



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099295
(43) 공개일자 2024년06월28일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
G01N 33/574 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7016339</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년10월13일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년05월17일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/125135</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/066133
국제공개일자 2023년04월27일</p> <p>(30) 우선권주장
202111208871.9 2021년10월18일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인
바이오세우스 인크.
중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완
타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비</p> <p>(72) 발명자
장, 젠칭
중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완
타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비
미아오, 샤오니우
중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완
타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
한라특허법인(유한)</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 24 항

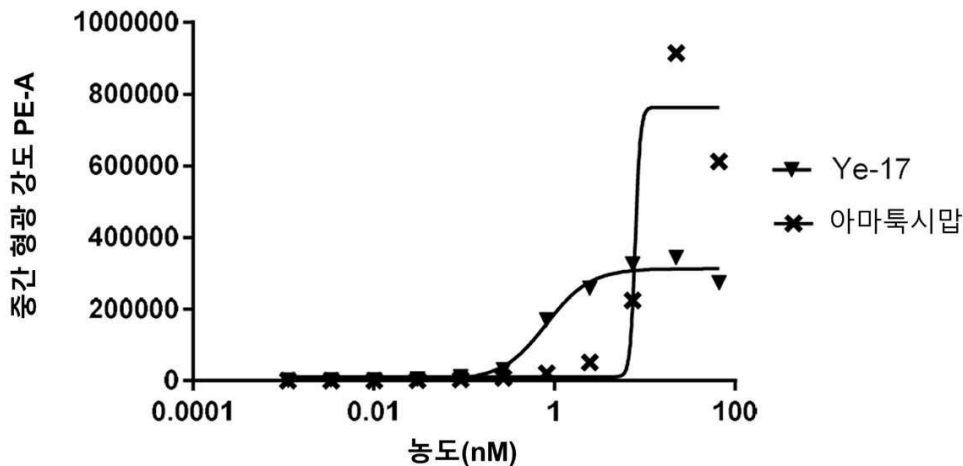
(54) 발명의 명칭 항-메조텔린 나노바디 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 MSLN에 특이적으로 결합하는 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편을 함유하는 조성물, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산, 이들을 포함하는 숙주 세포, 및 관련 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이들 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료적 및 진단적 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1

인간 MSLN을 과발현하는 CHO-S 세포에 대한 결합 활성



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/464468 (2023.05)
A61K 47/6803 (2023.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
G01N 33/574 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)

(72) 발명자

우, 판

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

리, 지위안

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

명세서

청구범위

청구항 1

MSLN에 특이적으로 결합할 수 있는 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

나노바디 또는 그의 항원-결합 단편은,

서열번호 4 및 6 내지 9 중 어느 하나에 기재된 가변 영역(VHH)에 포함된 CDR1 또는 그의 변이체, CDR2 또는 그의 변이체, CDR3 또는 그의 변이체를 포함하고;

변이체는 그것이 유래된 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖고; 바람직하게는, 치환은 보존적 치환이고;

바람직하게는, CDR은 IMGT, Kabat 또는 Chothia 넘버링 체계에 따라 정의되는, 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

나노바디 또는 그의 항원-결합 단편은,

서열번호 1에 기재된 서열을 갖는 CDR1 또는 그의 변이체, 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 CDR2 또는 그의 변이체, 및 서열번호 3에 기재된 서열을 갖는 CDR3 또는 그의 변이체를 포함하고;

변이체는 그것이 유래된 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖고, 바람직하게는, 치환은 보존적 치환이고;

바람직하게는, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 1에 기재된 서열을 갖는 CDR1, 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호 3에 기재된 서열을 갖는 CDR3을 포함하고;

바람직하게는, CDR은 IMGT 넘버링 시스템에 의해 정의되는, 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

(i) 서열번호 4에 기재된 서열;

(ii) 서열번호 4에 기재된 서열과 비교하여, 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열; 또는

(iii) 서열번호 4에 기재된 서열과 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인 서열

로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

바람직하게는, 치환은 보존적인 치환인, 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

나노바디 또는 그의 항원 결합 단편은 인간화되고;

바람직하게는, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편은 인간 면역글로불린의 중쇄 프레임워크 영역(예를 들어, 인간 면역글로불린 중쇄 배선 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 포함된 중쇄 프레임워크 영역)을 추가로 포함하고, 중쇄 프레임워크 영역은 선택적으로 인간 잔기로부터 낙타 잔기로의 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)의 역 돌연변이를 포함하는, 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

항체 또는 그의 항원 결합 단편은,

(i) 서열번호 10에 기재되거나, 또는 서열번호 10과 비교하여 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖거나, 또는 서열번호 10과 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인, FR1;

(ii) 서열번호 11 내지 13 중 어느 하나에 기재되거나, 또는 서열번호 11 내지 13 중 어느 하나와 비교하여 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖거나, 또는 서열번호 11 내지 13 중 어느 하나와 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인, FR2;

(iii) 서열번호 14 내지 16 중 어느 하나에 기재되거나, 또는 서열번호 14 내지 16 중 어느 하나와 비교하여 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖거나, 또는 서열번호 14 내지 16 중 어느 하나와 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인, FR3; 및/또는

(iv) 서열번호 17에 기재되거나, 또는 서열번호 17과 비교하여 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖거나, 또는 서열번호 17과 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인, FR4

를 포함하는, 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

나노바디 또는 그의 항원 결합 단편은,

(i) 서열번호 6 내지 9 중 어느 하나에 기재된 서열;

(ii) 서열번호 6 내지 9 중 어느 하나에 기재된 서열과 비교하여, 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열, 또는

(iii) 서열번호 6 내지 9 중 어느 하나에 기재된 서열과 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

바람직하게는, 치환은 보존적 치환인, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 7

MSLN에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드 구조체로서,

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 및 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하고,

바람직하게는, 면역글로불린 Fc 도메인은 임의로 펩티드 링커를 통해 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편의 N-말단 및/또는 C-말단(예를 들어, C-말단)에 결합되고;

바람직하게는, 면역글로불린 Fc 도메인은 IgG Fc 도메인(예를 들어, IgG1 Fc 도메인)이고;

바람직하게는, 면역글로불린 Fc 도메인은 서열번호 5에 기재된 서열, 또는 그 서열에 비해 서열 동일성이 적어

도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인 서열, 또는 이와 비교하여 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)을 갖는 서열을 포함하는, 폴리펩티드 구조체.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체를 코딩하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 9

제8항에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터; 바람직하게는 벡터는 클로닝 벡터 또는 발현 벡터인, 벡터.

청구항 10

제8항에 따른 핵산 분자 또는 제9항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체를 제조하는 방법으로서,

제10항에 따른 숙주 세포를, 단백질 발현을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계, 및 배양된 숙주 세포의 배양물로부터 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체를 회수하는 단계를 포함하는, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체의 제조 방법.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체를 포함하는 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체로서,

바람직하게는, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체는 MSLN에 특이적으로 결합하고, 추가적으로 하나 이상의 다른 표적에 특이적으로 결합하며;

바람직하게는, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체는 제2 표적에 대한 제2 결합 특이성을 갖는 적어도 하나의 제2 항체를 추가로 포함하는, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체.

청구항 13

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체, 및 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체에 결합된 치료제를 포함하는 접합체로서,

바람직하게는, 치료제는 세포독성제, 호르몬 약물, 생물학적 반응 조절제, 추가 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 같은 항종양 약물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 접합체.

청구항 14

항원 결합 도메인, 스페이서 도메인, 막 관통 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체로서,

항원 결합 도메인은 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하고;

바람직하게는, 키메라 항원 수용체는 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)에 의해 발현되는, 키메라 항원 수용체.

청구항 15

제14항에 따른 키메라 항원 수용체를 코딩하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 16

제15항에 따른 단리 핵산 분자를 포함하고; 바람직하게는 키메라 항원 수용체 T 세포를 제조하는데 사용되는 벡터.

청구항 17

제15항에 따른 단리 핵산 분자 또는 제16항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포로서,
 바람직하게는, 숙주 세포는 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)이고;
 바람직하게는, 숙주 세포는 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T)인, 숙주 세포.

청구항 18

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체, 제8항에 따른 단리된 핵산 분자, 제9항에 따른 벡터, 제10항에 따른 숙주 세포, 제12항에 따른 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 제13항에 따른 접합체, 제14항에 따른 키메라 항원 수용체, 제15항에 따른 단리된 핵산 분자, 제16항에 따른 벡터, 또는 제17항에 따른 숙주 세포를 포함하는 의약 조성물로서,
 바람직하게는, 의약 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 추가로 포함하고;
 바람직하게는, 의약 조성물은 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체, 제8항에 따른 단리된 핵산 분자, 제9항에 따른 벡터, 또는 제10항에 따른 숙주 세포를 포함하고;
 바람직하게는, 의약 조성물은 제12항에 따른 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체를 포함하고;
 바람직하게는, 의약 조성물은 제13항에 따른 접합체를 포함하고;
 바람직하게는, 의약 조성물은 제14항에 따른 키메라 항원 수용체, 제15항에 따른 단리된 핵산 분자, 제16항에 따른 벡터, 또는 제17항에 따른 숙주 세포를 포함하는, 의약 조성물.

청구항 19

대상체의 종양을 예방 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체, 제8항에 따른 단리된 핵산 분자, 제9항에 따른 벡터, 제10항에 따른 숙주 세포, 제12항에 따른 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 제13항에 따른 접합체, 제14항에 따른 키메라 항원 수용체, 제15항에 따른 단리된 핵산 분자, 제16항에 따른 벡터, 또는 제17항에 따른 숙주 세포, 또는 제18항에 따른 의약 조성물의 용도로서,
 바람직하게는, 종양은 MSLN-양성 종양이고;
 바람직하게는, 종양은 고형 종양, 예컨대 위암, 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 자궁경부암, 중피종 또는 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되고;
 바람직하게는, 대상체는 인간과 같은 포유동물이고;
 바람직하게는, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 폴리펩티드 구조체, 단리된 핵산 분자, 벡터, 숙주 세포, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 접합체, 키메라 항원 수용체, 또는 의약 조성물은 단독으로 사용되거나 또는 추가적인 약제학적 활성제(예를 들어, 항신생물제)와 조합하여 사용되는, 의약 조성물의 용도.

청구항 20

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체, 제8항에 따른 단리된 핵산 분자, 제9항에 따른 벡터, 제10항에 따른 숙주 세포, 제12항에 따른 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 제13항에 따른 접합체, 제14항에 따른 키메라 항원 수용체, 제15항에 따른 단리된 핵산 분자, 제16항에 따른 벡터, 또는 제17항에 따른 숙주 세포, 또는 제18항에 따른 의약 조성물의 유효량을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 종양을 예방 및/또는 치료하는 방법으로서,
 바람직하게는, 종양은 MSLN-양성 종양이고;
 바람직하게는, 종양은 고형 종양, 예컨대 위암, 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 자궁경부암, 중피종 또는 유방

암으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

바람직하게는, 대상체는 인간과 같은 포유동물인, 종양의 예방 및/또는 치료방법.

청구항 21

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체, 및 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체에 결합된 검출 가능 표지를 포함하는 집합체로서.

예를 들어 검출 가능한 표지는 효소(예를 들어, 양고추냉이 과산화효소 또는 알칼리성 포스파타제), 화학발광 시약(예를 들어, 아크리디늄 에스테르 화합물, 루미놀 및 그의 유도체, 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 비오틴을 포함하는 집합체.

