



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월24일
(11) 등록번호 10-2342935
(24) 등록일자 2021년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6825 (2017.08)
A61K 47/6847 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2016-7021198
(22) 출원일자(국제) 2015년02월04일
심사청구일자 2020년02월04일
(85) 번역문제출일자 2016년08월02일
(65) 공개번호 10-2016-0113620
(43) 공개일자 2016년09월30일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/052341
(87) 국제공개번호 WO 2015/118030
국제공개일자 2015년08월13일
(30) 우선권주장
1402006.9 2014년02월06일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
WO2012020006 A2
WO2007014744 A2

(73) 특허권자
온코매트릭스 바이오파마, 에스.엘.
스페인 이-48160 데리오 에디피시오 801비 - 2층
빠르크 테크놀로지코 데 비스카이아
(72) 발명자
콘메르만, 로렌드
스페인 이-48160 데리오 에디피시오 801비 - 2층
빠르크 테크놀로지코 데 비스카이아 온코매트릭스
바이오파마, 에스.엘. 내
프피젠마예르, 클라우스
스페인 이-48160 데리오 에디피시오 801비 - 2층
빠르크 테크놀로지코 데 비스카이아 온코매트릭스
바이오파마, 에스.엘. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **항체-약물 접합체 및 면역독소**

(57) 요약

본 발명은 하기 화학식 I을 갖는 접합체, 특히 항체-약물 접합체 및 면역독소, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물, 및 종양의 치료학적 치료에서 이러한 접합체의 사용에 관한 것이다: A-(L-D)_p, 식 중, A는 FAP에 선택적으로 결합하는 항체이고; L은 링커이며; D는 사이토라이신 또는 니그린-b A-쇄를 포함하는 약물이고; p는 1 내지 10이다. 이러한 접합체의 제조 방법 및 이러한 방법에서 사용하기 위한 성분이 개시된다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/30 (2013.01)
C07K 16/40 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

페레르, 크리스티나

스페인 이-48160 테리오 에디피시오 801비 - 2층
빠르크 테크놀로지코 데 비스까이아 온코매트릭스
바이오파마, 에스.엘. 내

파브레, 미리암

스페인 이-48160 테리오 에디피시오 801비 - 2층
빠르크 테크놀로지코 데 비스까이아 온코매트릭스
바이오파마, 에스.엘. 내

시몬, 로레노

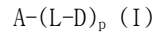
스페인 이-48160 테리오 에디피시오 801비 - 2층
빠르크 테크놀로지코 데 비스까이아 온코매트릭스
바이오파마, 에스.엘. 내

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I을 갖는 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물:



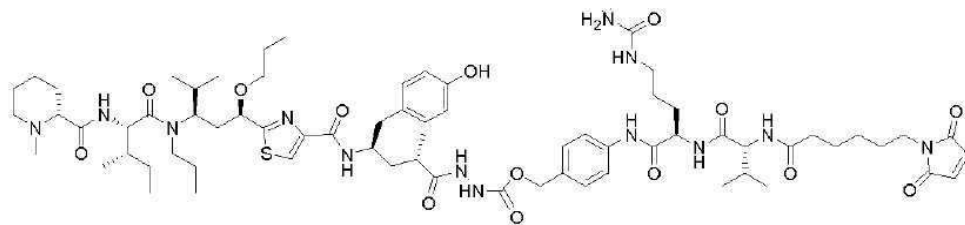
상기 화학식 I 중,

A는 섬유아세포 활성화 단백질(Fibroblast Activating Protein: FAP)에 선택적으로 결합하는 항체이고;

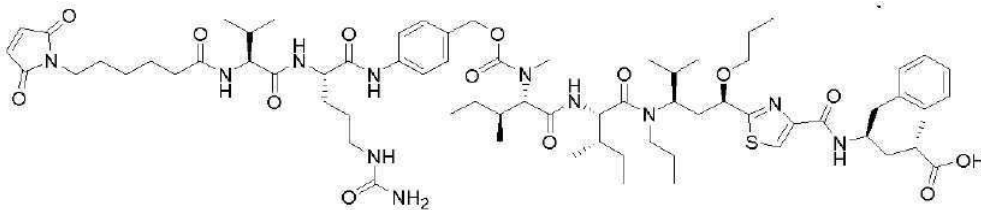
p는 1 내지 10이며;

L-D는 하기 식 1의 TAM471, 하기 식 2의 TAM551, 하기 식 3의 TAM552, 하기 식 4의 TAM553, 하기 식 5의 TAM558 중 어느 하나이다:

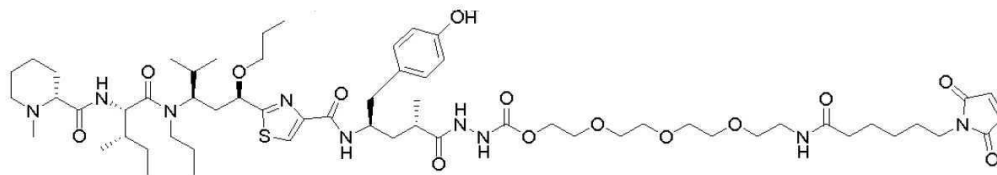
<식 1>



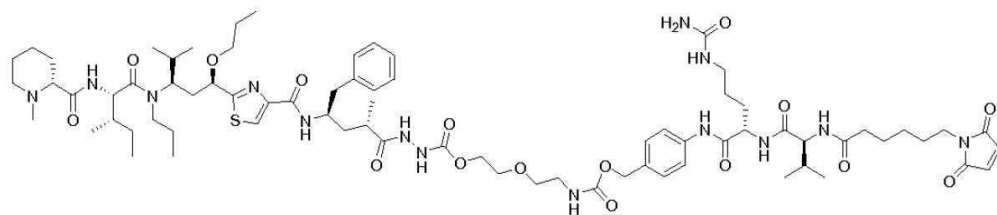
<식 2>



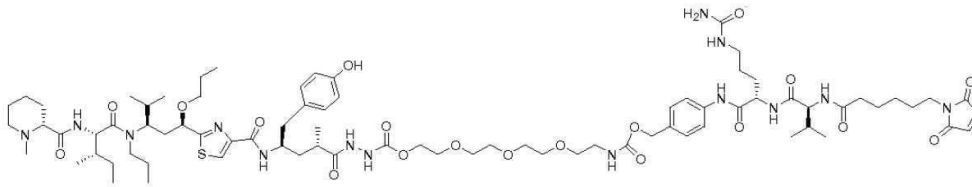
<식 3>



<식 4>



<식 5>



청구항 2

제1항에 있어서, A는 하기 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1 내지 3(CDRH1 내지 3) 및 경쇄 상보성 결정 영역 1 내지 3(CDRL1 내지 3)으로 이루어진, 접합체:

- (i) CDRH1: 서열번호 7, 또는 서열번호 7의 서열과 비교하여 최대 1 또는 2개의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체;
- (ii) CDRH2: 서열번호 8, 또는 서열번호 8의 서열과 비교하여 최대 1 또는 2개의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체;
- (iii) CDRH3: 서열번호 9, 또는 서열번호 9의 서열과 비교하여 최대 1 또는 2개의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체;
- (iv) CDRL1: 서열번호 10, 또는 서열번호 10의 서열과 비교하여 최대 1 또는 2개의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체;
- (v) CDRL2: 서열번호 11, 또는 서열번호 11의 서열과 비교하여 최대 1 또는 2개의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체; 및
- (vi) CDRL3: 서열번호 12, 또는 서열번호 12의 서열과 비교하여 최대 1 또는 2개의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체.

청구항 3

제2항에 있어서, A는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역(VH)과, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역(VL)으로 이루어진, 접합체.

청구항 4

제2항에 있어서, A는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄와, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄로 이루어진, 접합체.

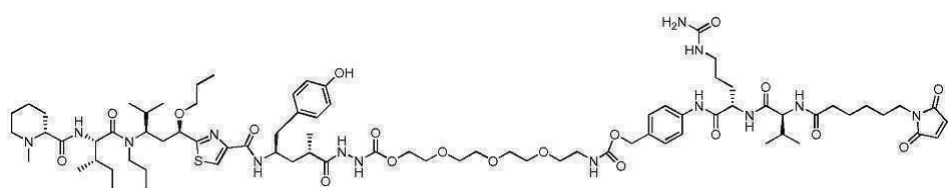
청구항 5

삭제

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, -L-D가 하기 식 5의 TAM558인, 접합체:

<식 5>



청구항 7

의약에서 사용하기 위한, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 접합체.

청구항 8

포유동물 대상체에서의 종양의 치료 방법에서 사용하기 위한, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 집합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 집합체는 1종 이상의 다른 항종양 약물과의 동시적, 순차적 또는 별개의 투여를 위한 것인, 집합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 1종 이상의 다른 항종양 약물은 세포독성 화학요법제 또는 항혈관형성제 또는 면역요법제를 포함하는, 집합체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 1종 이상의 다른 항종양 약물은 켄시타빈, 아브락산 베바시주맙, 이트라코나졸, 카복시아미도트리아졸, 항-PD-1 분자 또는 항-PD-L1 분자를 포함하는, 집합체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 항-PD-1 분자 또는 항-PD-L1 분자는 니볼루맙 또는 펌브롤리주맙을 포함하는, 집합체.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 종양은 췌장암, 유방암, 흑색종, 폐암, 두경부암, 난소암, 방광암 또는 대장암으로부터 선택된 고품 종양인, 집합체.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 섬유아세포 활성화 단백질 α(Fibroblast Activating Protein α: FAP)를 표적으로 하는 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate: ADC) 및 면역독소, 및 의약에서의, 예를 들면, 특정한 암의 치료에서의 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 악성 상피 종양은 인간 사망의 주요 암 관련 원인이다. 이러한 고형 종양은 소위 "결합조직형성 기질" 또는 "반응성 기질"과 같은 유의미한 기질 반응을 자주 나타내고, 이는 총 종양 질량의 20 내지 60%를 나타내고, 다수의 기질 세포 및 밀도 높은 세포외 기질(extracellular matrix: ECM)의 존재를 특징으로 한다. 최근 연구는 혈관 세포, 면역 세포, 섬유아세포, 근섬유아세포, 지방세포 및 골수-유래 전구세포로 예시화되는 기질 세포의 종양-촉진 역할을 보여주었다(1-6). 특히, 상당한 수의 암-연관된 섬유아세포(cancer-associated fibroblast: CAF)는 유방, 폐, 대장, 및 췌장 암종을 포함한 다양한 인간 암의 종양-연관된 기질에서 자주 관찰된다(14, 15). 기질의 상이한 성분과 대등하게 상호작용함으로써, CAF는 혈관신생 및 종양 성장을 촉진하는 능력을 갖고; CAF는 또한 침습 종양의 발달 및 암 진행 동안의 종양 침입에 중요한 것으로 나타났고(16-25); CAF는 멀리있는 장기에서 종양 세포의 확산 및 침윤, 따라서 전이의 형성을 가능하게 한다. 중요하게, 종양에의 전신성 약물 전달의

실패 및 약물 내성의 발달에 대한 기질 세포의 관련성이 또한 나타났다(7-11).

- [0003] 기질-종양 세포 상호작용을 과기시키고 따라서 종양형성을 약화시키는 세포 및 분자 표적의 확인은 최근 번역 종양학에서 가장 중요한 주제 중 하나이다. 실제로, 종양부근 기질의 표적화는 암 환자 사망률의 90% 이상을 나타내는 전이성 종양을 치료하는데 상당히 신규한 전략이다: 오직 몇몇 제품만이 현재까지 치료학적 승인을 받았고, 이들 대부분은 항혈관형성 약물(아바스틴(Avastin)(등록상표); 26)이다. 그 다음, 종양 미세환경에서 다른 신규한 분자를 확인하고 표적화하는 것은 기질-기반 치료학적 접근법과 조합으로서 통상적인 요법의 효능을 증가시키는데 필수적이며, 암 및 전이 치료에 강력한 접근법을 나타낸다(12, 13).
- [0004] 단클론성 항체(Monoclonal antibody: MAb)-기반 약물은 암과의 싸움에서 큰 가능성을 나타낸다. 이는 이들이 정밀하고 특이적인 방식으로 분자 수준에서 조준되는 치료를 허용하기 때문이다. 이러한 장점들은 이의 상업적 매력(짧은 개발 시간, 제한된 권한 및 일단 이들이 승인되면 다른 암 유형으로의 용이한 수출가능성)과 함께, 많은 제약 회사들이 신규한 항체-기반 분자의 개발, 뿐만 아니라 생물공학 회사로부터의 신규한 분자 또는 기술의 인-라이센싱(in-licensing)에 크게 투자하도록 만든다.
- [0005] 그러나, 치료적 항체의 임상학적 성공에도 불구하고, 세포 표면 종양 항원을 표적화하는 네이키드(naked) MAb는 이들 자체로는 충분한 효과를 거의 나타내지 못한다. MAb의 낮은 활성을 증가시키기 위하여, 신규한 전략은 이를 독성 분자에 결합시키는 것에 초점을 맞춘다. 식물성 및 박테리아성 독소뿐만 아니라 작은 화학요법 분자는 매우 작은 양으로 매우 강력하고 활성이 있기 때문에 우수한 후보가 될 수 있다.
- [0006] 암 치료를 위한 면역독소(immunotoxin: IT) 및 항체-약물 접합체(ADC) 분야는, 최근 몇년 동안 기술적 발달이 수행되었기 때문에, 최근 제약 회사에 의해 성장하는 개발 활동을 겪고 있고, 이는 이들이 면역원성, 목적하지 않은 독성, 제조, 반감기 및 내성에 대하여 초기에 나타냈던 문제점을 해결하는 것을 목표로 한다.
- [0007] 면역접합체는 세포독성 약물에 공유적으로 연결된 인간, 인간화된 또는 키메라성 재조합 항체로 만들어진다. 이러한 구조의 주요 목표는 작은 세포독성의 힘(300 내지 1000Da)과 종양-연관된 항원 표적화된(tumor-associated antigen targeted: TAA) MAb의 높은 특이성을 결합시키는 것이다.
- [0008] Ab는 항원에 도달하는데 매우 선택적이어야 하고, 이의 발현은 정상 세포로 제한되어야 한다. Ab는 또한 암 세포 내로 효과적으로 내재화되어야 한다.
- [0009] 이펙터 모이어티(moiety)로서 선택된 세포독성제는 세포의 세포질 내로의 내재화 및 방출 후에만 세포를 사멸시켜야 한다. ADC에서 가장 일반적으로 사용되는 페이로드(payload)는 DNA-손상 약물, 예를 들면, 칼리케아미신, 듀오카르미신, 또는 아우리스타틴 및 마이탄시노이드와 같은 미소관-표적화 화합물이다.
- [0010] Ab-세포독성 링커는 전신적으로 안정적이고 표적 세포 사이에서 세포독성을 방출하도록 설계된다.
- [0011] TAA는 자주 질병 조직에서 과발현되거나 적어도 내재화-활성화된 세포독성을 가능하게 하는데 충분하게 발현된 세포막 단백질이다. 이상적으로 항원은 정상 조직에서 제한된 발현을 나타내고, 중요 장기에서 낮은 발현을 나타내거나 발현을 나타내지 않는다. 이에 더하여, 종양 항원은 선택적으로 인식되어야 하며 Ab와 높은 친화력을 가져야 한다.
- [0012] 많은 유형의 인간 암에서, 섬유아세포 반응은 세포 표면 단백질, 섬유아세포 활성화 단백질 α(FAP α), 이의 발현이 장기 발달, 상처-치유 및 조직 리모델링으로 고도로 제한된 95kDa의 세린 프로테아제의 도입을 특징으로 한다.
- [0013] FAP는 하기 특성을 나타낸다:
- [0014]
 - SER-프로테아제 활성을 갖는 II형 막 당단백질(콜라게나제 + DPP)
- [0015]
 - 89% 인간-뮤린 단백질 상동성
- [0016]
 - 90% 미만의 암종(유방, 췌장, 폐, 방광 및 대장)에서 기질-발현된 종양
- [0017]
 - 상처-치유 및 장기 발달 동안 정상 성인 조직에서 일시적이고 고도로 제한된 발현
- [0018]
 - 종양 혈관계에 가까이 위치한 FAP(+) 섬유아세포

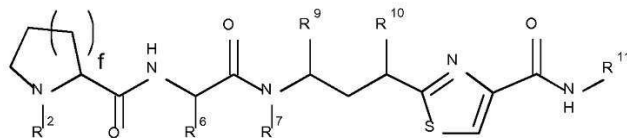
- [0019] • 매우 집중된 발현
- [0020] • 내재화
- [0021] • 세포외 기질 리모델링, 종양 성장 및 전이와의 연루
- [0022] FAP 발현은 최근 췌장 종양 세포뿐만 아니라 종양-연관된 기질 섬유아세포에서 발견되었다. FAP 발현은 더 짧은 환자 생존 및 더 안좋은 예후와 관련이 있고, 이는 이러한 종양 유형에서 가능한 FAP-기반 오토크린/파라크린 루프를 제안한다(32).
- [0023] 최근 10년 동안, 콘테르만(Kontermann) 및 화이젠마이어(Pfizenmaier)(IZI, University of Stuttgart, Germany)는 인간 및 무린 단백질 둘 다에 대항하는 항-FAP MAb 유도체를 개발하였다(27, 28). 이들은 항-FAP scFv 면역리소솜이 FAP+ 세포에 특이적으로 결합하고 내재화되는 것을 시험관내에서 보여주었다(29). 최근 연구에서 이들은 나노입자의 항종양 효과가 지질 및 항-FAP scFvs로 커버되고 TNF α 로 로딩됨을 입증하였다(30).
- [0024] 무린 MAb FAP5-DM1 면역독소에 의한 치료는 췌장암 및 폐암 이종이식 모델에서 임의의 불내성-관련 효과 없이 종양 성장의 장기간 지속되는 억제 및 완전한 퇴행을 유도하였다(31).
- [0025] 이러한 진보에도 불구하고, 상피 종양을 포함한 종양 치료를 위한 추가의 치료적 전략 및 이러한 치료적 전략에서 사용하기 위한 성분에 대한 충족되지 않은 요구가 남아 있다. 본 발명은 이들 및 다른 요구를 해결한다.

발명의 내용

- [0026] 대략적으로, 본 발명은 항-FAP 항체, 이의 접합체 및 항체 접합체 전략에서 사용하기 위한 최적화된 페이로드에 관한 것이다. 특히, 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 바와 같은 항-FAP 항체가 매우 특이적인 결합, 및 빠르고 효과적인 내재화를 나타내는 것을 발견하였다. 게다가, 본 발명자들은 니그린(Nigrin) b의 A쇄가 박테리아 숙주 세포에서 단리되고 제조될 수 있고, 니그린-b B-쇄의 부재 하에 여전히 시험관내 리보솜 불활성화 활성을 보유하고, 항체에 접합된 경우에만, 세포 내로 전위되는 능력 및 니그린-b B-쇄 없이 세포독성 활성 둘 다를 나타내는 것을 발견하였다.
- [0027] 본 명세서에 기재된 니그린-b A-쇄 및/또는 사이토라이신 유도체는 종양 치료에서 사용을 위하여 항-FAP 항체에 유리하게 접합된다.
- [0028] 따라서, 제1 양상에서 본 발명은 하기 화학식 I을 갖는 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 제공한다:
- [0029]
$$A-(L-D)_p (I)$$
- [0030] 식 중,
- [0031] A는 FAP에 선택적으로 결합하는 항체이고;
- [0032] L은 링커이며;
- [0033] D는 사이토라이신 또는 니그린-b A-쇄를 포함하는 약물이고;
- [0034] p는 1 내지 10이다.
- [0035] 본 발명의 당해 및 다른 양상에 따른 일부 경우에 A는 인간 FAP의 세포외 영역에 선택적으로 결합하는 단클론성 항체 또는 이의 결합 단편이다. 일부 경우에, A는 인간 및 무린 FAP 둘 다와 교차-반응할 수 있다. 특정한 경우, A는 하기 아미노산 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1 내지 3(CDRH1-3) 및 경쇄 상보성 결정 영역 1 내지 3(CDRL1-3)을 포함할 수 있다:
- [0036] (i) CDRH1: 서열번호 7 또는 서열번호 7의 서열과 비교하여 1 또는 2개까지의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체;
- [0037] (ii) CDRH2: 서열번호 8 또는 서열번호 8의 서열과 비교하여 1 또는 2개까지의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체;
- [0038] (iii) CDRH3: 서열번호 9 또는 서열번호 9의 서열과 비교하여 1 또는 2개까지의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체;

이체;

- [0039] (iv) CDRL1: 서열번호 10 또는 서열번호 10의 서열과 비교하여 1 또는 2개까지의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체;
- [0040] (v) CDRL2: 서열번호 11 또는 서열번호 11의 서열과 비교하여 1 또는 2개까지의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체; 및
- [0041] (vi) CDRL3: 서열번호 12 또는 서열번호 12의 서열과 비교하여 1 또는 2개까지의 아미노산 치환을 갖는 이의 변이체.
- [0042] 특정한 경우, CDRH1-3은 각각 서열번호 7 내지 9의 아미노산 서열을 포함하고, CDRL1-3은 각각 서열번호 10 내지 12의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0043] 특정한 경우, A는 서열번호 5의 전장 서열과 적어도 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.
- [0044] 특정한 경우, A는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.
- [0045] 특정한 경우, A는 서열번호 6의 전장 서열과 적어도 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 특히, A는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함할 수 있다.
- [0046] 특정한 경우, A는 서열번호 3의 전장 서열과 적어도 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 특히, A는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.
- [0047] 특정한 경우, A는 서열번호 4의 전장 서열과 적어도 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 특히, A는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다.
- [0048] 특정한 경우, A는 본 명세서에 예시된 항-FAP 항체 분자와 구조적으로 상이한, 경쟁적으로 결합하는 항-FAP 항체일 수 있다. 예를 들면, A는 고정화된 재조합 인간 FAP에의 결합에 대하여 본 명세서에서 "hu36"로 확인된 항-FAP IgG1 항체와 경쟁하는 항-FAP 항체 분자일 수 있다. hu36은 서열번호 3의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 4의 경쇄 아미노산 서열을 갖는다. 항-FAP 항체는, 일부 경우, hu36과 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 항체 결합 경쟁의 측정 방법 및 에피토프 맵핑 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들면, 문헌["Epitope Mapping by Competition Assay" Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277]을 참조한다.
- [0049] 본 발명의 당해 및 다른 양상에 따라, D는 사이토라이신일 수 있다. 사이토라이신은, 일부 경우, 제WO 2008/138561 A1호에 기재된 화합물일 수 있고, 이의 전문은 명백하게 본 명세서에 참조로서 인용된다(그 안에 기재된 화합물은 또한 튜블라이신(Tubulysine) 유도체로서 지칭된다). 사이토라이신은 제WO 2008/138561호에 기재된 바와 같이 합성될 수 있다. 특정한 경우, 사이토라이신은 제WO 2008/138561 A1호의 화학식 I 또는 화학식 IV에 기재된 바와 같을 수 있다. 특정한 경우, 사이토라이신은 하기 화학식 IV의 사이토라이신일 수 있다:



(IV)

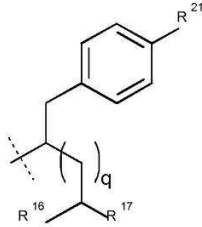
- [0050]
- [0051] 식 중,
- [0052] R²는 (i) 링커 L에 직접적으로 또는 간접적으로 부착되거나, (ii) H 또는 C₁-C₄ 알킬일 수 있고;
- [0053] R⁶은 C₁-C₆ 알킬이며;
- [0054] R⁷은 C₁-C₆ 알킬, CH₂OR¹⁹ 또는 CH₂OCOR²⁰이되, 여기서 R¹⁹는 알킬이고, R²⁰은 C₂-C₆-알케닐, 페닐, 또는 CH₂-페닐이며;

[0055] R^9 는 C_1-C_6 알킬이고;

[0056] R^{10} 은 H, OH, O-알킬 또는 O-아세틸이며;

[0057] f는 1 또는 2이고;

[0058] R^{11} 은 하기 구조를 가지며:



[0059]

[0060] 여기서, R^{21} 은 H, OH, 할로젠, NH_2 , 알킬옥시, 페닐, 알킬 아미노 또는 다이알킬 아미노이고;

[0061] R^{16} 은 H 또는 C_1-C_6 -알킬기이며;

[0062] R^{17} 은 (i) 링커 L에 직접적으로 또는 간접적으로 부착되거나 (ii) CO_2H , CO_2R^{18} , $CONHNH_2$, OH, NH_2 , SH 또는 임의로 치환된 알킬, 사이클로알킬, 헤테로알킬 또는 헤테로사이클로알킬기이고, 여기서 R^{18} 은 임의로 치환된 알킬, 헤테로알킬 또는 헤테로사이클로알킬기이며;

[0063] q는 0, 1, 2 또는 3이고;

[0064] 여기서, 용어 "임의로 치환된"은 하나 또는 여러개의 H 원자가 F, Cl, Br 또는 I 또는 OH, SH, NH_2 또는 NO_2 로 대체될 수 있는 기에 관한 것이고; 추가로 용어 "임의로 치환된"은 치환되지 않은 C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_1-C_6 헤테로알킬, C_3-C_{10} 사이클로알킬, C_2-C_9 헤테로사이클로알킬, C_6-C_{10} 아릴, C_1-C_9 헤테로아릴, C_7-C_{12} 아르알킬 또는 C_2-C_{11} 헤테로아르알킬기로 독점적으로 또는 추가로 치환될 수 있는 기에 관한 것이다.

