



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0057516
(43) 공개일자 2022년05월09일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 16/40</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
 <i>A61K 51/10</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/534</i> (2006.01) <i>G01N 33/60</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07K 16/40</i> (2013.01)
 <i>A61K 51/1045</i> (2020.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7002842
 (22) 출원일자(국제) 2022년07월02일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2022년01월25일
 (86) 국제출원번호 PCT/AU2020/050689
 (87) 국제공개번호 WO 2021/000017
 국제공개일자 2021년01월07일
 (30) 우선권주장
 2019902343 2019년07월02일 오스트레일리아(AU)</p> | <p>(71) 출원인
 테릭스 인터네셔널 피티와이 엘티디
 오스트레일리아, 3051, 빅토리아, 노스 멜버른,
 플레밍턴 로드 55, 스위트 226</p> <p>(72) 발명자
 휘트크로프트, 마이클 폴
 오스트레일리아, 3051, 빅토리아, 노스 멜버른,
 플레밍턴 로드 55, 씨/오 스위트 226
 베런부르크, 크리스티안 피터
 오스트레일리아, 3051, 빅토리아, 노스 멜버른,
 플레밍턴 로드 55, 씨/오 스위트 226</p> <p>(74) 대리인
 김경교, 양용</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 **신생아 FC 수용체에 대한 친화도가 감소된 CAIX에 대한 항체**

(57) 요약

본 발명은 야생형 IgG와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하는 항-CAIX 항체에 관한 것으로, 여기서 하나 이상의 아미노산 치환은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체의 친화도를 감소시키고, 이로써 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 변형 항체의 혈청 반감기를 감소시킨다. FcRn 결합을 감소시키는 효과를 갖는 하나 이상의 아미노산 변형은 His310, His433, His435, His436, Ile253 위치로부터 선택된다. 본 발명의 항체는 방사면역요법에 사용하기에 특히 적합하다.

(52) CPC특허분류

A61K 51/1072 (2020.05)

A61P 35/00 (2018.01)

G01N 33/534 (2013.01)

G01N 33/60 (2020.05)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/71 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 중쇄 불변 영역을 포함하는, 방사면역 요법에 사용하기 위한 IgG 클래스의 변형 항체로,

여기서 하나 이상의 아미노산 치환은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체의 친화도를 감소시키고, 이로써 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 변형 모노클로날 항체의 혈청 반감기를 감소시키는, IgG 클래스의 변형 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

하나 이상의 아미노산 치환은 His310, His433, His435, His436, Ile253 중 하나 이상의 위치에서 중쇄 불변 영역 내 치환으로부터 선택되는, 변형 항체.

청구항 3

제2항에 있어서,

하나 이상의 아미노산 치환이 His310 또는 His435 위치에서 중쇄 불변 영역 내 치환을 포함하고, 바람직하게는 아미노산 치환이 His310 및 His435 둘 다에 존재하는, 변형 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

변형 항체는, (a) IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 하나 이상의 Fc 감마 수용체에 대한 항체의 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환; 및/또는 (b) IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 변형 항체에서 CH1-CH2 힌지 영역의 안정성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함하는, 변형 항체.

청구항 5

제4항에 있어서,

Fc 감마 수용체에 대한 항체의 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환이 Leu235 위치에서의 아미노산 치환을 포함하는, 변형 항체.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

항체에서 CH1-CH2 힌지 영역의 안정성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환이 Ser228에서의 치환을 포함하는, 변형 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

변형 항체가 바람직하게는 링커 또는 킬레이터 모이어티를 통해 방사성 동위원소를 포함하는 진단제 또는 치료제에 접합되는, 변형 항체.

청구항 8

제7항에 있어서,

변형 항체가 방사성 동위원소 형태로 치료제에 접합되는, 변형 항체.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서,

방사성 동위원소가 악티늄-225 (^{225}Ac), 아스타틴-211 (^{211}At), 비스무트-212 및 비스무트-213 (^{212}Bi , ^{213}Bi), 구리-64 및 구리-67 (^{64}Cu , ^{67}Cu), 갈륨-67 및 갈륨-68 (^{67}Ga 및 ^{68}Ga), 인듐-111 (^{111}In), 요오드-123, -124, -125 또는 -131 (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I) (^{123}I), 납-212 (^{212}Pb), 루테튬-177 (^{177}Lu), 라듐-223 (^{223}Ra), 사마륨-153 (^{153}Sm), 스칸듐-44 및 스칸듐-47 (^{44}Sc , ^{47}Sc), 스트론튬-90 (^{90}Sr), 테크네튬-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 이트륨-86 및 이트륨-90 (^{86}Y , ^{90}Y), 및 지르코늄-89 (^{89}Zr)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 변형 항체.

청구항 10

IgG 클래스의 비변형 형태의 항체 또는 야생형 항체와 비교하여 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 변형 항체로서,

- His310, His433, His435, His 436 및 Ile253 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 IgG 클래스의 비변형 항체 또는 야생형 항체에 존재하는 잔기와 상이한 중쇄 불변 영역을 포함하고,

여기서 상기 비변형 항체는 탄산탈수효소 IX(CAIX)에 특이적으로 결합하고, 항체는

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a
을 포함하고,

여기서:

FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;

CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;

여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는, 변형 항체.

청구항 11

제10항에 있어서,

서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116의 아미노산 서열(N에서 C 말단 또는 C에서 N 말단의 순서로)로 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는 항원 결합 부위를 포함하는, 변형 항체.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

항체가 다음 중 적어도 하나를 포함하는, 변형 항체:

(i) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;

(ii) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 VH;

(iii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195, 또는 211

에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;

(iv) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열과 적어도 약 95% 동일한 서열을 포함하는 VL;

(v) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;

(vi) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH;

(vii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209의 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194, 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;

(viii) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL;

(ix) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH; 및 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL; 또는

(x) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

항체의 중쇄 불변 영역이 His310 및 His435 둘 다에서 아미노산 치환을 포함하는, 변형 항체.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

항체의 중쇄 불변 영역이 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235에 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함하는, 변형 항체.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

항체의 중쇄 불변 영역이 서열번호 226 내지 228 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 변형 항체.

청구항 16

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 서열번호 231 및 234에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 변형 항체.

청구항 17

면역글로불린 모이어티 및 이에 접합된 비단백질 제제를 포함하는 분자로,

여기서, 면역글로불린 모이어티는 CAIX에 특이적으로 결합하고,

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a
을 포함하는 항원 결합 부위를 포함하고,

여기서:

FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;

CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;

여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 가지고;

여기서 면역글로불린 모이어티는 야생형 면역글로불린과 비교하여 FcRn 수용체에 대한 친화도가 감소되거나 소거되며;

여기서 비-단백질 제제는 치료학적 모이어티, 바람직하게는 세포독소 또는 방사성 원소를 포함하는, 분자.

청구항 18

제17항에 있어서,

면역글로불린 모이어티가 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116의 아미노산 서열(N에서 C 말단 또는 C에서 N 말단의 순서로)로 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는 항원 결합 부위를 포함하는, 분자.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서,

면역글로불린 모이어티가 다음 중 적어도 하나를 포함하는, 분자:

(i) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;

(ii) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 VH;

(iii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195, 또는 211에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;

(iv) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열과 적어도 약 95% 동일한 서열을 포함하는 VL;

(v) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;

(vi) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH;

(vii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209의 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194, 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;

(viii) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL;

(ix) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH; 및 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제

시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL; 또는

(x) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

면역글로불린 모이어티가 불변 중쇄 영역의 His310 및/또는 His435와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함하여, FcRn 수용체에 대한 면역글로불린 모이어티의 친화도를 감소 또는 소거시키는, 분자.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

면역글로불린 모이어티가 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235에 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함하여, 활성화 Fc 감마 수용체에 대한 모이어티의 친화도를 감소시키거나 또는 모이어티를 안정화시키는, 분자.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

비-단백질 제제가 방사성 동위원소 형태의 치료제를 포함하는, 분자.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

비-단백질 제제가 악티늄-225 (^{225}Ac), 아스타틴-211 (^{211}At), 비스무트-212 및 비스무트-213 (^{212}Bi , ^{213}Bi), 구리-64 및 구리-67 (^{64}Cu , ^{67}Cu), 갈륨-67 및 갈륨-68 (^{67}Ga 및 ^{68}Ga), 인듐-111 (^{111}In), 요오드-123, -124, -125 또는 -131 (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I) (^{123}I), 납-212 (^{212}Pb), 루테튬-177 (^{177}Lu), 라듐-223 (^{223}Ra), 사마륨-153 (^{153}Sm), 스칸듐-44 및 스칸듐-47 (^{44}Sc , ^{47}Sc), 스트론튬-90 (^{90}Sr), 테크네튬-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 이트륨-86 및 이트륨-90 (^{86}Y , ^{90}Y), 지르코늄-89 (^{89}Zr)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 분자.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서,

방사성 동위원소가 악티늄-225(^{225}Ac), 아스타틴-211(^{211}At) 및 요오드-123(^{123}I)으로부터 선택되는, 분자.

청구항 25

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항의 항체, 또는 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 분자를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 대상체에서 신장암을 치료하는 방법.

청구항 26

방사면역요법에 사용하기에 적합한 항체를 생성하는 방법으로,

- 방사면역요법이 필요한 세포 또는 조직에 존재하는 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 갖는 항체를 제공하는 단계;

- 적어도 하나의 아미노산 치환을 항체의 중쇄 불변 영역에 도입하여 변형 항체를 생성하는 단계(여기서 적어도 하나의 아미노산 치환은 잔기 His310, His435, 및 Ile253에서의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 이로써 상기 항체의 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경됨);

- 변형 항체를 방사성 원소와 접합시키는 단계를 포함하여,

이로써 방사면역요법에 사용하기에 적합한 항체를 생성하는, 방법.

청구항 27

질병의 치료에 사용하기 위한 항체-방사성 동위원소 면역접합체를 생성하는 방법으로,

- 방사면역요법이 필요한 세포 또는 조직에 존재하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 갖는 항체를 제공하는 단계;
- 적어도 하나의 아미노산 치환을 항체의 중쇄 불변 영역에 도입하여 변형 항체를 생성하는 단계(여기서 적어도 하나의 아미노산 치환은 잔기 His310, His435, 및 Ile253에서의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 이로써 상기 항체의 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경됨);
- 변형 항체를 방사성 원소와 접합시키는 단계를 포함하여,

이로써 질병의 치료에 사용하기 위한 항체-방사성 동위원소 면역접합체를 생성하는, 방법.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서,

항체가 표 2에 기재된 바와 같은 상보성 결정 영역, 프레임워크 영역, 가변 경쇄, 가변 중쇄 영역 또는 불변 영역 중 임의의 것을 갖는 항체를 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체인, 방법.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

변형 항체가 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235에 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함하는, 방법.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

방사성 원소가 킬레이트제를 사용하여 변형 항체에 접합되고, 선택적으로 여기서 킬레이트제는 DOTA인, 방법.

청구항 31

제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

방사성 원소가 악티늄-225 (^{225}Ac), 아스타틴-211 (^{211}At), 비스무트-212 및 비스무트-213 (^{212}Bi , ^{213}Bi), 구리-64 및 구리-67 (^{64}Cu , ^{67}Cu), 갈륨-67 및 갈륨-68 (^{67}Ga 및 ^{68}Ga), 인듐-111 (^{111}In), 요오드-123, -124, -125 또는 -131 (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I), 납-212 (^{212}Pb), 루테튬-177 (^{177}Lu), 라듐-223 (^{223}Ra), 사마륨-153 (^{153}Sm), 스칸듐-44 및 스칸듐-47 (^{44}Sc , ^{47}Sc), 스트론튬-90 (^{90}Sr), 테크네튬-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 이트륨-86 및 이트륨-90 (^{86}Y , ^{90}Y), 및 지르코늄-89 (^{89}Zr)으로 이루어진 그룹(바람직하게는 방사성 원소는 악티늄-225(^{225}Ac), 아스타틴-211(^{211}At), 또는 루테튬-177(^{177}Lu)임)으로부터 선택되는, 방법.

청구항 32

제26항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

변형 항체가 아미노산 치환 His310Ala 및 His435Gln을 포함하는, 방법.

청구항 33

제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 서열번호 231 및 234에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 34

제26항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

질환이 신세포 암종(renal cell carcinoma)을 포함하는 암인, 방법.

청구항 35

비변형 형태의 항체와 비교하여 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경된 변형 항체를 생산하는 방법으로, 상기 방법은

(a) 면역글로불린 중쇄의 적어도 하나의 불변 영역을 인코딩하는 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 적합한 프로모터를 포함하는 발현 벡터(바람직하게는 복제가능한 발현 벡터)를 제공하는 단계(여기서 아미노산 잔기 His310, His435 및 Ile253으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 중쇄 불변 영역으로부터의 적어도 하나의 아미노산이 비변형 항체에 존재하는 것과 상이한 아미노산으로 치환되고, 이로써 FcRn 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경됨);

(b) 상기 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계; 및

(c) 상기 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 상기 변형 항체를 생산하는 단계;

선택적으로, 상보성 면역글로불린 경쇄를 인코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 제2 발현 벡터(바람직하게는 복제가능한 발현 벡터)를 제조하고 상기 세포주를 상기 제2 벡터로 추가로 형질전환시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

방사면역요법에서 사용하기 위한 치료 항체의 혈청 반감기를 변경하는 방법으로, 방법은

- 방사면역요법이 필요한 세포 또는 조직에 존재하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 갖는 항체를 제공하는 단계;

- 적어도 하나의 아미노산 치환을 항체의 중쇄 불변 영역에 도입하여 변형 항체를 생성하는 단계(여기서 적어도 하나의 아미노산 치환은 잔기 His310, His435, 및 Ile253에서의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 이로써 상기 항체의 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경됨)를 포함하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서,

변형 항체를 방사성 원소와 접합시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서,

항체가 표 2에 기재된 바와 같은 상보성 결정 영역, 프레임워크 영역, 가변 경쇄 또는 가변 중쇄 영역 중 임의의 것을 갖는 항체를 포함하는 CAIX에 결합하기 위한 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체(바람직하게는, 변형 항체는 또한 Ser228Pro 및/또는 Leu235Glu를 포함하는 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235에 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함함)인, 방법.

청구항 39

방사면역요법에서 사용하기 위한 항체의 독성을 감소시키는 방법으로, 방법은

- 방사면역요법이 필요한 세포 또는 조직에 존재하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 갖는 항체를 제공하는 단계;

- 적어도 하나의 아미노산 치환을 항체의 중쇄 불변 영역에 도입하여 변형 항체를 생성하는 단계(여기서 적어도 하나의 아미노산 치환은 잔기 His310, His435, 및 Ile253에서의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 치환은 혈청 반감기를 감소시키고/시키거나 순환으로부터 변형 항체의 제거를 증가시킴)를 포함하여,

이로써 항체가 방사면역요법에 사용하기 위해 방사성 원소에 접합하는 경우 항체의 독성을 감소시키는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서,

항체의 독성을 감소시키는 것은 순환에서 방사성 동위원소의 장기간 체류로 인해 발생할 수 있는 하나 이상의 독성 효과를 감소시키는 것을 포함하고, 여기서 독성은 바람직하게는 혈액학적 독성, 골 흡수 또는 골수 조사인, 방법.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서,

방사면역요법에서 사용하기 위한 항체의 독성은 대상체에 투여한 후 항체 또는 면역접합체의 종양:혈액 비율을 결정함으로써 평가되는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서,

변형 항체의 종양:혈액 비율은, 중쇄 불변 영역에 대한 변형을 갖지 않는 비변형 항체보다 적어도 2배 이상, 적어도 3배 이상, 적어도 4배 이상, 적어도 6배 이상, 적어도 8배 이상 또는 적어도 10배 이상인, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서,

비율은 항체를 투여한 후 적어도 8시간에 결정되는, 방법.

청구항 44

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항의 항체 또는 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 분자의 신장 암종의 치료용 약제의 제조에서의 용도.

청구항 45

신장 암종의 치료에 사용하기 위한, 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항의 항체 또는 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 분자.

청구항 46

제9항 내지 제16항 중 어느 한 항의 항체, 또는 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 분자를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 47

- 각각의 사슬이 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄;
- 여기서 중쇄 불변 영역은 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 하나 이상의 아미노산 치환은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체의 친화도를 감소시키고, 이로써 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 변형 모노클로날 항체의 혈청 반감기를 감소시키며;
- 중쇄 또는 경쇄의 하나 이상의 아미노산 잔기에 접합된 방사성 동위원소를 포함하는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 48

제47항에 있어서,

불변사슬에서 하나 이상의 아미노산 치환이 His310, His433, His435, His436, Ile253 중 하나 이상의 위치에서 중쇄 불변 영역에서의 치환으로부터 선택되는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서,

중쇄의 가변 영역이 서열번호 52, 68, 84, 100 및 116 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 50

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서,

경쇄의 가변 영역이 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 및 212 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 아미노산 치환이 His310 또는 His435 위치에서 중쇄 불변 영역에서의 치환을 포함하고, 바람직하게는 아미노산 치환이 His310 및 His435 둘 다에 존재하는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 52

제47항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,

변형 항체가 (a) IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 하나 이상의 Fc 감마 수용체에 대한 항체의 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환; 및/또는 (b) IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 변형 항체에서 CH1-CH2 힌지 영역의 안정성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함하는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 53

제52항에 있어서,

Fc 감마 수용체에 대한 항체의 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환이 Leu235 위치에서의 치환을 포함하는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서,

항체에서 CH1-CH2 힌지 영역의 안정성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환이 IgG 분자에서의 치환을 포함하는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 55

제47항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,

중쇄가 서열번호 231에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 치료학적 항체.

청구항 56

제47항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

경쇄가 서열번호 234에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 57

제47항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,

방사성 원소가 악티늄-225 (^{225}Ac), 아스타틴-211 (^{211}At), 비스무트-212 및 비스무트-213 (^{212}Bi , ^{213}Bi), 구리-64 및 구리-67 (^{64}Cu , ^{67}Cu), 갈륨-67 및 갈륨-68 (^{67}Ga 및 ^{68}Ga), 인듐-111 (^{111}In), 요오드-123, -124, -125 또는 -131 (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I), 납-212 (^{212}Pb), 루테튬-177 (^{177}Lu), 라듐-223 (^{223}Ra), 사마륨-153 (^{153}Sm), 스칸듐-44 및 스칸듐-47 (^{44}Sc , ^{47}Sc), 스트론튬-90 (^{90}Sr), 테크네튬-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 이트륨-86 및 이트륨-90 (^{86}Y , ^{90}Y), 및 지르코늄-89 (^{89}Zr)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 58

제47항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서,

방사성 원소가 악티늄-225 (^{225}Ac), 아스타틴-211 (^{211}At), 및 루테튬-177 (^{177}Lu)로부터 선택되는, 치료학적 IgG 분자.

청구항 59

탄산탈수효소 IX(CAIX)에 결합하거나 또는 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위로서, 항원 결합 부위는

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a
를 포함하고,

여기서:

FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;

CDR1a CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;

여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 가지는, 항원 결합 부위.

청구항 60

제59항에 있어서,

서열번호 68, 84, 100 또는 116의 아미노산 서열(N에서 C 말단 또는 C에서 N 말단의 순서로)을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는, 항원 결합 부위.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서,

항체의 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 항원 결합 도메인은 CAIX에 결합하거나 또는 특이적으로 결합하며, 항원 결합 도메인은 다음 중 적어도 하나를 포함하는, 항원 결합 부위:

(i) 서열번호 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열번호 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;

(ii) 서열번호 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 VH;

(iii) 서열번호 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 147, 163, 179, 195, 또는 211에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;

(iv) 서열번호 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열과 적어도 약 95% 동일한 서열을 포함하는 VL;

(v) 서열번호 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;

(vi) 서열번호 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH;

(vii) 서열번호 145, 161, 177, 193, 또는 209의 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 146, 162, 178, 194, 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;

(viii) 서열번호 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL;

(ix) 서열번호 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH; 및 서열번호 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL; 또는

(x) 서열번호 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL.

청구항 62

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 도메인이 다음 중 적어도 하나를 추가로 포함하는, 항원 결합 부위:

(i) 서열번호 73, 89, 105 또는 124에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 프레임워크 영역(FR) 1, 서열번호 74, 90, 106 또는 122에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 75, 91, 107 또는 123에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 76, 92, 108 또는 124에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VH;

(ii) 서열번호 153, 169, 185, 201 또는 217에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 154, 170, 186, 202, 또는 218에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 155, 171, 187, 203, 또는 219에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 156, 172, 188, 204 또는 220에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VL;

(iii) 서열번호 73, 89, 105, 또는 124에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 74, 90, 106, 또는 122에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 75, 91, 107 또는 123에 기재된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 76, 92, 108, 또는 124에 기재된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VH;

(iv) 서열번호 153, 169, 185, 201 또는 217에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 154, 170, 186, 202 또는 218에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 155, 171, 187, 203 또는 219에 기재된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 156, 172, 188, 204 또는 220에 기재된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VL; 또는

(v) 서열번호 73, 89, 105, 또는 124에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 74, 90, 106 또는 122에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 75, 91, 107 또는 123에 기재된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 76, 92, 108, 또는 124에 기재된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VH; 및 서열번호 153, 169, 185, 201, 또는 217에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 154, 170, 186, 202 또는 218에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 155, 171, 187, 203, 또는 219에 기재된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 156, 172, 188, 204, 또는 220에 기재된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VL.

청구항 63

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

VH는 서열번호 84 또는 100에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열

을 포함하거나 또는 서열번호 84 또는 100에 제시된 서열을 포함하고 VL은 서열번호 164, 180 또는 196에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 164, 180 또는 196에 제시된 서열을 포함하고, 바람직하게는 여기서 VH는 서열번호 84 또는 100에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 84 또는 100에 제시된 서열을 포함하고 VL은 서열번호 180 또는 196에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 180 또는 196에 제시된 서열을 포함하고, 보다 바람직하게는, 여기서 VH는 서열번호 84에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 84에 제시된 서열을 포함하고 VL은 서열번호 196에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 196에 제시된 서열을 포함하는, 항원 결합 부위.

청구항 64

제59항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 부위가 항체, 바람직하게는 네이키드 항체인, 항원 결합 부위.

청구항 65

제59항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 부위가 방사성표지 또는 세포독성제를 포함하는 표지에 접합되는, 항원 결합 부위.

청구항 66

제59항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 부위는 항체 불변 도메인, CH2-CH3 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG 면역글로불린으로, 야생형 항체 Fc 영역에 비해 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는, 항원 결합 부위.

청구항 67

제66항에 있어서,

IgG 면역글로불린이 야생형 IgG 면역글로불린과 비교하여 중쇄 불변 영역의 His310, His435, Ile253 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 항원 결합 부위.

청구항 68

제67항에 있어서,

하나 이상의 아미노산 변형이 H310 및 H435에 상응하는 잔기에서의 아미노산 치환으로부터 선택되고, 바람직하게는 아미노산 치환이 H310 및 H435 잔기 둘 다에 존재하는, 항원 결합 부위.

청구항 69

제68항에 있어서,

아미노산 치환이 His310Ala 및/또는 His435Gln인, 항원 결합 부위.

청구항 70

제59항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 부위가 활성화 Fc 감마 수용체에 대한 항체의 결합을 변형시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG 면역글로불린이고, 바람직하게는 아미노산 변형이 Leu235에서 글루탐산으로의 변형인, 항원 결합 부위.

청구항 71

제59항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 부위가 Ser228에서의 힌지 안정화 아미노산 변형을 포함하고, 여기서 바람직하게는 Ser228에서의 아미노산 변형은 프롤린으로의 변형인, 항원 결합 부위.

청구항 72

(a) 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항체, 또는 제65항 내지 제71항 중 어느 한 항의 항원 결합 부위 (상기 항체 또는 항원 결합 부위는 질병, 장애 또는 감염과 관련된 항원에 특이적으로 결합함)의 유효량을 대상 체에게 투여하는 단계;

(b) 항체 또는 항원 결합 부위가 상기 항원이 발견되는 상기 대상체의 부위에 농축되도록 하는 단계; 및

(c) 상기 항체 또는 항원 결합 부위를 검출하는 단계;

이로써, 백그라운드 또는 표준 수준 이상의 상기 항체 또는 항원 결합 부위의 검출은 대상체가 상기 질병 장애 또는 감염을 가짐을 나타내는 것을 포함하는, 대상체에서 질병, 장애 또는 감염을 진단, 모니터링 또는 예측하는, 생체내 방법.

청구항 73

제72항에 있어서,

항체 또는 항원 결합 부위가 방사성표지에 접합되고, 바람직하게는 여기서 방사성표지가

악티늄-225 (^{225}Ac), 아스타틴-211 (^{211}At), 비스무트-212 및 비스무트-213 (^{212}Bi , ^{213}Bi), 구리-64 및 구리-67 (^{64}Cu , ^{67}Cu), 갈륨-67 및 갈륨-68 (^{67}Ga 및 ^{68}Ga), 인듐-111 (^{111}In), 요오드-123, -124, -125 또는 -131 (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I), 바람직하게는 (^{124}I), 납-212 (^{212}Pb), 루테튬-177 (^{177}Lu), 라듐-223 (^{223}Ra), 사마륨-153 (^{153}Sm), 스칸듐-44 및 스칸듐-47 (^{44}Sc , ^{47}Sc), 스트론튬-90 (^{90}Sr), 테크네튬-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 이트륨-86 및 이트륨-90 (^{86}Y , ^{90}Y), 지르코늄-89 (^{89}Zr)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 74

제73항에 있어서,

방사성표지가 갈륨-67 및 갈륨-68 (^{67}Ga 및 ^{68}Ga), 요오드-124 (^{124}I) 및 지르코늄-89 (^{89}Zr)으로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 방사면역요법에 사용하기 위한 혈청 반감기가 감소된 항체, 특히 방사성 동위원소에 접합된 항체를 생산하기 위한 항체, 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0002] 관련 출원

[0003] 본 출원은 호주 가출원 제2019902343호로부터 우선권을 주장하며, 그 내용은 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0004] 방사선 요법은 종양 요법의 중요한 형태이다. 종양을 치료하기 위해 다양한 방사선 요법이 개발되어왔다. 그 중, 방사면역요법(radioimmunotherapy: RAIT)은 방사선 요법 제공에 대한 최근 생겨난 접근방식 중 하나이다. 이 방법은 항체 또는 항체 단편을 사용하여 방사성 동위원소를 특정 조직 및 세포로 지시함으로써 종양 치료의 특이성을 높이고 독성을 감소시킨다. RAIT는 저선량을 방사선을 사용하여 부작용을 더욱 감소시킨다.

[0005] 건강한 조직과 장기에 대한 방사선 손상은 방사선 요법과 관련된 중대한 문제이다. 이러한 손상은 핵산, 탄수화물, 지질 및 지단백질과 같은 기능적으로 중요한 생물학적 분자를 산화시키고 조직과 세포를 손상시키는 방사

선-발생 활성 산소 중에 주로 기인한다. 이들 중은 항균 방어, 염증, 발암 및 노화와 같은 다양한 생물학적 과정에 원인이 됨을 시사한다. 체중 감소에 의해 반영되는 바와 같이, 골수 억제 및 혈액 세포 손실, 예를 들면 백혈구(WBC) 및 혈소판 수 감소 및 조혈 독성은 방사선 손상의 가장 현저한 결과이다. 독성은 RAIT의 방사선량을 심각하게 제한하고 중앙 치료의 효과를 감소시킨다.

[0006] 방사선의 조혈 독성을 완화하기 위해 여러 방법이 개발되어왔다. 줄기세포 이식(SCT) 및 골수 이식(BMT)은 가장 흔히 사용되는 방법이다. 그러나 이러한 접근 방식은 침습적이고 비용이 많이 들며, 치료를 받는 개인이 장기간 입원할 수 있다.

[0007] 다른 방법으로는 사이토카인을 사용하여 면역 체계를 자극하고 HP5b와 같은 혈액 조절 단백질을 사용하여 방사선 노출 기간 동안 조혈을 차단하는 방법을 포함한다. 이들 방법은 소규모 연구에서 조혈독성 퇴치에서 다양한 정도의 성공을 달성했으나, 다시 환자를 추가 약물 및 치료에 노출시켜야 하므로 대부분 사용되지 않는다.

[0008] 방사면역요법과 관련된 독성을 완화하기 위한 새로운 방법이 여전히 요구된다.

[0009] 명세서에서 선행 기술에 대한 참조는 본 선행 기술이 모든 관련 업계에서 공통적인 일반 지식의 일부를 형성하거나 또는 본 선행 기술이 관련 기술 분야의 숙련가가 이해하고, 관련 있는 것으로 간주하고/하거나 선행 기술의 다른 부분과 결합하는 것으로 합리적으로 예상할 수 있는 승인 또는 제안이 아니다.

발명의 내용

[0010] 발명의 요약

[0011] 본 발명은 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 중쇄 불변 영역을 포함하는 방사면역요법에 사용하기 위한 IgG 클래스의 변형 항체를 제공하며, 여기서 하나 이상의 아미노산 치환은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체의 친화도를 감소시키고, 이로써 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 변형 항체의 혈청 반감기를 감소시킨다.

[0012] 하나의 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 IgG 분자의 중쇄 불변 영역 2(CH2)에서의 치환으로부터 선택되어, FcRn에 대한 IgG 분자의 친화도를 감소시킨다. 대안적으로, 하나 이상의 아미노산 치환은 IgG 분자의 중쇄 불변 영역 3(CH3)에 존재할 수 있고, 이로써 FcRn에 대한 IgG 분자의 친화도를 감소시킬 수 있다. 보다 추가적으로, 아미노산 치환은 IgG 분자의 CH2 영역에서 적어도 하나의 치환 및 CH3 영역에서 적어도 하나의 치환을 포함할 수 있으며, 이에 의해 치환은 FcRn에 대한 IgG의 친화도를 감소시킨다.

[0013] 특정 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 IgG의 잔기 His310, His433, His435, His436, 또는 Ile253 중 하나 이상에서 존재할 수 있다. 바람직하게는, 아미노산 치환은 His310 또는 His435 위치에서 중쇄 불변 영역 내 치환을 포함한다. 보다 바람직하게는, FcRn에 대한 항체의 친화도를 감소시키는 아미노산 치환은 His310 및 His435 둘 다에 있다.

[0014] 특정 실시양태에서, 변형 항체는 하나 이상의 Fc-감마 수용체에 결합하는 능력을 보유하고, 따라서 특정 실시양태에서 변형 항체는 이펙터 반응(ADCC 포함)을 자극하는 능력을 보유한다.

[0015] 대안적인 실시양태에서, FcRn 수용체에 대한 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형은 또한 Fc 감마 수용체에 대한 친화도를 감소시킨다. 변형 항체는 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 아미노산 치환은 하나 이상의 Fc 감마 수용체에 대한 항체의 친화도를 추가로 감소시킨다.

[0016] 추가 실시양태에서, 변형 항체는 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함하고, 여기서 아미노산 치환은 IgG 클래스의 야생형 항체에 비해 변형 항체에서 CH1-CH2 힌지(hinge) 영역의 안정성을 증가시킨다.

[0017] 하나의 실시양태에서, 변형 항체는 진단제 또는 치료제에 접합된다. 진단제 또는 치료제는 항체에 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들면 아미노산 잔기의 할로젠화에 의해 접합될 수 있다. 바람직하게는, 진단제 또는 치료제는 링커 또는 킬레이터 모이어티를 통해 항체에 간접적으로 접합된다. 하나의 예에서, 변형 항체는 TMT (6,6"-비스[N,N',N'"]-테트라(카복시메틸)아미노메틸)-4'-(3-아미노-4-메톡시페닐)-2,2':6',2"-테르페리딘), DOTA (1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-NN',N"(N'"]-테트라아세트산), TCMC, DO3A, CB-DO2A, NOTA, Diamsar, DTPA, CHX-A"-DTPA, TETE, Te2A, HBED, DFO, DFOsq 및 HOPO 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 기타 킬레이터제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 킬레이터 모이어티에 접합된다.

- [0018] 다른 예에서, 변형 항체는 이관능성 링커, 예를 들어 브로모아세틸, 티올, 숙신이미드 에스테르, TFP 에스테르, 말레이미드, 또는 당업계에 공지된 임의의 아민 또는 티올-개질 화합물을 사용하여 접합된다.
- [0019] 바람직하게는, 진단제 또는 치료제는 방사성 동위원소이다. 적합한 동위원소의 예로는 악티늄-225 (^{225}Ac), 아스타틴-211 (^{211}At), 비스무트-212 및 비스무트-213 (^{212}Bi , ^{213}Bi), 구리-64 및 구리-67 (^{64}Cu , ^{67}Cu), 갈륨-67 및 갈륨-68 (^{67}Ga 및 ^{68}Ga), 인듐-111 (^{111}In), 요오드-123, -124, -125 또는 -131 (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I) (^{123}I), 납-212 (^{212}Pb), 루테튬-177 (^{177}Lu), 라듐-223 (^{223}Ra), 사마륨-153 (^{153}Sm), 스칸듐-44 및 스칸듐-47 (^{44}Sc , ^{47}Sc), 스트론튬-90 (^{90}Sr), 테크네튬-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 이트륨-86 및 이트륨-90 (^{86}Y , ^{90}Y), 지르코늄-89 (^{89}Zr)을 포함한다.
- [0020] IgG 클래스의 비변형 항체와 비교하여 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 IgG 클래스의 변형 항체는 생물학적 부위에 진단제 또는 치료제를 표적화하는데 유용한 임의의 항체일 수 있다. 항체는 IgG1(인간 또는 무린), IgG2, IgG4, 무린 IgG2a를 포함하여 임의의 IgG 클래스일 수 있다. 바람직한 예에서, 항체는 암 세포에 진단제 또는 치료제를 표적화하거나 전달하는데 유용한 임의의 항체이다. 적합한 항체의 예로는 IgG1 항체 트라스투주맵(Herceptin®), 리툭시맵(Rituxan®), 베바시주맵(Avastin®), 디누톡시맵(Unituxin®), IgG2 항체 파나투무맵(Vectibix®), IgG4 항체, 켈트루리주맵(Keytruda®), 니볼루맵(Opdivo®), 무린 IgG2a 항체 토시투모맵(Bexxar®) 및 무린 IgG1 항체 이브리투모맵(Zevalin®)을 포함한다. 다른 예로는 켈투주맵(Mylotarg®), 브렌톡시맵(Adcetris®), 이노투주맵(Besponsa®), 글렘바투무맵(CDX-011), 아네투맵(BAY 94-9343), 미르베크시맵(IMGN853), 데파톡시맵(ABT-414), 로발피투주맵(Rova-T) 및 바다스톡시맵 탈리린(SGN-CD33A)을 포함한다.
- [0021] 본 발명은 IgG 클래스의 비변형 항체와 비교 또는 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 IgG 클래스의 변형 항체를 제공하며, IgG 클래스의 변형 항체는:
- [0022] - IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 여기서 하나 이상의 아미노산 치환은 생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체의 친화도를 감소시키고, 이로써 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 변형 항체의 혈청 반감기를 감소시킨다.
- [0023] 여기서 상기 항체는 전립선 특이적 막 항원(PSMA)에 특이적으로 결합하고, 여기서 항체는
- [0024] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a를 포함하고,
- [0025] 여기서:
- [0026] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;
- [0027] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0028] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;
- [0029] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0030] 여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 프레임워크 영역은 또한 각각의 항체로부터 유래된 다양한 프레임워크 영역을 정렬함으로써 결정될 수 있는 특정 잔기에서의 아미노산 변이를 포함하는 하기 표 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명은 또한 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VH로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VL로부터의 서열인 경우, 또는 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VL로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VH로부터의 서열인 경우를 포함한다.
- [0031] 보다 구체적으로, 본 발명은 IgG 클래스의 비변형 항체와 비교 또는 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 IgG 클래스의 변형 항체를 제공하며, IgG 클래스의 변형 항체는
- [0032] - His310, His433, His435, His436 및 Ile253 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 IgG 클래스의 비변형 항체 또는 야생형 항체에 존재하는 잔기와 상이한 중쇄 불변 영역을 포함하고,
- [0033] 여기서 상기 항체는 전립선 특이적 막 항원(PSMA)에 특이적으로 결합하고, 여기서 항체는
- [0034] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a를 포함하고,

- [0035] 여기서:
- [0036] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;
- [0037] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0038] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;
- [0039] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0040] 여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 프레임워크 영역은 또한 각각의 항체로부터 유래된 다양한 프레임워크 영역을 정렬함으로써 결정될 수 있는 특정 잔기에서의 아미노산 변이를 포함하는 하기 표 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명은 또한 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VH로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VL로부터의 서열인 경우, 또는 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VL로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VH로부터의 서열인 경우를 포함한다.
- [0041] 하나의 실시양태에서, PSMA에 특이적으로 결합하는 항체는 서열번호 4 또는 20의 (N에서 C 말단 또는 C에서 N 말단의 순서로) 아미노산 서열로 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는 항원 결합 부위를 포함한다.
- [0042] 추가 실시양태에서, PSMA에 특이적으로 결합하는 항체는 다음 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0043] (i) 서열번호 1 또는 17에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열번호 2 또는 18에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 3 또는 19에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0044] (ii) 서열번호 4 또는 20에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 VH;
- [0045] (iii) 서열번호 33에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 34에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 35에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0046] (iv) 서열번호 36에 제시된 서열과 적어도 약 95% 동일한 서열을 포함하는 VL;
- [0047] (v) 서열번호 1 또는 17에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 2 또는 18에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 3 또는 19에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0048] (vi) 서열번호 4 또는 20에 제시된 서열을 포함하는 VH;
- [0049] (vii) 서열번호 33에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 34에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 45에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0050] (viii) 서열번호 36에 제시된 서열을 포함하는 VL;
- [0051] (ix) 서열번호 1 또는 17에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 2 또는 18에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 3 또는 19에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH; 및 서열번호 33에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 34에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 35에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL; 또는
- [0052] (x) 서열번호 4 또는 20에 제시된 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 36에 제시된 서열을 포함하는 VL.
- [0053] 바람직하게는, 중쇄 불변 영역은 His310 및 His435 모두에서 아미노산 치환을 포함한다. 항체는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0054] 임의의 실시양태에서, 항체는 서열번호 235 내지 237 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 바람직하게는 여기서 중쇄 불변 영역은 서열번호 236에 제시된 서열을 포함한다.
- [0055] 또 다른 추가 실시양태에서, 항체의 중쇄는 서열번호 239 내지 242 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하고, 바

람직하게는 서열번호 239 중 어느 하나에 제시된 바와 같다.

- [0056] 추가로, 바람직한 실시양태에서, 항체의 경쇄 불변 영역은 서열번호 238에 제시된 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 항체는 서열번호 243에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다
- [0057] 특히 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열번호 239에 제시된 아미노산 서열 및 서열번호 243에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0058] 본 발명은 IgG 클래스의 비변형 항체와 비교 또는 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 IgG 클래스의 변형 항체를 제공하며, IgG 클래스의 변형 항체는:
- [0059] - IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 여기서 하나 이상의 아미노산 치환은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체의 친화도를 감소시키고, 이로써 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 변형 항체의 혈청 반감기를 감소시키고,
- [0060] 여기서 상기 항체는 탄산탈수효소 IX(CAIX)에 특이적으로 결합하고, 여기서 항체는
- [0061] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a를 포함하고,
- [0062] 여기서:
- [0063] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;
- [0064] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0065] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;
- [0066] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0067] 여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 아래 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 프레임워크 영역은 또한 각각의 항체로부터 유래된 다양한 프레임워크 영역을 정렬함으로써 결정될 수 있는 특정 잔기에서의 아미노산 변이를 포함하는 하기 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명은 또한 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VH로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VL로부터의 서열인 경우, 또는 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VL로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VH로부터의 서열인 경우를 포함한다.
- [0068] 본 발명은 또한 IgG 클래스의 비변형 모노클로날 항체와 비교 또는 IgG 클래스의 야생형 항체와 비교하여 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 IgG 클래스의 변형 항체를 제공하며, IgG 클래스의 변형 항체는
- [0069] - His310, His433, His435, His436 및 Ile253 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 IgG 클래스의 비변형 항체 또는 야생형 항체에 존재하는 잔기와 상이한 중쇄 불변 영역을 포함하고,
- [0070] 여기서 상기 항체는 탄산탈수효소 IX(CAIX)에 특이적으로 결합하고, 여기서 항체는
- [0071] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a를 포함하고,
- [0072] 여기서:
- [0073] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;
- [0074] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0075] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;
- [0076] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0077] 여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 프레임워크 영역은 또한 각각의 항체로부터 유래된 다양한 프레임워크 영역을 정렬함으로써 결정될 수 있는 특정 잔기에서의 아미노산 변이를 포함하는 하기 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명은 또한 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VH로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VL로부터의 서열인 경우, 또는 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VL로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VH로부터의 서열인 경우를 포함한다.

- [0078] 하나의 실시양태에서, CAIX에 특이적으로 결합하는 항체는 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116(N에서 C 말단 또는 C에서 N 말단의 순서로)의 아미노산 서열로 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는 항원 결합 부위를 포함한다.
- [0079] 추가 실시양태에서, CAIX에 특이적으로 결합하는 항체는 다음 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0080] (i) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0081] (ii) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 VH;
- [0082] (iii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195, 또는 211에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0083] (iv) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열과 적어도 약 95% 동일한 서열을 포함하는 VL;
- [0084] (v) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0085] (vi) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH;
- [0086] (vii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194, 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0087] (viii) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL;
- [0088] (ix) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH; 및 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL; 또는
- [0089] (x) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL.
- [0090] 바람직하게는, 중쇄 불변 영역은 His310 및 His435 모두에서 아미노산 치환을 포함한다. 항체는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0091] 바람직하게는, 항체는 서열번호 225 내지 228 중 어느 하나, 바람직하게는 서열번호 226에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0092] 또 다른 추가 실시양태에서, 항체는 바람직하게는 서열번호 230 내지 233 중 어느 하나에 제시된 서열, 바람직하게는 서열번호 231에 제시된 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다.
- [0093] 임의의 실시양태에서, 항체는 서열번호 229에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 바람직하게는, 항체는 서열번호 234에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0094] 특히 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열번호 231에 제시된 서열 및 서열번호 234에 제시된 서열을 포함한다.

