



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월29일

(11) 등록번호 10-1580713

(24) 등록일자 2015년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7024475

(22) 출원일자(국제) 2011년02월24일

심사청구일자 2013년06월26일

(85) 번역문제출일자 2012년09월19일

(65) 공개번호 10-2013-0012117

(43) 공개일자 2013년02월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/026079

(87) 국제공개번호 WO 2011/106528

국제공개일자 2011년09월01일

(30) 우선권주장

61/307,797 2010년02월24일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US20060239910 A1

Int. J. Cancer 39(3): 297-303(1987. 3. 15.)

Cancer Res. 51(22): 6125-6132(1991. 11. 15.)

Cancer Immun. 7: 6(2007. 3. 9.)

(73) 특허권자

이뮤노젠 아이엔씨

미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830

(72) 발명자

아브 올라

미국 02054 메사추세츠주 밀스 베이베리 서클 26

타바레스 다니엘

미국 01760 메사추세츠주 네이틱 실베스터 로드 27

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 51 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **엽산염 수용체 1 항체와 면역접합체 및 이들의 용도**

(57) 요약

인간 엽산염 수용체 1에 결합하는 항체와 면역접합체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 신규한 항암 작용제가 제시된다. 이들 작용제, 항체, 또는 면역접합체를 이용하는 방법, 예를 들면, 종양 성장을 억제하는 방법이 더욱 제시된다.

(72) 발명자

휘 령윤

미국 02493 매사추세츠주 웨스턴 애로우헤드 로드 11

페인 질리언

미국 02468 매사추세츠주 웨이번 오크베일 로드 21

골드메이커 빅터 에스

미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 펠럼 스트리트 74

(30) 우선권주장

61/346,595 2010년05월20일 미국(US)

61/413,172 2010년11월12일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 하기를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(a) GYFMN(SEQ ID NO:1)을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:2)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및 YDGSRAMDY(SEQ ID NO:3)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및

(b) KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7)를 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA(SEQ ID NO:8)를 포함하는 경쇄 CDR2; 및 QQSREYPYT(SEQ ID NO:9)를 포함하는 경쇄 CDR3.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인 및 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO:6의 중쇄 및 SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:13의 경쇄를 포함하는, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

2010년 4월 7일자에 ATCC에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 PTA-10772 를 갖는 플라스미드 DNA에 의해 암호화된 중쇄, 및 2010년 4월 7일자에 ATCC에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 PTA-10773 또는 PTA-10774를 갖는 플라스미드 DNA에 의해 암호화된 경쇄를 포함하는, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 SEQ ID NO:4 와 적어도 90% 동일한 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11 과 적어도 90% 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 SEQ ID NO:4 와 적어도 95% 동일한 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11 과 적어도 95% 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 SEQ ID NO:4 와 적어도 99% 동일한 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11 과 적어도 99% 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체인, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제 1 항, 제 2 항 및 제 5 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단편인, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편이 Fab, Fab', F(ab')₂, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 이황화 연결된 Fv, 인트라바디, IgG-CH₂, 미니바디, F(ab')₃, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, DVD-Ig, mAb₂, (scFv)₂, 또는 scFv-Fc를 포함하는, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 1.0 nM 또는 그 이상, 또는 1.0 내지 10 nM의 K_d로 인간 염산염 수용체 1에 결합하는, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 인간화된 항체를 만드는 방법으로서, (a) 상기 항체를 발현하는 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포로부터 항체를 분리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

화학식 (A) - (L) - (C)를 갖는 면역접합체로서,

(A)는 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

(L)은 링커이고; 그리고

(C)는 세포독성제이고,

여기서 상기 링커 (L)은 (A)를 (C)에 연결하는, 면역접합체.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편 (A)가 10 nM 이하의 K_d 로 인간 염산염 수용체 1에 결합하는 면역접합체.

청구항 15

제 13 항의 면역접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 종양 성장 억제 또는 암 치료용 약제학적 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 면역접합체가 2 내지 6개 (C)를 포함하고, 또한 면역접합체가 (A)당 평균적으로 3 내지 4개 (C)를 갖는 약제학적 조성물.

청구항 17

제 13 항에 있어서, 상기 링커가 절단성 링커, 비-절단성 링커, 친수성 링커, 및 디카르복실산 기초된 링커로 이루어진 군에서 선택되는 면역접합체.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 링커가 *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP) 또는 *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트(설포-SPP); *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB) 또는 *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트(설포-SPDB); *N*-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸) 시클로헥산 카르복실레이트(SMCC); *N*-설포숙신이미딜 4-(말레이미도메틸) 시클로헥산카르복실레이트 (설포SMCC); *N*-숙신이미딜-4-(요오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB); 및 *N*-숙신이미딜-[(*N*-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글리콜] 에스테르(NHS-PEG4-말레이미드)로 이루어진 군에서 선택되는 면역접합체.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 링커가 *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB) 또는 *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트(설포-SPDB)인 면역접합체.

청구항 20

제 13 항에 있어서, 상기 세포독성제가 메이탄시노이드, 벤조디아제핀, 탁소이드, CC-1065, 듀오카르마이신, 칼리키아미신, 돌라스타틴, 아리스타틴, 토메이마이신, 및 랩토마이신으로 이루어진 군에서 선택되는 면역접합체.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 세포독성제가 메이탄시노이드인 면역접합체.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 세포독성제가 N(2')-데아세틸-N(2')-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신 또는 N(2')-데아세틸-N(2')-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신인 면역접합체.

청구항 23

삭제

청구항 24

제 13 항의 면역접합체를 포함하는, 종양 성장 억제 또는 암 치료용 키트.

청구항 25

개체에서 종양 성장을 억제하기 위한 제 13 항의 면역접합체를 포함하는 의약.

청구항 26

하기를 포함하는 면역접합체로서:

(A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체;

(L) N-숙신이미딜-[(N-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글리콜] 에스테르(NHS-PEG4-말레이미드); N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB); 또는 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트(설포-SPDB); 및

(C) N(2')-데아세틸-N(2')-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신;

여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결하는 면역접합체.

청구항 27

하기를 포함하는 면역접합체로서:

(A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체;

(L) N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트(설포-SPDB); 및

(C) N(2')-데아세틸-N(2')-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신;

여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결하는 면역접합체.

청구항 28

하기를 포함하는 면역접합체로서:

(A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체;

(L) N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트(설포-SPP) 또는 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP); 및

(C) N(2')-데아세틸-N(2')-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신;

여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결하는 면역접합체.

청구항 29

제 26 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간화된 항체가 SEQ ID NO:4 의 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:11 의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 면역접합체.

청구항 30

제 26 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 2-6 개 (C) 을 포함하는 면역접합체.

청구항 31

삭제

청구항 32

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는, 암 진단용 시약.

청구항 33

제 32 항에 있어서, 표지(label)를 추가로 포함하는 시약.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 표지가 방사성표지(radiolabel), 형광단(fluorophore), 발색단(chromophore), 영상화제(imaging agent) 및 금속 이온(metal ion)으로 이루어진 군에서 선택되는 시약.

청구항 35

제 1 항 내지 제 7 항 및 제 26 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 항체, 항원 결합 단편 또는 면역접합체를 함유하는, 종양 성장 억제 또는 암 치료용 키트.

청구항 36

제 1 항 내지 제 7 항 및 제 26 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 항체, 항원 결합 단편 또는 면역접합체를 함유하는, 개체에서 종양 성장을 억제하기 위한 의약.

청구항 37

제 36 항에 있어서, 종양이 난소 종양, 뇌 종양, 유방 종양, 자궁 종양, 자궁내막 종양, 췌장 종양, 신장 종양, 및 폐 종양으로 이루어진 군에서 선택되는 의약.

청구항 38

제 37 항에 있어서, 종양이 난소 종양 또는 폐 종양인 의약.

청구항 39

제 36 항에 있어서, 종양 성장이 암을 치료하기 위해 억제되는 의약.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

화학식 (A) - (L) - (C)를 갖는 면역접합체를 함유하는, 개체에서의 암 치료용 의약으로서, 여기서

(A)는 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

(L)은 링커이고; 그리고

(C)는 메이탄시노이드로 이루어진 군에서 선택되는 세포독소이고; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결하는 의약.

청구항 43

제 42 항에 있어서, 암은 난소암, 뇌암, 유방암, 자궁암, 자궁내막암, 췌장암, 신장암, 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 의약.

청구항 44

제 42 항에 있어서, 암을 치료하기 위해 종양 성장이 억제되는 의약.

청구항 45

제 44 항에 있어서, 종양이 난소 종양 또는 폐 종양인 의약.

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

제 42 항에 있어서, 상기 면역접합체는 하기를 포함하는 의약:

(A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체;

(L) *N*-숙신이미딜-[(*N*-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글리콜] 에스테르(NHS-PEG4-말레이미드); *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB); 또는 *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트(설포-SPDB); 및

(C) N(2')-테아세틸-N(2')-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신.

청구항 49

제 48 항에 있어서, 암이 난소암, 뇌암, 유방암, 자궁암, 자궁내막암, 췌장암, 신장암, 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 의약.

청구항 50

제 49 항에 있어서, 암이 난소암 또는 폐암인 의약.

청구항 51

제 48 항에 있어서, 암을 치료하기 위해 종양 성장이 억제되는 의약.

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

제 48 항에 있어서, 상기 인간화된 항체가 SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인 및 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 의약.

청구항 55

제 42 항에 있어서, 상기 면역접합체가 하기를 포함하는 의약으로서:

(A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체;

(L) *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트(설포-SPP) 또는 *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP); 및

(C) N(2')-테아세틸-N(2')-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신;

여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결하는 의약.

청구항 56

제 42 항에 있어서, 상기 면역접합체가 하기를 포함하는 의약으로서:

(A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체;

(L) *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트(설포-SPDB); 및

(C) N(2')-테아세틸-N(2')-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신;

여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결하는 의약.

청구항 57

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원 결합 단편을 생산하는 분리된 세포.

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

SEQ ID NO: 5, 14 및 15 로 이루어진 군에서 선택되는 서열로 이루어진 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 62

제 61 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

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

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2010년 2월 24일 제출된 미국 특허가출원 제61/307,797호, 2010년 5월 20일 제출된 미국 특허가출원 제61/346,595호, 그리고 2010년 11월 12일 제출된 미국 특허가출원 제61/413,172호에 우선권을 주장하고, 이들

각각은 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함된다.

- [0003] 본 발명의 분야는 일반적으로 인간 엽산염 수용체 1에 결합하는 항체와 면역접합체에 관계하고, 그리고 암과 같은 질병의 치료를 위해 이들 항체와 면역접합체를 이용하는 방법에 관계한다.
- 배경 기술**
- [0004] 본 발명의 배경 기술
- [0005] 암은 선진국에서 주도적인 사망 원인 중의 하나인데, 매년 미국에서만 백만 명 이상이 암으로 진단되고 500,000 명이 사망하고 있다. 전체적으로, 3명중 1명 이상에서 그들의 일생 동안 일정한 형태의 암이 발생할 것으로 추정된다. 200가지 이상의 상이한 유형의 암이 존재하는데, 이들 중에서 4가지—유방암, 폐암, 결장직장암, 그리고 전립선암은 모든 새로운 증례의 절반 이상을 차지한다 (Jemal et al., 2003, *Cancer J. Clin.* 53:5-26).
- [0006] 엽산염 수용체-알파, 또는 엽산염 결합 단백질로 알려져 있는 엽산염 수용체 1(FOLR1)은 세포의 플라즈마 막(plasma membrane) 상에서 발현되는 N-당화된 단백질이다. FOLR1은 엽산(folic acid) 및 몇몇 환원된 엽산 유도체에 대한 높은 친화성을 갖는다. FOLR1은 생리학적 엽산염, 5-메틸테트라하이드로엽산염의 세포 내부로의 전달을 매개한다.
- [0007] FOLR1은 극히 다수의 난소 암뿐만 아니라 많은 자궁 암, 자궁내막 암, 췌장 암, 신장 암, 폐 암, 그리고 유방 암에서 과다발현되는 반면, 정상 조직에서 FOLR1의 발현은 신장 근위 세뇨관(proximal tubule), 폐의 폐포 폐세포(alveolar pneumocyte), 방광, 고환, 맥락막망(choroid plexus), 그리고 갑상선 내에 상피 세포의 꼭지면 막(apical membrane)에 국한된다(Weitman SD, et al., *Cancer Res* 52: 3396-3401 (1992); Antony AC, *Annu Rev Nutr* 16: 501-521 (1996); Kalli KR, et al. *Gynecol Oncol* 108: 619-626 (2008)). FOLR1의 이러한 발현 패턴으로 인하여, 이것은 FOLR1-지향된 암 요법에 대한 바람직한 표적이 된다.
- [0008] 난소 암은 전형적으로, 진단된 단계까지 무증상이기 때문에, 종종 말기에서 진단되고, 그리고 현재 가용한 절차, 전형적으로 외과적 종양제거(surgical de-bulking)후 화학요법 약물로 치료될 때 불량한 예후를 갖는다(von Gruenigen V et al., *Cancer* 112: 2221-2227 (2008); Ayhan A et al., *Am J Obstet Gynecol* 196: 81 e81-86 (2007); Harry VN et al., *Obstet Gynecol Surv* 64: 548-560 (2009)). 따라서, 난소 암에 대한 더욱 효과적인 치료제를 위한 명백한 충족되지 않은 의학적 요구가 존재한다.
- [0009] 3가지 항-FOLR1 항체가 잠재적 항암 약물로서 시험되었다. 쥐 단일클론성 항체 Mov18과 Mov19는 1980년대 말에 분리되고(Miotti S et al., *Int J Cancer* 39: 297-303 (1987)), 표적 FOLR1로 확인되고(Coney LR et al., *Cancer Res* 51: 6125-6132 (1991)), 그리고 세포독성 리보솜-비활성화 단백질과의 접합체로서 항원-발현 암 세포를 제거하는 능력에 대해 전임상 연구에서 조사되었다(Conde FP et al., *Eur J Biochem* 178: 795-802 (1989)).
- [0010] Mov19는 세포독성 T 세포 및 자연 킬러 세포를 표적으로 하는 이중-특이적 항체로서 시험되고(Mezzanzanica D et al., *Int J Cancer* 41: 609-615 (1988); Ferrini S et al., *Int J Cancer Suppl* 4: 53-55 (1989); Ferrini S et al., *Int J 암* 48: 227-233 (1991)), 그리고 생체내에서 Mov19의 단일-사슬 Fv(scFv)와 인터류킨-2의 융합 단백질로서 시험되었다(Melani C et al., *Cancer Res* 58: 4146-4154 (1998)). 키메라(쥐 가변/인간 불변) 항-FOLR1 항체 Mov18과 Mov19는 시험관내에서 FOLR1-발현 종양 세포의 세포독성 면역 세포-의존성 사멸을 매개하는 능력에 대해 전임상적으로 조사되고(Coney LR et al., *Cancer Res* 54: 2448-2455 (1994)), 그리고 키메라 Mov18-IgE는 IgE-의존성 면역요법 전임상 모형에서 조사되었다(Karagiannis SN et al., *J Immunol* 179: 2832-2843 (2007); Gould HJ et al., *Eur J Immunol* 29: 3527-3537 (1999)).
- [0011] Mov18는 전임상 연구에서, 그리고 이후, 1990년대 초 임상 시험에서 다양한 방사성핵종(radionuclide)과의 접합체 형태로 조사되었는데(Zacchetti A et al., *Nucl Med Biol* 36: 759-770 (2009)), 이들은 임상적 이용을 위해 승인된 어떠한 약물도 없이 종결되었다.
- [0012] 쥐 단일클론성 항-FOLR1 항체 LK26의 인간화된 형태인 MORAb003은 비-변형된 항체(Ebel W et al., *Cancer Immun* 7:6 (2007))로서 및 ¹¹¹In 방사성핵종과의 접합체(Smith-Jones PM et al., *Nucl Med Biol* 35: 343-351 (2008))로서 전임상적으로 평가되고, 그리고 현재, 비-변형된 항체로서 임상 시험 중에 있다(D. K. Armstrong et al. *J. Clin. Oncol.* 26: 2008, May 20 suppl; abstract 5500).

발명의 내용

[0013]

본 발명의 요약

[0014]

본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 결합하는 신규한 항체, 이들 항체를 포함하는 면역접합체, 그리고 이들의 이용 방법을 제시한다. 게다가, 본 발명은 신규한 폴리펩티드, 예를 들면, 인간 엽산염 수용체 1에 결합하는 항체, 이런 항체의 단편, 그리고 이런 항체와 연관된 다른 폴리펩티드를 제시한다. 또한, 이들 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제시되고, 이들 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 역시 제공된다. 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포가 추가로 제시된다. 신규한 엽산염 수용체 1 항체 또는 면역접합체를 포함하는 조성물(가령, 약제학적 조성물) 역시 제시된다. 그 외에도, 신규한 엽산염 수용체 1 항체 또는 면역접합체를 만들고 이용하는 방법, 예를 들면, 종양 성장을 억제하고 및/또는 암을 치료하기 위해 신규한 엽산염 수용체 1 항체 또는 면역접합체를 이용하는 방법 역시 제시된다.

[0015]

따라서, 한 양태에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) GYFMN(SEQ ID NO:1)을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃(SEQ ID NO:56)을 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 YDGSRAMDY(SEQ ID NO:3)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7)를 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA(SEQ ID NO:8)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSREYPYT(SEQ ID NO:9)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하고; 여기서 Xaa₁은 K, Q, H, 그리고 R에서 선택되고; Xaa₂는 Q, H, N, 그리고 R에서 선택되고; 그리고 Xaa₃은 G, E, T, S, A, 그리고 V에서 선택된다. 일정한 구체예에서, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 키메라 Mov19과 실질적으로 동일한 친화성으로 인간 엽산염 수용체 1에 결합한다. 일정한 구체예에서, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 CDR2 서열 RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:2)를 포함한다.

[0016]

일정한 구체예에서, 결합 친화성은 유세포분석법, Biacore, 또는 방사면역분석법에 의해 측정된다.

[0017]

다른 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) GYFMN(SEQ ID NO:1)을 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:2)를 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 그리고 YDGSRAMDY(SEQ ID NO:3)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 (b) KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; RASNLEA(SEQ ID NO:8)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 그리고 QQSREYPYT(SEQ ID NO:9)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함한다.

[0018]

일정한 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:6의 중쇄를 포함하는 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시한다. 다른 구체예에서, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2010년 4월 7일자에 ATCC에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 PTA-10772, PTA-10773 또는 10774를 갖는 플라스미드 DNA에 의해 암호화된다.

[0019]

일정한 구체예에서, 본 발명은 FOLR1에 결합에 대해, 하기를 포함하는 항체와 경쟁하는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시한다: (a) GYFMN(SEQ ID NO:1)을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃(SEQ ID NO:56)을 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 YDGSRAMDY(SEQ ID NO:3)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7)를 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA(SEQ ID NO:8)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSREYPYT(SEQ ID NO:9)를 포함하는 경쇄 CDR3; 여기서 Xaa₁은 K, Q, H, 그리고 R에서 선택되고; Xaa₂는 Q, H, N, 그리고 R에서 선택되고; 그리고 Xaa₃은 G, E, T, S, A, 그리고 V에서 선택된다. 일정한 구체예에서, 인간화된 항체는 중쇄 CDR2 서열 RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:2)를 포함한다.

[0020]

일정한 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:4에 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11에 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드, 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시한다. 다른 구체예에서, 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:4에 적어도 약 95% 동일한 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11에 적어도 약 95% 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 인간화된 항체는 SEQ ID NO:4에 적어도 약 99% 동일한 중쇄 가변

도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11에 적어도 약 99% 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일정한 구체예에서, 인간화된 항체는 SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일정한 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 88-119에 적어도 약 90% 동일한 폴리펩티드, 항체, 또는 항원 결합 단편을 제시한다. 일정한 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 88-119에 적어도 약 95% 동일한 폴리펩티드, 항체, 또는 항원 결합 단편을 제시한다. 일정한 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 88-119에 적어도 약 99% 동일한 폴리펩티드, 항체, 또는 항원 결합 단편을 제시한다.

[0021] 일정한 구체예에서, 본 발명은 진핵 세포에서 chMov19보다 적어도 10-배 높게 발현되는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시한다. 일정한 구체예에서, 진핵 세포는 HEK-293T 세포이다.

[0022] 일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) SSGMS(SEQ ID NO:30)를 포함하는 중쇄 CDR1; TISSGGSYTY(SEQ ID NO:31)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 DGEGLYAMDY(SEQ ID NO:32)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) KASDHINNWL(SEQ ID NO:27)를 포함하는 경쇄 CDR1; GATSLET(SEQ ID NO:28)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQWSTPFT(SEQ ID NO:29)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) TNYWMQ(SEQ ID NO:60)를 포함하는 중쇄 CDR1; AIYPGNGDSR(SEQ ID NO:61)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 RDGNAAAY(SEQ ID NO:62)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) RASENIYSNLA(SEQ ID NO:57)를 포함하는 경쇄 CDR1; AATNLAD(SEQ ID NO:58)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QHFWASPYT(SEQ ID NO:59)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) TNYWMY(SEQ ID NO:66)를 포함하는 중쇄 CDR1; AIYPGNSDTT(SEQ ID NO:67)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 RHDYGAMDY(SEQ ID NO:68)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) RASENIYTNL(SEQ ID NO:63)를 포함하는 경쇄 CDR1; TASNLA(SEQ ID NO:64)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QHFWVSPYT(SEQ ID NO:65)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) SSFGMH(SEQ ID NO:72)를 포함하는 중쇄 CDR1; YISSGSSTIS(SEQ ID NO:73)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 EAYGSSMEY(SEQ ID NO:74)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) RASQNNNLH(SEQ ID NO:69)를 포함하는 경쇄 CDR1; YVSQSVS(SEQ ID NO:70)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSNSWPHYT(SEQ ID NO:71)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) TSYTMH(SEQ ID NO:78)를 포함하는 중쇄 CDR1; YINPISGYTN(SEQ ID NO:79)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 GGAYGRKPMY(SEQ ID NO:80)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) KASQNVGPNA(SEQ ID NO:75)를 포함하는 경쇄 CDR1; SASYRYS(SEQ ID NO:76)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQYNSPYT(SEQ ID NO:77)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다.

[0023] 일정한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 전장(full length) 항체 또는 항원 결합 단편이다. 일정한 구체예에서, 이들 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 이황화 연결된 Fv, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디(intrabody), IgG-CH₂, 미니바디(minibody), F(ab')₃, 테트라바디(tetrabody), 트리아바디(triabody), 디아바디(diabody), 단일-도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂, 또는 scFv-Fc이다.

[0024] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드는 약 1.0 내지 약 10 nM의 K_d로 인간 엽산염 수용체 1에 결합한다. 한 구체예에서, 항체 또는 폴리펩티드는 약 1.0 nM 또는 그 이상의 K_d로 인간 엽산염 수용체 1에 결합한다. 일정한 구체예에서, 결합 친화성은 유세포분석법, Biacore, 또는 방사면역분석법에 의해 측정된다.

[0025] 본 발명은 또한, 본 발명의 항체를 만드는 방법을 제시하고, 상기 방법은 (a) 상기 항체를 발현하는 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포로부터 항체를 분리하는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, 세포는 진핵 세포이다.

[0026] 본 발명은 또한, 일반식 (A) - (L) - (C)을 가지는 면역접합체를 제시하고, 여기서: (A)는 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편 또는 폴리펩티드; (L)는 링커이고; 그리고 (C)는 세포독성제이고, 여기서 상기 링커 (L)는 (A)를 (C)에 연결한다.

[0027] 한 구체예에서, 링커는 절단성 링커, 비-절단성 링커, 친수성 링커, 그리고 디카르복실산 기초된 링커로 구성된 군에서 선택된다. 다른 구체예에서, 링커는 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP) 또는 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트(설포(sulfo)-SPP); N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB) 또는 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트(설포-SPDB); N-숙신이미딜 4-(말레이미도메

틸) 시클로헥산카르복실레이트(SMCC); *N*-설포숙신이미딜 4-(말레이미도메틸) 시클로헥산카르복실레이트(설포-SMCC); *N*-숙신이미딜-4-(요오드아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB); 그리고 *N*-숙신이미딜-[(*N*-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글리콜] 에스테르(NHS-PEG4-말레이미드)로 구성된 군에서 선택된다. 일정한 구체예에서, 링커는 *N*-숙신이미딜-[(*N*-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글리콜] 에스테르(NHS-PEG4-말레이미드)이다.

[0028] 한 구체예에서, 면역접합체는 메이탄시노이드, 메이탄시노이드 유사체, 벤조디아제핀(benzodiazepine), 톡소이드(taxoid), CC-1065, CC-1065 유사체, 듀오카르마이신(duocarmycin), 듀오카르마이신 유사체, 칼리키아미신(calicheamicin), 돌라스타틴(dolastatin), 돌라스타틴 유사체, 아리스타틴(aristatin), 토메이마이신(tomaymycin) 유도체, 그리고 렙토마이신(leptomycin) 유도체 또는 상기 작용제의 전구약물로 구성된 군에서 선택되는 세포독성제를 포함한다. 추가의 구체예에서, 세포독성제는 메이탄시노이드이다. 다른 구체예에서, 세포독성제는 N(2')-테아세틸-N(2')-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신(DM1) 또는 N(2')-테아세틸-N2-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신(DM4)이다.

[0029] 한 구체예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 면역접합체를 제시한다: (A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) *N*-숙신이미딜-[(*N*-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글리콜] 에스테르(NHS-PEG4-말레이미드); 그리고 (C) N(2')-테아세틸-N2-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결한다.

[0030] 한 구체예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 면역접합체를 제시한다: (A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB); 그리고 (C) N(2')-테아세틸-N2-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결한다.

[0031] 한 구체예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 면역접합체를 제시한다: (A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)2-설포부타노에이트(설포-SPDB); 그리고 (C) N(2')-테아세틸-N2-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결한다.

[0032] 한 구체예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 면역접합체를 제시한다: (A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트(설포-SPP); 그리고 (C) N(2')-테아세틸-N(2')-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결한다.

[0033] 한 구체예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 면역접합체를 제시한다: (A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP); 그리고 (C) N(2')-테아세틸-N(2')-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결한다.

[0034] 본 발명은 또한, 본 발명의 항체, 항원 결합 단편, 폴리펩티드 또는 면역접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제시한다. 일정한 구체예에서, 약제학적 조성물은 2차 항암제를 더욱 포함한다.

[0035] 본 발명은 또한, 표지된 본 발명의 항체, 항원 결합 단편, 폴리펩티드 또는 면역접합체를 포함하는 진단 시약을 제시한다. 한 구체예에서, 표지는 방사성표지, 형광단(fluorophore), 발색단(chromophore), 영상화제 및 금속이온으로 구성된 군에서 선택된다.

[0036] 본 발명은 또한, 본 발명의 항체, 항원 결합 단편, 폴리펩티드 또는 면역접합체를 포함하는 키트를 제시한다.

[0037] 본 발명은 또한, 본 발명의 항체, 항원 결합 단편, 폴리펩티드, 면역접합체 또는 약제학적 조성물의 치료 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 종양 성장을 억제하는 방법을 제시한다.

[0038] 일정한 구체예에서, 본 발명은 화학식 (A) - (L) - (C)를 갖는 면역접합체의 치료 효과량을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 종양 성장을 억제하는 방법을 제시하고, 여기서 (A)는 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고; (L)은 링커이고; 그리고 (C)는 메이탄시노이드와 메이탄시노이드 유사체로 구성된 군에서 선택되는 세포독소이고; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결하고, 그리고 여기서 면역접합체는 KB 이종이식편 모형에서 평균 종양 체적을 적어도 2배 감소시킨다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 (a) GYFMN(SEQ ID NO:1)을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDTFYNQXaa1FXaa2Xaa3(SEQ ID NO:56)을 포함하는 중쇄 CDR2;

그리고 YDGSRAMDY(SEQ ID NO:3)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7)를 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA(SEQ ID NO:8)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSREYPYT(SEQ ID NO:9)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하고; 여기서 Xaa₁은 K, Q, H, 그리고 R에서 선택되고; Xaa₂는 Q, H, N, 그리고 R에서 선택되고; 그리고 Xaa₃은 G, E, T, S, A, 그리고 V에서 선택된다. 다른 구체예에서, 항체는 RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:2)를 포함하는 중쇄 CDR2를 포함한다.

[0039] 일정한 구체예에서, 본 발명은 2010년 4월 7일자에 ATCC에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 PTA-10772, PTA-10773 또는 10774를 갖는 플라스미드 DNA에 의해 암호화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는, 종양 성장을 억제하는 방법을 제시한다.

[0040] 다른 구체예에서, 상기 방법은 SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) N-숙신이미딜-[(N-말레이미도프로피온아미도)-테트라에틸렌글리콜] 에스테르(NHS-PEG4-말레이미드); 그리고 (C) N(2')-데아세틸-N2-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신을 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0041] 다른 구체예에서, 상기 방법은 (A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB); 그리고 (C) N(2')-데아세틸-N2-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신을 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하고; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결한다.

[0042] 다른 구체예에서, 상기 방법은 (A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)2-설포부타노에이트(설포-SPDB); 그리고 (C) N(2')-데아세틸-N2-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신을 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하고; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결한다.

[0043] 다른 구체예에서, 상기 방법은 (A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-2-설포펜타노에이트(설포-SPP); 그리고 (C) N(2')-데아세틸-N(2')-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신을 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하고; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결한다.

[0044] 다른 구체예에서, 상기 방법은 (A) SEQ ID NO:4의 중쇄 가변 도메인, 그리고 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화된 항체; (L) N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP); 그리고 (C) N(2')-데아세틸-N(2')-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신을 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하고; 여기서 (L)은 (A)를 (C)에 연결한다.

[0045] 다른 구체예에서, 상기 방법은 2010년 4월 7일자에 ATCC에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 PTA-10775와 PTA-10776을 갖는 항체 huFR1-21을 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, huFR1-21 항체는 (a) SSYGMS(SEQ ID NO:30)를 포함하는 중쇄 CDR1; TISSGGSYTY(SEQ ID NO:31)를 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 DGEGLYAMDY(SEQ ID NO:32)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) KASDHINNWLA(SEQ ID NO:27)를 포함하는 경쇄 CDR1; GATSLET(SEQ ID NO:28)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQYWSPTFT(SEQ ID NO:29)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 (a) TNYWMQ(SEQ ID NO:60)를 포함하는 중쇄 CDR1; AIYPGNGDSR(SEQ ID NO:61)을 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 RDGNYAAY(SEQ ID NO:62)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) RASENIYSNLA(SEQ ID NO:57)를 포함하는 경쇄 CDR1; AATNLAD(SEQ ID NO:58)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QHFWASPYT(SEQ ID NO:59)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 huFR1-48 항체를 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 (a) TNYWMY(SEQ ID NO:66)를 포함하는 중쇄 CDR1; AIYPGNSDTT(SEQ ID NO:67)를 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 RHDYGAMDY(SEQ ID NO:68)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) RASENIYTNL(SEQ ID NO:63)를 포함하는 경쇄 CDR1; TASNLA(SEQ ID NO:64)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QHFWVSPYT(SEQ ID NO:65)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 huFR1-49 항체를 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 (a) SSFGMH(SEQ ID NO:72)를 포함하는 중쇄 CDR1; YISSGSSITIS(SEQ ID NO:73)를 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 EAYGSSMEY(SEQ ID NO:74)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) RASQNNNLH(SEQ ID NO:69)를 포함하는 경쇄 CDR1; YVSQSVS(SEQ ID NO:70)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSNSWPHYT(SEQ ID NO:71)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 huFR1-57 항체를 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 (a) TSYTMH(SEQ ID NO:78)를 포함하는 중쇄 CDR1; YINPISGYTN(SEQ ID NO:79)을 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 GGAYGRKPMYD(SEQ ID NO:80)를 포함하는 중쇄 CDR3;

그리고 (b) KASQNVGPVNA(SEQ ID NO:75)를 포함하는 경쇄 CDR1; SASYRYS(SEQ ID NO:76)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQYNSYPYT(SEQ ID NO:77)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 huFR1-65 항체를 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0046]

한 구체예에서, 상기 방법은 난소 종양, 뇌 종양, 유방 종양, 자궁 종양, 자궁내막 종양, 췌장 종양, 신장 종양, 또는 폐 종양 성장을 억제한다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 난소 종양 성장을 억제한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 폐 종양 성장을 억제한다. 일정한 구체예에서, 종양 성장 억제는 암을 치료하는데 이용된다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 2차 항암제를 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, 2차 항암제는 화학치료제이다.

[0047]

본 발명은 또한, 본 발명의 항체, 항원 결합 단편, 또는 폴리펩티드를 생산하는 분리된 세포를 제시한다.

[0048]

본 발명은 또한, SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48, 그리고 120-127로 구성된 군에서 선택되는 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제시한다. 일정한 구체예에서, 분리된 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48, 그리고 120-127로 구성된 군에서 선택되는 서열에 적어도 95% 동일하다. 다른 구체예에서, 분리된 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48, 그리고 120-127로 구성된 군에서 선택되는 서열에 적어도 99% 동일하다. 본 발명은 또한, SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48, 그리고 120-127의 폴리뉴클레오티드 중에서 한 가지를 포함하는 벡터를 제시한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48, 그리고 120-127의 폴리뉴클레오티드를 내포하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0049]

도 1. 쥐(muMov19)와 인간화된(huMov19) Mov19에 대한 표면 잔기. (A) 쥐와 인간화된 Mov19 경쇄 표면 잔기. 쥐와 인간화된 Mov19 경쇄 가변 영역 프레임 표면 잔기와 위치 번호(Kabat 시스템)가 제공된다. 본래 쥐 서열과 상이한 인간 잔기는 밑줄로 표시된다. *위치 74는 표면 위치에 있지 않지만, 이형 1.00에서 공통 N-연결된 당화 부위를 제거하기 위해, 상기 위치가 트레오닌(상기 위치에서 가장 일반적인 인간 잔기)으로 교체되어, 이형 1.60이 산출된다. (B) 쥐와 인간 Mov19 중쇄 표면 잔기. 쥐와 인간화된 Mov19 중쇄 가변 영역 프레임 표면 잔기와 위치 번호(Kabat 시스템)가 제공된다. 본래 쥐 서열과 상이한 인간 잔기는 밑줄로 표시된다. 유사한 표면 잔기가 FR1-21 (C)와 (D)에 대해 제공된다.

도 2. 키메라 Mov19와 huMov19 중쇄와 경쇄 가변 도메인 및 muFR1-21과 huFR1-21 중쇄와 경쇄 가변 도메인의 배열. 쥐 대응물과 함께 Mov19와 Fr1-21 가변 영역에 대한 재표면처리(resurfacing)된 서열의 배열. A)와 C) 경쇄 가변 도메인; B)와 D) 중쇄 가변 도메인. 대시 "-"는 쥐 서열과 동일함을 나타낸다. 이들 CDR(Kabat 정의)은 밑줄로 표시된다.

도 3. HEK 세포에서 키메라 Mov19와 huMov19의 발현. 키메라와 인간 Mov19 발현 플라스미드는 현탁 HEK293-T 세포 내로 일시적으로 형질감염되고, 7일후 수확되고, 그리고 발현된 항체가 정량적 ELISA에 의해 결정되었다. 경쇄와 중쇄 플라스미드는 3:1 또는 6:1 개별 몰 비율(respective molar ratio)로 형질감염되었다.

도 4. FOLR1-발현 300-19 세포에 대한 결합으로 검출되는, 항-FOLR1 항체의 결합 특이성. 유세포분석에 의한 300-19-FOLR1 세포에 huMov19의 결합. FOLR1을 발현하는 300-19 부모 세포. 회색 일색 명암은 세포 자기 형광(cellular auto fluorescence)을 나타낸다; 검은색 점선은 FITC에 접합된 항-인간 이차 항체와 함께 배양된 세포를 나타낸다; 검은색 실선은 huMov-19 항체 및 FITC에 접합된 항-인간 이차 항체와 함께 배양된 세포를 나타낸다.

도 5. 항-FOLR1 항체 및 면역접합체의 결합 친화성과 시험관내 세포독성 활성. huMov19 및 다양한 쥐와 인간화된 FR-1 항체의 결합 친화성은 SKOV3 세포에서 측정되었다. 이들 열거된 항체의 PEG4-Ma1-DM4 접합체의 시험관내 세포독성 활성 역시 평가되었다.

도 6. 면역접합체의 항체-의존성 세포 세포독성. huMov19, huFR1-21, 그리고 Mor003의 ADCC 활성은 Igrov1 세포에서 평가되었다. Igrov 1은 1:4의 15000개 세포/웰 표적:NK 세포 비율로 배양되었다.

도 7. KB 세포에 대한 huFR1-21-PEG4-mal-DM4와 huMov19-PEG4-mal-DM4의 연속 노출의 세포독성 활성. 과잉의 비-접합된 항체는 그들이 KB 세포의 존재에서 공동-배양될 때 면역접합체의 활성을 억제하였는데, 이것은 세포독성 활성이 항원-의존성임을 지시한다.

도 8. KB 이종이식편 모형에서 huMov19-표적화된 접합체의 생체내 효능. 비-FOLR1-표적화 huC242-SPDB-DM4(D)와 비교하여 FOLR1-표적화 절단성 접합체 huMov19-SPDB-DM4 (B), 그리고 비-표적화 huC242-PEG4Mal-DM4(E)와 비교하여 비-절단성 접합체 huMov19-PEG4-Mal-DM4 (C)는 SCID 마우스 내로 피하 이식된 KB 세포의 확립된 이종이식편 모형을 사용하여 조사되었다. huMov19에 의한 FOLR1의 표적화는 평균 종양 체적에서 유의미한 감소를 유발하였다.

도 9. KB 이종이식편 모형에서 쥐 FR-1 항-FOLR1 항체와 비교하여 huMov19-PEG4-Mal-DM4의 생체내 효능. 접합되지 않거나, 또는 PEG4-Mal-DM4에 접합된 FR-1 일련 항체는 KB 이종이식편 종양 모형에서 huMov19-PEG4-Mal-DM4와 비교하여 평균 종양 체적을 감소시키는 능력에 대해 조사되었다. (A) FR-1-9, (B) FR-1-13, (C) FR-1-22, 그리고 (D) FR-1-23.

도 10. KB 이종이식편 모형에서 huMov19-PEG4-Mal-DM4와 huFR1-21-PEG4-Mal-DM4의 생체내 효능. 접종후 6일자에 huMov19-PEG4-Mal-DM4와 huFR1-21-PEG4-Mal-DM4의 10 mg/kg 단일 주사가 수행되었다. huMov19-PEG4-Mal-DM4와 huFR1-21-PEG4-Mal-DM4는 평균 종양 체적에서 유의미한 감소를 보였다. "평균 TV"는 평균 종양 체적을 가리킨다.

도 11. HuMov19-PEG4-mal-DM4는 KB 이종이식편 모형에서 용량 의존성 활성을 보인다. 상기 면역접합체의 용량 의존성 활성은 조사된 용량 범위 전역에서 평가되었다. 주1회 투약은 항-종양 활성의 향상을 유발하였다. 높은 약물 로드(drug load)는 10 mg/kg 용량 그룹에서 활성을 단지 약간 향상시켰고, 더욱 적은 용량 그룹에서는 활성이 감소하였다. 3.7 DAR은 항체당 3.7개 약물 분자를 가리킨다.

도 12. 다양한 링커로 DM1과 DM4에 접합된 huMov19의 생체내 효능. huMov19는 항체당 3.9개 약물 분자로 SMCC-DM1; 항체당 3.7개 약물 분자로 설폰-mal-DM4 (B); 그리고 항체당 8.23개 약물 분자로 설폰-mal-DM4 (C)에 접합되고, 그리고 huMov19-PEG4-mal-DM4와 비교하여, 다양한 농도에서 평균 종양 체적을 감소시키는 능력에 대해 평가되었다.

도 13. 다양한 링커로 DM1과 DM4에 접합된 huMov19의 생체내 효능. huMov19는 항체당 4.3개 약물 분자로 SPP-DM1; 항체당 3.8개 약물 분자로 설폰-SPDB-DM4; 항체당 3.8개 약물 분자로 SPDB-DM4; 그리고 항체당 6.8개 약물 분자로 설폰-SPDB-DM4에 접합되고, 그리고 평균 종양 체적을 감소시키는 능력에 대해 평가되었다. 마우스는 앞서 열거된 접합체 중에서 한 가지의 5 mg/kg(A)과 2.5 mg/kg(B), 또는 PBS 단독으로 치료되었다.

도 14. OVCAR-3 이종이식편 종양 모형에서 huMov19-설폰-SPDB-DM4의 생체내 효능. 마우스는 25, 50, 또는 100 µg/kg의 huMov19-설폰-SPDB-DM4, 또는 PBS 단독으로 치료되었다.

