(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0059657
(43) 공개일자 2012년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7013238(분할)
(22) 출원일자(국제) 2004년07월21일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2006-7001429
원출원일자(국제) 2004년07월21일
심사청구일자 2009년05월29일
(85) 번역문제출일자 2012년05월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/023340
(87) 국제공개번호 WO 2005/009369
국제공개일자 2005년02월03일
(30) 우선권주장
60/488,447 2003년07월21일 미국(US)

(71) 출원인
이뮤노젠 아이엔씨
미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830
(72) 발명자
페인 길리안
미국 매사추세츠 02468 워번 21 오크 베일 로드
춘 필립
미국 매사추세츠 02148, 몰든 181 플레아상트 스트리트 25번가
타바레스 다니엘 제이
미국 매사추세츠 01760, 나틱 27 실베스터 로드
(74) 대리인
박창남

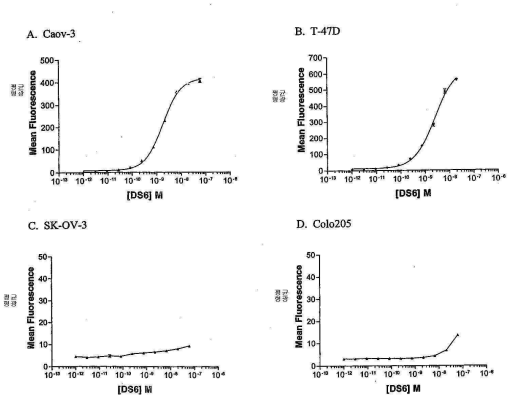
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **씨에이6 항원 특이적 세포독성 접합체 및 이를 사용하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 세포결합물질 및 세포독소를 포함하는 세포독성 접합체, 이 세포독성 접합체를 포함하는 치료용 조성물, 이 세포독성 접합체를 세포증식의 억제 및 질병을 치료하기 위하여 사용하는 방법, 세포독성 접합체를 포함하는 키트를 개시한다. 이들 모두는 본 발명의 실시형태이다. 특히 세포결합제는 CA6 글리코토프를 인식하여 결합하는 단일클론항체 및 그 항원결정기 결합절편이다. 또한 본 발명은 인간화된 또는 재표면화된 DS6, 항-CA6 생쥐 단일클론항체, 및 이의 항원결정기 결합절편에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

CA6 글리코토프에 결합하는 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편으로서,

(a) 설치류 및 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역 풀(pool)에 대한 x-레이 결정학적 구조로부터 얻은 상대 접근성 분포로부터 위치 정렬을 하여, 중쇄 및 경쇄 가변영역의 구조부(framework) 표면노출 위치들 세트를 구하되, 모든 설치류 및 인간 항체의 가변영역에 대한 정렬 위치들은 적어도 98% 일치하는 것을 특징으로 하는 중쇄 및 경쇄 가변영역의 구조부(framework) 표면노출 위치들 세트를 구하는 단계와,

(b) 상기 (a) 단계에서 구한 상기 중쇄 및 경쇄 가변영역의 구조부 표면노출 위치들 세트를 이용하여, 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편에 대해 중쇄 및 경쇄 가변영역의 구조부 표면노출 아미노산 잔기들 세트를 결정하는 단계와,

(c) 인간 항체 아미노산 서열로부터, 상기 (b) 단계에서 결정된 설치류의 구조부 표면노출 아미노산 잔기들 세트와 흡사한 중쇄 및 경쇄 가변영역의 구조부 표면노출 아미노산 잔기들의 세트를 확인하는 단계와,

(d) 상기 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편의 가변영역 구조부 아미노산 서열에 있어서, 상기 (b) 단계에서 결정된 중쇄 및 경쇄 가변영역의 구조부 표면노출 아미노산 잔기들의 세트를 상기 (c) 단계에서 확인된 중쇄 및 경쇄 가변영역의 구조부 표면노출 아미노산 잔기들의 세트로 치환하는 단계와,

(e) 상기 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편의 가변영역의 3차원 모형과, 상기 (d) 단계에서 특정된 치환으로부터 얻은 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편의 가변영역의 3차원 모형을 구성하는 단계와,

(f) 상기 (e) 단계에서 구성된 3차원 모형들을 비교하여, 상기 (b) 단계 또는 상기 (c) 단계에서 확인된 중쇄 및 경쇄 가변영역의 구조부 표면노출 아미노산 잔기들의 세트들 중 어떤 아미노산 잔기가 상기 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편의 상보성 결정영역 잔기의 어떤 원자에 대해 5Å 범위 내에 있는지를 확인하는 단계와,

(g) 상기 (f) 단계에서 확인된 아미노산 잔기는 인간 아미노산 잔기로부터 원래의 설치류 아미노산 잔기로 교체하여 가변영역의 구조부 표면노출 아미노산 잔기들의 인간화 세트(humanizing set)를 결정하는 단계와,

(h) 상기 (b) 단계에서 결정된 설치류 항체의 가변영역의 구조부 표면노출 아미노산 잔기들의 세트를 상기 (g) 단계에서 결정된 가변영역의 구조부 표면노출 아미노산 잔기들의 인간화 세트로 치환하는 단계와,

(i) CA6 글리코토프에 결합하는 상기 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편을 생산하는 단계를 포함하는 재표면화 과정에 의해 생산되고,

CA6 글리코토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편이 항원결정기 결합절편인 것을 특징으로 하는 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항원결정기 결합절편이, Fab절편, Fab' 절편, $F(ab')_2$절편, Fd절편, 단쇄 Fvs (scFv)절편, 단쇄 항체, 이황화결합 Fvs (sdFv)절편 및 V_L 또는 V_H 도메인을 포함하는 절편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 표면노출 아미노산 잔기들은 용매 접근성이 30% 이상인 것을 특징으로 하는 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 5

제1항에 있어서, SEQ ID NOS:1, 21 또는 2, 3 그리고 4-6의 아미노산 서열들을 갖는 적어도 6개의 상보성 결정영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합 절편은, 적어도 하나의 중쇄 가변영역 또는 이의 절편과, 적어도 하나의 경쇄 가변영역 또는 이의 절편을 포함하되,

상기 적어도 하나의 중쇄 가변영역 또는 이의 절편은 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 및 SEQ ID NO:3으로 각각 표시되는 아미노산 서열을 갖는 3개의 순차적인 상보성 결정영역을 포함하고,

상기 적어도 하나의 경쇄 가변영역 또는 이의 절편은 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 및 SEQ ID NO:6으로 각각 표시되는 아미노산 서열을 갖는 3개의 순차적인 상보성 결정영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편은, SEQ ID NO:7 또는 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편은, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 및 SEQ ID NO:11로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 설치류 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 9

CA6 글리코토프 발현 세포에 결합하는 개선된 항체 또는 항원결정기 결합절편으로서,

(a) SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:21 또는 2 및 SEQ ID NO:3으로 표시되는 아미노산 서열들을 갖는 3개의 상보성 결정영역과, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 및 SEQ ID NO:6으로 표시되는 아미노산 서열들을 갖는 3개의 상보성 결정영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원결정기 결합절편을 암호화하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계와,

(b) 상기 (a) 단계의 DNA 폴리뉴클레오티드에, 적어도 하나의 뉴클레오티드 돌연변이, 결실 또는 삽입을 도입하여, 상기 DNA 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 아미노산 서열의 적어도 하나의 잔기가 변경되도록 하는 단계와,

(c) 상기 (b) 단계의 DNA 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 항체 또는 항원결정기 결합절편을 발현시키는 단계와,

(d) 상기 발현된 항체 또는 항원결정기 결합절편에서 CA6 글리코토프 발현 세포에 대한 결합친화도가 개선된 것을 스크리닝하여, 개선된 항체 또는 항원결정기 결합절편을 생성하는 단계에 의해 생산되는 개선된 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 적어도 하나의 뉴클레오티드 돌연변이, 결실 또는 삽입은 올리고뉴클레오티드-매개된 위치 지향 돌연변이생성법(site directed mutagenesis), 카세트 돌연변이생성법(cassette mutagenesis), 에러-프론 PCR(error-prone PCR), DNA 셔플링(DNA shuffling) 및 *E.coli*에 대한 돌연변이유발 유전자 균주(mutator-strain)의 사용으로 구성된 군으로부터 선택된 방법에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 개선된 항체 또는 항원결정기 결합절편.

청구항 11

세포결합물질 및 세포독소를 포함하는 세포독성 접합체로서,

상기 세포결합물질은 CA6 글리코토프에 결합하고,

SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 또는 21 및 SEQ ID NO:3으로 표시되는 아미노산 서열들을 갖는 3개의 상보성 결정 영역과, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 및 SEQ ID NO:6으로 표시되는 아미노산 서열들을 갖는 3개의 상보성 결정 영역을 포함한 것을 특징으로 하는 세포독성 접합체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 세포결합물질이 다클론항체, 단일클론항체, 항체절편, 인간화되거나 재표면화된 항체, 항체의 기능 상동체, 개선된 항체, 인터페론, 림포카인, 호르몬, 성장인자, 트랜스페린 및 비타민으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 세포독성 접합체.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 세포결합물질이 인간화된 쥐의 항 CA6 단일클론 항체 DS6 또는 항원결정기 결합절편인 것을 특징으로 하는 세포독성 접합체.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 세포결합물질이 인간화된 쥐의 항 CA6 단일클론 항체 DS6 또는 이의 항원결정기 결합절편이고, 세포독소는 DM1 또는 DM4인 것을 특징으로 하는 세포독성 접합체.

청구항 15

제11항에 정의된 세포독성 접합체를 CA6 글리코토프를 발현하는 세포와 접촉시키는 것을 포함하는 CA6 글리코토프 발현 세포의 생장을 저해하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 세포독성 접합체가 세포결합물질로서 인간화 쥐의 항체 DS6 또는 이의 항원결정기 결합절편을 포함하며, 세포독소로서 DM1 또는 DM4를 포함하는 것을 특징으로 하는 CA6 글리코토프 발현 세포의 생장을 저해하는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 세포독성 접합체가 세포결합물질로서 인간화 쥐의 항체 DS6 또는 이의 항원결정기 결합절편을 포함하며, 세포독소로서 탁산을 포함하는 것을 특징으로 하는 CA6 글리코토프 발현 세포의 생장을 저해하는 방법.

청구항 18

제11항에 정의된 세포독성 접합체와, 약학적으로 수용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, CA6 글리코토프를 발현하는 질환 샘플을 치료하는데 사용하기 위한 치료용 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 세포독성 접합체가 세포결합물질로서 인간화 쥐의 항체 DS6 또는 이의 항원결정기 결합절편을 포함하며, 상기 세포독소로서 DM1 또는 DM4를 포함하는 것을 특징으로 하는 치료용 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 세포독성 접합체가 세포결합물질로서 인간화 쥐의 항체 DS6 또는 이의 항원결정기 결합절편을 포함하며, 세포독소로서 탁산을 포함하는 것을 특징으로 하는 치료용 조성물.

청구항 21

제18항의 치료용 조성물에 있어서 약제학적으로 효능이 있는 양의 약제 조성물을 암을 가진 숙주에 처리하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는, 암을 가진 숙주를 치료하는 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 세포독성 접합체가 세포결합물질은 인간화 생쥐 항체 DS6 또는 항원결정기 결합절편, 세포독소는 DM1 또는 DM4인 것을 특징으로 하는 암을 가진 숙주를 치료하는 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 세포독성 접합체가 세포결합물질은 인간화 생쥐 항체 DS6 또는 항원결정기 결합절편, 세포독소는 탁산인 것을 특징으로 하는 암을 가진 숙주를 치료하는 방법.

청구항 24

제18항에 있어서, 상기 암에서 CA6 글리코토프가 발현되거나 과발현되는 것을 특징으로 하는 암을 가진 숙주를 치료하는 방법.

청구항 25

제18항에 있어서, 상기 암은 혈청 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 내막암, 외음부암, 유방암, 췌장암 및 이행상피암을 포함하는 그룹으로부터 선택되어 지는 것을 특징으로 하는 암을 가진 숙주를 치료하는 방법.

청구항 26

제11항에 정의된 세포독성 접합체를 포함하는 키트(kit)로서, a) 상기 세포독성 접합체를 포함하는 콤파트먼트(compartment)와, b) 상기 키트의 용도에 관한 지시사항을 더 포함하고, 상기 용도는 CA6 글리코토프가 발현되거나 과발현된 암을 치료하는 것을 포함하는 키트.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 세포독성 접합체는 세포결합물질로서 인간화 쥐의 항체 DS6 또는 이의 항원결정기 결합절편을 포함하고, 세포독소로서 DM1 또는 DM4를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 28

제26항에 있어서,

상기 치료용 조성물의 세포독성 접합체는 세포결합물질로서 인간화 쥐의 항체 DS6 또는 이의 항원결정기 결합절편을 포함하고, 세포독소로서 탁산을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 29

제26항에 있어서,

상기 용도에 관한 지시사항은 암을 가진 대상을 치료하는 지시사항을 포함하고, 상기 암은 CA6 글리코토프가 발현되거나 과발현된 암을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 30

제18항에 정의된 치료용 조성물을 포함하는 키트(kit)로서,

a) 상기 치료용 조성물을 포함하는 콤파트먼트(compartment)와,

b) 상기 키트의 용도에 관한 지시사항을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 치료용 조성물의 세포독성 접합체는 세포결합물질로서 인간화 쥐의 항체 DS6 또는 이의 항원결정기 결합 절편을 포함하고, 세포독소로서 DM1 또는 DM4를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 32

제30항에 있어서,

상기 치료용 조성물의 세포독성 접합체는 세포결합물질로서 인간화 쥐의 항체 DS6 또는 이의 항원결정기 결합 절편을 포함하고, 세포독소로서 탁산을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 33

제30항에 있어서,

상기 용도는 CA6 글리코토프가 발현되거나 과발현된 암을 치료하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생쥐 항 씨에이6 글리코토프(CA6 glycotope) 단일클론 항체 및 그것의 인간화 및 재표면화된 버전에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항 CA6 글리코토프 단일클론 항체의 항원결정기 결합 절편 및 그것의 인간화 및 재표면화된 버전에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 또한 세포결합물질 및 세포독소로 구성된 세포독성 접합체, 그 접합체를 포함하는 치료 조성물, 세포 생장억제 및 질병치료에 있어서 접합체를 사용하는 방법 및 세포독성 접합체를 포함하는 키트에 관한 것이다. 특히 세포결합물질은 단일클론 항체 또는 그것의 항원결정기 결합 절편으로서 CA6 글리코토프 또는 인간화되고 재표면화된 버전을 인식하고 결합한다.

배 경 기 술

[0003] 이웃하는 비 암세포 및 조직을 해하지 않고 표적 암세포를 파괴하는 항암치료제를 개발하려는 수많은 시도가 있었다. 그러한 치료제들은 환자들의 암치료를 상당히 개선하는 효능이 있다.

[0004] 한가지 유력한 방법은 단일클론 항체 등의 세포결합물질들을 세포독소와 연결시키는 것이었다 (Sela et al, in Immunoconjugates 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, in Targeted Drugs 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al, in Antibody mediated delivery systems 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, in Antibody mediated delivery systems 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, in Antibody mediated delivery systems 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988). 세포결합물질의 선택에 따라 세포표면에 발현된 분자의 발현 프로파일을 바탕으로 세포독성 접합체는 특정 타입의 암세포만을 인식하고 결합하도록 고안될 수 있다.

[0005] 메토트렉세이트(methotrexate), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 멜파란(melphalan), 미토마이신 C(mitomycin C), 클로람부실(chlorambucil)과 같은 세포독소들은 다양한 생쥐 단일클론 항체에 결합되어 세포독성 접합체 내에서 사용되었다. 몇몇 경우에 독소 분자들은 혈청 알부민 같은 중간전달분자를 통해 항체분자들에 결합되었다. (Garnett et al, 46 Cancer Res. 2407-2412 (1986); Ohkawa et al 23 Cancer Immunol. Immunother. 81-86 (1986); Endo et al, 47 Cancer Res. 1076-1080 (1980)), dextran (Hurwitz et al, 2 Appl. Biochem. 25-35 (1980); Manabi et al, 34 Biochem. Pharmacol. 289-291 (1985); Dillman et al, 46 Cancer Res. 4886-4891(1986); Shoval et al , 85 Proc. Natl. Acad. Sci. 8276-8280 (1988)), or polyglutamic acid (Tsukada et al, 73 J. Natl. Canc. Inst. 721-729 (1984); Kato et al 27 J. Med. Chem. 1602-1607 (1984); Tsukada et al, 52 Br. J. Cancer 111-116 (1985))

[0006] 약간의 효능을 보여준 특이적 접합체의 예로서, 대장암 및 췌장암 종양 상에서 발현되는 항원인 CanAg에 대한 C242 항체와 메이탄신(maytansine) 유도체 DM1의 접합체가 있다 (Liu et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:

8618-8623 (1996)). 본 접합체의 시험관내 평가에 의하면 세포표면에 발현된 CanAg에 대한 결합친화도는 적정 K_d가 $3x10^{-11}$M로서 높았으며, CanAg 양성 세포에 대한 세포독성은 $6x10^{-11}$M IC_{50}였다. 이러한 세포독성은 항원의 존적으로, 여분의 비접합 항체에 의해 방해되고 항원 음성 세포들이 100배 이상 접합체에 덜 민감하기 때문이었다. 각각의 표적세포에 대한 높은 친화력 및 높은 항원 선택적 세포독성을 가진 다른 항체-DM1 접합체의 예로는 인체 CD56에 대한 인간화 항체인 huN901 접합체; 인체 CD33에 대한 인간화 항체인 huMy9-6; CanAg Mucl 에피톱(epitope)에 대한 인간화 항체인 huC242; PSMA에 대한 비면역 항체 huJ591; Her2/neu에 대한 인간화 항체인 트라스투주맙(trastuzumab); 및 CD44v6에 대한 인간화 항체인 비바투주맙(bivatuzumab)이 있다.

[0007] 특정유형의 암세포를 인식하는 세포독성 접합체의 추가적인 개발은 암환자의 치료 방법의 지속적인 개발에 있어서 중요하게 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 암세포 표면에 발현된 분자/수용체를 인식하고 결합하는 항체개발 및 항체 등의 세포결합물질 및 암세포 표면에 발현된 분자/수용체를 특정적으로 공격하는 세포독소로 구성된 새로운 세포독성 접합체의 개발로 진행된다.

[0009] 보다 구체적으로, 본 발명은 암세포에 의해 발현된 Muc1 뮤신 수용체(mucin receptor) 상의 새로운 CA6 시알로글리코토프(sialoglycotope)의 특성화, 그리고 이러한 Muc1 뮤신 수용체의 새로운 CA6 시알로글리코토프를 인지하고, 세포독성인자와 함께 CA6 글리코토프를 발현하는 세포의 생장을 저해하는데 사용될 수 있는 항체, 바람직하게는 인간화된 항체에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명에는 Mucl 뮤신 수용체의 새로운 CA6 시알로글리코토프를 특정적으로 인식하고 결합하는 항체 또는 그의 항원결정기 결합절편이 포함된다. 다른 실시예에서는 본 발명에는 Mucl 뮤신 수용체의 새로운 CA6 시알로글리코토프 ("CA6 글리코토프")를 인식하는 인간화 항체 또는 그의 항원결정기 결합절편이 포함된다.

[0011] 바람직한 실시예로 본 발명에는 생쥐 항 CA6 단일클론 항체 DS6("DS6 항체") 및 표면이 노출된 항체 잔기 또는 항원결정기 결합절편이 경쇄 및 중쇄에서 알려진 인간 항체표면과 근사한 DS6 항체의 재표면화되거나 인간화된 버전(version)이 포함된다. 본 발명의 인간화 항체 및 그것의 항원결정기 결합절편들은 완전 생쥐 버전보다 그들이 인체 숙주에서 훨씬 덜 면역적(또는 전혀 비면역적인)이라는 점에서 특성을 개선시켰다. 따라서 본 발명의 인간화 DS6 항체 및 항원결정기 결합절편들은 인체에는 면역적이지 않으면서 Mucl 뮤신 수용체, 즉 CA6 글리코토프에서 특정적으로 새로운 시알로글리코토프를 인식한다. 인간화 항체 및 항원결정기 결합절편은 메이탄시노이드 같은 약제에 결합되어 Mucl CA6 시알로글리코토프에 약제를 표적함으로써 항원 발현세포에 대한 특정 세포독성을 갖는 프로드러그(prodrug)를 형성할 수 있다. 그러한 항체 및 소형 맹독성 약제들(예를 들면 메이탄시노이드, 탁산, 및 CC-1065 유사체)로 구성된 세포독성 접합체들은 유방 및 난소종양 등의 종양 치료제로 사용될 수 있다.

[0012] 본 발명의 인간화된 DS6 항체는 본 명세서에서 완전히 특성화되는데, 경쇄 및 중쇄 가변영역 각각의 아미노산 서열, 상기 경쇄 및 중쇄 가변영역의 유전자 DNA 서열, CDRs의 동정, 표면 아미노산의 동정 및 재조합 형태에서 발현 수단의 개시 등이 서술된다.