- [0095] 본 발명은 또한 면역글로불린 모이어티 및 이에 접합된 비-단백질 제제를 포함하는 분자를 제공하며,
- [0096] 여기서, 면역글로불린 모이어티는 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하고,
- [0097] 여기서 면역글로불린 모이어티는 야생형 면역글로불린과 비교하여 FcRn 수용체에 대한 친화도가 감소되거나 소거되며; 및
- [0098] 여기서 비-단백질 제제는 세포독소 또는 방사성 원소와 같은 치료학적 모이어티를 포함한다.
- [0099] 면역글로불린 모이어티는 트라스투주맙(Herceptin®), 리툭시맙(Rituxan®), 베바시주맙(Avastin®), 디누톡시맙(Unituxin®), 파니투무맙(Vectibix®), 펄브롤리주맙(Keytruda®), 니볼루맙(Opdivo®), 토시투모맙(Bexxar®), 이브리투모맙(Zevalin®), 젠투주맙(Mylotarg®), 브렌톡시맙(Adcetris®), 이노투주맙(Besponsa®), 글렘바투무맙(CDX-011), 아네투맙(BAY 94-9343), 미르베크시맙(IMGN853) 데파톡시맙(ABT-414), 로발피투주맙(Rova-T) 및 바다톡시맙 탈리린(SGN-CD33A) 또는 본 명세서에 기술된 임의의 다른 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 종양-관련 항원에 결합하는데 유용한 임의의 항체를 포함할 수 있다.
- [0100] 본 발명은 또한 면역글로불린 모이어티 및 이에 접합된 비-단백질 제제를 포함하는 분자를 제공하며,
- [0101] 여기서, 면역글로불린 모이어티는 PSMA에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0102] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a,
- [0103] 여기서:
- [0104] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;
- [0105] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0106] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;
- [0107] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0108] 여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 가지고;
- [0109] 여기서 면역글로불린 모이어티는 야생형 면역글로불린과 비교하여 FcRn 수용체에 대한 친화도가 감소되거나 소거되며;
- [0110] 여기서 비-단백질 제제는 세포독소 또는 방사성 원소와 같은 치료학적 모이어티를 포함한다.
- [0111] 바람직하게는, 프레임워크 영역은 또한 각각의 항체로부터 유래된 다양한 프레임워크 영역을 정렬함으로써 결정될 수 있는 특정 잔기에서의 아미노산 변이를 포함하는 하기 표 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명은 또한 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VH로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VL로부터의 서열인 경우, 또는 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VL로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VH로부터의 서열인 경우를 포함한다. 바람직하게는, 면역글로불린 모이어티는 불변 중쇄 영역에서 His310 및/또는 His435와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 갖는다. 면역글로불린 모이어티는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0112] 바람직하게는, 비-단백질 제제는 방사성 원소를 포함한다.
- [0113] 본 발명은 또한 면역글로불린 모이어티 및 이에 접합된 비-단백질 제제를 포함하는 분자를 제공하며,
- [0114] 여기서, 면역글로불린 모이어티는 PSMA에 특이적으로 결합하고, 서열번호 4 또는 20의 아미노산 서열(N에서 C 말단 또는 C에서 N 말단의 순서로)로 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는 항원 결합 부위를 포함하고;
- [0115] 여기서 면역글로불린 모이어티는 야생형 면역글로불린과 비교하여 FcRn 수용체에 대한 친화도가 감소되거나 소거되며; 및
- [0116] 여기서 비-단백질 제제는 세포독소 또는 방사성 원소와 같은 치료학적 모이어티를 포함한다.
- [0117] 바람직하게는, 면역글로불린 모이어티는 불변 중쇄 영역에서 His310 및/또는 His435와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 갖는다. 면역글로불린 모이어티는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0118] 본 발명은 또한 면역글로불린 모이어티 및 이에 접합된 비-단백질 제제를 포함하는 분자를 제공하며,

- [0119] 여기서 면역글로불린 모이어티는 야생형 면역글로불린과 비교하여 FcRn 수용체에 대한 친화도가 감소되거나 소거되고, 면역글로불린 모이어티는 PSMA에 특이적으로 결합하고 다음 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0120] (i) 서열번호 1 또는 17에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열번호 2 또는 18에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 3 또는 19에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0121] (ii) 서열번호 4 또는 20에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 VH;
- [0122] (iii) 서열번호 33에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 34에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 35에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0123] (iv) 서열번호 36에 제시된 서열과 적어도 약 95% 동일한 서열을 포함하는 VL;
- [0124] (v) 서열번호 1 또는 17에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 2 또는 18에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 3 또는 19에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0125] (vi) 서열번호 4 또는 20에 제시된 서열을 포함하는 VH;
- [0126] (vii) 서열번호 33에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 34에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 45에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0127] (viii) 서열번호 36에 제시된 서열을 포함하는 VL;
- [0128] (ix) 서열번호 1 또는 17에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 2 또는 18에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 3 또는 19에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH; 및 서열번호 33에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 34에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 35에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL; 또는
- [0129] (x) 서열번호 4 또는 20에 제시된 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 36에 제시된 서열을 포함하는 VL.
- [0130] 바람직하게는, 면역글로불린 모이어티는 불변 중쇄 영역에서 His310 및/또는 His435와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 갖는다. 면역글로불린 모이어티는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 비-단백질 제제는 방사성 원소를 포함한다.
- [0131] 임의의 실시양태에서, 면역글로불린은 서열번호 235 내지 237 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 바람직하게는 여기서 중쇄 불변 영역은 서열번호 236에 제시된 서열을 포함한다.
- [0132] 또 다른 추가 실시양태에서, 면역글로불린은 서열번호 239 내지 242 중 어느 하나, 바람직하게는 서열번호 239에 제시된 서열을 포함한다.
- [0133] 임의의 실시양태에서, 면역글로불린은 서열번호 238의 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 면역글로불린은 서열번호 243에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.
- [0134] 특히 바람직한 실시양태에서, 면역글로불린은 서열번호 239 및 243에 제시된 서열을 포함한다.
- [0135] 본 발명은 또한 면역글로불린 모이어티 및 이에 접합된 비-단백질 제제를 포함하는 분자를 제공하며,
- [0136] 여기서, 면역글로불린 모이어티는 CAIX에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0137] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a,
- [0138] 여기서:
- [0139] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;
- [0140] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

- [0141] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;
- [0142] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0143] 여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 가지고,
- [0144] 여기서 면역글로불린 모이어티는 야생형 면역글로불린과 비교하여 FcRn 수용체에 대한 친화도가 감소되거나 소거되며;
- [0145] 여기서 비-단백질 제제는 세포독소 또는 방사성 원소와 같은 치료학적 모이어티를 포함한다.
- [0146] 바람직하게는, 프레임워크 영역은 또한 각각의 항체로부터 유래된 다양한 프레임워크 영역을 정렬함으로써 결정될 수 있는 특정 잔기에서의 아미노산 변이를 포함하는 하기 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명은 또한 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VH로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VL로부터의 서열인 경우, 또는 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VL로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VH로부터의 서열인 경우를 포함한다.
- [0147] 바람직하게는, 면역글로불린 모이어티는 불변 중쇄 영역에서 His310 및/또는 His435와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 갖는다. 면역글로불린 모이어티는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 비-단백질 제제는 방사성 원소를 포함한다.
- [0148] 본 발명은 또한 면역글로불린 모이어티 및 이에 접합된 비-단백질 제제를 포함하는 분자를 제공하며,
- [0149] 여기서, 면역글로불린 모이어티는 CAIX에 특이적으로 결합하고, 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116의 아미노산 서열(N에서 C 말단 또는 C에서 N 말단의 순서로)로 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는 항원 결합 부위를 포함하고;
- [0150] 여기서 면역글로불린 모이어티는 야생형 면역글로불린과 비교하여 FcRn 수용체에 대한 친화도가 감소되거나 소거되며;
- [0151] 여기서 비-단백질 제제는 세포독소 또는 방사성 원소와 같은 치료학적 모이어티를 포함한다.
- [0152] 바람직하게는, 면역글로불린 모이어티는 불변 중쇄 영역에서 His310 및/또는 His435와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 갖는다. 면역글로불린 모이어티는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 비-단백질 제제는 방사성 원소를 포함한다.
- [0153] 본 발명은 또한 면역글로불린 모이어티 및 이에 접합된 비-단백질 제제를 포함하는 분자를 제공하며,
- [0154] 여기서 면역글로불린 모이어티는 야생형 면역글로불린과 비교하여 FcRn 수용체에 대한 친화도가 감소되거나 소거되고, CAIX에 특이적으로 결합하고 다음 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0155] (i) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0156] (ii) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 VH;
- [0157] (iii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195, 또는 211에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0158] (iv) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열과 적어도 약 95% 동일한 서열을 포함하는 VL;
- [0159] (v) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에

제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;

- [0160] (vi) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH;
- [0161] (vii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194, 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0162] (viii) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL;
- [0163] (ix) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH; 및 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL; 또는
- [0164] (x) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL.
- [0165] 바람직하게는, 비-단백질 제제는 방사성 원소를 포함한다. 바람직하게는, 면역글로불린 모이어티는 불변 중쇄 영역에서 His310 및/또는 His435와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 갖는다. 면역글로불린 모이어티는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 비-단백질 제제는 방사성 원소를 포함한다.
- [0166] 임의의 실시양태에서, 면역글로불린은 서열번호 225 내지 228 중 어느 하나, 바람직하게는 서열번호 226에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0167] 또 다른 추가 실시양태에서, 면역글로불린은 서열번호 230 내지 233 중 어느 하나에 제시된 서열, 바람직하게는 서열번호 231에 제시된 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다.
- [0168] 임의의 실시양태에서, 면역글로불린은 서열번호 229에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 234의 서열을 포함한다.
- [0169] 특히 바람직한 실시양태에서, 면역글로불린은 서열번호 231 및 234에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0170] 본 발명은 또한 방법은 위에 기술된 바와 같이 접합된 면역글로불린 모이어티 및 비-단백질 제제를 포함하는 분자를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함을 포함하여, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0171] 본 발명은 또한 방사면역요법에 사용하기에 적합한 항체를 생성하는 방법을 제공하고, 방법은:
- [0172] - 방사면역요법이 필요한 세포 또는 조직에 존재하는 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 갖는 항체를 제공하는 단계;
- [0173] - 적어도 하나의 아미노산 치환을 항체의 중쇄 불변 영역에 도입하여 변형 항체를 생성하는 단계(여기서 적어도 하나의 아미노산 치환은 잔기 His310, His435, 및 Ile253에서의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 이로써 상기 항체의 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경됨);
- [0174] - 변형 항체를 방사성 원소와 접합시키는 단계를 포함하여,
- [0175] 이로써 방사면역요법에 사용하기에 적합한 항체를 생성한다.
- [0176] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 표 1 및 2에 기재된 바와 같은 상보성 결정 영역, 프레임워크 영역, 가변 경쇄 또는 가변 중쇄 영역 중 임의의 것을 갖는 항체를 포함하는, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체이다. 바람직하게는, 변형 항체는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는, 방사성 원소는 킬레이트제, 예를 들어 DOTA를 사용하여 변형 항체에 접합된다.
- [0177] 본 발명은 또한 질병의 치료에 사용하기 위한 항체-방사성 동위원소 면역접합체를 생성하는 방법을 제공하며, 방법은:
- [0178] - 방사면역요법이 필요한 세포 또는 조직에 존재하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 갖는 항체를 제공하는 단계;

- [0179] - 적어도 하나의 아미노산 치환을 항체의 중쇄 불변 영역에 도입하여 변형 항체를 생성하는 단계(여기서 적어도 하나의 아미노산 치환은 잔기 His310, His435, 및 Ile253에서의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 이로써 상기 항체의 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경됨);
- [0180] - 변형 항체를 방사성 원소와 접합시키는 단계를 포함하여,
- [0181] 이로써 질병의 치료에 사용하기 위한 항체-방사성 동위원소 면역접합체를 생성한다.
- [0182] 바람직하게는, 항체는 하기 표 1 및 2에 기재된 바와 같은 상보성 결정 영역, 프레임워크 영역, 가변 경쇄 또는 가변 중쇄 영역 중 임의의 것을 갖는 항체를 포함하는, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체이다. 바람직하게는, 변형 항체는 또한 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는, 방사성 원소는 킬레이트제, 예를 들어 DOTA를 사용하여 변형 항체에 접합된다. 보다 바람직하게는, 변형 항체는 아미노산 치환 His310Ala 및 His435Gln을 포함한다.
- [0183] 바람직하게는 질환은 전립선암 또는 신장세포암종을 포함하는 암이다.
- [0184] 본 발명은 비변형된 형태의 항체와 비교하여 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경된 변형 항체를 생산하는 방법을 추가로 제공하고, 여기서 상기 방법은,
- [0185] (a) 면역글로불린 중쇄의 적어도 하나의 불변 영역을 인코딩하는 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 적합한 프로모터를 포함하는 발현 벡터(바람직하게는 복제가능한 발현 벡터)를 제공하는 단계(여기서 아미노산 잔기 His310, His435 및 Ile253으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 중쇄 불변 영역으로부터의 적어도 하나의 아미노산이 비변형 항체에 존재하는 것과 상이한 아미노산으로 치환되고, 이로써 FcRn 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경됨);
- [0186] (b) 상기 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계; 및
- [0187] (c) 상기 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 상기 변형 항체를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0188] 선택적으로, 이러한 방법은 상보적 면역글로불린 경쇄를 인코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 제2 발현 벡터(바람직하게는 복제가능한 발현 벡터)를 제조하고 상기 세포주를 상기 제2 벡터로 추가로 형질전환시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0189] 본 발명은 방사면역요법에서 사용하기 위한 항체의 혈청 반감기를 변경하는 방법을 제공하고, 방법은:
- [0190] - 방사면역요법이 필요한 세포 또는 조직에 존재하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 갖는 항체를 제공하는 단계;
- [0191] - 적어도 하나의 아미노산 치환을 항체의 중쇄 불변 영역에 도입하여 변형 항체를 생성하는 단계(여기서 적어도 하나의 아미노산 치환은 잔기 His310, His435, 및 Ile253에서의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 이로써 상기 항체의 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기가 변경됨)를 포함한다.
- [0192] 바람직하게는, 방법은 변형 항체를 방사성 원소와 접합시키는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 항체는 하기 표 1 및 2에 기재된 바와 같은 상보성 결정 영역, 프레임워크 영역, 가변 경쇄 또는 가변 중쇄 영역 중 임의의 것을 갖는 항체를 포함하는, PSMA 또는 CAIX에 결합하기 위한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체이다. 바람직하게는, 변형 항체는 또한 Ser228Pro 및/또는 Leu235Glu를 포함하는 불변 중쇄 영역의 Ser228 및 Leu235와 상응하는 잔기에서 아미노산 치환을 포함한다. 보다 바람직하게는, 변형 항체는 아미노산 치환 His310Ala 및 His435Gln을 포함한다.
- [0193] 본 발명은 방사면역요법에서 사용하기 위한 항체의 독성을 감소시키는 방법을 제공하고, 방법은
- [0194] - 방사면역요법이 필요한 세포 또는 조직에 존재하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 갖는 항체를 제공하는 단계;
- [0195] - 적어도 하나의 아미노산 치환을 항체의 중쇄 불변 영역에 도입하여 변형 항체를 생성하는 단계(여기서 적어도 하나의 아미노산 치환은 잔기 His310, His435, 및 Ile253에서의 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 치환은 혈청 반감기를 감소시키고/시키거나 순환으로부터 변형 항체의 제거를 증가시킴)를 포함하고,
- [0196] 이로써 항체가 방사면역요법에 사용하기 위해 방사성 원소에 접합하는 경우 항체의 독성을 감소시킬 수 있다.

- [0197] 임의의 실시양태에서, 항체의 독성을 감소시키는 것은, 그렇지 않은 경우 순환(혈액학적 독성, 골 흡수 및 골수 조사를 포함함)에서 방사성 동위원소의 장기간 체류로 인해 발생할 수 있는 많은 독성 영향을 감소시키는 것을 포함한다.
- [0198] 임의의 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 방사성-표지된 항체 또는 방사면역접합체의 독성은 대상체에 투여한 후 항체 또는 면역접합체의 종양:혈액 비율을 결정함으로써 평가된다.
- [0199] 본 발명의 임의의 실시양태에서, 본 발명의 변형 항체의 종양:혈액 비율은, 비율이 항체 투여 후 적어도 8시간에 결정될 때, 본 명세서에 기재된 바와 같은 중쇄 불변 영역에 대한 변형을 갖지 않는 비변형 항체에 대한 것보다 적어도 2배 이상, 적어도 3배 이상, 적어도 4배 이상, 적어도 6배 이상, 적어도 8배 이상 또는 적어도 10배 이상 또는 그 이상이다. 대안적으로, 비율은 대상체에 대한 항체를 투여한 후 적어도 24, 48, 72 또는 120시간에 결정된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 변형 항체의 종양:혈액 비율은, 비율이 항체를 투여한 후 적어도 120시간에 결정될 때, 본 명세서에 기재된 바와 같은 중쇄 불변 영역에 대한 변형을 갖지 않는 비변형 항체에 대한 것보다 적어도 50배 이상, 적어도 100배 이상, 적어도 200배 이상, 또는 적어도 300배 이상이다.
- [0200] 본 발명의 임의의 실시양태에서, 비변형 항체와 비교하여 감소되거나 변경된 혈청 반감기를 갖는 본 명세서에 기재된 변형 항체는 비변형 항체보다 적어도 2배, 적어도 3배 또는 이상 더 빠른 혈청 제거율을 갖는다.
- [0201] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 치료학적 쌍에 사용하는데 적합하며, 여기서 치료학적 쌍은 1) 영상화제에 커플링된 항체 및 2) 요법을 위한 제제에 커플링된 항체를 포함한다. 예를 들어, 항체는 먼저 방사선 영상화에 사용하기에 적합한 방사성 동위원소에 커플링될 때 진단제로 사용될 수 있고, 두 번째로 항체는 요법에 사용하기에 적합한 방사성 동위원소 또는 세포독성제에 커플링될 때 치료제로 사용될 수 있다.
- [0202] 본 발명은 또한 다음을 포함하는 대상체에서 질병, 장애 또는 감염을 진단, 모니터링 또는 예측하는 생체내 방법을 제공한다:
- [0203] (a) 질병, 장애 또는 감염과 관련된 항원에 특이적으로 결합하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 변형 항체의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계;
- [0204] (b) 항체가 상기 항원이 발견되는 상기 대상체의 부위에 농축되도록 하는 단계; 및
- [0205] (c) 상기 변형 항체를 검출하는 단계;
- [0206] 이로써 백그라운드 또는 표준 수준 이상의 상기 변형 항체의 검출은 대상체가 상기 질병 장애 또는 감염을 가짐을 나타냄.
- [0207] 본 발명은 전립선 특이적 막 항원(PSMA)에 결합하거나 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 항원 결합 부위는 인간 PSMA에 결합하거나 특이적으로 결합한다.
- [0208] 본 발명은 PSMA에 대한 결합을 위한 항원 결합 부위를 제공하고, 항원 결합 부위는 다음을 포함한다:
- [0209] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a
- [0210] 여기서:
- [0211] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;
- [0212] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0213] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;
- [0214] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0215] 여기서 프레임워크 영역 또는 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 본 명세서에 기재된 바와 같다.
- [0216] 본 발명은 PSMA에 대한 결합을 위한 항원 결합 부위를 제공하고, 항원 결합 부위는 다음을 포함한다:
- [0217] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a
- [0218] 여기서:
- [0219] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

- [0220] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0221] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;
- [0222] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0223] 여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 프레임워크 영역은 또한 각각의 항체로부터 유래된 다양한 프레임워크 영역을 정렬함으로써 결정될 수 있는 특정 잔기에서의 아미노산 변이를 포함하는 하기 표 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명은 또한 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VH로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VL로부터의 서열인 경우, 또는 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VL로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VH로부터의 서열인 경우를 포함한다.
- [0224] 본 발명은 서열번호 4 또는 20의 아미노산 서열(N에서 C 말단 또는 C에서 N 말단의 순서로)을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는 항원 결합 부위를 제공한다.
- [0225] 본 발명은 또한 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 부위를 제공하며, 여기서 항원 결합 도메인은 PSMA에 결합하거나 특이적으로 결합하며, 항원 결합 도메인은 다음 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0226] (i) 서열번호 1 또는 17에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열번호 2 또는 18에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 3 또는 19에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0227] (ii) 서열번호 4 또는 20에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 VH;
- [0228] (iii) 서열번호 33에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 34에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 35에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0229] (iv) 서열번호 36에 제시된 서열과 적어도 약 95% 동일한 서열을 포함하는 VL;
- [0230] (v) 서열번호 1 또는 17에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 2 또는 18에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 3 또는 19에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0231] (vi) 서열번호 4 또는 20에 제시된 서열을 포함하는 VH;
- [0232] (vii) 서열번호 33에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 34에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 45에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0233] (viii) 서열번호 36에 제시된 서열을 포함하는 VL;
- [0234] (ix) 서열번호 1 또는 17에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 2 또는 18에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 3 또는 19에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH; 및 서열번호 33에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 34에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 35에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL; 또는
- [0235] (x) 서열번호 4 또는 20에 제시된 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 36에 제시된 서열을 포함하는 VL.
- [0236] 본 발명의 임의의 국면에서, 항원 결합 도메인은 다음 중 적어도 하나를 추가로 포함한다:
- [0237] (i) 서열번호 9 또는 25에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 프레임워크 영역(FR) 1, 서열번호 10 또는 26에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 11 또는 27에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 12 또는 28에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR4

를 포함하는 VH;

- [0238] (ii) 서열번호 41에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 42에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 43에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 44에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR4을 포함하는 VL;
- [0239] (iii) 서열번호 9 또는 25에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 10 또는 26에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 11 또는 27에 제시된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 12 또는 28에 제시된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VH;
- [0240] (iv) 서열번호 41에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 42에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 43에 제시된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 44에 제시된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VL; 또는
- [0241] (v) 서열번호 9 또는 25에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 10 또는 26에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 11 또는 27에 제시된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 12 또는 28에 제시된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VH; 및 서열번호 41에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 42에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 43에 제시된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 44에 제시된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VL.
- [0242] 임의의 실시양태에서, 항원 결합 부위는 서열번호 235 내지 237 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 바람직하게는 여기서 중쇄 불변 영역은 서열번호 236에 제시된 서열을 포함한다.
- [0243] 또 다른 추가 실시양태에서, 항원 결합 부위는 서열번호 239 내지 242, 바람직하게는 239 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함한다.
- [0244] 임의의 실시양태에서, 항원 결합 부위는 서열번호 238의 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 항원 결합 부위의 경쇄는 서열번호 243의 서열을 포함한다.
- [0245] 특히 바람직한 실시양태에서, 항원 결합 부위는 서열번호 239 및 243에 제시된 서열을 포함한다.
- [0246] 본 발명은 또한 탄산탈수효소 IX(CAIX)에 결합하거나 또는 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 항원 결합 부위는 인간 CAIX에 결합하거나 특이적으로 결합한다.
- [0247] 본 발명은 CAIX에 대한 결합을 위한 항원 결합 부위를 제공하고, 항원 결합 부위는 다음을 포함한다:
- [0248] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a
- [0249] 여기서:
- [0250] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;
- [0251] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0252] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;
- [0253] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0254] 여기서 프레임워크 영역 또는 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 본 명세서에 기재된 바와 같다.
- [0255] 본 발명은 CAIX에 대한 결합을 위한 항원 결합 부위를 제공하고, 항원 결합 부위는 다음을 포함한다:
- [0256] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - 링커 - FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a
- [0257] 여기서:
- [0258] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;
- [0259] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0260] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 프레임워크 영역이며;

- [0261] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역이고;
- [0262] 여기서 상보성 결정 영역 중 임의의 것의 서열은 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 프레임워크 영역은 또한 각각의 항체로부터 유래된 다양한 프레임워크 영역을 정렬함으로써 결정될 수 있는 특정 잔기에서의 아미노산 변이를 포함하는 하기 표 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명은 또한 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VH로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VL로부터의 서열인 경우, 또는 CDR1, CDR2 및 CDR3이 VL로부터의 서열이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a가 VH로부터의 서열인 경우를 포함한다.
- [0263] 본 발명은 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116의 아미노산 서열(N에서 C 말단 또는 C에서 N 말단의 순서로)을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나 이로 구성되는 항원 결합 부위를 제공한다.
- [0264] 본 발명은 또한 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 부위를 제공하며, 여기서 항원 결합 도메인은 CAIX에 결합하거나 특이적으로 결합하며, 항원 결합 도메인은 다음 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0265] (i) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0266] (ii) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 VH;
- [0267] (iii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195, 또는 211에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0268] (iv) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열과 적어도 약 95% 동일한 서열을 포함하는 VL;
- [0269] (v) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH;
- [0270] (vi) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH;
- [0271] (vii) 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194, 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL;
- [0272] (viii) 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL;
- [0273] (ix) 서열번호 49, 65, 81, 97 또는 113에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 50, 66, 82, 98 또는 114에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 51, 67, 83, 99 또는 115에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH; 및 서열번호 129, 145, 161, 177, 193, 또는 209에 제시된 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 130, 146, 162, 178, 194 또는 210에 제시된 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 131, 147, 163, 179, 195 또는 211에 제시된 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VL; 또는
- [0274] (x) 서열번호 52, 68, 84, 100 또는 116에 제시된 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 132, 148, 164, 180, 196 또는 212에 제시된 서열을 포함하는 VL.
- [0275] 본 발명의 임의의 국면에서, 항원 결합 도메인은 다음 중 적어도 하나를 추가로 포함한다:
- [0276] (i) 서열번호 57, 73, 89, 105 또는 124에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 프레임워크 영역(FR) 1, 서열번호 58, 74, 90, 106 또는 122에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도

97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 59, 75, 91, 107 또는 123에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 60, 76, 92, 108 또는 124에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VH;

[0277] (ii) 서열번호 137, 153, 169, 185, 201 또는 217에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 138, 154, 170, 186, 202, 또는 218에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 139, 155, 171, 187, 203, 또는 219에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 140, 156, 172, 188, 204 또는 220에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 FR4을 포함하는 VL;

[0278] (iii) 서열번호 57, 73, 89, 105, 또는 124에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 58, 74, 90, 106, 또는 122에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 59, 75, 91, 107 또는 123에 제시된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 60, 76, 92, 108, 또는 124에 제시된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VH;

[0279] (iv) 서열번호 137, 153, 169, 185, 201 또는 217에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 138, 154, 170, 186, 202 또는 218에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 139, 155, 171, 187, 203 또는 219에 제시된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 140, 156, 172, 188, 204 또는 220에 제시된 서열을 포함하는 FR4를 포함하는 VL; 또는

[0280] (v) 서열번호 57, 73, 89, 105, 또는 124에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 58, 74, 90, 106 또는 122에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 59, 75, 91, 107 또는 123에 제시된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 60, 76, 92, 108, 또는 124에 제시된 서열을 포함하는 FR4을 포함하는 VH; 및 서열번호 137, 153, 169, 185, 201, 또는 217에 제시된 서열을 포함하는 FR1, 서열번호 138, 154, 170, 186, 202 또는 218에 제시된 서열을 포함하는 FR2, 서열번호 139, 155, 171, 187, 203, 또는 219에 제시된 서열을 포함하는 FR3, 및 서열번호 140, 156, 172, 188, 204, 또는 220에 제시된 서열을 포함하는 FR4을 포함하는 VL.

[0281] 하나의 실시양태에서, VH는 서열번호 84 또는 100에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 84 또는 100에 제시된 서열을 포함하고 VL은 서열번호 164, 180 또는 196에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 164, 180 또는 196에 제시된 서열을 포함한다. 바람직하게는, VH는 서열번호 84 또는 100에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 84 또는 100에 제시된 서열을 포함하고 VL은 서열번호 180 또는 196에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 180 또는 196에 제시된 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, VH는 서열번호 84에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 84에 제시된 서열을 포함하고 VL은 서열번호 196에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 196에 제시된 서열을 포함한다. 대안적으로, VH는 서열번호 100에 제시된 서열과 적어도 약 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 또는 서열번호 100에 제시된 서열을 포함하고 VL은 서열번호 180 또는 196, 바람직하게는 196에 제시된 서열을 포함한다.

[0282] 전술한 항원 결합 부위는 또한 항체의 항원 결합 도메인으로 지칭될 수 있다.

[0283] 바람직하게는, 본 명세서에 기재된 항원 결합 부위는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 전형적으로, 항원 결합 부위는 항체, 예를 들어 모노클로날 항체이다.

[0284] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 항원 결합 부위는 다음의 형태일 수 있다:

[0285] (i) 단일 사슬 Fv 단편(scFv);

[0286] (ii) 이량체 scFv(디-scFv);

[0287] (iii) 항체의 불변 영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인(CH)₂ 및/또는 CH₃에 연결된 (i) 또는 (ii) 중 하나; 또는

- [0288] (iv) 면역 이펙터 세포에 결합하는 단백질에 연결된 (i) 또는 (ii) 중 하나.
- [0289] 또한, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 항원 결합 부위는 다음의 형태일 수 있다:
- [0290] (i) 디아바디(diabody);
- [0291] (ii) 트리아바디(triabody);
- [0292] (iii) 테트라바디(tetrabody);
- [0293] (iv) Fab;
- [0294] (v) F(ab')₂;
- [0295] (vi) Fv;
- [0296] (vii) 항체의 불변 영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인(CH)₂ 및/또는 CH₃에 연결된 (i) 내지 (vi) 중 하나; 또는
- [0297] (viii) 면역 이펙터 세포에 결합하는 단백질에 연결된 (i) 내지 (vi) 중 하나.
- [0298] 임의의 국면 또는 실시양태에서, 항체는 네이키드 항체이다. 구체적으로, 항체는 비접합 형태이고 접합체를 형성하도록 조정되지 않는다.
- [0299] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원 결합 부위, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab (단일 도메인 항체), di-scFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단일사슬 항체 분자, 또는 다중특이적 항체를 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [0300] 본 발명은 또한 표지 또는 세포독성제에 접합된 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원 결합 부위, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, di-scFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단일사슬 항체 분자, 또는 다중특이적 항체 또는 융합 단백질 형태의 접합체를 제공한다.
- [0301] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원 결합 부위, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, di-scFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단일사슬 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질 또는 접합체에 결합하기 위한 항체를 제공한다.
- [0302] 바람직한 실시양태에서, 항원 결합 부위는 항체 불변 도메인, CH₂-CH₃ 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG 면역글로불린이며, 이는 야생형 항체 Fc 영역에 비해 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체의 결합을 변형시킨다. 하나 이상의 아미노산 변형은 FcRn에 대한 항체 불변 도메인, Fc 영역, 또는 이의 FcRn 결합 단편의 친화도를 변화시킴으로써 항원 결합 부위의 혈청 반감기를 변경시킨다.
- [0303] 바람직하게는, 이러한 치환은 비변형 야생형 항체에 대해 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 상기 변형 항체의 혈청 반감기를 변경시킨다. 본 발명은 또한 비변형 항체와 비교하여 FcRn에 대한 감소된 결합 친화도 및/또는 감소된 혈청 반감기를 갖는 변형 항체를 제공하며, 여기서 CH₂ 도메인의 Ile253 또는 His310 위치에 존재하는 임의의 하나 이상의 아미노산 잔기 및/또는 CH₃ 도메인의 잔기 His435는 비변형 항체 또는 비변형 IgG에 존재하는 아미노산과 상이한 또 다른 아미노산으로 치환된다.
- [0304] 하나의 예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 H310 및 H435에 상응하는 잔기에서의 아미노산 치환으로부터 선택된다. 추가의 예에서, 항체는 His310 및 His435 잔기 둘 다에서 아미노산 치환을 포함한다.
- [0305] 아미노산 치환은 히스티딘 잔기로부터 알라닌, 글루타민, 글루탐산 또는 아스파르트산으로의 치환을 포함할 수 있다. 바람직하게는, His310에서의 아미노산 치환은 알라닌으로의 치환이다. 바람직하게는, His435에서의 아미노산 치환은 글루타민으로의 치환이다. 바람직하게는, Ile253에서의 아미노산 치환은 알라닌으로의 치환이다.
- [0306] 추가 실시양태에서, 항원 결합 부위는 활성화 Fc 감마 수용체에 대한 항체의 결합을 변형시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 항체이다. 하나 이상의 아미노산 변형은 임의의 하나 이상의 Fc 감마 수용체에 대한 항체 불변 도메인, Fc 영역, 또는 Fc 감마 수용체 결합 단편의 친화도를 변화시킨다. 바람직하게는, 아미노산 변형은 Leu235에 상응하는 잔기에 존재한다. 보다 바람직하게는, 아미노산 변형은 Leu235에서 글루탐산으로의 변형이다.
- [0307] 하나의 실시양태에서, 아미노산 변형은 Ser228에서의 힌지 안정화 돌연변이이다. 바람직하게는, Ser228에서의

아미노산 변형은 프롤린으로의 변형이다.

- [0308] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 항체는 Ser228, Leu235, His310 및 His435에서의 돌연변이를 포함한다. 바람직하게는, 아미노산 변형은 Ser228Pro, Leu235Glu, His310Ala 및 His435Gln이다.
- [0309] 아미노산 변형은 바람직하게는 IgG1 이소형을 갖는 항체에서, 또는 IgG4 이소형 상에서 이루어진다.
- [0310] 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열번호 225 내지 228 또는 235 내지 238 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0311] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원 결합 부위, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, di-scFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단일사슬 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질 또는 접합체를 인코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0312] 하나의 예에서, 이러한 핵산은 핵산이 프로모터에 작동가능하게 연결된 발현 작제물에 포함된다. 이러한 발현 작제물은 벡터, 예를 들어 플라스미드에 존재할 수 있다.
- [0313] 단일 폴리펩티드 사슬 항원 결합 부위에 관한 본 발명의 예에서, 발현 작제물은 해당 폴리펩티드 사슬을 인코딩하는 핵산에 연결된 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0314] 항원 결합 부위를 형성하는 다중 폴리펩티드 사슬에 대한 예에서, 발현 작제물은 예를 들어 프로모터에 작동가능하게 연결된 VH를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 및 예를 들어 프로모터에 작동가능하게 연결된 VL을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함한다.
- [0315] 또 다른 예에서, 발현 작제물은 바이시스트론 발현 작제물로, 예를 들어 5'에서 3' 순서로 작동 가능하게 연결된 다음의 구성요소를 포함한다:
- [0316] (i) 프로모터;
- [0317] (ii) 제1 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산;
- [0318] (iii) 내부 리보솜 진입 부위; 및
- [0319] (iv) 제2 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산,
- [0320] 여기서 제1 폴리펩티드는 VH를 포함하고 제2 폴리펩티드는 VL을 포함하거나 또는 그 반대이다.
- [0321] 본 발명은 또한, 하나는 VH를 포함하는 제1 폴리펩티드를 인코딩하고, 다른 하나는 VL을 포함하는 제2 폴리펩티드를 인코딩하는 별개의 발현 작제물을 고려한다. 예를 들어, 본 발명은 또한 하기를 포함하는 조성물을 제공한다:
- [0322] (i) 프로모터에 작동가능하게 연결된 VH를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 제1 발현 작제물; 및
- [0323] (ii) 프로모터에 작동가능하게 연결된 VL을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 제2 발현 작제물.
- [0324] 본 발명은 본 명세서에 기재된 벡터 또는 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 바람직하게는, 세포는 분리되거나, 실질적으로 정제되거나 재조합된다. 하나의 예에서, 세포는 본 발명의 발현 작제물을 포함하거나 또는:
- [0325] (i) 프로모터에 작동가능하게 연결된 VH를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 제1 발현 작제물; 및
- [0326] (ii) 프로모터에 작동가능하게 연결된 VL을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 제2 발현 작제물을 포함하고,
- [0327] 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드는 회합하여 본 발명의 항원 결합 부위를 형성한다.
- [0328] 본 발명의 세포의 예로 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포를 포함한다.
- [0329] 본 발명은 또한 항원 결합 부위를 포함하거나 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 CDR 및/또는 FR 서열, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab(단일 도메인 항체), di-scFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단일사슬 항체 분자, 또는 다중특이적

항체, 융합 단백질, 또는 접합체 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

- [0330] 본 발명은 또한 항원 결합 부위를 포함하거나 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 CDR 및/또는 FR 서열, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원 결합 부위, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, di-scFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단일사슬 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질, 또는 접합체, 희석제 및 선택적으로 표지를 포함하는 진단용 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 항원 결합 부위는 방사성 동위원소에 접합된 단일클론 항체이다.
- [0331] 본 발명은 또한 항원 결합 부위를 포함하거나 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 CDR 및/또는 FR 서열, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, di-scFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단일사슬 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질, 또는 접합체를 포함하는 키트 또는 제조 용품을 제공한다.
- [0332] 바람직하게는, 항원 결합 부위는 방사성 동위원소에 접합된 단일클론 항체이다.
- [0333] 본 명세서에 기재된 항원 결합 부위, 단백질 또는 항체는 인간 불변 영역, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 불변 영역 또는 이들의 혼합과 같은 IgG 불변 영역을 포함할 수 있다. VH 및 VL을 포함하는 항체 또는 단백질의 경우, VH는 중쇄 불변 영역에 연결될 수 있고 VL은 경쇄 불변 영역에 연결될 수 있다.
- [0334] 하나의 예에서, 본 명세서에 기술된 단백질 또는 항체 또는 본 명세서에 기술된 단백질 또는 항체의 조성물은 안정화된 중쇄 불변 영역을 포함하는, C-말단 라이신 잔기가 있거나 없는 서열의 혼합을 완전히 또는 부분적으로 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0335] 하나의 예에서, 본 발명의 항체는 IgG4 불변 영역 또는 안정화된 IgG4 불변 영역(예를 들어, 상기 논의된 바와 같음)에 연결되거나 융합된 본 명세서에 개시된 VH를 포함하고, VL은 카파 경쇄 불변 영역에 연결되거나 융합된다.
- [0336] 본 발명의 항원 결합 부위의 기능적 특징을 취하여 본 발명의 항체에 준용하여 적용할 것이다.
- [0337] 본 명세서에 기재된 항원 결합 부위는 정제, 실질적으로 정제, 분리 및/또는 재조합될 수 있다.
- [0338] 본 발명은 또한 본 발명의 항원 결합 부위를 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 이와 관련하여, 항원 결합 부위는 상태의 재발을 예방하기 위해 사용될 수 있으며, 이는 상태를 예방하는 것으로 간주된다.
- [0339] 예시적인 암은 전립선암을 포함한다. PSMA에 대한 친화도를 갖는 항체가 이러한 목적에 유용할 것임을 이해할 것이다.
- [0340] 예시적인 다른 암은 신장암을 포함한다. CAIX에 대한 친화도를 갖는 본 발명의 항체가 이러한 목적에 유용할 것임을 이해할 것이다.
- [0341] 본 발명은 또한 다음을 포함하는 대상체에서 질병, 장애 또는 감염을 진단, 모니터링 또는 예측하는 생체내 방법을 제공한다:
- [0342] (a) 질병, 장애 또는 감염과 관련된 항원에 특이적으로 결합하는 본 명세서에 기재된 상기 항체의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계;
- [0343] (b) 항체가 상기 항원이 발견되는 상기 대상체의 부위에 농축되도록 하는 단계; 및
- [0344] (c) 상기 항체를 검출하는 단계;
- [0345] 이로써 백그라운드 또는 표준 수준 이상의 상기 항체의 검출은 대상체가 상기 질병 장애 또는 감염을 가짐을 나타냄.
- [0346] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 문맥상 달리 요구되는 경우를 제외하고, 용어 "포함한다(comprise)", 및 이러한 용어의 변형, 예를 들면, "포함하는(comprising)", "포함하다(comprises)" 및 "포함된(comprised)"은 추가의 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하도록 의도하지는 않는다.
- [0347] 본 발명의 추가의 국면 및 선행 단락에서 설명된 국면의 추가 실시양태는 첨부 도면을 참조하여 예시로서 제공된 다음 기술된 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0348] 도 1: 본 발명의 항체의 평균 반감기 및 반감기의 Tukey 다중 비교.

오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. A: ChGmAb = 키메라 지렌투시맵 (chimeric girentuximab). HuGmAb = 인간화 지렌투시맵; HuGmAb-FcRn = 아미노산 치환 H310A 및 435Q를 갖는 인간화 지렌투시맵. HuGmAb-FcRg = 아미노산 치환 S228P, 235E, H310A 및 435Q를 갖는 인간화 지렌투시맵. B. J591 IgG = PSMA 결합을 위한 대조군 HuJ591 항체. ANT4044-K-DOTA = DOTA에 접합된 항체 ANT4044 라이신. ANT4044-A2-K-DOTA = DOTA에 접합된 항체 ANT4044-A2 라이신. ANT4044-FcRn-K-DOTA = FcRn-결합 영역 내 아미노산 치환이 있는, DOTA에 접합된 항체 ANT4044 라이신. ANT4044-FcRg-K-DOTA = FcRn 및 Fc 감마 수용체 결합 영역에 아미노산 치환이 있는, DOTA에 접합된 항체 ANT4044 라이신.

도 2: 본 발명의 선택된 항체에 대한 평균 곡선 아래 면적(AUC) 및 제거율(CL).

J591 IgG = PSMA 결합을 위한 대조군 HuJ591 항체. ANT4044-K-DOTA = DOTA에 접합된 항체 ANT4044 라이신. ANT4044-A2-K-DOTA = DOTA에 접합된 항체 ANT4044-A2 라이신. ANT4044-FcRn-K-DOTA = FcRn-결합 영역 내 아미노산 치환이 있는, DOTA에 접합된 항체 ANT4044 라이신. ANT4044-FcRg-K-DOTA = FcRn 및 Fc 감마 수용체 결합 영역 내 아미노산 치환이 있는, DOTA에 접합된 항체 ANT4044 라이신.

도 3: PET 영상의 ROI 분석으로 결정된 8시간에서의 항체 생체분포.

도 4: PET 영상의 ROI 분석으로 결정된 24시간에서의 항체 생체분포.

도 5: 생체 외 감마 계수로 결정된 48시간에서의 모든 항체의 생체분포.

도 6: PET 영상의 ROI 분석으로 결정된 48시간에서의 항체 생체분포.

도 7: 주입 후 5일까지 항체의 혈액 농도.

도 8: 영상화(8시간, 24시간, 48시간)로 결정된 항체의 종양 축적

도 9: 항체의 종양 대비 혈액의 비율.

각각의 항체에 대한 종양:혈액 비율(생체내 종양:꼬리 혈액)을 8시간, 24시간 및 48시간 시점에 결정하였다. 비율은 항체 JN005 및 hJ591과 비교하여 모든 시점에서 JN006 및 JN007이 상당히 더 높다.

도 10: 항체의 종양 대비 혈액의 비율.

각각의 항체에 대한 종양:혈액 비율(생체외:생체외)을 48시간 및 120시간 시점에서 결정하였다. 비율은 항체 JN005 및 hJ591과 비교하여 모든 시점에서 JN006 및 JN007이 상당히 더 높다.

도 11: 본 발명의 예시적인 항체의 생체내 영상화 및 생체내 분포.

본 발명의 항-PSMA, FcRn-K-DOTA-Lu-변형 항체를 받은 LNCap 이종이식 마우스에서의 SPECT 영상화.

도 12: 본 발명의 예시적인 항체의 혈액 약동학.

본 발명의 항-PSMA, FcRn-K-DOTA-Lu-변형 항체의 투여 후 마우스의 혈액에서 측정된 방사능 수준.

도 13: 본 발명의 예시적인 항체로 처리된 LNCap-보유 이종이식 마우스에서의 효능 연구.

본 발명의 항-PSMA, K-DOTA-Lu FcRn-변형 항체와의 처리는 0일과 비교하여 14일에 종양 부피의 변화가 없으므로 입증된 바와 같이 종양 성장을 유의하게 억제하였다. 대조군(PBS) 그룹에서는 FcRn-K-DOTA-Lu 처리 그룹의 해당 시간과 비교할 때 9일, 12일 및 14일에 종양이 상당히 커지면서 종양 부피가 전반적으로 증가했다.

도 14: 본 발명의 예시적인 항체의 투여 후 LNCap-보유 이종이식 마우스에서의 종양:혈액 비율.

FcRn-결합을 감소시키도록 변형된 본 발명의 항-PSMA, K-DOTA-Lu 항체(HuX592R-DOTA-Lu177)로 처리된 마우스에 대한 종양:혈액 비율을 나타낸다. 대조군 마우스에 항-PSMA, K-DOTA-Lu 항체 (HuJ591-DOTA-Lu177)를 투여하였다. 비변형 항체를 받은 마우스에 비해 특히 24시간 및 48시간 시점에서 FcRn 변형 항체를 받은 마우스가 비율이 더 높았다.

도 15: 종양 내로의 ⁸⁹Zr-DFOsq-FcRn-GmAb 및 ⁸⁹Zr-DFOsq-cGmAb-CHO 흡수의 시간 활성 곡선, 및 종양 대 조직의

비율.

PET 영상을 분석하고 결과를 평균 $\pm$ SEM, $n = 3$, **** $P < 0.0001$ 로 나타내었다.

도 16: 생체 외 생체분포 분석.

마우스를 $^{89}\text{Zr-DFOSq-FcRn-GmAb}$ (상부 패널) 및 $^{89}\text{Zr-DFOSq-cGmAb-CHO}$ (하부 패널) 접종 후 24, 48 및 144시간에 안락사시켰다. 조직을 수거하고 무게를 측정하고 감마 계수기에서 계수하였다. 추적자 흡수는 주입 용량/그램 조직 백분율로 표시된다. $n = 2$ 인 24시간 cGmAb-CHO를 제외하고 평균 $\pm$ SEM, $n = 3$ 인 데이터를 나타낸다.

도 17: 생체 외 감마 계수로 측정된 건강한 수컷 Balb/c 누드 마우스의 ^{177}Lu -표지된 HuX592R 및 HuJ591 생체분포.

A는 투여 후 24, 48 및 72시간에 평가된 HuX592R 생체분포를 나타내는 반면, B는 투여 후 72시간에서의 HuX592R의 생체분포를 HuJ591과 비교하여 도시한다.