도 15. IGROV-1 이종이식편 종양 모형에서 huMov19-설폰-SPDB-DM4의 생체내 효능. 마우스는 25, 50, 또는 100 µg/kg의 huMov19-설폰-SPDB-DM4, 또는 PBS 단독으로 치료되었다.

도 16. OV-90 이종이식편 종양 모형에서 huMov19-설폰-SPDB-DM4의 생체내 효능. 마우스는 25, 50, 또는 100 µg/kg의 huMov19-설폰-SPDB-DM4, 또는 PBS 단독으로 치료되었다.

도 17. KB 이종이식편 모형에서 면역접합체의 효능에 대한 절단성과 비-절단성 링커의 효과.

도 18. (A) KB 이종이식편 모형 및 (B) OVCAR-3 이종이식편 모형에서 면역접합체의 효능에 대한 절단성 링커의 효과.

도 19. KB와 이종이식편 종양 모형에서 huFR1-48, huFR1-49, huFR1-57, 그리고 huFR1-65-SMCC-DM1의 시험관내와 생체내 효능. 마우스는 200 µg/kg 단일 복용량으로 치료되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 본 발명의 상세한 설명

[0051] 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1(FOLR1)에 결합하는 항체와 면역접합체와 같은 폴리펩티드가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 신규한 작용제를 제시한다. 관련된 폴리펩티드와 폴리뉴클레오티드, FOLR1-결합 작용제를 포함하는 조성물, 그리고 FOLR1-결합 작용제를 만드는 방법 역시 제시된다. 신규한 FOLR1-결합 작용제를 이용하는 방법, 예를 들면, 종양 성장을 억제하고 및/또는 암을 치료하는 방법이 더욱 제시된다.

[0052]

I. 정의

[0053]

본 발명의 이해를 촉진하기 위해, 다수의 용어 및 구문이 하기에 정의된다.

[0054]

본 명세서에 사용된 용어 "인간 염산염 수용체 1" 또는 "FOLR1"은 달리 명시되지 않으면, 임의의 자연적인 FOLR1을 가리킨다. 용어 "FOLR1"은 "전장(full-length)", 가공되지 않은 FOLR1, 그리고 세포 내에서 가공으로 야기된 임의의 형태의 FOLR1을 포괄한다. 상기 용어는 또한, FOLR1의 자연발생적인 변이체, 예를 들면, 스플라이스 변이체(splice variant), 대립유전자 변이체(allelic variant), 그리고 동종체(isoform)를 포괄한다. 본 명세서에 기술된 FOLR1 폴리펩티드는 다양한 원천으로부터, 예를 들면, 인간 조직형 또는 다른 원천으로부터 분리될 수 있거나, 또는 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. FOLR1 서열의 예는 NCBI 참고 번호 P15328, NP_001092242.1, AAX29268.1, AAX37119.1, NP_057937.1, 그리고 NP_057936.1를 포함하지만 이들에 제한되지 않는다.

[0055]

용어 "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내에 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통해 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 또는 상이한 것들의 조합과 같은 표적을 인식하고 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 본 명세서에 사용된 용어 "항체"는 온전한(intact) 다중클론성 항체, 온전한 단일클론성 항체, 항체 단편(가령, Fab, Fab', F(ab')₂, 그리고 Fv 단편), 단일 사슬 Fv (scFv) 돌연변이체, 다중특이성 항체, 예를 들면, 적어도 2가지 온전한 항체로부터 생성된 이특이성(bispecific) 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체의 항원 결정 부분을 포함하는 융합 단백질, 그리고 항체가 바람직한 생물학적 활성을 나타내기만 하면 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자를 포괄한다. 항체는 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마, 그리고 뮤(mu)로 지정되는 그들의 중쇄 불변 도메인의 정체에 기초하여, 면역글로불린의 5가지 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG, 그리고 IgM 또는 이들의 하위 부류(동형)(가령, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 중에서 어느 하나일 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린은 상이하고 널리 공지된 서브유닛 구조 및 3-차원 배치를 갖는다. 항체는 나신이거나, 또는 독소(toxin), 방사성동위원소(radioisotope) 등과 같은 다른 분자에 접합될 수 있다.

[0056]

"차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 이것이 결합하는 항원, 예를 들면, FOLR1의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 일정한 구체예에서, 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 바람직하게는, 생물학적 활성은 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 100% 감소될 수 있다.

[0057]

용어 "항-FOLR1 항체" 또는 "FOLR1에 결합하는 항체"는 충분한 친화성을 가지고 FOLR1에 결합할 수 있어서, FOLR1를 표적화하는데 진단제 및/또는 치료제로서 유용한 항체를 가리킨다. 항-FOLR1 항체가 관련없는, 비-FOLR1 단백질에 결합하는 정도는 예컨대, 방사면역분석법(radioimmunoassay, RIA)에 의한 측정에서 FOLR1에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 일정한 구체예에서, FOLR1에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 의 해리상수(dissociation constant, K_d)를 갖는다.

[0058]

용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부분을 가리키며 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 가리킨다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 그리고 Fv 단편, 선형 항체, 단일 사슬 항체, 그리고 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함하지만 이들에 제한되지 않는다.

[0059]

"단일클론성 항체"는 단일 항원 결정기, 또는 에피토프의 고도로 특이적인 인식 및 결합에 관여하는 동종 항체 집단을 가리킨다. 이는 전형적으로, 상이한 항원 결정기에 대해 지향성인 상이한 항체를 포함하는 다중클론성 항체와 대조적이다. 용어 "단일클론성 항체"는 온전한 전장 단일클론성 항체는 물론이고 항체 단편(가령 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬(scFv) 돌연변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 그리고 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자를 포괄한다. 더욱이, "단일클론성 항체"는 하이브리도마, 파지 선별(phage selection), 재조합 발현, 그리고 형질전환 동물을 포함하지만 이들에 제한되지 않는 수많은 방식으로 만들어진 이런 항체를 가리킨다.

[0060]

용어 "인간화 항체"는 최소의 비-인간(가령, 쥐) 서열을 내포하는 특정 면역글로불린 사슬, 키메라 면역글로불린, 또는 이들의 단편인 비-인간(가령, 쥐) 항체의 형태를 가리킨다. 전형적으로, 인간화 항체는 상보성 결정 영역(complementary determining region, CDR)으로부터의 잔기가 바람직한 특이성, 친화성 및 능력을 가지는 비-인간 중(가령, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터)의 CDR로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린이다(Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536). 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(framework region, FR) 잔기

는 바람직한 특이성, 친화성 및 능력을 가지는 비-인간 종으로부터인 항체 내의 상응하는 잔기로 대체된다. 인간화 항체는 항체 특이성, 친화성, 및/또는 능력을 개선하고 최적화하기 위해 Fv 프레임워크 영역에서 및/또는 대체된 비-인간 잔기 내에 추가적인 잔기의 치환에 의해 추가로 변형될 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 면역글로불린에 상응하는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역을 내포하는 적어도 하나, 그리고 전형적으로 2개 또는 3개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하는 반면, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 컨센서스(consensus) 서열에 해당한다. 인간화 항체는 또한, 전형적으로 인간 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc)의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 인간화 항체를 생성하기 위해 사용된 방법의 예는 미국 특허 제5,225,539호 또는 제5,639,641호에 기술되어 있다.

[0061] 항체의 "가변 영역"은 단독이거나 조합된, 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 가리킨다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각, 극변 영역(hypervariable region)으로 공지된 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역(FR)으로 이루어진다. 각 사슬내 CDR은 FR에 의해 아주 근접하게 연결되고, 그리고 다른 사슬로부터의 CDR과 함께, 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 적어도 두 가지 기술이 존재한다: (1) 중간(cross-species) 서열 가변성을 기초로 한 접근법(즉, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구를 기초로 한 접근법(Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). 그 외에도, 이들 두 접근법의 조합이 일부 경우에 당해 분야에서 CDR을 측정하기 위해 사용된다.

[0062] 카바트 번호부여 시스템(Kabat numbering system)은 일반적으로, 가변 도메인 내 잔기(대략적으로, 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 지칭할 때 사용된다(가령, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0063] 카바트식의 아미노산 위치 번호부여는 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)에서 항체의 모음의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용되는 번호부여 시스템을 가리킨다. 상기 번호부여 시스템을 사용하여, 실제의 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 축소 또는 삽입에 상응하는 더욱 적거나 추가적인 아미노산을 내포할 수 있다. 가령, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 뒤에 단일 아미노산 삽입체(insert)(카바트식에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 뒤에 삽입된 잔기(가령, 카바트식에 따른 잔기 82a, 82b, 그리고 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트식 번호부여는 소정의 항체에 대해서, "표준" 카바트 번호 서열로 항체 서열의 상동성 영역에서 정렬에 의해 결정될 수 있다. 초티아(Chothia) 식은 그 대신에, 구조적인 루프(loop)의 위치를 가리킨다(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). 카바트식 번호부여 방식을 이용하여 번호를 매길 경우 초티아 CDR-H1 루프의 말단은 루프의 길이에 따라 H32 및 H34 사이에서 달라진다(이는 카바트식 번호부여 양식이 H35A 및 H35B에 삽입을 배치하기 때문이다; 35A와 35B 둘 모두 부재할 경우, 상기 루프는 32에서 끝난다; 35A만이 존재하는 경우, 상기 루프는 33에서 끝난다; 35A 및 35B 둘 모두 존재하는 경우, 상기 루프는 34에서 끝난다). AbM 극변 영역은 카바트 CDR 및 초티아 구조 루프 간의 타협점을 제시하며, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어(Oxford Molecular's AbM antibody modeling software)에 의해 사용된다.

루프	카바트식	AbM	초티아식
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32...34 (카바트 번호부여)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32 (초티아 번호부여)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0064]

[0065] 용어 "인간 항체"는 인간에 의해 생산된 항체 또는 당해 분야에 공지된 임의의 기술을 사용하여 만들어진, 인간에 의해 생산된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 가지는 항체를 의미한다. 인간 항체의 이러한 정의는 온전한

또는 전장 항체, 이의 단편, 및/또는 예로써, 쥐의 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체와 같은 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함한다.

[0066] 용어 "키메라 항체"는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 두 개 이상의 종으로부터 유래된 항체를 가리킨다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄 모두의 가변 영역은 바람직한 특이성, 친화성, 그리고 능력을 가지는 포유류(가령, 마우스, 래트, 토끼 등) 중 한 종으로부터 유래된 항체의 가변 영역에 상응하는 반면, 불변 영역은 또 다른 종(대개는 인간)에서의 면역 반응 유발을 방지하기 위해 상기 종으로부터 유래된 항체의 서열에 상동적이다.

[0067] 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정기"는 본 명세서에 상호교환적으로 사용되며 특정 항체가 인식하고 특정하게 결합할 수 있는 항원의 부분을 가리킨다. 항원이 폴리펩티드인 경우, 에피토프는 단백질의 3차원 접힘(tertiary folding)에 의해 나란히 배치된 근접 아미노산 및 비-근접 아미노산 둘 모두로부터 형성될 수 있다. 근접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 변성시 유지되는 반면, 3차원 접힘으로 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 변성시 사라진다. 에피토프는 독특한 공간적 구성에서 아미노산을 전형적으로 적어도 3개, 더욱 일반적으로는, 적어도 5 또는 8-10개 포함한다.

[0068] "결합 친화성"은 일반적으로, 분자(가령, 항체)의 단일 결합 부위 및 이의 결합 상대(가령, 항원) 사이의 비공유적 상호작용의 총 합의 강도를 가리킨다. 달리 명시되지 않으면, 본 명세서에 사용된, "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원(가령, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유의 결합 친화성을 가리킨다. 상대 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로, 해리 상수(Kd)로 표현될 수 있다. 친화성은 본 명세서에 기술된 것을 비롯하여 당해 분야에 공지된 일반적인 방법으로 측정될 수 있다. 저-친화성 항체는 일반적으로, 항원에 느리게 결합하고 쉽게 분해되는 경향을 갖는 반면, 고-친화성 항체는 일반적으로, 항원에 더욱 빠르게 결합하고 결합을 더 오래 유지하는 경향을 갖는다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법이 당해 분야에 공지이며, 이들 중 임의의 하나가 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 특정한 예시적 구체예가 하기에 기술된다.

[0069] 본 명세서에서 결합 친화성을 가리키기 위해 사용된 "또는 그 이상"은 분자 및 이의 결합 상대 사이의 더욱 강한 결합을 가리킨다. 본 명세서에서 사용된 "또는 그 이상"은 더욱 적은 수치의 Kd 값으로 표현된 더욱 강한 결합을 가리킨다. 가령, 항원에 대해 "0.6 nM 또는 그 이상"의 친화성을 가지는 항체에서, 항원에 대한 항체의 친화성은 <0.6 nM, 즉, 0.59 nM, 0.58 nM, 0.57 nM 등이거나 0.6 nM 미만인 임의의 값이다.

[0070] 본 명세서에 사용된 문구 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 두 가지 수치 값(일반적으로, 하나는 본 발명의 항체와 관련되고 다른 하나는 기준/비교자(comparator) 항체와 관련됨) 사이에 충분히 높은 정도의 유사성을 의미하며, 따라서 당업자는 두 가지 값 사이의 차이를 상기 값(가령, Kd 값)으로 측정된 생물학적 특성의 맥락 내에서 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 없거나 없는 것으로 간주할 것이다. 상기 두 값 사이의 차이는 기준/비교자 항체에 대한 값의 함수로서 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 또는 약 10% 미만일 수 있다.

[0071] "분리된" 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물은 자연에서 발견되지 않는 형태인 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물이다. 분리된 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물은 더 이상 자연에서 발견되는 형태가 아닌 정도까지 정제된 것들을 포함한다. 일부 구체예에서, 분리된 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물은 실질적으로 순수하다.

[0072] 본 명세서에 사용된 "실질적으로 순수한"은 적어도 50% 순수(즉, 오염물질이 없음), 적어도 90% 순수, 적어도 95% 순수, 적어도 98% 순수, 또는 적어도 99% 순수한 물질을 가리킨다.

[0073] 본 명세서에 사용된 용어 "면역접합체(immunoconjugate)" 또는 "접합체(conjugate)"는 세포 결합제(즉, 항-FOLR1 항체 또는 이의 단편)에 연결된 화합물 또는 이의 유도체를 가리키고 다음의 일반식으로 정의된다: C-L-A, 여기서 C = 세포독소(cytotoxin), L = 링커, 그리고 A = 세포 결합제 또는 항-FOLR1 항체 또는 항체 단편. 면역접합체는 또한 역순으로 된 일반식: A-L-C로 정의될 수 있다.

[0074] "링커(linker)"는 화합물, 일반적으로는 메이탄시노이드와 같은 약물을 항 FOLR1 항체 또는 이의 단편과 같은 세포-결합제에 안정한, 공유적인 방식으로 연결시킬 수 있는 임의의 화학적 모이어티이다. 링커는 화합물 또는 항체가 활성으로 남는 조건하에서 산-유도성 절단, 광-유도성 절단, 펩티다제-유도성 절단, 에스테라아제-유도성 절단, 그리고 이황화 결합 절단에 취약하거나 실질적으로 저항성일 수 있다. 적절한 링커는 당해 분야에 공지이고 예로써, 이황화 기, 티오에테르 기, 산분해성(acid labile) 기, 광분해성(photolabile) 기, 펩티다제 분해성 기 및 에스테라아제 분해성 기를 포함한다. 링커는 또한, 본 명세서에 기술되고 당해 분야에 공지된 바와 같이 하전된 링커, 그리고 이의 친수성 형태를 포함한다.

- [0075] 용어 "암" 및 "암성(cancerous)"은 세포의 집단이 조절되지 않는 세포 성장으로 특징지어지는 포유류에서의 생리학적인 조건을 가리키거나 기술한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 그리고 백혈병을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다. 이런 암의 더욱 특정한 예는 편평 세포 암, 소세포 폐 암, 비-소세포 폐 암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막 암, 간세포 암, 위장 암, 췌장 암, 교아종, 자궁경부 암, 난소 암, 간 암, 방광 암, 간종양, 유방 암, 대장 암, 결장직장 암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장 암, 간 암, 전립선 암, 음문 암, 갑상선 암, 간 암종 및 다양한 유형의 두경부 암을 포함한다.
- [0076] "종양" 및 "신생물(neoplasm)"은 전-암성(pre-cancerous) 병변을 비롯하여 양성(비-암성) 또는 악성(암성)인 과도한 세포 성장 또는 증식으로 야기된 임의의 조직 덩어리를 가리킨다.
- [0077] 용어 "암 세포", "종양 세포" 및 문법적 등가어는 종양 세포 집단의 대부분(bulk)을 포함하는 비-종양원성 세포, 그리고 종양원성 줄기 세포(암 줄기 세포)를 모두 포함하는, 종양 또는 전-암성 병변에서 유래된 세포의 총 집단을 가리킨다. 본 명세서에 사용된 용어 "종양 세포"는 암 줄기 세포로부터 이들 종양 세포를 구분하기 위해 재생하고 분화하는 능력이 결여된 종양 세포만을 가리키는 경우 용어 "비-종양원"에 의해 수식될 것이다.
- [0078] 용어 "개체"는 인간, 비-인간 영장류, 설치류 등을 포함하지만 이들에 제한되지 않고, 특정 치료의 수용자인 임의의 동물(가령, 포유류)을 가리킨다. 전형적으로, 용어 "개체" 및 "환자"는 인간 개체와 관련하여 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0079] 하나 이상의 추가적인 치료제와 "병용으로" 투여는 동시에(일시에 함께) 및 임의의 순서로 연속되는 투여를 포함한다.
- [0080] 용어 "약제학적 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일도록 허용하고, 제제가 투여될 개체에게 허용될 수 없게 독성인 부가적인 성분을 함유하지 않는 형태인 조제물을 가리킨다. 이런 제제는 무균 제제일 수 있다.
- [0081] 본 명세서에 개시된 항체의 "효과량"은 특정하게 언급된 목적을 수행하기 위해 충분한 양이다. "효과량"은 언급된 목적과 관련하여 경험적으로 및 일과적인 방식으로 결정될 수 있다.
- [0082] 용어 "치료 효과량"은 개체 또는 포유류에서 질병 또는 장애를 "치료"하기에 효과적인 항체 또는 다른 약물의 양을 가리킨다. 암의 경우에, 약물의 치료 효과량은 암 세포의 수를 감소; 종양 크기를 감소; 말초 기관으로의 암 세포 침투를 억제(즉, 어느 정도 늦추고, 일정한 구체예에서, 중지); 종양 전이를 억제(즉, 어느 정도 늦추고, 일정한 구체예에서, 중지); 종양 성장을 어느 정도까지 억제; 및/또는 하나 이상의 암과 관련된 증상을 어느 정도까지 완화시킬 수 있다. 본 명세서의 "치료" 정의를 참조한다. 약물이 존재하는 암 세포 성장을 예방하고 및/또는 제거할 수 있는 정도까지, 약물은 세포억제제(cytostatic) 및/또는 세포독성(cytotoxic)일 수 있다. "예방 효과량"은 바람직한 예방적 결과를 얻기 위해 필요한 투여량 및 시간에 있어서 효과적인 양을 가리킨다. 반드시 그렇지는 않지만 전형적으로, 예방적 투여량이 질병의 전 또는 초기 단계에 개체에 사용되기 때문에, 예방 효과량은 치료 효과량보다 적을 것이다.
- [0083] 본 명세서에 사용된 단어 "표지"는 항체에 직접 또는 간접적으로 접합되어 "표지된" 항체를 산출하는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 가리킨다. 표지는 그 자체로 검출가능(가령, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지)하거나, 또는 효소 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.
- [0084] "화학치료제"는 작용의 메커니즘과는 관계없이, 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학치료제의 부류는 알킬화제, 대사길항물질, 방추체 독성 식물 알칼로이드, 세포독성/항종양 항생제, 국소이성화효소 억제물질, 항체, 감광제, 그리고 키나아제 억제물질을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다. 화학치료제는 "표적화된 요법" 및 전통적인 화학요법에 이용되는 화합물을 포함한다.
- [0085] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료하는 것" 또는 "완화하는" 또는 "완화하는 것"과 같은 용어들은 1) 진단된 병리적 용태 또는 장애를 치유, 지연, 증상을 감소, 및/또는 진행을 중지하는 치료 수단 및 2) 표적으로 하는 병리적 용태 또는 장애의 진행을 방지 및/또는 늦추는 예방 또는 방지 수단을 모두 가리킨다. 따라서, 치료를 필요로 하는 개체는 이미 장애를 가지는 개체; 장애를 가지기 쉬운 개체; 및 장애가 예방되어야 하는 개체를 포함한다. 일정한 구체예에서, 환자가 다음 중 하나 이상을 보이는 경우 개체는 본 발명의 방법에 따라 암에 대해 성공적으로 "치료된"다: 암 세포 수의 감소 또는 완전한 부재; 종양 크기의 감소; 예로써, 연 조직 및 뼈로의 암의 퍼짐을 비롯한 말초 기관으로의 암 세포 침투의 억제 또는 부재; 종양 전이의 억제 또는 부재; 종양 성장의 억제 또는 부재; 특정 암과 연관된 하나 이상의 증상의 완화; 감소된 이환율(morbidity) 및 사망률(mortality); 삶의 질 향상; 종양의 종양원성, 종양원성 빈도, 또는 종양원성 능력의 감소; 종양 내에 암 줄기

세포의 수 또는 빈도 감소; 종양원성 세포의 비-종양원성 상태로의 분화; 또는 효과의 일부 조합.

[0086]

본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 가리키며, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 중합체로 포함될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 메틸화 뉴클레오티드 및 이들의 유사체와 같은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 추가될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분이 끼어들어 갈 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후에, 예로써 표지 성분과의 접합으로 추가로 변형될 수 있다. 다른 유형의 변형은 예로써, "캡(cap)", 자연 발생적인 뉴클레오티드 중 하나 이상이 유사체로 치환됨, 뉴클레오티드간 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 결합을 갖는 것들(가령, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등) 및 하전된 결합을 갖는 것들(가령, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 예로써 단백질(가령, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, ply-L-리신 등)과 같은 펜던트(pendant) 모이어티를 보유하는 것들, 인터칼레이터(intercalator)(가령, 아크리딘(acridine), 프소랄렌(psoralen) 등)을 가지는 것들, 킬레이트제(chelator)(가령, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화성 금속 등)를 보유하는 것들, 알킬화제를 보유하는 것들, 변형된 결합을 갖는 것들(가령, 알파 아노머 핵산 등) 뿐만 아니라 폴리뉴클레오티드(들)의 변형되지 않은 형태를 포함한다. 또한, 당 내에 원래 존재하는 임의의 히드록실 기는 예로써, 포스포네이트 기, 포스포에이트 기에 의해 대체되거나, 표준 보호기에 의해 보호되거나, 추가적인 뉴클레오티드에 추가적인 결합을 만들기 위해 활성화되거나, 또는 고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나, 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 아민 또는 유기 캡핑 기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실 역시 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한, 예로써 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 탄소환상 당 유사체, α-아노머 당, 에피머(epimeric) 당, 예를 들면, 아라비노스, 자일로스 또는 릭소스(lyxose), 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스, 비환상(acyclic) 유사체 및 비염기성 뉴클레오시드 유사체, 예를 들면, 메틸 리보사이드를 포함하는, 일반적으로 당해 분야에 공지된 유사한 형태의 리보스 또는 데옥시리보스 당을 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 결합은 대안적인 연결기(linking group)로 대체될 수 있다. 이들 대안적인 연결기는 포스포에이트가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S("디티오에이트"), "(O)NR₂("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈")로 대체된 구체예를 포함하지만 이들에 제한되지 않고, 여기서 각각의 R 또는 R'은 독립적으로 H이거나, 또는 에테르(—O—) 결합, 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알딜을 임의적으로 내포하는 치환되거나 치환되지 않은 알킬(1-20 C)이다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 결합이 동일할 필요는 없다. 전술된 설명은 RNA 및 DNA를 비롯하여, 본 명세서에 언급된 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[0087]

용어 "벡터"는 숙주 세포에서 목적되는 하나 이상의 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달하거나 발현시킬 수 있는 구조체를 의미한다. 벡터의 예는 바이러스성 벡터, 나신 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파아지 벡터, 양이온성 축합제(condensing agent)와 연합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜으로 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 그리고 생산자 세포(producer cell)와 같은 특정한 진핵 세포를 포함하지만 이들에 제한되지 않는다.

[0088]

용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 가리키기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 비-아미노산에 의해 간섭될 수 있다. 상기 용어는 또한, 자연적으로 또는 간섭(intervention); 가령, 이황화 결합 형성, 글리코실화(glycosylation), 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예를 들면, 표지 성분과의 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다. 본 정의에는 또한, 예로써 아미노산의 하나 이상의 유사체(가령, 비천연 아미노산 등을 포함)를 함유하는 폴리펩티드뿐만 아니라 당해 분야에 공지된 다른 변형이 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드가 항체를 기초로 하기 때문에, 일정한 구체예에서, 이들 폴리펩티드는 단일 사슬 또는 연결된 사슬로 발생할 수 있을 것으로 이해된다.

[0089]

둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드의 맥락에서 용어 "동일한" 또는 "동일성" 백분율은 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존성 아미노산 치환은 고려하지 않고, 최대 대응도를 위해 비교하고 정렬(필요한 경우, 갭(gap)을 도입)할 경우에, 동일하거나, 또는 동일한 특정 백분율의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기를 가지는 둘 이상의 서열 또는 하위서열을 가리킨다. 동일성 백분율은 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 이용하여, 또는 육안 검사(visual inspection)에 의해 측정될 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 정렬을 수득하기 위해 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어가 당해 분야에 공지되어 있다. 서열 정렬 알고리즘의 이런 한 가지 무제한적 예는 Karlin et al, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268에 기술된 알고리즘이고, Karlin

et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877에서처럼 변형되며, NBLAST 및 XBLAST 프로그램(Altschul et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402)에 통합된다. 일정한 구체예에서, 갭처리 BLAST(Gapped BLAST)가 Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다. BLAST-2, WU-BLAST-2(Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2(Genentech, South San Francisco, California) 또는 Megalign(DNASTAR)이 서열을 정렬하기 위해 사용될 수 있는 추가의 공개적으로 입수가 가능한 소프트웨어 프로그램이다. 일정한 구체예에서, 두 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 백분율은 GCG 소프트웨어에서 GAP 프로그램을 이용하여(가령, NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70, 또는 90의 갭 가중치(gap weight) 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치(length weight)를 이용하여) 측정된다. 특정한 대안적인 구체예에서, Needleman 및 Wunsch의 알고리즘(*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970))을 포함하는 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램이 두 아미노산 서열 사이의 동일성 백분율을 측정하기 위해 사용될 수 있다(가령, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 그리고 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5의 길이 가중치를 이용하여). 대안적으로, 일정한 구체예에서, 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성 백분율은 Myers 및 Miller의 알고리즘(CABIOS, 4:11-17 (1989))을 이용하여 결정된다. 가령, 동일성 백분율은 ALIGN 프로그램(버전 2.0)을 사용하고, 잔기 테이블, 12의 갭 길이 페널티(penalty) 및 4의 갭 페널티를 가지는 PAM120를 사용하여 결정될 수 있다. 특정 정렬 소프트웨어에 의한 최대 정렬을 위해 적절한 파라미터는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 일정한 구체예에서, 정렬 소프트웨어의 디폴트(default) 파라미터가 사용된다. 일정한 구체예에서, 첫 번째 아미노산 서열 대 두 번째 서열 아미노산의 동일성 백분율 "X"는 $100 \times (Y/Z)$ 로 계산되며, 여기서 Y는 첫 번째 및 두 번째 서열의 정렬(육안 검사 또는 특정한 서열 정렬 프로그램으로 정렬됨)에서 동일 정합으로서 기록된 아미노산 잔기의 수이고 Z는 두 번째 서열에서 잔기의 총 수이다. 첫 번째 서열의 길이가 두 번째 서열보다 길 경우, 첫 번째 서열 대 두 번째 서열의 동일성 백분율은 두 번째 서열 대 첫 번째 서열의 동일성 백분율보다 길 것이다.

[0090]

무제한적 예로서, 임의의 특정한 폴리뉴클레오티드가 기준 서열에 대해 특정 백분율의 서열 동일성(가령, 적어도 80% 동일, 적어도 85% 동일, 적어도 90% 동일, 그리고 일부 구체예에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일)을 가지는 지 여부는 일정한 구체예에서, 베스트핏(Bestfit) 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix용 버전 8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)을 이용하여 결정될 수 있다. 베스트핏은 두 서열 사이의 상동성의 최고의 세그먼트(segment)를 찾기 위해, Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981)의 부분 상동성(local homology) 알고리즘을 사용한다. 특정한 서열이 본 발명에 따른 기준 서열과 예로써, 95% 동일한지를 결정하기 위해 베스트핏 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램을 이용하는 경우, 파라미터는 동일성 백분율이 기준 뉴클레오티드 서열의 전장에서 계산되고, 기준 서열 내 뉴클레오티드의 총 수에서 최대 5%의 상동성으로 갭이 허용되도록 설정된다.

[0091]

일부 구체예에서, 본 발명의 두 핵산 또는 폴리펩티드는 실질적으로 동일한데, 이것은 이들이 서열 비교 알고리즘을 이용하거나 육안 검사에 의한 측정에서, 최대의 대응을 위해 비교되고 정렬될 때, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 그리고 일부 구체예에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는다는 것을 의미한다. 일정한 구체예에서, 동일성은 적어도 약 10, 약 20, 약 40-60개 잔기 길이 또는 그 사이의 임의의 정수 값을 갖는 서열의 영역 위에서, 또는 60-80개 잔기보다 긴 영역, 적어도 약 90-100개 잔기 위에서 존재할 수 있고, 또는 이들 서열은 예로써, 뉴클레오티드 서열의 암호화 영역과 같은 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일하다.

[0092]

"보존성 아미노산 치환"은 한 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 다른 아미노산 잔기로 대체되는 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 염기성 측쇄(가령, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(가령, 아스파르트산, 글루타민산), 하전되지 않은 극성 측쇄(가령, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(가령, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-가치형 측쇄(가령, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(가령, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 비롯하여, 당분야에서 정의되었다. 가령, 티로신에 대한 페닐알라닌의 치환은 보존성 치환이다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드와 항체의 서열에서 보존성 치환은 항원(들), 다시 말하면, 폴리펩티드 또는 항체가 결합하는 FOLR1에 대한, 아미노산 서열을 내포하는 폴리펩티드 또는 항체의 결합을 파괴하지 않는다. 항원 결합을 제거하지 않는 뉴클레오티드와 아미노산 보존성 치환을 확인하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다 (참조: Brummell et al., 1993, *Biochem.*, 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., 1999, *Protein Eng.* 12:879-884 (1999); 그리고 Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

- [0093] 본 발명의 명세서와 특허청구범위에서 사용된, 단수 형태는 문맥에서 달리 명시되지 않으면, 복수 형태를 포함한다.
- [0094] 구체예가 본 명세서에서 용어 "포함하는"으로 기술되는 경우에, "구성되는" 및/또는 "본질적으로 구성되는"의 관점에서 기술된 다른 모든 점에서 유사한 구체예 역시 제공되는 것으로 이해된다.
- [0095] 문구에서 사용되는 용어 "및/또는", 예를 들면, "A 및/또는 B"는 "A와 B" 둘 모두; "A 또는 B"; "A", 그리고 "B"를 포함하는 것으로 의도된다. 유사하게, 문구에서 사용되는 용어 "및/또는", 예를 들면, "A, B, 및/또는 C"는 하기 구체예 각각을 포함하는 것으로 의도된다: A, B, 그리고 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A와 C; A와 B; B와 C; A (단독으로); B (단독으로); 그리고 C (단독으로).
- [0096] **II. FOLR1 결합제**
- [0097] 본 발명은 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 작용제를 제공한다. 이들 작용제는 본 명세서에서 "FOLR1-결합제"로 지칭된다. FOLR1에 대한 전장 아미노산 서열(aa)와 뉴클레오타이드(nt) 서열은 당해 분야에 공지되고, 또한 본 명세서에서 각각 SEQ ID NO:25와 26으로 제공된다.
- [0098] 일정한 구체예에서, FOLR1 결합제는 항체, 면역접합체 또는 폴리펩티드이다. 일부 구체예에서, FOLR1 결합제는 인간화 항체이다. 일정한 구체예에서, FOLR-1 결합제는 쥐 Mov19 항체의 인간화된 이형(각각, SEQ ID NO: 17과 18로서 제시된 가변 중쇄와 경쇄)이다.
- [0099] 일정한 구체예에서, FOLR1-결합제는 다음의 효과 중에서 하나 이상을 가진다: 종양 세포의 증식 억제, 종양 내에서 암 줄기 세포의 빈도를 감소시킴으로써 종양의 종양원성 감소, 종양 성장 억제, 생존 증가, 종양 세포의 세포사 촉발, 종양원성 세포를 비-종양원성 상태로 분화, 또는 종양 세포의 전이 방지.
- [0100] 일정한 구체예에서, 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 면역접합체 또는 다른 작용제는 세포독성제를 통해 세포사를 촉발한다. 가령, 일정한 구체예에서, 인간 FOLR1 항체에 대한 항체는 단백질 내재화에 의해, FOLR1을 발현하는 종양 세포에서 활성화되는 메이탄시노이드에 접합된다. 특정한 대안적인 구체예에서, 작용제 또는 항체는 접합되지 않는다.
- [0101] 일정한 구체예에서, FOLR1-결합제는 종양 성장을 억제할 수 있다. 일정한 구체예에서, FOLR1-결합제는 생체내에서(*in vivo*, 가령, 이종이식 마우스 모델 및/또는 암을 가진 인간에서) 종양 성장을 억제할 수 있다. 일정한 구체예에서, FOLR1-결합제는 인간에서 종양 성장을 억제할 수 있다.
- [0102] 따라서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) GYFMN(SEQ ID NO:1)을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃(SEQ ID NO:56)을 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 YDGSRAMDY(SEQ ID NO:3)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7)를 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA(SEQ ID NO:8)을 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSREYPYT(SEQ ID NO:9)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하고; 여기서 Xaa₁은 K, Q, H, 그리고 R에서 선택되고; Xaa₂는 Q, H, N, 그리고 R에서 선택되고; 그리고 Xaa₃은 G, E, T, S, A, 그리고 V에서 선택된다. 일정한 구체예에서, 항체는 huMov19 항체이고, 이것은 중쇄 CDR2 RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:2)를 포함하는 앞서 기술된 항체이다.
- [0103] 일정한 구체예에서, 본 발명은 CDR당 최대 4개(즉, 0, 1, 2, 3, 또는 4개)의 보존성 아미노산 치환을 갖는 huMov19의 CDR을 포함하는, FOLR1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) GYFMN(SEQ ID NO:1)을 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:2)를 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 그리고 YDGSRAMDY(SEQ ID NO:3)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 (b) KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; RASNLEA(SEQ ID NO:8)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 그리고 QQSREYPYT(SEQ ID NO:9)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함한다.

- [0104] 본 발명은 또한, 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체(huFR1-21) 또는 이의 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) SSGMS(SEQ ID NO:30)를 포함하는 중쇄 CDR1; TISSGGSYTY(SEQ ID NO:31)를 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 DGEGLYAMDY(SEQ ID NO:32)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) KASDHINNWL(A) (SEQ ID NO:27)를 포함하는 경쇄 CDR1; GATSLET(SEQ ID NO:28)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQYWSTPFT(SEQ ID NO:29)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다.
- [0105] 일정한 구체예에서, 본 발명은 CDR당 최대 4개(즉, 0, 1, 2, 3, 또는 4개)의 보존성 아미노산 치환을 갖는 huFR1-21의 CDR을 포함하는, FOLR1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) SSGMS(SEQ ID NO:30)를 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 TISSGGSYTY(SEQ ID NO:31)를 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 DGEGLYAMDY(SEQ ID NO:32)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 (b) KASDHINNWL(A) (SEQ ID NO:27)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 GATSLET(SEQ ID NO:28)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 QQYWSTPFT(SEQ ID NO:29)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함한다.
- [0106] 일정한 구체예에서, 본 발명은 CDR당 최대 4개(즉, 0, 1, 2, 3, 또는 4개)의 보존성 아미노산 치환을 갖는 huFR1-48의 CDR을 포함하는, FOLR1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) TNYWMQ(SEQ ID NO:60)를 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 IYPGNGDSR(SEQ ID NO:61)을 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 RDGNYAAY(SEQ ID NO:62)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 (b) RASENIYSNLA(SEQ ID NO:57)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 AATNLAD(SEQ ID NO:58)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 QHFVWSPYT(SEQ ID NO:59)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함한다.
- [0107] 일정한 구체예에서, 본 발명은 CDR당 최대 4개(즉, 0, 1, 2, 3, 또는 4개)의 보존성 아미노산 치환을 갖는 huFR1-49의 CDR을 포함하는, FOLR1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) TNYWMY(SEQ ID NO:66)를 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 AIYPGNSDTT(SEQ ID NO:67)를 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 RHDYGAMDY(SEQ ID NO:68)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 (b) RASENIYTNL(A) (SEQ ID NO:63)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 TASNLA(D) (SEQ ID NO:64)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 QHFVWSPYT(SEQ ID NO:65)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함한다.
- [0108] 일정한 구체예에서, 본 발명은 CDR당 최대 4개(즉, 0, 1, 2, 3, 또는 4개)의 보존성 아미노산 치환을 갖는 huFR1-57의 CDR을 포함하는, FOLR1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) SSFGMH(SEQ ID NO:72)를 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 YISSGSSTIS(SEQ ID NO:73)를 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 EAYGSSMEY(SEQ ID NO:74)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 (b) RASQNNNNLH(SEQ ID NO:69)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 YVSQSVS(SEQ ID NO:70)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 QQSNSWPHYT(SEQ ID NO:71)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함한다.

[0109]

일정한 구체예에서, 본 발명은 CDR당 최대 4개(즉, 0, 1, 2, 3, 또는 4개)의 보존성 아미노산 치환을 갖는 huFR1-65의 CDR을 포함하는, FOLR1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 염산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편을 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) TSYTMH(SEQ ID NO:78)를 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 YINPISGYTN(SEQ ID NO:79)을 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 GGAYGRKPM DY(SEQ ID NO:80)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 (b) KASQNVGPVNA(SEQ ID NO:75)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 SASYRYS(SEQ ID NO:76)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및/또는 QQYNSYPYT(SEQ ID NO:77)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1, 2, 3, 또는 4개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함한다.

[0110]

본 명세서에서 기술된 개별 경쇄 또는 중쇄 중에서 한 가지를 포함하는 폴리펩티드, 그리고 경쇄와 중쇄 둘 모두를 포함하는 폴리펩티드(가령, 항체) 역시 제시된다. SEQ ID NO: 4와 6의 폴리펩티드는 huMov19의 중쇄의 가변 도메인, 그리고 huMov19의 중쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO:10-13의 폴리펩티드는 huMov19의 가변 도메인 경쇄 이형 1.00, 가변 도메인 경쇄 이형 1.60, 경쇄 이형 1.00, 그리고 경쇄 이형 1.60을 각각 포함한다. SEQ ID NO: 42와 46의 폴리펩티드는 huFR1-21의 중쇄의 가변 도메인, 그리고 huFR1-21의 중쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO:41과 45의 폴리펩티드는 huFR1-21의 가변 도메인 경쇄와 경쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO: 97과 113의 폴리펩티드는 huFR1-48의 중쇄의 가변 도메인, 그리고 huFR1-48의 중쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO:96과 112의 폴리펩티드는 huFR1-48의 가변 도메인 경쇄와 경쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO: 99와 115의 폴리펩티드는 huFR1-49의 중쇄의 가변 도메인, 그리고 huFR1-49의 중쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO:98과 114의 폴리펩티드는 huFR1-49의 가변 도메인 경쇄와 경쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO: 101과 117의 폴리펩티드는 huFR1-57의 중쇄의 가변 도메인, 그리고 huFR1-57의 중쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO:100과 116의 폴리펩티드는 huFR1-57의 가변 도메인 경쇄와 경쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO:103과 119의 폴리펩티드는 huFR1-65의 중쇄의 가변 도메인, 그리고 huFR1-65의 중쇄를 각각 포함한다. SEQ ID NO:102와 118의 폴리펩티드는 huFR1-65의 가변 도메인 경쇄와 경쇄를 각각 포함한다.

