	FQASGYPLT
경쇄 가변 도메인	No.158	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSVSYMHW YQKKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEADAATYYCFQASGYP LTFGGGTKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No.159	

[0229]

hAb6-3.110 서열 (No.17x, L-CDR3:Y94F 및 H-CDR3:A100R)

H-CDR1	No. 170	NYGVS
H-CDR2	No. 171	VTWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	No. 172	PGRGYAMDY
중쇄 가변 도메인	No. 173	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKL.NRL.QTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLTVTVSS
중쇄의 뉴클레오타이드	No. 174	
L-CDR1	No. 175	SASSSVSYMH
L-CDR2	No. 176	DTSKLT
L-CDR3	No. 177	FQSGGFPLT
경쇄 가변 도메인	No. 178	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSGVPGRFSGSGSGNSY TLTISSEAEADAATYYCFQSGGFP LTFGGGTKVEIKR
경쇄의 뉴클레오타이드	No. 179	

[0230]

[0231]

본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부를 암호화하는 핵산 분자, 및 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포는 본 발명에 의해 포함된다. 더욱이, 본 발명은 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 전이유전자를 포함하는 유전자전이 마우스 (여기서, 상기 마우스는 본 발명의 항체를 발현한다), 및 상기 마우스로부터 제조된 하이브리도마 (여기서, 상기 하이브리도마는 본 발명의 항체를 생성한다)를 제공한다.

[0232]

본 발명의 모노클로날 항체의 생성

[0233]

본 발명의 모노클로날 항체(mAb)는 통상적인 모노클로날 항체 방법, 예를 들어, 문헌(참조: Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495)의 표준 체세포 하이브리드화 기술을 포함하는 다양한 기술에 의해 생성될 수 있다. 체세포 하이브리드화 과정이 원칙적으로 바람직하지만, 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다른 기술이 또한 사용될 수 있고, 예를 들어, B 림프구의 바이러스 또는 발암성 형질전환이 있다.

[0234]

하이브리도마를 제조하기 위해 바람직한 동물 시스템은 뮤린 시스템이다. 마우스 내 하이브리도마 생성은 매우 널리 확립된 과정이다. 면역화 프로토콜 및 융합을 위해 면역화된 비장세포의 단리를 위한 기술은 당업계에 공지되어 있다. 융합 파트너 (예를 들어, 뮤린 골수종 세포) 및 융합 과정은 또한 공지되어 있다.

[0235]

본 발명의 키메라 또는 인간화된 항체는 상기된 바와 같이 제조된 뮤린 모노클로날 항체의 서열을 기준으로 제조될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 암호화하는 DNA는 목적하는 뮤린 하이브리도마로부터 수득될 수 있고 표준 분자 생물학 기술에 의해 비-뮤린 (예를 들어, 인간) 면역글로불린 서열을 함유하도록 가공될 수 있다. 예를 들어, 키메라 항체를 생성하기 위해, 뮤린 가변 영역은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 인간 불변 영역에 연결될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, U.S. Pat. No. 4,816,567 to Cabilly et al.). 인간화된 항체를 생성하기 위해, 뮤린 CDR 영역은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 인간 골격에 삽입될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, U.S. Pat. No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen et al.)

[0236]

하나의 구현예에서, 본 발명의 항체는 인간 모노클로날 항체이다. SSEA4에 대해 지시된 상기 인간 모노클로날 항체는 마우스 시스템 보다 차라리 인간 면역 시스템의 일부를 함유하는 유전자전이 또는 염색체전이 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 이들 유전자전이 및 염색체전이 마우스는 각각 HuMAb 마우스 및 KM Mice™로서 본원에 언급된 마우스를 포함하고, 총체적으로 본원에서 "인간 Ig 마우스"로서 언급된다.

[0237]

HuMAb 마우스 (Medarex, Inc.)는 내인성 μ 및 κ 쇠 유전자좌를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께, 재정렬되지 않은 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열을 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자 소형유전자좌를 함유한다(문헌참조: 예를 들어, Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 K의 감소된 발현을 나타내고, 면역화에 반응하여 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 전이유전자는 부류 스위칭 및 체세포 돌연변이를 진행하여 고친화성 인간 IgGk 모노클로날을 생성한다(문헌참조: Lonberg, N. et al. (1994), supra; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology*

113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). HuMab 마우스의 제조 및 사용, 및 상기 마우스에 의해 수행되는 게놈 변형은 문헌(참조: Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; and Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, 이의 모든 내용은 이의 전문이 참조로 인용됨)에 기재되어 있다. 추가로 문헌(U.S. Pat. Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; and 5,770,429; all to Lonberg and Kay; U.S. Pat. No. 5,545,807 to Surani et al.; PCT Publication Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 and WO 99/45962, all to Lonberg and Kay; and PCT Publication No. WO 01/14424 to Korman et al.)을 참조한다.

[0238] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 항체는 인간 중쇄 전이유전자 및 인간 경쇄 전이염색체를 함유하는 마우스와 같은, 전이유전자 및 전이염색체 상에 인가 면역글로불린 서열을 함유하는 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 본원에서 "KM Mice™"로서 언급되는 상기 마우스는 PCT 공개공보 WO 02/43478 to Ishida et al에 상세히 기재되어 있다.

[0239] 여전히 추가로, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 전이유전자 동물 시스템은 당업계에서 가용하고 본 발명의 항-PD-1 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 이종마우스 (Abgenix, Inc.)로서 언급되는 반복적 전이유전자 시스템은 예를 들어, 문헌(U.S. Pat. Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 및 6,162,963 to Kucherlapati et al.)에 기재되어 있다.

[0240] 더욱이, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 전이염색체 동물 시스템은 당업계에서 가용하고 본 발명의 항-SSEA4 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, "TC 마우스"로서 언급되는, 인간 중쇄 전이염색체 및 인간 경쇄 전이염색체 둘 다를 함유하는 마우스가 사용될 수 있고; 상기 마우스는 문헌(참조: Tomizuka et al. *Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727)에 기재되어 있다. 추가로, 인간 중쇄 및 경쇄 전이염색체를 함유하는 소는 문헌(참조: Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894)에 기재되어 있고 본 발명의 항-PD-1 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0241] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 인간 면역글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하기 위한 파아지 디스플레이 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 인간 항체를 단리하기 위한 상기 파아지 디스플레이 방법은 당업계에서 확립되었다. 예를 들어 하기 문헌을 참조한다: U.S. Pat. Nos. 5,223,409; 5,403,484; and 5,571,698 to Ladner et al.; U.S. Pat. Nos. 5,427,908 and 5,580,717 to Dower et al.; U.S. Pat. Nos. 5,969,108 and 6,172,197 to McCafferty et al.; and U.S. Pat. Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 and 6,593,081 to Griffiths et al.

[0242] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 인간 면역 세포가 재구성된 SCID 마우스를 사용한 제조될 수 있고, 상기 인간 항체 반응은 면역화시 생성될 수 있다. 상기 마우스는 예를 들어, 문헌(U.S. Pat. Nos. 5,476,996 and 5,698,767 to Wilson et al.)에 기재되어 있다.

[0243] **본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마의 생성**

[0244] 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 면역화된 마우스로부터의 비장세포 및/또는 림프절은 단리될 수 있고 마우스 골수종 세포주와 같은 적당한 면역화된 세포주에 융합될 수 있다. 수득한 하이브리도마는 항원-특이적 항체의 생성을 위해 스크리닝될 수 있다.

[0245] **본 발명의 모노클로날 항체를 생성하는 전이염색체의 생성**

[0246] 본 발명의 항체는 또한 당업계에 널리 공지된 바와 같은 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질감염 방법의 조합을 사용한 숙주 세포 형질감염체에서 생성될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

[0247] 상기 용어 "항체-의존성 세포-매개된 세포독성" 또는 "ADCC"는 세포독성 형태를 언급하고, 여기서, 특정 세포독성 세포(예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR) 상으로 결합된 분비된 Ig는 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원-함유 표적 세포에 결합하도록 할 수 있고 후속적으로 세포독성으로 표적 세포를 사멸시키도록 할 수 있다. 항체는 세포독성 세포를 "무장"시키고 세포독성 세포는 상기 기작에

의해 표적 세포의 사멸을 위해 요구된다. ADCC 매개하기 위한 주요 세포, NK 세포는 단지 Fc γ R111를 발현하는 반면 단핵구는 Fc γ R1, Fc γ R2 및 Fc γ R111를 발현한다. 조혈 세포 상에서 Fc 발현은 문헌(참조: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991))의 제464면 상에서 표 3에 요약되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 검정하기 위해, 문헌(참조: U.S. Pat. No. 5,500,362 or 5,821,337)에 기재된 것과 같은 시험관내 ADCC 검정이 수행될 수 있다. 상기 검정을 위해 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로, 목적하는 분자의 ADCC 활성은 문헌(참조: Clynes et al., *PNAS USA* 95:652-656 (1998))에 기재된 바와 같이 생체내, 예를 들어, 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0248] 용어 "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적 세포의 용해를 언급한다. 전형적 보체 경로의 활성화는 보체 시스템 (C1q)의 제1 성분을 이들의 동족체 항원에 결합된 항체 (적당한 아부류의)에 결합시킴에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어, 문헌(참조: Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996))에 기재된 바와 같은 CDC 검정이 수행될 수 있다. 변형된 Fc 영역 아미노산 서열 및 증가되거나 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 항체 변이체는 문헌(참조: U.S. Pat. No. 6,194,551B1 and W099/51642)에 기재되어 있다. 상기 특허 공보의 내용은 본원에 참조로 구체적으로 인용된다. 예를 들어, 문헌 (Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000))을 참조한다

[0249] 용어 "성장을 저해한다" (예를 들어, 종양 세포와 같은 세포를 언급하는)는 -SSEA4 항체와 접촉되지 않은 동일한 세포의 성장과 비교하여 항-SSEA4 항체와 접촉되는 경우 세포 성장에서 임의의 측정가능한 감소를 포함하는 것으로 의도되고, 예를 들어, 세포 배양물의 성장 저해는 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 100%이다. 세포 성장에서의 감소는 다양한 기전, 예를 들어, 이펙터 세포 식세포작용, ADCC, CDC, 및/또는 아포토시스에 의해 일어날 수 있다.

[0250] 또 다른 양상에서, 본 발명은 세포독소, 약물(예를 들어, 면역억제) 또는 방사능독소와 같은 치료학적 모이어티에 접합된 항-SSEA4 항체 또는 이의 단편을 특징으로 한다.

[0251] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 치료학적 세포독소의 다른 예는 두오카마이신, 칼리케아미신, 마이탄신 및 아우리스타틴 및 이의 유도체를 포함한다. 칼리케아미신 항체 접합체의 예는 시판되고 있다(Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

[0252] 세포독소는 링커 기술을 사용하여 본 발명의 항체에 접합될 수 있다. 세포 독소를 항체에 접합시키기 위해 사용되는 링커 유형의 예는 하이드라존, 티오에테르, 에스테르, 디설파이드 및 펩타이드-함유 링커를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 리소좀 격실 내에서 낮은 pH에 의한 절단에 민감할 수 있거나 카텝신 (예를 들어, 카텝신 B, C, D)과 같은 종양 조직내에서 우선적으로 발현되는 프로테아제와 같은 프로테아제에 의한 절단에 민감할 수 있는 링커가 선택될 수 있다.

[0253] 세포독소, 링커 및 치료학적 제제를 항체에 접합시키기 위한 방법의 유형을 추가로 논의하기 위해, 또한 문헌 (Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P. A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T. M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P. D. and Springer, C. J. (2001)*Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264)을 참조한다.

[0254] 항체-약물 접합체 (ADC)는 강력한 세포독성 약물을 하위-발현 종양 세포에 표적화함에 의해 항체와 세포독성 약물 둘 다의 성질을 조합하는 표적화된 화학치료학적 분자를 포함할 수 있어서(문헌참조: Teicher, B. A. (2009) *Current Cancer Drug Targets* 9:982-1004), 효능을 최대화하고 목표의 독성을 최소화함으로써 치료 지수를 향상시킬 수 있다(문헌참조: Carter, P. J. and Senter P. D. (2008) *The Cancer Jour.* 14(3):154-169; Chari, R. V. (2008) *Acc. Chem. Res.* 41:98-107).

[0255] 본 발명의 ADC 화합물은 항암 활성을 갖는 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, ADC 화합물은 접합된, 즉, 약물 모이어티에 접착된 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 링커를 통한 약물 모이어티에 공유적으로 접착된다. 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)는 유효량의 약물을 종양 조직에 선택적으로 전달하여 보다 큰 선택성, 즉 보다 낮은 유효 용량이 성취될 수 있고 치료학적 지수("치료학적 윈도우")를 증가시킨다.

[0256] 특정 구현예에서, ADC는 화학식 AB-(L-D)_p를 갖고, 여기서: AB는 본원에 기재된 항체 또는 결합 단편이고, L은 링커이고; D는 적합한 세포독성 약물이고 p는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 이상의 범위일 수 있다.

[0257] ADC 작제를 위해 적합한 예시적 링커 "L"은 6-말레이미도카프로일 (MC), 말레이미도프로파노일 (MP), 발린-시트

룰린 (val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (ala-phe), p-아미노벤질옥시카보닐 (PAB), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)펜타노에이트(SPP), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1 카복실레이트 (SMCC), N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트 (STAB), 글루쿠로니다제 기질, 및 PEG로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 "L"을 포함할 수 있다.

[0258] 항체-약물 접합체 (ADC)의 약물 모이어티 (D)는 임의의 화합물, 모이어티 또는 세포독성 또는 세포증억제 효과를 갖는 그룹을 포함할 수 있다. 약물 모이어티는 튜블린 결합, DNA 결합 또는 사이 삽입(intercalation), 및 RNA 폴리머라제, 단백질 합성 및/또는 토포이소머라제의 저해를 포함하지만 이에 제한되지 않는 기전에 의해 이들의 세포독성 및 세포증억제 효과를 부여할 수 있다. 예시적 약물 모이어티는 마이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우리스타틴, 칼리케아미신, 피롤로벤조디아제핀 (PBD), 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF), 네모루비신 및 이의 유도체, PNU-159682, 안트라사이클린, 두오카마이신, 빈카 알칼로이드, 탁산, 트리코테센, CC1065, 캠프토테신, 엘리나피드, 및 억제이성체, 등배전자체, 유사체, 및 세포독성 활성을 갖는 이의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0259] 본 발명의 항체는 또한 방사능활성 동위원소에 접합되어 또한 방사선면역접합체로서 언급되는 세포독성 방사선 약제를 생성할 수 있다.

[0260] 이특이적 분자

[0261] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 항-SSEA4 항체 또는 이의 단편을 포함하는 이특이적 분자를 특징으로 한다. 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합부는 또 다른 기능성 분자, 예를 들어, 또 다른 펩타이드 또는 단백질 (예를 들어, 수용체에 대한 또 다른 항체 또는 리간드)로 유도체화되거나 연결되어 적어도 2개의 상이한 결합 부위 또는 표적 분자에 결합하는 이특이적 분자를 생성할 수 있다. 본 발명의 항체는 사실 하나 초과와 다른 기능성 분자로 유도체화되거나 연결되어 2개 초과와 상이한 결합 부위 및/또는 표적분자에 결합하는 다중특이적 분자를 생성할 수 있고; 상기 다중특이적 분자는 또한 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이특이적 분자"에 의해 포함되는 것으로 의도된다. 본 발명의 이특이적 분자를 생성하기 위해, 본 발명의 항체는 기능적으로 (예를 들어, 화학적 커플링, 유전학적 융합, 비공유 연합 또는 기타에 의해) 또 다른 항체, 항체 단편, 펩타이드 또는 결합 모사체와 같은 하나 이상의 다른 결합 분자에 연결하여 이특이적 분자를 생성할 수 있다.

[0262] 약제학적 조성물

[0263] 또 다른 양상에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 제형화된 본 발명의 하나 이상의 조합된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부 중 하나 또는 이의 조합을 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 본 발명의 (2개 이상의 상이한) 항체, 또는 면역접합체 또는 이특이적 분자 중 하나 또는 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물은 표적 항원 상에 상이한 에피토프에 결합하거나 상보적 활성을 갖는 항체 (또는 면역접합체 또는 이특이적 항체)의 조합을 포함할 수 있다.

[0264] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 즉, 다른 제제와 조합된 조합 치료요법으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 치료요법은 적어도 하나의 다른 항-염증조절복합체 또는 면역억제제와 조합된 본 발명의 항-SSEA4 항체를 포함할 수 있다. 조합 치료요법에 사용될 수 있는 치료학적 제제의 예는 본 발명의 항체의 용도에 대한 섹션에서 하기에 보다 상세하게 기재된다.

[0265] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 상용성인, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항생균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 상피 투여 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의해)를 위해 적합하다. 투여 경로에 의존하여, 활성 화합물, 즉, 항체, 면역접합체 또는 이특이적 분자는 화합물을, 상기 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산 및 다른 천연 조건의 작용으로부터 보호하기 위해 물질에 코팅될 수 있다.

[0266] 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용되는 염"은 모 화합물의 목적하는 생물학적 활성을 보유하는 염을 언급하고 임의의 목적하지 않은 독성학적 효과를 부여하지 않는다(문헌참조: 예를 들어, Berge, S. M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). 상기 염의 예는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 비독성 무기산으로부터 유래된 것들, 예를 들어, 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드수소산, 인산 등, 및 비독성 유기산으로부터 유래된 것들, 예를 들어, 지방족 모노- 및 디카복실산, 페닐-치환된 알카노산, 하이드록시 알카노산, 방향족산, 지방족 및 방향족 설폰산 등을 포함한다. 염기 부가염은 알칼린 토금속으로부터 유래된 것들, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등, 및 비독성 유기 아민으로부터 유래된 것들, 예를 들어, N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글

루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등을 포함한다.

[0267] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 약제학적으로 허용되는 항산화제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 항산화제의 예는 다음을 포함한다: (1) 수용성 항산화제, 예를 들어, 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 이황화나트륨, 나트륨 메타바이설피트, 나트륨 설피트 등; (2) 지용성 항산화제, 예를 들어, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니졸 (BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔 (BHT), 렉시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤, 등; 및 (3) 금속 킬레이팅제, 예를 들어, 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등.

[0268] 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물, 식물성유, 예를 들어, 올리브유, 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레이트를 포함한다. 적당한 유동성은 예를 들어, 렉시틴과 같은 코팅 물질의 사용으로, 분산의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용으로 유지될 수 있다.

[0269] 이들 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재의 예방은 상기 멸균화 과정에 의한 그리고 다양한 항생균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 콜레스테롤, 페놀 소르브산 등의 내포에 의한 둘 다로 보장될 수 있다. 또한 등장성제, 예를 들어, 당, 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 요구될 수 있다. 추가로, 주사가 가능한 약제학적 형태의 지연 흡수는 암모늄 모노스테아레이트 및 겔라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함하여 성취될 수 있다.

[0270] 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 약제학적으로 활성인 물질에 대한 상기 매질 및 제제의 용도는 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고는, 본 발명의 약제학적 조성물 중의 용도가 고려된다. 보충 활성 화합물은 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0271] 치료학적 조성물은 전형적으로 멸균성이고 제조 및 저장 조건하에서 안정해야만 한다. 상기 조성물은 용액, 미세에멀전, 리포솜 또는 높은 약물 농도에 적합할 수 있는 다른 정돈된 구조물로서 제형화될 수 있다. 상기 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어, 렉시틴과 같은 코팅의 사용으로, 분산 경우에 요구되는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용으로 유지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물 중에 등장성 제제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사가 가능한 조성물의 지연 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 겔라틴을 조성물에 포함시킴에 의해 성취될 수 있다.

[0272] 멸균 주사가 가능한 용액은 요구되는 바와 같이 상기 계수된 성분들 중 하나 또는 이의 조합으로 적당한 용매 중에서 요구되는 양으로 활성 화합물을 혼입시킴에 이어서 멸균 미세여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질, 및 상기 열거된 것들로부터 요구되는 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클로 혼입시킴에 의해 제조된다. 멸균 주사가 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 산제의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조(동결 건조)이고 이는 활성 성분 및 이의 이전의 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성시킨다.

[0273] 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료받을 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 다양하다. 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료학적 효과를 생성하는 조성물의 양이다. 일반적으로, 100%를 기준으로, 상기 양은 약제학적으로 허용되는 담체와 조합하여, 활성 성분의 약 0.01% 내지 약 99%, 바람직하게 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게 약 1% 내지 약 30%의 범위일 수 있다.