도 18: HuX592R(FcRn-K-DOTA-Lu)의 투여 후 또는 무처리 대조군의 각 치료 코호트에서 LNCaP 이종이식 종양의 퇴행.

도 19: TLX592(FcRn-K-DOTA-Lu), TLX591(K-DOTA-Lu 항체, 본 명세서에서 HuJ591-DOTA-Lu177로도 지칭됨)의 투여 후 또는 무처리 대조군의 연구 기간 동안 코호트 생존의 플롯.

도 20: 본 발명의 예시적인 $^{225}\text{-Ac-DOTA-}$ 또는 $^{177}\text{-Lu-DOTA-}$ 표지된 인간화 항-CAIX 결합 항체의 치료 효능

무처리 대조군과 비교하여 $^{225}\text{-Ac-DOTA-hG250}$ 또는 $^{177}\text{-Lu-DOTA-hG250}$ 의 투여 후 시간 경과에 따른 평균 종양 크기(mm^3)의 변화.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0349] 본 명세서에 개시되고 정의된 본 발명은 텍스트 또는 도면으로부터 언급되거나 명백한 개별 특징들 중 둘 이상의 모든 대안적인 조합으로 확장된다는 것을 이해할 것이다. 이들 상이한 조합 모두는 본 발명의 다양한 대안적 국면을 구성한다.
- [0350] 본 발명의 추가의 국면 및 선행 단락에서 설명된 국면의 추가 실시양태는 첨부 도면을 참조하여 예시로서 제공된 다음 기술설명으로부터 명백해질 것이다.
- [0351] 이제 본 발명의 특정 실시양태를 상세히 참조할 것이다. 본 발명은 실시양태와 관련하여 기재될 것이지만, 본 발명을 이러한 실시양태로 제한하려는 의도가 아님을 이해할 것이다. 반대로, 본 발명은 청구범위에 의해 정의된 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 수정 및 등가물을 포함하도록 의도된다.
- [0352] 본 발명은 부분적으로 방사면역요법에 사용하기 위한 방사면역결합체의 독성을 감소시키기 위한 새로운 접근법의 확인에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 방법은 방사면역결합체의 치료 잠재력에 상당한 영향을 미치지 않으면서 독성을 감소시킨다.
- [0353] 앞서 설명한 바와 같이 건강한 조직과 세포에 대한 방사선 손상은 방사면역요법과 관련된 주요 문제이다. 독성은 RAIT의 방사선량을 심각하게 제한하고 종양 치료의 효과를 감소시킨다.
- [0354] 그러나, 본 발명자들은 항체의 불변 중쇄를 변형시켜 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체의 친화도를 감소시켜 야생형 항체에 비해 혈청 반감기를 감소시킨 방사면역요법에서 사용하기 위한 항체를 개발하였다. 따라서, 본 발명자들에 의해 개발된 항체는 다양한 면역요법에 사용하는데 상당한 이점을 갖는다.
- [0355] 치료 항체의 FcRn-결합 도메인의 변형이 이전에 보고되었지만, 이러한 변형은 예를 들어 치료 항체의 혈청 반감기를 증가시키고 순환에 있어서 치료 항체의 체류를 연장하기 위해 FcRn 친화도를 증가시킬 목적으로 개발되어 왔다. 선행 기술의 접근 방식과 대조적으로, 본 발명은 치료제의 혈청 반감기를 감소시키는 것을 목표로 한다.
- [0356] 놀랍게도, 본 발명자들은 혈청 반감기를 감소시킴(및 투여 후 전신 순환으로부터 제거율이 증가함)에도 불구하고, 본 발명의 항체가 비변형 항체로서 종양 부위로 전달되고 축적될 수 있는 유사한 능력을 갖는다는 것을 발견하였다. 이러한 결과는 변형 항체와 비변형 항체에 대한 종양 로딩이 통계적으로 상이하지 않다는 점에서 놀

라운 일이며, 이는 본 발명자들이 채택한 접근법이 혈청 반감기 및 그에 따른 독성을 상당히 감소시키면서, 항체가 표적 에피토프에 결합하는 능력 또는 항체가 표적 부위에 전달되는 능력에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

[0357] 보다 중요하게는, 본 발명자들은 증가된 제거율에도 불구하고 본 발명의 변형 항체가 종양 부위에 상주하는 것을 보여주었다. 따라서 본 발명자들의 연구는 방사성 표지된 항체의 FcRn 또는 FcRn 및 Fc 감마 수용체 결합 도메인의 변형이 종양에 축적되는 항체의 능력과 관련하여 항체의 치료 잠재력에 영향을 미치지 않으면서 순환에 있어서 방사성 동위원소의 양을 줄이는 데 상당히 유용함을 나타낸다. 이것은 순환에서 방사성 동위원소의 장기간 체류로 인해 발생할 수 있는 많은 독성 영향(골수 조사 및 골 흡수의 결과로서 혈액학적 독성을 포함함)을 줄이는 것을 포함하여 많은 이점을 가진다. 더욱이, 지금까지 많은 RAIT 요법에 대한 용량 제한 독성이 이러한 확장된 혈액 순환 및 골수 조사의 직접적인 결과로서 혈액학적 독성이었다는 점을 고려하면, 본 발명은 더 높은 수준에서 허용 가능한 투여 가능성을 제공하고, 이에 따라 골 흡수 및 골수 조사에 보다 효과적인 치료를 유도하게 된다.

[0358] 예기치 않게, 본 발명자들은 또한 불변 중쇄에 대한 아미노산 변형이 FcRn 결합을 소거하면서 단백질 G 및 일부 단백질 A 정제 수지에 결합하는 항체의 능력에 영향을 미치지 않는다는 것을 발견하였다. 따라서, 다른 면역치료제에 비해 혈청 반감기가 감소된 본 발명의 항체는 일반 항체용으로 개발된 동일한 기준/표준화된 생산 플랫폼을 사용하여 생산될 수 있다. 이것은 상이한 다수의 조작된 항체 형식들 중 몇가지, 예를 들어, 생산이 번거롭고 IgG 분자보다 덜 안정적인 미니바디, 디아바디에 비해 중요한 장점이다. 또한, 신체에 '고유한' 분자 형식으로서 전장 항체는 조작된 항체 또는 항체 단편보다 면역원성 반응의 가능성이 감소하는 경향이 있다.

[0359] 본 발명의 항체의 추가 이점은 치료진단 분야에서의 적용에 대한 이의 특정한 적합성이다. 보다 구체적으로, 전술한 바와 같이, 항체의 감소된 혈청 반감기는 방사성 동위원소에 커플링될 때 항체를 요법에 특히 유용하게 만들며, 항체가 종양에 적절한 양의 방사성 체제를 전달할 수 있기 때문에 순환에서 빠르게 제거된다. 또한, 항체의 감소된 혈청 반감기는 항체에 커플링되고 영상화를 위해 선택된 방사성 동위원소의 신속한 제거가 바람직한 진단 방법에 사용하기에 특히 적합하다. 따라서, 제1 예로서 진단으로서 항체의 용도는 항체의 치료 형태(즉, 항체가 요법에 적합한 방사성 동위원소에 커플링되는 경우)의 사용 및 투여량을 알려주는 것이다. 따라서, 본 발명의 항체는 상이한 방사성 동위원소에 커플링되고 후속적으로 "치료진단 쌍(theranostic pair)"으로 사용되는 경우에 유용하다.

[0360] 상기에 추가하여, 본 발명자들은 본 명세서에서 탄산탈수효소(CAIX)에 결합하기 위한 신규 인간화 항체 및 전립선 특이적 막 항원(PSMA)에 결합하기 위한 항체를 기술한다. 이들 항체는 비변형 항체로서 또는 중쇄 불변 사슬의 FcRn 및 Fc 감마 수용체 결합 부분에 대한 변형을 갖는 항체로서 모두 사용하기 위해 본 명세서에 기재되어 있다.

[0361] 전반적인 기술

[0362] 본 명세서 전반에 걸쳐, 구체적으로 명시되지 않거나 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성, 단계의 그룹 또는 물질의 조성 그룹에 대한 언급은 이들 단계, 물질의 조성, 단계 그룹 또는 물질의 조성 그룹 중 하나 및 다수(즉, 하나 이상)를 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 따라서, 본 명세서에 사용된 단수 형태 "하나(a)", "하나의(an)" 및 "그(the)"는 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의 국면을 포함하고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 예를 들어, "하나"에 대한 언급은 단일 및 둘 이상을 포함하고; "하나의"에 대한 언급은 단일 뿐만 아니라 둘 이상을 포함하며; "그"에 대한 언급은 단일뿐만 아니라 둘 이상 등을 포함한다.

[0363] 당업자는 본 발명이 구체적으로 기술된 것 이외의 변형 및 수정이 가능하다는 것을 이해할 것이다. 본 발명은 이러한 모든 변형 및 수정을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명은 또한 개별적으로 또는 집합적으로 본 명세서에서 참조되거나 표시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물, 및 상기 단계 또는 특징 중 임의의 및 모든 조합 또는 이들 중 임의의 둘 이상을 포함한다.

[0364] 당업자는 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 다수의 방법 및 물질을 인식할 것이다. 본 발명은 기술된 방법 및 물질에 어떠한 방식으로든 제한되지 않는다.

[0365] 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 공보는 전문이 참조로 포함된다.

[0366] 본 발명은 단지 예시의 목적으로 의도된 본 명세서에 기재된 특정 실시예에 의해 범위를 제한하지 않는다. 기능적으로 동등한 제품, 조성물 및 방법은 본 발명의 범위 내에 명백히 존재한다.

- [0367] 본 명세서에서 본 발명의 임의의 실시예 또는 실시양태는 달리 구체적으로 기술되지 않는 한 본 발명의 임의의 다른 실시예 또는 실시양태에 준용하여 적용할 것이다.
- [0368] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계(예를 들면, 세포 배양, 분자 유전학, 면역학, 면역 조직 화학, 단백질 화학 및 생화학)의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주되어야 할 것이다.
- [0369] 달리 명시되지 않는 한, 본 개시내용에서 사용되는 재조합 단백질, 세포 배양 및 면역학적 기술은 당업자에게 잘 알려진 표준 절차이다. 이러한 기술은 다음과 같은 출처의 문헌 전반에 걸쳐서 서술되고 설명된다: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook 외 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel 외 (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), and J.E. Coligan 외 (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (현재까지의 모든 업데이트를 포함함).
- [0370] 가변 영역 및 이의 부분, 면역글로불린, 항체 및 이의 단편에 대한 설명 및 정의는 문헌[참조: Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991, Bork 외, J Mol. Biol. 242, 309-320, 1994, Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196:901 -917, 1987, Chothia 외 Nature 342, 877-883, 1989 and/or or Al-Lazikani 외, J Mol Biol 273, 927-948, 1997]에 의해 추가로 명확해질 수 있다.
- [0371] 용어 "및/또는", 예를 들어 "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되어야 하며 두 가지 의미 또는 어느 한 의미에 대한 명시적 지원을 제공하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0372] 본 명세서에서 사용된 용어 "로부터 유래된"은 특정 출처에서 반드시 직접적으로는 아닐지라도 지정된 정수가 특정 출처에서 얻어질 수 있음을 나타내는 것으로 간주되어야 한다.
- [0373] 선택된 정의
- [0374] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 종양:혈액 비율은 대상체의 혈액 내 동일한 항체의 양에 대한 항체(또는 방사성 표지된 항체)의 양의 비율을 지칭한다. 당업자는 종양:혈액 비율을 계산하기 위한 표준 기술과 익숙할 것이다. 예를 들어, 방사성 동위원소(또는 표지된 항체)의 생체의 활성 농도를 측정하고 조직(또는 혈액) 그램당 감쇠-보정된 주입 활성의 백분율로 표시하고, 주입 용량/g 백분율(%ID/g)로 근사치를 낸다. 그런 다음 종양 대 혈액 비율은 혈액에서 검출된 활성에 대한 종양에서 검출된 활성으로 계산한다.
- [0375] 본 명세서에 사용된 용어 '치료진단'은 진단 및 요법에 사용되는 화합물/물질의 능력을 지칭한다. 용어 "치료진단 시약"은 환자의 질병 또는 상태의 검출, 진단 및/또는 치료에 모두 적합한 임의의 시약에 관한 것이다. 치료진단 화합물/물질의 목적은 별개의 진단제와 치료제 사이에 존재할 수 있는 생체 분포 및 선택성의 바람직하지 않은 차이를 극복하는 것이다. 치료진단 쌍을 사용하면 질병을 확인하거나 신체의 영향을 받는 부위를 발견하기 위해 영상화 방사성 핵종을 포함하는 진단학적 화합물이 먼저 환자에게 투여된다. 일단 확인/발견되면, 영상화 및 치료 방사성 핵종의 생체 분포가 동일하기 때문에 표적 특이적 방식으로 치료 방사성 핵종을 포함하는 치료학적 화합물을 투여함으로써 질병을 치료할 수 있다.
- [0376] 본 발명의 문맥에서, 본 발명의 항체는 예를 들어 항체가 영상화 또는 진단 목적을 위해 방사성 동위원소에 접합되고 동일한 항체가 요법에 적합한 상이한 방사성 동위원소 또는 세포독성제와 접합되는 경우 치료진단 쌍에 포함시키는데 특히 유용하다. 항체의 항원 결합 부위는 진단용 방사성 동위원소를 종양 부위로 지시하거나 표적화하여 진단(종양 분포, 종양 크기, 종양 밀도를 포함함)을 용이하게 하는 한편, 항체의 동일한 항원 결합 부위는 방사성 동위원소를 요법용 종양으로 지시한다.
- [0377] 본 명세서에 사용된 용어 "Fc 영역"은 때때로 "Fc" 또는 "Fc 도메인"으로 지칭되며, IgG 분자의 파파인 소화에 의해 수득된 결정화가 가능한 단편과 관련있는 IgG 분자의 부분을 지칭한다. Fc 영역은 이화물 결합에 의해 연결된 IgG 분자의 두 중쇄의 C-말단 절반으로 이루어진다. Fc 영역은 항원 결합 활성이 없지만 탄수화물 모이어티 및 보체 및 FcRn 수용체를 포함하는 Fc 수용체에 대한 결합 부위를 포함한다. Fc 영역은 전체 두 번째 불변 도

메인 CH2(EU 인덱스 넘버링 시스템에 따른 인간 IgG1의 잔기 231-340으로 카밧(Kabat) 시스템에서 잔기 244-360으로도 정의됨) 및 세 번째 불변 도메인 CH3(잔기 341-447 EU 인덱스/361-478 카밧)을 포함한다(예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함되어 있는 제WO2015175874호의 서열번호 1 또는 CH2의 서열에 대해 도 1C 및 서열번호 2의 서열; CH3의 서열에 대해서는 도 1D를 참조하며; 또한 면역글로불린의 Fc 영역에 있는 다양한 잔기에 사용되는 넘버링 규칙의 비교에 대해서는 http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs를 참조한다).

[0378] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "EU 인덱스" 또는 "EU 넘버링 방식"은 EU 항체의 넘버링을 지칭한다(Edelman 외, 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85, 전문이 참고로 본 명세서에 포함됨). 본 명세서에 사용된 "카밧 시스템"은 카밧 서열(참조: Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)을 지칭한다. 당업자는 주어진 아미노산 서열이 EU 또는 카밧 시스템에 따라 번호가 매겨졌는지 여부를 쉽게 결정할 수 있을 것이다.

[0379] 용어 "분리된 단백질" 또는 "분리된 폴리펩티드"는 그 기원 또는 유래의 원천으로 인해 천연 상태에서 이를 수반하는 천연 관련 성분과 연관되지 않고; 동일한 공급원과는 다른 단백질이 실질적으로 없는 단백질 또는 폴리펩티드이다. 단백질은 자연적으로 결합된 성분이 실질적으로 없게 되거나 당업계에 공지된 단백질 정제 기술을 사용하여 분리에 의해 실질적으로 정제될 수 있다. "실질적으로 정제된"은 단백질에 오염 물질이 실질적으로 없는, 예를 들어 약 70% 또는 75% 또는 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 이상으로 오염 물질이 없음을 의미한다.

[0380] 용어 "재조합(recombinant)"은 인공 유전자 재조합의 산물을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 재조합 단백질의 맥락에서, 이 용어는 B 세포 성숙 동안 발생하는 자연 재조합의 산물인 대상체의 신체 내에서 자연적으로 발생하는 항체를 포함하지 않는다. 그러나, 이러한 항체가 분리된 경우, 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 분리된 단백질로 간주되어야 한다. 유사하게, 단백질을 인코딩하는 핵산이 분리되고 재조합 수단을 사용하여 발현된다면, 생성된 단백질은 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 재조합 단백질이다. 재조합 단백질은 또한 재조합 단백질이 예를 들어 발현되는 세포, 조직 또는 대상체 내에 존재할 때 인공 재조합 수단에 의해 발현되는 단백질을 포함한다.

[0381] 용어 "단백질"은 단일 폴리펩티드 사슬, 즉 펩티드 결합에 의해 연결된 일련의 연속 아미노산 또는 서로 공유 또는 비공유 연결된 일련의 폴리펩티드 사슬(즉, 폴리펩티드 복합체)을 포함하는 것으로 간주되어야 할 것이다. 예를 들어, 일련의 폴리펩티드 사슬은 적합한 화학물질 또는 이황화 결합을 사용하여 공유적으로 연결될 수 있다. 비공유 결합의 예로는 수소 결합, 이온 결합, 반 데르 발스 힘 및 소수성 상호 작용을 포함한다.

[0382] 용어 "폴리펩티드" 또는 "폴리펩티드 사슬"은 펩티드 결합에 의해 연결된 일련의 연속적인 아미노산을 의미하는 것으로 앞 단락에서 이해될 것이다.

[0383] 본 명세서에 사용된 용어 "항원 결합 부위"는 "항원 결합 도메인"과 상호교환적으로 사용되며 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 영역, 즉 VH 또는 VL 또는 VH 및 VL 둘 다를 포함하는 Fv를 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 항원 결합 도메인은 전체 항체의 맥락에 있을 필요는 없으며, 예를 들어, 분리되어 있거나(예를 들어, 도메인 항체) 또는 예를 들어 scFv와 같이 본 명세서에 기재된 바와 같은 다른 형태일 수 있다.

[0384] 본 개시내용의 목적을 위해, 용어 "항체"는 Fv 내에 포함된 항원 결합 도메인에 의해 하나 또는 몇 개의 밀접하게 관련된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 포함한다. 이 용어는 4개의 사슬 항체(예를 들어, 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄), 재조합 또는 변형 항체(예를 들어, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, CDR-이식 항체, 영장류화 항체, 탈면역화 항체, 동인간화 항체, 반-항체, 이중특이성 항체)를 포함한다. 항체는 일반적으로 불변 영역 또는 불변 단편 또는 결정화가능한 단편(Fc)으로 배열될 수 있는 불변 도메인을 포함한다. 항체의 예시적인 형태는 기본 단위로서 4-사슬 구조를 포함한다. 전장 항체는 공유 연결된 2개의 중쇄(약 50 내지 70kDa)와 2개의 경쇄(각각 약 23kDa)를 포함한다. 경쇄는 일반적으로 가변 영역(존재하는 경우) 및 불변 도메인을 포함하고 포유동물에서 κ 경쇄 또는 λ 경쇄이다. 중쇄는 일반적으로 가변 영역 및 힌지 영역에 의해 추가의 불변 도메인(들)에 연결된 1개 또는 2개의 불변 도메인(들)을 포함한다. 포유류의 중쇄는 α , δ , ϵ , γ 또는 μ 유형 중 하나이다. 각 경쇄는 또한 중쇄 중 하나에 공유적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 두 개의 중쇄와 중쇄 및 경쇄는 사슬간 이황화 결합과 비공유 상호작용에 의해 함께 유지된다. 사슬간 이황화 결합의 수는 다양한 유형의 항체에 따라 다양할 수 있다. 각 사슬은 N-말단 가변 영역(각각이 약 110개 아미노산 길이인 VH 또는 VL) 및 C-말단에 하나 이상의 불변 도메인을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인(약 110개 아미노산 길이인 CL)은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인(330~440개 아미노산 길이인 CH1)과 정렬되고 이황화 결합된다. 경쇄

가변 영역은 중쇄의 가변 영역과 정렬된다. 항체 중쇄는 2개 이상의 추가 CH 도메인(예를 들어, CH2, CH3 등)을 포함할 수 있고 CH1 및 CH2 불변 도메인 사이의 힌지 영역을 포함할 수 있다. 항체는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위 클래스일 수 있다. 하나의 예에서, 항체는 무린(마우스 또는 래트) 항체 또는 영장류(예를 들어, 인간) 항체이다. 하나의 예에서 항체 중쇄에는 C-말단 라이신 잔기가 없다. 하나의 예에서, 항체는 인간화, 동인간화, 키메라, CDR 이식 또는 탈면역화된다.

[0385] 용어 "전장 항체(full-length antibody)", "온전한 항체(intact antibody)" 또는 "전체 항체(whole antibody)"는 항체의 항원 결합 단편과는 대조적으로, 실질적으로 온전한 형태의 항체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 구체적으로, 전체 항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 것을 포함한다. 불변 도메인은 야생형 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 야생형 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0386] 본원에 사용된 "가변 영역"은 항원에 특이적으로 결합할 수 있고 상보성 결정 영역(CDR); 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 프레임워크 영역(FR)의 아미노산 서열을 포함하는 본 명세서에 정의된 바와 같은 항체의 경쇄 및/또는 중쇄 부분을 지칭한다. 예를 들어, 가변 영역은 3개의 CDR과 함께 3개 또는 4개의 FR(예를 들어, FR1, FR2, FR3 및 임의로 FR4)을 포함한다. VH는 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0387] 본 명세서에 사용된 용어 "상보성 결정 영역"(동어의 CDR, 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 특이적 항원 결합에 대한 주요 기여자로 존재하는 항체 가변 영역의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각각의 가변 영역 도메인(VH 또는 VL)은 일반적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 확인된 3개의 CDR을 갖는다. VH의 CDR은 또한 본 명세서에서 각각 CDR H1, CDR H2 및 CDR H3으로 지칭되며, 여기서 CDR H1은 VH의 CDR 1에 상응하고, CDR H2는 VH의 CDR 2에 상응하며, CDR H3은 VH의 CDR 3에 상응한다. 마찬가지로, VL의 CDR은 본 명세서에서 각각 CDR L1, CDR L2 및 CDR L3으로 지칭되며, 여기서 CDR L1은 VL의 CDR 1에 상응하고, CDR L2는 VL의 CDR 2에 상응하며, CDR L3은 VL의 CDR 3에 상응한다. 하나의 예에서, CDR 및 FR에 할당된 아미노산 위치는 카바트 서열[Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991(본 명세서에서 "Kabat 넘버링 시스템"으로도 지칭됨)]에 따라 정의된다. 다른 예에서, CDR 및 FR에 할당된 아미노산 위치는 참조(Enhanced Chothia Numbering Scheme, <http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>)에 따라 정의된다. 본 발명은 카바트 넘버링 시스템에 의해 정의된 FR 및 CDR에 제한되지 않고, 표준 넘버링 시스템 또는 문헌(참조: Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987; Chothia 외, Nature 342: 877-883, 1989; and/or Al-Lazikani 외, J. Mol. Biol. 273: 927-948, 1997; the numbering system of Honnegger and Plukthun J. Mol. Biol. 309: 657-670, 2001; or the IMGT system discussed in Giudicelli 외, Nucleic Acids Res. 25: 206-211 1997)의 넘버링 시스템을 포함하여 모든 넘버링 시스템을 포함한다. 하나의 예에서, CDR은 카바트 넘버링 시스템에 따라 정의된다. 선택적으로, 카바트 넘버링 시스템에 따른 중쇄 CDR2는 본 명세서에 나열된 5개의 C-말단 아미노산을 포함하지 않거나 이들 아미노산 중 임의의 하나 이상이 또 다른 천연 발생 아미노산으로 치환된다. 이와 관련하여, 문헌(참조: Padlan 외, FASEB J., 9:133-139, 1995)는 중쇄 CDR2의 5개 C-말단 아미노산이 일반적으로 항원 결합에 관여하지 않는다는 것을 확립하였다.

[0388] "프레임워크 영역"(FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 영역 잔기이다. VH의 FR은 또한 본 명세서에서 각각 FR H1, FR H2, FR H3 및 FR H4로 지칭되며, 여기서 FR H1은 VH의 FR 1에 상응하고, FR H2는 VH의 FR 2에 상응하고, FR H3은 VH의 FR 3에 상응하며, FR H4는 VH의 FR 4에 상응한다. 마찬가지로, 본 명세서에서 VL의 FR은 각각 FR L1, FR L2, FR L3 및 FR L4로 지칭되며, 여기서 FR L1은 VL의 FR 1에 상응하고, FR L2는 VL의 FR 2에 상응하고, FR L3은 VL의 FR 3에 상응하며, FR L4는 VL의 FR 4에 상응한다.

[0389] 본 명세서에 사용된 용어 "Fv"는 다중 폴리펩티드 또는 단일 폴리펩티드로 구성되든 간에 VL 및 VH가 회합하고 항원 결합 도메인을 갖는, 즉 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 복합체를 형성하는 임의의 단백질을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 항원 결합 도메인을 형성하는 VH 및 VL은 단일 폴리펩티드 사슬 또는 상이한 폴리펩티드 사슬에 존재할 수 있다. 또한, 본 발명의 Fv (및 본 발명의 임의의 단백질)는 동일한 항원에 결합하거나 결합하지 않을 수 있는 다중 항원 결합 도메인을 가질 수 있다. 이 용어는 항체로부터 직접적으로 유래된 단편뿐만 아니라 제조할 수단을 사용하여 생산된 이러한 단편에 상응하는 단백질을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 예에서, VH는 중쇄 불변 도메인(CH) 1에 연결되지 않고/않거나 VL은 경쇄 불변 도메인(CL)에 연결되지 않는다. 폴리펩티드 또는 단백질을 포함포함하는 예시적인 Fv는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 또는 고차 복합체, 또는 불변 영역 또는 이의 도메인, 예를 들어, CH2 또는 CH3 도메인에 연결된 전술한 것 중 임의의 것, 예를 들어, 미니바디를 포함한다. "Fab 단편"은 면역글로불린의

1가 항원 결합 단편으로 이루어지며, 전체 항체를 효소 파쇄인으로 분해하여 온전한 경쇄 및 일부 중쇄로 이루어진 단편을 생성함으로써 생산할 수 있거나 또는 제조할 수단을 사용하여 생산할 수 있다. 항체의 "Fab' 단편"은 전체 항체를 펩신으로 처리한 후 환원하여 VH 및 단일 불변 도메인을 포함하는 중쇄의 일부 및 온전한 경쇄로 이루어진 분자를 생성함으로써 수득할 수 있다. 이러한 방식으로 처리된 항체당 2개의 Fab' 단편이 수득된다. Fab' 단편은 또한 제조할 수단에 의해 생산될 수 있다. 항체의 "F(ab')₂ 단편"은 2개의 이황화 결합에 의해 함께 유지된 2개의 Fab' 단편의 이량체로 이루어지며, 후속 환원 없이 전체 항체 분자를 효소 펩신으로 처리하여 수득된다. "Fab2" 단편은 예를 들어 류신 지퍼 또는 CH3 도메인을 사용하여 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 제조할 단편이다. "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv"는 경쇄의 가변 영역과 중쇄의 가변 영역이 적절하고 유연한 폴리펩티드 링커에 의해 공유 연결되어 있는 항체의 가변 영역 단편(Fv)을 포함하는 제조할 분자이다.

[0390] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 항원 결합 부위 또는 이의 항원 결합 도메인과 항원의 상호작용과 관련하여, 용어 "결합하다"는 상호작용이 항원 상에서 특정 구조(예를 들어, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질이 아닌 특정 단백질 구조를 인식하고 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 결합하는 경우, 표지된 "A"와 단백질을 포함하는 반응에서 에피토프 "A"(또는 유리, 표지되지 않은 "A")를 포함하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 "A"의 양을 감소시킬 것이다.

[0391] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합하다" 또는 "특이하게 결합하다"는 본 발명의 항원 결합 부위가 대안적인 항원 또는 세포에서 하는 것보다 특정 항원 또는 이를 발현하는 세포와 보다 빈번히, 보다 신속하게, 더 긴 지속기간 및/또는 더 큰 친화도로 반응하거나 회합함을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 항원 결합 부위는 다른 항원에 비해 물질적으로 더 큰 친화도(예를 들어, 1.5배 또는 2배 또는 5배 또는 10배 또는 20배 또는 40배 또는 60배 또는 80배 내지 100배 또는 150배 또는 200배)로 PSMA 또는 CAIX에 결합한다.

[0392] 본 명세서에 사용된 용어 "에피토프(epitope)"(동의어 "항원 결정기")는 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 부위가 결합하는 세포 표면 단백질(예를 들어, PSMA 또는 CAIX)의 영역을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0393] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "상태"는 정상 기능의 파괴 또는 간섭을 지칭하고, 임의의 특정 상태에 제한되지 않으며, 질병 또는 장애를 포함할 것이다.

[0394] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "예방하는", "예방하다" 또는 "예방"은 본 발명의 항원 결합 부위를 투여하여 한 상태의 적어도 하나의 증상의 발병을 중지 또는 방해하는 것을 포함한다. 이 용어는 또한 재발을 예방하거나 방해하기 위해 호전중인 대상체의 치료를 포함한다.

[0395] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 본 명세서에 기재된 항원 결합 부위를 투여하여 특정 질병 또는 상태의 적어도 하나의 증상을 감소 또는 제거하는 것을 포함한다.

[0396] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 인간을 포함하는 모든 동물, 예를 들어 포유동물을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 예시적인 대상체는 인간 및 인간이 아닌 영장류를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 대상체는 인간이다.

[0397] 변형 항체

[0398] 본 발명은 부분적으로 IgG 항체에 대한 변형에 관한 것으로, FcRn에 대한 항체의 친화도를 감소시키거나 소거시킴으로써 항체의 혈청 반감기를 감소시키는 항체 영역에 대한 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0399] 본 발명에 따르면, 감소된 혈청 반감기가 요구되는 임의의 항체는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 변형될 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 바람직한 실시양태에서, 혈청 반감기를 감소시키도록 변형되는 항체는 진단 또는 치료 적용, 보다 구체적으로 진단치료학적 적용에 유용한 항체인 것으로 이해될 것이다.

[0400] 본 발명의 방법에 따라 사용하기에 적합한 항체의 예로는 트라스투주맵 (Herceptin[®]), 리툽시맵 (Rituxan[®]), 베바시주맵 (Avastin[®]), 디누톡시맵 (Unituxin[®]), 파니투무맵 (Vectibix[®]), 캄브롤리주맵 (Keytruda[®]), 니볼루맵 (Opdivo[®]), 토시투모맵 (Bexxar[®]) 이브리투모맵 (Zevalin[®])이 포함된다. 그러나, 본 발명이 특정 항체에 제한되는 것은 아님을 또한 이해해야 할 것이며, 단 항체는 FcRn에 의한 결합을 허용할 것이다.

[0401] 본 발명은 또한 종양 항원을 표적화하기 위한 항체 약물 접합체의 용도를 고려하며, 여기서 접합체는 세포독성

페이로드(cytotoxic payload)를 포함한다. 이러한 항체의 예로는 켄투주맵 (Mylotarg[®]), 브렌톡시맵 (Adcetris[®]), 이노투주맵 (Besponsa[®]), 글렘바투주맵 (CDX-011), 아네투맵 (BAY 94-9343), 미르베크시맵 (IMGN853), 데과톡시맵 (ABT-414), 로발피투주맵 (Rova-T) 및 마다스톡시맵 탈리린 (SGN-CD33A)을 포함한다. 추가 예들이 문헌(참조: Lambert 외, 2017, Adv Ther (2017) 34:1015-1035)에 기재되어 있으며, 본 명세서에 참조로 포함된다.

- [0402] 특정 실시양태에서, FcRn에 대한 친화도를 감소시키기 위해 본 발명에 따른 변형에 적합한 항체는 표 1 및 2에 나타난 바와 같은 서열 중 하나 이상을 갖는 항체이다.
- [0403] 본 발명은 또한 본원에 제시된 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 항원 결합 부위 또는 이를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 하나의 예에서, 본 발명의 항원 결합 부위 또는 핵산은 본 명세서에 제시된 서열과 적어도 약 85% 또는 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다.
- [0404] 대안적으로 또는 추가로, 항원 결합 부위는 임의의 예에 따라 본 명세서에 기재된 바와 같은 V_H 또는 V_L 의 CDR (들)과 적어도 약 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 CDR(예를 들어, 3개의 CDR)을 포함한다.
- [0405] 또 다른 예에서, 본 발명의 핵산은 임의의 예에 따라 본 명세서에 기재된 바와 같은 기능을 갖는 항원 결합 부위를 인코딩하는 서열과 적어도 약 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 항원 결합 부위를 인코딩하는 핵산을 포함하며, 이는 유전암호의 축퇴의 결과로서 본 명세서에 예시된 서열과 상이하다.
- [0406] 핵산 또는 폴리펩티드의 동일성(%)은 겐 생성 페널티=5 및 겐 확장 페널티=0.3으로 하는 GAP(Needleman and Wunsch, Mol. Biol. 48, 443-453, 1970) 분석 (GCG 프로그램)으로 결정된다. 쿼리 서열(query sequence)은 길이가 50개 이상의 잔기이고 GAP 분석은 50개 이상의 잔기 영역에 걸쳐 두 개의 서열을 정렬한다. 예를 들면, 쿼리 서열은 길이가 100개 이상의 잔기이고 GAP 분석은 100개 이상의 잔기 영역에 걸쳐 두 개의 서열을 정렬한다. 예를 들어, 두개의 서열은 전체 길이에 걸쳐 정렬된다.
- [0407] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 항원 결합 부위를 인코딩하는 핵산으로 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화하는 핵산을 고려한다. "적당한 엄격성"은 45°C 내지 65°C 범위의 온도에서 2 x SSC 완충액, 0.1% (w/v) SDS로 또는 동등한 조건으로 수행되는 혼성화 및/또는 세척으로 본 명세서에 정의된다. "높은 엄격성"은 0.1 x SSC 완충액, 0.1% (w/v) SDS, 또는 더 낮은 염 농도 및 65°C 이상의 온도에서 또는 동등한 조건에서 수행되는 혼성화 및/또는 세척인 것으로 본 명세서에 정의된다. 본 명세서에서 특정 수준의 엄격성에 대한 참조는 당업자에게 공지된 SSC 이외의 세척/혼성화 용액을 사용하는 동등한 조건을 포함한다. 예를 들어, 이중 가닥 핵산의 가닥이 해리되는 온도 (융점 온도 또는 T_m 으로도 공지되어 있음)를 계산하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 핵산의 T_m 과 유사(예: 50°C 이내 또는 10°C 이내)하거나 동일한 온도는 높은 엄격성으로 고려된다. 중간 엄격성은 핵산의 계산된 T_m 의 10°C 내지 20°C 또는 10°C 내지 15°C 이내인 것으로 고려된다.
- [0408] 본 발명은 또한 본 명세서에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 본 발명의 항원 결합 부위의 돌연변이 형태를 고려한다. 일부 예에서, 항원 결합 부위는 10개 이하, 예를 들어, 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2 또는 1개의 보존적 아미노산 치환을 포함한다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄 및/또는 소수성 및/또는 친수성을 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다.
- [0409] 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계열은, 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), β -분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함하여 당업계에 정의되어 있다. 소수성 지수는 예를 들어 문헌[참조: Kyte and Doolittle J. Mol. Biol., 157: 105-132, 1982]에 기재되어 있고, 친수성 지수는 예를 들어 제 US4554101호에 기재되어 있다.
- [0410] 본 발명은 또한 비보존적 아미노산 변화를 고려한다. 예를 들어, 하전된 아미노산을 다른 하전된 아미노산 및 중성 또는 양전하를 띤 아미노산으로 치환하는 것에 특히 관심이 있다. 일부 예에서, 항원 결합 부위는 10개 이하, 예를 들어, 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2 또는 1개의 보존적 아미노산 치환을 포

함한다.

- [0411] 하나의 예에서, 돌연변이(들)는 본 발명의 항원 결합 부위의 항원 결합 도메인의 FR 내에서 발생한다. 다른 예에서, 돌연변이(들)는 본 발명의 항원 결합 부위의 CDR 내에서 발생한다.
- [0412] 항원 결합 부위의 돌연변이 형태를 생성하기 위한 예시적인 방법은 다음을 포함한다:
- [0413] * DNA(Thie 외, *Methods Mol. Biol.* 525: 309-322, 2009) 또는 RNA(Kopsidas 외, *Immunol. Lett.* 107:163-168, 2006; Kopsidas 외 *BMC Biotechnology*, 7: 18, 2007; 및 제W01999/058661호)의 돌연변이 생성단계;
- [0414] * 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 돌연변이 세포, 예를 들어 XL-1Red, XL-mutS 및 XL-mutS-Kanr 박테리아 세포(Stratagene)에 도입하는 단계;
- [0415] * 예를 들어 문헌[Stemmer, *Nature* 370: 389-91, 1994]에 기재된 바와 같은 DNA 셔플링 단계; 및
- [0416] * 예를 들어 문헌[Dieffenbach (ed) and Dveksler (ed) (*In: PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995)]에 기재된 바와 같은 부위 지정 돌연변이 생성단계.
- [0417] 본 발명의 돌연변이 항원 결합 부위의 생물학적 활성을 결정하기 위한 예시적인 방법은 숙련된 기술자에게 명백하고/거나 본 명세서에 기재된, 예를 들어 항원 결합이다. 예를 들어, 항원 결합, 결합의 경쟁적 억제, 친화도, 회합, 해리 및 치료 효능을 결정하는 방법이 본 명세서에 기술되어 있다.
- [0418] **불변 영역**
- [0419] 본 발명은 항체의 불변 영역을 포함하는 본 명세서에 기재된 항원 결합 부위 및/또는 항체를 포함한다. 이것은 Fc에 융합된 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0420] 본 발명의 단백질을 생산하는데 유용한 불변 영역의 서열은 다수의 상이한 공급원으로부터 취득할 수 있다. 일부 예에서, 단백질의 불변 영역 또는 이의 부분은 인간 항체로부터 유래된다. 불변 영역 또는 이의 부분은 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하는 임의의 항체 클래스 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 임의의 항체 이소형으로부터 유래될 수 있다. 하나의 예에서, 불변 영역은 인간 이소형 IgG4 또는 안정화된 IgG4 불변 영역이다.
- [0421] **선호하는 변형**
- [0422] 본 발명은 구체적으로 Fc 영역 또는 불변 영역을 포함하는 항체 또는 항원 결합 부위에 대한 변형을 고려한다.
- [0423] 신생아 Fc-수용체(FcRn)는 생체 내에서 IgG 클래스의 항체의 대사 운명에 중요하다. FcRn은 리소좀 분해 경로에서 IgG를 구조하는 기능을 하여 제거율이 감소하고 반감기가 증가한다. 이는 50kDa 클래스 I 주요 조직적합성 복합체-유사 단백질(α -FcRn) 및 15kDa p2-마이크로글로불린(β 2m)의 두 가지 폴리펩티드로 구성된 이중량체 단백질이다. FcRn은 IgG 클래스 항체의 Fc-영역의 CH2-CH3 부분에 높은 친화도로 결합한다. IgG 클래스의 항체와 FcRn 사이의 상호작용은 pH 의존적이며 1:2 화학량론에서 발생하고, 즉, 하나의 IgG 항체 분자는 두 개의 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 통해 두 개의 FcRn 분자와 상호작용할 수 있다[예를 들어, Huber, A.H.외, *J. Mol. Biol.* 230 (1993) 1077-1083]].
- [0424] 따라서, IgG의 시험관 내 FcRn 결합 특성/특징은 혈액 순환에서의 생체 내 약동학적 특성을 나타낸다. FcRn과 IgG 클래스의 항체의 Fc-영역 사이의 상호작용에는 중쇄 CH2- 및 CH3-도메인의 상이한 아미노산 잔기가 참여한다.
- [0425] FcRn 결합 및 이와 함께 혈액 순환의 반감기에 영향을 미치는 다양한 돌연변이가 공지되어 있다. 마우스 Fc-영역-마우스 FcRn 상호작용에 중요한 Fc-영역 잔기는 부위 지향적 돌연변이유발에 의해 확인되었다[예를 들어, Dall'Acqua, W.F., 외 *J. Immunol* 169 (2002) 5171-5180를 참조한다]. 잔기 Ile253, His310, His433, Asn434 및 His435(EU 인덱스 넘버링 시스템에 따른 넘버링)가 상호작용에 관여한다(Medesan, C, 외, *Eur. J. Immunol.* 26 (1996) 2533-2536; Firan, M., 외, *Int. Immunol.* 13 (2001) 993-1002; Kim, J.K., 외, *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 542-548). (Kabat 시스템을 사용하여, 관련 잔기는 Ile266, His329, His464, Asn465 및 His466이다). 잔기 Ile253, His310 및 His435는 인간 Fc-영역과 무린 FcRn의 상호작용에 중요한 것으로 밝혀졌다(Kim, J.K., 외, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2819-2885).
- [0426] 보다 구체적으로, 항체는 단백질의 반감기를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를

들어, 항체는 신생아 Fc 영역(FcRn)에 대한 Fc 영역의 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

- [0427] 본 발명은 또한 천연 발생 IgG 클래스 항체 불변 영역과 실질적으로 동일한 불변 영역을 갖는 항체를 제공하고, 여기서 잔기 His310, His435, 및 Ile253으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 잔기는 천연 발생 IgG 클래스 항체에 존재하는 것과 상이하여, 이에 따라 천연 발생 항체에 비해 상기 항체의 FcRn 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기를 변경시킨다. 바람직한 실시양태에서, 천연 발생 IgG 클래스 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG2M3, IgG3 또는 IgG4 분자의 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0428] 또한 바람직한 실시양태에서, 천연 발생 IgG 클래스 항체와 실질적으로 동일한 불변 영역을 갖는 항체의 중쇄 불변 영역으로부터의 아미노산 잔기 310 또는 잔기 435는 히스티딘이 아니고 FcRn에 대한 불변 영역의 친화도를 감소시키는 임의의 아미노산이다. 예를 들어, 잔기 310 또는 435의 아미노산은 알라닌, 글루탐산, 아스파르트산, 류신, 이소류신, 아르기닌, 프롤린, 글루타민, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 라이신, 아스파라긴, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 시스테인, 발린 또는 글리신일 수 있다.
- [0429] 바람직하게는, 중쇄 불변 영역으로부터의 310 위치의 잔기는 알라닌, 글루탐산 또는 글루타민으로부터 선택되고; 또는 아미노산 잔기 435는 아르기닌, 글루타민 또는 알라닌으로부터 선택된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 천연 발생 클래스 IgG 항체와 실질적으로 동일한 불변 영역을 갖는 항체는 310 위치에서 알라닌 잔기 및 435 위치에서 글루타민 잔기를 갖는다.
- [0430] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 변형 항체의 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기는 적어도 약 30%, 50%, 80%, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 감소한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 상기 변형 항체의 FcRn에 대한 결합 친화도 및/또는 혈청 반감기는 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 감소한다.
- [0431] 또한, 본 발명의 항체는 임의의 하나 이상의 Fc 감마 수용체에 대한 항체의 친화도를 변형시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0432] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 불변 영역의 Fc 영역은 이펙터 기능을 유도하는 능력을 보유한다. 하나의 예에서, 불변 영역의 Fc 영역은 야생형 IgG와 비교하여 증가하는 이펙터 기능을 포함하여 이펙터 기능을 조절하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0433] 하나의 예에서, 불변 영역의 Fc 영역은 예를 들어 천연 또는 야생형 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 영역과 비교하여 이펙터 기능을 유도하는 능력이 감소되어 있다. 하나의 예에서, 이펙터 기능은 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및/또는 항체-의존성 세포-매개 식균작용(ADCP) 및/또는 보체-의존성 세포독성(CDC)이다. 단백질을 포함하는 Fc 영역의 이펙터 기능 수준을 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있고/있거나 본 명세서에 기술되어 있다.
- [0434] 하나의 예에서, 이펙터 기능을 유도하는 항체의 능력을 수정하는 아미노산 치환은 중쇄 불변 영역으로부터 잔기 Ile253에서의 아미노산 치환이다. 하나의 예에서, 치환은 알라닌, 글루탐산, 아스파르트산, 류신, 이소류신, 아르기닌, 프롤린, 글루타민, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 라이신, 아스파라긴, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 시스테인, 발린 또는 글리신으로부터 선택된 임의의 아미노산으로의 치환으로, 여기서 치환은 이펙터 기능을 유도하는 항체의 능력을 감소시킨다. 바람직한 실시양태에서, 잔기 253에서 Ile로부터의 치환은 아르기닌, 프롤린 또는 아스파르테이트, 보다 바람직하게는 알라닌으로의 치환이다.
- [0435] 하나의 예에서, Fc 영역은 IgG4 Fc 영역(즉, IgG4 불변 영역으로부터), 예를 들어 인간 IgG4 Fc 영역이다. 적합한 IgG4 Fc 영역의 서열은 숙련가에게 명백할 것이고/또는 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스(예를 들어, National Center for Biotechnology Information에서 이용 가능함)에서 이용가능할 것이다.
- [0436] 하나의 예에서, 불변 영역은 안정화된 IgG4 불변 영역이다. 용어 "안정화된 IgG4 불변 영역"은 Fab 암(arm) 교환을 감소하도록 변형된 또는 Fab 암 교환 또는 반-항체 형성을 겪는 경향 또는 절반 항체를 형성하는 경향을 가진 IgG4 불변 영역을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "Fab 암 교환"은 인간 IgG4에 대한 일종의 단백질 변형을 지칭하며, 여기서 IgG4 중쇄 및 부착된 경쇄(반-분자)는 다른 IgG4 분자의 중쇄 쌍으로 교체된다. 따라서, IgG4 분자는 2개의 별개의 항원을 인식하는 2개의 별개의 Fab 암을 획득할 수 있다 (이중특이적 분자를 생성함). Fab 암 교환은 생체 내에서 자연적으로 발생하며 정제된 혈액 세포 또는 환원된 글루타티온과 같은 환원제에 의해 시험관 내에서 유도될 수 있다. "절반 항체"는 IgG4 항체가 해리되어 각각 단일 중쇄 및 단일

경쇄를 포함하는 2개의 분자를 형성하는 경우 형성된다.