[0111]

또한, (a) SEQ ID NO:4 또는 6에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:10-13에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 또한, (a) SEQ ID NO: 42 또는 46에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO: 41와 45에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 또한, (a) SEQ ID NO:97 또는 113에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:96 또는 112에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 또한, (a) SEQ ID NO:99 또는 115에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:98 또는 114에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 또한, (a) SEQ ID NO:101 또는 117에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:100 또는 116에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 또한, (a) SEQ ID NO:103 또는 119에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:102 또는 118에 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 일정한 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:4, 6, 10-13, 41, 42, 45 또는 46에 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 폴리펩티드는 (a) SEQ ID NO:4 또는 6에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드, 및/또는 (b) SEQ ID NO:10-13에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 폴리펩티드는 (a) SEQ ID NO:42 또는 46에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드, 및/또는 (b) SEQ ID NO:41 또는 45에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 또한, (a) SEQ ID NO:97 또는 113에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:96 또는 112에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 또한, (a) SEQ ID NO:99 또는 115에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:98 또는 114에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 또한, (a) SEQ ID NO:101 또는 117에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:100 또는 116에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 또한, (a) SEQ ID NO:103 또는 119에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:102 또는 118에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 제시된다. 일정한 구체예에서, 폴리펩티드는 (a) SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리

펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 폴리펩티드는 (a) SEQ ID NO:45의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:46의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 폴리펩티드는 (a) SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:13의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 폴리펩티드는 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 폴리펩티드이다. 일정한 구체예에서, 폴리펩티드는 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체이다. 가령, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 그리고 (b) SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 인간화된 항체를 제시한다. 일정한 구체예에서, SEQ ID NO:4를 포함하는 폴리펩티드는 중쇄 가변 영역이다. 일정한 구체예에서, SEQ ID NO:10 또는 11을 포함하는 폴리펩티드는 경쇄 가변 영역이다. 본 발명은 또한, (a) SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 그리고 (b) SEQ ID NO:12 또는 SEQ ID NO:13의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 인간화된 항체를 제시한다. 본 발명은 또한, (a) SEQ ID NO:45의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 그리고 (b) SEQ ID NO:46의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 인간화된 항체를 제시한다. 본 발명은 또한, (a) SEQ ID NO:112의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 그리고 (b) SEQ ID NO:113의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 인간화된 항체를 제시한다. 본 발명은 또한, (a) SEQ ID NO:114의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 그리고 (b) SEQ ID NO:115의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 인간화된 항체를 제시한다. 본 발명은 또한, (a) SEQ ID NO:116의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 그리고 (b) SEQ ID NO:117의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 인간화된 항체를 제시한다. 본 발명은 또한, (a) SEQ ID NO:118의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 그리고 (b) SEQ ID NO:119의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 인간 FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 인간화된 항체를 제시한다. 일정한 구체예에서, SEQ ID NO: 4, 6, 10-13, 41, 42, 45, 46, 96-103 및 112-119에 일정한 백분율의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드는 보존성 아미노산 치환에 의해서만, SEQ ID NO: 4, 6, 10-13, 41, 42, 45, 46, 96-103 및 112-119와 상이하다.

[0112] 일정한 구체예에서, FOLR1-결합체는 huMov19, FR-1-21, FR1-48, FR1-49, FR1-57, 그리고 FR1-65 항체로 구성된 군에서 선택되는 항-FOLR1 항체를 포함하거나, 이러한 항체로 본질적으로 구성되거나, 또는 이러한 항체로 구성된다.

[0113] 일정한 구체예에서, huMov19 항체는 2010년 4월 7일자에 American Type Culture Collection(ATCC)에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 PTA-10772, PTA-10773 또는 10774를 갖는 플라스미드에 의해 암호화된다.

[0114] 일정한 구체예에서, FR-1-21 항체는 2010년 4월 7일자에 American Type Culture Collection(ATCC)에 기탁되고, 그리고 수탁 번호 PTA-10775와 10776이 부여된 플라스미드에 의해 암호화된다.

[0115] 일정한 구체예에서, 인간화된 항체는 항체 키메라 Mov19와 실질적으로 동일한 친화성으로 FOLR1에 결합한다. 항원에 대한 항체의 친화성 또는 친화력은 당해 분야에 널리 공지된 임의의 적절한 방법, 예를 들면, 유세포분석법, 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA), 또는 방사면역분석법(RIA), 또는 동역학(가령, BIACORE™ 분석)을 이용하여 실험적으로 측정될 수 있다. 직접 결합 분석 및 경쟁 결합 분석 형식이 쉽게 이용될 수 있다(예로써, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992); 그리고 본 명세서에서 기술된 방법을 참고). 특정 항체-항원 상호작용의 측정된 친화성은 상이한 조건(가령, 염 농도, pH, 온도) 하에 측정되면 변할 수 있다. 따라서, 친화성 및 기타 항원-결합 파라미터(가령, KD 또는 Kd, K_{on}, K_{off})의 측정은 항체와 항원의 표준화된 용액, 그리고 당해 분야에 공지되고 본 명세서에서 기술된 완충액과 같은 표준화된 완충액으로 만들어진다.

[0116] 한 양태에서, 결합 분석은 표면 상에 FOLR1 항원을 발현하는 세포 상에서 유세포분석법을 사용하여 수행될 수 있다. 가령, FOLR1-양성 세포, 예를 들면, SKOV3은 100 μ l FACS 완충액(2% 정상 염소 혈청으로 보충된 RPMI-1640 배지)에서 샘플당 1 x10⁵개 세포를 이용하여 다양한 농도의 항-FOLR1 항체와 함께 배양되었다. 이후, 세포는 펠릿화되고, 세척되고, 그리고 100 μ l의 FITC-접합된 염소-항-마우스 또는 염소-항-인간 IgG-항체(이것은 예로써, Jackson Laboratory로부터 구입가능하다, FACS 완충액에서 6 μ g/ml)와 함께 1시간 동안 배양되었다. 세포는 다시 펠릿화되고, FACS 완충액으로 세척되고, 그리고 1% 포름알데히드를 내포하는 200 μ l의 PBS에서 재현

탁되었다. 샘플은 예로써, HTS 멀티웰 샘플러가 구비된 FACSCalibur 유세포계측기를 이용하여 획득되고 CellQuest Pro를 이용하여 분석되었다(이들 모두 BD Biosciences, San Diego, US로부터). 각 샘플에 대해, FL1에 대한 평균 형광 강도(mean fluorescence intensity, MFI)가 추출되고 반-로그 플롯(semi-log plot)에서 항체 농도에 대해 플롯팅(plotting)되고 결합 곡선(binding curve)이 산출되었다. S자형 용량-반응 곡선(sigmoidal dose-response curve)은 결합 곡선에 맞춤(fitting)되고, 그리고 EC50 값은 디폴트 파라미터(default parameter)를 갖는 GraphPad Prism v4(GraphPad software, San Diego, CA)와 같은 프로그램을 이용하여 계산된다. EC50 값은 각 항체에 대한 겉보기 해리 상수(apparent dissociation constant) "Kd" 또는 "KD"에 대한 척도로서 이용될 수 있다.

[0117] 단일클론성 항체는 Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495에서 기술된 것과 같은 하이브리도마 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법을 이용하여, 마우스, 햄스터, 또는 다른 적절한 숙주 동물은 면역화 항원에 특이적으로 결합하게 될 항체의, 림프구에 의한 생산을 유도하기 위해 상기 기술된 바와 같이 면역화된다. 림프구는 또한, 시험관내(*in vitro*)에서 면역화될 수 있다. 면역화 이후에, 림프구는 분리되고 예로써, 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 적절한 골수종 세포주와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성하고, 이들 세포는 이후, 융합안된 림프구 및 골수종 세포로부터 선별될 수 있다. 면역침강법, 면역블로팅법, 또는 시험관내(*in vitro*) 결합 분석(가령, 방사면역분석(RIA); 효소-결합 면역흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA))에 의해 측정된 바와 같이 선택된 항원을 특이적으로 지향하는 단일클론성 항체를 생산하는 하이브리도마는 이후, 표준 방법을 이용한 시험관내(*in vitro*) 배양 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986), 또는 동물에서 복수 종양(ascites tumor)과 같이 생체내(*in vivo*)에서 증식될 수 있다. 단일클론성 항체는 이후, 상기에서 다중클론성 항체에 대해 기술된 바와 같이 배양 배지 또는 복수로부터 정제될 수 있다.

[0118] 대안적으로, 단일클론성 항체는 또한, 미국 특허 제4,816,567호에 기술된 바와 같이 재조합 DNA 방법을 이용하여 만들어질 수 있다. 단일클론성 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 예로써, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자를 특이적으로 증폭시키는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하는 RT-PCR에 의해, 성숙 B-세포 또는 하이브리도마 세포로부터 분리되며 이들의 서열은 통상적 절차를 이용하여 결정된다. 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드는 이후, 적절한 발현 벡터로 클로닝되며, 이들은 대장균(*E. coli*) 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 만약 그렇지 않으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포로 형질감염되는 경우, 단일클론성 항체가 숙주 세포에 의해 생산된다. 또한, 바람직한 종의 재조합 단일클론성 항체 또는 이의 단편은 기존 문헌에서 기술되는 바와 같이 바람직한 종의 CDR을 발현하는 파아지 전사 라이브러리(display library)로부터 분리될 수 있다(McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628; 및 Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[0119] 단일클론성 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(들)은 대안적인 항체를 생성하기 위해, 재조합 DNA 기술을 사용하는 많은 상이한 방식으로 추가로 변형될 수 있다. 일부 구체예에서, 예로써 마우스 단일클론성 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인은 1) 예로써, 키메라 항체를 산출하기 위해 인간 항체의 이들 영역으로 치환되거나, 또는 2) 융합 항체를 산출하기 위해 비-면역글로불린 폴리펩티드로 치환될 수 있다. 일부 구체예에서, 불변 영역은 절단 또는 제거되어 단일클론성 항체의 바람직한 항체 단편이 산출된다. 가변 영역의 특정 부위(site-directed) 또는 고밀도(high-density) 돌연변이유발(mutagenesis)이 단일클론성 항체의 특이성, 친화성 등을 최적화하기 위해 사용될 수 있다.

[0120] 일부 구체예에서, 인간 FOLR1에 대한 단일클론성 항체는 인간화 항체이다. 일정한 구체예에서, 이런 항체는 인간 개체에 투여될 때 항원성 및 HAMA(인간 항-마우스 항체) 반응을 감소시키기 위해 치료적으로 사용된다.

[0121] 비-인간 또는 인간 항체를 조작하거나, 인간화하거나, 또는 재표면처리(resurfacing)하는 방법 역시 이용될 수 있고 당분야에 널리 공지되어 있다. 인간화된, 재표면처리된 또는 유사하게 조작된 항체는 비-인간 출처, 예를 들면, 마우스, 래트, 토끼, 비-인간 영장류 또는 다른 포유동물로부터 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 "이입(import)" 잔기로 종종 지칭되는 잔기에 의해 대체되고, 이들 잔기는 전형적으로, 공지된 인간 서열의 "이입" 가변, 불변 또는 기타 도메인으로부터 획득된다.

[0122] 이런 이입된 서열은 면역원성을 감소시키거나, 또는 결합 친화성, 온-레이트(on-rate), 오프-레이트(off-rate), 친화력(avidity), 특이성(specificity), 반감기(half-life), 또는 당분야에 공지된 바와 같은 임의의 다른 적절한 특징을 감소시키거나, 증강시키거나 또는 변화시키는데 이용될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 FOLR1 결

합에 영향을 주는데 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 관련된다. 따라서 비-인간 또는 인간 CDR 서열의 일부 또는 전부는 유지되는 반면, 가변과 불변 영역의 비-인간 서열은 인간 또는 기타 아미노산으로 대체될 수 있다.

[0123]

또한, 항체는 임의적으로, 항원 FOLR1에 대한 높은 친화성 및 기타 호의적인 생물학적 성질을 유지하도록 조작된 인간화된, 재표면처리된, 조작된 또는 인간 항체일 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 인간화된(또는 인간) 또는 조작된 항-FOLR1 항체 및 재표면처리된 항체는 부모, 조작된, 그리고 인간화된 서열의 3-차원 모형을 이용한, 부모 서열 및 다양한 개념적 인간화된 산물과 조작된 산물의 분석 과정에 의해 임의적으로 준비될 수 있다. 3-차원 번역글로불린 모형은 상업적으로 구입가능하고 당업자에게 익숙하다. 선별된 후보 번역글로불린 서열의 개연적인 3-차원 형태 구조(conformational structure)를 예시하고 전시하는 컴퓨터 프로그램이 가능하다. 이들 전시의 검사는 후보 번역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 유망한 역할에 대한 분석, 다시 말하면, 항원, 예를 들면, FOLR1에 결합하는 후보 번역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, 프레임워크(FR) 잔기는 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성과 같은 바람직한 항체 특징이 달성되도록 공통과 이입 서열로부터 선택되고 결합될 수 있다.

[0124]

본 발명의 항체의 인간화, 재표면처리 또는 조작은 각각, 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함되는 Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), 미국 특허 제5,639,641호; 제5,723,323호; 제5,976,862호; 제5,824,514호; 제5,817,483호; 제5,814,476호; 제5,763,192호; 제5,723,323호; 제5,766,886호; 제5,714,352호; 제6,204,023호; 제6,180,370호; 제5,693,762호; 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,225,539호; 제4,816,567호; PCT/:US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; EP 229246; 7,557,189; 7,538,195; 그리고 7,342,110, 그리고 이들에서 언급된 참고문헌에서 기술된 것들을 포함하지만 이들에 제한되지 않는 임의의 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0125]

일정한 대안적 구체예에서, FOLR1에 대한 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 당해 분야에 공지된 다양한 기술을 이용하여 직접 제조할 수 있다. 시험관내(*in vitro*)에서 면역화되거나 면역화된 개인으로부터 분리된, 표적 항원에 대해 지향성인 항체를 생산하는 불멸화된(immortalized) 인간 B 림프구가 생성될 수 있다(가령, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; 및 미국 특허 제5,750,373호를 참조). 또한, 인간 항체는 파아지 라이브러리로부터 선택될 수 있고, 여기서 상기 파아지 라이브러리는 예로써, Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, 그리고 Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581)에 기술된 바와 같이 인간 항체를 발현한다. 항체 파아지 라이브러리를 생성하기 위한 기술 및 용도는 또한, 미국 특허 제5,969,108호, 제6,172,197호, 제5,885,793호, 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,582,915호; 제6,593,081호; 제6,300,064호; 제6,653,068호; 제6,706,484호; 및 제7,264,963호; 및 Rothe et al., 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018에 기술된다(이들 각각은 전체적으로 참고문헌으로 포함된다). 친화성 성숙(affinity maturation) 전략 및 사슬 셔플링(chain shuffling) 전략(Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783, 전체적으로 참고문헌으로 포함됨)은 당해 분야에 공지이며 고친화성 인간 항체를 생성하는데 이용될 수 있다.

[0126]

인간화 항체는 또한, 면역화시킬 경우 내생적 번역글로불린 생산의 부재에서 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 인간 번역글로불린 좌위(locus)를 포함하는 형질전환 마우스에서 만들어질 수 있다. 상기 접근법은 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 제5,661,016호에 기술되어 있다.

[0127]

본 발명은 또한, 인간 엽산염 수용체 1을 특이적으로 인식하는 이특이성 항체를 포함한다. 이특이성 항체는 적어도 두 개의 상이한 에피토프를 특이적으로 인식하고 결합할 수 있는 항체이다. 상이한 에피토프는 동일한 분자(가령, 동일한 인간 엽산염 수용체 1) 내에 있거나 상이한 분자에 있을 수 있고, 따라서 예로써, 항체는 인간 엽산염 수용체 1뿐만 아니라, 예로써, 1) T-세포 수용체(가령, CD3) 또는 Fc 수용체(가령, CD64, CD32, 또는 CD16)와 같은 백혈구 상의 효과기 분자 또는 2) 하기에 상세하게 기술되는 세포독성제를 특이적으로 인식하고 결합할 수 있다.

- [0128] 예시적인 이특이성 항체는 두 개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있고, 이들 중에서 적어도 하나가 본 발명의 폴리펩티드에서 기원한다. 대안적으로, 면역글로불린 분자의 항-항원성 가지(arm)는 세포 방어 메커니즘을 특정 항원을 발현하는 세포에 집중시키기 위해, T 세포 수용체 분자(가령, CD2, CD3, CD28, 또는 B7) 또는 IgG을 위한 Fc 수용체와 같은 백혈구 상의 촉발(triggering) 분자에 결합하는 가지와 조합될 수 있다. 이특이성 항체는 또한, 세포독성제를 특정 항원을 발현하는 세포에 지향시키는데 사용될 수 있다. 이들 항체는 항원-결합 가지 및 세포독성제 또는 방사성핵종(radionuclide) 킬레이트제, 예를 들면, EOTUBE, DPTA, DOTA, 또는 TETA에 결합하는 가지를 가진다. 이특이성 항체를 만들기 위한 기술은 당해 분야에 알려져 있다(Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539; Brennan et al., 1985, Science 229:81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol. 121:120; Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368; 및 미국 특허 제5,731,168호). 둘 이상의 결합가(valency)를 가지는 항체 역시 고려된다. 가령, 삼특이성 항체가 제조될 수 있다(Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)). 따라서, 일정한 구체예에서, FOLR1에 대한 항체는 다중특이성이다.
- [0129] 일정한 구체예에서, 예로써 종양 침입을 증가시키기 위한 항체 단편이 제공된다. 항체 단편의 생산을 위한 다양한 기술이 공지되어 있다. 전통적으로, 이들 단편은 온전한 항체의 단백질가수분해 절단을 통해 유래된다(가령, Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; Brennan et al., 1985, Science, 229:81). 일정한 구체예에서, 항체 단편은 재조합으로 생산된다. Fab, Fv 및 scFv 항체 단편은 모두 대장균(*E. coli*) 또는 다른 숙주 세포에서 발현되고 분비될 수 있고, 따라서 다량의 이들 단편의 생산을 가능하게 한다. 이런 항체 단편은 또한, 상기 논의된 항체 파아지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 항체 단편은 또한, 예로써 미국 특허 제5,641,870호에 기술된 선형 항체일 수 있고, 일특이성 또는 이특이성일 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술이 숙련된 기술자에게 명백할 것이다.
- [0130] 본 발명에 따르면, 기술은 인간 엽산염 수용체 1에 특이적인 단일-사슬 항체의 생산을 위해 개조될 수 있다(미국 특허 제4,946,778호를 참조). 또한, 방법은 엽산염 1 수용체, 또는 이의 유도체, 단편, 유사체 또는 동종체에 대한 바람직한 특이성을 가지는 단일클론성 Fab 단편의 빠르고 효과적인 판별을 가능하게 하는 Fab 발현 라이브러리의 구성을 위해 개조될 수 있다(Huse, et al., Science 246:1275-1281 (1989)). 항체 단편은 다음을 포함하지만 이들에 제한되지 않는 당해 분야의 기술에 의해 생산될 수 있다: (a) 항체 분자의 펩신 절단에 의해 생산된 F(ab')₂ 단편; (b) F(ab')₂ 단편의 이황화 연결의 환원으로 생성된 Fab 단편, (c) 파파인(papain) 및 환원제로 항체 분자의 처리에 의해 생성된 Fab 단편, 그리고 (d) Fv 단편.
- [0131] 추가로, 특히 항체 단편의 경우에, 혈청 반감기를 늘리기 위해 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는 예로써, 항체 단편 내에서 적절한 영역을 돌연변이시켜 재생 수용체(salvage receptor) 결합 에피토프를 항체 단편 내로 포함시키거나, 또는 상기 에피토프를 펩티드 태그(tag) 내로 포함시키고 이를 이후, 항체 단편에 말단 또는 중간부에 융합시켜(가령, DNA 또는 펩티드 합성에 의해) 성취될 수 있다.
- [0132] 이중접합체 항체 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 이중접합체 항체는 두 개의 공유적으로 연결된 항체로 이루어진다. 이런 항체는 예로써, 면역 세포가 원치않는 세포를 표적화하도록 하기 위해 제안되었다(미국 특허 제4,676,980호). 항체는 가교연결제를 수반하는 것들을 비롯하여 합성 단백질 화학에서 공지된 방법을 이용하여 시험관내(in vitro)에서 제조될 수 있는 것으로 고려된다. 가령, 면역독소(immunotoxin)는 이황화 교환 반응을 사용하거나 티오에테르 결합을 형성하여 구성될 수 있다. 상기 목적을 위해 적절한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르이미데이트를 포함한다.
- [0133] 본 발명의 목적을 위해, 변형된 항체가 인간 FOLR1의 폴리펩티드와 항체의 연결을 제공하는 임의 유형의 가변 영역을 포함할 수 있음이 이해되어야 한다. 상기 측면에서, 가변 영역은 원하는 종양 연관된 항원에 대한 체액성 반응을 증가시키고 면역글로불린을 생성하도록 유도될 수 있는 임의 유형의 포유류를 포함하거나 이로부터 유래될 수 있다. 그러므로, 변형된 항체의 가변 영역은 예로써, 인간, 쥐, 비-인간 영장류(가령, 필리핀 원숭이(*cynomolgus monkey*), 마카크속 원숭이 등) 또는 이리(lupine)과 기원일 수 있다. 일부 구체예에서, 변형된 면역글로불린의 가변 및 불변 영역은 모두 인간의 것이다. 다른 구체예에서, 양립할 수 있는(compatible) 항체의 가변 영역(일반적으로, 비-인간 출처에서 유래)은 분자의 결합 특성을 개선하거나 면역원성을 감소시키기 위해 조작되거나 특정하게 맞춤화될 수 있다. 이런 관점에서, 본 발명에서 유용한 가변 영역은 인간화되거나, 또는 외래 아미노산 서열의 포함을 통해 달리 변형될 수 있다.
- [0134] 일정한 구체예에서, 중쇄 및 경쇄 모두에서 가변 도메인은 하나 이상의 CDR의 적어도 부분적인 치환에 의해, 그

리고 필요한 경우, 부분적인 프레임워크 영역 치환 및 서열 변화에 의해 변형된다. CDR이 프레임워크 영역이 유래된 항체와 동일한 부류 또는 하위 부류의 항체로부터 유래될 수 있지만, 이들 CDR은 상이한 부류의 항체 및 일정한 구체예에서, 상이한 종의 항체로부터 유래될 것으로 예상된다. 한 가변 도메인의 항원 결합 능력을 다른 도메인에 전달하기 위해 반드시 모든 CDR을 공여자 가변 영역으로부터의 완전한 CDR로 대체할 필요는 없다. 오히려, 항원 결합 부위의 활성을 유지하기에 필요한 잔기만 전달하는 것이 필요할 수도 있다. 미국 특허 제 5,585,089호, 제5,693,761호 및 제5,693,762호에 제시된 설명을 고려하면, 일상적 실험의 수행 또는 시행착오 검사를 통해, 감소된 면역원성을 가지는 기능적 항체를 얻는 것은 당연하게 당업자의 능력에 속할 것이다.

[0135]

가변 영역에의 변형에도 불구하고, 본 발명의 변형된 항체는 하나 이상의 불변 영역 도메인 중에서 적어도 일부가 결실되거나 달리 변형되어 자연의 또는 변형되지 않은 불변 영역을 포함하는 대략 동일한 면역원성의 항체와 비교할 때, 증가된 종양 국소화(localization) 또는 감소된 혈청 반감기와 같은 바람직한 생화학적 특성을 제공하는 항체(가령, 전장 항체 또는 이의 면역반응성 단편)를 포함할 것임을 당업자는 이해할 것이다. 일부 구체예에서, 변형된 항체의 불변 영역은 인간의 불변 영역을 포함할 것이다. 본 발명과 양립가능한 불변 영역의 변형은 하나 이상의 도메인에서 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환을 포함한다. 즉, 본 명세서에 개시된 변형된 항체는 세 가지 중쇄 불변 도메인(CH1, CH2 또는 CH3) 중에서 하나 이상 및/또는 경쇄 불변 도메인(CL)의 변형 또는 변경을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 도메인이 부분적으로 또는 전부 결실된 변형된 불변 영역이 고려된다. 일부 구체예에서, 변형된 항체는 전체 CH2 도메인이 제거된 도메인 결실된 구조체 또는 변이체(Δ CH2 구조체)를 포함할 것이다. 일부 구체예에서, 제거된 불변 영역 도메인은 부재된 불변 영역에 의해 전형적으로 부여되던 분자 유연성을 일부 제공하는 짧은 아미노산 스페이서(spacer)(가령, 10개 잔기)에 의해 치환될 것이다.

[0136]

이들의 배치 외에도, 불변 영역은 몇몇 효과기 기능을 매개하는 것으로 당해 분야에 공지되어 있다. 가령, 보체의 C1 성분과 항체의 결합은 보체 시스템을 활성화한다. 보체의 활성화는 옵소닌작용(opsonisation) 및 세포 병원체의 용해에서 중요하다. 보체의 활성화는 또한, 염증 반응을 촉진하고 자가면역 과민반응(autoimmune hypersensitivity)에도 관여할 수 있다. 또한, 항체는 Fc 영역을 통해 세포에 결합하는데, 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 부위가 세포 상의 Fc 수용체(FcR)에 결합한다. IgG(감마 수용체), IgE(에타 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)를 비롯한 상이한 부류의 항체에 대해 특이적인 수많은 Fc 수용체가 존재한다. 세포 표면 상의 Fc 수용체에 대한 항체의 결합은 포식작용(engulfment) 및 항체-코팅된 입자의 파괴, 면역 복합체의 제거, 살해 세포(killer cell)에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 용해(항체-의존성 세포-매개 세포독성, 또는 ADCC로 지칭됨), 염증 매개물질의 방출, 태반 전달 및 면역글로불린 생산의 제어를 비롯한 수많은 중요하고 다양한 생물학적 반응들을 촉발한다.

[0137]

일정한 구체예에서, FOLR1-결합 항체는 변형된 효과기 기능을 제공하고, 이것은 차례로, 투여된 항체의 생물학적 프로파일에 영향을 준다. 가령, 불변 영역 도메인의 결실 또는 비활성화(점 돌연변이 또는 다른 수단을 통한)는 순환하는 변형된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시키고 이를 통해 종양 국소화를 증가시킬 수 있다. 다른 경우에, 본 발명과 일치하는 불변 영역 변형은 보체 결합을 조정하고, 따라서 혈청 반감기 및 집합된 세포독소의 비특이적 결합을 감소시킬 수 있다. 그러나 불변 영역의 다른 변형이 이항화 결합 또는 올리고당 모이어티를 제거하기 위해 사용될 수 있고, 이는 증가된 항원 특이성 또는 항체 유연성으로 인해 개선된 국소화를 가능하게 한다. 유사하게, 본 발명에 따른 불변 영역의 변형은 숙련된 기술자의 이해 범위 내에서 널리 공지된 생화학적 또는 분자공학 기술을 이용하여 쉽게 만들어질 수 있다.

[0138]

일정한 구체예에서, FOLR1-결합제는 하나 이상의 효과기 기능을 갖지 않는 항체이다. 가령, 일부 구체예에서, 항체는 어떠한 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC) 활성 및/또는 어떠한 보체-의존성 세포독성(CDC) 활성도 가지지 않는다. 일정한 구체예에서, 항체는 Fc 수용체 및/또는 보체 인자에 결합하지 않는다. 일정한 구체예에서, 항체는 어떠한 효과기 기능도 가지지 않는다.

[0139]

일정한 구체예에서, 변형된 항체는 CH3 도메인을 개별적인 변형된 항체의 경첩 영역(hinge region)에 직접 융합하기 위해 조작될 수 있음이 주목될 것이다. 다른 구조체에서, 펩티드 스페이서를 경첩 영역 및 변형된 CH2 및/또는 CH3 도메인 사이에 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 가령, 양립가능한 구조체가 발현될 수 있고, 여기서 CH2 도메인은 결실되고 남아있는(변형되거나 변형되지 않은) CH3 도메인은 경첩 영역에 5-20개 아미노산 스페이서로 연결된다. 이런 스페이서는 예로써, 불변 도메인의 조절 요소가 유리 상태로 남아있거나 접근가능하고, 또는 경첩 영역이 유연하게 남아있도록 보장하기 위해 부가될 수 있다. 그러나, 아미노산 스페이서가 일부 경우에, 면역원이고 구조체에 대해 원치 않는 면역 반응을 도출할 수 있는 것으로 입증될 수 있다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 구조체에 부가된 임의의 스페이서는 변형된 항체의 바람직한 생화학적

성질을 유지하기 위해 상대적으로 비-면역원성이거나, 심지어 모두 제거될 것이다.

[0140] 전체 불변 영역 도메인의 결실 이외에, 본 발명의 항체는 소수의 또는 심지어 단일 아미노산의 부분적인 결실 또는 치환에 의해 제공될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 가령, CH2 도메인의 선택된 부분에서 단일 아미노산의 돌연변이가 실질적으로 Fc 결합을 감소시키고, 이를 통해 중앙 국소화를 증가시키는데 충분할 수 있다. 유사하게, 효과기 기능(가령, 보체 C1q 결합)이 조절되도록 제어하는 하나 이상의 불변 영역 도메인 중 일부를 단순히 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 불변 영역의 이런 부분적인 결실은 항체의 선택된 특성(혈청 반감기)을 개선할 수 있는 반면, 주요 불변 영역 도메인과 연관된 다른 바람직한 기능은 온전하게 유지될 수 있다. 더욱이, 상기에서 시사한 바와 같이, 개시된 항체의 불변 영역은 결과의 구조체의 프로필을 향상시키는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이 또는 치환을 통해 변형될 수 있다. 이러한 관점에서, 변형된 항체의 배치 및 면역원성 프로필을 실질적으로 유지하면서 보존된 결합 부위(가령, Fc 결합)에 의해 제공되는 활성을 저해하는 것이 가능하다. 특정 구체에는 효과기 기능의 감소 또는 증가와 같은 바람직한 특성을 개선하기 위해, 또는 더욱 많은 세포독소 또는 탄수화물 부착을 제공하기 위해 불변 영역에 하나 이상의 아미노산의 부가를 포함할 수 있다. 이런 구체에서, 선택된 불변 영역 도메인에서 유래한 특정 서열을 삽입하거나 복제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0141] 본 발명은 추가로 본 명세서에 제시된 키메라, 인간화 및 인간 항체, 또는 이들의 항체 단편에 실질적으로 상동성인 변이체 또는 등가물을 포함한다. 이들은 예로써, 보존성 치환 돌연변이, 즉, 유사한 아미노산에 의한 하나 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다. 가령, 보존성 치환은 아미노산을 동일한 일반 부류 내에 다른 아미노산으로, 예를 들면, 하나의 산성 아미노산을 다른 산성 아미노산으로, 하나의 염기성 아미노산을 다른 염기성 아미노산으로, 또는 하나의 중성 아미노산을 다른 중성 아미노산으로 치환하는 것을 가리킨다. 보존성 아미노산 치환에 의해 의도되는 것은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

[0142] 본 발명의 폴리펩티드는 인간 FOLR1에 대한 항체, 또는 이의 단편을 포함하는 재조합 폴리펩티드, 천연 폴리펩티드, 또는 합성 폴리펩티드일 수 있다. 본 발명의 일부 아미노산 서열이 단백질의 구조 또는 기능에 중요한 영향을 끼치지 않으면서 달라질 수 있는 것으로 당해 분야에서 인식될 것이다. 따라서, 본 발명은 인간 엽산염 수용체 단백질에 대해 상당한 활성을 나타내거나 항체, 또는 이의 단편의 영역을 포함하는 폴리펩티드의 변형을 추가로 포함한다. 이런 돌연변이체는 결실, 삽입, 역위, 반복, 그리고 유형 치환을 포함한다.

[0143] 폴리펩티드 및 유사체는 일반적으로는 단백질의 일부가 아닌 추가적인 화학적 모이어티를 포함하도록 더욱 변형될 수 있다. 이들 유도체화된 모이어티는 단백질의 용해성, 생물학적 반감기 또는 흡수를 개선할 수 있다. 이들 모이어티는 또한, 단백질 등의 임의의 바람직한 부수 효과를 감소시키거나 제거할 수 있다. 이들 모이어티에 대한 개요는 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000)에서 찾아볼 수 있다.

[0144] 본 명세서에 기술된 분리된 폴리펩티드는 당해 분야에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 생산될 수 있다. 이런 방법은 직접적인 단백질 합성 방법에서부터 분리된 폴리펩티드 서열을 암호화하는 DNA 서열을 구성하고 적절한 형질전환된 숙주에서 이들 서열을 발현시키는 것까지 다양하다. 일부 구체에서, DNA 서열은 재조합 기술을 이용하여 목적되는 야생형 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 분리하거나 합성함으로써 구성된다. 임의적으로, 서열은 특정 부위 돌연변이에 의해 돌연변이되어 이의 기능적 유사체를 제공할 수 있다. 가령, Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) 및 미국 특허 제4,588,585호를 참조한다.

[0145] 일부 구체에서, 목적되는 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성장치를 이용한 화학적 합성에 의해 구성될 것이다. 이런 올리고뉴클레오타이드는 바람직한 폴리펩티드의 아미노산 서열 및 목적되는 재조합 폴리펩티드가 생산되는 숙주 세포에서 선호되는 이들 코돈(codon)의 선택을 기초로 설계될 수 있다. 목적되는 분리된 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열을 합성하기 위해 표준 방법이 적용될 수 있다. 가령, 역-번역된(back-translated) 유전자를 구성하기 위해 완전한 아미노산 서열이 사용될 수 있다. 추가로, 특정한 분리된 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 올리고머가 합성될 수 있다. 가령, 바람직한 폴리펩티드의 부분을 암호화하는 여러 개의 작은 올리고뉴클레오타이드가 합성되고 이후, 결합될 수 있다. 개별적인 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로, 상보적 조립을 위한 5' 또는 3' 오버행(overhang)을 포함한다.

[0146] 일단 조립되면(합성, 특정 부위 돌연변이유발 또는 다른 방법을 통한), 목적되는 특정한 분리된 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 발현 벡터 내로 삽입되고 바람직한 숙주에서 단백질의 발현을 위해 적절한 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된다. 적절한 조립은 적절한 숙주에서 뉴클레오타이드 서열분석(sequencing), 제한지도작성법(restriction mapping), 그리고 생물학적으로 활성인 폴리펩티드의 발현에 의해 확인될 수 있다.

당해 분야에 널리 공지된 바와 같이, 숙주 내에서 형질감염된 유전자의 높은 발현 수준을 얻기 위해, 상기 유전자는 선택된 발현 숙주에서 기능하는 전사 및 번역 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결되어야만 한다.

[0147]

일정한 구체예에서, 인간 FOLR1에 대한 항체, 또는 이의 단편을 암호화하는 DNA를 증폭하고 발현하기 위해 재조합 발현 벡터가 사용된다. 재조합 발현 벡터는 포유류, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자에서 유래된 적절한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동가능하게 연결된, 항-FOLR1 항체, 또는 이의 단편의 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 합성 또는 cDNA-유래 DNA 단편을 가지는 복제가능한 DNA 구조체이다. 전사 단위체는 일반적으로, 하기에 상세하게 기술되는 (1) 유전자 발현에 조절 역할을 가지는 유전적 요소 또는 요소들, 예를 들면, 전사 프로모터 또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역되는 구조 또는 암호화 서열, 그리고 (3) 적절한 전사 및 번역 개시 및 종료 서열의 조립체를 포함한다. 이런 조절 요소는 전사를 제어하기 위한 오퍼레이터(operator) 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로 복제 개시점(origin of replication)에 의해 부여되는 숙주에서 복제하는 능력, 그리고 형질전환체의 인식을 촉진하기 위한 선택 유전자(selection gene)가 추가적으로 포함될 수 있다. DNA 영역은 이들이 기능적으로 서로 연관되어 있을 때 작동가능하게 연결된다. 가령, 신호 펩티드(분비 선도(leader))에 대한 DNA는 이것이 폴리펩티드의 분비에 관여하는 전구체로서 발현되는 경우 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결된다; 프로모터는 이것이 서열의 전사를 제어하는 경우 암호화 서열에 작동가능하게 연결된다; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 허용하도록 배치되는 경우 암호화 서열에 작동가능하게 연결된다. 효모 발현 시스템에서 사용하기 위해 의도된 구조적 요소는 숙주 세포에 의해 번역된 단백질의 세포의 분비를 가능하게 하는 선택도 서열을 포함한다. 대안적으로, 재조합 단백질이 선도 또는 수송 서열 없이 발현되는 경우, 이는 N-말단 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 상기 잔기는 발현된 재조합 단백질로부터 임의적으로 차후에 절단되어 최종 생성물을 제공할 수 있다.

[0148]

발현 제어 서열 및 발현 벡터의 선택은 숙주의 선택에 의존적일 것이다. 광범위한 발현 숙주/벡터 조합이 사용될 수 있다. 진행 숙주를 위한 유용한 발현 벡터는 예로써, SV40의 발현 제어 서열, 소 유두종 바이러스, 아테노바이러스 및 거대세포바이러스(cytomegalovirus)를 포함하는 벡터를 포함한다. 박테리아 숙주를 위한 유용한 발현 벡터는 공지의 박테리아 플라스미드, 예를 들면, pCR 1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체를 비롯한 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 플라스미드, 더욱 넓은 범위의 숙주 플라스미드, 예를 들면, M13 및 섬유상(filamentous) 단일-가닥(single-stranded) DNA 파아지를 포함한다.

[0149]

FOLR1-결합 폴리펩티드 또는 항체(또는 항원으로서 사용을 위한 FOLR1 단백질)의 발현을 위한 적절한 숙주 세포는 적절한 프로모터의 제어하에 원핵생물, 효모, 곤충 또는 고등 진핵 세포를 포함한다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 생물체, 예를 들면 대장균(*E. coli*) 또는 바실루스(*bacillus*)를 포함한다. 고등 진핵 세포는 하기에 기술되는 포유류 기원의 공인된 세포주를 포함한다. 무세포(Cell-free) 번역 시스템이 또한 사용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모, 그리고 포유류 세포 숙주와 함께 사용하기 위해 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 Pouwels 등에 의해 기술되며(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), 이의 연관된 개시는 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다. 항체 생산을 비롯한 단백질 생산의 방법에 관한 추가적인 정보는 예로써, 미국 공개 공보 제2008/0187954호, 미국 특허 제6,413,746호 및 제6,660,501호, 그리고 국제특허공보 제WO 04009823호에서 찾아볼 수 있고, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함된다.

[0150]

다양한 포유류 또는 곤충 세포 배양 시스템이 또한 재조합 단백질을 발현하는데 유리하게 이용된다. 포유류 세포에서 재조합 단백질의 발현은 이들 단백질이 일반적으로 정확하게 접히고, 적절히 변형되고 완전히 기능성이기 때문에 수행될 수 있다. 적절한 포유류 숙주 세포주의 예는 HEK-293과 HEK-293T, Gluzman(Cell 23:175, 1981)에 기술된 원숭이 신장 세포의 COS-7 세포주, 그리고 예로써, L 세포, C127, 3T3, 중국 햄스터 난소(CHO), HeLa 및 BHK 세포주를 비롯한 다른 세포주를 포함한다. 포유류 발현 벡터는 비전사 요소, 예를 들면, 복제 개시점, 발현되는 유전자에 연결된 적절한 프로모터 및 인핸서, 그리고 다른 5' 또는 3' 인접하는(flanking) 비전사 서열, 그리고 5' 또는 3' 비번역 서열, 예를 들면, 필수 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스(splice) 공여자 및 수용자 부위, 그리고 전사 종료 서열을 포함할 수 있다. 곤충 세포에서 이형 단백질을 생산하기 위한 바큘로바이러스(Baculovirus) 시스템은 Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)에서 검토된다.

[0151]

형질전환된 숙주에 의해 생산된 단백질은 임의의 적절한 방법에 따라 정제될 수 있다. 이런 표준 방법은 크로마토그래피(가령, 이온 교환, 친화성 및 사이징(sizing) 칼럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해성(differential solubility), 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술을 포함한다. 헥사히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 외피 서열 및 글루타티온-S-전이효소와 같은 친화성 태그가 적절한 친화성 칼럼 위에 통과에 의해 쉽게 정제되도록 단백질에 부착될 수 있다. 분리된 단백질은 또한, 단백질가수분해

(proteolysis), 핵자기공명 및 x-선 결정분석과 같은 기술을 이용하여 물리적으로 규명될 수 있다.