청구항 22

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체, 또는 제21항에 따른 집합체를 포함하는 키트로서,

바람직하게는, 키트는 제21항에 따른 집합체를 포함하고;

바람직하게는, 키트는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체, 및 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체를 특이적으로 인식할 수 있는 제2 항체를 포함하고; 선택적으로, 제2 항체는 효소(예를 들어, 양고추냉이 과산화효소 또는 알칼리성 포스파타제), 화학발광 시약(예를 들어, 아크리디늄 에스테르 화합물, 루미놀 및 그의 유도체, 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 비오틴과 같은 검출 가능 표지를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 23

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체 또는 제21항에 따른 집합체를 포함하는, 시료 내에서 MSLN의 존재 또는 수준을 검출하는 방법으로서,

바람직하게는, 방법은 웨스턴 블롯, 효소 면역분석(예를 들어, ELISA), 화학발광 면역분석, 형광 면역분석, 또는 방사성 면역분석과 같은 면역분석이고;

바람직하게는, 방법은 제21항에 따른 집합체를 사용하는 것을 포함하고;

바람직하게는, 방법은 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체를 사용하는 것을 포함하고, 그리고 방법은, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체를 검출하기 위해, 검출 가능한 표지(예를 들어, 효소(예를 들어, 양고추냉이 과산화효소 또는 알칼리성 포스파타제), 화학발광 시약(예를 들어, 아크리디늄 에스테르 화합물, 루미놀 및 그의 유도체, 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 비오틴)를 담지하는 제2 나노바디를 사용하는 것을 추가로 포함하는, MSLN의 존재 또는 수준의 검출방법.

청구항 24

시료 내에서 MSLN의 존재 또는 수준을 검출하거나, 또는 MSLN을 표적으로 하는 항종양 요법에 의한 종양의 치료 가능 여부를 검출하기 위한 검출 시약의 제조에 있어서, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 제7항에 따른 폴리펩티드 구조체 또는 제21항에 따른 집합체의 용도로서,

바람직하게는, 검출 시약은 시료 내에서 MSLN의 존재 또는 수준을 검출하고, 선택적으로 제23항에 따른 방법에 의해 MSLN을 표적으로 하는 항종양 요법에 의해 종양이 치료 가능한지 여부를 검출하고;

바람직하게는, 시료는 세포 시료(예를 들어, 종양 세포를 함유하는 시료) 또는 대상체(예를 들어, 포유류, 예컨대, 인간)로부터의 체액 시료(예를 들어, 혈액)인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 MSLN에 특이적으로 결합하는 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물, 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 및 이를 포함하는 숙주 세포, 및 이와 관련된 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 및 진단 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메조텔린(MSLN)은 췌장암, 난소암, 중피종(mesothelioma) 및 기타 일부 암에서 고도로 발현되는 40 kDa 세포 표면 당단백질이다. MSLN은 소수의 환자의 혈액에도 분비된 가용성 형태의 sMSLN으로 존재할 수 있으므로, 혈액 내 MSLN 측정은 환자의 상태를 진단 및 추적하는 데 유용할 수 있다. MSLN 유전자는 분자량이 69 kDa인 전구체 단백질을 코딩하며, 이는 40 kDa의 막 결합 단백질(MSLN이라고 함)과 거핵구 강화 인자(MPF)라고 하는 31 kDa의 단편 내부로 가공되는 단편은 셀로부터 분비된다. MSLN은 암 특이적 항원이 아니며, 정상 흉막(pleura), 심낭(pericardium), 복막(peritoneum)의 중피세포(mesothelial cell)에서 발현될 수 있으나, 다양한 암세포에서도 높게 발현된다. 정상 조직에 대한 MSLN의 제한된 분포로 인해, MSLN은 중앙 특이적 치료의 유망한 표적이 된다.

[0003] 현재 MSLN을 표적으로 하는 다양한 항체 약물이나 세포 치료제가 임상 단계에 진입한 상태이다. 예를 들어, 바이엘(Bayer), 이뮤노젠(IMMUNOGEN), 모포시스(Morphosys) 및 기타 회사들이 개발한 항체-접합 약물 아네투맵 라브탄신은 임상 2상(NCT03926143)에서 고형 중앙 치료에 사용되어 왔고, 모포텍(morphotek)이 개발한, MSLN을 표적으로 하는 단일클론항체 약물 아마투시맵(AMATUXIMAB)도 고형 중앙 임상 사용되어 현재 임상 2상을 진행 중이며, 중국 인민해방군 군사외과대학과 TCR2 테라퓨틱스(Therapeutics)도 현재 임상시험 단계에 있는, MSLN을 표적으로 하는 CAR-T 치료제를 개발하였다. 기존 임상시험에서는 대부분 메조텔린 표적 치료법이 안전하지만 치료 효과가 미미한 것으로 나타났다.

[0004] 나노바디 또는 중쇄(heavy chain) 항체(hcAb)라고도 알려진 단일 도메인 항체(sdAb)는 낙타류와 상어의 혈청에서 단리된 항체로서, 그 부피는 기존 항체의 약 1/10이다. 기존 항체와는 달리, 단일 도메인 항체는 중쇄로만 구성되어 있고, 그 항원 결합 영역은 힌지 영역을 통해 Fc 영역과 연결된 단일 도메인에 불과하며, 이 항원 결합 영역은 항체와 분리된 후에도 여전히 항원과 결합하는 능력이 있다. 단일 도메인 항체는 분자량이 작고 안정성이 좋은 특징을 가지고 있다. 약물 개발 및 진단 시약 개발에서 전통적인 정상 항체와 비교하여, 조직 침윤(infiltration)이 우수하고, 투여가 유연하고, 인간화 정도가 높고, 재조합 단백질로의 변형이 용이하고, 그리고 기타 많은 이점을 가지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명자들은 광범위한 연구 끝에 항-MSLN 나노바디를 스크리닝하여 수득하였다. 나노바디는 MSLN에 대한 높은 결합 활성을 가지며, 인간, 원숭이 및/또는 마우스 MSLN과 교차 반응성을 갖는다. 또한, 나노바디는 분자량이 작고 안정성이 좋은 특성도 가지고 있다. 약물 개발 및 진단 시약 개발에서 전통적이고 일반적인 항체와 비교하여, 조직 침윤이 우수하고, 투여가 유연하고, 인간화 정도가 높으며, 재조합 단백질로의 변형이 용이하고, 그리고 기타 많은 이점을 가지고 있다.

[0006] 이를 기반으로, 본 발명은 또한, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산, 이를 포함하는 숙주 세포, 및 이들의 관련 용도를 제공한다.

[0007] 나노바디 및 그의 항원 결합 단편

[0008] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 MSLN에 특이적으로 결합할 수 있는 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 본 명세서에 기술된 나노바디는 일반적으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 및 FR4라고 불리우는 4개의 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 상보성 결정 영역(CDR)으로 구성된다. 항원 결합 단편은 MSLN에 특이적으로 결합하는 단편의 능력을 부여하기에 충분한 나노바디의 적어도 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 나노바

디는, 항원에 결합하는 능력 및 특이성을 실질적으로 유지하는 한, FR1 및/또는 FR4의 일부만을 포함하도록 N- 또는 C-말단에서 절단될 수 있거나, 또는 이러한 프레임워크 영역 중 하나 또는 둘이 결합될 수 있다.

- [0009] 특정 구현예에서, 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0010] 서열번호 4 및 6 내지 9 중 어느 하나에 기재된 가변 영역(VHH)에 포함된 CDR1 또는 그의 변이체, CDR2 또는 그의 변이체, CDR3 또는 그의 변이체; 여기서 변이체는 그것이 유래된 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는다. 특정 구현예에서, 치환은 보존적 치환이다.
- [0011] 특정 구현예에서, CDR은 IMGT, Kabat 또는 Chothia 넘버링 체계에 따라 정의된다.
- [0012] 특정 구현예에서, 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0013] 서열번호 1에 기재된 서열을 갖는 CDR1 또는 그의 변이체, 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 CDR2 또는 그의 변이체, 및 서열번호 3에 기재된 서열을 갖는 CDR3 또는 그의 변이체;
- [0014] 여기서 변이체는 그것이 유래된 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는다. 특정 구현예에서, 치환은 보존적 치환이다.
- [0015] 특정 구현예에서, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 1에 기재된 서열을 갖는 CDR1, 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호 3에 기재된 서열을 갖는 CDR3을 포함한다.
- [0016] 특정 구현예에서, CDR은 IMGT 넘버링 시스템에 의해 정의된다.
- [0017] 특정 구현예에서, 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편은 다음으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다:
- [0018] (i) 서열번호 4에 기재된 서열;
- [0019] (ii) 서열번호 4에 기재된 서열과 비교하여, 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열; 또는
- [0020] (iii) 서열번호 4에 기재된 서열과 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인 서열.
- [0021] 특정 구현예에서, 치환은 보존적인 치환이다.
- [0022] 특정 구현예에서, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편은 인간화된다.
- [0023] 특정 구현예에서, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편은 인간 면역글로불린의 중쇄 프레임워크 영역(예를 들어, 인간 면역글로불린 중쇄 배선 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 포함된 중쇄 프레임워크 영역)을 추가로 포함하고, 중쇄 프레임워크 영역은 선택적으로 인간 잔기로부터 낙타 잔기로의 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)의 역 돌연변이를 포함한다.
- [0024] 특정 구현예에서, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0025] (i) 서열번호 10에 기재되거나, 또는 서열번호 10과 비교하여 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖거나, 또는 서열번호 10과 비교하여 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인, FR1;
- [0026] (ii) 서열번호 11 내지 13 중 어느 하나에 기재되거나, 또는 서열번호 11 내지 13 중 어느 하나와 비교하여 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖거나, 또는 서열번호 11 내지 13 중 어느 하나와 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인, FR2;
- [0027] (iii) 서열번호 14 내지 16 중 어느 하나에 기재되거나, 또는 서열번호 14 내지 16 중 어느 하나와 비교하여 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖거나, 또는 서열번호 14 내지 16 중 어느 하나와 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도

