



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월21일  
(11) 등록번호 10-2783861  
(24) 등록일자 2025년03월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/30 (2006.01) A61K 51/10 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/3069 (2013.01)  
A61K 51/1072 (2020.05)
- (21) 출원번호 10-2018-7012299
- (22) 출원일자(국제) 2016년10월04일  
심사청구일자 2021년10월05일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월30일
- (65) 공개번호 10-2018-0053756
- (43) 공개일자 2018년05월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/073684
- (87) 국제공개번호 WO 2017/060247  
국제공개일자 2017년04월13일
- (30) 우선권주장  
1517550.8 2015년10월05일 영국(GB)  
1519105.9 2015년10월29일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌  
US20140286862 A1  
EP00213303 A2  
JP2010004895 A

- (73) 특허권자  
프레닥스 에이비  
스웨덴 237 37 비오리드 한스 요나스 베그 2
- (72) 발명자  
트란, 아만다 튜이  
스웨덴, 21619 말모, 라벨로브스가탄 39  
악셀손, 안데르스  
스웨덴, 237 31 비오리드, 아네스 베그 5  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인씨엔에스(유)

전체 청구항 수 : 총 27 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 인간화 항 PSA(5A10) 항체

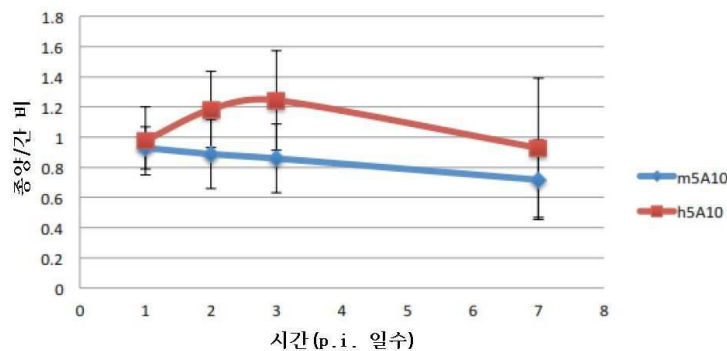
(57) 요약

본 개시내용은 전립선 특이적 항원(PSA)에 대한 결합 특이성을 갖는 항체 폴리펩타이드를 제공하되, 여기서 항체 폴리펩타이드는, (a) 아미노산 서열 TTGMGVS, HIYWDDKRYSTSLK 및 KGYGYFDY를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 아미노산 서열 RASQNVNTDVA, STSYLQS 및 QQYSNYPLT를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하되, 중쇄 가변

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4

중양-간 비



영역과 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 인간 항체로부터의 프레임워크 아미노산 서열을 포함한다. 본 출원은 전립선암의 진단 및 치료에서의 상기 항체 폴리펩타이드의 용도를 더 제공한다. 실험 결과는, 인간화 항체 h5A10이 생체내 전립선 종양을 효율적으로 표적화하고, 이의 m5A10보다 더 양호한 종양 축적을 나타내며, 그리고 무린 항체보다 더 양호한 (15 초과의 종양-대-기관 비로 표시된 바와 같은) 영상화 콘트라스트를 제공하는 것을 입증한다.

(52) CPC특허분류

**A61K 51/1096** (2013.01)  
**A61P 35/00** (2018.01)  
 A61K 2039/505 (2013.01)  
 C07K 2317/24 (2013.01)  
 C07K 2317/55 (2013.01)  
 C07K 2317/565 (2013.01)  
 C07K 2317/92 (2013.01)  
 C07K 2317/94 (2013.01)

**스트랜드, 스펠-에릭**

스웨덴, 224 68 룬드, 테너그란드 3

**라민마키, 우르포 유하니**

핀란드, 21410 반할리나, 메스타린티에 27

(72) 발명자

**말름보리 하거, 세실리아 앤-크리스틴**

스웨덴, 252 50 헬싱보리, 이원최평스가탄 83

**세스트룀, 셸**

스웨덴, 에스이-227 30 룬드, 윌리그게어비겐 16

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

전립선 특이적 항원(prostate specific antigen: PSA) 또는 성숙한 활성 형태의 인간 PSA에 대한 결합 특이성을 갖는 항체 폴리펩타이드로서,

(a) 서열번호 1 및 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열번호 4 및 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하되,

상기 중쇄 가변 영역과 상기 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 인간 항체로부터의 프레임워크 아미노산 서열을 포함하며, 그리고

상기 PSA는 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지며, 그리고 상기 성숙한 활성 형태의 인간 PSA는 아미노산 서열  
 IVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSVILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHDMLLRL  
 SEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSIPEEFLTPKKLQCVDLHVI SNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGIT  
 WGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP

을 갖는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 항체 폴리펩타이드는

(a) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 영역

중 적어도 하나를 포함하는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 무손상(intact) 항체 또는 Fv 단편 및 Fab-유사 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항원-결합 단편을 포함하거나, 또는 상기 무손상 항체 또는 상기 항원-결합 단편으로 이루어진, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 중쇄 불변 영역을 더 포함하는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린 아형으로 이루어진, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 경쇄 불변 영역을 더 포함하는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 경쇄로 이루어진, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 불변 영역, 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 불변 영역 중 적어도 하나를 포함하는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄, 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 중 적어도 하나를 포함하는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 항체 폴리펩타이드는 치료적 모이어티(therapeutic moiety)에 직접적으로 또는 간접적으로 연결되어 있는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 치료적 모이어티는, 1종 이상의 방사성 동위원소를 포함하거나 또는 1종 이상의 방사성 동위원소로 이루어진 세포독성 모이어티(cytotoxic moiety)인, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 상기 1종 이상의 방사성 동위원소는 베타-이미터(emitter), 오거(auger)-이미터, 전환 전자-이미터, 알파-이미터 및 저 광자 에너지-이미터로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 1종 이상의 방사성 동위원소는,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$ ;  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{76}\text{As}/^{77}\text{As}$ , 또는  $^{153}\text{Sm}$ 을 포함하는 장거리(long-range) 베타-이미터;  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ , 또는  $^{161}\text{Tb}$ 를 포함하는 중거리(medium range) 베타-이미터;  $^{45}\text{Ca}$ ,  $^{35}\text{S}$  또는  $^{14}\text{C}$ 를 포함하는 저-에너지 베타-이미터;  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ , 또는  $^{135}\text{La}$ 를 포함하는 전환 또는 오거-이미터; 및  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ac}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  또는  $^{221}\text{At}$ 를 포함하는 알파-이미터로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 상기 항체 폴리펩타이드는 검출 가능한 모이어티를 더 포함하는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 검출 가능한 모이어티는 방사성 동위원소를 포함하거나 또는 방사성 동위원소로 이루어진, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 방사성 동위원소는  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{123}\text{I}$  및  $^{201}\text{Tl}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 17**

제10항에 있어서, 상기 치료적 모이어티 및 검출 가능한 모이어티 중 적어도 하나는 연결 모이어티(linking moiety)를 통해 간접적으로 상기 항체 폴리펩타이드에 연결되어 있는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 연결 모이어티는 킬레이터(chelator)인, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 킬레이터는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)의 유도체, 테페록스아민(DFO), 다이에틸렌트라이아민헵타아세트 아비드(DTPA)의 유도체, S-2-(4-아이소티오사이아나토 벤질)-1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA)의 유도체 및 1,4,8,11-테트라아자사이클로도

테칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA)의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 폴리펩타이드.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항체 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 핵산 분자.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 서열번호 14 및 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

**청구항 22**

제20항에 따른 핵산 분자를 포함하는 재조합 숙주 세포.

**청구항 23**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항체 폴리펩타이드를 포함하는 전립선암의 치료 또는 진단에 사용하는 약학 조성물.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체를 더 포함하는, 약학 조성물.

**청구항 25**

제23항에 있어서, 치료될 상기 전립선암은 전이성 전립선암 또는 미소전이성(micrometastatic) 전립선암인, 약학 조성물.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 치료될 상기 전이성 전립선암은 림프계의 전이: 척추(spine), 척추뼈(vertebrae), 골반, 또는 갈비뼈를 포함하는 뼈의 전이; 또는 골반, 직장, 방광, 또는 요도 내의 전이인, 약학 조성물.

**청구항 27**

제23항에 있어서, 치료될 상기 전립선암은 거세 저항성 전립선암(castration-resistant prostate cancer: CRPC)인, 약학 조성물.

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

### **발명의 설명**

### **기술 분야**

[0001] 본 발명은, 일반적으로, 특히 전립선암 분야에서, 치료 및 진단 체제 및 방법의 분야에 관한 것이다.

### **배경 기술**

[0002] 전립선암은 현재 남성에게서 가장 흔한 형태의 암이다. 전립선은 정액에서의 한 성분인 유체를 생성하는 남성의 호두-크기의 샘(gland)이다. 전립선은 조직의 외부 층에 의해 에워싸인 2개 이상의 로브(lobe) 또는 섹션을 갖는다. 전립선은 직장의 앞에 그리고 방광(urine bladder) 바로 아래에 위치하며, 요도를 감싼다.

[0003] 전립선암의 발생은 유럽의 북서부 및 미국에서 가장 많다. 종양의 성장은 통상적으로 장기간 동안 발생하는 과정이다. 전립선암은 보통 경증 형태의 암이다. 실제로, 전립선암으로 진단된 남성의 대다수는 생존하고 회복하

며, 단지 소수의 남성만이 초기 단계에서 전이하는 더욱 공격적인 형태의 전립선암에 봉착하고 있다. 이 공격적인 형태의 전립선암은, 암이 피막외(extracapsular) 조직까지 퍼지기 전, 오직 초기 단계에서 진단되는 경우에만 치유 가능하다.

- [0004] 현재, 전립선암의 진단 및 모니터링은 전형적으로는 환자의 혈액에서 전립선 특이적 항원(prostate specific antigen: PSA)의 농도를 측정함으로써 수행될 수 있다. PSA의 농도가 여러 시점에서 수행된 몇몇의 연속적 측정에서 뚜렷하게 높은 경우, 그 평가는 전립선암의 개연성(probability)이 존재한다는 것이다. 이 시점에서, 전립선암을 검증하기 위해 생검(biopsy)이 수행될 수 있다.
- [0005] PSA(칼리크레인 III(kallikrein III)으로도 또한 공지되어 있음)는 전립선의 분비 세포에서 생성되는 237개의 아미노산의 단일 쇠로 구성된 단백질이다. 이들 분비 세포는 전체 전립선 샘플에서 발견될 수 있다. PSA는 전립선암에 대해 잘 확립되고 전반적으로 연구된 마커이다. 건강한 세포와 비교하면, PSA의 생성은 악성(malignant) 세포에서 더욱 낮으며, 과다형성(hyperplastic) 세포에서 더욱 높다. 따라서, PSA의 농도는 실제로 전립선암을 앓는 남성으로부터의 혈액에서 더욱 높은 것과는 오히려 모순되는 것이다. 그러나, 악성 세포가 악화된 세포 구조를 가지며, 이에 따라 PSA에 대해 더욱 투과 가능한 것이라고 하는 설명이 있을 수 있다.
- [0006] 전립선암의 요법을 위해 표적으로서 적합할 수 있는 또 다른 중요한 세린 프로테아제는 인간 샘 칼리크레인 2(human glandular kallikrein 2: hK2)이다. hK2를 암호화하는 유전자는 PSA를 암호화하는 유전자와 함께 염색체 19에 위치한다. hK2는 단지 PSA와 같이 전립선 조직에서 주로 발현한다. 전립선에서, PSA는 비활성 프로-폼(pro-form)으로 존재하며, hK2의 펩티다아제 작용을 통해 활성화된다. hK2에 대한 면역조직화학 검사에서는, hK2가 분화의 수준과 관련하여 발현되는 것을 보여준다. 이는, hK2가 전립선암을 겪게 되는 조직과 같이 저 분화의 조직에서 더욱 높은 수율로 발현되며, 그리고 또 다른 통상적인 전립선 문제인 양성 전립선 과다형성(benign prostatic hyperplasia: BPH)을 겪게 되는 조직과 같이 고 분화의 조직에서 더욱 낮은 수율로 발현되는 것을 의미한다.
- [0007] 전립선암의 현재 요법은 수술(예컨대, 근치 전립선절제술(radical prostatectomy)), 방사능 요법(라듐-223 클로라이드 투여, 근접치료(brachytherapy) 및 외부 방사선 요법을 포함함), 고강도 집속 초음파(high-intensity focused ultrasound: HIFU), 화학요법, 경구 화학치료 약물, 냉동수술(cryosurgery)(종양을 동결시킴), 호르몬 요법(예컨대, 항안드로겐 요법), 거세, 또는 전술한 것들의 조합이다.
- [0008] 그러나, 이들 요법의 대부분(수술 및 외부 방사선 요법)은 일차 종양 및 대 전이의 치료에만 (또는 주로) 유용할 뿐이다. 화학요법은 암의 파종에 사용되지만 이들 환자의 대부분에 대해서는 아니며, 이는 일시적인 효과이고/이거나 생존을 지연시킨다. 따라서, 파종성의 악성 질환, 특히 미소전이의 경우에 상당한 개선을 달성하기 위해서는, 다른 또는 보완적인 치료 양식이 필요하다.
- [0009] 항체 및 이의 단편과 같은 표적 분자를 이용하는 요법, 예컨대, 면역요법 또는 방사면역요법은 파종성 질환의 요법의 가능성을 제공할 수 있다.
- [0010] 따라서, 전립선암을 치료 및 진단하는 새로운 치료제 및 치료방법이 필요하다.

**발명의 내용**

[0011] 따라서, 본 발명은, 당해 분야에서 상기-확인된 결함 및 결점들 중 하나 이상을 단독으로 또는 임의의 조합으로 경감, 완화 또는 제거하고자 하며, 첨부된 특허 청구범위에 따른 치료제 및 치료방법을 제공함으로써 적어도 상기 언급된 문제들을 해결한다.

[0012] 본 발명의 제1 양상은 전립선 특이적 항원(PSA)에 대한 결합 특이성을 갖는 항체 폴리펩타이드를 제공하되, 여기서 항체 폴리펩타이드는,

[0013] (a) 서열번호 1 및 서열번호 2 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역

[0014] CDRH1: TTGMGVS 서열번호 1

[0015] CDRH2: HIYWDDDKRYSTSLK 서열번호 2

[0016] CDRH3: KGYGYFDY 서열번호 3

[0017] 및/또는

[0018] (b) 서열번호 4 및 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0019] CDRL1: RASQNVNTDVA **서열번호 4**

[0020] CDRL2: STSYLQS **서열번호 5**

[0021] CDRL3: QQYSNYPLT **서열번호 6**

[0022] 을 포함하며, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 하나 이상의 인간 항체로부터의 프레임워크 아미노산 서열을 포함한다.

[0023] 6개의 아미노산 서열은, 문헌[Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Immunological Interest*, 5th edition, NIH, Bethesda, MD](이의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)에 따라 정의된 바와 같이, 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 상보성 결정 영역(complementarity-determining region)(CDR)을 나타낸다.

[0024] "항체 폴리펩타이드"란, 본 발명자들에 의하면, 실질적으로 무손상(intact) 항체 분자, 단쇄 항체, 이중체(diabody), 이중특이성(bispecific) 항체, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 동종이량체(homodimer) 및 이종이량체(heterodimer), 및 항원 결합 단편 및 이의 유도체를 포함한다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노산"은 20개의 표준 유전자-암호화된 아미노산 및 (자연의 'L' 형태와 비교해서) 이들의 상응하는 'D' 형태의 입체이성체, 오메가-아미노산, 다른 자연-발생 아미노산, 비통상적인 아미노산(예컨대, α, α-이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산 등) 및 화학적으로 유도된 아미노산을 포함한다(이후 내용 참조).

[0026] 예컨대 "알라닌" 또는 "Ala" 또는 "A"와 같이, 아미노산이 특별히 열거되는 경우, 상기 용어는 달리 명시적으로 기술되지 않는 한 L-알라닌 및 D-알라닌 둘 다를 지칭한다. 원하는 기능 성질이 폴리펩타이드에 의해 유지되는 한, 다른 비통상적인 아미노산이 또한 본 발명의 폴리펩타이드에 대해 적합한 성분일 수 있다. 제시된 펩타이드에 대하여, 각 암호화된 아미노산 잔기는, 적절하다면, 통상의 아미노산의 3문자(trivial) 명칭에 상응하는 단일 문자 명칭으로 표시된다.

[0027] 일 실시형태에 있어서, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 폴리펩타이드는 L-아미노산들을 포함하거나 또는 이들로 이루어진다.

[0028] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 PSA에 대한 특이성, 바람직하게는, 인간 PSA의 성숙한 활성 형태를 나타낸다.

[0029] 인간 PSA의 아미노산 서열은 이하에 제시된다.

APLILSRIVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSV  
ILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHDMLLRSE  
PAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWSIEPEEFLTPKQLQCVDLHVISNDVC  
AQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPE  
RPSLYTKVVHYRKWKIDTIVANP

**[서열번호 7]**

[0030]

[0031] (여기서 성숙한 활성 PSA 단백질의 서열은 밑줄쳐 있다; 또한 UniProtKB 수탁 번호 P07288 참조)

[0032] 정액 장액(seminal plasma)에서 발견되는 대부분의 PSA는 비활성적이며, 단백질 C 억제제(protein C inhibitor: PCI)와 착체화된다. 또한, PSA는 다른 세포외 프로테아제 억제제와의 착체를 형성하는 것이 가능하다. 시험관내 연구는, PSA가 α2-항플라스민(α2-AP), ACT, AMG, 항-트롬빈 III(ATIII), C1-불활성화제 및 플라스미노겐 활성화제 저해제-1(plasminogen activator inhibitor-1: PAI-1)에 결합할 수 있음을 제시한다.

[0033] 일 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 PSA의 착체화된 아이소폼(isoform)과 비교하여 PSA의 자유 혹은 유리(free)(즉, 비-착체화된) 아이소폼에 대한 특이성을 갖는다. PSA의 자유 아이소폼에 대해 특이성을 갖는 결합 부분은 PSA의 자유 아이소폼에 노출되지만 PSA의 착체화된 아이소폼에 노출되지 않은 에피토프(epitope)에 대해 결합 특이성을 가질 수 있으며, 이는 선형 또는 배좌(conformational)(즉, 비-선형) 에피토프일 수 있다. 예를 들면, 항체 폴리펩타이드는, PSA가 PCI에 착체화되는 경우 정액에 존재하는 형태와 같이, 자유 PSA에서 노출되고 착체화된 아이소폼에서 노출되지 않은 PSA의 촉매 클레프트(catalytic cleft)의 일부인 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 대해 특이성을 가질 수 있다.