- [0152] 가령, 재조합 단백질을 배양 배지로 분비하는 시스템으로부터의 상청액(supernatant)은 먼저, 시판되는 단백질 농축 여과기, 예를 들면, Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 유닛을 사용하여 농축될 수 있다. 농축 단계 후에, 농축물은 적절한 정제 매트릭스에 가해질 수 있다. 대안적으로, 음이온 교환 수지, 예를 들면, 펜던트(pendant) 디에틸아미노에틸(diethylaminoethyl, DEAE) 기를 가지는 매트릭스 또는 기질이 사용될 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 셀룰로오스 또는 단백질 정제에서 흔히 사용되는 다른 유형일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 단계가 사용될 수 있다. 적절한 양이온 교환체는 설포프로필 또는 카르복시메틸 기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스를 포함한다. 마지막으로, 소수성 RP-HPLC 배지, 예를 들면, 펜던트 메틸 또는 다른 지방족 기를 가지는 실리카겔을 이용하는 하나 이상의 역상 고성능 액체 크로마토그래피(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) 단계가 추가로 FOLR1-결합제를 정제하기 위해 사용될 수 있다. 전술한 정제 단계들 중에서 일부 또는 전부가 다양한 조합으로, 또한 동종의 재조합 단백질을 제공하기 위해 사용될 수 있다.
- [0153] 박테리아 배양으로 생산된 재조합 단백질은 예로써, 세포 펠렛으로부터 최초 추출, 그 이후에 하나 이상의 농축, 염석(salting-out), 수성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 분리될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 최종 정제 단계를 위해 사용될 수 있다. 재조합 단백질의 발현에 사용되는 미생물 세포는 동결-해동 사이클링(freeze-thaw cycling), 초음파처리(sonication), 기계적 분쇄, 또는 세포 용해제의 이용을 비롯한 임의의 통상적인 방법에 의해 분쇄될 수 있다.
- [0154] 항체 및 기타 단백질을 정제하기 위한 당해 분야에 공지된 방법은 또한, 예로써 미국 특허 공개 공보 제 2008/0312425호, 제2008/0177048호, 그리고 제2009/0187005호에 기술된 것을 포함하며, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함된다.
- [0155] 일정한 구체예에서, FOLR1-결합제는 항체가 아닌 폴리펩티드이다. 높은 친화성으로 단백질 표적에 결합하는 비-항체 폴리펩티드를 동정하고 생산하기 위한 다양한 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 가령, Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 (2007), Hosse et al., Protein Science, 15:14-27 (2006), Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 (2006), Nygren, FEBS J., 275:2668-76 (2008), 그리고 Skerra, FEBS J., 275:2677-83 (2008)를 참조하고, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함된다. 일정한 구체예에서, 파아지 전사 기술이 FOLR1-결합 폴리펩티드를 동정/생산하기 위해 사용되었다. 일정한 구체예에서, 폴리펩티드는 단백질 A, 리포칼린, 피브로넥틴 도메인, 안키린(ankyrin) 컨센서스 반복 도메인, 그리고 티오레독신으로 구성된 군에서 선택되는 유형의 단백질 골격(scaffold)을 포함한다.
- [0156] 일부 구체예에서, 작용제는 비-단백질 분자이다. 일정한 구체예에서, 작용제는 소형 분자이다. 비-단백질 FOLR1-결합제의 동정에 유용한 조합 화학 라이브러리 및 기술이 당업자에게 공지되어 있다. 가령, Kennedy et al., J. Comb. Chem., 10:345-354 (2008), Dolle et al., J. Comb. Chem., 9:855-902 (2007), 그리고 Bhattacharyya, Curr. Med. Chem., 8:1383-404 (2001)을 참조하고, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함된다. 특정한 추가적인 구체예에서, 작용제는 탄수화물, 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan), 당단백질, 또는 프로테오글리칸(proteoglycan)이다.
- [0157] 일정한 구체예에서, 작용제는 핵산 앵타머(aptamer)이다. 앵타머는 다른 분자에 결합하는 그들의 능력에 기초하여 선택된(가령, 무작위 또는 돌연변이된 풀(pool)로부터) 폴리뉴클레오티드 분자이다. 일부 구체예에서, 앵타머는 DNA 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정한 대안적 구체예에서, 앵타머는 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 앵타머는 하나 이상의 변형된 핵산 잔기를 포함한다. 단백질에 결합하기 위한 핵산 앵타머를 생성하고 선별하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 가령, 미국 특허 제5,270,163호, 미국 특허 제5,683,867호, 미국 특허 제5,763,595호, 미국 특허 제6,344,321호, 미국 특허 제7,368,236호, 미국 특허 제5,582,981호, 미국 특허 제5,756,291호, 미국 특허 제5,840,867호, 미국 특허 제7,312,325호, 미국 특허 제7,329,742, 국제 공개 공보 WO 02/077262, 국제 공개 공보 WO 03/070984, 미국 특허 출원 공개 공보 제 2005/0239134호, 미국 특허 출원 공개 공보 제2005/0124565호, 그리고 미국 특허 출원 공개 공보 제 2008/0227735호를 참조하고, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함된다.

[0158] III.면역접합체

- [0159] 본 발명은 또한, 세포독소(약물) 또는 전구약물에 연결되거나 접합된 본 명세서에서 개시된 바와 같은 항-FOLR1 항체, 항체 단편, 기능적 등가물, 향상된 항체 및 그들의 양태를 포함하는 접합체(본 명세서에서, 면역접합체로

지칭됨)에 관계한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 염산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 면역접합체를 제시하고, 여기서 상기 항체는 (a) GYFMN(SEQ ID NO:1)을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃(SEQ ID NO:56)을 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 YDGSRAMDY(SEQ ID NO:3)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7)를 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA(SEQ ID NO:8)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSREVPYT(SEQ ID NO:9)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하고; 여기서 Xaa₁은 K, Q, H, 그리고 R에서 선택되고; Xaa₂는 Q, H, N, 그리고 R에서 선택되고; 그리고 Xaa₃은 G, E, T, S, A, 그리고 V에서 선택된다. 일정한 구체예에서, 항체는 huMov19 항체이고, 이것은 중쇄 CDR2 RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:2)를 포함하는 앞서 기술된 항체이다. 다른 구체예에서, 항체는 FR1-21이고, 그리고 (a) SSYGMS(SEQ ID NO:30)를 포함하는 중쇄 CDR1; TISSGGSYTY(SEQ ID NO:31)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 DGEGLYAMDY(SEQ ID NO:32)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) KASDHINNLA(SEQ ID NO:27)를 포함하는 경쇄 CDR1; GATSLET(SEQ ID NO:28)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQYWSTPFT(SEQ ID NO:29)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 다른 구체예에서, 항체는 FR1-48이고, 그리고 (a) TNYWMQ(SEQ ID NO:60)를 포함하는 중쇄 CDR1; AIYPGNGDSR(SEQ ID NO:61)을 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 RDGNIAAY(SEQ ID NO:62)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) RASENIYSNLA(SEQ ID NO:57)를 포함하는 경쇄 CDR1; AATNLAD(SEQ ID NO:58)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QHFWASPYT(SEQ ID NO:59)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 다른 구체예에서, 항체는 FR1-49이고, 그리고 (a) TNYWMY(SEQ ID NO:66)를 포함하는 중쇄 CDR1; AIYPGNSDTT(SEQ ID NO:67)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 RHDYGAMDY(SEQ ID NO:68)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) RASENIYTDLA(SEQ ID NO:63)를 포함하는 경쇄 CDR1; TASNLA(SEQ ID NO:64)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QHFWVSPYT(SEQ ID NO:65)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 다른 구체예에서, 항체는 FR1-57이고, 그리고 (a) SSFGMH(SEQ ID NO:72)를 포함하는 중쇄 CDR1; YISSGGSSTIS(SEQ ID NO:73)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 EAYGSSMEY(SEQ ID NO:74)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) RASQNNNNLH(SEQ ID NO:69)를 포함하는 경쇄 CDR1; YVSQSVS(SEQ ID NO:70)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSNSWPHYT(SEQ ID NO:71)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 항체는 FR1-65이고, 그리고 (a) TSYTMH(SEQ ID NO:78)를 포함하는 중쇄 CDR1; YINPISGYTN(SEQ ID NO:79)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는 GGAYGRKPMYD(SEQ ID NO:80)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 (b) KASQNVGPNA(SEQ ID NO:75)를 포함하는 경쇄 CDR1; SASYRYS(SEQ ID NO:76)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQYNSYPYT(SEQ ID NO:77)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다.

[0160] 적절한 약물 또는 전구약물은 당해 분야에 공지되어 있다. 일정한 구체예에서, 약물 또는 전구약물은 세포독성제이다. 본 발명의 세포독성 접합체에 사용되는 세포독성제는 세포의 사멸을 야기하거나, 세포사를 유도하거나, 또는 일부 방식으로 세포 생존력을 감소시키는 임의의 화합물 일 수 있고, 예로써 메이탄시노이드 및 메이탄시노이드 유사체, 벤조디아제핀, 톡소이드, CC-1065 및 CC-1065 유사체, 듀오카르마이신 및 듀오카르마이신 유사체, 엔다이인(enediyne), 예를 들면, 칼리키아미신; 아우리스타틴, 토메이마이신 유도체, 랩토마이신 유도체, 메토크세이트, 시스플라틴, 카르보플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실 및 모르폴리노 독소루비신을 비롯한 돌라스타틴 및 돌라스타틴 유사체를 포함한다. 일정한 구체예에서, 세포독성제는 메이탄시노이드 및 메이탄시노이드 유사체이다.

[0161] 이런 접합체는 약물 또는 전구약물을 항체 또는 기능적 균등물에 연결하기 위해 연결기를 사용하여 제조될 수 있다. 적절한 연결기는 당해 분야에 널리 공지되며 예로써, 이황화 기, 티오에테르 기, 산분해성 기, 광분해성 기, 펩티다제 분해성 기 및 에스테라아제 분해성 기를 포함한다.

[0162] 약물 또는 전구약물은 예로써, 항-FOLR1 항체 또는 이의 단편에 이황화 결합을 통해 연결될 수 있다. 링커 분자 또는 가교연결제는 항-FOLR1 항체 또는 이의 단편과 반응할 수 있는 반응성 화학기를 포함한다. 일정한 구체예에서, 세포-결합제와의 반응을 위한 반응성 화학기는 *N*-숙신이미딜 에스테르 및 *N*-설포숙신이미딜 에스테르이다. 추가적으로, 링커 분자는 반응성 화학기, 일정한 구체예에서 약물과 반응하여 이황화 결합을 형성할 수 있는 디티오피리딜 기를 포함한다. 일정한 구체예에서, 링커 분자는 예로써, *N*-숙신이미딜 3-(2-피리딜 디티오) 프로피오네이트(SPDP)(가령, Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)를 참조), *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB)(가령, 미국 특허 제4,563,304호를 참조), *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)2-설포부타노에이트(설포-SPDB)(가령, 미국 공개 공보 제20090274713호를 참조), *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오) 펜타노에이트(SPP)(가령, CAS 등록 번호 제341498-08-6호를 참조), 2-이미노티올란, 또는 아세틸숙신산 무수물을 포함한다. 가령, 항체 또는 세포 결합체는 가교연결 시약으로 변형될 수 있고, 그리고 이렇게 유래된 유리 또는 보호된 티올기를 함유하는 항체 또는 세포 결합체는 이후, 이황화- 또는 티올-함유 메이탄시노이드와 반응하여 접합체를 생성한다. 접합체는 HPLC, 크기-배제, 흡착, 이온 교환 및 친화성 포획, 투석

또는 접선 유동 여과(tangential flow filtration)를 포함하지만 이들에 제한되지 않는 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 일정한 구체예에서, 항-FOLR1 항체는 SPDB 또는 세포-SPDB 링커를 거쳐 세포독소에 연결된다. 일정한 구체예에서, huMov19 항체는 SPDB 또는 세포-SPDB 링커를 거쳐 세포독소에 연결된다.

[0163] 본 발명의 다른 양태에서, 항-FOLR1 항체는 세포독성 약물에 이황화 결합 및 폴리에틸렌 글리콜 스페이서를 거쳐 연결되어 면역접합체의 효력, 용해성 또는 효능을 강화한다. 이런 절단성 친수성 링커는 W02009/0134976에 기술된다. 이러한 링커 설계의 추가적인 이익은 바람직한 높은 단량체 비율 및 항체-약물 접합체의 최소 응집이다. 이러한 양태에 특히 고려되는 것은 2-8개 범위의 좁은 약물 로드를 가지는 폴리에틸렌 글리콜 스페이서 $((CH_2CH_2O)_{n=1-14})$ 를 보유하는 이황화 기($-S-S-$)를 거쳐 연결된 세포-결합제 및 약물의 접합체이고, 이들은 암 세포에 대해 상대적으로 높은 효력의 생물학적 활성을 보이며 최소의 단백질 응집에서 높은 접합 수율 및 높은 단량체 비율의 바람직한 생화학적 특성을 가지는 것으로 기술된다.

[0164] 본 양태에 특히 고려되는 것은 화학식(I)의 항-FOLR1 항체 약물 접합체 또는 화학식 (I')의 접합체이다:

[0165] $A-[X_1-(-CH_2-CH_2O-)_n-Y-C]_m$ (I)

[0166] $[C-Y-(-CH_2-CH_2O-)_n-X_1]_m-A$ (I')

[0167] 여기서:

[0168] A는 항-FOLR1 항체 또는 단편을 나타내고;

[0169] C는 세포독소 또는 약물을 나타내고;

[0170] X는 티오에테르 결합, 아마이드 결합, 카르바메이트 결합, 또는 에테르 결합을 통해 세포-결합체에 부착된 지방족, 방향족 또는 헤테로환상 단위체를 나타내고;

[0171] Y는 이황화 결합을 통해 약물에 부착된 지방족, 방향족 또는 헤테로환상 단위체를 나타내고;

[0172] l는 0 또는 1이고;

[0173] m은 2 내지 8의 정수이고; 및

[0174] n은 1 내지 24의 정수이다.

[0175] 일정한 구체예에서, m은 2 내지 6의 정수이다.

[0176] 일정한 구체예에서, m은 3 내지 5의 정수이다.

[0177] 또한, 일정한 구체예에서, n은 2 내지 8의 정수이다. 대안적으로, 예로써 미국 특허 제6,441,163호 및 제 7,368,565호에 개시된 바와 같이, 약물은 세포-결합제와 반응하기에 적절한 반응성 에스테르를 도입하기 위해 먼저 변형될 수 있다. 활성화 링커 모이어티를 보유하는 이들 약물과 세포-결합제의 반응은 세포-결합제 약물 접합체를 생산하는 다른 방법을 제공한다. 메이탄시노이드는 또한, 예로써 미국 특허 제6,716,821호에 제시된 바와 같이 PEG 연결기를 이용하여 항-FOLR1 항체 또는 단편에 연결될 수 있다. 이들 PEG 비-절단성 연결기는 물 및 비-수성 용매 모두에 용해성이고 하나 이상의 세포독성제를 세포 결합제에 연결하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 PEG 연결기는 한쪽 말단에서 기능성 설피드릴 또는 이황화 기, 그리고 다른 말단에서 활성 에스테르를 통해 링커의 반대 말단에서 세포독성제 및 세포 결합제와 반응하는 이중이기능성(heterobifunctional) PEG 연결기를 포함한다. PEG 연결기를 이용하여 세포독성 접합체를 합성하는 일반적인 예로서, 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함되는 미국 특허 제6,716,821호를 다시 한 번 참고한다. 합성은 반응성 PEG 모이어티를 보유하는 하나 이상의 세포독성제와 세포-결합제의 반응으로 시작하며, 각 반응성 PEG 모이어티의 말단 활성 에스테르가 세포 결합제의 아미노산 잔기에 의해 변위되어, PEG 연결기를 통해 세포 결합제에 공유적으로 결합된 하나 이상의 세포독성제를 포함하는 세포독성 접합체가 산출된다. 대안적으로, 세포 결합은 반응성 이황화 모이어티(가령, 이황화피리딜)를 도입하기 위해 이기능성 PEG 가교연결제로 변형될 수 있고, 이는 이후, 티올-함유 메이탄시노이드로 처리되어 접합체를 제공할 수 있다. 다른 방법에서, 세포 결합은 티올 모이어티를 도입하기 위해 이기능성 PEG 가교연결제로 변형될 수 있고, 이는 이후, 반응성 이황화물-함유 메이탄시노이드(가령 이황화피리딜)로 처리되어 접합체를 제공할 수 있다.

[0178] 비-절단성 연결을 가지는 항체-메이탄시노이드 접합체 역시 제조될 수 있다. 이런 가교연결제는 당해 분야에 기술되어 있으며(ThermoScientific Pierce Crosslinking Technical Handbook 및 미국 특허 출원 공개 공보 제

2005/0169933호를 참조), *N*-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸) 시클로헥산카르복실레이트(SMCC), SMCC의 긴 사슬 유사체인 *N*-숙신이미딜-4-(*N*-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트)(LC-SMCC), κ -말레이미도운데칸산 *N*-숙신이미딜 에스테르(KMUA), β -말레이미도프로판산 *N*-숙신이미딜 에스테르(BMPS), γ -말레이미도부티르산 *N*-숙신이미딜 에스테르(GMBS), ϵ -말레이미도카프로산 *N*-히드록시숙신이미드 에스테르(EMCS), *m*-말레이미도벤조일-*N*-히드록시숙신이미드 에스테르(MBS), *N*-(α -말레이미도아세톡시)-숙신이미드 에스테르(AMAS), 숙신이미딜-6-(β -말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트(SMPH), *N*-숙신이미딜 4-(*p*-말레이미도페닐)-부티레이트(SMPB), 그리고 *N*-(*p*-말레이미도페닐)이소시아네이트(PMPI), *N*-숙신이미딜-4-(요오드아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB), *N*-숙신이미딜 요오드아세테이트(SIA), *N*-숙신이미딜 브로모아세테이트(SBA), 그리고 *N*-숙신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트(SBAP)를 포함하지만 이들에 제한되지 않는다. 일정한 구체예에서, 항체는 1-10개의 반응성기를 도입하기 위해 기존 문헌에 기술된 바와 같이 숙신이미딜 4-(*N*-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), 설폰-SMCC, 말레이미도벤조일-*N*-히드록시숙신이미드 에스테르(MBS), 설폰-MBS 또는 숙신이미딜-요오드아세테이트와 같은 가교연결 시약으로 변형된다(Yoshitake et al, Eur. J. Biochem., 101:395-399 (1979); Hashida et al, J. Applied Biochem., 56-63 (1984); 및 Liu et al, Biochem., 18:690-697 (1979)). 변형된 항체는 이후, 티올-함유 메이탄시노이드 유도체와 반응하여 접합체를 생성한다. 접합체는 세파덱스(Sephadex) G25 칼럼을 통한 겔 여과(gel filtration) 또는 투석 또는 점선 유도 여과에 의해 정제될 수 있다. 변형된 항체는 티올-함유 메이탄시노이드(1 내지 2 몰 당량/말레이미도 기)로 처리되고, 그리고 항체-메이탄시노이드 접합체는 세파덱스 G-25 칼럼을 통한 겔 여과, 세라믹 히드록시아파타이트(hydroxyapatite) 칼럼에서 크로마토그래피, 투석 또는 점선 유도 여과 또는 이들 방법의 조합에 의해 정제된다. 전형적으로, 항체당 평균 1-10개 메이탄시노이드가 연결된다. 한 가지 방법은 항체를 숙신이미딜 4-(*N*-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC)로 변형하여 말레이미도기를 도입하고, 그 이후에 변형된 항체와 티올-함유 메이탄시노이드를 반응시켜 티오에테르-연결된 접합체를 제공하는 것이다. 이번에도, 항체 분자당 1 내지 10개 약물 분자를 가지는 접합체가 산출된다. 항체, 항체 단편, 단백질 호르몬, 단백질 성장 인자 및 기타 단백질의 메이탄시노이드 접합체는 동일한 방식으로 만들어진다.

[0179] 본 발명의 다른 양태에서, FOLR1 항체(가령, huMov19, FR1-21, FR1-48, FR1-49, FR1-57, 또는 FR1-65)는 PEG 스페이서의 중개를 통한 비-절단성 결합을 거쳐 약물에 연결된다. 약물 및 항-FOLR1 항체 또는 단편 사이에 링커를 형성하는 친수성 PEG 사슬을 포함하는 적절한 가교연결 시약은 당해 분야에 널리 공지되거나, 또는 시판된다(가령, Quanta Biodesign, Powell, Ohio로부터). 적절한 PEG-함유 가교연결제는 또한, 시판되는 PEG 그 자체로부터 당해 분야의 숙련자에게 공지된 표준 합성 화학 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 약물은 미국 특허 공개 공보 제20090274713호 및 W02009/0134976에 상세하게 기술된 방법에 의해 이기능성 PEG-함유 가교연결제와 반응하여 하기 화학식, $Z-X_1-(-CH_2-CH_2-O-)_n-Y_p-D$ 의 화합물이 제공될 수 있고, 상기 화합물은 이후, 세포 결합체와 반응하여 접합체를 제공할 수 있다. 대안적으로, 세포 결합은 티올-반응성 기(가령, 말레이미드 또는 할로아세트아미드)를 도입하기 위해 이기능성 PEG 가교연결제로 변형될 수 있고, 이는 이후, 티올-함유 메이탄시노이드로 처리되어 접합체를 제공할 수 있다. 다른 방법에서, 세포 결합은 티올 모이어티를 도입하기 위해 이기능성 PEG 가교연결제로 변형될 수 있고, 이는 이후, 티올-반응성 메이탄시노이드(가령, 말레이미드 또는 할로아세트아미드)를 보유하는 메이탄시노이드로 처리되어 접합체를 제공할 수 있다.

[0180] 따라서, 본 발명의 다른 양태는 화학식(II) 또는 화학식 (II')의 항-FOLR1 항체 약물 접합체이다:

[0181]
$$A-[X_1-(-CH_2-CH_2-O-)_n-Y_p-C]_m \quad (II)$$

[0182]
$$[C-Y_p-(-CH_2-CH_2-O-)_n-X_1]_m-A \quad (II')$$

[0183] 여기서, A는 항-FOLR1 항체 또는 단편을 나타내고;

[0184] C는 세포독소 또는 약물을 나타내고;

[0185] X는 티오에테르 결합, 아마이드 결합, 카르바메이트 결합, 또는 에테르 결합을 거쳐 세포-결합체에 결합된 지방족, 방향족 또는 헤테로환상 단위체를 나타내고;

[0186] Y는 티오에테르 결합, 아마이드 결합, 카르바메이트 결합, 에테르 결합, 아민 결합, 탄소-탄소 결합 및 히드라존 결합으로 구성된 군에서 선택된 공유결합을 통해 약물에 결합된 지방족, 방향족, 또는 헤테로환상 단위체를 나타내고;

[0187] *n*은 0 또는 1이고;

- [0188] p는 0 또는 1이고;
- [0189] m은 2 내지 15의 정수이고; 그리고
- [0190] n은 1 내지 2000의 정수이다.
- [0191] 일정한 구체예에서, m은 2 내지 8의 정수이고; 그리고
- [0192] n은 1 내지 24의 정수이다.
- [0193] 일정한 구체예에서, m은 2 내지 6의 정수이다.
- [0194] 일정한 구체예에서, n은 2 내지 8의 정수이다.
- [0195] 일정한 구체예에서, m은 3 내지 5의 정수이다. 일정한 구체예에서, 항체는 huMov19이다. 다른 구체예에서, 항체는 FR-1-21이다. 다른 구체예에서, 항체는 FR-1-48이다. 다른 구체예에서, 항체는 FR-1-49이다. 다른 구체예에서, 항체는 FR-1-57이다. 다른 구체예에서, 항체는 FR-1-65이다. 적절한 PEG-함유 링커의 예는 항-FOLR1 항체 또는 이의 단편과 반응하기 위한 N-숙신이미딜 에스테르 또는 N-설포숙신이미딜 에스테르 모이어티뿐만 아니라 상기 화합물과 반응하기 위한 말레이미도- 또는 할로아세틸계 모이어티를 가지는 링커를 포함한다. PEG 스페이서가 본 명세서에 기술된 방법에 의해, 당해 분야에 공지된 임의의 가교연결제 내로 포함될 수 있다.
- [0196] 본 명세서에 개시된 많은 링커는 미국 특허 공개 공보 제20050169933호 및 제20090274713호, 그리고 WO2009/0134976에 상세하게 기술되어 있다; 이들 문헌의 내용은 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함된다.
- [0197] 본 발명은 약 2 내지 약 8개의 약물 분자("약물 로드"), 예를 들면, 메이탄시노이드가 항-FOLR1 항체 또는 이의 단편에 연결된 양태를 포함하며, 접합체의 항-종양 효과는 동일한 세포 결합체에 연결된 더욱 적거나 더욱 많은 수의 약물의 약물 로드와 비교할 때 훨씬 효과적이다. 본 명세서에 사용된 "약물 로드"는 세포 결합체(가령, 항-FOLR1 항체 또는 이의 단편)에 부착할 수 있는 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)의 수를 가리킨다. 한 양태에서, 세포 결합체에 부착될 수 있는 약물 분자의 수는 평균적으로 약 2 내지 약 8개(가령, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1개)일 수 있다. 일정한 구체예에서, 약물은 $N^{2'}$ -데아세틸- $N^{2'}$ -(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신(DM1) 또는 $N^{2'}$ -데아세틸- $N^{2'}$ -(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸) 메이탄신(DM4)이다. 따라서, 일정한 구체예에서, 항체 huMov19는 DM1 또는 DM4에 접합된다. 다른 구체예에서, 항체 FR-1-21은 DM1 또는 DM4에 접합된다. 다른 구체예에서, 항체 FR-1-48은 DM1 또는 DM4에 접합된다. 다른 구체예에서, 항체 FR-1-49는 DM1 또는 DM4에 접합된다. 다른 구체예에서, 항체 FR-1-57은 DM1 또는 DM4에 접합된다. 다른 구체예에서, 항체 FR-1-65는 DM1 또는 DM4에 접합된다.
- [0198] 따라서, 한 양태에서, 면역접합체는 항체당 1개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 2개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 3개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 4개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 5개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 6개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 7개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 8개의 메이탄시노이드를 포함한다.
- [0199] 한 양태에서, 면역접합체는 항체당 약 1 내지 약 8개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 약 2 내지 약 7개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 약 2 내지 약 6개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 약 2 내지 약 5개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 약 3 내지 약 5개의 메이탄시노이드를 포함한다. 다른 양태에서, 면역접합체는 항체당 약 3 내지 약 4개의 메이탄시노이드를 포함한다.
- [0200] 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로 약 2 내지 약 8개(가령, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1개)의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)가 부착된다. 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로

약 1 내지 약 8개의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)를 가진다. 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로 약 2 내지 약 7개의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)를 가진다. 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로 약 2 내지 약 6개의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)를 가진다. 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로 약 2 내지 약 5개의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)를 가진다. 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로 약 3 내지 약 5개의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)를 가진다. 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로 약 3 내지 약 4개의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)를 가진다. 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로 약 3.5 내지 약 4개의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)를 가진다.

[0201] 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로 약 2 ± 0.5 , 약 2.5 ± 0.5 , 약 3 ± 0.5 , 약 3.5 ± 0.5 , 약 4 ± 0.5 , 약 4.5 ± 0.5 , 약 5 ± 0.5 , 약 5.5 ± 0.5 , 약 6 ± 0.5 , 약 6.5 ± 0.5 , 약 7 ± 0.5 , 약 7.5 ± 0.5 , 또는 약 8 ± 0.5 개의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)가 부착된다. 한 양태에서, 면역접합체를 포함하는 조성물은 항체당 평균적으로 약 3.5 ± 0.5 개의 약물 분자(가령, 메이탄시노이드)를 가진다.

[0202] 항-FOLR1 항체 또는 이의 단편은 이기능성 가교연결 시약과 항-FOLR1 항체 또는 이의 단편을 반응시켜 변형될 수 있고, 이를 통해 항-FOLR1 항체 또는 이의 단편에 링커 분자의 공유적 부착을 야기한다. 본 명세서에 사용된, "이기능성 가교연결 시약"은 세포-결합제를 본 명세서에 기술된 약물과 같은 약물에 공유적으로 연결하는 임의의 화학적 모이어티이다. 다른 방법에서, 연결 모이어티의 일부는 약물에 의해 제공된다. 이런 관점에서, 약물은 세포-결합제를 약물에 연결하는데 사용되는 더욱 큰 링커 분자의 부분인 연결 모이어티를 포함한다. 가령, 메이탄시노이드 DM1을 형성하기 위해, 메이탄신의 C-3 히드록실 기에서 측쇄가 유리 설피드릴 기(SH)를 갖도록 변형된다. 메이탄신의 이러한 티올레이트화 형태는 변형된 세포-결합제와 반응하여 접합체를 형성할 수 있다. 그러므로, 최종 링커는 하나는 두 가지 성분으로 조립되고, 이들 중에서 하나는 가교연결 시약에 의해 제공되고, 그 반면 다른 하나는 DM1의 측쇄에 의해 제공된다.

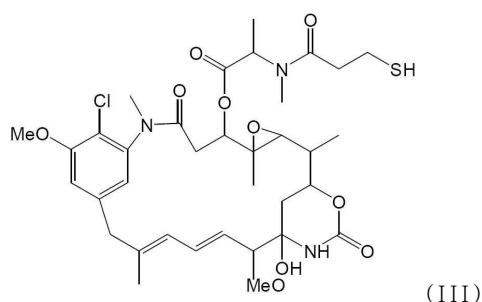
[0203] 약물 분자는 또한, 혈청 알부민과 같은 중개적 담체 분자를 통해 항체 분자에 연결될 수 있다.

[0204] 본 명세서에 사용된, 표현 "세포-결합제에 연결된" 또는 "항-FOLR1 항체 또는 단편에 연결된"은 적절한 연결기, 또는 이의 전구체를 통해 세포-결합제 항-FOLR1 항체 또는 단편에 결합된 적어도 하나의 약물 유도체를 포함하는 접합체 분자를 가리킨다. 일정한 구체예에서, 연결기는 SMCC이다.

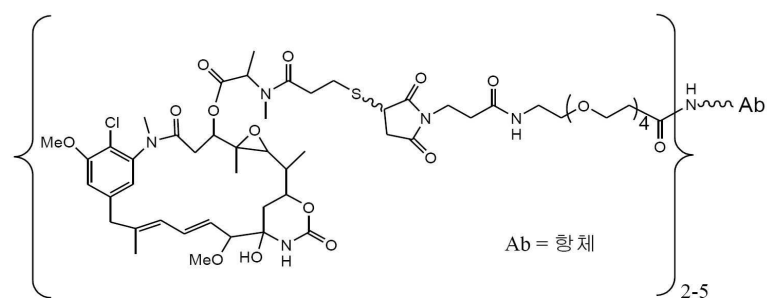
[0205] 일정한 구체예에서, 본 발명에서 유용한 세포독성제는 메이탄시노이드 및 메이탄시노이드 유사체이다. 적절한 메이탄시노이드의 예는 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체의 에스테르를 포함한다. 미세소관 형성을 억제하고 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체와 같이 포유류 세포에 고도로 독성인 임의의 약물이 포함된다.

[0206] 적절한 메이탄시놀 에스테르의 예는 변형된 방향족 고리를 가지는 것들 및 다른 위치에 변형을 가지는 것들을 포함한다. 이런 적절한 메이탄시노이드는 미국 특허 제4,424,219호; 제4,256,746호; 제4,294,757호; 제4,307,016호; 제4,313,946호; 제4,315,929호; 제4,331,598호; 제4,361,650호; 제4,362,663호; 제4,364,866호; 제4,450,254호; 제4,322,348호; 제4,371,533호; 제5,208,020호; 제5,416,064호; 제5,475,092호; 제5,585,499호; 제5,846,545호; 제6,333,410호; 제7,276,497호 및 제7,473,796호에 개시되어 있다.

[0207] 일정한 구체예에서, 본 발명의 면역접합체는 세포독성제로서 티올-함유 메이탄시노이드(DM1)를 이용하며, 정식 명칭은 $N^{2'}$ -데아세틸- $N^{2'}$ -(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신이다. DM1은 다음의 구조식 (III)으로 표현된다:

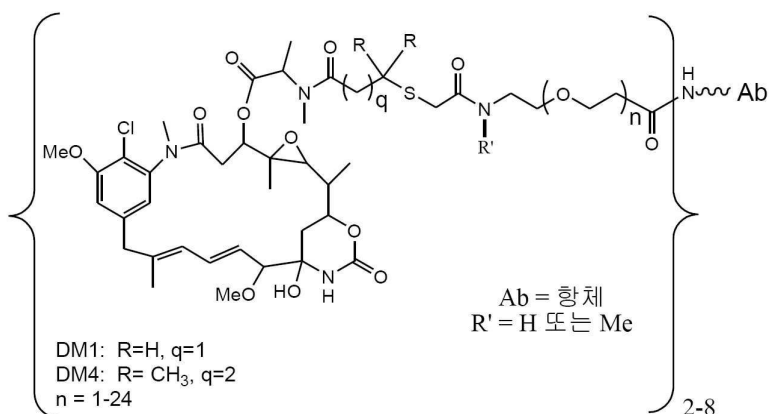


[0208] 다른 구체예에서, 본 발명의 접합체는 티올-함유 메이탄시노이드인 $N^{2'}$ -데아세틸- $N^{2'}$ -(4-메틸-4-메르캅토-1-옥소펜



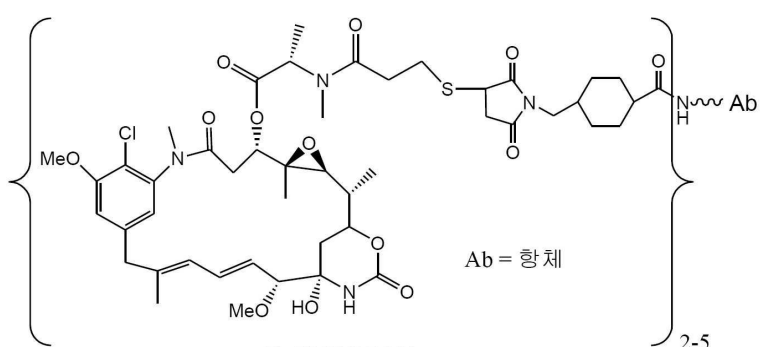
Ab-PEG4-Mal-DM1

(VII)



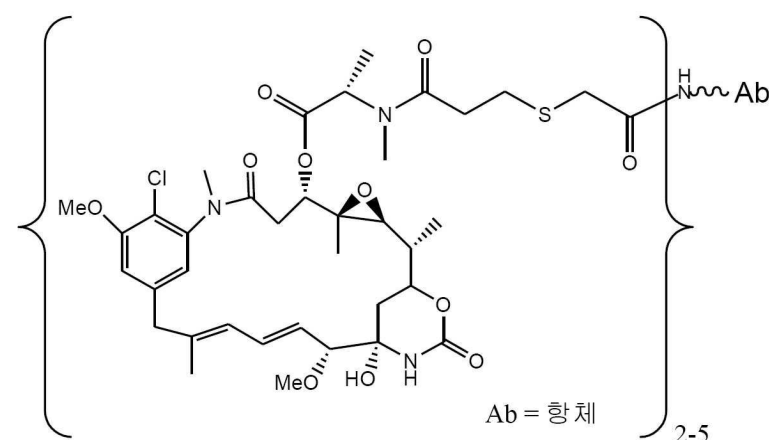
Ab-PEG-SIA-DM1/DM4

(VIII)



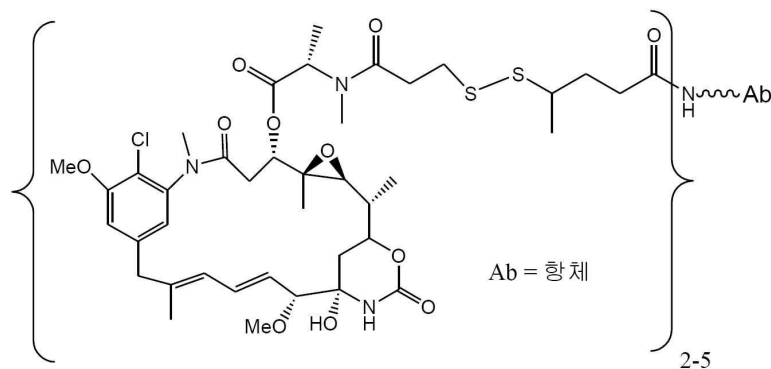
Ab-SMCC-DM1

(IX)



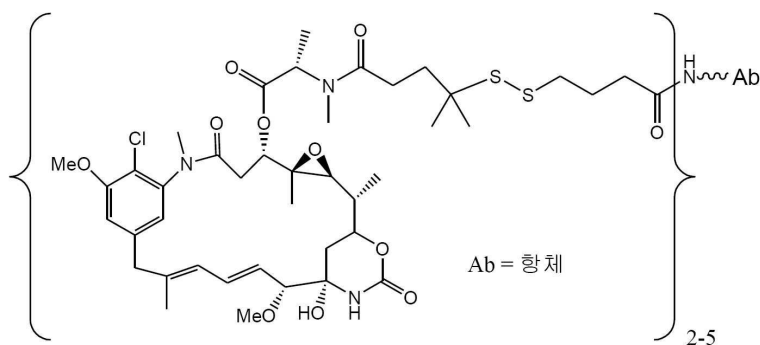
Ab-SIA-DM1

(X)



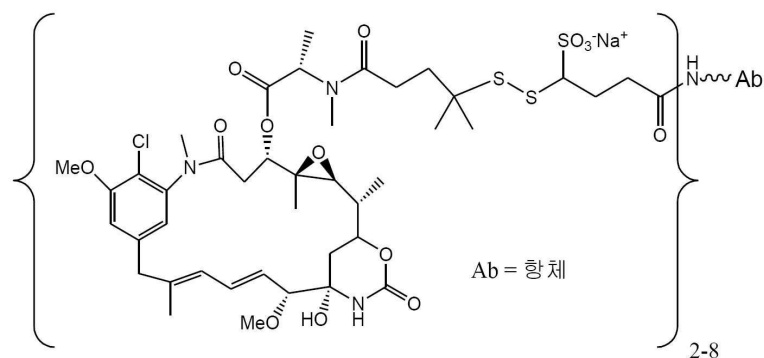
[0221]

(XI)



[0222]

(XII)



[0223]

(XIII)

[0224]

일정한 구체예에서, 항체는 huMov19이다. 다른 구체예에서, 항체는 FR1-21이다.

[0225]

이런 항체-메이탄시노이드 접합체를 생산하기 위한 몇몇 설명이 미국 특허 제6,333,410호, 제6,441,163호, 제6,716,821호, 그리고 제7,368,565호에 제공되며, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 포함된다.

[0226]

일반적으로, 수성 완충액에서 항체의 용액은 반응성 기를 보유하는 이황화물 모이어티를 가지는 몰과량(molar excess)의 메이탄시노이드와 함께 배양될 수 있다. 반응 혼합물은 과량의 아민(가령, 에탄올아민, 타우린 등)을 첨가하여 퀀칭(quenching)될 수 있다. 메이탄시노이드-항체 접합체는 이후, 겔 여과에 의해 정제될 수 있다. 항체 분자당 결합되는 메이탄시노이드 분자의 수는 252 nm 및 280 nm에서 흡광도의 비율을 분광학적으로(spectrophotometrically) 측정하여 결정될 수 있다. 평균적으로 1-10개 메이탄시노이드 분자/항체 분자가 이용되고, 그리고 일정한 구체예에서, 평균적으로 2-5개가 이용된다. 메이탄시노이드 분자/항체의 평균 수는 예로써, 약 1-10, 2-5, 3-4, 3.5-4 또는 3.5일 수 있다. 한 양태에서, 메이탄시노이드 분자/항체의 평균 수는 약 3.5 ± 0.5 이다. 한 양태에서, 메이탄시노이드 분자/항체의 평균 수는 약 3.5-4이다.

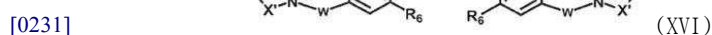
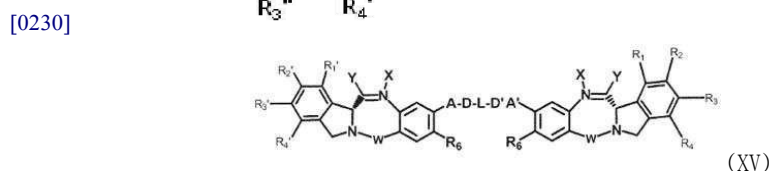
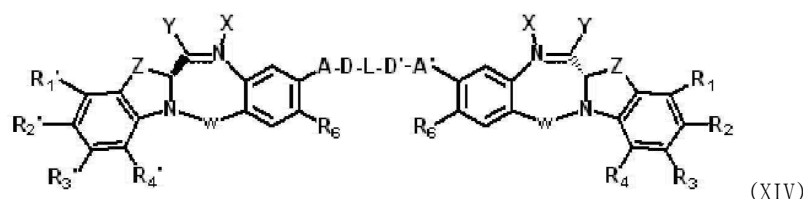
[0227]

메이탄시노이드 약물과 항체의 접합체는 시험관내(in vitro)에서 다양한 원치않는 세포주의 증식을 억제하는 그

들의 능력에 대해 평가될 수 있다. 가령, 인간 KB 세포주와 같은 세포주가 이들 화합물의 세포 독성을 평가하기 위해 쉽게 사용될 수 있다. 평가되는 세포는 이들 화합물에 4 내지 5 일간 노출되고, 그리고 세포의 생존율이 공지의 방법에 의한 직접 분석으로 측정될 수 있다. 이후에, 상기 분석의 결과로부터 IC₅₀ 값이 계산될 수 있다.