98%, 적어도 99%, 또는 100%인, FR3; 및/또는

- [0028] (iv) 서열번호 17에 기재되거나, 또는 서열번호 17과 비교하여 하나 또는 수개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖거나, 또는 서열번호 17과 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인, FR4.
- [0029] 특정 구현예에서, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편은 다음으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다:
- [0030] (i) 서열번호 6 내지 9 중 어느 하나에 기재된 서열;
- [0031] (ii) 서열번호 6 내지 9 중 어느 하나에 기재된 서열과 비교하여, 하나 또는 여러 개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열, 또는
- [0032] (iii) 서열번호 6 내지 9 중 어느 하나에 기재된 서열과 비교하여, 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인 서열.
- [0033] 특정 구현예에서, 치환은 보존적 치환이다.
- [0034] 폴리펩티드 구조체
- [0035] 제2 양태에서, 본 발명은 또한 MSLN에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드 구조체를 제공하고, 이는 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 및 면역글로불린 Fc 도메인을 포함한다.
- [0036] 이러한 문맥에서, Fc 영역이라고도 불리는 Fc 도메인은 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 중쇄 불변(constant) 영역의 일부를 지칭한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 힌지(hinge), CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함한다. Fc 도메인이 힌지로 구성된 경우, 힌지는 2개의 Fc 함유 폴리펩티드들 사이의 이량체화를 매개한다. Fc 도메인은 임의의 항체 중쇄 불변 영역 이소형일 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 Fc 도메인이다.
- [0037] 특정 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드 구조체에 의해 포함된 Fc 도메인은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 천연 Fc 영역이다. 예를 들어, Fc 도메인은 천연 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc 영역, 천연 서열을 갖는 인간 IgG2 Fc 영역, 천연 서열을 갖는 인간 IgG3 Fc 영역, 또는 천연 서열을 갖는 인간 IgG4 Fc 영역일 수 있다. 천연 Fc 영역은 이펙터 기능을 가질 수 있다. 예시적인 "이펙터 기능"은 Fc 수용체에 대한 결합; C1q 결합 및 보체(complement) 의존성 세포독성(CDC); 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화 등을 포함한다. 기능적 변화는 천연 Fc 영역의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 잔기로 대체하거나 화학적 변형에 의해 생성될 수 있으며, 이러한 변화는 예를 들어, 이펙터 리간드(예를 들어, FcR 또는 보체 성분 C1q)에 대한 항체의 친화도를 변경하고, 그에 따라 이펙터 기능을 변경(예를 들어, 저하 또는 강화)하는 것을 포함한다.
- [0038] 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드 구조체에 의해 포함된 Fc 도메인은 또한 변이체 Fc 영역일 수 있으며, 이는 본 발명의 항체의 다음 특성 중 하나 이상을 변화시키기 위해 천연 Fc 영역과 비교하여 하나 이상(예를 들어, 1 내지 10개, 예를 들어 1 내지 5개)의 아미노산 돌연변이 또는 화학적 변형을 포함할 수 있다: Fc 수용체 결합, 항체 글리코실화, 시스테인 잔기의 수, 이펙터 세포 기능 또는 보체 기능 등.
- [0039] 특정 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드 구조체에 의해 포함된 Fc 도메인은 ADCC 활성을 보유한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드 구조체에 포함된 Fc 도메인은 ADCC 활성을 보유하지 않는다.
- [0040] 특정 구현예에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 임의로 펩티드 링커를 통해 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편의 N-말단 및/또는 C-말단(예를 들어, C-말단)에 링크된다.
- [0041] 특정 구현예에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 IgG Fc 도메인(예를 들어, IgG1 Fc 도메인)이다.
- [0042] 특정 구현예에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 서열번호 5에 기재된 서열, 또는 그 서열에 비해 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%인 서열, 또는 이와 비교하여 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열을 포함한다.

- [0043] 나노바디 및 폴리펩티드 구조체의 제조
- [0044] 본 발명의 나노바디 또는 폴리펩티드 구조체는 본 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있으며, 예를 들어, 유전공학적 재조합 기술에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 나노바디 또는 폴리펩티드 구조체를 코딩하는 DNA 분자는 화학적 합성 또는 PCR 증폭을 통해 수득될 수 있다. 생성된 DNA 분자는 발현 벡터에 삽입된 다음, 숙주 세포에 형질감염된다. 그 다음, 형질감염된 숙주 세포를 특정 조건하에서 배양하고, 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드 구조체를 발현시킨다.
- [0045] 본 발명의 항원-결합 단편은 온전한 나노바디 분자를 가수분해함으로써 얻어질 수 있다(Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117(1992) 및 Brennan et al., Science 229:81(1985) 참조). 게다가, 이들 항원-결합 단편은 또한 재조합 숙주 세포로부터 직접 생산될 수도 있다(Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557(1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370(2000)에서 검토됨). 본 기술분야의 숙련자들은 이러한 항원-결합 단편을 제조하기 위한 다른 기술을 잘 알고 있다.
- [0046] 핵산 분자
- [0047] 제3 양태에서, 본 발명은 또한 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 위에서 설명한 폴리펩티드 구조체를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0048] 벡터
- [0049] 제4 양태에서, 본 발명은 위에서 설명한 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 구현예에서, 벡터는 클로닝 벡터 또는 발현 벡터이다.
- [0050] 숙주 세포
- [0051] 제5 양태에서, 본 발명은 위에서 설명한 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 이러한 숙주 세포로는 박테리아 세포(예를 들어, *E. coli* 세포)와 같은 원핵 세포, 및 진균 세포(예를 들어, 효모 세포), 곤충 세포, 식물 세포, 및 동물 세포(예를 들어, 포유동물 세포, 예를 들어, 마우스 세포, 인간 세포, 등)와 같은 진핵 세포가 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 제조 방법
- [0053] 제6 양태에서, 본 발명은 위에서 설명한 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 위에서 설명한 폴리펩티드 구조체를 제조하는 방법을 제공하는데, 이는 단백질 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 위에서 설명한 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 배양된 숙주 세포의 배양물로부터 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0054] 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체
- [0055] 제7 양태에서, 본 발명은 또한 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 위에서 설명한 폴리펩티드 구조체를 포함하는 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체의 제조에서 본 발명의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체, 또는 이를 코딩하는 핵산 분자, 벡터 또는 숙주 세포의 용도를 제공한다.
- [0056] 특정 구현예에서, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체는 MSLN에 특이적으로 결합하고, 추가로 하나 이상의 다른 표적에 특이적으로 결합한다.
- [0057] 특정 구현예에서, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체는 제2 표적에 대한 제2 결합 특이성을 갖는 적어도 하나의 제2 항체를 추가로 포함한다.
- [0058] 접합체
- [0059] 8 양태에서, 본 발명은 또한 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 위에서 설명한 폴리펩티드 구조체를 포함하는 접합체, 및 상기에서 기재한 바와 같은 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체에 접합된 치료제를 제공한다. 본 발명은 또한 접합체의 제조에서 본 발명의 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체, 또는 이를 코딩하는 핵산 분자, 벡터 또는 숙주 세포의 용도를 제공한다.
- [0060] 특정 구현예에서, 치료제는 세포독성제, 호르몬제, 생물학적 반응 조절제, 추가적 항체 또는 그의 항원 결합 단

편과 같은 항신생물제(antineoplastic agent)로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0061] 키메라 항원 수용체

[0062] 제9 양태에서, 본 발명은 또한 항원 결합 도메인, 스페이서 도메인, 막 횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인(예를 들어, 1차 신호전달 도메인 및/또는 공동자극 신호전달 도메인)을 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공하고, 여기서 항원 결합 도메인은 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 본 발명은 또한 키메라 항원 수용체 또는 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포의 제조에서 본 발명의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체, 또는 이들을 코딩하는 핵산 분자, 벡터 또는 숙주 세포의 용도를 제공한다.

[0063] 특정 구현예에서, 항원 결합 도메인은 MSLN을 인식하는 능력을 키메라 항원 수용체에 부여하고; 스페이서 도메인은 단백질의 구조적 유연성을 촉진하고 서로 관련하여 하나 또는 두 개의 도메인의 이동을 가능하게 하고; 막 횡단 도메인은 세포막(특히 진행 세포막)과 결합될 때 열역학적으로 안정할 수 있으며; 세포내 신호전달 도메인은 효과적인 항원 수용체 결합 신호를 면역 이펙터 세포의 내부로 전달하거나, CAR 발현 면역 이펙터 세포의 적어도 하나의 정상적인 이펙터 기능을 활성화하거나, 또는 CAR 발현 면역 이펙터 세포에 의한 적어도 하나의 사이토카인의 분비를 향상시킨다.

[0064] 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)에 의해 발현된다.

[0065] 제10 양태에서, 본 발명은 또한 위에서 설명한 키메라 항원 수용체를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

[0066] 제11 양태에서, 본 발명은 또한 위에서 설명한 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 구현예에서, 단리된 핵산 분자는 키메라 항원 수용체 T 세포를 제조하는데 사용된다.

[0067] 제12 양태에서, 본 발명은 또한 위에서 설명한 단리된 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0068] 특정 구현예에서, 숙주 세포는 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)이다.

[0069] 특정 구현예에서, 숙주 세포는 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T)이다.

[0070] 의약 조성물

[0071] 제13 양태에서, 본 발명은 또한 제1 양태의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 제2 양태의 폴리펩티드 구조체, 제7 양태의 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 제8 양태의 접합체, 제9 양태의 키메라 항원 수용체, 제3 또는 제10 양태의 단리된 핵산 분자, 제4 또는 제11 양태의 벡터, 또는 제5 또는 제12 양태의 숙주 세포를 포함하는 의약 조성물을 제공한다.

[0072] 특정 구현예에서, 의약 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 추가로 포함한다.

[0073] 특정한 예시적 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제는 멸균 주사용 액체(예를 들어, 수성 또는 비 수성 현탁액 또는 용액)를 포함한다. 특정한 예시적 구현예에서, 이러한 멸균 주사용 액체는 주사용수(WFI), 정균 주사용수(BWFI), 염화나트륨 용액(예를 들어, 0.9%(w/v) NaCl), 텍스트로스 용액(예를 들어, 5% 글루코스), 계면활성제 함유 용액(예를 들어, 0.01% 폴리소르베이트 20을 함유한 용액), pH 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 용액), 링거 용액, 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0074] 특정 구현예에서, 의약 조성물은 제1 양태의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 제2 양태의 폴리펩티드 구조체, 제3 양태의 단리된 핵산 분자, 제4 양태의 벡터, 또는 제5 양태의 숙주 세포를 포함한다.

[0075] 특정 구현예에서, 의약 조성물은 위에서 설명한 제7 양태의 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체를 포함한다.

[0076] 특정 구현예에서, 의약 조성물은 위에서 설명한 제8 양태의 접합체를 포함한다.

[0077] 특정 구현예에서, 의약 조성물은, 위에서 설명한 제9 양태의 키메라 항원 수용체, 제10 양태의 단리된 핵산 분자, 제11 양태의 벡터, 또는 제12 양태의 숙주 세포를 포함한다.

[0078] 의약 용도

[0079] 제14 양태에서, 본 발명은 또한, 대상체의 종양을 예방 및/또는 치료하기 위한 의약품의 제조에서, 제1 양태의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 제2 양태의 폴리펩티드 구조체, 제7 양태의 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 제8 양태의 접합체, 제9 양태의 키메라 항원 수용체, 제3 양태 또는 제10 양태의 단리된 핵산 분자, 제4 양태 또는 제11 양태의 벡터, 제5 양태 또는 제12 양태의 숙주 세포, 또는 제13 양태의 의약 조성물의 용도를

제공한다.