[0274] 투여 및 용량

[0275] 투여 용법은 최적의 목적하는 반응 (예를 들어, 치료학적 반응)을 제공하기 위해 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스가 투여될 수 있고, 여러 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나 상기 용량은 치료학적 상황의 긴급 사태에 의해 지적된 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 특히, 투여를 용이하게 하고 투여의 균일성을 위한 투여 단위 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단위 투여 형태로서 적합한 물리적으로 구분된 단위를 언급하고; 각각의 단위는 요구되는 약제학적 담체와 연합하여 치료학적 효과를 생성하는 것으로 계산된 활성 화합물의 미리결정된 양

을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태를 위한 세부 사항은 (a) 활성 화합물의 고유 특징 및 성취될 특정 치료학적 효과, 및 (b) 개체에서 민감성의 치료를 위한 상기 활성 화합물을 혼합하는 당업계에 고유한 한계에 의해 그리고 직접적으로 이에 의존하여 지시된다.

[0276] 항체의 투여를 위해, 상기 용량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 및 보다 일반적으로 0.01 내지 5 mg/kg (숙주 체중)의 범위이다. 예를 들어, 용량은 0.3 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중일 수 있거나 1-10 mg/kg 범위내일 수 있다. 예시적 치료 용법은 주당 1회 투여, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월 1회, 3개월 마다 1회 또는 3개월 내지 6개월 마다 1회를 수반한다. 본 발명의 항-PD-1 항체를 위해 바람직한 용량 용법은 정맥내 투여를 통한 1 mg/kg 체중 또는 3 mg/kg 체중을 포함하고 항체는 하기의 투여 스케줄 중 하나를 사용하여 투여된다: (i) 6회 용량에 대한 4주 마다, 이어서 3개월 마다; (ii) 3주 마다; (iii) 3 mg/kg 체중 1회에 이어서 3주 마다 1 mg/kg 체중.

[0277] 일부 방법에서, 상이한 결합 특이성을 갖는 2개 이상의 모노클로날 항체는 동시에 투여되고, 이 경우에 투여되는 각각의 항체 용량은 지정된 범위내에 있다. 항체는 일반적으로 다중 시점에 투여된다. 단일 용량 간의 간격은 예를 들어, 주마다, 개월 마다, 3개월 마다 또는 연간일 수 있다. 간격은 또한 환자내 표적 항원에 대한 항체의 혈액 수준을 측정함에 의해 지적된 바와 같이 불규칙할 수 있다. 일부 방법에서, 용량은 약 1-1000 µg/ml의 혈장 항체 농도 및 일부 방법에서는 약 25-300 µg/ml의 혈장 항체 농도를 성취하기 위해 조정된다.

[0278] 대안적으로, 항체는 지연 방출 제형으로서 투여될 수 있고, 이 경우에 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여 및 빈도는 환자 내 항체의 반감기에 의존하여 다양하다. 일반적으로, 인간 항체는 최장 반감기를 보여주고 이어서 인간화된 항체, 키메라 항체 및 비인간 항체이다. 투여 용량 및 빈도는 치료가 예방학적인지 또는 치료학적 인지에 따라 다양할 수 있다. 예방학적 적용에서, 상대적으로 낮은 용량은 장기간 동안 비교적 빈번하지 않은 간격으로 투여된다. 일부 환자는 이들의 나머지 생애 동안 치료를 계속 받는다. 치료학적 적용에서, 상대적으로 짧은 간격에서 비교적 높은 용량은 때로는 질환의 진행이 감소되거나 종결될 때까지 및 바람직하게는 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 보여줄때까지 요구된다. 이후, 환자는 예방학적 용법으로 투여될 수 있다.

[0279] 본 발명의 약제학적 조성물 중에 활성 성분의 실제 투여 수준은 환자에게 독성 없이, 특정 환자에 대한 목적하는 치료학적 반응, 조성물 및 투여 방식을 성취하기 위해 효과적인 활성 성분의 양을 수득하기 위해 다양할 수 있다. 선택된 투여 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물, 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 분비율, 치료의 지속기간, 사용되는 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 연령, 성별, 체중, 병태, 치료받는 환자의 일반 건강 및 사전 병력 등을 포함하는 다양한 약동학적 인자 및 의료 분야에서 널리 공지된 인자에 의존한다.

[0280] 본 발명의 항-SSEA4 항체의 "치료학적 유효량"은 바람직하게 질환 증상의 중증도의 감소, 질환 증상-부재 기간의 빈도 및 지속 기간의 증가 또는 질환의 영향으로 인한 손상 또는 불구의 예방을 유도한다. 예를 들어, 종양의 치료를 위해, "치료학적 유효량"은 비치료된 대상체와 비교하여, 바람직하게 적어도 약 20%, 보다 바람직하게 적어도 약 40%, 보다 더 바람직하게 적어도 약 60%, 및 여전히 보다 바람직하게 적어도 약 80% 까지 세포 성장 또는 종양 성장을 저해한다. 종양 성장을 저해하는 화합물의 능력은 인간 종양에서 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 상기 조성물의 성질은 당업자에게 공지된 검정에 의한 시험관내 억제와 같은 화합물이 억제하는 능력을 조사함에 의해 평가될 수 있다. 치료학적 화합물의 치료학적 유효량은 대상체에서 종양 크기를 감소시킬 수 있거나 다르게는 증상을 개선시킬 수 있다. 당업자는 대상체의 크기, 대상체 증상의 중증도 및 선택된 특정 조성물 또는 투여 경로와 같은 인자를 기준으로 상기 양을 결정할 수 있다.

[0281] 또 다른 양상에서, 본원의 개시내용은 본원에 기재된 바와 같이 항-SSEA4 항체를 포함하는 부분의 약제학적 키트를 제공한다. 상기 키트는 또한 추가로 과증식성 질환 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 암)의 치료에 사용하기 위한 지침서를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 항-SSEA4 항체는 예를 들어, PD-1 조절 및/또는 CAR-T 치료학적 제제와 같은 단위 용량 형태로 동시 패키징될 수 있다.

[0282] 또 다른 양상에서, 본원의 개시내용은 임의의 다른 "세포 치료요법" 또는 적응성 면역치료학적 방식과 조합하여 투여될 수 있는 치료학적 방법 및 조성물을 제공한다. 예시적 적응성 면역치료학적 방식은 예를 들어, 문헌(참조: Maus et al, Annu. Rev. Immunol. 2014. 32:189-225)에 기재되어 있고; 키메라 항원 수용체 (CAR-T) 치료요법, 항-PD-1 치료요법, 항-PD-L1 치료요법 및 항-CTLA4 치료요법 등을 포함할 수 있다.

[0283] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 다양하다. 본

발명의 항체에 대한 바람직한 투여 경로는 정맥내, 근육내, 종양내, 복막내, 피하, 척추 또는 투여의 다른 비경구 경로, 예를 들어, 주사 또는 주입을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비경구 투여"는 일반적으로 주사에 의한 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고 제한없이 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 캡슐내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 캡슐내, 지주막하, 척수내, 경막의 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

[0284] 대안적으로, 본 발명의 항체는 비-비경구 경로를 통해, 예를 들어, 국소, 상피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어, 비강내, 경구, 질내, 직장, 설하 또는 국소적으로 투여될 수 있다.

[0285] 활성 화합물은 신속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있고, 예를 들어, 조절 방출 제형이 있고, 이는 이식체, 경피 패치 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함한다. 생분해성 생체적합한 중합체가 사용될 수 있고, 예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 있다. 상기 제형의 제조를 위한 많은 방법은 특허되었거나 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌(*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)을 참조한다.

[0286] 치료학적 조성물은 당업계에 공지된 의학적 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 구현예에서, 본 발명의 치료학적 조성물은 미국 특허 제5,399,163호, 제5,383,851호, 제5,312,335호, 제5,064,413호, 제4,941,880호, 제4,790,824호, 또는 제4,596,556호에 기재된 장치와 같은 바늘 없는 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에 유용한 널리 공지된 이식체 및 모듈의 예는 다음을 포함한다: 조절된 비율로 분배 의약처리를 위한 이식가능한 마이크로-주입 펌프를 기재하는 미국 특허 제4,487,603호; 피부를 통해 의약을 투여하기 위한 치료학적 장치를 기재하는 미국 특허 제4,486,194호; 정확한 주입 비율로 의약을 전달하기 위한 의약처리 주입 펌프를 기재하는 미국 특허 제4,447,233호; 연속 약물 전달을 위한 다양한 유동 이식가능한 주입 장치를 기재하는 미국 특허 제4,447,224호; 다중-챔버 격실을 갖는 삼투압 약물 전달 시스템을 기재하는 미국 특허 제4,439,196호; 및 삼투압 약물 전달 시스템을 기재하는 미국 특허 제4,475,196호. 이들 특허 문헌은 본원에 참조로 인용된다. 많은 다른 상기 이식체, 전달 시스템 및 모듈은 당업자에게 공지되어 있다.

[0287] 특정 구현예에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 생체내 적당한 분배를 보장하기 위해 제형화될 수 있다. 예를 들어, 혈뇌 장벽(BBB)은 많은 고도의 친수성 화합물을 배제한다. 본 발명의 치료학적 화합물이 BBB를 통과하도록 (요구되는 경우) 보장하기 위해, 이들은 예를 들어, 리포솜에 제형화될 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법을 위해, 예를 들어, 미국 특허 제 4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 수송되어 표적화된 약물 전달을 증진시키는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다(문헌참조: 예를 들어, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). 예시적 표적화 모이어티는 폴레이트 또는 비오틴(문헌참조: 예를 들어, U.S. Pat. 5,416,016 to Low et al.); 만노시드(문헌참조: Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); 항체(문헌참조: P. G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); 계면활성제 단백질 A 수용체(문헌참조: Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); 또한, 문헌참조(K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273)를 포함한다.

[0288] 본 발명의 용도 및 방법

[0289] 본 발명의 항체, 항체 조성물 및 방법은 다수의 시험관내 및 생체내 용도를 갖는다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다. 예를 들어, 이들 분자는 다양한 상황에서 면역력을 증진시키기 위해, 배양내, 시험관내 또는 생체외로 세포에 투여될 수 있거나 인간 대상체에, 예를 들어 생체내로 투여될 수 있다. 따라서, 하나의 양상에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합부를 투여함을 포함하는 대상체에서 ADCC 반응을 변형시켜 대상체 내 ADCC 반응이 변형되도록 하는 방법을 제공한다. 바람직하게, 상기 반응은 증진되거나, 자극되거나 상향 조절된다.

[0290] 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 항-SSEA4 항체 또는 이의 항원 결합부를 투여함을 포함하는, 대상체에서 중앙 세포의 성장을 저해하는 방법을 제공한다. 바람직하게, 상기 항체는 인간 항-SSEA4 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 인간 항-SSEA4 항체)이다. 추가로 또는 대안적으로, 상기 항체는 키메라 또는 인간화된 항-SSEA4 항체일 수 있다.

[0291] 특정 구현예에서, 본원에 논의된 치료학적 항체의 조합은 약제학적으로 허용되는 담체 중 단일 조성물로서 동시

에 또는 약제학적 허용되는 담체 중 각각의 항체와 별도의 조성물로서 동시에 투여될 수 있다.

- [0292] **중양 성장을 저해하는 항체**
- [0293] 본원에서는 SSEA4에 특이적으로 결합하는 신규한 재조합 항-SSEA4 항체 또는 이의 유도체, 및 암의 치료와 같은 항-중양 면역치료요법에 사용하기 위한 방법이 제공된다. 일단 암 항원에 결합되면, 항체는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성을 유도할 수 있고, 보체 시스템을 활성화시킬 수 있고 중양의 성장을 억제할 수 있다.
- [0294] 하나의 구현예에서, SSEA4는 뇌 종양 세포, 폐 종양 세포, 유방 종양세포, 경구 종양세포, 식도 종양 세포, 위 종양 세포, 간 종양 세포, 담관 종양 세포, 췌장 종양 세포, 결장 종양세포, 신장 종양 세포, 자궁경관 세포, 난소 종양 세포, 전립선 종양 세포를 포함하는, 다양한 종양 세포상에서 고도로 발현된다.
- [0295] 하나의 구현예에서, 모노클로날 항-SSEA4 항체는 SSEA4 분자에 특이적으로 결합한다.
- [0296] 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 항-SSEA4 항체를 포함하는 조성물은 항-암 치료요법에 유용하다. 특히, 본 발명의 구현예는 다양한 항-SSEA4 결합부에 사용될 수 있는, 특이적 항-SSEA4 항체의 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 제공한다. 특히, 본 발명은 SSEA4 또는 이의 유도체에 결합할 수 있는 인간화된 항체 또는 키메라 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0297] 특정 구현예에서, CDR 서열은 캐뱃 방법에 의해 한정된다.
- [0298] 특정 구현예에서, 항-SSEA4 항체는 중양 성장의 저해 활성을 갖는다.
- [0299] 특정 구현예에서, 단리된 항-SSEA4 항체는 모노클로날 항체이다. SSEA4에 대한 모노클로날 항체는 당업계 지식 또는 기술에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 이것은 인간 배아 암종 세포를 시험 대상체에 주사함에 이어서 목적하는 서열 또는 이의 기능적 특성을 갖는 항체를 발현하는 하이브리도마를 단리시킴에 의해 제조될 수 있다.
- [0300] 하나의 구현예에서, 본원의 개시내용은 표적 결합시 항체가 CDC 유도 활성을 갖는, SSEA4에 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공한다.
- [0301] 하나의 구현예에서, 본원의 개시내용은 표적 결합시 항체가 ACDC 유도 활성을 갖는, SSEA4에 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공한다.
- [0302] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다: (i) 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 또는 이의 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성의 보존된 서열 동족체; 및 (ii) 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 또는 이의 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성의 보존된 서열 동족체.
- [0303] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다: (i) 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 또는 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체; 및 (ii) 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 또는 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체.
- [0304] 하나의 구현예에서, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부는 추가로 다음을 포함한다: (i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택되는 H-CDR1 또는 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151, 및 171로부터 선택되는 H-CDR2 또는 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체, 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택되는 H-CDR3 또는 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체를 각각 추가로 포함하는 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체, 및 (ii) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1 또는 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 이

의 보존된 서열 동족체; 및 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택되는 L-CDR2 또는 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체, 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157, 및 177로부터 선택되는 L-CDR3 또는 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체를 추가로 포함하는 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 또는 이의 80% 이상의 보존된 서열 동족체.

- [0305] 하나의 구현예에서, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부는 다음을 포함한다: (i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택되는 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151, 및 171로부터 선택되는 H-CDR2, 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택되는 H-CDR3을 각각 추가로 포함하는 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체, 및 (ii) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 및 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택되는 L-CDR2, 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157, 및 177로부터 선택되는 L-CDR3을 추가로 포함하는 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체.
- [0306] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다: (i) 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역, 및 (ii) 서열번호 15, 45, 55, 65, 75, 85, 105, 125, 135, 145, 155 및 175로부터 선택되는 L-CDR1; 및 서열번호 16, 46, 56, 66, 76, 86, 106, 126, 136, 146, 156 및 176으로부터 선택되는 L-CDR2, 및 서열번호 17, 47, 57, 67, 77, 87, 107, 127, 137, 147, 157, 및 177로부터 선택되는 L-CDR3을 추가로 포함하는 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체.
- [0307] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 다음을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다: (i) 서열번호 10, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150 및 170으로부터 선택되는 H-CDR1; 서열번호 11, 41, 51, 61, 71, 81, 101, 121, 131, 141, 151, 및 171로부터 선택되는 H-CDR2, 서열번호 12, 42, 52, 62, 72, 82, 102, 122, 132, 142, 152 및 172로부터 선택되는 H-CDR3을 각각 추가로 포함하는 서열번호 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 103, 123, 133, 143, 153, 및 173으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 또는 10개 미만의 아미노산 치환을 함유하는 이의 보존된 서열 동족체, 및 (ii) 서열번호 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 108, 128, 138, 148, 158, 및 178로부터 선택되는 경쇄 가변 영역.
- [0308] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 표 2A-2D에서 각각의 변이체에 제시된 바와 같이, 각각의 상응하는 VH, VL 및 각각의 H-CDR 및 L-CDR을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0309] 본원에 사용된 바와 같은, 동족체 또는 보존된 서열 동족체는 참조 서열과 비교하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖고/갖거나, 참조 서열과 비교하여 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 각각의 상응하는 VH, VL 및 각각의 H-CDR 및 L-CDR을 포함하는 SSEA4를 표적화하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.
- [0310] 특정 구현예에서, 항-SSEA4 항체는 모노클로날 항체이다.
- [0311] 특정 구현예에서, 항-SSEA4 항체는 키메라 또는 인간화된 항체이다.
- [0312] 하나의 양상에서, 골격 서열은 인간 컨센서스 골격서열 또는 인간 생식선 골격 서열로부터 유래한다.
- [0313] 추가의 양상에서, 중쇄 가변 도메인, 항체 또는 항원 결합 단편은 적어도 C_H1 도메인을 추가로 포함한다.
- [0314] 추가의 양상에서, 중쇄 가변 도메인, 항체 또는 항원 결합 단편은 C_H1, C_H2 및 C_H3 도메인을 추가로 포함한다.
- [0315] 추가의 양상에서, 가변 영역 경쇄, 항체 또는 항원 결합 단편은 적어도 C_L 도메인을 추가로 포함한다.

- [0316] 추가의 양상에서, 항체는 C_H1, C_H2, C_H3 및 C_L 도메인을 추가로 포함한다.
- [0317] 추가의 특정 양상에서, 항체는 인간 또는 뮤린 불변 도메인을 추가로 포함한다.
- [0318] 여전히 추가의 양상에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0319] 추가의 양상에서, 핵산은 이전에 기재된 임의의 항-SSEA4 항체를 암호화하는 핵산의 발현을 위해 적합한 벡터를 추가로 포함한다. 여전히 추가의 특이적 양상에서, 벡터는 핵산의 발현을 위해 적합한 숙주 세포를 추가로 포함한다. 여전히 추가의 특정 양상에서, 숙주 세포는 진핵 세포 또는 원핵 세포이다. 특정 양상에서, 진핵 세포는 포유동물 세포, 예를 들어, 차이나이즈 햄스 난소 (CHO)이다. 또 다른 양상에서, 세포는 효모 세포이다.
- [0320] 하나의 양상에서, 본 발명은 항체 또는 단편을 생성하기 위해 적합한 조건하에서 발현을 위해 적합한 형태로 임의의 이전에 기재된 항-SSEA4 항체 또는 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산을 함유하는 숙주 세포를 배양하고 상기 항체 또는 단편을 회수함을 포함하는, 항-SSEA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0321] 하나의 구현예에서, 본 발명은 본원에 제공된 바와 같은 항-SSEA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0322] 하나의 양상에서, 본원의 개시내용은 표적 결합시 항체가 ACDC 및 CDC 유도 활성을 갖는, SSEA4에 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공한다.
- [0323] 본원에 기재된 임의의 항체는 전장 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 Fab 단편, F(ab')₂ 단편 또는 단일쇄 Fv 단편이다. 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 Fab 단편, F(ab')₂ 단편 또는 단일쇄 Fv (scFv) 단편이다. 일부 실시예에서, 단리된 항체는 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체 또는 단일쇄 항체이다.
- [0324] 본원에 기재된 임의의 항체는 하기의 하나 이상의 특징을 갖는다:
- [0325] a) 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 항체 단편, 이특이적 항체, 1특이적 항체, 1가 항체, IgG 항체 또는 항체의 유도체;
- [0326] b) 인간, 뮤린, 인간화된 또는 키메라 항체, 항체의 항원 결합 단편 또는 유도체;
- [0327] c) 단일쇄 항체 단편, 멀티바디, Fab 단편 및/또는 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD 이소형 및/또는 이의 아부류의 면역글로불린;
- [0328] d) 하기의 특징 중 하나 이상을 가짐: (i) 암 세포의 ADCC 및/또는 CDC를 매개함; (ii) 암 세포의 아포토시스를 유도하고/하거나 촉진시킴; (iii) 암 세포의 표적 세포의 증식을 저해함; (iv) 암 세포의 식세포작용을 유도하고/하거나 촉진시킴; 및/또는 (v) 세포독성 제제의 방출을 유도하고/하거나 촉진시킴;
- [0329] e) 종양 특이적 탄수화물 항원인 종양 관련 탄수화물 항원에 특이적으로 결합함;
- [0330] f) 비-암 세포, 비-종양 세포, 양성 암 세포 및/또는 양성 종양 세포 상에서 발현되는 항원에 결합하지 않음; 및/또는
- [0331] g) 암 줄기 세포 상에서 및 정상 암 세포 상에 발현되는 종양 관련 탄수화물 항원에 특이적으로 결합함.
- [0332] 항체는 고 친화성 (낮은 K_D 값)으로 이의 표적 에피토프에 결합하는데 적합하고, 바람직하게 K_D는 나노 몰 범위 이하이다. 친화성은 예를 들어 표면 플라즈몬 공명과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0333] 특정 구현예에서, 예시적 항-SSEA4 항체 또는 항원-결합 단편은 하나 이상의 세포독성 제제, 화학치료학적 제제 또는 치료학적 항체와 조합함에 의해 종양 성장을 저해하거나 감소시킨다.
- [0334] 하나의 구현예에서, 본 발명은 스페이서에 의해 항-CD3 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는 T 세포-결합 분자에 융합되거나 연결되는 예시적 항-SSEA4 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 이특이적 항체의 조성물을 제공한다.
- [0335] 또 다른 구현예에서, 본발명은 예시적 항-SSEA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 세포의 도메인, CAR을 세포막에 부착시키는 막관통 도메인, 및 CAR이 SSEA4와 반응하면 활성화 신호를 전송하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)의 조성물을 제공한다. CAR은 SSEA4를 발현하는 암 세포를 표적화하고 사멸

시키기 위해, T 세포, NK 세포, 및 NKT 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는 면역 세포 상에서 유전학적으로/인공적으로 발현될 수 있다.