[0228] 예로써, 미국 특허 출원 공개 공보 제2010/0203007호에 기술된 벤조디아제핀 화합물(가령, 인돌리노벤조디아제핀 또는 옥사졸리디노벤조디아제핀), 이들의 유도체, 이들의 중간물질 역시 항-FOLR1 항체 단편 또는 접합체를 제조하는데 이용될 수 있다.

[0229] 유용한 벤조디아제핀은 화학식 (XIV), (XV) 및 (XVI)의 화합물, 또는 이들 화합물의 약제학적으로 허용가능한 용매화합물, 염, 수화물 또는 수화된 염, 이들의 광학적 이성질체, 라세체, 부분입체이성질체, 거울상이성질체 또는 이들의 다형적 결정성 구조(polymorphic crystalline structure)를 포함하고, 여기서 이합체 화합물은 임의적으로, 세포 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기를 포함한다.



[0230] 여기서 N과 C 사이에 이중선 $\equiv$ 은 단일 가닥 또는 이중 가닥을 나타내고, 단서로써 이것이 이중 가닥일 때 X는 부재하고 Y는 H이고, 그리고 이것이 단일 가닥일 때, X는 H 또는 화합물을 전구약물로 전환시키는 아민 보호 모이어티(amine protecting moiety)이고;

[0231] Y는 -OR, -OCOR'로 표시되는 에스테르, -OCOOR'로 표시되는 카보네이트, -OCONR'R''로 표시되는 카바메이트, NR'R''로 표시되는 아민 또는 히드록실 아민, -NRCOR'로 표시되는 아마이드, NRCOP로 표시되는 펩티드(여기서 P는 2 내지 20개 아미노산 단위를 내포하는 아미노산 또는 폴리펩티드이다), SR'로 표시되는 티오에테르, SOR'로 표시되는 설포시드, -SO₂R'로 표시되는 설포, 설피트 -SO₃, 비설피트 -OSO₃, 할로젠, 시아노, 아지도, 또는 티올에서 선택되고, 여기서 R, R'과 R''는 동일하거나 상이하고, 그리고 H, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 치환된 또는 치환되지 않은 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알킬닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위(-OCH₂CH₂)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다), 6 내지 10개 탄소 원자를 갖는 아릴, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 헤테로환상 고리에서 선택되고, 여기서 치환기는 할로젠, OR₇, NR₈R₉, NO₂, NRCOR', SR₁₀, SOR'로 표시되는 설포시드, -SO₂R'로 표시되는 설포, 설피트 -SO₃, 비설피트 -OSO₃, SO₂NRR'로 표시되는 설포아미드, 시아노, 아지도, -COR₁₁, OCOR₁₁ 또는 OCONR₁₁R₁₂에서 선택되고, 여기서 R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ 및 R₁₂의 정의는 앞서 제공된 바와 같고, 임의적으로 R'는 OH이고;

[0232] W는 C=O, C=S, CH₂, BH, SO 또는 SO₂이고;

[0233] R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂' 및 R₄'는 각각 독립적으로, H, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 치환된 또는 치환되지 않은 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알킬닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위(-OCH₂CH₂)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다), 또는 할로젠, 구아니디늄[-NH(C=NH)NH₂], OR₇, NR₈R₉, NO₂, NRCOR', SR₁₀, SOR'로 표시되는 설포시드, -SO₂R'로 표시되는 설포, 설피트 -SO₃, 비설피트 -OSO₃, SO₂NRR'로 표시되는 설포아미드, 시아노, 아지도, -COR₁₁, OCOR₁₁ 또는 OCONR₁₁R₁₂에서 선택되는 치환기에서 선택되고, 여기서 R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ 및 R₁₂는 각각 독립적으로, H, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알킬닐, 폴리에

틸렌 글리콜 단위($-\text{OCH}_2\text{CH}_2$)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다), 6 내지 10개 탄소 원자를 갖는 아릴, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 헤테로환상 고리에서 선택되고, 임의적으로 R₁₀은 SR₁₃ 또는 COR₁₃이고, 여기서 R₁₃은 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위($-\text{OCH}_2\text{CH}_2$)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다), 6 내지 10개 탄소 원자를 갖는 아릴, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 헤테로환상 고리에서 선택되고, 임의적으로 R₁₁은 OR₁₄이고, 여기서 R₁₄는 R과 동일한 정의를 갖고, 임의적으로, R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃', 또는 R₄' 중에서 하나는 공유 결합에 의한 세포 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기이거나, 또는 세포 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기를 임의적으로 보유하는 폴리피롤로, 폴리-인돌릴, 폴리-이미다졸릴, 폴리피롤로-이미다졸릴, 폴리-피롤로-인돌릴 또는 폴리이미다졸로-인돌릴 단위에서 선택되고;

[0236] Z는 (CH₂)_n(n은 1, 2 또는 3이다), CR₁₅R₁₆, NR₁₇, O 또는 S에서 선택되고, 여기서 R₁₅, R₁₆ 및 R₁₇은 각각 독립적으로, H, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 폴리에틸렌 글리콜 단위($-\text{OCH}_2\text{CH}_2$)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다)에서 선택되고;

[0237] R₆은 OR, SR 또는 NRR'이고, 여기서 R과 R'는 앞서 제시된 바와 동일한 정의를 갖고;

[0238] X'는 CH₂, NR, CO, BH, SO 또는 SO₂에서 선택되고, 여기서 R은 앞서 제시된 바와 동일한 정의를 갖고;

[0239] Y'는 O, CH₂, NR 또는 S이고, 여기서 R은 앞서 제시된 바와 동일한 정의를 갖고;

[0240] Z'는 CH₂ 또는 (CH₂)_n(여기서 n은 2, 3 또는 4이다)이고, 단서로써 X', Y'와 Z'는 동일한 시점에 모두 CH₂인 것은 아니고;

[0241] A와 A'는 동일하거나 상이하고, 그리고 O, -CRR'O, S, -CRR'S, -NR₁₅ 또는 CRR'NHR₁₅에서 선택되고, 여기서 R과 R'는 앞서 제시된 바와 동일한 정의를 갖고, 그리고 여기서 R₁₅는 R에 대해 앞서 제시된 바와 동일한 정의를 갖고;

[0242] D와 D'는 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로, 할로젠, OR₇, NR₈R₉, NO₂, NRCOR', SR₁₀, SOR'로 표시되는 설펍시드, -SO₂R'로 표시되는 설펍, 설펍트 -SO₃, 비설펍트 -OSO₃, SO₂NRR'로 표시되는 설펍아미드, 시아노, 아지도, -COR₁₁, OCOR₁₁ 또는 OCONR₁₁R₁₂ 중에서 하나로 임의적으로 치환된 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알키닐(여기서 R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ 및 R₁₂의 정의는 앞서 제시된 바와 동일하다), 폴리에틸렌 글리콜 단위($-\text{OCH}_2\text{CH}_2$)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다)에서 선택되고;

[0243] L은 임의적 페닐 기, 또는 임의적으로 치환되는 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 헤테로환 고리이고, 여기서 치환기는 공유 결합에 의한 세포 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기이거나, 또는 할로젠, OR₇, NR₈R₉, NO₂, NRCOR', SR₁₀, SOR'로 표시되는 설펍시드, -SO₂R'로 표시되는 설펍, 설펍트 -SO₃, 비설펍트 -OSO₃, SO₂NRR'로 표시되는 설펍아미드, 시아노, 아지도, -COR₁₁, OCOR₁₁ 또는 OCONR₁₁R₁₂ 중에서 하나로 임의적으로 치환된 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알키닐(여기서 R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ 및 R₁₂의 정의는 앞서 제시된 바와 동일하다), 폴리에틸렌 글리콜 단위($-\text{OCH}_2\text{CH}_2$)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다)에서 선택되고; 임의적으로, L은 그 자체로, 공유 결합에 의한 세포 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기이고; 단서로써, 상기 화합물은 공유 결합에 의한 세포 결합체의 결합을 가능하게 하는 단지 하나의 연결기를 갖는다.

[0244] 한 양태의 화합물, 또는 이들 화합물의 약제학적으로 허용가능한 용매화합물, 염, 수화물 또는 수화된 염, 이들의 광학적 이성질체, 라셈체, 부분입체이성질체, 거울상이성질체 또는 이들의 다형적 결정성 구조(polymorphic crystalline structure)에서, N과 C 사이에 이중선 $\equiv$ 은 단일 가닥 또는 이중 가닥을 나타내고, 단서로써 이것이 이중 가닥일 때 X는 부재하고 Y는 H이고, 그리고 이것이 단일 가닥일 때, X는 H 또는 화합물을 전구약물로 전환시키는 아민 보호 기이고;

[0245] Y는 -OR, NR'R", 설펍트 -SO₃, 또는 비설펍트 -OSO₃에서 선택되고, 여기서 R은 H, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖

는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알킬닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위($-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다), 6 내지 10개 탄소 원자를 갖는 아릴, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 헤테로환상 고리에서 선택되고;

[0246] W는 C=O, CH₂ 또는 SO₂이고;

[0247] R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' 및 R₄'는 각각 독립적으로 H, NO₂ 또는 공유 결합에 의한 세로 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기에서 선택되고;

[0248] R₆은 OR₁₈이고, 여기서 R₁₈은 R과 동일한 정의를 갖고;

[0249] Z는 (CH₂)_n(여기서 n은 1, 2 또는 3이다), CR₁₅R₁₆, NR₁₇, O 또는 S에서 선택되고, 여기서 R₁₅, R₁₆ 및 R₁₇은 각각 독립적으로 H, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 폴리에틸렌 글리콜 단위($-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다)에서 선택되고;

[0250] X'는 CH₂, 또는 C=O에서 선택되고;

[0251] Y'는 O, NR, 또는 S이고, 여기서 R은 앞서 기술된 바와 같이 정의되고;

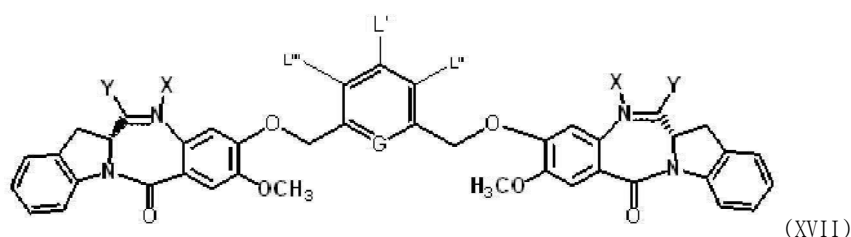
[0252] Z'는 CH₂ 또는 (CH₂)₂이고;

[0253] A와 A'는 각각 O이고;

[0254] D와 D'는 동일하거나 상이하고, 그리고 독립적으로, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알킬닐에서 선택되고;

[0255] L은 임의적 폐닐 기, 또는 임의적으로 치환되는 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 헤테로환 고리이고, 여기서 치환기는 공유 결합에 의한 세로 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기이거나, 또는 할로젠, OR₇, NR₈R₉, NO₂, NRCOR', SR₁₀, SOR'로 표시되는 설폭시드, $-\text{SO}_2\text{R}'$ 로 표시되는 설폰, 설퍼트 $-\text{SO}_3$, 비설퍼트 $-\text{OSO}_3$, $\text{SO}_2\text{NRR}'$ 로 표시되는 설포아미드, 시아노, 아지도, $-\text{COR}_{11}$, OCOR_{11} 또는 $\text{OCONR}_{11}\text{R}_{12}$ 중에서 하나로 임의적으로 치환된 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알킬닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위($-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$)_n(여기서 n은 1 내지 2000의 정수이다)에서 선택되고; 임의적으로, L은 그 자체로, 공유 결합에 의한 세로 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기이다.

[0256] 다른 양태에서, 화합물은 화학식 (XVII)로 표시된다:



[0257]

[0258] 여기서 N과 C 사이에 이중선 $\equiv$ 은 단일 가닥 또는 이중 가닥을 나타내고, 단서로써 이것이 이중 가닥일 때 X는 부재하고 Y는 H이고, 그리고 이것이 단일 가닥일 때, X는 H 또는 화합물을 전구약물로 전환시키는 아민 보호 기이고, 그리고 Y는 OH, $-\text{OR}$ 로 표시되는 에테르, 설퍼트 $-\text{SO}_3$, 또는 비설퍼트 $-\text{OSO}_3$ 에서 선택되고, 여기서 R은 1 내지 10개 탄소 원자를 보유하는 선형, 분지형 또는 환상 알킬, 알케닐 또는 알킬닐에서 선택되고;

[0259] R₂, R₃ 중에서 하나는 공유 결합에 의한 세로 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기이고, 나머지 하나는 H이고,

[0260] L', L'' 또는 L''' 중에서 하나는 세로 결합체에 결합을 가능하게 하는 연결기이고, 반면 다른 것들은 H이고; L'는 연결기일 수 있고, 그리고 G는 CH 또는 N이다. 다른 실례는 미국 특허 출원 제61/150,201호에서 기술되고, 이의 전체 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다. 따라서, 일정한 구체예에서, 항체 huMov19는 상기 XIX-XXII에서 제시된 구조를 갖는 벤조디아제펜에 접합된다. 다른 구체예에서, 항체 FR-1-21은 상기 XIX-

XXII에서 제시된 구조를 갖는 벤조디아제펜에 접합된다.

IV. 폴리뉴클레오티드

일정한 구체예에서, 본 발명은 인간 FOLR1 수용체에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 이런 폴리펩티드의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다. 가령, 본 발명은 인간 FOLR1에 대한 항체를 암호화하거나 이런 항체의 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제시한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RNA의 형태이거나 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 cDNA, 유전체 DNA, 그리고 합성 DNA를 포함하며; 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있고, 단일 가닥일 경우에는 암호화 가닥 또는 비-암호화(안티-센스) 가닥일 수 있다.

일정한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 분리된다. 일정한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 실질적으로 순수하다.

본 발명은 SEQ ID NO: 4, 10, 11, 41, 42, 그리고 88-103으로 구성된 군에서 선택된 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제시한다. 또한, SEQ ID NO: 4, 10, 11, 41, 42, 그리고 88-103에 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제시된다.

폴리뉴클레오티드 SEQ ID NO: 5, 14, 그리고 15는 각각, huMov19 가변 도메인 중쇄, 가변 도메인 경쇄 이형 1.00, 그리고 가변 도메인 경쇄 이형 1.60에 대한 암호화 서열을 포함한다.

또한, 본 발명은 SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48, 그리고 120-127로 구성된 군에서 선택되는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제시한다. 또한, SEQ ID NO: 5, 14, 15, 37, 38, 43, 44, 47, 48, 그리고 120-127에 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드가 제시된다. 따라서, 일정한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 (a) SEQ ID NO: 5에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드, 및/또는 (b) SEQ ID NO: 14 또는 15에 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일정한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 (a) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드; 및/또는 (b) SEQ ID NO: 14 또는 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

일정한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 예로써, 숙주 세포로부터 폴리펩티드의 발현 및 분비를 보조하는 폴리뉴클레오티드(가령, 세포로부터 폴리펩티드의 수송을 제어하기 위한 분비 서열로서 기능하는 선도 서열)에 동일한 해독 틀(reading frame) 내에서 융합된 성숙 폴리펩티드에 대한 암호화 서열을 포함한다. 선도 서열을 가지는 폴리펩티드는 전단백질(preprotein)이고, 그리고 성숙 형태의 폴리펩티드를 형성하기 위해 숙주 세포에 의해 절단되는 선도 서열을 가질 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한, 성숙 단백질 + 추가의 5' 아미노산 잔기인 전구단백질(proprotein)을 암호화할 수 있다. 전구서열(presequence)을 갖는 성숙 단백질은 전구단백질이고, 그리고 비활성 형태의 단백질이다. 일단 전구서열이 절단되면, 활성 성숙 단백질이 남게 된다.

일정한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 동일한 해독 틀 내에서, 예로써 암호화된 폴리펩티드의 정제를 가능하게 하는 마커 서열에 융합된 성숙 폴리펩티드에 대한 암호화 서열을 포함한다. 가령, 마커 서열은 박테리아 숙주의 경우에 마커에 융합된 성숙 폴리펩티드의 정제를 제공하기 위해 pQE-9 벡터에 의해 공급된 헥사히스티딘 태그일 수 있거나, 또는 마커 서열은 포유류 숙주(가령, COS-7 세포)가 이용될 때, 인플루엔자 적혈구응집소 단백질로부터 유래된 적혈구응집소(HA) 태그일 수 있다.

본 발명은 추가로 예로써, 단편, 유사체, 그리고 유도체를 암호화하는 상기에 기술된 폴리뉴클레오티드의 변이체와 관련된다.

폴리뉴클레오티드 변이체는 암호화 영역, 비-암호화 영역, 또는 둘 모두에 변이를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 침묵(silent) 치환, 부가, 또는 결실을 생성하는 변이를 포함하지만, 암호화된 폴리펩티드의 특성 또는 활성을 변화시키지 않는다. 일부 구체예에서, 뉴클레오티드 변이체는 유전자 코드의 축퇴로 인한 침묵 치환에 의해 생산된다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 다양한 이유로, 예를 들면, 특정 숙주에 대한 코돈 발현을 최적화하기 위해(인간 mRNA에서 코돈을 대장균(*E. coli*)과 같은 박테리아 숙주에서 선호되는 것들로 변화시키기 위해) 생산될 수 있다.

- [0271] 본 명세서에 기술된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 세포가 또한 제시된다.
- [0272] **V. 이용 방법 및 약제학적 조성물**
- [0273] 본 발명의 FOLR1-결합제(항체, 면역접합체, 그리고 폴리펩티드를 포함)는 치료적 처리 방법, 예를 들면, 암의 치료를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 적용 분야에서 유용하다. 일정한 구체예에서, 작용제는 종양 성장 억제, 분화 유발, 종양 부피 감소, 및/또는 종양의 종양원성 감소를 위해 유용하다. 사용 방법은 시험관내(*in vitro*), 생체외(*ex vivo*), 또는 생체내(*in vivo*) 방법일 수 있다. 일정한 구체예에서, FOLR1-결합제 또는 항체 또는 면역접합체, 또는 폴리펩티드는 이것이 결합하는 인간 FOLR1의 길항제이다.
- [0274] 한 양태에서, 본 발명의 항-FOLR1 항체 및 면역접합체는 생물학적 샘플에서 FOLR1의 존재를 검출하기 위해 유용하다. 본 명세서에 사용된 용어 "검출"은 정량적 또는 정성적 검출을 포괄한다. 일정한 구체예에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직을 포함한다. 일정한 구체예에서, 이런 조직은 다른 조직에 비해 FOLR1을 높은 수준으로 발현하는 정상 및/또는 암성 조직을 포함한다. 일정한 구체예에서, FOLR1 과다발현은 난소 암, 폐 암, 뇌 암, 유방 암, 자궁 암, 신장 암 또는 췌장 암의 존재를 검출한다.
- [0275] 한 양태에서, 본 발명은 생물학적 샘플에서 FOLR1의 존재를 검출하는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 FOLR1에 항-FOLR1 항체의 결합을 허용하는 조건하에 생물학적 샘플을 항-FOLR1 항체와 접촉시키는 단계 및 항-FOLR1 항체 및 FOLR1 사이에 복합체가 형성되었는지 검출하는 단계를 포함한다.
- [0276] 한 양태에서, 본 발명은 FOLR1의 증가된 발현과 연관된 장애를 진단하는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 검사 세포를 항-FOLR1 항체와 접촉시키는 단계; FOLR1에 항-FOLR1 항체의 결합을 검출하여 검사 세포의 FOLR1 발현 수준(정량적이거나 정성적으로)을 결정하는 단계; 및 검사 세포의 FOLR1 발현 수준을 대조 세포(가령, 검사 세포와 동일한 조직 기원의 정상 세포 또는 이런 정상 세포에 필적하는 수준으로 FOLR1을 발현하는 세포)의 FOLR1 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 대조 세포와 비교하여 검사 세포의 더욱 높은 수준의 FOLR1의 발현은 FOLR1의 증가된 발현과 연관된 장애의 존재를 나타낸다. 일정한 구체예에서, 검사 세포는 FOLR1의 증가된 발현과 연관된 장애를 가지는 것으로 의심되는 개체로부터 취득된다. 일정한 구체예에서, 상기 장애는 암 또는 종양과 같은 세포 증식성 장애이다.
- [0277] 일정한 구체예에서, 상기 기술된 것과 같은 진단 또는 검출의 방법은 세포 표면 상에서, 또는 표면에 FOLR1을 발현하는 세포에서 얻은 막 표본에서 발현된 FOLR1에 항-FOLR1 항체의 결합을 검출하는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, 상기 방법은 FOLR1에 항-FOLR1 항체의 결합을 허용하는 조건하에 세포를 항-FOLR1 항체와 접촉시키는 단계, 그리고 세포 표면 상에 항-FOLR1 항체 및 FOLR1 사이에 복합체가 형성되는지를 검출하는 단계를 포함한다. 세포의 표면에 발현된 FOLR1에 항-FOLR1 항체의 결합을 검출하기 위한 예시적인 분석은 "FACS" 분석이다.
- [0278] 특정한 다른 방법이 FOLR1에 항-FOLR1 항체가 결합한 것을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 이런 방법은 당해 분야에 널리 공지된 항원-결합 분석, 예를 들면, 웨스턴 블롯, 방사면역분석법, ELISA(효소-결합 면역흡착 분석), "샌드위치" 면역분석, 면역침강 분석, 형광 면역분석, 단백질 A 면역분석, 그리고 면역조직화학염색법(immunohistochemistry, IHC)을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다.
- [0279] 일정한 구체예에서, 항-FOLR1 항체는 표지된다. 표지는 직접 검출되는 표지 또는 모이어티(가령, 형광, 발색(chromophoric), 전자-고밀도, 화학발광, 그리고 방사성 표지)뿐만 아니라 예로써, 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출되는 효소 또는 리간드와 같은 모이어티를 포함하지만 이들에 제한되지 않는다.
- [0280] 일정한 구체예에서, 항-FOLR1 항체는 불용성 매트릭스 상에 고정화된다. 고정화는 항-FOLR1 항체를 용액에 유리 상태로 남아있는 임의의 FOLR1로부터 분리시키는 단계를 수반한다. 이는 통상적으로, 분석 절차 전에, 물-불용성 매트릭스 또는 표면에 흡착(Bennich et al., 미국 특허 제3,720,760호), 또는 공유 커플링(가령, 글루타르알데히드 가교 연결을 이용함)에 의해 항-FOLR1 항체를 불용성화하거나, 또는 예로써, 면역침강법으로 항-FOLR1 항체 및 FOLR1 사이에 복합체의 형성후 항-FOLR1 항체를 불용성화함으로써 달성된다.
- [0281] 진단 또는 검출의 상기 구체예 중 임의의 하나는 본 발명의 면역접합체를 항-FOLR1 항체 대신에 또는 이에 부가하여 사용하여 수행될 수 있다.
- [0282] 일정한 구체예에서, FOLR1-결합제 또는 길항제(가령, huMov19 항체 또는 면역접합체)로 치료되는 질병은 암이다. 일정한 구체예에서, 암은 FOLR1-결합제(가령, 항체)가 결합하는 엽산염 수용체 1을 발현하는 종양으로 특징지어진다.

- [0283] 본 발명은 치료 효과량의 FOLR1-결합제를 개체(가령, 치료를 필요로 하는 개체)에 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일정한 구체예에서, 암은 결장직장 암, 췌장 암, 폐 암, 난소 암, 간 암, 유방 암, 뇌 암, 신장 암, 전립선 암, 위장 암, 흑색종, 자궁경부 암, 방광 암, 교아종, 그리고 두경부 암으로 구성된 군에서 선택되는 암이다. 일정한 구체예에서, 암은 난소 암이다. 일정한 구체예에서, 암은 폐 암이다. 일정한 구체예에서, 개체는 인간이다.
- [0284] 본 발명은 추가로 본 명세서에 기술된 항체 또는 다른 작용제를 이용하여 종양 성장을 억제하기 위한 방법을 제공한다. 일정한 구체예에서, 종양 성장을 억제하기 위한 방법은 세포를 FOLR1-결합제(가령, 항체)와 시험관내(*in vitro*)에서 접촉시키는 단계를 포함한다. 가령, FOLR1을 발현하는 불멸화된 세포주 또는 암 세포주는 종양 성장을 억제하기 위한 항체 또는 다른 작용제가 첨가된 배지에서 배양된다. 일부 구체예에서, 종양 세포는 예로써, 조직 생검, 흉수(pleural effusion), 또는 혈액 샘플과 같은 환자의 샘플로부터 분리되고 종양 성장을 억제하기 위한 FOLR1-결합제가 첨가된 배지에서 배양된다.
- [0285] 일부 구체예에서, 종양 성장을 억제하는 방법은 종양 또는 종양 세포를 FOLR1-결합제(가령, 항체)와 생체내(*in vivo*)에서 접촉시키는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, FOLR1-결합제와 종양 또는 종양 세포의 접촉은 동물 모델에서 수행된다. 가령, FOLR1-결합제는 면역억제된(immunocompromised) 마우스(가령, NOD/SCID 마우스)에서 성장한, 하나 이상의 FOLR1을 발현하는 이종이식편에 종양 성장을 억제하기 위해 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 암 줄기 세포는 예로써, 조직 생검, 흉수, 또는 혈액 샘플과 같은 환자의 샘플로부터 분리되고 종양 세포 성장을 억제하기 위해 이후에 FOLR1-결합제가 투여되는 면역억제된(immunocompromised) 마우스에 주입된다. 일부 구체예에서, FOLR1-결합제는 종양원성 세포를 동물에 도입하는 것과 동시에 또는 그 직후에, 종양 성장을 억제하기 위해 투여된다. 일부 구체예에서, FOLR1-결합제는 종양원성 세포가 특정 크기까지 성장한 후에 치료제로서 투여된다.
- [0286] 일정한 구체예에서, 종양 성장을 억제하는 방법은 치료 효과량의 FOLR1-결합제를 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, 개체는 인간이다. 일정한 구체예에서, 개체는 종양을 앓고 있거나 종양을 제거한 적이 있다.
- [0287] 일정한 구체예에서, 종양은 FOLR1-결합제 또는 항체가 결합하는 엽산염 수용체를 발현한다. 일정한 구체예에서, 종양은 인간 FOLR1을 과발현한다.
- [0288] 일정한 구체예에서, 종양은 뇌 종양, 결장직장 종양, 췌장 종양, 폐 종양, 난소 종양, 간 종양, 유방 종양, 신장 종양, 전립선 종양, 위장 종양, 흑색종, 자궁경부 종양, 방광 종양, 교아종, 그리고 두경부 종양으로 구성된 군에서 선택되는 종양이다. 일정한 구체예에서, 종양은 난소 종양이다.
- [0289] 그 외에도, 본 발명은 치료 효과량의 FOLR1-결합제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 종양의 종양원성을 감소시키는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, 종양은 암 줄기 세포를 포함한다. 일정한 구체예에서, 종양에서 암 줄기 세포의 빈도가 상기 작용제의 투여에 의해 감소된다.
- [0290] 따라서, 일정한 구체예에서, 본 발명은 huMov19 항체 및 면역접합체를 이용하여 암을 치료하는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, huMov19 면역접합체는 huMov19-SPDB-DM4; huMov19-설포-SPP-DM1; huMov19-SPP-DM1; 또는 huMov19-PEG4-Mal-DM4이다.
- [0291] 본 발명은 추가로 예로써, FOLR1-결합제를 종양원성 세포를 포함하는 종양을 앓거나 이런 종양을 제거한 적이 있는 개체에 투여함으로써 종양원성 세포를 FOLR1-결합제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양원성 세포를 비-종양원성 세포로 분화시키는 방법을 제시한다. 일정한 구체예에서, 종양원성 세포는 난소 종양 세포이다.
- [0292] 본 발명은 추가로 간질을 효과량의 FOLR1-결합제, 폴리펩티드 또는 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 고형 종양의 간질(stroma)에서 근섬유아세포 활성화를 감소시키는 방법을 제시한다.
- [0293] 본 발명은 추가로 본 명세서에 기술된 하나 이상의 FOLR1-결합제를 포함하는 약제학적 조성물을 제시한다. 일정한 구체예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 비히클(vehicle)을 추가로 포함한다. 이들 약제학적 조성물은 인간 환자에서 종양 성장을 억제하고 암을 치료하는데 사용된다.
- [0294] 일정한 구체예에서, 본 발명의 정제된 항체 또는 작용제를 약제학적으로 허용가능한 비히클(가령, 담체, 부형제)과 화합시켜 저장 및 사용을 위한 제제가 제조된다(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000). 적절한 약제학적으로 허용가능한 비히클은 무독성 완충액, 예를 들면, 포스페이트, 시트레이트, 그리고 다른 유기산; 염화나트륨과 같은 염; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산

화제; 보존제(가령, 염화옥타데실디메틸벤질 암모늄; 염화헥사메토늄; 염화벤잘코늄; 염화벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들면, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜(catechol); 레조르시놀(resorcinol); 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레솔(cresol)); 저분자량 폴리펩티드(가령, 약 10개 미만의 아미노산 잔기); 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 아미노산, 예를 들면, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 탄수화물, 예를 들면, 당당류, 이당류, 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; EDTA와 같은 킬레이트화제(chelating agent); 당, 예를 들면, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 나트륨과 같은 염-형성 반대-이온(counter-ion); 금속 복합체(가령, Zn-단백질 복합체); 및 비-이온성 계면활성제, 예를 들면, TWEEN 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다.

[0295] 본 발명의 약제학적 조성물은 국소 또는 전신 치료를 위한 수많은 경로로 투여될 수 있다. 투여는 국소(가령, 질과 직장 수송을 비롯한 점막으로), 예를 들면, 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점안액, 좌제, 스프레이, 액체 및 분말; 폐(가령, 흡입기(nebulizer)에 의한 것을 비롯한 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 취입을 포함; 기관내, 비강내, 상피 및 경피); 경구; 또는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입을 비롯한 비경구; 또는 두개내(intracranial)(가령, 척추강내 또는 뇌실내) 투여될 수 있다.

[0296] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 약제학적 복합 제제, 또는 복합 요법으로서 투약 섭생에서, 항-암 특성을 가지는 2차 화합물과 화합될 수 있다. 약제학적 복합 제제 또는 투약 섭생의 2차 화합물은 서로 부정적인 영향을 주지 않도록 이러한 조합의 ADC에 대해 상호보완적인 활성을 가진다. FOLR1-결합체 및 2차 항암제를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 제시된다.

[0297] 질병의 치료를 위해, 본 발명의 항체 또는 작용제의 적절한 투여량은 치료하는 담당의의 재량에서, 치료되는 질병의 유형, 질병의 심각도 및 경과, 항체 또는 작용제가 치료적 또는 예방적 목적으로 투여되는지에 상관없이 질병의 반응성, 선행 치료, 환자의 임상 이력 등에 좌우된다. 항체 또는 작용제는 한 번에, 또는 수일 내지 수 개월에 이르는 일련의 치료를 거쳐 투여되거나, 또는 치유가 달성되거나 질병 상태의 축소(가령, 종양 크기의 감소)가 달성될 때까지 투여될 수 있다. 최적의 투약 스케줄은 환자의 체내에서 약물 축적의 측정으로부터 계산될 수 있고 개별 항체 또는 작용제의 상대적인 효력에 따라 달라질 것이다. 투여 담당의는 최적 투여량, 투약 방법 및 반복 횟수를 쉽게 결정할 수 있다. 일정한 구체예에서, 투여량은 체중의 kg당 0.01 μ g 내지 100 mg이고, 하루, 매주, 매달 또는 매년 한 번 이상 제공될 수 있다. 일정한 구체예에서, 항체 또는 다른 FOLR1-결합체는 2주마다 한 번 또는 3주마다 한 번 제공된다. 일정한 구체예에서, 항체 또는 다른 FOLR1-결합체의 투여량은 체중의 kg당 약 0.1 mg 내지 약 20 mg이다. 치료 담당의는 체액 또는 조직 내에서 약물의 측정된 체류 시간(residence time)과 농도를 기초로 하여 투약을 위한 반복 횟수를 예측할 수 있다.

[0298] 복합 요법은 "상승(synergy)"을 제공하고 "상승적(synergistic)"인 것으로 입증될 수 있다, 다시 말하면, 활성 성분들을 함께 사용할 때 얻어진 효과가 이들 화합물을 개별적으로 사용하여 도출된 효과의 합보다 더욱 크다. 상승적 효과는 활성 성분들이 (1) 조합된, 단일 투여 제제로 동시-제제화되고 동시에 투여되거나 수송되거나; (2) 개별 제제로서 교대로 또는 나란히 수송되거나; 또는 (3) 일부 다른 섭생에 의해 수송될 때 얻어질 수 있다. 교대 요법으로 수송되는 경우에, 상승적 효과는 화합물들이 예로써, 개별 주사기에서 상이한 주입에 의해 순차적으로 투여되거나 수송될 때 얻어질 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 동안, 각 활성 성분의 효과적 투여량은 순차적으로, 즉, 일련으로 투여되는 반면, 복합 요법에서, 둘 이상의 활성 성분의 효과적 투여량은 함께 투여된다.

[0299] VI. FOLR1 결합체를 포함하는 키트

[0300] 본 발명은 본 명세서에 기술된 방법을 수행하기 위해 사용될 수 있는, 본 명세서에 기술된 항체, 면역접합체 또는 다른 작용제를 포함하는 키트를 제시한다. 일정한 구체예에서, 키트는 하나 이상의 용기(container) 내에 인간 염색체 수송체 1에 대한 적어도 하나의 정제된 항체를 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 모든 대조, 분석을 수행하기 위한 지시, 그리고 분석을 위해 필요한 임의의 소프트웨어 및 결과의 표시를 비롯하여, 검출 분석을 수행하기 위해 필요한 및/또는 충분한 모든 성분을 포함한다. 당업자는 본 발명의 개시된 항체, 면역접합체 또는 다른 작용제가 당해 분야에 널리 공지된 공인된 키트 형식 중에서 하나로 쉽게 포함될 수 있음을 쉽게 인식할 것이다.

[0301] FOLR1-결합체(가령, FOLR1-결합 항체)뿐만 아니라 2차 항암제를 포함하는 키트가 추가로 제시된다. 일정한 구체예에서, 2차 항암제는 화학치료제(가령, 젬시타빈 또는 이리노테칸)이다.

- [0302] 본 개시의 구체예는 본 개시의 특정 항체의 제조 및 본 개시의 항체를 사용하기 위한 방법을 상세하게 기술하는 다음의 무제한적 실시예를 참조로 하여 더욱 규정될 수 있다. 재료 및 방법 둘 모두에 대한 많은 변형이 본 개시의 범위에서 벗어남 없이 실시될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0303] 실시예
- [0304] 본 명세서에 기술된 실시예 및 구체예는 단지 예시를 목적으로 하고, 그리고 이에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당해 분야의 기술자에게 제안될 것이며 본 출원의 사상 및 이해 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다.
- [0305] 실시예 1
- [0306] 쥐 단일클론성 항체 Mov19의 키메라화
- [0307] Mov19에 대한 가변 영역 아미노산 서열은 NCBI 데이터베이스(경쇄의 경우에 접근 번호 CAA68253(SEQ ID NO:24) 및 중쇄의 경우에 CAA68252(SEQ ID NO:23))로부터 획득되고, 이후 코돈-최적화되고 Blue Heron Biotechnology에 의해 합성되었다. 경쇄 가변 영역은 pAbKZeo 플라스미드의 EcoRI와 BsiWI 부위 내로 클로닝되고, 그리고 중쇄 가변 영역은 pAbG1Neo 플라스미드의 HindIII와 ApaI 부위 내로 클로닝되었다.
- [0308] 실시예 2
- [0309] 쥐 단일클론성 항체 Mov19와 FR1-21의 인간화
- [0310] Mov19 항체는 기존 문헌에서 기술된 프레임워크 재표면처리 방법에 따라 인간화되었다(Roguska M. et. al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 Feb; 91:969-973 및 Roguska et al., *Protein Eng.* 9(10):895-904 (1996)). 간단히 말하면, 각 가변 영역 프레임워크 잔기에 대한 평균 용매 접근성(average solvent accessibility)은 PDB 데이터베이스로부터 밀접하게 관련된 해결된 항체 구조를 이용하여 계산되고, 그리고 30% 이상의 평균 접근성을 갖는 위치는 표면 잔기로서 표시되었다(Pedersen J.T. et. Al, *J. Mol. Biol.* 1994; 235: 959-973). 인간 표면 치환 서열은 Kabat 데이터베이스에서 인간 항체 생식계열 서열의 상응하는 위치와 함께 쥐 항체 서열의 표면 위치를 정렬함으로써 선별되었다(Johnson, G. and Wu, T. T. (2001) *Nucleic Acids Research*, 29: 205-206). 가장 상동한 인간 경쇄 가변 영역 표면(클론 DPK19, Mov19의 경우에 IMGT 좌위 IGKV2D-30*01 및 FR1-21의 경우에 IMGT 좌위 IGKV1/OR2-0*01), 그리고 가장 상동한 인간 중쇄 가변 영역 표면(클론 8M27, Mov19의 경우에 IMGT 좌위 IGHV1-69*08 및 FR1-21의 경우에 IMGT 좌위 IGHV5-51*02)은 쥐 Mov19 프레임워크 표면 위치를 대체하기 위해 선별되고, 6개 CDR(표 1)은 변화없이 남겨졌다. 쥐와 인간 Mov19과 FR1-21 표면 위치와 잔기는 도 1A-D에 제공된다.
- [0311] [표 1A]
- [0312] 재표면처리를 위해 정의된 Mov19와 FR1-21 경쇄와 중쇄 CDR이 제공된다. 중쇄 CDR2에 대한 Kabat 정의 역시 쥐와 인간 항체 둘 모두에 대해 제공된다.

Mov19 CDR	FR1-21 CDR
경쇄	경쇄
CDR1: KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7)	CDR1: KASDHINNWL(A SEQ ID NO:27)
CDR2: RASNLEA(SEQ ID NO:8)	CDR2: GATSLET(SEQ ID NO:28)
CDR3: QQSREYPTT(SEQ ID NO:9)	CDR3: QQWSTPFT(SEQ ID NO:29)
중쇄	중쇄
CDR1: GYFMN(SEQ ID NO:1)	CDR1: SSYGMS(SEQ ID NO:30)
CDR2 (AbM): RIHPYDGDTF (SEQ ID NO:131)	CDR2 (AbM): TISSGGSYTY(SEQ ID NO:31)
CDR3: YDGSRANDY(SEQ ID NO:3)	CDR3: DGEGLYAMDY(SEQ ID NO:32)
Kabat 정의된 Mov19 HC CDR2	Kabat 정의된 FR1-21 HC CDR2
쥐	쥐
HC CDR2: RIHPYDGDTFYNQNFKD(SEQ ID NO:128)	HC CDR2: TISSGGSYTYYPDGVKG(SEQ ID NO:33)
인간	인간
HC CDR2: RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:2)	HC CDR2: TISSGGSYTYSPGFQG(SEQ ID NO:34)

[0313]

[0314]

잔기 변화 중에서 어느 것도 Mov19 또는 FR1-21 CDR과 염산염 수용체 1 상에서 그들의 표적 에피토프와의 상호 작용에 영향을 주는 우려를 야기하지 않았고, 따라서 어떤 표면 복귀 돌연변이(surface back mutation)도 어느 한쪽 항체의 인간화된 서열에 대해 고려되지 않았다. 하지만, 재표면처리된 Mov19 서열은 경쇄 N74에서 공통 N-연결된 당화 부위(경쇄 이형 1.00)를 도입하고, 따라서 이러한 부위를 제거하기 위해 두 번째 인간화된 경쇄 이형이 만들어졌다. Kabat 인간 경쇄 서열 데이터베이스의 재검토는 트레오닌이 경쇄 위치 74에서 발견되는 가장 일반적인 잔기이고, 따라서 인간화된 Mov19 경쇄 이형 1.60이 위치 74에서 트레오닌으로 만들어진다는 것을 노출시켰다. 위치 74는 표면 잔기가 아니고, 따라서 이러한 잔기 치환은 재표면처리에 의해 인간화에 영향을 주지 않는다. 쥐와 인간화된 Mov19, 그리고 FR1-21의 가변 영역 서열의 배열은 도 2에 제공된다.