[0065] 일부 경우, R^2 는 링커 L에 대한 결합이다.

[0066] 일부 경우, R^{17} 은 $C(O)X$, $CONHNHX$, OX , NHX 또는 SX 이되, 여기서 X는 링커 L에 대한 결합이다.

[0067] 일부 경우, 링커 L은 추가로 스페이서를 포함할 수 있다.

[0068] 일부 경우, 스페이서는 2 내지 30개의 원자의쇄 길이를 갖는다.

[0069] 일부 경우, 스페이서는 알킬렌(즉, 2가 알킬) 또는 헤테로알킬렌(즉, 2가 헤테로알킬) 기를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0070] 일부 경우, 스페이서는 알킬렌 또는 옥시알킬렌 기를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0071] 일부 경우, 스페이서는 $-(CH_2)_n$ -기 또는 $-(OCH_2CH_2)_n$ -기를 포함하거나 이로 이루어지고, 여기서 n은 1 이상이다.

[0072] 일부 경우, 스페이서는 $-(OCH_2CH_2)_n$ -기를 포함하거나 이로 이루어지고, 여기서 n은 1 이상이다. 특히, n은 1 내지 15, 1 내지 10, 1 내지 6, 또는 2 내지 5일 수 있다. 예를 들면, n은 3 또는 4일 수 있다.

[0073] 일부 경우, 스페이서는 1 내지 6개의 에틸렌 글리콜 단위, 예를 들면, 트라이에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0074] 일부 경우, 스페이서는 R^{17} 기에 직접적으로 부착될 수 있거나, R^{17} 기에 브릿지기를 통해 부착될 수 있다.

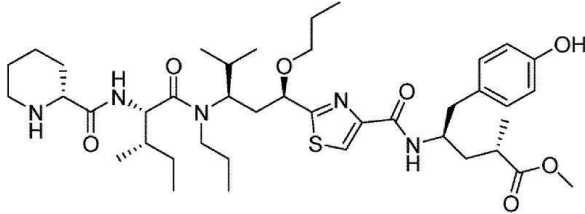
[0075] 일부 경우, 스페이서는 R^{17} 기에 $-C(O)X$ 브릿지기를 통해 부착되고, 여기서 X는 R^{17} 에 대한 결합이다.

[0076] 일부 경우, R^{17} 은 $CONHNHX$ 이고, 스페이서는 R^{17} 기에 $-C(O)X$ 브릿지기를 통해 부착되고, 여기서 X는 스페이서와

R¹⁷ 사이의 결합을 나타낸다.

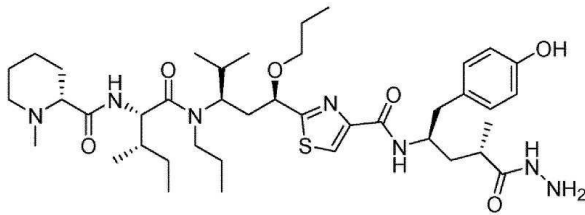
[0077] 일부 경우, R¹⁷은 CONHNHX이고, 스페이서는 R¹⁷에 -C(O)X 브릿지기를 통해 부착된 -(OCH₂CH₂)_n-이고, 여기서 n은 2, 3 또는 4이다.

[0078] 일부 경우, D는 하기 구조를 갖는 사이토라이신을 포함한다:



[0079]

[0080] 일부 경우, D는 하기 구조를 갖는 사이토라이신을 포함한다:

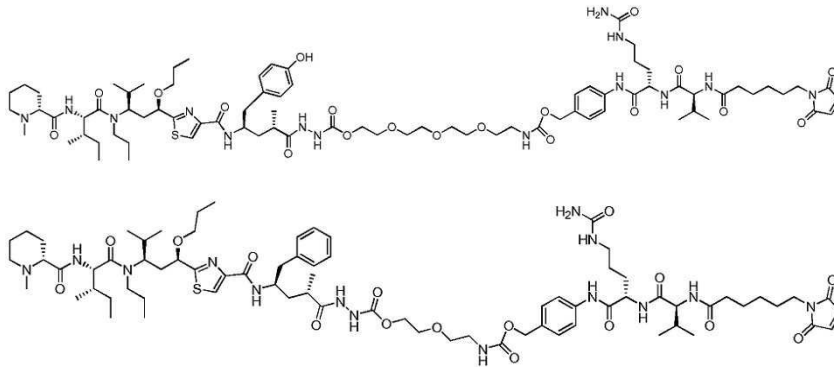


[0081]

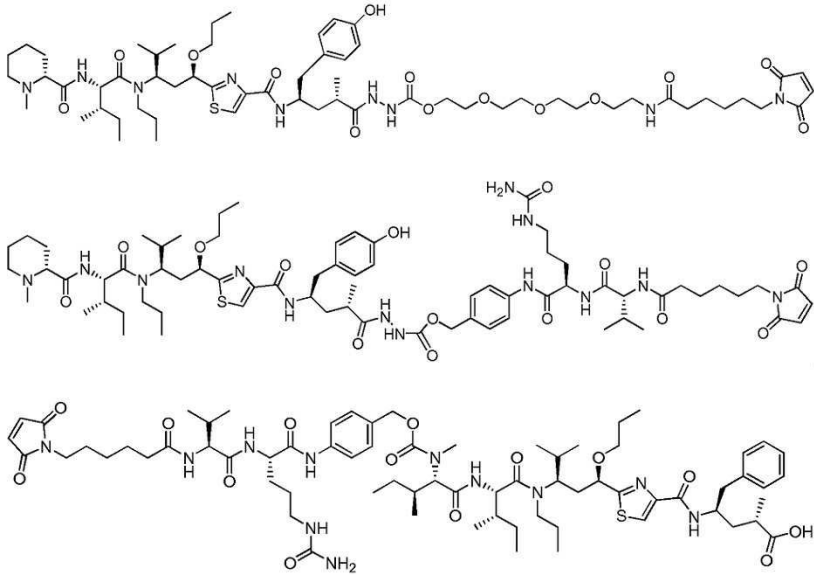
[0082] 특정한 경우, L은 A에 대한 부착을 위한 부착기 및 프로테아제 절단 가능한 부위를 포함한다. 예를 들면, L은 발린-시트룰린 단위를 포함할 수 있다. 특히, L은 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질카바메이트를 포함할 수 있다.

[0083] 일부 경우, 말레이미드의 이중 결합은 항체 A에 대한 링커 L의 연결을 야기하기 위하여 항체 A의 시스테인 잔기의 티올기와 반응하여 황-탄소 결합을 형성한다.

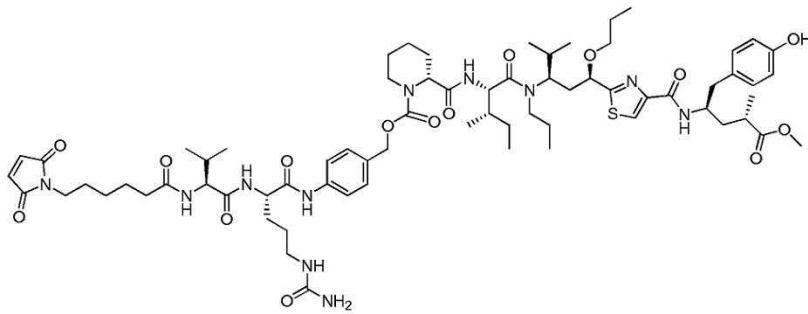
[0084] 일부 경우, -L-D는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 구조를 갖는다:



[0085]



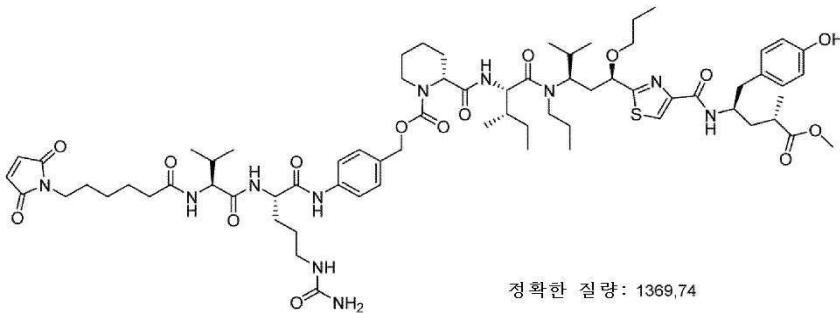
및



[0086]

[0087]

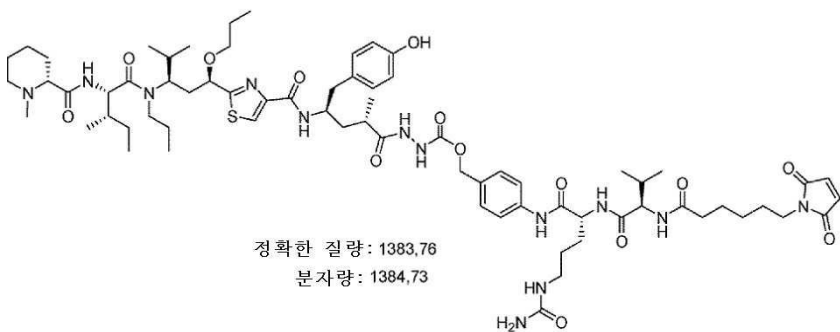
특정한 경우, -L-D는 하기 구조를 가질 수 있다:



[0088]

[0089]

특정한 경우, -L-D는 하기 구조를 가질 수 있다:



[0090]

[0091]

본 발명의 당해 및 다른 양상에 따라, p는, 일부 경우, 1 내지 5, 예를 들면, 1 내지 4, 또는 1 내지 3 범위에 속할 수 있다. 특정한 경우, p는 1 또는 2일 수 있다. 특정한 경우, p는 3 또는 4일 수 있다.

- [0092] 본 발명의 당해 및 다른 양상에 따라, D는 니그린-b A-쇄일 수 있다. 바람직하게는, 니그린-b A-쇄는 니그린-b B-쇄의 부재 하에 있다. 니그린-b A-쇄는 서열번호 13의 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.
- [0093] 특정한 경우, 니그린-b A-쇄는, 예를 들면, 박테리아 숙주 세포에서, 재조합적으로 생성될 수 있거나 제조되었을 수 있다. 본 발명자들은 놀랍게도 니그린-b A-쇄가 박테리아 숙주 세포에서 재조합적으로 생성되는 경우와 같이 천연 글리코실화의 손실 또는 변경에도 불구하고, 니그린-b A-쇄가 이의 활성(예를 들면, 세포독성 및/또는 리보솜 억제 활성)을 보유하는 것을 발견하였다.
- [0094] 본 발명의 접합체가 독성 페이로드(즉, D)로서 니그린-b A-쇄를 포함하는 경우, L은 단순히 A의 황 원자와 D의 황 원자 사이의 이황화 결합일 수 있다. 따라서, L은 이황화 결합을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.
- [0095] 제2 양상에서, 본 발명은 의약에서 사용하기 위한 본 발명의 제1 양상에 따라 정의된 바와 같은 접합체를 제공한다.
- [0096] 제3 양상에서, 본 발명은 포유동물 대상체에서 종양의 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 제1 양상에 따라 정의된 바와 같은 접합체를 제공한다.
- [0097] 일부 경우, 접합체는 하나 이상의 다른 항종양 약물과 동시적, 순차적 또는 별개의 투여를 위한 것이다. 하나 이상의 다른 항종양 약물은 세포독성 화학요법제 또는 항혈관형성제 또는 면역요법제를 포함한다. 일부 경우, 하나 이상의 다른 항종양 약물은 켄시타빈, 아브락산 베마시주맵, 이트라코나졸, 카복시아미도트리아졸, 항-PD-1 분자 또는 항-PD-L1 분자(예를 들면, 니볼루맵 또는 펌브롤리주맵)를 포함한다.
- [0098] 특정한 경우, 접합체는 고형 종양의 치료에서 사용하기 위한 것이다. 특히, 접합체는 췌장암, 유방암, 흑색종, 폐암, 두경부암, 난소암, 방광암 또는 대장암의 치료에서 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0099] 제4 양상에서, 본 발명은 포유동물 대상체에서 종양의 치료 방법으로서, 본 발명의 제1 양상에 따라 정의된 바와 같은 접합체의 치료학적 유효량을 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 경우, 방법은 고형 종양의 치료를 위한 것일 수 있다. 특히, 방법은 췌장암, 유방암, 흑색종, 폐암, 두경부암, 난소암, 방광암 또는 대장암의 치료를 위한 것일 수 있다.
- [0100] 제5 양상에서, 본 발명은 항체-약물 접합체의 제조에서 사이토라이신의 사용을 제공하고, 여기서 항체는 FAP-특이적 항체, 예를 들면, 본 발명의 제8 양상에 따른 FAP-특이적 항체이다. 일부 경우, 사용은 본 발명의 제1 양상에 따라 정의된 바와 같은 항체-약물 접합체의 제조에서 사이토라이신의 사용일 수 있다.
- [0101] 제6 양상에서, 본 발명은 염증성 병태(예를 들면, 류머티스성 관절염)의 치료에서 사용하기 위한 본 발명의 제5 양상의 접합체를 제공한다.
- [0102] 제7 양상에서, 본 발명은 포유동물 대상체에서 염증성 병태(예를 들면, 류머티스성 관절염)의 치료 방법으로서, 본 발명의 제5 양상의 접합체의 치료학적 유효량을 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0103] 제8 양상에서, 본 발명은 니그린-b B-쇄의 부재하의 단리된 니그린-b A-쇄를 제공한다. 니그린-b A-쇄의 아미노산 서열은 서열번호 13의 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.
- [0104] 제9 양상에서, 본 발명은 면역독소의 제조에서 본 발명의 제8 양상에 따른 단리된 니그린-b A-쇄의 사용을 제공한다. 일부 경우, 면역독소는 상기 단리된 니그린-b A-쇄(니그린-b B-쇄의 부재하에)에 접합 및/또는 결합된 단클론성 항체를 포함한다. 일부 경우, 면역독소는 FAP에 선택적으로 결합하는 항체, 예를 들면, 단클론성 항체, 예를 들면, 인간 단클론성 항체를 포함한다. 일부 경우, 면역독소는 본 발명의 제10 양상에 따른 항체를 포함한다.
- [0105] 제10 양상에서, 본 발명은 FAP에 선택적으로 결합하고 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 단클론성 항체, 예를 들면, 인간 단클론성 항체를 제공한다.
- [0106] 제11 양상에서, 본 발명은 의약에서 사용하기 위한 본 발명의 제10 양상의 항체를 제공한다. 항체는 염증성 병태(예를 들면, 류머티스성 관절염)의 치료에서 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0107] 제12 양상에서, 본 발명은 항체-약물 접합체 또는 면역독소의 제조에서 본 발명의 제10 양상에 따른 단클론성 항체의 사용을 제공한다.
- [0108] 제13 양상에서, 본 발명은 서열번호 1 내지 6 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적

어도 하나의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 경우, 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 14의 핵산 서열을 포함할 수 있다.

- [0109] 제14 양상에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 본 발명의 제5 양상에 따른 접합체의 제조 방법을 제공한다:
- [0110] (a) FAP에 선택적으로 결합하는 항체를 유도체화하여 적어도 하나의 설피드릴기를 도입하는 단계; 및
- [0111] (b) 항체와 니그린-b A-쇄 사이의 이황화 결합 연결의 형성을 허용하는 조건 하에, 유도체화된 항체를 니그린-b A-쇄(니그린-b B-쇄 부재)의 적절한 잔기(예를 들면, 시스테인 아미노산)와 반응시켜, 접합체를 제조하는 단계. 방법은 접합체를 정제 및/또는 단리시키는 단계 (c)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0112] 일부 경우, 단계 (a)는 항체를 4-석신이미딜옥시카보닐- α -메틸- α -(2-피리딜-다이티오)톨루엔(SMPT), N-석신이미딜 3-(2-피리딜-다이티오프로피오네이트)(SPDP) 또는 메틸 4-머캅토부티르이미데이트와 반응시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0113] 제15 양상에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 본 발명의 제5 양상에 따른 접합체의 제조 방법을 제공한다:
- [0114] (a) FAP에 선택적으로 결합하는 항체를 링커에 티올기를 통해 연결하는 단계; 및
- [0115] (b) 사이토라이신을 링커에 사이토라이신 분자의 적절한 기를 통해 연결하는 단계. 일부 경우, 사이토라이신은 링커에 위치 R₂ 또는 위치 R₁₇을 통해 연결된다. 단계 (a) 및 (b)는 어떠한 순서로도 수행될 수 있다. 임의의 추가의 단계 (c)에서, 방법은 접합체의 정제 및/또는 단리시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0116] 본 발명은, 이러한 조합이 명백하게 허용되지 않거나 분명하게 회피된다고 기재되는 경우를 제외하고, 기재된 양상 및 바람직한 특징의 조합을 포함한다. 본 발명의 이들 및 추가의 양상 및 실시형태는 하기에 추가로 상세하게, 첨부된 실시예 및 도면을 참조하여 설명된다.

도면의 간단한 설명

- [0117] **도 1**은 인간화된 scFv hu33 및 hu36의 특성규명을 도시한다. **a)** 정제된 scFv 단편의 SDS-PAGE 분석. 쿠마시 염색. R-환원, NR-비환원. **b)** HT1080-huFAP 세포에 hu36(인간화) 및 mo36(키메라성)의 결합의 유세포 분석. 결합된 항체는 항-His-tag 항체(n=2)로 검출하였다. **c)** 고정화된 재조합 인간 FAP(100ng/ml로 코팅됨)에 대한 hu36 scFv 및 mo36 scFv의 결합의 ELISA. 결합된 항체는 HRP-접합된 항-Myc-tag 항체로 검출하였다.
- 도 2**는 **a)** 재조합 인간 FAP(rhFAP) 또는 대조군 단백질(BSA)(각각 삼각형 및 역삼각형)에 대한 결합에 대한 항-FAP mo36-IgG1(원형) 및 hu36-IgG1(사각형)의 ELISA를 도시한다. 웰당 단백질 50 ng을 코팅하였다. 결합된 항체는 HRP-접합된 항-인간 IgG-Fc로 검출하였다. **b)** HT1080-FAP에 대한 결합에 대한 항-FAP mo36-IgG1(삼각형 및 별형) 및 hu36-IgG1(사각형 및 원형)의 유세포 분석. 결합된 단백질은 PE-표지된 항-hu IgG-Fc 항체로 검출하였다.
- 도 3**은 **a)** 인간 FAP(HT1080-huFAP) 및 **b)** 마우스 FAP(HT1080-moFAP)를 발현하는, 안정하게 형질감염된 HT1080에 대한 hu36-IgG1의 결합의 유세포 분석을 도시한다. 결합된 항체는 PE-표지된 항-인간 Fc 항체로 검출하였다.
- 도 4**는 다양한 시간(0, 30 및 60분) 동안 hu36-IgG1와 배양하고, FITC-표지된 항-IgG 항체, WGA-TRed(막 염색), 및 DAPI(핵)으로 염색한 HT1080-FAP 세포의 공초점 현미경을 도시한다. 우측 패널은 세 염색의 병합 이미지를 도시한다.
- 도 5**는 막 염색 단독(PM; 흰 막대), PM 및 세포내 염색(회색 막대), 또는 세포내 염색 단독(검은 막대)을 나타내는 세포(n=10 내지 30)의 식별에 의한 hu36-IgG1의 내재화의 분석을 도시한다. 분명한 시간-의존적 내재화가 증명된다.
- 도 6**은 재조합 니그린-b A-쇄의 MALDI-Tof 프로파일을 도시한다. 관찰된 질량(Da): 28546.55; 예상된 질량(Da): 28546.09; 질량 편차: 0.5; 질량 정확도: 16 ppm.
- 도 7**은 천연(WT) 니그린-b에 대한, 토끼 망상적혈구 무세포 용해물(rabbit reticulocyte cell-free lysate: RRL)에서 시험된 재조합 니그린-b A-쇄(recNgA)의 리보솜 불활성화 단백질(ribosome inactivating protein: RIP) 활성을 도시한다. (3a, 3b, 6c, 9c)는 recNgA의 상이한 제형을 나타낸다.
- 도 8**은 크리스탈 바이올렛 생존능 검정을 통해 HT1080-FAP 세포주에 대하여 시험된 recNgA의 세포독성을 도시한다(천연 니그린-마름모형; 재조합 니그린-b A-쇄-사각형).

도 9는 천연(WT) 니그린(삼각형) 및 재조합 니그린-b A-쇄(recNgA; 사각형)과 비교하여 RRL 검정에서 항-FAP hu36-IgG1-recNgbA 면역독소 접합체(HSP131-001; x표)의 RIP 활성을 도시한다.

도 10은 a) HT1080-WT 세포주; 및 b) HT1080-FAP 세포주에서 항-FAP hu36-IgG1-recNgbA 면역독소 접합체(HSP131-001; 삼각형), 접합되지 않은(네이키드) 항-FAP hu36-IgG1(사각형) 및 재조합 니그린-b A-쇄(recNgA; 마름모형)의 세포독성 활성을 도시한다. 증식에서 배율-변화는 항체/면역독소 농도에 대하여 플롯팅한다.

도 11은 vcPABA 링커를 통해 사이토라이신-접합된 항체에 있어서 일반적인 항체 접합체 구조를 도시한다. 사이토라이신의 부착은 R₁ 또는 R₄를 통할 수 있다(화살표에 의해 확인됨).

도 12는 환자-유래 이종이식(PDX) 마우스(췌장 종양)의 항-FAP hu36 종양 부분의 면역검출을 도시한다. 기질의 특이적 용량- 및 시간-의존적 염색은 췌장암(Panc185) PDX 마우스 모델로부터 피하 종양에서 관찰되고, 항-hu/moFAP hu36 IgG1의 단일 용량(1 및 5 mg/kg)을 PDX 마우스 Panc-185에 복강내 투여하였고; 면역검출을 항-인간 IgG1 2차 항체로 수행하였고, 20× 축적 사진으로 나타낸다. 대조군-48h: 마우스에 비히클을 투여하였고, 48시간 후 종양을 절개하였다.

도 13은 매주 1회 투여된 상이한 용량(2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1 mg/kg)으로 항-FAP:recNgA 면역독소에 의한 치료 후 모니터링된 동물 중량을 도시한다. 유의미한 중량 손실 및 독성은 5 mg/kg(제시 생략)에 의한 치료와 유사하게 그룹 1 및 2(각각 2.5 및 1 mg/kg)에서 관찰되었고; 0.5 mg/kg은 단일 제제로서 적용시 가장 높은 내약 용량이었다.

도 14는 4주 동안(처리일 1, 8, 15, 22, 29) 미처리(비히클; 10 ml/kg/일; 매주 1회), 젬시타빈(GEM; 150 mg/kg; 매주 1회) 처리, 또는 항FAP:recNgA 면역독소(OMTX505; 0.5/0.25 mg/kg; 매주 1회) 처리, 또는 둘 다(OMTX505(0.25 mg/kg):GEM(150 mg/kg)) 처리 시, 환자-유래 이종이식 마우스(PAXF 736)로부터 측정된 (a) 상대적인 체중 및 (b) 종양 용적을 도시한다.