[0336] 본 발명은 추가의 제한으로서 해석되지 말아야 하는 하기의 실시예로 추가로 설명한다. 모든 도면 및 본원의 전반에 걸쳐 인용된 모든 참조문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 명백하게 참조로 본원에 인용된다.

[0337] **실시예**

[0338] **실시예 1: 다양한 암 세포주에 대한 글로보-시리즈 글리코스핑고지질 발현의 검출**

[0339] 뇌 종양 세포, 폐 종양 세포, 유방 종양 세포, 경구 종양 세포, 식도 종양 세포, 위 종양 세포, 간 종양 세포, 담관 종양 세포, 췌장 종양 세포, 결장 종양 세포, 신장 종양 세포, 자궁경관 종양 세포, 난소 종양 세포, 전립선 종양 세포 (표 4)를 포함하는 다양한 암 세포주의 세포(1×10^5)를 30분 동안 병상에서 50 μ L FACS 완충액 (1% FBS를 갖는 PBS 용액) 중에서 0.5 μ g Alexa Flour 488-접합된 항-SSEA3 mAb (MC-631), 항-SSEA4 mAb (MC813-70), 또는 알로피코시아닌 (APC)-접합된 항-GloboH mAb (VK9, 기증: Philip O. Livingston, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York). 렉틴 염색을 위해, 세포는 비오틴화된 렉틴을 함유하는 렉틴-결합 완충액 [1% BSA, 0.5 \times Carbo-부재 차단 완충액 (Vector Laboratories), 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂] 중에서 병상에서 30분 동안 항온처리하였다. 렉틴-결합 완충액으로 2회 세척한 후, 세포는 스트렙타비딘-APC(FACS 완충액 중에 1-500배 희석됨; Biolegend)로 항온처리하였다. 200 μ L의 FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 세포는 1 μ g/mL 프로피듐 요오다이드 (PI)를 함유하는 200 μ L FACS 완충액 중에 재현탁시키고 분석에 적용하였다. 데이터 획득은 FACSDiva 소프트웨어 (BD Biosciences)를 사용하여 FACSCanto (BD Biosciences) 상에서 수행하였고, 데이터 분석은 FlowJo 소프트웨어 (TreeStar)를 사용하여 수행하였다. 생존 PI⁻ 세포는 분석을 위해 게이팅하였다. 메탄올 세척 동안, 세포를 세척하고 실온에서 15분 동안 PBS 중에 4% (wt/vol) 파라포름알데하이드로 고정시킴에 이어서 특이적 항체로 염색하기 전에 메탄올 중에서 10분 동안 항온처리하였다.

[0340] **실시예 2: 예시적 모노클로날 항-SSEA4 항체를 생성하고 제조하기 위한 대표적 방법**

[0341] 하이브리도마 기술은 SSEA4에 특이적이고/이거나 이를 표적화하는 모노클로날 항체를 생성하기 위해 사용하였다. 예를 들어, 6주령의 암컷 Balb/c 마우스 (Biolasco, Taiwan)는 2주 간격에서 10^7 NCCIT 세포로 3회 복막내 주사하였다. 혈청은 3번째 면역화 후 1주째에 수거하였고 항-SSEA4 IgG 및/또는 IgM 항체의 역가는 ELISA에 의해 측정하였다. ELISA는 0.1 μ g의 BSA-접합된 SSEA4로 코팅된 96웰 점검 플레이트를 사용함에 의해 수행하였다. 1주 후, 이어서 융합 기준을 충족하는 마우스에 10^7 NCCIT 세포를 최종 부스팅하였다. 최종 부스트 후 3일째에 마우스를 희생시키고 이들 마우스로부터 비장 세포를 하이브리도마를 생성하기 위해 사용하였다. BSA-접합된 SSEA4에 양성이고 BSA에 음성인 하이브리도마 클론은 추가로 서브클로닝하여 모든 하이브리도마 클론이 단일 세포로부터 유래함을 확인하였다. 하나의 예시적 수행에서, 총 10 SSEA4-양성 하이브리도마 클론은 5,000개 초과 클론으로부터 선택하였다. 이들 클론 중에서, 유일한 Ab6은 IgG이고, 나머지 다른 것은 IgM 항체들이다. Ab6의 아부류는 항체 이소형분류 키트에 의해 추가로 결정하였고, 상기 결과는 Ab6에 대한 이소형이 IgG3, 카파임을 보여주었다. 서열분석 후, Ab6의 뮤린 가변 영역 (V_H 및 V_L)은 PCR 증폭시키고 인간 IgG1의 불변 영역 (C_H 및 C_L)을 함유하는 발현 벡터에 서브클로닝하여 chAb6인 인간-마우스 키메라 항체를 생성하였다.

[0342] **실시예 3: ELISA에 의한 SSEA4로의 예시적 항-SSEA4 항체의 결합**

[0343] 예시적 키메라 및 인간화된 항-SSEA4 항체의 SSEA4로의 결합 친화성은 ELISA에 의해 결정하였다. 간략하게, 항체는 지정된 농도에서 PBS 중에서 희석시키고 이어서 실온에서 1시간 동안 96-웰 플레이트에서 BSA-접합된 SSEA4와 항온처리하였다. 세척 사이클 후, HRP-접합된 염소 항-인간 IgG 항체 (PBS 중에서 1:10,000 희석, Jackson Immuno Research)를 웰에 첨가하고 또 다른 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 세척 사이클 후, TMB ELISA 기질 (Abcam)은 발색 동안 첨가하고 반응은 동일 용적의 2N H₂SO₄를 첨가하여 종료하였다. O.D. 450 nm에서 흡광도를 판독하고 M5 ELISA 판독기 (Molecular Device)로 기록하였다. (도 6a-6d)

[0344] **실시예 4: 췌장 암 세포주 HPAC에 대한 chAb6의 결합 친화성**

[0345] 유동 세포측정 분석 동안, 5×10^5 HPAC 세포는 FACS 완충액 (PBS 중 1% FBS)에서 4°C에서 30분 동안 지정된 농도에서 chAb6로 항온처리하였다. FACS 완충액에 의한 세척 후, 세포는 이어서 30분 동안 4°C에서 PE-접합된 염소 항-인간 IgG 항체 (FACS 완충액 중에서 1:250 희석됨, Jackson Immuno Research)로 항온처리하였다. 항-

SSEA4 항체의 세포로의 결합은 이어서 BD FACSVerser 유동 세포측정기에 의해 분석하였다. (도 10a-10b)

[0346]

실시예 5: 예시적 항-SSEA4 항체의 결합 특이성

[0347]

예시적 항-SSEA4 항체의 결합 특이성은 152 화학적으로 합성된 글리칸과 함께 글리칸 마이크로어레이를 사용함에 의해 분석하였다(도 7). 간략하게, 글리칸 마이크로어레이는 1시간 동안 37°C에서 지정된 농도로 항체로 항온처리하였다. PBST (PBS 중에서 0.05% Tween 20)에 의해 세척한 후, 이어서 글리칸 마이크로어레이는 실온에서 1시간 동안 FITC-표지된 염소 항-인간 IgG 항체로 항온처리하였다. 또 다른 세척 사이클에 이어서, 글리칸 마이크로어레이는 공기 건조시키고 635 nm에서 마이크로어레이 형광 칩 판독기 (4000B, Genepix)에 의해 스캐닝하였다. 이어서 데이터는 GenePix Pro-6.0 (Axon Instruments)에 의해 분석하였다.

[0348]

실시예 6: 췌장 종양 세포주 HPAC에 대한 chAb6의 항체-의존성 세포성 세포 독성 (ADCC) 활성

[0349]

높은 SSEA4 발현을 갖는 칼세인 AM-표지된 HPAC 세포인 인간 췌장 종양 세포는 처음 PBMC와 혼합하였고 이어서 항-SSEA4 항체는 지정된 농도에서 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 세포 상등액을 수거하고 ex.485 nm /em.535 nm에서 검출하고 세포 세포독성의 퍼센트는 다음과 같이 계산하였다: (실험 값 - 자발적 용해)/(최대 용해 - 자발적 용해) x 100. (도 12)

[0350]

실시예 7: 췌장 종양 세포주 HPAC에 대한 chAb6의 보체-의존성 세포 독성 (CDC) 활성

[0351]

CDC 검정을 위해, 2x10⁵ HPAC 세포는 37°C에서 1시간 동안 지정된 농도에서 15%의 인간 혈청 및 항-SSEA4 항체로 항온처리하였다. 항온처리 후, 죽은 세포를 실온에서 5분 동안 프로피듐 요오다이드 (PI)로 염색하고, 이어서 BD FACSVerser 유동 세포측정에 의해 계수하고 분석하였다(도 15a).

[0352]

실시예 8: HPAC 이종이식체 모델에서 예시적 항-SSEA4 항체의 생체내 항-종양 효능

[0353]

생체내 예시적 항-SSEA4 항체의 항-종양 효능을 평가하기 위해, 8주령의 암컷 CB17.SCID 마우스 (Biolasco, Taiwan)에 5x10⁶ HPAC 세포를 주사하였다. 종양이 형성되고 용적이 50 내지 100 mm³에 도달하고, 비히클 또는 예시적 항-SSEA4 항체 (20 mpk)를 주 당 2회 꼬리 정맥내 주사하였다. 종양 성장은 수직 종양 직경, 길이(L) 및 폭 (W)을 베니어 캘리퍼로 측정함에 의해 주 마다 2회 모니터링하였다. 종양의 용적(V)은 식 $V=LW^2/2$ 로 계산하였다. 24일째 (이식 후 24일), 마우스를 희생시키고 종양 무게를 측정하였다. 모든 결과는 평균± S.D로서 나타냈으며(각각의 그룹에 대해 n = 3), 스튜던트 t 시험은 통계학적 분석을 위해 사용하였다. (도16a-16b)

[0354]

실시예 9. 예시적 chAb6을 사용함에 의한 종양 조직내 발현된 SSEA4 검출

[0355]

면역조직화학 (IHC)을 사용하여 종양 조직 내 SSEA4의 존재를 검출하였다(도 19). 간략하게, HPAC 이종이식체 종양의 동결된 절편을 처음 10분 동안 실온에서 10% 중성 완충 포르말린 (Sigma-Aldrich)으로 고정시키고, 내인성 퍼옥시다제 활성은 절편을 RT에서 15분 동안 ddH₂O에서 0.3% 과산화수소/0.1% 아지드화나트륨 중에 침지시킴에 의해 켜졌다. 세척 사이클 후(PBS, 3회, 각각에 대해 5분), 절편을 4°C에서 밤새 2 µg/mL의 FITC-표지된 chAb6 또는 인간 IgG1, 카파로 항온처리하였다. 밤새 항온 처리 후, 절편을 이어서 세척하고 실온에서 1시간 동안 HRP-표지된 염소 항-FITC 항체 (1:200, KPL)로 항온처리하였다. 또 다른 세척 사이클 후, DAB 기질 (Vector laboratories)은 발색을 위해 사용하였고, 헤마톡실린(Sigma-Aldrich)은 카운터 염색을 위해 사용하였다.

[0356]

실시예 10 장애의 치료

[0357]

암의 위험에 처하거나 이를 앓고 있는 대상체는 면역 반응 증강을 필요로 할 수 있고 이는 가용성 형태로 본 발명의 SSEA4 항체를 사용한 치료가 이득이 된다. 가장 통상적으로, 항체는 느린 정맥내 (IV) 주입에 의해 약 0.1-10 mg/kg 용량에서 주마다 투여함에 의해 외래환자 세팅으로 투여한다. 적당한 치료학적 유효량의 길항체는 치료 임상외에 의해 선택되고 대략 1 µg/kg 내지 20 mg/kg, 1 µg/kg 내지 10 mg/kg, 1 µg/kg 내지 1 mg/kg, 10 µg/kg 내지 1 mg/kg, 10 µg/kg 내지 100 µg/kg, 100 µg 내지 1 mg/kg, 및 500 µg/kg 내지 5 mg/kg의 범위이다. 본 발명의 SSEA4 항체는 개월 당 1회 이하의 빈도로 투여하는 것으로 예상된다. 치료 지속기간은 1개월과 수년 사이의 범위일 수 있다.

[0358]

인간에서 항체의 임상 효능을 시험하기 위해, 암을 갖는 개체를 동정하고 치료 그룹으로 무작위화하였다. 치료 그룹은 위약 그룹 및 SSEA4 항체 (상이한 용량)로 치료받은 1 내지 3개 그룹을 포함한다. 개체는 향후 1 내지 3년 동안 계속 치료한다. 치료를 받은 개체는 개선을 나타내는 것으로 예상된다.

- [0359] **실시예 11: 표면 플라즈몬 공명에 의한 예시적 항-SSEA4 항체의 동력학적 결합 검증.**
- [0360] 예시적 항-SSEA4 항체의 동력학적 결합은 Biacore T200 시스템을 사용하여 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 분석하였다. 첫번째로, 비오틴화된 SSEA4는 센서 칩 SA 상에 고정화시켰다. 대표적인 항-SSEA4 항체 hAb6-3.1, hAb6-3 및 chAb6은 전개 완충액 (0.05 % Tween-20을 함유하는 1 x PBS, pH7.4)에서 100, 33.3, 11.1, 3.7, 1.2 nM의 농도로 연속으로 희석시키고, 이어서 단일-사이클 방식을 사용하여 5분 동안 30 uL/min으로 주사하였다. 파라미터의 분석은 BIA평가 소프트웨어에 의해 수행하였다. (도 5)
- [0361] **실시예 12: 유동 세포측정 분석에 의한 예시적 항-SSEA4 항체의 세포로의 결합**
- [0362] 유동 세포측정 분석 동안, 유방암 세포주 MDA-MB-231, MCF7과 같은 3×10^5 압 세포는 FACS 완충액 (PBS 중 1% FBS)에서 4°C에서 30분 동안 지정된 농도에서 예시적 항-SSEA4 항체로 항온처리하였다. FACS 완충액에 의한 세척 후, 세포는 이어서 30분 동안 4°C에서 PE- 또는 Alexa Fluor488-접합된 염소 항-인간 IgG 항체 (FACS 완충액 중에서 1: 250 내지 1:400 희석됨, Jackson Immuno Research)로 항온처리하였다. 항-SSEA4 항체의 세포로의 결합은 이어서 BD FACSVerser 유동 세포측정기에 의해 분석하였다. (도 9a-9b 및 도 11a-11f)
- [0363] **실시예 13: 유방 및 췌장 암 세포주에 대한 예시적 키메라 및 인간화된 Ab6의 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 활성.**
- [0364] MDA-MB-231, MCF7 및 HPAC 세포는 20 uM의 칼세인 AM으로 30분 동안 표지시킨다. 세척 후, 칼세인-AM 표지된 표적 세포 (1×10^4 세포/웰)을 새로운 단리된 인간 PBMC (2.5×10^5 세포/웰, E/T 비율 = 25/1)와 동시 항온처리하고, 4시간 동안 연속으로 희석된 항-SSEA4 항체로 처리하거나 처리하지 않았다. 칼세인-AM의 방출은 M5 ELISA 판독기 (ex. 485, em. 520)로 검출하고 상대적 세포독성의 평가를 위해 사용하였다. (도 13, 도 14a-14b)
- [0365] **실시예 14: 유방 및 췌장 암 세포주에 대한 예시적 키메라 및 인간화된 Ab6의 보체-의존성 세포성 세포독성 (CDC) 활성.**
- [0366] HPAC를 위해, 2×10^5 세포는 37°C에서 1시간 동안 지정된 농도에서 15%의 인간 혈청 및 항-SSEA4 항체로 항온처리하였다. 항온처리 후, 죽은 세포를 실온에서 5분 동안 프로피듐 요오다이드 (PI)로 염색하고, 이어서 BD FACSVerser 유동 세포측정에 의해 계수하고 분석하였다. (도 15a).
- [0367] MCF7에 대해, 세포는 처음으로 20 uM 의 칼세인 AM으로 표지시켰다. 세척 후, 칼세인-AM 표지된 표적 세포 (검정 당 1×10^4 세포)는 10%의 인간 혈청으로 동시 항온처리하고 37°C에서 2시간 동안 지정된 농도에서 항-SSEA4 항체로 처리하거나 처리하지 않았다. 칼세인-AM의 방출은 M5 ELISA 판독기 (ex. 485, em. 520)로 검출하고 상대적 세포독성의 평가를 위해 사용하였다. (도 15b).
- [0368] **실시예 15: MDA-MB-231 이종이식체 모델에서 항-SSEA4 항체의 생체내 항-종양 효능**
- [0369] 생체내 항-SSEA4 항체의 항-종양 효능을 평가하기 위해, 8주령의 암컷 Balb/c 누드 마우스에 5×10^6 MDA-MB-231 세포를 정위 주사하였다. 종양이 형성되고 용적이 100 내지 150 mm³에 도달하고, 비히클, 헤르셉틴 (Herceptin) 또는 항-SSEA4 항체 (20 mpk)를 주 당 2회 꼬리 정맥내 주사하였다. 종양 성장은 수직 종양 직경, 길이(L) 및 폭 (W)을 베니어 캘리퍼로 측정함에 의해 주 마다 2회 모니터링하였다. 종양의 용적 (V)은 식 $V=LW^2/2$ 로 계산하였다. 모든 결과는 평균± SEM (각각의 그룹에 대해 n = 8)으로 나타내었고, 스튜던트 시험은 통계학적 분석을 위해 사용하였다. (도 17)
- [0370] **실시예 16: MCF7 이종이식체 모델에서 항-SSEA4 항체의 생체내 항-종양 효능**
- [0371] MCF7 이종이식체 모델을 확립하기 위해, 암컷 Balb/c 누드 마우스 (8주령, 제조원 (Biolasco, Taiwan)으로부터 구입함)에 피하내로 17-베타-에스트라디올 펠렛을 1일째에 이식하였다. 5백만 MCF7 세포는 매트릭셀과 혼합하고 이어서 포유동물 지방 패드에 정위 주사하였다. 종양이 형성되고 용적이 150 내지 200 mm³에 도달하고, 비히클 또는 hAb6-3.1 (지정된 용량에서)을 주 당 2회 꼬리 정맥내 주사하였다. 종양 성장은 수직 종양 직경, 길이 (L) 및 폭 (W)을 베니어 캘리퍼로 측정함에 의해 주 마다 2회 모니터링하였다. 종양의 용적 (V)은 식 $V=LW^2/2$ 로 계산하였다. 모든 결과는 평균± SEM으로서 나타내었고 (각각의 그룹에 대해 n = 7), 스튜던트 t 시험은 통계학적 분석을 위해 사용하였다. (도 18)