[0315]

인간화된 Mov19과 FR1-21에 대한 가변 영역 서열은 코돈-최적화되고 Blue Heron Biotechnology에 의해 합성되었다. 이들 서열은 단일 사슬 포유류 발현 플라스미드에서 개별 불변 서열과의 인-프레임(in-frame) 클로닝을 용이하게 하기 위해 제한 효소 부위(restriction enzyme site)와 접한다. 경쇄 가변 영역은 pAbKZeo 플라스미드의 EcoRI와 BsiWI 부위 내로 클로닝되었다. huMov19 경쇄를 암호화하는 결과의 플라스미드 DNA는 ATCC 수탁 번호 PTA-10773과 PTA-10774로서 ATCC에 기탁되고, huFR1-21 경쇄를 암호화하는 결과의 플라스미드 DNA는 ATCC 수탁 번호 PTA-10776로서 기탁되었다. 중쇄 가변 영역은 pAbG1Neo 플라스미드의 HindIII와 ApaI 부위 내로 클로닝되었다. huMov19 중쇄를 암호화하는 결과의 플라스미드 DNA는 ATCC 수탁 번호 PTA-10772로서 ATCC에 기탁되고, 그리고 huFR1-21 중쇄를 암호화하는 결과의 플라스미드 DNA는 ATCC 수탁 번호 PTA-10775로서 기탁되었다. 이들 플라스미드는 이후, huMov19를 생산하기 위해 실시예 3에서 기술된 바와 같이 형질감염되었다. 어느 한쪽 huMov19 경쇄를 암호화하는 플라스미드(즉, ATCC 수탁 번호 PTA-10773 또는 PTA-10774로서 기탁됨)는 본 명세서에서 제시되고 당업자에게 널리 공지된 방법에 따라, huMov19 항체를 산출하기 위해, huMov19 중쇄를 암호화하는 플라스미드와 대합(pairing)될 수 있다.

[0316]

실시예 3

[0317]

재조합 항체 발현

[0318]

키메라와 인간화된 항체 구조체는 스피너 플라스크(spinner flask)에서, 표준 인산칼슘 절차(BD Biosciences, CalPhos Mammalian Transfection Kit, Cat # 631312)를 이용하여 유착성 HEK-293T 세포에서, 또는 변형된 PEI 절차[Durocher Y, Perret S, Kamen A High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. Nucleic Acids Res. 2002 Jan 15;30(2):E9]를 이용하여 현탁 적응된 HEK-293T 세포에서 일시적으로 생산되었다. PEI 일시적 형질감염은 HEK-293T 세포가 Freestyle 293(Invitrogen)에서 성장되고 배양 부피(culture volume)가 PEI-DNA 복합체의 첨가 후 회석 없이 남겨진다는 점을 제외하고, 기존 문헌에서 기술된 바와 같이 수행되었다(Durocher, Y. et al.,

Nucleic Acids Res. 30(2):E9 (2002)), 유착성과 현탁 일시적 형질감염체 둘 모두 1주일 동안 배양되고, 이후 투명한 상층액은 하기에 기술된 바와 같이, 단백질을 A 칼럼, 그 이후에 CM 칼럼 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 도 3에 도시된 바와 같이, huMov19의 발현은 형질감염된 세포에서 키메라 Mov19의 발현보다 적어도 10배 높았다.

[0319] 실시예 4

[0320] 항체 정제

[0321] 항체는 표준 방법, 예를 들면, 단백질을 A 또는 G 크로마토그래피(HiTrap 단백질을 A 또는 G HP, 1 ml, Amersham Biosciences)를 이용하여, 투명한 세포 배양 상층액으로부터 정제되었다. 간단히 말하면, 상층액은 1/10 부피의 1 M Tris/HCl 완충액, pH 8.0의 첨가에 의한 크로마토그래피를 위해 준비되었다. pH-조정된 상층액은 0.22 μ m 필터 막을 통해 여과되고 결합 완충액(PBS, pH 7.3)으로 평형화된 칼럼 위에 적하되었다. 칼럼은 280 nm에서 흡광도 없음으로 안정된 기준선이 획득될 때까지 결합 완충액으로 세척되었다. 항체는 0.5 ml/min의 유속(flow rate)을 이용하여, 0.15 M NaCl, pH 2.8을 내포하는 0.1 M 아세트산 완충액으로 용리되었다. 대략 0.25 ml의 분획(fraction)이 수집되고 1/10 부피의 1M Tris/HCl, pH 8.0의 첨가에 의해 중화되었다. 피크 분획(들)은 하룻밤동안 1x PBS에 대해 2회 투석되고, 그리고 0.2 μ m 필터 막을 통해 여과함으로써 멸균되었다. 정제된 항체는 A₂₈₀에서 흡광도에 의해 정량되었다.

[0322] 단백질을 A 정제된 분획은 카복시메틸(CM) 크로마토그래피와 함께 이온 교환 크로마토그래피(IEX)를 이용하여 더욱 정제되었다. 간단히 말하면, 단백질을 A 정제로부터 샘플은 출발 완충액(10 mM 인산칼륨, 10 mM 염화나트륨, pH 7.5) 내로 완충액 교환되고 0.22 μ m 필터를 통해 여과되었다. 준비된 샘플은 이후, 120 cm/hr의 유속에서 출발 완충액으로 평형화된 CM fast flow 수지(GE lifesciences) 위에 적하되었다. 칼럼 크기는 샘플 내에 모든 항체에 결합할 만큼 충분한 수용력을 갖도록 선택되었다. 칼럼은 이후, 280 nm에서 흡광도 없음으로 안정된 기준선이 획득될 때까지 결합 완충액으로 세척되었다. 항체는 20 칼럼 부피(column volume, CV)에서 10 mM로부터 500 mM 염화나트륨으로 구배를 개시함으로써 용리되었다. 50 mAU의 주요 피크를 초과하는 UV 시도를 갖는 분획은 수집되었다. 순도(단량체와 가용성 고분자량 집합체의 백분율)는 Agilent HPLC 1100 시스템(Agilent, Santa Clara, CA)을 이용하여, SWXL 가드 칼럼(guard column), 6.0 x 40 mm(Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA)와 함께 TSK 겔 G3000SWXL, 7.8 x 300 mm에서 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 평가되었다. 원하는 순도(>95%)를 갖는 분획은 모아지고, TFF 시스템을 이용하여 PBS(pH 7.4)로 완충액 교환되고, 그리고 0.2 μ m 필터 막을 통한 여과에 의해 멸균되었다. 정제된 항체는 SEC에 의해 순도에 대해 더욱 조사되고, 그리고 IgG 농도는 1.47의 소광 계수(extinction coefficient)를 이용하여 280 nm에서 흡광도 측정(absorbance measurement)에 의해 결정되었다. 필요하면 희석이 이루어졌다. 대안으로, 향상된 선별성(selectivity)으로 쥐와 인간화된 항체 둘 모두를 다듬기 위해 세라믹 히드록시아파티트(HT)가 이용될 수 있다. 40 μ m 입자 크기를 갖는 타입 II HT 수지(Bio-Rad Laboratories)가 IEX 크로마토그래피와 유사한 프로토콜로 항체의 다듬기(polishing)에 적용되었다. HT를 위한 출발 완충액은 20 mM 인산나트륨, pH 7.0이고, 그리고 항체는 20 CV에 걸쳐 20-160 mM 인산나트륨의 구배로 용리되었다.

[0323] 실시예 5

[0324] 쥐 항-FOLR1 항체의 개발

[0325] 2가지 상이한 면역화/스크리닝 시리즈가 있었다. 첫 번째 시리즈는 FR1-21 클론의 발생을 유발하고, 두 번째 시리즈는 FR1-48, FR1-49, FR1-57과 FR1-65 클론의 발생을 유발하였다. 첫 번째 시리즈에서, 마우스는 대략 5×10^6 개 FOLR1-발현 KB 세포(American Tissue Culture Collection, ATCC CCL-17)로 피하 면역화되었다. 두 번째 시리즈에서, 표면 상에 인간 FOLR1을 발현하는 300-19 세포가 마우스를 면역화하는데 이용되었다. 이들 세포를 만들기 위해, 인간 FOLR1 아미노산 서열은 NCBI 웹사이트(접근 번호 NP_057937)로부터 획득되고, 이후 코돈 최적화되고, Blue Heron biotechnologies에 의해 합성되고, pSRa 포유류 발현 벡터 내로 클로닝을 용이하게 하기 위해 EcoRI와 XbaI 제한 부위와 접하였다. Balb/c 마우스로부터 유래된 프리-B 세포주인 300-19 세포(Reth et al., *Nature*, 317:353-355 (1985))는 세포 표면 상에서 높은 수준의 인간 FOLR1을 안정적으로 발현하기 위해 pSRa-FolR1 발현 플라스미드로 형질감염되었다. 당업자에게 공지된 표준 면역화 프로토콜, 예를 들면,

ImmunoGen, Inc에서 이용된 것들이 양쪽 시리즈에 적용되었다. 면역화된 마우스는 하이브리도마 산출을 위해 희생 3일 전에 항원으로 추가 접종되었다. 마우스로부터 비장은 RPMI-1640 배지에서 단일 세포 현탁액을 획득하기 위해, 표준 동물 프로토콜, 예를 들면, 2개의 무균 동결된 현미경 슬라이드 사이에서 조직 분쇄에 따라 수집되었다. 비장 세포는 원심분리되고, 펠릿화되고, 세척되고, 그리고 폴리에틸렌 글리콜-1500(Roche 783 641)을 이용하여 귀 골수중, 예를 들면, P3X63Ag8.653 세포(Kearney et al., J. Immunol., 123:1548-1550 (1979))와 융합되었다. 융합된 세포는 히포산틴-아미노프테린-티미딘(HAT)(Sigma H-0262)을 내포하는 RPMI-1640 선별 배지에서 재현탁되고 5% CO₂와 37°C에서 96-웰 편평-바닥 배양 평판(Corning-Costar 3596, 웰당 0.2 ml의 세포 현탁액)에서 성장에 대해 선별되었다. 5일간 배양후, 0.1 ml의 배양 상청액은 각 웰로부터 제거되고 히포산틴-티미딘(HT) 보충물(Sigma H-0137)을 내포하는 0.1 ml의 RPMI-1640 배지로 대체되었다. 5% CO₂와 37°C에서 배양은 하이브리도마 클론이 항체 스크리닝에 대해 준비될 때까지 지속되었다. Langone et al. (Eds., "Immunochemical Techniques, Part I", Methods in Enzymology, Academic Press, volume 121, Florida) 및 Harlow et al. ("Antibodies: A Laboratory Manual"; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988))에서 기술된 것들을 비롯하여, 면역화와 하이브리도마 생산의 다른 기술 역시 이용될 수 있다

[표 1B]

FR1-48, 49, 57, 그리고 65 경쇄와 중쇄 CDR이 제공된다. 중쇄 CDR2에 대한 Kabat 정의 역시 쥐와 인간 항체들 모두에 대해 제공된다.

FR1-48 CDR	FR1-49 CDR	FR1-57 CDR	FR1-65 CDR
경쇄	경쇄	경쇄	경쇄
CDR1 - RASENIYSNLA(SEQ ID NO:57)	CDR1 - RASENIYTSLA(SEQ ID NO:63)	CDR1 - RASQNIYNLH(SEQ ID NO:69)	CDR1 - KASQNVGPNVA(SEQ ID NO:75)
CDR2 - AATNLAD(SEQ ID NO:58)	CDR2 - TASNLA(SEQ ID NO:64)	CDR2 - YVSQSVS(SEQ ID NO:70)	CDR2 - SASIRYS(SEQ ID NO:76)
CDR3 - QHFWASPYT(SEQ ID NO:59)	CDR3 - QHFWVSPYT(SEQ ID NO:65)	CDR3 - QQSNWPHYT(SEQ ID NO:71)	CDR3 - QQYNSIPYT(SEQ ID NO:77)
중쇄	중쇄	중쇄	중쇄
CDR1 -TAYWMQ(SEQ ID NO:60)	CDR1 -TAYWMY(SEQ ID NO:66)	CDR1 -SSFQMH(SEQ ID NO:72)	CDR1 -TSYTMH(SEQ ID NO:78)
CDR2 - AIYPGNGDSR(SEQ ID NO:61)	CDR2 - AIYPGNSDTT(SEQ ID NO:67)	CDR2 - YISSGSSTIS(SEQ ID NO:73)	CDR2 - YINPISGYTN(SEQ ID NO:79)
CDR3 - RDGNYAAY(SEQ ID NO:62)	CDR3 - RHDYGAIDY(SEQ ID NO:68)	CDR3 - EAYGSSMEY(SEQ ID NO:74)	CDR3 - GGAYGRKPMY(SEQ ID NO:80)
Kabat HC CDR2	Kabat HC CDR2	Kabat HC CDR2	Kabat HC CDR2
쥐 AIYPGNGDSRYTQKFKG(SEQ ID NO:81)	쥐 AIYPGNSDTTYNLKFKG(SEQ ID NO:130)	쥐 YISSGSSTISYADTVKG(SEQ ID NO:84)	쥐 YINPISGYTNYNQKFKD(SEQ ID NO:86)
인간 AIYPGNGDSRYTQKFQG(SEQ ID NO:82)	인간 AIYPGNSDTTYNQKFQG(SEQ ID NO:83)	인간 YISSGSSTISYADSVKG(SEQ ID NO:85)	인간 YINPISGYTNYNQKFQG(SEQ ID NO:87)

실시예 6

하이브리도마 스크리닝과 선별

[0331] 인간 FOLR1과 KB 세포로 형질감염된 FOLR1-300-19 세포는 대응되게, 스크리닝의 첫 번째와 두 번째 시리즈에 이용되었다. 하이브리도마로부터 배양 상청액은 FOLR1 양성 세포, 예를 들면, FOLR1-발현 300-19 세포 또는 KB 세포에 결합하지만, FOLR1 음성 세포, 예를 들면, 비-형질감염된 300-19 세포에 결합하지 않는 마우스 단일클론성 항체의 분비에 대해 유세포분석법에 의해 스크리닝되었다. 0.1 ml의 하이브리도마 상청액은 0.1 ml FACS 완충액 (2% 정상 염소 혈청으로 보충된 RPMI-1640 배지)에서 FOLR1-양성 세포 또는 비-형질감염된 300-19 세포(샘플당 1×10^5 개 세포)와 함께 3시간 동안 배양되었다. 이후, 이들 세포는 원심분리되고, 펠릿화되고, 세척되고, 그리고 0.1 ml의 PE-접합된 염소 항-마우스 IgG-항체(가령, Jackson Laboratory로부터 구입가능, FACS 완충액에서 $6 \mu\text{g/ml}$)와 함께 1시간 동안 배양되었다. 이들 세포는 원심분리되고, 다시 한 번 펠릿화되고, FACS 완충액으로 세척되고, 그리고 1% 포르말데히드를 내포하는 0.2 ml의 PBS에서 재현탁되었다. 세포-연관된 형광(cell-associated fluorescence)은 HTS 멀티웰 샘플러가 구비된 FACSCalibur 유세포계측기, 또는 FACS 어레이 유세포계측기를 이용하여 측정되고 CellQuest Pro(이들 모두 BD Biosciences, San Diego, US)를 이용하여 분석되었다. 양성 하이브리도마 클론은 제한 희석(limiting dilution)에 의해 서브클로닝(subcloning)되었다. 유세포분석법에 의해 FOLR1에 대해 부모 세포와 동일한 반응성을 보이는, 각 하이브리도마로부터 하나의 서브클론(subclone)이 차후 분석을 위해 선택되었다. 안정된 서브클론은 배양되고, 그리고 각 분비된 항-FOLR1 항체의 아이소타입(isotype)은 상업적 아이소타이핑(isotyping) 시약(Roche 1493027)을 이용하여 확인되었다. 쥐 항체는 앞서 기술된 바와 같이 투명한 하이브리도마 배지로부터 단백질 A 정제되었다. 이들 항체는 FR-1 항체로 명명되었다.

[0332] 실시예 7

[0333] 쥐 단일클론성 항체 정제

[0334] 항체는 표준 방법, 예를 들면, 단백질 A 또는 G 크로마토그래피(HiTrap 단백질 A 또는 G HP, 1 ml, Amersham Biosciences)를 이용하여, 하이브리도마 서브클론 상청액으로부터 정제되었다. 간단히 말하면, 상청액은 1/10 부피의 1 M Tris/HCl 완충액, pH 8.0의 첨가에 의한 크로마토그래피를 위해 준비되었다. pH-조정된 상청액은 0.22 μm 필터 막을 통해 여과되고 결합 완충액(PBS, pH 7.3)으로 평형화된 칼럼 위에 적하되었다. 칼럼은 280 nm에서 흡광도 없음으로 안정된 기준선이 획득될 때까지 결합 완충액으로 세척되었다. 항체는 0.5 ml/min의 유속(flow rate)을 이용하여, 0.15 M NaCl, pH 2.8을 내포하는 0.1 M 아세트산 완충액으로 용리되었다. 대략 0.25 ml의 분획(fraction)이 수집되고 1/10 부피의 1M Tris/HCl, pH 8.0의 첨가에 의해 중화되었다. 피크 분획(들)은 하룻밤동안 1x PBS에 대해 2회 투석되고, 그리고 0.2 μm 필터 막을 통해 여과함으로써 멸균되었다. 정제된 항체는 A_{280} 에서 흡광도에 의해 정량되었다.

[0335] 실시예 8

[0336] 유세포분석법에 의한 결합 특징

[0337] 결합 특이성은 정제된 항체를 이용한 유세포분석법에 의해 조사되었다. FOLR1-발현 300-19 세포에 항-FOLR1의 결합 및 부모 300-19 세포에 결합의 결여를 증명하는 FACS 히스토그램은 도 4에 도시된다. 각 항체는 0.1 ml FACS 완충액(2% 정상 염소 혈청으로 보충된 RPMI-1640 배지)에서 FOLR1-발현 300-19 세포 또는 비-형질감염된 300-19 세포(샘플당 1×10^5 개 세포)와 함께 3시간 동안 배양되었다. 이후, 이들 세포는 펠릿화되고, 세척되고, 그리고 0.1 ml의 FITC-접합된 염소 항-마우스 IgG-항체(가령, Jackson Laboratory로부터 구입가능, FACS 완충액에서 $6 \mu\text{g/ml}$)와 함께 1시간 동안 배양되었다. 이들 세포는 다시 한 번 펠릿화되고, FACS 완충액으로 세척되고, 그리고 1% 포르말데히드를 내포하는 200 μl 의 PBS에서 재현탁되었다. 샘플은 HTS 멀티웰 샘플러가 구비된 FACSCalibur 유세포계측기, 또는 FACS 어레이 유세포계측기를 이용하여 획득되고 CellQuest Pro(이들 모두 BD Biosciences, San Diego, US)를 이용하여 분석되었다. 항-FOLR1 항체의 FACS 히스토그램은 형광 이동(fluorescence shift)을 보이는 반면, 부모 300-19 세포는 그렇지 않았다. 또한, 이들 세포주 중에서 어느 한쪽이 단지 FITC 접합된 염소 항-인간 IgG-항체 단독과 함께 배양될 때, 유의미한 형광 이동은 검출되지 않았다.

[0338] 실시예 9

- [0339] muFR1-21의 VL과 VH 영역의 클로닝과 염기서열분석
- [0340] 전체 세포 RNA는 제조업체의 프로토콜에 따라, RNeasy 키트(QIAgen)를 이용하여 5×10^6 개 하이브리도마 세포로부터 준비되었다. cDNA는 차후에, SuperScript II cDNA 합성 키트(Invitrogen)를 이용하여 전체 RNA로부터 합성되었다. 하이브리도마 세포로부터 유래된 cDNA 상에서 일차 라운드 축퇴 PCR 반응을 위한 절차는 Wang et al. ((2000) J Immunol Methods. Jan 13; 233(1-2):167-77) 및 Co et al. ((1992) J Immunol. Feb 15;148(4):1149-54)에서 기술된 방법에 기초되었다. VH 서열은 하기 축퇴 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭되었다:
*Eco*MH1 CTTCCGGAATTCARGTNMAGCTGSAGSAGTC(SEQ ID NO:50) *Eco*MH2
 CTTCCGGAATTCARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG(SEQ ID NO:51) 및 BamIG1 GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTGGC(SEQ ID NO:52). VL 서열은 하기 축퇴 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭되었다: SacIMK
 GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA(SEQ ID NO:53) 및 HindKL
 TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC(SEQ ID NO:54). (혼성 염기는 하기와 같이 정의된다: N=G+A+T+C, S=G+C, Y=C+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T).
- [0341] PCR 반응 혼합물은 이후, 1% 저융점 아가로스 겔 상에서 이동되고, 300 내지 400 bp 밴드가 절제되고, Zymo DNA 미니 칼럼을 이용하여 정제되고, 그리고 염기서열분석을 위해 Agencourt Biosciences로 보내졌다. 개별 5'와 3' PCR 프라이머는 양쪽 방향으로부터 가변 영역 cDNA를 산출하기 위한 염기서열분석 프라이머로서 이용되었다. VH와 VL 영역의 아미노산 서열은 DNA 염기서열분석 결과를 VectorNTI 소프트웨어로 해석함으로써 획득되었다.
- [0342] 예비 가변 영역 cDNA 서열 내에서 5'말단 프라이머 염기서열분석 인공물을 확인하기 위해, 항체 서열이 유래되는 쥐 생식계열 서열에 대한 검색에 NCBI IgBlast 사이트(www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)가 이용되었다. 정화된 가변 영역 서열은 이후, 예측된 전장 쥐 항체 서열을 집합시키기 위해 특정 항체 불변 영역에 대한 NCBI 참고 서열과 결합되었다. 이후, 예측된 쥐 Fr1-21 경쇄와 중쇄의 분자량이 계산되고 액체 크로마토그래피/질량분광분석(LC/MS)에 의해 측정된 질량과 비교되었다. 쥐 FR1-21 중쇄는 측정된 질량과 대응하지만, 경쇄는 5' 말단 서열을 결정하기 위해 후속 염기서열분석 노력이 요구되었다. CD37-1LClead1 PCR 프라이머 (ttttgaattcgccaccatgaagtttcttctcaacttct)는 쥐 항체의 생식계열 연관된 선도 서열에 어닐링(annealing)되도록 설계되고, 따라서 이러한 새로운 PCR 반응은 프라이머에 의해 변형되지 않는 완전한 가변 영역 cDNA 서열을 산출할 것이다. PCR 반응, 밴드 정제, 그리고 염기서열분석은 앞서 기술된 바와 같이 수행되고, 그리고 새로운 완전한 서열은 LC/MS에 의해 측정된 Fr1-21 경쇄 질량과 대응하는 경쇄를 암호화하였다.
- [0343] 실시예 10
- [0344] 참고 항체의 발현
- [0345] Morphotech 항-FOLR1 항체, MorAb-003 (Farletuzumab), 아미노산 서열은 World Health Organization (WHO) International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN) 목록으로부터 획득되고, 코돈-최적화되고, 그리고 Blue Heron Biotechnology에 의해 합성되었다. 단일 사슬 포유류 발현 플라스미드 내에서 개별 불변 서열과의 인-프레임 클로닝을 위해, 경쇄 가변 영역 서열은 *Eco*RI와 *Bsi*WI 제한 효소 부위와 접하고, 그리고 중쇄 가변 영역 서열은 *Hind*III과 *Apal* 제한 효소 부위와 접한다. 클로닝, 발현 및 정제는 상기 인간화된 Mov19와 Fr1-21에 대해 기술된 바와 같이 수행되었다.
- [0346] 실시예 11
- [0347] huMov19의 ADCC 활성
- [0348] 새로 분리된 인간 자연 킬러(NK) 세포를 효과기 세포로서 이용하여 종양 세포주의 항체-의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC)을 측정하기 위해, 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 방출 분석법이 이용되었다(가령, Shields, J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001)). NK 세포는 먼저, NK 분리 키트 II(Miltenyi Biotech, 130-091-152)에 대한 변형된 프로토콜을 이용하여, 정상 공여자로부터 인간 혈액(Research Blood Components, Inc., Brighton, MA)으로부터 분리되었다. 혈액은 1x PBS로 2-배 희석되었다. 25 ml의 희석된 혈액은 50 ml 원뿔 튜브 내에 25 ml의 Ficoll Paque 위에 조심스럽게 층을 이루고 RT에서 45분 동안 400 g로 원심분리되었다. 말초혈 단핵 세포(PBMC)는 계면으로부터 수집되고, 새로운 원뿔 50 ml 튜브 내로 이전되고, 그리고 1x PBS로 1회 세척되었다. PBMC는 2 ml의 NK-분리 완충액(1 x PBS, 0.5% BSA, 2mM EDTA)에서 재현탁되고, 이후 500 μ l의

비오틴-항체 콕테일이 세포 현탁액에 첨가되었다. 비오틴-항체 콕테일은 NK 세포를 제외한 림프구에 결합하는 비오틴화된 항체를 내포하고 NK 세포의 음의 선별(negative selection)을 유발한다. 혼합물은 4℃에서 10분 동안 배양되고, 이후 1.5 ml의 NK-분리 완충액 및 1 ml의 항-비오틴 마이크로비드가 추가되었다. 세포 항체 혼합물은 4℃에서 추가로 15분 동안 배양되었다. 그 다음, 세포는 50 ml의 NK-분리 완충액으로 1회 세척되고 3 ml의 NK-분리 완충액에서 재현탁되었다. 이후, MACS LS 칼럼은 autoMACS 분리기(Miltenyi Biotech) 위에 적재되고 3 ml의 NK-분리 완충액으로 미리-세척되었다. 세포 현탁액은 칼럼 위에 자동적으로 적용되고, 세척되고, 그리고 표지되지 않은 NK 세포를 갖는 유출성 분획(effluent fraction)이 새로운 50 ml 원뿔 튜브 내로 수집되었다. 결과의 NK 세포는 30 ml의 완전한 RPMI 배지(5% 소 태아 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1 mM HEPES, 1 mM 피루브산나트륨, 1% 100X MEM 비-필수 아미노산 용액으로 보충된 RPMI-1640) 내로 하룻밤동안 도말되었다. 차후 분석 및 모든 희석은 RHPB 배지(20 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA 및 1% 페니실린 스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640 배지)에서 수행되었다. RHPB 배지에서 다양한 농도의 항체가 50 μ l/웰에서 둥근 바닥 96-웰 평판 내로 이중으로 분취되었다. 표적 세포는 RHPB 배지에서 10⁶ 개 세포/ml로 재현탁되고 항체 희석액을 내포하는 각 웰에 100 μ l/웰로 첨가되었다. 표적 세포 및 항체 희석액을 내포하는 평판은 37℃에서 30분 동안 배양되었다. 이후, 50 μ l/웰로 표적 세포를 내포하는 웰에 NK 세포가 첨가되었다. 전형적인 비율은 약 1개 표적 세포 대(對) 3-4개 NK 세포이었다. 각 실험을 위해 적어도 하기 대조가 설정되었다: NK 세포 단독, 표적 세포 단독(자발적 LDH 방출), NK 세포와 함께 표적 세포(항체 독립성 LDH 방출), 10% TritonX-100과 함께 표적 세포(최대 LDH 방출). 혼합물은 세포 용해(cell lysis)를 가능하게 하기 위해 37℃에서 4시간 동안 배양되었다. 평판은 10분 동안 1200 rpm으로 원심분리되고, 그리고 100 μ l의 상청액이 새로운 편평 바닥 96-웰 평판으로 조심스럽게 이동되었다. 세포독성 검출 키트(Roche 1 644 793)로부터 LDH 반응 혼합물(100 μ l/웰)이 각 웰에 첨가되고 실온에서 5 내지 30분 동안 배양되었다. 샘플의 광학 밀도(optical density)는 490 nm(OD₄₉₀)에서 측정되었다. 각 샘플의 특이적 용해 퍼센트(percent specific lysis)는 하기 공식을 이용하여 결정되었다: 특이적 용해 퍼센트 = (샘플 값 - 자발적 방출)/(최대 방출 - 자발적 방출) * 100.

[0349] huMov19와 함께 배양은 인간 NK 효과기 세포의 존재에서 IGROV-1 세포에 대한 우수한 ADCC 활성을 유발하였다. IGROV-1 세포에서 ADCC 활성은 huMov19, huFR-1-21, Mor003, 그리고 chTK1(아이소타입 대조)과 비교되었다(도 6). 0.9 ng/ml huMov19로 처리는 다른 항-FOLR1 항체에서 관찰되는 활성과 유사한, 대략 30% IGROV-1 세포 용해를 유발하였다. huMov19에 의한 ADCC 활성은 0.20 ng/ml의 EC₅₀을 갖고, huFr-1-21은 0.11 ng/ml의 EC₅₀을 갖고, Mor003은 0.16 ng/ml의 EC₅₀을 갖고, 그리고 chTK1은 IGROV-1 세포에 대한 어떤 활성도 보이지 않았다.

[0350] 실시예 12

[0351] 항-FOLR1 면역접합체의 제조

[0352] huMOV19v1.6-설포-SPDB-DM4의 제조

[0353] 예시적인 2-설포-SPDB 링커는 DMA에 용해되었다. huMOV19v1.6 항체는 pH 7.5와 25℃에서 대략 2시간 동안 12배 물 과잉(molar excess)의 2-설포-SPDB 링커와 함께 8 mg/ml로 배양되었다. 반응 혼합물은 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.5를 내포하는 50 mM 인산칼륨 완충액으로 평형화된 SEPHADEX™ G25F 칼럼을 이용하여 정제되었다. 메이탄시노이드 DM4는 디메틸아세트아미드(DMA, 최종 농도는 5%이다)에서 용해되고 링커와 비교하여 1.7배 물 과잉이 설포-SPDB 변형된 항체에 방울방울 첨가되었다. 반응 혼합물은 1 M HEPES 완충액으로 pH 7.5로 조정되었다. 실온에서 하룻밤 배양후, 접합된 항체는 10 mM 히스티딘, 250 mM 글리신, 1% 수크로오스, pH 5.5로 평형화된 SEPHADEX™ G25F에서 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 항체 분자당 연결된 DM4 분자의 숫자는 항체와 메이탄시노이드에 대한 기준에 보고된 소광 계수를 이용하여 결정되었다(Widdison, WC, et al. J Med Chem, 49:4392-4408 (2006)). 총 유리 메이탄시노이드 화학종의 백분율은 앞서 기술된 바와 같이 결정되었다. huMov19v1.6 항체당 3.5-4개 DM4 분자를 갖는 접합체가 획득되었는데, <1%가 접합되지 않은 메이탄시노이드로서 존재하였다.

[0354] huMOV19v1.6-SPP-DM1의 제조

[0355] 예시적인 N-숙신이미딜 4-(2-페리디닐티오)펜타노에이트(SPP) 링커는 에탄올에 용해되었다. huMOV19v1.6 항체는 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 그리고 5% 에탄올을 내포하는 50 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.5)에서 실온에서 대략 2시간

간 동안 6.5 내지 6배 물 과잉의 SPP 링커와 함께 8 mg/ml로 배양되었다. SPP 변형된 항체는 PBS, pH 6.5에서 2-배 희석되고, 그리고 디메틸아세트아미드(DMA)에서 DM1의 농축된 용액(15-30 mM)의 첨가에 의해 1.5배 물 과잉의 메이탄시노이드 DM1로 변형되었다. DMA의 농도는 5%로 조정되고, 그리고 실온에서 하룻밤 배양후, 접합된 항체는 10 mM 히스티딘, 250 mM 글리신, 1% 수크로오스 pH 5.5로 평형화된 SEPHADEX™ G25F에서 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 항체 분자당 연결된 DM1 분자의 숫자는 항체와 DM1에 대한 기준에 보고된 소광 계수를 이용하여 결정되었다(Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8618-8623 (1996)). 접합 반응후 존재하는 유리 메이탄시노이드의 백분율은 100 mM 암모늄 아세테이트 완충액, pH 7.0에서 25% 아세토니트릴에 평형화된 HiSep™ 칼럼 위에 20-50 μ g 접합체를 주입하고, 그리고 아세토니트릴에서 용리함으로써 결정되었다. 총 유리 메이탄시노이드 화학종(구배로 용리되고, 그리고 공지된 표준과의 용리 시간의 비교에 의해 확인됨)의 피크 면적은 총 유리 메이탄시노이드 화학종의 백분율을 계산하기 위해, 252 nm의 파장으로 설정된 흡광도 검출기(absorbance detector)를 이용하여 측정되고, 그리고 결합된 메이탄시노이드(칼럼 관류 분획 내에 접합체 피크에서 용리됨)에 관련된 피크 면적과 비교되었다. huMOV19v1.6당 3.5-4개 DM1 분자를 갖는 접합체가 획득되었는데, <1%가 접합되지 않은 메이탄시노이드로서 존재하였다.

[0356] huMOV19v1.6 SPDB-DM4의 제조

[0357] 예시적인 N-숙신이미딜 4-(2-피리디디티오)부타노에이트(SPDB) 링커는 에탄올에 용해되었다. huMOV19v1.6 항체는 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 그리고 3% 에탄올을 내포하는 50 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.5)에서 실온에서 대략 2 시간 동안 5.5-5배 물 과잉의 SPDB 링커와 함께 8 mg/ml로 배양되었다. SPDB 변형된 항체는 PBS, pH 6.5에서 2-배 희석되고, 그리고 디메틸아세트아미드(DMA)에서 DM4의 농축된 용액(15-30 mM)의 첨가에 의해 1.5배 물 과잉의 메이탄시노이드 DM4로 변형되었다. 실온에서 하룻밤 배양후, 접합된 항체는 10 mM 히스티딘, 250 mM 글리신, 1% 수크로오스 pH 5.5로 평형화된 SEPHADEX™ G25F에서 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 항체 분자당 연결된 DM4 분자의 숫자는 항체와 메이탄시노이드에 대한 기준에 보고된 소광 계수를 이용하여 결정되었다(Widdison, WC, et al. J Med Chem, 49:4392-4408 (2006)). 총 유리 메이탄시노이드 화학종의 백분율은 앞서 기술된 바와 같이 결정되었다. huMOV19v1.6 항체당 3.5-4개 DM4 분자를 갖는 접합체가 획득되었는데, <1%가 접합되지 않은 메이탄시노이드로서 존재하였다.

[0358] huMOV19v1.0-3-설폰-mal-DM4의 제조

[0359] NHS-3-설폰-mal 링커와 DM4는 DMA에서 별개로 용해되었다. 상기 링커와 DM4 티올은 1.6:1의 DM4 대(對) 링커의 몰 비율(molar ratio) 및 10mM에 동등한 DM4의 최종 농도를 제공하기 위해, 40% 200mM 숙신산염 완충액, 2mM EDTA, pH5.0을 내포하는 DMA의 용액에서 함께 혼합되었다. 혼합물은 25℃에서 2시간 동안 반응되었다. 정제 없이, 반응 혼합물은 첨가되고, 따라서 항체에 대해 9.6 몰 과잉의 링커의 등가물이 4mg/ml 항체, 90% 인산염 완충액/10% DMA pH7.5 (v/v)의 최종 접합 조건 하에 인산염 완충액(pH7.5)에서 huMOV19v1.0 항체의 용액에 첨가되었다. 실온에서 하룻밤 배양후, 접합 혼합물은 PBS pH7.5에서 평형화된 SEPHADEX G25에서 크로마토그래피에 의해 정제되었다. huMOV19v1.0-3-설폰-mal-DM4는 이후, 9.55mM 인산염, 139.6mM NaCl, pH6.5를 내포하는 완충액으로 투석되었다. 항체 분자당 연결된 DM4 분자의 숫자는 항체와 메이탄시노이드에 대한 기준에 보고된 소광 계수를 이용하여 결정되었다(Widdison, WC, et al. J Med Chem, 49:4392-4408 (2006)). 총 유리 메이탄시노이드 화학종의 백분율은 앞서 기술된 바와 같이 결정되었다. huMOV19v1.0 항체당 3.5-4개 DM4 분자를 갖는 접합체가 획득되었는데, <1%가 접합되지 않은 메이탄시노이드로서 존재하였다.

[0360] huMOV19v1.0-SMCC-DM1의 제조

[0361] NHS-설폰-SMCC 링커와 DM1은 DMA에서 별개로 용해되었다. 상기 링커와 DM1 티올은 1.2:1의 DM1 대(對) 링커의 몰 비율(molar ratio) 및 3.75mM에 동등한 DM1의 최종 농도를 제공하기 위해, 40% 200mM 숙신산염 완충액, 2mM EDTA, pH5.0을 내포하는 DMA의 용액에서 함께 혼합되었다. 혼합물은 20℃에서 75분 동안 반응되었다. 정제 없이, 반응 혼합물은 첨가되고, 따라서 항체에 대해 6.4 몰 과잉의 링커의 등가물이 4mg/ml 항체, 88% 50mM 인산칼륨, 50mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.5/12% DMA pH7.5 (v/v)의 최종 접합 조건 하에 인산염 완충액(pH7.5)에서 huMOV19v1.0 항체의 용액에 첨가되었다. 20℃에서 2시간 배양후, 접합 혼합물은 PBS pH7.5에서 평형화된 SEPHADEX G25에서 크로마토그래피에 의해 정제되었다. huMOV19v1.0-SMCC-DM1은 이후, 250 mM 글리신, 10 mM 히

스티딘 pH5.5를 내포하는 완충액 내로 투석되었다. 항체 분자당 연결된 DM1 분자의 숫자는 항체와 메이탄시노이드에 대한 기준에 보고된 소광 계수를 이용하여 결정되었다(Widdison, WC, et al. J Med Chem, 49:4392-4408 (2006)). 총 유리 메이탄시노이드 화학종의 백분율은 앞서 기술된 바와 같이 결정되었다. huMOV19v1.0 항체당 3.5-4개 DM1 분자를 갖는 접합체가 획득되었는데, <2.8%가 접합되지 않은 메이탄시노이드로서 존재하였다.

[0362] huMOV19v1.0-PEG4-mal-DM1의 제조

[0363] NHS-PEG4-mal-DM1 1 단계 시약은 DMA에 용해되었다. huMov19v1.0 항체는 50mM KPi, 50mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.5 및 부피로 10% DMA에서 25℃에서 하룻밤동안 5.7배 물 과잉의 NHS-PEG4-mal-DM1과 함께 5mg/ml로 배양되었다. 반응 혼합물은 PBS pH7.5에서 평형화된 SEPHADEX G25 칼럼에 의해 정제되었다. huMOV19v1.0-PEG4-mal-DM1은 250 mM 글리신, 10 mM 히스티딘 pH5.5를 내포하는 완충액으로 투석되었다. 항체 분자당 연결된 DM1 분자의 숫자는 항체와 메이탄시노이드에 대한 기준에 보고된 소광 계수를 이용하여 결정되었다(Widdison, WC, et al. J Med Chem, 49:4392-4408 (2006)). 총 유리 메이탄시노이드 화학종의 백분율은 앞서 기술된 바와 같이 결정되었다. huMOV19v1.0 항체당 3.5-4개 DM1 분자를 갖는 접합체가 획득되었는데, <1.1%가 접합되지 않은 메이탄시노이드로서 존재하였다.

[0364] 실시예 13

[0365] 항체와 접합체의 결합 친화성

[0366] 항-FOLR1 항체 및 이들의 SPDB-DM4, PEG4Mal-DM4, SMCC-DM1, 또는 항-FOLR1-셀포-SPDB-DM4 접합체의 결합 친화성은 유세포분석법에 의해 평가되었다. FOLR1-발현 SKOV3 세포는 다양한 농도의 항-FOLR1 항체 또는 이들의 접합체와 함께 배양되고 유세포분석법 분석을 위해 앞서 기술된 바와 같이 처리되었다. 데이터 분석은 CellQuest Pro(BD Biosciences, San Diego, US)를 이용하여 수행되고, 그리고 각 샘플에서, FL1에 대한 평균 형광 강도(mean fluorescence intensity, MFI)가 추출되고 반-로그 플롯(semi-log plot)에서 항체 농도에 대해 플롯팅(plotting)되었다. 용량-반응 곡선은 비-선형 회귀에 의해 산출되고, 그리고 SKOV3 세포에 결합에 대한 검사-샘플의 겉보기 평형 해리 상수(apparent equilibrium dissociation constant)(K_d)에 대한 값은 GraphPad Prism v4(GraphPad software, San Diego, CA)를 이용하여 계산되고 도 5에 도시된다. 이들 결과는 이용된 링커 중에서 어느 한쪽을 통한 DM1 또는 DM4에 접합이 이들 항체(가령, huMov19) 중에서 어느 한쪽의 친화성을 현저하게 변화시키지 않는다는 것을 증명한다.