도 15는 FAP 표적에 대한 ADC471 결합의 ELISA 및 FACS 분석을 도시한다. (a) huFAP 융합 단백질에 대한 ADC-471 결합의 ELISA 검출을 네이키드 항-hu/mo FAP hu36 항체와 비교하고; EC50 값은 DAR=3.48에서 HPS124-3 ADC-471 분자를 지시한다. (b) 및 (c): HPS131-143-1(ADC-471; DAR 4), HPS131-124-1(ADC-467; DAR 1.2) 및 HPS131-124-3(ADC-471; DAR 3.48) ADC의 HT1080-huFAP, HT1080-wt 및 HEK293 세포에서의 결합의 FACS 분석. EC₅₀ 값은 이러한 후자를 지시한다(b).

도 16은 살아있는 HT1080-FAP 세포에서 항-FAP hu36:사이토라이신 ADC(ADC-471; HPS131-124-3)의 내재화 능력의 지속 촬영 면역형광 분석을 도시한다. 좌측 패널: 네이키드 항-hu/moFAP hu36(FITC-AB; 녹색)과의 배양; 우측 패널: ADC-471(FITC-ADC; 녹색)과의 배양. 시간 0, 30, 60, 90분(상부 패널): HT1080-FAP 세포. 시간 30분(하부 패널): HT1080-야생형 세포.

도 17은 (a) HT1080-wt 및 (b) FAP(+) 세포에서 항-hu/moFAP hu36:사이토라이신 ADC의 시험관내 세포독성 효과를 도시한다. 세포 증식 저지는 10⁻⁶ 내지 10⁻¹²M의 농도 범위에서 각각의 화합물로 72시간 배양 후 크리스탈 바이올렛 염색을 통해 증명되었다. 모(parental) TAM334 사이토라이신은 비특이적 세포독성에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다.

도 18은 항-hu/moFAP hu36:사이토라이신 ADC 후보의 종양 성장 억제 효과를 도시한다. (a) ADC471 대 ADC551; (b) ADC471 및 ADC553(OMTX705-553) 대 ADC558(OMTX705-558). 비히클 및 GEM(젬시타빈): 음성 및 양성 대조군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0118] 본 발명의 설명에서, 하기 용어가 사용될 것이고, 하기 지시된 바와 같이 정의되는 것을 의도한다.

[0119] FAP

[0120] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "섬유아세포 활성화 단백질", "섬유아세포 활성화 단백질", "FAP" 및 "FAP α"는 상호교환적으로 사용된다. FAP는 임의의 포유동물 종의 FAP일 수 있다. 일부 경우, FAP는 인간 FAP(또한 세프라제(Seprase), 170 kDa 흑색종 막-결합된 젤라티나제, 섬유아세포 활성화 단백질 알파 또는 내재막 세린 프로테아제로도 알려짐)이고, 이의 아미노산 서열은 유니프로트 수탁 번호(UniProt accession No.) Q12884(버전 140, 2013년 12월 11일자)(서열번호 15)에 공지되어 있다. 일부 경우, FAP에 결합하는 분자(예를 들면, 항체 분자 또는 이의 접합체)는 FAP의 세포외 도메인의 영역에 결합할 수 있다. 인간 FAP의 세포외 도메

인은 전장 인간 FAP 단백질의 잔기 26 내지 760을 포함한다. 일부 경우, FAP는 뮤린 FAP(또한 섬유아세포 활성화 단백질 알파 또는 내재막 세린 프로테아제로도 알려짐)이고, 이의 아미노산 서열은 유니프리트 수탁 번호 P97321(버전 117, 2013년 12월 11일자)(서열번호 16)에 공지되어 있다. 뮤린 FAP의 세포의 도메인은 전장 뮤린 FAP 단백질의 잔기 26-761을 포함한다.

[0121] *접합체*

[0122] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "접합체"는 분자를 연결함으로써 형성된 결과 구조를 포함하고, 특이적으로 항체-약물 접합체(ADC) 및 면역독소(IT)를 포함한다.

[0123] *선택적인 결합*

[0124] 용어 선택적으로 결합하는 것 및 선택적인 결합은 항체, 또는 이의 결합 단편이 미리 결정된 분자(예를 들면, 항원)에 특이적인 방식으로 결합하는 것을 의미한다. 예를 들면, 항체, 또는 이의 결합 단편은 적어도 약 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 의 친화력으로 FAP, 예를 들면, 이의 세포의 부위에 결합할 수 있고, 미리 결정된 분자 이외의 분자에 결합하는 이의 친화력보다 적어도 2배 큰(예를 들면, 5배 또는 10배 큰) 친화력으로 미리 결정된 분자에 결합할 수 있다.

[0125] *항체 분자*

[0126] 본 발명의 모든 양상을 참조하여 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체" 또는 "항체 분자"는 천연 또는 부분적 또는 전체적 합성으로 제조된 임의의 면역글로불린을 포함한다. 용어 "항체" 또는 "항체 분자"는 단클론성 항체(mAb) 및 다중클론성 항체(다중클론성 항혈청 포함)를 포함한다. 항체는 온전하거나 전체 항체로부터 유래된 단편일 수 있다(하기 참조). 항체는 인간 항체, 인간화된 항체 또는 비인간 기원 항체일 수 있다. "단클론성 항체"는 단일 항원 부위 또는 표적 분자의 "결정인자"를 향하는 동종의, 매우 특이적인 항체 개체군이다. "다중클론성 항체"는 표적 분자의 상이한 항원성 결정인자를 향하는 이종 항체 개체군을 포함한다. 용어 "항혈청(antiserum/antisera)"은 면역화된 동물로부터 수득된 항체를 함유하는 혈청을 의미한다.

[0127] 전체 항체의 단편은 항원에 결합하는 기능을 수행할 수 있다는 것을 나타냈다. 따라서 본 명세서에서 항체에 대한 언급은 본 발명의 방법, 어레이 및 키트를 참조하여 완전한 항체를 포함하며 또한 항체 결합 단편을 포함하는 임의의 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함한다. 결합 단편의 예는 (i) V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인으로 이루어진 Fab 단편; (ii) V_H 및 C_H1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편; (v) 단리된 CDR 영역; (vi) 두 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (vii) 단일 쇠 Fv 분자(scFv)로서, V_H 도메인 및 V_L 도메인이 펩타이드 링커에 의해 연결되어 두 도메인이 연관되는 것을 허용함으로써 항원 결합 부위를 형성하는 분자; (viii) 이중특이적 단일 쇠 Fv 이합체(제WO 93/11161호) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 구성된 다가 또는 다중특이적 단편인 "다이하바디(diabody)"(제WO94/13804호; 58). Fv, scFv 또는 다이하바디 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 이황화 브릿지의 도입에 의해 안정화될 수 있다. $CH3$ 도메인에 연결된 scFv를 포함하는 미니바디가 또한 만들어질 수 있다.

[0128] 항체 분자와 관련하여, 용어 "선택적으로 결합하는 것"은 특이적 결합 쌍 중 하나의 멤버가 이의 특이적 결합 파트너(들) 이외에 분자에 임의의 유의미한 결합을 나타내지 않는 상황을 의미하는 것으로 본 명세서에서 사용될 수 있다. 용어는 또한, 예를 들면, 항원-결합 부위가 다수의 항원에 의해 보유되는 특정한 에피토프에 특이적인 경우에 적용가능하고, 이 경우, 항원-결합 부위를 보유한 특이적 결합 멤버는 에피토프를 보유한 다양한 항원에 결합할 수 있을 것이다.

[0129] 본 발명에 따른 일부 경우, 항체는 완전한 인간 항체일 수 있다.

[0130] *세포독성 화학요법제*

[0131] 본 발명의 임의의 양상에 따른 일부 경우, 본 발명의 접합체는 세포독성 화학요법제 또는 항혈관형성제 또는 면역요법제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 다른 항종양 약물과 (동시적으로, 순차적으로 또는 별개로) 투여될 수 있거나 투여되기 위한 것일 수 있다.

[0132] 세포독성 화학요법제는 당해 분야에 잘 알려져 있고 하기와 같은 항암제를 포함한다: 질소 머스터드, 예를 들면, 메클로레타민(HN2), 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 멜팔란(L-사코라이신) 및 클로람부실을 포함하는 알킬화제; 10 에틸렌이민 및 메틸멜라민, 예를 들면, 헥사메틸멜라민, 티오테파; 알킬 설포네이트, 예를 들면,

부설관; 나이트로소유레아, 예를 들면, 카무스틴(BCNU), 로무스틴(CCNLJ), 세무스틴(메틸-CCN-U) 및 스트렙토조에인(스트렙토조토신); 및 트리아젠, 예를 들면, 예를 들면, 데카바진(DTIC; 다이메틸트리아제노이미다졸카복사미드); 염산 유사체, 예를 들면, 메토크세이트(아메토크세이트)를 포함하는 항대사물질; 피리미딘 유사체, 예를 들면, 플루오로우라실(5-플루오로우라실; 5-FU), 플록스유리딘(플루오로데옥시유리딘; FUDR) 및 사이타라빈(사이토신 아라비노사이드); 및 퓨린 유사체 및 관련 억제제, 예를 들면, 머캅토피린(6-머캅토피린; 6-MP), 티오구아닌(6-티오구아닌; TG) 및 펜토스타틴(2'-데옥시코포나이신). 빈카 알칼로이드, 예를 들면, 빈블라스틴(VLB) 및 빈크리스틴을 포함하는 천연 생성물; 에피포도필로톡신, 예를 들면, 에토포사이드 및 테니포사이드; 항생제, 예를 들면, 닥티노마이신(악티노마이신 D), 다우노라비신(다우노마이신; 루비도마이신), 독소루비신, 블레오마이신, 플리카마이신(미트라마이신) 및 미토마이신(미토마이신 Q; 효소, 예를 들면, L-아스파라기나제; 및 생체 반응 조절제, 예를 들면, 인터페론 알페논. 플래티넘 정합 착물, 예를 들면, 시스플라틴(cis-DDP) 및 카보플라틴을 포함하는 다양한 제제; 안트라센다이온, 예를 들면, 미톡산트론 및 안트라브라사이클린; 치환된 유레아, 예를 들면, 하이드록시유레아; 메틸 하이드라진 유도체, 예를 들면, 프로카바진(N-메틸하이드라진, MIH); 및 부신 피질 억제제, 예를 들면, 미토탄(o, p'-DDD) 및 아미노글루테티미드; 탁솔 및 유사체/유도체; 및 호르몬 효능제/길항제, 예를 들면, 플루타미드 및 타목시펜. 추가의 바람직한 세포독성 제제는 잼시타빈(잼자르(Gemzar)(등록상표))이다. 추가의 바람직한 세포독성 제제는 인간 혈청 알부민에 결합된 팍리탁셀(아브락산(등록상표))이다.

[0133] 항혈관형성제는 당해 분야에 잘 알려져 있고, 항암제, 예를 들면, 베바시주맵, 이트라코나졸, 및 카복시아미도 트리아졸을 포함한다.

[0134] 면역요법제는 당해 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들면, 니볼루맵(MDX1106) 및 켐브롤리주맵(MK-3475)을 포함하여 항-예정세포사 단백질 1(PD-1) 항체 및 항-예정세포사-리간드 1(PD-L1) 항체를 포함한다.

[0135] *약제학적 조성물*

[0136] 본 발명의 접합체는 약제학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 약제학적 조성물 중에 포함될 수 있다.

[0137] 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 2차 반응을 유발하지 않고, 예를 들면, 접합체의 투여 촉진, 신체에서 이의 수명 및/또는 이의 효능 증가 또는 용액 중의 이의 용해도 증가를 허용하는 약제학적 조성물 내로 도입되는 화합물 또는 화합물의 조합일 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용 가능한 비히클은 잘 알려져 있고, 접합체의 투여 방식의 작용으로서 당해 분야의 숙련가에 의해 개조될 것이다.

[0138] 일부 실시형태에서, 본 발명의 접합체는 투여 전 재구성을 위한 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 예를 들면, 동결건조된 접합체는 개체에 투여되기 전에 멸균수 중에 재구성되고 염분과 혼합될 수 있다.

[0139] 본 발명의 접합체는 일반적으로 약제학적 조성물의 형태로 투여될 것이고, 이는 접합체 이외에 적어도 하나의 성분을 포함할 수 있다. 따라서 약제학적 조성물은, 접합체 이외에, 약제학적으로 허용 가능한 부형제, 담체, 완충제, 안정화제 또는 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 기타 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 비독성이어야 하고 접합체의 효능을 방해하지 말아야 한다. 담체 또는 기타 물질의 정확한 성질은 투여 경로에 따라 좌우될 것이고, 이는 하기 논의된 바와 같이 볼루스, 주입, 주사 또는 임의의 기타 적합한 경로에 의한 것일 수 있다.

[0140] 예를 들면, 주사에 의한 정맥내 투여를 위하여, 접합체를 포함하는 약제학적 조성물은 발열원 무함유이고 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태일 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 예를 들면, 등장성 비히클, 예를 들면, 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 락테이트 링거 주사액을 사용하여 적합한 용액을 잘 제조할 수 있다. 필요한 경우, 완충제, 예를 들면, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산; 항산화제, 예를 들면, 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제(예를 들면, 옥타데실다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들면, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소시놀; 사이클로헥산올; 3'-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들면, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 당당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이트화제, 예를 들면, EDTA; 당, 예를 들면, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 예를 들면, 나트륨; 금속 착물(예를 들면, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들면, 트윈(TWEEN)(상표명), 플루로닉스(PLURONICS)(상표명) 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 기타 첨가제가 사용될 수 있다.

[0141] **대상체**

[0142] 대상체는 인간, 반려 동물(예를 들면, 개 또는 고양이), 실험용 동물(예를 들면, 마우스, 래트, 토끼, 피그 또는 비인간 영장류), 가축 또는 농장 동물(예를 들면, 돼지, 소, 말 또는 양)일 수 있다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다. 일부 경우, 대상체는 암, 예를 들면, 상피 종양의 발달 위험이 있는 것으로 진단되거나 분류된 인간일 수 있다. 특정한 경우, 대상체는 실험용 동물, 예를 들면, 암의 마우스 모델일 수 있다. 특정한 경우, 대상체는 염증성 병태, 예를 들면, 류머티스성 관절염(RA)의 발달 위험이 있는 것으로 진단되거나 분류된 포유동물(예를 들면, 인간)일 수 있다. 특히, 대상체는 RA를 갖는 인간일 수 있다.

[0143] **암**

[0144] 본 명세서에 기재된 항-FAP 접합체는 포유동물 대상체에서 종양 치료에서 사용할 수 있다. 종양은 고형 종양일 수 있다. 특히, 종양은 췌장암, 유방암, 흑색종, 폐암, 두경부암, 난소암, 방광암 또는 대장암일 수 있다.

[0145] **염증성 병태**

[0146] 본 발명에 따른 일부 경우, 항-FAP 항체 또는 항체 약물 접합체는 염증성 병태의 치료에서 사용하기 위한 것일 수 있다. 류머티스성 관절염(RA) 환자의 섬유아세포-유사 활막세포(FLS)에서 FAP 발현이 보고되었다(예를 들면, 문헌[Bauer et al., *Arthritis Res. Therp.*(2006):8(6); R171] 참조). 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 항-FAP 항체, 및/또는 본 명세서에 기재된 이의 접합체가 RA 및/또는 RA의 증상을 완화시킬 수 있을 것으로 생각한다.

[0147] 하기는 예시의 방식으로 나타낸 것이고, 청구항의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

[0148] **실시예**

[0149] **실시예 1 - 항-FAP 항체의 제조**

[0150] 면역화된 FAP^{-/-} 녹아웃(knock-out) 마우스로부터의 파지 디스플레이에 의해 선택된 항-FAP scFvs는 이전에 설명되었다(28). 인간 및 뮤린 FAP에 교차-반응성인 두 scFvs, "M036" 및 "M033"(28)을 후속적인 특성규명 연구 및 면역독소 및 ADC의 생성을 위하여 전장 IgG로 전환하였다. 이들 scFv(scFv33 및 scFv36)를 사용하여 중쇄 및 경쇄 불변 도메인을 각각 VH 및 VL에 융합하는 키메라성 항체를 생성하였다. 추가로, CDR 그래프팅으로 둘 다 인간화하고, 모 scFv와 비교하여 FAP-발현 세포 및 재조합 FAP에 대한 결합에 대하여 시험하였다. 당해 비교를 위하여, 가장 우수한 결합제를 사용하여 전장 IgG를 생성하였다. 모든 scFvs를 이.콜라이(*E.coli*)에서 제조하고 IMAC로 정제하고, 항체 제조를 위해 개발된 Lonza GS 발현 벡터 pEE6.4 및 pEE14.4를 사용하여 IgG를 포유동물 세포(CHO)에서 제조하였다. scFvs의 특징을 표 1에 요약한다.

표 1

[0151] **항체, 특이성, 하위분류, 및 출발 물질로서 사용된 벡터**

형식	종	항원	클론	VI 하위분류	벡터	플라스미드 DNA #
scFv	마우스	hu/mo FAP	mo33	람다	pAB1	376
scFv	마우스	hu/mo FAP	mo36	카파	pAB1	277
scFv	인간화	hu/mo FAP	hu33	람다	pAB1	1214
scFv	인간화	hu/mo FAP	hu36	카파	pAB1	1215

[0152] 모든 scFvs를 이.콜라이 TG1에서 박테리아성으로 제조하고, IMAC에 의한 1L 배양의 주면세포질 추출물로부터 정제하였다. 인간화된 항체 둘 다(scFv hu33 및 hu36)를 약 0.6 mg/배양액 L의 수율로 가용성 형태로 정제하였다. SDS-PAGE에서 단백질은 약 30kDa의 예상된 크기로 이동하였다(도 1a). 순도는 90% 초과인 것으로 추정되었다. 인간 FAP를 발현하는 HT1080 세포(안정한 형질감염체)를 사용하는 유세포 실험에서, 유사한 결합이 scFv hu36 및 mo36 scFv에 대하여 관찰되었고, 이는 또한 박테리아에서 생성되었다(제시 생략). EC₅₀값은 낮은 나노몰 범위였다. 더 높은 농도에서 다소 차이가 관찰되었다(도 1b). scFv hu33은 이들 실험에서 결합을 나타내지 않거나 오직 미미한 결합을 나타냈다. 따라서 추가의 개발은 hu36에 집중되었다. mo36 scFv에 대하여 나타난 것보다 결합이 다소 약하지만, hu36 scFv의 결합이 또한 재조합 인간 FAP(세포의 영역 aa 26-760; R&D 시스템스)에 의한

ELISA에 의하여 관찰되었다(도 1c).

[0153] 전장 IgG1 항체에 상응하는 플라스미드를 생성하고, 약 1 mg/세포 배양액 L(실험실 규모)의 수율로 Lonza의 CHO 발현 시스템에서 항체의 제조를 위하여 CHO 세포 내로 형질감염시켰다. 단백질 A 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액으로부터 항체를 정제하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE 및 크기 배제 크로마토그래피로 특성규명하였다. 재조합 FAP, 및 HRP-접합된 항-인간 IgG 항체에 의한 결합된 항체의 검출을 사용하는 ELISA로 생물활성을 분석하였다. HT1080-FAP 세포주를 사용하는 유세포 분석법으로 세포 결합을 분석하였다.

[0154] 결과:

[0155] 생성된(및 서열화된) 플라스미드:

[0156] mo36 IgG1: pEE14.4 mo36-IgG1 OCMTX001p(키메라성 항-FAP IgG1)

[0157] hu36 IgG1: pEE14.4 hu36-IgG1 OCMTX002p(인간화된 항-FAP IgG1)

[0158] **실시예 2 - 항-FAP 항체의 특성규명**

[0159] 인간화된 항-FAP IgG1 hu36(hu36-IgG1) 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)의 아미노산 서열을 각각 하기에 나타낸다:

[0160] **항-FAP hu36-IgG1-HC:**

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTENIIHWVRQAPGQGLEWMGWFHGPGSGSIKYNEKFKDRV
TMTADTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARHGGTGRGAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 1)

[0161]

[0162] aa 449

[0163] 가공된 HC의 MW 49,069

[0164] 이론적 pI 8.69

[0165] 잠재적인 글리코실화 부위(이중 밑줄): N297

[0166] ADCC 및 CDC 결손을 야기하는 돌연변이는 굵은 이탤릭체로 표시된다(또한 제WO 99/58572호 참조).

[0167] 신호 서열은 박스로 표시된다.

[0168] VH 도메인은 밑줄로 표시되고; CDRH1-H3은 굵게, 곡선 밑줄로 표시된다.

[0169] **항-FAP hu36-IgG1-LC:**

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASKSVSTSAYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSIQPEDFATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGEC (서열번호 2)

[0170]

[0171] aa 218

[0172] 가공된 HC의 MW 23,919

[0173] 이론적 pI 7.77

[0174] 신호 서열은 박스로 표시된다.

[0175] VL 도메인은 밑줄로 표시되고; CDRL1-L3은 굵게, 곡선 밑줄로 표시된다.

[0176] hu36-IgG1-HC - 신호 서열 없음:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTENIIHWVRQAPGQGLEWMGWFHPGSGSIKYNEKFKDRV
TMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHGGTGRGAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 3)

[0177] hu36-IgG1-LC - 신호 서열 없음:
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTSAISYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLES
SGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGEC (서열번호 4)

[0180] hu36-VH:
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTENIIHWVRQAPGQGLEWMGWFHPGSGSIKYNEKFKDRV
 TMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHGGTGRGAMDYWGQGLTVTVSS (서열번호 5)

[0182] hu36-VL:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTSAISYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLES
 SGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKR (서열번호 6)

[0184] hu36-CDRH1:
 ENIIH(서열번호 7)

[0186] hu36-CDRH2:
 WFHPGSGSIKYNEKFKD(서열번호 8)

[0188] hu36-CDRH3:
 HGGTGRGAMDY(서열번호 9)

[0190] hu36-CDRL1:
 RASKSVSTSAISYMH(서열번호 10)

[0192] hu36-CDRL2:
 LASNLES(서열번호 11)

[0194] hu36-CDRL3:
 QHSRELPYT(서열번호 12)

[0196] 전체 hu36-IgG의 파라미터는 하기와 같다:

[0197]	전장 IgG의 총 길이(aa):	1,334
[0198]	전장 IgG의 계산된 분자 질량:	145,922
[0199]	전장 IgG의 계산된 흡광 계수:	209,420
[0200]	Abs 0.1%(=1 g/l)	1.435
[0201]	이론적 pI:	8.60

- [0202] 잠재적인 글리코실화 부위: N297
- [0203] 정제된 키메라성 및 인간 항-FAP 항체 mo36 및 hu36을 재조합 FAP에의 결합에 대하여 ELISA로 분석하였다. 두 항-FAP 항체는 모두 유사한 EC₅₀ 값(약 5nM)으로 재조합 FAP에 특이적이고 강한 결합을 나타냈다(도 2a). 추가로, 두 항체는 모두 이들 세포 표면에서 인간 FAP를 발현하는 HTP1080-FAP에 대한 결합을 나타냈다(도 2b). 인간화된 IgG는 키메라성 IgG와 비교하여 더 강한 신호를 제공하지만, 유사한 EC₅₀ 값을 나타냈다. 인간화된 hu36 항-FAP 항체는 FACS 분석에 의하여 나타난 바와 같이 인간 및 무린 FAP 둘 다에 대하여 교차-반응할 수 있었다(도 3a 및 도 3b). Hu36-IgG1은 나노몰 이하의 EC50 값(0.33 및 0.25nM)으로 두 세포주 모두에 농도-의존적 방식으로 결합하였다.
- [0204] 규모 증가를 위하여 항체 구조체를 GS 이중 벡터(pEE14.4)에서 클로닝하였다. 200ml의 용적에서의 발현 평가를 위하여 DNA 플라스미드를 형질변환시키고 증폭시키고 일시적으로 CHOK1SV 세포 내로 형질감염시켰다. 두 번째 단계에서 항체는 5 내지 10 L 대규모 배양에서 일시적으로 발현되었다. 정화된 배양 상청액을 1-단계 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 대조군 샘플로서 인-하우스(in-house) 인간 항체와 함께, 정제된 물질을 1 mg/ml의 농도로 사용하여, SE-HPLC, SDS-PAGE 및 LAL를 통한 생성물 품질 분석을 수행하였다.
- [0205] 정제된 단백질 샘플을 0.2 μm 필터를 통해 여과하고, SE-HPLC 크로마토그램으로 분석하였다. 항체를 98.8% 초과로 정제하였다. 내독소 수준은 0.5 EU/mg 미만이었다.
- [0206] 모든 정제된 단백질을 환원 및 비환원 조건 하에 SDS-PAGE로 분석하였다(데이터 나타내지 않음).
- [0207] 정제된 단백질 hu36-IgG 및 mu36-IgG를 SDS-PAGE 및 크기 배제 크로마토그래피로 특성규명하였다. 재조합 FAP, 및 HRP-접합된 항-인간 IgG 항체에 의한 결합된 항체의 검출을 사용하는 ELISA로 생물활성을 분석하였다. HT1080-FAP 세포주를 사용하는 유세포 분석법으로 세포 결합을 분석하였다. 제타사이저 나노(zetasizer nano)를 사용하여 동적 광산란법으로 용점을 측정하였다. 아타나 A100(Attana A100)을 사용하여 QCM으로 친화력으로 측정하였다. 내재화 연구를 수행하였다. FITC-표지된 2차 항체에 의하여 결합되고 내재화된 항체를 검출하는, 침투된 세포에 대하여 간접적인 면역형광 공초점 현미경으로 내재화 연구를 수행하였다.
- [0208] 면역접합체의 생성을 위하여 전장 IgG1 정제된 항체를 실험실 규모 및 대규모에서 성공적으로 제조하였다. 항체 성질의 요약은 표 2에 나타낸다. 항체는 ELISA 및 유세포 분석 실험에서 나타난 바와 같이 이의 특이성을 보유하고 있었다. 항체는 나노몰 이하의 EC₅₀ 값으로 FAP-발현 세포에 결합하였다. QCM에 의해 측정된 바, 친화력은 모 항체의 것과 유사하였다. QCM 측정은 고친화성 결합에 결합능 효과의 기여를 지시하였다. 열 안정성은 상이한 IgG(77-80°C) 사이에서 상이하였다.
- [0209] HT1080-FAP 세포에서 hu36-IgG1(인간화된 항-FAP 항체)에 대하여 빠른 내재화가 나타났다(도 4 및 5 참조).