- [0372] **실시예 17: 당-가공된 hAb6-3.1의 개발을 위한 예시적 방법**
- [0373] 당-가공된 hAb6-3.1의 생성
- [0374] 예시적 항-SSEA4 항체 hAb6-3.1의 글리칸은 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다제 및 푸코시다제와의 동시 항온처리를 통해 모노-GlcNAc 형태로 가수분해하였다. 당-가공된 항체는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다제 돌연변이체의 존재하에 모노-GlcNAc 상으로 범용 글리칸을 트랜스당화시킴에 의해 생성하고 이어서 r단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다. 당-가공된 hAb6-3.1의 특징 분석은 SDS-PAGE 및 유동 세포측정 분석 (각각 도 20 및 21)에 의해 수행하였다.
- [0375] 당-가공된 hAb6-3.1의 시험관내 기능성 검증
- [0376] 글리코가공은 면역 세포 상에 발현되는 Fc 감마 수용체로의 항체의 결합 친화성을 개선시키고 이는 보호기능을 면역계에 기여하는 것으로 나타났다. 본원 발명자는 하기와 같이 당-가공된 hAb6-3.1의 Fc 감마 수용체 IIIA 결합 및 ADCC 기능 (항체-의존성 세포-매개된 세포독성)을 입증하였다.
- [0377] Fc 감마 수용체 IIIA 결합
- [0378] Fc 감마 수용체 IIIA는 ELISA 플레이트 상에 코팅시키고 지정된 농도에서 본래 및 당-가공된 항체로 항온처리하였다. 결합 활성은 이어서 HRP-접합된 항-인간 IgG H+L 및 TMB 기질을 사용함에 의해 결정하였다. (도 22)
- [0379] ADCC 검증
- [0380] 높은 SSEA-4 발현을 갖는 인간 3중-음성 유방암 세포주인 칼세인 AM-표지된 MDA-MB-231 세포를 처음 PBMC와 혼합하였고 이어서 본래의 또는 당-가공된 항-SSEA-4 항체는 지정된 농도에서 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 세포 상등액을 수거하고 ex.485/em.535에서 검출하고 세포 세포독성의 퍼센트는 다음과 같이 계산하였다: (실험 값 - 자발적 용해)/(최대 용해 - 자발적 용해) x 100. (도 23)
- [0381] 항-SSEA-4 항체의 글리코가공은 Fc 감마 수용체 IIIA로의 항체의 결합을 상당히 증진시켰고 이는 본래의 항체와 비교하여 개선된 항체-의존성 세포독성 (ADCC) 활성을 유도한다.
- [0382] **실시예 18: 항체-약물 접합 복합체의 개발/형성을 위한 대표적인 방법**
- [0383] 여러 화학적 접근법은 라이신 및 시스테인 잔기 상의 티올-멜리미드 형성과 같은 항체-약물 접합(Lewis Phillips et al., 2008), 셀레노시스테인 잔기 상에 셀레놀-말레이미드 형성(Hofer et al., 2009), 변형된 Fc 글리칸으로의 옥심 연결(Zhou et al., 2014), 클릭 화학(Axup et al., 2012), 포틸글라이신 잔기로의 하이드라지노-이소-픽테트-스펜글러 연결(Drake et al., 2014)을 위해 가능하다. 본원 발명자는 본원 발명의 예시적 ADC 형성 접근법으로서 변형된 Fc 글리칸 상으로의 대표적인 옥심 연결의 사용을 채택하였다. 항체 및 페이로드 화합물 A1 상에 변형된 글리칸 사이에 옥심 연결 (알콕시아민-절단가능한 링커를 사용한 세포독성 약물 MMAE, M.W.: 1348.7265)은 25°C에서 pH 4.5에서 100 mM 아세트이트 완충액 중에서 항체 (8 mg/mL) 및 A01 (3 mM)의 존재하에 수행하였다. 반응은 48시간 동안 항온처리하고 생성물은 r단백질 A, Capto S 및 Capto Q 칼럼에 의해 연속으로 정제하였다. hAb6-3.1-A01 복합체 형성 결과는 SDS-PAGE로 분석하였다(도 24a-b).
- [0384] **실시예 19: 유동 세포측정에 의한 SSEA4-발현하는 세포로의 hAb6-3.1-A01의 결합 능력**
- [0385] SSEA4-발현 세포주 MCF7 및 SKOV3은 PBS로 세척하고 1×10^5 의 세포는 10 ug/mL의 hAb6-3.1 또는 hAb6-3.1-A01로 FACS 완충액(2% FBS 및 0.1% NaN_3 를 함유하는 PBS) 중에서 1시간 동안 빙상에서 항온처리하였다. PBS로 세척 후, 세포는 Alexa-Fluor 488 표지된 항-인간 IgG 항체로 염색시키고 0.5시간 동안 빙상에서 항온처리하였다. 항체의 세포 결합을 위한 신호는 유동 세포측정에 의해 검출하였다(도 XX11AB). 상기 결과는 hAb6-3.1-A01 내지 SSEA4-발현 세포로의 hAb6-3.1-A01의 결합 성질이 모 항체 hAb6-3.1과 유사함을 지적했다. (도 25a-b)
- [0386] **실시예 20: 유방 암 세포주에서 시험관내 세포 세포독성 검증**
- [0387] MCF7, SSEA4-발현 유방암 세포주는 96-웰 화이트 플레이트(1×10^3 세포/웰)에 씨당하고 밤새 37°C에서 항온처리하였다. 상기 세포는 연속 희석된 hAb6-3.1 또는 hAb6-3.1-A01로 처리하고 추가로 5일 동안 항온처리하였다. 처리 후, 배양 배지를 제거하고 세포는 CellTiter Glo 시약 (Promega)으로 처리하였다. 발광 신호는 10분 동안 항온처리 후 ELISA 판독기 (M5)에 의해 검출하고 세포 생존력을 계산하였다(비처리된 세포의 신호는 100%의 생존력으로 설정하였다).

- [0388] 도 26에 나타낸 바와 같이, hAb6-3.1-A01은 용량 의존적 방식으로 세포독성을 수행하였다. ADC는 S자형 곡선을 나타내고 표적 SSEA-4로의 특이적 결합을 지적한다. 대조적으로, hAb6-3.1 단독은 만흔 세포독성을 갖지 않는다. 상기 결과는 ADC가 특이성 및 세포독성 둘 다의 이점을 성취함을 지적한다. 보존된 세포독성은 예상된 치료학적 효과를 성취하고 특이성은 암 세포를 표적화하고 정상 세포를 유지함으로써 부작용을 최소화한다.
- [0389] **실시예 21: 난소 암 세포주에서 시험관내 세포 세포독성 검정**
- [0390] SKOV3, SSEA4-발현 난소암 세포주는 hAb6-3.1-A01의 효능을 입증하기 위해 적용하였다. 세포 세포독성 검정의 방법은 실시예 20에 기재하였다. hAb6-3.1-A01은 나노-몰 수준에서 SKOV3에 대한 세포독성의 보다 강력한 효능을 나타냈다.
- [0391] 확인된 모든 특허 및 다른 공보는 명백히 기재하고 개시할 목적으로 본원에 참조로 인용되고, 예를 들어, 상기 방법은 본 발명과 연계하여 사용될 수 있는 상기 공보에 기재한다. 이들 공보는 본원의 출원일 전에 이들의 개시를 위해서만 제공된다. 이와 관련하여 어떠한 것도 본 발명이 선행 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유 때문에 상기 기재 보다 선행되지 않은 것임을 인정하는 것으로서 해석되지 말아야 한다. 이들 참조자료의 내용에 관한 날짜 또는 제공에 대한 모든 진술은 출원인에 가용한 정보를 기준으로 하고 이들 참조자료의 날짜 또는 내용의 정확성에 대한 임의의 인정을 구성하지 않는다.
- [0392] 달리 정의되지 않는 경우, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 기술자에 의해 통사적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 임의의 공지된 방법, 장치 및 재료가 본 명의 수행 또는 시험에 사용될 수 있지만, 이와 관련된 방법, 장치 및 재료는 본원에 기재된다.

도면

도면1a

캐벳, abM, 초티아, 접촉 및 IMGT 방법 각각에서 대표적인 항-SSEA4 항체 chab6의 CDR

H-CDR1

방법	정의	서열
캐벳	H31-H35B	NYGVS
AbM	H26-H35	GFSLKNYGVS
초티아	H26-H32...H34	GFSLKNY[GV]
접촉	H30-H35	KNYGVS
IMGT	온라인 예측	GFSLKNYG

H-CDR2

방법	정의	서열
캐벳	H50-H65	VIWGDGSTNYHSTLRS
AbM	H50-H58	VIWGDGSTN
초티아	H52-H56	WGDGS
접촉	H47-H58	WLGVIWGDGSTN
IMGT	온라인 예측	IWGDGST

H-CDR3

방법	정의	서열
캐벳	H95-H102	PGAGYAMDY
AbM	H95-H102	PGAGYAMDY
초티아	H95-H102	PGAGYAMDY
접촉	H93-H101	AKPGAGYAMD
IMGT	온라인 예측	AKPGAGYAMDY

L-CDR1

방법	정의	서열
캐벳	L24-L34	SASSSVSYM
AbM	L24-L34	SASSSVSYM
초티아	L24-L34	SASSSVSYM
접촉	L30-L36	VSYMHWY
IMGT	온라인 예측	SSVSY

L-CDR2

방법	정의	서열
캐벳	L50-L56	DTSKLTS
AbM	L50-L56	DTSKLTS
초티아	L50-L56	DTSKLTS
접촉	L46-L55	LWIYDTSKLT
IMGT	온라인 예측	DTS

L-CDR3

방법	정의	서열
캐벳	L89-L97	FQGSYPLT
AbM	L89-L97	FQGSYPLT
초티아	L89-L97	FQGSYPLT
접촉	L89-L96	FQGSYPL
IMGT	온라인 예측	FQGSYPLT

도면1b

중쇄

	H-CDR1	H-CDR2
chAb6	QVQLKESGPGLVAPSSQLSITCTVSGFSLKNYGVS W RQPPGKLEWL G VIWGDGSTNYH	
hAb6-3.1	QVQLQESGPGLVAPSSQLSITCTVSGFSLKNYGVS W RQPPGKLEWL G VIWGDGSTNYH	
	H-CDR3	
chAb6	STLRSRLTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPGAGYAMDYWGQGTSVTVSS	
hAb6-3.1	STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPGRGYAMDYWGQGLTVTVSS	

경쇄

	L-CDR1	L-CDR2
chAb6	QIVLTQSPAIMSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR	
hAb6-3.1	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR	
	L-CDR3	
chAb6	FSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYCFQGSYPLTFGGGKLEIKR	
hAb6-3.1	FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGSYPLTFGGGKLEIKR	

도면1c

중쇄

chAb6	QVQLKESGPGLVAPSSQLSITCTVSGFSLKNYGVS W RQPPGKLEWL G VIWGDGSTNYH
hAb6-2	QVQLKESGPGLVAPSSQLSITCTVSGFSLKNYGVS W RQPPGKLEWL G VIWGDGSTNYH
hAb6-3	QVQLQESGPGLVAPSSQLSITCTVSGFSLKNYGVS W RQPPGKLEWL G VIWGDGSTNYH
chAb6	STLRSRLTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPGAGYAMDYWGQGTSVTVSS
hAb6-2	STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPGAGYAMDYWGQGTSVTVSS
hAb6-3	STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPGAGYAMDYWGQGLTVTVSS

경쇄

chAb6	QIVLTQSPAIMSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
hAb6-2	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
hAb6-3	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
chAb6	FSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYCFQGSYPLTFGGGKLEIKR
hAb6-2	FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDVATYYCFQGSYPLTFGGGKLEIKR
hAb6-3	FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGSYPLTFGGGKLEIKR

도면1d

중쇄

hAb6-3 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLK NYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.1 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLK NYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.2 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLK SYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.3 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLK NYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.4 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLK NYGVSWVRQPPGKGLEWIGVIWGDGSTNYH

hAb 6-3 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPGAGYAMDYWGQGLTVTVSS
 hAb6-3.1 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLTVTVSS
 hAb6-3.2 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLTVTVSS
 hAb6-3.3 SALRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLTVTVSS
 hAb6-3.4 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLTVTVSS

경쇄

hAb6-3 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.1 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.2 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.3 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDT SSKLTSGVPGR
 hAb6-3.4 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWYDT VSKLTSGVPGR

hAb6-3 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.1 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.2 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.3 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.4 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYPLTFGGGTKVEIKR

도면1e

중쇄

hAb6-3 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLKNYGVSWWRQPPGKLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.101 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLKNYGVSWWRQPPGKLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.103 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLKNYGVSWWRQPPGKLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.105 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLKNYGVSWWRQPPGKLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.106 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLKNYGVSWWRQPPGKLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.107 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLKNYGVSWWRQPPGKLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.108 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLKNYGVSWWRQPPGKLEWIGVIWGDGSTNYH
 hAb6-3.110 QVQLQESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLKNYGVSWWRQPPGKLEWIGVIWGDGSTNYH

hAb6-3 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTD DTATYYCAKPGAGYAMDYWGQGT LVTVSS
 hAb6-3.101 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTD DTATYYCAKPGRGYAMDYWGQGT LVTVSS
 hAb6-3.103 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTD DTATYYCAKPGRGYAMDYWGQGT LVTVSS
 hAb6-3.105 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTD DTATYYCAKPGRGYAMDYWGQGT LVTVSS
 hAb6-3.106 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTD DTATYYCAKPGRGYAMDYWGQGT LVTVSS
 hAb6-3.107 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTD DTATYYCAKPGRGYAMDYWGQGT LVTVSS
 hAb6-3.108 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTD DTATYYCAKPGRGYAMDYWGQGT LVTVSS
 hAb6-3.110 STLRSRVTISKDNSKSQLFLKLNRLQTD DTATYYCAKPGRGYAMDYWGQGT LVTVSS

경쇄

hAb6-3 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQK SSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.101 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQK SSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.103 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQK SSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.105 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQK SSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.106 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQK SSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.107 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQK SSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.108 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQK SSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
 hAb6-3.110 EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQK SSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR

hAb6-3 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGS GYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.101 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGS GYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.103 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGS GYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.105 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGS GYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.106 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGS GYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.107 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGS GYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.108 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGS GYPLTFGGGTKVEIKR
 hAb6-3.110 FSGSGSGNSYTLTISSMEAEDAATYYCFQGS GYPLTFGGGTKVEIKR

도면2

chAb6

중쇄

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLKNYGVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHST
 LRSRLTISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPGAGYAMDYWGQGSTVTVSS

경쇄

QIVLTQSPAIMSVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQKSSSTSPKLWIYDTSKLTSGVPGRFS
 GSGSGNSYSLT ISSMEAEDVATYYCFQSGGYPLTFGGGTKLEIKR

인간화된 Ab6-2

중쇄

QVQLKESGPGLVAPSQ[]LSITCTVSGFSLKNYGVSWVRQPPGKGLEW[]GVIWGDGSTNYHST
 LRSR[]TISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPGAGYAMDYWGQGSTVTVSS

경쇄

[]IVLTQSPAI[]SVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQKSSSTSPKLWIYDTSKLTSGVPGRFS
 GSGSGNSY[]LT ISSMEAEDVATYYCFQSGGYPLTFGGGTKLEIKR

인간화된 Ab6-3

중쇄

QVQL[]ESGPGLVAPSQ[]LSITCTVSGFSLKNYGVSWVRQPPGKGLEW[]GVIWGDGSTNYHST
 LRSR[]TISKDNSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKPGAGYAMDYWGQGT[]VTVSS

경쇄

[]IVLTQSPAI[]SVYPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQKSSSTSPKLWIYDTSKLTSGVPGRFS
 GSGSGNSY[]LT ISSMEAED[]ATYYCFQSGGYPLTFGGGTK[]EIKR

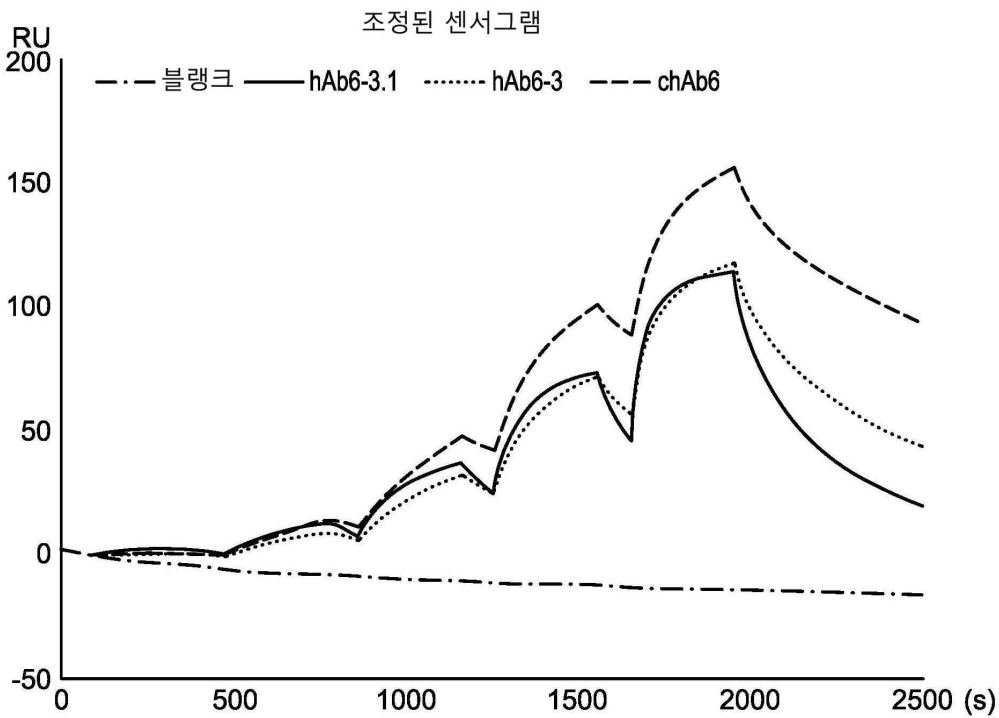
도면3

H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	H13	H14	H15			
Q	V	Q	L	K	E	S	G	P	G	L	V	A	P	S			
H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30			
Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	K			
H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43	H44	H45			
N	Y	G	V	S	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L			
H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60			
E	W	L	G	V	I	W	G	D	G	S	T	N	Y	H			
H61	H62	H63	H64	H65	H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75			
S	T	L	R	S	R	L	T	I	S	K	D	N	S	K			
H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85	H86	H87	H88	H89	H90
S	Q	L	F	L	K	L	N	R	L	Q	T	D	D	T	A	T	Y
H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H101	H102	H103	H104	H105		
Y	C	A	K	P	G	A	G	Y	A	M	D	Y	W	G	Q		
H106	H107	H108	H109	H110	H111	H112	H113	H114									
G	T	S	V	T	V	S	S	-									

도면4

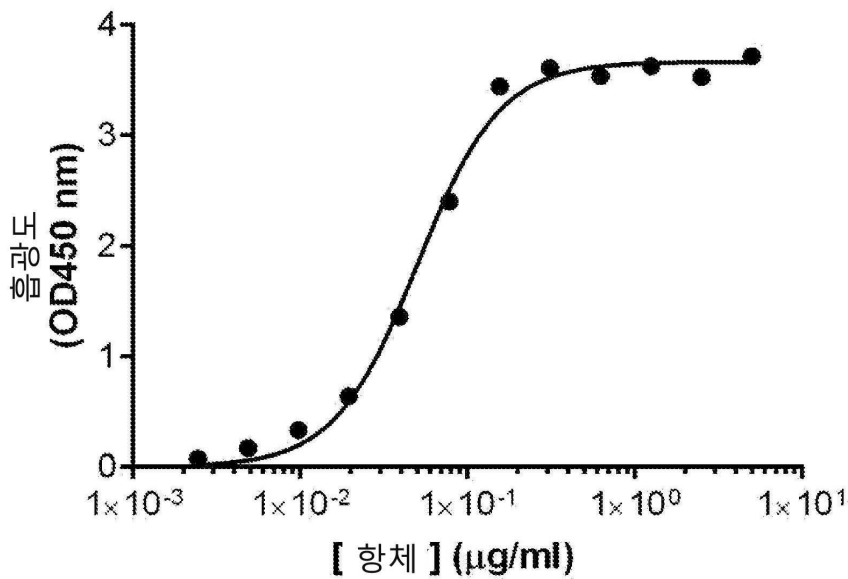
L01	L02	L03	L04	L05	L06	L07	L08	L09	L10	L11	L12	L13	L14	L15
Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	V	Y	P
L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30
G	E	K	V	T	M	T	C	S	A	S	S	-	S	V
L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43	L44	L45
S	Y	M	H	W	Y	Q	Q	K	S	S	T	S	P	K
L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60
L	W	I	Y	D	T	S	K	L	T	S	G	V	P	G
L61	L62	L63	L64	L65	L66	L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75
R	F	S	G	S	G	S	G	N	S	Y	S	L	T	I
L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89	L90
S	S	M	E	A	E	D	V	A	T	Y	Y	C	F	Q
L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105
G	S	G	Y	P	L	T	F	G	G	G	T	K	L	E
L106	L107	L108	L109	L110	L111									
I	K	R	-	-	-									