- [0080] 특정 구현예에서, 종양은 MSLN-양성 종양이다.
- [0081] 특정 구현예에서, 종양은 고형 종양, 예컨대 위암, 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 자궁경부암, 중피종 또는 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이러한 종양이 MSLN을 고도로 발현한다는 것은 본 기술분야에 공지되어 있다(예를 들어, Aurore et al., cancer discovery, 2016 참조).
- [0082] 특정 구현예에서, 대상체는 인간과 같은 포유동물이다.
- [0083] 특정 구현예에서, 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 폴리펩티드 구조체, 단리된 핵산 분자, 벡터, 숙주 세포, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 접합체, 키메라 항원 수용체, 또는 의약 조성물은 단독으로 또는 추가적인 약학적 활성제(예를 들어, 항신생물제)와 조합하여 사용된다.
- [0084] 종양의 예방 및/또는 치료 방법
- [0085] 제15 양태에서, 본 발명은 또한, 대상체의 종양을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공하고, 이 방법은 제1 양태의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 제2 양태의 폴리펩티드 구조체, 제7 양태의 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 제8 양태의 접합체, 제9 양태의 키메라 항원 수용체, 제3 양태 또는 제10 양태의 단리된 핵산 분자, 제4 양태 또는 제11 양태의 벡터, 제5 양태 또는 제12 양태의 숙주 세포, 또는 제13 양태의 의약 조성물의 유효량을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0086] 특정 구현예에서, 종양은 MSLN 양성 종양이다.
- [0087] 특정 구현예에서, 종양은 위암, 폐암, 난소암, 식도암, 췌장암, 자궁경부암, 중피종 또는 유방암과 같은 고형 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0088] 특정 구현예에서, 대상체는 인간과 같은 포유동물이다.
- [0089] 본 발명의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 폴리펩티드 구조체, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 또는 의약 조성물은, 정제, 환, 현탁액, 에멀전, 용액, 겔, 캡슐, 분말, 과립, 영약, 로젠, 좌제, 주사제(주사용 용액, 주사용 멸균 분말, 및 주사용 농축 용액을 포함), 흡입제, 스프레이 등과 같은 의료 분야에 공지된 임의의 제형으로 제형화될 수 있다. 바람직한 투여 형태는 의도된 투여 및 치료적 사용 방식에 따라 달라진다. 본 발명의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 폴리펩티드 구조체, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 또는 의약 조성물은 생산 및 저장 조건하에서 멸균되고 안정해야 한다. 바람직한 제형 중 하나는 주사 가능한 용액이다. 이러한 주사액은 무균 주사용 용액일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 폴리펩티드 구조체, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 또는 의약 조성물의 필요한 투여량을 적절한 용매에 혼입하고, 선택적으로 여기에 다른 원하는 성분(pH 조절제, 계면활성제, 보조제, 이온 강도 증진제, 등장제, 보존제, 희석제, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)을 동시에 혼입한 후, 이어서 필터 멸균함으로써 멸균 주사 가능한 용액을 제조할 수 있다. 또한, 멸균 주사용 용액은 저장 및 사용의 용이성을 위해 멸균 동결 건조 분말(예를 들어, 진공 건조 또는 동결 건조에 의해)로서 제조될 수 있다. 이러한 멸균 동결건조 분말은 사용 전에 적합한 담체, 예를 들어, 주입용수(WFI), 주입용 정균수(BWFI), 염화나트륨 용액(예를 들어, 0.9%(w/v) NaCl), 글루코스 용액(예를 들어, 5% 글루코스), 계면활성제 함유 용액(예를 들어, 0.01% 폴리소르베이트 20을 함유하는 용액), pH 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 용액), 링거 용액, 및 이들의 임의의 조합물에 분산될 수 있다.
- [0090] 본 발명의 나노바디 또는 항원 결합 단편, 폴리펩티드 구조체, 이중특이성 또는 다중특이성 항체, 또는 의약 조성물은, 본 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법, 즉 비 제한적인 예로서, 경구, 협측(buccal), 설하, 안과, 국소, 비경구, 직장, 척수강내, 수조내, 서혜부, 방광내, 국소(topical)(예를 들어, 분말, 연고 또는 점적(drop)) 또는 비강 경로에 의해 투여될 수 있다. 그러나 많은 치료 용도의 경우, 양호한 투여 경로/방식은 비경구(예를 들어, 정맥내 또는 볼루스 주사, 피하 주사, 복강내 주사, 근육내 주사)이다. 본 기술분야의 숙련자는 투여 경로 및/또는 투여 방식이 의도된 목적에 따라 달라질 것임을 이해할 것이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 폴리펩타이드 구조체, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 또는 의약 조성물은 정맥내 주사 또는 볼루스 주사에 의해 투여된다.
- [0091] 검출 적용
- [0092] 접합체

- [0093] 제16 양태에서, 본 발명은 또한 접합체를 제공하고, 이는 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 위에서 설명한 폴리펩티드 구조체, 및 본 발명의 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체에 접합된 검출 가능 표지를 포함한다. 특정 구현예에서, 검출 가능한 표지는 효소(예를 들어, 양고추냉이 과산화효소 또는 알칼리성 포스파타제), 화학발광 시약(예를 들어, 아크리디늄 에스테르 화합물, 루미놀 및 그의 유도체, 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 비오틴이다.
- [0094] 키트
- [0095] 제17 양태에서, 본 발명은 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 위에서 설명한 폴리펩티드 구조체 또는 위에서 설명한 제16 양태의 접합체를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0096] 특정 구현예에서, 키트는 위에서 설명한 제16 양태의 접합체를 포함한다.
- [0097] 특정 구현예에서, 키트는 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편, 및 위에서 설명한 폴리펩티드 구조체, 및 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편을 특이적으로 인식할 수 있는 제2 항체 또는 폴리펩티드 구조체를 포함한다. 선택적으로, 제2 항체는 효소(예를 들어, 양고추냉이 과산화효소 또는 알칼리성 포스파타제), 화학발광 시약(예를 들어, 아크리디늄 에스테르 화합물, 루미놀 및 그의 유도체, 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 비오틴과 같은 검출 가능한 표지를 추가로 포함한다.
- [0098] 검출 방법
- [0099] 제18 양태에서, 본 발명은 또한 시료에서 MSLN의 존재 또는 수준을 검출하는 방법을 제공하는 데, 이는 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편, 위에서 설명한 폴리펩티드 구조체 또는 위에서 설명한 제16 양태의 접합체를 사용하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 이 방법은 치료 목적, 진단 목적, 또는 비 치료적 비 진단 목적으로 사용된다.
- [0100] 특정 구현예에서, 이 방법은 웨스턴 블롯, 효소 면역분석(예를 들어, ELISA), 화학발광 면역분석, 형광 면역분석, 또는 방사성 면역분석과 같은, 면역분석이다.
- [0101] 특정 구현예에서, 이 방법은 위에서 설명한 제16 양태의 접합체를 사용하는 것을 포함한다.
- [0102] 특정 구현예에서, 이 방법은 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 위에서 설명한 폴리펩티드 구조체를 사용하는 단계를 포함하고, 이 방법은 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드 구조체를 검출하기 위해, 검출 가능한 표지(예를 들어, 효소(예를 들어, 양고추냉이 과산화효소 또는 알칼리성 포스파타제), 화학발광 시약(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 루미놀 및 그의 유도체, 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 비오틴)를 담지하는 제2 나노바디를 사용하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0103] 특정 구현예에서, 이 방법은 다음 단계를 포함한다:(1) 시료를 본 발명의 나노바디 또는 그의 항원-결합 단편, 본 발명의 폴리펩티드 구조체, 또는 본 발명의 제16 양태의 접합체와 접촉시키는 단계; (2) 항원-항체 면역 복합체의 형성을 검출하거나 또는 면역 복합체의 양을 검출하는 단계. 면역 복합체의 형성은 MSLN 또는 MSLN-발현 세포의 존재를 나타낸다.
- [0104] 특정 구현예에서, 이 방법은 MSLN을 표적으로 하는 항종양 치료법으로 종양을 치료할 수 있는지 여부를 검출하는 데 사용된다.
- [0105] 검출시약 제조에 대한 용도
- [0106] 제19 양태에 있어서, 본 발명은 또한, 시료 중 MSLN의 존재 또는 수준을 검출하거나, 또는 MSLN을 표적으로 하는 항종양 치료법에 의한 종양의 치료 가능 여부를 검출하기 위한 검출 시약의 제조에 있어서, 위에서 설명한 나노바디 또는 그의 항원 결합 단편 또는 상기에서 기재한 바와 같은 폴리펩티드 구조체 또는 상기에서 기재한 바와 같은 제16 양태의 접합체의 용도를 제공한다.
- [0107] 특정 구현예에서, 검출 시약은 시료 내 MSLN의 존재 또는 수준을 검출하고, 선택적으로 위에서 설명한 제18 양태의 방법에 의해 MSLN을 표적으로 하는 항종양 치료법에 의해 종양이 치료 가능한지 여부를 검출한다.
- [0108] 특정 구현예에서, 시료는 대상체(예를 들어, 포유동물, 예컨대, 인간)로부터의 세포 시료(예를 들어, 종양 세포

를 함유하는 시료) 또는 체액 시료(예를 들어, 혈액)이다.

[0109] 용어의 정의

[0110] 본 발명에서, 달리 명시하지 않는 한, 본 명세서에 사용된 과학 및 기술 용어는 본 기술분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 의미를 가진다. 또한, 본 명세서에 사용된 바이러스학, 생화학, 및 면역학 실험실 절차들은 본 기술 분야에서 널리 사용되는 일상적인 절차이다. 한편, 본 발명을 더 잘 이해하기 위해, 관련 용어의 정의 및 설명이 이하에 제공된다.

[0111] "예를 들어", "~와 같은", "예를 들면", "포함하다", "포괄하다" 또는 그 변형이 본 명세서에 사용되는 경우, 이러한 용어는 한정적인 용어로 간주되지 않으며, 대신 "제한 없이" 또는 "제한되지 않음"을 의미하는 것으로 해석된다.

[0112] 본 명세서에서 다르게 표시되거나 문맥상 명확하게 모순되지 않는 한, 용어 "a" 및 "an"은 물론 "the" 및 본 발명을 기재하는 문맥에서 유사한 지시어(특히 다음 청구범위의 문맥에서)는 단수 및 복수를 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

[0113] 본 명세서에서 사용된, 용어 "낙타과(camelid) 항체"는 항원에 대한 항체를 의미하며, 이는 낙타과(Camelidae)에 속하는 동물(낙타, 알파카 및 L.glama 포함)을 항원으로 면역화하거나 또는 공격함으로써 생성된다. 낙타과 동물에 의해 생산된 항체 중에서, 경쇄가 부족한 '낙타과 중쇄 항체(HCAB)'가 있다는 것은 본 기술분야의 숙련자에게 알려져 있다. 이러한 항체는 HCAB(VHH)의 중쇄의 가변 도메인 1개와 기존의 CH2 및 CH3 영역 2개만을 포함하며, 별도로 복제되어 발현되는 VHH 영역은 구조적 안정성 및 항원 결합 활성이 우수하다. VHH는 표적 항원을 결합할 수 있는 가장 작은 단위로 현재 알려져 있다.

[0114] 본 명세서에 사용된, 용어 "나노바디"는 본 기술분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 의미를 가지며, 중쇄 항체의 가변 영역(예를 들어, 낙타 또는 상어 항체)으로부터 유래되는 단일 단량체 가변 항체 도메인(예를 들어, 단일 중쇄 가변 영역)으로 구성된 항체 단편을 의미한다. 일반적으로, 나노바디는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 구조를 가지며 4개의 프레임워크 영역과 3개의 상보성 결정 영역으로 구성된다. 나노바디는, 항원 결합 능력과 특이성을 실질적으로 유지하는 한, FR1 및/또는 FR4의 일부만 포함하거나 프레임워크 영역 중 하나 또는 두 개가 결여되도록 N- 또는 C-말단이 절단될 수 있다. 나노바디는 단일 도메인 항체(sdAb)라고도 불리며, 이 두 항체는 같은 의미로 사용된다.