표 2

항체 성질의 요약

[0210]

항체	mo36-IgG1	hu36-IgG1
항원	hu 및 mo FAP	hu 및 mo FAP
동형	γ 1*/ κ	γ 1*/ κ
IgG 유형	키메라성	인간화
플라스미드	OCMTX001p	OCMTX002p
순도(SEC)	적은 응집체	√
Tm(DLS)	77°C	80°C
EC ₅₀ ELISA	3nM(rhFAP)	3nM(rhFAP)
EC ₅₀ FACS	0.5nM (HT1080-huFAP)	0.3nM (HT1080-huFAP) 0.2nM (HT1080-moFAP)
1차 종양 섬유아세포에 대한 결합	n. d.	+
결합 상수 K _D (QCM)	rhFAP: K _D 1 = 112nM K _D 2 = 0.6nM	rhFAP: K _D 1 = 218nM K _D 2 = 0.4nM
내재화	n. d.	HT1080-FAP 30-60분

√1* = ADCC 및 CDC 결손(문헌[Amour et al., 1999; Richter et al., 2013] 참조).

- [0211] 항-FAP IgG1 생체내 결합
- [0212] 항-FAP IgG1 hu36을 1 및 5 mg/kg의 단일 용량으로 쥐장암의 환자-유래 이중이식 마우스에 복강내 투여하였다. 투여 12, 24 및 48시간 후, 종양을 절개하고, 포르말린으로 고정하고, 파라핀 포매를 수행하였다. 항-인간 IgG 2차 항체로 항-FAP hu36의 면역검출을 수행하였다. 도 12는 처리된 마우스로부터의 종양 샘플에서만 기질의 특이적 용량- 및 시간-의존적 염색을 나타낸다.
- [0213] **실시예 3 - 니그린-b A-쇄**
- [0214] 리신(Ricin)으로 광범위하게 기재된 바와 같이, 혈류로부터 방출될 수 있는 유리 독소의 부작용을 피하고 RIP 독소의 잠재적인 면역원성을 감소시키기 위하여, 니그린 b의 효소 도메인, A 쇄를 박테리아에서 클로닝하고 발현시켰다. 본 발명자는 박테리아에서 제조된 A 쇄가 이의 활성을 보유할 수 있다면, 항체와 같은 비히클 분자에 접합되지 않는 한, 이는 세포로 들어갈 수 없다고 가정하였다.
- [0215] **제조**
- [0216] 니그린-b A-쇄를 박테리아 발현을 위한 코돈 최적화를 고려하여 합성하고, 합성된 유전자를 두 상이한 이.콜라이 계통, 이.콜라이 BLR(DE3) 및 이.콜라이 HMS174(DE3)에서 발현을 위하여 두 상이한 벡터, 니그린_pET30b-3 및 니그린_pET33b-1(+/- His tag)에서 클로닝하였다. 상이한 배양 배지를 사용하여 상이한 발현 조건을 확인하였다. 정제 공정은 Capto Q 크로마토그래피 및 SP 세파로스 하이 퍼포먼스(Sepharose High Performance)를 사용하여 확립하였다. 정제된 재조합 니그린-b A-쇄(recNgA)를 PBS 1X pH 7.4, DTT 0.5mM, 글리세롤 10% 중에서 5 mg/ml로 제형화하였다. 내독소 수준은 1 EU/니그린 mg 미만이었으며, 순도는 단량체 형태로 99% 초과였다.
- [0217] 엘드만(Eldman) N-말단 서열분석으로 recNgA의 N-말단은 예상된 서열에 상응하는 것이 밝혀졌다.
- [0218] 재조합 니그린-b A-쇄 아미노산 서열:

MIDYPSVSFNLDGAKSATYRDFLSNLRKTVATGTYEVNGLPVLRRSEVQVKSREVLVPLTNYNGNTV
TLAVDVTNLYVVAFFSGNANSYFFKDATEVQKSNLFGVTKQNTLSFTGNYDNLETAANTRESIELGPS
PLDGAITSLYHGDSVARSLLVVIQMVSEAAFRYIEQEVRRSLQQATSFTPNALMLSMENNWSMSLE
IQQAGNNVSPFFGTVQLLNYDHTHRLVDNFEELYKITGIAILLFRCSSPSND (서열 번호 13)
- [0219]
- [0220] 재조합 니그린-b A-쇄는 하기 특성을 갖는다:
- [0221] 아미노산의 수: 256
- [0222] 분자량: 28546.0
- [0223] 이론적 pI: 5.45

[0224] 재조합 니그린-b A-쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 하기와 같다:

```

atagactatc cctccgtctc cttcaacttg gatggagcca agtcggctac atacagggac
ttcctcagca acctgcgaaa aacagtggca actggcacct atgaagtaaa cggtttacca
gtactgaggc gcgaaagtga agtacaggtc aagagtcggt tcggttctcgt ccctctcacc
aattacaatg gaaacaccgt cacgttggca gtagatgtga ccaaccttta cgtgggtggct
tttagtgtaa atgcaaaact ctactttttc aaggacgcta cggaagttca aaagagtaat
ttattcgttg gcaccaagca aaatacgtta tccttcacgg gtaattatga caaccttgag
actgcgcgca atactaggag ggagtctatc gaactgggac ccagtccgct agatggagcc
attacaagtt tgtatcatgg tgatagcgta gcccgatctc tccttgtggt aattcagatg
gtctcggaa gggcaaggtt cagatacatt gagcaagaag tgcgccgaag cctacagcag
gctacaagct tcacaccaa tgctttgatg ctgagcatgg agaacaactg gtcgtctatg
tccttgagaga tccagcaggc gggaaataat gtatcacctc tccttgggac cgttcagctt
ctaaattacg atcacactca ccgcctagtt gacaactttg aggaactcta taagattacg
gggatagcaa ttcttctctt ccgttgctcc tcaccaagca atgat ( 서열 번호 14)
    
```

[0225]

물질

[0226]

- 니그린_pET30b-3 유전자 구조체.

[0227]

- 이.콜라이(Migula) 카스텔라니 앤드 팔머스(Castellani and Palmers) BLR(DE3)

[0228]

- 배양 배지: 자가 유도 배지(AIM)

[0229]

- 추출 배양 완충액: 글리신/NaOH 10 mM, 류페틴 1 µg/ml, 웹스타틴 1 µg/ml, pH 9.5.

[0230]

- 추출 상청 완충액 Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, 류페틴 1 µgml⁻¹, 웹스타틴 1 µgml⁻¹, 리소자임 0.1 mgml⁻¹, pH8.0.

[0231]

- 투석 용액: 시트르산/NaOH 25mM pH5.0. -Capto Q FPLC: 평형 완충액 A: 글리신/NaOH 50 mM pH 9.5. 용리 완충액 B: 글리신/NaOH 50mM pH 9.5, NaCl 1 M.

[0232]

- Capto Q 단계로부터 수집된 분획(+ 80 ml 추출).

[0233]

- SP 세파로스 HP FPLC: 평형 완충액 A: 시트르산 25 mM pH 4.0. 용리 완충액 B: 시트르산 25 mM pH 4.0, NaCl 1 M.

[0234]

방법

[0235]

발현 니그린_pET30b-3을 갖는 이.콜라이 BLR(DE3)을 카나마이신 30 µgml⁻¹과 함께 자가 유도 배지(AIM)의 1 L 형식으로 배양하였다. 단백질 발현은 성장 약 3-4시간 후 락토스 활성화 및 글루코스 소모에 의해 촉발되었다. 그 다음, 온도를 하룻밤 기간 동안 20°C로 낮추었다. 추출을 위하여, 처음에 각각의 세포 펠렛을 배양 리터당 추출 완충액 80ml로 재현탁시키고, 진탕하에 8°C에서 배양 30분 후, 1100-110 Bar에서 7분 붕괴를 3 사이클 수행하였다. 그 다음, 추출물을 8°C에서 15,900 g로 60분 동안 원심분리시켰다. 상청액은 정제의 출발 물질이었다.

[0236]

Capto Q FPLC: 8l 배양으로부터의 추출된 생성물 160 ml를 Capto Q 160 ml에 로딩하고, 평형 완충액 4CV를 사용하여 평형을 맞추고, 평형 완충액 15CV로 세척하였다. 용리를 3 단계로 수행하였다: 1.5 mS/cm에서 15CV(7.6%B); 23.8 mS/cm에서 20CV(18.9%B); 20CV 100%B.

[0237]

투석을 하기 조건으로 수행하였다: 생성물 650 ml를 4×5 L 욕조에서 시트르산/NaOH 25 mM pH 5.0, 컷오프(cut-off) 6-8000Da 중에서 투석하였다. 투석 인자 대략 3500, 24시간 미만. 투석 후, 20,500g 및 8°C에서 30분의 원심분리는 불용성 분획으로부터 가용성 분획을 분리하는 것을 허용한다. 투석 전후에 전체 및 가용성 분획 둘다에 대하여 SDS-PAGE를 수행하였다(SDS-PAGE에 10µl 로딩). 용리액을 PBS pH7.4로 투석하고, 2×20cm² EKV 필터를 사용하여 φ=0.22 µm로 여과하였다.

[0238]

- [0239] SP 세파로스 HP: 시트르산 25 mM pH 5.0 중의 Capto Q의 투석된 풀 610 ml를 평형 완충액 4CV와 함께 SP 세파로스 하이 퍼포먼스 240ml에 로딩하고, 평형 완충액 15CV로 세척하고, 20% B에 대한 25Cv 구배; 100% B의 4CV 단계로 용리시켰다.
- [0240] SP 세파로스 HP 단계로부터 수집된 분획을 PBS pH 7.4, DTT 0.5 mM 중에서 투석하였다(5×4 L 욕조, 0.97 mg/ml에서 수집된 분획 950 mL). 컷오프는 6-8000 Da이고, 투석 인자는 대략 3130, 시간은 24시간 미만이었다. 그 후, 20,55 g 및 8°C에서 30분의 원심분리는 불용성 분획으로부터 가용성 분획을 분리하는 것을 허용하였다. 그 후, 10% 글리세롤을 가하였다.
- [0241] 최종적으로 용리액을 PBS pH 7.4(5개 욕조 대략 3100)으로 투석시키고, $\phi=0.2 \mu\text{m}$ 로 여과한 다음, recNg b A 배취(batch)를 -80°C에서 스냅 냉동하였다. 그 후, 세미-프레파라티브 S200 슈퍼텍스(Semi-Preparative S200 Superdex)에서 SEC를 수행하였다.
- [0242] 크기 배제 크로마토그래피 및 질량 분석계 분석은 수득된 제조합 니그린-b A-쇄(recNgA)의 단량체 및 정제 상태를 입증하였다(도 6).
- [0243] 안정성 연구를 수행하여 니그린-b A-쇄 단백질 그 자체 및 이의 활성에 대한 pH 및 온도를 평가하였다. recNgA는 5 내지 9 범위의 pH에서, 글리세롤(10 내지 45%)의 존재 및 부재 하에 안정하였다(데이터 나타내지 않음).
- [0244] **활성**
- [0245] 제조합 니그린-b A-쇄의 리보솜-불활성화 단백질(RIP) 활성을 토끼 망상적혈구 무세포 용해물 중에서 시험하였다: 수득된 IC₅₀ 값은 천연 니그린-b와 유사하고 2.5 내지 25pM 범위였다(도 7 참조). 따라서, 박테리아에서 제조합 단백질로서 발견되는, 니그린-b로부터의 A 쇠는 이의 효소 활성을 유지하고, 이는 글리코실화가 니그린-b A-쇄의 RIP 활성에 필요하지 않다는 것을 지지하였다.
- [0246] RecNgA는 (-80°C)에서 냉동되어 저장되고 냉동-해동 사이클 3 이하인 경우, 토끼 망상적혈구 무세포 용해물 중에서 이의 활성을 보유하였다(제시 생략).
- [0247] recNgA의 세포독성 활성을 크리스탈 바이올렛-기반 생존능 검정을 통해 세포 배양에서 시험하였다. 세포 사이에서 전이되는 B 쇠가 부족한 recNgA는 도 8에 도시된 바와 같이, 천연 니그린-b보다 100 내지 1000 적은 독성 활성을 나타낸다. 천연 니그린 b는 IC₅₀ ≈ 2 × 10⁻⁸ M(이전에 공개된 데이터와 유사; 33 참조)을 나타냈고, recNgA는 IC₅₀ ≈ 2 × 10⁻⁶ M을 나타냈다.
- [0248] 이전에 공개된 연구는 천연 니그린 b가 RRL 검정에서 리신보다 높은 RIP 활성을 나타내고, 세포 또는 생체내에서 매우 낮은 독성(30 내지 10,000 배, 대략)이 있다는 것을 보여주었다(표 3에서 IC₅₀ 및 LD₅₀ 값 참조).
- [0249] B 쇠를 제거하면, 리신 A 쇠는 RRL 검정 및 세포독성 검정 둘 다에서 활성을 손실한다. 예상외로, 본 발명에서 처음으로 생성된, 니그린 b A 쇠는 오직 세포 세포독성 검정에서만 활성을 손실하고, RRL 검정에서는 심지어 천연 니그린 b에 비해 증가하였다. 이들 데이터는, 리신의 경우, B 쇠의 제거가 A 쇠의 결합 및 전위뿐만 아니라 이의 RIP 활성에도 영향을 미치지만, 이의 RRL 활성을 보유하고 심지어 이의 천연 대응물보다 증가하는 니그린 b A 쇠의 경우에는 그렇지 않다는 것을 제시하였다. 결과적으로, 니그린 b A 쇠는 RRL에서 리신 A 쇠보다 50배 활성이 있다.
- [0250] 결과적으로, 접합 시, 니그린 b A 쇠 접합체는 리신 A 쇠 접합체(nM 범위)보다 높은 세포독성 활성(pM 범위의 IC₅₀)을 나타낸다(제시 생략).

표 3

리신 및 니그린(천연 및 A 쇠)에 대한 시험관내 및 생체내 활성 데이터.

[0251]

	토끼 용해물 IC ₅₀ (pM)	HeLa 세포 IC ₅₀ (pM)	마우스 LD ₅₀ (μgkg^{-1})
니그린 b	30	27,600.00(20-2300nM; dpt 세포주)	12,000.00
니그린 b A 쇠	6.5	750,000.00(HT1080-FAP) 300,000.00(HT1080)	ND

리신	100	0.67	3.00
리신 A쇄	300	260,000.00(T 세포)	ND

[0252] (발명자들의 자체 데이터 - 니그린 b A쇄; 또한 문헌[Ferrerias J.M. et al., *Toxins*, 3:420, 2011; Svinth M. et al., *BBRC*, 249: 637, 1998] 참조)

[0253] **실시예 4 - 항-FAP 항체에 대한 니그린-b A-쇄의 접합**

[0254] 최대 세포독성을 나타내는 RIP를 함유하는 면역접합체를 위하여 RIP는 표적화 비히클로부터 완전한 활성 형태로 방출되어야 하고, 이는 입체 장애의 회피를 필요로 한다(34). 이황화 결합은 이러한 기준에 맞는 유일한 연결 유형이다(35, 36). 이러한 결합은 유리 설피드릴기, 예를 들면, N-석신이미딜 3(2-피리딜-다이티오프로피오네이트)(SPDP) 및 4-석신이미딜옥시카보닐- α -메틸- α (2-피리딜-다이티오)톨루엔(SMPT)의 도입을 위한 시약을 사용하여 접합을 허용한다. 종종 제2 세대 면역독소로서 표지된, 장애 이황화 링커에 의해 독소에 공유적으로 결합된 mAb로 이루어진 면역독소는 안정하고 수명이 길며 표적 세포에 강력한 세포독성을 보인다(37).

[0255] SPDP는 니그린 b를 함유하는 면역독소(IT)의 제조에서 이미 사용되었다(38, 39). 게다가 SMPT는 티올레이트 음이온의 공격으로부터 이황화 결합을 보호하고, 이는 연결의 생체내 안정성을 개선시킨다(40, 41).

[0256] **물질**

[0257] - 5°C에서 저장된 PBS, pH 7.4, 10% 글리세롤, 0,5 mM DTT, 4.92 gl⁻¹ 중의 재조합 니그린 b A쇄

[0258] - 5,5'-다이티오-비스-(2-나이트로벤조산)

[0259] - GE PD 미니트랩(MiniTrap) G-10 탈염 칼럼.

[0260] - 0.2 μ m 28 mm 살균 미니사트(Minisart) 필터.

[0261] - 사이클론(Sciclone) ALH 3000 위크스테이션

[0262] - 사슈트 마이크로테스트 플레이트 96-웰 플랫 보텀(Sarstedt Microtest Plate 96-Well Flat Bottom), ref n° 82.1581.

[0263] **방법**

[0264] 다이티오트레이틀(DTT, 클릴랜드(Clelland) 시약)은 단백질 샘플에 존재하는 티올기를 유리시키는데 사용할 산화 환원 시약이다. 일단 상기 기가 유리되어 반응이 가능해지면, 5,5'-다이티오-비스-(2-나이트로벤조산)(엘만(Elman) 시약)을 가할 것이다. 엘만 시약 이황화 브릿지는 절단될 것이고, 2개의 수득된 티오-나이트로벤조에이트 분자(TNB)는 티올기 부위에서 단백질에 부착될 것이다. TNB를 적정하기 위하여 흡광도 값을 DTT가 흡수되지 않는 파장인 $\lambda=412\text{nm}$ 에서 수득하고, 이는 티올기의 농도를 제공한다. $\lambda=280$ 에서 이의 흡광도로부터 수득된 단백질의 농도와 이들의 비율은 단백질 분자당 유리 티올기의 수를 제공할 것이다.

[0265] 직접적인 티올 적정은 하기와 같이 수행하였다: recNg b A 204 μ l를 20 mM 포스페이트 250mM NaCl 1 mM EDTA pH 7.0(검정 완충액) 796 μ l에 용해시켰다(1.0033 gl⁻¹=최종 농도). 엘만 시약을 3 gl⁻¹으로 포스페이트 0.2 M에 용해시켰다. 두 완충액에 있어서 1상 및 2상 인산나트륨을 1.61 대 1 질량비로 가하였다. PH를 실온에서 조절하고, 완충액을 여과하였다. 엘만 완충액 100 ml 및 검정 완충액 500 ml를 제조하였다. 엘만 시약을 중량 측정 대신에 완전하게 재현탁시켰다.

[0266] recNgA 샘플을 4.8 mM DTT의 존재하에 실온에서 30분 동안 배양하였다. 그 다음, recNgA 샘플을 칼럼에서 정제하고, 용리액의 처음 10 ml를 분취하였다(V=0.5 ml). 분취액의 A₂₈₀을 수득하고, 가장 높은 농도 2개를 혼합하였다. A₂₈₀을 다시 수득하였다. 3 gl⁻¹ DTNB 10 μ l를 가하고, 블랭크(n₀=3)와 동일한 농도로 검정 완충액 중에 희석된 엘만을 사용하여 2분 후 A₄₁₂를 측정하였다(n=1). 판독은 0.1-3 AU 선형 범위에 속하였다. 단백질 용액을 보텍싱 후 메니스커스 우측 아래에 피펫팅하였다. 웰당 100 μ l를 피펫팅하였다. 당해 연구의 결과는 recNgA의 단일 시스템인 잔기에 속하는 티올기가 유리 상태이고 반응이 가능하며 이의 3차 구조에 의해 차단되지 않았음을 보여준다. 이는 recNgA가 장애 쇠-내 이황화 결합을 필요로 하는 링커를 사용하여 접합되는 것을 허용할 것이다.

[0267] 리보솜-불활성화 단백질을 함유하는 면역접합체는 오직 독소 분자가 완전한 활성 형태로 표적화 비히클로부터

방출되는 경우에만 최대 세포독성을 나타내는 것으로 잘 확립되어 있다. 담체로부터의 RIP 분자의 분리는 입체 장애를 회피하는 것 및 독소의 세포질 내로의 효과적인 전위를 허용하는 것을 필요로 한다(34). 현재, 이황화 결합은 이러한 기준에 맞는 것으로 나타난 유일한 연결 유형이다(36).

[0268] 헤테로다имер 형성을 야기하는 두 상이한 단백질 거대분자의 커플링은 각각의 단백질을, 이들을 혼합하여 반응시키기 전에, 변형시킬 필요가 있다. 유형 2 RIP의 A 쇠의 경우, 변형은 분자의 활성 (A)와 결합 (B) 쇠를 연결하는 천연 시스템인 잔기의 환원적 절단으로 제한된다.

[0269] IgG 분자에 있어서, 시스템 잔기가 단백질의 3차 및/또는 4차 구조를 유지하는데 포함되어 있고, 따라서 특이적 단백질 기능의 손실 없이 이를 환원시키는 것이 불가능하기 때문에, 이는 불가능하다. 게다가, 활성화된 RIP에 최적 접합을 위하여 생성되어야 하는 면역글로불린당 10개의 티올기에 의해 입증되는 바와 같이, 아마도 시스템 잔기 중 일부는 입체적으로 접근할 수 없다(42).

[0270] 이러한 이유로, 대부분의 IgG 분자에서, 티올기는 헤테로-2작용 시약을 사용하여 화학적으로 삼입되고, 몇몇 방법은 동일중합체의 형성을 최소화하는 것을 회피하거나 감소시키는 헤테로접합체를 생성하기 위하여 개발되었다. 대부분의 경우, 티올기를 도입하는데 사용되는 시약은 아미노기와 반응하여 아미드 또는 아미딘 결합을 형성한다. 아미노기는 반응성이고, 풍부하고, 대부분의 단백질에 있어서 제한적으로, 소모성이다. 즉, 제한된 수의 아미노기는 단백질의 생물학적 활성을 약화시키지 않고 변형될 수 있다(36).

[0271] 유리 설피드릴기의 도입을 위하여 가장 일반적으로 사용되는 시약은 아미노기와 반응하여 중성 아미드를 형성함으로써 2-피리딜 이황화 기를 단백질로 도입하는 N-석신이미딜 3-(2-피리딜-다이티오프로피오네이트)(SPDP) 및 4-석신이미딜옥시카보닐- α -메틸- α -(2-피리딜-다이티오)톨루엔(SMPT); 및 반응하여 하전된 아미딘을 형성함으로써 머캡토뷰티르이미도일 기를 도입하고 따라서 유도체화된 아미노산의 양성 전하를 방지하는 메틸 4-머캡토뷰티르이미데이트(2-이미노티올란, 트라우트(Traut) 시약)이다(36, 41).