도면5

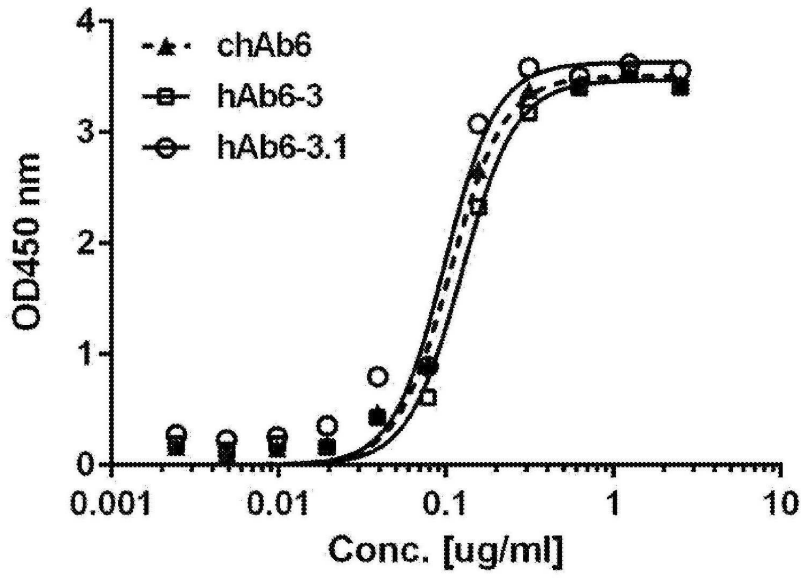


모드	1:1 결합				
파라미터	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (nM)	Rmax (RU)	χ^2 (RU ²)
hAb6-3.1	2.4×10^5	5.6×10^{-3}	23.1	128.16	2.74
hAb6-3	1.7×10^5	3.0×10^{-3}	17.8	131.08	1.99
chAb6	0.9×10^5	0.9×10^{-3}	10.11	164.90	3.43