[0367] 실시예 14

[0368] 시험관내 세포독성 분석

[0369] 세포 성장을 억제하는 예시적인 muFR1-9, muFR1-13, muFR1-22, muFR1-23, huFR1-23, muFR1-21, 그리고 huFR1-21 접합체의 능력은 Kovtun YV et al. (Cancer Res 66: 3214-3221 (2006))에서 기술된 방법에 의해 시험관내 세포독성 분석법을 이용하여 측정되었다. 다양한 농도에서 PEG4-mal-DM4 접합체가 완전 RPMI 배지(RPMI-1640, 10% 소 태아 혈청, 2 mM 글루타민, 1% 젤타마이신, 이들 모두 Invitrogen으로부터)에서 100 μ l에서 1,000개 세포/웰로 96 웰 평판 내에 FOLR1-발현 KB 세포에 첨가되었다. 항체와 접합체는 3-배 희석 시리즈를 이용하여 완전 RPMI 배지 내로 희석되고 웰당 100 μ l가 첨가되었다. 최종 농도는 전형적으로, 3×10^{-8} M 내지 4.6×10^{-12} M 범위에서 변화였다. 세포와 배지를 내포하지만 접합체가 없는 대조 웰, 그리고 배지만을 내포하는 웰이 각 분석 평가에 포함되었다. 이들 평판은 5% CO₂를 내포하는 습한 공기에서 37℃에서 4 내지 6일 배양되었다. WST-8 시약, 10% v/v(Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD, US)가 이후, 웰에 첨가되고, 그리고 이들 평판은 37℃에서 2-6시간 동안 배양되었다. WST-8은 생존하는 세포에서 탈수소화효소에 의해, 조직 배양 배지에서 용해성인 오렌지색 최대 포르마잔 산물로 환원되었다. 생산된 포르마잔의 양은 생존하는 세포의 수에 직접으로 비례한다. 평판은 멀티웰 평판 판독기에서 450 nm(A_{450})와 650 nm(A_{650})에서 흡광도를 측정함으로써 분석되었다. 먼저, 세포의 배경 단백광(opalescence)(A_{650})이 A_{650} 으로부터 뺄셈되었다. 결과의 A_{450} 은 이후, 세포의 생존 분획(surviving fraction)을 결정하는데 이용되었다. 배경 A_{450} 흡광도는 배지 및 WST-8 단독을 갖는 웰의 흡광

도이었다. 생존 분획은 하기와 같이 계산되었다: 생존력 퍼센트 = $100 \times (A_{450} \text{ 처리된 샘플} - A_{450} \text{ 배경}) / (A_{450} \text{ 처리되지 않은 샘플} - A_{450} \text{ 배경})$. 생존 분획 값은 각 처리에 대해 반-로그 플롯(semi-log plot)에서 항체 또는 접합체 농도에 대해 플롯팅(plotting)되었다. 이들 데이터로부터, IC_{50} 값은 이후, GraphPad Prism v4(GraphPad software, San Diego, CA)를 이용하여 결정되고 도 5에 도시된다. 도 5에 도시된 결과는 모든 접합체가 FOLR1-발현 KB 세포에 대한 그들의 세포독성 효능에서 유사한 활성을 갖는다는 것을 증명한다. FOLR1을 향한 항-FOLR1-메이탄사노이드 접합체의 특이성을 더욱 확인하기 위해, 그들의 활성이 KB 세포에서 과잉의 비-접합된 항체의 존재에서 평가되었다. 접합체에 과잉의 경쟁 비-접합된 항체의 첨가는 도 7에서 확인되는 바와 같이, 그들의 세포독성을 억제하였다. 이들 데이터는 상기 접합체가 항원-의존성 방식으로 KB 세포를 사멸시킨다는 것을 지시한다. 추가의 데이터는 huMov19-SPDB-DM4가 시험관내 분석 동안 KB 세포에서 G2/M 기(phase)에서 세포 주기 정지(cell cycle arrest)를 유도한다는 것을 증명하였다.

[0370]

[0371]

실시에 15

[0372]

KB 이중이식편 모형에서 유사한 비-표적화 접합체와 비교하여 huMov19-PEG4Mal-DM4와 huMov19-SPDB-DM4 접합체의 생체내 효능

[0373]

비-표적화 huC242-SPDB-DM4와 비교하여 FOLR1-표적화 절단성 접합체 huMov19-SPDB-DM4, 그리고 비-표적화 huC242-PEG4Mal-DM4와 비교하여 비-절단성 접합체 huMov19-PEG4-Mal-DM4는 SCID 마우스 내로 피하 이식된 KB 세포의 확립된 이중이식편 모형을 이용하여 조사되었다. 마우스는 체중에 의해 치료 그룹으로 무작위화되고 각각, 세포 접종후 3일자에 단독으로(SPDB 접합체), 또는 세포 접종후 3, 10, 그리고 17일자에 5와 10 mg/kg의 접합체로 주 3회 치료되었다. 상이한 치료 그룹의 중점 종양 체적은 도 8에 플롯팅된다. huMov19-SPDB-DM4, 또는 huMov19-PEG4Mal-DM4로 치료는 PBS 대조와 비교하여 중점 종양 체적에서 감소를 유발하는 반면, 개별 비-표적화 접합체 중에서 어느 하나로 치료는 유의미한 효과를 산출하지 못하였다.

[0374]

실시에 16

[0375]

KB 이중이식편 모형에서 항-FOLR1-PEG4Mal-DM4 접합체의 생체내 효능

[0376]

예시적인 항-FOLR1 항체 huMov19, muFR-1-9, muFR-1-13, muFR-1-22, muFR-1-23, 그리고 huFR-1-21의 PEG4Mal-DM4 접합체는 SCID 마우스 내로 피하 이식된 KB 세포의 확립된 이중이식편 모형을 이용하여 조사되었다. 마우스는 체중에 의해 치료 그룹으로 무작위화되고 세포 접종후 3일자에, 앞서 열거된 접합체 중에서 한 가지의 10 mg/kg로, 또는 PBS 단독으로 1회 치료되었다. HuMov19-PEG4Mal-DM4는 시험관내 세포독성 효능에서 muFR-1-9, muFR-1-13, muFR-1-22, muFR-1-23, 그리고 huFR-1-21의 PEG4Mal-DM4 접합체와 유사한 것으로 앞서 밝혀졌다. HuMov19-PEG4Mal-DM4와 huFR-1-21-PEG4Mal-DM4는 임의의 다른 접합체보다 생체내에서 훨씬 강력하였고, 중점 종양 체적에서 훨씬 현저한 감소를 유발하였다(도 9와 10). 이러한 효능은 또한, 용량-의존성인 것으로 증명되었고(도 11), 그리고 링커의 선택 역시 일정한 역할을 하였다(도 12와 13).

[0377]

실시에 17

[0378]

이중이식편 모형에서 항-FOLR1-설폰-SPDB-DM4 접합체의 생체내 효능

[0379]

항-FOLR1 huMov19-설폰-SPDB-DM4 접합체는 3가지 난소 장액 선암종 이중이식편에서 조사되었다: OVCAR-3, IGROV-1, 그리고 OV-90. 이들 각 이중이식편 종양은 포르말린-고정된 파라핀-포매된 박편에서 조절된 면역조직화학(IHC) 염색 방법을 이용하여 측정될 때, 환자 종양에 필적하는 FOLR1 발현 수준을 보였다. 확립된 피하 이중이식편 종양(대략 100 mm^3)을 보유하는 마우스는 1.2, 2.5, 그리고 5.0 mg/kg(항체 농도에 기초됨)에서 huMov19-설폰-SPDB-DM4 접합체의 단일 정맥내 주사로 치료되었다; 도 14-16에서는 메이탄사노이드(maytansanoid) 접합체 농도($\mu\text{g/kg}$)를 보여준다. 상기 접합체는 평가된 3가지 모형 모두에서 활성이었다. OVCAR-3 이중이식편에서, 최소 유효량(minimally efficacious dose, MED)은 1.2 mg/kg이었다(도 14). 더욱 높은 용량 수준은 고도로 활성이고, 각각 2.5와 5.0 mg/kg 치료 그룹에서 4/6와 2/6 마우스에서 완전 관해(complete regression, CR)를 유발하였다. 상기 접합체로 치료는 2.5 mg/kg, 단일 주사의 MED에서, IGROV-1과 OV-90 이중이식편 모형 둘 모두에서 강한 항-종양 활성을 유발하였다(도 15와 16). 이들 데이터는 환자 종양에

필적하는 FOLR1 발현 수준을 갖는 난소 이종이식편 종양에 대한 huMov19-세포-SPDB-DM4 접합체의 강한 항-종양 활성을 증명한다.

실시예 18

면역접합체 효능에 대한 링커의 효과

항-FOLR1 항체 huMov19는 이황화-내포 절단성 링커 SPP, SPDB, 또는 세포-SPDB를 거쳐, 또는 비-절단성 링커 SMCC를 거쳐 DM1 또는 DM4에 연결되었다. KB, IGROV-1 및 JEG-3 세포주에 대한 이들 접합체의 시험관내 세포독성 활성이 조사되었다. FACS 분석은 KB(자궁경부) 세포가 세포당 > 2,000,000개 항체 결합 부위를 갖는다는 것을 지시하였다. IGROV-1(난소) 세포는 세포당 260,000개 항체 결합 부위를 갖고, 그리고 JEG-3(융모막암종) 세포는 세포당 40,000개 항체 결합 부위를 가졌다. 시험관내 세포독성의 결과는 하기 표 2에 요약된다. 절단성 접합체는 SMCC-접합체의 시험관내 활성과 비교하여 훨씬 높은 시험관내 활성을 나타냈다.

[표 2]

시험관내에서 세포독성에 대한 면역접합체 링커의 효과

세포	IC ₅₀ , nM (n=3), Ab-기초됨			
	SPP-DM1	SPDB-DM4	세포-SPDB-DM4	SMCC-DM1
KB	0.1	0.1	0.1	0.1
Igrov 1	0.1	0.1	0.3	1.0
Jeg3	0.2	0.2	3.0	20

FOLR1-양성 KB-와 OVCAR-3-종양 모형에서 접합체의 생체내 활성 역시 조사되었다. 도 17에 도시된 결과는 절단성 SPDB-DM4 및 세포-SPDB-DM4 접합체가 생체내에서 비-절단성 SMCC-DM1 접합체보다 더욱 강력하다는 것을 증명한다. 이에 더하여, 절단성 접합체 중에서, SPP-DM1 접합체는 양쪽 이종이식편 모형에서 SPDB-DM4 또는 세포-SPDB-DM4 접합체보다 활성이 덜하였다(도 18). 이들 2가지 후자 접합체는 KB 종양에 대해 유사한 활성을 갖는 반면, 세포-SPDB-DM4 접합체는 OVCAR-3 모형에 대해 더욱 높은 활성을 가졌다. OVCAR-3 모형을 이용하여 획득된 데이터는 하기 표 3에 요약된다.

[표 3]

OVCAR-3 이종이식편 모형에서 종양 크기에 대한 면역접합체 링커의 효과.

접합체	대조에 비하여 종양(%)	부분 반응	완전 반응	반응
SPP-DM1	54	0/6	0/6	비활성
SPDB-DM4	9	6/6	1/6	고도 활성
세포-SPDB-DM4	0	6/6	4/6	고도 활성

이들 데이터는 절단성 링커를 내포하는 면역접합체가 시험관내와 생체내 둘 모두에서 증가된 효능을 보이고, 그리고 세포-SPDB를 내포하는 항-FOLR1 면역접합체가 종양 모형에서 높은 활성을 갖는다는 것을 증명한다.

실시예 19

[0391] huFR1 항체 SMCC-DM1 접합체의 시험관내와 생체내 효능

[0392] 항-FOLR1 huFR1-48, huFR1-49, huFR1-57, 그리고 huFR1-65는 SMCC 링커와 DM1로 접합되고, 그리고 KB 세포에 대한 효과, 그리고 앞서 기술된 이중이식편 모형을 이용한 생체내 효과가 앞서 기술된 바와 같이 분석되었다. 각 항체가 KB 세포 모형에서 유사한 효능을 보이긴 하지만, huFR1-48, huFR1-49, huFR1-57, 그리고 huFR1-65 면역접합체는 이중이식편 모형 시스템에서 200 μ g/kg 용량에서 가변적이지만 유의미한 생체내 효능을 보였다(표 4 및 도 19).

[0393] [표 4]

huFR1 항체 SMCC-DM1 접합체의 시험관내와 생체내 효능

클론 #	겉보기 친화성 (nM)	시험관내에서 KB에 대한 huAb-smcc-DM1 활성 (nM)	생체내에서 huAb-smcc-DM1 활성
huFR1-48	0.13	0.05	+
huFR1-49	0.08	0.10	+
huFR1-57	0.14	0.10	+
huFR1-65	0.15	0.10	+
huMov19	0.06	0.10	++

[0394]

[0395] 본 명세서에서 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원, 인터넷 사이트, 그리고 접근 번호/데이터베이스 서열(폴리뉴클레오타이드와 폴리펩티드 서열 둘 모두 포함)은 마치 각 개별 간행물, 특허, 특허 출원, 인터넷 사이트, 그리고 접근 번호/데이터베이스 서열이 참고문헌으로 포함되는 것으로 분명하게 및 개별적으로 지시되는 것처럼 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 포함된다.

수탁번호

[0396]

기탁기관명 : The American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-10772

수탁일자 : 20100407

기탁기관명 : The American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-10773

수탁일자 : 20100407

기탁기관명 : The American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-10774

수탁일자 : 20100407

기탁기관명 : The American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-10775

수탁일자 : 20100407

기탁기관명 : The American Type Culture Collection (ATCC)

수탁번호 : PTA-10776

수탁일자 : 20100407

도면

도면1a

경쇄				
Kabat #	muMov19	DPK19	huMov19v1.00	huMov19v1.60
1	D	D	D	D
3	E	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>V</i>
5	T	T	T	T
9	A	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>L</i>
15	L	L	L	L
17	Q	Q	Q	Q
18	R	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
40	P	P	P	P
41	G	G	G	G
42	Q	Q	Q	Q
45	K	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
57	G	G	G	G
60	T	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
67	S	S	S	S
70	D	D	D	D
74*	N	K	N	<i>T*</i>
76	H	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
80	E	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>
81	E	E	E	E
100	G	G	G	G
103	K	K	K	K
105	E	E	E	E
107	K	K	K	K
108	R	R	R	R

도면1b

중쇠			
Kabat #	muMov19	8m27	huMov19
1	Q	Q	Q
3	Q	Q	Q
5	Q	<u>V</u>	<u>V</u>
9	A	A	A
11	L	<u>V</u>	<u>V</u>
13	K	K	K
14	P	P	P
19	K	K	K
23	K	K	K
28	S	<u>T</u>	<u>T</u>
41	H	<u>P</u>	<u>P</u>
42	G	G	G
43	K	<u>Q</u>	<u>Q</u>
61	Q	Q	Q
62	N	<u>K</u>	<u>K</u>
64	K	<u>Q</u>	<u>Q</u>
65	D	<u>G</u>	<u>G</u>
73	K	K	K
74	S	S	S
82B	S	S	S
84	S	S	S
85	E	E	E
105	Q	Q	Q
112	S	S	S
113	S	S	S

도면1c

FR1-21 V _L		
Kabat 위치	쥐 잔기	인간 잔기
1	D	D
3	V	V
9	S	S
10	Y	S
15	L	V
18	R	R
40	P	P
41	G	G
42	N	K
45	R	K
57	G	G
60	S	S
67	S	S
80	Q	Q
81	T	P
100	S	Q
103	K	K
105	E	E
107	K	K
108	R	R

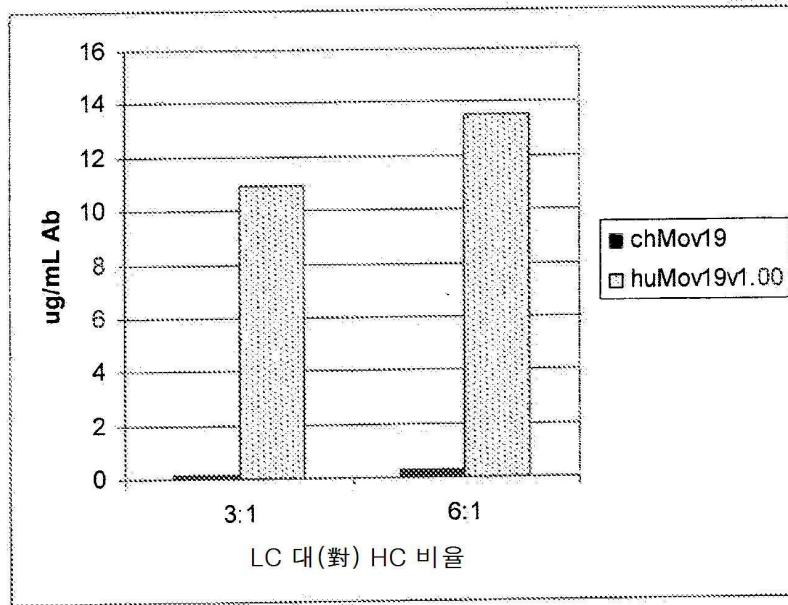
도면1d

FR1-21 V _H		
Kabat 위치	쥐 잔기	인간 잔기
1	E	E
3	K	Q
11	L	V
13	K	K
14	P	P
17	S	S
19	K	K
41	P	P
42	D	G
43	K	K
44	R	G
60	P	S
61	D	P
63	V	F
64	K	Q
65	G	G
73	N	K
74	A	S
75	K	K
83	K	K
84	S	A
85	E	E
105	Q	Q
112	S	S

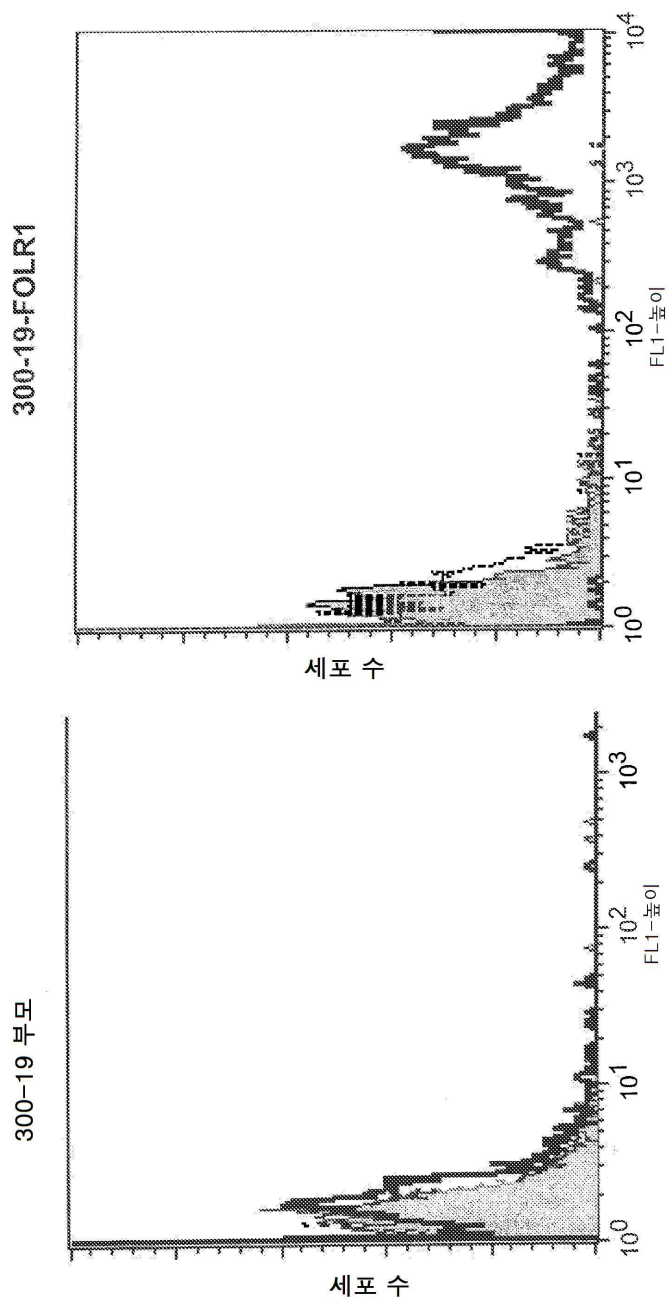
도면2

A		1	60
	muMov19 LC	DIELTQSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQPKLLIYRASNLEA	
	huMov19LCv1.00	--V-----L-----P-----R-----	
	huMov19LCv1.60	--V-----L-----P-----R-----	
		61	112
	muMov19 LC	GVPTRFSGSGSKTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKL	
	huMov19LCv1.00	---D-----N-S--A-----EIKR	
	huMov19LCv1.60	---D-----T-S--A-----EIKR	
B		1	60
	muMov19 HC	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWVKSHGKSLEWIGRIHPYDGDIFY	
	huMov19 HC	---V-----V-----T-----P-Q-----	
		61	118
	muMov19 HC	<u>NONFKDKATLTVDKSSNTAHMELL</u> SLTSEDFAVYVCTRYDGSRAMDYWGQGTITVTVS	
	huMov19 HC	--K-QG-----S	
C		1	60
	muFR1-21 LC	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQKPGNAPRLIISGATSLEIGVPS	
	huFR1-21 LC	-----S---V-----K--K-----	
		61	108
	muFR1-21 LC	RFSGSGSGKDYTLISSLQTEDVATYYCQY ~~WSTP~~ PFTFGSGTKLEIKR	
	huFR1-21 LC	-----P-----Q-----	
D		1	60
	muFR1-21 HC	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGM ~~SWVR~~ QTPDKRLECVATISSGGSYTYY	
	huFR1-21 HC	--Q-----V-----G-G-----	
		61	120
	muFR1-21 HC	<u>PDGVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSS</u> LKSEDTAMYYCARDGEGGLYAMDYWGQGTSTVTVSS	
	huFR1-21 HC	SP-FQ-----KS--A-----	

도면3



도면4

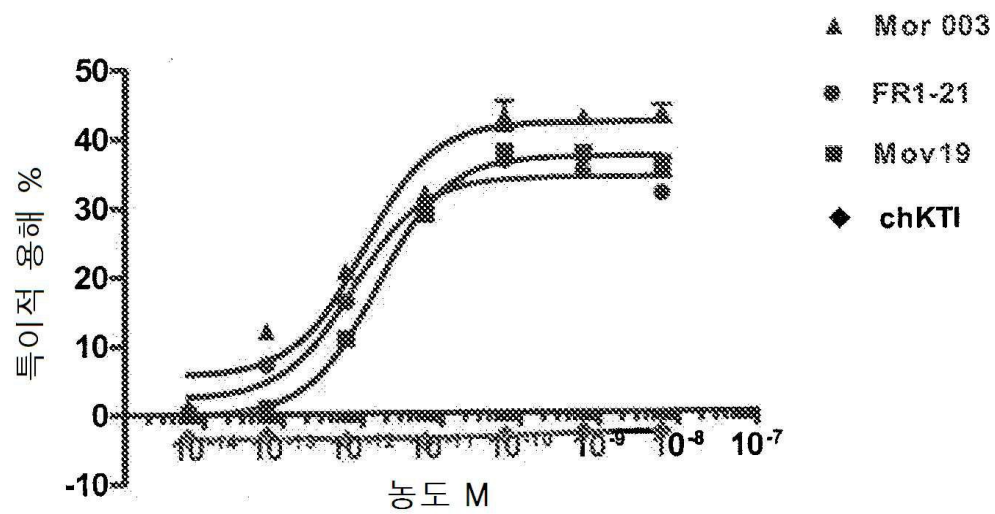


300-19 부모 세포
 회색 실선 = 세포 자기 형광
 검은색 점선 = 세포 + 항-인간 이차-FITC
 검은색 실선 = 세포 + huMov-19 + 항-인간 이차-FITC

도면5

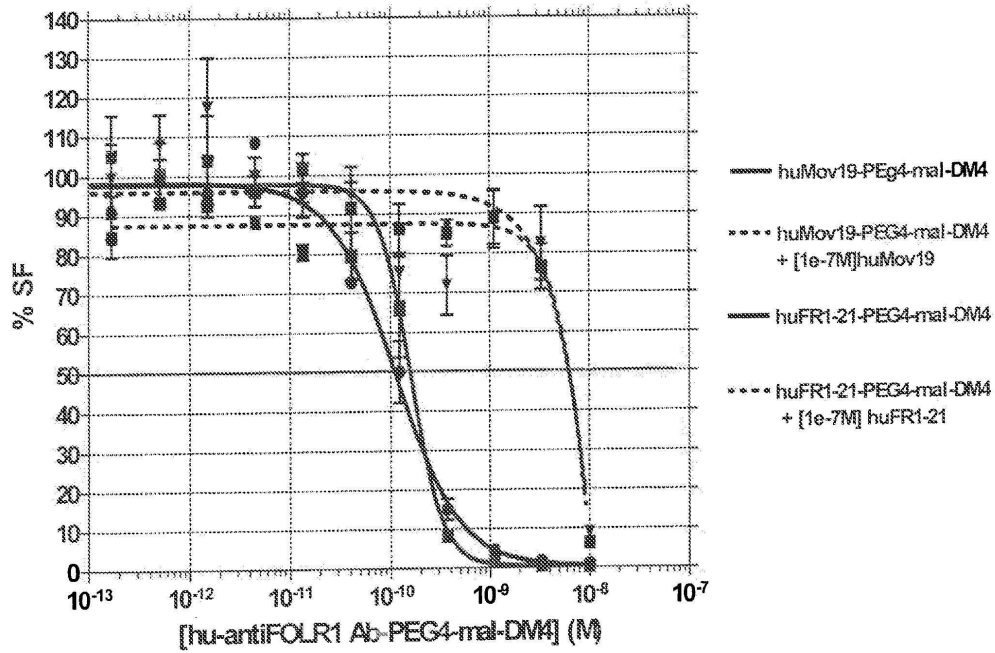
클론	아이소타입	SKOV3 세포에서 친화성, Kd, nM	KB 세포에서 PEG4-mal-DM4 접합체의 세포독성 활성, IC50, nM(연속 노출)
huMov19	IgG1	0.07	0.15
muFR1-9	IgG1	0.13	0.22
muFR1-13	IgG2b	0.66	0.15
muFR1-22	IgG2a	0.69	0.14
muFR1-23	IgG2a	0.55	0.13
huFR1-23	IgG1	0.60	
muFR1-21	IgG2b	0.07	0.10
huFR1-21	IgG1	0.07	0.10

도면6

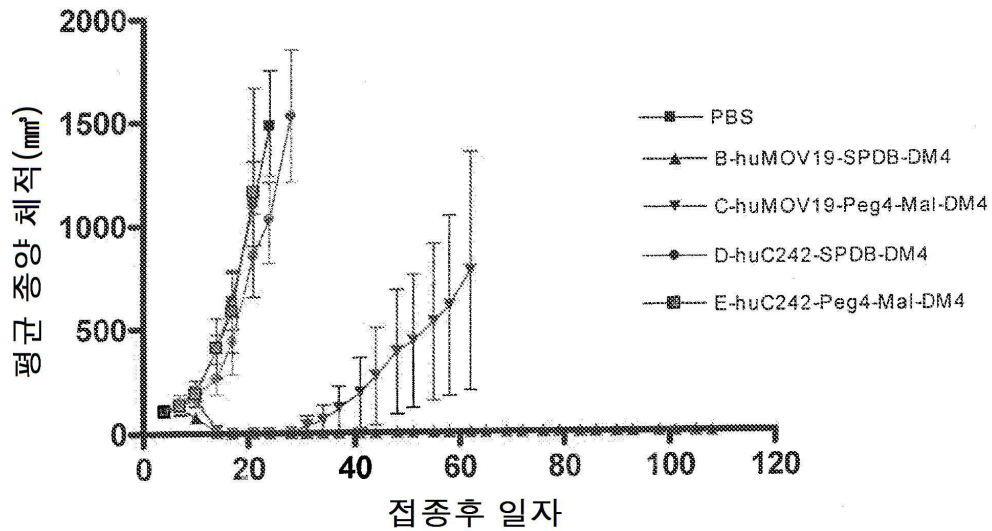


도면7

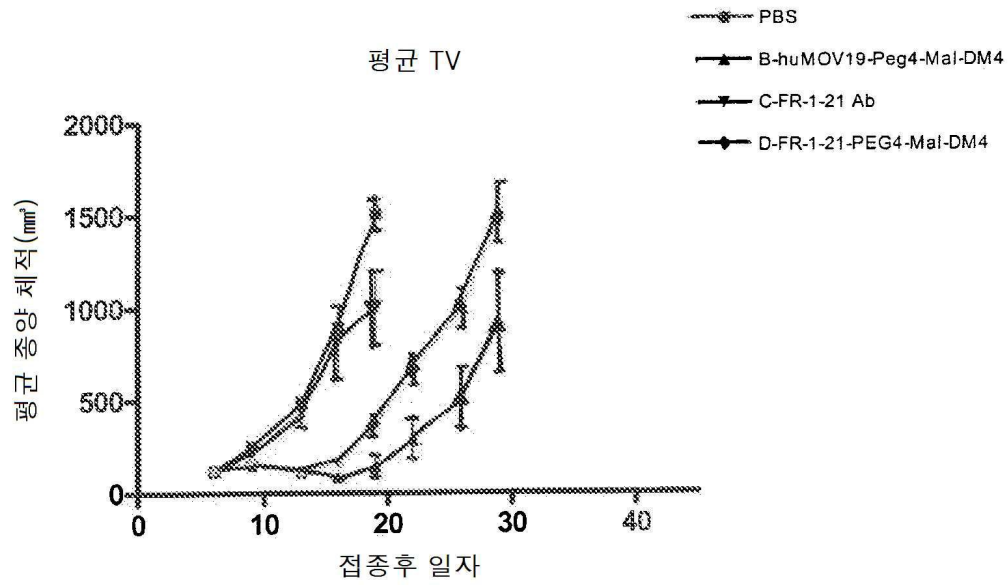
KB 세포에서 huFR1-21-PEG4-mal-DM4와
huMov19-PEG4-mal-DM4의 세포독성 활성
연속 노출, WST8



도면8

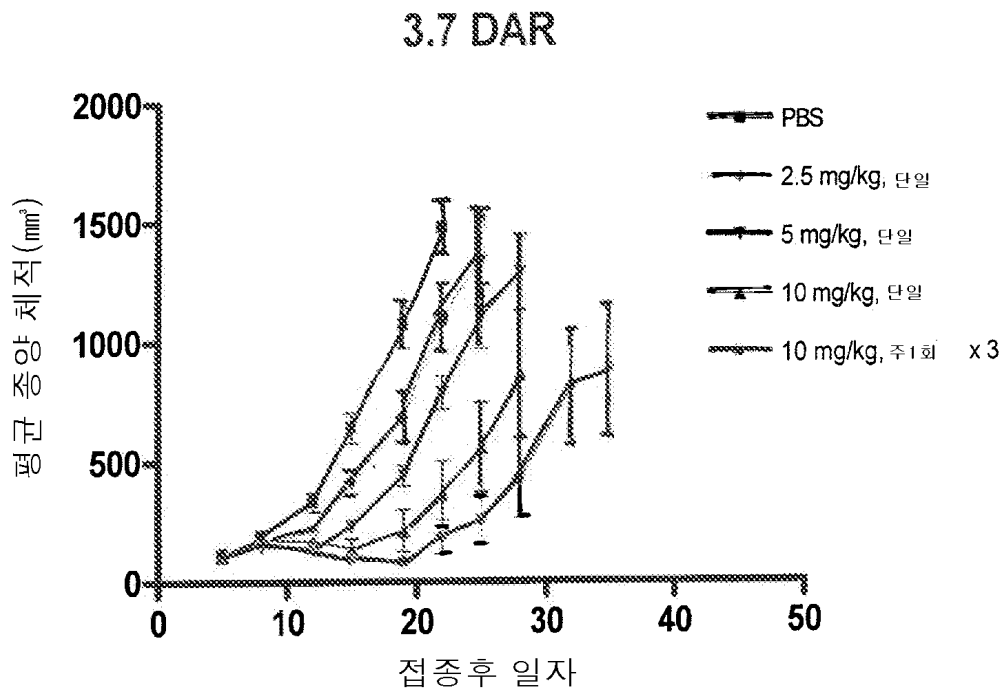


도면10

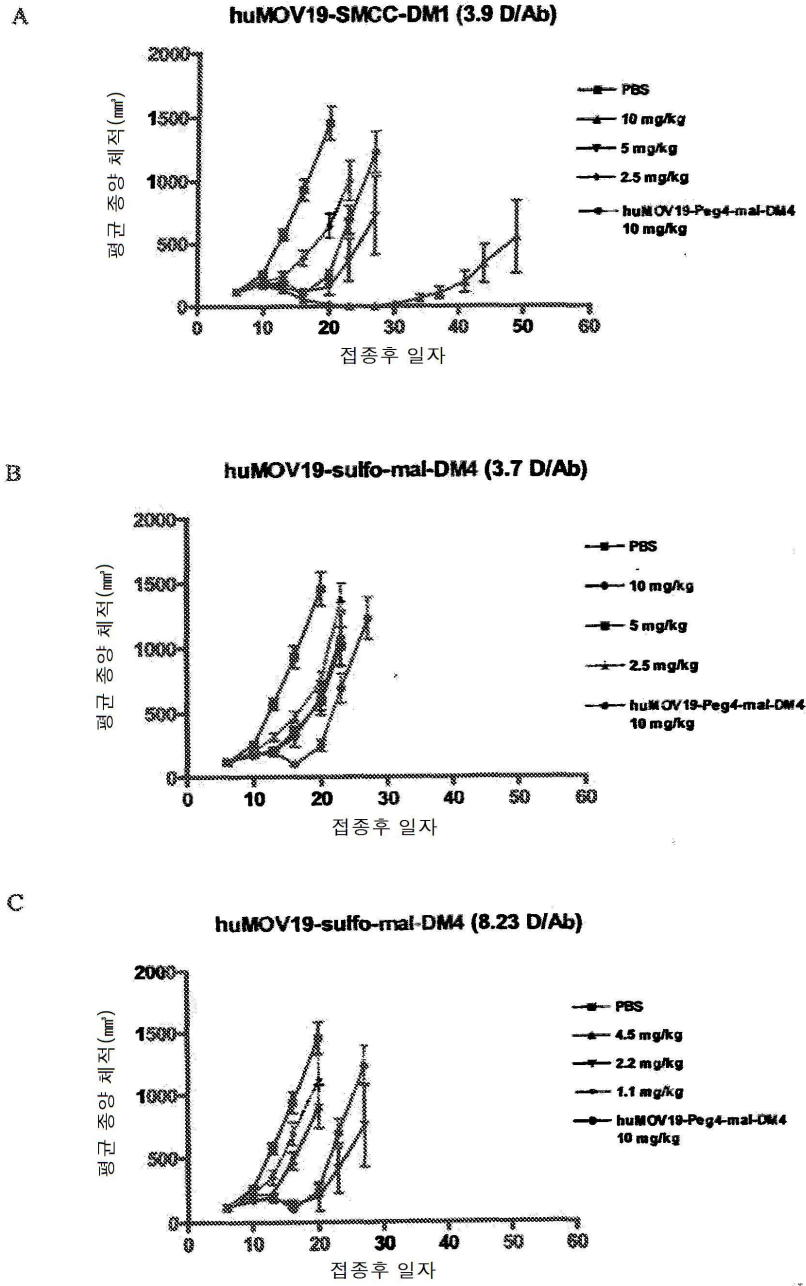


접종 후 6일자에 10 mg/kg 단일 주사, KB 모형

도면11

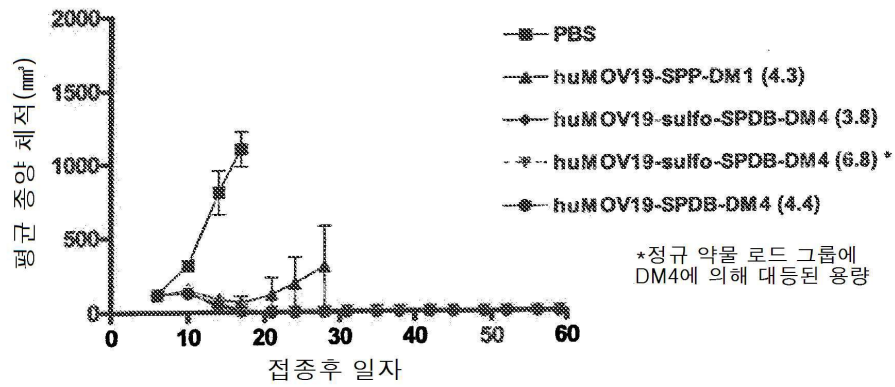


도면12

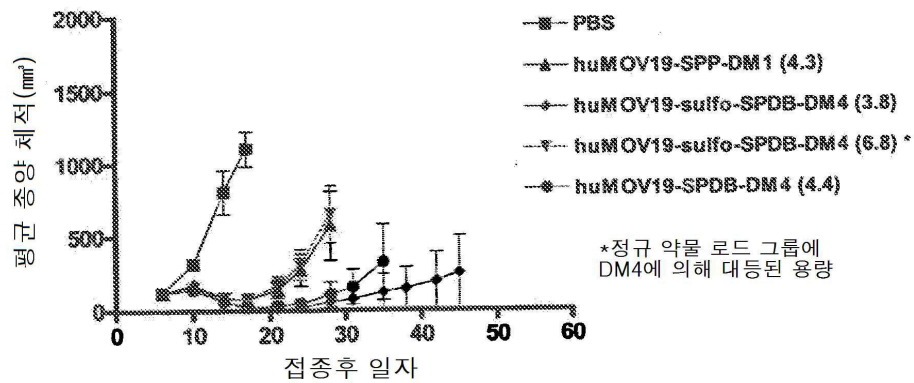


도면13

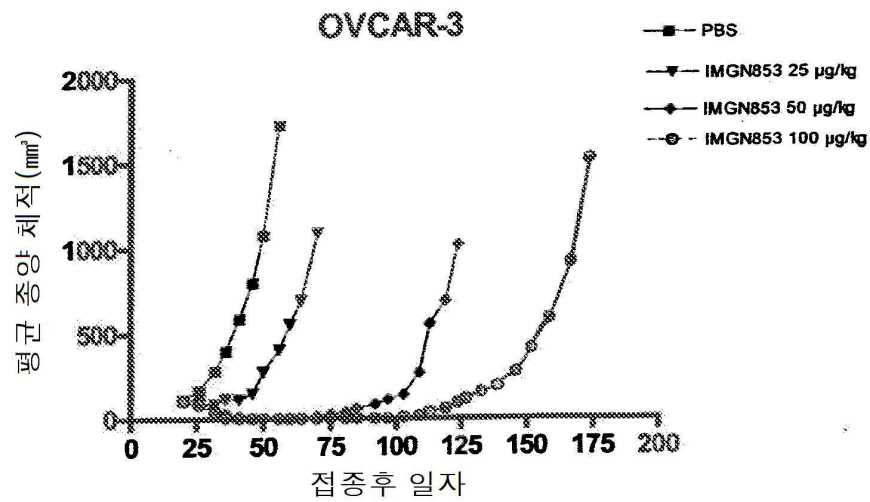
A. 5 mg/kg
단일 주사



B. 2.5 mg/kg
단일 주사

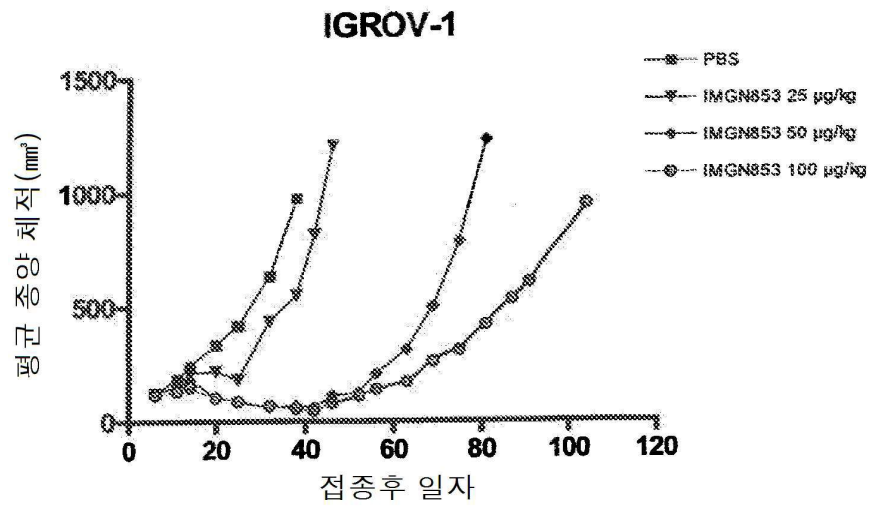


도면14



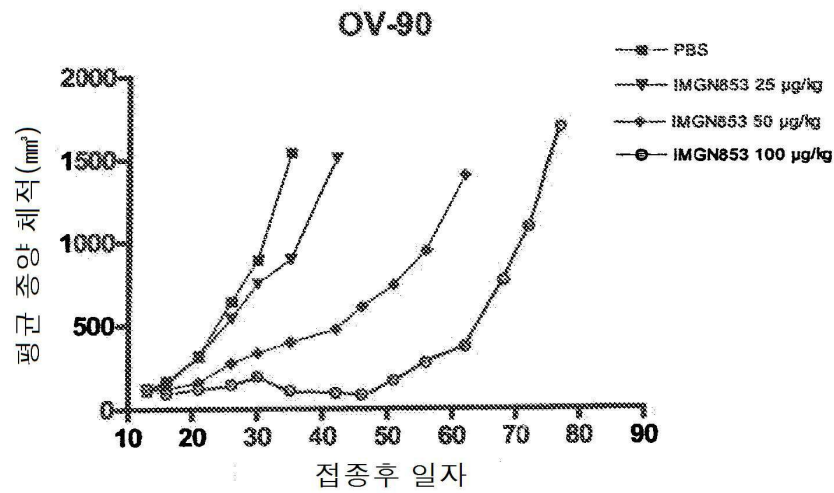
모형	주사당 용량	T/C (%)	(T-C) (일자)	로그 세포 사멸	관해		종양없는 생존자 208일	주석
					부분	완전		
OVCAR-3	25 µg/kg	18	21.0	0.7	2/6	1/6	0/6	활성
	50 µg/kg	0	74.5	2.4	6/6	4/6	0/6	고도 활성
	100 µg/kg	0	120.0	3.9	6/6	6/6	0/6	고도 활성