[0272] SPDP 및 SMPT는 장애 이황화 결합을 도입하지만, 2-이미노티올란-SH는 5,5'-다이티오비스-2-나이트로벤조산(엘만 시약)와 이의 반응에 의해 보호되어야 한다. 엘만 시약과의 반응은 또한 단백질 설피드릴기의 빠른 측정에 사용된다(43, 44).

[0273] SMPT는 이황화 결합에 인접한 탄소 원자에 부착된 메틸기 및 벤젠 고리를 갖고, 이는 티올레이트 음이온의 공격으로부터 결합을 보호하고, 따라서 연결의 생체내 안정성을 개선시킨다(40, 41).

[0274] 이러한 데이터를 기반으로, IgG 단백질은 하기 조건에서, 심지어 이들이 반응 부위에서 단백질의 전하를 변화시키는 경우에도, 분자의 항원 결합 성질에 유의미한 효과를 미치지 않는 SMPT에 의하여 변형될 수 있다.

[0275] 현재 연구에서 본 발명자들은 접합 프로토콜에 따라 SMPT:mAb 몰비 6을 이용해서 유도체화한 후에 2개의 상이한 recNgA:mAb 몰비 2.5 및 3.5를 사용하여, 인간화된 항-FAP-IgG1을 recNgA와 접합시키는 것을 조사하였다(36). 정제는 세파크릴(Sephacryl) S200에서 크기 배제 크로마토그래피로 수행하였다(37).

[0276] 기재된 조건 하에, 면역독소는 대부분 고분자량 성분(몇몇 RIP 단백질에 연결된 IgG)의 존재하에 1 또는 2개의 독소 분자에 연결된 항체의 혼합물, 뿐만 아니라 유리 중합체 RIP(recNgA의 경우 이합체) 및 유리 항체이다. 따라서, 순수한 생성물을 수득하는데 조심스러운 정제가 바람직하다고 여겨진다.

[0277] **생화학적 특성규명**

[0278] 항-FAP hu36-IgG1-recNgA 면역독소 접합체를 제조하고 하기와 같이 특성규명하였다:

[0279] 접합체 HPS131-001-1

[0280] 농도 0.277 mg/ml

[0281] 약물:항체 비율(DAR): 1.8

[0282] PM: 182 kDa

[0283] 순도: 87%(유리 mAb의 13%)

[0284] **시험관내 활성 시험**

[0285] 상기 기재된 바와 같이 제조된 접합체에 대한 활성 시험은 토끼 망상적혈구 무세포 용해물(RRL) 검정에서 RIP 활성의 평가(도 9) 및 세포 배양에서 세포독성 효과(도 10a 및 도 10b)를 통해 수행하였다.

- [0286] RRL 검정 결과는 항-FAP hu36-IgG1-recNgA 접합체(HPS131-001-1)가 천연 니그린-b 또는 recNgA와 유사한 IC50 값을 나타냈고 3pM 범위였음을 보여주고, 이는 항체 접합이 recNgA의 효소 활성을 약화시키지 않았음을 보여준다(도 9 참조).
- [0287] 세포 세포독성 결과는 HT1080 야생형 세포에서, 접합된 항체 HPS131-001-1이 오직 가장 높은 농도에서 아주 약간의 독성(존재하는 경우)을 나타내고, 네이키드 항-FAP hu36-IgG1이 어떠한 효과도 없으며, recNgA가 오직 10⁻⁶M에서 및 배양 72h 후에만 세포 독성을 나타내는 것을 보여준다(도 10a 참조).
- [0288] 그러나, FAP-발현 세포에서, HT1080-FAP, 오직 HPS131-001-1 접합된 항-FAP 항체만이 5pM의 IC₅₀ 농도에서 HT-1080-FAP 세포 생존능을 피코몰 농도의 범위로 강하게 감소시킨다(도 10b 참조).
- [0289] 이러한 결과는 하기를 나타낸다: 1) 항-FAP:recNgA 면역독소는 시험관내에서 매우 활성이고, 이는 피코몰 범위의 세포독성이고; 2) HT1080-WT에서 유의미한 효과가 관찰되지 않았기 때문에 활성은 FAP-발현에 매우 특이적이고; 3) 항-FAP hu36-IgG1의 표적에 대한 특이성은 recNgA에 대한 접합에 의해 영향을 받지 않고, recNgA의 효소 RIP 활성이 아니고; 4) 네이키드 IgG1에 대해 효과가 관찰되지 않기 때문에 활성은 접합된 항-FAP hu36-IgG1에 특이적이고; 5) 접합되지 않은 recNgA(막 결합 도메인 부족)가 세포독성 효과를 거의 나타내지 않기 때문에(IC₅₀ > 1 μM) 항-FAP:recNgA 면역독소는 내재화된다(도 8 참조).
- [0290] 요약하면, 항-FAP:recNgA 면역독소는 표적(FAP)을 특이적으로 인식하는 시험관내 활성을 갖고, 세포질 내에 내재화되고, recNgA 이펙터 모이어티를 방출하여 리보솜을 능동적으로 억제하고, 이는 피코몰 범위의 세포독성 IC₅₀ 값을 야기한다.
- [0291] **항종양 효과의 생체내 평가**
- [0292] 면역독소 항-FAP:recNgA를 체장암의 세포-유래 및 환자-유래 이종이식 마우스 모델 둘 다에서 생체내 시험하였다. 용량 범위 연구를 먼저 수행하여 정상 마우스 및 각각의 이러한 모델들에서 최대 내약 용량을 정의하였다: 5 내지 0.1 mg/kg의 용량을 3주 동안 매주 1회 복강내 투여하고, 동물 중량을 2일마다 모니터링하여 면역독소의 독성 효과로 인하여 가능한 중량 손실을 검출하였다. 결과를 도 13에 나타낸다.
- [0293] 고용량(0.5 mg/kg 초과)은 정상 마우스에서 간독성을 유도하였지만, FAP-의존성 독성은 자궁 및 골격근의 병리학적 분석 후 관찰되지 않았고, 여기서 낮은 FAP 발현이 설명되었고(Dolznic H., et al., *Cancer Immun.*, 5:10, 2005; Roberts E.W., et al., *J. Exp.Med.*, 210:1137, 2013), 심장 및 신장에서도 관찰되지 않았다. 0.5 mg/kg보다 낮은 용량은 체장암의 세포주-유래 동소(도 13) 및 환자-유래 피하(도 14a) 이종이식 무린 모델에서 임의의 검출가능한 비특이적 독성을 유도하지 않았다.
- [0294] 0.5 내지 0.1 mg/kg의 비독성 용량으로 수행된 효능 연구에서, 단일 제제로서 또는 켐시타빈(240 mg/kg)과 조합으로서 적용된 항-FAP:recNgA 면역독소는 FAP(-) 세포주-유래 동소 이종이식 무린 모델에서 생체내 항종양 효능을 나타내지 않았지만(제시 생략), 높은 생체내 항종양 효능은 체장암의 FAP(+) 환자-유래 피하 이종이식 무린 모델에서 0.5 mg/kg의 용량에서 입증되었다(도 14b). 켐시타빈(150 mg/kg)과 조합 시, 이는 심지어 100% 종양 성장 억제 및 종양 퇴행을 보였다.
- [0295] **실시예 5 - 사이토라이신 및 항-FAP 항체에 대한 이의 접합**
- [0296] 튜블라이신은 매우 높은 활성으로 아포토시스(apoptosis)를 유도하여 튜블린 골격을 불안정화시킬 수 있는, 미소박테리아(Myxobacteria)로부터 단리된 최근 발견된 천연 화합물이다. 세포 형태학에서 빠르고 비가역적이고 강한 변화를 야기하는, 튜블라이신 및 이의 합성 테트라펩타이드 유사체, 사이토라이신은 매우 강력한 세포사멸제(nM 내지 pM 활성)이다. 튜블라이신 A는 0.75 내지 1 μM의 IC₅₀으로 시험관내 튜블린 중합을 억제하고, 따라서 방추체의 형성을 차단하고 G2/M 상에서 세포 주기 정지를 유도한다. 튜블라이신은 튜블린의 빈블라스틴 결합 부위에 대한 결합을 통해 빈블라스틴과 강하게 경쟁한다. 추가로 이들은 리소솜 풍부 세포 분획에서 안정하다(45-48).
- [0297] 접합할 수 있는, 많은 상이한 튜블라이신/사이토라이신 유도체는 임상전 및 임상 개발을 위한 충분한 양으로 완전 합성에 의해 접근가능하고; 이의 구조에서 작용기는 몇몇 상이한 링커 기술에 맞게 개조될 수 있다.
- [0298] 접합 연구에 사용되는 사이토라이신을 상기 나타낸 일반적인 구조(화학식 IV)로부터 선택하였다. 이러한 구조는 상이한 암 세포주에 대항하는 활성을 나타낸다(nM 내지 pM 범위).

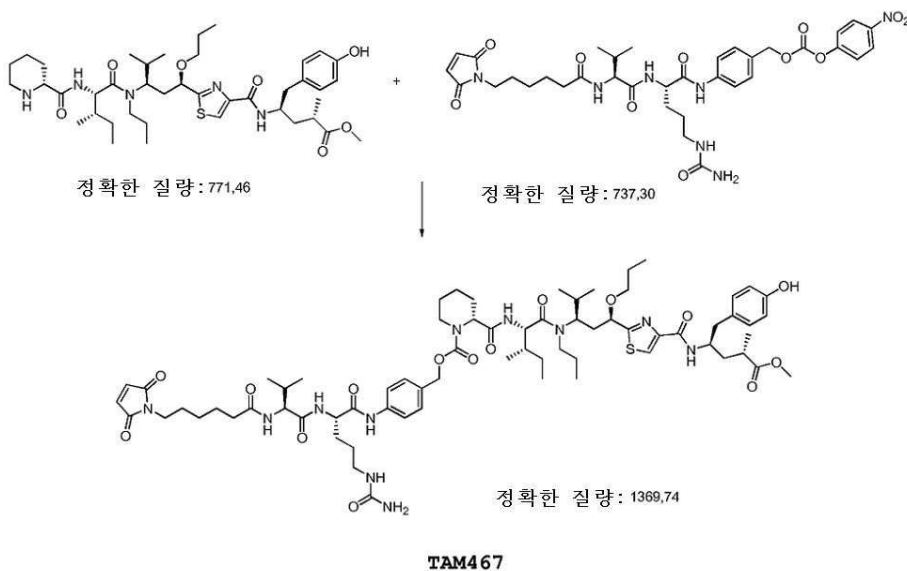
[0299] 다양한 링커 시스템이 사용되고 분자의 R² 또는 R¹⁷ 위치에 부착될 수 있다.

[0300] vcPABA 링커 및 항-FAP 항체를 포함하는 사이토라이신 접합체의 일반적인 개요는 도 11에 나타낸다(도 11에 도시된 구조에서, vcPABA 링커에 대한 사이토라이신의 부착 부위는 위치 R₁ 또는 R₄이고, 도 11에서 사용된 R₁ 및 R₄ 번호 체계는, 예를 들면, 청구항에서 사용된 R기 번호 체계와 상이하고; 도 11의 R₁이 청구항에서 R²에 상응하고, 도 11의 R₄가 청구항의 R¹⁷에 상응하는 것이 의도된다).

[0301] vcPABA(발린-시트룰린-PABC) 프로테아제-절단 가능한 링커는 ADC 분자 브렌투시맙 베도틴(Brentuximab Vedotine)에서 이미 사용되었고, 이는 시애틀 제네틱스 앤드 타케다(Seattle Genetics and Takeda)에 의해 개발되고, 최근 FDA 및 EMEA에서 아세트리스(Adcetris)(등록상표)로 승인되었다(각각 2011년, 및 2012년 11월). 당해 ADC에서 vcPABA는 mAb(cAC10 항-CD30 항체)에서 티올-기반 접합을 위하여 말레이미드 카프로일에 이의 유리 NH₂에서 커플링되었다. 다른 측면에서, vcPABA는 시애틀 제네틱스(Seattle Genetics)(MMAE)로부터의 아우리스타틴 세포독성 약물에 이의 COOH를 통해 접합되었다(49 참조)

[0302] 본 발명자들은 당해 링커(말레이미드 카프로일-vcPABA)를 사용하여 말레이미드 카프로일과의 티올-기반 반응을 통해 항-FAP 항체에 접합시키고, 다른 말단에서, 사이토라이신 세포독성 분자에 이의 환형 피페피딘을 통해 vcPABA로 접합시켰다(도 11에 도시된 사이토라이신의 R1 또는 R4 위치).

[0303] 말레이미도-val-cit-PABOCO-튜블라이신/사이토라이신-TAM461의 합성:



[0304]

[0305] TAM461(튜블라이신/사이토라이신): 30.0mg(0.041 mmol)

[0306] DMF: 3 mL

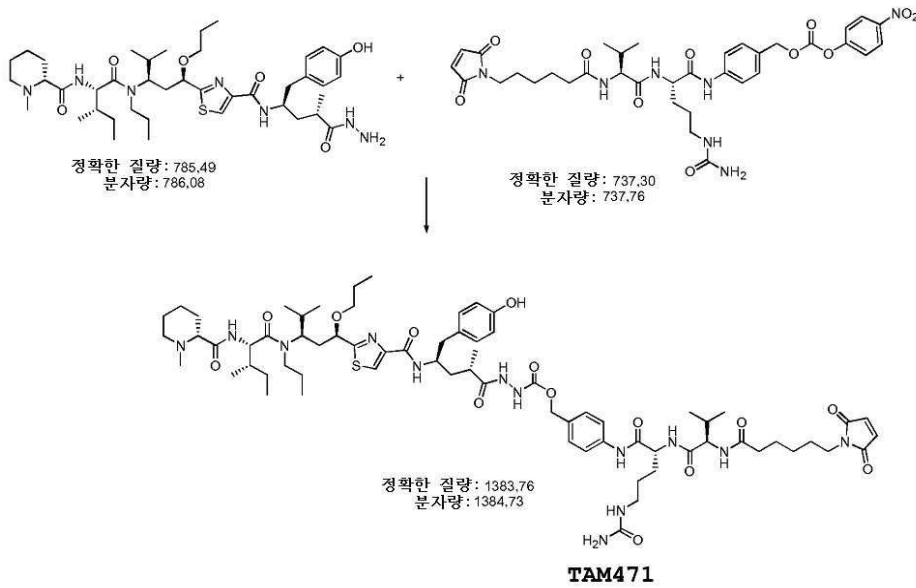
[0307] TAM465(링커): 35mg(0.045 mmol)

[0308] HOBt: 1.4mg

[0309] DIPEA: 10 μ l

[0310] TAM461 및 TAM465를 건조 조건 하에 무수 DMF 중에 용해시키고, 수득된 용액을 HOBt 및 DIPEA로 처리하였다. 반응물을 실온에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 수득된 오일을 2 내지 6% 메탄올:DCM을 사용하는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 TAM467 35mg(64%)을 백색 고체로서 수득하였다. ESI-MS: m/z = 1371 [M+H].

[0311] 말레이미도-val-cit-PABOCO-튜블라이신/사이토라이신-TAM470의 합성:



[0312]

[0313] TAM470(튜블라이신/사이토라이신): 0.07 mmol

[0314] DMF: 5 mL

[0315] TAM466(링커): 50mg(0.065 mmol)

[0316] HOBt: 2.4mg

[0317] DIPEA: 18 μ l

[0318] TAM470 및 TAM466을 건조 조건 하에 무수 DMF 중에 용해시키고, 수득된 용액을 HOBt 및 DIPEA로 처리하였다. 반응물을 실온에서 18시간 동안 교반한 다음, TLC로 분석하고, 이는 반응 완료를 지시하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 수득된 오일을 4 내지 12% 메탄올:DCM을 사용하는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 TAM471 56mg을 수득하였다(수율: 62%). ESI-MS: 1384.6 [M+1].

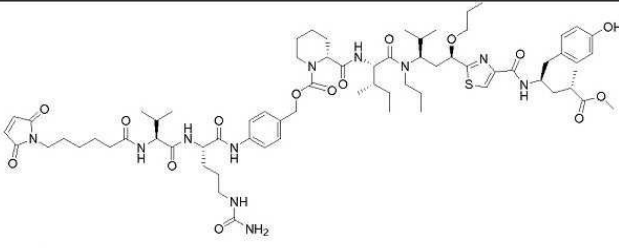
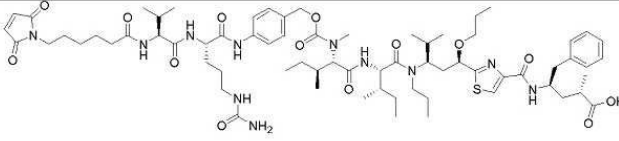
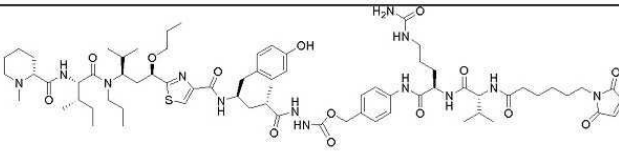
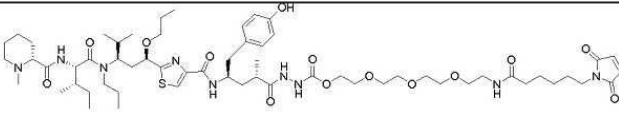
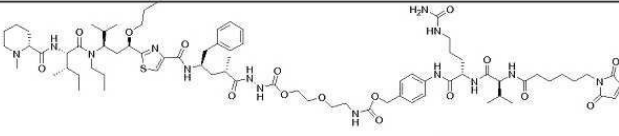
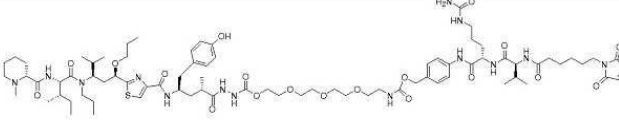
[0319] 시험관내 활성 시험을 수행하였다. 작용 활성은 미소관 억제 검정을 통해 평가할 것이고, 세포독성 활성은 크리스탈 바이올렛 생존능 검정을 통해 측정한다.

[0320] 사이토라이신-링커 유도체의 생성

[0321] 상이한 사이토라이신-링커 유도체를 11에 나타낸 일반적인 구조에 따라 합성하였고, 여기서 vcPABA 링커를 위치 R1(TAM467, TAM551) 또는 R4(TAM471, TAM553, TAM558)에, 단독으로 또는 에틸렌-글리콜 스페이서(EG; n=1 내지 3)와 함께, 가하거나 에틸렌 글리콜 기(n=3)(TAM552)로 치환하였다. 각각의 화학 구조를 표 4에 나타낸다.

표 4

사이토라이신-링커 유도체의 화학 구조

생성물	코드	분자량
	TAM467	1370.7
	TAM551	1356.7
	TAM471	1384.7
	TAM552	1198.5
	TAM553	1499.8
	TAM558	1603.9

[0322]

[0323]

각각의 신규한 유도체의 미소관 억제 활성 및 세포독성 활성을 튜블린 중합 억제 검정(TPI; 튜블린 중합 검정 키트; Cytoskeleton, Cat. #BK011P), 및 HT1080 세포에서 세포 증식 저지(CPA; 크리스탈 바이올렛)를 통해 평가하였다. IC₅₀을 계산하고, 결과를 표 5에 나타낸다.

표 5

[0324]

사이토라이신-링커 유도체의 미소관 억제 활성 및 세포 세포독성 활성. (ND: 측정되지 않음)

화합물	IC ₅₀ (TPI 검정; μM)	IC ₅₀ (CPA 검정; nM)
TAM467(R1에서 링커)	150	230-420
TAM551(R1에서 링커)	ND	90
TAM471(R4에서 링커; vcPABA)	14	17-42
TAM552(R4에서 링커; vcPABA 없음; 3EG)	1.9	10
TAM553(R4에서 링커; vcPABA; 1EG)	6	98
TAM558(R4에서 링커; vcPABA; 3EG)	1.9	98
TAM334(모 사이토라이신; 링커 없음)	2	0.3-0.6

튜블라이신 A	ND	0.04-0.2
튜블라이신 A + 링커	ND	5-20
MMAE(시아틀 제네틱스)	ND	0.1-0.6
DM1-DM4(면역원)	ND	0.01-0.1

[0325] 모 사이토라이신 TAM334의 시험관내 활성은 아우리스타틴(MMAE) 또는 메이탄시노이드(DM1-DM4)과 같은 항체-약물 접합체의 발생에 최근 사용되는 다른 페이로드의 동일한 범위에 속한다. 튜블라이신 A 패밀리로부터 다른 화합물에 대하여 예상되고 미리 기재된 바와 같이, 링커 첨가 시, 사이토라이신의 세포 세포독성 활성은 모 화합물 TAM334에 대하여 감소하였다. 추가로, TAM467 유도체는 두 검정 모두에서 유의미하게 가장 낮은 활성을 나타냈다. 모든 유도체를 접합에 사용하여 ADC 분자를 생성하였다.

[0326] 접합 및 ADC의 화학적 특성규명

[0327] 각각의 신규하게 생성된 유도체를 시스테인 잔기에 비-부위-특이적 접합 방법에 따라 항-FAP hu36에 접합시켰다. 이러한 목표를 위하여, 1 배치의 항체를 감소시키고 각각의 유도체와 반응시켰다. 상이한 TCEP 비율을 3 내지 4의 최적 DAR, 유리 항체 및 약물 10% 미만에 도달할 때까지 시험하였다. 최적 접합 조건은 다음과 같았다: TCEP=2.5 및 3.57 티올 수준 엘만 시약. 그 다음, 접합체를 G25 세파덱스(Sephadex)에서 정제하고 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 통해 분석하여 이의 순도를 측정할 뿐만 아니라 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 및 중합체성 액체 역상 크로마토그래피(PLRP)로 DAR, 유리 항체의 함량 및 상이한 ADC 종의 분포 프로파일(0 내지 8 약물/mAb)을 측정하였다. 유리 약물의 함량을 280 nm에서 UV 검출 방법으로 평가하였다. 화학적 분석(SEC, HIC 및 PLRP 프로파일)의 결과를 각각의 ADC 및 유리 항체(제시 생략)에 대하여 측정하였다. ADC의 생화학적 특성을 표 6에 나타낸다.

표 6

상이한 ADC 분자의 화학적 특성의 요약

로트	약물	mAb 농도	HIC 유리 mAb	DAR	SEC 순도 280 nm	유리 약물	용적
HPS157-039-001	TAM471	1.195 mg/mL	10.1%	3.38	92%	0%	~5.8 mL (6.931 mg)
HPS157-039-002	TAM551	1.332 mg/mL	22.4%	3.08	74%	0%	~5.8 mL (7.726 mg)
HPS157-039-003	TAM552	1.319 mg/mL	5.1%	3.84	97%	0%	~5.8 mL (7.650 mg)
HPS157-039-004	TAM553	1.305 mg/mL	7.0%	4.10	84%	0%	~5.8 mL (7.569 mg)
HPS157-039-005	TAM558	1.332 mg/mL	5.8%	3.92	93%	0%	~5.8 mL (7.726 mg)

[0328]

[0329] 다양한 약물은 상이한 수준의 응집을 생성하였다. 특히 ADC HPS157-039-002(TAM551)는 DAR=3.08에서 이미 가장 높은 수준의 응집을 보였고, 접합되지 않은 항체 22.4%를 남겼다. TAM467과의 예비 접합은 또한 높은 수준의 응집을 보여주었다: DAR 3.27에서, SEC 순도는 이미 67%, 유리 약물 16%였다(데이터는 제시 생략). 이러한 데이터는 위치 R1에서 vcPABA 링커가 이러한 조건 하에 이러한 유형의 사이토라이신 분자에 대하여 최적보다 명백하게 낮은 것을 제시하였다.

[0330] 접합체의 표적 결합

[0331] huFAP 융합 단백질에 대한 항-FAP hu36:TAM471 ADC 결합을 ELISA로 분석하고, HT1080-FAP 세포에 대한 결합을 FACS로 분석하였다(도 15). FACS 분석을 위하여, 화합물을 계열 희석(도 15b) 또는 1회 희석(도 15c; 10nM)으로 배양하고 항-인간 IgG-PE(γ쇄 특이적)로 검출하였다.