- [0437] 하나의 예에서, 안정화된 IgG4 불변 영역은 카밧 시스템(문헌 참조: Kabat 외, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 and/or 1991)에 따라 힌지 영역의 241 위치에 프롤린을 포함한다. 이 위치는 EU 넘버링 시스템에 따른 힌지 영역의 228 위치에 해당한다. 인간 IgG4에서 이 잔기는 일반적으로 세린이다. 프롤린에 대한 세린의 치환 후, IgG4 힌지 영역은 서열 CPPC를 포함한다. 이와 관련하여, 숙련가는 "힌지 영역"이 항체의 2개의 Fab 암에 이동성을 부여하는 Fab 영역 및 Fc를 연결하는 항체 중쇄 불변 영역의 프롤린이 풍부한 부분이라는 것을 인지할 것이다. 힌지 영역은 중쇄간 이황화 결합에 관여하는 시스테인 잔기를 포함한다. 일반적으로 카밧의 넘버링 시스템에 따라 인간 IgG1의 Glu226에서 Pro243으로(또는 EU 인덱스를 사용하여 Glu216에서 Pro230으로) 신장시키는 것으로 정의된다. 다른 IgG 이소형의 힌지 영역은 중쇄간 이황화(S-S) 결합을 형성하는 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치에 위치시킴으로써 IgG1 서열과 정렬될 수 있다(예를 들어, 제W02010/080538호 참조).
- [0438] 안정화된 IgG4 항체의 추가 예는 (EU 넘버링 시스템에 따라) 인간 IgG4의 중쇄 불변 영역에서 409 위치에 있는 아르기닌이 라이신, 트레오닌, 메티오닌 또는 류신으로 치환된 항체이다(예를 들면, 제W02006/033386호에 기재된 바와 같음). 불변 영역의 Fc 영역은 (EU 넘버링 시스템에 따라) 405에 상응하는 위치에서 알라닌, 발린, 글리신, 이소류신 및 류신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 잔기를 추가로 또는 대안적으로 포함할 수 있다. 선택적으로, 힌지 영역은 241 위치에서 프롤린(즉, CPPC 서열)을 포함한다(상기 설명된 바와 같음).
- [0439] 또 다른 예에서, Fc 영역은 감소된 이펙터 기능을 갖도록 변형된 영역, 즉 "비-면역자극 Fc 영역"이다. 예를 들어, Fc 영역은 268, 309, 330 및 331로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 위치에서 치환을 포함하는 IgG1 Fc 영역이다. 또 다른 예에서, Fc 영역은 하기 변경 E233P, L234V, L235A 및 G236의 결실 중 하나 이상 및/또는 하기 변경 A327G, A330S 및 P331S 중 하나 이상을 포함하는 IgG1 Fc 영역이다 (Armour 외, *Eur J Immunol.* 29:2613-2624, 1999; Shields 외, *J Biol Chem.* 276(9):6591-604, 2001). 비-면역자극성 Fc 영역의 추가 예는 예를 들어 문헌(참조: Dall'Acqua 외, *J Immunol.* 177 : 1129-1138 2006; 및/또는 Hezareh *J Virol* :75: 12161-12168, 2001)에 기재되어 있다.
- [0440] 또 다른 예에서, Fc 영역은 키메라 Fc 영역으로, 예를 들어, IgG4 항체로부터의 적어도 하나의 C_H2 도메인 및 IgG1 항체로부터의 적어도 하나의 C_H3 도메인을 포함하고, 여기서 Fc 영역은 240, 262, 264, 266, 297, 299, 307, 309, 323, 399, 409 및 427(EU 넘버링)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 위치에서 치환을 포함한다(예를 들어, 제W02010/085682호에 기술된 바와 같음). 예시적인 치환은 240F, 262L, 264T, 266F, 297Q, 299A, 299K, 307P, 309K, 309M, 309P, 323F, 399S, 및 427F를 포함한다.
- [0441] **항체 생산**
- [0442] 바람직하게는, 임의의 예에 따른 본 명세서에 기재된 항원 결합 부위는 재조합체이다.
- [0443] 재조합 단백질의 경우, 이를 인코딩하는 핵산은 발현 작제물 또는 벡터로 클로닝될 수 있으며, 이어서 숙주 세포, 예를 들어, 달리 단백질을 생성하지 않는 대장균 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포, 예를 들어, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, 또는 골수종 세포로 형질감염된다. 단백질 발현에 사용되는 예시적인 세포는 CHO 세포, 골수종 세포 또는 HEK 세포이다. 이러한 목적을 달성하기 위한 분자 복제 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[참조: Ausubel 외, (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present) or Sambrook 외, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]에 기재되어 있다. 다양한 클로닝 및 시험관 내 증폭 방법이 재조합 핵산의 구성에 적합하다. 재조합 항체를 생산하는 방법은 또한 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 제US4816567호 또는 제US5530101호를 참조한다.
- [0444] 분리 후, 핵산은 추가 클로닝 (DNA 증폭)을 위해 또는 무세포 시스템 또는 세포에서 발현을 위해 발현 작제물 또는 발현 벡터의 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 삽입된다.
- [0445] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "프로모터"는 가장 넓은 맥락에서 사용되어야 하며, 예를 들어, 발달 및/또는 외부 자극에 대한 반응으로, 또는 조직 특이적 방식으로 핵산의 발현을 변경하는 추가적인 조절 요소[예를 들어, 업스트림 활성화 서열, 전사 인자 결합 부위, 인핸서(enhancer) 및 사일런서(silencer)]의 유무에 관계없

이 정확한 전사 개시에 필요한 TATA 박스 또는 개시제 요소를 포함하는 게놈 유전자의 전사 조절 서열을 포함한다. 현재 맥락에서, 용어 "프로모터"는 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 부여, 활성화 또는 강화시키는 제조합, 합성 또는 융합 핵산, 또는 유도체를 설명하는 데에도 사용된다. 예시적인 프로모터는 발현을 추가로 강화시키고/시키거나 상기 핵산의 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변경하기 위해 하나 이상의 특이적 조절 요소의 추가 카피를 포함할 수 있다.

- [0446] 본 명세서에 사용된 용어 "작동가능하게 연결된"은 핵산의 발현이 프로모터에 의해 제어되도록 핵산에 대해 프로모터를 위치시키는 것을 의미한다.
- [0447] 세포에서 발현을 위한 많은 벡터를 사용할 수 있다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 단백질을 인코딩하는 서열(예를 들어, 본 명세서에 제공된 정보로부터 유래됨), 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 순서 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 숙련된 기술자는 단백질 발현에 적합한 서열을 인지할 것이다. 예시적인 신호 서열은 원핵생물 분비 신호(예를 들어, *pelB*, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, *Ipp*, 또는 열 안정성 장독소 II), 효모 분비 신호(예를 들어, 인버타제 리더, α 인자 리더 또는 산 포스파타제 리더) 또는 포유동물 분비 신호(예를 들어, 단순 포진 *gD* 신호)를 포함한다.
- [0448] 포유동물 세포에서 활성인 예시적인 프로모터는 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터(CMV-IE), 인간 신장 인자 1- α 프로모터(EF1), 소형 핵 RNA 프로모터(U1a 및 U1b), α -미오신 중쇄 프로모터, 유인원 바이러스 40 프로모터(SV40), 라우스 육종 바이러스 프로모터(RSV), 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, β -액틴 프로모터; CMV 인핸서/ β -액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터를 포함하는 하이브리드 조절 요소 또는 이의 활성 단편을 포함한다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예로는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10), 또는 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)이다.
- [0449] 예를 들어 *피치아 파스토리스*(*Pichia pastoris*), *사카로마이세스 세레비시아에*(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 *에스.폼베*(*S. pombe*)를 포함하는 그룹으로부터 선택된 효모 세포와 같은 효모 세포에서의 발현에 적합한 전형적인 프로모터는 *ADHI* 프로모터, *GALI* 프로모터, *GAL4* 프로모터, *CUP1* 프로모터, *PHO5* 프로모터, *nmt* 프로모터, *RPR1* 프로모터 또는 *TEF1* 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0450] 분리된 핵산 또는 이를 포함하는 발현 작제물을 발현을 위해 세포에 도입하는 수단은 당업자에게 공지되어 있다. 주어진 세포에 사용되는 기술은 공지된 성공적인 기술에 좌우된다. 제조합 DNA를 세포에 도입하기 위한 수단은 미세주입, DEAE-텍스트란에 의해 매개되는 형질감염, 리포펙타민(Gibco, MD, USA) 및/또는 선택틴(Gibco, MD, USA)을 사용하는 것과 같은 리포솜에 의해 매개되는 형질감염, PEG-매개 DNA 흡수, 전기천공 및 다른 것들 중에서 DNA-피복된 텅스텐 또는 금 입자(Agracetus Inc., WI, USA)를 사용하는 마이크로입자 충돌을 포함한다.
- [0451] 단백질을 생산하는 데 사용되는 숙주 세포는 사용되는 세포 유형에 따라 다양한 배지에서 배양될 수 있다. Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma), RPM1-1640 (Sigma) 및 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma)과 같은 상업적으로 이용 가능한 배지가 포유류 세포의 배양에 적합하다. 본 명세서에 논의된 다른 세포 유형을 배양하기 위한 배지가 당업계에 공지되어 있다.
- [0452] 단백질의 분리
- [0453] 단백질을 분리하는 방법은 당업계에 공지되어 있고/있거나 본 명세서에 기술되어 있다.
- [0454] 항원 결합 부위가 배양 배지로 분리되는 경우, 이러한 발현 시스템의 상청액은 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 장치를 사용하여 먼저 농축될 수 있다. PMSF와 같은 프로테아제 억제제는 단백질 분해를 억제하기 위해 임의의 상기 단계에 포함될 수 있고, 항생제는 외래성 오염물의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 상청액은 예를 들어 연속 원심분리를 사용하여 단백질을 발현하는 세포로부터 여과 및/또는 분리될 수 있다.
- [0455] 세포로부터 제조된 항원 결합 부위는 예를 들어 이온 교환, 수산화인회석 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A 친화성 크로마토그래피 또는 단백질 G 크로마토그래피), 또는 이들의 임의의 조합을 사용하여 정제될 수 있다. 이들 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 제 W099/57134호 또는 문헌[참조: Ed Harlow 및 David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]에 기재되어 있다.

- [0456] 숙련된 기술자는 또한 단백질이 정제 또는 검출을 용이하게 하는 태그, 예를 들어 폴리-히스티딘 태그, 예를 들어 헥사-히스티딘 태그, 또는 인플루엔자 바이러스 혈구응집소(HA) 태그 또는 유인원 바이러스 5(V5) 태그, FLAG 태그 또는 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST) 태그를 포함하도록 변형될 수 있음을 인지할 것이다. 이후, 생성된 단백질을 친화성 정제와 같은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 정제한다. 예를 들어, 헥사-히스 태그를 포함하는 단백질은, 단백질을 포함하는 시료를 고체 또는 반고체 지지체에 고정된 헥사-히스 태그에 특이적으로 결합하는 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA)과 접촉시키고, 시료를 세척하여 미결합된 단백질을 제거하며, 이어서 결합된 단백질을 용출함으로써 정제된다. 대안적으로, 또는 추가로 태그에 결합하는 리간드 또는 항체는 친화성 정제 방법에 사용된다.
- [0457] **방사성 동위원소를 항체에 연결함**
- [0458] 본 발명의 임의의 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 진단제 또는 치료제에 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있고, 바람직하게는, 진단제 또는 치료제는 방사성 동위원소이다.
- [0459] 적합한 동위원소의 예는 악티늄-225 (^{225}Ac), 아스타틴-211 (^{211}At), 비스무트-212 및 비스무트-213 (^{212}Bi , ^{213}Bi), 구리-64 및 구리-67 (^{64}Cu , ^{67}Cu), 갈륨-67 및 갈륨-68 (^{67}Ga 및 ^{68}Ga), 인듐-111 (^{111}In), 요오드-123, -124, -125 또는 -131 (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I) (^{123}I), 납-212 (^{212}Pb), 루테튬-177 (^{177}Lu), 라듐-223 (^{223}Ra), 사마륨-153 (^{153}Sm), 스칸듐-44 및 스칸듐-47 (^{44}Sc , ^{47}Sc), 스트론튬-90 (^{90}Sr), 테크네튬-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 이트륨-86 및 이트륨-90 (^{86}Y , ^{90}Y), 지르코늄-89 (^{89}Zr)을 포함한다. 당업자는 어떤 방사성 동위원소가 진단제로서 사용하기에 바람직하고 어떤 것이 치료제로 사용하기 바람직한지 잘 알 것이다.
- [0460] 방사성 동위원소는 직접적(킬레이트제 또는 보결기 또는 링커를 통해)으로 또는 항체의 단일 또는 다중 아미노산 잔기에 대한 결합(예를 들어, 티로신 잔기의 할로젠화)을 통해 간접적으로 본 발명의 항체에 접합될 수 있음이 이해될 것이다.
- [0461] 대안적인 실시양태에서, 방사성 동위원소를 항체에 접합시키기 위해 킬레이트제 또는 링커가 사용될 수 있다. 하나의 예에서, 항체는 TMT(6,6"-비스[N,N',N']-테트라(카복시메틸)아미노메틸)-4'-(3-아미노-4-메톡시페닐)-2,2':6',2"-테르피리딘), DOTA(1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-NN',N"(N'"-테트라아세트산, 테트라세탄으로 도 알려진), TCMC(DOTA의 테트라-1차 아미드), DO3A(1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7-트리스(아세트산)-10-(2-티오에틸)아세트아미드), CB-DO2A(4,10-비스(카복시메틸)-1,4,7,10-테트라아자비시클로[5.5.2]테트라데칸), NOTA(1,4,7-트리아자비시클로노난-트리아세트산), 디암사르(3,6,10,13,16,19-헥사아자비시클로[6.6.6]에이코산-1,8-디아민), DTPA(펜텐산 또는 디에틸렌트리아민펜타아세트산), CHX-A"-DTPA ([(R)-2-아미노-3-(4-이소티오시아네이트로페닐)프로필]-트랜스-(S,S)-시클로헥산-1,2-디아민-펜타아세트산), TETA(1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,8), 11-테트라아세트산, Te2A(4,11-비스(카복시메틸)-1,4,8,11-테트라아자비사이클로[6.6.2]헥사데칸), HBED, DFO(테스페리옥사민), DFOsq (DFO-스쿼라미드) 및 HOPO (3,4,3-(LI-1,2-HOPO) 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 기타 킬레이트제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 킬레이트 모이어티에 접합될 수 있다.
- [0462] 방사성 금속 및 기타 할로젠화된 방사성 동위원소를 갖는 킬레이터는 하나 이상의 라이신 잔기, 티로신 잔기 또는 티올 잔기를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 항체 내의 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 반응성 모이어티를 통해 본 발명의 항체에 결합될 수 있다.
- [0463] 다른 예에서, 변형 항체는 이관능성 링커, 예를 들어 브로모아세틸, 티올, 숙신이미드 에스테르, TFP 에스테르, 말레이미드, 또는 당업계에 공지된 임의의 아민 또는 티올-개질 화합물을 사용하여 접합된다.
- [0464] 당업자는 킬레이트제를 항체 및 이의 유도체 또는 단편에 접합시키는 표준 방법에 익숙할 것이다. 또한, 당업자는 예를 들어 본 명세서에 참조로 포함되어 있는 문헌 [참조: Chem. Soc. Rev., 2014,43, 260]에 기재된 바와 같이, 방사성 금속과 짝을 이루는 관련 킬레이트제를 선택하기 위한 접근 방식에 익숙할 것이다.
- [0465] **항원 결합 부위의 활성 검정**
- [0466] *PSMA 또는 CAIX에 대한 결합*
- [0467] 본 발명의 바람직한 항원 결합 부위가 PSMA 또는 CAIX에 결합한다는 것은 본 명세서의 개시내용으로부터 숙련된 기술자에게 명백할 것이다. 단백질에 대한 결합을 평가하는 방법은, 예를 들어 문헌[참조: Scopes (In:

Protein purification: principles and practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994)에 기재된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 일반적으로 항원 결합 부위를 고정화하고 표지된 항원과 접촉시키는 것을 포함한다. 비특이적 결합 단백질을 제거하기 위해 세척한 후 표지의 양과 결과적으로 결합된 항원이 검출된다. 물론, 항원 결합 부위는 표지되어 항원이 고정될 수 있다. 패닝-유형 검정도 사용할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 표면 플라즈몬 공명 검정이 사용될 수 있다.

[0468] **치료, 진단 및 치료진단 방법**

[0469] 본 발명의 항체는 방사면역요법에 의한 치료를 필요로 하는 다수의 상태를 치료하는데 유용하다. 일반적으로 이러한 상태는 암을 포함한다.

[0470] 예시적인 암은 항문 조직, 담관, 방광, 혈액 세포, 장, 뇌, 유방, 유암종, 자궁경부, 눈, 식도, 두경부, 신장, 후두, 백혈병, 간, 폐, 림프절, 림프종, 흑색종, 중피종, 골수종, 난소, 췌장, 음경, 전립선, 피부(예를 들어, 편평 세포 암종), 육종, 위, 고환, 갑상선, 질, 외음부의 종양을 포함하여 양성 및 고형 종양, 뼈 및 연조직 종양을 포함한다. 연조직 종양에는 양성 신경초종 단일염색체(Benign schwannoma Monosomy), 데스모이드 종양(Desmoid tumor), 지방모세포종(lipo-blastoma), 지방종(lipoma), 자궁 평활근종(uterine leiomyoma), 투명 세포 육종(clear cell sarcoma), 피부 섬유 육종(dermatofibrosarcoma), 유잉 육종(Ewing sarcoma), 골격외 점액성 연골육종(extraskelatal myxoid chondrosarcoma), 지방육종 점액종(liposarcoma myxoid), 폐포 횡문근육종(Alveolar rhabdomyosarcoma) 및 활액 육종(synovial sarcoma)이 포함된다. 특정 골종양에는 비골화 섬유종(nonossifying fibroma), 단일 골낭종(unicameral bone cyst), 내연골종(enchon-droma), 동맥류 골낭종(aneurismal bone cyst), 골모세포종(osteoblastoma), 연골모세포종(chondroblastoma), 연골점액섬유종(chondromyxofibroma), 골화 섬유종 및 선종(ossifying fibroma and adamantinoma), 거대 세포 종양(Giant cell tumor), 섬유성 이형성증(fibrous dysplasia), 유잉 육종 호산구성 육아종(Ewing's sarcoma eosinophilic granuloma), 골육종(osteosarcoma), 연골종(chondroma), 연골육종(chondrosarcoma), 악성 섬유성 조직구종(malignant fibrous histiocytoma) 및 전이성 암종(metastatic carcinoma)이 포함된다. 백혈병에는 급성 림프모구성(acute lymphoblastic), 급성 골수모구성(acute myeloblastic), 만성 림프구성(chronic lymphocytic) 및 만성 골수(chronic myeloid)가 포함된다.

[0471] 다른 예로는 유방 종양(breast tumor), 결장직장종양(colorectal tumor), 선암종(adenocarcinoma), 중피종(mesothelioma), 방광종양(bladder tumor), 전립선종양(prostate tumor), 생식 세포 종양(germ cell tumor), 간/담관암(hepatoma/cholangio), 암종(carcinoma), 신경내분비 종양(neuroendocrine tumor), 뇌하수체 종양(pituitary neoplasm), 작은 원형 세포 종양(small round cell tumor), 편평세포암(squamous cell cancer), 흑색종(melanoma), 비정형 섬유황색종(atypical fibroxanthoma), 정상피종(seminoma), 비정상피종(nonseminoma), 간질 라이디히 세포 종양(stromal leydig cell tumor), 세르톨리 세포 종양(Sertoli cell tumor), 피부 종양(skin tumor), 신장 종양(kidney tumor), 고환 종양(testicular tumor), 뇌종양(brain tumor), 난소 종양(ovarian tumor), 위 종양(stomach tumor), 구강 종양(oral tumor), 방광 종양(bladder tumor), 뼈 종양(bone tumor), 자궁경부 종양(cervical tumor), 식도 종양(esophageal tumor), 후두 종양(laryngeal tumor), 간 종양(liver tumor), 폐 종양(lung tumor), 질 종양(vaginal tumor) 및 빌름스 종양(Wilm's tumor)이 포함된다.

[0472] 바람직하게는, 본 발명의 항원 결합 부위는 PSMA 또는 CAIX의 존재를 특징으로 하는 암 치료에 유용하다. 예를 들어, PSMA에 결합하는 항체는 전립선암을 포함하여 PSMA의 증가된 발현을 특징으로 하는 암을 치료하는데 유용하다. CAIX에 결합하는 항체는 신장 세포 암종을 포함하여 CAIX의 증가된 발현을 특징으로 하는 암을 치료하는데 유용하다.

[0473] 당업자는 본 명세서에 기재된 상태를 진단하기 위한 방사선 영상화에 사용하기 위한 방사성 동위원소를 포함하여, 본 발명의 항체와 함께 사용하기에 적합한 진단제를 선택하는 방법에 익숙할 것이다. 또한, 당업자는 본 명세서에 기재된 진단 시약과 함께 사용하기 위한 영상화 기술에 익숙할 것이다.

[0474] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 치료진단 방법은 종양 세포 및/또는 전이의시험관내 및/또는 생체내 시각화, 확인 및/또는 검출 방법 뿐만 아니라 암 치료 방법이다.

[0475] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 진단학적 방법을 포함한다.

[0476] (1) 진단학적 유효량의 본 발명의 항체를 환자 또는 대상체에게 투여하는 단계,

- [0477] (여기서 항체는 하나 이상의 진단학적으로 유용한 표지를 포함함), 및
- [0478] (2) 진단학적 유효량의 본 발명의 항체를 환자 또는 대상체에게 투여하는 단계,
- [0479] 여기서 항체는 종양 치료제(들)(예를 들어, 방사성 동위원소, 독소(들), 약물(들))를 포함한다.
- [0480] 바람직하게는, 단계 1 및 단계 2는 순차적으로 수행되고 단계 1 및 단계 2의 항체는 동일하다.
- [0481] **단백질을 포함하는 항체 결합 도메인**
- [0482] *단일-도메인 항체*
- [0483] 일부 예에서, 본 발명의 항원 결합 부위 또는 단백질은 단일-도메인 항체이거나 이를 포함한다(이는 용어 "도메인 항체" 또는 "dAb"와 상호교환적으로 사용됨). 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 영역의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬이다. 특정 예에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다(Domantis, Inc., Waltham, MA; 예를 들어, 제US6248516호를 참조함).
- [0484] *디아바디, 트리바디, 테트라바디*
- [0485] 일부 예에서, 본 발명의 단백질은 제W098/044001호 및/또는 제W094/007921호에 기재된 것과 같은 디아바디, 트리바디, 테트라바디 또는 고차 단백질 복합체이거나 이를 포함한다.
- [0486] 예를 들어, 디아바디는 각각의 폴리펩티드 사슬이 구조 V_L -X- V_H 또는 V_H -X- V_L 을 포함하는 2개의 연관된 폴리펩티드 사슬을 포함하는 단백질이고, 여기서 V_L 은 항체 경쇄 가변 영역이고, V_H 는 항체 중쇄 가변 영역이고, X는 단일 폴리펩티드 사슬에서 V_H 및 V_L 이 회합(또는 Fv를 형성)하도록 하는데 불충분한 잔기를 포함하는 링커이거나 또는 부재이고, 여기서 하나의 폴리펩티드 사슬의 V_H 는 다른 폴리펩티드 사슬의 V_L 에 결합하여 항원 결합 도메인을 형성하고, 즉, 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 Fv 분자를 형성한다. V_L 및 V_H 는 각각의 폴리펩티드 사슬에서 동일할 수 있고 또는 V_L 및 V_H 는 이종특이성 디아바디(즉, 상이한 특이성을 갖는 2개의 Fv를 포함함)를 형성하도록 각각의 폴리펩티드 사슬에서 상이할 수 있다.
- [0487] *단일 사슬 Fv(scFv)*
- [0488] 숙련된 기술자는 scFv가 단일 폴리펩티드 사슬에 V_H 및 V_L 영역 및 scFv가 항원 결합(즉, 단일 폴리펩티드 사슬의 V_H 및 V_L 이 서로 회합하여 Fv를 형성함)을 위해 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 하는 V_H 및 V_L 사이의 폴리펩티드 링커를 포함한다는 것을 인지할 것이다. 예를 들어, 링커는 scFv에 대해 보다 선호되는 링커 중 하나인 $(Gly_4Ser)_3$ 과 함께 12개를 초과하는 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0489] 본 발명은 또한 단일 시스테인 잔기가 V_H 의 FR 및 V_L 의 FR에 도입되고 시스테인 잔기는 안정한 Fv를 생성하기 위해 이황화 결합에 의해 연결되는, 이황화 안정화된 Fv(또는 diFv 또는 dsFv)를 고려한다.
- [0490] 대안적으로 또는 추가로, 본 발명은 이량체 scFv, 즉, 비공유 또는 공유 연결, 예를 들어 류신 지퍼 도메인(예를 들어, Fos 또는 Jun으로부터 유래됨)에 의해 연결된 2개의 scFv 분자를 포함하는 단백질을 포괄한다. 대안적으로, 2개의 scFv는, 예를 들어 제US20060263367호에 기재된 바와 같이, scFv 둘 모두가 항원을 형성하고 항원에 결합하도록 하는데 충분한 길이의 펩티드 링커에 의해 연결된다.
- [0491] *중쇄 항체*
- [0492] 중쇄 항체는 중쇄를 포함하지만 경쇄는 포함하지 않는다는 점에서 많은 다른 형태의 항체와 구조적으로 상이하다. 따라서 이러한 항체는 "중쇄 전용 항체"라고도 한다. 중쇄 항체는 예를 들어 낙타과 연골어류(IgNAR라고도 함)에서 발견된다.
- [0493] 자연 발생 중쇄 항체에 존재하는 가변 영역은 일반적으로 낙타류 항체에서는 " V_H 도메인", IgNAR에서는 V-NAR로 지칭되는데, 이는 통상적인 4-사슬 항체(이들은 " V_H 도메인"으로 지칭됨)에 존재하는 중쇄 가변 영역과 구별하고 통상적인 4-사슬 항체(" V_L 도메인"으로 지칭됨)에 존재하는 경쇄 가변 영역과 구별하기 위해서이다.
- [0494] 낙타과로부터의 중쇄 항체 및 이의 가변 영역 및 이의 생산 및/또는 분리 및/또는 사용 방법에 대한 일반적인 설명은 특히 다음의 참조문헌 제W094/04678호, 제W097/49805호 및 제W0 97/49805호에서 찾을 수 있다.

- [0495] 연골 어류로부터의 중쇄 항체 및 이의 가변 영역 및 이의 생산 및/또는 분리 및/또는 사용 방법에 대한 일반적인 설명은 특히 제W02005/118629호에서 찾을 수 있다.
- [0496] 기타 항체 및 이의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질
- [0497] 본 발명은 또한 기타 항체 및 이의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질, 예를 들어:
- [0498] (i) 제US5731168호에 기재된 바와 같은 "키 앤 홀(key and hole)" 이중특이성 단백질;
- [0499] (ii) 예를 들어, 제US4676980호에 기재된 바와 같은 이중접합체 단백질;
- [0500] (iii) 예를 들어, 제US4676980호에 기재된 바와 같은 화학적 가교제를 사용하여 생산된 이중접합체 단백질; 및
- [0501] (iv) Fab₃ (예를 들어, 제EP19930302894호에 기술된 바와 같음)을 고려한다.
- [0502] **조성물**
- [0503] 일부 예에서, 본 명세서에 기술된 항원 결합 부위는 경구, 비경구, 흡입 스프레이, 흡착, 흡수, 국소, 직장, 비강, 협측, 질, 뇌실내, 통상적인 무독성 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 투여 제형의 이식된 저장소를 통해, 또는 임의의 다른 편리한 투여 형태에 의해 투여될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 척추강내, 뇌실내, 흉골내 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0504] 항원 결합 부위를 대상체(예를 들어, 약제학적 조성물)에 투여하기에 적합한 형태로 제조하는 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990) 및 U.S. Pharmacopeia: National Formulary (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1984)]에 기재된 방법을 포함한다.
- [0505] 본 발명의 약제학적 조성물은 정맥내 투여 또는 장기 또는 관절의 체강 또는 내강으로의 투여와 같은 비경구 투여에 특히 유용하다. 투여용 조성물은 일반적으로 약제학적으로 허용되는 담체, 예를 들어 수성 담체에 용해된 항원 결합 부위의 용액을 포함할 것이다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 완충 식염수 등을 사용할 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 완충액, 독성 조절제 등과 같은 생리학적 조건을 근사화하기 위해 필요한 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들어, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 젖산나트륨 등을 포함할 수 있다. 이들 제형에서 본 발명의 항원 결합 부위의 농도는 광범위하게 변할 수 있고, 주로 선택된 특정 투여 방식 및 환자의 요구에 따라 체적, 점도, 체중 등을 기반으로 선택될 것이다. 예시적인 담체는 물, 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함한다. 혼합유 및 에틸올레이트와 같은 비수성 비히클도 사용될 수 있다. 리포솜은 또한 담체로 사용될 수 있다. 비히클에는 등장성 및 화학적 안정성을 강화시키는 소량의 첨가제(예를 들어, 완충액 및 방부제)를 포함할 수 있다.
- [0506] **투여량 및 투여 시기**
- [0507] 본 발명의 항원 결합 부위의 적합한 투여량은 특정 항원 결합 부위, 치료될 상태 및/또는 치료되는 대상체에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 차선의 투여량으로 시작하여 최적 또는 유용한 투여량을 결정하기 위해 투여량을 점진적으로 수정함으로써 적절한 투여량을 결정하는 것은 숙련된 의사의 능력 범위 내에 있다. 대안적으로, 치료/예방을 위한 적절한 투여량을 결정하기 위해 세포 배양 분석 또는 동물 연구의 데이터가 사용되며, 여기서 적절한 투여량은 독성이 거의 또는 전혀 없는 활성 화합물의 ED₅₀을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 다양할 수 있다. 치료학적/예방학적 유효 용량은 세포 배양 검정으로부터 초기에 추정할 수 있다. 세포 배양에서 결정된 IC₅₀(즉, 증상의 최대 억제)의 절반을 달성하는 화합물의 농도 또는 양)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위한 용량이 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 정보를 사용하여 인간에게 유용한 용량을 보다 정확하게 결정할 수 있다. 혈장 내 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.
- [0508] 일부 예에서, 본 발명의 방법은 본 명세서에 기재된 단백질을 예방학적 또는 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.
- [0509] 용어 "치료학적 유효량"은 치료를 필요로 하는 대상체에 투여될 때 대상체의 예후 및/또는 상태를 개선하고/하거나 본 명세서에 기재된 임상 상태의 하나 이상의 증상을 해당 상태를 임상 진단하거나 또는 임상학적 특징으로 관찰되고 허용되는 수준보다 낮은 수준으로 감소 또는 억제하는 양이다. 대상체에게 투여되는 양은 치료할 상태의 특정 특성, 치료되는 상태의 유형 및 단계, 투여 방식 및 대상체의 특성(예를 들어, 일반적인 건강, 기

타 질병, 나이, 성별, 유전자형 및 체중)에 좌우될 것이다. 숙련가는 이들 및 기타 인자에 따라 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 따라서, 이 용어는 본 발명을 특정 양, 예를 들어 단백질(들)의 중량 또는 양으로 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 본 발명은 대상체에서 언급된 결과를 달성하기에 충분한 항원 결합 부위(들)의 임의의 양을 포함한다.

[0510] 본 명세서에 사용된 용어 "예방학적 유효량"은 임상 상태의 하나 이상의 검출 가능한 증상의 발병을 예방 또는 억제 또는 지연시키기에 충분한 양의 단백질을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 숙련된 기술자는 이러한 양이 예를 들어 투여된 특정 항원 결합 부위(들) 및/또는 특정 대상체 및/또는 상태의 유형 또는 중증도 또는 수준 및/또는 상태에 대한 경향(유전적 또는 기타)에 따라 달라질 것임을 인식할 것이다. 따라서, 이 용어는 본 발명을 특정 양, 예를 들어 항원 결합 부위(들)의 중량 또는 양으로 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 본 발명은 대상체에서 언급된 결과를 달성하기에 충분한 항원 결합 부위(들)의 임의의 양을 포함한다.

[0511] **키트**

[0512] 본 발명은 하기 중 하나 이상을 포함하는 키트를 추가로 포함한다:

[0513] (i) 본 발명의 항체 또는 이를 인코딩하는 발현 작제물(들);

[0514] (ii) 본 발명의 분자;

[0515] (iii) 본 발명의 복합체; 또는

[0516] (iii) 본 발명의 약제학적 조성물.

[0517] 암을 검출하기 위한 키트의 경우, 키트는 예를 들어 본 발명의 항원 결합 부위에 연결된 검출 수단을 추가로 포함할 수 있다.

[0518] 치료용/예방용 키트의 경우, 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0519] 선택적으로, 본 발명의 키트는 임의의 예에 따라 본 명세서에 기재된 방법에 사용하기 위한 설명서와 함께 제공된다.

표 1

[0520] **본 발명의 PSMA-결합 항체에 대한 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열의 요약**

항체 ID	영역	서열번호	아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열
ANT4044 가변 중쇄	HCDR1 (단백질)	1	EYTIH
	HCDR2 (단백질)	2	NINPNNGGTTYNQKFED
	HCDR3 (단백질)	3	GWNFYD
	VH (단백질)	4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFEYTIHWVRQAPGKLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTITVTVSS
	HCDR1 (DNA)	5	GAATACACCATCCAC
	HCDR2 (DNA)	6	AACATTAATCTCAACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGAC
	HCDR3 (DNA)	7	GGTTGGAACCTTGACTAC
	VH (DNA)	8	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTGAATACACCATCCA CTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAACATTAAT CCTAACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCACAA TCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAG ATCTGAGGATACTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTAC TGGGGCCAAGGCACCGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1 (단백질)	9	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFT
	HFR2 (단백질)	10	WVRQAPGKLEWIG
	HFR3 (단백질)	11	RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
	HFR4 (단백질)	12	WGQGTITVTVSS
	HFR1 (DNA)	12	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGT
	HFR2 (DNA)	14	TGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGA
	HFR3 (DNA)	15	AGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA GCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGTCTATTACTGTGCAGCT
	HFR4 (DNA)	16	TGGGGCCAAGGCACCGTCACCGTCTCCTCA

ANT4044-A2 가변 중쇄	HCDR1 (단백질)	17	EYTIH
	HCDR2 (단백질)	18	NINPNNGGTTYNQKFED
	HCDR3 (단백질)	19	YWLFDY
	VH (단백질)	20	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAYWLFDYWGQGTITVTVSS
	HCDR1 (DNA)	21	GAATACACCATCCAC
	HCDR2 (DNA)	22	AACATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGAC
	HCDR3 (DNA)	23	TACTGGCTGTTCTGACTAC
	VH (DNA)	24	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTGAATACACCATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAACATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCACAACTACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTTACTGGCTGTTCTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1 (단백질)	25	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
	HFR2 (단백질)	26	WVRQAPGKGLEWIG
	HFR3 (단백질)	27	RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
	HFR4 (단백질)	28	WGQGTITVTVSS
	HFR1 (DNA)	29	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGT
	HFR2 (DNA)	30	TGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGA
	HFR3 (DNA)	31	AGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGTCTATTACTGTGCAGCT
	HFR4 (DNA)	32	TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
ANT4044/ ANT4044-A2 가변 경쇄	LCDR1 (단백질)	33	KASQDVGTAVD
	LCDR2(단백질)	34	WASTRHT
	LCDR3 (단백질)	35	QQYNSYPLT
	VL (단백질)	36	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIK
	LCDR1 (DNA)	37	AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGAC
	LCDR2 (DNA)	38	TGGGCATCCACCCGGCACACT
	LCDR3 (DNA)	39	CAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACG
	VL (DNA)	40	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGTATCAACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGACTGCAGCCTGAAGACTTTGCAGTTTATTA CTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCCGCCAGGGGACCAAGGTG GATATCAAA
	LFR1(단백질)	41	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC
	LFR2 (단백질)	42	WYQQKPGQAPKLLIY
	LFR3 (단백질)	43	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYC
	LFR4(단백질)	44	FGQGTKVDIK
	LFR1(DNA)	45	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACTTGC
	LFR2(DNA)	46	TGGTATCAACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAACTACTGATTTAC
	LFR3 (DNA)	47	GGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTGCAGTTTATTACTGT
	LFR4(DNA)	48	TTCCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA
ANT4044/ANT4044-A2 비변형 인간 IgG1 중쇄 불변 영역	IgG1 HC (단백질)	235	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHSTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

ANT4044/ANT4044-A2 변형 인간 IgG1 중쇄 불변 영역	IgG1 H310A H435Q HC (단백질)	236	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMH EALHNYTQKSLSLSPGK
ANT4044/ANT4044-A2 변형 인간 IgG4 불변 사슬 영역	IgG4 S228P L235E H310A H435Q HC (단백질)	237	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKYGP PCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNQYTQKSLSLSLGK
ANT4044/ANT4044-A2 카파 경쇄 불변 영역	인간 κ LC 불변 영역	238	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
ANT4044 RADmAb IgG1 중쇄 (HuX592r)	FcRn-무효, IgG1 동종이형 G1m(3) H310A H435Q	239	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNIN PNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFYD WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVSCSVMHEALHNYTQKSLSLSPGK
ANT4044 RADmAb IgG4 중쇄	FcRn+FcR γ -무효, IgG4 S228P L235E H310A H435Q	240	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNIN PNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFYD WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKYGPCCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNYTQKSLSLSLGK
ANT4044-A2 RADmAb IgG1 중쇄	FcRn-무효, IgG1 H310A H435Q	241	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNIN PNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAYWLFYD WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVSCSVMHEALHNYTQKSLSLSPGK
ANT4044-A2 RADmAb IgG4 중쇄	FcRn+FcR γ -무효, IgG4 S228P L235E H310A H435Q	242	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNIN PNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAYWLFYD WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKYGPCCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNYTQKSLSLSLGK
ANT4044-A2-ANT4044-A2 Vκ 경쇄	Vκ 경쇄	243	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWAS TRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYNYSYPLTFGGQTKV DIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

표 2

본 발명의 CAIX-결합 항체에 대한 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열의 요약

항체 ID	영역	서열번호	아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열
지렌톡시맵 키메라 VHO 가변 중쇄	HCDR1 (단백질)	49	NYYSMS

	HCDR2 (단백질)	50	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3 (단백질)	51	HRSGYFSMDY
	VH (단백질)	52	DVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFSNYMSWVRQTPEKRELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGSTVTVSS
	HCDR1 (DNA)	53	AACATTACATGTCT
	HCDR2 (DNA)	54	GCCATTAATAGTGATGGTGGTATCACCTACTATCTAGACACTGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	55	CACCGCTCGGGCTACTTTTCTATGGACTAC
	VH (DNA)	56	GACGTGAAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCTTGGAGGATCCCTGAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAACATTACATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGATGGTGGTATCACCTACTATCTAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCAAGAGACAATGCCAAGAACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCTTGTTTACTGTGCAAGACACCGCTCGGGCTACTTTTCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1 (단백질)	57	DVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFS
	HFR2 (단백질)	58	WVRQTPEKRELV
	HFR3 (단백질)	59	RFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTALFYCAR
	HFR4 (단백질)	60	WGQGSTVTVSS
	HFR1 (DNA)	61	GACGTGAAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCTTGGAGGATCCCTGAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGT
	HFR2 (DNA)	62	TGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCA
	HFR3 (DNA)	63	CGATTACCATTTCAAGAGACAATGCCAAGAACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCTTGTTTACTGTGCAAGA
	HFR4 (DNA)	64	TGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
지렌특시맵 인간화 VH1 가변 중쇄	HCDR1 (단백질)	65	NYMS
	HCDR2 (단백질)	66	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3 (단백질)	67	HRSGYFSMDY
	VH (단백질)	68	DVKLVESGGGLVKPGSLRLSCAASGFTFSNYMSWVRQAPGKLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGSTVTVSS
	HCDR1 (DNA)	69	AACACTACATGAGC
	HCDR2 (DNA)	70	GCCATTAACAGTGACGGTGGCATCACCTACTACCTGGACACCGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	71	CACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC
	VH (DNA)	72	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACACTACATGAGCTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGCTGGTTGCCGCCATTAACAGTGACGGTGGCATCACCTACTACCTGGACACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAAGAGCGGAGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGACACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTACTGGGCCAGGGCACCAGCGTCACTGTCTCCTCA
	HFR1 (단백질)	73	DVKLVESGGGLVKPGSLRLSCAASGFTFS
	HFR2 (단백질)	74	WVRQAPGKLELV
	HFR3 (단백질)	75	RFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTALFYCAR
	HFR4 (단백질)	76	WGQGSTVTVSS
	HFR1 (DNA)	77	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGT
	HFR2 (DNA)	78	TGGGTGCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGCTGGTTGCC
	HFR3 (DNA)	79	CGATTACCATCTCCAGGACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAAGAGCGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGA
	HFR4 (DNA)	80	TGGGGCCAGGGCACCAGCGTCACTGTCTCCTCA
지렌특시맵 인간화 VH3 가변 중쇄	HCDR1 (단백질)	81	NYMS
	HCDR2 (단백질)	82	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3 (단백질)	83	HRSGYFSMDY
	VH (단백질)	84	DVKLVESGGGLVKPGSLRLSCAASGFTFSNYMSWVRQAPGKLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGSTVTVSS
	HCDR1 (DNA)	85	AACACTACATGAGC
	HCDR2 (DNA)	86	CCATTAACAGTGACGGTGGCATCACCTACTACCTGGACACCGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	87	CACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC

	VH (DNA)	88	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGATCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACTACTACATGAGCTGG GTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGCTGGTTGCCGCCATTAACAGTGAC GGTGGCATCACCTACTACCTGGACACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGG GACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGACACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCTCTCA
	HFR1 (단백질)	89	DVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
	HFR2 (단백질)	90	WVRQAPGKGLELVA
	HFR3 (단백질)	91	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR
	HFR4 (단백질)	92	WGQGLTVTVSS
	HFR1 (DNA)	93	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGATCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGT
	HFR2 (DNA)	94	TGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGCTGGTTGCC
	HFR3 (DNA)	95	CGATTACCATCTCCAGGACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGA
	HFR4 (DNA)	96	TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCTCTCA
지렌특시맵 인간화 VH4 가변 중쇄	HCDR1 (단백질)	97	NYYS
	HCDR2 (단백질)	98	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3 (단백질)	99	HRSGYFSMDY
	VH (단백질)	100	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYSWVRQAPGKGLELVA AINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR HRSGYFSMDYWGQGLTVTVSS
	HCDR1 (DNA)	101	AACTACTACATGAGC
	HCDR2 (DNA)	102	GCCATTAACAGTGACGGTGGCATCACCTACTACCTGGACACCGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	103	CACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC
	VH (DNA)	104	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGATCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACTACTACATGAGCTGG GTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGCTGGTTGCCGCCATTAACAGTGAC GGTGGCATCACCTACTACCTGGACACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGG GACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGACACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCTCTCA
	HFR1 (단백질)	105	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
	HFR2 (단백질)	106	WVRQAPGKGLELVA
	HFR3 (단백질)	107	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR
	HFR4 (단백질)	108	WGQGLTVTVSS
	HFR1 (DNA)	109	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGATCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGT
	HFR2 (DNA)	110	TGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGCTGGTTGCC
	HFR3 (DNA)	111	CGATTACCATCTCCAGGACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGA
	HFR4 (DNA)	112	TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCTCTCA
지렌특시맵 인간화 VH5 가변 중쇄	HCDR1 (단백질)	113	NYYS
	HCDR2 (단백질)	114	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3 (단백질)	115	HRSGYFSMDY
	VH (단백질)	116	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYSWVRQAPGKGLEWVA AINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR HRSGYFSMDYWGQGLTVTVSS
	HCDR1 (DNA)	117	AACTACTACATGAGC
	HCDR2 (DNA)	118	GCCATTAACAGTGACGGTGGCATCACCTACTACCTGGACACCGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	119	CACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC
	VH (DNA)	120	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGATCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACTACTACATGAGCTGG GTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGTTGCCGCCATTAACAGTGAC GGTGGCATCACCTACTACCTGGACACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGG GACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGACACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCTCTCA
	HFR1 (단백질)	121	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
	HFR2 (단백질)	122	WVRQAPGKGLEWVA

	HFR3 (단백질)	123	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR
	HFR4 (단백질)	124	WGQGLVTVSS
	HFR1 (DNA)	125	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGATCCCTG AGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGT
	HFR2 (DNA)	126	TGGGTGCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCC
	HFR3 (DNA)	127	CGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAATGAAC AGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGA
	HFR4 (DNA)	128	TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCTCTCA
지렌특시맵 키메라 Vk0 가변 경쇄	LCDR1 (단백질)	129	KASQNVVSAVA
	LCDR2(단백질)	130	SASNRYT
	LCDR3 (단백질)	131	QQYSNYPWT
	VL (단백질)	132	DIVMTQSQRFMSTTVGDRVSI TCKASQNVVSAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNR YTGVPDRFTGSGSGTDFLTLSNMQSEDLADFFCQQYSNYPWTFGGGTKLEIK
	LCDR1 (DNA)	133	AAGGCCAGTCAGAATGTGGTTTCTGCTGTTGCC
	LCDR2 (DNA)	134	TCAGCATCCAATCGGTACACT
	LCDR3 (DNA)	135	CAACAATATAGCAACTATCCGTGGACG
	VL (DNA)	136	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAGATTCATGTCCACAACAGTAGGAGACAGG GTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTTTCTGCTGTTGCCCTGGTAT CAACAGAAACCAGGACAATCTCTAACTACTGATTACTCAGCATCCAATCGG TACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATTAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCTGATTTTTCTGTCAACAA TATAGCAACTATCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
	LFR1(단백질)	137	DIVMTQSQRFMSTTVGDRVSI T
	LFR2 (단백질)	138	WYQQKPGQSPKLLIY
	LFR3 (단백질)	139	GVPDRFTGSGSGTDFLTLSNMQSEDLADFFC
	LFR4(단백질)	140	FGGGTKLEIK
	LFR1(DNA)	141	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAGATTCATGTCCACAACAGTAGGAGACAGG GTCAGCATCACCTGC
	LFR2 (DNA)	142	TGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCTAACTACTGATTAC
	LFR3 (DNA)	143	GGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATTAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCTGATTTTTTCTGT
	LFR4(DNA)	144	TTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
지렌특시맵 인간화 Vk1 가변 경쇄	LCDR1 (단백질)	145	KASQNVVSAVA
	LCDR2(단백질)	146	SASNRYT
	LCDR3 (단백질)	147	QQYSNYPWT
	VL (단백질)	148	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVVSAVAWYQQKPGQAPKLLIYSASNR YTGVPDRFTGSGSGTDFLTLSLQSEDLADYFCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK
	LCDR1 (DNA)	149	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	150	AGCGCCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	151	CAACAGTACAGCAATTACCCTTGGACG
	VL (DNA)	152	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCAAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAAGCTCCTGATCTATAGCGCCTCCAACAGG TACACCGGGTCCCAGACAGGTTACCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGCTGCAGAGCGAAGATCTGGCAGACTATTTCTGTCAACAG TACAGCAATTACCCTTGGACGTTCCGGCGCGGACCAAGGTGGAAATCAAA
	LFR1(단백질)	153	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITC
	LFR2 (단백질)	154	WYQQKPGQAPKLLIY
	LFR3 (단백질)	155	GVPDRFTGSGSGTDFLTLSLQSEDLADYFC
	LFR4(단백질)	156	FGGGTKVEIK
	LFR1(DNA)	157	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	158	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAAGCTCCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	159	GGGGTCCCAGACAGGTTACCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGAGCGAAGATCTGCAGACTATTTCTGT
	LFR4(DNA)	160	TTCCGGCGGCGGACCAAGGTGGAAATCAAA
지렌특시맵 인간화 Vk2 가변 경쇄	LCDR1 (단백질)	161	KASQNVVSAVA
	LCDR2(단백질)	162	SASNRYT
	LCDR3 (단백질)	163	QQYSNYPWT

	VL (단백질)	164	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVSAVAVYQQKPGQAPRLLIYSASNR YTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYFCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK
	LCDR1 (DNA)	165	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	166	AGCGCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	167	CAACAGTACAGCAATTACCCTTGGACG
	VL (DNA)	168	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCAAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCTCCTGATCTATAGCGCTCCAACAGG TACACCGGGGTCCCAGACAGGTTACCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGCTGCAGGCCGAAGATCTGGCAGACTATTTCTGTCAACAG TACAGCAATTACCCTTGGACGTTTCGGCGGCGGACCAAGGTGGAATCAAA
	LFR1(단백질)	169	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITC
	LFR2 (단백질)	170	WYQQKPGQAPRLLIY
	LFR3 (단백질)	171	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYFC
	LFR4(단백질)	172	FGGGTKVEIK
	LFR1(DNA)	173	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	174	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCTCCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	175	GGGGTCCCAGACAGGTTACCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGGCCGAAGATCTGGCAGACTATTTCTGT
	LFR4(DNA)	176	TTCGGCGGCGGACCAAGGTGGAATCAAA
지렌특시맵 인간화 Vk3 가변 경쇄	LCDR1 (단백질)	177	KASQNVVSAVA
	LCDR2(단백질)	178	SASNRYT
	LCDR3 (단백질)	179	QQYSNYPWT
	VL (단백질)	180	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVSAVAVYQQKPGQAPRLLIYSASNR YTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYFCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK
	LCDR1 (DNA)	181	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	182	AGCGCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	183	CAACAGTACAGCAATTACCCTTGGACG
	VL (DNA)	184	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCAAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCTCCTGATCTATAGCGCTCCAACAGG TACACCGGGGTCCCAGACAGGTTACCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGCTGCAGGCCGAAGATCTGGCAGACTATTTCTGTCAACAG TACAGCAATTACCCTTGGACGTTTCGGCGGCGGACCAAGGTGGAATCAAA
	LFR1(단백질)	185	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
	LFR2 (단백질)	186	WYQQKPGQAPRLLIY
	LFR3 (단백질)	187	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYFC
	LFR4(단백질)	188	FGGGTKVEIK
	LFR1(DNA)	189	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	190	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCTCCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	191	GGGGTCCCAGACAGGTTACCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGGCCGAAGATCTGGCAGACTATTTCTGT
	LFR4(DNA)	192	TTCGGCGGCGGACCAAGGTGGAATCAAA
지렌특시맵 인간화 Vk4 가변 경쇄	LCDR1 (단백질)	193	KASQNVVSAVA
	LCDR2(단백질)	194	SASNRYT
	LCDR3 (단백질)	195	QQYSNYPWT
	VL (단백질)	196	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVSAVAVYQQKPGQAPRLLIYSASNR YTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYFCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK
	LCDR1 (DNA)	197	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	198	AGCGCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	199	CAACAGTACAGCAATTACCCTTGGACG
	VL (DNA)	200	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCAAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCTCCTGATCTATAGCGCTCCAACAGG TACACCGGGGTCCCAGACAGGTTACCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGCTGCAGGCCGAAGATCTGGCAGACTATTCTGTCAACAG TACAGCAATTACCCTTGGACGTTTCGGCGGCGGACCAAGGTGGAATCAAA
	LFR1(단백질)	201	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC

	LFR2 (단백질)	202	WYQQKPGQAPRLIY
	LFR3 (단백질)	203	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYC
	LFR4(단백질)	204	FGGGTKVEIK
	LFR1(DNA)	205	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	206	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCTCCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	207	GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCCAAGATCTGGCAGACTATTACTGT
	LFR4(DNA)	208	TTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAATCAAA
지렌특시맵 인간화 V _k 5 가변 경쇄	LCDR1 (단백질)	209	KASQNVVSAVA
	LCDR2(단백질)	210	SASNRYT
	LCDR3 (단백질)	211	QQYSNPWT
	VL (단백질)	212	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVVSAVAWYQQKPGQAPRLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYCQQYSNPWTFGGGKVEIK
	LCDR1 (DNA)	213	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	214	AGCGCCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	215	CAACAGTACAGCAATTACCTTGGACG
	VL (DNA)	216	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGAAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGAGGCTGATCTATAGCGCTCCAACAGGTACACCGGGTCCCAGACAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCCAAGATCTGGCAGACTATTACTGTCAACAGTACAGCAATTACCTTGGACGTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAATCAAA
	LFR1(단백질)	217	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
	LFR2 (단백질)	218	WYQQKPGQAPRLIY
	LFR3 (단백질)	219	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYC
	LFR4(단백질)	220	FGGGTKVEIK
	LFR1(DNA)	221	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	222	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGAGGCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	223	GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCCAAGATCTGGCAGACTATTACTGT
	LFR4(DNA)	224	TTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAATCAAA
지렌특시맵 비변형 인간 IgG1 불변 사슬 영역	IgG1 HC (단백질)	225	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
지렌특시맵 변형 인간 IgG1 불변 사슬 영역	IgG1 H310A H435Q HC (단백질)	226	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNQYTKQKSLSLSPGK
지렌특시맵 변형 인간 IgG4 불변 사슬 영역	IgG4 S228P L235E HC (단백질)	227	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPEPPEEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
지렌특시맵 변형 인간 IgG4 불변 사슬 영역	IgG4 S228P L235E H310A H435Q HC (단백질)	228	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPEPPEEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNQYTKQKSLSLSLGK
지렌특시맵 카파 경쇄 불변 영역	Human κ LC 불변 영역	229	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

지렌특시맵 천연 IgG1 동중이형 Gm (1,17) VH4 중쇄	IgG1 VH4 중쇄	230	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLVLAAINS GGITYYLDITVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDY WGQGTLLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTHTCPPELPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
h지렌특시맵 IgG1 동중이형 Gm (1,17) RADmAb VH4 중쇄	FcRn-무효 IgG1 동중이형 H130A H435Q	231	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLVLAAINS GGITYYLDITVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDY WGQGTLLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTHTCPPELPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHE ALHNQYTQKSLSLSPGK
h지렌특시맵 IgG4 RADmAb VH4 중쇄	FcR γ-무효 IgG4 S228P L235E	232	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLVLAAINS GGITYYLDITVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDY WGQGTLLTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKR VESKYGPCCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK
h지렌특시맵 IgG4 RADmAb VH4 중쇄	FcRn+FcR γ-무효 IgG4 S228P L235E H310A H435Q	233	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLVLAAINS GGITYYLDITVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDY WGQGTLLTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKR VESKYGPCCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NQYTQKSLSLSLGK
h지렌특시맵 Vκ 경쇄	Vκ 경쇄	234	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVSAVAYQQKPGQAPRLLIYSASNR YTGVPRDRFSGSGSGTDFTLTITSSLAEDLADYYCQQYSNPWTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0522] 실시예

[0523] 실시예 1: CAIX에 결합하기 위한 항체

[0524] 요약

[0525] 인간화 항체 가변 영역 유전자를 비변형 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 및 인간 카파 경쇄 불변 도메인을 인코딩하는 벡터에 클로닝하였다. 키메라 항체를, FcRn 및 단백질 A 결합을 소거하는 돌연변이 H310A 및 H435Q를 포함하는 변형 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인(Andersen 외, 2012) 또는 돌연변이 S228P(힌지를 안정화하기 위함(Angal 외, 1993)) 및 L235E(이펙터 기능을 제거하기 위함(Reddy 외, 2000)) 뿐만 아니라 위에서 설명된 FcRn 소거 돌연변이를 포함하는 변형 인간 IgG4 중쇄 작제물을 인코딩하는 벡터에 추가로 클로닝하였다. 키메라 및 인간화 항체는 HEK EBNA 세포에서 일시적으로 발현되었고 바이어코어(Biacore) 단일 주기 동역학 분석을 사용하여 인간 탄산탈수효소 IX(CAIX)에 대한 결합에 대해 시험하였다. 선택된 리드 항체를 단백질 A 또는 단백질 G로 정제하고 분석학적 SEC, 경쟁 ELISA 및 바이어코어 다중 주기 동역학 분석으로 분석하였다.

[0526] 키메라 항체에 유사한 결합을 갖는 3개의 리드 후보 인간화 항체를 확인하였다. 항체들은 이후 상기 기재된 바와 같이 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인(H310A, H435Q) 및 IgG4 중쇄 불변 도메인(S241P, L235E, H310A, H435Q)을 인코딩하는 벡터에 클로닝하였다. 키메라 및 리드 인간화 항체는 CHO 세포에서 일시적으로 발현되었고 바이어코어 단일 주기 동역학 분석을 사용하여 인간 탄산탈수효소 IX(CAIX)에 대한 결합에 대해 시험하였다. 항체를 단백질 A 또는 단백질 G로 정제하고 분석학적 SEC 및 바이어코어 다중 주기 동역학 분석으로 분석하였다.

[0527] 방법

- [0528] 복합 인간 항체TM 가변 영역 서열의 설계
- [0529] Swiss PDB를 사용하여 지렌투스맵 항체 V 영역의 구조 모델을 생성하였고 항체의 결합 특성에 필수적일 가능성이 있는 중요한 "제약" 아미노산을 확인하기 위해 분석하였다. 많은 프레임워크 잔기와 함께 CDR 내에 포함된 대부분의 잔기(카바트 및 코티아 정의 모두 사용)가 중요한 것으로 고려되었다. 지렌투스맵의 VH 및 V_K 서열은 전형적인 프레임워크 잔기 및 많은 무린 항체에 필적하는 CDR 1, 2 및 3 모티프를 포함한다.
- [0530] 위의 분석으로부터, 지렌투스맵의 복합 인간 서열은 CDR 외부의 대체 잔기에 대해 넓은 관용도를 가지지만 CDR 서열 내에서는 좁은 메뉴의 가능한 잔기로 생성될 수 있다고 여겨졌다. 예비 분석은 여러 인간 항체의 상응하는 서열 세그먼트를 조합하여 무린 서열의 것과 유사하거나 동일한 CDR을 생성할 수 있음을 보여주었다. CDR 외부 및 측면 영역의 경우, 광범위한 선택의 인간 서열 세그먼트가 신규 인간화 V 영역의 가능한 성분으로서 확인되었다.
- [0531] CD4+ T 세포 에피토프 회피
- [0532] 구조 분석을 기반으로 지렌투스맵 인간화 변이체를 생성하는 데 사용할 수 있는 서열 세그먼트의 대규모 예비 집합을 확인하였다. 이들 세그먼트는 인간 MHC 클래스 II 대립유전자에 대한 펩티드 결합의 인 실리코(in silico) 분석을 위해 iTopeTM 기술을 사용(Perry 외, 2008)하고, 공지된 항체 서열-관련 T 세포 에피토프의 TCEDTM를 사용(Bryson 외, 2010)하여 선택하고 분석하였다. 인간 MHC 클래스 II에 대한 상당한 비인간 생식계열 결합제로 확인되거나 TCEDTM에 대해 상당한 히트를 기록한 서열 세그먼트는 폐기되었다. 이러한 결과 세그먼트 집합이 감소하고, 세그먼트 사이의 접합부가 잠재적인 T 세포 에피토프를 포함하지 않음을 보장하기 위해 위와 같이 이들의 조합을 다시 분석하였다. 선택된 서열 세그먼트는 유의미한 T 세포 에피토프가 결합되어 있는 완전한 V 영역 서열로 조립되었다. 이후, 5개의 중쇄(VH0(키메라), VH1, VH3, VH4 및 VH5) 및 6개의 경쇄(V_K0(키메라), V_K1 내지 V_K5) 서열이 포유동물 세포에서의 유전자 합성 및 발현을 위해 선택되었다(표 2 참조).
- [0533] 키메라 항체 및 인간화 변이체의 작제
- [0534] 키메라 VH0 및 V_K0 지렌투스맵 서열 및 이의 인간화 변이체는 비변형 인간 IgG1 중쇄(동종이형 G1m 1,17; 지렌투스맵 동종이형과 동등함)(pANT68) 및 카파 경쇄(pANT13.2)에 대한 Abzena의 pANT 발현 벡터 시스템으로 클로닝하기 위한 측면 제한 효소 부위와 함께 합성되었다. VH 영역은 Mlu I과 Hind III 제한 부위 사이에 클로닝되었고 V_K 영역은 BssH II와 BamHI 제한 부위 사이에 클로닝되었다. 모든 작제물은 시퀀싱에 의해 확인되었다.
- [0535] FcRn 소거 돌연변이, H310A 및 H435Q는 인간 IgG1 중쇄(지렌투스맵에 대한 동등한 동종이형)(pANT69) 또는 인간 IgG4(S228P, L235E) 중쇄(pANT70)에 대한 발현 벡터에 위치 지정 돌연변이생성에 의해 삽입되었다. VH0는 IgG4(S228P, L235E)를 인코딩하는 pANT36.2 외에 이 두 벡터에 클로닝되었다.
- [0536] HEK293 EBNA 세포 내 항체의 발현
- [0537] 키메라 지렌투스맵(VH0/V_K0), 2개의 대조군 항체(VH0/V_K1, VH1/V_K0) 및 VH 및 V_K 사슬의 조합(총 20쌍)은 PEI 형질감염 방법을 사용하여 HEK EBNA 세포(LGC Standards, Teddington, UK)에서 일시적으로 IgG1으로 발현되었다. 세포를 형질감염 후 7일 동안 항온처리하였다. 추가로, HEK EBNA 세포를 IgG1(H310A, H435Q) 중쇄 벡터, IgG4(S228P, L235E) 중쇄 벡터 및 IgG4(S228P, L235E H310A, H435Q) 중쇄 벡터에서 키메라 지렌투스맵 VH0 및 V_K0으로 유사하게 형질감염시켰다. 상등액 항체 역가는 ELISA에 의해 결정되었다.
- [0538] 탄산탈수효소 IX에 대한 키메라 및 인간화 변이체 결합의 동역학 분석
- [0539] 모든 지렌투스맵 복합 인간 항체TM 변이체의 결합을 평가하기 위해, 일시적으로 형질감염된 HEK EBNA 세포 배양물의 상등액에 대해 단일 주기 동역학 분석을 수행하였다. 동역학 실험은 바이어코어 T200 Control 소프트웨어 V2.0.1 및 평가 소프트웨어 V3.0을 실행하는 바이어코어 T200(일련 번호 1909913)(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)으로 수행하였다. 모든 단일 주기 동역학 실험은 HBS-P+ 실행 완충액(pH 7.4)(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)을 사용하여 25°C에서 실행하였다. 직접적인 비교를 위해 모든 항체는 단백질 G 칩(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)에 포획되었다.
- [0540] 항체는 ELISA 역가에 의해 평가된 농도를 기반으로 0.5 µg/ml의 최종 농도로 실행 완충액 중에 희석하였다. 각 주기가 시작될 때 항체는 단백질 G 칩(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)의 Fc2, Fc3 및 Fc4에 로딩하였다. IgG는 10 µl/분의 유속으로 포획되어 약 79 RU의 고정 수준(RL), 이론적 값은 약 50 RU의 R_{max}를 수득하

였다. 그 다음, 표면이 안정화되도록 하였다. 단일 주기 동역학 데이터는 잠재적인 질량 수송 제한을 최소화하기 위해 30 μ l/분의 유속에서 탄산탈수효소 IX(CAIX, Stratech, Newmarket, UK)를 분석물질로 사용하여 수득하였다. 기준 키메라 항체(VH0/V κ 0 IgG1)를 사용한 다중 반복을 수행하여 동역학 주기에 걸쳐 표면 및 분석물의 안정성을 확인하였다. 기준 표면에 대한 비특이적 결합의 차이를 보정하기 위해 Fc2, Fc3 및 Fc4의 신호에서 기준 채널 Fc1(항체 없음)의 신호를 차감하였다. 각 농도 사이에 재생하지 않고 3.125 nM에서 25 nM CAIX까지의 4점, 2배 희석 범위를 사용하였다. 증가하는 농도로 CAIX를 4회 주입하는 것에 대한 회합 단계는 매번 200초 동안 모니터링하였고 단일 해리 단계는 CAIX를 마지막 주입한 후 300초 동안 측정하였다. 단백질 G 표면의 재생은 10 mM 글리신-HCL (pH 1.5)의 주입에 이어 0.5% P20을 포함하는 10 mM 글리신-HCL(pH 1.5)를 주입하여 수행하였다.

[0541] 상대적 KD의 계산에 사용된 기준 키메라(VH0/V κ 0 IgG1)로 변이체를 분석하였다. 표면 안정성의 차이를 보정하기 위해 각 항체 블랭크 실행시 신호를 차감하였다. 단일 주기 동역학 데이터로 모든 인간화 변이체가 기준 키메라 항체의 2배 내에서 CAIX에 결합하는 것을 입증하였고, VH5 및/또는 V κ 5를 포함하는 것을 제외하고 이들 변이체가 CAIX에 대해 더 낮은 친화도를 나타냈다.

[0542] 키메라 및 리드 인간화 항체의 정제

[0543] 6개의 IgG1 리드 항체, VH3/V κ 2, VH3/V κ 3, VH3/V κ 4, VH4/V κ 2, VH4/V κ 3 및 VH4/V κ 4를 인간성과 단일 주기 동역학 데이터를 기반으로 정제하였다. 키메라 IgG1 항체, 리드 인간화 IgG1 항체 및 키메라 IgG4(S228P, L235E) 항체를 단백질 A 세파로스 컬럼(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)을 사용하여 세포 배양 상청액에서 정제하였다. 키메라 IgG1(H310A, H435Q) 및 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q) 항체를 HiTrapTM Protein G HP 컬럼(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)을 사용하여 세포 배양 상청액에서 정제하였으며, H310A H435Q 이중 돌연변이는 일부 단백질 A 수지에 대한 결합에 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 모든 항체를 pH 7.2의 1x PBS 완충액으로 교환하고 예측된 아미노산 서열을 기반으로 하는 흡광 계수(Ec(0.1%))를 사용하여 OD280nm로 정량화하였다. 2 μ g 로딩된 항체의 SDS-PAGE를 환원시켜 항체를 분석하였고, 전형적인 항체의 프로파일에 상응하는 밴드를 관찰하였다.

[0544] 키메라 및 리드 항체의 다중 주기 동역학 분석

[0545] 바이어코어(Biacore) T200 평가 소프트웨어 V3.0.1을 실행하는 바이어코어 T200(일련 번호 1909913) 기기(Uppsala, Sweden)를 사용하여 정제된 키메라 항체 및 6개의 리드 IgG1 항체에 대해 다중 주기 동역학 분석을 수행하여 탄산탈수효소 IX에 대한 정확한 친화도를 확립하였다. 정제된 항체를 HBS-P+ 중 1 μ g/ml의 농도로 희석하였다. 각 주기가 시작될 때 각 항체는 단백질 G 표면에 포획되어 약 79RU의 RL을 수득하였다. 포획 후, 표면이 안정화되도록 하였다. 임의의 잠재적인 물질 전달 효과를 최소화하기 위해 30 μ l/분의 유속을 사용하여 동역학 데이터를 수득하였다. 동역학 분석을 위해 탄산탈수효소 IX(CAIX)를 사용했다. 동역학 주기에 걸쳐 표면 및 분석물 둘 다의 안정성을 확인하기 위해 블랭크(CAIX)의 다중 반복 및 단일 농도의 분석물의 반복이 동역학 실행에서 프로그래밍되었다. 동역학 분석을 위해 50 nM에서 0.078 nM CAIX까지 2배 희석 범위를 선택했다. CAIX의 회합 단계는 280초 동안 모니터링하였고 해리 단계는 300초 동안 모니터링하였다. 단백질 G 표면의 재생은 10 mM 글리신-HCL (pH 1.5)의 주입에 이어 0.5% P20을 포함하는 10 mM 글리신-HCL(pH 1.5)를 주입하여 수행하였다. 기준 채널 Fc1의 신호를 Fc2, Fc3 및 Fc4의 신호에서 차감하여 기준 표면에 대한 비특이적 결합의 차이를 보정하고 전역 Rmax 매개변수를 1:1 결합 모델에 사용하였다. 상대적 KD는 인간화 변이체의 KD를 동일한 칩에 있는 키메라 항체의 KD로 나누어 계산하였다. 상이한 IgG 백본 상의 모든 리드 인간화 IgG1 변이체 및 키메라 항체는 키메라 IgG1 항체의 2배 내의 상대적 KD를 보여주었다.

[0546] 탄산탈수효소 IX 경쟁 ELISA

[0547] 상이한 IgG 불변 도메인(IgG1, IgG1(H310A, H435Q), IgG4(S228P, L235E) 및 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q)으로 발현되는 리드 정제된 IgG1 변이체 및 키메라 항체는 비오틴화(Innova Biosciences, Cambridge, UK의 비오틴화 키트) 키메라 지렌톡시맵 IgG1에 대한 경쟁을 사용하여 CAIX에 대한 결합에 대해 시험하였다. 관련이 없는 인간 IgG1 항체는 CAIX에 대한 결합에 대한 음성 대조군으로 시험하였다.

[0548] CAIX를 1x PBS 중에 0.5 μ g/ml로 희석하고 100 μ l/웰을 96웰 ELISA 플레이트에서 4°C에서 밤새 코팅하였다. 다음 날, 플레이트를 1x PBS/0.05% Tween(PBST)으로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 2% BSA/PBS 200 μ l로 차단했다. 96웰 희석 플레이트에서, 고정된 농도의 비오틴화된 지렌톡시맵 키메라 IgG1 항체(0.3 μ g/ml 최종 농도)를 3배 적정 시리즈의 시험 항체(20 μ g/ml를 시작 농도로 하여 차단 완충액에 희석함(최종 농도는 10 μ

g/ml))에 동일한 부피로 첨가하였다.

- [0549] 플레이트를 PBS-T로 3회 세척한 후, 100 μ l의 키메라/시험 항체 혼합물을 ELISA 플레이트에 첨가하였다.
- [0550] 실온에서 1시간 배양한 후, 플레이트를 PBS-T로 3회 세척하고 PBS-T에 1:1000으로 희석한 100 μ l의 스트렙타빈 딘-퍼옥시다제 접합 이차 항체(Sigma, Dorset, UK)를 실온에서 1시간 동안 적용하여, 결합된 비오틴화된 지렌 특시맵 키메라 IgG1 항체를 검출하였다. 발색을 위해 플레이트를 PBS-T로 3회 세척한 후 100 μ l의 TMB 기질을 첨가하고 실온에서 약 5분 동안 배양하였다. 50 μ l의 3.0 M 염산으로 반응을 중단하고 450 nm에서 다이넥스 (Dynex) 플레이트 판독기를 사용하여 흡광도를 즉시 판독하였다.
- [0551] 각 변이체에 대한 IC₅₀ 값을 계산하였고 상대적 IC₅₀ 값은 인간화 변이체의 IC₅₀을 동일한 플레이트에서 분석된 지렌특시맵 키메라 IgG1 항체의 IC₅₀으로 나누어 계산하였다. 상이한 백본에 있는 모든 리드 인간화 변이체 및 키메라 항체는 지렌특시맵 키메라 IgG1 항체의 2배 이내에서 IC₅₀ 값을 나타냈다.
- [0552] 생성된 모든 데이터(iTope™ 분석, 인간성 백분율, 다중 주기 동역학 데이터 및 경쟁 ELISA 데이터를 포함함)를 분석하여, VH3/V κ 4, VH4/V κ 3 및 VH4/V κ 4의 3가지 항체가 IgG1, IgG1(H310A, H435Q) 및 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q)로서 추가 발현 및 분석을 위한 리드로 선택되었다.
- [0553] CHO 세포에서 리드 인간화 지렌특시맵 항체의 발현
- [0554] 위에서 설명한 바와 같이 중쇄 가변 도메인을 Fc 무효 벡터 pANT69(IgG1(H310A, H435Q)) 및 pANT70(IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q))에 클로닝하였다.
- [0555] 키메라(VH0/V κ 0), VH3/V κ 4, VH4/V κ 3 및 VH4/V κ 4는 MaxCyte STX® 전기천공 시스템(MaxCyte Inc., Gaithersburg, USA)을 사용하여 상응하는 플라스미드로 FreeStyle™ CHO-S 세포를 일시적 형질감염 (ThermoFisher, Loughborough, UK)시킨 후 IgG1, IgG1(H310A, H435Q) 및 IgG4(S228, L235E, H310A, H435Q)로 발현되었다(총 12개의 조합). 세포를 회수한 후, 8 mM L-글루타민(ThermoFisher, Loughborough, UK) 및 1 x 하이포잔틴-티미딘(ThermoFisher, Loughborough, UK)를 포함하는 CD Opti-CHO 배지(ThermoFisher, Loughborough, UK)에서 3 x 10⁶ 세포/ml로 세포를 희석하였다. 형질감염 24시간 후, 배양 온도를 32℃로 낮추고 1 mM 부티르산나트륨(Sigma, Dorset, UK)을 첨가하였다. 배양물은 1일째에 30% CD Efficient Feed B(ThermoFisher, Loughborough, UK) 및 3.3% FunctionMAX™ TiterEnhancer(ThermoFisher, Loughborough, UK)로, 그리고 7일째에 15% CD Efficient Feed B(ThermoFisher, Loughborough, UK) 및 1.65% FunctionMAX™ TiterEnhancer(ThermoFisher, Loughborough, UK) (시작 배양 부피를 기준으로 한 백분율)로 급식하였다. IgG 상청액 역가를 IgG ELISA에 의해 모니터링하고 형질감염된 세포를 상청액을 수거하기 전에 최대 14일 동안 배양 하였다.
- [0556] 상이한 IgG로 발현되는 키메라 및 리드 인간화 항체의 정제
- [0557] 키메라(VH0/V κ 0), VH3/V κ 4, VH4/V κ 3 및 VH4/V κ 4 IgG1 항체와 VH4/V κ 4 IgG4(S228P, L235E) 항체를 단백질 A 세파로스 컬럼을 사용하여 세포 배양 상청액에서 정제하였다. IgG1(H310A, H435Q) 및 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q)로 발현되는 키메라(VH0/V κ 0), VH3/V κ 4, VH4/V κ 3 및 VH4/V κ 4를 단백질 G 컬럼을 사용하여 정 제하였다. 정제된 항체를 상기 요약된 바와 같이 처리하였다. 2 μ g 로딩된 항체의 SDS-PAGE를 환원시켜 항체 를 분석하였고, 전형적인 IgG의 프로파일에 상응하는 밴드를 관찰하였다.
- [0558] 상이한 IgG로 발현되는 키메라 및 리드 인간화 항체의 다중 주기 동역학 분석
- [0559] 바이어코어 T200 평가 소프트웨어 V3.0.1을 실행하는 바이어코어 T200(일련 번호 1909913) 기기(Uppsala, Sweden)를 사용하여 다양한 IgG 백본에 있는 키메라(VH0/V κ 0), VH3/V κ 4, VH4/V κ 3 및 VH4/V κ 4 항체에 대해 다중 주기 동역학 분석을 수행하여 탄산탈수효소 IX에 대한 정확한 친화도를 확립하였다. 다중 주기 동역학은 섹션 2.7에 설명된 대로 수행하였다. VH0/V κ 0 IgG1은 각 실행의 Fc2에 대한 참조로 실행되었다. 상대적 KD는 인간화 변이체의 KD를 동일한 칩에 있는 키메라 항체의 KD로 나누어 계산하였다. 3개의 모든 IgG 백본에서 리 드 변이체는 동일한 IgG 백본을 가진 VH0/V κ 0의 2배 이내에서 모두 결합한다.
- [0560] 결론 및 논의
- [0561] 4개의 인간화 VH 영역 및 5개의 인간화 V κ 영역(복합 인간 항체™ 기술을 사용하여 설계됨)과 함께 지렌특시맵

항체의 V 영역 유전자를 IgG1(지렌톡시맙과 동일한 동종이형) 중쇄 및 카파 경쇄 벡터에 클로닝하였다. 키메라 (VH0/Vκ0)는 돌연변이 H310A 및 H435Q가 FcRn 결합을 소거하는 VH 벡터 IgG1(H310A, H435Q) 및 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q)에 추가로 클로닝되었다.

[0562] HEK293 EBNA 세포로 일시적으로 형질감염된 항체는 단일 주기 바이어코어 분석에 의해 CAIX에 대한 결합을 시험하였다. 6개의 IgG1 리드 항체(VH3/Vκ2, VH3/Vκ3, VH3/Vκ4, VH4/Vκ2, VH4/Vκ3 및 VH4/Vκ4)는 발현 수준 및 단일 주기 동역학 데이터를 기반으로 식별되었다. 바이어코어 다중주기 분석 및 경쟁 ELISA에 의해 시험된 정제 리드는 IgG1 키메라 항체의 2배 내에서 결합하는 것으로 나타났다.

[0563] iTope™ 분석, 인간성 비율, 다중 주기 동역학 데이터 및 경쟁 ELISA 데이터를 기반으로 6개의 리드가 3개; VH3/Vκ4, VH4/Vκ3 및 VH4/Vκ4로 좁혀졌다. 이 3가지 리드 변이체를 재클로닝하고 항체를 3가지 상이한 백본(IgG1, IgG1(H310A, H435Q) 및 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q))상의 CHO-S 세포에서 일시적으로 발현시켰다. 모든 항체를 정제한 다음 바이어코어 다중 주기 동역학 분석으로 시험하였다. 3개의 모든 IgG 백본에서 리드 인간화 변이체는 동일한 IgG 백본과 VH0/Vκ0의 2배 내에서 모두 결합하는 것으로 나타났다.

[0564] 실시예 2: PSMA에 결합하기 위한 항체

[0565] 요약

[0566] 2개의 항체인 ANT4044 및 ANT4044-A2에 대한 항체 VH 유전자 서열은, 비변형 IgG1, 돌연변이 H310A 및 H435Q(FcRn 결합 및 단백질 A 결합을 소거함(Andersen 외, 2012))을 보유하는 IgG1 (IgG1 (H310A, H435Q)라고 지칭함) 및 힌지 안정화 S228P 돌연변이(Angal 외, 1993) 및 Fc 사일런스 L235E 돌연변이(Reddy 외, 2000)와 함께 위에 기재된 동일한 FcRn 소거 돌연변이를 가진 변형 IgG4(IgG4 (S228P, L235E, H310A, H435Q)라고 지칭함)를 인코딩하는 3개의 상이한 인간 IgG 이중 발현 벡터로 클로닝된다. 각각의 이중 발현 벡터는 또한 ANT4044 및 ANT4044-A2 둘 다에 공통적인 항체 Vκ 유전자 서열을 포함하였다.

[0567] 총 5개의 항체를 일시적으로 형질감염시키고 CHO 세포에서 발현시키고 단백질 A(ANT4044-A2 IgG1) 또는 단백질 G(IgG1(H310A, H435Q) 및 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q) 둘 다로서 ANT4044 및 ANT4044-A2 둘 다)를 사용하여 정제하였다. 친화성 크로마토그래피에 이어 예비 크기배제 크로마토그래피(SEC)를 수행하였다.

[0568] 항체 무결성은 바이어코어에 의한 SDS-PAGE, 분석학적 SEC, 열 안정성 및 PSMA에 대한 항원 결합으로 평가하였다. 바이어코어 단일 주기 분석을 사용하여 인간 Fc 감마 수용체의 패널(FcγR11A176F, FcγR11A176V, FcγR11B, FcγR11A167R, FcγR11A167H, FcγR11B, FcγR1) 뿐만 아니라 신생아 수용체 FcRn에 대해 추가 테스트를 수행하였다.

[0569] 방법 및 결과

[0570] 항체-발현 플라스미드의 작제

[0571] 인간화 항체 ANT4044 및 친화성 성숙 인간화 항체 ANT4044-A2의 VH 및 Vκ 서열을 사용하여 IgG1 (pANT18), IgG1 (H310A, H435Q) (pANT71) 및 IgG4 (S228P, L235E, H310A, H435Q) (pANT73)에 대한 pANT 이중 발현 벡터로 클로닝하기 위한 측면 제한 효소 부위가 있는 DNA 단편을 생성하였다. 각 이소형(isotype) 벡터 내의 VH 영역을 Mlu I 및 Hind III 제한 부위 사이에 클로닝하였고 Vκ 영역을 Pte I 및 BamHI 제한 부위 사이에 클로닝하였다. 5개의 모든 작제물은 DNA 시퀀싱으로 확인하였다.

[0572] 항체의 일시적인 발현

[0573] 5가지 항체 작제물에 상응하는 내독소가 없는(Endotoxin-free) DNA를 제조하고 MaxCyte STX® 전기천공 시스템(MaxCyte Inc., Gaithersburg, USA)을 사용하여 CHO-S 세포(ThermoFisher, Loughborough, UK)에 일시적으로 형질감염시켰다. 세포를 회수한 후, 8 mM L-글루타민(ThermoFisher, Loughborough, UK) 및 1x 하이포잔틴-티미딘(ThermoFisher, Loughborough, UK)를 포함하는 CD Opti-CHO 배지(ThermoFisher, Loughborough, UK)에서 3×10^6 세포/ml로 세포를 희석하였다. 형질감염 24시간 후, 배양 온도를 32°C로 낮추고 1 mM 부티르산나트륨(Sigma, Dorset, UK)을 첨가하였다.

[0574] 배양물에게 3.6%(시작 부피 중) 사료(2.5% CHO CD Efficient Feed A(ThermoFisher, Loughborough, UK), 0.5% Yeastolate(BD Biosciences, Oxford, UK), 0.25mM Glutamax(ThermoFisher, Loughborough, UK) 및 2 g/L 포도당(Sigma, Dorset, UK))를 첨가하여 매일 급식하였다. IgG 상청액 역가를 IgG ELISA에 의해 모니터링하고 형질

감염된 세포를 상청액을 수확하기 전에 최대 14일 동안 배양하였다.

[0575] *항체 정제*

[0576] 세포 배양 상청액을 단백질 A(ANT4044-A2 IgG1) 또는 단백질 G(IgG1(H310A, H435Q) 및 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q) 둘 다로서 ANT4044 및 ANT4044-A2 둘 다) 세파로스 컬럼(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)에 통과시켰다. 모든 항체를 pH 7.2의 1x PBS 완충액으로 교환하였다. 단백질 A 또는 단백질 G 정제 물질을 이동상으로 1x PBS를 사용하여 HiLoad™ 26/600 Superdex™ 200 pg 분취 SEC 컬럼(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)에서 실행했으며, 그 동안 단량체 분획을 수집하고, 모아서 여과멸균하였다. SEC 프로파일은 항체, 특히 ANT4044-A2가 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q)로 발현되었을 때 다른 IgG 이소형으로 발현된 항체와 비교하여 더 큰 수준의 응집(최대 22%)을 나타냈다는 것을 보여주었다.

[0577] 항체는 OD280nm를 측정하고 예측된 아미노산 서열을 기반으로 하는 흡광 계수(Ec(0.1%))를 사용하여 정량화하였다.

[0578] *분석학적 SEC 및 SDS-PAGE*

[0579] 스톱 ANT4044 IgG1 및 단백질 A 또는 단백질 G에 이어 예비 SEC 정제 물질을 Superdex™ 200 Increase 10/300 GL 분석 컬럼(GE Healthcare, Little Chalfont, UK) 및 1x PBS를 이동상으로 사용하여 분석학적 SEC에 의해 분석하였다. 용출 프로파일은 올바르게 폴딩된 단량체 종의 IgG에 대해 일반적이었다. 항체를 또한 비환원 및 환원 SDS-PAGE으로 분석하였다. VH 및 VK 사슬의 예측된 크기에 해당하는 밴드가 관찰되었다.

[0580] *열안정성 분석*

[0581] 스톱으로부터 ANT4044 IgG1과 함께 5개의 정제된 항체의 열안정성을 평가하기 위해, 형광-기반 열 이동 검정을 사용하여 용융 온도(단백질 도메인의 50%가 언폴딩되는 온도)를 결정하였다. 모든 항체를 SYPRO® Orange(ThermoFisher, Loughborough, UK)를 포함하는 1x PBS 중 100 µg/ml의 작업 농도로 희석하고 25°C에서 99°C까지의 온도 구배로 StepOnePlus 실시간 PCR 시스템(ThermoFisher, Loughborough, UK)을 56분 동안 수행하였다. 단백질 열안정성 소프트웨어(버전 1.2)를 사용하여 용융 곡선을 분석하고 1차 미분 데이터를 기반으로 Tm을 계산하였다.

[0582] ANT4044와 ANT4044-A2 둘 다에서 IgG1 백본이 둘 다 69.3°C의 최저 융점을 보이며 가장 열적으로 안정한 것으로 나타났다. 다른 IgG 백본을 비교할 때 ANT4044는 ANT4044-A2와 비교하여 더 큰 열 안정성을 나타내었다.

[0583] *PSMA에 대한 결합의 평가*

[0584] 전립선-특이적 막 항원(PSMA)에 대한 결합을 평가하기 위해 정제된 각각의 항체에 대해 다중-주기 동역학 분석을 수행하였다. 바이어코어 T200 평가 소프트웨어 V3.0.1을 실행하는 바이어코어 T200(일련 번호 1909913) 기기(Uppsala, Sweden)를 사용하여 분석을 수행하였다. 직접적인 비교를 위해 모든 항체는 단백질 G 칩(GE healthcare, Uppsala, Sweden)에 포획되었다.