- [0034] "특이성"에 대하여, 본 발명자들은, 항체 폴리펩타이드가 생체내, 즉, PSA가 인체 내에 존재하는 생리학적 조건 하에서 PSA에 결합할 수 있음을 의미한다. 바람직하게는, 항체 폴리펩타이드는 생체내에서 임의의 다른 단백질에 결합하지 않는다.
- [0035] 이러한 결합 특이성은 당해 분야에 잘 공지된 방법, 예컨대, ELISA, 면역조직화학, 면역침강, 웨스턴 블롯(Western blot) 및 PSA를 발현하는 형질주입된(transfected) 세포를 사용하는 유세포분석(flow cytometry)에 의해 결정될 수 있다. 유리하게는, 항체 폴리펩타이드는 PSA에 선택적으로 결합할 수 있다. 즉, 이것은 다른 단백질들(특히, 다른 칼리크레인, 예컨대 전립선 특이성 항원 또는 PSA)에 대해서보다 PSA에 대해 적어도 10배 더 강하게 결합한다.
- [0036] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 5A10 항체의 선택된 인간화 버전에 기초하며, 이는 예기치 않은 바람직한 성질을 나타낸다.
- [0037] 특히, 본 발명의 인간화 항체들은 이들의 CDR 서열이 유도되는 모(parent) 뮤린 5A10 항체(m5A10)와 비교하여 종양 내로의 향상된 종양 내 흡수율(enhanced uptake into tumour)을 나타낸다(실시예 6 참조).
- [0038] "향상된 종양 내 흡수율"에 대하여, 본 발명자들은, 본 발명의 항체 폴리펩타이드(5A10 항체의 인간화된 형태)가 전립선 종양을 지닌 환자에게 투여되는 경우 더 적은 정상의 기관(organ) 독성을 갖는 모 뮤린 5A10 항체보다 높은 종양 흡수된 투여량을 제공할 수 있음을 의미한다.
- [0039] 예기치 않은 더 양호한 종양 축적은 본 발명의 항체의 더 양호한 치료적 프로파일을 제공한다. 이것은 이어서 더욱 높은 방사선 선량(흡수된 선량)을 사용하도록 허용하며, 이로 인해 건강한 조직 및 기관에 대해 부작용 또는 '부수적 손상(collateral damage)'을 증가시키는 일 없이 전립선암의 치료에서 더욱 우수한 효능을 초래한다.
- [0040] 인간화(humanisation)(재형성(reshaping) 또는 CDR-이식(grafting)이라고도 지칭됨)는, 이종발생성 공급원(xenogeneic source)으로부터(통상적으로, 설치류, 예컨대 마우스로부터)의 단핵 항체의 면역원성을 감소시키기 위한 그리고 인간 면역계의 활성화를 개선시키기 위한 기술이다(문헌 [Almagro & Fransson, 2008, *Frontiers in Bioscience* 13:1619-1633]에 의한 검토 참조; 이의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 임상적 시도에서의 인간화된 단핵 항체가 몇몇 존재하며, 일부가 약물로서 사용되는 것이 승인되었다. 비록 분자생물학의 기술을 사용하는 공학적으로 조작된(engineered) 단핵 항체를 생성시키는 기술은 상대적으로 간단할지라도, 인간 프레임워크로의 설치류 상보성 결정 영역(CDR)의 단순한 이식은 항상 본래 단핵 항체의 결합 친화성 및 특이성을 재구성하지는 않는다. 항체를 인간화하기 위하여, 인간화 항체의 설계는 본래 분자의 기능을 재생성시키는 데 있어 결정적인 단계이다.
- [0041] 인간화 항체의 설계는 사용되는 CDR의 정도 및 사용되는 인간 프레임워크를 포함하는 몇몇 주된 선택을 포함한다. 그러나, 모 항체의 특이성을 유지하기 위하여, 설치류 mAb로부터 인간 프레임워크 영역 내로 하나 이상의 잔기를 치환하는 것(소위 역돌연변이(backmutation))이 결정적일 수 있다. 필요한 역돌연변이의 위치를 동정하는 것에서는 상세한 서열/구조적 분석이 요구된다. 최근, 선택된 위치들에서 아미노산을 변화시키는 데 있어서 파지 라이브러리(phage library)가 사용되어 왔다. 유사하게, 설치류 CDR을 이식하는 대부분의 적절한 인간 프레임워크를 선택하는 데 있어서 많은 접근법이 사용되어 왔다. 초기 실험에서는, 설치류 단핵 항체에 대한 서열 동일성과 관계없이(소위 고정된 프레임워크 접근) 잘-특성규명된 인간 단핵 항체의 제한된 하위셋을 사용하였다(종종 구조가 입수 가능한 경우). 일부 군에서는 설치류 가변 영역에 대한 높은 아미노산 서열 동일성을 갖는 가변 영역을 사용하고(상동성 매칭 또는 최적화(best-fit)); 다른 것들에서는 공통(consensus) 또는 생식세포계열(germline) 서열을 사용하지만, 여전히 다른 것들은 몇몇 상이한 인간 단핵 항체로부터의 각 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 내에서 프레임워크 서열의 단편을 선택한다. 표면 설치류 잔기를 인간 단핵 항체들에서 발견되는 대부분의 통상의 잔기로 대체하는 개발된 인간화에 대한 접근("리서피싱(resurfacing)" 또는 "비니어링(veneering)") 및 CDR의 정도의 여러 정의를 사용하는 것들이 또한 존재한다.
- [0042] 그러나, 항체 인간화의 집중적인 연구에도 불구하고, 일부 설치류 단핵 항체에서는 인간화가 곤란한 것으로 입증되었다.
- [0043] 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 개발에서는 프레임워크 영역에서뿐만 아니라 CDR 일부에서도 역돌연변이가 요구되었다(하기 실시예 2 참조). 따라서, 서열번호 1 내지 6에서 앞서 나타낸 6개의 CDR 서열은 뮤린 항-PSA 항체 5A10으로부터 유도되지만, 모 뮤린 항체와 비교하여 CDRH2(서열번호 2) 및 CDRH1(서열번호 4)에서의 돌연변이를 함유한다. 5A10의 인간화된 버전에 대한 최적의 특이성 및 안정성을 제공하기 위하여 CDR에서의 이들 돌연변이

가 이루어졌다.

- [0044] 일 실시형태에 있어서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는  $0.1 \times 10^{-9}$  M 초과인  $K_D$ 를 갖는 PSA를 결합한다.
  - [0045] 상호작용(예컨대, 항체와 리간드 사이의 상호작용)의 전체 친화성( $K_D$ ) 및 온-레이트(on-rate)( $k_a$ ) 및 오프-레이트(off-rate)( $k_d$ )를 측정하는 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 예시적인 시험관내 방법은 하기 실시예 3에 기재되어 있다. 또한, 유세포 분석에 기초한 방법을 사용하는 것도 또한 고려 가능하다(문헌 [Sklar *et al.*, 2002, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **31**:97-119]; 이의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).
  - [0046] 유리하게는, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는  $1.0 \times 10^{-10}$  M 미만의 PSA에 대한 친화도( $K_D$ ), 예컨대,  $9.0 \times 10^{-11}$  M 미만,  $8.0 \times 10^{-11}$  M,  $7.0 \times 10^{-11}$  M,  $6.0 \times 10^{-11}$  M,  $5.0 \times 10^{-11}$  M,  $4.0 \times 10^{-11}$  M,  $3.0 \times 10^{-11}$  M,  $2.0 \times 10^{-11}$  M 또는  $1.0 \times 10^{-11}$  M 미만의  $K_D$ 를 갖는다.
  - [0047] 본 발명의 항체 폴리펩타이드가 항체 중쇄, 항체 경쇄, 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 동종이량체 및 이종이량체, 및 항원 결합 단편 및 이의 유도체를 구성할 수 있음은 당업자가 이해할 것이다.
  - [0048] 일 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 무손상(즉, 완전한) 항체, 예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 분자를 포함하거나 또는 이것으로 이루어진다.
  - [0049] 유리하게는, 항체 폴리펩타이드는 무손상 IgG 분자, 또는 항원 결합 단편 또는 이의 유도체를 포함하거나 또는 이것으로 이루어진다.
  - [0050] IgG 분자는 임의의 공지된 아형, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4일 수 있다.
  - [0051] 항체의 "항원-결합 단편 및 유도체"에 대하여, 본 발명자들은 Fv 단편(예컨대, 단일쇄 Fv 및 이황화-결합된 Fv), Fab-유사 단편(예컨대, Fab 단편, Fab' 단편 및 F(ab)<sub>2</sub> 단편) 및 도메인 항체(단일 V<sub>H</sub> 가변 도메인 또는 V<sub>L</sub> 가변 도메인)를 포함한다.
  - [0052] 예를 들면, 항체 폴리펩타이드는 scFv 또는 Fab 단편을 포함할 수 있거나 또는 이것으로 이루어질 수 있다.
  - [0053] 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 추가의 특징적인 특성은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에서 하나 이상의 인간 항체로부터의 프레임워크 아미노산 서열의 존재이다.
  - [0054] "프레임워크 서열"에 대하여, 본 발명자들은 CDR 이외의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 영역을 포함한다. 전형적으로, 각 가변 도메인은 상기 CDR 서열이 하기와 같이 위치되는 FR1 내지 FR4로 명명된 4개의 프레임워크 영역을 포함할 것이다:
- FR1 --- CDR1 --- FR2 --- CDR2 --- FR3 --- CDR3 --- FR4
- [0055]
  - [0056] 프레임워크 영역의 아미노산 서열은 완전하게 인간일 수 있거나 또는 하나 이상의 역돌연변이를 함유할 수 있는 것(즉, 인간 프레임워크에 존재하는 아미노산 서열은 CDR이 유도되는 모 설치류 가변 도메인 내의 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산으로 치환될 수 있는 것)임이 이해될 것이다. 결론적으로, 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인(들)의 FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4의 서열은 비-자연-발생적일 수 있다.
  - [0057] 일 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드의 프레임워크 서열은 하나 이상의 인간 항체로부터의 프레임워크 영역과 적어도 70%의 서열 동일성, 예컨대, 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상을 공유한다. 따라서, 항체 폴리펩타이드는 인간 항체의 FR1 영역과의 적어도 70%의 서열 동일성을 공유하는 중쇄 FR1 영역을 포함할 수 있다. 항체 폴리펩타이드의 중쇄 및 경쇄는 여러 인간 항체의 프레임워크 영역과 서열 동일성을 공유할 수 있다.
  - [0058] 퍼센트 동일성은, 예컨대, 파라미터로서 포괄 정렬 옵션(global alignment option), 점수 매트릭스(scoring matrix) BLOSUM62, 오픈 갭 패널티(opening gap penalty) -14, 연장 갭 패널티(extending gap penalty) -4를 사용하는 Expasy facility site([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html))에서의 LALIGN 프로그램(Huang and Miller, *Adv. Appl. Math.* (1991) 12:337-357)에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 2개의 폴리펩타이드 사이의 퍼센트 서열 동일성은 적합한 컴퓨터 프로그램, 예컨대, 위스콘신 유전자 컴퓨팅 그룹 대학(University of Wisconsin Genetic Computing Group)의 GAP 프로그램을 사용하여 결정될 수 있으며, 이것은 서

열이 최적으로 정렬되는 폴리펩타이드와 관련하여 퍼센트 동일성이 계산되는 것임이 이해될 것이다.

[0059] 대안적으로, 정렬은 (본 명세서에 참고로 편입되어 있는 문헌 [Thompson *et al.*, 1994, *Nucl. Acid Res.* 22:4673-4680]에 기재된 바와 같이) Clustal W 프로그램을 사용하여 실시될 수 있다. 사용된 파라미터는 하기와 같을 수 있다:

[0060] - 패스트 쌍화 정렬 파라미터(Fast pair-wise alignment parameters): K-튜플(tuple)(워드) 크기; 1, 창 크기; 5, 갭 패널티; 3, 상부 대각선 수; 5. 접수화법: x 퍼센트.

[0061] - 다중 정렬 파라미터: 갭 오픈 패널티; 10, 갭 연장 패널티; 0.05.

[0062] - 점수 매트릭스: BLOSUM.

[0063] 대안적으로, 국소 서열 정렬을 결정하는 데 있어서 BESTFIT 프로그램이 사용될 수 있다.

[0064] 일 실시형태에 있어서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 중쇄 가변 도메인의 프레임워크 서열은 인간 면역글로불린 VH4 유전자 패밀리에 의해 암호화된다.

[0065] 예를 들면, 프레임워크 서열은 적어도 부분적으로 VH4-28 세포계열 유전자에 의해 암호화될 수 있다(예컨대, FR1, FR2 및 FR3은 VH4-28에 의해 암호화될 수 있으며, FR4는 JH1에 의해 암호화될 수 있다).

[0066] 따라서, 일 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역을 포함하거나 또는 이것으로 이루어질 수 있다(여기서 CDR 서열은 볼드체로 밑줄쳐 있다):

```

Q V T L K E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T
T G M G V S W I R Q P P G K A L E W L A H I Y W D D D K R Y S
T S L K T R L T I S E D S S K N Q V V L T M T N M D P V D T A
T Y Y C A R K G Y Y G Y F D Y W G Q G T L V T V S S
    
```

[서열번호 8]

[0067]

[0068] 일 실시형태에 있어서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 서열은 인간 면역글로불린 Kappa V4 유전자 패밀리에 의해 암호화된다.

[0069] 예를 들면, 프레임워크 서열은 적어도 부분적으로 IgkV4-B3 생식세포계열 유전자에 의해 암호화될 수 있다(예컨대, FR1, FR2 및 FR3은 IgkV4-B3에 의해 암호화될 수 있으며, FR4는 JK2에 의해 암호화될 수 있다).

[0070] 따라서, 일 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함하거나 또는 상기 경쇄 가변 영역으로 이루어질 수 있다(여기서 CDR 서열은 볼드체로 밑줄쳐 있다):

```

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T V T C R A S Q N V N
T D V A W Y Q Q K P G K A P K A L I F S T S Y L Q S G V P S
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
Y S N Y P L T F G Q G T K V E I K
    
```

[서열번호 9]

[0071]

[0072] "적어도 부분적으로"에 대하여, 프레임워크 서열이 기준 유전자에 의해 암호화된 적어도 10개의 연속 아미노산, 예컨대, 적어도 20개의 연속 아미노산을 포함하는 것을 포함한다. 또한, 본 발명자들은 FR 영역에서 전부는 아니지만 하나 이상은 기준 유전자에 의해 암호화되는 것을 포함한다(예컨대, FR3이 아닌, FR1 및 FR2는 기준 유전자에 의해 암호화될 수 있다).

[0073] 바람직한 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0074] 임의로, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 중쇄 불변 영역 또는 이의 일부를 더 포함한다.

[0075] 일 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 IgG 중쇄(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중쇄)의 CH1, CH2

및/또는 CH3 영역을 포함한다. 따라서, 항체 폴리펩타이드는 IgG1 중쇄로부터의 불변 영역 모두 또는 일부를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체 폴리펩타이드는 CH1 및 CL 불변 영역을 포함하는 Fab 단편일 수 있다.

[0076] 일 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 항체 Fc-영역을 포함할 수 있다. 숙련자에게는, Fc 부분이 IgG 항체로부터 유래될 수 있거나, 또는 여러 부류의 항체(예컨대, IgM, IgA, IgD 또는 IgE)로부터 유래될 수 있음이 이해될 것이다. 일 실시형태에 있어서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체로부터 유래된다.

[0077] Fc 영역은 자연-발생적(예컨대, 내인성 생성된 항체의 일부)일 수 있거나, 또는 인위적(예컨대, 자연-발생 Fc 영역과 비교되는 하나 이상의 점 돌연변이 및/또는 CH2 도메인 내의 탄수화물 잔기에 대한 변형을 포함함)일 수 있다. FcR을 결합하는 이들의 능력을 개선시키는 점 돌연변이를 갖는 Fc-영역은, 예컨대, 혈청 반감기를 변경시킴으로써 또는 ADCC 및 CDC에 수반된 Fc $\gamma$  수용기(Fc $\gamma$ R)에 대한 결합을 조정함으로써(즉, 향상시키거나 또는 감소시킴으로써) 유리할 수 있다.

[0078] 유리하게는 항체 폴리펩타이드는 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 이의 부분을 포함할 수 있다:

```
A S T K G P S V F F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D
Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L
Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K
V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E
V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L
T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V
M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
```

**[서열번호 10]**

[0079] 임의로, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 경쇄 불변 영역 또는 이의 일부를 더 포함한다.

[0081] 일 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 IgG 경쇄(예컨대, 카파 또는 람다 경쇄)의 CL 영역을 포함한다.

[0082] 예를 들면, 항체 폴리펩타이드는 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 이의 일부를 포함할 수 있다:

```
T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F
Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D
S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L
S S P V T K S F N R G E C
```

**[서열번호 11]**

[0083] 유리하게는, 항체 폴리펩타이드는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어진 중쇄 불변 영역, 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어진 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0085] 일 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는,

[0086] (a) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어진 중쇄(여기서, 가변 영역은 볼드체이고, CDR 서열은 밑줄쳐 있음)

Q V T L K E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S  
T T G M G V S W I R Q P P G K A L E W L A H I Y W D D D K R  
Y S T S L K T R L T I S E D S S K N Q V V L T M T N M D P V  
D T A T Y Y C A R K G Y Y G Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S  
T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F  
P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S  
L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D  
K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F  
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K  
F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V  
L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I  
S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C  
L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L  
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H  
E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

[서열번호 12]

[0087]

[0088]

및/또는

[0089]

(b) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어진 경쇄(여기서, 가변 영역은 볼드체이고, CDR 서열은 밑줄쳐 있음)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T V T C R A S Q N V N  
T D V A W Y Q Q K P G K A P K A L I F S T S Y L Q S G V P S  
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q  
Y S N Y P L T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S  
D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N  
A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K  
A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

[서열번호 13]

[0090]

[0091]

를 포함한다.

[0092]

예를 들면, 항체 폴리펩타이드는 이황화 가교(disulphide bridge)에 의해 함께 연결된 서열번호 12의 2개의 중쇄와 서열번호 13의 2개의 경쇄를 포함하거나 또는 이것으로 이루어져서 전형적인 IgG 항체 구조를 형성할 수 있다.

[0093]

본 발명의 항체 폴리펩타이드는 변형되거나 또는 유도된 하나 이상의 아미노산을 포함하거나 또는 이것으로 이루어질 수 있다.