[0332] 두 검정에서 획득된 EC₅₀ 값은 네이키드 항-hu/moFAP hu36 항체에 대하여 유의미한 차이를 나타내지 않았다(도 15a 및 도 15b). FAP(-) 세포, 예를 들면, HT1080-wt 및 HEK293 세포에서 결합이 관찰되지 않았다(도 15c).

[0333] 도 16은 네이키드 항-FAP 항체(도 16A)와 유사하게, ADC-471(도 16B)이 특이적으로 결합하고 HT1080-FAP 세포에서 90분 후 완전하게 내재화되는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 접합이 항-FAP hu36 IgG1의 표적 특이성 및

친화력, 또는 내재화 능력에 영향을 미치지 않는 것을 입증하였다.

[0334] **실시예 6 - 시험관내 세포독성 활성 및 생체내 항종양 효과의 평가**

[0335] 항-FAP:사이토라이신 ADC 후보를 증식 저지 검정(크리스탈 바이올렛 염색)을 통해 시험관내 평가하였다. 결과로도 17에 나타내고 표 7의 IC₅₀으로 나타냈다. 각각의 ADC 후보의 항종양 효과를 췌장암의 환자-유래 이종이식(PDX) 마우스 모델에서 평가하였다(PAXF-736). 당해 모델을 FAP 발현 수준 및 기질 확장에 대하여 미리 선택하였다. ADC 화합물을 매주 1회 2.5 mg/kg으로 복강내 투여하였다. 종양 용적 및 체중을 매주 2회 측정하였다. 비히클-처리된 및 켈시타빈-처리된(150 mg/kg) PDX 마우스를 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하였다. 결과로도 18에 나타낸다.

[0336] R1 위치(ADC-551)에서 vcPABA 링커 단독의 위치는 R4 위치(ADC-471)를 이용하는 접합체와 비교하여 훨씬 적은 생체내 세포독성 활성을 갖고(도 17; 표 7), 생체내 항종양 활성을 갖지 않는(도 18) 접합체를 생성하였다.

[0337] R4 위치에서 vcPABA 링커에 대한 스페이서로서 에틸렌-글리콜 기의 수의 증가(ADC-471(n=0) 대 ADC-553(n=1) 및 ADC-558(n=3))는 시험관내 FAP-특이적 세포독성 활성(도 17) 및 생체내 항종양 효과(도 18)를 증가시키는 것으로 나타났다. 3개의 에틸렌 글리콜 스페이서를 갖지만 링커에 vcPABA가 존재하지 않는 TAM552 접합체(ADC-552)는 최소의 생체내 항종양 활성을 나타내거나 나타내지 않는 것으로 확인되었다(데이터는 나타내지 않음). ADC-471 및 ADC-553은 HT1080-WT와 FAP 세포 사이에서 차이 없이 낮은 FAP-특이적 세포독성 활성을 나타내거나 나타내지 않거나(각각 10nM 및 100nM IC₅₀ 범위), 생체내 항종양 효과를 나타내지 않고, ADC-558은 FAP(+)와 FAP(-) HT1080 세포 사이에서 500의 특이성 비율로 1nM 범위 FAP-특이적 세포독성 활성, 및 췌장암의 PDX 마우스 모델 2.5 mg/kg 용량에서 40% 종양 성장 억제 효과를 나타냈다. 중량 손실이나 독성 효과는 당해 용량에서 어떠한 후보에서도 관찰되지 않았다(제시 생략).

표 7

증식 저지 검정에서 수득된 IC₅₀ 값(nM)

[0338]

화합물	HT1080-WT	HT1080-FAP
TAM334	1.04	0.77
ADC-471 (HPS-157-039-001)	5.6	10.33
ADC-551 (HPS-157-039-002)	964	552
ADC-553 (HPS-157-039-004)	90	108
ADC-558 (HPS-157-039-005)	555	0.96

[0339] ADC-558을 사용하여 추가의 조사를 수행하였다. 최대 내약 용량(MTD)을 정상 마우스에서 수행하고, ADC-558은 3주 동안 매주 치료 하에 2.5 내지 25 mg/kg 용량 범위에서 비독성인 것으로 확인되었다. 그 다음, 20, 10 및 5 mg/kg으로부터의 용량을 높은 FAP 발현 수준 및 기질 확장의 PDX 마우스 모델(Panc185)에 4주 동안 매주 투여하여 ADC-558 접합체의 종양 성장 억제 및 완전한 퇴행 효능을 확인하였다.

[0340] 각각의 개별적인 문헌 또는 특허 또는 특허 출원이 특정하게 개별적으로 그 전문이 참조로서 인용되는 것으로 지시되는 바와 동일한 정도로, 본 명세서에 기재된 모든 문헌은 그 전문이 참조로서 모든 목적을 위하여 본 명세서에 인용된다.

[0341] 본 명세서에 기재된 특정한 실시형태는 제한의 방식이 아닌 예시의 방식으로 제공된다. 본 명세서에서 임의의 부제목은 오직 편의를 위하여 포함된 것이고 어떠한 방식으로든 기재내용을 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

[0342]

참조문헌

1. Weinberg, R.A., et al., Garland science, Taylor & Francis Group LLC, New York, NY, USA, 2007
2. Nieman, K.M., et al., Nat. Med., 2011, 17: 1498-1503
3. Joyce, J.A., et al., Nat. Rev. Cancer, 2009, 9: 239-252
4. Hanahan, D., et al., Cancer Cell, 2012, 21: 309-322
5. Gupta, G.P., et al., Cell, 2006: 127: 679-695
6. Valastyan, S., et al., Cell, 2011, 147: 275-292
7. Meads, M.B, et al., Nat. Rev. Cancer, 2009, 9: 665-674
8. Olive, K.P., et al., Science, 2009, 324: 1457-1461
9. Acharyya, S., et al., Cell, 2012, 150: 165-178
10. Crawford, Y., et al. Cancer Cell, 2009, 15: 21-34
11. Straussman, R., Nature, 2012, 487: 500-504
12. Joyce, J.A., et al., Cancer Cell, 2005, 7: 513-520
13. Hanahan, D., et al., Cell, 2011, 144: 646-674
14. Kalluri, R., Nat. Rev. Cancer, 2006, 6: 392-401
15. Pietras, K., et al., Exp. Cell Res., 2010, 316: 1324-1331
16. Orimo, A., et al., Cell, 2005, 121: 335-348
17. Erez, N., et al., Cancer Cell, 2010, 17: 135-147
18. Olumi, A.F., et al., Cancer Res., 1999, 59: 5002-5011
19. Yang, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 16472-16477
20. Hwang, R.F., et al., Cancer Res., 2008, 68: 918-926
21. Hu, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 106: 3372-3377
22. Medema, J.P., et al., Nature, 2011, 474: 318-326
23. Malanchi, I., et al., Nature, 2012, 481: 85-89
24. Strell, C., et al., Ups. J. Med. Sci., 2012, 117: 187-195
25. Horimoto, Y., et al., Cell Adhes. Migr., 2012, 6: 193-202
26. Wu, et al., J. Cancer Mol., 2008, 4: 37-45
27. Mersmann M., et al., Int. J. Cancer, 2001, 92: 240-248
28. Brocks B., et al., Molecular Medicine, 2001, 7: 461-469
29. Schmidt A., et al., Eur. J. Biochem., 2001, 268: 1730-1738
30. Messerschmidt, S.K., et al., J Control Release, 2009, 137: 69-77
31. Ostermann E., et al., Clin. Cancer Res., 2008, 14: 4584-4592
32. Shi, M., et al., World J. Gastroenterology, 2012, 28: 840-846.

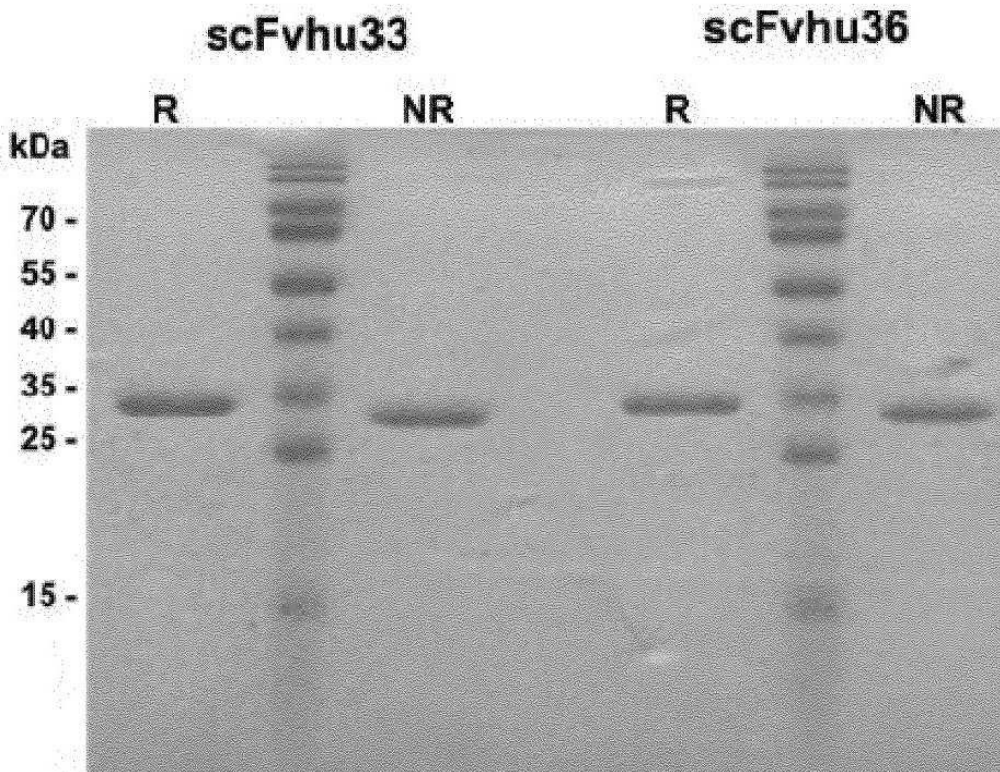
[0343]

33. Muñoz et al., *Cancer Res.*, 2001
34. Trush et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 1996, 14:49-71
35. Lambert et al., 1988,
36. Barbieri, et al., *Methods in Mol. Biol.*, 2001, 166: 71-85
37. Ghetie and Vitetta, *Mol. Biotechnol.*, 2001, 18: 251-286
38. Muñoz R., et al., *Cancer Lett.*, 2007, 256: 73-80.
39. Muñoz R., et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012
40. Thorpe et al., *Cancer Res.*, 1987, 47:5924-5931
41. Fracasso et al., *Mini Rev. Med. Chem.*, 2004, 4: 545-562
42. Marsh et al., "Immunotoxins", Frankel A.E. ed., *Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 1988, 213-237*
43. Riddles et al., *Anal. Biochem.*, 1979, 94:75-81
44. Riener et al., *Anal. Bioanal. Chem*, 2002, 373:266-276
45. Sasse, F., et al., *Journal of Antibiotics*, 2000, 53:879-885.
46. Kaur, G., et al., *Biochem. J.*, 2006, 396:235-242.
47. Schluep, T., et al., *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15:181-189
48. Reddy, J.A., et al., *Mol. Pharmaceutics*, 2009.
49. Gualberto A. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012; 21(2): 205-16
50. Perez-Soler et al., *Clin. Cancer Res.*, 2000, 6: 4932-4938;
51. Yabuchi et al., *Cancer Letters*, 2013

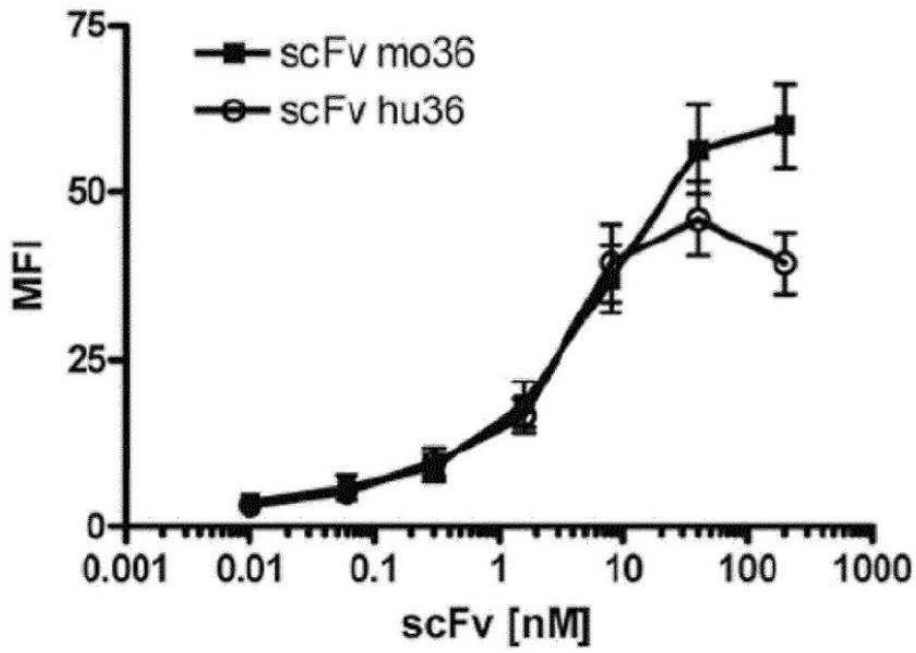
[0344]