[0585] 정제된 항체를 HBS-EP+ 중 1 µg/ml의 농도로 희석하였다. 각 주기가 시작될 때 각 항체는 단백질 G 표면에 포획되어 약 50 RU의 RL을 제공했다. 포획 후, 표면이 안정화되도록 하였다. 임의의 잠재적인 물질 전달 효과를 최소화하기 위해 35 µl/분의 유속을 사용하여 동역학 데이터를 획득하였다. 동역학 분석을 위해, PSMA(R&D Systems, Minneapolis, U.S.A)를 사용하였다. 동역학 주기에 걸쳐 표면 및 분석물 둘 다의 안정성을 확인하기 위해 블랭크(PSMA)의 다중 반복 및 단일 농도의 분석물의 반복이 동역학 실행에서 프로그래밍되었다. 동역학 분석을 위해 25 nM에서 1.5625 nM PSMA까지 2배 희석 범위를 선택했다. PSMA의 회합 단계는 600초 동안 모니터링하였고 해리 단계는 2400초 동안 모니터링하였다. 각 주기의 마지막에 0.5% P20를 포함하는 10 mM 글리신-HCl pH 1.5를 2회 주입하여 단백질 G 표면의 재생을 수행하였다.

[0586] 기준 채널 Fc1의 신호를 Fc2, Fc3 및 Fc4의 신호에서 차감하여 기준 표면에 대한 비특이적 결합의 차이를 보정하고 전역 Rmax 매개변수를 1:1 결합 모델에 사용하였다. 상대적 KD는 각 항체의 KD를 동일한 칩에 있는 ANT4044 IgG1의 KD로 나누어 계산하였다.

[0587] *인간 FcRn에 대한 결합의 평가*

[0588] FcRn에 대한 정제된 항체의 결합은 바이어코어 T200 평가 소프트웨어 V3.0.1을 실행하는 바이어코어 T200(일련 번호 1909913) 기기(Uppsala, Sweden)를 사용하여 정상 상태 친화도 분석으로 평가하였다. FcRn (Sino

Biological, Beijing, China)을 300 RU인 표준 아민 커플링을 사용하여 pH 5.5의 아세트산나트륨 중 10 μ g/mL로 CM5 칩에 코팅하였다.

[0589] 정제된 항체를 pH 6.0 또는 pH 7.4에서 0.05% P20을 포함하는 PBS 중 37 nM에서 3000 nM으로 5점 희석으로 적정하였다. 항체를 30 μ l/분의 유속 및 25°C에서 증가하는 농도로 칩에 통과시켰다. 주입 시간은 30초, 해리 시간은 100초였다. 단일 해리 후, 칩은 0.1 M Tris pH 8.0으로 재생하였다.

[0590] 예상한 바와 같이, H310A H435Q 돌연변이는 pH 6.0에서 FcRn에 대한 항체 결합을 유의하게 감소시켰다. 비변형 IgG1으로 시험된 ANT4044 및 ANT4044-A2 항체 둘 다는 pH 6.0에서 FcRn에 대해 유사한 친화도를 나타내었다. pH 7.4에서 임의의 항체에 대한 결합은 거의 관찰되지 않았다.

[0591] **인간 Fc 감마 수용체에 대한 결합 평가**

[0592] 고친화성 및 저친화성 Fc 감마 수용체에 대한 정제된 항체의 결합은 30 μ l/분의 유속으로 실행되는 바이어코어 T200 평가 소프트웨어 V3.0.1을 실행하는 바이어코어 T200(일련 번호 1909913) 기기(Uppsala, Sweden)를 사용하여 단일 주기 분석으로 평가하였다. 인간 Fc 수용체인 Fc γ RI, Fc γ RIIa(167R 및 167H 다형성 모두), Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa(176F 및 176V 다형성 모두) 및 Fc γ RIIIb는 시노 바이오로지컬(Sino Biological, Beijing, China)에서 입수하였다. 표준 아민 화학을 사용하여 히스캡처 키트(Hiscapture kit)(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)를 사용하여 미리 커플링된 CM5 센서 칩에서 Fc γ R을 포획하였다.

[0593] 각 주기가 시작될 때, HBS-P+에 희석된 His 태그가 붙은 Fc 감마 수용체를 특정 RU 수준으로 로딩하였다. 각 농도 사이에 재생이 없는 5점, 3배 희석 범위의 항체를 각 수용체에 사용하였다. 모든 경우에서, 해리 후 pH 1.5의 글리신을 2회 주입하여 칩을 재생시켰다. 기준 채널 Fc1(블랭크)의 신호는 기준 표면에 대한 비특이적 결합의 차이를 보정하기 위해 수용체가 로딩된 Fc의 신호에서 차감되었다.

[0594] 고친화성 Fc 감마 수용체 Fc γ RI 및 저친화성 Fc 감마 수용체에 대한 정상 상태 결합에 의해 1:1 동역학에 대한 센서그램을 분석하였다. 대표적인 센서그램

[0595] 비변형 IgG1으로 발현된 ANT4044 및 ANT4044-A2는 모든 고친화성 및 저친화성 인간 활성화 Fc γ 수용체에 결합하였다. 저친화성 인간 Fc γ 수용체에 대한 결합이 약간 더 낮아지는 사소한 경향이 관찰되었으나, IgG1 내 H310A 및 H435Q 돌연변이의 도입은 상기 결합에 영향을 주지는 않았다. 예상한 바와 같이, IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q) 항체는 모든 활성화 Fc γ 수용체에 대해 현저히 감소된 결합을 나타내었다. 시험된 모든 항체는 억제 수용체 Fc γ RIIb에 대한 낮은 친화도 결합을 나타내었다. 따라서, IgG1 및 IgG1(H310A, H435Q) 둘 다는 잠재적으로 이펙터 기능을 자극할 수 있는 반면, IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q)는 이펙터 기능을 자극할 가능성이 없다.

[0596] **결론**

[0597] 인간화 항-PSMA 항체 ANT4044 및 이의 친화성 성숙 변이체 ANT4044-A2에 상응하는 가변 중쇄 및 경쇄 서열을 비변형 인간 IgG1, 돌연변이 H310A 및 H435Q(FcRn 결합을 소거함)를 갖는 인간 IgG1, 또는 인간 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q)을 인코딩하는 이중 발현 벡터로 클로닝하였다. CHO 세포를 일시적으로 형질감염시키고 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피 및 예비 SEC에 의해 5개의 항체를 정제하였다. 분석학적 SEC를 수행하여 응집의 증거가 거의 없는 단량체 IgG와 일치하는 프로파일을 밝혀냈다. ANT4044 IgG1(스톡으로부터)을 포함한 모든 항체는 열안정성 및 PSMA, 인간 FcRn 및 인간 Fc γ 수용체에 대한 결합 측면에서 특성화되었다.

[0598] ANT4044 및 ANT4044-A2 둘 다의 경우, IgG1 백본이 가장 열적으로 안정한 것으로 나타난 반면, ANT4044 항체는 ANT4044-A2 항체와 비교하여 더 큰 열 안정성을 나타냈다. IgG1(H310A, H435Q) 및 IgG4(S228P, L235E, H310A, H435Q) 형식 둘 다의 모든 항체는 비변형 IgG1로 발현되는 대응물로서 PSMA에 유사한 결합을 나타냈다. 친화성 성숙 ANT4044-A2 항체는 ANT4044와 비교하여 PSMA에 대해 2-3배 더 큰 친화도를 보여주었다.

[0599] pH 6.0에서 FcRn에 대한 결합은 H310A, H435Q 돌연변이의 도입에 의해 상당히 감소된 반면, pH 7.4에서 FcRn에 대한 결합은 임의의 항체에서 거의 관찰되지 않았다.

[0600] 인간 Fc γ 수용체에 대한 항체 결합을 분석하여 IgG4 (S228P, L235E, H310A, H435Q)로 발현되는 항체에서 L235E 돌연변이에 의한 결합의 소거를 확인하였다. 돌연변이 H310A 및 H435Q는 인간 Fc γ 수용체에 대한 항체의 결합에 유의한 영향을 미치지 않았으므로, IgG1 및 IgG1(H310A, H435Q) 둘 다는 유사한 이펙터 기능 특성을 나타낼 것으로 예상된다.

[0601] 실시예 3: 항체의 접합

[0602] 항체 ANT4044-IgG1, ANT4044-A2-IgG1, ANT4044-IgG1 H310A H435Q(일명 ANT4044-IgG1-2M) 및 ANT4044-IgG4 S228P L235E H310A H435Q(일명 ANT4044-IgG4-4M)를 ThioBridge™-PEG(6u)-DOTA 시약 또는 NHS-DOTA 시약에 접합하였다.

[0603] ThioBridge™는 PolyTherics의 독점적인 이황화 접합 링커이며 DOTA는 킬레이터 페이로드, 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노 아마이드이다.

[0604] ThioBridge™ DOTA 접합 평가: ANT4044-IgG1은 반응 완충액(20 mM 인산나트륨, pH 7.5, 150 mM NaCl, 20 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)) 중 6-10 mg/mL 용액으로 제조되었다. 반응 완충액(6-10 mg/mL, 40℃) 중 ANT4044-IgG1에 항체 또는 DTT 10 mM 당 6-10 당량의 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)을 첨가하였다. 항체 농도를 반응 완충액으로 희석하여 5 mg/mL로 조정하였다. 환원 혼합물을 37-40℃에서 1시간 동안 배양하였다. 시약을 첨가하기 전에 환원 혼합물을 22℃로 냉각시켰다. 아세토니트릴 중 ThioBridge™-PEG(6u)-DOTA 5.6-8 당량을 혼합물에 첨가하고, 이를 반응 완충액으로 4 mg/mL로 추가 희석하였다. 혼합물 중 아세토니트릴의 백분율은 5%이었다. 반응 혼합물을 22℃에서 최대 22시간 동안 배양하였다. 완충액 교환 및 여분의 시약 제거를 비바스핀(Vivaspin) 20 필터(30 kDa MWCO, PES 멤브레인, Generon)를 사용하여 14,000 rcf에서 초원심분리에 의해 수행하였다. 시료를 비바스핀 20 필터(30 kDa MWCO, PES 멤브레인, Generon)를 사용하여 pH 7.2-7.5의 둘베코 PBS 완충액으로 7 내지 9회 교환하였다. 항체-ThioBridge™ DOTA 접합체 농도를 UV-vis로 측정하고 pH 7.2-7.5의 둘베코-PBS를 사용하여 4.0 mg/mL로 보정하고, 멸균 여과(0.22 µm 셀룰로오스 아세테이트 필터)한 다음, -80℃에서 보관하였다.

[0605] 라이신-DOTA 접합 평가: ANT4044-IgG1은 0.1M NaHCO₃ 및 20 mM 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), pH 8-9 (반응 완충액) 중 6 mg/mL 용액으로 제조되었다. 다음으로, pH 7.2-7.5의 둘베코(Dulbecco)의 PBS 완충액 5.0 mg/mL 중 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노-N-하이드록시숙신이미드 에스테르 헥사플루오로포스페이트 트리플루오로아세테이트 염(NHS-DOTA 시약)을 제조하였다. 10-25 당량의 NHS-DOTA 시약 용액을 가하고 반응 완충액을 추가하여 항체 농도를 4.0 mg/mL로 보정하였다. 2-3시간 동안 22℃에서 배양하였다. 다음으로, pH 5.5(4:1 v/v)의 0.2M 아세트산나트륨을 첨가하여 퀀칭(quenching)하고 비바스핀 20 필터(30kDa MWCO, PES 멤브레인, Generon)를 사용하여 14,000 rcf에서 초원심분리하였다. 희석 및 초원심분리를 2배 더 반복하였다. 이후, 완충액을 비바스핀 20 필터(30 kDa MWCO, PES 멤브레인, Generon)를 사용하여 pH 7.2-7.5인 둘베코의 PBS로 4회 교환하였다. 항체-DOTA 접합체 농도를 UV-vis로 측정하고 둘베코-PBS pH 7.2-7.5를 사용하여 4.0 mg/mL로 보정하고, 멸균 여과(0.22 µm 셀룰로오스 아세테이트 필터)한 다음, -80℃에서 보관하였다. 적절한 접합 조건을 확인하기 위해 소규모 반응 및 정제가 먼저 수행되었다. 분석학적 SEC 및 분석 LC-MS 방법은 존재하는 접합의 정도, 순도 및 잔류 시약을 확인하기 위해 전개되었다. 접합은 두 시약 모두에 효과적인 것으로 밝혀졌다. 두 시약 모두 접합 중 또는 접합 후에 응집을 일으키지 않았다. 라이신 접합체는 다양한 범위로 상이하게 로딩된 DOTA 중을 나타내고 ThioBridge™ 접합체보다 LC-MS 분석에 더 많은 양을 필요로 하였다. 시험한 모든 시료는 LC-MS에 의해 평균 DAR이 4.0~4.2 (ThioBridge™ 접합체)이고 평균 DAR이 3.8 내지 4.9 (라이신 접합체)인 것으로 나타났다.

[0606] 실시예 4: CAIX에 결합하는 항체의 약동학적 분석

[0607] 본 발명의 다양한 항체의 약동학적 (PK) 특성을 마우스 모델인 B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ에서 결정하였다.

[0608] B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ 마우스 (Tg32)는 인간 내인성 FcRn 프로모터에 의해 구동되는 이식유전자를 통해 FcRn(hFcRn) 발현을 위해 인간화된다. 공개된 조직 FcRn 발현 및 인간 IgG PK 데이터는 인간 환자 데이터와 밀접하게 유사하며, 인간 IgG PK 분석에 대해 최고 기준 역할을 하는 비인간 영장류의 데이터보다 인간 데이터와의 상관관계가 더 높다. 이 PK 연구에 사용된 Tg32 마우스는 Tg(FCGRT)32Dcr 이식유전자에 대해 반접합체이므로 항체-hFcRn 친화도 차이를 측정할 수 있는 중간 범위에서 항체 반감기가 차선으로 최대화되도록 한다.

[0609] 다음 항체의 약동학이 결정되었다: 키메라 지렌톡시맵(ChGmAb), 인간화 지렌톡시맵(HuGmAb), FcRn 결합 도메인

에 아미노산 치환을 포함하는 인간화 지렌톡시맵(HuGmAb-FcRn), 및 FcRn 결합 및 Fc 감마 수용체 결합 도메인에 아미노산 치환을 포함하는 인간화 지렌톡시맵 (HuGmAb-FcRg).

[0610] 방법

[0611] 각각의 항체를 5 ml/kg의 부피에 5 mg/kg으로 Tg32 반접합 마우스에 정맥내 투여하였다.

[0612] a) 생체 내(*In Vivo*) 연구 설계

[0613] i) Tg32 마우스는 표 1에 설명된 대로 그룹당 6마리의 마우스가 있는 4개의 그룹으로 분배할 것이다.

[0614] ii) 모든 마우스의 무게를 측정하고 예비 출혈로 기능하기 위해 시간 0에서 화합물 투여 1일 전에 항응고제로 K3EDTA를 사용하여 25 μ L 혈액 시료를 수집하였다. 작은 직경의 모세관(Drummond #1-000-0250)을 사용하여 안와후동에서 혈액을 수집하고 혈액 시료를 혈장으로 처리하였다. 10 마이크로리터의 혈장 시료를 저장 완충액(PBS 중 50% 글리세롤)으로 1/10로 희석하고 특수 96웰 저장 플레이트에서 급속 동결한 다음, -20°C에서 저장하였다.

[0615] iii) 0시간에, 시험 용품을 5 ml/kg의 용량 부피에 5 mg/kg으로 Tg32 마우스에 IV 주입하여 투여하였다.

[0616] iv) 30분 및 1, 2, 3, 5, 7, 10 및 14일에 출혈 일정에 따라 각 마우스에서 혈액 시료를 수집하였다. 혈액 시료를 전술한 바와 같이 혈장으로 처리하고 저장하였다

[0617] v) 14일의 생체내 실험이 끝나면 연구 시료를 ELISA로 평가하였다.

[0618] 결과

[0619] 도 1A는 시험된 항체의 혈청 반감기를 보여준다. FcRn 결합 부위 또는 FcRn 및 Fc 감마 수용체 결합 부위에 아미노산 치환을 갖는 항체에 대한 항체 반감기가 유의하게 감소하는 결과를 명백히 보여준다.

[0620] **실시예 5: PSMA 결합에 대한 항체의 약동학 분석**

[0621] 실시예 1에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여 하기 항체의 혈청 반감기를 평가하였다: J591 IgG 라이신 DOTA 접합체(PSMA 결합을 위한 대조군 항체), ANT4044 라이신 DOTA 접합체(ANT4044-K-DOTA), ANT4044-A2 라이신 DOTA 접합체(ANT4044-A2-K-DOTA), FcRn 결합 영역에 아미노산 치환이 있는 ANT4044 라이신 DOTA 접합체(ANT4044-FcRn-K-DOTA) 및 FcRn 및 Fc 감마 수용체 결합 영역에 아미노산 치환이 있는 ANT4044 라이신 DOTA 접합체(ANT4044-FcRg-K-DOTA). 이에 대한 결과는 도 1B에 도시되어 있다.

[0622] 도 2는 각 시험 항체에 대한 평균 곡선 아래 면적(AUC, 상단) 및 제거율(CL, 하단)을 보여준다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다.

[0623] **실시예 6: 생체 분포 및 종양 축적 연구**

[0624] 마우스 모델에서 LNCaP 세포에 대한 본 발명의 상이한 항체의 비교 표적화를 정량적으로 분석하여 평가하였다.

[0625] 항체의 방사성 표지 및 TLC 분석.

[0626] 시험 항체는 다음과 같다:

[0627] 1. ANT4044-IgG1+DOTA ("JN005")

[0628] 2. ANT4044-A2-IgG1+DOTA ("JN008")

[0629] 3. ANT4044-IgG1(FcRn)+DOTA ("JN007")

[0630] 4. ANT4044-IgG4(FcRn/FcR감마)+DOTA ("JN006")

[0631] 5. HuJ591 IgG1+DOTA("J591" - PSMA에 대한 결합 대조군)

[0632] 모든 항체는 실온에서 45분 동안 0.1M pH 5.5 암모늄 아세테이트 완충액 중 200배 과량의 생체분자로 ⁶⁴Cu와 함께 배양하였다. 각 용액의 시료를 취하여 50 mM EDTA와 1:1로 혼합하였다. 5 μ L의 각 용액을 TLC 종이(실리카 겔이 함침된 Agilent iTLC-SG 글래스 극세사 크로마토그래피 종이)에 스폿팅하고 50:50 H₂O:에탄올로 실행하였다. 이후, 플레이트를 방사성 동위원소 형광체 스크린을 사용하여 Carestream MSFX 영상화 시스템으로 영상화하였다. 필요한 경우 제조업체 프로토콜에 따라 7K MWCO Zeba 스핀 컬럼(Thermo Scientific)을 사용하여 정

제하여 결합되지 않은 구리를 제거하였다. 모든 시료는 >95% 표지화를 나타내었다.

[0633] 품질 관리를 위해 EDTA에 결합된 Cu-64 및 유리 Cu-64의 용출 거동을 모니터링하기 위해 대조군 실험을 수행하였다.

[0634] 종양 개시 및 성장

[0635] 8주령 수컷 Balb/c 누드 마우스에 100 μ L 인산 완충 식염수 중 5×10^6 LNCaP 세포를 각 마우스 우측면에 피하 주입(27G 바늘)하였다.

[0636] 꼬리 정맥(29G)을 통해 항체 용액을 주입한 다음, Siemens Inveon PET-CT 기기를 사용하여 마우스를 영상화하거나, 꼬리 자르기를 통해 혈액을 수집하고 표시된 시점의 혈액 농도 분석을 위해 감마 계수기를 통해 활성을 측정하였다.

[0637] 영상화 프로토콜

[0638] 폐쇄형 마취 유도실에서 2% 용량의 이소플루란(IsoFlo, Abbott Laboratories)으로 마우스를 마취시켰다. 깊은 마취를 보장하기 위해 안구 및 페달 반사를 사용하여 마우스를 모니터링했다. 마우스가 깊이 마취되면 마취 공기 혼합물(1%)이 노즈콘을 통해 코와 입으로 전달되는 적절한 동물 베드에 놓았다. 동물 모니터링 시스템(BioVet™ 시스템, m2m Imaging, Australia)을 사용하여 모든 실험에 걸쳐 생리학적 모니터링(센서 프로브를 사용한 호흡)을 달성하였다. 항체의 꼬리 정맥 주입 후 Siemens Inveon PET-CT 스캐너를 사용하여 영상을 획득하였다.

[0639] 주입용 주사기에 방사성 동위원소 용액(약 150 μ L)을 채우고 교정 계수가 35인 용량 교정기(Capintec CRC-25)를 사용하여 주사기 내의 활성을 측정하였다. 꼬리 정맥 주입 후 주사기에 남은 활성을 동일한 용량 교정기를 사용하여 측정하고 각 마우스에 주입된 총 부피를 계산하였다.

[0640] 방사선 공급원으로서 일정량의 Cu-64 용액을 포함하는 자체 제작 팬텀으로 PET/CT 스캐너의 보정을 수행하였다.

[0641] 마우스를 스캐너 베드에 위치시키고(자체 개발한 베드를 사용하여 스캔당 n=4) 해부학적 공동 등록을 위해 마이크로-CT 스캔을 획득하였다. 마우스의 CT 영상은 전압을 80 kV로 설정하고 전류를 500 μ A로 설정한 X선 공급원을 통해 획득하였다. 스캔은 낮은 배율과 4의 비닝 계수로 120 개의 회전 단계로 360° 회전을 사용하여 수행하였다. 노출 시간은 106 μ m의 유효 픽셀 크기로 230 ms이었다. CT 영상은 Feldkamp 재구성 소프트웨어(Siemens)를 사용하여 재구성되었다. CT 영상화 후, 30 내지 60분 정적 획득을 사용하여 방사성추적자 주입 후 8 시간, 24 시간 및 48 시간에 PET 스캔을 획득하였다. PET 영상은 OSEM2D(ordered-subset Expectation maximization) 알고리즘을 사용하여 재구성하였으며 CT 및 PET 영상의 융합 및 관심 영역(ROI) 정의를 허용하는 인베온 리서치 워크플레이스(Inveon Research Workplace) 소프트웨어(IRW 4.1)(Siemens)를 사용하여 분석하였다. 각 개별 동물의 CT 및 PET 데이터 세트는 IRW 소프트웨어(Siemens)를 사용하여 정렬되어 관심있는 장기가 양호하게 중첩되는 것을 보장하였다. 3차원 ROI는 심장, 신장, 폐, 방광, 간, 비장, 장 및 종양과 같은 관심있는 모든 장기 뿐만 아니라 전신 내에 배치되었으며 형태학적 CT 정보를 사용하여 장기를 묘사했다. 3D 화소 당 활성은, PET 스캐너 효율성을 설명하기 위해 알려진 Cu-64 활성으로 채워진 원통형 팬텀을 스캔하여 얻은 변환 계수를 사용하여 nci/cc로 변환되었다. 이후, 활성 농도는 주입 용량/g 백분율(%ID/g)로 근사할 수 있는 조직 cm^3 당 감쇠-보정된 주입 활성의 백분율로 표현하였다.

[0642] 그 다음, 혈액에서 검출된 활성에 대한 종양에서 검출된 활성으로 종양 대 혈액 비율을 계산하였다.

[0643] **결과**

[0644] 주입 후 8, 24 및 48시간에 마우스를 영상화하였다. 48시간 시점 이후, 감마 계수 및 장기 분포의 정량화를 위해 장기를 수거하였다.

[0645] 종양 가장자리(CT 스캔에서 기술된 대로) 주위로 관심 영역이 도시화되었고, 영상화 연구에서 각 마우스에 대한 항체 농도(주입 용량%를 기준으로 함)를 계산하였다. 도 3 내지 6 및 8은 생체내 및 생체외(감마 계수기에 의해) 측정된 장기 축적을 나타낸다. 생체 내 및 생체 외 사이의 정량화 변동성은 생체 내 플롯에 대한 ROI 및 백그라운드 신호로 인해 발생한다. ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$

[0646] 도 7은 주입 후 5일까지의 항체의 혈액 농도를 도시한다.

- [0647] 생체내 영상화는 모든 항체에 대한 종양 축적 및 장기간 국소화(2일 이상)를 나타내었다. 상이한 항체 사이에는 통계적 차이가 없었고 종양의 양은 48시간까지 대략 5% ID/g이었다.
- [0648] 생체의 분석은 모든 항체에 대해 48시간의 생체분포를 나타내었다. 이 시점에서, 종양 축적은 항체 농도가 가장 높았고 간, 비장, 및 폐의 순서였다.
- [0649] JN005는 다른 변이체(J591 제외)보다 더 낮은 간 및 비장 축적을 보여준다. 이것은 훨씬 더 긴 순환 시간에서도 극명하며, 120 시간에서 순환하는 JN005는 여전히 약 10% ID/g이었다.
- [0650] 혈액 시료를 120시간 동안 채취하여 약동학 평가를 수행하였다. 다른 항체에 비해 JN007이 빠르게 제거되는 것이 가장 주목할만한 관찰이었다.
- [0651] 또한, 혈액 시료를 사용하여 항체의 종양:혈액 비율을 계산하였다. 각각의 항체에 대한 종양:혈액 비율(생체내:꼬리 출혈)을 8시간, 24시간 및 48시간 시점에 결정하고 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 10은 48시간 및 120시간에서의 종양:혈액 비율(생체외:생체외)을 도시한다.
- [0652] 종양:혈액 비율은 항체 JN005(ANT4044-IgG1+DOTA) 및 J591와 비교하여 모든 시점에서 항체 JN006(ANT4044-IgG4(FcRn/FcRgamma)+DOTA) 및 JN007(ANT4044-IgG1(FcRn)+DOTA)가 상당히 더 높다. 120시간에서의 비율은 특히 현저하며, FcRn 결합 변형 및 FcRn/Rf 감마 수용체-결합 변형 항체의 종양:혈액 비율은 비변형 항체의 종양:혈액 비율보다 약 200배 초과한다.
- [0653] **논의**
- [0654] 시험된 항체 중 일부가 혈청 반감기를 유의하게 감소(및 제거율을 증가)시켰음에도 불구하고, 종양에 축적되는 모든 항체의 양은 통계적으로 다르지 않았다. 이러한 결과는 각 항체에 대한 종양 로딩이 동일하고, 이는 모든 항체가 표적 에피토프에 대해 유사한 결합 친화도를 가졌음을 나타내며, FcRn 및 Fc 감마 수용체 변형이 JN007 및 JN006 항체의 제거율을 상당히 증가시키고 혈청 반감기를 감소시켰음에도 불구하고 모든 항체는 표적 부위에 전달되는 유사한 능력을 가졌음을 보여준다는 점에서 놀라운 결과이다.
- [0655] 이들 결과는 방사성 표지된 항체의 FcRn 또는 FcRn 및 Fc 감마 수용체 결합 도메인의 변형이 종양 내 축적 능력과 관련하여 항체의 치료 잠재력에 영향을 미치지 않으면서 순환 중 방사성 동위원소의 양을 줄이는 데 상당한 유용성을 갖는다는 것을 나타낸다. 이것은 그렇지 않은 경우 순환(혈액학적 독성, 골 흡수 및 골수 조사를 포함함)에서 방사성 동위원소의 장기간 체류로 인해 발생할 수 있는 많은 독성 영향을 감소시키는 것을 포함하여 수많은 이점을 갖는다.
- [0656] **실시예 7: 본 발명의 예시적인 항체의 ¹⁷⁷Lu 영상화 및 방사선요법 효능 연구**
- [0657] **시험 물품**
- [0658] 1. TXP02-JN007 (ANT4044-FcRn-K-DOTA)
- [0659] 2. TXP02-JN005 (ANT4044-K-DOTA)
- [0660] 3. PSMA-617 (PSMA-결합 펩티드)
- [0661] **1단계 화학: 영상화 연구**
- [0662] **표지화 개요: JN007, JN005.**
- [0663] ANT4044는 본 명세서에 기재된 항-PSMA 항체이다. ANT4044-FcRn은 항체의 변형 형태로, 불변 중쇄의 FcRn 결합 부위를 변형시켜 혈청 반감기를 감소시킨 것이다. ANT4044-FcRn-K-DOTA는 라이신 잔기를 통해 킬레이터 DOTA에 접합되는 ANT4044-FcRn이다.
- [0664] 150 µg의 ANT4044-FcRn은 37°C에서 2시간 배양하면서 500 MBq의 Lu-177로 표지화하였다. 표지화 효율은 81%였다. 반응 혼합물을 NAP-5 컬럼에서 PBS로 정제하였으며, 후속 표지화 효율이 98%였다. 표지된 항체를 포함하는 분획을 대조하였다. 각각 20 MBq의 Lu-177로 표지된 10 µg, 100 µg 및 370 µg을 포함하는 용량을 비표지된 ANT4044-FcRn 항체 및 PBS를 적절한 양으로 첨가하여 제조하였다.
- [0665] 500 µg의 ANT4044 항체를 37°C에서 2시간 배양하면서 100 MBq의 Lu-177로 표지하였다. 표지화 효율은 98.2%이었다. 제제를 PBS에 희석하고 추가 정제 없이 사용하였다.

- [0666] 2단계 화학: 효능 연구
- [0667] 표지화 개요: PSMA-617, ANT4044-FcRn.
- [0668] 6 μg (4 nmol)의 PSMA-617 (6 μl 의 1 mg/ml 수용액)을 0.1 M 암모늄 아세테이트 완충액 (pH 5.5) 중 200 MBq Lu-177로 표지하고 10분 동안 95°C로 가열하였다. 표지화 효율은 97.6%이었다. 체제를 PBS에 희석하고 추가 정제 없이 사용하였다.
- [0669] 300 μg ANT4044-FcRn을 120 MBq Lu-177로 표지화하였다. 37°C에서 2시간 항온처리 후 표지화 효율은 96.5%이었다. 체제를 5 μl 0.1 M EDTA를 첨가하여 킨칭하고 PBS에 희석하고 추가 정제 없이 사용하였다.
- [0670] 1단계 - 영상화 연구 설계
- [0671] 1. 1단계 연구를 위해, 적절한 종양 크기 (150-300 mm^3)를 가진 동물을 n=3의 4개 그룹으로 연구에 배치하여 다음과 같이 투여하였다.
- [0672] a. 그룹 1: 200 μL 중 10 μg [^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn, 측면 꼬리 정맥에 정맥(IV) 주입
- [0673] b. 그룹 2: 200 μL 중 100 μg [^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn, 측면 꼬리 정맥에 정맥(IV) 주입.
- [0674] c. 그룹 3: 200 μL 중 370 μg [^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn, 측면 꼬리 정맥에 정맥(IV) 주입.
- [0675] d. 그룹 4: 200 μL 중 100 μg [^{177}Lu]TXP02- ANT4044, 측면 꼬리 정맥에 정맥(IV) 주입.
- [0676] 2. 항체 생체분포는 SPECT/CT 영상화를 통해 항체 주입 후 4, 24 및 48시간에 평가되었다.
- [0677] a. 해부학적 참조를 위해 전신 정적 SPECT 영상을 획득한 후 전신 CT를 촬영하였다.
- [0678] b. SPECT 스캔 시간은 40분이었고 CT 스캔 시간은 스캔당 12분이었다.
- [0679] c. 여러 마리의 마우스가 있는 호텔에서 한 번에 세 마리의 동물을 촬영하였다.
- [0680] 3. 일주일에 3번 캘리퍼스 측정을 통해 종양 부피를 평가하였다. 동물에게 부작용이 있는지 검사하고 정기적으로 무게를 측정하였다.
- [0681] 4. 선택된 동물의 경우 추가적인 생체외 분석을 위해 조직을 수집하였다.
- [0682] 5. 나머지 동물은 도태되었고 사체는 폐기하였다.
- [0683] 2단계 - 효능 연구 설계
- [0684] 1. 주요 효능 연구를 위해, 적절한 종양 크기 (150-300 mm^3)를 가진 동물을 다음과 같은 투여량으로 n=6의 3개 그룹으로 연구에 배치하였다.
- [0685] a. 그룹 1: 200 μL 중 50 μg [^{177}Lu]TXP02- ANT4044-FcRn, 정맥주입
- [0686] b. 그룹 2: 200 μL 중 600 ng [^{177}Lu]PSMA-617, 정맥주입
- [0687] c. 그룹 3: 200 μL PBS, IV
- [0688] 2. 시험제 주입 후 3주 동안 주 3회 캘리퍼스 측정을 통해 종양 크기를 평가하였다.
- [0689] 3. 동물에게 부작용이 있는지 검사하고 정기적으로 무게를 측정하였다.
- [0690] 4. 0.5, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120시간에 그룹 1 및 2의 꼬리 찌르기 방법을 통해 동물에서 혈액 시료를 채취하고 감마 계수를 통해 평가하였다.
- [0691] 5. 전혈 시료의 무게를 측정한 다음 참조 표준과 함께 감마 계수기에서 계수하였다.
- [0692] 6. 초기 연구 목표는 치료 후 5주 동안 종양 성장을 모니터링하는 것이었다. 이 시간 프레임은 일부 [^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn 마우스에서 관찰된 방사선 질병으로 인해 단축되었다.
- [0693] 7. 선택된 동물의 경우 추가적인 생체외 분석을 위해 조직을 수집하였다.

8. 나머지 동물은 도태되었고 사체는 폐기하였다.

결과 및 논의

도 11은 이중이식 마우스에서 [^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn 분포의 예시적인 영상이다.

도 12는 마우스의 혈액에서 측정된 [^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn 방사능 수준의 플롯이다.

도 13은 본 연구에서 결정된 바와 같은 종양 성장의 플롯이다. ANT4044-FcRn-DOTA-Lu 처리는 0일과 비교하여 14일에 종양 부피의 변화가 없다는 증거로서 종양 성장을 유의하게 억제하였다. 대조군(PBS) 그룹에서는 종양 부피가 전반적으로 증가하였는데, ANT4044-FcRn-DOTA-Lu 처리군의 상응하는 시간과 비교할 때 9일, 12일 및 14일에 종양의 크기가 상당히 커졌다.

시험(JN007) 항체와 비교 항체(JN005) 모두의 방사성 표지는 2 MBq/ μg 의 최대 비활성을 달성하여 성공적(>96% 표지 효율)이었다.

영상 연구를 통해 LNCaP 종양 이중이식편에서 시험 항체와 비교 항체 모두의 흡수를 보여주었다(표 3 참조).

심장의 좌심실에 그려진 작은 ROI에 의해 추론된 혈액 제거율은 JN005 항체의 동일한 시점과 비교하여 주입 후 48시간에 모든 그룹의 JN007 항체에서 더 빨랐다(표 4 참조).

표 3

4, 24 및 48시간에서의 [^{177}Lu] TXP02-JN007 및 [^{177}Lu]TXP02-JN005 종양 흡수

그룹	질량 용량($\mu\text{g}/\text{동물}$)	영상화 추적자	방사선량(Mbq/동물, 평균 $\pm$ SD)	4시간:종양 %ID/g (평균 $\pm$ SD)	24시간: 종양 %ID/g (평균 $\pm$ SD)	48시간: 종양 %ID/g(평균 $\pm$ SD)
1	100	[^{177}Lu] TXP02-JN007	19.4 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 1.2	8.3 $\pm$ 1.7
2	100	[^{177}Lu] TXP02-JN005	19.7 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.2	16.8 $\pm$ 1.2	23.7 $\pm$ 0.8

표 4

4, 24 및 48시간에서의 [^{177}Lu] TXP02-JN007 및 [^{177}Lu]TXP02-JN005 심장(혈액) 흡수

그룹	질량 용량($\mu\text{g}/\text{동물}$)	영상화 추적자	방사선량(Mbq/동물, 평균 $\pm$ SD)	4시간:혈액 %ID/g (평균 $\pm$ SD)	24시간: 혈액 %ID/g (평균 $\pm$ SD)	48시간: 혈액 %ID/g(평균 $\pm$ SD)
1	100	[^{177}Lu] TXP02-JN007	19.4 $\pm$ 0.6	11.7 $\pm$ 1.7	3.0 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1
2	100	[^{177}Lu] TXP02-JN005	19.7 $\pm$ 0.7	16.5 $\pm$ 1.1	10.0 $\pm$ 0.6	7.8 $\pm$ 0.9

도 14는 JN007 항체(FcRn-결합을 감소시키도록 변형된 본 발명의 항-PSMA, K-DOTA-Lu 항체- HuX592R-DOTA-Lu177로도 지칭됨)를 투여한 후 마우스에서 종양:혈액 비율의 플롯이다. 대조군 마우스(JN005, 즉 FcRn-결합 영역에 변형을 갖지 않는 항-PSMA, K-DOTA-Lu 항체 HuJ591-DOTA-Lu177)와 비교하여 FcRn 변형 항체를 받은 마우스는 항체의 종양 대비 혈액의 비율이 더 높았다.

실시예 8: PET 영상화제의 생체 내 평가

시험 항체

- [0707] FcRn-GmAb = $^{89}\text{Zr-DFOsq-FcRn-GmAb}$ (FcRn 결합을 감소시키도록 변형된 본 발명의 항-CAIX-결합 항체, 지르코늄으로 표지됨).
- [0708] cGmAb-CHO = $^{89}\text{Zr-DFOsq-cGmAb-CHO}$ (FcRn 결합을 감소시키는 변형을 포함하지 않는 본 발명의 항-CAIX-결합 항체, 지르코늄으로 표지됨).
- [0709] 실험 방법
- [0710] * 암컷 Balb/c 마우스(Australian BioResources, NSW, 8주)의 우측에 50% 마트리젤 내 5×10^6 HT-29 세포를 피하 접종하였다.
- [0711] * 9마리의 HT-29 종양 보유 마우스에 각각 120-130 μl 의 부피로 3 MBq FcRn-GmAb 또는 3 MBq cGmAb-CHO를 정맥 주입하였다.
- [0712] * 주입한지 4, 24, 48 및 144시간 후 3마리의 마우스를 이소플루란을 사용하여 마취하고 G8 PET/CT 스캐너(Perkin Elmer)의 영상 베드에 위치시켰다.
- [0713] * CT 스캔을 수행한 후 즉시 10분 정적 PET 스캔을 수행하였다.
- [0714] * PET 영상을 ML-EM(Maximal Likelihood and Expectation Maximization) 알고리즘을 사용하여 재구성하고 VivoQuant(Invivo)를 사용하여 분석하였다. 종양 SUV_{최대}, 종양 SUV_{최대}/백그라운드 평균(TBR)(여기서 백그라운드는 종격동 흡수를 나타냄), 종양 SUV_{최대}/간 평균(종양:간) 및 종양 SUV_{최대}/뼈 평균(종양:뼈)(여기서, 뼈는 비골과 경골 사이의 관절 주변의 높은 흡수 영역을 나타냄)을 결정하였다.
- [0715] * 3마리 동물의 코호트를 24, 48 및 144시간에 영상화한 후 안락사시키고 선택된 조직을 제거하고 무게를 측정하고 감마 계수기에서 계수하였다. 추적자 흡수는 % 주입 용량/그램 조직으로 계산하였다.
- [0716] * 데이터의 통계 분석은 그래프패드 프리즘 7(GraphPad Prism 7)을 사용하여 수행되었다.
- [0717] 결과
- [0718] FcRn-GmAb 및 cGmAb-CHO가 주입된 마우스의 PET 영상을 획득하고 PET 영상의 정량화는 도 15에 도시된다. 각 추적자에 대한 조직 생체분포 데이터를 도 16에 요약하였다.
- [0719] FcRn-GmAb PET 영상은 접종 후 4시간에 상당한 간 축적을 보여주며, 접종 후 144시간에 적당한 종양 흡수를 보여준다. 대조적으로, cGmAb-CHO 영상은 접종 후 144시간에서 최소한의 간 축적 및 높은 종양 흡수를 보여준다. PET 영상을 분석하면 cGmAb-CHO의 종양 흡수가 4시간에서 48시간까지 선형적으로 증가한 것으로 나타나고, 이후 수준이 정체되기 시작했다(도 15, 좌측 상단 패널). FcRn-GmAb의 최대 종양 흡수는 24시간에 나타났고 추적자 세출은 144시간에 명백했다. cGmAb-CHO 종양 SUV_{최대}는 접종 후 24, 48 및 144시간에 FcRn-GmAb보다 유의하게 더 높았다 ($P < 0.0001$, Sidak의 다중 비교 검정).
- [0720] cGmAb-CHO 종양 대 백그라운드 비율(TBR)은 4시간에서 144시간까지 선형적으로 증가하는 반면 FcRn-GmAb TBR은 4시간에서 24시간으로 증가한 다음 144시간까지 정체되었다(도 15, 우측 상단 패널). cGmAb-CHO 종양 대 간 비율(TLR)은 48시간까지 선형으로 증가하고 그 후 정체 상태를 유지한 반면 FcRn-GmAb TLR은 24시간까지 증가하고 144시간에 4시간 수준으로 감소하였다(도 15, 좌측 하단 패널).
- [0721] PET 영상화 결과와 일치하며, 생체분포 데이터(도 16)는 (i) FcRn-GmAb와 비교하여 cGmAb-CHO는 혈액, 폐, 신장, 근육, 뼈 및 종양으로부터 더 느린 세출; (ii) 24, 48 및 144시간에 FcRn-GmAb보다 cGmAb-CHO의 더 낮은 간 및 비장 흡수를 나타내었으며; (iii) cGmAb-CHO의 종양 흡수 및 보유는 48 시간($P = 0.006$, t-시험) 및 144 시간($P = 0.0002$, t-시험)에서 FcRn-GmAb보다 유의하게 더 높았다. cGmAb-CHO 그룹에서 $n=2$ 이므로 24시간에서의 분석을 수행하지 않았다.
- [0722] **실시예 9: 본 발명의 예시적인 항체의 치료학적 효능**
- [0723] 시험 항체
- [0724] 1. HuX592R (ANT4044-FcRn).
- [0725] 2. HuJ591 (ANT4044)

- [0726] *항체의 방사성 표지 및 TLC 분석.*
- [0727] 모든 항체는 0.1M pH 5.5 암모늄 아세테이트 완충액 중 HuX592R 및 HuJ591에 대해 각각 50배 또는 100배 과량의 생체분자로 실온에서 45분 동안 ^{177}Lu 와 함께 배양하였다. 각 용액의 시료를 취하여 50 mM EDTA와 1:1로 혼합하였다. 5 μL 의 각 DTPA 배양된 시료 또는 순수한 용액을 TLC 종이(실리카 겔이 함침된 Agilent iTLC-SG 글래스 극세사 크로마토그래피 종이)에 스폿팅하고 50:50 H₂O:에탄올로 실행하였다. 이후, Eckert 및 Ziegler 미니-스캔 및 플로우-카운트 시스템을 사용하여 방사성 표지된 종 이동의 검출을 달성하였다. 모든 시료는 $\geq 90\%$ 표지화를 나타내었다. 대조군 실험은 품질 관리를 위해 DTPA에 결합된 유리 ^{177}Lu 및 ^{177}Lu 의 용출 거동을 모니터링하기 위해 수행하였다.
- [0728] *세포 결합*
- [0729] Lu-표지된 작제물 HuX592R 및 HuJ591을 세포 결합에 대해 평가하였다.
- [0730] 요약하면, 0.100 mL PBS에 1.25×10^5 PC-3 종양 세포(음성 대조군) 또는 1.25×10^5 LNCaP 종양 세포를 포함하는 에펜도르프(Eppendorf) 튜브를 5 μL (0.030 MBq)의 표지된 항체와 함께 37°C에서 배양하였다. 배양은 분석을 위해 1시간, 2시간, 4시간, 및 24시간의 시점에서 중단되었다.
- [0731] *비결합된 분획 결정.*
- [0732] 각 배양 기간이 끝나면 에펜도르프(Eppendorf) 튜브를 500 g에서 5분 동안 원심분리하였다. 유리 Lu-177 항체를 포함하는 상청액을 별도의 튜브에서 회수하고 감마 분석을 사용하여 계수하였다. Lu-177 표지된 항체와 관련된 세포를 포함하는 펠렛을 0.200 mL의 PBS 용액으로 세척하고 500 g에서 5분 동안 3회 반복하여 원심분리하였다. 각각의 세척액의 상청액을 수집하고 계수하며, 회수된 항온처리 상청액과 결합한 값을 총 유리 비결합된 항체의 결과로 하였다.
- [0733] *표면 결합된 분획 결정.*
- [0734] 펠렛을 빙냉 온도에서 20분 동안 pH 4.0에서 0.1mL PBS에 재현탁시켰다. 이후, 에펜도르프 튜브를 4°C에서 500 g에서 5분 동안 원심분리하고 상청액을 수집하여 계수하였다. 빙냉 PBS pH 4.0으로 추가로 3회 세척한 후, 감마 계수를 위해 상청액을 수집하였다.
- [0735] *내재화된 분획 결정.*
- [0736] 세척 및 원심분리 후, 세포 펠렛을 내재화된 분획으로 계수하였다.
- [0737] *단백질 농도*
- [0738] 세포를 1M NaOH에 의해 용해시키고 단백질 농도를 측정하였다.
- [0739] *계산*
- [0740] 종양 세포(표면 결합 및 내재화 분획)에 대한 Lu-177 항체의 결합 및 비결합된 항체를 계산하고 단백질 mg당 배양된 총 방사능의 백분율로 보고하였다.
- [0741] *동물*
- [0742] 6주령의 건강한 수컷 Balb/C 누드 마우스(약 20g)를 ARC(Western Australia)에서 입수하여 본 연구에 사용하였다. 세포 주입 전에 환경에 순응하기 위해 연구 전 1주일 동안 마우스를 모니터링하였다. 모든 동물은 실험 전과 실험 도중 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있었다.
- [0743] *투여*
- [0744] 주입용 주사기에 방사성 표지된 항체 용액(약 100 μL)을 채우고 교정 계수가 35인 용량 교정기(Capintec CRC-25)를 사용하여 주사기의 활성을 측정하였다. 꼬리 정맥 주입 후 주사기에 남은 활성은 동일한 용량 교정기를 사용하여 측정하고 각 마우스에 주입된 총 부피를 계산하였다.
- [0745] *내약성*
- [0746] 건강한 수컷 Balb/C 누드 마우스(용량 코호트당 n=3)에 ^{177}Lu 로 표지된 HuX592R을 7일 간격으로 총 3회 주입(29G, 약 100 μL 식염수에 꼬리 정맥 주입함)하여 마우스당 약 100 μg 의 질량 용량으로 6, 9 또는 12 MBq 주

입 용량을 제공하였다. 다음으로, 주입 후의 마우스 건강을 모니터링하고 초기 주입 후 28일에 모든 마우스는 도태되었고 장기를 PFA로 고정하고 30% 자당으로 옮기고 필요한 경우 잠재적인 미래 분석을 위해 냉동 보관하기 전에 감퇴하도록 두었다.