[0094]

하나 이상의 아미노산의 화학적 유도체는 작용성 결기와의 반응에 의해 달성될 수 있다. 이러한 유도된 분자는, 예컨대, 아민 염산염, *p*-톨루엔 설포닐기, 카복시벤즈옥시기, *t*-부틸옥시카보닐기, 클로로아세틸기 또는 폼일기를 형성하도록 유도체화되어 있는 분자들을 포함한다. 자유 카복실기는 염, 메틸 및 에틸 에스터 또는 다른 유형의 에스터 및 하이드라자이드를 형성하도록 유도체화될 수 있다. 자유 하이드록실기는 0-아실 또는 0-알킬 유도체를 형성하도록 유도체화될 수 있다. 또한, 화학적 유도체로서 20개의 표준 아미노산의 자연-발생 아미노산 유도체를 함유하는 펩타이드인 것이 포함된다. 예를 들면, 4-하이드록시프롤린은 프롤린에 대해 치환될 수 있고; 5-하이드록시라이신은 라이신에 대해 치환될 수 있으며; 3-메틸히스티딘은 히스티딘에 대해 치환될 수 있고; 호모세린은 세린에 대해 치환될 수 있으며, 오르니틴은 라이신에 대해 치환될 수 있다. 또한 유도체는, 필수 활성이 유지되는 한, 하나 이상의 부가 또는 결실을 함유하는 펩타이드를 포함한다. 기타 변형은 아미드화, 아미노 말단 아실화(예컨대, 아세틸화 또는 티오글리콜산 아미드화), 말단 카복시아미드화(예컨대, 암모니아 또는 메틸아민 사용), 및 기타 말단 변형을 포함한다.

[0095]

당업자에게는, 펩타이드모방체(peptidomimetic) 화합물이 또한 유용할 수 있음이 추가로 이해될 것이다. 용어 '펩타이드모방체'는 치료제로서 특정 펩타이드의 변형 및 원하는 특징을 모방하는 화합물을 지칭한다.

[0096]

예를 들면, 상기 폴리펩타이드는, 아미노산 잔기가 펩타이드(-CO-NH-) 연결기(linkage)에 의해 연결되어 있는 분자들뿐만 아니라, 펩타이드 결합이 역전되어 있는 분자들을 포함한다. 이러한 레트로-인버소(retro-inverso) 펩타이드모방체는 당해 분야에 공지된 방법, 예컨대, 본 명세서에 참고로 편입되는 문헌 [Meziere *et al.*

(1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237]에 기재된 바를 사용하여 제조될 수 있다. 이 접근법은 주 사슬에 수반되는 변화들을 함유하는 슈도-펩타이드를 제조하는 것을 포함하지만, 결사슬의 배향은 포함하지 않는다. CO-NH-펩타이드 결합 대신에 NH-CO 결합을 함유하는 레트로-인버스(retro-inverse) 펩타이드는 단백질분해에 대해 매우 크게 저항적이다. 대안적으로, 상기 폴리펩타이드는, 아미노산 잔기들 중 하나 이상이 통상적인 아미드 연결기 대신에  $\gamma$ -(CH<sub>2</sub>NH)- 결합에 의해 연결되어 있는 펩타이드모방체 화합물일 수 있다.

- [0097] 추가의 대안예에서, 펩타이드 결합은, 아미노산 잔기의 탄소 원자들 사이의 이격을 유지하는 적절한 링커 잔기가 사용될 수 있다는 완전한 전제 하에 제공될 수 있으며; 이것은 링커 잔기에 대하여 펩타이드 결합과 실질적으로 동일한 하전(charge) 분배 및 실질적으로 동일한 평탄도(planarity)를 갖는 데 있어서 유리할 수 있다.
- [0098] 상기 폴리펩타이드는 엑소-단백질분해 소화(exo-proteolytic digestion)에 대한 감수성을 감소시키는 데 도움을 주기 위하여 이의 N- 또는 C-말단에서 편의상 블록킹될 수 있는 것이 이해될 것이다.
- [0099] 다양한 비-암호화된 또는 변형된 아미노산, 예컨대, D-아미노산 및 N-메틸 아미노산이 또한 포유류 펩타이드를 변형시키기 위하여 사용되어 왔다. 추가로, 추정된 생체활성 입체형태(bioactive 이종이량체)는 공유 변형화, 예컨대, 고리화에 의해 또는 락탐 또는 다른 유형의 가교의 혼입에 의해 안정화될 수 있으며, 예컨대, 본 명세서에 참고로 편입되는 문헌[Veber *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2636 및 Thursell *et al.*, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111:166]을 참조한다.
- [0100] 당업자에게는, 본 발명의 항체 폴리펩타이드가 의의 의도된 용도를 예컨대, 생체내 조영제(imaging agent) 및 치료제로서 촉진시키기 위해 작용 모이어티로 증대될 수 있음이 이해될 것이다.
- [0101] 따라서, 일 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 치료적 모이어티에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다.
- [0102] 임의의 적절한 치료적 모이어티가 사용될 수 있다. 적절한 치료적 모이어티는 전립선 암세포의 성장을 감소 또는 저해하거나, 또는 특별히 사멸시킬 수 있는 것이다. 예를 들면, 치료제는 세포독성 모이어티일 수 있다. 세포독성 모이어티는 1종 이상의 방사성 동위원소(radioisotope)를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 예를 들면, 1종 이상의 방사성 동위원소는 베타-이미터(beta-emitter), 오거(Auger)-이미터, 전환 전자-이미터, 알파-이미터 및 저 광자 에너지-이미터로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택될 수 있다. 1종 이상의 방사성 동위원소는, 제제의 부근에 고 흡수된 투여량을 생성하는 국소 흡수된 에너지의 방출 패턴을 각각 독립적으로 갖는 것이 바람직할 수 있다. 예시적인 방사성 동위원소는 <sup>90</sup>Y, <sup>32</sup>P, <sup>186</sup>Re/<sup>188</sup>Re; <sup>166</sup>Ho, <sup>76</sup>As/<sup>77</sup>As, <sup>89</sup>Sr, <sup>153</sup>Sm과 같은 장거리 베타-이미터; <sup>131</sup>I, <sup>177</sup>Lu, <sup>67</sup>Cu, <sup>161</sup>Tb, <sup>105</sup>Rh와 같은 중거리 베타-이미터; <sup>45</sup>Ca 또는 <sup>35</sup>S와 같은 저-에너지 베타-이미터; <sup>51</sup>Cr, <sup>67</sup>Ga, <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>114m</sup>In, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>201</sup>Tl과 같은 전환(conversion) 또는 오거-이미터; 및 <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>223</sup>Ac, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Pb, <sup>255</sup>Fm, <sup>223</sup>Ra, <sup>149</sup>Tb 및 <sup>221</sup>At와 같은 알파-이미터를 포함할 수 있다. 다른 방사성 핵종(radionuclide)이 이용 가능하며, 치료용으로 사용 가능할 것이다.
- [0103] 다른 실시형태에 있어서, 치료적 모이어티 또는 세포독성 모이어티는 WO 2006/087374 A1, 특히 이의 11페이지, 7 내지 15행에서 "트레이서(tracer)"로 개시된 바와 같이 모이어티가 아닌 것이 바람직할 수 있다.
- [0104] 하나의 바람직한 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드는 방사성 동위원소 <sup>177</sup>Lu에 연결된다(또는 그렇지 않으면 이로 표지화된다).
- [0105] 대안적으로, 치료적 모이어티는 하나 이상의 치료(예컨대, 세포독성) 약물, 예컨대, 세포분열억제 약물(cytostatic drug); 항-안드로겐 약물; 코르티손 및 이의 유도체; 포스포네이트; 테스토스테론-5- $\alpha$ -환원효소 저해제; 보론 어텐드(boron addend); 사이토카인; 탱시가긴(thapsigargin) 및 이의 대사물; 독소(예컨대, 사포린(saporin) 또는 칼리키아미신(calicheamicin)); 화학요법제(예컨대, 항대사물질(antimetabolite)); 또는 전립선 암종의 치료에 유용한 임의의 다른 치료 또는 세포독성 약물을 포함할 수 있거나 또는 이로 이루어질 수 있다.
- [0106] 예시적인 치료/세포독성 약물은, 예를 들어, 하기 것들을 포함할 수 있다:
- [0107] ● 세포분열억제제, 특히 사이클로포스아마이드, 클로람부실, 이포스파마이드, 부셀판, 로무스틴, 탁산, 에스트라무스틴, 포스페이트 및 다른 질소 머스타드, 항생제(독소루비신, 칼리키아미신 및 에스퍼라미신 포함), 빈카 알칼로이드, 아자리딘, 플라티늄-함유 화합물, 엔도스타틴, 알킬 설포네이트, 나이트로소우레아, 트리아젠, 엽산 유사체, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 효소, 전환된 우레아, 메틸-하이드라진 유도체, 다우노루비신, 양

친매성 아민을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아닌 투여량-제한 부작용을 갖는 것들,

[0108] • 플루타마이드 및 비칼루타마이드 및 이의 대사물과 같은 항-안드로겐;

[0109] • 코르티손 및 이의 유도체;

[0110] • 디포스포네이트 및 부포스포네이트와 같은 포스포네이트;

[0111] • 테스토스테론-5- $\alpha$ -환원효소 저해제;

[0112] • 보론 어텐드;

[0113] • 사이토카인;

[0114] • 탭시가긴 및 이의 대사물;

[0115] • 전립선 암종의 치료에 사용되는 다른 제제들.

[0116] 대안적으로, 세포독성 모이어티는 광자 활성화 요법, 중성자 활성화 요법, 중성자 유도된 오거 전자 요법, 싱크로트론 조사(synchrotron irradiation) 요법 또는 저 에너지 X-선 광자 활성화 요법과 같은 활성화 요법에 사용하기에 적절한 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있거나 또는 이로 이루어질 수 있다.

[0117] 예를 들면, 본 발명의 항체 폴리펩타이드로, 사전-투여된 고-Z 종양-표적 제제(표적izing agent)와의 상호작용에 의해 외부 X-선 조사로부터 국소 에너지 침적이 암 조직에서 향상되는 소위 광-활성화 방사선요법(photo-activation radiotherapy)(PAT)에 주로 초점을 맞춘 방사선요법의 진보를 위해 싱크로트론 방사(또는 저 에너지 X-선)을 이용하는 잠재성이 존재할 것이다.

[0118] PAT 치료 양상(modality)은 그레노블(Grenoble)에 있는 유럽 싱크로트론 방사 설비(European Synchrotron Radiation Facility)(ESRF)에서 ID17 바이오메디컬 빔라인(ID17 biomedical beamline)에 의해 제공되는 바와 같은 싱크로트론 공급원으로부터 얻어지는 단색 X-선을 이용하며, 앞으로는 새로운 스웨덴식 싱크로트론 설비, Max-IV와 같은 다른 설비에서 이용 가능한 것으로 기대된다.

[0119] 추가의 잠재적인 치료 양상으로서, "유도된 오거 전자 종양 요법(induced Auger electron tumour therapy)"에 대한 연구가 이번 룬드(Lund)에서의 유럽 파쇄 소스(European Spallation Source)(ESS)이며, 희망적으로 의학 적 실험 장소(station)이다. 반응기-생성된 열 및 반-열 중성자는 보론-중성자-캡처-요법(BNCT, Boron-Neutron-Capture-Therapy)에 오랫동안 사용되어 왔으며, 고 국소 흡수 에너지(흡수 선량)를 제공하는 유도 알파-파티클 및 리코일 핵( $^7\text{Li}$ )으로 사전-임상 실험 및 뇌 종양의 치료 모두에 사용되어 왔다. 유사한 접근법은 중성자를 사용하는 것이며, 중성자에 대한 고 단면적을 갖는 안정한 핵으로 표지된 적절한 종양-표적 분자를 사용하는 것이다. 항체 또는 펩타이드는 예를 들면, 안정한 가돌리늄( $^{157}\text{Gd}$ )으로 표지될 수 있으며, 소위 GdNCT(*Gadolinium Neutron Capture Therapy*)라 불리는 Gd-핵에 의해 포획되는 중성자에 대한 표적 분자로 작용한다. 몬테 카를로(Monte Carlo) 기술에 의하면, 종양 및 그 주위의 조직에서의 투여량 분포는,  $\gamma$ -광자, 중성자, 핵 리코일(nuclear recoil)뿐만 아니라 가돌리늄 또는 다른 잠재적 원소로부터 특징적 x-선, 내부 전환 및 오거-전자로부터 형성됨에 따라 계산된다.

[0120] 위에서 논의된 바와 같이, 치료적 모이어티(예컨대, 방사성 동위원소, 세포독성 모이어티 등)는 결합 모이어티(예컨대, 항체 또는 이의 단편)에 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 적절한 링커는 당해 분야에 알려져 있으며, 예를 들면, 보결 분자단, 비-폐놀성 링커(N-숙시이미딜-벤조에이트의 유도체; 도데카보레이트), 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)의 유도체, 다이에틸렌트라이아민헵타아세트아미드(DTPA)의 유도체, S-2-(4-아이소티오시아나토벤질)-1,4,7-트라이아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA)의 유도체 및 1,4,8,11-테트라아자사이클로도데칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA)의 유도체, 3,6,9,15-테트라아자비사이클로[9.3.1]-헵타데카-1(15),11,13-트라이엔-4-(S)-(4-아이소티오시아나토벤질)-3,6,9-트리아세트산(PCTA)의 유도체, 5-S-(4-아미노벤질)-1-옥사-4,7,10-트라이아자사이클로도데칸-4,7,10-트리스(아세트산)(DO3A)의 유도체와 같은 거대환식 및 비환식 킬레이터(chelator) 모두의 킬레이팅 모이어티 및 다른 킬레이팅 모이어티를 포함한다. 이러한 링커의 사용은, 특히 제제가 링커를 통해 치료적 모이어티로서 방사성 동위원소에 결합되는 결합 모이어티로서 항체 또는 이의 단편을 포함하거나 이로 이루어진 분위기

에서 적절할 수 있다.

- [0121] 하나의 바람직한 링커는, 예컨대, <sup>177</sup>Lu-DTPA-[본 발명의 항체 폴리펩타이드]에 사용되는 것과 같은 DTPA이다.
- [0122] 추가의 바람직한 링커는, 예컨대, <sup>89</sup>Zr-DFO-[본 발명의 항체 폴리펩타이드]에 사용되는 것과 같은 데페록사민, DFO이다.
- [0123] 임의로, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 검출 가능한 모이어티를 더 포함할 수 있다(또는 포함하지 않을 수 있다). 예를 들면, 검출 가능한 모이어티는 방사성 동위원소, 예컨대, <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>72</sup>As, <sup>89</sup>Zr, <sup>123</sup>I 및 <sup>201</sup>Tl로 이루어진 군으로부터 선택되는 방사성 동위원소를 포함하거나 또는 이것으로 이루어질 수 있다. 선택적으로, 제제는 <sup>86</sup>Y/<sup>90</sup>Y 또는 <sup>124</sup>I/<sup>211</sup>At와 같은 한 쌍의 검출 가능하며 세포독성인 방사성 핵종을 포함할 수 있다. 대안적으로, 제제는 소위 "복합성 테라그노스틱(Multimodality theragnostics)"을 제공하기 위해 검출 가능한 모이어티로서 그리고 또한 세포독성 모이어티로서 다중 모드(multi-modal) 방식으로 동시에 작용할 수 있는 방사성 동위원소를 포함할 수 있다. 따라서, 결합 모이어티는 방사성 핵종 또는 화학요법제와 같은 세포독성 약물을 이용한 치료 능력과 함께 다중-이미지의 능력(예컨대, SPECT, PET, MRI, 광학(Optical) 또는 초음파)을 갖는 나노입자에 결합될 수 있다. 또한, 고주파 교호 자계(alternating magnetic field) 및 수반된 초음파 영상을 이용한 온열요법에 의한 치료의 가능성이 본 발명에 포함된다.
- [0124] 대안적으로, 검출 가능한 모이어티는 상자성(paramagnetic) 동위원소를 포함할 수 있거나 또는 이것으로 이루어질 수 있으며, 이러한 상자성 동위원소는 <sup>157</sup>Gd, <sup>55</sup>Mn, <sup>162</sup>Dy, <sup>52</sup>Cr 및 <sup>56</sup>Fe로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0125] 항체 폴리펩타이드가 검출 가능한 모이어티를 포함하는 경우, 검출 가능한 모이어티는 SPECT, PET, MRI, 광학 또는 초음파 영상화(imaging)와 같은 영상 기술에 의해 검출될 수 있다.
- [0126] 치료 및 검출 가능한 모이어티는 당해 분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 항체 폴리펩타이드와 접합될 수 있거나 또는 다르게는 이와 조합될 수 있다(예컨대, 현존하는 면역접합체(immunoconjugate) 요법, 켈투주맙 오조가미신(gemtuzumab ozogamicin)[상표명: Mylotarg(등록상표)]은 세포독성 칼리키아미신에 연결된 단핵 항체를 포함한다).
- [0127] 추가의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 항체 폴리펩타이드 분자의 집단을 포함하는 제형의 형태로 전립선암을 치료하는 데 사용된다. 일 옵션에서, 집단에서 모든(또는 90중량%, 95중량%, 99중량%, 99.9중량% 이상과 같이 실질적으로 모든) 항체 폴리펩타이드는 동일한 치료적 모이어티를 포함한다. 다른 옵션에서, 상기 집단은 다른 제제들과 여러 치료적 모이어티의 혼합물을 포함한다. 이 옵션은, 화학요법제, 호르몬요법제, 또는 표적 제제가 치료 활성 방사성 핵종을 종양 관련 항원으로 운반할 뿐만 아니라 동시에 세포내 신호전달 캐스케이드를 조정함으로써(예컨대, 촉발하거나 또는 차단함으로써) 표적화된 종양 세포를 방사선 증감화하는(radiosensitize) 요법들의 다른 조합과 같은, 다양한 제제를 사용하여 표적화된 방사성 핵종 치료의 효과를 증진시키는 가능성을 제공할 것이다. 또한, 이 옵션은 큰 종양, 미소전이 및 단일 종양 세포의 조합된 치료를 위해, 예를 들면, 알파- 및 다른 범위의 베타-이미티의 콕테일, 또는 다른 범위를 갖는 방사성 핵종의 콕테일, LET(선형 에너지 전달(linear energy transfer)) 및 RBE(상대적인 생물학적 효과(relative biological effect))를 이용하여 세포독성제의 혼합물로 전립선암을 치료하는 데 유용하다. 일 실시형태에 있어서, 장거리 이미티가 큰 종양의 치료를 위해 사용될 수 있으며, 단거리 이미티가 미소전이 및 단일 종양 세포와 같은 더욱 작은 종양의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0128] 임의로, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 제제의 생체내 반감기를 증가시키는 모이어티를 더 포함할 수 있다(또는 포함하지 않을 수 있다). 제제의 생체내 반감기를 증가시키기 위한 예시적인 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 인간 혈청 알부민, 글리코실화기, 지방산 및 텍스트란을 포함할 수 있다. PEG가 특별히 상정될 수 있다.
- [0129] 본 발명의 폴리펩타이드는, 예컨대, 동결 건조, 분무 건조, 분무 냉각 또는 초임계 이산화탄소로부터의 입자 형성의 사용(침전)을 통해서, 저장을 위해 동결건조되고 사용 전에 적합한 담체에서 재구성될 수 있다. 임의의 적합한 동결건조 방법(예컨대, 동결-건조, 분무 건조, 케이크 건조) 및/또는 재구성 기술들이 사용될 수 있다. 당업자에게는, 동결건조 및 재구성이 활성 손실의 가변 정도를 초래할 수 있으며 사용 수준이 상향 조정되어서 보상할 수 있어야 함이 이해될 것이다. 바람직하게는, 동결건조된(lyophilised)(냉동 건조된(freeze dried)) 폴리펩타이드는 재수화되는(rehydrate) 경우 (동결건조 전에) 이의 활성의 약 1% 이하가 손실되거나, 또는 재수화되는 경우 (동결건조 전에) 이의 활성의 약 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 이하, 또는 약 50% 이하가

손실된다.