도면15



모형	주사당 용량	T/C (%)	(T-C) (일자)	로그 세포 사멸	관해		종양 없는 생존자 120일	주석
					부분	완전		
IGROV-1	25 µg/kg	55	6.0	0.2	0/6	0/6	0/6	비활성
	50 µg/kg	7	41.0	1.1	5/6	0/6	0/6	고도 활성
	100 µg/kg	5	67.0	1.8	6/6	0/6	0/6	고도 활성

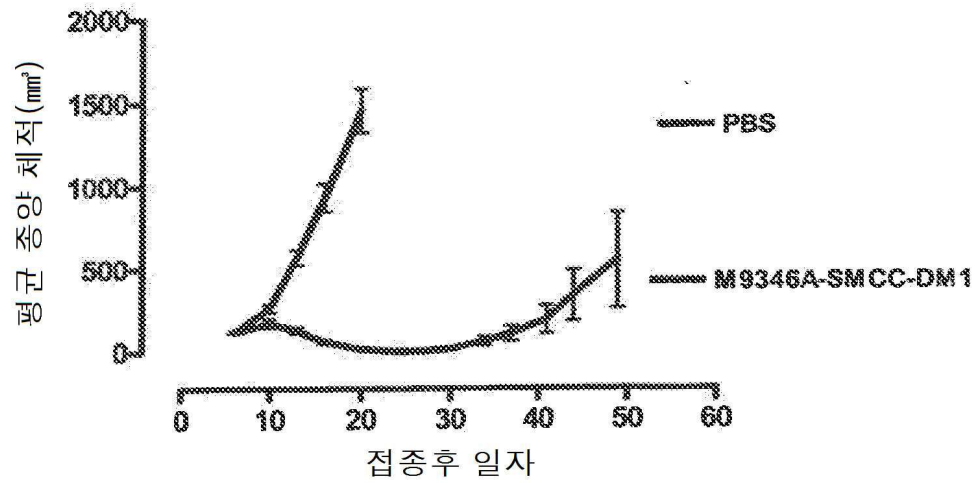
도면16



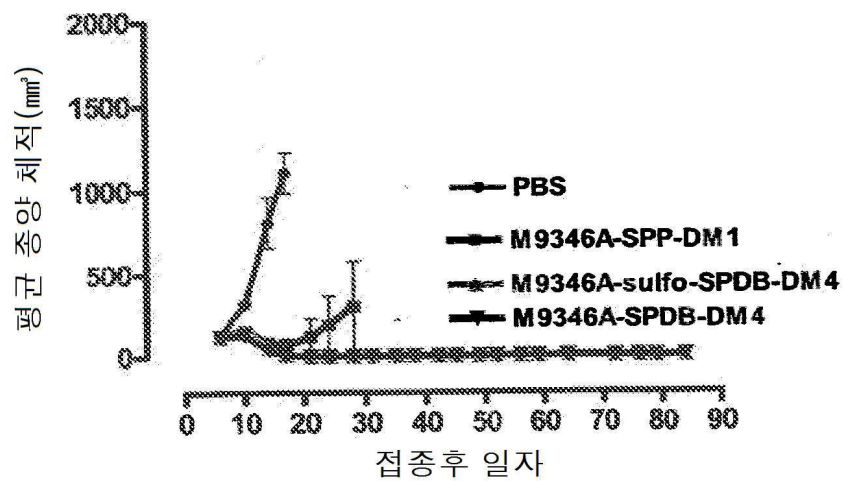
모형	주사당 용량	T/C (%)	(T-C) (일자)	로그 세포 사멸	관해		종양 없는 생존자 92일	주석
					부분	완전		
OV-90	25 µg/kg	77	5.0	0.2	0/6	0/6	0/6	비활성
	50 µg/kg	36	26.0	1.2	0/6	0/6	0/6	활성
	100 µg/kg	16	40.0	1.9	2/6	0/6	0/6	활성

도면17

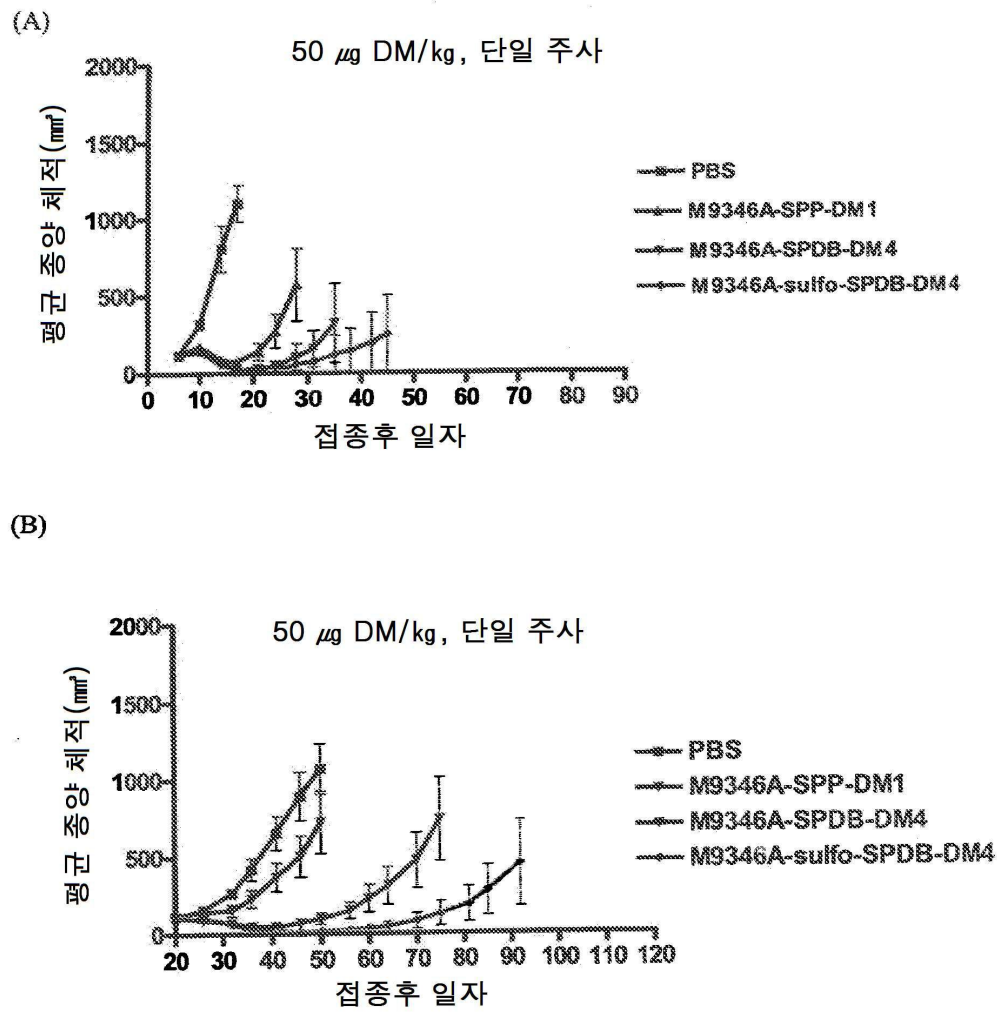
10 mg 접합체/kg, 단일 주사



5 mg 접합체/kg, 단일 주사

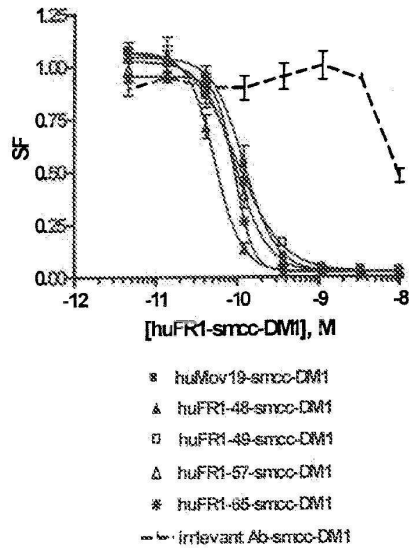


도면18

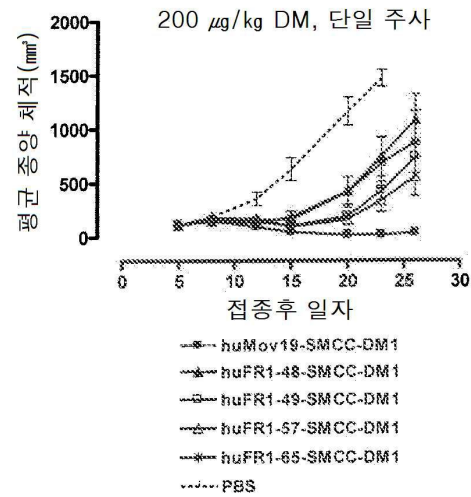


도면19

시험관내
KB 세포주



생체내
KB 이종이식편 모형



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> ImmunoGen, Inc.
- <120> Folate Receptor 1 Antibodies and Immunoconjugates and Uses Thereof
- <130> 2921.002PC04/EKS/MSS
- <140> PCT/US2011/026079
- <141> 2011-02-24
- <150> 61/413,172
- <151> 2010-11-12
- <150> 61/346,595
- <151> 2010-05-20
- <150> 61/307,797
- <151> 2010-02-24
- <160> 131
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huMov19 vHC CDR1

<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huMov19 vHC CDR2

<400> 2

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huMov19 vHC CDR3

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huMov19 vHC

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 440

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huMov19 vHC nucleic acid sequence

<400> 5

aagcttgcca ccatgggttg gtcatgcac atcctcttct tgggtgcaac tgctaccgga	60
gtgcacagtc aggtacagct cgtgcagtc gccgccgagg tgggaagcc tgggtgccagc	120
gtgaagatct cctgtaaagc cagtggatgc acattcaccg gttattttat gaattgggtg	180
aaacagagcc caggccaatc cctcgaatgg atagggcgaa tccacccata tgacggggac	240
accttttaca accagaaatt ccaggggaaa gccactctga cagtggacaa gagttccaac	300
actgcacaca tggagcttct ctcctgacc agcgaagact tcgctgttta ttactgtacc	360

cgttatgatg gttcccgctc aatggactac tggggccaag ggaccactgt caccgtaagt	420
tccgccagca ccaagggcc	440

<210> 6

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huMov19 HC amino acid sequence

<400> 6

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> huMov19 vLC CDR1
 <400> 7
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His

```

1             5             10             15
<210> 8
<211
> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> huMov19 vLC CDR2
<400> 8
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1             5
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> huMov19 vLC CDR3
<400> 9
Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1             5
<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> huMov19 vLCv1.00
<400> 10
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1             5             10             15

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

```

65						70						75						80
Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg			
					85						90						95	
Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg			
					100						105						110	
<210>	11																	
<211>	112																	
<212>	PRT																	
<213>	Artificial sequence																	
<220><223>	huMov19 vLCv1.60																	
<400>	11																	
Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly			
1					5					10					15			
Gln	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Phe	Ala			
					20						25						30	
Gly	Thr	Ser	Leu	Met	His	Trp	Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro			
					35						40						45	
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Asp			
					50						55						60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser			
65					70					75					80			
Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg			
					85						90						95	
Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg			
					100						105						110	
<210>	12																	
<211>	218																	
<212>	PRT																	
<213>	Artificial sequence																	
<220><223>	huMov19 LCv1.00																	
<400>	12																	
Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly			

1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

 Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

 Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 13
 <211> 218
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> huMov19 LCv1.60

<400> 13

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 14

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huMov19 LCv1.00 nucleic acid

<400> 14

gaattcgcca ccatgggctg gagctgcatt atcctttttc tggtagccac agctacaggc 60
gtgcatagcg atatcgtgct gacacaatcc cccctctctc tggccgtgtc actcggacag 120

cccgtatca tcagctgcaa agccagccag tctgtcagct tcgctggaac aagtcttatg 180
cattgggtatc atcagaagcc tggccagcaa cccaggtctg tgatctatcg agcctcaaac 240
ttggaagcag gagtgccaga ccggttttct gggtcggga gtaaaaccga ttttacactt 300
aatatctcac ctgtcgaggc cgaggacgcc gccacctact actgtcagca gagccgagag 360
tacccttaca cttttggcgg tgggactaaa ctggaaataa aacgtacg 408

<210> 15

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huMov19 LCv1.60 nucleic acid

<400> 15

gaattcgcca ccatgggctg gtcttgtatc atcctgtttc tggtagccac cgcaaccggt 60

gttcactccg acattgtgct gacacagtcc cccctttcac tggtgtatc cctcggccag 120
cccgtatca tcagctgcaa ggctagccag agcgtgagtt ttgccggcac ttcacttatg 180
cattgggtacc atcagaaacc aggccagcaa cctaggctgc tgatttatcg ggctagcaac 240
ctggaggccg gcgtgccga ccgcttttagc gggagcggct ccaagactga cttcactctg 300
accatctccc ccgtagaagc agaagatgct gcaacctact actgtcagca gtctcgcgag 360
tatecttata cattcggagg cggaactaaa ctggagatta aacgtacg 408

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muMov19 vHC CDR2

<400> 16

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muMov19 vHC_CAA68252

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser

115

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muMov19 vLC_CAA68253

<400> 18

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Thr
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105

<210> 19
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> chMov19 HC
<400> 19

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chMov19 LC

<400> 20

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Thr
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 21

<211> 441

<212>

> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> chMov19 HC nucleic acid

<400> 21

aagcttgcca ccatgggttg gtcttgatt atctcttttc tcgtcgcaac cgcaacaggc 60
 gtccattcac aagtccaact gcagcaatcc ggccgccgaac tcgttaaacc tggagcatct 120
 gttaaaatct catgtaaagc atcaggatcac tcattttactg gctattttat gaactgggtc 180
 aaacaatcac acggaaaatc acttgaatgg atcggacgta ttcacccta tgatggcgat 240
 actttttaca accagaactt caaagacaaa gctacactca ccgttgacaa atcatctaac 300
 accgctcaca tggaactcct ttcactcaca tctgaagact tcgctgttta ttactgtact 360

agatacgatg gatcaagagc tatggattat tggggacaag gaacaacagt cacagtctca 420
 tctgcatcaa ctaagggcc a 441

<210> 22

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> chMov19 LC nucleic acid

<400> 22

gaattcgcca ccatgggttg gtcttgatt atctctttc tcgtcgcaac cgcaacaggc 60
gtccattcag atatgaact cacacaatca ccagcttccc tcgcagtctc tctcggtcaa 120
cgcgcaatca tctcttgtaa agcctcccaa tcagtctcat tcgccggcac gtcctcatg 180
cattggtacc atcaaaaacc cggtcagcaa cccaaactcc ttatctatag agcaagcaac 240

ctcgaagcag gcgttccac cagatttagc ggatcaggaa gtaaaaccga tttcacactc 300
aacattcatc cagtcgaaga agaagatgca gctacttatt attgccaaca gtctagagaa 360
tatccataca cattcgagg gggtaacaaa cttgaaatta aacgtacg 408

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muMov19 vHC_CAA68252

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser

115

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muMov19 vLC_CAA68253

<400> 24

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Thr

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100 105

<210> 25

<211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(257)

<400> 25

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val

1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu

20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly

35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala

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

 Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
 100 105 110
 Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
 115 120 125
 Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
 130 135 140
 Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
 145 150 155 160

 Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175
 Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
 180 185 190
 Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
 195 200 205
 Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
 210 215 220

 Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
 225 230 235 240
 Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
 245 250 255

 Ser

<210> 26

<211> 771

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(771)

<400> 26

atggctcagc ggatgacaac acagctgctg ctcttcttag tgtgggtggc tgtagtaggg 60

gaggctcaga caaggattgc atgggccagg actgagcttc tcaatgtctg catgaacgcc 120

aagcaccaca aggaaaagcc agggcccgag gacaagttgc atgagcagtg tcgaccctgg 180

aggaagaatg cctgctgttc taccaacacc agccaggaag ccataagga tgtttcctac 240

ctatatagat tcaactggaa cactgtgga gagatggcac ctgcctgcaa acggcatttc 300

atccaggaca cctgcctcta cgagtgtcc cccaacttgg ggccctggat ccagcaggtg 360

gatcagagct ggcgcaaaga gcgggtactg aacgtgcccc tgtgcaaaga ggactgtgag 420

caatgggtggg aagattgtcg cacctcctac acctgcaaga gcaactggca caagggtgg 480

aactggactt cagggtttta caagtgcga gtgggagctg cctgccaacc tttccatttc 540

tacttccca caccactgt tctgtgcaat gaaatctgga ctactccta caaggtcagc 600

aactacagcc gagggagtgg ccgctgcatc cagatgtggt tcgaccagc ccagggaac 660

cccaatgagg aggtggcgag gttctatgct gcagccatga gtggggtgg gccttgggca 720

gcctggcctt tctgtcttag cctggcccta atgtgctgt ggctgctcag c 771

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-21 vLC CDR1

<400> 27

Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp Leu Ala

1 5 10

<210

> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-21 vLC CDR2

<400> 28

Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr

1 5

<210> 29

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FR1-21 vLC CDR3
 <400> 29
 Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FR1-21 vHC CDR1
 <400> 30
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5
 <210>
 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FR1-21 vHC CDR2
 <400> 31
 Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FR1-21 vHC CDR3
 <400> 32
 Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-21 Kabat murine CDR-H2

<400> 33

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Gly Val Lys

1 5 10 15
Gly

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-21 Kabat human CDR-H2

<400> 34

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Pro Gly Phe Gln

1 5 10 15
Gly

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-21 vLC

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly

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

65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 36

 $\langle 211 \rangle$ 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-21 vHC

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Cys Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Gly Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37

<211> 323

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-21 vLC DNA sequence

<400> 37

gacatccaga tgacacaatc ttcacacctac ttgtctgtat ctctaggagg cagagtcacc 60

attacttgca aggcaagtga ccacataaat aattggtttag cctgggtatca gcagaaacca 120

ggaaatgctc ctaggtctctt aatatctggt gcaaccagtt tggaaactgg ggttccttca 180

agattcagtg gcagtggatc tggaaaggat tacactctca gcatttccag tcttcagact 240

gaagatgttg ctacttatta ctgtcaacag tattggagta ctccattcac gttcggctcg 300

gggacaaaagt tggaaataaa acg 323

<210> 38

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-21HCvarPat

<400> 38

gaagtgaagc tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggttggagtg tgtcgcaacc attagtagtg gtgtagtta cacctactat 180

ccagacggtg tgaagggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagggacggc 300

gaggggggcc tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-21 LC

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Leu Gln Thr

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly

115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 40

<211> 456

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-21 HC

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Cys Val

35	40	45	
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Gly Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val			
115	120	125	
Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr			
130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu			
165	170	175	
Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala			
195	200	205	
Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser			
210	215	220	
Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala			
225	230	235	240
Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile			
245	250	255	
Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val			
260	265	270	
Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val			
275	280	285	

Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp

290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln

305 310 315 320

Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp

325 330 335

Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val

340 345 350

Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser

355 360 365

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

370 375 380

Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr

385 390 395 400

Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr

405 410 415

Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe

420 425 430

Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys

435 440 445

Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys

450 455

<210> 41

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-21 vLC

<400> 41

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

1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-21 vHC

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Cys Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Pro Gly Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 43

<211> 446

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-21VH_co

<400> 43

aagcttgcca ccatgggatg gtcatgcac attctttttc tcgtcgccac tgccacaggt 60

gtgcattccg aggtgcaact tgtagaatct ggcggggatg ttgtgaagcc tggaggtagt 120

ctcaagttgt cctgtgctgc atctgggttt accttctctt cctacggaat gagctgggtg 180

agacagactc ctggcaaggg gctggagtgc gttgccacca ttagtagtgg aggttcttac 240

acctactatt cacctggttt tcagggacgc ttacaatct cccgcgataa gtctaagaac 300

accctttacc tccagatgag tagccttaag gctgaggaca cagccatgta ttattgcgt 360

cgcgatgggg agggagggct ttacgtatg gactactggg gccagggtac cagcgtgacc 420

gtttcctctg ctagtacaa gggccc 446

<210> 44

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR21VL_co

<400> 44

gaattcgcca ccatgggatg gtcattgac attctgttct tggtagcaac agcaactggc 60

gtccattctg acatccagat gacccaatcc tccagcagct tgcagtatc cgttgggggc 120

cgcgttacta ttacctgtaa ggctccgac catataaata actggcttgc atggtatcaa 180

cagaagcctg ggaaggcacc taaactgctt atctctgggg ccacaagcct ggagaccggc 240

gtgccttcca ggttctctgg aagtggatct ggcaaggact ataccttgag cattagtagc 300

cttcaacctg aggacgtcgc cacctactat tgcagcagt attggtctac accctttacc 360

tttggacagg gcactaaatt ggagataaaa cgtacg 396

<210> 45

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-21 LC

<400> 45

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

1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 46

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-21 HC

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Cys Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Pro Gly Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

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

210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
Gly			

<210> 47
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> huFR1-21LC DNA sequence
 <400> 47
 gacatccaga tgacccaatc ctccagcagc ttgtcagtat ccgttggggg ccgcgttact 60
 attacctgta aggcctccga ccatataaat aactggcttg catggtatca acagaagcct 120

 gggaaggcac ctaaactgct tatctctggg gccacaagcc tggagaccgg cgtgccttcc 180
 aggttctctg gaagtggatc tggcaaggac tataccttga gcattagtag ccttcaacct 240
 gaggacgtcg ccactacta ttgtcagcag tattggtcta caccctttac ctttggacag 300
 ggactaaat tggagataaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
 <210> 48
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> huFR1-21HC DNA sequence
 <400> 48
 gaggtgaac ttgtagaatc tggcggggat gttgtgaagc ctggaggtag tctcaagttg 60
 tctgtgtctg catctgggtt taccttctct tcctacggaa tgagctgggt gagacagact 120
 cctggcaagg ggctggagtg cgttgccacc attagtagtg gaggttctta cacctactat 180
 tcacctgggtt ttcagggacg cttacaatc tcccgcgata agtctaagaa caccctttac 240

 ctccagatga gtagccttaa ggctgaggac acagccatgt attattgcgc tcgcatggg 300
 gagggagggc tttacgctat ggactactgg ggccagggtt ccagcgtgac cgtttcctct 360
 gctagtacca agggcccatc agttttcccc ttggctccaa gttctaaatc cacaagcgg 420
 ggaacagctg cactgggatg cctcgttaaa gattatttcc ctgagcctgt gacagtgagc 480
 tggaatagcg gagcattgac ttcagggtgtg cacacttttc ccgctgtgtt gcagtcctcc 540

ggctctgtact cactgtccag tgtcgtaacc gtcccttcta gcagcttggg aacccagacc	600
tacatctgta acgtcaacca taaaccatcc aacacaaagg tggataagaa ggttgaacca	660
aagagctgtg ataagacaca tacatgcctt cttgtctctg caccagagct cctcggaggt	720
ccatctgtgt tctgttttcc ccccaaacc aaggacactc ttatgatctc tcgtactcca	780
gaggtcacct gtgttgttgt cgacgtgagc catgaagatc ccgaggttaa attcaactgg	840
tacgtggatg gagtcgaggt tcacaatgcc aagaccaagc ccaggaggga gcaatataat	900
tctacatatac gggtagttag cgttctgacc gtgctccacc aagattggct caatggaaaa	960
gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggct cttcccgtc ccattgagaa aactatctcc	1020
aaagccaagg ggcagccacg ggaacccag gtgtatacat tgccccatc tagagacgag	1080
ctgaccaaga accaggtgag tctcacttgt ctggtaagg ggttttacc tttgacatt	1140
gctgtagagt gggagtctaa cggacagcca gaaaacaact acaagacaac tccccagtg	1200
ctggacagcg acgggagctt cttcctctac tccaagttga ctgtagacaa gtctagatgg	1260
cagcaaggaa acgttttctc ctgctcagta atgcatgagg ctctgcacaa tcaataacc	1320
cagaaatcac tgtcccttag cccaggg	1347
<210> 49	
<211> 792	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> huFolR1 DNA sequence EcoRI to XbaI	
<400> 49	
gaattcgcca ccatggcaca gcgcatgacc actcagctcc tgcttctgtt ggtttgggtg	60
gcagtcgtgg gagaggccca gaccaggatt gcttgggcac gcacagagct gcttaatgtt	120
tgcatgaacg caaagcaca taaagagaaa cccggtcccg aggataagtt gcacgaacag	180
tgccgccctt ggagaaagaa tgcatgctgt agcacgaaca cctctcagga ggcgcataaa	240
gacgtaagct atttgtatag atttaactgg aaccattgcg gtgaaatggc acctgcctgt	300
aaacggcact ttatccagga tacttgcttg tacgagtga gcccgaaatc cgggccctgg	360
attcagcaag ttgatcagag ttggcgcaaa gagaggggtgc tgaacgttcc gctttgcaag	420
gaggactcgc agcaatgggt ggaagactgt agaaccagct acacctgtaa gtctaactgg	480
cacaaaggat ggaactggac atccgggttt aacaaatgcg ctgtcggcgc tgcctgccag	540
ccatttcatt tctactttcc aactcccact gtctgtgtga acgagatttg gacgcattca	600
tataaagtca gcaactacag ccggggctcc ggccgctgca ttcagatgtg gttcgaccct	660

gcacagggca accctaacga ggaggctgca cgcttctacg ctgcagcaat gtctggagcc 720
 ggtccttggg ctgcttgccc atttctcctt agcctcgccc tcatgcttct ctggctgttg 780
 tcataatcta ga 792

<210> 50
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer EcoMH1
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> s is g or c
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> r is a or g
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n is g, a, t or c
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> m is a or c
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> s is g or c
 <220><221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> s is g or c

<400>

50

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32

<210> 51
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer EcoMH2

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> s is g or c

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> r is a or g

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n is g, a, t or c

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> m is a or c

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> s is g or c

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> s is g or c

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> w is a or t

<400> 51

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg

35

<210> 52

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer BamIcG1

<400> 52

ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt ttggc

36

<210> 53

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> SacIMK
 <220><221> misc_feature

 <222> (10)..(10)
 <223> y is c or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> m is a or c
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> s is g or c
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> m is a or c
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> r is a or g
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> w is a or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> m is a or c
 <400> 53
 ggagctcgay attgtgmtsa cmcarwctmc a

31

<210> 54
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> HindKL
 <400> 54
 tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc
 <210> 55
 <211> 39

46

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> cd37-1LClead

<400> 55

ttttgaattc gccaccatga agtttccttc tcaacttct 39

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> human and chimeric Mov19 vHC CDR2 composite

<220><221> MISC_FEATURE

<222

> (14)..(14)

<223> Xaa can be Gln, His, Lys, or Arg

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa can be Arg, Gln, His, or Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa can be Glu, Thr, Ser, Gly, Ala, or Val

<400> 56

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa

1	5	10	15
---	---	----	----

Xaa

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-48vL CDR1

<400> 57

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 58

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FR1-48vL CDR2
 <400> 58
 Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
 1 5
 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FR1-48vL CDR3
 <400> 59
 Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FR1-48vH CDR1
 <400> 60
 Thr Asn Tyr Trp Met Gln
 1 5
 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> FR1-48vH CDR2
 <400> 61
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg
 1 5 10
 <210> 62
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-48vH CDR3

<400> 62

Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr

1 5

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-49vL CDR1

<400> 63

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-49vL CDR2

<400> 64

Thr Ala Ser Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-49vL CDR3

<400> 65

Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-49vH CDR1

<400> 66

Thr Asn Tyr Trp Met Tyr

1 5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-49vH CDR2

<400> 67

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr

1 5 10

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-49vH CDR3

<400> 68

Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-57vL CDR1

<400> 69

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn Leu His

1 5 10

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-57vL CDR2

<400> 70

Tyr Val Ser Gln Ser Val Ser

1 5

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-57vL CDR3

<400> 71

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His Tyr Thr

1 5 10

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-57vH CDR1

<400> 72

Ser Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-57vH CDR2

<400> 73

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser

1 5 10

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-57vH CDR3

<400> 74

Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr

1 5

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-65vL CDR1

<400> 75

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn Val Ala

1 5 10

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-65vL CDR2

<400> 76

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-65vL CDR3

<400> 77

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-65vH CDR1

<400> 78

Thr Ser Tyr Thr Met His

1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-65vH CDR2

<400> 79

Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn

1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1-65vH CDR3

<400> 80

Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 81

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-48 Kabat defined HC CDR2

<400> 81

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-48 Kabat defined HC CDR2

<400> 82

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-49 Kabat defined HC CDR2

<400> 83

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-57 Kabat defined HC CDR2

<400> 84

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

1 5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-57 Kabat defined HC CDR2

<400> 85

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

1 5 10 15

Gly

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-65 Kabat defined HC CDR2

<400> 86

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

1 5 10 15

Asp

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-65 Kabat defined HC CDR2

<400> 87

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

1 5 10 15

Gly

<210> 88

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-48vL

<400> 88

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 89

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-48vH

<400> 89

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Gln Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-49vL

<400> 90

```

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

           35           40           45
Tyr Thr Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65           70           75           80
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr
           85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

```

100

105

<210> 91

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-49vH

<400> 91

```

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

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

```

85 90 95
 Thr Lys Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 92

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-57vL

<400> 92

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

1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Val Ser Gln Ser Val Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210>

93

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-57vH

<400> 93

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

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

<210> 94

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-65vL

<400> 94

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

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 95
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> muFR1-65vH

 <400> 95
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Ala Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 96
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220><223> huFR1-48vL
 <400> 96
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly

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

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

<210> 97

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-48vH

<400> 97

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
 Met Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 98

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-49vL

<400> 98

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 99

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-49vH

<400> 99

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

1 5 10 15

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

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

Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Lys Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 100

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-57vL

<400> 100

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn

20 25 30

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

35 40 45

Lys Tyr Val Ser Gln Ser Val Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 101

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-57vH

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 102

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-65vL

<400> 102

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Thr Ser Pro Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 103

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-65vH

<400> 103

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 104

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-48LC

<400> 104

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly

115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 105

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-48HC

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Gln Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Met Arg

180	185	190
Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys		
210	215	220
Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys		
225	230	235
Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val		
245	250	255
Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe		
260	265	270
Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu		
275	280	285
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His		
290	295	300
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala		
305	310	315
Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg		
325	330	335
Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met		
340	345	350
Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro		
355	360	365
Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn		
370	375	380
Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val		
385	390	395
Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr		
405	410	415
Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu		
420	425	430

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 106
<211> 214
<212> PRT

<213> Artificial sequence
<220><223> muFR1-49LC
<400> 106

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Thr Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125
Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140
Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160
Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210
 <210> 107
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> muFR1-49HC
 <400> 107
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Leu Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Leu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Lys Arg His Asp Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

	165	170	175
Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr			
	180	185	190
Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser			
	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro			
	210	215	220
Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu			
	245	250	255
Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro			
	260	265	270
Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala			
	275	280	285
Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val			
	290	295	300
Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu			
	340	345	350
Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys			
	355	360	365
Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn			
	370	375	380
Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys			
	405	410	415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
420 425 430

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 108

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-57LC

<400> 108

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

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

Lys Tyr Val Ser Gln Ser Val Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 109

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-57HC

<400> 109

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr
180 185 190

Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
245 250 255

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
260 265 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
275 280 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
290 295 300

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
340 345 350

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
355 360 365

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
370 375 380

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys

405 410 415
 Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
 420 425 430

 Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 110
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> muFR1-65LC
 <400> 110
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Glu Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
 65 70 75 80
 Ala Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

 100 105 110
 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190
Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 111

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-65HC

<400> 111

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Ala Trp Ile

35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val

115 120 125

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

130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val	Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr		
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser			
	180	185	190
Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala			
195	200	205	
Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys			
210	215	220	
Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val			
	245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe			
260	265	270	
Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro			
275	280	285	
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro			
290	295	300	
Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val			
305	310	315	320
Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr			
325	330	335	
Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys			
340	345	350	
Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp			
355	360	365	
Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro			
370	375	380	

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser

385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala

405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His

420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 112

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-48LC

<400> 112

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ala Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 113
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> huFR1-48HC
 <400> 113
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

 Trp Met Gln Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115	120	125	
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
130	135	140	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
165	170	175	
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
180	185	190	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
195	200	205	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
210	215	220	
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
245	250	255	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
260	265	270	
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
275	280	285	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
290	295	300	
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
305	310	315	320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
325	330	335	
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
340	345	350	
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
355	360	365	

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 114

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-49LC

<400> 114

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Val Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 115

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-49HC

<400> 115

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

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

115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445
<210> 116

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-57LC

<400> 116

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

Lys Tyr Val Ser Gln Ser Val Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 117

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-57HC

<400> 117

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

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 118

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-65LC

<400> 118

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Thr Ser Pro Gly

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

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

100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 119
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> huFR1-65HC
 <400> 119
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Ala Trp Ile

 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95	
Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
115	120	125	
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
165	170	175	
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
180	185	190	
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
195	200	205	
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 120

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-48_VL

<400> 120

gaattcgcca ccatgggatg gagttgtatc atcctgtttc ttgtggctac agccacaggg	60
gtacactccg atattcaaat gacacagtcc cttcatccc tgtccgtcag tgtgggggaa	120
agggttacca tcacctgccg tgcacagag aacatctatt ccaacctcgc ctggtaccaa	180

cagaaacctg gcaagtcgcc taagctgttg gtctacgccg ctacaaacct cgccgatggg	240
gtgccttccc gtttcagtgg gtcagagtca ggcaccgact attctctgaa gatcaactcc	300
ctccagcctg aggatttcgg ctctattac tgtcagcact tctgggctag tccatatact	360
ttcggccagg gaaccaaact tgaaattaaa cgtacg	396

<210> 121

<211> 437

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-48_VH

<400> 121

aagcttgcca ccatggggtg gagctgcatc atcctttttc tgggtggccac tgccaccggc 60

gtgcactctc aggtccaact tgtgcagagc ggagccgagg tggccaaacc cggagctagt 120

gttaagctct catgtaaagc atctggctac acctttacta actactggat gcagtggatc 180

aagcaacggc caggccaggg cctggagtgg attggtgcta tttatcccgg aaacggggat 240

agcaggtaca ctcagaaatt tcagggaag gctaccctta ccgccgataa gatttcttcc 300

acagcatata tgcaagtctc ctctctgacc tcagaggata gtgctgtcta ttactgcgct 360

cgccgggatg gcaactatgc agcctattgg ggtcaaggca cccttgtgac tgtatccgca 420

gcaagcacca agggccc 437

<210> 122

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-49_VL

<400> 122

gaattcgcca ccatgggttg gtcattgatt atcctgtttc tggtcgcaac agcaacaggt 60

gtgcacagtg acattcagat gacccaaagc ccctccagtc tgagcgtttc cgtgggggaa 120

cgtgtcacta tcacatgcag agcttccgag aatatattaca ctaacctcgc atggtaccag 180

cagaaacccg ggaagtctcc aaaacttctc gtatatacag ccagcaactt ggcagatggg 240

gtgccagccc ggtttagcgg atctgggtca ggcaccgact attctttgaa aattaattcc 300

ctgcagcctg aggattttgg tactactat tgccagcatt tttgggtatc accatacact 360

tttggacagg gaacaaagct ggagatcaag cgtacg 396

<210> 123

<211> 440

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-49_VH

<400> 123

aagcttgcca ccatgggctg gtcttgtatt attctttttc ttgtggccac agccacagga 60

gtccattcac aggtacagct ccaacagtct ggcgagcttg tcgccaagcc cggcgctct 120

gtgaagatga gttgcaaggc ctctggctac accttacta attattggat gtactggatc	180
aaacaacgcc cgggccaggg tctggaactc attggagcca tctaccagg caactccgac	240
acaacatata atcagaagtt tcagggcaaa gcaaccctga ccgctgtaac ctcagctaat	300
accgtgtaca tggaggttaag tagcttgact agtgaagatt ccgcagtata ctattgcacc	360
aagcgccatg attacggcgc catggattac tggggccaag gtaccagtgt gaccgtgtct	420
tccgcttcca ccaagggccc	440
<210> 124	
<211> 399	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> huFR1-57_VL	
<400> 124	
gaattcgcca ccatgggctg gtcattgatt atttgttcc tggtcgccac cgcaaccggc	60
gttcattccg aaattgttct tactcagagc cctgcaacct tgagtgtgac acccggcgat	120
cgggtctcac tgagtgcag agcttccag aatatcaaca ataactgca ctggtatcag	180
cagaagcctg gccagtctcc tcgcttgctg attaagtatg tctcacagag cgtgtcaggt	240
atccctgacc gtttctcgg gtcagggtca ggcaccgact tcacactgtc catttctagc	300
gtggagcctg aggatttcgg aatgtacttt tgccagcaga gcaatagctg gcctcactac	360
acctttggcc aagggaacca gctggagatc aagcgtacg	399
<210> 125	
<211> 440	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> huFR1-57_VH	
<400> 125	
aagcttgcca ccatgggctg gagctgtatc atcttgttcc ttgtggccac agctactggc	60
gtgcactccg aggtgcagct ggtcgaatcc ggcggaggcc tgggtcagcc tggggggagt	120
agacggctgt cctgcgctgc ctctgggttt actttctcaa gtttcggtat gcactgggtg	180
cgtcaggccc ccgggaaggg cctggaatgg gttgcttata tatcatctgg cagctccacc	240
atttcttatg ctgattccgt taagggacgc ttcaccattt ccagagacaa cagtaagaaa	300
acccttctgc tgcagatgac ctctctccgc gccgaagaca ccgcaatgta ttattgtgct	360
agagaggcct acggcagtag tatggaatac tgggggcagg ggaccctggt gaccgtgtct	420

tccgcatcta ctaagggccc 440

<210> 126

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-65_VL

<400> 126

gaattcgcca ccatgggctg gtcttgcat attctgttcc tggttgcaac agccactggc 60

gtccattccg aaatcgtgat gacccaatct cccgccacca tgtctacctc tcccggggac 120

cgggtgtctg tgacctgcaa ggcctctcag aatgttgccc caaacgtggc atggtatcaa 180

cagaaaccag ggcagtcacc cagagccctg atttactcgg cttcttacag atattcagga 240

gttccccccc ggttcacagg tagtgggtcc ggcactgact ttaccttgac catttccaac 300

atgcaatccg aggacctggc cgaatacttc tgtcagcagt acaattcata tccctataca 360

ttcggccagg ggaccaagct ggaaataaag cgtacg 396

<210> 127

<211> 446

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> huFR1-65_VH

<400> 127

aagcttgcca ccatgggctg gtcatgcata atcctgttcc tggtcgcaac cgctacaggt 60

gtactactccc aggtgcagtt ggtgcagagc ggggccgaag ttgctaagcc cggtgcaagt 120

gtaaaaatgt cctgcaaagc tagcgggtac acattcacat cctatactat gcattgggta 180

aaacacgcc caggacaggg gctcgcctgg ataggctata ttaaccaat atcaggatac 240

acaaactaca atcagaaatt tcagggaag gcaaccctga ccgccgacaa gtctcttctt 300

accgcatata tgcagctcaa ctccctgacc agtgaagata gcgcagtgtt ttactgtgcc 360

tccggcgggtg cttatggccg gaaacccatg gattactggg gacaaggcac ctccgtcaca 420

gtgagtagcg cctcaaccaa gggccc 446

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Kabat Defined Mov19 HC CDR2 Murine

<400> 128

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Kabat Defined Mov19 HC CDR2 Human

<400> 129

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 130

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> muFR1-49 Kabat defined HC CDR2

<400> 130

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

1 5 10 15

Gly

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMov19 vHC CDR2

<400> 131

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe

1 5 10