[0747] 생체 분포

[0748] 건강한 수컷 Balb/c 누드 마우스(코호트당 n=3)에 ¹⁷⁷Lu로 표지된 작제물을 주입(29G, 식염수에 꼬리 정맥 주입 함)하여 마우스당 질량 용량 100(HuX592R) 또는 140(HuJ591) μ g으로 6 MBq 주입 용량을 제공하였다. 다음으로, 주입 후 24, 48 및 72시간(HuX592R의 경우) 및 72시간(HuJ591의 경우)에 동물을 희생시켰다. 혈액을 샘플링하고 조직을 수집하고 과량의 혈액을 제거하고 생체 외 분석을 위해 칭량하였다. Perkin PerkinElmer 2480 자동 감마 계수기를 사용하여 조직의 방사능을 측정하였다. ¹⁷⁷Lu의 알려진 시료를 사용하여 감마 계수를 보정하였고, 주입된 활동을 기반으로 하는 조직 중량의 %ID/g으로 표시된 활동을 측정하였다.

[0749] 종양 개시 및 성장

[0750] 자가방사촬영 및 치료 연구를 위해 8-12주령 수컷 Balb/c 누드 마우스에 50 μ L 50:50 인산염 완충 식염수:마트리젤 중 4 x 10⁶ LNCaP 세포를 각 마우스의 우측면에 피하 주입(27G 바늘)하였다. 세포 주입 당시 종양의 증거는 없었으며; 동물을 면밀히 모니터링하고 캘리퍼스로 종양을 측정했으며 고형 종양의 성장을 제외하고는 양호한 상태를 유지하였다. 종양 성장은 LNCaP 종양에서 종종 관찰되는 것처럼 산발적이었고 종양이 100-200 mm³에 도달함에 따라 마우스를 적절한 연구 절차에 참여시켰다.

[0751] 자기방사촬영

[0752] 종양이 있는 수컷 Balb/C 누드 마우스(코호트당 n=2)에 ¹⁷⁷Lu로 표지된 작제물을 주입(29G, 약 100 μ L 식염수에 꼬리 정맥 주입)하여 마우스당 100(HuX592R) 또는 140(HuJ591) μ g의 질량 용량으로 6 MBq 주입 용량을 제공하였다. 주입 후 7일째에 동물을 희생시키고, 종양 시료를 이소펜탄-드라이 아이스 슬러리에서 급속 냉동시킨 다음, 절단을 위해 OCT 화합물에 삽입하였다. 20 μ m 섹션을 슬라이드에 수집하고 공기 건조시킨 다음 약 3.5시간 동안 폐쇄형 카세트의 형광 스크린에 노출시켰다. 그런 다음 1000의 감도 설정으로 ¹⁷⁷Lu에 최적화된 50 μ m(스캔 시간 20-30분)의 픽셀 크기를 이용하는 아머샴 타이폰 인광영상기(Amersham Typhoon Phosphorimager)를 사용하여 영상을 획득하였다. 이미지퀀트(ImageQuant) TL 소프트웨어를 사용하여 영상을 분석하였다.

[0753] 치료학적 연구

[0754] 종양이 있는 수컷 Balb/C 누드 마우스(코호트당 n=6)에 ¹⁷⁷Lu로 표지된 작제물을 주입(29G, 약 100 μ L 식염수에 꼬리 정맥 주입)하여 HuX592R의 경우 100 μ g 또는 HuJ591의 경우 140 μ g의 질량 용량으로 HuX592R의 경우 6 또는 8 MBq 또는 HuJ591의 경우 6 MBq 주입 용량을 마우스당 3주 동안 매주 제공하였다. 비히클 단독 대조군과 비교하여 요법에 대한 반응으로 종양 성장을 90일에 걸쳐 모니터링하였다.

[0755] 결과

[0756] HuX592R과 HuJ591는 둘 다 성공적인 ¹⁷⁷Lu 표지화를 보여주었다. 이러한 ¹⁷⁷Lu 표지된 작제물은 세포 결합, 내약성, 생체 분포 및 치료학적 효능 연구에 직접 사용되었다.

[0757] 세포 결합

[0758] ¹⁷⁷Lu-표지된 HuX592R 및 HuJ591의 결합을 LNCaP(PSMA+) 및 PC3(PSMA-) 세포주에 대해 평가하였다. 작제물을 세포에 첨가한 후 1, 2 및 4시간에 미결합, 표면 결합 및 세포 펠렛 관련 분획을 평가하였다. 세포 검정을 통해 HuJ591 및 HuX592R 둘 다 PSMA 발현 세포주에서 향상된 축적을 보여주었고, 세포 펠렛에서 관찰된 최고 농도는 검정 기간 동안(모든 시점에서) 성공적인 내재화를 나타냈다. PSMA-음성 세포주(PC3)에서 일반적으로 최소 회합/내재화를 관찰하였으며, 이는 결합이 수용체-의존적이었고 표지화가 수용체에 대한 항체 결합을 유의하게 방해하지 않았음을 나타냈다.

[0759] 내약성

[0760] 건강한 수컷 Balb/c 누드 마우스(코호트당 n=3)에서 ¹⁷⁷Lu로 표지된 HuX592R의 내약성은 1주일 간격으로 3회 투

여되는 12, 9 및 6 MBq의 3가지 용량 수준으로 평가하였다. 동물 건강은 치료 투여 3주를 포함하여 4주 동안 동물 체중 및 동물성적표로 평가하였다. 이 연구에서 12 MBq 용량이 너무 높은 것으로 밝혀져서 6 MBq 및 8 MBq 용량을 사용하여 전체 연구를 수행하였다.

[0761] 생체 분포

[0762] 건강한 수컷 Balb/c 누드 마우스(코호트당 n=3)에서 ^{177}Lu -표지된 작제물의 생체 분포를 HuX592R의 경우 투여 후 24, 48 및 72 시간에 평가하고(도 17A) HuJ591의 경우에만 투여 후 72 시간에 평가하였다(도 17B). 그 결과, HuX592R에 비해 HuJ591의 순환 시간이 유의하게 더 높았고 간 및 비장과 같은 정리 장기에서 축적 수준이 그에 비례하여 더 낮음을 보여주었으며, 시스템에 의해 보다 빨리 제거됨을 시사한다.

[0763] 자기방사촬영

[0764] ^{177}Lu -표지된 작제물을 종양이 있는 수컷 Balb/c 누드 마우스에 투여하였다. 동물은 주입 1주일 후 희생되었고, 종양은 OCT에서 동결되었고, 절단되고 자기방사촬영 영상을 획득하였다. 결과를 종합하자면, 이 시점에서 HuX592R에 비해 HuJ591에 대한 축적이 강화되어, 두 작제물에 의한 종양 축적 및 침투와 일치한다. 더욱이, 방사선 치료제의 분포는 두 항체 모두에 대해 종양 전체에 잘 분산된 것으로 나타났다.

[0765] 치료학적 연구

[0766] 측면에 LNCaP 이종이식 종양이 있는 수컷 Balb/c 누드 마우스를 치료 코호트에 배정하고 다음 중 하나를 1주 간격으로 3회 용량을 투여하였다:

[0767] 1. 비히클 대조군

[0768] 2. 6 MBq [^{177}Lu]-HuX592R

[0769] 3. 8 MBq [^{177}Lu]-HuX592R

[0770] 4. 6 MBq [^{177}Lu]-HuJ591

[0771] 동물 체중으로 평가된 종양 퇴행(도 19) 및 동물 건강을 100일 동안 모니터링하였다. 그 결과, HuX592R 8 MBq에서 2 마리의 마우스 및 HuJ591(도시되지 않음) 코호트에서 4 마리의 마우스가 HuX592R(도 18)에 대한 상당한 종양 성장 억제를 보여주며, 여기서 종양 부담이 캘리포스에 의해 측정될 수 없는 완전한 종양 퇴행을 나타냈다. 치료를 시작한 지 37일(모든 코호트가 통계적 비교를 허용하는 n=6인 최종 데이터 지점), 3가지 처리군 모두 2원 변량분석(ANOVA)에 의해 결정된 바와 같이 대조군 코호트와 비교하여 6 MBq에서 HuX592R (p 0.0105), 8MBq에서 HuX592R(p 0.0086) 및 6MBq에서 HuJ591(p 0.0056)으로 종양 성장이 유의하게 감소하였다.

[0772] 체중 변화에 의해 평가된 바와 같이 심각한 건강 악화를 나타내는 투여 그룹은 없었다.

[0773] 마우스 생존(도 19)은 대조군 코호트(중양 생존값 83.5일)와 비교하여 모든 3개의 치료 코호트(중양 생존값 > 연구 기간)에 대해 통계적으로 더 길다(Mantel-Cox 테스트에 의해 p < 0.05). 위쪽 눈금은 비종양/건강 관련 문제로 인해 안락사된 동물을 나타낸다.

[0774] 두 체형 HuJ591(6MBq) 및 HuX592R(6MBq 및 8MBq 모두)은 종양을 발현하는 PSMA에 대해 효능을 보여주었다. HuJ591(6MBq)과 HuX592R(8MBq) 모두 연구 100일 동안 치료/종양 관련 사망이 없었고 HuX592R 8MBq에서 2마리의 마우스와 HuJ591 그룹에서 4마리의 마우스가 종양의 절대 퇴행(캘리포스로 측정할 수 없음)을 나타냈다. 생존 플롯의 관점에서, 항체가 있는 모든 처리군은 대조군보다 통계적으로 더 우수하였다.

[0775] 실시예 10: 본 발명의 ^{225}Ac -DOTA- 및 ^{177}Lu -DOTA-표지된 항-CAIX 결합 항체의 생체분포, 치료 효능 및 내약성

[0776] CAIX에 결합하기 위한 인간화 항체의 예(예를 들어, 실시예 1에 제시된 아미노산 서열을 포함함)는 알파-입자 방출 방사성 동위원소(악티늄 225) 또는 베타-입자 방출 방사성 동위원소(루테튬 177) 중의 하나로 표지되었다. 방사성표지화는 본 명세서에 기술된 바와 같은 표준 접합 방법을 사용하여 수행하였다(즉, DOTA 킬레이트제를 사용함).

[0777] SK-RC-52 이종이식을 가진 Balb/c 누드 마우스를 다음과 같이 4개의 처리군과 1개의 대조군으로 할당하였다:

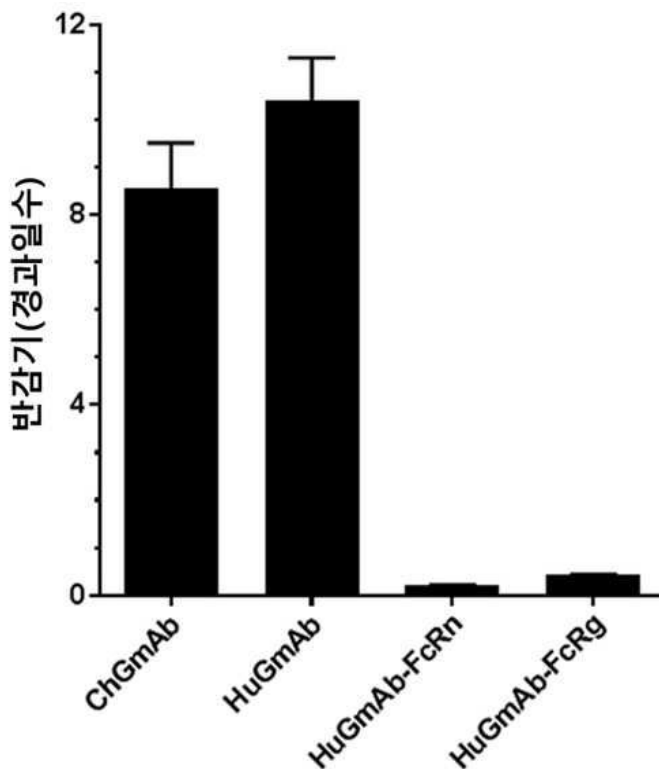
- [0778] 1. ^{225}Ac -hG250 5kBq
- [0779] 2. ^{225}Ac -hG250 15kBq
- [0780] 3. ^{225}Ac -hG250 25kBq
- [0781] 4. ^{177}Lu -hG250 13MBq
- [0782] 5. 대조군
- [0783] N= 그룹당 10마리.

[0784] 각 그룹에 대한 종양 성장 속도 및 종양 크기를 평가하였다. 도 20은 치료 후 시간에 따른 평균 종양 크기 (mm^3)를 나타낸다. 이러한 결과는 비치료 대조군과 비교하여 시간이 지남에 따라 빠르고 지속적인 종양 크기의 감소를 보여준다.

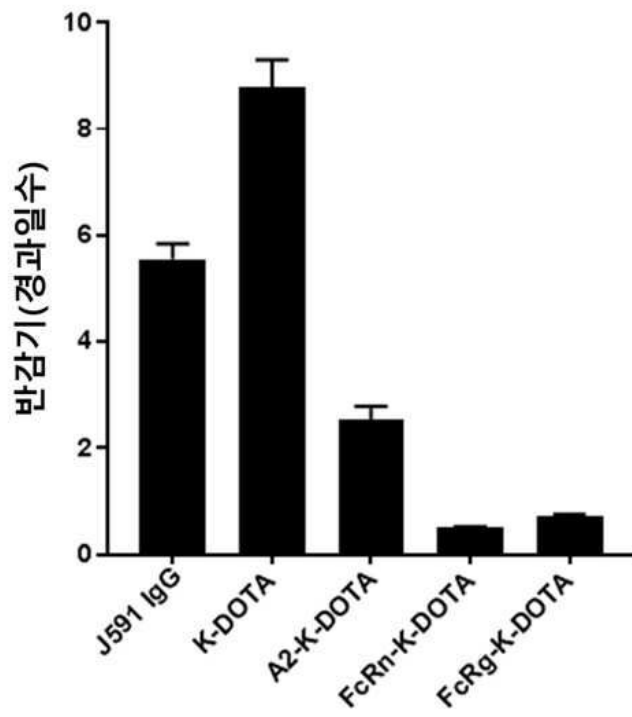
[0785] 본 명세서에 개시되고 정의된 본 발명은 텍스트 또는 도면으로부터 언급되거나 명백한 개별 특징들 중 둘 이상의 모든 대안적인 조합으로 확장된다는 것을 이해할 것이다. 이들 상이한 조합 모두는 본 발명의 다양한 대안적 국면을 구성한다.