- [0130] 본 발명의 폴리펩타이드의 제조방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다.
- [0131] 편의상, 폴리펩타이드는 재조합 폴리펩타이드이거나 또는 이를 포함한다. 이러한 재조합 폴리펩타이드의 적합한 제조방법은 당해 분야에서, 예컨대, 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서의 발현과 같이 잘 공지되어 있다(예컨대, 문헌 [Sambrook & Russell, 2000, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor, New York] 참조, 이 문서의 관련 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).
- [0132] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 또한 상업적으로 입수 가능한 시험관내 해독 시스템, 예컨대, 토끼 망상적혈구 용해질(reticulocyte lysate) 또는 밀밭아 용해질(프로메가사(Promega)로부터 입수 가능함)을 사용하여 제조될 수 있다. 바람직하게는, 해독 시스템은 토끼 망상적혈구 용해질이다. 편의상, 해독 시스템은 전사 시스템, 예컨대, TNT 전사-해독 시스템(프로메가사)에 커플링될 수 있다. 이 시스템은 해독과 동일한 반응에서 암호화 DNA 폴리뉴클레오타이드로부터 적합한 mRNA 전사를 제조하는 장점을 갖는다.
- [0133] 당업자에게는, 대안적으로는 본 발명의 폴리펩타이드가 인위적으로, 예컨대, 잘 공지된 액상 또는 고상 합성 기술(예컨대, *t*-Boc 또는 Fmoc 고상 펩타이드 합성)을 사용하여 합성될 수 있음이 이해될 것이다.
- [0134] 본 발명의 제2 양상은 본 발명의 항체 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 핵산 분자, 또는 이의 성분 폴리펩타이드 사슬을 제공한다. "핵산 분자"에 대하여, 본 발명자들은 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있는 DNA(예컨대, 게놈 DNA 또는 상보성 DNA) 및 mRNA 분자를 포함한다.
- [0135] 일 실시형태에 있어서, 핵산 분자는 cDNA 분자이다.
- [0136] 당업자에게는, 핵산 분자가 특정 숙주 세포에서 항체 폴리펩타이드의 발현을 위해, 예컨대, 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있음이 이해될 것이다(예컨대, 문헌 [Angov, 2011, *Biotechnol. J.* 6(6):650-659] 참조).

[0137] 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명의 핵산 분자는,

[0138] (a) 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열

```
CAGGTCACACTGAAGGAATCTGGGCCTGCTTTGGTGAAGCCACTCAGACTCTGACACTCA
CATGCACCTTCTCCGGGTTTAGCCTGTCAACCACCGGTATGGGCGTGAGTTGGATTCGCCA
ACCACCGGGTAAAGCGCTTGAGTGGCTTGACACATCTATTGGGACGATGACAAGCGGTAC
AGTACTAGCCTGAAAACGAGACTGACCATAAGCGAGGACTCATCCAAGAATCAGGTGGTAC
TGACGATGACCAACATGGATCCCCTTGATACCGCCACATACTACTGTGCCAGGAAAGGCTA
CTATGGCTATTTGACTATTGGGGACAGGGAACACTCGTCACTGTGTCCTCT
```

**[서열번호 14]**

[0139] 및/또는

[0141] (b) 서열번호 15의 뉴클레오타이드

```
GACATCCAGATGACCCAATCTCCCTCTAGCTTGTCGGCTAGTGTGGTGATAGGGTGACAG
TGACATGCAGAGCTAGCCAGAATGTCAACACAGACGTTGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGG
CAAAGCACCCAAAGCCCTCATCTTCTCCACGTCATATCTGCAAAGCGGAGTACCTTCCCGG
TTTAGTGGGTCTGGGTGAGGCACTGACTTCACCCCTGACCATATCCAGCCTTCAACCGGAAG
ATTTGCGGACCTACTACTGTGTCAGCAGTACAGCAACTATCCTCTGACTTTTGGACAGGGCAC
TAAGGTGGAGATTAAGCGT
```

**[서열번호 15]**

[0142] 를 포함한다.

[0144] 따라서, 본 발명의 핵산 분자는,

[0145] (a) 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열

CAGGTCACACTGAAGGAATCTGGGCCTGCTTTGGTGAAGCCCCTCAGACTCTGACACTCA  
 CATGCACCTTCTCCGGGTTTAGCCTGTCAACCACCGGTATGGGCGTGAGTTGGATTTCGCCA  
 ACCACCGGGTAAAGCGCTTGAGTGGCTTGACACACATCTATTGGGACGATGACAAGCGGTAC  
 AGTACTAGCCTGAAAACGAGACTGACCATAAGCGGAGACTCATCCAAGAATCAGGTGGTAC  
 TGACGATGACCAACATGGATCCCGTTGATACCGCCACATACTACTGTGCCAGGAAAGGCTA  
 CTATGGCTATTTTCGACTATTGGGGACAGGGAACACTCGTCACTGTGTCTCTGTAGCACC  
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG  
 CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGG  
 CGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC  
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG  
 TGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA  
 AACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC  
 TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG  
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA  
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC  
 AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT  
 CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCG  
 AGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC  
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG  
 GGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT  
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC  
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
 GTAATGA

[서열번호 16]

[0146]

[0147] 및/또는

[0148] (b) 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열

GACATCCAGATGACCCAATCTCCCTCTAGCTTGTCCGCTAGTGTCCGGTGATAGGGTGACAG  
 TGACATGCAGAGCTAGCCAGAATGTCAACACAGACGTTGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGG  
 CAAAGCACCCAAAGCCCTCATCTTCTCCACGTCATATCTGCAAAGCGGAGTACCTTCCCGG  
 TTTAGTGGGCTCTGGGTACGGCACTGACTTCACCCCTGACCATATCCAGCCTTCAACCGGAAG  
 ATTTGCGGACCTACTACTGTGACGAGTACAGCAACTATCCTCTGACTTTTGGACAGGGCAC  
 TAAGGTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT  
 GAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG  
 AGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGT  
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA  
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC  
 CCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[서열번호 17]

[0149]

[0150] 을 포함할 수 있다.

[0151] 또한, 본 발명의 범위 내에 하기의 것들이 포함된다:

[0152] (a) 본 발명의 제3 양상은 본 발명의 제2 양상에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터(예컨대, 발현 벡터)를 제공하  
 고;

[0153] (b) 본 발명의 제4 양상은 본 발명의 제2 양상에 따른 핵산 분자 또는 본 발명의 제3 양상에 따른 벡터를 포함  
 하는 숙주 세포(예컨대, 인간 세포와 같은 포유류 세포)를 제공하며;

[0154] (c) 본 발명의 제5 양상은, 본 발명의 제1 양상에 따른 항체 폴리펩타이드를 생성시키기 위한 것이며, 본 발명  
 의 제4 양상에 따른 숙주 세포의 집단을 상기 폴리펩타이드가 발현되는 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 방

법을 제공한다.

- [0155] 또한, 본 발명의 제6 양상은 치료적 유효량의 본 발명의 제1 양상의 항체 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0156] 또한, EDTA, 시트레이트, EGTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이트제를 포함하는 추가의 화합물이 약제학적 조성물에 포함될 수 있다.
- [0157] 약제학적 조성물은 충분히 저장 안정성이 있으며 인간 및 동물에게 투여하기에 적절한 당해 분야에 알려진 방식으로 제조될 수 있다. 예를 들면, 약제학적 조성물은, 예컨대, 냉동 건조, 분무 건조, 분무 냉각을 통해 또는 초임계 입자 형성으로부터의 입자 형성의 사용을 통해 동결건조될 수 있다.
- [0158] "약제학적으로 허용 가능한"에 대하여, 본 발명자들은 본 발명의 제제의 칼리크레인 단백질-결합 활성의 효과를 감소시키지 않는 무독성 물질을 의미한다. 이러한 약제학적으로 허용 가능한 버퍼, 담체 또는 부형제는 당해 분야에 잘 알려져 있다(문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th edition, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) 및 *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)] 참조, 이들의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).
- [0159] 용어 "완충제"는 pH를 안정화시키고자 하는 목적으로 산-염기 혼합물을 함유하는 수용액을 의미하는 것으로 의도된다. 완충제의 예는 Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, 포스페이트, 카보네이트, 아세테이트, 시트레이트, 글리콜레이트, 락테이트, 보레이트, ACES, ADA, 타트레이트, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, 카코딜레이트, CHES, DIPSO, EPPS, 에탄올아민, 글리신, HEPPSO, 이미다졸, 이미다졸락트산, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO 및 TES이다.
- [0160] 용어 "희석제"는 약제학적 제조물에서 제제를 희석시킬 목적으로 수성 또는 비수성 용액을 의미하는 것으로 의도된다. 희석제는 1종 이상의 염수, 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올 또는 오일(예컨대, 홍화유, 옥수수유, 땅콩 기름, 면실유 또는 참기름)일 수 있다.
- [0161] 용어 "보조제(adjutant)"는 본 발명의 제제의 생물학적 효과를 증가시키기 위해 제형에 첨가되는 임의의 화합물을 의미하는 것으로 의도된다. 보조제는 예컨대, 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 요오드, 티오시아네이트, 설파이트, 하이드록사이드, 포스페이트, 카보네이트, 락테이트, 글리콜레이트, 시트레이트, 보레이트, 타트레이트 및 여러 아실 조성물의 아세테이트와 같은 여러 음이온을 갖는 1종 이상의 아연, 구리 또는 은 염일 수 있다. 또한, 보조제는 양이온성 셀룰로스 에터, 양이온성 셀룰로스 에스터, 탈아세틸화 히알루론산, 키토산과 같은 양이온성 중합체, 양이온성 덴드리머(dendrimer), 폴리(비닐 이미다졸)과 같은 양이온성 합성 중합체, 및 폴리히스티딘, 폴리리신, 폴리아르기닌 및 이들 아미노산을 함유하는 펩타이드와 같은 양이온성 폴리펩타이드일 수 있다.
- [0162] 부형제는 1종 이상의 탄수화물, 중합체, 지질 및 미네랄일 수 있다. 탄수화물의 예는 락토스, 글루코스, 수크로스, 만니톨 및 사이클로덱스트린일 수 있으며, 이들은, 예컨대, 동결건조를 촉진하기 위해 조성물에 첨가된다. 중합체의 예는 전분, 셀룰로스 에터, 셀룰로스 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 에틸하이드록시에틸 셀룰로스, 알기네이트, 카라기난, 히알루론산 및 이의 유도체, 폴리아크릴산, 폴리설포네이트, 폴리에틸렌글리콜/폴리에틸렌 옥사이드, 폴리에틸렌옥사이드/폴리프로필렌 옥사이드 공중합체, 여러 가수분해도의 폴리비닐알코올/폴리비닐아세테이트, 및 폴리비닐피롤리돈이며, 여러 분자량 모두를 포함하며, 이들은, 예컨대, 점도 조절을 위해, 생체접착(bioadhesion)을 달성하기 위해, 또는 화학 및 단백질분해로부터 지질을 보호하기 위해 조성물에 첨가된다. 지질의 예는 지방산, 인지질, 모노-, 다이-, 및 트라이글리세라이드, 세라마이드, 여러 아실 사슬 길이 및 포화도의 스펅고리피드 및 글리코리피드, 에그(egg) 레시틴, 대두(soy) 레시틴, 수소화된 에그 및 대두 레시틴이며, 이들은 중합체에 대한 것과 유사한 이유로 조성물에 첨가된다. 미네랄의 예는 활석, 산화마그네슘, 산화아연 및 산화티타늄이며, 이들은 액체 축적의 감소 또는 유리한 안료 성질과 같은 이점을 얻기 위해 조성물에 첨가된다.
- [0163] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 이의 운반에 적합한 당해 분야에 알려진 임의 유형의 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다.
- [0164] 일 실시형태에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 리포솜의 형태로 존재할 수 있으며, 여기서 항체 폴리펩타이드는 약제학적으로 허용 가능한 담체에 덧붙여 마이셀(micelle)로서의 응집된 형태로 존재하는 지질, 불용성 단층(monolayer) 및 지질 결정(lipid crystal)과 같은 양친매성 제제와 조합된다. 리포솜 제형에 적절한 지질은 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 설파타이드, 리소레시틴, 인지질, 사포닌, 담즙산 등을 포함하지만 이들로

제한되는 것은 아니다. 적절한 지질은 또한 혈류 순환 시간을 연장하기 위해 극성 헤드 기(headgroup) 내의 폴리(에틸렌 글리콜)에 의해 변형된 상기 지질을 포함한다. 이러한 리포솜 제형의 제조는 예컨대, US 4,235,871에 기재되어 있으며, 이의 개시내용은 본 명세서에 참고로 인용되고 있다.

- [0165] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 생분해성 마이크로스피어의 형태로 존재할 수 있다. 폴리(락트산)(PLA), 폴리(글리콜산)(PGA), PLA와 PGA의 공중합체(PLGA) 또는 폴리(카프로락톤)(PCL) 및 폴리안하이드라이드와 같은 지방족 폴리에스터가 마이크로스피어의 생성 시 생분해 가능한 중합체로서 널리 사용되어 왔다. 이러한 마이크로스피어의 제조는 US 5,851,451 및 EP 0 213 303에 기재되어 있으며, 이들의 개시내용은 본 명세서에 참고로 인용된다.
- [0166] 추가의 실시형태에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 중합체 겔의 형태로 제공되며, 여기서 전분, 셀룰로스 에터, 셀룰로스 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 에틸하이드록시에틸 셀룰로스, 알기네이트, 카라기난, 히알루론산 및 이의 유도체, 폴리아크릴산, 폴리비닐 이미다졸, 폴리설포네이트, 폴리에틸렌글리콜/폴리에틸렌 옥사이드, 폴리에틸렌옥사이드/폴리프로필렌 옥사이드 공중합체, 상이한 가수분해도의 폴리비닐알코올/폴리비닐아세테이트, 및 폴리비닐피롤리돈과 같은 중합체가 상기 체제를 함유하는 용액의 농축을 위해 사용된다. 중합체는 또한 젤라틴 또는 콜라겐을 포함할 수 있다.
- [0167] 대안적으로, 항체 폴리펩타이드는 간단히 염수, 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올 또는 오일(예컨대, 홍화유, 옥수수유, 땅콩 기름, 먼실유 또는 참기름), 트래거캔트 겔, 및/또는 각종 완충제에 용해될 수 있다.
- [0168] 본 발명의 약제학적 조성물이 활성 항체 폴리펩타이드의 활성의 잠재화를 위해 이온 및 한정된 pH를 포함할 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 조성물은 멸균과 같은 통상적인 약제학적 작업에 가해질 수 있고/있거나, 보존제, 안정화제, 습윤제, 에멀전화제, 완충제, 충전제 등과 같은 통상적인 보조제를 함유할 수 있다.
- [0169] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 당업자에게 공지된 임의의 적절한 경로를 통해 투여될 수 있다. 따라서, 가능한 투여 경로는 비경구(정맥내, 피하 및 근육내), 경피, 눈, 비강, 폐, 협측(buccal), 구강, 경구, 비경구 및 직장을 포함한다. 또한, 이식물로부터의 투여가 가능하다. 주입(infusion)은 투여 제제의 잠재적으로 높은 세포독성 때문에 원하는 경로일 수 있다.
- [0170] 일 실시형태에 있어서, 약제학적 조성물은, 예컨대, 정맥내, 뇌혈관내, 관절내, 동맥내, 복강내, 척수내, 심실내, 흉골내, 두개강내, 근육내 또는 피하와 같이 비경구 투여되거나, 또는 이들은 주입 기술에 의해 투여될 수 있다. 이들은 편의상 예컨대, 혈액과 등장성인 용액을 형성하기 위해 충분한 염 또는 포도당과 같은 다른 물질들을 함유할 수 있는 멸균 수용액 형태로 사용된다. 수용액은 필요에 따라 적절히 완충된다(예컨대, pH 3 내지 9). 멸균 조건 하에서의 적절한 비경구 제형의 제조는 당업자에게 잘 알려진 표준 약제학적 기술에 의해 용이하게 달성된다.
- [0171] 비경구 투여에 적절한 제형은 항산화제, 완충제, 세균발육 저지제 및 의도된 수용자의 혈액과 등장성인 제형을 제공하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사액; 및 현탁화제 및 점증제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 제형은, 예컨대, 밀봉된 앰플 및 바이알과 같은 단위-용량 또는 다중-용량 용기에 존재할 수 있으며, 예컨대, 사용 직전에 주사용 물과 같은 멸균 액체 담체의 첨가만을 필요로 하는 동결-건조(동결건조된) 상태로 보관될 수 있다. 즉석(extemporaneous) 주사액 및 현탁액은 앞서 언급된 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0172] 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 특히 환자의 종양에 대해(예컨대, 종양 내 또는 종양 주변) 정맥내 투여 또는 국소 투여와 같은 비경구 투여에 적합하다.
- [0173] 약제학적 조성물은 약제학적으로 효과적인 투여량으로, 즉, 치료 방사성 핵종을 치료적으로 유효한 흡수된 선량으로 환자에게 투여될 것이다.
- [0174] 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 치료 용도의 맥락에서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, '치료적 유효량' 또는 '유효량' 또는 '치료적으로 유효한'은 주어진 상태 및 투여 요법에 대해 치료 효과를 제공하는 양을 지칭한다. 이는 필요한 첨가제 및 희석제, 즉, 담체 또는 투여 비히클과 관련하여 원하는 치료 효과를 생성하는 것으로 계산된 활성 물질의 사전 결정된 양이다. 또한, 이는 숙주의 활동성, 기능 및 반응에서 임상적으로 유의한 결손을 감소 및/또는 방지하는데 충분한 양을 의미하는 것으로 의도된다. 대안적으로, 치료적 유효량은 숙주에서 임상적으로 유의한 상태에서의 개선을 일으키기에 충분하다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 화합물의 양은 특이적 활성에 따라 달라질 수 있다. 적절한 투여량은 필요한 희석제와 관련하여 원하는 치료 효과를 생성

하는 것으로 계산된 활성 조성물의 사전 결정된 양을 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물의 제조 방법 및 용도에 서, 활성 성분의 치료적 유효량이 제공된다. 치료적 유효량은, 당해 분야에 알려져 있는 바와 같이, 나이, 체중, 성별, 상태, 합병증, 다른 질환과 등과 같은 환자 특성에 기초하여 통상의 숙련된 의료인에 의해 결정될 수 있다(하기 실시예 6 참조). 약제학적으로 효과적인 투여량의 투여는 개별 투여량 단위 또는 그렇지 않으면 더욱 작은 투여량 단위들의 형태로 단일 투여에 의해 그리고 또한 특정 간격으로 세분화된 투여량의 다중 투여에 의해 수행될 수 있다. 대안적으로, 투여량은 장기간에 걸쳐 연속 주입으로서 제공될 수 있다.