도면

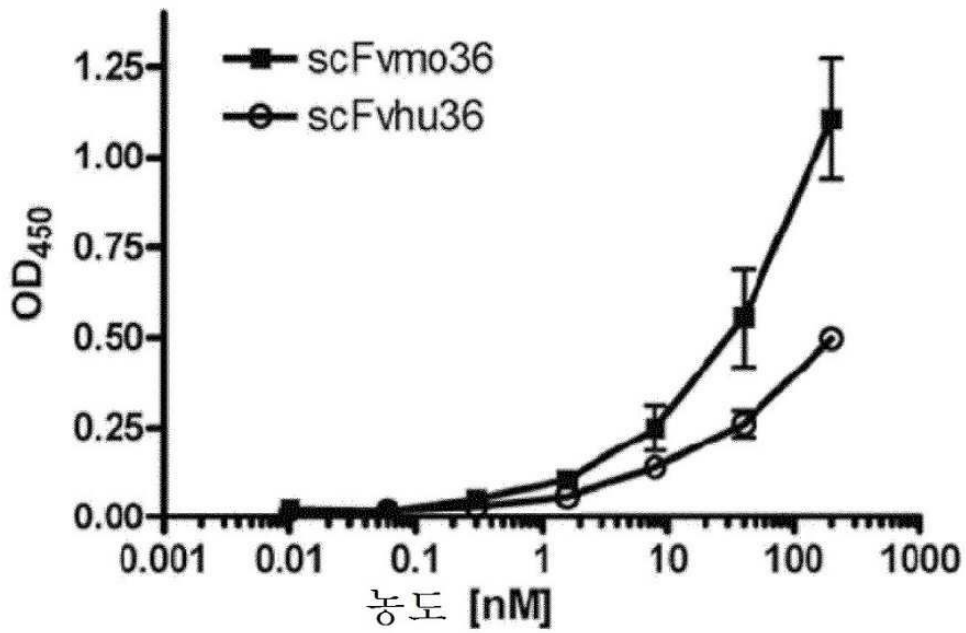
도면1a



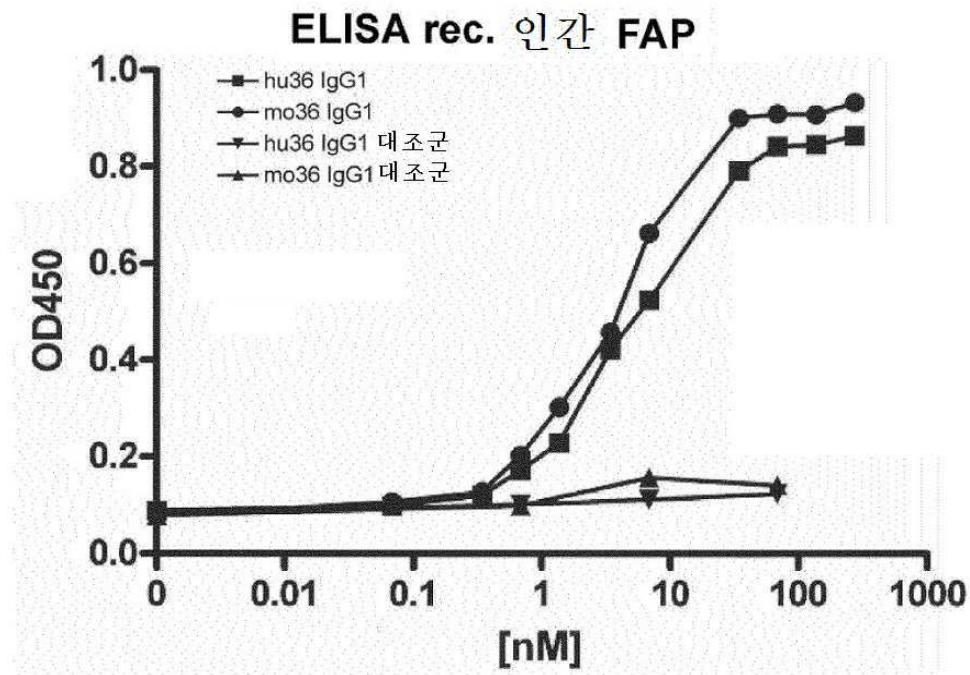
도면1b



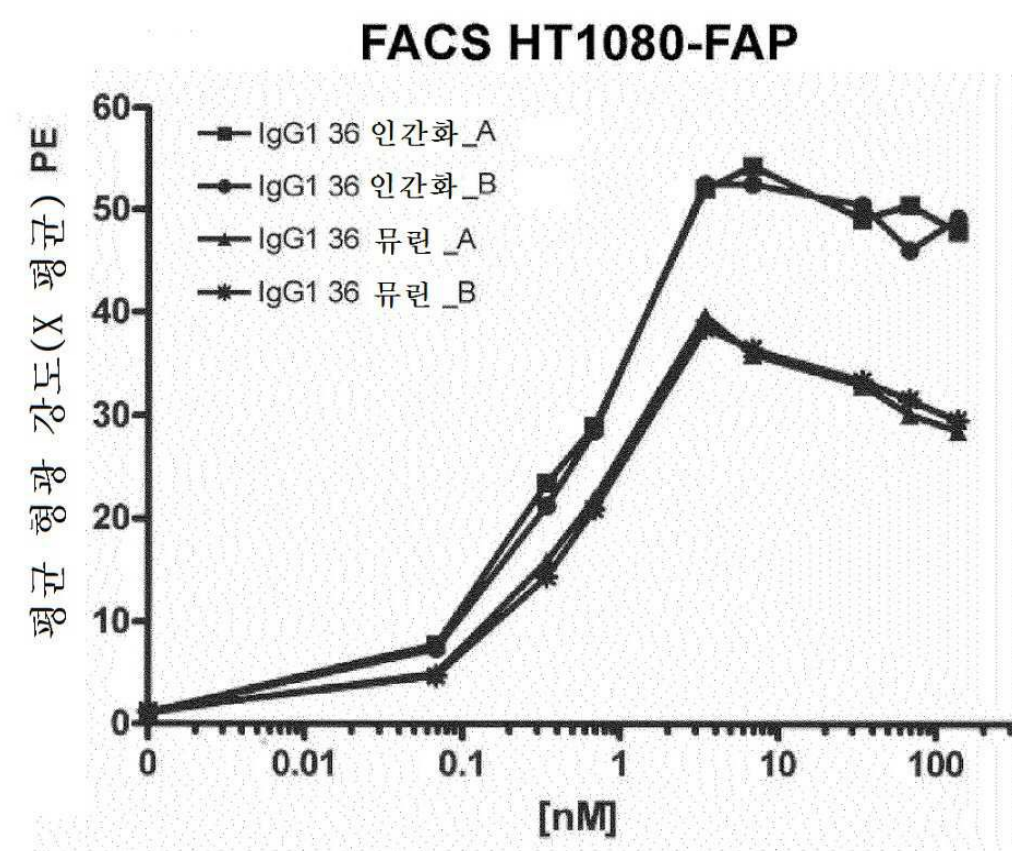
도면1c



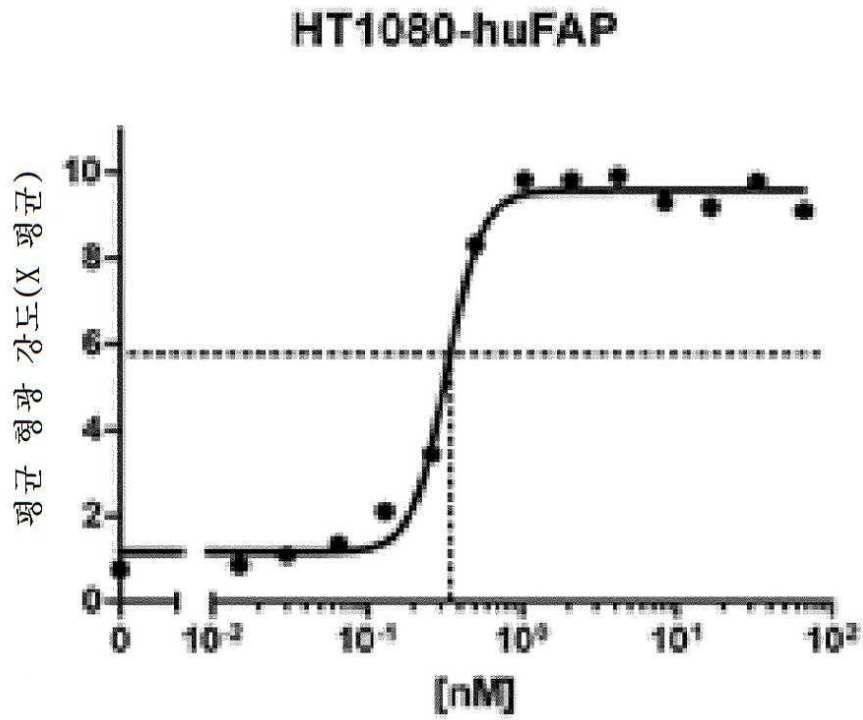
도면2a



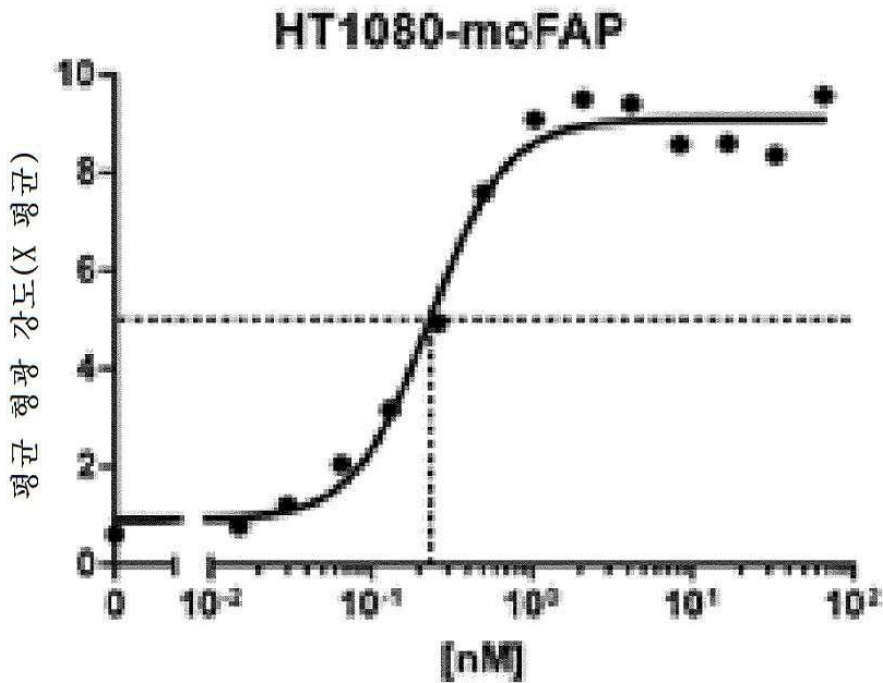
도면2b



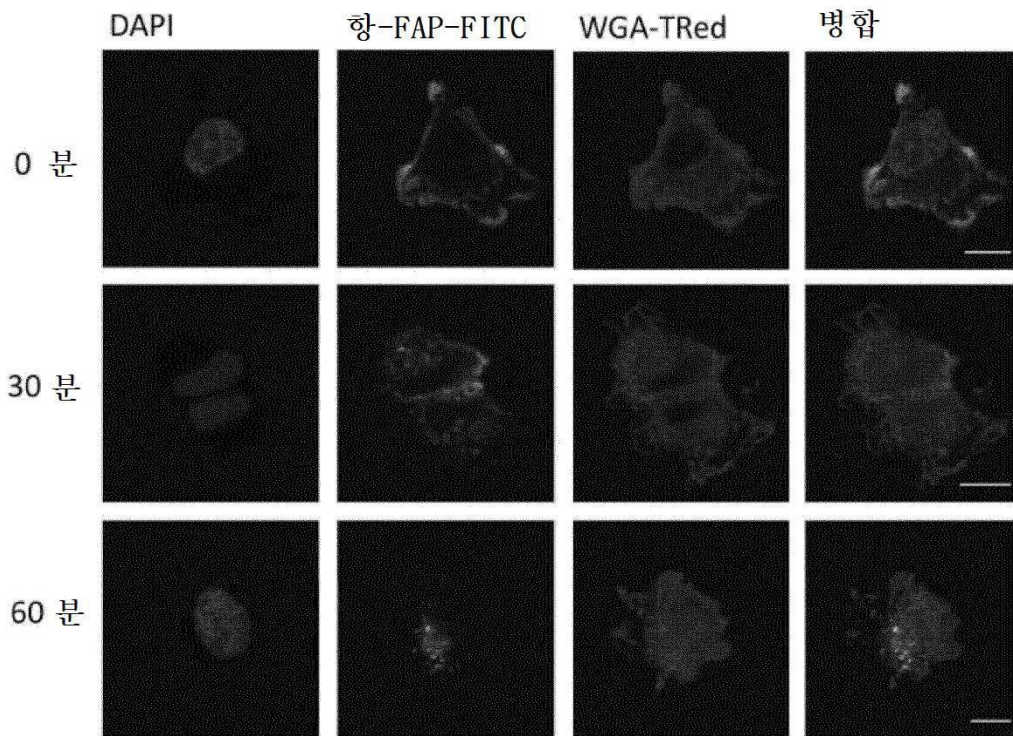
도면3a



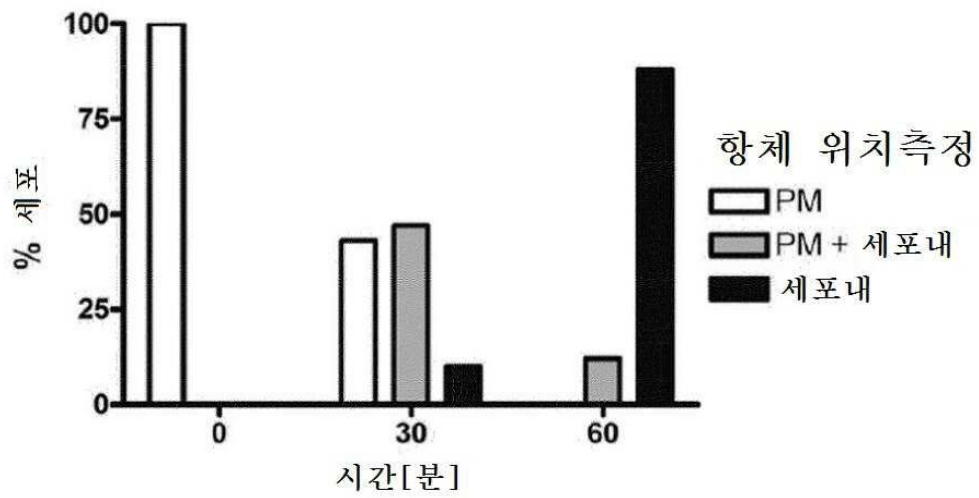
도면3b



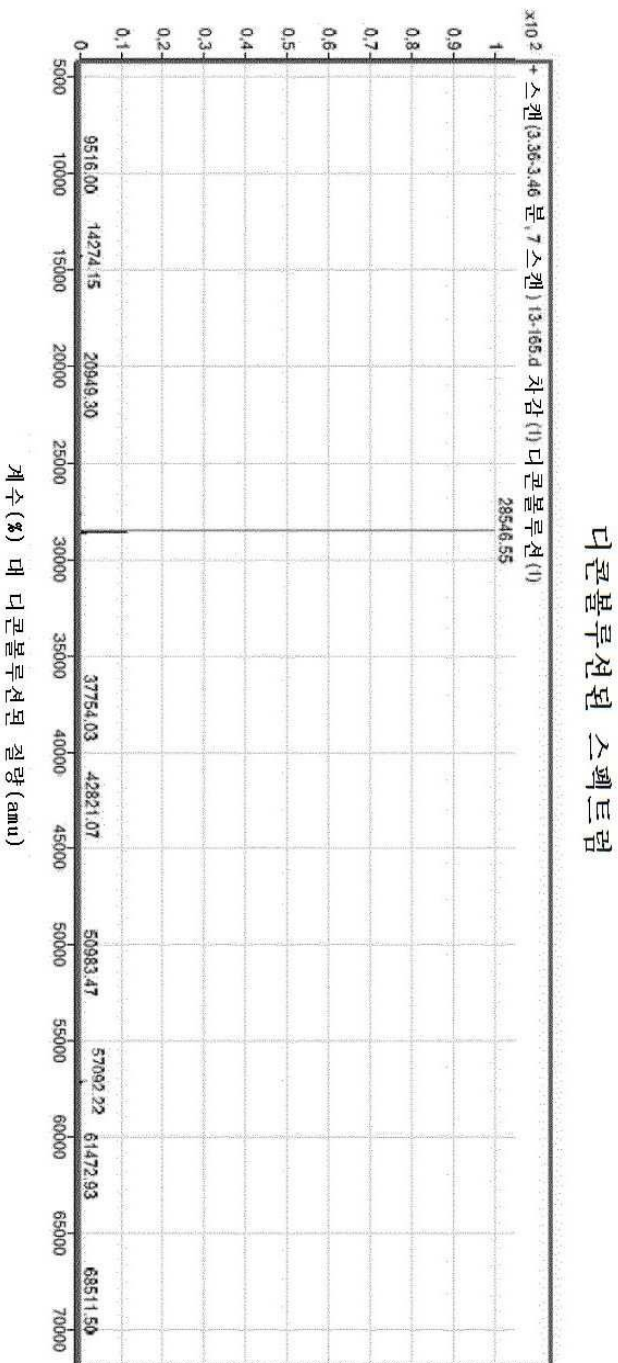
도면4



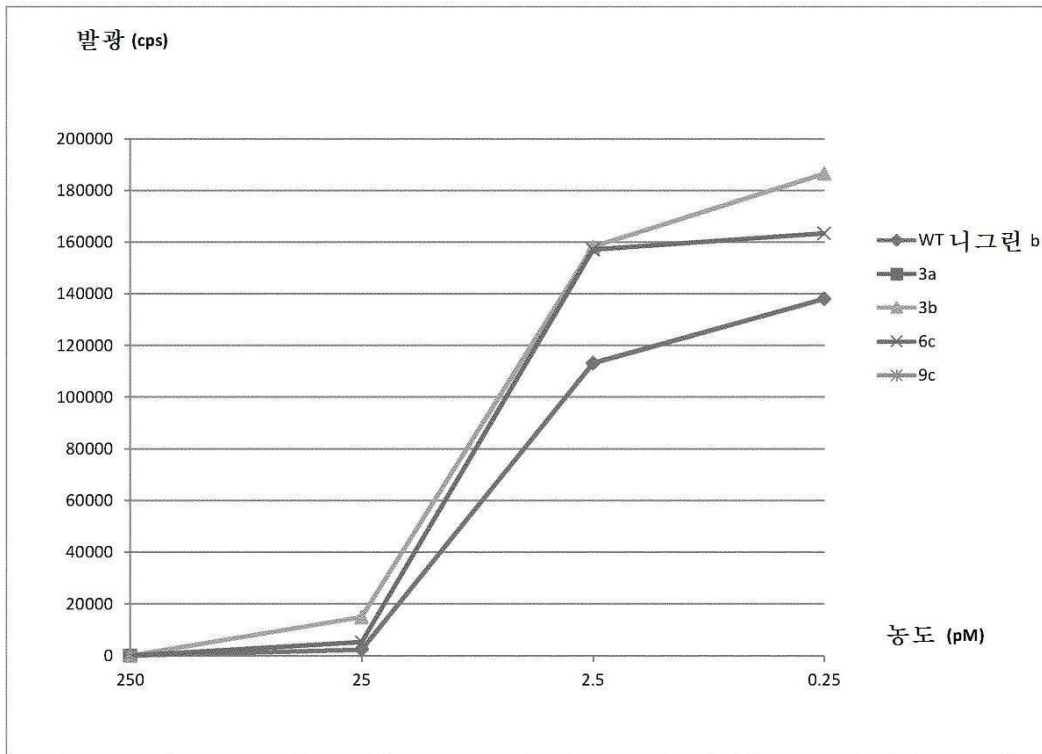
도면5



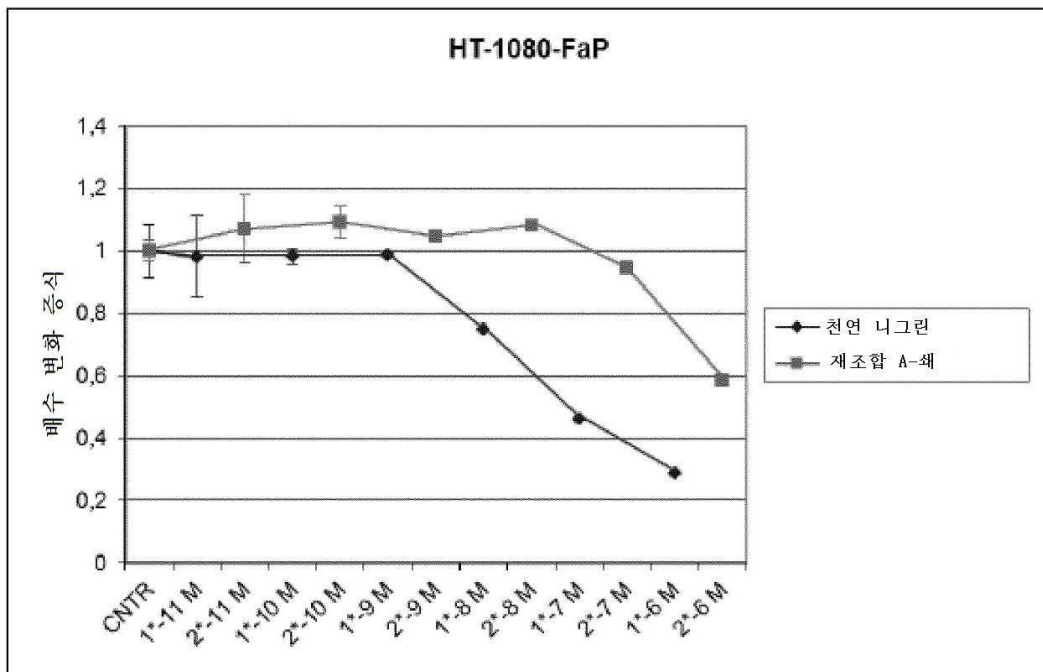
도면6



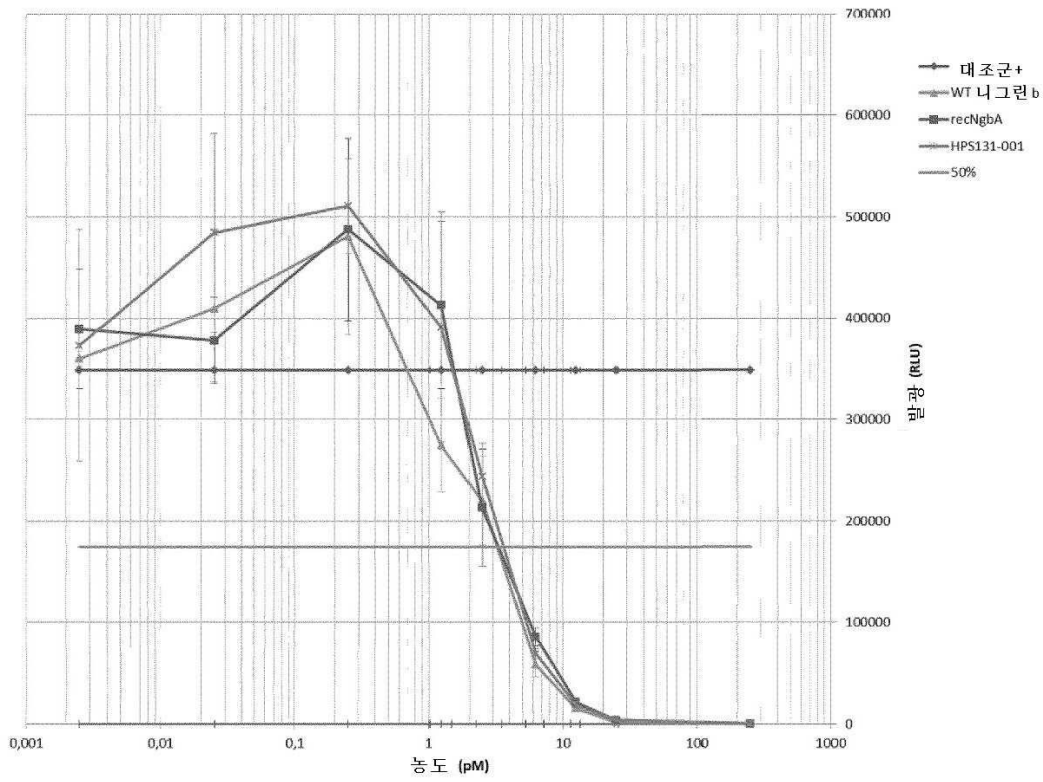
도면7



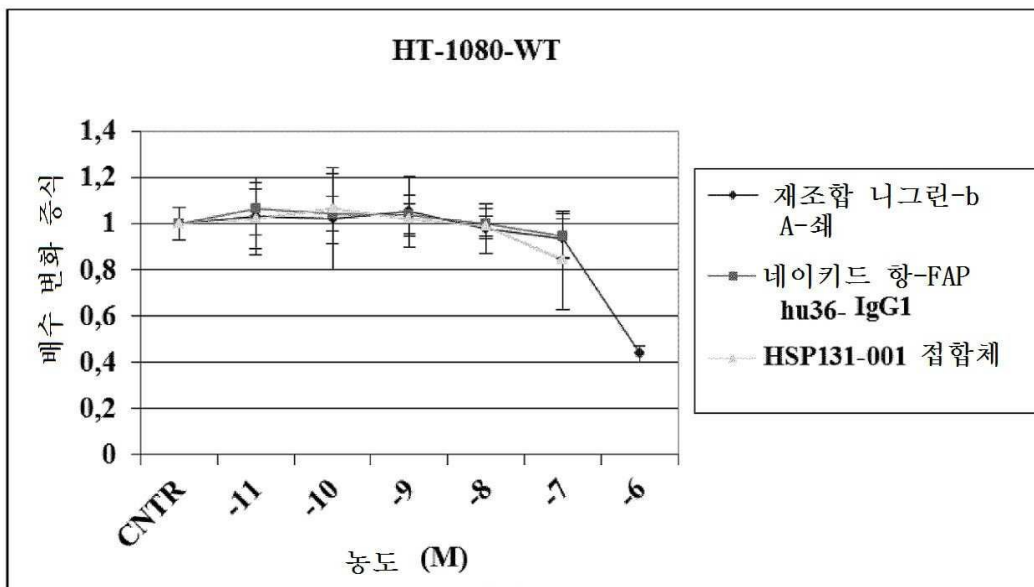
도면8



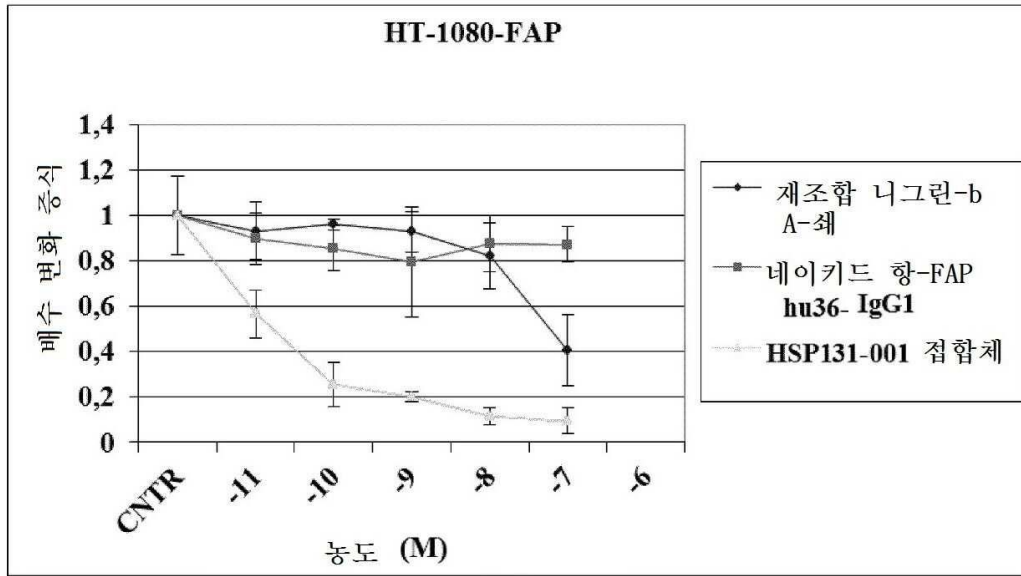
도면9



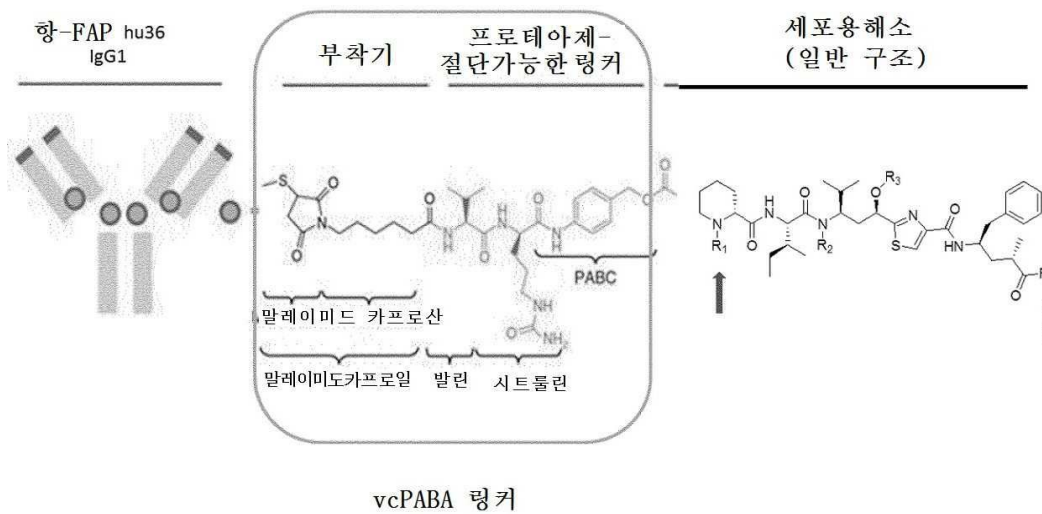
도면10a



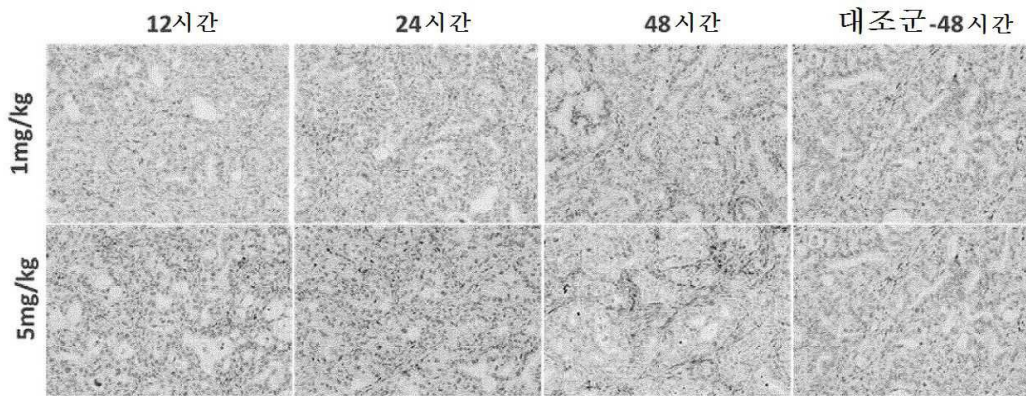
도면10b



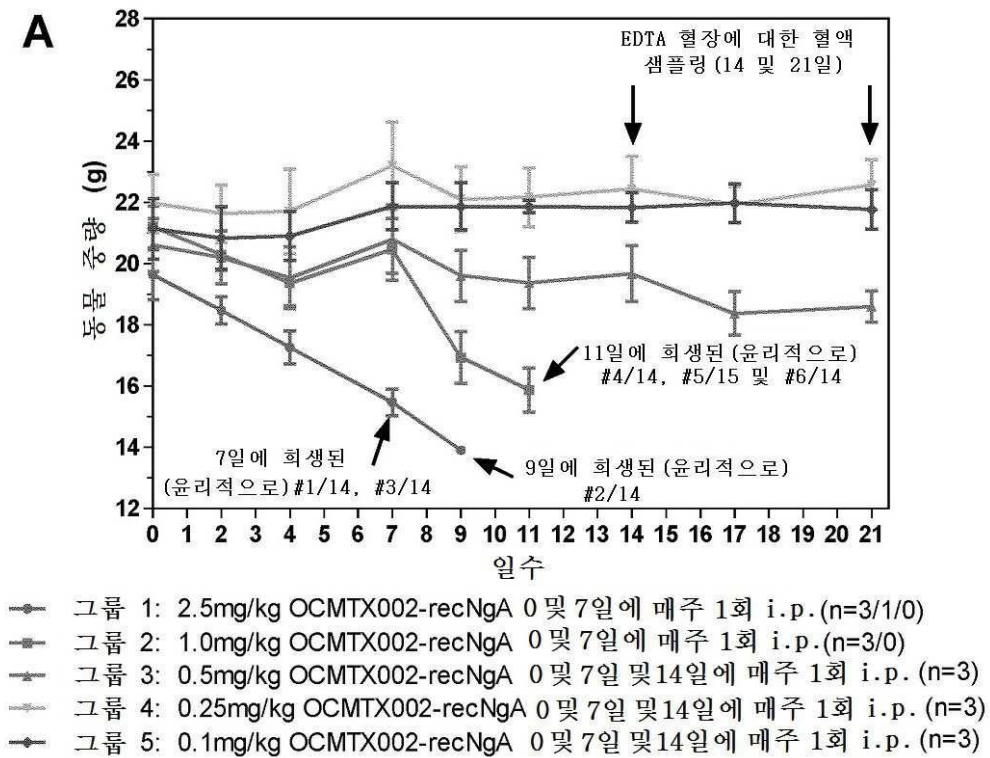
도면11



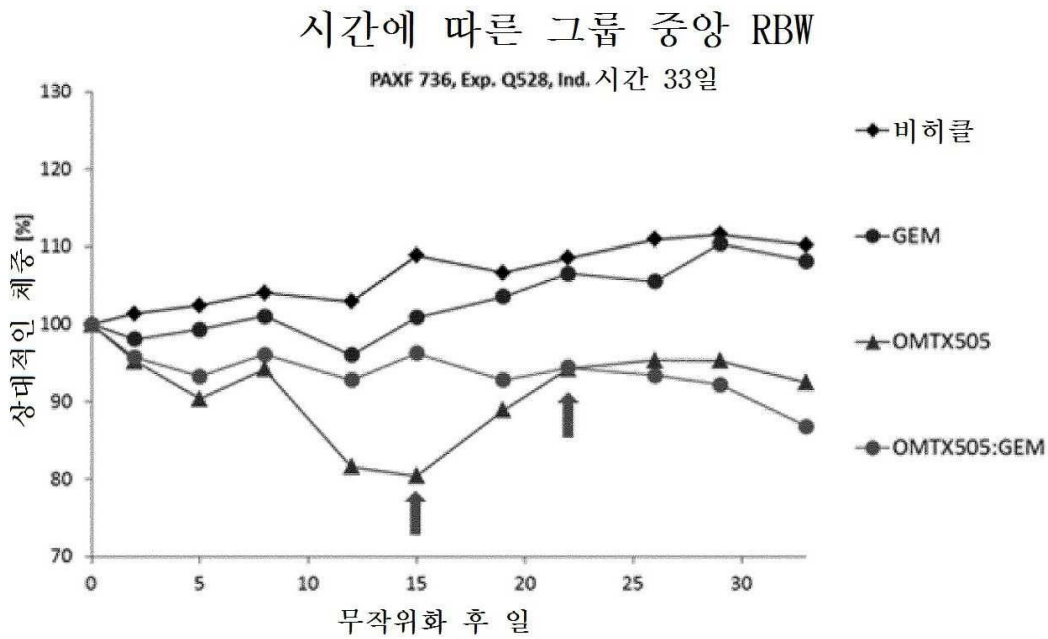
도면12



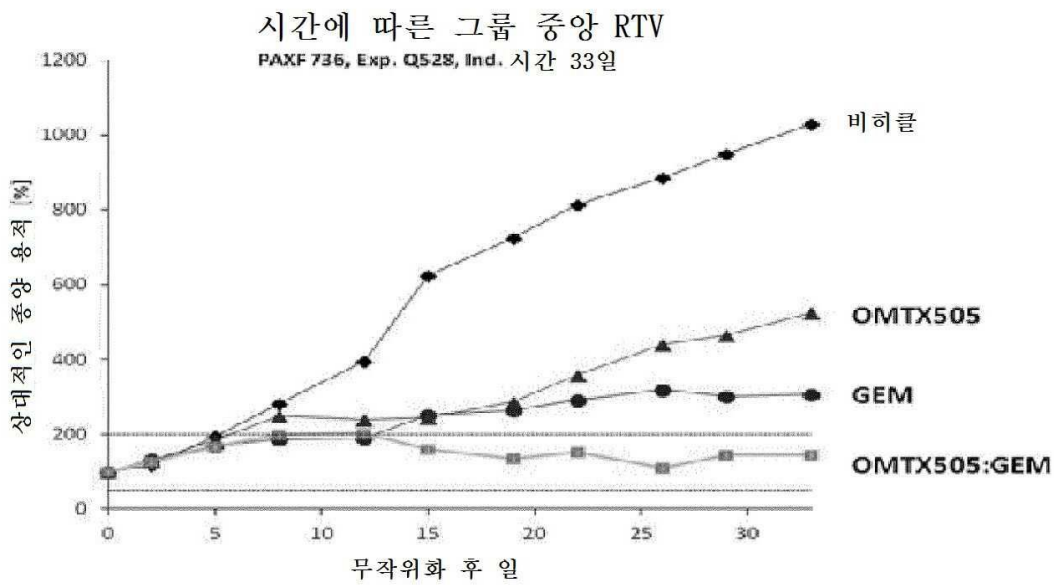
도면13



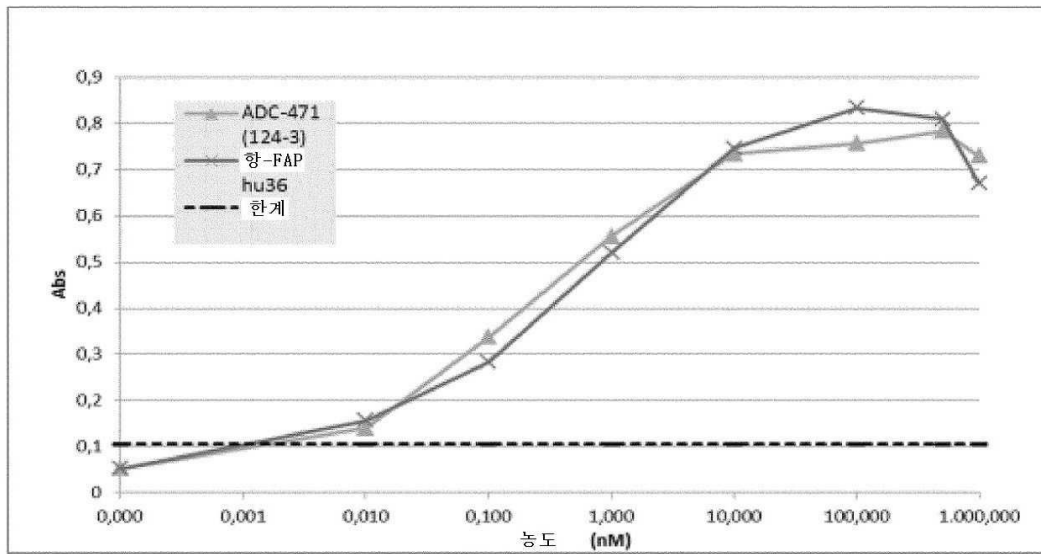
도면14a



도면14b

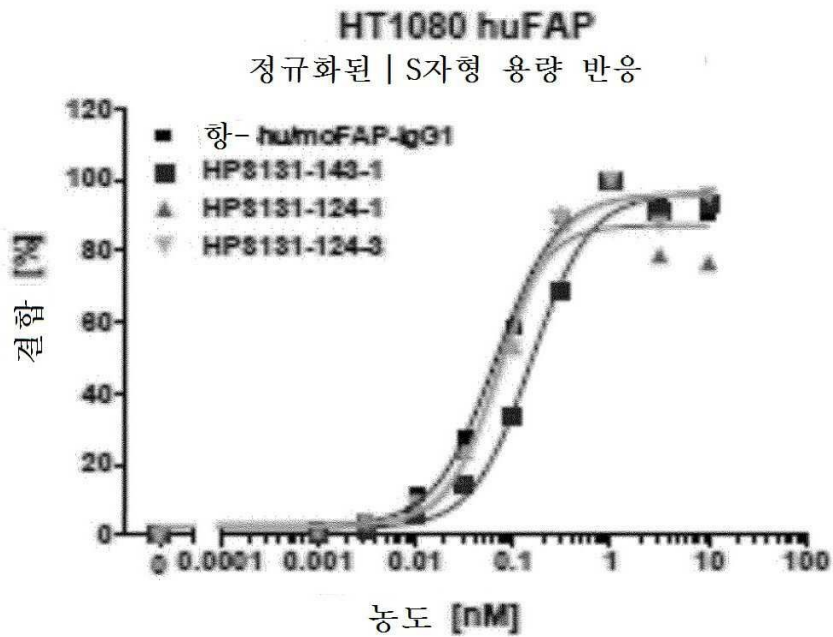


도면15a



EC₅₀ (nM): 0.210 (항-FAP hu36) - 0.153 (ADC-471; HPS124-3; DAR 3.48)

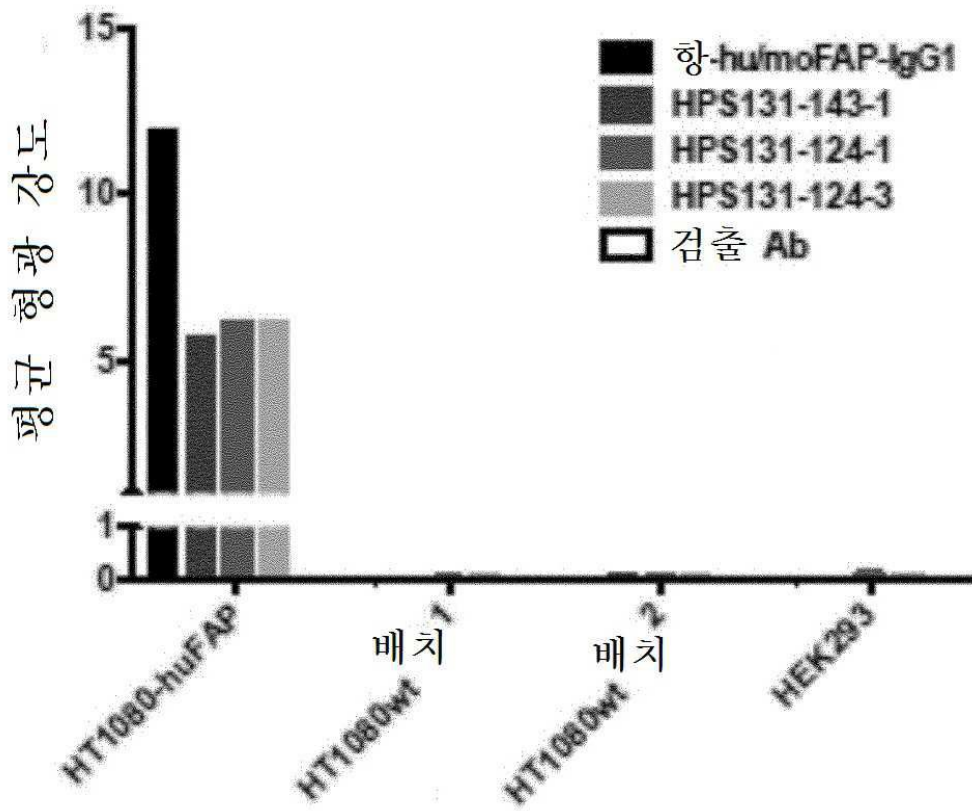
도면15b



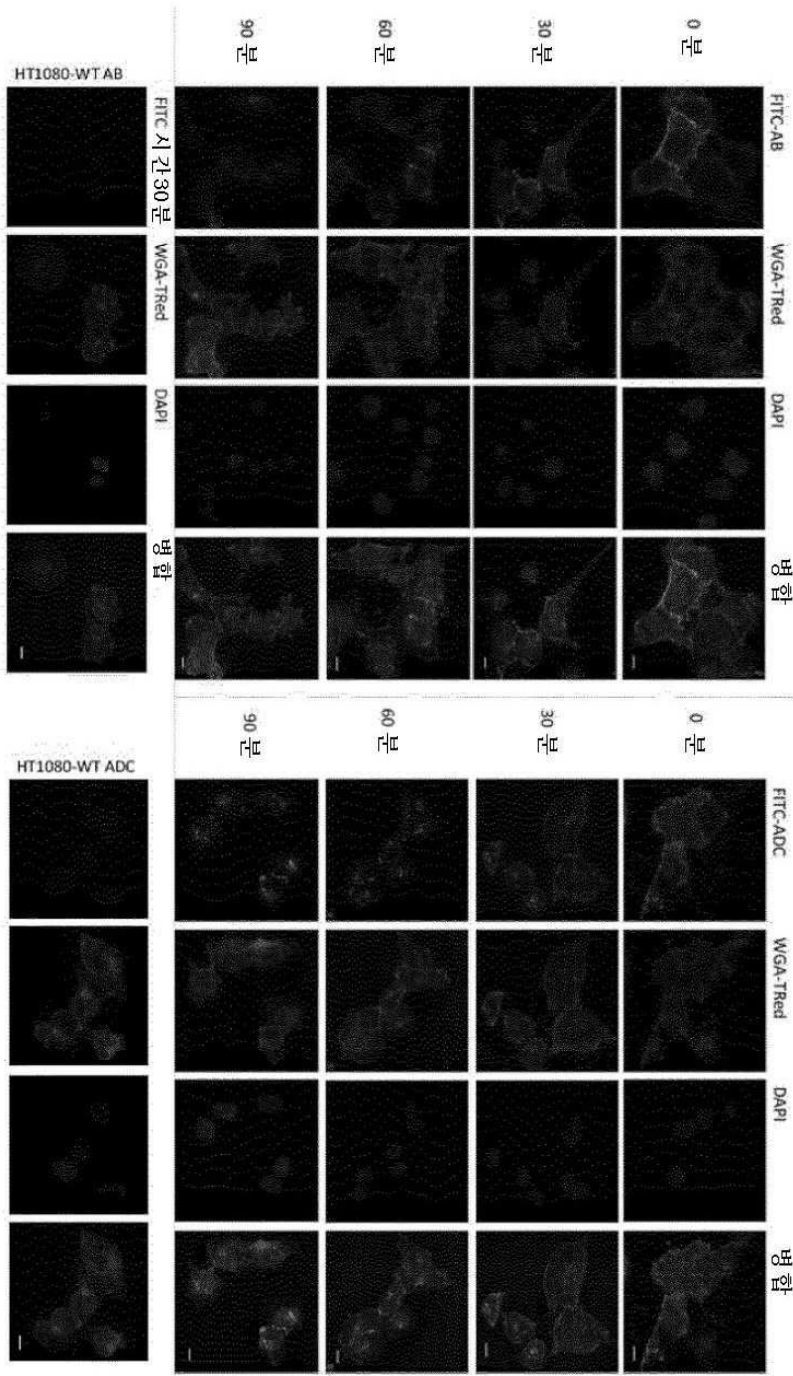
EC₅₀ (nM): 0.067 (항-FAP hu36) - 0.081 (ADC-471; HPS124-3; DAR 3.48)

도면15c

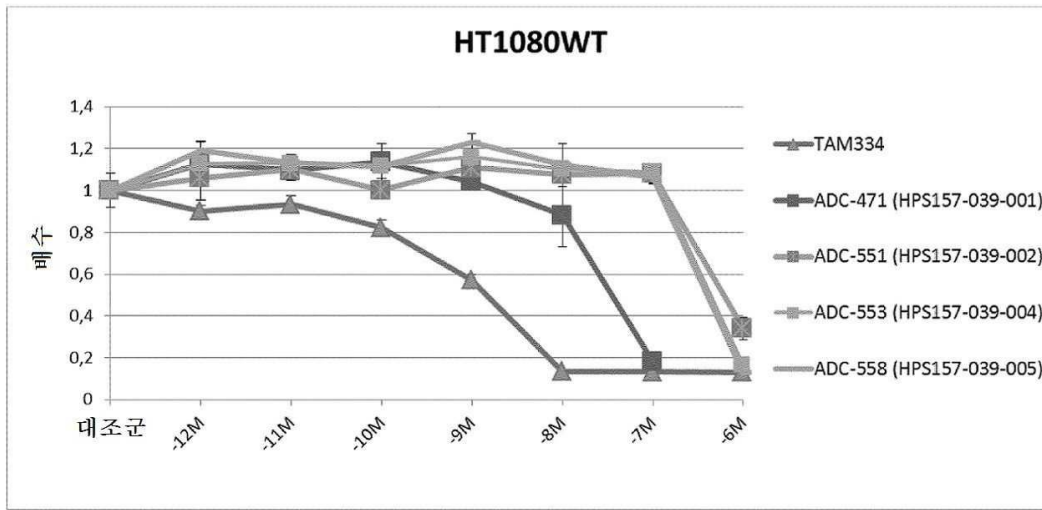
10 nM 항체의 결합



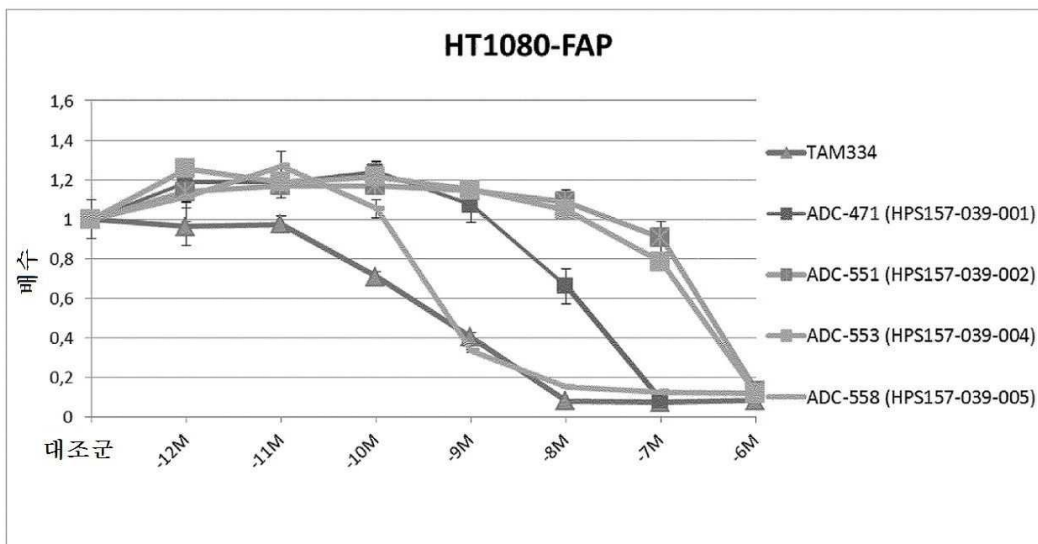
도면16



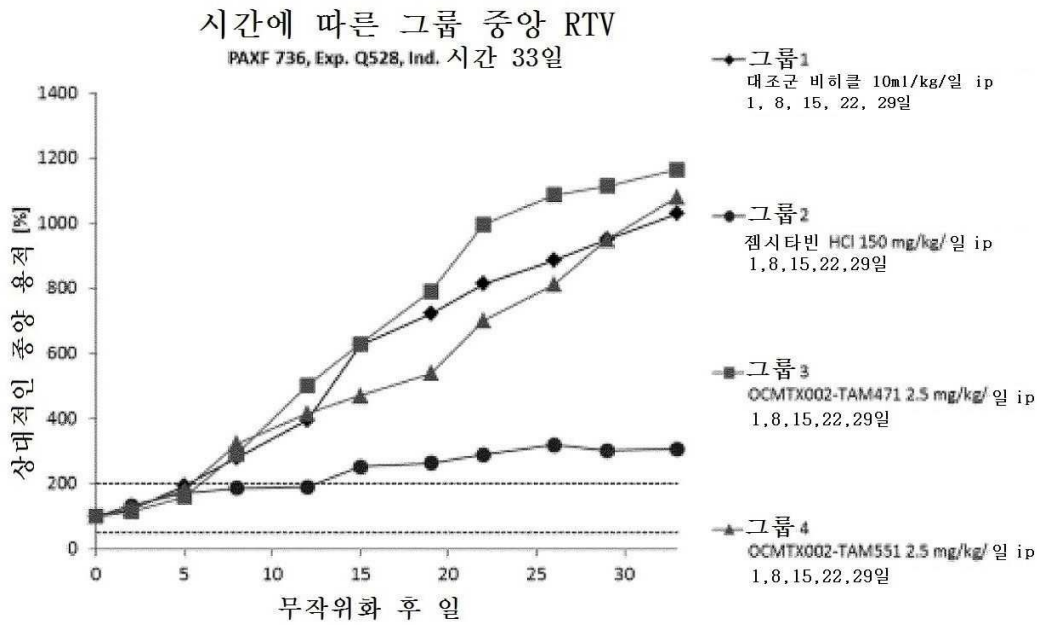
도면17a



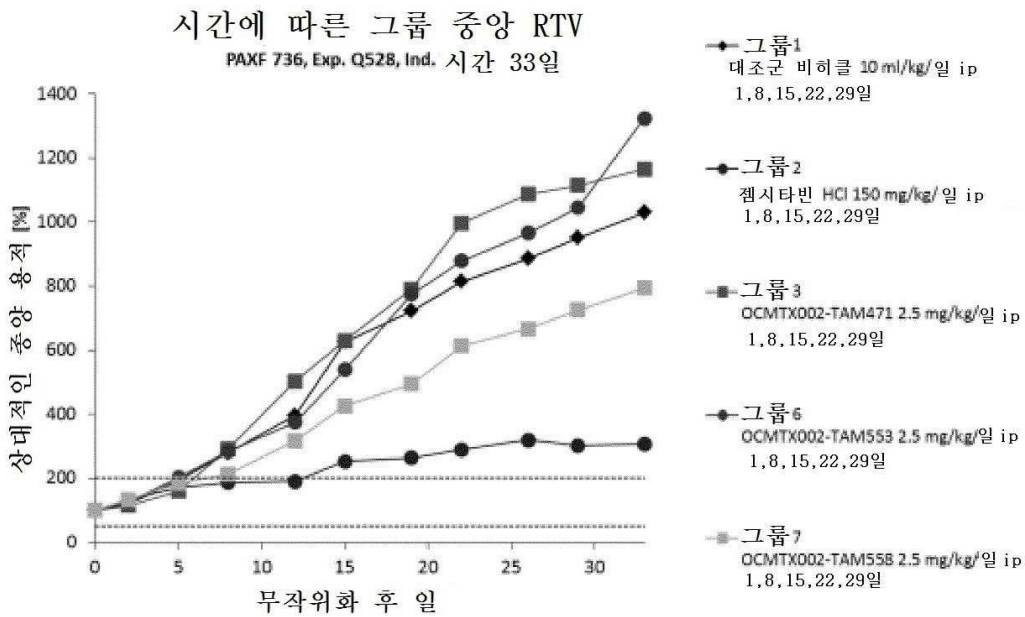
도면17b



도면18a



도면18b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Oncomatrix Biopharma, S.L.

<120> Antibody - Drug Conjugates and Immunotoxins

<130> WO 2015/118030

<140> PCT/EP2015/052341

<141> 2015-02-04

<150> GB 1402006.9
 <151> 2014-02-06
 <160> 16
 <170> PatentIn version 2.0
 <210> 1
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic sequence: Anti-FAP hu36-IgG1-HC

<400> 1
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 35 40 45

Phe Thr Glu Asn Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Trp Phe His Pro Gly Ser Gly Ser Ile Lys Tyr
 65 70 75 80

Asn Glu Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 85 90 95

Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Gly Thr Gly Arg Gly Ala Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 245 250 255

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 340 345 350

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

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

145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 3

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: hu36-IgG1-HC - without signal sequence

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Phe His Pro Gly Ser Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu 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 Pro Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335

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

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

Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln 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> 5
 <211> 120
 <212>
 PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic sequence: hu36-VH
 <400> 5
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn
 20 25 30
 Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Phe His Pro Gly Ser Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Glu Asn Ile Ile His

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: hu36-CDRH2

<400> 8

Trp Phe His Pro Gly Ser Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: hu36-CDRH3

<400> 9

His Gly Gly Thr Gly Arg Gly Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: hu36-CDRL1