도면

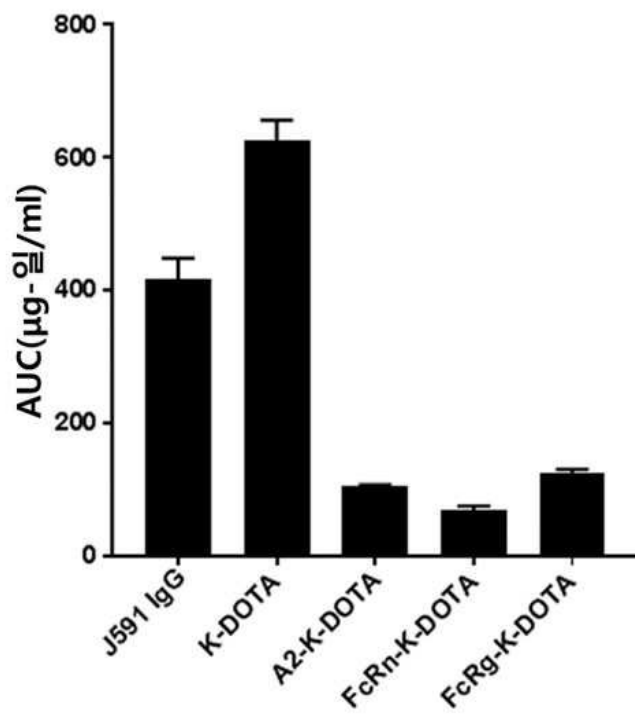
도면1a



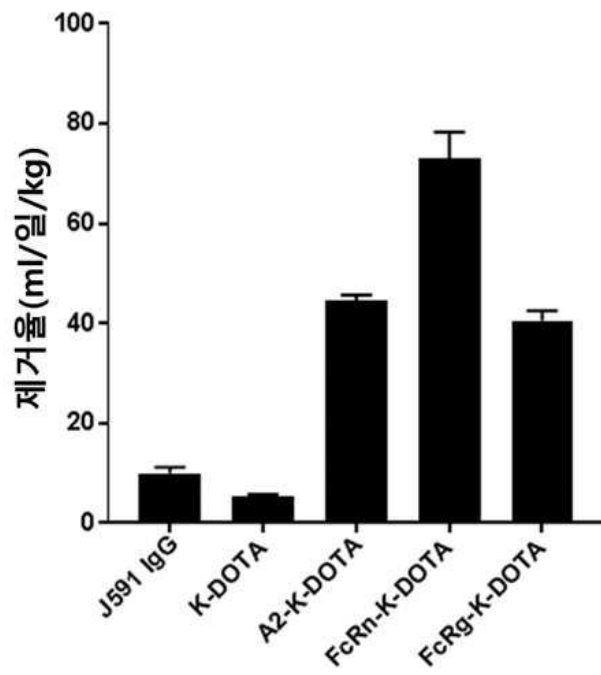
도면1b



도면2a

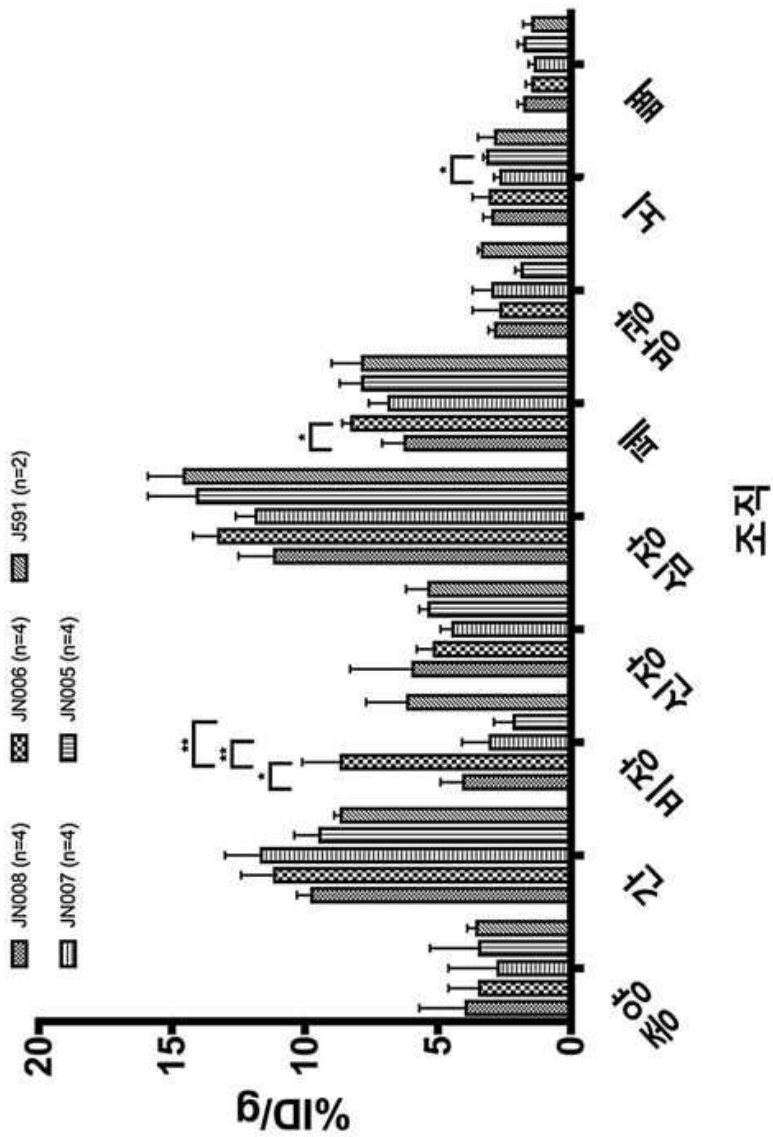


도면2b



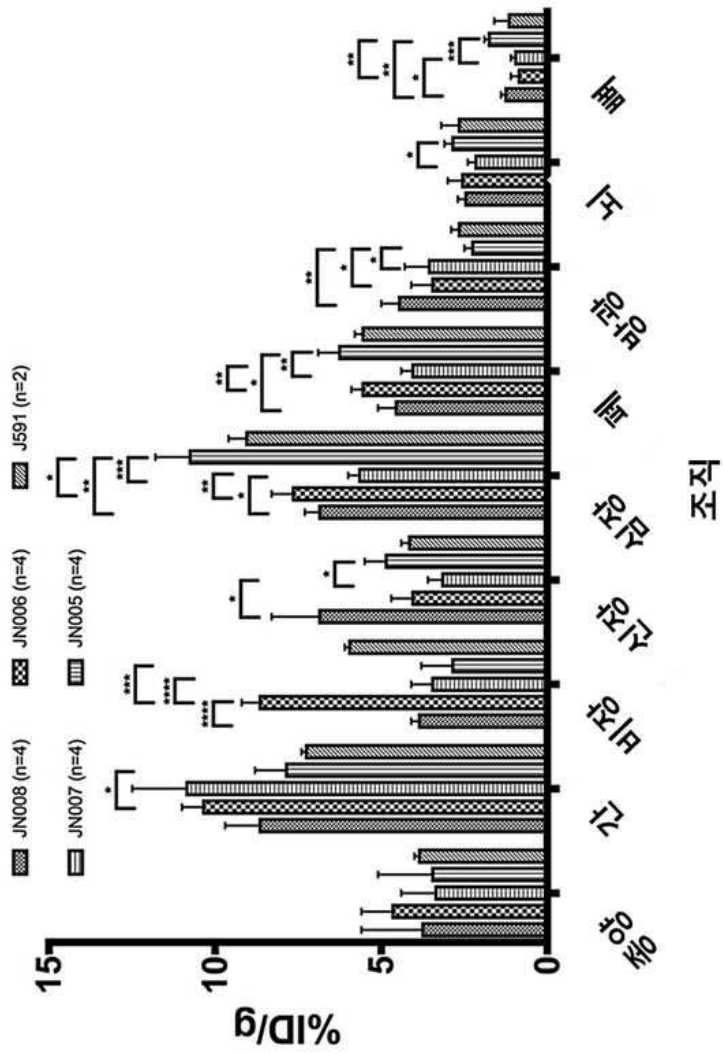
도면3

8시간에서의 생체내 생체 분포



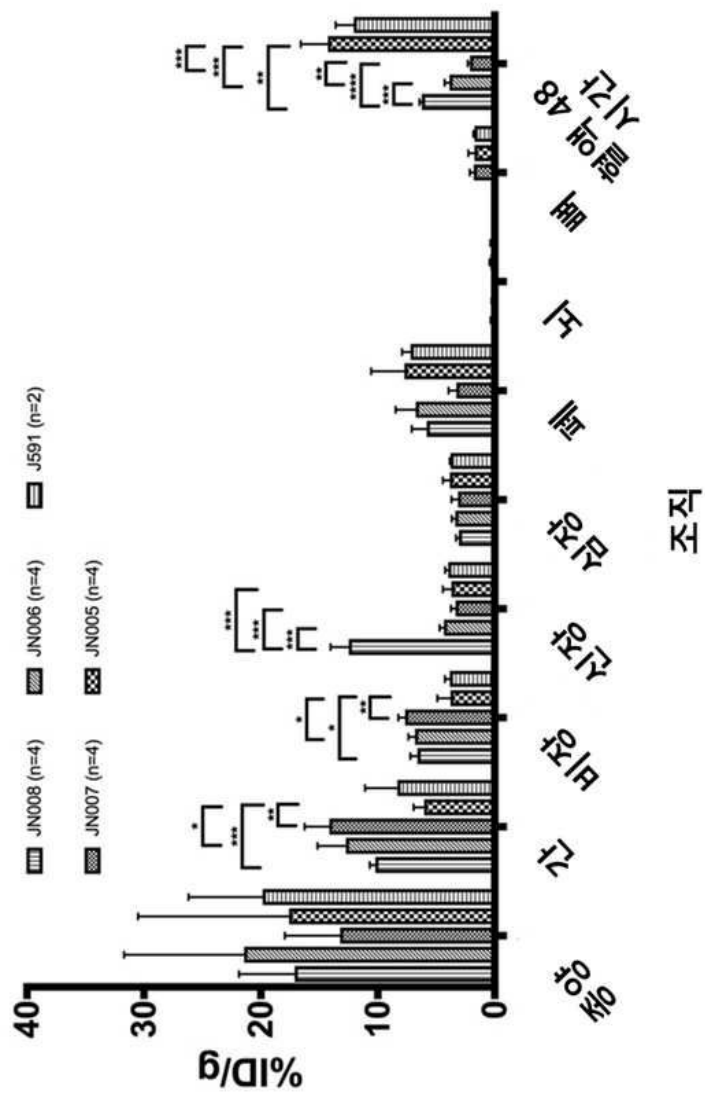
도면4

24시간에서의 생체내 생체 분포



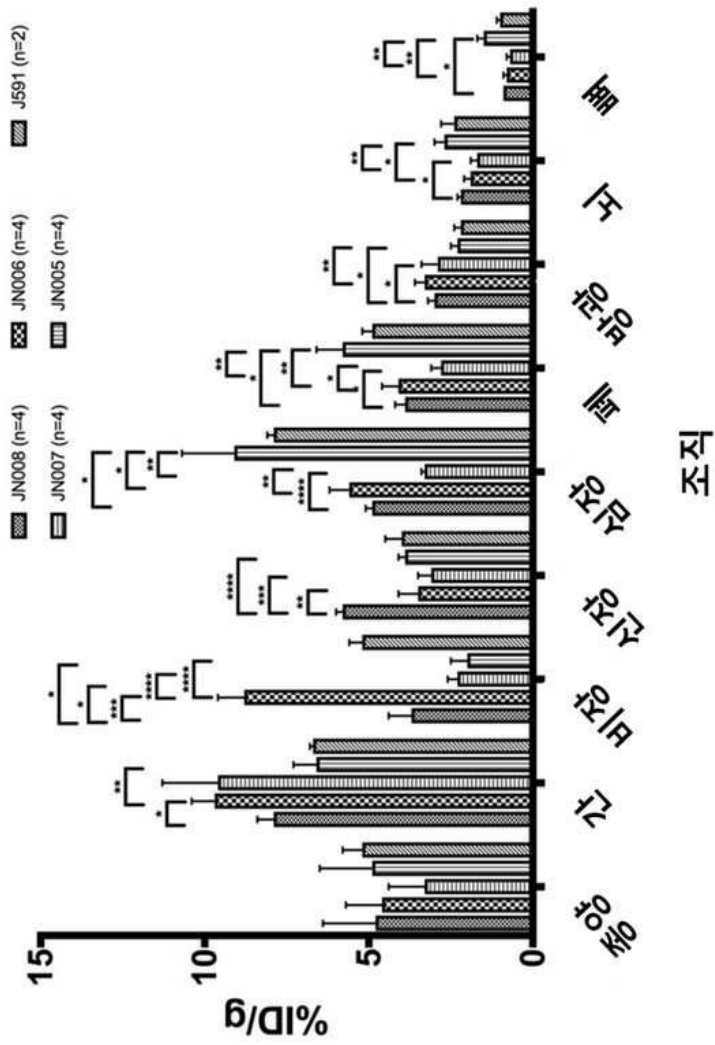
도면5

48시간에서의 생체외 생체 분포

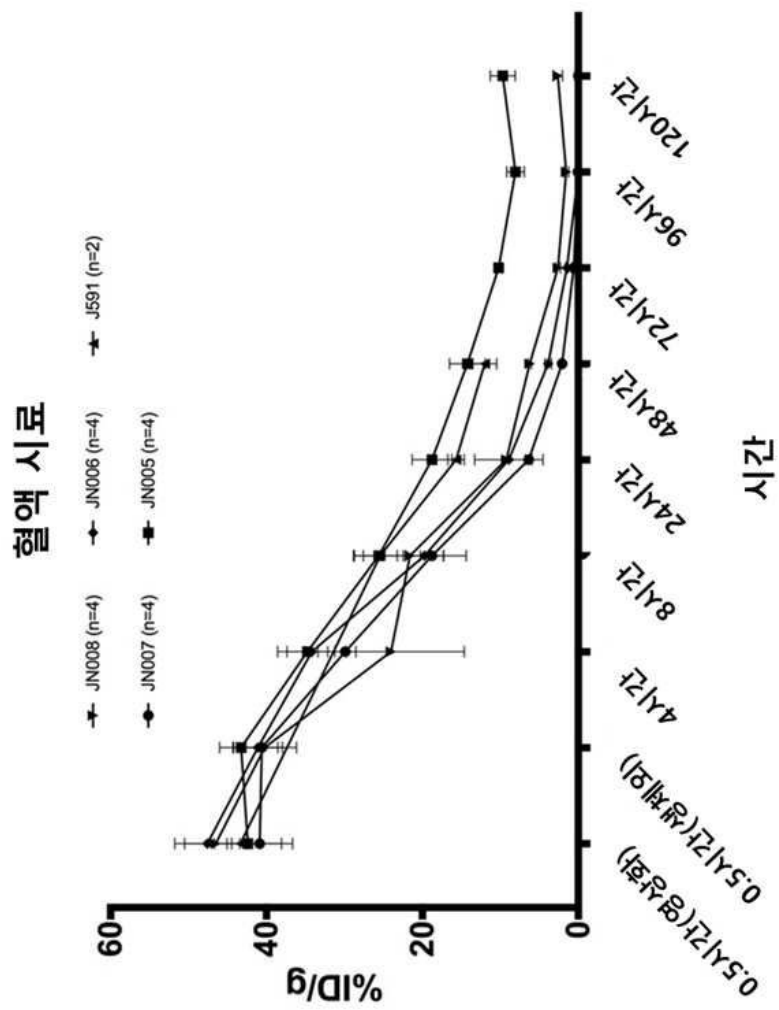


도면6

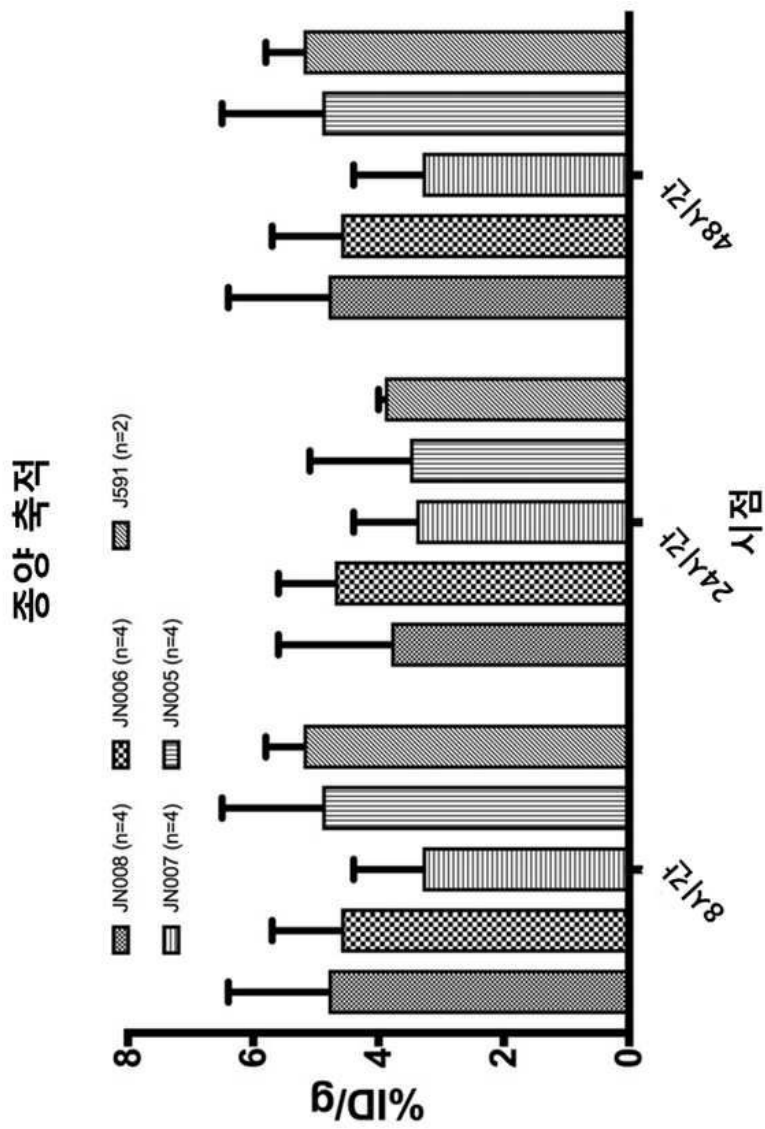
48시간에서의 생체내 생체 분포



도면7

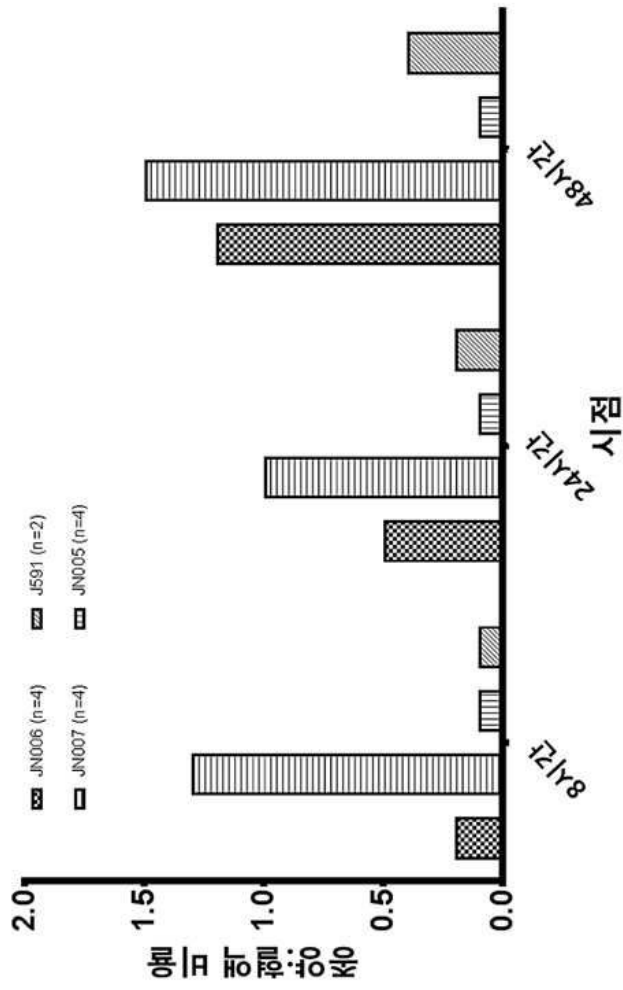


도면8

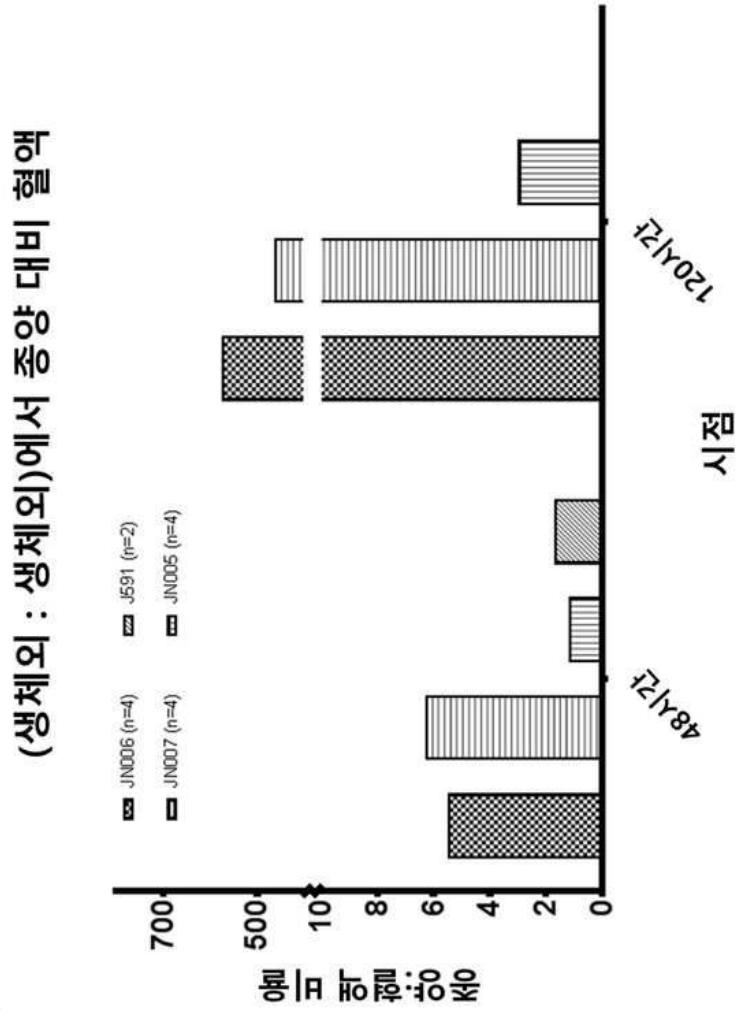


도면9

(생체내 : 꼬리 출혈)에서 증양 대비 혈액



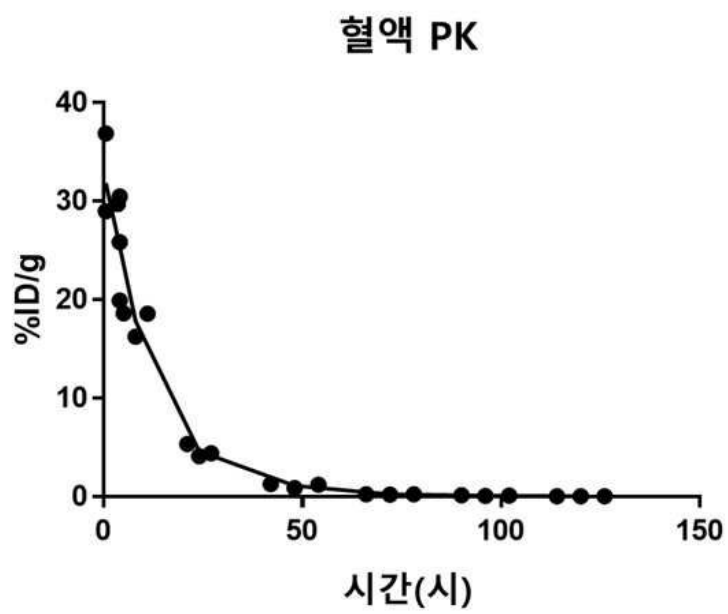
도면10



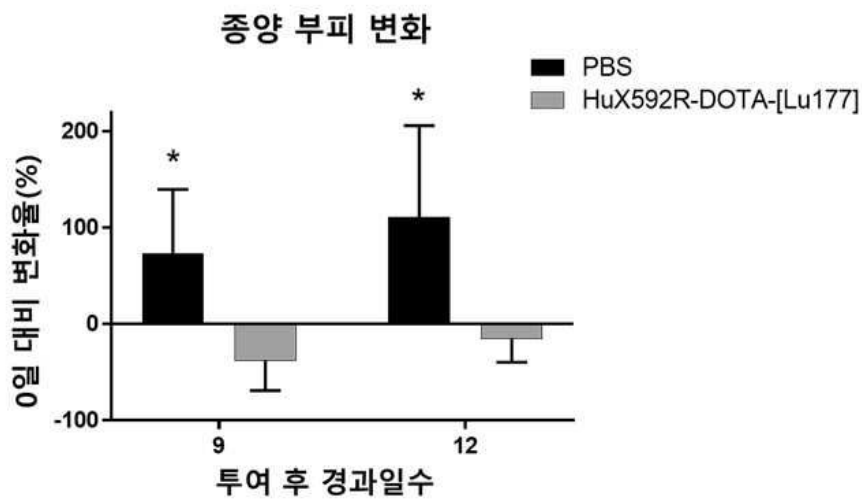
도면11



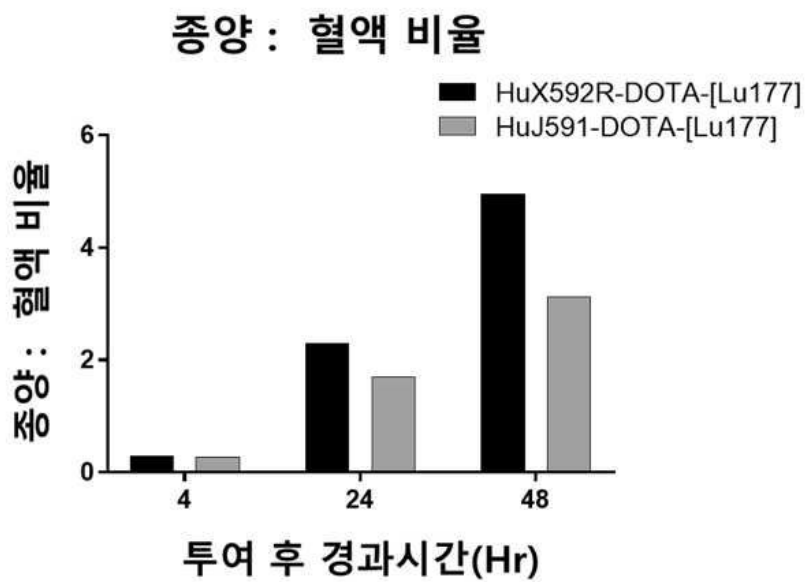
도면12



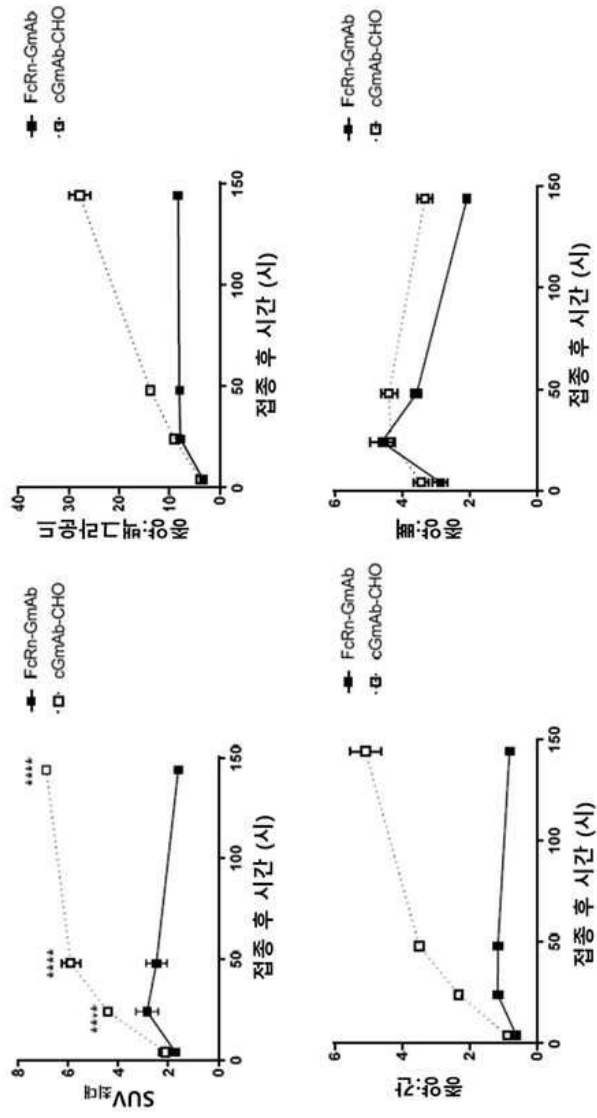
도면13



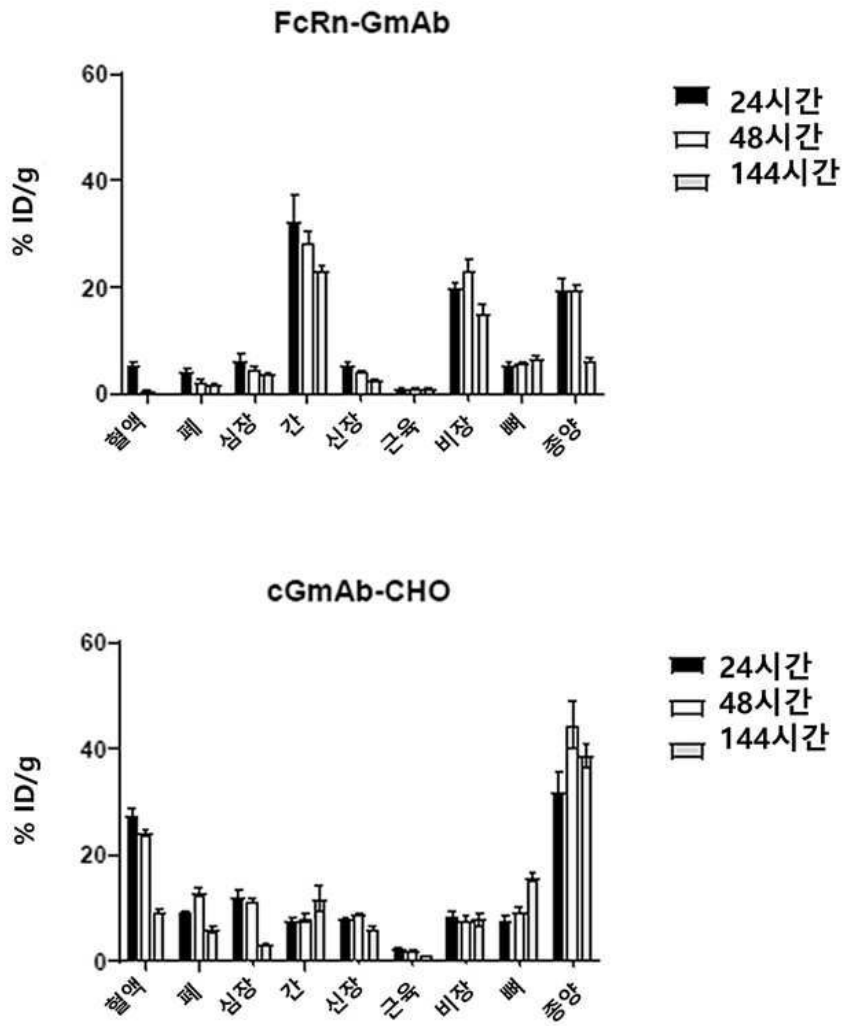
도면14



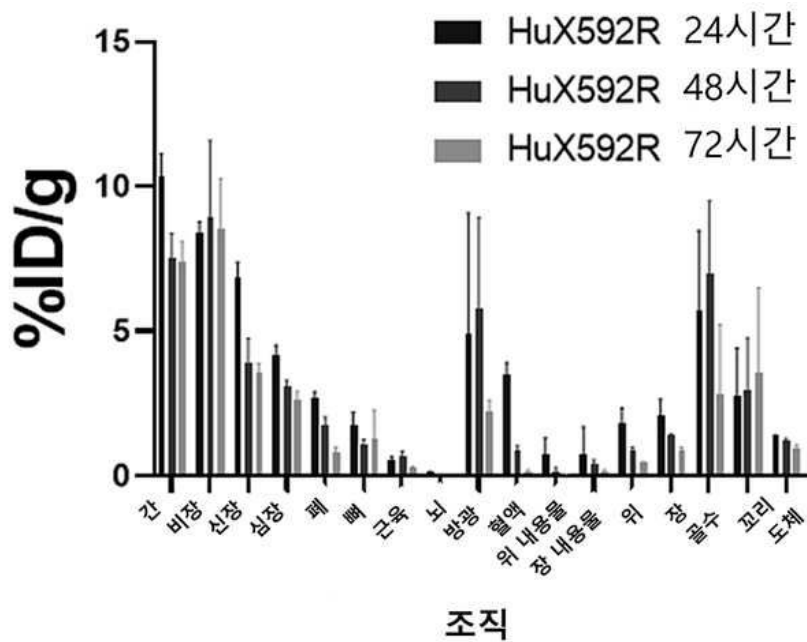
도면15



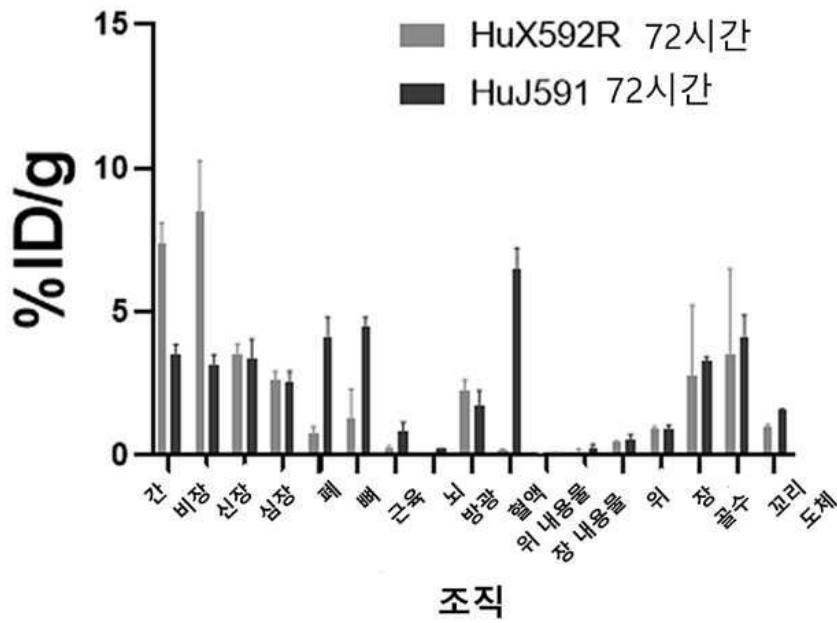
도면16



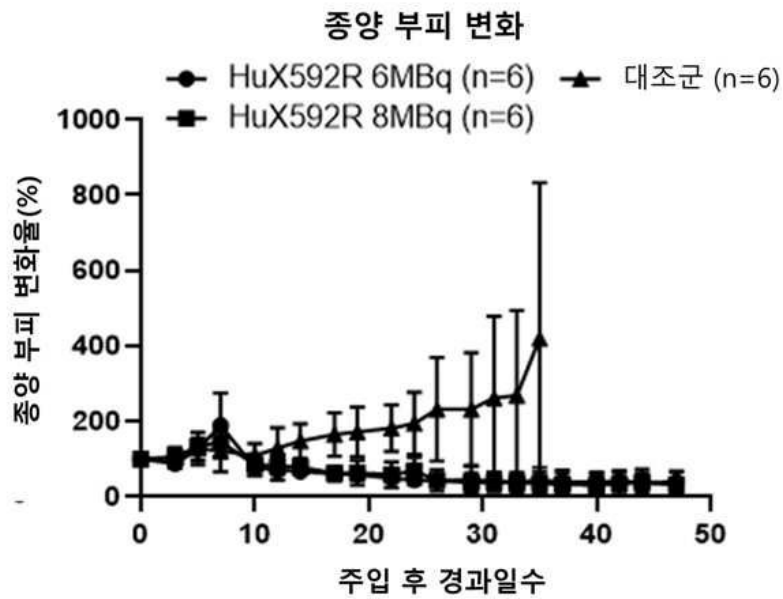
도면17a



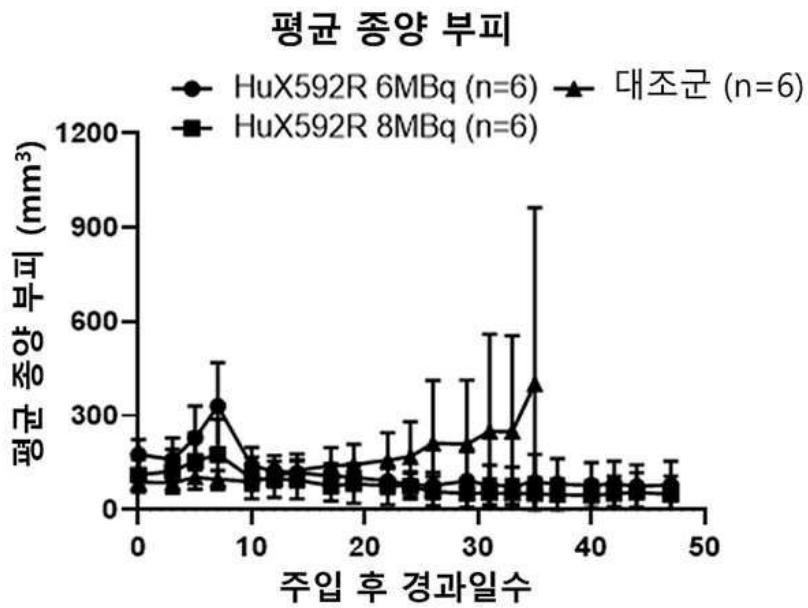
도면17b



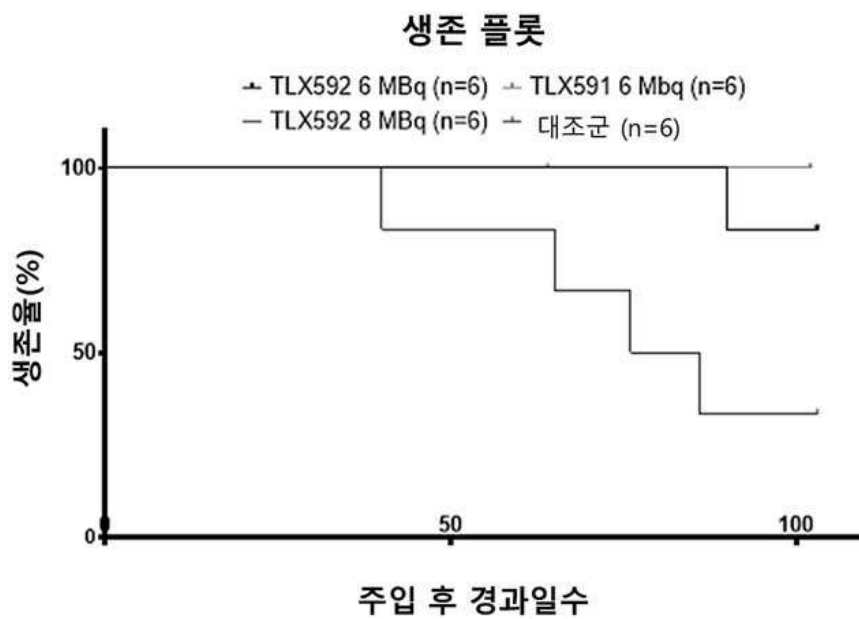
도면18a



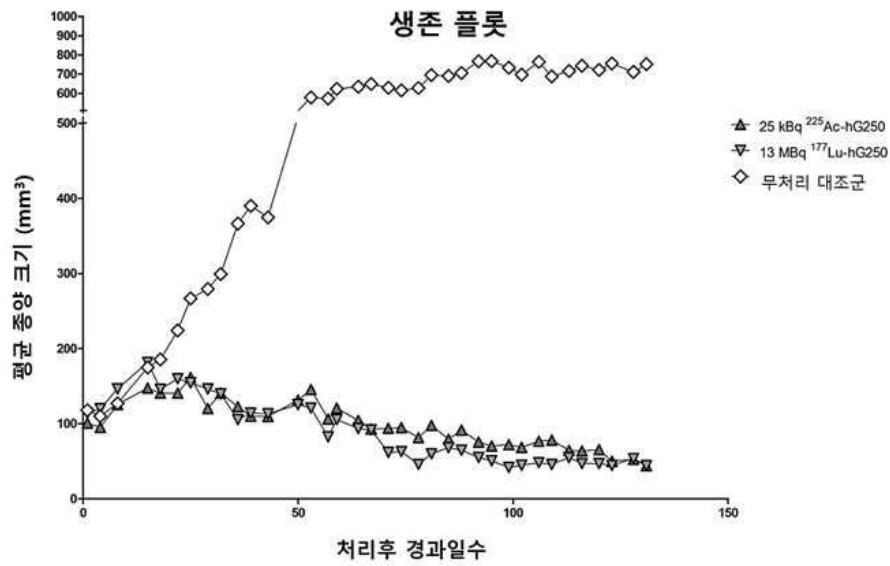
도면18b



도면19



도면20



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Telix International Pty Ltd
- <120> Antibodies
- <130> 53082446SCH
- <140> 2019902343
- <141> 2020-06-10
- <150> 2019902343
- <151> 2019-07-02
- <160> 243
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HCDR1 (protein)
- <400> 1
- Glu Tyr Thr Ile His
- 1 5
- <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HCDR2 (protein)

<400> 2

Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HCDR3 (protein)

<400> 3

Gly Trp Asn Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - VH (protein)

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95	
Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr			
100	105	110	
Val Ser Ser			
115			
<210> 5			
<211> 15			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HCDR1 (DNA)			
<400> 5			
gaatacacca tccac			15
<210> 6			
<211> 51			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HCDR2 (DNA)			
<400> 6			
aacattaatc ctaacaatgg tgggtactacc tacaaccaga agttcgagga c			51
<210> 7			
<211> 18			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HCDR3 (DNA)			
<400> 7			
ggttggaact ttgactac			18
<210> 8			
<211> 345			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - VH (DNA)			
<400> 8			
gaggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc			60

tcctgcaagg ctcttgata cacattcact gaatacacca tccactgggt gaggcaggcc 120
 cctggaaagg gccttgagtg gattggaaac attaataccta acaatggtgg tactacctac 180
 aaccagaagt tcgaggacag agtcacaatc actgtagaca agtccaccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgag atctgaggat actgcagtct attactgtgc agctggttgg 300
 aactttgact actggggcca aggcaccacg gtcacgtct cctca 345

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HFR1 (protein)

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HFR2 (protein)

<400> 10

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

1 5 10

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HFR3 (protein)

<400> 11

Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala

20 25 30

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HFR4 (protein)

<400> 12

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 13

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HFR1 (DNA)

<400> 13

gaggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact 90

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HFR2 (DNA)

<400> 14

tgggtgaggc aggcccttg aaaggcctt gattggattg ga 42

<210> 15

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HFR3 (DNA)

<400> 15

agatcacaa tcaactgtaga caagtcacc agcacagcct acatggagct cagcagcctg 60

agatctgagg atactgcagt ctattactgt gcagct 96

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 Variable Heavy chain - HFR4 (DNA)

<400> 16

tggggccaag gcaccacggt caccgtctcc tca

33

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HCDR1 (protein)

<400> 17

Glu Tyr Thr Ile His

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HCDR2 (protein)

<400> 18

Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HCDR3 (protein)

<400> 19

Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr

1 5

<210> 20

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - VH (protein)

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ala Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 21

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HCDR1 (DNA)

<400> 21

gaatacacca tccac

15

<210> 22

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HCDR2 (DNA)

<400> 22
aacattaatc ctaacaatgg tgggtactacc tacaaccaga agttcgagga c 51
<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HCDR3 (DNA)
<400> 23
tactggctgt tcgactac 18
<210> 24
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - VH (DNA)
<400> 24
gaggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctcttgata cacattcact gaatacacca tccactgggt gaggcaggcc 120
cctggaaagg gccttgagtg gattggaaac attaataccta acaatgggtg tactacctac 180
aaccagaagt tcgaggacag agtcacaatc actgtagaca agtccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag atctgaggat actgcagtct attactgtgc agcttactgg 300
ctgttcgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctca 345
<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HFR1 (protein)

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
<210> 26
<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HFR2 (protein)

<400> 26

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

1 5 10

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HFR3 (protein)

<400> 27

Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala

20 25 30

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HFR4 (protein)

<400> 28

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 29

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HFR1 (DNA)

<400> 29

gaggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact 90

<210> 30

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HFR2 (DNA)

<400> 30

tgggtgaggc aggccccctgg aaagggcctt gattggattg ga 42

<210> 31

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HFR3 (DNA)

<400> 31

agagtcacaa tcactgtaga caagtccacc agcacagcct acatggagct cagcagcctg 60

agatctgagg atactgcagt ctattactgt gcagct 96

<210> 32

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 Variable Heavy chain - HFR4 (DNA)

<400> 32

tggggccaag gcaccacggt caccgtctcc tca 33

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LCDR1 (protein)

<400> 33

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Asp

1 5 10

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LCDR2 (protein)

<400> 34

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LCDR3 (protein)

<400> 35

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - VL (protein)

<400> 36

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 37
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LCDR1 (DNA)
 <400> 37
 aaggccagtc aggatgtggg tactgctgta gac 33
 <210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LCDR2 (DNA)
 <400> 38
 tgggcatcca cccggcacac t 21
 <210> 39
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LCDR3 (DNA)
 <400> 39
 cagcaatata acagctatcc tctcacg 27
 <210> 40
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - VL (DNA)
 <400> 40
 gacattcaga tgaccacagtc tcccagcacc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc 60
 atcacttgca aggccagtcg ggatgtgggt actgctgtag actggtatca acagaaacca 120
 gggcaagctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtcctgat 180
 cgcttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag actgcagcct 240
 gaagactttg cagtttatta ctgtcagcaa tataacagct atcctctcac gttcggccag 300
 gggaccaagg tggatatcaa a 321

<210> 41

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LFR1 (protein)

<400> 41

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LFR2 (protein)

<400> 42

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

1 5 10 15

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LFR3 (protein)

<400> 43

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LFR4 (protein)

<400> 44

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

1 5 10

<210> 45

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LFR1

(DNA)

<400> 45

gacattcaga tgacccagtc tcccagcacc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc 60

atcacttgc 69

<210> 46

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LFR2(DNA)

<400> 46

tggtatcaac agaaaccagg gcaagctcct aaactactga tttac 45

<210> 47

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LFR3 (DNA)

<400> 47

ggagtccttg atcgcttcag cggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc 60

agactgcagc ctgaagactt tgcagtttat tactgt 96

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ ANT4044-A2 Variable Light chain - LFR4 (DNA)

<400> 48

ttcggccagg ggaccaaggt ggatatcaaa

30

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HCDR1 (protein)

<400> 49

Asn Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HCDR2 (protein)

<400> 50

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HCDR3 (protein)

<400> 51

His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - VH (protein)

<400> 52

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly

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

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

<210> 53

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HCDR1 (DNA)

<400> 53

aactattaca tgtct 15

<210> 54

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HCDR2 (DNA)

<400> 54

gccattaata gtgatgggtgg taccacctac tatctagaca ctgtgaaggg c 51

<210> 55

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HCDR3 (DNA)

<400> 55

caccgctcgg gctacttttc tatggactac 30

<210> 56

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - VH (DNA)

<400> 56

gacgtgaagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ttggaggatc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactattaca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagagaaga ggctggagtt ggtcgcagcc attaatagtg atggttggtat cacctactat 180

ctagacactg tgaagggccg attcaccatt tcaagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccttgt tttactgtgc aagacaccgc 300

tcgggctact tttctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357

<210> 57

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HFR1 (protein)

<400> 57

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HFR2 (protein)

<400> 58

Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala

1 5 10

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HFR3 (protein)

<400> 59

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

1 5 10 15

Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Phe Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HFR4 (protein)

<400> 60

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 61

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VHO Variable Heavy chain - HFR1 (DNA)

<400> 61

gacgtgaagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ttggaggatc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt 90

<210> 62

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VH0 Variable Heavy chain - HFR2 (DNA)

<400> 62

tgggttcgcc agactccaga gaagaggctg gagttggtcg ca 42

<210> 63

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VH0 Variable Heavy chain - HFR3 (DNA)

<400> 63

cgattcacca tttaagaga caatgccaag aacaccctgt acctgcaaat gagcagtcgt 60

aagtctgagg acacagcctt gttttactgt gcaaga 96

<210> 64

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab chimeric VH0 Variable Heavy chain - HFR4 (DNA)

<400> 64

tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc tca 33

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HCDR1 (protein)

<400> 65

Asn Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HCDR2

<400> 66

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HCDR3 (protein)

<400> 67

His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 68

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - VH (protein)

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val

35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100	105	110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 69		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HCDR1 (DNA)		
<400> 69		
aactactaca tgagc		15
<210> 70		
<211> 51		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HCDR2 (DNA)		
<400> 70		
gccattaaca gtgacggagg catcacctac tacctggaca ccgtgaaggg c		51
<210> 71		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HCDR3 (DNA)		
<400> 71		
cacaggagcg gctacttctc tatggactac		30
<210> 72		
<211> 357		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - VH (DNA)		
<400> 72		
gacgtgaagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggatc cctgagactc		60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aactactaca tgagctgggt gcgccaggct		120
ccaggaagg ggctggagct ggttgccgcc attaacagtg acggtggcat cacctactac		180

ctggacaccg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa caccctgtat 240
ctgcaaatga gcagcctgaa gagcgaggac acggccctgt attactgtgc gagacacagg 300
agcggctact tctctatgga ctactggggc cagggcacca gcgtcactgt ctctca 357

<210> 73

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HFR1 (protein)

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 74

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HFR2 (protein)

<400> 74

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

1 5 10

<210> 75

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HFR3 (protein)

<400> 75

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

1 5 10 15

Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HFR4 (protein)

<400> 76

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 77

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HFR1 (DNA)

<400> 77

gacgtgaagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggatc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt 90

<210> 78

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HFR2 (DNA)

<400> 78

tgggtgcgcc aggctccagg gaaggggctg gagctggttg cc 42

<210> 79

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HFR3 (DNA)

<400> 79

cgattcacca tctccaggga caacccaag aacacctgt atctgcaaat gagcagcctg 60

aagagcgagg acacggccct gtattactgt gcgaga 96

<210> 80

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH1 Variable Heavy chain - HFR4 (DNA)

<400> 80

tggggccagg gcaccagcgt cactgtctcc tca 33

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HCDR1 (protein)

<400> 81

Asn Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HCDR2 (protein)

<400> 82

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HCDR3 (protein)

<400> 83

His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 84

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - VH (protein)

<400> 84

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

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

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

<210> 85

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HCDR1 (DNA)

<400> 85

aactactaca tgagc 15

<210> 86

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HCDR2 (DNA)

<400> 86

ccattaacag tgacggtggc atcacctact acctggacac cgtgaagggc 50

<210> 87

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HCDR3 (DNA)

<400> 87

cacaggagcgc gctacttctc tatggactac 30

<210> 88

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - VH (DNA)

<400> 88

gacgtgaagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtcaagc ctggaggatc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aactactaca tgagctgggt gcgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagct ggttgccgcc attaacagtg acggtggcat cacctactac 180

ctggacaccg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa caccctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag ggccgaggac acggccctgt attactgtgc gagacacagg 300

agcggctact tctctatgga ctactggggc cagggcaccc tggctactgt ctctca 357

<210> 89

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HFRL (protein)

<400> 89

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 90

<211> 14

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HFR2 (protein)

<400> 90

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

1 5 10

<210> 91

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HFR3 (protein)

<400> 91

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

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HFR4 (protein)

<400> 92

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 93

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HFR1 (DNA)

<400> 93

gacgtgaagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggatc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt 90

<210> 94

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HFR2 (DNA)

<400> 94

tgggtgcgcc aggtccagg gaaggggctg gagctggtg cc 42

<210> 95

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HFR3 (DNA)

<400> 95

cgattcacca tctccaggga caacccaag aacaccctgt atctgcaaat gaacagcctg 60

agggccgagg acacggccct gtattactgt gcgaga 96

<210> 96

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH3 Variable Heavy chain - HFR4 (DNA)

<400> 96

tggggccagg gcaccctggt cactgtctcc tca 33

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HCDR1 (protein)

<400> 97

Asn Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HCDR2 (protein)

<400> 98

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HCDR3 (protein)

<400> 99

His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 100

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - VH (protein)

<400> 100

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val

35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 101		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HCDR1 (DNA)		
<400> 101		
aactactaca tgagc		15
<210> 102		
<211> 51		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HCDR2 (DNA)		
<400> 102		
gccattaaca gtgacggagg catcacctac tacctggaca ccgtgaaggg c		51
<210> 103		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HCDR3 (DNA)		
<400> 103		
cacaggagcg gctacttctc tatggactac		30
<210> 104		
<211> 357		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - VH (DNA)		
<400> 104		
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggatc cctgagactc		60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aactactaca tgagctgggt gcgccaggct		120
ccaggaagg ggctggagct ggttgccgcc attaacagtg acggtggcat cacctactac		180

ctggacaccg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag ggccgaggac acggccctgt attactgtgc gagacacagg 300
agcggctact tctctatgga ctactggggc cagggcaccc tggtcactgt ctctca 357

<210> 105

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HFR1 (protein)

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 106

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HFR2 (protein)

<400> 106

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

1 5 10

<210> 107

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HFR3 (protein)

<400> 107

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

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HFR4 (protein)

<400> 108

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 109

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HFR1 (DNA)

<400> 109

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggatc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt 90

<210> 110

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HFR2 (DNA)

<400> 110

tgggtgcgcc aggctccagg gaaggggctg gagctggttg cc 42

<210> 111

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HFR3 (DNA)

<400> 111

cgattcacca tctccaggga caacccaag aacacctgt atctgcaaat gaacagcctg 60

agggccgagg acacggccct gtattactgt gcgaga 96

<210> 112

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH4 Variable Heavy chain - HFR4 (DNA)

<400> 112

tggggccagg gcaccctggc cactgtctcc tca 33

<210> 113

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HCDR1 (protein)

<400> 113

Asn Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 114

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HCDR2 (protein)

<400> 114

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HCDR3 (protein)

<400> 115

His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 116

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - VH (protein)

<400> 116

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

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

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

<210> 117

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HCDR1 (DNA)

<400> 117

aactactaca tgagc 15

<210> 118

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HCDR2 (DNA)

<400> 118

gccattaaca gtgacggtgg catcacctac tacctggaca ccgtgaaggg c 51

<210> 119

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HCDR3 (DNA)

<400> 119

cacaggagcgc gctacttctc tatggactac 30

<210> 120

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - VH (DNA)

<400> 120

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggatc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aactactaca tgagctgggt gcgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggttgccgcc attaacagtg acggtggcat cacctactac 180
ctggacaccg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag ggccgaggac acggccctgt attactgtgc gagacacagg 300

agcggctact tctctatgga ctactggggc cagggcaccc tggctactgt ctctca 357

<210> 121

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HFRL (protein)

<400> 121

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 122

<211> 14

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HFR2 (protein)

<400> 122

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

1 5 10

<210> 123

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HFR3 (protein)

<400> 123

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

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 124

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HFR4 (protein)

<400> 124

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 125

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HFR1 (DNA)

<400> 125

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggatc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt 90

<210> 126

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HFR2 (DNA)

<400> 126

tgggtgcgcc aggtccagg gaaggggctg gagggggtg cc 42

<210> 127

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HFR3 (DNA)

<400> 127

cgattcacca tctccaggga caacgccaag aacaccctgt atctgcaaat gaacagcctg 60

agggccgagg acacggccct gtattactgt gcgaga 96

<210> 128

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab humanised VH5 Variable Heavy chain - HFR4 (DNA)

<400> 128

tggggccagg gcaccctggt cactgtctcc tca 33

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LCDR1 (protein)

<400> 129

Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala Val Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LCDR2 (protein)

<400> 130

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LCDR3 (protein)

<400> 131

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 132

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- VL (protein)

<400> 132

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Thr Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 133

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LCDR1 (DNA)
 <400> 133
 aaggccagtc agaattgtgtt ttctgctgtt gcc 33
 <210> 134
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LCDR2 (DNA)
 <400> 134
 tcagcatcca atcggtacac t 21
 <210> 135
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LCDR3 (DNA)
 <400> 135
 caacaatata gcaactatcc gtggacg 27
 <210> 136
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- VL (DNA)
 <400> 136
 gacattgtga tgaccagtc tcaaagattc atgtccacaa cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtc gaattgtgtt tctgctgttg cctggatatca acagaaacca 120
 ggacaatctc ctaaactact gatttactca gcatccaatc ggtacactgg agtcctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccattagcaa tatgcagtct 240
 gaagacctgg ctgatttttt ctgtcaacaa tatagcaact atccgtggac gtccggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321
 <210> 137

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LFR1 (protein)

<400> 137

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Thr Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys

20

<210> 138

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LFR2 (protein)

<400> 138

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

1 5 10 15

<210> 139

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LFR3 (protein)

<400> 139

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Phe Phe Cys

20 25 30

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LFR4 (protein)

<400> 140

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 141

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LFR1 (DNA)

<400> 141

gacattgtga tgacccagtc tcaaagattc atgtccacaa cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctgc 69

<210> 142

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LFR2 (DNA)

<400> 142

tggtatcaac agaaaccagg acaatctcct aaactactga ttac 45

<210> 143

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LFR3 (DNA)

<400> 143

ggagtcctgt atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag atttactct caccattagc 60

aatatgcagt ctgaagacct ggctgatttt ttctgt 96

<210> 144

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Chimeric Vk0 Variable light chain- LFR4 (DNA)

<400> 144

ttcgggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 30

<210> 145

<211> 11

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LCDR1 (protein)

<400> 145

Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala Val Ala

1 5 10

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LCDR2 (protein)

<400> 146

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LCDR3 (protein)

<400> 147

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 148

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- VL (protein)

<400> 148

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 149

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LCDR1 (DNA)

<400> 149

aaggcaagtc agaacgtggt gagtgctgtg gcc 33

<210> 150

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LCDR2 (DNA)

<400> 150

agcgctcca acaggtacac c 21

<210> 151

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LCDR3 (DNA)

<400> 151

caacagtaca gcaattaccc ttggacg 27

<210> 152

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- VL (DNA)

<400> 152

gacatcgtga tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggcaagtca gaacgtggtg agtgctgtgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcaggctc ctaagctcct gatctatagc gcctccaaca ggtacaccgg ggtcccagac 180

aggttcaccg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagagc 240

gaagatctgg cagactatct ctgtcaacag tacagcaatt acccttgac gttcggcggc 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 153

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LFR1 (protein)

<400> 153

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 154

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LFR2 (protein)

<400> 154

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

1 5 10 15

<210> 155

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LFR3 (protein)

<400> 155

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys

20 25 30

<210> 156

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LFR4 (protein)

<400> 156

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 157

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LFR1 (DNA)

<400> 157

gacatcgtga tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgc 69

<210> 158

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LFR2 (DNA)

<400> 158

tggtatcagc agaaaccagg gcaggctcct aagctcctga tctat 45

<210> 159

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LFR3 (DNA)

<400> 159

gggtcccag acaggttcac cggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc 60

agcctgcaga gcgaagatct ggcagactat ttctgt 96

<210> 160

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk1 Variable light chain- LFR4 (DNA)

<400> 160

ttcggcggcg ggaccaaggt ggaaatcaaa 30

<210> 161

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LCDR1 (protein)

<400> 161

Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala Val Ala

1 5 10

<210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LCDR2 (protein)

<400> 162

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LCDR3 (protein)

<400> 163

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 164

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- VL (protein)

<400> 164

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 165

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LCDR1 (DNA)

<400> 165

aaggcaagtc agaacgtggt gagtgctgtg gcc

33

<210> 166

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LCDR2 (DNA)

<400> 166

agcgcctcca acaggtacac c 21

<210> 167

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LCDR3 (DNA)

<400> 167

caacagtaca gcaattaccc ttggacg 27

<210> 168

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- VL (DNA)

<400> 168

gacatcgtga tgaccacgac tccatccagc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggcaagtca gaacgtgggtg agtgcgtgtgg cctgggtatca gcagaaacca 120

gggcaggctc ctaggctcct gatctatagc gcctccaaca ggtacaccgg ggtcccagac 180

aggttcaccg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcaggcc 240

gaagatctgg cagactatct ctgtcaacag tacagcaatt acccttggac gttcggcggc 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 169

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LFR1 (protein)

<400> 169

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 170

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LFR2 (protein)

<400> 170

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

1 5 10 15

<210> 171

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LFR3 (protein)

<400> 171

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys

20 25 30

<210> 172

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LFR4 (protein)

<400> 172

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 173

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LFR1 (DNA)

<400> 173
gacatcgtga tgaccacgagc tccatccagc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgc 69

<210> 174

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LFR2 (DNA)

<400> 174
tggtatcagc agaaaccagg gcaggctcct aggctcctga tctat 45

<210> 175

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LFR3 (DNA)

<400> 175
ggggtcccag acaggttcac cggcagtgga tctgggacag atttactct caccatcagc 60
agcctgcagg ccgaagatct ggcagactat ttctgt 96

<210> 176

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk2 Variable light chain- LFR4 (DNA)

<400> 176
ttcggcggcg ggaccaaggt ggaaatcaaa 30

<210> 177

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LCDR1 (protein)

<400> 177

Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala Val Ala

1 5 10

<210> 178

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LCDR2 (protein)

<400> 178

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LCDR3 (protein)

<400> 179

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 180

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- VL (protein)

<400> 180

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

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

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 181

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LCDR1 (DNA)

<400> 181

aaggcaagtc agaacgtggt gagtgctgtg gcc 33

<210> 182

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LCDR2 (DNA)

<400> 182

agcgctcca acaggtacac c 21

<210> 183

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LCDR3 (DNA)

<400> 183

caacagtaca gcaattaccc ttggacg 27

<210> 184

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- VL (DNA)

<400> 184

gacatccaga tgaccagtc tccatccagc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggcaagtca gaacgtggtg agtgctgtgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcaggctc ctaggctcct gatctatagc gcctccaaca ggtacaccgg ggtcccagac 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcaggcc 240
 gaagatctgg cagactatit ctgtcaacag tacagcaatt acccttggac gttcggcggc 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 185

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LFR1 (protein)

<400> 185

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 186

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LFR2 (protein)

<400> 186

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

1 5 10 15

<210> 187

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LFR3 (protein)

<400> 187

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys

20 25 30

<210> 188

<211> 10

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LFR4 (protein)

<400> 188

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 189

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LFR1 (DNA)

<400> 189

gacatccaga tgaccagtc tccatccagc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgc 69

<210> 190

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LFR2 (DNA)

<400> 190

tggtatcagc agaaaccagg gcaggtcct aggtcctga tctat 45

<210> 191

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LFR3 (DNA)

<400> 191

ggggtccag acaggttcag cggcagtga tctgggacag atttactct caccatcagc 60

agcctgcagg ccgaagatct ggcagactat ttctgt 96

<210> 192

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk3 Variable light chain- LFR4 (DNA)

<400> 192

ttcggcggcg ggaccaaggt ggaaatcaaa 30

<210> 193

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LCDR1 (protein)

<400> 193

Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala Val Ala

1 5 10

<210> 194

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LCDR2 (protein)

<400> 194

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LCDR3 (protein)

<400> 195

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 196

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- VL (protein)

<400> 196

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 197

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LCDR1 (DNA)

<400> 197

aaggcaagtc agaacgtggt gaggctgtg gcc 33

<210> 198

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LCDR2 (DNA)

<400> 198

agcgctcca acaggtacac c 21

<210> 199

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LCDR3 (DNA)

<400> 199

caacagtaca gcaattaccc ttggacg 27

<210> 200

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain - VL (DNA)

<400> 200

gacatccaga tgacccagtc tccatccagc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggcaagtca gaacgtggtg agtgctgtgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcaggctc ctaggctcct gatctatagc gcctccaaca ggtacaccgg ggtcccagac 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggcc 240

gaagatctgg cagactatta ctgtcaacag tacagcaatt acccttggac gttcggcggc 300

gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 201

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LFR1 (protein)

<400> 201

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 202

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LFR2 (protein)

<400> 202

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

1 5 10 15

<210> 203

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LFR3 (protein)

<400> 203

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 204

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain- LFR4 (protein)

<400> 204

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 205

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain - LFR1 (DNA)

<400> 205

gacatccaga tgaccagtc tccatccagc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgc 69

<210> 206

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain - LFR2 (DNA)

<400> 206

tggtatcagc agaaaccagg gcaggctcct aggtcctga tctat 45

<210> 207

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain - LFR3 (DNA)

<400> 207

ggggtcccag acaggttcag cggcagtggg tctgggacag attcactct caccatcagc 60

agcctgcagg ccgaagatct ggcagactat tactgt 96

<210> 208

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk4 Variable light chain - LFR4 (DNA)

<400> 208

ttcggcggcg ggaccaaggt ggaaatcaaa 30

<210> 209

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LCDR1 (protein)

<400> 209

Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala Val Ala

1 5 10

<210> 210

<211> 7

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LCDR2 (protein)

<400> 210

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 211

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LCDR3 (protein)

<400> 211

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 212

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - VL (protein)

<400> 212

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 213

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LCDR1 (DNA)

<400> 213

aaggcaagtc agaacgtggt gagtgctgtg gcc 33

<210> 214

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LCDR2 (DNA)

<400> 214

agcgctcca acaggtacac c 21

<210> 215

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LCDR3 (DNA)

<400> 215

caacagtaca gcaattaccc ttggacg 27

<210> 216

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - VL (DNA)

<400> 216

gacatccaga tgaccagtc tccatccagc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggcaagtc gaacgtggtg agtgctgtgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcaggctc ctaggaggct gatctatagc gcctccaaca ggtacaccgg ggtcccagac 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggcc 240

gaagatctgg cagactatta ctgtcaacag tacagcaatt acccttggac gttcggcggc 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 217

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LFR1 (protein)

<400> 217

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 218

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LFR2 (protein)

<400> 218

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

1 5 10 15

<210> 219

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LFR3 (protein)

<400> 219

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 220

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LFR4 (protein)

<400> 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 221
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LFR1 (DNA)
 <400> 221
 gacatccaga tgaccagtc tccatccagc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgc 69

<210> 222
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LFR2 (DNA)
 <400> 222
 tggtatcagc agaaaccagg gcaggctcct aggaggctga tctat 45

<210> 223
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LFR3 (DNA)
 <400> 223
 ggggtcccag acaggttcag cggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc 60
 agcctgcagg ccgaagatct ggcagactat tactgt 96

<210> 224
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Girentuximab Humanised Vk5 Variable light chain - LFR4 (DNA)
 <400> 224
 ttcggcggcg ggaccaaggt ggaaatcaaa 30

<210> 225
 <211> 330
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab unmodified human IgG1 constant chain region - IgG1
HC (protein)

<400> 225

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

 <210> 226
 <211> 330

 <212>

 PRT

 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Girentuximab modified human IgG1 constant chain region - IgG1
 H310A H435Q HC (protein)

 <400> 226

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

 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330

<210> 227

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab modified human IgG4 constant chain region - IgG4
S228P L235E HC (protein)

<400> 227

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 228

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Girentuximab modified human IgG4 constant chain region - IgG4
S228P L235E H310A H435Q HC (protein)

<400> 228

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 229
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Girentuximab kappa light chain constant region - Human ? LC
constant region (protein)
<400> 229

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 230
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Girentuximab native IgG1 allotype Gm (1,17) VH4 heavy chain -
IgG1 VH4 heavy chain (protein)

<400> 230

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 231

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGirentuximab IgG1 allotype Gm (1,17) RADmAb VH4 heavy chain -

FcRn-null IgG1 allotype H130A H435Q (protein)

<400> 231

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val

35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

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

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

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

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 232

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGirentuximab IgG4 RADmAb VH4 heavy chain - FcR?-null IgG4

S228P L235E

(protein)

<400> 232

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val

35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220

 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 233

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGirentuximab IgG4 RADmAb VH4 heavy chain - FcRn+FcR?-null IgG4

S228P L235E H310A H435Q (protein)

<400> 233

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

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

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

35 40 45
Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

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

85 90 95
Ala Arg His Arg Ser Gly Tyr Phe Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

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

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 234

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGirentuximab V? Light Chain - V? Light Chain (protein)

<400> 234

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Val Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 235

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ANT4044-A2 unmodified human IgG1 heavy chain constant

region - IgG1 HC (protein)

<400> 235

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 236

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ANT4044-A2 modified human IgG1 heavy chain constant
 region - IgG1 H310A H435Q HC (protein)

<400> 236

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 237

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ANT4044-A2 modified human IgG4 constant chain region -
IgG4 S228P L235E H310A H435Q HC (protein)

<400> 237

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

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

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

130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 238

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044/ANT4044-A2 kappa light chain constant region

Human Kappa

LC constant region (protein)

<400> 238

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

<210> 239

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 RADmAb IgG1 heavy chain (HuX592r) - FcRn-null, IgG1
 allotype G1m(3) H310A H435Q (protein)

<400> 239

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

85 90 95
Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val

130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys

195 200 205
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys

210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300
Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

420 425 430
Gln Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 240

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044 RADmAb IgG4 heavy chain - FcRn+FcR Gamma-null, IgG4 S228P

L235E H310A H435Q (protein)

<400> 240

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30
Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val

130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

180 185 190

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys

195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys

210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

290 295 300

Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu

340 345 350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

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

405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr

420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440

<210> 241

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-A2 RADmAb IgG1 heavy chain - FcRn-null, IgG1 H310A H435Q
(protein)

<400> 241

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30
Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60
Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65	70							75							80						
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys						
				85							90						95				
Ala	Ala	Tyr	Trp	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr						
				100							105						110				
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro						
				115							120						125				
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val						
				130							135						140				
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala						
				145			150							155						160	
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly						
				165							170						175				
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly						
				180							185						190				
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys						
				195							200						205				
Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys						
				210							215						220				
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu						
				225			230							235						240	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu						
				245							250						255				
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys						
				260							265						270				
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys						
				275							280						285				
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu						
				290							295						300				
Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys						
				305			310							315						320	

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

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

420 425 430

Gln Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 242

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ANT4044-A2 RADmAb IgG4 heavy chain - FcRn+FcR Gamma-null IgG4

S228P L235E H310A H435Q

(protein)

<400> 242

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50	55	60	
Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Ala Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr			
	100	105	110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro			
	115	120	125
Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val			
	130	135	140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala			
145	150	155	160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly			
	165	170	175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly			
	180	185	190
Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys			
	195	200	205
Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys			
	210	215	220
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
225	230	235	240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	245	250	255
Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp			
	260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	275	280	285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	290	295	300

Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 340 345 350
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 243

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANT4044-ANT4044-A2 Vk Light chain - Vk Light chain (protein)

<400> 243

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

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Gln	Pro
65				70				75				80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu
85				90				95							
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
100				105				110							
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
115				120				125							
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
130				135				140							
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145				150				155				160			
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
165				170				175							
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
180				185				190							
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
195				200				205							
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
210															