- [0175] 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 진단 용도의 맥락에서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, '약제학적 유효량' 또는 '유효량' 또는 '진단적으로 유효한'은 생체내 영상 목적을 위해 검출 가능한 신호를 제공하는 양을 지칭한다.
- [0176] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 사용되는 화합물의 효능/독성에 따라 다양한 농도로 제형화될 수 있다. 제형은 0.1 μM 내지 1mM, 1 μM 내지 500 μM, 500 μM 내지 1mM, 300 μM 내지 700 μM, 1 μM 내지 100 μM, 100 μM 내지 200 μM, 200 μM 내지 300 μM, 300 μM 내지 400 μM, 400 μM 내지 500 μM, 약 500 μM의 농도로 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0177] 전형적으로, 인간 환자에게서 (치료적 모이여티를 포함하거나 또는 포함하지 않는) 항체 폴리펩타이드의 치료적 투여량은 (70kg의 체중에 기초하여) 투여당 100 μg 내지 700mg의 범위로 존재할 것이다. 예를 들면, 최대 치료적 투여량은 투여당 0.1 내지 10mg/kg, 예컨대, 0.1 내지 5mg/kg 또는 1 내지 5mg/kg 또는 0.1 내지 2mg/kg의 범위 일 수 있다. 이러한 투여량은, 방사선종양전문의(oncologist)/내과 의사(physician)에 의해 결정되는, 여러 간격으로 투여될 수 있으며, 예컨대, 투여량은 매일, 매주 2회, 매주, 2주마다 또는 매달 투여될 수 있다.
- [0178] 본 발명의 약제학적 조성물은, 단독으로 투여되거나 또는 전립선암의 치료에 사용되는 다른 치료제와 조합되어, 또는 다른 치료 항체, 수술(예컨대, 근치적 전립선절제술), 방사성핵종 요법, 근접요법, 외부 빔 방사성 요법, 고강도 집속 초음파(HIFU), 화학요법, 경구 화학치료 약물, 동결수술(종양 동결), 호르몬 요법(예컨대, 항안드로젠 요법), 거세 또는 이들의 조합과 같은, 전립선암의 치료를 위한 다른 치료 양상으로 환자를 치료하기 전, 후 또는 이와 동시에 투여될 수 있음이 당해 분야의 숙련자에게 이해될 것이다.
- [0179] 본 발명의 제7 양상은, 본 명세서에 기재된 바와 동일한 것의 용도에 관한 지시사항과 함께, 본 발명의 제1 양상에 따른 항체 폴리펩타이드 또는 본 발명의 제6 양상에 따른 약제학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0180] 본 발명의 제8 양상은 약제에서의 사용을 위한 본 발명의 제1 양상에 따른 항체 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0181] 본 발명의 제9 양상은 전립선암의 치료 및/또는 진단에서의 사용을 위한 본 발명의 제1 양상에 따른 항체 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0182] 본 발명의 제10 양상은, 본 발명의 제1 양상에 따른 항체 폴리펩타이드를 치료적 유효량 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에게서 전립선암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0183] '치료'에 대하여, 본 발명자들은 환자의 치료적 및 예방적 치료 둘다를 포함한다. 용어 '예방적'은, 본 명세서에 기재된 바와 같은 제제 또는 이의 제형을 환자 또는 대상체에서 전립선암의 가능성 또는 국소화된 전립선암의 확산, 파종 또는 전이를 방지 또는 감소시키는 데 사용하는 것을 포함하는 것으로 사용된다. 또한, 용어 '예방적'은 본 명세서에 기재된 바와 같은 제제 또는 이의 제형을 이전에 전립선암에 대해 치료받은 적이 있는 환자에게서 전립선암의 재발을 방지하는 데 사용하는 것을 포함한다.
- [0184] 본 발명의 제11 양상은, 본 발명의 제1 양상에 따른 항체 폴리펩타이드를 진단 유효량 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 전립선암을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0185] "진단"에 대하여, 본 발명자들은 생체내(즉, 환자의 신체 내) 또는 생체외(즉, 환자의 신체로부터 제거된 세포 샘플 또는 조직 내) 전립선암 세포의 검출을 포함한다.
- [0186] 치료 또는 진단될 전립선암은 전립선에 국소화되거나, 또는 비-국소화된(즉, 파종된(disseminated)) 전립선암일 수 있다. 전립선에 국소화된 전립선암은, 예컨대, TNM 시스템(종양/결절/전이(Tumor/Nodes/Metastases)의 약어)에 따라 임상 T1 또는 T2 암으로 분류될 수 있으며, 비-국소화된/파종된 전립선암은, 예컨대, 임상 T3 또는 T4 암으로 분류될 수 있다.
- [0187] 치료 또는 진단될 전립선암은 전이성 전립선암일 수 있다. 전이는 체내에서 이의 본래 위치로부터 다른 부위로의 암 확산을 지칭한다. 예를 들면, 치료 또는 진단되는 전이성 전립선암은 림프계에서 존재하는 전이: 뼈(척추

(spine), 척추뼈(vertebrae), 골반, 갈비뼈 포함)에서 존재하는 전이; 골반, 직장, 방광 또는 요도 내의 전이일 수 있다. 다른 덜 일반적인 위치에 존재하는 전이도 또한 본 발명으로 치료될 수 있다. 전이는 미소전이(micrometastases)일 수 있다. 미소전이는 새로 형성된 종양이 일반적으로 검출되기에 너무 작거나 또는 어렵게 검출되는 형태의 전이이다. 예를 들면, 본 발명은, 이러한 세포 또는 클러스터(cluster)의 존재가 불가사의한 파종된 질병과 같이 존재는 하지만 진단하기에는 가능하지 않은 경우에도, 단일 암 세포 또는 세포 클러스터를 치료하기 위한 수단으로 통상의 기술자에게 제공한다.

- [0188] 따라서, 전립선암의 종래 치료와 비교되는 본 발명에 의해 제공된 치료의 특히 중요한 기술적 이점은, 파종된 및/또는 전이성(미소전이성 포함) 전립선암의 치료에 향상된 효능인 것으로 기대된다.
- [0189] 따라서, 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 원발성 전립선 종양의 전이를 예방 또는 치료하는 제제 및 방법을 제공한다.
- [0190] 전립선암은 50세 이상, 더욱 통상적으로 60, 65 또는 70세 이상의 남성에게서 발달하는 경향이 있으며, 남성에게서 가장 널리 퍼져있는 유형 중 하나임에도 불구하고, 대다수가 증상을 가지고 있지 않고, 어떠한 요법도 경험하지 않아, 결국 다른 원인으로 사망하게 된다. 이는 전립선암이 대부분의 경우 느리게 성장하고 증상이 없기 때문이며, 이러한 상태를 갖는 남성들은 더욱 나이가 많으므로, 이들은 흔히 심장/순환기 질병, 폐렴, 다른 무관한 암, 또는 노령과 같이 전립선암과 무관한 원인으로 사망한다. 전립선암 경우의 약 3분의 2는 느린 성장을 나타내며, 나머지 3분의 1은 더욱 공격적이고 빠르게 발달한다.
- [0191] 따라서, 전립선암의 치료 및 진단에 대한 효과적인 방법의 개발은 특별히 더욱 공격적이고 빠른 발달 형태의 암을 특히 더욱 젊은 환자에게서 관리하는 것이 중요하다. 따라서, 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 전립선암의 진단 시 및/또는 치료 시에 90세 미만, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40세 또는 그 미만의 연령인 환자에게서의 전립선암의 치료 또는 진단과 관련된다.
- [0192] 전립선암에 걸린 제1 친족관계(first-degree relative)를 가진 남성(아버지 또는 남자형제)은 전립선암 발달의 위험이 2배인 것으로 생각되며, 영향을 받은(affected) 2명의 제1 친족관계를 가진 남성은 가족력이 없는 남성에게 비해 5배 이상의 위험을 갖는 것으로 생각된다. 따라서, 본 발명은 1명, 2명 또는 그 이상의 가족원, 특히 제1 가족 구성원(first-degree family member)(예컨대, 아버지 또는 남자형제)이 전립선암으로 이전에 진단받았던 것을 특징으로 하는 환자에서 전립선암을 치료 또는 진단하는 것과 관련될 수 있다.
- [0193] 또한, 본 발명은 환자에게서 전립선암의 치료 또는 진단과 관련되며, 여기서 치료되는 전립선암은 거세-저항성 전립선암(castration-resistant prostate cancer: CRPC)이다. CRPC는 전형적으로 1 내지 3년 후 호르몬 치료에 난치성이 되고, 호르몬 요법에도 불구하고 성장을 재개하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0194] 본 발명의 의약 용도 및 방법에서, 항체 폴리펩타이드는 전형적으로 환자의 신체 내에 주입 또는 주입된다. 그 다음, 생체내에서, 항체 폴리펩타이드는 표적 항원, PSA; 주로 전립선암 세포 및 이의 전이를 생성시키는 조직에 결합한다. 결합 시, 항체 폴리펩타이드는 치료 효과(예컨대, ADCC, CDC를 통해 또는 방사성 동위원소 또는 다른 세포독성 모이어티를 운반함으로써 세포 사멸을 유도함)를 직접적으로 발휘할 수 있다. 대안적으로, 결합된 항체 폴리펩타이드는 진단(영상) 도구로서 작용할 수 있으며, 이것은 암세포의 수술적 제거를 도와주거나 또는 요법의 선택을 안내할 수 있다.
- [0195] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 다른 치료 및/또는 진단 제제/치료, 예컨대, 외부 방사성요법, 수술, 세포증식 억제 및 안드로겐 치료와 조합하여 사용될 수 있음이 당해 분야의 숙련자에게 이해될 것이다.
- [0196] 상기 설명에서는 전립선암의 치료 및 진단을 위한 방법에 적용 가능한 본 발명의 구현들에 집중하고 있다. 그러나, 본 발명은 이러한 적용에 국한되지 않으며, 수술후 검사, 및 방사선, 세포분열억제 및 안드로겐 치료 도중 또는 이후의 검사에 유용할 수 있다.
- [0197] 다른 실시형태에 있어서, 방사선유도 수술(RadioGuided Surgery: RGS) 또는 영상유도 수술(Image-Guided Surgery: IGS)이 수술 도중 및/또는 이전에 본 발명의 트레이서-표지된 항체 폴리펩타이드를 확인하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 검출 가능한 모이어티를 포함하는 항체 폴리펩타이드는 수술 도중 및/또는 이전에 투여될 수 있다. 이 실시형태에 있어서, 항체 폴리펩타이드가 우선 주입될 수 있다. 그 후, RGS/IGS가 수술 도중 또는 이전에 검출 가능한 모이어티에 민감한 검출 기구로 PSA-생성 조직을 확인하는 데 사용될 수 있다. 검출 가능한 모이어티는 예컨대, 방사선 방출 또는 자기-민감성 검출 가능한 모이어티일 수 있고; 이는 예컨대, 세렌코프(Cerenkov) 방사선 및/또는 브렘스트라링(Bremsstrahlung)의 이미터일 수 있으며; 이는 형광 표지 및/또는 자기 또는 자기화 가능한 표지일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 RGS/IGS는 예컨대, 광학, 세렌코프, 브렘스트라링

또는 베타 방사선의 검출; 방사성 핵종 표지의 검출에 기초한 방법일 수 있고/있거나, 자기측정을 포함할 수 있다. RGS는, 검출 가능한 모이어티에 의해 "마킹된" 조직을 외과의사가 확인할 수 있는 외과 기술로서 당업자에게 잘 알려져 있다.

- [0198] 상기 방법에 따라 얻어진 시각화(visualisation)는 SPECT/PET, 컴퓨터 단층촬영(computed tomography: CT), 초음파(ultrasound: US) 및 자기 공명 단층촬영(magnetic resonance imaging: MRI)와 같은 다른 방사선적 시각화 방법과 조합될 수 있다.
- [0199] 따라서, 추가의 양상에서, 또한 본 발명은, 방사선유도 또는 영상유도 수술과 같은 수술 도중 및/또는 이전에 전립선암을 앓는 환자에게 투여하는, 약제에서의 용도를 위한 항체 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0200] 본 발명의 또 다른 추가의 양상은, 대상체의 혈액에서 전립선 종양 세포의 검출을 위한 시험관내 방법으로서, 상기 방법은,
- [0201] (a) 시험되는 대상체로부터의 혈액의 샘플을 제공하는 단계;
- [0202] (b) 선택적으로는, 상기 혈액 샘플에 존재하는 세포를 추출하고/하거나 정제하는 단계;
- [0203] (c) 상기 혈액 샘플에 존재하는 세포와 본 발명의 제1 양상에 따른 항체 폴리펩타이드를 접촉시키는 단계;
- [0204] (d) 상기 항체 폴리펩타이드가 자유(즉, 비착체화된) PSA에 결합하는 지를 (직접적으로 또는 간접적으로) 결정하는 단계를 포함하며,
- [0205] 여기서, 상기 항체 폴리펩타이드가 자유 PSA에 결합하는 것은 대상체의 혈액에서의 전립선 종양 세포의 존재를 나타내는 것인 방법을 제공한다.
- [0206] 따라서, 상기 방법은, 혈액 샘플이 자유 PSA를 함유하는지를 검출하는 검정을 수행하는 것을 포함하며, 자유 PSA의 존재는 대상체의 혈액에서의 전립선 종양 세포의 존재를 나타내는 것이다.
- [0207] 당해 분야의 숙련자는 이러한 검정을 수행하기 위한 방식들이 다수 존재함을 이해할 것이다. 예를 들면, 면역검정은 균질하거나 또는 더욱 바람직하게는 이질적일 수 있다. 검정은 또한 경쟁적이거나 또는 더욱 바람직하게는 비경쟁적 포맷으로 수행될 수도 있다.
- [0208] 이질적이고 비경쟁적 검정의 경우, 예시적인 프로토콜은,
- [0209] (a) 시험되는 대상체로부터의 혈액의 샘플을 제공하는 단계;
- [0210] (b) 선택적으로는, 상기 혈액 샘플에 존재하는 세포를 추출하고/하거나 정제하는 단계;
- [0211] (c) 상기 혈액 샘플에 존재하는 세포와 본 발명의 제1 양상에 따른 고상 고정된 항체 폴리펩타이드를 접촉시키는 단계;
- [0212] (d) (고체 표면에 결합하지 않은) 가용성 성분들을 세척하여 제거하는 단계;
- [0213] (e) 트레이서, 즉, 리포터(reporter) 분자/입자로 표시된 또 다른 항-PSA 특이적 항체를 첨가하는 단계;
- [0214] (f) 결합되지 않은 트레이서 항체를 세척하여 제거하는 단계;
- [0215] (g) 상기 트레이서 항체로부터 신호를 검출하는 단계일 있다.
- [0216] 단계 b와 c 또는 c와 d 사이에서, 세포에 대하여 가용성 PSA를 제조하며, 이어서 검출될 수 있는 항온처리 단계 이어야 한다.
- [0217] 본 발명의 또 다른 추가의 양상은, 대상체의 조직에서 전립선 종양 세포의 검출을 위한 시험관내 방법으로서, 상기 방법은,
- [0218] (a) 시험되는 대상체로부터의 조직의 샘플(예컨대, 조직학적 샘플)을 제공하는 단계;
- [0219] (b) 선택적으로는, 상기 조직 샘플에 존재하는 세포를 추출하고/하거나 정제하는 단계;
- [0220] (c) 상기 조직 샘플에 존재하는 세포와 본 발명의 제1 양상에 따른 항체 폴리펩타이드를 접촉시키는 단계;
- [0221] (d) 상기 항체 폴리펩타이드가 자유(즉, 비착체화된) PSA에 결합하는 지를 (직접적으로 또는 간접적으로) 결정하는 단계를 포함하며,

- [0222] 여기서, 상기 항체 폴리펩타이드가 자유 PSA에 결합하는 것은 대상체의 조직에서의 전립선 종양 세포의 존재를 나타내는 것인 방법을 제공한다.
- [0223] 상기 시험관내 방법의 일 실시형태에 있어서, 단계 (d)는 ELISA에 의해 실시된다. 그러나, 시험관내 항체-항원 상호작용을 검출하는 데 적합한 검정이 사용될 수 있다.
- [0224] 추가의 실시형태에 있어서, 방법은 샘플에서 전립선 종양 세포의 정량화를 더 포함한다.
- [0225] 상기 시험관내 방법의 추가의 실시형태에 있어서, 방법은 대상체에서 전립선암의 진단을 위한 것이다.
- [0226] 단수 표현의 사용은 청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "포함하는(comprising)"과 함께 사용되는 경우 "하나"를 의미할 수도 있고, 또한 "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 하나 초과"의 의미와 일치할 수 있다.
- [0227] 본 발명의 이들 및 다른 구현들은 상기 설명 및 첨부된 도면을 참조하여 고려되는 경우 더욱 잘 인정받고 이해될 것이다. 그러나, 상기 설명은 본 발명의 다양한 구현 및 이의 다수의 특정 상세 설명을 나타내면서 예시적이지만 제한적이지 않은 방식으로 제공되는 것으로 이해되어야 한다. 다수의 치환, 변형, 부가 및/또는 재배열은 본 발명의 취지를 벗어나지 않고서 본 발명의 범위 내에서 이루어질 수 있으며, 본 발명은 이러한 모든 치환, 변형, 부가 및/또는 재배열을 포함한다.
- [0228] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 발명의 특정 양상을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본 명세서에 제시된 특정 실시형태들의 상세한 설명과 함께 하나 이상의 이들 도면을 참조하여 더욱 잘 이해될 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0229] **도 1:** <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10의 주사 후 최대 7일까지 스캔된 LNCaP 이종이식편의 대표적인 SPECT/CT 이미지(image).
- 도 2:** <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10의 주사 후 최대 7일까지 스캔된 LNCaP 이종이식편의 대표적인 SPECT/CT 이미지.
- 도 3:** LNCaP 이종이식 마우스에서 m5A10 및 h5A10의 종양-대-반대쪽 비의 분석.
- 도 4:** LNCaP 이종이식 마우스에서 m5A10 및 h5A10의 간-대-종양 비의 분석.
- 도 5:** LNCaP 이종이식 마우스에서 <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10 및 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10의 생체분포(biodistribution) 분석.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0230] 하기 실시예는 본 발명의 특정 실시형태들을 설명하기 위해 포함된다. 후속하는 실시예들에 개시된 기술들이 본 발명의 실시에서 잘 기능하도록 본 발명자에 의해 발견된 기술들을 나타내며, 따라서 그의 실시를 위해 특정 모드를 구성하도록 고려될 수 있음이 당해 분야의 숙련자에게 인정받아야 한다. 그러나, 당해 분야의 숙련자는 본 개시내용의 양상에서 개시된 특정 실시형태들에서 다수의 변화가 이루어질 수 있으며, 여전히 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고서 유사하거나 비슷한 결과를 얻을 수 있음을 이해해야 한다.