[0115] 본 명세서에 사용된, 나노바디의 "항원-결합 단편"이라는 용어는 나노바디가 결합하는 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하고 및/또는 "항원 결합 부분"이라고도 불리는 항원에 대한 특이적 결합을 위해 나노바디와 결합하는 나노바디의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 일반적으로, Fundamental Immunology, Ch. 7(Paul, W., ed., 2nd ed., Raven Press, N.Y.(1989)을 참조하는 데, 이는 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 발명의 항체의 항원 결합 단편은 재조합 DNA 기술에 의해 또는 본 발명의 나노바디의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 획득될 수 있다. 일부 구현예에서, 전장(full-length) 나노바디와 비교하여, 나노바디의 "항원 결합 단편"은 N-말단 또는 C-말단에서 절단될 수 있으며, 그 결과 항원 결합 능력 및 특이성을 실질적으로 유지하는 한, FR1 및/또는 FR4의 일부만 포함하거나 또는 프레임워크 영역 중 1개 또는 2개가 결여되어 있다.

[0116] 나노바디의 항원 결합 단편은 본 기술분야의 숙련자에게 공지된 통상적인 기술(예를 들어, 재조합 DNA 기술 또는 효소적 또는 화학적 단편화 방법)을 사용하여 주어진 나노바디(예를 들어, 본 발명에 의해 제공되는 나노바디)로부터 얻어질 수 있으며, 나노바디의 항원 결합 단편은 온전한 나노바디와 동일한 방식으로 특이성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0117] 본 명세서에서 "나노바디"라는 용어가 언급되는 경우, 문맥에서 달리 명시하지 않는 한, 이는 손상되지 않은 나노바디 뿐만 아니라 나노바디의 항원 결합 단편도 포함한다.

[0118] 본 명세서에 사용된, 용어 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 결합을 담당하는 항체의 가변 영역 내의 아미노산 잔기를 지칭한다. 나노바디는 CDR1, CDR2 및 CDR3로 명명되는, 3개의 CDR을 포함한다. 이들 CDR의 정확한 경계는 Kabat 넘버링 시스템(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia 넘버링 시스템(Chothia & Lesk(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al.(1989) Nature 342:878-883), 또는 IMGT 넘버링 시스템(Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003)과 같이 본 기술분야에 공지된 다양한 넘버링 시스템에 따라 규정될 수 있다. 주어진 항체에 대해, 당업자는 각 넘버링 시스템에 의해 정의된 CDR

을 쉽게 확인할 수 있을 것이다. 더욱이, 서로 다른 넘버링 시스템 사이의 대응은 당업자에게 잘 알려져 있다 (예를 들어, Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003 참조).

- [0119] 본 명세서에서 사용된, 용어 "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 상기에서 정의된 바와 같은 CDR 잔기 이외의 항체 가변 영역 내의 아미노산 잔기를 지칭한다.
- [0120] 본 명세서에서 사용된, 용어 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 중쇄 불변 영역의 일부를 지칭한다. 항체의 Fc 단편은 다양한 기능을 가지고 있지만, 항원 결합에는 참여하지 않는다. Fc 영역에 의해 매개되는 "이펙터 기능"은 Fc 수용체 결합; C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC); 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화 등을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 힌지, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함한다. Fc 영역이 힌지를 포함하는 경우, 힌지는 2개의 Fc 함유 폴리펩티드 사이의 이량체화를 매개한다. Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4와 같은 임의의 항체 중쇄 불변 영역 이소형일 수 있다.
- [0121] Fc 도메인은 천연 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역을 포함할 수 있다. 천연 Fc 영역은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 일치하는 아미노산 서열을 포함하며, 예를 들어 천연 인간 Fc 영역은 천연 서열을 갖는 인간 IgG1(비-A 및 A 동종이형) Fc 영역; 천연 서열을 갖는 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열을 갖는 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열을 갖는 인간 IgG4 Fc 영역뿐만 아니라 그의 자연 발생 변이체를 포함한다. 변이체 Fc 영역은 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해 천연 Fc 영역의 아미노산 서열과 다른 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 변이체 Fc 영역은 천연 Fc 영역과 비교하여 변경된 이펙터 기능(예를 들어, Fc 수용체 결합, 항체 글리코실화, 시스테인 잔기의 수, 이펙터 세포 기능, 또는 보체 기능)을 보유할 수 있다.
- [0122] 본 명세서에서 사용된, 용어 "인간화 항체"는 인간 항체와 서열 상동성을 증가시키기 위해 아미노산 서열을 변형시키고, 유전자 조작된 비인간 항체를 지칭한다. 일반적으로 말하면, 인간화 항체의 CDR 영역 전부 또는 일부는 비인간 항체(공여자 항체)로부터 유래되고, 그리고 비-CDR 영역(예를 들어, 가변 영역 및/또는 불변 영역의 FR)의 전부 또는 일부는 인간 면역글로불린(수용체 항체)로부터 유래된다. 특정 구현예에서, 인간화 항체의 CDR 영역은 비인간 항체(공여자 항체)로부터 유래되고, 비-CDR 영역(예를 들어, 가변 영역 및/또는 불변 영역의 FR)의 전부 또는 일부는 인간 면역글로불린(수용체 항체)로부터 유래된다. 인간화 항체는 일반적으로 항원 특이성, 친화성, 반응성 등을 포함하지만 이에 국한되지 않는 공여자 항체의 예상 특성을 유지한다. 본 발명에서, 공여자 항체는 원하는 특성(예를 들어, 항원 특이성, 친화성, 반응성 등)을 갖는 낙타과 동물의 항체일 수 있다. 인간화 항체를 제조하기 위해, 면역화된 동물로부터의 항체의 CDR 영역은 본 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 인간 프레임워크 서열에 삽입될 수 있다. 나노바디와 관련하여, 인간화 항체는 인간화 VHH, 즉 하나 이상의 프레임워크 영역이 인간 프레임워크 영역에 의해 실질적으로 대체된 VHH를 지칭할 수 있다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 특정 프레임워크 영역(FR)은 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 추가적으로, 인간화 VHH는 원래 VHH 또는 인간 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 함유할 수 있지만, VHH 또는 VHH 함유 폴리펩티드의 성능을 추가로 개선하고 최적화하기 위해 포함된다.
- [0123] 본 명세서에서 사용된, 용어 "동일성"은 2개의 폴리펩티드 사이 또는 2개의 핵산 사이의 서열 일치를 지칭하는데 사용된다. 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위해, 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다(예를 들어, 제2 아미노산 또는 핵산 서열과의 최적의 일치를 위해 제1 아미노산 서열 또는 핵산 서열에 갭이 도입될 수 있음). 이어서, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열의 위치가 제2 서열의 해당 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드로 점유되면 분자는 동일하다. 두 서열들 간의 동일성 백분율은 서열이 공유하는 동일한 위치 수의 함수이다(즉, 동일성 백분율 = 동일한 중복 위치의 수/전체 위치의 수 x 100%). 특정 구현예에서, 두 서열은 모두 동일한 길이를 갖는다.
- [0124] 두 서열들 사이의 동일성 백분율의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다. 두 서열의 비교를 위한 수학적 알고리즘의 어떤 비-제한적인 예는 Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268의 알고리즘이고, 이는 Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877에 의해 개선되었다. 이러한 알고리즘은 Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 의해 통합되었다.
- [0125] 본 명세서에 사용된, 용어 "특이적 결합"은 항체와 및 그것이 표적으로 삼는 항원 사이의 결합 반응과 같이, 두 분자들 사이의 비-무작위 결합 반응을 지칭한다. 특정 결합 상호작용의 강도 또는 친화도는 상호작용의 평형 해리 상수(K_D)로 표현될 수 있다. 본 발명에서, 용어 " K_D "는 항체 및 항원 사이의 결합 친화도를 설명하기 위해 사

용되는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭한다. 평형 해리 상수가 작을수록 항체-항원 결합은 더 단단해지고, 항체 및 항원 사이의 친화도는 더 높아진다.

[0126] 두 분자들 사이의 특정 결합 특성은 본 기술분야에 알려진 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 한 접근법은 항원 결합 부위/항원 복합체가 형성되고 해리되는 속도를 측정하는 것이다. "결합 속도 상수"(k_a 또는 k_{on}) 및 "해리 속도 상수"(k_{dis} 또는 k_{off})는 모두 결합 및 해리의 농도 및 실제 속도로부터 계산될 수 있다(Malmqvist M, Nature, 1993, 361:186-187 참조). k_{dis}/k_{on} 비율은 해리 상수 K_D 와 동일하다(Davies et al., Annual Rev Biochem, 1990; 59:439-473 참조). K_D , k_{on} 및 k_{dis} 값은 임의의 유효한 방법으로 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 해리 상수는 Biacore 기기를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정될 수 있다. 그 외에, 생물발광 간섭계 또는 Kinexa를 사용하여 해리 상수를 측정할 수 있다.

[0127] 본 명세서에 사용된, 본 발명의 검출 가능한 표지는 형광, 분광, 광화학적, 생화학적, 면역학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단에 의해 검출 가능한 임의의 물질일 수 있다. 이러한 표지는 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 그 예로는 효소(예를 들어, 양고추냉이 과산화효소, 알칼리성 포스포타제, β -갈락토시다제, 우레아제, 글루코스 산화효소 등), 방사성 핵종(예를 들어, 3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C 또는 ^{32}P), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 플루오레세인, 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트(TRITC), 피코에리트린(PE), 텍사스 레드, 로다민, 양자점 또는 시아닌 염료 유도체(예를 들어, Cy7, Alexa 750)), 발광 물질(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 루미놀 및 그의 유도체 화합물과 같은 화학발광 물질, 루테늄 테르피리딜과 같은 루테늄 유도체), 자성 비드(예를 들어, Dynabeads®), 콜로이드 금 또는 유색 유리 또는 플라스틱(예를 들어, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등)과 같은 열량 측정 마커 비드, 및 위 표지로 변형된 아비딘(예를 들어, 스트렙타아비딘)에 결합하기 위한 비오틴이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0128] 본 명세서에 사용된, 용어 "백터"는 폴리뉴클레오티드가 삽입될 수 있는 핵산 전달체(delivery vehicle)를 지칭한다. 백터가 삽입된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 단백질을 발현할 수 있는 경우, 백터를 발현 백터라고 한다. 백터는 형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 통해 숙주 세포에 도입될 수 있고, 이로써 백터가 운반하는 유전 물질 요소가 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 백터는 본 기술분야의 숙련자에게 잘 알려져 있고, 다음을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다: 플라스미드; 파지미드; 코스미드; 효모 인공 염색체(YAC), 세균 인공 염색체(BAC) 또는 P1 유래 인공 염색체(PAC)와 같은 인공 염색체; λ 파지 또는 M13 파지 및 동물 바이러스 등과 같은 파지. 백터로 사용될 수 있는 동물 바이러스는 다음을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다: 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스바이러스(예를 들어, 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바클로바이러스, 유두종바이러스, 파코바바이러스(예를 들어, SV40). 백터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택 요소, 및 리포터 유전자를 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 발현-제어 요소를 포함할 수 있다. 그 외에, 백터는 복제 기점(origin)을 포함할 수도 있다.