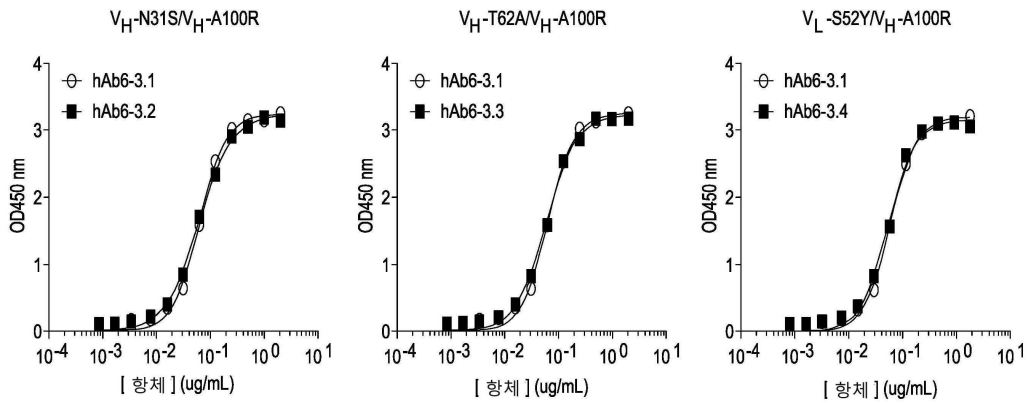
도면6a



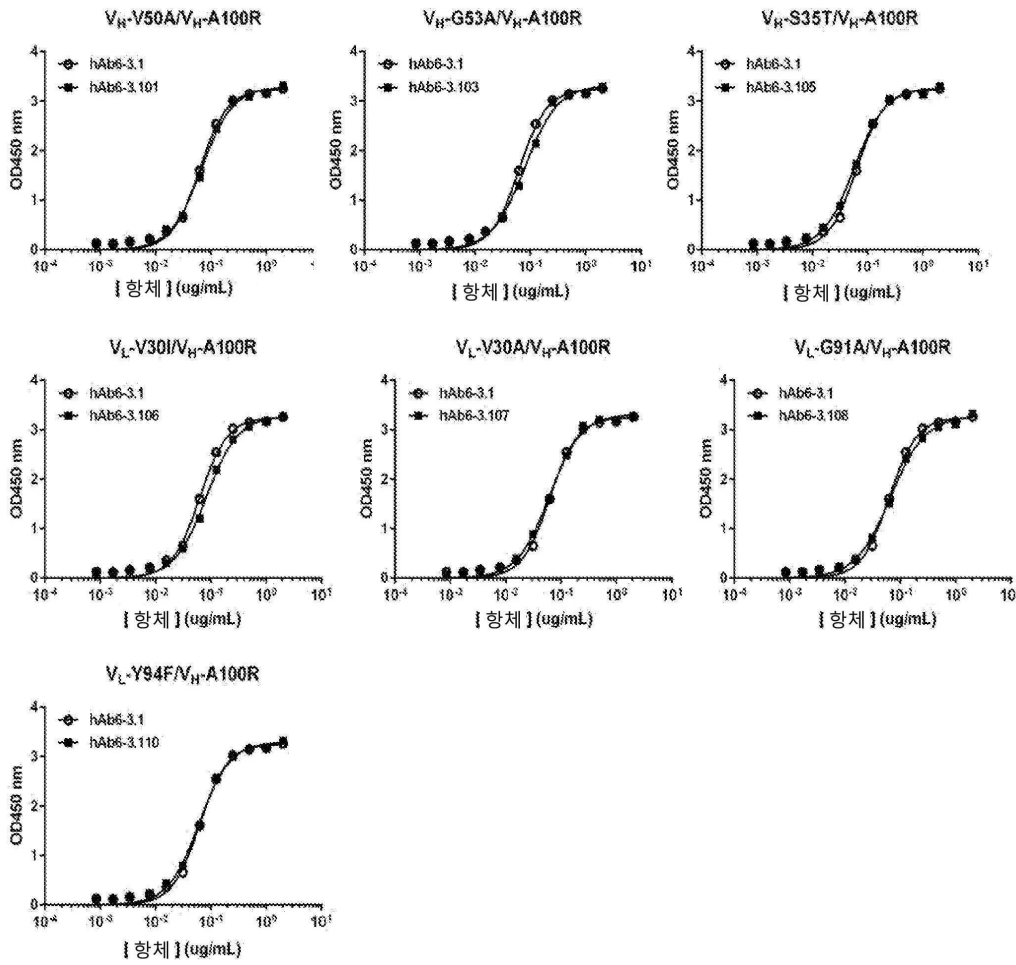
도면6b



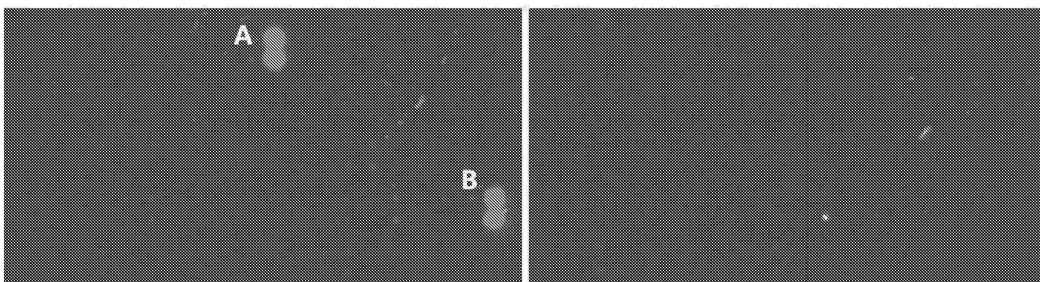
도면6c



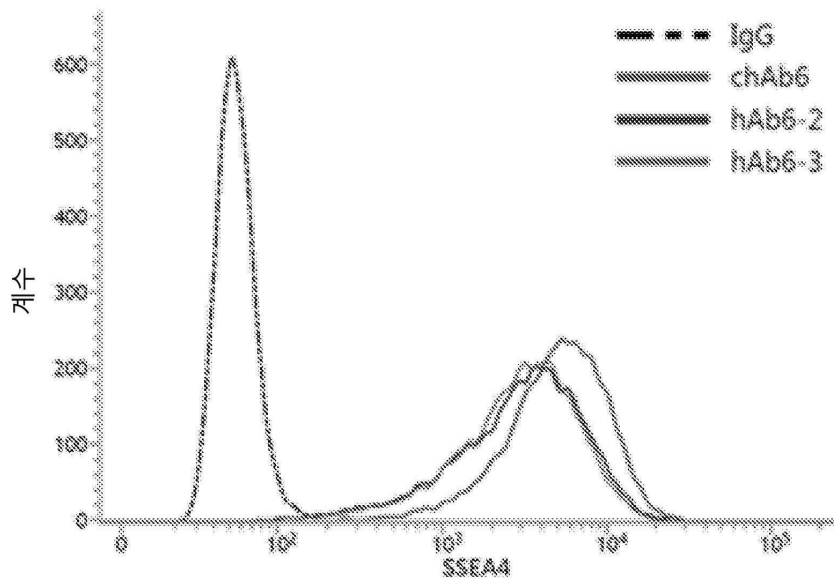
도면6d



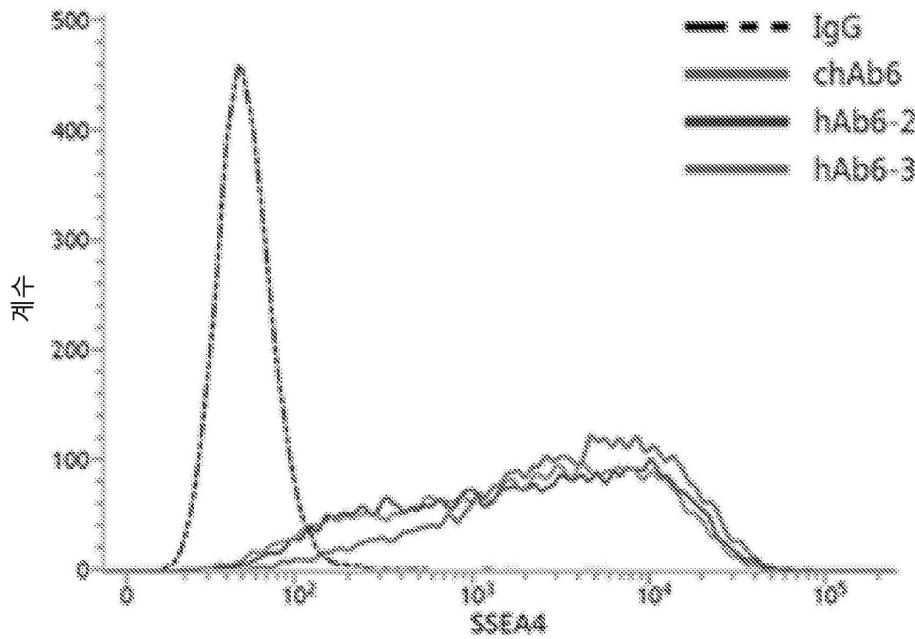
도면7



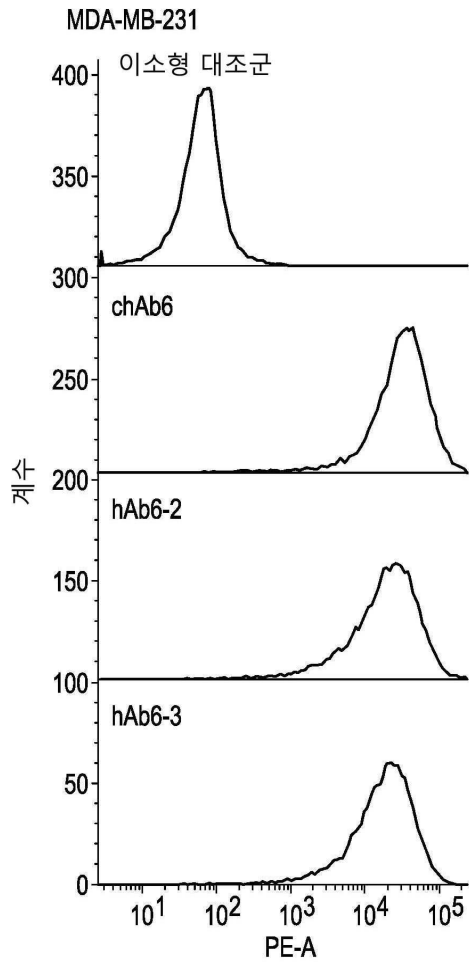
도면8a



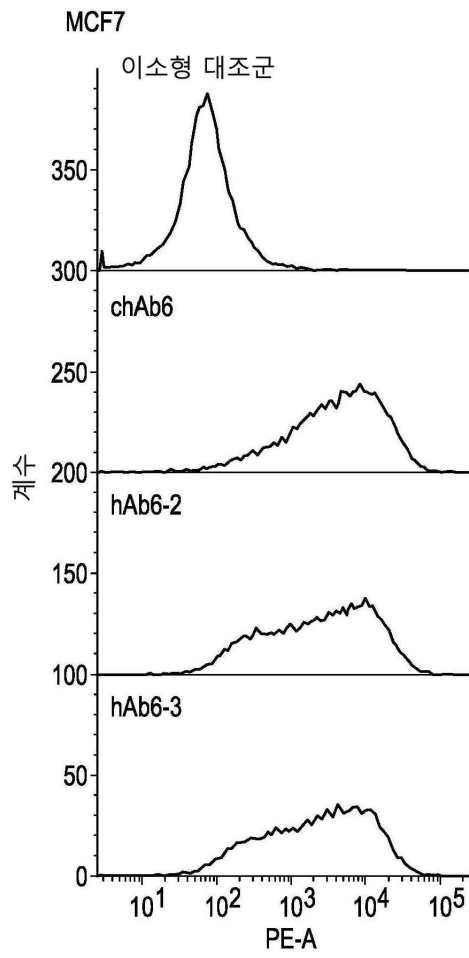
도면8b



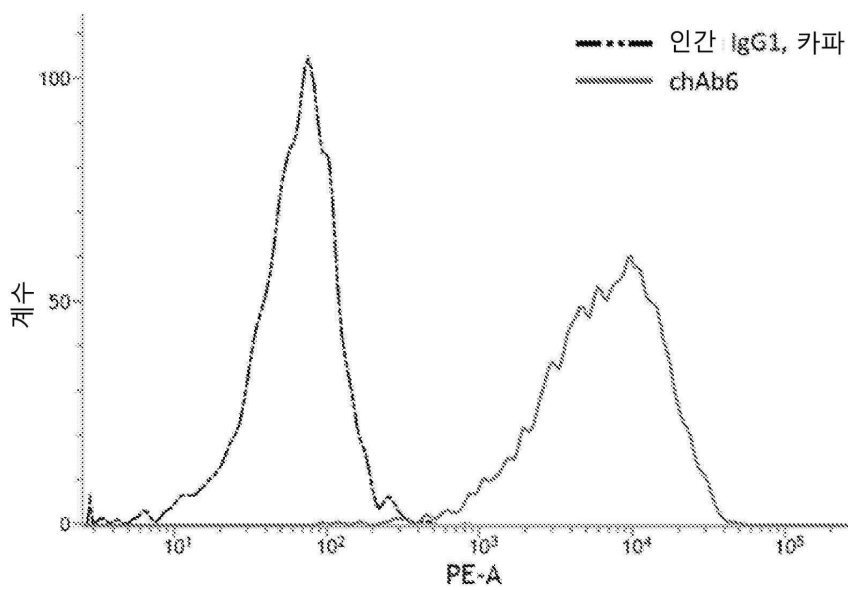
도면9a



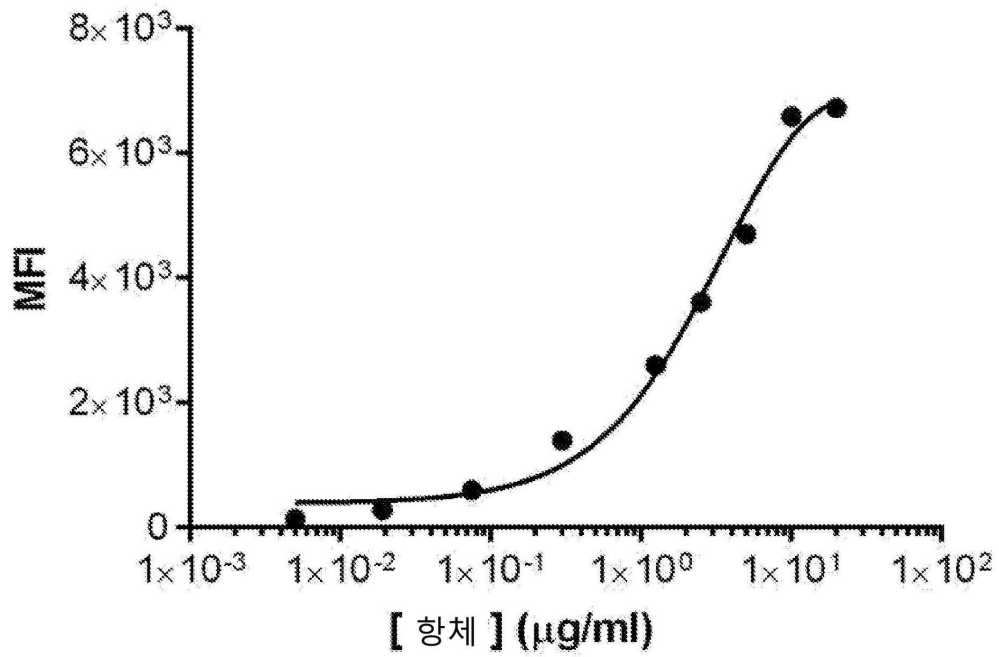
도면9b



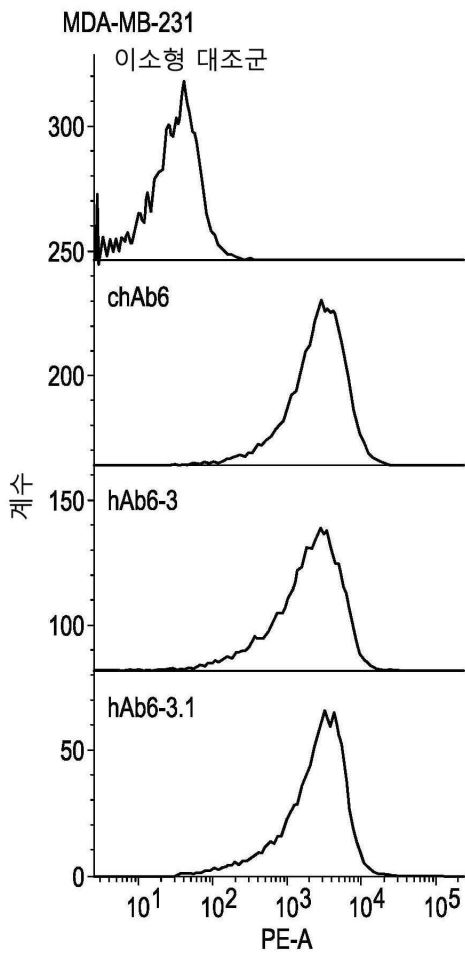
도면10a



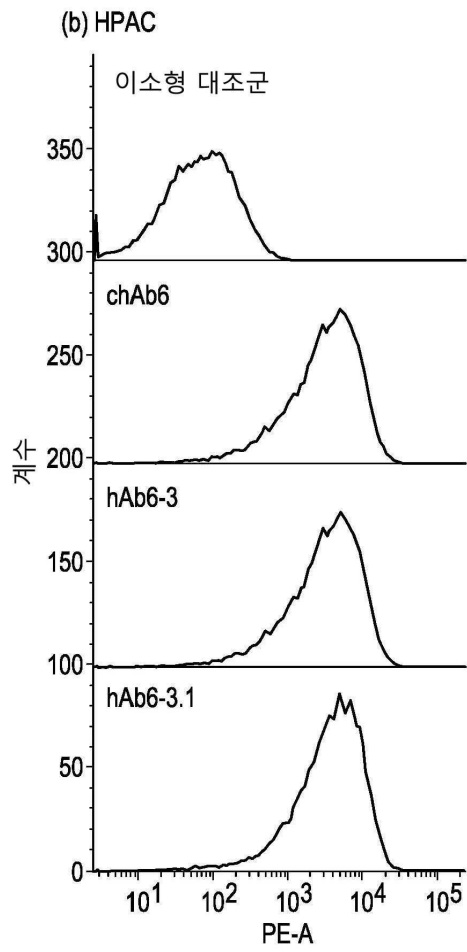
도면10b



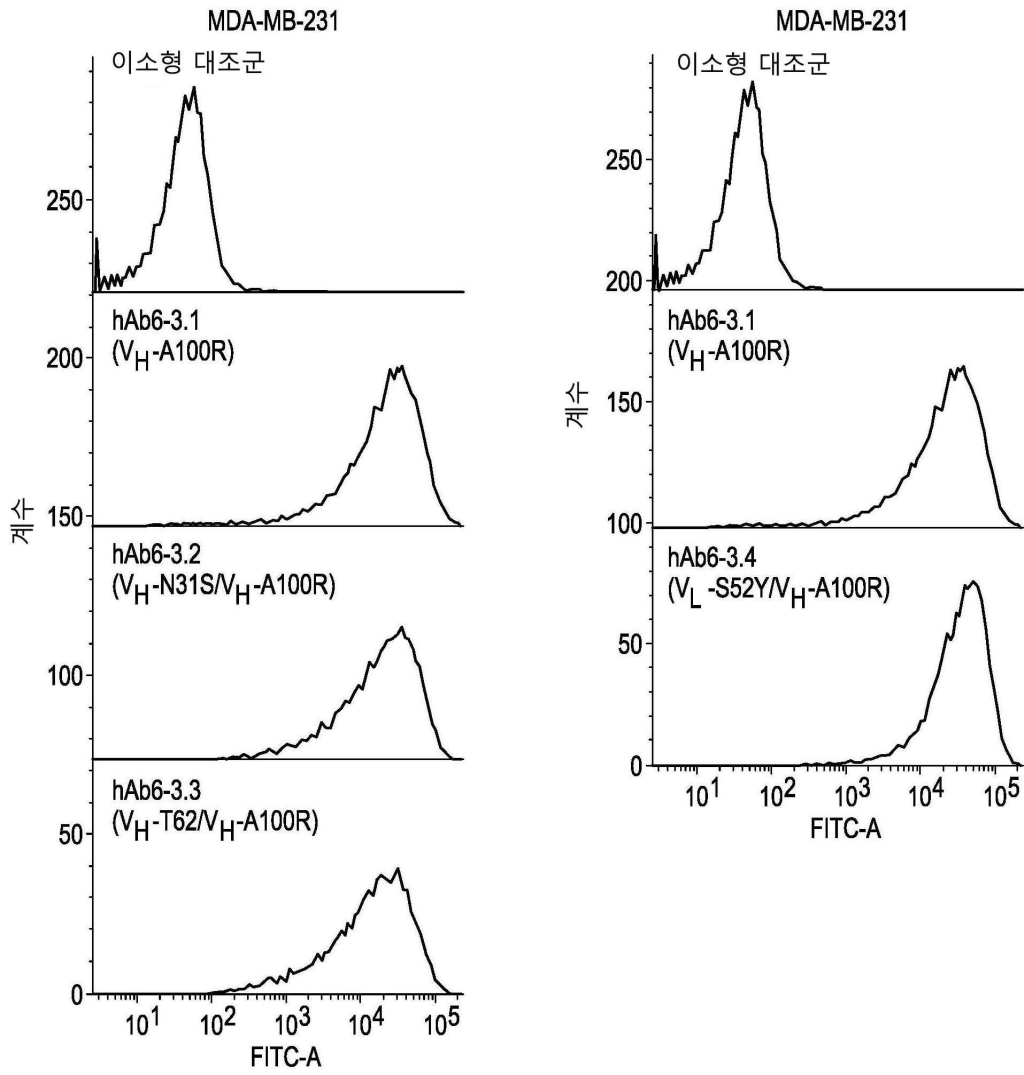
도면11a



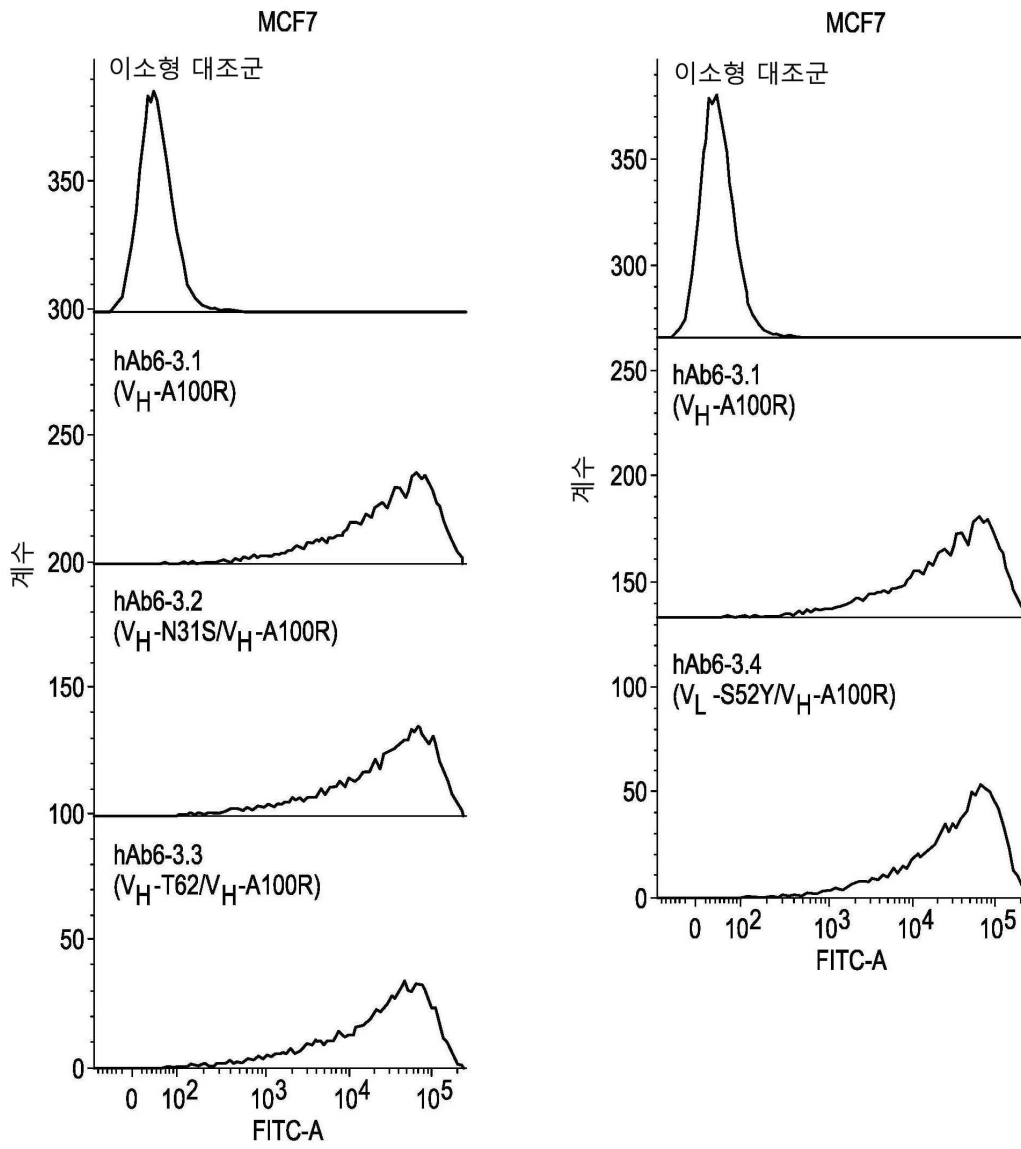
도면11b



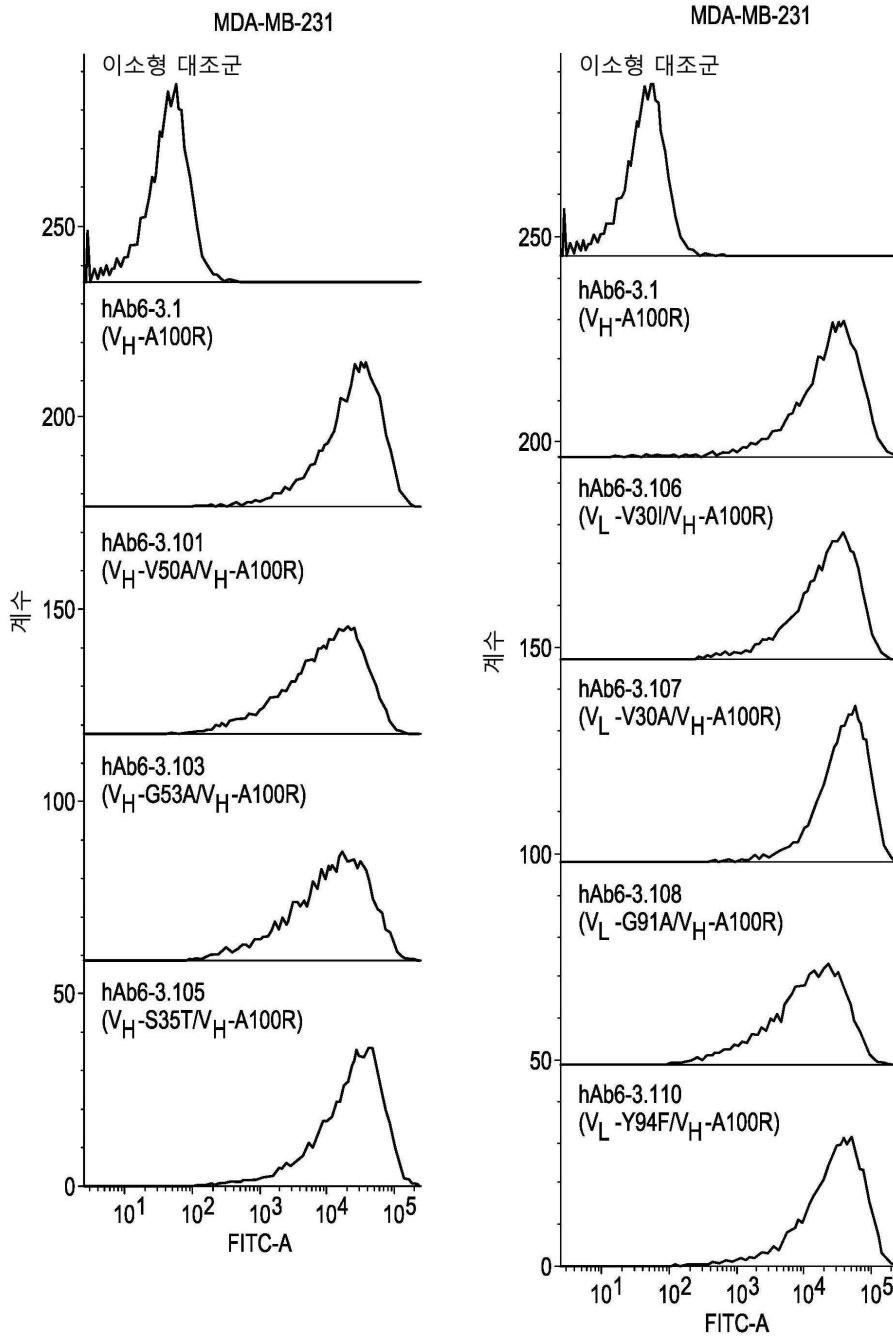
도면11c



도면11d

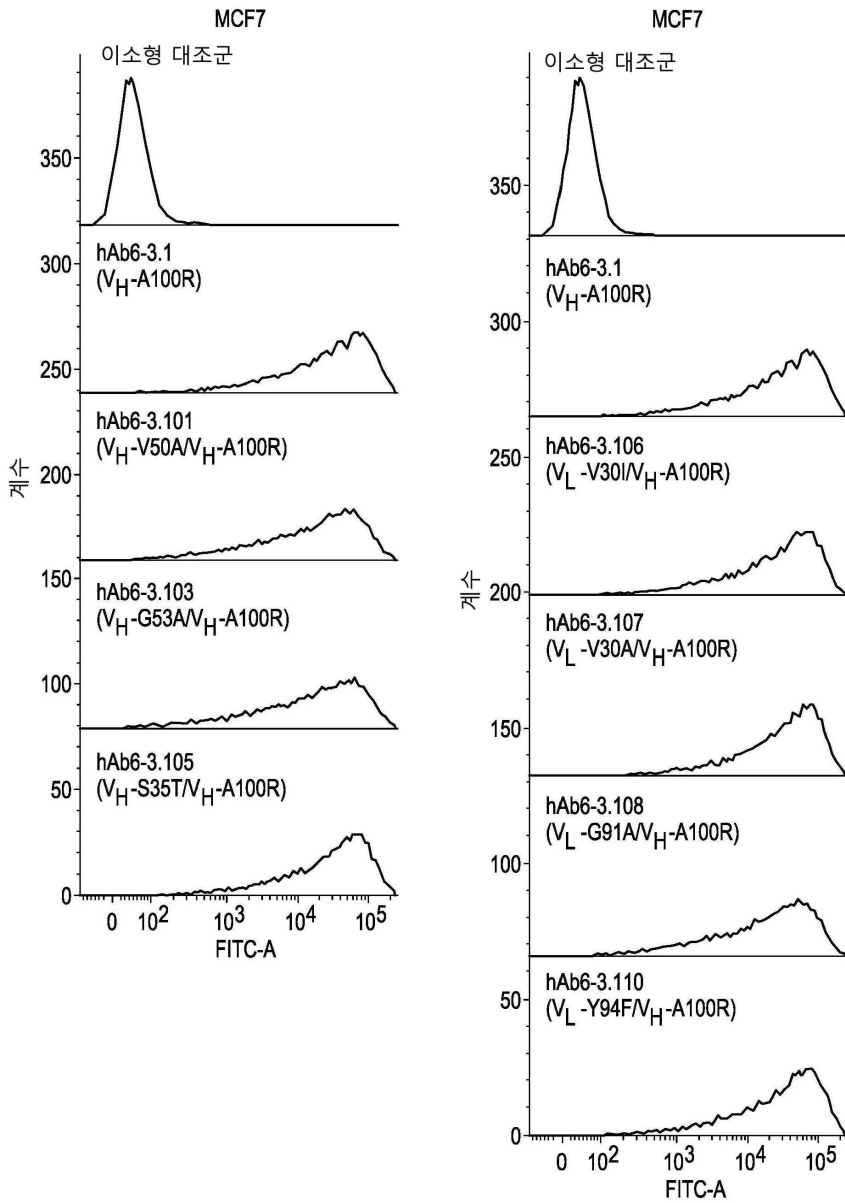


도면11e

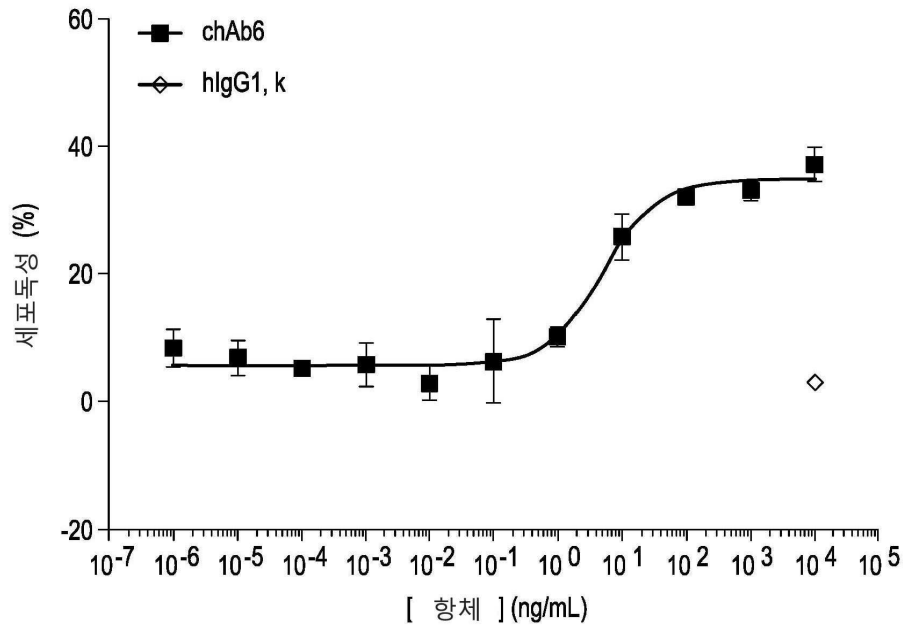


도면11f

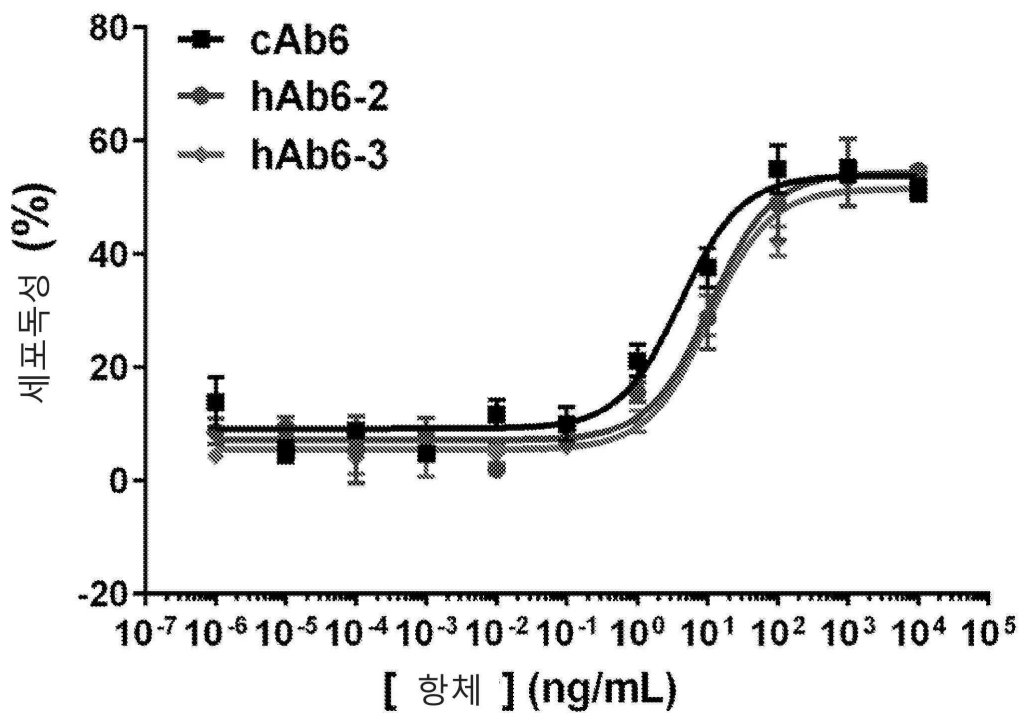
보존성 CDR변형을 갖는 예시적 인간화된 ab6의
MCF7 세포주로의 결합의 입증