[0231] **실시예**

[0232] **실시예 1 - 류린 5A10 단클론성 항체의 Fab 포맷으로의 클로닝**

[0233] **시약**

[0234] 제한 효소는 퍼멘타스사(Fermentas) 및 프로메가사로부터 입수하였고, 알칼리성 포스파타제는 아머삼 파마시아 바이오테크사(Amersham Pharmacia Biotech)로부터, dNTP 및 T4 DNA 리가제는 퍼멘타스사로부터 입수하였다, 프라이머들은 투르크 대학의 바이오테크과로부터 그리고 유로젠테크사(Eurogentec)로부터 입수하였다. 퀴아젠(Qiagen) 키트는 DNA 정제를 위하여 사용하였다.

[0235] **mRNA 추출 및 cDNA 합성**

[0236] mRNA는 문헌["Biomagnetic Techniques in Molecular Biology: Technical handbook"(Dynal A.S, 2nd edition, 1995)]에서 제조사에 의해 기재된 절차에 따라서 다이날 폴리-dT 자성 비즈(Dynal poly-dT magnetic beads)를 이용해서 5A10 MAB 생산 하이브리도마 세포(2E6 세포; Lilja *et al*, 1991)로부터 추출하였다. mRNA로부터의 cDNA 합성은 슈퍼 스크립트 효소(Super Script enzyme)(깁코 기초연구소(Gibco BRL))에서 수행하였다: 우선,

mRNA에 결합된 자성 입자를 1x 반응 완충제, 0.1 M DTT, 2 mM dNTP 및 RNase 저해제(50 $\mu$ l의 총 반응 용적 중 1.5 $\mu$ l)를 함유하는 반응액에서 42 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 항온처리하였다. 이어서, 1 $\mu$ l의 슈퍼 스크립트(Super Script)(200U)를 첨가하고, 반응을 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 진행시켰다. cDNA 합성 후에, 상기 입자와 반응 혼합물을 자성 입자 수집기에 의해 분리시키고, 액체를 제거하고 입자를 TE 완충제에 현탁시키고, mRNA를 방출시키기 위하여 1분 동안 95 $^{\circ}$ C에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 입자-결합된 cDNA를 수집하고, mRNA-함유 완충제를 제거하고, 입자를 TE로 세척하고, 마지막으로 저장을 위하여 50 $\mu$ l의 TE에 현탁시켰다.

[0237] cDNA로부터의 항체 유전자의 증폭 및 클로닝

[0238] 투르쿠 대학의 바이오테크놀로지 시퀀싱 서비스 센터(Center of Biotechnology sequencing service)에서 에드만 분해 방법(Edman degradation method)에 의해 경쇄 및 중쇄의 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 경쇄 및 중쇄로부터 얻어진 서열은 각각 DIVMTQS[서열번호 18] 및 EVQLVESG[서열번호 19]였다. N-말단 아미노산 서열에 기초하여, 마우스의 면역글로불린 생식세포계열 V-유전자 중에서 대응하는 뉴클레오타이드 서열을 동정하기 위하여 데이터베이스 서치(database search)(SwissProt)를 수행하였다. 중쇄 및 경쇄를 클로닝하기 위하여 순방향 PCR 프라이머의 상보적 영역을 상기 서치에 기초하여 설계하였다. 역방향 프라이머는 CH1 및 CL을 각각 결합하도록 설계하였다. 프라이머는 또한 클로닝을 위하여 요구되는 제한 효소 인식 부위(뒤에 밑줄)를 함유한다.

[0239] PCR 반응은 (프라이머 및 주형을 변화시킨 것 이외에) 이하의 조건에서 수행하였다: 125 $\mu$ M dNTP, 0.5 $\mu$ M 순방향 및 역방향 프라이머, 1 $\times$  Pfu 반응 완충제 및 2.5U Pfu DNA 폴리머라제(스트라타젠사(Stratagene)). 증폭은 95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 1분 및 72 $^{\circ}$ C 1분 30초의 30 사이클로 수행하였다.

[0240] 경쇄는 cDNA로부터 이하의 프라미어로 증폭되었다:

- 5A10-L (5'-CCAGCCATGGCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCA-3', NcoI [서열번호 20]) 및
- WO252 (5'-GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCTGTTGAA-3', XbaI [서열번호 21]).

[0241]

[0242] 관련 없는 의 유전자를 함유하는 경쇄 및 벡터 pComb3(Barbas et al., 1991)는 NcoI 및 XbaI로 소화(벡터에 대해서는, NcoI로 부분적 소화)시키고, 아가로스 겔로부터 정제시키고, 결찰시켰다. 결찰 산물은 플라스미드 p5A10-L을 얻기 위하여 이. 콜라이(E. coli) XL1-블루(Blue)로 형질전환시켰다.

[0243] Fd (VH+CH1) 사슬은 이하의 프라이머 쌍으로 증폭시켰다: 5A10-H(5'-CCAGCCATGGCTGAGGTGCAATTGGTGGAGTCTGG-3', NcoI [서열번호 22]) 및 WO267(5'-CTAGACTAGTACAATCCCTGGGCACAATTTTC-3', SpeI [서열번호 23]). Fd 사슬은 벡터에 의해 운반된 또 다른 Fab의 Fd 유전자를 대체하기 위하여 벡터 pComb3으로 클로닝하였다. PCR 산물 및 벡터는 NcoI(벡터 및 삽입물 둘 다에 대해서는 부분 소화) 및 SpeI(뉴 잉글랜드 바이오랩스사(New England Biolabs))로 소화시키고, 아가로스 겔로부터 정제시키고, 결찰시켰다. 결찰 산물은 벡터 p5A10-H를 생성시키기 위하여 이. 콜라이 XL1-블루로 형질전환시켰다.

[0244] 5A10 경쇄는 플라스미드 p5A10-L로부터 SpeI 및 XbaI로 소화시키고, 겔 정제 후에, 겔 정제된 플라스미드 p5A10-H로 결찰시키고 또한 대응하는 효소로 소화시켰다. 결찰 산물은 Fab 5A10의 경쇄 및 Fd 쇠 둘 다를 함유하는 플라스미드 pComb3-5A10을 얻기 위하여 이. 콜라이 XL1-블루로 형질전환시켰다. Fd 쇠에 융합된 파지 코트 단백질 유전자 gIIp를 제거하기 위하여, pComb3-5A10은 SpeI 및 NheI로 더욱 소화시키고, 자체-결찰시키고, 이. 콜라이 XL1-블루로 형질전환시켰다. 플라스미드 pComb3-5A10DIII는 가용성의 기능적 Fab 5A10의 발현을 가능하게 하였다.

- [0245] 참고문헌
- Barbas CF 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 88, pp. 7978-7982
- Biomagnetic Techniques in Molecular Biology: Technical handbook. Dynal A.S, 2nd edition, 1995
- Lilja H, Christensson A, Dahlén U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, Lövgren T. (1991) Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem.* 37(9):1618-25
- [0246]
- [0247] **실시예 2 - 인간화 5A10 항체의 발현 및 정제**
- [0248] HEK293 세포를 프리스타일 293 발현 배지(FreeStyle 293 Expression Medium)(라이프 테크놀로지스사(Life Technologies))에서 2ℓ 현탁 배양액에서 증식시켰다. 형질주입을 위한 날에 세포 밀도는  $1 \times 10^6$  세포/ml였다.
- [0249] 성분 중쇄 혹은 경쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(즉, 각각 서열번호 16 및 17)은 포유류 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화시키고, 합성시키고 IgG 발현 벡터로 클로닝시켰다. 다음에, 중쇄 및 경쇄에 대한 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 플라스미드 DNA(발현 벡터)를 형질주입제와 혼합하고 실온에서 10분간 항온처리하였다. 플라스미드를 서서히 흔들면서 DNA-형질주입제-혼합물을 세포 배양물에 서서히 첨가하였다. 그 다음, 형질주입된 세포 배양물을 약 135rpm으로 회전하는 오비탈 셰이커 플랫폼에서 37℃, 8% CO<sub>2</sub>에서 7일 동안 항온처리하였다.
- [0250] 원심분리에 의해 배양 배지를 수거하고, 5 $\mu$ m, 0.6 $\mu$ m 및 0.22 $\mu$ m 필터 시스템을 통해 여과시켰다.
- [0251] 항체를 단백질 G 크로마토그래피에 의해 정제시키고, 완충제는 투석에 의해 PBS pH 7.4로 변화시키고; 후속적으로, 항체를 한외여과에 의해 농축시켰다.
- [0252] 농도는 흡광도에 의해 측정되었다.
- [0253] DNA:
- [0254] 경쇄: p5A10VLhDhk (4300 bp) 양: 0.35mg
- [0255] 중쇄: p5A10VHhDhIgG1 (4900 bp) 양: 0.60mg
- [0256] NA 양은 최적화되지 않았다.
- [0257] 형질주입제: 소유권이 있는 물품(하지만, 엑스펙트(Xfect)(상표명) 형질주입 시약(Transfection Reagent)(클론 테크사(Clontech)), 리포팩타민(Lipofectamine)(라이프 테크놀로지스사), FuGENE® HD 형질주입 시약(프로메가사), 프리스타일(FreeStyle)(상표명) 맥스(Max) 시약(인비트로젠사(Invitrogen)), DEAE-덱스트란, 폴리에틸렌 이민 및 인산칼슘과 같은 적절히 상업적으로-입수 가능한 형질주입제가 쉽게 이용 가능하다.)
- [0258] 전체 수율: 15mg(7.5mg/ℓ).
- [0259] **실시예 3 - h5A10의 특성규명: 친화도**
- [0260] 연구 목적
- [0261] 본 연구의 목적은 바이아코어(Biacore) 기기 상에서 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance: SPR)의 기술을 사용하여 항체 5A10 및 항원 PSA의 8개의 변이체 간의 결합 동역학을 조사하기 위한 것이었다.
- [0262] 단백질 시료(항체 및 항원)의 품질을 조사하기 위하여, SPR 실험 전에 SDS-PAGE 겔을 수행하였다.
- [0263] 예비-연구에서, 본 연구에서의 실험을 위한 적절한 조건을 알아내기 위해 다양한 파라미터를 조사하였다.
- [0264] 본 연구에 있어서, 8개의 항체 및 항원에 대해 다중 결합 측정을 수행하였다. 수집된 데이터로부터, 결합 및 해리 속도 상수( $k_{on}$  및  $k_{off}$ ) 및 해리 상수(KD)를 계산하고 여기에 기록하였다.
- [0265] 시약 및 기기 정보

- [0266] 8개의 항체 및 하나의 항원의 이하의 용액은 디아프로스트 아베사(Diaprost AB)에서 제공되었다:
- PSA 169  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$
  - m5A10 (141203) 1  $\text{mg}/\text{m}\ell$
  - m5A10 (140905) 4  $\mu\text{M}$
  - m5A10-DFO (140905) 4  $\mu\text{M}$
  - m5A10-DOTA (140905) 4  $\mu\text{M}$
  - m5A10-DTPA (140905) 4  $\mu\text{M}$
  - h5A10 (141203) 1  $\text{mg}/\text{m}\ell$
  - h5A10-DFO (141203) 2  $\text{mg}/\text{m}\ell$
  - h5A10-DTPA (141203) 1  $\text{mg}/\text{m}\ell$
  - h5A10-DOTA (141211) 2.5  $\mu\text{M}$
- [0267]
- [0268] 모든 샘플을 분액시키고, 분석 전에  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다.
- [0269] 모든 결합 실험은 바이아코어 300(Biacore 3000) 기기에서 CM4 칩 상에서 수행하였다. 활성화, 고정, 불활성화, 결합 및 재생을 위하여 필요로 되는 칩 및 모든 시약은 GE 헬스케어사(GE Healthcare)로부터 구입하였고, 제조사의 가이드라인에 따라서 사용하였다.
- [0270] SDS-파지
- [0271] (a) 실험의 설명
- [0272] 디아프로스트 아베사에 의해 제공된 시약은 제조사의 가이드라인에 따라 노벡스사(Novex)의 Tris-트리신 10 내지 20% 아크릴아마이드겔 상에서 가동시켰다.
- [0273] 본래의 것(native)과 환원된 것(reduced)의 2 시리즈의 단백질 샘플을 표준 샘플과 함께 동일한 겔 상에서 동시에 가동시켰다.
- [0274] 본래의 것의 시리즈 내의 각 샘플은 1 내지  $1.3\mu\text{g}$ 의 단백질, TRIS-완충제 pH 7.4, SDS 및 로딩 완충제를 함유하였다.
- [0275] 환원된 것의 시리즈 내의 각 샘플은 1 내지  $1.3\mu\text{g}$ 의 단백질, TRIS-완충제 pH 7.4, SDS, 로딩 완충제 및 0.04% v/v 베타2-머캅토에탄올(환원제)을 함유하였다.
- [0276] 겔의 염색은 아세트산, 에탄올 및 물을 0.7, 3.0, 6.3의 대응하는 비율로 함유하는 쿠마시 브릴리언트 블루 용액에서 수행하였다.
- [0277] 겔의 탈색(destaining)은 아세트산, 에탄올 및 물을 0.7, 3.0, 6.3의 대응하는 비율로 함유하는 용액에서 수행하였다.
- [0278] (b) 결과 및 결론
- [0279] 이들 결과로부터 항체 및 항원 샘플이 높은 품질 및 순도(결과는 제시 생략)인 것은 명백하다.
- [0280] 친화도 연구
- [0281] (a) 이하에 기재된 조건을 이용해서 상호작용의 친화도를 결정하기 위하여 수행한 두 실험.
- [0282] CM4 칩 상에 항원의 고정.
- [0283] 칩 CM4-1의 활성화는 EDC 및 NHS 혼합물을 사용하여 아민 결합을 위해 제조사의 가이드라인에 따라서 수행하였다.
- [0284]  $3.00\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 항원 PSA(10mM NaAc-완충제 pH 3.8에 희석된 PSA의 스톡 용액)을 함유하는 용액을, 칩에 항원을 고정시키기 위하여 칩 CM4-1 상에 채널 fc2 내지 fc4에 걸쳐 흐르게 하였다. 유량:  $5\mu\text{l}/\text{min}$ , 용적:  $200\mu\text{l}$ .

- [0285] 표적 RU  $\leq M_w/10$   $M_w(\text{PSA}) = 30\ 000\ \text{Da}$  표적 RU (PSA)  $\leq 3000$
- [0286] 채널 fc1은 블랭크로 사용되었다.
- [0287] 첫 번째 실험에서 하기의 고정화가 달성되었다:
- [0288] fc2 = 1450 RU fc3 = 850 RU fc4 = 900 RU
- [0289] 두 번째 실험에서 하기의 고정화가 달성되었다:
- [0290] fc2 = 1325 RU fc3 = 890 RU fc4 = 1060 RU
- [0291] 모든 채널(fc1 내지 fc4)은 활성화 및 고정화 후에 에탄올아민에 의해 블로킹되었다.
- [0292] 이러한 데이터는  $3.00\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항원을 이용하여 적절한 고정화가 달성되었음을 입증한다.
- [0293] (b) 회합 단계(association phase)의 조사
- [0294] 각 항체의 4가지 다른 농도의 용액(HSP-완충제에 희석된 스톱 용액)을  $30\ \mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 칩 CM4-1 상의 채널 fc2 내지 fc4에 걸쳐 흘려보냈을 때, 8개 항체의 칩 CM4-1에 대한 회합 단계가 5분 동안 시행되었다.
- [0295] 각 항체에 대해 조사된 농도는 100, 50, 25 및  $12.5\ \text{nM}$ 이었다.
- [0296] 또한 회합 데이터는 해리 프로세스가 8시간 동안 시행된 실험으로부터 획득되었다.
- [0297] 전체적으로, 각 항체에 대해서 3 내지 9개의 개별적인 회합 실험을 수행하였다.
- [0298] 블랭크, fc1로부터의 신호는 모든 데이터에 대해 공제되었다.
- [0299] 본 발명자들은, 5분 후에, 회합 과정에 대한 데이터를 적합화할 수 있었던 것을 확인하였다.
- [0300] (c) 해리 단계의 조사
- [0301] 각 항체에 대해 8시간 동안 해리 단계를 시행하였다.
- [0302] 블랭크 fc1로부터의 신호는 해리 속도 상수의 계산에 사용된 모든 데이터에서 공제되었다.
- [0303] 그 데이터는 해리 프로세스가 매우 느린 것을 나타낸다.
- [0304] (d) 해리 속도 상수( $k_{\text{off}}$ )의 추정
- [0305] 해리 단계 데이터를 적합화시키고, 해리 속도 상수( $k_{\text{off}}$ )를 추정하였다(표 1 참조).
- [0306] (e) 회합 속도 상수( $k_{\text{on}}$ )의 추정
- [0307] 결합 속도 상수를 추정하기 위하여, 해리 속도 상수(표 1)가 적합화된 방정식에 사용되었다.
- [0308] (f) 해리 상수( $K_D$ )의 추정
- [0309] 시험된 각 항체에 대한 해리 상수( $K_D$ )를 표 1에 나타낸다.