[0129] 본 명세서에 사용된, 용어 "숙주 세포"는 백터를 도입하는데 사용될 수 있는 세포를 지칭하고, 이는 대장균(*E. coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 원핵 세포, 효모 세포 또는 아스퍼질러스(*Aspergillus*)와 같은 진균 세포, S2 초파리(*S2 Drosophila*) 세포 또는 Sf9와 같은 곤충 세포, 또는 섬유아세포, CHO 세포, COS 세포, NSO 세포, HeLa 세포, BHK 세포, HEK 293 세포 또는 인간 세포와 같은 동물 세포를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0130] 본 명세서에 사용된, 용어 "보존적 치환"은 아미노산 서열을 포함하는 단백질/폴리펩티드의 예상 특성에 부정적인 영향을 미치지거나 변경시키지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 부위-지정 돌연변이 및 PCR-매개 돌연변이와 같은, 본 기술분야에 알려진 표준 기술에 의해 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄, 예를 들어, 상응하는 아미노산 잔기와 물리적으로 또는 기능적으로 유사한(예를 들어, 공유 결합이나 수소 결합을 형성하는 능력 등을 포함한, 유사한 크기, 모양, 전하, 화학적 특성, 등) 것을 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 포함한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계열은 본 기술분야에 규정되어 있다. 이러한 계열은 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 및 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않는 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비-극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), β -분지 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신), 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함한다. 따라서, 상응하는 아미노산 잔기를 동일한 측쇄 계열로부터의 다른 아미노산 잔기로 교체하는 것이 바람직하다. 아미노산의 보존적 치환을 확인하는 방법은 본 기술분

야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187(1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10):879-884(1999); 및 Burks et al. Proc. Natl Acad. Set USA 94:412-417(1997) 참조, 본 명세서에 참조로 포함됨).

[0131] 이 문헌에 포함된 20개의 기존 아미노산은 기존 사용법에 따라 작성되었다. 예를 들어, 여기에 참조로 포함된 Immunology-A Synesis(2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass.(1991)) 참조. 본 발명에서, 용어 "폴리펩티드"와 "단백질"은 동일한 의미를 가지며 상호교환적으로 사용된다. 그리고 본 발명에서, 아미노산은 일반적으로 본 기술분야에 잘 알려진 1-글자 및 3-글자 약어로 표현된다. 예를 들어, 알라닌은 A 또는 Ala로 표현될 수 있다.

[0132] 본 명세서에 사용된, 용어 "약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제"는 대상체 및 활성 성분과 약리학적 및/또는 생리학적으로 적합한 담체 및/또는 부형제를 지칭하고, 이는 본 기술분야에 잘 알려져 있고(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995 참조), pH 조절제, 계면활성제, 보조제, 이온 강도 강화제, 희석제, 삼투압 유지제, 흡수지연제, 보존제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, pH 조절제는 인산염 완충액을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 계면활성제는 Tween-80과 같은 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이온 강도 강화제는 염화나트륨을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보존제는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산 등과 같은 다양한 항균 및 항진균제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 삼투압 유지제는 설탕, NaCl, 및 이와 유사한 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 흡수지연제는 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 희석제는 물, 수성 완충액(예를 들어, 완충 식염수), 알코올 및 폴리올(예를 들어, 글리세롤) 및 이와 유사한 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보존제는 티메로살, 2-페녹시에탄올, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산 등과 같은 다양한 항균 및 항진균제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 안정제는 본 기술분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 의미를 가지며, 글루타민산 나트륨, 젤라틴, SPGA, 당류(예를 들어, 소르비톨, 만니톨, 전분, 자당, 유당, 텍스트란, 또는 글루코스), 아미노산(예를 들어, 글루탐산, 글리신), 단백질(예를 들어, 건조 유장, 알부민 또는 카제인) 또는 그의 분해 생성물(예를 들어, 락탈알부민 가수분해물) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 의약품 내 활성 성분의 원하는 활성을 안정화할 수 있다. 특정 예시적인 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제는 멸균 주사용 액체(예를 들어, 수성 또는 비-수성 현탁액 또는 용액)를 포함한다. 특정 예시적인 구현예에서, 이러한 멸균 주사용 액체는 주사용수(WFI), 정균 주사용수(BWFI), 염화 나트륨 용액(예를 들어, 0.9%(w/v) NaCl), 텍스트로스 용액(예를 들어, 5% 글루코스), 계면활성제-함유 용액(예를 들어, 0.01% 폴리소르베이트 20을 함유한 용액), pH 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 용액), 링거 용액 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0133] 본 명세서에 사용된, 용어 "예방"은 대상체에서 질환 또는 병태 또는 증상의 발생을 예방하거나 지연시키기 위해 수행되는 방법을 지칭한다. 본 명세서에 사용된, 용어 "치료"는 유익하거나 기대되는 임상 결과를 얻기 위해 수행되는 방법을 지칭한다. 본 발명의 목적을 위해, 유익하거나 기대되는 임상 결과는, 검출 가능하거나 또는 검출 가능하지 않거나에 관계 없이, 증상 완화, 질환 정도의 감소, 질환 상태의 안정화(즉, 악화 없음), 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 증상(부분적이든 완전하든)의 완화를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 외에, "치료"는 치료를 받지 않을 경우 예상되는 생존 기간에 비해 생존 기간이 연장되는 것을 또한 지칭한다.

[0134] 본 명세서에 사용된, 용어 "대상체"는 인간, 원숭이, 마우스와 같은 포유동물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 대상체(예를 들어, 인간, 원숭이, 마우스)는 MSLN과 연관된 질환(예를 들어, MSLN-양성 종양)을 앓고 있거나, 이에 대한 위험이 있는 대상체를 지칭한다.

[0135] 본 명세서에 사용된, 용어 "유효량"은 기대하는 효과를 달성하거나 적어도 부분적으로 달성하기에 충분한 양을 지칭한다. 예를 들어, 예방 유효량은 질환(예를 들어, MSLN-양성 종양)의 발병을 예방, 저지 또는 지연시키는 데 충분한 양을 지칭하고; 치료 유효량은 이미 질환을 앓고 있는 환자의 질환 및 그 합병증을 치료하거나 적어도 부분적으로 예방하기에 충분한 양을 지칭한다. 그러한 유효량을 결정하는 것은 본 기술분야의 능력 내에 있다. 예를 들어, 치료 유효량은 치료할 질환의 중증도, 환자 자신의 면역 체계의 전반적인 상태, 연령, 체중, 성별과 같은 환자의 일반적인 상태, 약물 투여 방식, 동시에 투여되는 다른 치료 등에 따라 달라질 것이다.

발명의 효과

[0136] 본 발명은 인간, 원숭이 및/또는 마우스 MSLN과 교차반응성을 갖는 MSLN에 대한 높은 결합 활성을 갖는 나노바

디를 제공한다. 또한, 나노바디는 분자량이 작고 안정성이 좋은 특성도 가지고 있다. 약물 개발 및 진단 시약 개발에서 전통적이고 일반적인 항체와 비교하여, 우수한 조직 침투, 유연한 투여, 높은 인간화 정도, 재조합 단백질로의 용이한 전환 등 많은 장점을 가지고 있다.

[0137] 따라서, 본 발명의 나노바디는 종양 성장 억제 및 MSLN 검출을 포함하나, 이에 국한되지 않는 다양한 목적으로 사용될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 완전 인간화 항체는 면역원성 반응을 유발하지 않고 인간 대상체에게 안전하게 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 상당한 임상적 가치를 갖는다.

[0138] 이하, 본 발명의 구현예가 첨부된 도면 및 실시예를 참조하여 상세하게 설명될 것이지만, 본 기술분야의 숙련자는 다음의 도면 및 실시예가 단지 본 발명을 예시하기 위하여 사용되었고, 본 발명의 범위를 한정하지 않는다는 것을 이해할 것이다. 본 발명의 다양한 목적 및 유리한 양태는 첨부된 도면 및 바람직한 구현예에 대한 다음의 상세한 설명으로부터 본 기술분야의 숙련자에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0139] 도 1은 CHO-hMSLN 세포에 대한 항-MSLN 나노바디의 친화도 검출 결과를 도시한다.
- 도 2는 CHO-hMSLN 세포에 대한 인간화 항-MSLN 나노바디의 친화도 검출 결과를 도시한다.
- 도 3은 CHO-cyMSLN 세포에 대한 인간화 항-MSLN 나노바디의 친화도 검출 결과를 도시한다.
- 도 4는 CHO-mMSLN 세포에 대한 인간화 항-MSLN 나노바디의 친화도 검출 결과를 도시한다.
- 도 5는 인간 MSLN과 그의 리간드 CA125의 결합을 차단하는 인간화 항-MSLN 나노바디의 차단 활성에 대한 검출 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0140] 서열 정보

[0141] 본 발명에서 커버하는 서열은 아래 표에 설명되어 있다.

표 1

[0142]

서열 정보	
서열 번호	서열 및 설명
1	YE-17 CDR1GIFSRN의 아미노산 서열
2	YE-17 CDR2ILNDGTT의 아미노산 서열
3	YE-17 CDR3GYSDYRGTDY의 아미노산 서열
4	YE-17의 아미노산 서열 VHHQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSRNGMGWFRQAPGEQRELVARILNDGTTMYADSVKGRFTISRDNKNTVLLQMNSLKPEDTAVYYCGYSDYRGTDYWGQGTQVTVSS
5	인간 IgG1-Fc 단편의 아미노산 서열 fragmentDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
6	HZ-YE-17-01 VHH의 아미노산 서열 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATSGTIFSRNGMGWFRQAPGEQRELVARILNDGTTMYADSVKGRFTISRDNKNTVLLQMNSLKPEDTAVYYCGYSDYRGTDYWGQGTQVTVSS
7	HZ-YE-17-02 VHH의 아미노산 서열 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATSGTIFSRNGMGWFRQAPGKQRELVARILNDGTTMYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCGYSDYRGTDYWGQGTQVTVSS
8	HZ-YE-17-03 VHH의 아미노산 서열 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATSGTIFSRNGMGWFRQAPGKLELVARILNDGTTMYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCGYSDYRGTDYWGQGTQVTVSS
9	HZ-YE-17-04 VHH의 아미노산 서열 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATSGTIFSRNGMGWFRQAPGKLELVARILNDGTTMYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCGYSDYRGTDYWGQGTQVTVSS
10	인간 FR1의 아미노산 서열 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATS

11	인간 FR2의 아미노산 서열 1 MGWFRQAPGEQRELVAR
12	인간 FR2의 아미노산 서열 2 MGWFRQAPGKQRELVAR
13	인간 FR2의 아미노산 서열 3 MGWFRQAPGKGLELVAR
14	인간 FR3의 아미노산 서열 1 MYADSVKGRFTISRDNKNTVLLQMNSLKPEDTAVYYC
15	인간 FR3의 아미노산 서열 2 MYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYC
16	인간 FR3의 아미노산 서열 3 MYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYC
17	인간 FR4의 아미노산 서열 WGQGTQVTVSS
18	아마투시맵 중쇄의 아미노산 서열 QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYTMNWKQSHGKSLWIGLITPYNGASSYQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSED SAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSKDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
19	아마투시맵 경쇄의 아미노산 서열 DIELTQSPAIMASPGKEKVTMTCSASSSVSMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPGRFSGSGSGNSYSLTISVVEAEDDATYYCQQW SKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLT SKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

[0143] **본 발명을 수행하기 위한 특이적 모델**

[0144] 이하, 다음의 실시예를 참조하여 본 발명을 설명하고자 하는 데, 이는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 한정하기 위한 것이 아니다,

[0145] 달리 명시하지 않는 한, 본 발명에서 사용된 분자생물학 실험 방법 및 면역분석 방법은 기본적으로 J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, and F. M. Ausubel et al., Compiled Laboratory Guide to Molecular Biology, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1995;에 기재된 방법을 참조하여 수행되었고, 제한효소의 사용은 제품 제조사가 권장하는 조건을 따랐다. 당업자는 실시예가 본 발명을 예시로서 기재하고 청구된 본 발명의 범위를 한정하려는 의도가 아님을 이해할 것이다.