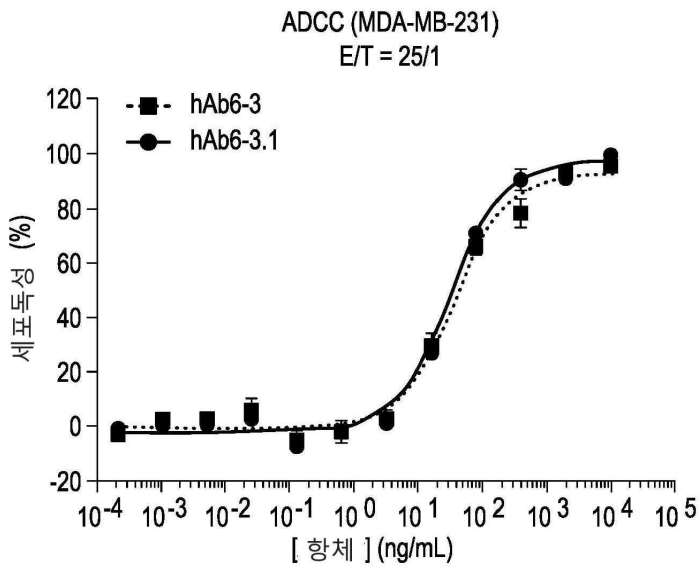
도면12



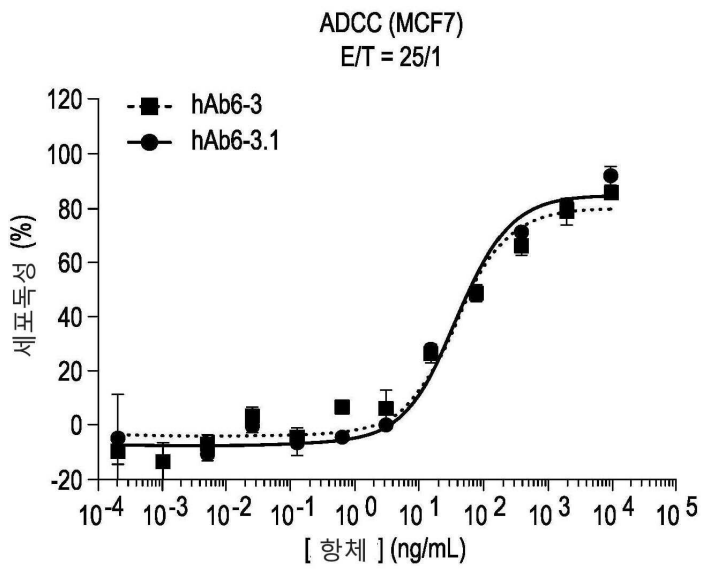
도면13



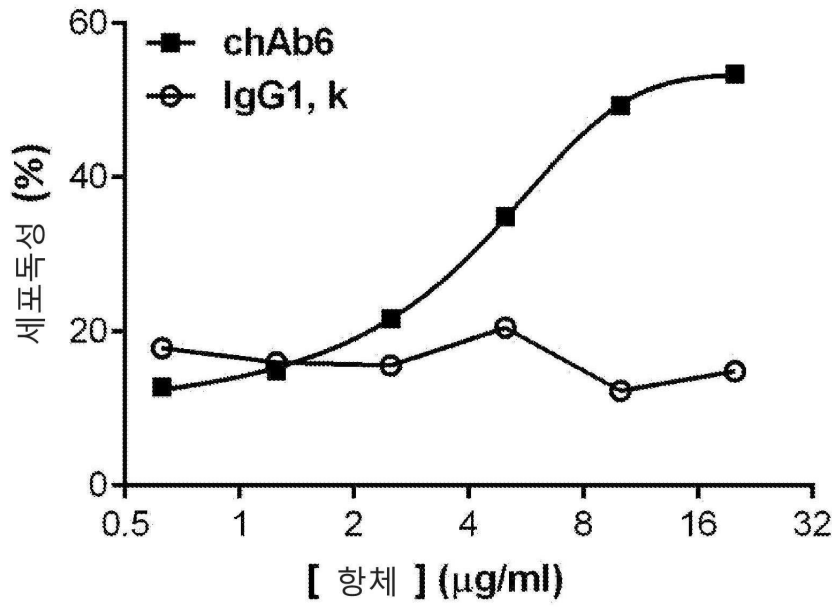
도면14a



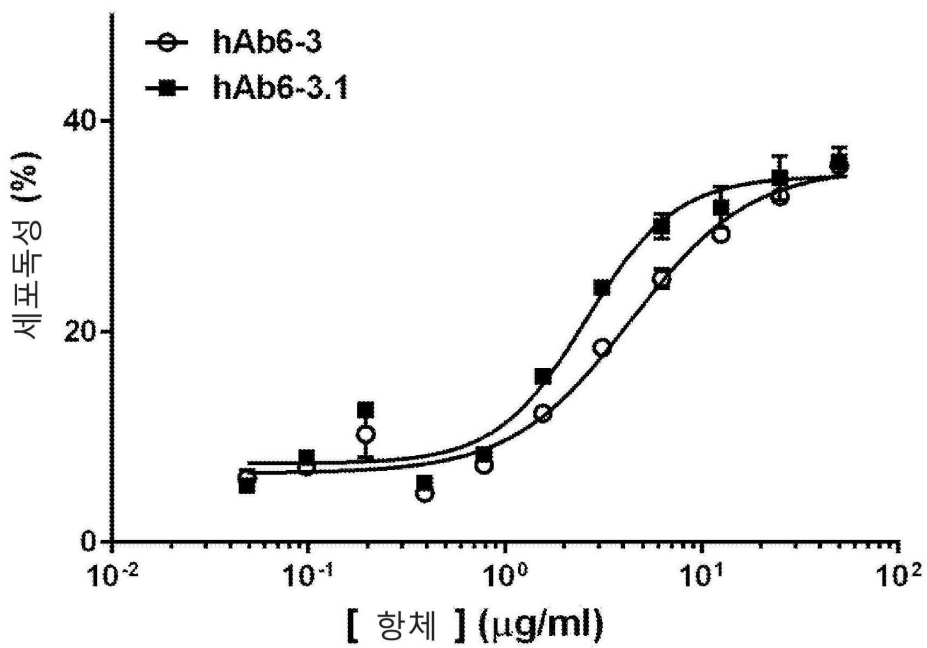
도면14b



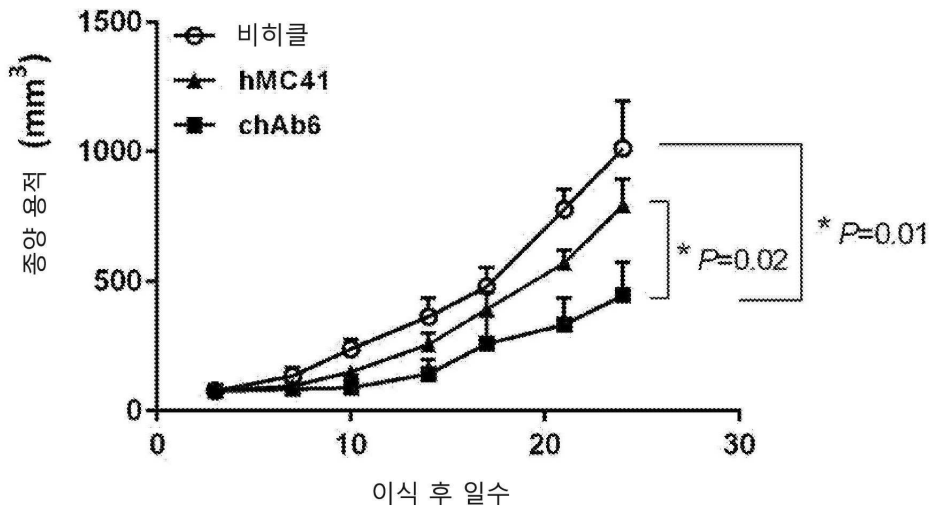
도면15a



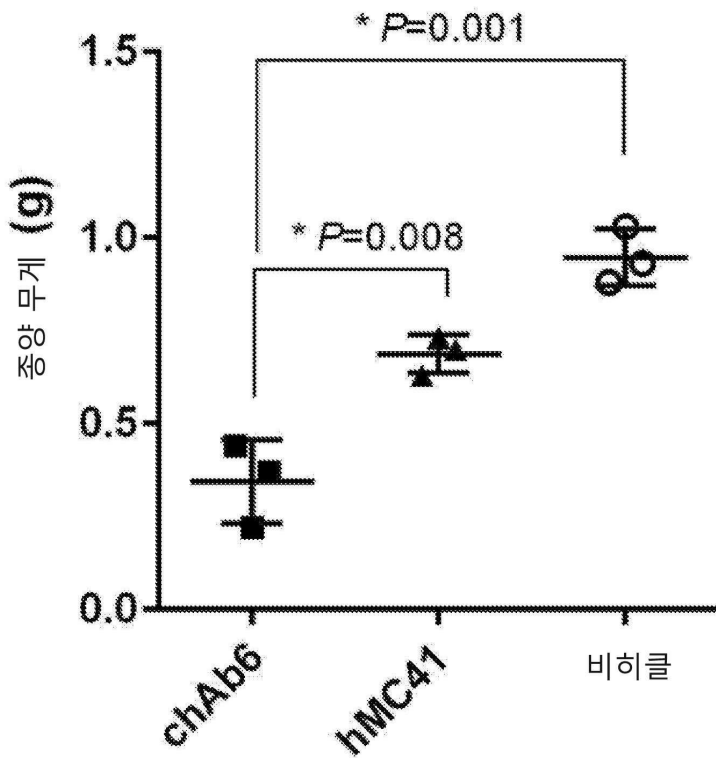
도면15b



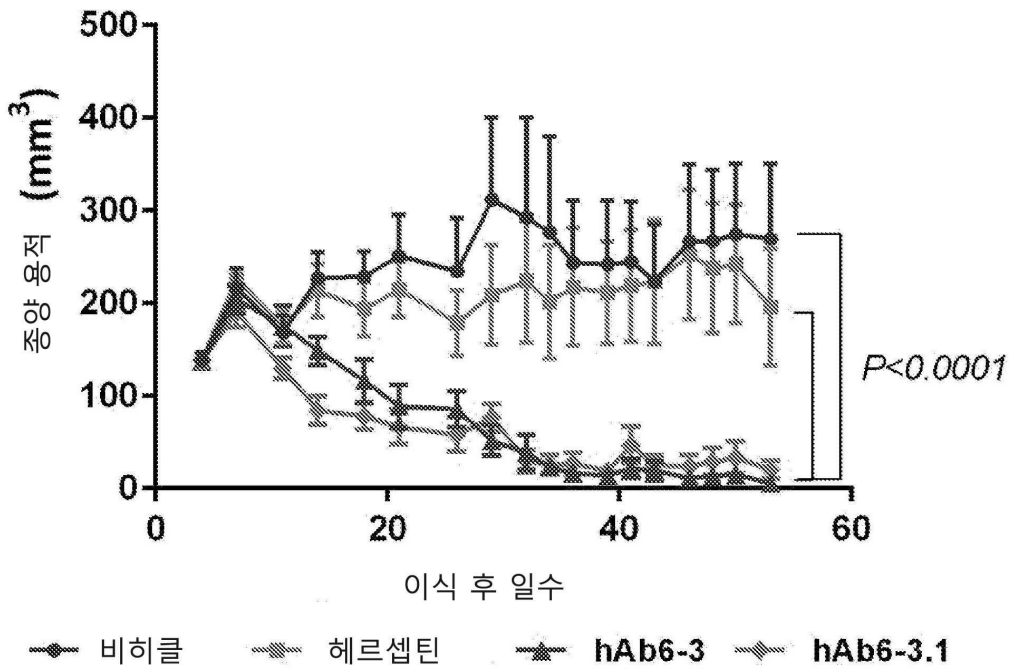
도면16a



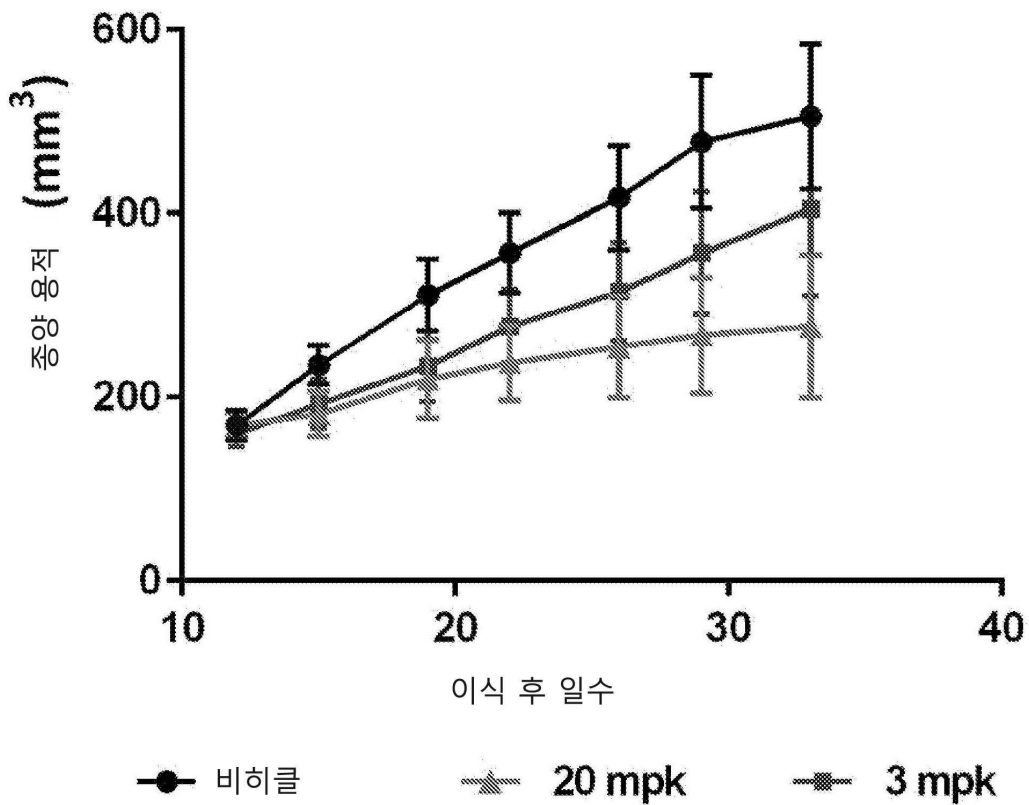
도면16b



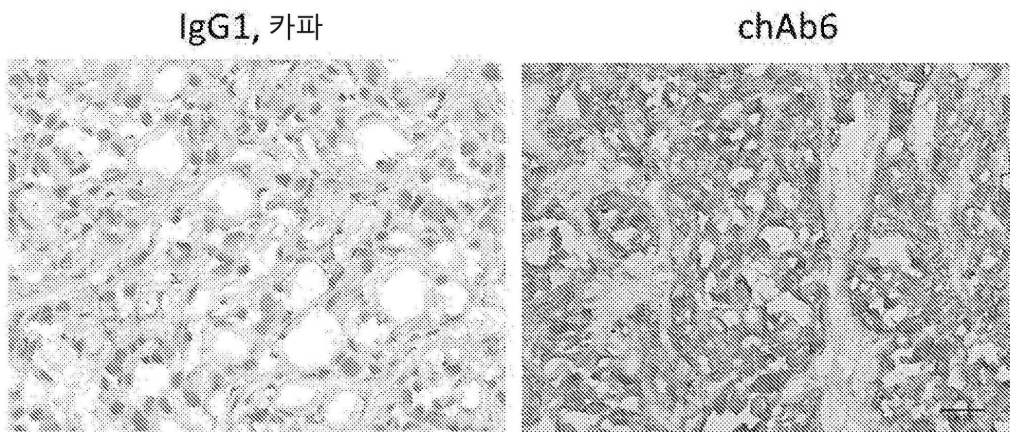
도면17



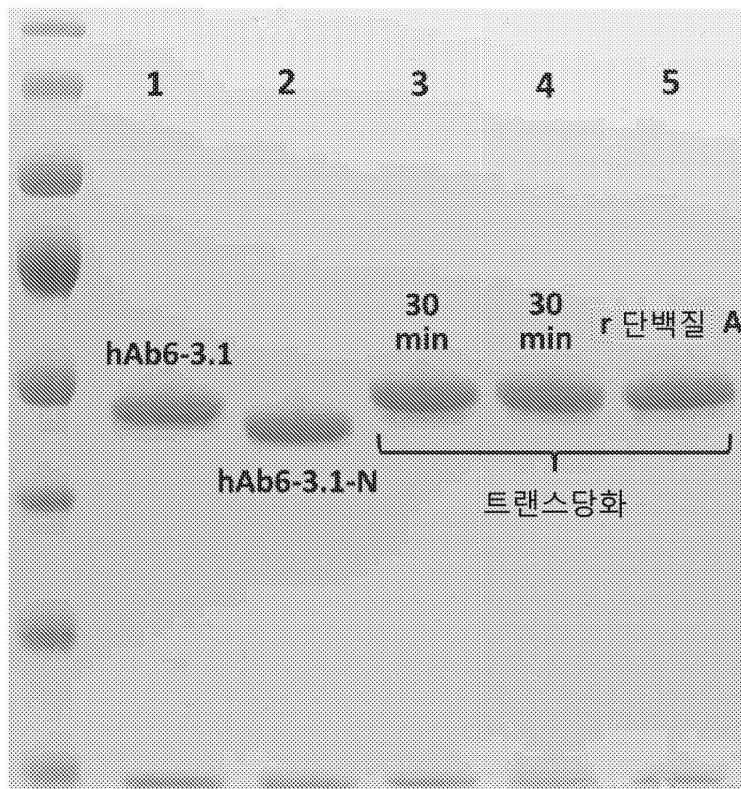
도면18



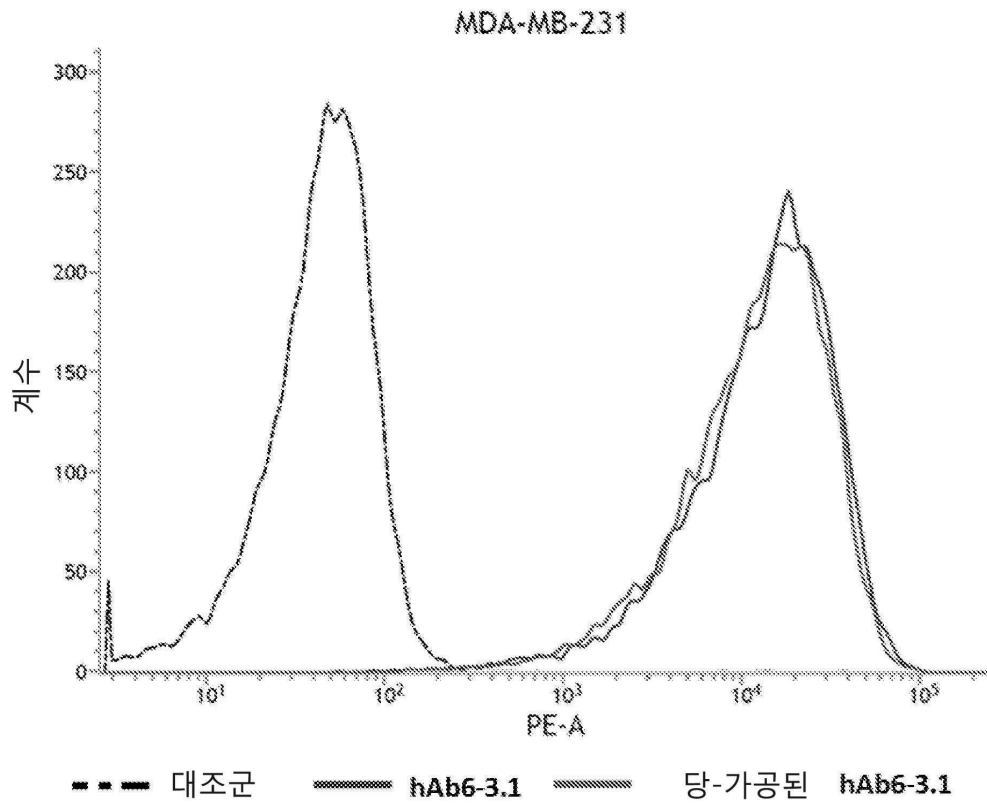
도면19



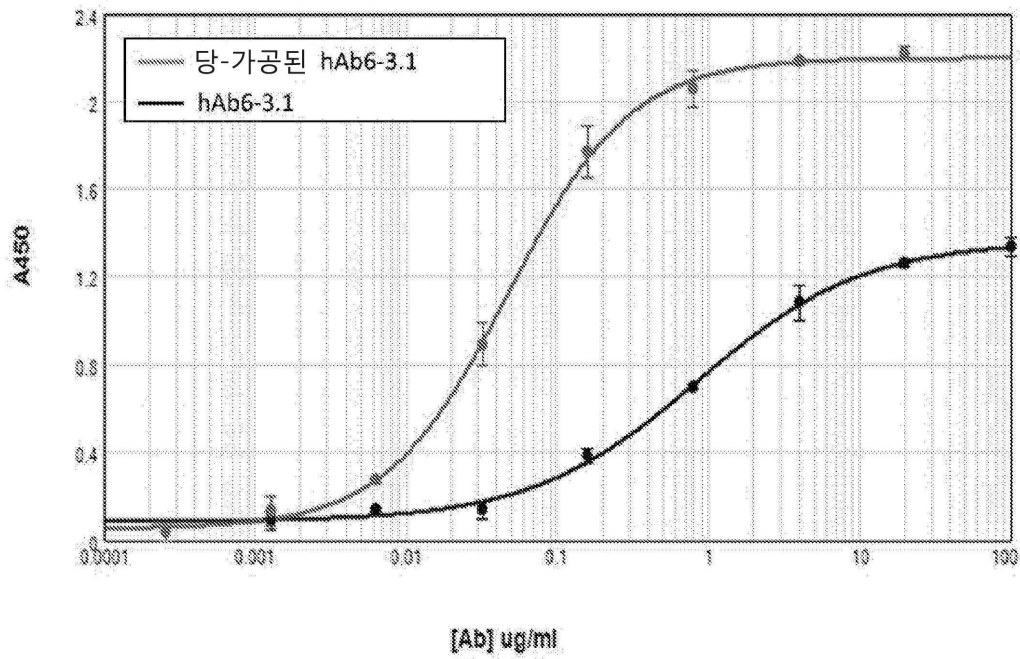
도면20



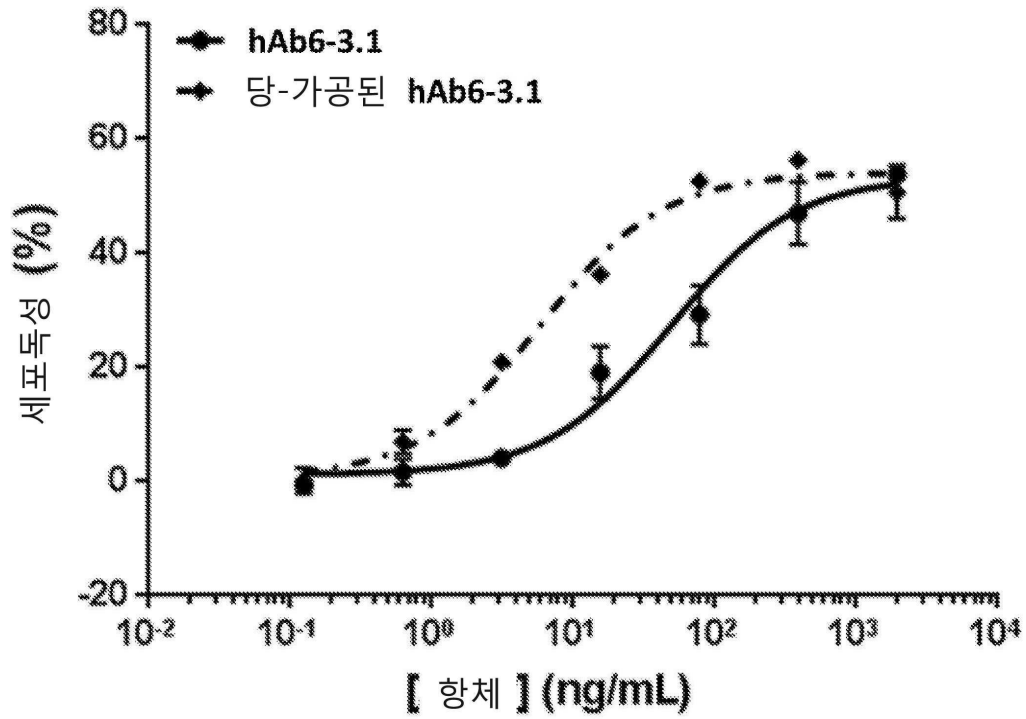
도면21



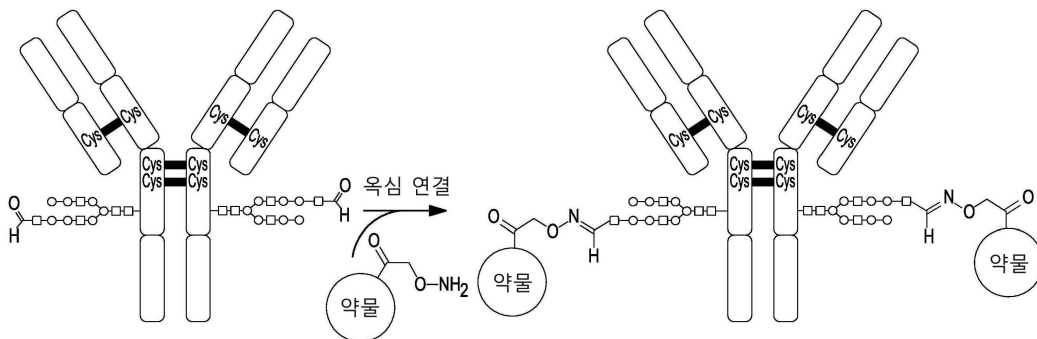
도면22



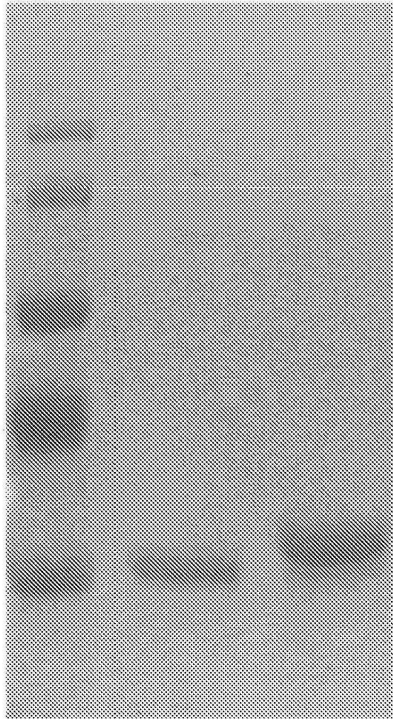
도면23



도면24a

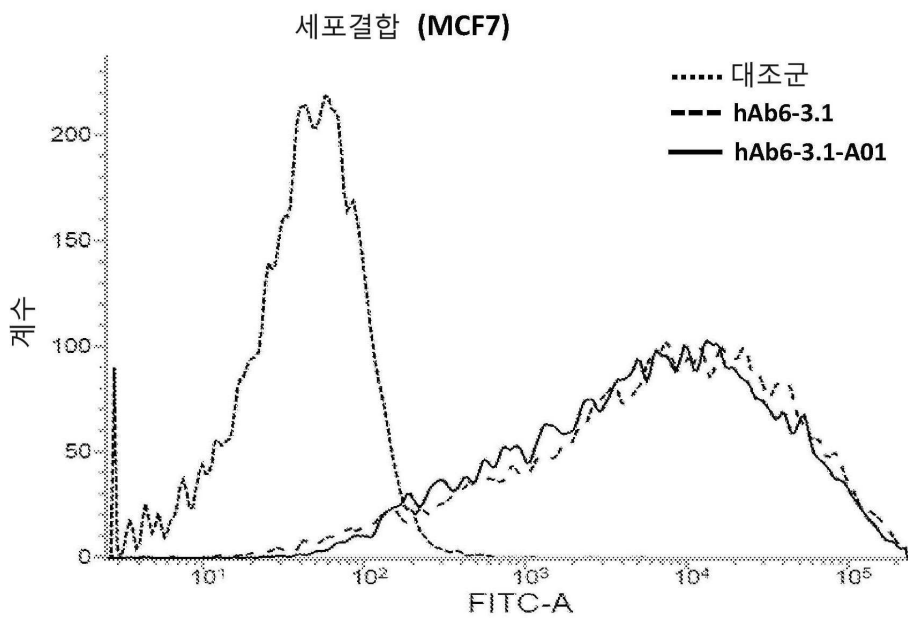


도면24b

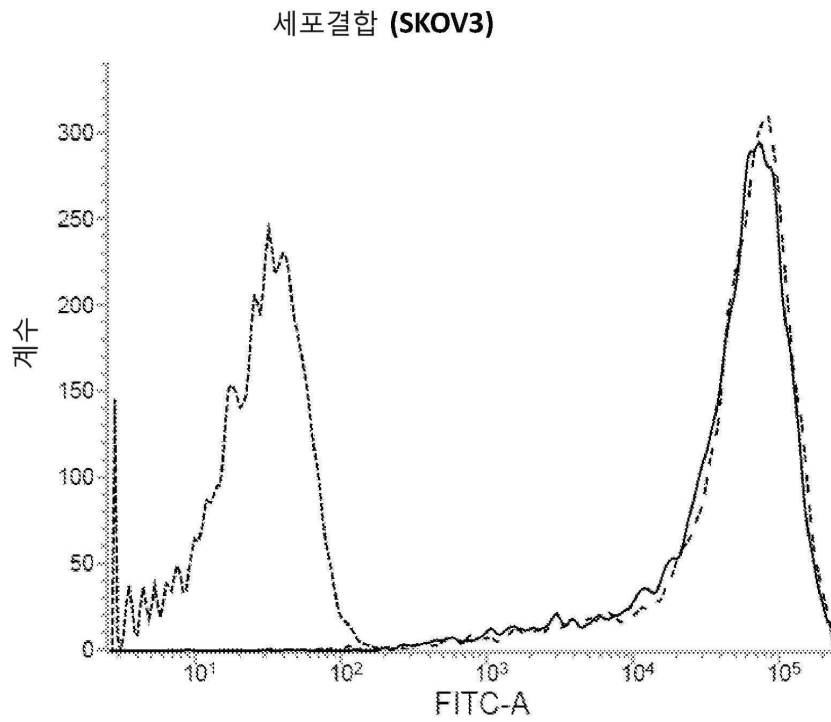


레인 1 2 3

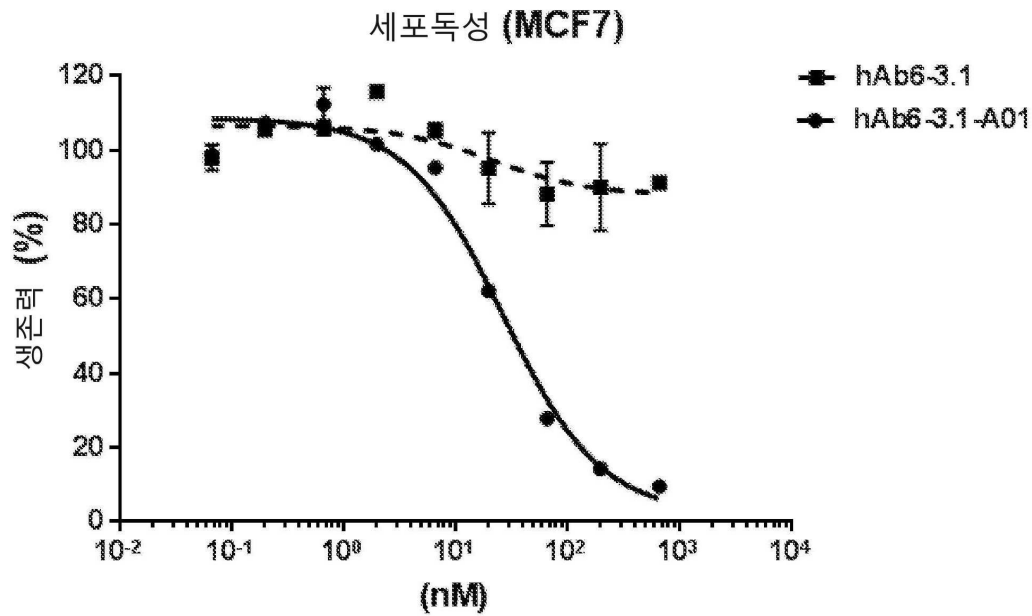
도면25a



도면25b

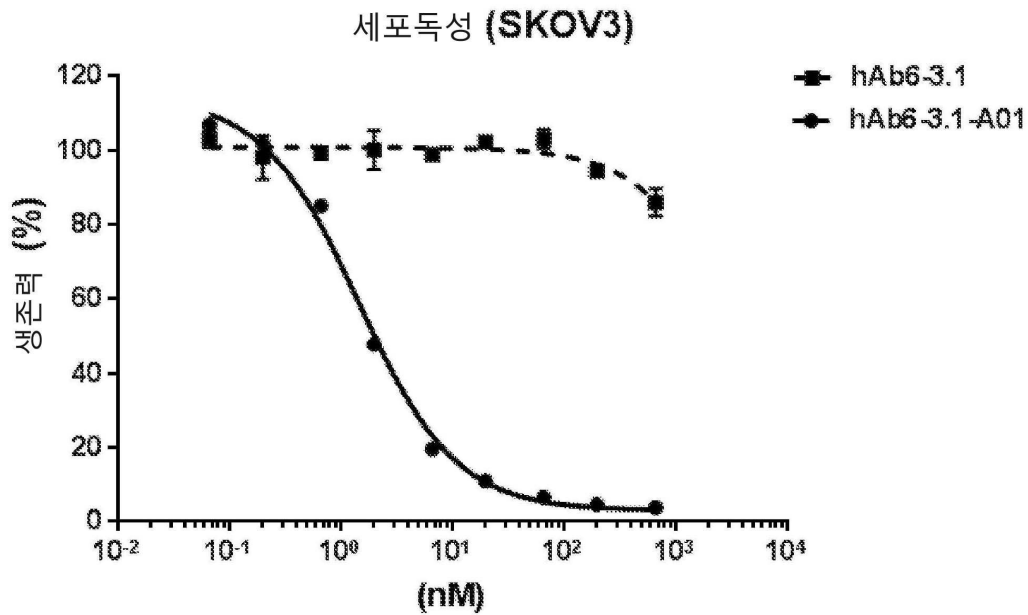


도면26



항체	EC50 (nM)	Max. 사멸 (%)
hAb6	-	8.8
hAb6-A01	27.42	90.5

도면27



항체	EC50 (nM)	Max. 사멸 (%)
hAb6	-	14.07
hAb6-A01	1.48	96.21

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CHO PHARMA INC.

<120> ANTIBODIES, BINDING FRAGMENTS, AND METHODS OF USE

<130> G2112-00818

<140> PCT/US2017/048074

<141> 2017-08-22

<150> 62/378,102

<151> 2016-08-22

<160> 197

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<400> 1

000

<210> 2

<400> 2

000

<210> 3

<400> 3

000

<210> 4

<400> 4

000

<210> 5

<400> 5

000

<210> 6

<400> 6

000

<210> 7

<400> 7

000

<210> 8

<400> 8

000

<210> 9

<400> 9

000

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 10

Asn Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 11

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 12

Pro Gly Ala Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 13

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Pro Gly Ala Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 14

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60

acatgcactg tctcagggtt ctcatataaa aactatggtg taagctgggt tcgccagcct 120

ccaggaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggtg acgggagcac aaattatcat 180

tcaactctca gatccagact gaccatcagc aaggataatt ccaagagcca acttttctta 240

aaactgaaca gactgcaaac tgatgacaca gccacgtact actgtgcaa acctggggcg 300

ggttatgcta tggactactg ggtcaagga acctcagtca ccgtctctc a 351

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 15

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 16

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 18

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Val Tyr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 19

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 19

```

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgtat atccagggga aaaggtcacc      60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaagc      120
acctccccc aactctggat ttatgacaca tccaaactga cttctggagt cccaggtcgc      180
ttcagtgcca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacga tcagcagcat ggaggctgaa      240
gatgttgcca cttattactg ttttcagggg agtgggtacc cactcacgtt cggagggggg      300
accaagctgg aaataaaacg g                                     321
    
```

<210> 20

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 20

```

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgtat atccagggga aaaggtcacc      60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaagc      120
acctccccc aactctggat ttatgacaca tccaaactga cttctggagt cccaggtcgc      180
ttcagtgcca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacga tcagcagcat ggaggctgaa      240
gatgttgcca cttattactg ttttcagggg agtgggtacc cactcacgtt cggagggggg      300
accaagctgg aaataaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatcc                    345
    
```

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 21

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 22

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Pro Gly Ala Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210

> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 24

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Val Tyr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 25

<400> 25

000

<210> 26

<400> 26

000

<210> 27

<400> 27

000

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 28

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

 35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 29

<400> 29

000

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<400> 31

000

<210> 32

<400> 32

000

<210> 33

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 33

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg

 50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

 85 90 95

Lys Pro Gly Ala Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 34

<400> 34

000

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<400> 36

000

<210> 37

<400> 37

000

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 38

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Gln Ser Val Tyr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 39

<400> 39

000

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 40

Asn Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 41

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 42

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 43

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 43

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 44

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 44

caggtgcagc tgcaggagtc cggaccagga ctggtggctc ccagccagac cctgtctatc 60
 acctgcacag tgctcggctt ctccctgaag aactacggcg tgagctgggt gagacagcca 120
 cctggcaagg gactggagtg gatcggcgtg atctggggcg acggctctac caattatcac 180
 tccacactga ggagccgggt gaccatctcc aaggataact ccaagagcca gctgtttctg 240
 aagctgaatc gcctgcagac agacgatacc gccacatact attgcgctaa gccaggccgg 300
 ggctacgcta tggactattg gggccagggc acctggtga cagtgtccag c 351

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 45

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 46

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 47

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 48

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

<400> 51

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 52

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 53

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 54

<400> 54

000

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 55

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 56

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 57

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 58

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 60

Asn Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 61

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Ala Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 62

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 63

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Ala Leu Arg

50 55 60

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

 85 90 95
Lys Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 65

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 66

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 67

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 68

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 68

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 70

Asn Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 71

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 71

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 72

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 73

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 73

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

1 5 10 15

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

Asp Thr Tyr Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 77

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 78

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 79

<400> 79

000

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 80

Asn Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 81

Ala Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 82

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 83

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 83

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

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

<210> 84

<400> 84

000

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 85

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 86