**표 1**

[0310]

항체	$K_{\text{off}} (10^{-6} \text{ s}^{-1})$	$K_{\text{on}} (10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$K_D (10^{-11} \text{ M})$
m5A10 (140905)	6.3	0.29	2
m5A10 (141203)	5.4	0.25	2
hu5A10 (141203)	4.8	0.62	1
m5A10-DF0 (140905)	6.6	0.29	2
h5A10-DF0 (141203)	8.3	0.17	5
m5A10-DOTA (140905)	6.3	0.28	2
h5A10-DOTA (141211)	11.7	0.54	2
m5A10-DTPA (140905)	6.3	0.27	2
h5A10-DTPA (141203)	4.8	0.39	1

- [0311] 해리 상수( $K_D$ )는 8개의 모든 항체에 대해서  $10^{-11}$ M 범위이다.
- [0312] 통계학적으로 유의하지 않지만, 인간화 항체에 대한 해리 상수는 모 무린 항체의 해리 상수에 비해 더 높은 것으로 보인다.
- [0313] 인간화 항체의 접합은  $K_D$ 가 상당히 변하지 않기 때문에, 친화도에 현저히 영향을 주는 것으로 보이지 않는다.
- [0314] 요약
- [0315] ● 회합 과정은 모든 항체에 대해 매우 신속하며, 결합 속도 상수( $k_{on}$ )는 각 항체에 대해 3 내지 9회의 실험에 기초하여 모두  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이다.
- [0316] ● 해리 과정은 매우 느리며, 거의 대부분 바이아코어의 기술적 한계의 범위 내이다. 해리 속도 상수( $k_{off}$ )는 각 항체에 대해 3 내지 9회의 실험에 기초하여 모두  $10^6 \text{ s}^{-1}$  범위 내이다.
- [0317] ● 해리 상수( $K_D$ )는 모든 항체에 대해  $10^{-11}$ M 범위 내이다.

[0318] **실시예 4 - h5A10의 특성규명: 응집**

[0319] 실험 요약

[0320] IgG의 6가지 변이체에 대해서 이들의 응집 성향을 조사하기 위하여 동적 광산란(DLS) 시험을 수행하였다. DLS 결과는 모든 작제물이 상당한 크기(구형 단백질로 추정되는 200kDa 또는 200kDa보다 약간 큼)를 갖고 거의 응집이 없거나 전혀 응집이 없는 것을 나타낸다.

[0321] 목적

[0322] 동적 광산란을 이용하여 올리고머 상태에 관하여 6개의 IgG 작제물을 특성규명하기 위함.

[0323] 결과

[0324] 동적 광 산란

[0325] 동적 광산란은 말vern 제타사이저(Malvern Zetasizer) APS 장비를 이용하여 이중 샘플에서 20℃에서 측정하였다. 각 샘플은 3회 측정하였다. HBS-EP 완충제(고객으로부터 입수)는 완충제에 합리적으로 더스트 및 응집체가 없다는 것을 확실히 하기 위하여 대조군으로서 사용되었다. HBS-EP 완충제 내 응집체의 신뢰성 있는 측정은 행해질 수 없었는데, 이는 완충제에 응집체가 없어야만 하므로 양호하다. 모든 샘플은 수 분포 함수를 사용하여 쉽게 측정될 수 있었다. 가장 풍부한 종의 평균 반경은 그 종의 다분산도에 따라 계산되었다. 이 종의 평균 질량 분포가 또한 계산되었다. 표 2 참조.

**표 2**

[0326]

크기 분포로부터 유도된 동적 광산란 데이터			
작제물	평균 반경(nm)	다분산도(%)	질량 분포(%)
m5A10-DFO	6,1	22,7	100
h5A10-DFO	6,3	10,2	98,7
m5A10-DOTA	6,2	24,6	100
h5A10-DOTA	6,4	11,3	99,1
m5A10-DTPA	6,2	27,5	100
h5A10-DTPA	6,2	10,6	98,9

다분산도 = 반경의 표준편차/평균 반경 × 100%

[0327] 5.7nm의 반경은 완전한 구형상을 갖는 단백질에 대해 약 200kDa의 분자량에 상응한다. 6.1nm의 반경은 완전한 구형상을 갖는 단백질에 대해 약 230kDa의 분자량에 상응한다. 이것은 IgG 분자량에 대해 150kDa의 분자량에 상당히 가까운 것이며, 이는 그 샘플의 대부분이 주로 단량체 및/또는 이량체 IgG 분자로 구성됨을 의미한다. 이량체를 배제하지 않은 이유는, 광산란이 분자 형태에 기초하여 대략적인 크기 추정치를 제공하며, 이는 단량체

와 이량체를 분리하기 어렵게 만들지만 단량체로부터 큰 응집체를 분리하기는 쉽기 때문이다. 1 kDa 미만의 작은 입자는 모든 마우스 IgG 샘플에서 발견되었다. 이들 입자는 표 1에서는 무시되어 있는데, 그 이유는 이들의 작은 크기로 인해 완충제에서 발견되는 화합물에 속하는 것으로 상정되기 때문이다. 한편 보다 큰 응집체의 작은 분획이 모든 인간 IgG에서 발견되지만 마우스 IgG에서는 발견되지 않는다.

[0328] 결론

[0329] 동적 광산란은 모든 작제물이 상당한 크기를 가지며, 응집이 거의 없거나 전혀 없음을 나타낸다. 6개의 모든 작제물에 대한 크기 분포는 중첩되어 있다. 놀랍게도 완충제 유사 입자(< 1 kDa)는 모든 마우스 IgG 샘플에서 발견되는 한편, 보다 큰 응집체는 오로지 인간 IgG 샘플에서만 발견된다.

[0330] 실시예 5 - h5A10의 특성규명: 생체내 생체분포

[0331] 이 연구는 <sup>111</sup>In으로 표지될 경우 무린 5A10 및 인간 5A10의 생체분포를 비교한다.

[0332] 재료 및 방법

[0333] 인간화 상대방 항체인 h5A10은 이하에 기재된 바와 같이 생성되었다.

[0334] • 항체: 서열번호 12에 따른 중쇄와 서열번호 13에 따른 경쇄를 포함하는 예시적인 인간화 단클론성 항체 5A10(IgG1/카파, HEK 293 세포로 발현되는 과도기; 실시예 2 참조)는, 룬드에 소재한 이노바겐 아베(Innovagen AB)(로트 번호 90475.33, PBS, pH 7.4 중 농도 1.0mg/ml)에 의해 제공되었다. 비특이적 IgG 항체는 아이소형 대조군(마우스 혈청으로부터의 IgG 항체, 시그마(Sigma) I-8765)으로서 사용되었다.

[0335] 접합 및 방사성표지화

[0336] CHX-A''-DTPA의 5A10과의 접합: PBS 또는 NaCl 중 무린 및 인간화 5A10 mAb의 용액은 0.07M 붕산나트륨 완충제(시그마 알드리치사(Sigma Aldrich))를 사용해서 pH 9.2로 조정하였다. 이어서 단백질 용액을 킬레이터 CHX-A''-DTPA(마크로사이클릭스사(Macrocylics), 미국 소재)와 3:1 킬레이터 대 항체의 몰비로 40°C에서 4시간 동안 접합시켰다. 반응이 종결되고 CHX-A''-DTPA-11B6(DTPA-11B6)은 20ml의 0.2M 아세트산나트륨 완충액, pH 5.5로 평형화된 NAP-5 칼럼(GE 헬스케어사) 상에서의 크기-배제 크로마토그래피에 의해 유리 킬레이터로부터 분리되었다. 접합된 5A10 항체를 1ml의 아세트산암모늄 완충제로 용리시키고, 200µl의 분취된 샘플을 -20°C에서 저장하였다.

[0337] DTPA-5A10의 방사성표지화: 아세트산암모늄 완충제 pH 5.5 중 무린 및 인간화 DTPA-5A10을 미리 결정된 양의 <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub>(말링크로트 메디컬사(Mallinkrodt Medical), 아일랜드 더블린 소재)와 혼합하였다. 실온에서 2시간 항온처리 후에, 표지화를 종료하고, PBS(써모사이언티픽사(Thermo Scientific), 미국 소재)로 평형화된 NAP-5 칼럼 상에서 정제시켰다. 표지화 효율 및 속도론은 0.2M 시트르산(시그마 알드리치사)로 용리되는 순간 박층 크로마토그래피(ITLC)(바이오텍스사(Biodex), 미국 뉴욕 셸리 소재)에 의해 모니터링하였다. 이 시스템에서, 방사성 표지화된 접합체는 원래 라인에 유지되는 한편 <sup>111</sup>In은 유리되었다. 방사성 분포는 옵티퀀트 정량화 소프트웨어(Optiquant quantification software)를 구비한 사이클론 스토리지 포스포 시스템(Cyclone Storage Phosphor System)(퍼킨 엘머사(Perkin Elmer); 미국 매사추세츠주 윌섬 소재)을 이용해서 결정하였다.

[0338] 동물 연구

[0339] 생체내 연구를 위해, hK2를 발현하는 전립선 암종 세포주 LNCaP(ATCC, 미국 버지니아주 머내서스 소재)를 사용하였다. 세포를 써모사이언티픽사로부터의 10% 우태 혈청 및 PEST(페니실린 100 IU/ml 및 스트렙토마이신 100 µg/ml)가 보충된 RPMI 1640 배지(써모사이언티픽사)에서 배양하였다. 세포를 5% CO<sub>2</sub>와 함께 가습된 인큐베이터에서 37°C에서 유지하고, 트립신-EDTA 용액(0.25% 트립신, 0.02% EDTA 완충제, 써모사이언티픽사)으로 떼어내었다. LNCaP 세포를 이종이식할 때에, 매트릭셀(Matrigel) 매트릭스(BD-바이오사이언시스(BD-Biosciences), 미국 캘리포니아주 산호세 소재)가 사용되었다.

[0340] 모든 동물 실험은 실험실 동물 보호에 대한 국가적 법률에 따라 그리고 동물 연구에 대한 윤리 위원회(Ethics Committee for Animal Research)(스웨덴 룬트 대학)의 승인 하에 수행하였다.

[0341] 수컷의 면역결핍 누드 마우스 NMRI-Nu(6 내지 8주령)(젠비어 랩스(Janvier Labs), 프랑스 소재)를 본 연구에 사용하였다. 모든 마우스는 LNCaP 세포로, 이들의 좌측 또는 우측 옆구리에 100µl 성장 배지 및 100µl 매트릭셀

중 5 내지 6백만개 세포로 이종이식되었다. 이종이식편은 6 내지 8주 성장시켰다.

[0342] SPECT/CT 영상화 연구

[0343] SPECT/CT 영상화 연구는 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10 및 <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10에 대해서 수행하였다. 동물은 영상화 동안 2% 내지 3% 아이소플루란 기체(박스터사; 미국 일리노이주 테어필드 소재)로 마취시켰다. s.c. LNCaP 이종이식편을 가진 NMRI-nu 마우스는 100 uL PBS 중 대략 13-15 MBq, 50 ug의 mAb와 함께 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10(n = 4) 또는 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10(n = 4)로 꼬리 정맥에 정맥내 주사하였다. 동물은 NSP-106 다중-핀홀 마우스 콜리메이터를 구비한 전임상 SPECT/CT 스캐너(NanoSPECT/CT Plus, 바이오스캔사; 미국 워싱턴 디씨 소재)를 사용함으로써 1시간 동안 영상화하였다. 영상화는 주사 후 1, 2, 3 및 7일에 수행하였다. SPECT 데이터는 HiSPECT 소프트웨어(SciVis; 독일 피팅겐 소재)를 이용해서 재구성하였다. CT 영상화는 각각의 전신 SPECT 전에 행하였다. SPECT/CT 이미지는 InVivoScope 2.0 소프트웨어(invicro; 미국 매사추세츠주 보스턴 소재)를 이용해서 분석되었고, 관심대상 영역(region-of-interest: ROI)은 해부학적 기준으로서 CT 이미지를 사용하여 인출하였다.

[0344] 생체분포 연구

[0345] 생체분포 연구는 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10 및 <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10 둘 다에 대해 수행하였다. 마우스들 중 동물군(n=12)에는 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10(대략 3-4 MBq, 100 uL PBS 중 50 ug mAb) 또는 <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10(3-4 MBq, 100 uL PBS 중 50 ug mAb)을 정맥내 주사하였다. 동물은 7일 p.i.로 희생시키고, 관심대상 기관을 수집하여 3-인치 NaI(Tl) 검출기를 구비한 자동화 NaI(Tl) 웰-카운터(well-counter)(1480 WIZARD, 월락 오이사(Wallac Oy), 핀란드 투르쿠 소재)로 분석하였다.

[0346] 조직 그램당 주사된 투여량 퍼센트(% IA/g)로 표기된, 조직 흡수값(tissue uptake value)은 다음과 같이 산출되었다:

[0347]  $\%IA/g = (\text{조직 방사능}/\text{주사된 방사능})/\text{기관 중량} \times 100$

[0348] 여기서, iv 주사에 대해서:

[0349]  $\text{주사된 방사능} = \text{주사기 내 방사능} - \text{사용된 주사기에 남은 방사능} - \text{꼬리에 있는 방사능}$

[0350] 기관은 또한 절제 후에 칭량되었다. 데이터는 배경 및 물리적 붕괴에 대해서 보정되었다.

[0351] 결과

[0352] SPECT/CT 영상화

[0353] <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10 및 <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10의 주사 후 최대 7일까지 스캔된 LNCaP 이종이식편의 대표적인 SPECT/CT 이미지가 도 1 및 도 2에 도시되어 있다. 활성도는 신속하게 24시간 이내에 LNCaP 종양에 축적되고, 방사능은 주사 후 7일에 유지된다. 활성도의 높은 축적은 또한 간에서 검출되었다. ROI 분석은 종양 대 반대쪽 다리의 연질 조직의 비가 7일 p.i. 시에 <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10에 대해서  $5.2 \pm 0.84$ , <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10에 대해서  $6.4 \pm 1.3$  이었던 것을 나타내었다.

[0354] 생체분포

[0355] 상이한 기관에서 활성 축적을 더욱 철저하게 조사하기 위하여, 생체의 생체분포가 더 많은 수의 동물(n = 항체당 12마리)에서 수행되었다.

[0356] 시간 경과에 따른 <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10 및 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10의 종양 대 반대쪽 비는 도 3에 도시되어 있다. 예기치 않게, 이 비는 '모' 류린 하에에 대한 것보다 인간화 항체에 대해서 현저하게 높은 것이 관찰되었다.

[0357] 시간 경과에 따른 <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10 및 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10의 종양 대 간 비가 도 4에 도시되어 있다. 재차 예기치 않게, 이 비는 '모' 류린 항체에 대한 것보다 인간화 항체에 대해서 현저하게 높은 것이 관찰되었다.

[0358] <sup>111</sup>In-DTPA-m5A10 및 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10의 생체분포 데이터는 도 5에 도시되어 있다.

[0359] LNCaP 이종이식편을 가진 NMRI 마우스 내 류린 및 인간화 5A10에 대한 생체분포는 7일째에 높은 종양 축적을 보

인 한편, 뼈, 근육과 같은 다른 기관 내 축적은 훨씬 낮았다.

[0360] 인간화 <sup>111</sup>In-DTPA-h5A10에 대한 생체분포 데이터와 모 무린 항체(<sup>111</sup>In-DTPA-m5A10)에 대한 생체분포 데이터의 비교는 예기치 않은 유리한 차이를 드러내었다. 종양 축적은 무린에 대한 것보다 인간화된 것에 대해서 유의하게 훨씬 더 높았으며, h5A10에 대한 7.4 ± 1.4 %IA/g는 7일 p.i에서 m5A10(p < 0.001)에 대한 2.7 ± 0.75 %IA/g와 비교되었다(도 6). 다른 기관 내 방사능의 축적은 두 항체에 대해서 대략 동일한 수준이었고, 이는 종양-대-기관 비를 모 무린 m5A10에 대한 것보다 인간화 h5A10에 대해서 훨씬 더 높게 만들었다(표 3).

표 3

	종양-대-기관 비	
	h5A10	m5A10
혈액	2.9	1.1
심장	7.9	3.4
폐	4.7	2.0
간	3.0	0.9
GI관	21.7	10.8
신장	9.1	3.6
타액	5.1	2.7
피부	4.9	3.0
근육	44.2	17.6
고환	9.1	4.8
뼈	7.3	3.1

[0362] 결론 및 논의

[0363] 이 연구의 결과는 하기를 입증한다:

- [0364] • 인간화 5A10 항체, <sup>111</sup>In-h5A10은, 생체내에서 전립선 종양을 효율적으로 표적화한다;
- [0365] • 인간화 h5A10 항체는 이의 무린 항체보다 예기치 않게 더 양호한 종양 축적을 나타낸다;
- [0366] • 인간화 h5A10 항체는 무린 항체보다 (더 높은 종양-대-기관 비로 도시된 바와 같이) 더 양호한 영상화 콘트라스트(imaging contrast)를 제공한다.

[0367] 종합하면, 이들 지견은 진단에서 인간화 5A10 항체의 더 양호한 표적화 특성과 전립선암의 치료에서 마찬가지로 더 양호한 효능의 설득력 있는 증거를 제공한다.

[0368] 실시예 6 - 방사성핵종 치료 선량 측정 계획 및 환자에서 전립선암의 치료

[0369] 방사성핵종 치료(RNT)를 위하여, 방사선 공급원은 전체적으로 분포되며, 방사능은 통상 방사성 의약품으로서 전신 투여된다. 방사능 분포는 여러 조직에서 시간 경과에 따라 축적되는 방사성 의약품의 양에 따라 달라지며, 일부는 환자들 간에 다르다(1).

[0370] RNT 치료는 미리 정해진 흡수 선량에 기초하여야 한다(2). 이어서, 첫 번째 치료는 추적자량(tracer amount)의 방사성 의약품을 사용하여 예비-치료 시험을 수행해야 하고, 그리고 종양 및 기관 흡수 선량을 정해야 한다. 보통, 이러한 정보는 단위 투여 활성도당 기관 흡수 선량(mGy/MBq 단위)을 나타내는 인자인  $D_T^P$ (기관)으로 표현된다.

[0371] 그 다음, 치료 투여가 유사한 조건 하에 주어지면, 이 인자는 주어진 기관, 조직 또는 종양에 미리 정해진 흡수 선량을 전달하도록 투여하는데 필요한 활성도를 결정하는데 사용될 수 있다(4,6).

[0372] 방사성표지된 h5A10 항체를 이용한 전립선암 치료의 경우에, 예비-치료 시험은 <sup>111</sup>In-h5A10을 이용한 <sup>111</sup>In 이미징에 기초하여야 한다. <sup>177</sup>Lu가 치료 방사성핵종인 경우에 <sup>111</sup>In은 정량적(평면/SPECT) 이미징에 가장 적합하다. 그 다음,  $D_T^P$ (기관)이 결정되면, 치료는 소정의 치료 효과를 제공하는 치료 활성  $A_T$ 로 부여될 수 있다. 치료 중

에, 활성 분포 및 이에 상응하는 투여 속도는 치료 평가에 필요한 중앙 및 정상 기관에 주어진 실제 치료 흡수 선량을 얻기 위한 이미징에 기초하여 계산되어야 한다.