<400> 10

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Ala Tyr Ser Tyr Met His

1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: hu36-CDRL2

<400> 11

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: hu36-CDRL3

<400> 12

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Recombinant Nigrin-b A-chain amino acid
sequence

<400> 13

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

1 5 10 15

Ala Thr Tyr Arg Asp Phe Leu Ser Asn Leu Arg Lys Thr Val Ala Thr

20 25 30

Gly Thr Tyr Glu Val Asn Gly Leu Pro Val Leu Arg Arg Glu Ser Glu

35 40 45

Val Gln Val Lys Ser Arg Phe Val Leu Val Pro Leu Thr Asn Tyr Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Phe Ser Gly Asn Ala Asn Ser Tyr Phe Phe Lys Asp Ala Thr Glu

85 90 95

Val Gln Lys Ser Asn Leu Phe Val Gly Thr Lys Gln Asn Thr Leu Ser

100 105 110

Phe Thr Gly Asn Tyr Asp Asn Leu Glu Thr Ala Ala Asn Thr Arg Arg

attacaagtt tgiatcatgg tgatagcgta gcccgatctc tccttgtggt aattcagatg 480
 gtctcggaag cggcaaggtt cagatacatt gagcaagaag tgcgccgaag cctacagcag 540
 gctacaagct tcacaccaa tgctttgatg ctgagcatgg agaacaactg gtcgtctatg 600
 tccttggaga tccagcaggc gggaataat gtatcacct tctttgggac cgttcagctt 660
 ctaaattacg atcacactca ccgctagt gacaacttg aggaactcta taagattacg 720
 gggatagcaa ttcttctctt ccgttgctcc tcaccaagca atgat 765

<210> 15

<211> 760

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val

1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His

20 25 30

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser

145 150 155 160

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

Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
 660 665 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
 675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
 690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
 705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
 725 730 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
 740 745 750

Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
 755 760

<210> 16
 <211> 761
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16

Met Lys Thr Trp Leu Lys Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Val Val Ile Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val Tyr
 20 25 30

Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
 35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe Pro Asn Trp Ile Ser Glu
 50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp Asn Ile Val Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Asn Ser Thr Met Lys
 85 90 95

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

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
 355 360 365
 Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
 370 375 380
 Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile
 385 390 395 400
 Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
 405 410 415
 Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser
 420 425 430
 Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
 435 440 445
 Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
 465 470 475 480
 Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
 485 490 495
 Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys
 500 505 510
 Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
 515 520 525
 Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
 530 535 540
 Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
 565 570 575
 Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu
 580 585 590
 Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile