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 87

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 88

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 88

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

000

<210> 99

<400> 99

000

<210> 100

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 100

Asn Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 101

Val Ile Trp Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 102

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 103

<211

> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 103

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg

 50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

 85 90 95

Lys Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 104

<400> 104

000

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 105

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 106

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 107

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 108

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 108

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

<400>

118

000

<210> 119

<400> 119

000

<210> 120

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 120

Asn Tyr Gly Val Thr

1 5

<210> 121

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 121

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 122

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 123

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 123

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Lys Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg
 50 55 60

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

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 124

<400> 124

000

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 125

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 126

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 127

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 128

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 128

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 132

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 133

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 133

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 134

<400> 134

000

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 135

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met His

1 5 10

<210

> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 136

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 137

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 138

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 138

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met

 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

 35 40 45

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

 50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

 100 105

<210> 139

<400> 139

000

<210> 140

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 140

Asn Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 141

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 141

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 142

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 143

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 143

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 144

<400> 144

000

<210> 145

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 145

Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met His

1

5

10

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 146

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1

5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 147

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5
 <210> 148
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 148
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Gln Ser Val Tyr Pro Gly

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

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

<210> 149
 <400> 149
 000
 <210> 150
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 150
 Asn Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 151

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 151

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 152

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210

> 153

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 153

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 154

<400> 154

000

<210> 155

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 155

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 156

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 156

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 157

Phe Gln Ala Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 158

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 158

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 159

<400> 159

000

<210> 160

<400> 160

000

<210> 161

<400> 161

000

<210> 162

<400> 162

000

<210> 163

<400> 163

000

<210> 164

<400> 164

000

<210> 165

<400> 165

000

<210> 166

<400> 166

000

<210> 167

<400> 167

000

<210> 168

<400>

168

000

<210> 169

<400> 169

000

<210> 170

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 170

Asn Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 171

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 171

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 172

Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 173

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 173

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Thr Leu Arg

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

Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 174

<400> 174

000

<210> 175

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 175

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 176

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 176

Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 177

Phe Gln Gly Ser Gly Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 178

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 178

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Phe Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 179

<400> 179

000

<210> 180
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 180
Gly Phe Ser Leu Lys Asn Tyr Gly Val Ser
1 5 10

<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 181
Gly Phe Ser Leu Lys Asn Tyr Gly Val
1 5

<210> 182
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 182
Lys Asn Tyr Gly Val Ser
1 5

<210> 183
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 183

Gly Phe Ser Leu Lys Asn Tyr Gly

1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 184

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn

1 5

<210> 185

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 185

Trp Gly Asp Gly Ser

1 5

<210> 186

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 186

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

1 5 10

<210> 187

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 187

Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr

1 5

<210> 188

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 188

Ala Lys Pro Gly Ala Gly Tyr Ala Met Asp

1 5 10

<210> 189

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 189

Ala Lys Pro Gly Ala Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 190

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 190

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr

1 5

<210> 191

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 191

Ser Ser Val Ser Tyr

1 5

<210> 192

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 192

Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Thr

1 5 10

<210> 193

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 193

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu

1 5

<210> 194

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 194

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

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

 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Leu Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Pro Gly Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210

> 195

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 195

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

 Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

polypeptide

<400> 197

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Val Tyr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105