[0373] 치료 계획의 결과로서 골수 독성 수준에 이르고, 골수 지원이 필요하며 또한 골수강에 대한 선량 측정에 기초한 치료의 경우에, 줄기 세포의 재주입을 위한 시간을 결정해야 한다.

[0374] 요약하면, 이에 따라 하기의 치료 스킴이 계획되어야 한다:

[0375] *예비-치료 선량 측정 연구*

[0376] 1.  $^{111}\text{In}$ -표지된 h5A10(200 내지 300 MBq) 주사

[0377] 2. 혈액 샘플링 - 혈액 및 혈장 내에서 활성 농도를 첫 주에 측정함.

[0378] 3. 적어도 1주에 걸친 이미징(SPECT/평면)(3 내지 5회)

[0379] 4. 룬다도즈(LundaDose) 스킴(3) 또는 등가의 프로그램에 기초한 기관 선량 측정

[0380] 5. 골수(2 내지 3Gy), 신장(20 내지 30Gy) 및 간(12 내지 36Gy)과 같은 방사능 감수성 기관에 대해 특정 흡수 선량으로 제한된 치료 활성을 결정함.

[0381] *내부-치료(intra-therapy) 선량 측정을 포함하는 치료*

[0382] 1. (예비치료 선량 측정에 기초하여) 투여된  $^{177}\text{Lu}$ -표지된 h5A10

[0383] 2. 혈액 샘플링 - 혈액 및 혈장에서의 활성 농도

[0384] 3. 적어도 1주에 걸친 이미징(3 내지 5회)

[0385] 4. 룬다도즈 스킴(3) 또는 등가의 프로그램에 기초한 기관 선량 측정 ==> 미리 정해진 치료 흡수 선량의 검증.

[0386] 선량 측정에 대한 특정 커멘트

[0387] 산출된 활성도는 시간 경과에 따라 주어진 부위에서 일어나는 붕괴의 수이다. 단위는 Bq s 또는 Bq h이다. 이온화 방사선이 물질을 통해 이동하는 경우에, 이는 에너지와 상호작용하며 에너지를 데포지트시킨다(deposit). 부여된 에너지는 주어진 용적 내에서 모든 에너지 데포지트의 합이다. 흡수 선량은 부여된 에너지와 상기 부피의 질량의 비율이다. 흡수 선량의 단위는 그레이(Gy)이며, 1Gy는 1J/kg과 같다.

[0388] 상이한 시간에서 조직 내 활성도 값으로부터, 산출된 활성은 적분에 의해 결정되고, 흡수 선량이 결정될 수 있다. 활성도 측정은 전체-기관 선량 측정을 위한 평면 이미징을 사용하여 이루어진다. 정량 SPECT/CT는 복셀-기반 방법(voxel-based method)을 사용하여 보다 작은 용적에서 선량 측정이 가능하도록 한다.

[0389] 활성 농도값의 3D 분포로부터, 흡수 선량을 분포가 소위 점 선량 커널(point dose kernel) 또는 복셀 S값을 사용하여 계산될 수 있으며, 이는 조직에 위치한 점 공급원 주변의 에너지 데포지션 패턴(energy deposition pattern)을 나타낸다. 이 방법은 몸통(trunk) 내의 연조직과 같이 해부학적 부위가 밀도 측면에서 균일한 것으로 가정한다. 폐에서와 같이 밀도가 균일하지 않은 신체 부위에 대해서는, 직접 몬테 카를로 계산(direct Monte Carlo calculation)이 바람직하다. 여기서, SPECT 또는 PET로부터의 활성도 분포는 몬테 카를로 선량 계산 코드에 대한 입력으로서 사용된다.

[0390] 참고문헌

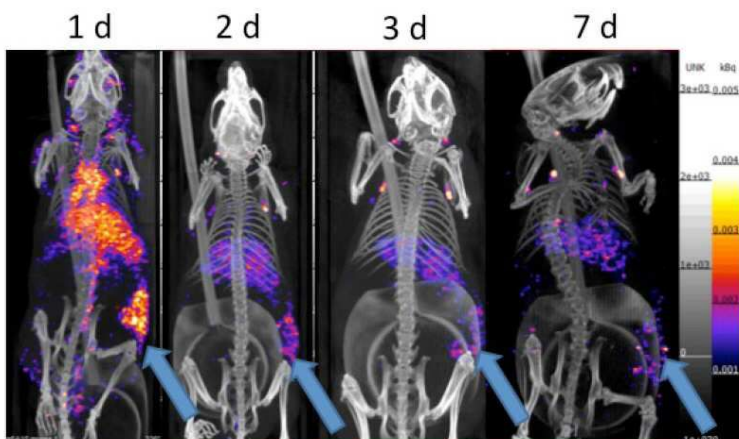
1. Strand S-E, Zanzonico P, Johnson TK. Pharmacokinetic modeling. *Med Phys* 1993;20(2):515-27
2. ICRU report nr 67 - Dose Specifications in Nuclear Medicine. Adelstein SJ, DeLuca P, Feinendegen LE, Green L, Howell RW, Humm JL, Strand SE ICRU; 2002
3. The LundADose Method for Planar Image Activity Quantification and Absorbed-Dose Assessment in Radionuclide Therapy. Sjogreen,K., Ljungberg,M., Wingardh,K., Minarik,D., and Strand,S.E. (2005); *Cancer Biother.Radiopharm.*, 20:92-97
4. Quantitative imaging for clinical dosimetry. Bardies M, Flux G, Lassman M, Monsieurs N, Savolainen S, Strand S-E *Nucl Instr and Methods* 2006;569:467-471.
5. <sup>177</sup>Lu-[DOTA0,Tyr3] octreotate therapy in patients with disseminated neuroendocrine tumors: Analysis of dosimetry with impact on future therapeutic strategy. Garkavij Michael, Nickel Mattias, Sjogreen-Gleisner Katarina, Ljungberg Michael, Ohlsson Tomas, Wingardh Karin, Strand Sven-Erik, Tennvall Jan. *Cancer* 2010;116(4 Suppl):1084-92.
6. Dosimetry in patients with B-cell lymphoma treated with [(90)Y]ibritumomab tiuxetan or [(131)I]tositumomab Sjogreen-Gleisner K., Dewaraja YK., Chisea C., Tennvall J., Lindén O., Strand SE, Ljungberg M.. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2011 April;55(2):126-54.

[0391]

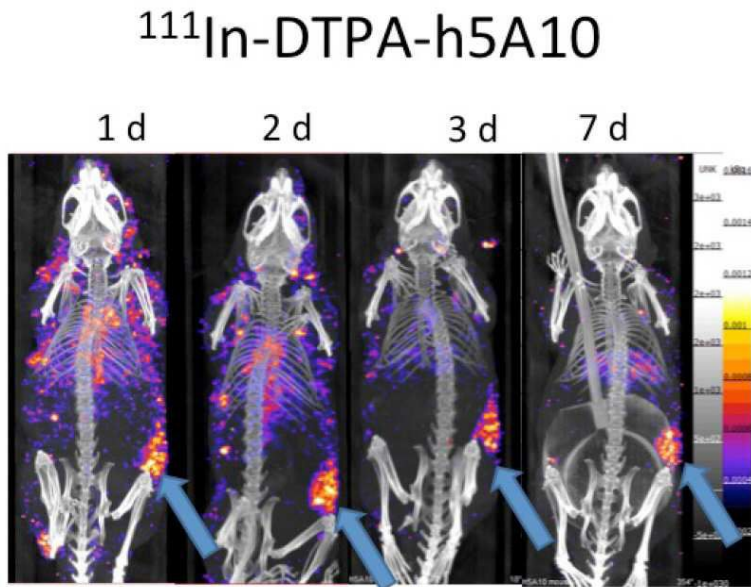
도면

도면1

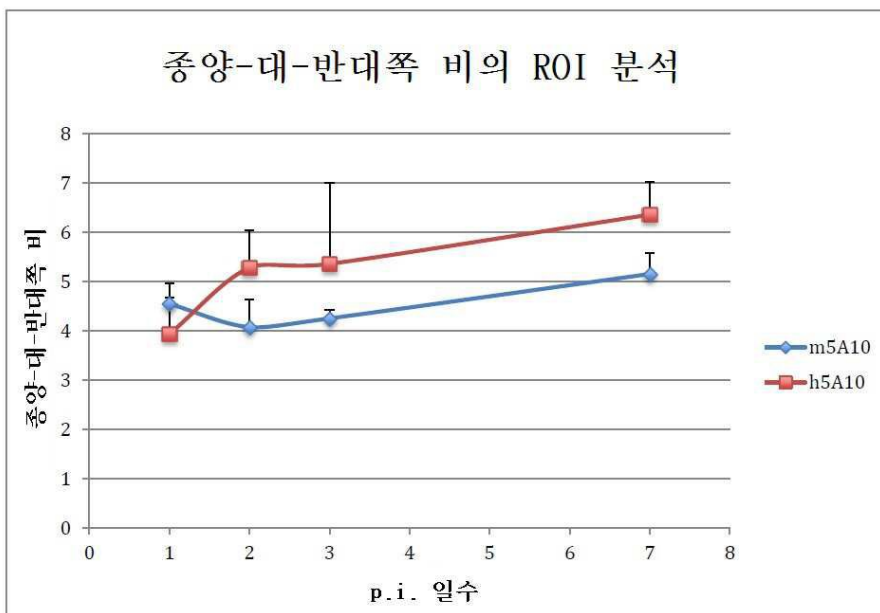
<sup>111</sup>In-DTPA-m5A10



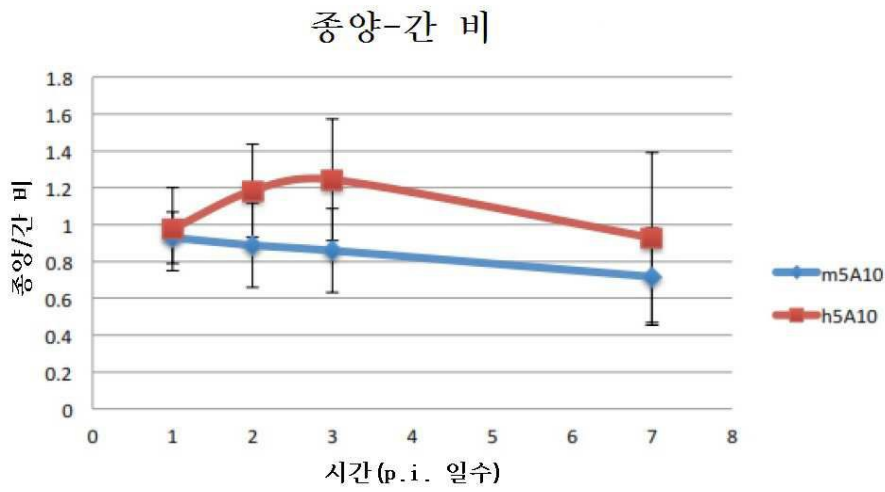
도면2



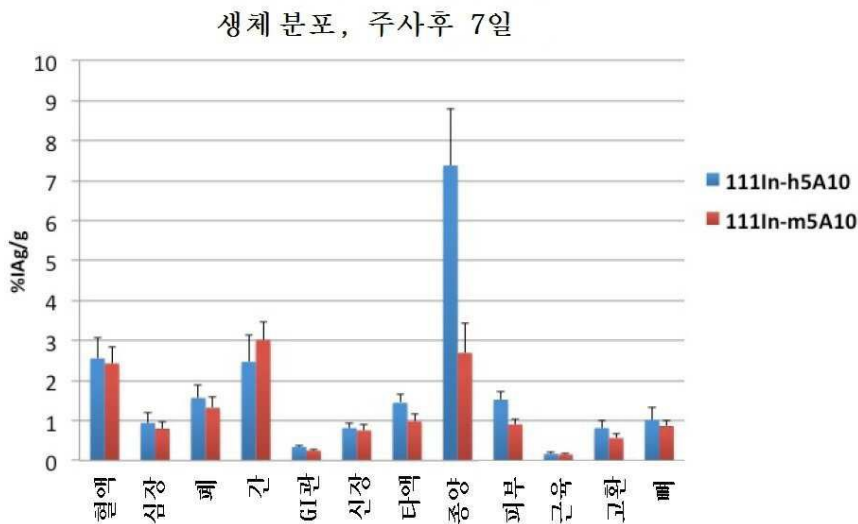
도면3



도면4



도면5



**서열 목록**

SEQUENCE LISTING

<110> FREDAX AB

<120> HUMANIZED ANTI PSA (5A10) ANTIBODIES

<130> WO/2017/060247

<140> PCT/EP2016/073684

<141> 2016-10-04

<150> GB 1517550.8

<151> 2015-10-05

<150> GB 1519105.9

<151> 2015-10-29

<160> 23

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain variable region CDRH1

<400> 1

Thr Thr Gly Met Gly Val Ser

1                    5

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<

223> Heavy chain variable region CDRH2

<400> 2

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Thr Ser Leu Lys

1                    5                    10                    15

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain variable region CDRH3

<400> 3

Lys Gly Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr

1                    5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain variable region CDRL1

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Thr Asp Val Ala

1                    5                    10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain variable region CDRL2

<400> 5

Ser Thr Ser Tyr Leu Gln Ser

1                    5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain variable region CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr

1                    5

<210> 7

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Amino acid sequence of human PSA

<400> 7

Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys

1                    5                    10                    15

His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala Val

20                    25                    30

Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His

35 40 45

Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu Phe

50 55 60

His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe Pro

65 70 75 80

His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg Pro

85 90 95

Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu Pro

100 105 110

Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln Glu

115 120 125

Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile Glu

130 135 140

Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His

145 150 155 160

Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr

165 170 175

Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr Cys

180 185 190

Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly

195 200 205

Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser

210 215 220

Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile

225 230 235 240

Val Ala Asn Pro

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain variable region amino acid sequence

<400> 8

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Thr  
                   20                    25                    30  
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
                   35                    40                    45  
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Thr Ser  
                   50                    55                    60  
  
 Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Glu Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val  
 65                    70                    75                    80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                   85                    90                    95  
 Cys Ala Arg Lys Gly Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   100                    105                    110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain variable region amino acid sequence

<400> 9

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

Phe Ser Thr Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 10

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antibody amino acid sequence

<400> 10

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 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> 11

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antibody amino acid sequence

<400> 11

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

<210> 12

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain amino acid sequence

<400> 12

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Lys Gly Tyr Tyr Gly Tyr Phe 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 Glu Glu Met 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> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain amino acid sequence

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Thr Asp  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile  
 35 40 45

Phe Ser Thr Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60



acatgcacct tciccgggtt tagcctgtca accaccggtg tgggcgtgag ttggattcgc 120  
 caaccaccgg gtaaagcgtt tgagtggctt gcacacatct attgggacga tgacaagcgg 180  
 tacagtacta gcctgaaaac gagactgacc ataagcgagg actcatcaa gaatcaggtg 240  
 gtactgacga tgaccaacat ggatcccgtt gataccgcca catactactg tgccaggaaa 300

ggctactatg gctatttcga ctattgggga cagggaacac tcgtcactgt gtctct 357

<210> 15

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..324

<223> /mol\_type="unassigned DNA"

    /note="Nucleic acid sequence"

    /organism="Artificial Sequence"

<400> 15

gacatccaga tgacceaatc tcctcttagc ttgtccgcta gtgtcggta tagggtgaca 60  
 gtgacatgca gagctagcca gaatgtcaac acagacgttg cctggtatca gcagaagcca 120  
 ggcaaagcac ccaaagccct catcttctcc acgtcatatc tgcaaagcgg agtaccttcc 180

cggttttagtg ggictgggtc aggcactgac ttcaccctga ccatatccag ctttcaaccg 240

gaagatttcg cgacctacta ctgtcagcag tacagcaact atcctctgac ttttggacag 300

ggcactaagg tggagattaa gcgt 324

<210> 16

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..1350

<223> /mol\_type="unassigned DNA"

    /note="Nucleic acid sequence"

    /organism="Artificial Sequence"

<400> 16

caggtcacac tgaaggaatc tgggcctgct ttggtgaagc ccaactcagac tctgacactc 60

acatgcacct tctccgggtt tagcctgtca accaccggtg tgggcgtgag ttggattcgc 120

caaccaccgg gtaaacgctt tgagtggctt gcacacatct attgggacga tgacaagcgg 180

tacagtacta gcctgaaaac gagactgacc ataagcgagg actcatcaa gaatcaggtg 240

gtactgacga tgaccaacat ggatcccggt gataccgcca catactactg tgccaggaaa 300

ggctactatg gctatttcca ctattgggga caggaacac tcgtcactgt gtcctctgct 360

agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccg gaccctgag 780

gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg 1320

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1350

<210> 17

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..642

<223> /mol\_type="unassigned DNA"

```

    /note="Nucleic acid sequence"
    /organism="Artificial Sequence"
<400> 17
gacatccaga tgaccaaatc tccctctagc ttgtccgcta gtgtcgggta tagggigaca      60
gtgacatgca gagctagcca gaatgtcaac acagacgttg cctggtatca gcagaagcca      120
ggcaaagcac ccaaagccct catcttctcc acgtcatatc tgcaaagcgg agtaccttcc      180

cggtttagtg ggtctgggtc aggcaactgac ttcaccctga ccatatccag ccttcaaccg      240
gaagatttcg cgacctacta ctgtcagcag tacagcaact atcctctgac ttttggacag      300
ggcactaagg tggagattaa gcgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc      600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                                642
<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> N terminal amino acid sequence from light chain of antibody
<400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
1             5
<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> N terminal amino acid sequence from heavy chain of antibody
<400> 19
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
1             5

```

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..35

<223> /mol\_type="unassigned DNA"

/note="Light chain primer 5A10-L "

/organism="Artificial Sequence"

<400> 20

ccagccatgg ctgacattgt gatgacccag tctca

35

<210> 21

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..34

<223> /mol\_type="unassigned DNA"

/note="Light chain primer W0252"

/organism="Artificial Sequence"

<400>

> 21

gcgccgtcta gaattaacac tcattcctgt tga

34

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..35

<223> /mol\_type="unassigned DNA"

/note="Fd chain primer 5A10-H "

```

        /organism="Artificial Sequence"
<400> 22
ccagccatgg ctgaggtgca attggtggag tctgg           35
<210> 23
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..32
<223> /mol_type="unassigned DNA"

```

```

        /note="Fd chain primer W0267"
        /organism="Artificial Sequence"
<400> 23
ctagactagt acaatccctg ggcacaattt tc           32

```