[0146] 실시예 1 : 항-MSLN 나노바디의 면역화 및 스크리닝

[0147] 알파카(Llama)를 인간 MSLN(AcroBiosystems로부터 구입, Cat. No.: MSN-H522a)으로 면역시킨 후, 알파카 말초 림프구로부터 전체 RNA를 추출하고, 역전사시켜 cDNA를 얻었다. cDNA의 PCR 생성물을 효모 디스플레이 벡터에 결합한 후, Saccharomyces cerevisiae(ATCC에서 구입, Cat. No.: 208289)에 전기 형질전환하여 항-MSLN 나노바디 라이브러리를 구축하였다.

[0148] 인간 MSLN은 비오틴 라벨링 키트(Thermo로부터 구입, Cat. No.: 90407)의 제품 지침에 따라 라벨링되었다. 증식된(expanded) 항-MSLN 나노바디 효모 라이브러리를 비오틴 표지 MSLN으로 라벨링된 후, 자성 비드를 사용하여 양성 표지된 효모를 풍부하게 하였다. 마그네틱 비드로 농축된 효모 세포를 확장시킨 후, 1:200 비율로 희석된 항-c-Myc 항체(Thermo로부터 구입, Cat. No.: MA1-980) 및 적당량의 비오틴 라벨링된 MSLN을 첨가하여 염색하였고, 효모 세포를 PBS로 세척한 후, 1:500으로 희석된 염소-항-마우스 IgG(H+L) Alexa Fluor Plus 488(Invitrogen로부터 구입, 카탈로그 번호: A32723TR) 및 스트렙타비딘 APC 접합 형광 항체(Invitrogen로부터 구입, Cat. No.: SA1005)를 첨가한 다음, 15분간 배양하였다. 세포를 PBS에 재현탁시키고, BD FACSAria II 기기로 분류하여, 인간 MSLN에 대한 결합 능력이 더 높은 효모 세포를 얻었다.

[0149] 자성 비드로 농축하고 유세포 분석법으로 선별하여 얻어진 인간 MSLN에 대한 높은 결합능을 가진 효모 세포를 30°C 및 225 rpm에서 밤새 팽창 배지에서 배양하고, 효모 플라스미드 추출 키트(Tiangen(Cat. No. DP112로부터 구입)의 작동에 따라 효모 플라스미드를 추출하였다. 플라스미드를 Top10 캄피턴트(competent) 세포(Tiangen로부터 구입, Cat No.: CB104-02)로 전기 형질전환하고, 압피실린 내성 플레이트 상에 코팅하고, 37°C에서 밤새

배양하였다. 단일 클론을 배열결정(sequencing)을 위해 선택하여 VHHH(가변 영역) 유전자 서열을 얻고, IMGT 넘버링 시스템에 따라 CDR 영역 서열을 결정하였다. 얻어진 단클론 나노바디 YE-17의 서열 정보는 아래 표 1과 같다.

표 2

나노바디의 VHH 및 CDR 서열 정보				
클론 번호	VHH (서열 번호)	CDR1 (서열 번호)	CER2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)
YE-17	4	1	2	3

[0150]

[0151]

실시예 2: 항-MSLN 나노바디의 발현 벡터 구축, 단백질 발현 및 정제

[0152]

스크리닝된 항-MSLN 항체 YE-17의 VHH 코딩 서열 및 인간 IgG1 Fc 세그먼트의 코딩 서열(서열번호 5)은, 인간 IgG1 Fc 세그먼트가 VHH의 C-말단에 결합된 융합 단백질 발현 서열로의 상동 재조합을 통해 구축되었다. ExpiCHO™ 발현 시스템 키트(Thermo로부터 구입, Cat No.: A2910001)를 사용하여, 제품 설명서에 기재된 형질감염 방법에 따라, 제조된 융합 단백질 발현 플라스미드를 Expi-CHO 세포(Thermo로부터 구입, Cat No.: A2910002)에 중간량으로 전달하였다. 세포배양 5일 후, 상등액을 수집하고, 단백질 A 자성 비드(GenScript로부터 구입, Cat No.: L00723)를 사용하여 표적 단백질을 정제하였다. 자성 비드를 적절한 부피(자성 비드 부피의 1 내지 4배)의 결합 완충액(PBS+0.1% Tween 20, pH 7.4)에 재현탁시킨 다음, 정제할 시료에 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 배양하여 그 기간 동안 부드럽게 흔들었다. 시료를 자성 스탠드(Beaver로부터 구입)에 놓은 후, 상등액을 버리고 자성 비드를 바인딩 버퍼로 3회 세척하였다. 자성 비드의 3 내지 5배 부피의 용출 완충액(0.1M 구연산나트륨, pH 3.2)을 첨가하고, 실온에서 5 내지 10분 동안 흔들 후, 다시 자성 스탠드 상에 놓은 다음, 용출 완충액을 수집하여 중화 완충액(1M Tris, pH 8.54)이 있는 수집 관에 옮겨 잘 혼합하여 제조를 완료한 후에 정제된 항-MSLN 나노바디 YE-17을 얻었다.

[0153]

실시예 3: 항-MSLN 나노바디의 단백질 결합 친화도 검출

[0154]

ForteBio 친화도 측정은 기존 방법(Estep, P et al., High Throughput Solution based Measurement of Antibody-Antigen Affinity and Epitope Binning MAbs, 2013.5(2):p.270-8)에 따라 수행하였다. 간략히 설명하면, 센서를 분석 버퍼에서 30분 동안 오프라인으로 평형화한 후, 60초 동안 온라인으로 검출하여 기준선을 설정하고, 실시예 2에서 획득한 정제된 항체를 온라인으로 AHQ 센서에 로딩하였다. 그 다음, 센서를 100nM 인간 MSLN(Uniprot ID: Q13421)에 5분 동안 배치한 후 센서를 PBS로 옮겨 5분 골랑 해리시켰다. 동역학 분석은 1:1 결합 모델을 사용하여 수행되었다. 또한, 항체 아마톡시맵(CAS No.: 931402-35-6)을 대조군으로 병행하였다. 항체 아마톡시맵의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 서열번호 18-19에 나타냈다. 그 결과를 하기 표 3에 나타냈다.

표 3

후보 분자의 친화도			
항체 번호	KD (M)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)
YE-17	1.88E-10	5.50E+05	1.04E-04
아마톡시맵	8.13E-10	1.53E+06	1.24E-03

[0155]

[0156]

실시예 4: 항-MSLN 나노바디의 세포 결합 친화도 검출

[0157]

인간 MSLN(Uniprot ID: Q13421)을 과발현하는 CHO 세포, 즉 CHO-hMSLN 세포는 MSLN cDNA를 포함하는 pCHO1.0 벡터(Invitrogen로부터 구입)를 형질감염시켜 제조되었다. 증식 배양된 CHO-MSLN 세포를 2×10^6 세포/ml의 세포 밀도가 되도록 조정된 후, 96-웰 플로우 플레이트에 100 μ L/웰씩 첨가하고, 추후 사용하기 위해 원심분리하였다. 실시예 2에서 제조된 정제된 항-MSLN 항체 YE-17을 PBS로 희석하였고, 400 nM에서 시작하여 3배 희석하여 총 12회 연속 희석하였다. 희석된 시료를 세포가 들어 있는 96-웰 플로우 플레이트에 100 μ L/웰씩 첨가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. PBS로 100 배 희석된 염소 F(ab')₂ 항-인간 IgG-Fc(PE)(Abcam으로부터 구입, Cat No.: ab98596)를 100 μ L/웰 첨가한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양한 다음, PBS로 두 번 세척하였다. PBS를 웰당 100 μ l씩 첨가하여 세포를 재현탁시키고, CytoFlex(Bechman) 유세포 분석기로

검출을 수행하고, 해당 MFI(평균 형광 강도) 값을 계산하였다.

[0158] 실험 결과는 도 1과 표 4에 나타났다. 실험 결과, 실시예 2에서 제조된 항-MSLN 항체 YE-17은 CHO-hMSLN 세포에 대한 결합 활성을 가지며, Morphotek 사의 단일 사슬 대조 항체 아마투시맙보다 결합 활성이 더 높은 것으로 나타났다.

표 4

[0159]

CHO-hMSLN 세포에 결합하기 위한 항-MSLN 나노바디의 EC ₅₀	
항체 번호	EC50 (nM)
YE-17	0.9647
아마투시맙	1.531

[0160] 실시예 5: 인간화 항-MSLN 나노바디의 단백질 결합 친화도 검출

[0161] 본 실시예에서는 항체 YE-17이 인간화되었다. 그리고 인간화 항체의 서열을 기반으로, 실시예 2에 기재된 방법에 따라, 인간화 항체의 백터 구축, 발현 및 정제를 수행하였다. 마지막으로, YE-17를 기반으로 인간화 항체의 4 균주, 즉 HZ-P-YE-17-01, HZ-P-YE-17-02, HZ-P-YE-17-03 및 HZ-P-YE-17-04를 얻었으며, 이들의 VHHH 서열은 각각 서열번호 6-9에 표시되었다.

[0162] 실시예 3에 기재된 방법에 따라, 정제된 인간화 항체의 단백질 결합 친화도를 검출하고, 그 결과를 하기 표 5에 나타냈다.

표 5

[0163]

인간화 항-MSLN 나노바디의 단백질 결합 친화도 검출 결과			
항체 번호	KD (M)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)
YE-17	1.40E-09	4.21E+05	5.90E-04
HZ-P-YE-17-01	8.07E-10	4.02E+05	3.25E-04
HZ-P-YE-17-02	2.20E-09	4.03E+05	8.88E-04
HZ-P-YE-17-03	1.91E-08	3.36E+05	6.40E-03
HZ-P-YE-17-04	1.93E-08	3.29E+05	6.36E-03

[0164] 실시예 6: CHO-hMSLN에 대한 인간화된 항-MSLN 나노바디의 결합능 검출 및 그의 교차 반응성

[0165] 정제된 인간화 항체는, 실시예 4에 기재된 방법에 따라, CHO-hMSLN 세포에 대한 친화도 검출을 수행하였다.

[0166] 그 결과를 도 2 및 표 6에 나타냈다. 실시예 5에서 제조된 인간화 항-MSLN 항체는 모두 CHO-hMSLN 세포에 결합 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

표 6

[0167]

CHO-hMSLN 세포에 결합하기 위한 인간화 나노바디의 EC50	
번호	EC50 (nM)
YE-17	0.305
HZ-P-YE-17-01	0.4775
HZ-P-YE-17-02	0.5515
HZ-P-YE-17-03	0.2415
HZ-P-YE-17-04	0.3399

[0168] 원숭이 MSLN(cyMSLN, Uniprot ID: F6Q1U7)에 대한 인간화 항체의 세포 수준에서의 친화도를 확인하기 위해, 실시예 4에 기재된 방법에 따라 세포 균주를 구축하고, 정제된 인간화 항체의 CHO-cyMSLN 세포에 대한 친화도를 검출하였다.

[0169] 그 결과를 도 3 및 표 7에 나타냈다. 그 결과, 항체 YE-17 및 그의 인간화된 항-MSLN 항체는 모두 CHO-cyMSLN 세포에 대한 결합 활성을 가짐을 확인하였다.

표 7

[0170]

CHO-cyMSLN 세포에 결합하기 위한 인간화 나노바디의 EC50	
번호	EC50 (nM)
YE-17	0.7161
HZ-P-YE-17-01	1.24
HZ-P-YE-17-02	0.6298
HZ-P-YE-17-03	0.7084
HZ-P-YE-17-04	1.009

[0171]

마우스 MSLN(mMSLN, Uniprot ID: Q61468)에 대한 항체의 세포 수준에서의 친화도를 확인하기 위하여, 실시예 4에 기재된 방법에 따라 세포주를 구축하고, 정제된 인간화 항체의 CHO-mMSLN 세포에 대한 친화도를 검출하고, 그 결과를 도 4 및 표 8에 나타냈다.

표 8

[0172]

CHO-mMSLN 세포에 결합하기 위한 인간화 나노바디의 EC50	
번호	EC50 (nM)
YE-17	6.312
HZ-P-YE-17-01	12.99
HZ-P-YE-17-02	7.293
HZ-P-YE-17-03	22.35
HZ-P-YE-17-04	~ 249165

[0173]

표 6 내지 8 및 도 2 내지 4의 결과를 종합하면, 항체 YE-17 및 그의 인간화 항체는 인간 및 원숭이 MSLN 세포에 대해 교차 결합 활성을 갖는 것으로 나타났으며, 항체 YE-17 및 그의 인간화 항체의 일부(예를 들어, HZ-P-YE-17-01, HZ-P-YE-17-02, HZ-P-YE-17-03)도 인간, 원숭이 및 마우스 MSLN 세포에 대해 특정 교차 결합 활성을 갖는 것으로 나타났다.

[0174]

실시예 7: Anti-MSLN 인간화 나노바디에 의한 인간 MSLN의 리간드 CA125에 대한 결합 차단

[0175]

인간 MSLN이 리간드 CA125에 결합하는 것을 차단하는 항체의 차단 활성을 확인하기 위해, 다음 방법에 따라 실험적 검증을 수행하였다: 고 흡착 ELISA 플레이트에 1 µg/mL 인간 MSLN을 코팅하고, 4°C에서 밤새 코팅을 실시하고; 그 다음, 코팅액을 버리고, 실온에서 2시간 동안 5% BSA로 차단을 실시하고; 연속적으로 희석된 인간화 항체를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하고; 플레이트를 3회 세척한 후, 1 µg/mL Biotin-CA125(Acro로부터 구입, Cat. No.: CA5-H82F4)를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하고; 플레이트를 3회 세척한 후, 1:10,000 비율로 희석된 SA-HRP(Abcam로부터 구입, Cat No.: Ab7403)를 첨가하고 실온에서 30분 동안 배양하고; 플레이트를 6회 세척한 후, 50 µl/mL TMB 발색용액을 첨가하여 3 내지 5분 동안 배양하고; 50 µl/mL 정지 용액을 첨가하고; 그리고 기계에서 A450 값을 판독하였다.

[0176]

그 결과를 도 5 및 표 9에 나타냈다. 그 결과, 항체 YE-17 및 그의 인간화 항체는 모두 인간 MSLN의 리간드 CA125에 대한 결합을 효과적으로 차단하여 암 침습 및 전이를 억제할 수 있음을 보여주었다.

표 9

[0177]

인간 MSLN의 리간드 CA125 결합을 차단하는 인간화 나노바디의 EC50	
번호	EC50 (nM)
YE-17	5.958
HZ-P-YE-17-01	3.342
HZ-P-YE-17-02	2.627
HZ-P-YE-17-03	4.753
HZ-P-YE-17-04	3.234

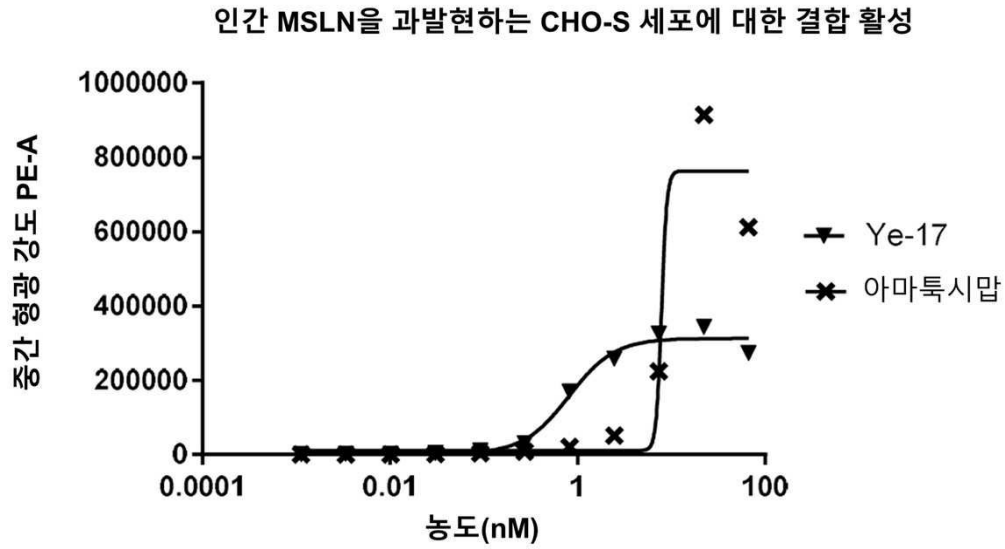
[0178]

본 발명의 특정 구현예가 상세히 설명되었지만, 본 기술분야의 숙련자는 개시된 모든 교시에 따라 이러한 세부 사항에 대해 다양한 수정 및 대체가 이루어질 수 있고, 이러한 변경은 모두 본 발명의 범위 내에 속하고 있음을

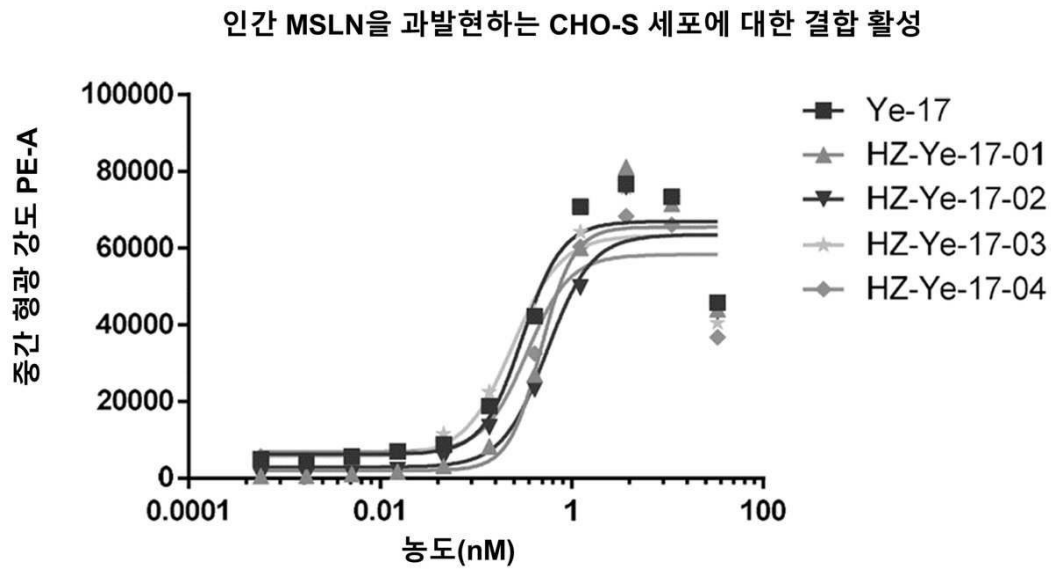
이해할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 첨부된 청구범위 및 그의 임의의 동등물로서 주어진다.

도면

도면1

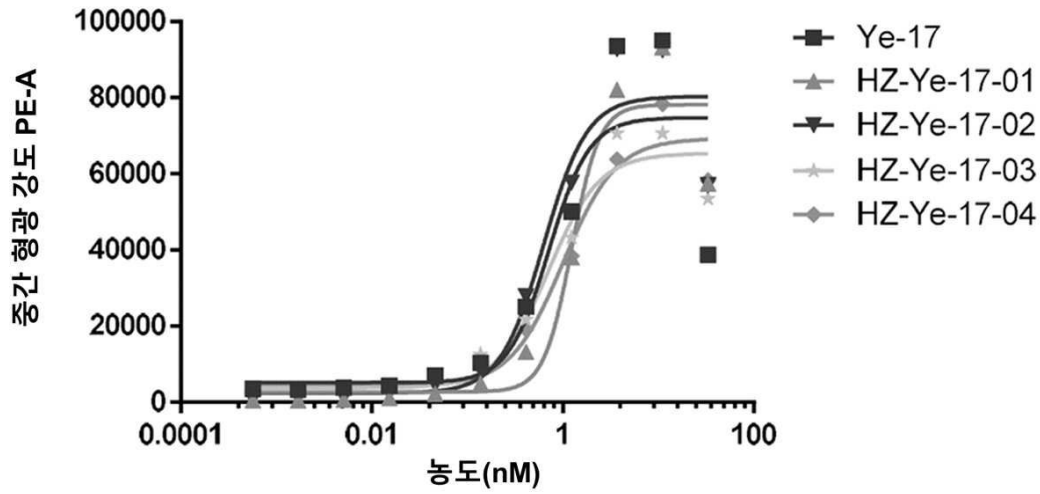


도면2



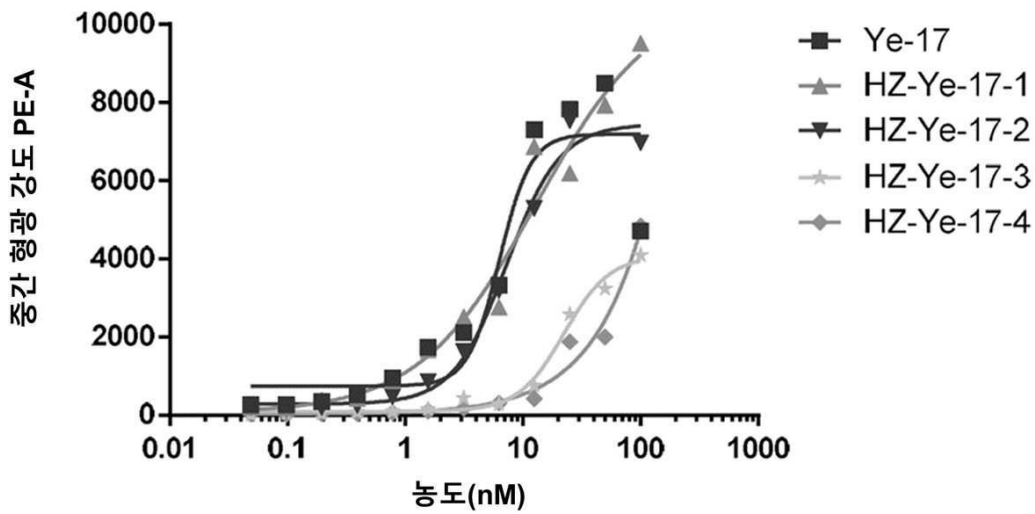
도면3

시노물구스 MSLN을 과발현하는 CHO-S 세포에 대한 결합 활성



도면4

마우스 MSLN을 과발현하는 CHO-S 세포에 대한 결합 활성



도면5

MSLN의 CA125에 대한 결합 차단 활성