[0013] 첫번째 실시예에서는 하기의 SEQ ID NOS:1-3의 아미노산 서열을 갖는 CDR이 포함된 중쇄 및 SEQ ID NOS:4-6의 아미노산 서열을 갖는 CDR이 포함된 경쇄가 함유된 인간화 DS6 항체 또는 항원결정기 결합절편이 제공된다:

[0014] S Y N M H (SEQ ID NO : 1),

[0015] Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G (SEQ ID NO : 2),

[0016] G D S V P F A Y (SEQ ID NO : 3),

[0017] S A H S S V S F M H (SEQ ID NO: 4),

[0018] S T S S L A S (SEQ ID NO: 5),

[0019] Q Q R S S F P L T (SEQ ID NO: 6)

[0020] 또한 최소한 90% 서열을 하기의 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 8의 서열로 구성하는 아미노산 서열이 포함된 경쇄 가변영역을 갖는 인간화 DS6 항체 및 항원결정기 결합절편이 공급된다:

[0021] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYS

[0022] TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0023] AGTKLELKR (SEQ ID NO:7)

[0024] EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYS

[0025] TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0026] AGTKLELKR (SEQ ID NO:8)

[0027] 유사하게 최소한 90% 서열을 하기의 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 또는 SEQ ID NO: 11의 서열로 구성하는 아미노산 서열이 포함된 중쇄 가변영역을 갖는 인간화 DS6 항체 및 항원결정기 결합절편이 공급된다:

[0028] QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0029] WIGYIYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0030] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:9)

[0031] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0032] WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0033] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:10)

[0034] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0035] WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0036] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:11)

[0037] 또 다른 실시예에서는 하기의 SEQ ID NO: 8에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 인간화되고 재표면화된 경쇄 가변영역 함유 인간화 DS6 항체 및 항원결정기 결합절편이 공급된다

[0038] EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYS

[0039] TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0040] AGTKLELKR (SEQ ID NO:8)

[0041] 유사하게 하기의 SEQ ID NO: 10 또는 SEQ ID NO: 11 각각에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 인간화되고 재표면화된 중쇄 가변영역 함유 인간화 DS6 항체 및 항원결정기 결합절편이 공급된다:

[0042] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0043] WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0044] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:10)

[0045] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0046] WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0047] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:11)

[0048] 본 발명의 인간화 DS6 항체 및 항원결정기 결합절편에는 인간 영역에서 변화를 요하는 5Å CDR 이내에서 발견된 생쥐 표면 구조부를 나타내는 표1 상의 별표 표시된 하나 또는 그 이상의 위치에서 경쇄 및/또는 중쇄 아미노산 영역에서의 치환이 포함될 수 있다. 예를 들면 생쥐 서열 (SEQ ID NO:7)에서의 첫번째 아미노산 잔기 Q는 항체를 인간화하기 위해서 E (SEQ ID NO:8)로 대체되었다. 그러나, 이러한 잔기는 CDR에 근접하기 때문에 항체 친화도를 유지하기 위해서 쥐의 아미노산 잔기 Q로의 역 돌연변이가 요구될 수 있다.

표 1

[0049]

muDS6 구조부의 CDR에 대한 근접성 (Kabat numbering)	
경쇄	중쇄
Q1*	Q1
V3	K64*
T5	P73*
P40	S74
G57	
A60	
S67	
E81	

[0050] 또한, 표 2에는 muDS6 가변 영역 표면 잔기가 인간의 가변 영역 표면 잔기(가장 상동성을 가진 3개)와 정렬되어 있다. 표 1의 아미노산 잔기는 표 2에서 밑줄 친 아미노산 잔기에 대응한다.

표 2

[0051]

상위 3 개의 상동 인간항체 표면잔기		
항체	경쇄	SEQ ID NO:
muDS6	Q V T A I P K P G G A S R E K	SEQ ID NO:12
28E4	E V T A T P R P G G A S S E K	SEQ ID NO:13
HAZcPB	E V T G T P R P G G D S R E K	SEQ ID NO:14
SSaPB	E V T G T P R P G G D S R E K	SEQ ID NO:15
항체	중쇄	SEQ ID NO:
muDS6	Q Y Q A L R S K K P G Q Q K K G P S S S E Q S	SEQ ID NO:16
28E4	Q Q V A V K P K K P G Q Q K Q G T S S S E Q S	SEQ ID NO:17
HAZcPB	- Q V A V K P K K P G Q Q K Q G E S S S S E Q S	SEQ ID NO:18
SSaPB	- Q V A V K P K K P G Q Q K Q G E S S S S E Q S	SEQ ID NO:19

[0052] 본 발명은 (1) CA6 글리코토프를 인식하고 결합하는 세포결합물질 및 (2) 세포독소로 구성된 세포독성 접합체를 제공한다. 세포독성 접합체에서 세포결합물질은 CA6 글리코토프에 대한 높은 친화도를 가지며, 세포독소는 CA6 글리코토프를 발현하는 세포에 대해 높은 세포독성을 지니며, 따라서 본 발명의 세포독성 접합체는 효과적인 공격인자를 형성한다.

[0053] 바람직한 실시예에서는 세포결합물질은 항 CA6 항체 또는 항원결정기 결합절편이며, 보다 바람직하게는 인간화 항 CA6 항체 또는 항원결정기 결합절편이고 세포독소는 직접적으로 또는 절단 또는 비절단 연결기를 통해 항체 또는 항원결정기 결합절편에 공유결합되어 있다. 보다 바람직한 실시예에서는 세포결합물질은 인간화 DS6 항체 또는 항원결정기 결합절편이고 세포독소는 탁솔, 메이탄시노이드, CC-1065 또는 CC-1065 유사물이 해당된다.

[0054] 본 발명의 실시예로서 세포결합물질은 인간화 항 CA6 항체, 세포독소는 메이탄시노이드 또는 탁산 등이 바람직하다.

[0055] 보다 바람직하게는 세포결합물질은 인간화 항 CA6 항체 DS6, 세포독소는 DM1 또는 DM4 같은 메이탄시노이드류이다.

[0056] 또한, 본 발명은 CA6 글리코토프를 발현하는 세포의 생장을 억제하는 방법을 포함한다. 바람직한 실시예에서, CA6 글리코토프를 발현하는 세포의 생장을 억제하는 방법은 세포의 죽음을 수반하는 생체 내(*in vivo*) 방법이다. 그러나, 본 발명은 시험관 내(*in vitro*) 방법 및 생체 외(*ex vivo*) 적용을 배제하는 것은 아니다.

[0057] 본 발명은 또한 세포독성 접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 치료제 조성물을 제공한다.

[0058] 본 발명에는 암을 가진 표적을 치료성분을 사용하여 치료하는 방법이 포함된다. 바람직한 실시예로서, 세포독성 접합체는 항 CA6 항체 및 세포독소로 구성된다. 보다 바람직하게는 세포독성 접합체는 인간화 DS6 항체-DM1 접합체, 인간화 DS6 항체-DM4 접합체 또는 인간화 DS6 항체-탁산 접합체로 구성되고, 접합체는 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 함께 투여된다.

[0059] 본 발명에는 또한 항 CA6 항체-세포독소 접합체로 구성된 키트 및 사용방법이 포함된다. 바람직한 실시예로서, 항 CA6 항체는 인간화 DS6 항체, 세포독소는 DM1 또는 DM4 같은 메이탄신류이고, 사용방법은 암을 가진 표적의 치료에서 접합체를 사용하기 위한 것이다. 또한, 상기 키트는 약제학적으로 허용가능한 제형의 준비를 위해 필요한 구성요소, 예를 들어 접합체가 동결건조 상태 또는 농축된 형태일 때 필요한 희석제, 그리고 제형의 투여를 위해 필요한 구성요소를 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명에는 또한 CA6 글리코토프에 특이하게 결합하고 인식하는 항체 유도체가 포함된다. 바람직한 실시예에서, 상기 항체 유도체는 CA6 글리코토프에 결합하는 항체를 재표면화하거나 인간화하여 제조함으로써 숙주에 대해 감소된 면역원성을 나타낸다.

[0061] 본 발명은 검색 또는 진단시약용으로 표지되어 있는 인간화 항체 또는 절편을 제공한다. 바람직한 실시예로서 표지는 방사성 표지, 형광단(fluorophore), 발색단(chromophore), 이미징 물질(imaging agent) 또는 금속이온이다.

[0062] 진단방법은 또한 상기 표지된 인간화 항체 또는 항원결정기 결합절편이 암을 가진 것으로 의심되는 표적에서 구현되거나 표적의 체내에서 표지를 측정 또는 감지하는 데 사용된다.

[0063] 본 발명은 또한 인간화 항체 접합체를 단독으로 사용하거나 다른 세포독소 또는 치료제와 함께 사용하여 암을 가진 표적을 치료하는 방법을 제공한다. 암은 하나 또는 그 이상, 예를 들면 유방암, 결장암, 난소암, 자궁내막암, 골육종, 자궁경부암, 전립선암, 폐암, 활액암, 췌장암, 육종암, CA6가 발현되는 암 또는 CA6 글리코토프가 발현되는 것이 확실한 다른 암일 수 있다.

[0064] 달리 언급되지 않는 한 여기서 인용된 참고자료 및 특허는 모두 참고문헌에 해당된다.

[0065] 본 발명은 항 CA6 단일클론항체, 항 CA6 인간화 항체, 항 CA6 항체절편을 제공한다. 본 발명의 항체 및 항체절편 각각은 세포표면에서 CA6 글리코토프를 특이하게 인식하고 결합하도록 고안되어 있다. CA6는 많은 인간 종양, 즉 95%의 난소암, 50%의 자궁내막암, 50%의 자궁경부암, 69%의 내막암, 80%의 외음부암, 60%의 유방암, 67%의 췌장암, 48%의 요로상피암에 의해 발현되도록 알려져 있지만, 정상 인체조직에 의해서는 거의 발현되지 않는다.

[0066] Kearse의 보고서[Kearse et al., Int. J. Cancer 88(6):866-872 (2000)]는 CA6 항원결정기의 특성화를 위해 하이브리도마 상등액을 사용하였는데, CA6 항원결정기가 발견된 단백질을, CA6 항원결정기를 포함하는 N-링크 탄수화물을 갖는 80kDa 단백질로서 잘못 동정하였다. 이후 본 발명자들은 정제된 DS6를 사용하여 CA6 항원결정기가 250kDa 이상의 비-2황화결합된(non-disulfide linked) 당단백질의 O-링크 탄수화물 상에 존재하는 것을 밝혔다. 또한, 상기 당단백질을 뮤신, Muc1으로서 동정하였다. 서로 다른 Muc1 대립유전자들이 가변 탠덤 반복(VNTR)에서 상이한 반복수를 갖기 때문에 도메인 세포들은 종종 다른 크기의 두 개의 특이한 Muc1 단백질을 발현한다 (Taylor-Papadimitriou, *Biochem. Biophys. Acta* 1455(2-3):301-13 (1999). 당화에서의 차이 및 VNTR 도메인에서 반복수치 차이로 인해 Muc1의 분자량은 세포주 마다 다양하다.

[0067] 과요오드산에 대한 CA6 면역반응 감응성은 CA6가 탄수화물 항원결정기 "글리코토프"임을 나타낸다. *Vibrio cholerae*의 뉴라미니다아제 치료에 대한 부가적인 CA6 면역반응 감응성은 CA6 항원결정기가 시알릭산 의존성 글리코토프, 즉 "시알로글리코토프"임을 나타낸다.

[0068] CA6 특정화의 세부사항은 실시예 2(하기 참조)에서 발견될 수 있다. 부가사항은 WO 02/16401; Wennerberg et al., *Am. J. Pathol.* 143(4):1050-1054 (1993); Smith et al., *Human Antibodies* 9:61-65 (1999); Kearse et al., *Int. J. Cancer* 88(6):866-872 (2000); Smith et al., *Int. J. Gynecol. Pathol.* 20(3):260-6 (2001); 및 Smith et al., *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 10(2):152-8 (2002) 에서 발견될 수 있다.

[0069] 본 발명에는 또한 두 개의 주요 성분으로 구성된 세포독성 접합체가 포함된다. 첫번째 구성요소는 세포결합물질로서 CA6 글리코토프를 인식하고 결합한다. 세포결합물질은 Muc1에서 고도의 특이성을 가지고 CA6 시알로글리코토프를 인식하여 세포독성 접합체가 의도하는 세포만을 인식하고 결합하게 된다. 고도의 특이성으로 인해 접합체는 비특이적 결합에서 생기는 역효과없이 표적 방식으로 활동할 수 있게 될 것이다.

[0070] 또 다른 실시예에서는 본 발명의 세포결합물질이 고도의 친화도를 가지고 CA6 글리코토프를 인식하고 접합체는 세포독소 부분이 세포 상에 작용하거나, 내부도입되기에 충분한 시간을 제공하기 위해 상당 기간 동안 표적세포와 연결될 것이다.

[0071] 바람직한 실시예로서 세포독성 접합체는 세포결합물질로서 항 CA6 항체로 , 보다 바람직하게는 생쥐 DS6 항 CA6 단일클론항체로 구성된다. 보다 바람직한 실시예로서 세포독성 접합체는 인간화 DS6 항체 또는 항원결정기 결합절편으로 구성된다. DS6 항체는 고도의 특이성을 가지고 CA6를 인식 가능하며, 표적 방식으로 세포독소를 암세포 같은 비정상 세포 또는 조직으로 매개한다.

[0072] 두번째 구성요소는 세포독소이다. 바람직한 실시예에서 세포독소는 DM1, DM4, CC-1065, CC-1065 상동체 같은 탁솔, 메이탄시노이드이다. 바람직한 실시예에서 세포결합물질은 세포독소에 직접 또는 절단 또는 비절단 연결부를 통해 공유결합되어 있다.

[0073] 세포결합물질, 세포독소, 연결부는 하기에 보다 상세하게 기술되어 있다.

[0074] 세포결합물질

[0075] 치료제로서 본 발명 구성요소의 효능은 적절한 세포결합물질의 세심한 선별에 달려 있다. 세포결합물질은 현재 알려진 어떠한 종류의 것도 해당 될 수 있고 펩티드 및 비-펩티드도 포함된다. 세포결합물질은 세포를 특이적으로나 비특이적으로 결합할 수 있는 어떠한 물질도 해당 될 수 있다. 일반적으로 항체 (특히 단일클론항체), 림포카인류, 호르몬, 성장인자, 비타민, 영양전달물질 (예. 트랜스페린)이나 어떤 종류의 세포결합물질도 해당 될 수 있다.

[0076] 보다 특이한 세포결합물질의 예로는 다음의 것이 포함될 수 있다:

[0077] (a) 다클론항체;

[0078] (b) 단일클론항체;

[0079] (c) Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$, Fv (Parham, *J. Immunol.* 131:2895-2902 (1983); Spring et al. *J. Immunol.* 113:470-478 (1974); Nisonoff et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244 (1960)) 같은 항체절편;

[0080] (d) 인터페론 (예.. α., β., γ.);

[0081] (e) IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 같은 림포카인류;

[0082] (f) 인슐린, TRH (티로트로핀 방출호르몬), MSH (멜라닌세포 자극호르몬), 안드로겐 및 에스트로겐 같은 스테로이드 호르몬 등의 호르몬;

[0083] (g) EGF, TGF-α, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF 같은 성장인자 및 콜로니 자극인자 (*Burgess, Immunology Today* 5:155-158 (1984));

[0084] (h) 트랜스페린 (O'Keefe et al. J. Biol. Chem. 260:932-937 (1985)); 및

[0085] (i) 엽산 같은 비타민.

[0086] 항체

[0087] 적절한 세포결합물질의 선별은 표적될 특정 세포구성 여하에 달려 있는 문제이며, 일반적으로 항체는 적절하게 준비될 수 있으면 바람직하되, 단일클론항체가 보다 바람직하다.

[0088] 단일클론항체기술로 인해 극히 특이적인 세포결합물질을 특이적 단일클론항체 형태로 생산가능하게 된다.

[0089] 본 기술분야에서 잘 알려진 것이 마우스, 래트, 햄스터 또는 기타 다른 포유류를 본래의 표적 세포, 표적 세포로부터 분리된 항원, 전체 바이러스(whole virus), 전체 바이러스를 약화시킨 것, 바이러스 외피 단백질과 같은 바이러스 단백질로 면역화시켜 생산되는 단일 클론 항체의 제조기술이다. 항원에 민감해진 인간 세포도 사용될 수 있다. 단일클론항체를 얻는 또 다른 방법으로는 scFv (단쇄 가변영역), 특히 인간의 scFv의 파아지 라이브러리를 이용하는 것이다 (Griffiths et al., U.S. Patent Nos. 5,885,793 및 5,969,108; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587 참조).

[0090] 일반적인 항체는 두 개의 동일한 중쇄 및 두 개의 동일한 경쇄로 구성되어 있는데 이황화결합되어 있다. 가변영역은 항체 중쇄 및 경쇄 부분으로서 항체 간에 서열에서 차이가 나고, 항원에 특이한 각각의 항체 결합력 및 특이성에서 협력한다. 가변성은 통상 항체 가변 영역에 걸쳐 균일하게 분포하지 않는다. 그것은 경쇄 및 중쇄 가변영역 중에서 CDR 또는 과잉 가변영역이라 불리는 세 개의 가변영역 부분 내에 집중되어 있다. 가변영역 중 보다 고정된 부분은 구조부라고 한다. 중쇄 및 경쇄의 가변영역에는 네 개의 구조부가 있으며, 대개 β-병풍 구조를 채택하면서 각각의 구조부는 3개의 CDR에 의해 연결되어 있다. 3개의 CDRs은 β-병풍 구조를 연결하는 루프를 형성하고, 일부의 경우 β-병풍 구조의 일부를 형성한다. 각 체인에 있는 CDR은 구조부에 의해 매우 친밀하게 연결되어 있고 다른 체인으로부터의 CDR과 함께 항체의 항원결합자리의 형성에 기여한다 (E. A. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 1991, NIH).

[0091] 불변영역(constant region)은 중쇄의 일부분이다. 이는 비록 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지는 않지만 항체-의존적인 세포 독성에서 항체가 관여하는 것과 같은 이펙터(effector) 기능을 나타낸다.

[0092] 본 발명에 사용하기 위한 적절한 단일클론항체에는 생쥐 DS6 단일클론항체가 포함된다 (U.S.Patent No. 6,596,503; ATCC deposit No. PTA-4449)

[0093] 인간화되거나 재표면화된 DS6 항체

[0094] 바람직하게 인간화 항 CA6 항체는 본 발명의 세포결합물질로 사용된다. 인간화 항체의 바람직한 실시예는 인간화 DS6 항체 또는 항원결정기 결합절편이다.

[0095] 인간화의 목적은 항원 결합 친화도 및 항체 특이성을 유지하면서 생쥐 항체 같은 이종항체의 면역성 축소에 있다.

[0096] 인간화 항체는 재표면화 및 CDRs 그라프팅(grafting)과 같은 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 본 명세서에서와 같이, 재표면화 기술은 분자 모델링, 통계학적 분석 및 돌연변이생성법의 조합을 이용하여 항체 가변 영역의 비-CDR 표면을 표적 숙주의 알려진 항체의 표면과 닮도록 변환하는 것이다.

[0097] 항체 재표면화 기술과 방법 및 다른 숙주 내에서 항체 면역성을 감소시키는 다른 방법은 본 원에서 참고자료로 참조된 US Patent 5,639,641 (Pedersen et al.) 에 기재되어 있다. 바람직한 방법으로는, (1) 항체 중쇄 및 경쇄 가변영역 풀의 배열이 일련의 중쇄 및 경쇄 가변영역 구조표면 노출부위를 형성하기 위해 제공되며, 모든 가변영역에 대한 상기 배열은 적어도 98% 동일하고, (2) 일련의 중쇄 및 경쇄 가변영역 구조표면 노출 아미노산 잔기는 설치류 항체로 한정되며 (또는 절편); (3) 설치류 표면노출 아미노산 잔기에 거의 일치하는 일련의 중쇄 및 경쇄 가변영역 구조표면 노출 아미노산 잔기가 명시되고; (4) 설치류 항체의 상보성 결정영역의 잔기의 어떤 원자에 대해 5Å 범위 내에 있는 아미노산 잔기들은 제외하고, (2)단계에서 한정된 중쇄 및 경쇄 가변영역 구조표면 노출 아미노산 잔기가 (3) 단계에서 명시된 일련의 중쇄 및 경쇄 가변영역 구조표면 노출 아미노산 잔기로 치환되고; 및 (5) 결합특이성을 가지는 인간화 생쥐 항체가 생산된다.

[0098] 항체는 CDR-grafting (EP 0 239 400; WO 91/09967; U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 및 5,585,089), 베니어링 또는 재표면화 (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska M.A. et al., 1994, PNAS 91:969-973), 및 사슬 셔플링(chain shuffling) (U.S. Pat. No. 5,565,332)를 포함하는 다양한 기술을 사용하여 인간화될 수 있다. 인간 항체는 파지 디스플레이 방법을 포함하는 기술분야에서 알려진 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 또한 U.S. Pat. Nos. 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806, 및 5,814,318; 및 국제특허출원번호 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, 및 WO 91/10741를 참고할 수 있다

[0099] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 Mucl 뮤신에서 새로운 시알로글리코토프 (CA6 글리코토프)를 인식하는 인간화 항체 또는 절편을 제공한다. 또 다른 실시예에서, 인간화 항체 또는 항원결정기 결합절편은 CA6 글리코토프를 발현하는 세포성장을 방해하는 추가적인 기능을 가진다.

[0100] 보다 바람직한 실시예에서, 항체의 표면노출 잔기 또는 절편이 알려진 인간 항체 표면과 근접하도록 경쇄 및 중쇄로 교체되는 재표면화 또는 인간화된 DS6 항체가 제공된다. 본 발명의 인간화 DS6 항체 또는 항원결정기 결합절편은 개선된 특징을 갖는다. 예를 들면, 인간화 DS6 항체 또는 항원결정기 결합절편은 Mucl 뮤신에서 특이하게 새로운 시알로글리코토프 (CA6 글리코토프)를 인식한다. 보다 바람직하게 인간화 DS6 항체 또는 항

원결정기 결합절편은 CA6 글리코토프를 발현하는 세포성장을 방해하는 추가적인 기능을 가진다. 인간화 DS6 항체 또는 항원결정기 결합절편은 새로운 Mucl 시알로글리코토프, CA6에 약제를 표적화함으로써 항원 발현세포에 대해 특이적 세포독성을 갖는 프로드러그를 형성하기 위해 메이탄시노이드 같은 약물에 접합될 수 있다. 항체 및 소형 높은독성을 지닌 약물(예. 메이탄시노이드, 탁산, CC-1065 유사물)로 구성된 세포독성 접합체는 유방 및 난소종양 등의 종양치료를 위한 치료제로 사용될 수 있다.

[0101] 인간화 DS6 항체는 또한 경쇄 및 중쇄 모두의 각각의 아미노산 서열, 경쇄 및 중쇄 가변영역에 대한 유전자 DNA 서열, CDRs의 명명, 그들의 표면 아미노산의 명명, 및 재조합 형태에서 발현 방법의 발견에 따라 완전하게 특정될 수 있다.

[0102] 하나의 실시예에서, SEQ ID NO:1-3으로 된 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하는 인간화 항체 또는 항원결정기 결합절편이 제공된다:

[0103] S Y N M H (SEQ ID NO:1)

[0104] Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G (SEQ ID NO:2)

[0105] G D S V P F A Y (SEQ ID NO:3)

[0106] 중쇄 CDR이 AbM 모델링에 의해 결정될때 SEQ ID NO:20-22로 나타난다:

[0107] G Y T F T S Y N M H (SEQ ID NO:20)

[0108] Y I Y P G N G A T N (SEQ ID NO:21)

[0109] G D S V P F A Y (SEQ ID NO:22)

[0110] 동일한 실시예에서, 인간화 항체 또는 항원결정기 결합절편은 SEQ ID NO:4-6으로 된 아미노산 서열을 포함하는 CDR로 된 경쇄를 포함한다:

[0111] S A H S S V S F M H (SEQ ID NO:4)

[0112] S T S S L A S (SEQ ID NO:5)

[0113] Q Q R S S F P L T (SEQ ID NO:6)

[0114] 또한 SEQ ID NO:7 또는 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 보이는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 인간화 항체 및 항원결정기 결합절편이 제공된다:

[0115] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYS

[0116] TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0117] AGTKLELKR. (SEQ ID NO:7)

[0118] EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYS

[0119] TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0120] AGTKLELKR. (SEQ ID NO:8)

[0121] 유사하게 SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 보이는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역을 포함하는 인간화 항체 및 항원결정기 결합절편이 제공된다:

[0122] QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0123] WIGYIYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0124] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (SEQ ID NO:9)

[0125] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0126] WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0127] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (SEQ ID NO:10)

[0128] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0129] WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0130] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (SEQ ID NO:11)

[0131] 또다른 실시예에서는, SEQ ID NO:8 에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 인간화 또는 재표면화된 경쇄 가변영역을 갖는 인간화 항체 및 항원결정기 결합절편이 제공된다.

[0132] EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYS

[0133] TSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFG

[0134] AGTKLELKR. (SEQ ID NO:8)

[0135] 유사하게, SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:11 에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 인간화 또는 재표면화된 중쇄 가변영역을 갖는 인간화 항체 및 항원결정기 결합절편이 제공된다:

[0136] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0137] WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0138] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (SEQ ID NO:10)

[0139] QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLE

[0140] WIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVY

[0141] FCARGDSVPFAYWGQGTLVTVSA. (SEQ ID NO:11)

[0142] 본 발명의 인간화항체 및 항원결정기 결합절편에는 또한 CDR에 근접한 인간 표면 아미노산 잔기가 표 1에서의 잔기로 한정된 하나 또는 그 이상의 위치에서 상보적인 muDS6 표면잔기로 교체되어 지는 경쇄 및/또는 중쇄 가변영역이 포함된다.

[0143] DS6 항체 경쇄 및 중쇄, 및 인간화 형태의 1차 아미노산 및 DNA 서열이 개시되어 있다. 단, 본 발명의 범위는 항체 및 당해 서열을 포함하는 절편에만 한정되어 있지 않다. 대신 Mucl 수용체상에서 종양 특이적 글리코토프와 같은 CA6에 특이적으로 결합하는 모든 항체 및 절편이 본 발명에 포함되어 있다. 바람직하게는 CA6에 특이적으로 결합하는 항체 및 절편은 수용체의 생물학적 활동을 방해한다. 보다 바람직하게는 그러한 항체들은 보다 더 광범위하게 경쟁자 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 항체 및 항체절편은 그들의 골격을 이루는 아미노산 서열, CDRs, 및/또는 경쇄, 중쇄에 있어서 DS6 항체 또는 인간화 유도물질과는 상이하며, 여전히 본 발명의 범주에 속하게 된다.

[0144] DS6 항체의 CDR은 모델링에 의해 명시되고, 분자 구조는 예상되어져 왔다. CDR은 항원결정기 인식에 있어서 중요한 반면, 발명의 항체 및 절편에 있어서 필수적인 것은 아니다. 본 발명상의 항체의 친화도 증가로 인해 개선된 성질을 갖는 항체 및 절편이 제공된다.

[0145] 마우스 경쇄 IgVκap4 생식계열 유전자 및 중쇄 IgVh J558.41 생식계열 유전자(이들로부터 DS6 유도)가 도 11에 DS6 항체의 서열과 정렬되어 도시되어 있다. 비교부위는 DS6 항체의 있음직한 체세포 돌연변이를 나타내고 CDRs내에 몇개를 포함한다.

[0146] DS6 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역 서열 및 DS6 항체의 CDR 서열은 이전에는 알려지지 않았으나, 도 9A 및 9B에 도시되어 있다. 본 사실은 DS6 항체의 인간화 형태를 생산하기 위해 사용될 수 있다.

[0147] 항체 절편

[0148] 본 발명의 항체들에는 항원결정기 결합절편 뿐만 아니라 상기 설명된 전체 길이 항체가 포함된다. "항체절편"에는 전체 길이 항체에 의해 인식된 항원결정기에 결합하는 능력을 보유하는 항체의 부분이 포함되며, "항원결정기 결합절편"으로 부른다. 항체절편의 예로는 Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 항체, 이황화 결합 Fvs (dsFv) 및 V_L 또는 V_H 영역을 포함하는 절편이 있다. 단쇄 항체를 포함하여 항원결정기 결합절편에는 가변 영역 단독 또는 힌지 영역, C_H1, C_H2, 및 C_H3 도메인 전체 또는 일부와 조합된 가변영역(들)이 포함된다.

[0149] 절편들에는 Fab 또는 $F(ab')_2$가 하나 또는 둘 모두 포함될 수 있다. 바람직하게는 항체 절편에는 전체 항체 6개의 CDR 모두를 포함할 수도 있으나, 여전히 기능적이면서도 3개 내지 5개의 CDR 처럼 일부를 포함할 수도 있다. 또한 절편들은 다음의 면역글로불린 유형, 즉 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE 및 하위유형 중의 하나이거나 조합할 수도 있다.

[0150] Fab 및 $F(ab')_2$ 절편은 파파인(papain)(Fab 절편) 또는 펩신(F(ab')2 절편)과 같은 효소를 사용하는 단백질 가수분해로 생산될 수 있다.

[0151] 단쇄 Fv(scFv) 절편은 적어도 하나 이상의 항체 경쇄 가변영역(V_L)에 연결된 적어도 하나 이상의 항체 중쇄 가변영역(V_H)을 포함하는 항원결정기 결합절편이다. 연결물질은 단쇄 항체가 유도되는 전체 항체의 표적 분자 결합 특이성을 유지하기 위해 연결될 때 V_H 및 V_L 영역의 적절한 3차원 접힘이 형성되는지 확인하기 위해 선택된 짧고 유연한 펩티드가 될 수 있다. (V_L) 또는 (V_H) 서열의 카르복실기 말단은 연결물질에 의해 상보적 (V_L) 또는 (V_H) 서열의 아미노산 말단에 공유결합될 수 있다.

[0152] 본 발명의 단쇄 항체 절편에는 적어도 하나 이상의 가변 또는 상보성 결정영역(CDR)을 갖지만, 불변영역 일부 또는 전부가 결여된 아미노산 서열이 포함될 수 있다. 불변영역은 항원 결합을 위해서 필수적이지 않지만 전체 항체의 구조에 있어서는 중요한 부분을 구성한다. 따라서 단쇄 항체 절편은 불변영역 일부 또는 전부를 포함함으로써 항체의 이용과 관련한 몇가지 문제를 극복할 수 있다. 예를 들면 단쇄 항체 절편은 생물 분자와 중쇄 불변영역 간의 바람직하지 않은 상호작용이나 생물 작용에서 제외될 수 있다. 또한 단쇄 항체 절편은 전체 항체보다 상당히 작기 때문에 항원 결합부위에 보다 효과적으로 내재화되고 결합할 수 있어서 더 큰 모세혈관 투과성을 가지게 된다. 또한 항체 절편은 원핵세포 내에서 상대적으로 대량 생산될 수 있다. 또한 단쇄 항체의 작은 크기로 인해 전체 항체보다 수용체 내에서 면역반응을 덜 일으키게 된다.

[0153] 단쇄 항체 절편은 분자 클로닝, 항체 파지 디스플레이 라이브러리 또는 주지한 유사 기술을 통해 생산될 수 있다. 예를 들면 박테리아를 포함해서 진핵 또는 원핵 세포 내에서 생산될 수 있다. 항원결정기 결합절편은 또한 주지한 다양한 파지 디스플레이 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 파지 디스플레이 기술에서 기능성 항체 도메인은 파지 입자 표면에 나타나게 되는데, 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 전달하게 된다. 특히, 그러한 파지는 저장소 또는 조합 항체 도서관 (예. 인간 또는 설치류)로부터 발현된 항원결정기 결합 도메인을 도시하기 위해 이용될 수 있다. 항원결정기 결합 도메인을 발현하는 파지는 관련 항원을 결합하면서 솔리드 표면이나 비드에 결합되거나 포착된 표지 항원을 이용하여 항원에 의해 선택되거나 명시될 수 있다. 파지는 일반적으로 필라멘트형 파지로서 Fab, Fv, 이황화물-안정화 Fv 항체 도메인을 가진 파지로부터 발현된 fd 및 M13 결합 도메인을 포함하면서 파지 유전자 Ⅲ이나 Ⅷ 단백질로 융화된다.

[0154] 항원결정기 결합절편을 만들기 위한 파지 디스플레이 기술의 예는 본 원에서 참조문헌으로 인용된 Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; PCT application No. PCT/GB91/01134; PCT publications WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 및 U.S. Pat. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 및 5,969,108 에 기재되어 있다.

[0155] 파지 선택 후, 절편을 암호화하는 파지 부위는 분리되고 선택된 포유류 세포, 곤충 세포, 식물세포, 곰팡이, 박테리아를 포함한 숙주 내에서 재조합 DNA 기술을 이용한 발현을 통해 항원결정기 결합절편을 생산하기 위해 사용된다. 예를 들면, Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$ 절편을 재조합으로 생산하는 기술은 또한 본원에서 참조문헌으로 인용된 PCT publication WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, AJRI 34:26-34; 및 Better et al., 1988, Science 240:1041-1043에 기재된 것과 같은 주지의 기술을 사용하여 도입될 수 있다. 단쇄 Fvs 및 항체를 생산하기 위한 기술의 예는 U.S. Pat. Nos. 4,946,778 및 5,258,498; Huston et al., 1991, Methods in Enzymology 203:46-88; Shu et al., 1993, PNAS 90:7995-7999; Skerra et al., 1988, Science 240:1038-1040에 기재된 내용을 포함한다.

[0156] 등기능물(Functional Equivalents)

[0157] 또한 발명의 범주 내에는 항 CA6 항체 및 인간화 항 CA6 항체의 등기능물이 포함된다. "등기능물" 에는 상동 서열, 쉬메릭 항체, 인공 항체 및 변형된 항체 를 포함하는 항체가 포함되어 있는데, 여기서 각 등기능물은 CA6에 대한 결합능력에 의해 한정된다. "항체 절편"이라는 분자 그룹과 "등기능물"이라는 그룹 내에서의 겹침이 당업자라면 이해할 것이다. 등기능물 생산방법은 예를 들면 본 원에서 참고자료로 인용된 PCT Application WO 93/21319, European Patent Application No. 239,400; PCT Application WO 89/09622; European Patent Application 338,745; and European Patent Application EP 332,424에 개시되어 있다.

[0158] 상동 서열을 가지는 항체는 항 CA6 항체 및 인간화 항 CA6 항체의 아미노산 서열과 서열 동질성을 갖는 항체들이다. 바람직하게는 상동성이란 항 CA6 항체 및 인간화 항 CA6 항체의 가변영역의 아미노산 서열을 갖는 것을 말한다. "서열 동질성"이란 다른 아미노산 서열에 대해 최소한 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 서열 동질성, 보다 바람직하게는 최소한 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동질성을 가지는 것을 의미한다. 예를 들면 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988)에 따라 FASTA 검색방법에서 결정된 바와 같다.

[0159] 상기 사용된 바와 같이, 쉬메릭 항체는 항체의 다른 부분이 다른 동물종으로부터 유도된다. 예를 들면 생쥐 단일클론항체로부터 유도된 가변영역을 포함하는 항체는 인간 면역글로불린 불변영역과 쌍을 이루었다. 쉬메릭 항체 생산방법은 본 원에서 참고자료로 인용한 Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; 및 4,816,397에 기재되어 있다.

[0160] 인간화 쉬메릭(chimeric) 항체는 예를 들면 생쥐항체의 상보성 결정영역을 인간 구조부로 치환함으로써 만들어진다. PCT Pub. No. WO92/22653를 참조할 수 있다. 인간화 쉬메릭 항체는 바람직하게는 연관된 인간 항체 영역으로부터 치환하거나 단독으로 유도된 상보성 결정영역(CDR) 및 인간 외의 포유류로부터 유도된 CDR보다는 불변영역과 가변영역을 포함한다.

[0161] 인공 항체는 scFv 절편, 이합체, 삼합체, 사합체 및 mru (Winter, G. and Milstein, C., 1991, Nature 349: 293-299; Hudson, P.J., 1999, Current Opinion in Immunology 11: 548-557 검토 참조)를 포함하며, 각각은 항원 결합능력을 보유한다. 단쇄 Fv 절편 (scFv)에서 항체의 V_H 및 V_L 도메인은 유연성 펩티드에 연결되어 있다. 연결물질 펩티드는 약 15개 아미노산 잔기 길이이다. 예를 들어 5개 아미노산과 같이 연결물질이 더 작다면, scFv 이형체인 이합체가 형성된다. 연결물질은 3개 아미노산 잔기보다 더 작아지게 된다면, 삼합체 및 사합체라고 부르는 트리머릭 및 테트라머릭 구조가 형성된다. 항체의 최소 결합단위는 CDR인데, 전형적으로는 상당한 인식 및 결합력을 보유하여 분리되어 사용될 수 있는 중쇄의 CDR2이다. 그러한 절편은 분자 인식 단위 또는 mru 라고 한다. 다양한 mru가 짧은 연결 펩티드에 연결되어 결국 단일 mru보다 높은 특성을 보유한 인위적 결합 단백질을 형성할 수 있다.

[0162] 본 원의 등기능물에는 또한 변형된 항체, 즉 분자와 항체 사이의 공유결합에 의해 변형된 항체가 포함된다. 예를 들면 변형된 항체에는 당화, 아세틸화, PEG화, 포스포릴화, 아미드화, 알려진 방어 그룹에 의한 유도, 단백질 가수분해, 세포리간드나 다른 단백질과의 연결 등에 의해 변형된 항체가 포함된다. 항체는 공유결합때문에 항 유전자형 반응을 하지 않게 된다. 이러한 변형은 제한되지 않고 특이한 화학분해, 아세틸화, 포르밀화, 튜니카마이신의 대사 합성 등의 알려진 기술에 의해 발생한다. 또한 변형된 항체는 하나 또는 그 이상의 비전형 아미노산을 포함한다.

[0163] 등기능물은 다양한 구조부 내에서 다양한 CDR을 상호교류함으로써 생성될 수 있다. 따라서, 예를 들면 다른 종류의 항체는 주어진 일련의 CDR을 다른 중쇄로 치환함으로써 얻어지며, 여기서 IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE 항체 및 이소타입이 생산될 수 있다. 유사하게 본 발명의 범주 내에서 인위적 항체는 주어진 일련의 CDR을 합성 구조부 내에 삽입함으로써 얻어질 수 있다.

[0164] 등기능물은 특정 CDR의 측면에 있는 가변영역 및/또는 불변영역 서열 내에서 광범위한 주기 기술을 사용한 돌연변이, 삭제 및/또는 삽입에 의해 생산될 수 있다.

[0165] 항체 절편 및 등기능물은 DS6 항체와 비교하면 CA6에 대해 감지할 수 있을 정도로 결합하는 분자를 포함한다. 감지할 수 있는 정도의 결합에는 최소한 10-100%, 바람직하게는 최소한 50%, 60% 또는 70%, 보다 바람직하게는 최소한 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99%의 범위 내의 모든 값을 생쥐 DS6 항체의 CA6에 대한 결합 능력에 있어서 포함한다.

[0166] 개선된 항체

[0167] CDR은 항원결정기 인식 및 항체 결합에 있어서 가장 중요하다. 단, CDR을 포함하는 잔기가 항체의 항원결정기 인식 및 결합능력을 방해하지 않고 변할 수 있다. 예를 들면, 항원결정기 인식에 영향을 주지는 않지만 항원결정기에 대한 항체 결합 친화도를 증가시키는 변화가 생길 수 있다.

[0168] 또한 본 발명의 범주에는 증대된 친화도를 가지고 특이하게 CA6를 인식하고 결합하는 개선된 생쥐 및 인간화 항체가 포함된다.

[0169] 일차 항체 서열에 관한 지식을 바탕으로 항체 서열 내의 다양한 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변화의 영향에 관한 다양한 연구가 행해졌다 (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254, 392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539).

[0170] 당해 연구들에서 일차 항체의 등가물은 CDR1, CDR2, CDR3 또는 구조부에 있는 중쇄 및 경쇄 유전자의 서열을 올리고뉴클레오티드 매개 점 돌연변이, 카세트 돌연변이, 오차 PCR, DNA 셔플링 또는 E-Coli 같은 돌연변이 균주 등의 방법을 이용하여 변형함으로써 생성되었다 (Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Chapter 16, pp. 277-291, in "Phage Display of Peptides and Proteins" Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). 일차 항체 서열을 변화시키는 방법은 이차 항체의 개선된 친화도로 이어졌다 (Gram, H. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. and Riechmann, L., 1996, Immunotechnolgy, 2, 169-179; Thompson, J. et al., 1996, J. Mol. Biol., 256, 77-88; Short, M. K. et al., 2002, J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276, 27622-27628).

[0171] 유사한 방법의 항체의 아미노산 잔기 변형방법에 의해 본 발명에 개시된 항체 서열은 CA6에 대한 개선된 친화도를 포함하여 개선된 기능의 항 CA6 항체를 분화시키기 위해 사용될 수 있다.

[0172] 개선된 항체에는 또한 동물 면역화, 하이브리도마 형성 및 특이성을 갖는 항체에 대한 선택 기술에 의해 개선된 특성을 가지는 항체가 포함될 수 있다.

[0173] 세포독소

[0174] 본 발명의 세포독성 접합체에서 사용되는 세포독소는 세포의 파괴를 가져오거나 세포 생존능력을 감소시키는 물질일 수 있다. 바람직한 세포독소는 메이탄시노이드 및 메이탄시노이드 유사물질, 탁소이드, CC-1065 및 CC-1065 유사물질, 돌래스타틴 및 돌래스타틴 유사물질을 포함한다. 당해 세포독소는 항체, 항체 절편, 등기능물, 개선된 항체 및 유사물질에 접합되어 있다.

[0175] 세포독성 접합체는 시험관내 방법으로 제조될 수 있다. 독소나 프로드러그를 항체에 연결시키기 위해 연결기가 사용된다. 적절한 연결기는 당업계에 잘 알려져 있고, 이황화기, 티오에테르기, 산 불안정기(acid labile group), 광 불안정기, 펩티다아제 불안정기 및 에스테라아제 불안정기를 포함한다. 바람직한 연결기는 이황화기 및 티오에테르기이다. 예를 들어, 접합체는 이황화 교환반응을 이용하거나, 항체와 약물 또는 프로드러그 사이에 티오에테르 결합을 형성하여 구성될 수 있다.

[0176] 메이탄시노이드

[0177] 세포독성 접합체를 형성하기 위해 본 발명에서 사용되는 세포독소 중에 메이탄사노이드 및 메이탄시노이드 유사물질이 있다. 적합한 메이탄시노이드의 예에는 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사물질이 포함된다. 메이탄시노이드는 미세관 형성 억제 및 포유류 세포에 대한 높은 독성을 가진 약물이다.

[0178] 적합한 메이탄시놀 유사물질의 예에는 변형된 방향성 고리 함유물질 및 다른 위치에서 변형을 갖는 물질이 있다. 적합한 메이탄시노이드들은 U.S. Patent Nos. 4,424,219; 4,256,746; 4,294,757; 4,307,016; 4,313,946; 4,315,929; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,450,254; 4,322,348; 4,371,533; 6,333,410; 5,475,092; 5,585,499; 및 5,846,545 에 개시되어 있다.

[0179] 변형된 방향성 고리를 갖는 적합한 메이탄시놀 유사물질의 특이한 예는:

[0180] (1) C-19-데클로로(dechloro)(미국특허 4,256,746) (안사미토신 P2(ansamytocin P2)의 LAH 환원에 의해 제조);

[0181] (2) C-20-히드록시 (또는 C-20-데메틸(demethyl)) +/-C-19-데클로로 (미국특허 4,361,650 및 4,307,016) (스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 또는 악티노마이세스(*Actinomyces*)를 이용한 탈메틸화, 또는 LAH를 이용한 탈염소화에 의해 제조); 및

[0182] (3) C-20-데메톡시(demethoxy), C-20-아실옥시(-OCOR), +/-데클로로 (미국특허 4,294,757) (아실 클로라이드를 이용한 아실화에 의해 제조)를 포함한다.

[0183] 다른 위치의 변형을 갖는 적합한 메이탄시놀 유사물질의 특이한 예는:

[0184] (1) C-9-SH (U.S. Pat. No. 4,424,219) (H_2S 또는 P_2S_5 과 메이탄시놀의 반응에 의해 제조);

[0185] (2) C-14-알콕시메틸 (데메톡시/CH_2OR) (U.S. Pat. No. 4,331,598);

[0186] (3) C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH_2OH 또는 CH_2OAc) (U.S. Pat. No. 4,450,254) (*Nocardia* 로부터 제조);

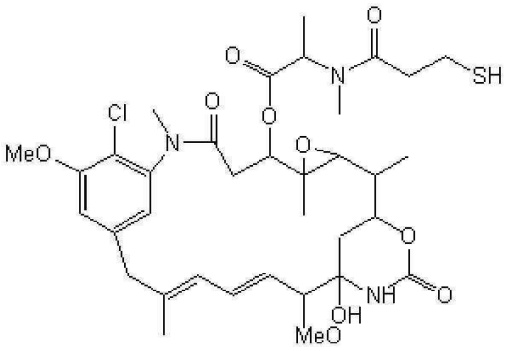
[0187] (4) C-15-히드록시/아실옥시 (U.S. Pat. No. 4,364,866) (*Streptomyces* 에 의한 메이탄시놀의 변환에 의해 제조);

[0188] (5) C-15-메톡시 (U.S. Pat. Nos. 4,313,946 및 4,315,929) (*Trewia* nudiflora로부터 분리됨);

[0189] (6) C-18-N-데메틸(demethyl)(미국특허 4,362,663 및 4,322,348) (스트렙토마이세스(*Streptomyces*)에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조); 및

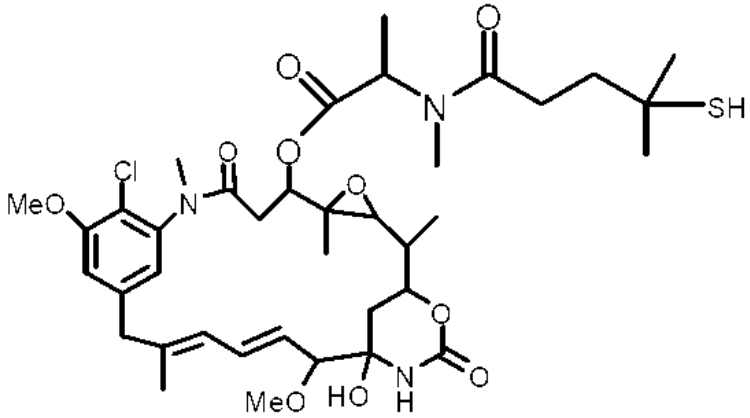
[0190] (7) 4,5-데옥시(deoxy) (미국특허 4,371,533) (메이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드(titanium trichloride)/LAH 환원에 의해 제조)를 포함한다.

[0191] 바람직한 실시예에서 세포독성 접합체는 티올-함유 메이탄시노이드(DM1), 정식명칭으로서 $N^{2'}$-데아세틸(deacetyl)-$N^{2'}$-(3-머갑토-1-옥소프로필)-메이탄신을 세포독소로 사용한다. DM1은 하기 구조식 (I)에 개시되어 있다

[0192] 

(I)

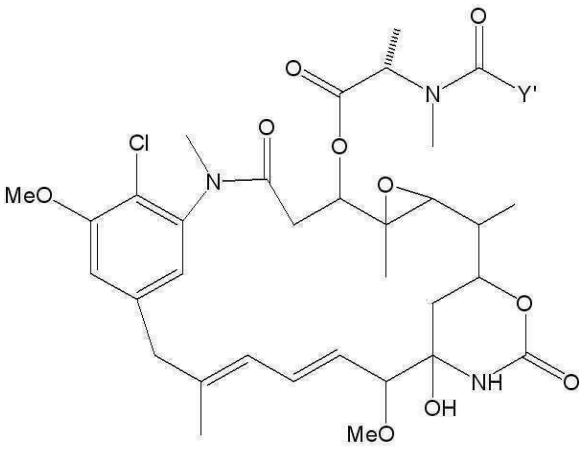
[0193] 또 다른 바람직한 실시예에서 세포독성 접합체는 티올-함유 메이탄시노이드인 $N^{2'}$-데아세틸(deacetyl)-$N^{2'}$-(4-메틸-4-머갑토-1-옥소펜틸)-메이탄신을 세포독소로 사용한다. DM4은 하기 구조식 (II)에 개시되어 있다

[0194] 

(II)

[0195] 또 다른 실시예로서 티올 및 이황화물 함유 메이탄시노이드를 포함하면서 황을 갖는 탄소에서 일- 또는 이-알킬기 치환을 일으키는 메이탄신류가 사용될 수 있다. 이들은 C-3, C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시, 또는 C-20 데스메틸(desmethyl)에서 아실화된 아미노산 측쇄[간섭된 설퍼히드릴기(sulfhydryl group)를 갖는 아실기 가짐]를 갖는 메이탄시노이드이고, 티올 작용기를 갖는 상기 아실기의 탄소 원자는 하나 또는 2개의 치환기를 가지며, 상기 치환기는 CH_3, C_2H_5, 1개 내지 10개의 탄소원자를 갖는 선형 또는 가지형 알킬 또는 알케닐, 3개 내지 10개의 탄소원자를 갖는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이고, 상기 치환기의 하나는 수소일 수 있으며, 아실기는 카르보닐 작용기와 황 원자 사이에서 적어도 3개의 탄소원자길이의 직쇄상 사슬을 갖는다.

[0196] 메이탄신류에는 구조식 (III)으로 개시되는 화합물이 추가된다:

[0197] 

(III)

[0198] Y' 는

[0199] $(CR_7R_8)_l(CR_9{=}CR_{10})_pC{\equiv}C_qA_o(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}{=}CR_{12})_r(C{\equiv}C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$

[0200] 을 나타내며,

[0201] R_1 및 R_2 각각 독립적으로 CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개의 탄소를 갖는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼, 및 R_2 는 추가적으로 H이 될 수 있고;

[0202] A, B, D는 3-10개 탄소를 갖는 시클로알킬 또는 시클로알케닐, 단순 또는 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼;

[0203] R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, 및 R_{12} 각각 H, CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 갖는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로시클릭 방향족 또는

헤테로시클릭 라디칼;

[0204] l, m, n, o, p, q, r, s, t 및 u 는 각각 독립적으로 0 또는 1 내지 5 중의 정수이고, l, m, n, o, p, q, r, s, t 및 u 중 적어도 두 개는 어떤 경우에도 0이 아니며; 및

[0205] Z는 H, SR 또는 -COR, 여기서 R은 1-10개 탄소를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 갖는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 또는 단순 또는 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이다.

[0206] 구조식 (III)의 바람직한 실시예는 구조식 (III)의 화합물을 포함한다. 여기서,

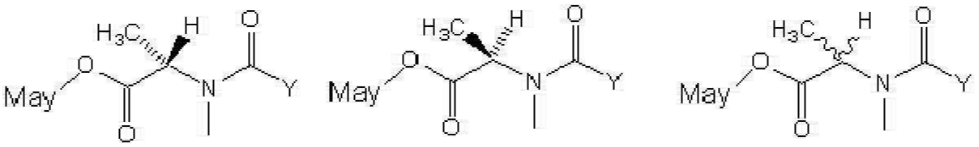
[0207] R_1 는 메틸, R_2 는 H, Z 는 H이다.

[0208] R_1 및 R_2 는 메틸, Z 는 H이다.

[0209] R_1 는 메틸, R_2 는 H, Z 는 $-SCH_3$이다.

[0210] R_1 및 R_2 는 메틸, Z 는 $-SCH_3$이다.

[0211] 메이탄신에는 또한 구조식 (IV-L), (IV-D), 또는 (IV-D,L)에 개시된 물질이 추가적으로 포함된다:

[0212] 

(IV-L)

(IV-D) (IV-D,L)

[0213] 여기서 Y 는 $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$이며,

[0214] R_1 및 R_2 는 각각 CH_3, C_2H_5, 1-10 개 탄소를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 갖는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐 , 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼, 또한 추가적으로 R_2 는 H일 수 있다;

[0215] R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H, CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 갖는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이다;

[0216] l, m 및 n 는 각각 1-5까지의 정수이고, 또한 추가적으로 n 은 0일 수 있다;

[0217] Z는 H, SR 또는 -COR, 여기서 R은 1-10개 탄소를 갖는 선형이거나 가지형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 갖는 시클로 알킬 또는 알케닐, 또는 단순하거나 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼; 및

[0218] May는 C-3, C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시 또는 C-20 데스메틸(desmethyl)에서 측쇄를 갖는 메이탄시노이드를 나타낸다.

[0219] 구조식 (IV-L), (IV-D) 및 (IV-D,L)의 바람직한 실시예는 구조식 (IV-L), (IV-D), (IV-D,L)의 물질을 포함한다:

[0220] R_1 는 메틸, R_2 는 H, R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H, l 및 m 는 각각 1, n 는 0, Z 는 H이다.

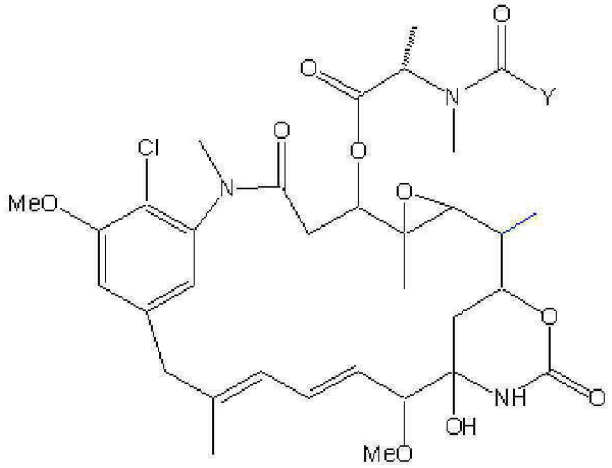
[0221] R_1 및 R_2 는 메틸, R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H, l 및 m 는 1, n 는 0, Z 는 H이다.

[0222] R_1 는 메틸, R_2 는 H, R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H, l 및 m 는 각각 1, n 는 0, Z 는 $-SCH_3$이다.

[0223] R_1 및 R_2 는 메틸(methyl), R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H, l 및 m 는 1, n 은 0, Z 는 $-SCH_3$이다.

[0224] 바람직하게 세포독소는 구조식(IV-L)에 기재되어 있다.

[0225] 메이탄신으로는 구조식 (V)에 기재된 물질이 추가적으로 포함된다 :

[0226] 

(V)

[0227] 여기서 Y 는 $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$이며,

[0228] R_1 및 R_2 는 각각 CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 갖는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼, 추가적으로 R_2 는 H일 수 있다;

[0229] R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H, CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 갖는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼;

[0230] l, m, n 는 각각 1-5 중의 정수이고, 추가적으로 n 은 0일 수 있으며; Z 는 H, SR 또는 COR, 여기서 R 는 1-10개 탄소를 가진 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 가진 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 또는 단순 또는 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이다.

[0231] 구조식(V)의 바람직한 실시예는 구조식 (V)의 물질을 포함한다:

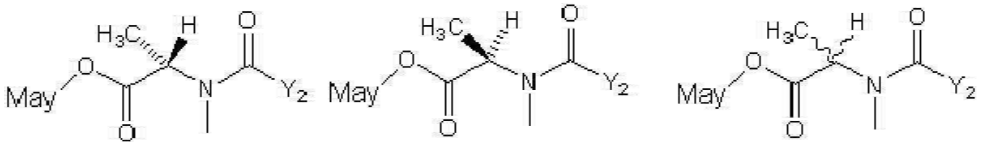
[0232] R_1 은 메틸, R_2 는 H, R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H; l 및 m 는 각각 1; n 은 0; Z 은 H이다.

[0233] R_1 및 R_2 는 메틸; R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H, l 및 m 는 1; n 은 0; Z 는 H이다.

[0234] R_1 은 메틸, R_2 는 H, R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H, l 및 m 은 각각 1, n 은 0, Z 은 $-SCH_3$이다.

[0235] R_1 및 R_2 는 메틸, R_5, R_6, R_7, R_8 은 각각 H, l 및 m 은 1, n 은 0, Z 은 $-SCH_3$이다.

[0236] 추가적인 메이탄신으로는 구조식(VI-L), (VI-D), 또는 (VI-D,L)에 도시된 물질을 포함할 수 있다:

[0237] 

[0238] (VI-L) (VI-D) (VI-D, L)

[0239] 여기서

[0240] Y_2 는 $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$이며,

[0241] R_1 및 R_2 는 각각 CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 가진 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 가진 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼, 추가적으로 R_2 은 H이 될 수 있고;

[0242] R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8 는 각각 H, CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 가진 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 가진

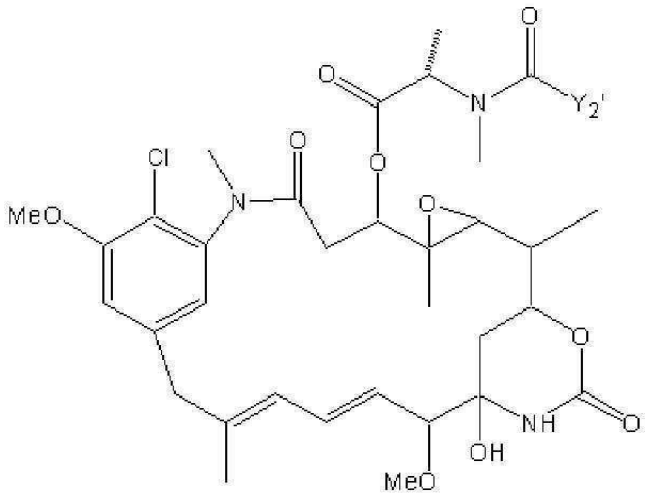
가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이며;

[0243] l, m 및 n는 각각 1-5까지의 정수이고, 추가적으로 n 은 0일 수 있고;

[0244] Z_2는 SR 또는 -COR이고, 여기서 R은 1-10개 탄소를 가진 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 가진 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 또는 단순 또는 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이며;

[0245] May는 메이탄시노이드(Maytansinoid)이다.

[0246] 추가적인 메이탄신에는 또한 구조식(VII)에 도시된 물질이 포함된다:

[0247] 

(VII)

[0248]

[0249] 여기서 Y_2'는 $(CR_7R_8)_l(CR_9{=}CR_{10})p(C{\equiv}C)_q\underline{A}_o(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}{=}CR_{12})_r(C{\equiv}C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$이고,

[0250] R_1 및 R_2 는 각각 CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 가진 선형 가지형 또는 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 가진 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼, 추가적으로 R_2 은 H이 될 수 있고;

[0251] A, B, D는 각각 3-10개 탄소를 가진 시클로알킬 또는 시클로알케닐, 단순 또는 치환된 아릴, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼;

[0252] R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12} 는 각각 H, CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 가진 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 가진 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼;

[0253] l, m, n, o, p, q, r, s, t, 및 u 는 각각 0 또는 1-5의 정수이며, l, m, n, o, p, q, r, s, t, 및 u 중에서 적어도 두 개는 어떠한 경우에도 0이 아니며;

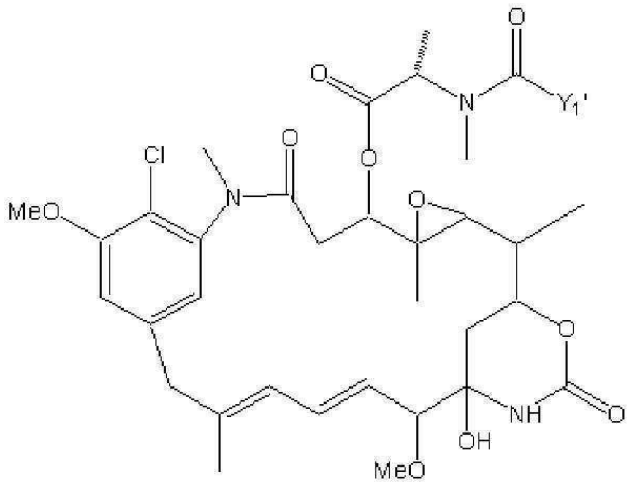
[0254] Z_2은 SR 또는 -COR이고, 여기서 R은 1-10개의 탄소를 포함하는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개의 탄소를 포함하는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 또는 단순하거나 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이다.

[0255] 구조식(VII)의 바람직한 실시예는 구조식(VII)의 화합물을 포함하는데, 여기서 R_1 은 메틸, R2 는 H이다.

[0256] 상기 메이탄시노이드는 항 CA6 항체 DS6, 유사물질 또는 절편에 접합될 수 있으며, 항체는 C-3, C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시 또는 C-20 데스메틸(desmethyl)에서 발견되는 아실화된 아미노산 측쇄의 아실기 상에 존재하는 티올 또는 이황화 작용기를 사용하여 메이탄시노이드에 연결된다. 상기 아실화된 아미노산 측쇄의 아실기는 하나 또는 두 개의 치환기를 갖는 탄소에 위치한 티올 또는 이황화 작용기를 가지며, 여기서 치환기

는 CH_3, C_2H_5, 1-10개 탄소를 가진 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개 탄소를 가진 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이고, 추가적으로 치환기 중 하나는 수소일 수 있으며, 상기 아실기는 카르보닐 작용기와 황원자 사이에 적어도 3개의 탄소원자가 있는 선형 사슬을 가진다.

[0257] 바람직한 접합체는 구조식(VIII)의 메이탄시노이드에 접합된 항 CA6 항체 DS6, 또는 유사물질이나 절편을 포함하는 것이다:

[0258] 

(VIII)

[0259] 여기서, Y_1'는 $(CR_7R_8)_l(CR_9{=}CR_{10})_p(C{\equiv}C)_qA_o(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}{=}CR_{12})_r(C{\equiv}C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$ 이고,

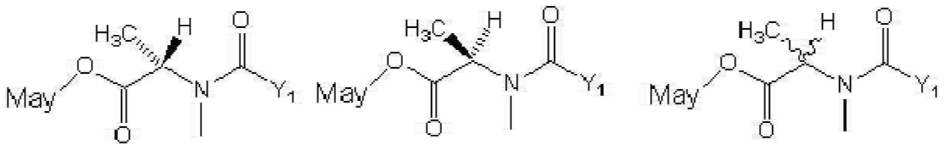
[0260] A, B, D는 3-10개의 탄소를 갖는 시클로알킬 또는 시클로알케닐, 단순 또는 치환 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이고;

[0261] R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} 및 R_{12}는 각각 H, CH_3, C_2H_5, 1-10개의 탄소를 포함하는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개의 탄소를 포함하는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐이거나 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이며;

[0262] l, m, n, o, p, q, r, s, t, 및 u 는 각각 0이거나 1부터 5까지의 정수이고, l, m, n, o, p, q, r, s, t,및 u 중에서 적어도 두 개는 어떠한 경우에도 0이 아니다.

[0263] 바람직하게는 R1은 메틸, R2는 H이거나 R1 및 R2는 메틸이다.

[0264] 보다 바람직한 접합체는 구조식 (IX-L), (IX-D), 또는 (IX-D,L)의 메이탄시노이드에 접합된 항 CA6 항체 DS6, 유사물질 또는 절편을 포함하는 것이다:

[0265] 

[0266] IX-L IX-D IX-D,L

[0267] 여기서 Y1는 $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$이고,

[0268] R_1, R_2는 각각 CH3, C2H5, 1-10개의 탄소를 포함하는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개의 탄소를 포함하는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐이거나 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이며, 부가적으로 R_2는 H가 될 수 있으며;

[0269] R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8는 각각 H, CH_3, C_2H_5, 1-10개의 탄소를 포함하는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10개의 탄소

를 포함하는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐이거나 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클릭 라디칼이며;

[0270] l, m, n 은 각각 1-5 의 정수이고, 부가적으로 n은 0이 될 수 있으며;

[0271] May는 C-3, C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시 또는 C-20 데스메틸(desmethyl)에서 측쇄를 갖는 메이탄시노이드를 나타낸다.

[0272] 구조식 (IX-L), (IX-D), (IX-D,L)의 바람직한 실시예에는 구조식 (IX-L), (IX-D), (IX-D,L)의 물질이 포함된다:

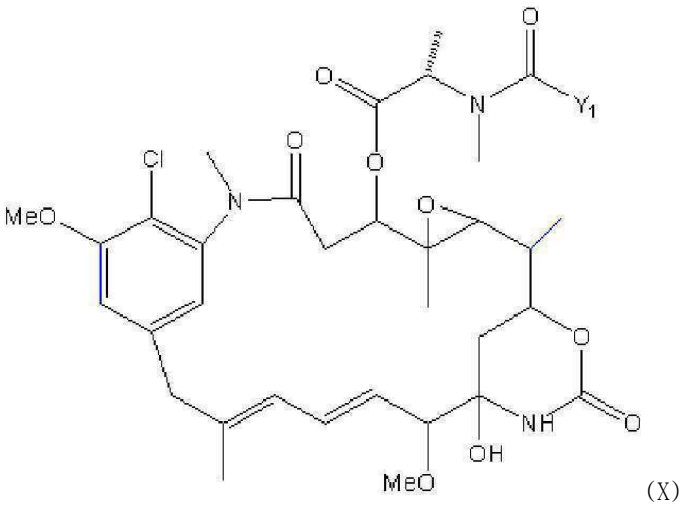
[0273] 여기서 R1은 메틸, R2는 H 또는 R1 및 R2은 메틸,

[0274] R1은 메틸, R2는 H, R5, R6, R7, R8은 각각 H, l 및 m은 각각 1, n은 0,

[0275] R1 및 R2는 메틸, R5, R6, R7, R8은 각각 H, l 및 m은 1, n은 0이다.

[0276] 바람직한 세포독소는 구조식 (IX-L)에 기재되어 있다.

[0277] 보다 바람직한 접합체는 구조식(X)의 메이탄시노이드에 접합된 항 CA6 항체 DS6, 유사물질 또는 절편을 포함한다:

[0278] 

(X)

[0279] 여기서 치환기는 상기 구조식(IX)에 정의되어 있다.

[0280] 상기 기재된 화합물 중 특히 바람직한 것은 R_1은 메틸이고, R_2은 수소이며, R_5, R_6, R_7, R_8은 각각 수소이고, l 및 m은 각각 1이며, n은 0인 경우이다.

[0281] 상기 기재된 화합물 중 보다 특별히 바람직한 것은 R_1 및 R_2은 메틸이고, R_5, R_6, R_7, R_8은 각각 수소이며, l 및 m은 1이고, n은 0인 경우이다.

[0282] 또한, L-아미노아실 광학이성질체(L-aminoacyl stereoisomer)가 바람직하다.

[0283] 본원에서 참고자료로 인용된 U.S. 특허출원번호 10/849,136에서 설명된 메이탄시노이드 각각은 또한 본 발명의 세포독성 접합체로 사용될 수 있다.

[0284] 이황화물 포함 연결기

[0285] 메이탄시노이드를 DS6 항체 등의 세포결합물질에 연결하기 위해 메이탄시노이드는 연결매체를 포함한다. 연결매체에는 특정부위에서 완전히 활성인 메이탄시노이드 방출을 허용하는 화학적 결합이 포함된다. 적절한 화학적 결합은 당업계에 알려져 있고, 이황화결합, 산 불안정 결합, 광 불안정 결합, 펩티다아제 불안정 결합 및 에스테라아제 불안정 결합이 포함된다. 바람직한 결합은 이황화결합이다.

[0286] 연결매체에는 또한 반응성 화학물질이 포함된다. 바람직한 실시예에서 반응성 화학물질은 이황화결합을 통해 메이탄시노이드에 공유결합될 수 있다.

[0287] 특별히 바람직한 반응성 화학물질은 N-숙신이미딜 에스테르(*N*-succinimidyl esters) 및 N-설포숙신이미딜 에

스테르(*N*-sulfosuccinimidyl esters)이다.

[0288] 특별히 반응성 화학물질을 갖는 연결매체를 포함하는 것으로 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀의 C-3 에스테르 및 유사물질로서, 연결물질이 이황화결합을 포함하고, 화학반응물질은 N-숙신이미딜 에스테르 또는 N-설포숙신이미딜 에스테르를 포함한다.

[0289] 메이탄시노이드의 많은 부위가 연결매체를 화학적으로 연결하는 기능을 수행할 수 있다. 예를 들면 히드록실기를 갖는 C-3 부위, 히드록시메틸기로 변형된 C-14 부위, 히드록시기로 변형된 C-15 부위 및 히드록시기를 가지는 C-20 부위는 모두 사용 가능하다. 단 C-3 부위가 바람직하며 메이탄시놀의 C-3 부위가 특히 바람직하다.

[0290] 연결매체를 갖는 메이탄시놀 에스테르의 합성이 이황화결합 포함 연결매체로 설명되어지는 한편, 당업자라면 다른 화학결합을 가진 연결매체도 본 발명에 사용될 것이라는 것을 이해할 것이다. 산 불안정 결합, 광 불안정 결합, 펩티다아제 불안정 결합, 에스테라아제 불안정 결합을 포함하는 다양한 화학결합의 특이한 예가 있다. 참고자료로 인용된 U.S. Patent No. 5,208,020에는 그러한 결합을 생산하는 메이탄시노이드의 제조가 설명되어져 있다.

[0291] 반응기를 생산하는 이황화 물질을 가지는 메이탄시노이드 및 그 유도체의 제조는 U.S. Patent Nos. 6,441,163 및 6,333,410, 및 U.S. Application No. 10/161,651에 설명되어져 있으며, 본 발명의 참고자료로 인용되어 있다.

[0292] DM1 등의 메이탄시노이드 함유 반응기는 DS6 항체 등의 항체와 반응하여 세포독성 접합체를 생산한다. 접합체들은 HPLC 또는 겔 여과(gel-filtration)에 의해 정제될 수 있다.

[0293] 항체-메이탄시노이드 접합체 생산에 대한 다양한 기술은 본 발명에서 참고자료로 인용된 U.S. Patent No. 6,333,410, 및 U.S. Application Nos. 09/867,598, 10/161,651 및 10/024,290에 기술되어 있다.

[0294] 일반적으로 수용성 완충용액 내의 항체 용액은 반응기를 갖는 이황화 성분을 함유하는 몰 과량의 메이탄시노이드와 인큐베이션될 수 있다. 반응 혼합물에 과량의 아민(예를 들어, 에탄올아민, 타우린 등)을 첨가하여 반응을 종료시킬 수 있다. 그런 다음, 메이탄시노이드-항체 접합체는 겔 여과에 의해 정제될 수 있다.

[0295] 항체 분자당 결합된 메이탄시노이드 분자의 수는 분광기로 252 nm 및 280 nm에서 측정한 흡광도 비를 측정하여 결정될 수 있다. 평균 항체 분자 하나 당 1개-10개의 메이탄시노이드 분자 수가 바람직하다.

[0296] 항체와 메이탄시노이드 약물의 접합체는 원하지 않는 다양한 세포주의 시험관 내 증식을 억제하는 능력에 대해 평가될 수 있다. 예를 들면 인간의 편평상피세포암(epidermoid carcinoma) 세포주 A-431, 인간의 소세포 타입 폐암 세포주 SW2, 인간의 유방암 세포주 SKBR3 및 버킷의 임파종 세포주 Namalwa(Burkitt's lymphoma line Namalwa)와 같은 세포주는 이들 화합물의 세포독성 평가를 위해 손쉽게 사용될 수 있다. 평가 세포들은 24시간 동안 화합물에 노출시켰고, 알려진 방법으로 직접 분석하여 생존 세포 비율을 측정하였다. 분석 결과 IC_{50} 값이 산출될 수 있다.

[0297] PEG-함유 연결기

[0298] 메이탄시노이드는 또한 PEG 연결기를 사용하여 세포결합물질에 연결될 수 있는데, U.S. Application No. 10/024,290에 개시되어 있다. 이들 PEG 연결기는 수용액 및 비수용액 모두에서 가용성이고, 하나 또는 그 이상의 세포독소를 세포결합물질에 결합시키기 위해 사용가능하다. 대표적인 PEG 연결기에는 연결기의 반대편 말단에서 한쪽 말단에서는 기능적인 황화수소 또는 이황화 그룹, 다른 말단에서는 활성 에스테르를 통해 세포독소 및 세포결합물질에 결합하는 헤테로-이중기능성 PEG 연결기가 포함된다.

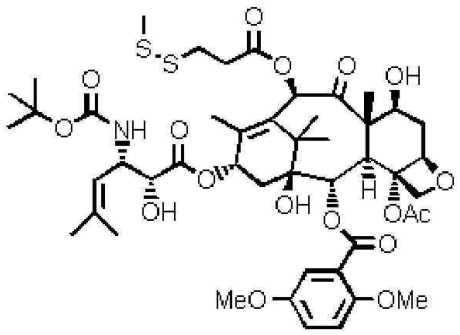
[0299] PEG 연결기를 이용한 세포독성 접합체의 합성에 대한 일반적인 예의 세부사항은 참고자료인 U.S. Application No. 10/024,290에 기술되어 있다. 합성은 반응성 PEG 물질을 생산하는 하나 또는 그 이상의 세포독소와 세포결합물질의 작용으로 개시되어, 세포결합물질의 아미노산 잔기에 의한 각 반응성 PEG 물질의 말단부 활성 에스테르의 교체로 이어져 PEG 연결기를 통해 세포결합물질에 공유결합된 하나 또는 그 이상의 세포독소로 구성된 세포독성 접합체를 생산하게 된다.

[0300] 탁산

[0301] 본 발명에 따른 세포독성 접합체 내에서 사용된 세포독소는 또한 탁산 또는 그 유도체가 될 수 있다.

[0302] 탁산은 세포독성을 갖는 천연물인 파클리탁셀(paclitaxel)[택솔(Taxol)], 및 반-합성의 유도체인 도세탁셀(Docetaxel)[택소티어(Taxotere)]을 포함하는 화합물 군으로서, 이들 두 화합물은 암치료에 널리 사용되는 것이다. 탁산은 세포분열시 방추사 독소로서 튜블린의 탈중합체화를 방해하여 세포사멸을 유도한다. 도세탁셀 및 파클리탁셀이 암치료에 유용한 약제이지만 정상 세포에 대한 비특이적인 독성문제 때문에 이들의 항종양 활성은 제한된다. 또한, 도세탁셀 및 파클리탁셀 등의 화합물은 세포결합물질의 접합에 사용될 만한 능력이 충분하지 않다.

[0303] 세포독성 접합체 제조에 있어서 유용한 바람직한 탁산은 구조식(XI) 의 탁산이다:

[0304] 

(XI)

[0305] 본 발명의 세포독성 접합체 내에서 사용가능한 탁산 합성방법은 항체 등의 세포결합물질에 탁산을 접합시키기 위한 방법을 따라서 U.S. Patent Nos. 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, 6,436,931, 및 U.S. Application Nos. 10/024,290, 10/144,042, 10/207,814, 10/210,112, 10/369,563에 세부사항이 기술되어 있다.

[0306] CC-1065 유사물질

[0307] 세포독성 접합체에서 사용된 세포독소는 또한 CC-1065 또는 그 유도체일 수 있다.

[0308] CC-1065는 스트렙토마이세스 제렌시스(*Streptomyces zelensis*) 배양액으로부터 분리된 강력한 항종양 항생물질이다. CC-1065는 독소루비신(doxorubicin), 메토트렉사트(methotrexate), 빈크리스틴(vincristine) 등의 일반적인 항암제보다 시험관 내에서 약 1000배 이상 효능이 있다(B.K. Bhuyan et al., *Cancer Res.*, 42, 3532-3537 (1982)). CC-1065 및 유사물질은 U.S. Patent Nos. 6,372,738, 6,340,701, 5,846,545, 5,585,499에 개시되어 있다.

[0309] CC-1065의 세포독성능은 그것의 알킬화 활성과, DNA-결합활성 또는 DNA-삽입활성(DNA-intercalating activity)과 연관되어 있다. 이들 두가지 활성은 분자에 있어서 상호 떨어진 부위에 존재한다. 따라서 알킬화 활성은 시클로프로파피롤로인돌(CPI) 서브 유닛에 존재하고 DNA-결합활성은 두 개의 피롤로인돌 서브 유닛에 존재한다.

[0310] 비록 CC-1065가 세포독소로서 특징적인 면을 지니지만, 치료용으로는 한계를 가진다. CC-1065를 생쥐에 주입하면 지속된 간독성을 일으켜서 혈관내에 1회당 12.5 μg/kg을 투여한 지 50일 만에 사망으로 이어졌다 {V. L. Reynolds et al., J. Antibiotics, XXIX, 319-334 (1986)}. 이로 인해 지속된 독성을 일으키지 않는 유사물 개발노력을 자극하였고, CC-1065를 모델로 한 보다 단순한 유사물 합성은 개시되었다{M.A. Warpehoski et al., J. Med. Chem., 31, 590-603 (1988)}.

[0311] 다른 유사물에서, CPI 부위가 시클로프로파벤지인돌(CBI)로 대체되었다[D.L. Boger et al., J. Org. Chem., 55, 5823-5833, (1990), D.L. Boger et al., BioOrg. Med. Chem. Lett., 1, 115-120 (1991)]. 이들 화합물은 모체 약물의 높은 시험관 내 약물효능을 유지하면서도 마우스에 지연성 독성을 일으키지 않는다. CC-1065처럼 이들 화합물은 DNA의 마이너 그루부(minor groove)에 공유결합하여 세포사멸을 유발하는 알킬화제이다. 그러나, 가장 유망한 유사체인 아도젤레신(Adozelesin) 및 카젤레신(Carzelesin)에 대한 임상실험은 실망스런 결과를 가져왔다[B.F. Foster et al., Investigational New Drugs, 13, 321-326 (1996); I. Wolff et al.,

Clin. Cancer Res., 2,1717-1723 (1996)]. 이들 약제는 높은 전신 독성 때문에 낮은 치료효과를 나타낸다.

[0312] CC-1065 유사물의 치료효능은 생체 내에서 종양부위로의 표적화된 전달을 통해 생체 내 분포를 변화시킴으로써 크게 개선될 수 있고, 결과적으로 비표적 조직에 대한 보다 낮은 독성 그리고 보다 낮은 전신 독성을 유발하게 된다. 목적 달성을 위해 특이적으로 종양 세포를 표적화하는 유사물 및 CC-1065의 유도체와 세포결합물질과의 접합체가 개시되어 있다 {US Patents; 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545}. 이들 접합체는 전형적으로 시험관 내에서 높은 표적특이적 세포독성을 나타내며, 마우스의 인간 종양 이종이식 모델에서 예외적인 항종양 활성을 나타낸다{R.V. J. Chari et al., Cancer Res., 55, 4079-4084 (1995)}.

[0313] 본 발명의 세포독성 접합체에서 사용될 수 있는 CC-1065 유사물 합성방법은 항체 등의 세포결합물질에 유사물을 접합시키기 위한 방법을 따라서 U.S. Patent Nos. 5,475,092, 5,846,545, 5,585,499, 6,534,660, 6,586,618 및 U.S. Application Nos. 10/116,053 및 10/265,452에 세부사항이 기술되어 있다.

[0314] 다른 약제

[0315] 메토트렉사트(methotrexate), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 멜팔란(melphalan), 미토마이신 C(mitomycin C), 클로람부실(chlorambucil), 칼리케아미신(calicheamicin), 튜불리신(tubulysin), 튜불리신 유사체(tubulysin analogs), 듀오카르마이신(duocarmycin) 및 듀오카르마이신 유사체, 돌라스타틴(dolastatin) 및 돌라스타틴 유사체 등의 약제 또한 본 발명의 접합체 제조에 적합하다. 약제 분자는 혈청 알부민 등의 중간매개분자를 통해 항체 분자에 연결될 수 있다. 독사루비신(Doxarubicin) 및 다노루비신(Danorubicin) 화합물 또한 유용한 세포독소이며, 예를 들면 U.S. Serial No. 09/740991에 기재되어 있다.

[0316] 치료용 조성물

[0317] 또한 본 발명은 다음과 같은 치료용 조성물을 제공한다:

[0318] (a) 유효량의 하나 또는 그 이상의 세포독성 접합체, 및

[0319] (b) 약학적으로 수용가능한 담체(carrier).

[0320] 유사하게 본 발명은 유효량의 세포독성 접합체 또는 세포독성 접합체 함유 치료제를 단독 또는 다른 세포독소나 치료제와 함께 사용하여 접근성 표적세포로 구성된 선택된 세포집단 또는 표적세포로 구성된 조직의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0321] 본 발명에는 본 발명의 치료용 조성물을 사용하여 암을 가지는 숙주를 치료하는 방법이 포함된다.

[0322] 이전에 기술된 방법에 의해 세포독성 접합체의 시험관 내 효능 및 특이성을 평가할 수 있다 (예를 들면, R.V.J. Chari et al, Cancer Res. 55:4079-4084 (1995)). 생쥐에서 인간종양 이종이식모형에 의해 항종양 활성을 평가할 수 있다 (예를 들면, Liu et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623 (1996) 참조).

[0323] 적합한 제약학적으로 허용가능한 담체는 잘 알려진 것으로서 임상 상황이 허용하는 바에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다. 여기서 사용된 바와 같이 담체로는 희석제 및 부형체(excipient)가 포함된다.

[0324] 적절한 담체, 희석제 및/또는 부형제의 예로서는 (1) 약 1-25 mg/ml의 인간 혈청 알부민을 포함하거나 포함하지 않는 둘베코(Dulbecco) 인산완충식염수(pH ~ 7.4), (2) 0.9% 생리식염수 (0.9% w/v NaCl), 및 (3) 5% (w/v) 덱스트로스를 포함하고, 또한 트립타민(tryptamine)과 같은 항산화제 및 트윈 20(Tween 20)과 같은 안정화제를 포함할 수도 있다.

[0325] 선택된 세포집단의 생장을 억제하는 방법은 시험관 내, 생체 내, 생체 외에서 실시될 수 있다. 여기서 사용된 바와 같이 생장 억제는 단시간 또는 장시간에 걸친 세포생장 지연, 세포 생존율 감소, 세포 사멸 유발, 세포 용해 및 세포사멸 유도를 의미한다.

[0326] 시험관 내 사용의 예에는 질환을 갖고 있는 세포 또는 종양성 세포를 죽이기 위한 동일한 환자로의 이식에 앞선 자가 골수 처치; 면역력 있는 T 세포 사멸 및 이식편대숙주질환(GVHD) 방지를 위한 이식에 앞선 골수 처치; 표적 항원을 발현하지 않는 변이를 제외한 모든 세포를 죽이기 위해, 또는 원하지 않는 항원을 발현하는 변이를 죽이기 위한 세포배양물 처치가 포함된다.

[0327] 비-임상적인 시험관 내 사용 조건은 당업자에 의해 쉽게 결정된다.

[0328] 임상적인 생체 밖(*ex vivo*) 사용의 예는 암치료 또는 자가면역질환 치료에 있어서 자가 이식에 앞서 종양 세포 또는 임파구를 골수로부터 제거하거나, 이식편대숙주질환(GVHD) 방지를 위해 이식에 앞서 T 세포와 다른 임파구를 자가 또는 동종의 골수 또는 조직으로부터 제거하는 것이다. 치료는 다음과 같이 수행될 수 있다. 골수가 환자 또는 다른 개인으로부터 추출되고 본 발명의 세포독소가 첨가되어 있는 혈청이 포함된 배지에서 배양된다. 농도는 약 10μM 에서 1pM로 하고, 배양시간은 약 37°C에서 약 30 분에서 약 48 시간으로 한다. 정확한 배양 농도 및 시간 조건, 즉 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정된다. 배양 후에 골수세포는 혈청을 포함하는 배지로 세척되고, 알려진 방법에 따른 정맥 내 주입에 의해 환자에게 복귀시킨다. 골수 추출과 처치된 세포의 재주입 시간 사이에 파괴성 화학요법이나 전신 방사선 치료와 같은 다른 치료를 받고 있는 환자의 경우, 처치된 골수세포는 표준 의료장비를 사용하여 액화질소에서 냉동 저장된다.

[0329] 생체 내 임상용 사용을 위한 세포독성 접합체는 무균 및 내독소(endotoxin) 수준에 대해 테스트된 용액으로서 제공될 것이다. 적절한 세포독성 접합체 투여의 예는 다음과 같다. 접합체는 4주 동안 매주 정맥 볼루스(bolus)로서 투여된다. 일반적인 생리적 식염수 50-100 ml(5-10 ml의 인간 혈청 알부민이 첨가될 수 있음)로 볼루스 투여가 이루어진다.

[0330] 투여량은 1회 정맥 내 투여 당 10 μg-100 mg이 될 것이다(하루에 100 ng-1 mg/kg의 범위).

[0331] 보다 바람직하게 투여량은 50 μg-30 mg이 될 것이다. 가장 바람직하게는 1-20 mg이 될 것이다. 4주간의 치료 후에 환자는 주간 단위로 치료를 계속 받을 수 있다. 투여 방식, 부형제, 희석제, 투여량, 시간 등에 관한 특정 임상 프로토콜은 임상 상황이 허용하는 바에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0332] 선택된 세포집단을 사멸시키는 생체 내 또는 생체 밖 방법에 따라 치료될 수 있는 의학적 조건들의 예로는 모든 형태의 악성종양으로서, 폐암, 유방암, 결장암, 전립선암, 신장암, 췌장암, 난소암, 자궁경부암, 임파선암, 골육종, 활액종, CA6가 발현되는 육종 또는 암종, 그리고 CA6 글리코토프가 우세하게 발현되는 것으로 결정된 다른 암들; 전신 루푸스, 류마티스 관절염, 다발성 경화증 등의 자가면역 질환; 신장 이식거부, 간 이식거부, 폐 이식거부, 심장 이식거부, 골수 이식거부 등의 이식거부; GVHD 질환; mV 감염, HIV 감염, AIDS 등의 바이러스 감염; 그리고 람블편모충증(giardiasis), 아메바증(amoebiasis), 주혈흡충병(schistosomiasis) 등의 기생충 감염 및 다른 감염을 포함한다.

[0333] 키트(Kit)

[0334] 본 발명은 키트, 예를 들면 전술한 세포독성 접합체를 포함하는 키트, 및 특정 세포 유형을 사멸시키기 위한 세포독성 접합체의 사용방법(사용지침)을 포함한다. 상기 사용방법에는 세포독성 접합체를 시험관 내, 생체 내, 생체 외에서 사용하기 위한 지침이 포함된다.

[0335] 일반적으로 키트는 세포독성 접합체를 포함하는 콤파트먼트(compartment)를 가진다. 세포독성 접합체는 냉동건조형태, 액상, 또는 장치 내에 포함될 수 있도록 수정가능한 다른 형태일 수 있다. 키트는 키트 내의 지시사항에 기술된 방법을 실시하기 위해 필요한 부가요소, 예를 들면 냉동건조 분말을 재구성하기 위한 살균용액, 환자에 투여하기 전 세포독성 접합체와 결합하기 위한 첨가물, 환자에 접합체를 투여하기 위한 보조물을 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0336] 도 1은 DS6 항체의 선별된 암세포 라인 표면 결합능을 결정하기 위해 수행된 연구결과를 보여준다. DS6 1차 항체와 FITC 접합 항마우스 IgG(H+L) 2차 항체로 배양된 세포라인의 형광도는 유세포 분석기로 측정되었다. DS6 항체는 Caov-3 (도 1A) 및 T-47D (도 1B)세포를 각각 1.848 nM 및 2.586 nM Kd로 결합시켰다. 항원 음성 세포라인, 즉 SK-OV-3 (도 1C) 및 Colo205 (도 1D)은 어떠한 항원 특이성 결합도 나타내지 않았다.

도 2는 항원결정기 발현의 도트 블롯팅(dot blotting) 분석 결과를 보여준다. Caov-3 (도 2A 및 도 2B), SKMEL28 (도 2C), Colo205 (도 2D) 세포 용해물은 각각 니트로셀룰로오스막으로 떨어진 후에 각각 프로나아제, 프로테이나아제 K, 뉴라미니다아제 또는 과요오드산으로 배양되었다. 이후 세포막은 DS6 항체(도 2A), CM1 항체 (도 2B), R24 항체 (도 2C) 또는 C242 항체 (도 2D)로 면역블롯팅(immunoblotting)되었다.

도 3은 DS6 항원발현의 도트 블롯팅(dot blotting) 분석 결과를 보여준다. Caov-3 세포 용해물은 각각 PVDF 막으로 떨어진 후에 트리플루오로메탄술폰산(TFMSA)의 존재하에 배양되었다. 이후 세포막은 CM1 항체 (1 & 2) 또는 DS6 항체 (3 & 4)로 면역블롯팅(immunoblotting)되었다.

도 4는 DS6 항원의 글리코토프 분석 결과를 보여준다. N-글리카나아제("N-gly"), O-글리카나아제("O-gly") 및/또는 시알리다제("S")로 선처리된 Caov-3 용해물은 니트로셀룰로오스로 떨어진 후에 DS6 항체 또는 CM1 항체(Muc-1 VNTR)로 면역블롯팅(immunoblotting)되었다.

도 5는 DS6 항원의 웨스턴 블롯 분석결과를 보여준다. 세포용해물은 DS6 항체로 면역침전("IP")되고 면역블롯팅되었다. 항원은 항원 양성 Caov-3 (도 5A 및 5B), T47D (도 5C) 세포에서 발견된 250 kDa이상의 단백질밴드에 해당한다. 항원 음성 SK-OV-3 (도 5D), Colo205 (도 5E) 세포라인은 밴드를 나타내지 않는다. 면역침전 후, Caov-3 세포용해물의 단백질 G 비드(bead)는 뉴라미니다아제("N")(도 5A) 또는 과요오드산("PA")(도 5B)로 배양되었다. 항체("α"), 전(前)-IP("Lys") 및 후(後)-IP 유동통과 ("FT") 세포용해물 대조군들을 동일한 겔에서 이동시켰다. 또한 Caov-3 면역침전물은 N-글리카나아제("N-gly"), O-글리카나아제("O-gly") 및/또는 시알리다아제("S") (도 5F 참조)로 배양되었으며, 블롯은 순차적으로 비오틸화된 DS6 및 스트렙타비딘-HRP 로 감지되었다.

도 6은 Caov-3 (도 6A) 및 HeLa (도 6B) 세포 용해물 상에서 DS6 항체 및 CM1 항체의 면역침전 및/또는 면역블롯팅 결과를 나타낸다. CM1 및 DS6의 중복되는 웨스턴 블롯팅 신호는 DS6 항원이 Muc1 단백질 상에 존재함을 의미한다. HeLa 세포용해물에 있어서, Muc1 이중선은 탠덤반복(tandem repeat)의 수에서 다른 대립유전자들에 의해 지시되는 Muc1 발현의 결과이다.

도 7은 DS6 항체 샌드위치 ELISA 고안 (도 7A)과 표준곡선 (도 7B)를 보여준다. 표준곡선은 알려진 상업용 CA15-3 표준 농도를 사용하여 생성되었다 (1 CA15-3 단위는 1 DS6 단위에 해당함).

도 8은 정량적인 ELISA 표준 곡선을 나타낸다. 검출 항체 (스트렙타비딘-HRP/비오틴-DS6) 신호의 표준 곡선 (도 8C)은, 플레이팅된 염소의 항-마우스 IgG에 의해 포획되거나(도 8A), ELISA 플레이트 상에 직접 결합된 (도 8B) 비오틴-DS6의 알려진 농도를 이용하여 결정되었다.

도 9는 생쥐 DS6 항체에 대한 경쇄(도 9A) 및 중쇄(도 9B) 가변영역의 cDNA 및 아미노산 서열을 나타낸다. 각 서열에서 3개의 CDRs에 대해 밑줄이 그어져 있다(Kabat 정의).

도 10은 Kabat 정의로 된 생쥐 DS6 항체의 경쇄 (도 10A)및 중쇄 (도 10B) CDR를 보여준다. AbM 모델 소프트웨어에서는 중쇄 CDR에 대해 다소 상이한 값을 보여준다 (도 10C).

도 11은 IgVKap4(SEQ ID NO:23) 및 IgVhJ558.41(SEQ ID NO:24) 유전자에 대한 생식세포 서열로 정렬된 생쥐 DS6 항체의 경쇄("muDS6LC")(SEQ ID NO:7의 1-95 잔기) 및 중쇄("muDS6HC")(SEQ ID NO:9의 1-98 잔기) 아미노산 서열을 보여준다. 회색은 서열 차이를 나타낸다.

도 12는 브루크하벤 데이타베이스에서 구조파일을 결정하는 생쥐 DS6 (muDS6) 경쇄 ("muDS6LC") 및 중쇄 ("muDS6HC")서열에 가장 근접한 열 개의 경쇄 및 중쇄 항체 서열을 보여준다. 서열들은 최저 근접 순으로 정렬되어있다.

도 13은 생쥐 DS6 항체 경쇄 가변영역의 구조 잔기가 표면 접근성이 있는지 예견하기 위한 데이터 및 계산을 보여준다. 평균 25-35%의 표면 접근성을 가진 부분은 "??"로 표시되어 있으며, 2차 분석에 들어가도록 되어 있었다. DS6 항체 경쇄 가변영역 (도 13A) 및 중쇄 가변영역 (도 13B).

도 14는 prDS6 v1.0 포유류 발현 플라스미드 지도를 보여준다. 본 플라스미드는 재조합 쉬메릭 및 인간화 DS6 항체를 생성하고 발현하도록 사용되었다.

도 15는 생쥐("muDS6") 및 인간화("huDS6")(v1.0 & v1.2) DS6 항체 경쇄 (도 15A) 및 중쇄 (도 15B) 가변 도메인의 아미노산 서열을 보여준다.

도 16은 인간화 DS6 항체("huDS6") (v1.0 & v1.2)에 대한 경쇄 가변영역의 cDNA 및 아미노산 서열을 보여준다.

도 17은 인간화 DS6 항체("huDS6")v1.0 (도 17A) 및 v1.2(도 17B)에 대한 중쇄 가변영역의 cDNA 및 아미노산 서열을 보여준다.

도 18은 WISH 세포에서 수행된 시험으로부터 획득한 muDS6, huDS6 클론의 유세포 분석기 결합곡선을

보여준다. 쉬메릭, v1.0, v1.2 인간 DS6 클론(각 Kd=3.15, 3.71, 4.20 nM)의 결합친화도 (도 18A)는 누드 및 비오틸화 생쥐 DS6 (각 Kd=1.93, 2.80 nM)에 상당한다(도 18B).

도 19는 huDS6와 muDS6 항체 간의 경쟁 결합실험 결과를 보여준다. WISH 세포는 적정 Kd 6.76 nM를 가진 결합곡선을 생성하는 비오틴-muDS6 및 스트렙타비딘-DTAF로 배양되었다(도 19A). 비오틴이 결합되지 않은 muDS6 및 v1.0, v1.2 huDS6의 농도를 변화시키면서 2nM의 비오틴-muDS6과 2차 스트렙타비딘-DTAF를 넣어 주는 방식으로 어세이를 수행하였다.

도 20은 비접합 DS6 항체 대 DS6 항체-DM1 접합체의 결합 친화도 결정 결과를 보여준다. DM1 접합이 항체의 결합친화도에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 결과를 보여주었다. DS6 항체-DM1 접합체 (3.902nM)("DS6-DM1")의 적정 Kd값은 누드 항체 (2.020 nM)("DS6")보다 다소 높았다.

도 21은 DS6 항체를 항마우스 IgG (H+L) DM1 접합체(2° Ab-DM1)의 존재 또는 부존재하에서 간접적인 세포 생존능력 실험한 결과를 보여준다. 항원 양성 Caov-3 세포는 2차 접합체("DS6 + 2° Ab-DM1") 존재하에서만 DS6 항체 의존 방식(IC_{50}=424.9 pM)으로 파괴되었다.

도 22는 DS6 항체와 인간화 DS6 항체의 상호의존 세포독성(CDC) 분석결과를 보여준다. 결과에 따르면 HPAC (도 22A) 및 ZR-75-1 (도 22B)세포에서 DS6 항체 또는 인간화 DS6 항체(v1.0 및 v1.2)의 CDC 매개효과는 없었다.

도 23은 DS6 항체-DM1 접합체 대 자유 메이탄신의 생체 외 세포독성 분석결과를 보여준다. 집락형성분석에서는 DS6 항원-양성 난소암 세포주(도 23A), 유방암 세포주(도 23B), 자궁경부암 세포주(도 23C) 및 췌장암 세포주(도 23D)가 DS6 항체-DM1 컨쥬게이트에 대한 지속적인 노출로 인한 세포독성에 대해 시험되었다(왼쪽 칸). 이들 세포주는 메이탄신 단독에 대해 72시간 노출시켜 메이탄신 민감도에 대해 유사하게 시험되었다(오른쪽 칸). 시험된 난소암 세포주는 OVCAR5, TOV-21G, Caov-4 및 Caov-3이었다. 시험된 유방암 세포주는 T47D, BT-20 및 BT-483이었다. 시험된 자궁경부암 세포주는 KB, HeLa 및 WISH였다. 시험된 췌장암 세포주는 HPAC, Hs766T 및 HPAF-II였다.

도 24는 DS6 항체-DM1 접합체의 시험관내 세포독성 실험결과를 나타낸다. MTT 세포생존율 실험에서, 인간 난소암 세포주(도 24A, 도 24B, 도 24C), 유방암 세포주(도 24D, 도 24E), 자궁경부암 세포주(도 24F, 도 24G) 및 췌장암 세포주(도 24H, 도 24I)는 DS6 항체-DM1 접합체 의존적인 방식으로 사멸되었다. 접합되지 않은 DS6 항체는 이들 세포들의 생장에 악영향을 주지 않아 세포독성효과를 위해서는 DM1 접합이 필요함을 알 수 있다.

도 25A는 피하 KB 종양 이종이식에서의 DS6 항체-DM1 접합체의 생체 내 항 종양 효능연구 결과를 보여준다. 종양 세포는 0 일에 주입되고, 6 일에 1차 치료가 행해졌다. 면역접합 치료는 총 5회분 투여량으로 매일 지속적으로 처치되었다. PBS 대조군 동물은 종양 용적이 1500mm^3을 초과하면 안락사시켰다. 접합체는 항체 농도 각각 5.7 및 8.5 mg/kg에 상응하는 1회 150 또는 225 μg/kg DM1이 주입되었다. 생쥐의 체중 (도 25B)이 연구 진행중 측정되었다.

도 26은 피하 종양 이종이식에서의 DS6 항체-DM1 접합체의 항암 효능연구 결과를 보여준다. OVCAR5 (도 26A, 26B), TOV-21G (도 26C, 26D), HPAC(도 26E, 26F), HeLa (도 26G, 26H) 세포는 0 일에 주입되고, 면역접합 치료는 6 일, 13일에 행해졌다. PBS 대조군 동물은 종양 용적이 1000mm^3을 초과하면 안락사시켰다. 접합체는 항체 농도 27.7 mg/kg에 상응하는 1회 600 μg/kg DM1이 주입되었다. 생쥐의 종양 용적(도 26A, 26C, 26E, 26G) 및 체중(도 26B, 26D, 26F, 26H)이 연구 진행중 측정되었다.

도 27은 복부 OVCAR5 종양에서의 DS6 항체-DM1 접합체의 생체 내 효능 연구결과를 보여준다. 종양 세포는 복부에 0일에 주입되고, 면역접합 치료는 6일, 13일에 행해졌다. 동물은 체중 손실이 20%을 초과하면 안락사시켰다.

도 28은 HeLa 세포에서의 누드 및 탁산 접합 DS6 항체의 결합친화도로부터 유세포분석기 결합곡선을 보여준다. 탁산(MM1-202) 접합은 역으로 항체의 결합친화도에 영향을 미치지 않는다. DS6-MM1-202 접합체의 적정 Kd (1.24nM)값은 누드 DS6 항체(620 pM)보다 다소 높았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0337] 본 발명은 검색 또는 진단용으로 표지되는 단일클론항체, 인간화 항체 및 항원결정기 결합절편을 제공한다.

바람직한 실시예에서 표지는 방사능, 형광체(fluorophore), 조영물 또는 금속이온이 있다.

[0338] 상기 표지된 항체 또는 항원결정기 결합절편이 암을 가진 것으로 의심되는 숙주에 투입되는 진단방법은 제공되고, 숙주의 체내에서 표지의 분배가 측정된다.

[0339] 광범위한 본 발명은 다음 실시예들을 참고하여 이해될 수 있으며, 실시예들은 특정 실시예에 한정하도록 의도하고 있지 않다.

[0340] 실시예 1: 유세포분석 결합시험에 의한 항원 양성 및 음성 세포주의 확인

[0341] 유세포분석은 DS6 항원결정기, CA6를 세포 표면에 DS6 에피토프인 CA6의 위치를 결정하기 위해 사용되었다. 인간 세포주는 OVCAR5 (Kearse et al., *Int. J. Cancer* 88(6):866-872 (2000)), OVCAR8 및 IGROV1 세포 (M. Seiden, Massachusetts General Hospital)를 제외하고 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 입수하였다. 모든 세포들은 이후 배지로서 언급되는 4 mM의 L-글루타민, 50 U/ml의 페니실린, 50㎍/ml의 스트렙토마이신(Cambrex Bio Science, Rockland, ME) 및 10% v/v의 우태아 혈청(fetal bovine serum) (Atlas Biologicals, Fort Collins, CO)이 보충된 RPMI 1640에서 생장시켰다. 세포들은 37℃, 5% CO_2의 습도조절된 인큐베이터에서 배양되었다.

[0342] 세포들($1-2\times10^{-5}$ cells/well)은 96-웰 플레이트에서 FACS 완충용액(2% 염소 혈청, RPMI)으로 순차적으로 농도가 희석된 DS6 항체와 함께 얼음 위에서 3-4 시간 동안 배양되었다. 세포들은 4℃에서 테이블 탑 원심분리기(table top centrifuge)에서 5분간 1500rpm으로 회전시켜 침강시켰다. 배지를 제거한 후에 웰은 150 ㎕의 FACS 완충용액으로 다시 채워졌다. 그런 다음 세척단계가 반복되었다. FITC-표지된 염소의 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch)가 FACS 완충용액으로 1:100 희석되었으며, 얼음 위에서 1시간 동안 세포와 함께 배양되었다. 플레이트는 빛에 의한 신호의 광탈색을 막기 위해 호일(foil)로 덮여졌다. 2회 세척 후에 세포는 1% 포름알데히드로 고정되고 유세포분석기로 분석되었다.

[0343] CA6 항원결정기는 종양 면역조직화학으로부터 예상된 바와 같이 난소, 유방, 자궁경부 및 췌장 근원 (표 3)의 세포라인에서 발견되었다. 한편, 몇몇 다른 종양 유형의 세포라인은 제한된 CA6 발현을 나타냈다. DS6 항체는 135.6 pM의 적정 K_D로 결합한다(PC-3 세포내에서, 도 3). 항원 양성 세포라인 내에서의 결합곡선 (도 1)의 최대 형광평균(mean fluorescence) (표 3)은 상대적 항원 농도를 암시한다.

표 3

[0344]

세포라인	조직	항원	MMF*	적정 Kd (M)		세포라인	조직	항원	MMF*	적정 Kd (M)
HL-60	혈액	-				Caov-3	난소	+	465.20	5.478x 10-09
Jurkat	혈액	-				Caov-4	난소	+	149.00	4.043 x 10-09
Namalwa	혈액	-				ES-2	난소	-		
U-937	혈액	-				IGROV1	난소	-		
T98G	뇌	+	35.94	1.775 X 10-10		OV-90	난소	-		
BT-20	유방	+	232.20	9.142 x 10-10		OVCAR-3	난소	-		
BT-474	유방	-				OVCAR5	난소	+	97.10	1.473 x 10-09
BT-483	유방	+	1911.00	1.366 x 10-08		OVCAR8	난소	-		
BT-549	유방	+	71.39	1.046 x 10-09		PA-1	난소	-		

CAMA-1	유방	+	12.46	2.330×10^{-09}		SK-OV-3	난소	-		
MCF-7	유방	+	81.41	2.890×10^{-09}		SW 626	난소	-		
MDA-MB-157	유방	+	8.635	1.972×10^{-10}		TOV-112D	난소	-		
MDA-MB-231	유방	+	31.85	1.460×10^{-09}		TOV-21G	난소	+	87.79	3.067×10^{-10}
MDA-MB-468	유방	+	71.58	8.127×10^{-10}		AsPC-1	췌장	-		
SK-BR-3	유방	-				BxPC-3	췌장	+	79.99	5.263×10^{-09}
T-47D	유방	+	559.58	3.424×10^{-09}		HPAC	췌장	+	2228.00	2.348×10^{-08}
ZR-75-1	유방	+	811.67	4.299×10^{-09}		HPAF-II	췌장	+	266.50	2.811×10^{-09}
HeLa	자궁경부	+	242.50	6.938×10^{-10}		Hs766T	췌장	+	182.90	2.319×10^{-09}
KB	자궁경부	+	119.56	1.110×10^{-09}		MIAPaCa2	췌장	-		
WISH	자궁경부	+	1133.55	2.380×10^{-09}		MPanc96	췌장	-		
Colo205	장	-				SU.86.86	췌장	+	36.86	1.043×10^{-09}
DLD-1	장	-				SW1990	췌장	+	36.17	3.679×10^{-10}
HCT-8	장	-				PC-3	전립선	+	24.81	1.356×10^{-10}
HT-29	장	-				A375	피부	-		
Caki-1	신장	-				SKMEL28	피부	-		
A549	폐	-				KLE	자궁	-		
SW2	폐	-								

[0345] *average maximum relative mean fluorescence

[0346] 실시예 2: DS6 항원결정기의 특정

[0347] DS6 항원인 CA6의 특성을 단백질가수분해 (프로나아제 및 프로테이나아제 K) 및/또는 당분해 (뉴라미니다아제 및 과요오드산)에 의해 분해된 CA6-양성 세포용해물(또는 세포여액)(Caov-3)의 도트 블랏(dot blot)을 면역블롯팅(immunoblotting)에 의해 분석하였다. 양성 대조군을 위해, 다양한 항원결정기를 인식하는 다른 항체들이 항원 양성 세포라인의 용해물 상에서 테스트되었다 (Caov-3 및 CM1; Colo205 및 C242; SKMEL28 및 R24). CM1

는 Muc-1의 다수 탠덤 반복 도메인(VNTR)의 단백질 항원결정기를 인식하여 단백질 항원결정기를 조절하는 항체이다. C242는 단백질 위에서 글리코토프를 조절하는 Muc-1상의 새로운 결장암 특이적 시알릭산-의존성 글리코토프에 (CanAg) 결합한다. R24는 흑색종에 특이적이고 비단백질 골격상에서 글리코토프를 조절하는 GD3 갱글리오시드에 결합한다.

[0348] Caov-3, Colo205, 및 SKMEL28 세포들은 15cm 조직배양 플레이트에 이식되었다. 배지(30mL/plate)는 용해 전날에 새로 갈아주었다. 변형된 RIPA 완충액 (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0.25% DOC), 프로테아제 억제제 [PMSF, 펩스타틴 A(Pepstatin A), 루펩틴(Leupeptin), 아프로티닌(Aprotinin)], 및 PBS는 얼음 위에서 미리 냉각되었다. 배지가 플레이트로부터 흡출된 후에 세포는 냉각된 PBS 10 ml로 두 번 세척되었다. 이후의 절차들 모두는 얼음 위에서 및/또는 4℃ 냉장실에서 실시되었다. 최종 PBS 세척액이 흡출된 후 세포들은 1-2 mL의 세포용해 완충용액 (프로테아제 억제제가 새롭게 첨가된 RIPA 완충액으로서, PMSF가 1 mM, 펩스타틴 A가 1 μM, 루펩틴이 10 ㎍/ml, 아프로티닌이 2㎍/ml의 최종농도가 되도록 첨가)에서 용해되었다. 셀 리프터(cell lifter)를 사용하여 플레이트의 세포용해물을 잘게 만들고, 18G 니들을 사용하여 현탁액을 위 아래로 (5-10 회) 피펫팅하여 세포용해물을 분쇄하였다. 세포용해물은 10 분 동안 회전된 다음에 미세원심분리기에서 최대 (13K rpm)로 10 분간 원심분리되었다. 펠렛은 버려지고 상층액은 브래드포드 단백질 분석키트(Bradford Protein assay kit) (Biorad)를 사용하여 분석되었다.

[0349] 세포용해물 (2 ㎕)은 건조 0.2 ㎛ 니트로셀룰로오스막 위로 직접 피펫팅되었다. 스폿은 약 30분 동안 공기중 건조되었다. 막은 한 개의 스폿을 함유하는 조각으로 절단되었다. 스폿은 프로나아제(1 mg/ml 효소, 50 mM Tris pH 7.5, 5 mM $CaCl_2$), 프로테이나아제 K (1 mg/ml 효소, 50 mM Tris pH 7.5, 5 mM $CaCl_2$), 뉴라미니다아제 (20 mU/ml 효소, 50 mM 아세트산나트륨 pH 5, 5 mM $CaCl_2$, 100 g/ml BSA) 또는 과요오드산 (20 mM, 0.5M 아세트산나트륨 pH 5) 존재하에서 37℃, 1시간 동안 인큐베이션되었다. 시약은 Roche (효소) 및 VWR (과요오드산)로부터 구입하였다. 막은 5분간 T-TBS 세척 완충액 (0.1% Tween 20, 1X TBS)으로 세척되었고, 차단완충용액(blocking buffer) (3% BSA, T-TBS)에서 2시간 동안 실온에서 차단되었으며, 차단 완충용액에서 2 ㎍/ml의 1차 항체(즉, DS6, CM1, C242, R24)와 함께 밤새 4℃에서 인큐베이션되었다. 막은 5분간 T-TBS로 3회 세척된 다음, HRP-접합된 염소의 항-마우스 (또는 인간) IgG 2차 항체(Jackson Immunoresearch; 차단 완충용액으로 1:2000으로 희석)로 1시간 동안 실온에서 인큐베이션되었다. 면역블롯은 3회 세척되었고 ECL 시스템(Amersham)을 사용하여 현상하였다.

[0350] 분해된 대조군 세포용해물의 면역 블롯(immunoblot)(도 2)은 단백질 항원결정기를 인식하는 항체에 대해 예상된 바와 같이 당분해 신호가 영향을 받지 않는 반면에 CM1 신호는 단백질분해에 의해 파괴되었음을 나타낸다. C242 신호는 단백질 상의 글리코토프를 인식하는 항체에 대해 예상된 바와 같이 단백질분해 또는 당분해에 의해 파괴되었다. 단백질분해로 영향을 받지 않는 R24 신호는 갱글리오시드를 인식하는 항체에 대해 예상된 대로 뉴라미니다아제 또는 과요오드산으로 파괴되었다. 분해된 Caov-3 세포용해물 도트 블롯(dot blots)에 대한 DS6 면역블롯은 단백질분해 및 당분해 화합물 처리에 의한 신호 감소를 보여준다. 따라서, C242와 같이 DS6는 단백질 코어 상에서 탄화수소 항원결정기에 결합한다. 또한, DS6 면역블롯(immunoblot)에서의 신호는 뉴라미니다아제 처리에 민감했다. 따라서 CanAg과 같이 CA6는 시알릭산-의존성 글리코토프이다.

[0351] CA6의 탄수화물 성질을 확인하기 위해 Caov-3 세포 용해물이 PVDF 막 위로 스폿되었고, 대기온도의 질소 하에서 5분 동안 화학적 탈글리코실화 시약인 트리플루오로메탄 술폰산(TFMSA)으로 처리되었다. 블롯은 T-TBS로 세척되었고 CM1 또는 DS6로 면역블롯팅하였다(도 3). DS6 신호는 CA6가 글리코토프라는 증거를 제공하는 산처리에 의해 파괴되었다. TFSMA 처리에 대한 CM1 신호의 증가는 산처리가 필터 상의 단백질에 영향을 주지 않는다는 것을 의미하며, 당분해 처리는 CM1에 의해 인식된 단백질 항원결정기를 벗긴다는 것을 암시한다.

[0352] CA6가 존재하는 탄수화물 구조를 밝히기 위해, 도트 블롯(dot blots)은 N-글리카나아제, O-글리카나아제, 및/또는 시알리다아제로 분해되었다(도 4). Caov-3 세포용해물(100 ㎍, 30㎕)은 100℃에서 5분 동안 SDS 및 β-머캅토에탄올을 포함하는 2.5 ㎕의 변성완충액(Glyko)으로 인큐베이션되었다. 변성된 세포용해물은 37℃에서 1시간 동안 1 ㎕의 N-글리카나아제, O-글리카나아제, 및/또는 시알리다아제 A (Glyko)로 분해되었다. 분해된 세포용해물은 전술한 바와 같이 니트로셀룰로오스 상에 스폿팅(2 ㎕)되었고 면역블롯팅되었다.

[0353] N-글리카나아제는 DS6 면역블롯 신호에 대해 명시적인 영향을 주지 않는다. 그러나, 시알리다아제로 분해된 샘플들은 아무런 신호를 내보내지 않았다. O-글리카나아제는 시알리다아제에 의한 사전처리없이는 시알화된 O-링크 탄수화물을 분해할 수 없기 때문에, O-글리카나아제 단독으로 처리된 샘플의 DS6 신호는 영향을 받지 않았다. 반면에, N-글리카나아제는 활성을 위해 글리코시드 효소에 의한 사전처리를 요구하지 않는다. N-글리

카나아제 처리가 DS6 신호에 영향을 주지 않는다는 사실은 CA6 항원결정기가 시알화된 O-링크 탄수화물 사슬 상에서 존재할 가능성이 가장 높음을 암시한다.

[0354] 실시예 3: CA6 항원결정기가 발현되는 항원의 발견

[0355] CA6 시알로글리코토프가 발견된 항원을 동정하기 위해, DS6 면역침전물이 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅(Western blotting)에 의해 분석되었다. 세포용해물의 상층액(1 mL/샘플; 3-5 mg 단백질)은 단백질 G 비드(30 ㎕)에 의해 미리 정화되었고, 4℃에서 1-2 시간 동안 교반하면서 1 ml의 RIPA 완충용액으로 평형상태로 하였다. 이후의 절차들은 모두 얼음 위 및/또는 4℃ 냉장실에서 실시되었다. 미리 정화된 비드는 마이크로원심분리기에서 간단하게 (2-3초) 분리되었다. 미리 정화된 상층액은 깨끗한 튜브로 이동되었고 회전시키면서 2㎍의 DS6와 함께 밤새 인큐베이션하였다. 깨끗하고 평형상태인 단백질 G 비드(30㎕)가 세포 용해물에 첨가되었고 회전시키면서 1시간 동안 인큐베이션되었다. 비드-세포용해물 현탁액은 마이크로원심분리기에서 간단하게 회전시켜 가라앉게 하였고, 면역침전 후 세포용해물 샘플이 선택적으로 취해졌다. 비드는 1 mL의 RIPA 완충액으로 5-10회 세척되었다.

[0356] 면역침전된 DS6 샘플은 이후 30㎕의 뉴라미니다아제(20 mU 뉴라미니다아제(Roche), 50 mM 아세트산나트륨 pH 5, 5 mM $CaCl_2$, 100 ㎍/ml BSA) 또는 30㎕의 과요오드산 (20 mM 과요오드산 (VWR), 0.5M 아세트산나트륨 pH 5)로 37℃에서 1시간 동안 분해처리되었고, 30㎕의 2X 샘플 로딩 완충용액 (β-머캅토에탄올 함유)에서 다시 현탁시켰다. 비드는 5분간 가열되었고, 로딩 완충용액의 상층액은 4-12% 또는 4-20% 트리스-글리신 겔(Invitrogen)상으로 로딩되었다. 상기 겔은 Laemmli 전기영동 완충액에서 125 V로 1.5 시간 동안 전기영동되었다. 상기 겔 샘플은 20 mA에서 미니 트랜스-블롯 이동장치 (Biorad)를 사용하여 밤새 0.2 μm 니트로셀룰로오스막(Invitrogen)으로 이동되었다. 상기 막은 상기 실시예 2에서 기술된 바와 같이 DS6로 면역블롯팅되었다.

[0357] 다른 방법으로서, 면역침전된 비드는 먼저 변성된 후에 N-글리카나아제, O-글리카나아제 및/또는 시알리다아제 A (Glyko)에 의해 효소적으로 분해되었다. 상기 비드는 27㎕의 인큐베이션 완충용액 및 2㎕의 변성 용액(Glyko)에서 다시 현탁되었고 100℃에서 5분간 인큐베이션되었다. 실온으로 냉각된 후에 세제 용액(2 ㎕)이 첨가되었고, 샘플은 1 ㎕의 N-글리카나아제, O-글리카나아제, 및/또는 시알리다아제 A로 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션되었다. 5X 샘플 로딩 완충용액 (7㎕)을 첨가한 후에 샘플은 5분간 가열되었다. 전술한 바와 같이, 샘플에 대해 SDS-PAGE를 수행하였고 샘플은 면역블롯팅되었다.

[0358] DS6는 항원 양성 세포 용해물에서 볼 수 있는 >250 kDa 단백질 밴드를 면역침전한다(도 5A, B, C). 몇몇 세포라인에서 (즉 T-47D) 더블릿이 관찰된다. >250 kDa 밴드는 CA6 항원결정기가 >250 kDa 밴드 상에서 존재함을 암시하면서 뉴라미니다아제 또는 과요오드산으로 처리된 Caov-3 면역침전물에서 제거되었다 (도 5 A 및 B). >250 kDa 밴드는 또한 O-연결 탄화수소 위에 있는 CA6와 일치하는 면역침전물을 N-글리카나아제로 처리하는 것에 민감하지 않은 것으로 나타났다 (도 5F). 250 kDa 밴드가 CA6 항원임을 더욱 지지하는 것은 DS6가 DS6 항원 음성 세포로부터 아무런 밴드도 면역침전하지 않는다는 사실이다 (도 5D 및 E).

[0359] *여러 가지 증거에 의하면 CA6 항원이 Muc1이라는 것을 의미했다. 높은 분자량 및 O-연결 탄화수소-특이성 당분해 효소에 대한 민감성 때문에 CA6 항원이 뮤신인 것처럼 보였다. 뮤신 과발현은 DS6의 주요 종양 반응성과 일치하면서 특히 유방 및 난소 종양에서 특정된다. 또한, CanAg (Muc1 상의 시알로글리코토프)처럼 CA6는 과염소산 침전에 민감하지 않는데, 이는 CA6 항원이 고도로 O-글리코실화된 것을 암시한다. 세포라인을 발현하는 몇몇 DS6에서 DS6가 >250 kDa 더블릿을 면역침전하는 것을 관찰하면 CA6가 Muc1임을 암시한다. 인체 내에서 Muc1은 탠덤 반복의 수치에서 차이가 있으면서 다른 분자량의 두 개의 Muc1 단백질을 발현하게 하는 두 개의 특징적인 Muc1 대립유전자의 존재로 증명한다.

[0360] CA6가 Muc1에서 발견되는지를 시험하기 위해, Caov-3 세포용해물로부터의 DS6 면역침전물에 대해 SDS-PAGE가 수행되었고, DS6 또는 Muc1 VNTR 항체인 CM1으로 면역블롯팅시켰다. 도 6A에서 볼 수 있는 것과 같이 CM1은 DS6로 면역침전된 >250 kDa 밴드와 강하게 반응한다. 도 6B에서 HeLa 세포 용해물로부터의 DS6 및 CM1 면역침전물은 DS6 또는 CM1로 면역블롯팅될 때 동일한 >250 kDa 더블릿을 나타낸다. 본 결과들은 CA6 항원결정기가 Muc1 단백질에 위치하는 것을 암시한다. HeLa (및 T-47D) 세포에서 발견되는 DS6 더블릿은 Muc1 발현이 다수 탠덤 반복을 가진 특이한 대립유전자에 의해 진행된다는 사실로 설명된다.

[0361] 비록 CM1과 DS6은 동일한 Muc1 단백질에 결합하지만, 구별되는 항원결정기이다. 트리플루오로메탄 술폰산

(TFMSA)에 의한 Caov-3 세포용해물 도트 블롯(dot blots)의 화학적 탈-글리코실화는 DS6 신호를 제거하였다(도 3). 그러나, 동일한 처리는 CM1 신호를 증가시켰다. 탈글리코실화는 CM1 항체에 대한 숨은 항원결정기를 노출시켰다. 또한 DS6 및 CM1의 유세포분석기 결합결과 비교(표 4)는 CA6 항원결정기가 Muc1을 발현하는 모든 세포에 존재하는 것은 아님을 알 수 있다. CA6 항원결정기가 Muc1 CanAg 시알로글리코토프를 매우 높은 수준으로 발현하는 것으로 알려진 세포주인 Colo205에서 발현되지 않는다는 것은 주목할 만하다(표 3).

표 4

[0362]

		DS6		CM1	
	세포라인	MMF*	적정 Kd (M)	MMF*	적정 Kd (M)
DS6 양성 & CM1 양성	BT549	71.39	1.046×10^{-09}	187.90	6.056×10^{-09}
	CaOV3	465.20	5.478×10^{-09}	1031.00	7.479×10^{-09}
	HeLa	242.50	6.938×10^{-10}	334.80	2.907×10^{-09}
	KB	119.56	1.110×10^{-09}	338.00	5.345×10^{-09}
	MCF7	81.41	2.890×10^{-09}	1023.00	8.694×10^{-09}
DS6 음성 & CM1 양성	KLE	27.48	-	561.70	8.156×10^{-09}
	OVCAR3	21.19	-	192.50	5.949×10^{-09}
	SKOV3	17.53	-	49.41	6.246×10^{-09}

[0363] *MMF = maximum mean relative fluorescence

[0364] 실시예 4: 이탈된(흘러들어간) CA6 항원결정기의 정량분석

[0365] CA6 항원결정기가 다수 암환자에서 혈류속으로 흘려지는 분자인 Muc1 상에 있기 때문에, 수치가 DS6 항체 요법에 대해 억제적인가를 결정하기 위해 정량적으로 접근되었다. 순환하는 항체를 항원에 결합하는 것으로 인해 혈액으로부터 급속한 면역 혼합물의 제거를 유도한다. 만약 항체 투여 중 중요한 부분이 급속하게 순환에서 제거된다면 종양에 도달량은 항체 요법의 항종양 활성 감소 결과를 가져올 것으로 보인다. 항체가 고기능 세포독성 화합물에 접합될 때 접합체의 급속한 제거는 비특이적 독성을 상당히 증가시킬 수 있을 것이다. 따라서 DS6-DM1 등의 항체-소형약제 접합체의 경우, 고도의 흘려진 항원이 항종양 효과 감소 및 투여량 제한 독성 증가 모두를 가져올 것으로 예상된다.

[0366] 항체요법의 최근 임상실험은 약물역학적으로 흘러들어간 항원 농도의 영향에 대한 정보를 제공했다. 예를 들면 her2/neu-발현 전이성 유방암의 치료에 사용된 항체인 트라스투주맙(trastuzumab)(Herceptin)에 의한 임상실험에 있어서, 트라스투주맙 제거에 대한 약물역학은 흘러들어간 Her2/neu 수치가 500 ng/mL 보다 작을때는 변경되지 않는 것으로 나타났다(Pegram et al., *J. Clin. Oncol.* 16(8):2659-71 (1998). 흘러들어간 Her2/neu의 분자량이 110,000 달톤(Daltons)인 것을 가정할 때, 4.5 nM 이하의 흘러들어간 Her2/neu의 몰 농도는 약물역학에 영향을 주지 않는 것으로 보인다.

[0367] 또다른 실시예에서 칸투주맙(cantuzumab) 머탄신 (huC242-DM1)에 의한 임상실험은 사전처리 흘려진 CanAg (C242 epitope) 수치와 항체제거의 약물역학 사이에 아무런 관련이 없음을 보여주었다 (Tolcher et al., *J. Clin. Oncol.* 21(2):211-22 (2003). DS6에 의해 인식된 CA6 항원결정기와 유사한 CanAg 항원결정기는 특정 종양에 특이적인 Muc1 상의 O-연결 시알로글리코토프이다. 한편, CanAg 항원결정기의 이질적인 성질로 인해 분자량을 측정하기 곤란하게 된다. 일반적인 집단에서 Muc1 대립유전자는 다양한 탠덤 반복 (VNTR) 도메인에서의 탠덤 반복 수치에 따라 길이가 다양하다. O-연결 글리코실화에 대한 다양한 부위가 각 탠덤 반복에서 발생한다. 복잡한 CanAg 발현에 더하여, 발현은 전해진 글리코실 전이효소 활성에 있어서 세포대 세포마다 다양하다. 따라서 광범위한 Muc1 분자마다의 CanAg 항원결정기는 한 명의 환자에게서도 가능하다. 또한 Muc1 분자마다의 CanAg 항원결정기 비율은 환자 집단마다 상이할 것이다. 이 때문에, 혈청 샘플내의 흘려진 CanAg은

CanAg 항원결정기를 갖는 흘려진 Muc1가 C242에 의해 포획되고 비오티닐화된 C242/스트렙타비딘 HRP 시스템에 의해 감지되는 샌드위치 ELISA에 의해 측정된다. 흘려진 CanAg는 Muc1 분자농도가 아닌 ml 혈청 당 항원결정기 수에 비례하는 표준단위(U)에서 정량화된다. 유추하여 흘려진 CA6 항원결정기의 정량화에 대해 유사한 조건이 발생한다. 반대로 트라스투주맙에 대해서 흘려진 her2/neu 분자마다 흘려진 항원의 정량화를 상당히 단순화시키는 단 하나의 항원결정기가 있다.

[0368] CA6 흘려진 항원결정기를 트라스투주맙 및 칸투주맙 머탄신으로 행한 임상시험에서 발견된 것들에 연관시키기 위해 시알로글리코토프 등의 복잡한 흘려진 항원결정기의 분자농도를 획득하는 방법이 개발되었다. 먼저 DS6에 대한 단순한 샌드위치 ELISA 분석이 행해졌다. 분석 표본은 도 7A에 보여진다. DS6은 CA6 항원결정기를 갖는 Muc1을 포획하기 위해 사용되었다. 각각의 Muc1 분자는 중합 CA6 항원결정기를 가지기 때문에, 비오틸화된 DS6 또한 추적 항체로 사용되었다. 포획된 CA6에 결합된 비오틸화 DS6는 기질로서 ABTS를 사용하여 스트렙타비딘-HRP에 의해 탐지되었다. CA6 항원결정기는 난소암 환자 혈청 또는 유방암 환자의 흘려진 Muc1 감시 목적의 상업용 Muc1 테스트 장치(CA15-3)로부터 기원한 표준으로부터 포획되었다. DS6 단위/ml 는 CA15-3 표준단위/ml에 전적으로 일치했다.

[0369] 도 7B에서는 CA15-3 표준이 사용된 DS6 샌드위치 ELISA 결과가 보여진다. 형성된 곡선은 CA15-3 실험에서 CA15-3 표준으로 획득된 것과 흡사하다. DS6 단위/ml를 CA6 분자농도로 전환하기 위해 신호를 피코그램 DS6로 바꾸는 비오틸화 DS6에 대한 표준곡선이 필요하다. CA6 항원결정기와 DS6 항체 및 분자량 160,000 Daltons의 비오틸화 DS6 간의 일대일 화학량론을 측정하면 추가된 샘플 용적당 포획된 CA6 분자를 산출할 수 있다.

[0370] 도 8A 및 B에는 비오틸화 DS6에 대한 표준곡선을 제공하는 두 개의 방법의 대표예가 있다. 도 8A에서는 염소 항마우스 IgG 다클론항체가 도 7 상의 샌드위치 ELISA 분석에서 사용된 바와 동일한 방식으로 순차적으로 탐지되는 비오틸화 DS6를 포획하기 위해 사용된다. 도 8B에 기재된 방법에서 비오틸화 DS6는 직접 ELISA 플레이트에 놓여지고 도 8A에서와 같이 감지된다. 도 8C에 기재된 것과 같이 비오틸화 DS6 표준곡선은 일치한다.

[0371] 표 5에서는 다양한 흘려진 항원에 대한 난소암환자 혈청 샘플의 분석을 볼 수 있다. CA125 ELISA는 흘려진 CA125 단위/ml를 측정하여 난소암환자의 치료를 감시하기 위해 일반적으로 사용된다. CA125가 혈청 샘플로 제공되었다. CA15-3 ELISA는 DS6로 인식된 것과 상이한 항원결정기를 인식하는 포획 및 탐지 항체를 사용하는 흘려진 Muc1 단위/ml를 측정하여 유방암환자의 치료를 감시하기 위해 일반적으로 사용된다. 표 5에서는 CA15-3가 난소암환자 혈청샘플에서 측정된다.

표 5

[0372]

혈청 No.	CA125[1] (U/ml)	CA15-3[1] (U/ml)	DS6[2] (U/ml)	DS6[3] (pM)	DS6[4] (pM)
4	72.80	117.72	29.79	52.13	188.94
5	3651.90	98.19	567.02	654.44	>2560.00
6	930.50	87.08	504.15	667.56	2505.00
7	76.00	72.70	135.65	246.94	778.25
8	32.50	18.44	39.96	65.19	239.88
9	551.70	292.39	>975.61	1512.31	>2560.00
10	90.00	42.40	49.48	85.19	305.88
11	200.50	60.58	92.32	152.38	526.75
12	283.00	35.67	83.65	135.81	485.06
13	197.50	20.61	35.92	61.06	216.25
14	100.60	6.13	12.39	23.19	88.06
15	34.60	59.18	199.85	286.63	1228.56
17	196.40	56.75	66.53	130.44	405.88
18	16.90	30.45	34.43	60.81	223.69
19	22.00	263.93	118.98	191.69	728.94
22	110.70	21.44	16.46	29.94	111.38
[1] 상업용 ELISA 장치로 결정됨					
[2] 상업용 CA15-3 표준으로 결정됨 (1 CA15-3 U = 1 DS6 U)					
[3] 염소 항마우스 IgG & 비오틴-DS6 표준곡선					
[4] 비오틴-DS6 표준곡선					

[0373] 표 5에 나타난 CA15-3의 값을 얻기 위해 CanAg Diagnostics에서 구입한 CA15-3 효소면역분석장치(Enzyme Immnuno Assay Kit)가 사용되었다. DS6 U/ml의 경우, 표준곡선이 DS6 샌드위치 ELISA에서의 CA15-3 표준(CanAg Diagnostics에서 구입한 CA15-3 효소면역분석장치로부터 얻음)을 사용하여 생성되었다. DS6 U/ml는 CA15-3 U/ml와 동등하도록 임의로 설정했다. 표 5의 마지막 2열에서 피코몰(pM) 단위의 흘러들어간 CA6는 도 8C에 도시된 비오틴화된 DS6 표준곡선을 사용하여 계산되었다.

[0374] CanAg 정량분석의 경우, CanAg 혈청 수준은 치료에 앞서 칸투주맙 머탄신 임상실험에 참가한 환자들에 대해 보고된 것들이다(Tolcher et al., *J. Clin. Oncol.*21(2):211-22 (2003). DS6에 대해 기술된 것과 유사한 ELISA 분석을 사용하여 CanAg 표준을 이용한 CanAg 표준곡선을 생성하였다. C242가 CanAg 표준을 포획하기 위해 사용되었다. 포획된 CanAg는 비오틴화된 C242 추적자를 사용하여 검출되는데, 기질로서 ABTS를 사용하는 스트렙타비딘-HRP에 의한 현상이 뒤따르게 된다. 비오틴화-C242 표준곡선은 비오틴화된 DS6에 대해 수행된 바와 같이 구성되어, 순환하는 CanAg 항원결정기의 U/ml 단위를 몰농도로 전환가능하게 한다. 표 6에는 칸투주맙 머탄신 임상실험 환자로부터의 CanAg 수준과 이에 대응하는 순환하는 CanAg의 산출 몰농도가 나타나 있다.

표 6

[0375]

CanAg[1] (U/ml)	CanAg[2] (pM)	CanAg[3] (pM)
31240	19185.7	34592.8
8687	3535	9619.3
7456	4579	8256.2
3686	2263.7	4081.6
1447	888.7	1602.3
1262	775	1397.4
718	441	795.1
547	335.9	605.7
394	242	436.3
381	234	421.9
329	202.1	364.3
322	197.8	356.6
306	187	338.8
284	174.4	314.5
247	151.7	273.5
242	148.6	268
229	140.6	253.6
227	139.4	251.4
184	113	203.7
120	73.7	132.9
107	65.7	118.5
100	61.4	110.7
81	49.7	89.7
81	49.7	89.7
67	41.1	74.2
53	32.5	58.7
45	27.6	49.8
43	26.4	47.6
39	24	43.2
36	22.1	39.9
24	14.7	26.6
18	11.1	19.9
17	10.4	18.8
<10	6.1	11.3
<10	6.1	11.3
<10	6.1	11.3

<10	6.1	11.3
[1] 샌드위치 ELISA로 측정된 순환하는 CanAg의 사전처리		
[2] 염소 항마우스 IgG & 비오틴-C242 표준곡선		
[3] 비오틴-C242 표준곡선		

[0376] 난소암 환자에 있어서 흘러들어간 CA6의 pM 수치를 CanAg-양성 암환자에 있어서 흘러들어간 CanAg에 대해 계산된 수치와 비교하면 일반적으로 CA6 수치가 CanAg 수치와 유사함을 알 수 있다. 또한, 16명의 난소암 환자 혈청 중에서 단 2명의 것만이 4.5nM 보다 높은 CA6 수준을 보이며 (혈청 샘플 번호 5 및 9의 경우 신호가 표준곡선의 범위를 벗어남), 상기 수준 이상에서는 Her2/neu-양성 유방암 환자에 대한 임상실험에서 변경된 허세핀(herceptin) 약물역학이 관찰되었다. 4.5nM보다 높은 CanAg 수준은 37명의 임상실험 환자 중에서 3명에서만 나타났다. 본 임상실험에서 흘러들어간 CanAg 수준과 칸투주맙 머탄신의 보다 신속한 제거는 상관관계가 없었다. 그러나, 가장 높은 수준의 CanAg(31240 U/ml)를 나타낸 환자에 대해서만 8시간 후-수혈(transfusion)을 위해 샘플링하였다. 이러한 결과는 CA6 및 CanAg와 같은 Muc1의 에피토프가 암환자에 있어서 혈액으로 흘러들어가지만 그 수준은 항체 치료를 방해하는 수준이 아님을 시사한다.

[0377] 실시예 6: 쥐의 DS6 항체 가변영역 클로닝.

[0378] DS6 같은 생쥐 단일클론항체는 인간면역 시스템에 의해 외부인으로 인식되기 때문에 임상용 효용성이 제한되어져 왔다. 환자는 신속하게 인간 항마우스 항체(HAMA)를 분화하여 생쥐항체를 급속하게 제거하여 버린다. 이 때문에 생쥐 DS6 (muDS6)의 가변영역은 인간화 DS6 (huDS6) 항체를 생산하기 위해 재표면화되었다.

[0379] 쥐의 DS6 항체 가변영역은 RT-PCR에 의해 클로닝되었다. 전체 RNA는 퀴아진 알엔이지 미니프렙 키트(Qiagen RNeasy miniprep kit)를 사용하여 DS6 하이브리도마 세포들로 포화된 T175 플라스크로부터 정제되었다. RNA 농도는 UV 분광기를 통해 결정되었고, RT 반응은 4-5㎍의 전체 RNA에 대해 깁코 수퍼스크립트 II 키트(Gibco Superscript II kit) 및 랜덤 헥사머 프라이머(random hexamer primer)를 사용하여 수행하였다.

[0380] PCR 반응은 다음의 문헌에 기재된 방법에 기초하여 축퇴 프라이머(degenerate primer)를 가지고 수행하였다[(Wang Z et al., *J Immunol Methods*. Jan 13;233(1-2):167-77 (2000)]. RT 반응 혼합물은 축퇴성 PCR 반응(degenerate PCR reaction)을 위해 직접 사용되었다. 3'경쇄 프라이머인 HindKL (tatagagctcaagcttggatggtgggaagatggatacagttggtgc) (SEQ ID NO:25) 및 3'중쇄 프라이머인 BamIgG1 (ggaGgatcCatagacagatgggggtgtcgttttggc) (SEQ ID NO:26)가 사용되었고, 5'말단 PCR 프라이머의 경우에는 경쇄 프라이머로서 Sac1MK (GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA) (SEQ ID NO:27)가 사용되었고 중쇄 프라이머로서 EcoR1MH1 (CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC) (SEQ ID NO:28) 및 EcoR1MH2 (CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG) (SEQ ID NO:29)의 동등혼합물이 사용되었다(혼합 염기: H = A+T+C, S = G+C, Y = C+T, K = G+T, M = A+C, R = A+G, W = A+T, V = A+C+G, N = A+T+G+C).

[0381] 10% DMSO로 보충되는 것을 제외하면 PCR 반응은 표준에 따른다 (50㎕의 반응 혼합물에는 최종농도로서 1X 반응 완충용액(ROCHE), 2mM의 각각의 dNTP, 1mM의 각각의 프라이머, 2㎕의 RT 반응물, 5㎕의 DMSO 및 0.5㎕ Taq (ROCHE)이 포함됨). PCR 반응은 MJ 리서치 열순환기(MJ research thermocycler) 상에서 Wang 등(*J Immunol Methods*. Jan 13;233(1-2):167-77 (2000))의 프로그램을 응용하여 다음과 같이 수행되었다: 1) 94 ℃, 3 분; 2) 94 ℃, 15 초; 3) 45 ℃, 1 분; 4) 72 ℃, 2 분; 5) 2)번 단계로 복귀 후 29회 반복; 6) 72 ℃에서 10분 동안 최종 연장 단계를 수행하여 종료. PCR 산물은 제한효소(제한위치는 PCR 프라이머에 의해 생성됨)를 사용하여 pBluescript II SK+ (Stratagene)으로 클로닝되었다. 시크라이트(Seqwright) 시퀀싱 서비스는 중쇄 및 경쇄 클론의 서열을 결정하였다.

[0382] 5'말단 cDNA 서열을 확인하기 위해 PCR 및 클로닝이 추가 실시되었다. 축퇴성 PCR 클론으로부터 결정된 DS6 경쇄 및 중쇄 cDNA 서열이 NCBI 블라스트 검색 웹사이트(NCBI's Blast search website)로 플러그인되었으며, 제출된 신호 서열을 가진 쥐의 항체서열이 저장되었다. PCR 프라이머는 관련 DNA 서열 사이에서 보존된 부분을 사용하여 신호 펩티드로부터 설계되었다. EcoRI 제한 위치가 리더 서열 프라이머에 추가되었고(표 7), 이들이 전술한 RT-PCR 반응에서 사용되었다.

표 7

[0383]

표 7
DS6 신호 서열 축퇴성 프라이머 (DS6 signal sequence degenerate primers)

명칭	서열
중쇄 - DS6HClead	ttttgaattcaataactacaggtgtccact - SEQ ID NO:30
경쇄 - KTILClead	ttttgagctccagattttcagcttcctgct - SEQ ID NO:31

[0384] 다수의 개별 경쇄 및 중쇄 클론은 서열 오류를 발생시킬 가능성이 있는 중합효소를 인지하고 회피하도록 서열화되었다. 단 하나의 서열만이 경쇄 및 중쇄 RT-PCR 클론 양쪽에 대해 획득되었다. 이들 서열은 신호 서열 속으로 연장하면서 생쥐 DS6 경쇄 및 중쇄 서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 고안하기에 충분했다. PCR 반응 이후의 클론은 원래의 분해 프라이머에 의해 변경된 가변영역의 5'말단 서열을 확인하였다. 다양한 cDNA 클론으로부터 축적된 결과는 도 9에 나타난 마지막 생쥐 DS6 경쇄 및 중쇄 서열을 제공했다. Kabat 및 AbM 정의를 사용하여, 세 개의 경쇄 및 중쇄 CDRs 이 밝혀졌다 (도 9 및 10). NCBI IgBlast 데이터베이스에 대한 조사는 muDS6 항체 경쇄 가변영역은 생쥐 IgVκ ap4 성유전자로부터 유도될 가능성이 큰 반면, 중쇄 가변영역은 생쥐 IgVh J558.41 성유전자로부터 유도될 가능성이 크다는 것을 의미한다 (도 11).

[0385] 실시예 7: DS6 항체의 가변영역 표면잔기의 결정

[0386] Pedersen et al. (1994) 및 Roguska et al. (1996)에 기술된 항체 재표면화 기술은 생쥐 항체 가변 서열의 표면잔기를 예상하면서 시작된다. 표면잔기는 전체 표면 중 최소한 30%이 물 분자에 접근가능한 아미노산으로 정의된다. muDS6에 대한 표면잔기를 발견하기 위한 해결구조가 없는 상태에서, 127 개 항체구조 파일에서 가장 유사한 서열을 가진 열 개의 항체를 배열했다 (도 12). 각 Kabat 부위에 대한 용매 접근성은 이들 배열된 서열로 평균되었다 (도 13A 및 B).

[0387] 25% 및 35% 사이에서의 평균 접근성을 가진 표면부위는 각 측면에 붙어 있는 두 개의 동일한 잔기를 포함하는 항체를 비교함으로써 2차 분석에 놓여졌다 (도 13A 및 B). 2차 분석 후, Tyr3 및 Lys23을 30% 보다 큰 예상 표면 접근성을 가진 잔기목록에 추가하자 muDS6 중쇄에 대한 21개의 예상된 표면잔기가 23개로 늘어났다. 대부분의 재표면화 항체에서는 중쇄 CDR1에 대해 Kabat 정의가 사용되지만 DS6에 대해서는 AbM 정의가 사용되어서 중쇄 잔기 T28이 다르게 되었을 수도 있었지만 구조 표면잔기로 정의되지 않았다. 경쇄 표면 부위의 수는 16에서 15로 줄었는데 Ala80의 예상된 표면 접근성이 30.5% 에서 27.8% 로 2차 분석에서 감소했기 때문이다. muDS6 중쇄 및 경쇄 가변 서열은 38 개의 예상 표면 접근성 구조잔기를 가진다.

[0388] 실시예 8: 인간항체 선택

[0389] 쥐의 DS6 가변영역의 표면 위치는 Kabat 데이터베이스의 인간 항체서열의 대응 위치와 비교되었다(Johnson G, Wu TT. *Nucleic Acids Res.* Jan 1;29(1):205-6 (2001)). 항체 데이터베이스 관리 소프트웨어 SR (Searle, 1998)을 사용하여 가공하지 않은 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 쌍으로부터 표면 잔기를 추출하고 배열하였다. CDR의 5Å 범위 내에 있는 위치에 주목하면서, 가장 동일한 표면잔기를 갖는 인간 항체 가변영역 표면을 선택하여 쥐의 DS6 항체 가변영역 표면잔기와 교체하였다.

[0390] 실시예 9: 쉬메릭(chimeric) 및 인간화 항체 발현벡터

[0391] 경쇄 및 중쇄가 짝을 이룬 서열은 단일 포유류 발현벡터로 클로닝되었다. 인간 가변서열을 위한 PCR 프라이머는 제한위치를 형성하는데, 이 제한위치를 통해 인간 신호서열이 pBluescriptII 클로닝 벡터에 추가된다. 상기 가변서열은 경쇄 또는 중쇄에 대해 각각 EcoRI 및 BsiWI 또는 HindIII 및 ApaI에 의해 포유류 발현 플라스미드로 클로닝될 수 있다(도 14). 경쇄 가변서열은 인간의 IgKappa 불변 영역 상에 인-프레임(in-frame)으로 클로닝되었고, 중쇄 가변서열은 인간의 IgGamma1 불변 영역 서열로 클로닝되었다. 최종 발현 플라스미드에서 인간 CMV 프로모터가 경쇄 및 중쇄 cDNA 서열 모두의 발현을 촉진시킨다.

[0392] 실시예 10: DS6 활성에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 잔기의 확인

[0393] 대부분의 인간화 작업에서 대상 항체의 분자 모델에 대한 잠재적 문제가 되는 잔기로서, CDR에 근접한 잔기에 대한 확인작업이 이루어졌다. 지나온 연구 경험은 모델을 만드는 것 만큼이나 문제 예상에 있어서 효과적이지만, 연구대상인 재표면화된 항체의 수가 증가하면서 DS6에 대해서는 분자모델이 확립되지 않았다. 대신에 쥐의 DS6 표면잔기는 앞서 재표면화된 항체들과 비교되었고, 항체의 결합활성에 높은 위험도 내지 낮은 위험도로 영향을 미치는 잔기들이 확인되었다.

[0394] 유사한 잔기들 세트가 CDR의 5Å 범위 내에 있는 것으로서 반복적으로 확인되는데, 이는 밝혀진 항체 구조 및 인간화 분자 모델 모두에서 확인된다. 이러한 데이터를 이용하여, 표 1은 CDR의 5Å 범위에 근접하고 CDR의 5Å 범위 내에 존재할 수 있는 쥐의 DS6 잔기를 제시하고 있다. 이들 위치의 다수가 앞선 인간화 과정에서 변경되었지만 중쇄 위치 74만이 결합활성의 손실을 가져왔다. 쥐 항체의 결합활성을 보존하기 위해, 쥐의 잔기는 huC242 및 huB4 모두에서 상기 위치에서 보존되었다. 반면에, 인간화된 6.2G5C6에서는 동일한 위치가 대응되는 인간 잔기로 변경되었지만 활성손실이 없었다(6.2G5C6는 자주 단순히 항-C6로 언급되는 항-IGF1-R 항체이다). 표 1의 어떤 잔기도 인간화된 항체 내에서 문제를 야기할 수 있지만, 중쇄 잔기 P73은 이 부위에서의 이전 경험 때문에 특별히 관심대상이 될 것이다.

[0395] 실시예 11: 가장 흡사한 인간 표면의 선택

[0396] muDS6 재표면화를 위해 참여한 인간 항체 표면은 SR 소프트웨어를 사용하여 Kabat 항체 서열 데이터베이스로부터 검색되었다. 본 소프트웨어는 항체 데이터베이스에 대항하여 특이화된 잔기 부위를 검색하기 위한 인터페이스를 제공한다. 천연 쌍을 보존하기 위해 경쇄 및 중쇄 모두의 표면 잔기가 비교되었다. Kabat 데이터베이스와 가장 흡사한 인간 표면은 서열 명명 순위에 따라 정렬되었다. SR Kabat 데이터베이스 소프트웨어로 정렬된 상위 3 개의 표면이 표 2에 주어져 있으며 표면은 이후 인간 표면이 표 1에서 명시된 잔기로의 최소한의 변화를 요구함을 밝혀 내기 위해 비교되었다. 항-Rh(D) 항체인 28E4 (Boucher et al, 1997)는 최소한의 표면 잔기 변화를 요구하며(총 11 개) 이들 중 3 개만이 잠재적 문제 잔기 목록에 포함될 수 있다. 28E4 항체가 가장 근접한 인간 표면을 제공하기 때문에 muDS6의 재표면화를 위한 최선의 후보이다.

[0397] 실시예 12: 인간화 DS6 항체를 위한 DNA 서열의 구성

[0398] DS6에 대한 11 개의 표면 잔기는 PCR 변이를 사용하여 변화되었다. PCR 변이는 재표면화된 인간 DS6 유전자를 형성하기 위해 생쥐 DS6 가변영역 cDNA 클론 상에서 발생했다. 하기 표 8에서 나타난 바와 같이, 인간화 프라이머는 재표면화된 DS6 에 요구되는 아미노산 변화를 일으키도록 고안되었다.

표 8

[0399]

프라이머 명칭	프라이머 서열	
DS6HCapa	cgatgggcccttggtggaggctgcagagacagtgaccaga	SEQ ID NO:32
DS6LCBsi	ttttcgtacgtttcagctccagcttggt	SEQ ID NO:33
DS6HC5end	caggtgtacactcccaggcttatctccagcagtct	SEQ ID NO:34
huC6HCApa	cgatgggcccttggtggaggcggcagagacagtgaccaga	SEQ ID NO:35
ds6lc5et	caggtgtacactccgagattgttctcacccagtctccagcaacc atgtctgcatct	SEQ ID NO:36
ds6LCr18	ggcactgcaggttatggtgaccctctcccctggaga	SEQ ID NO:37
ds6lcs77f	caatcagcagcatggaggctgaaga	SEQ ID NO:38
ds6lcs77r	gcctccatgctgctgattgtgaga	SEQ ID NO:39
DS6HCvvkp	caggtgtacactcccaggctcagctcgtgcagtctggggctg aggtggtgaagcccggggcctcagt	SEQ ID NO:40
DS6HCt	ttgactgcagacacatcctccagcaca	SEQ ID NO:41
ds6hcQT	gtgtctgcagtcaatgtggccttgccctggaacttctgat	SEQ ID NO:42
huDS6HCapa	cgatgggcccttggtggaggcggcagagacagtgacaaga	SEQ ID NO:43

[0400] 10% DMSO로 보충되는 것을 제외하면 PCR 반응은 표준에 따른다 (50㎕의 반응 혼합물에는 최종농도로서 1X 반응 완충용액(ROCHE), 2mM의 각각의 dNTP, 1mM의 각각의 프라이머, 100ng의 주형, 5㎕의 DMSO 및 0.5㎕ Taq

(ROCHE)이 포함됨). PCR 반응은 MJ 리서치 열순환기(MJ research thermocycler) 상에서 다음과 같이 수행되었다: 1) 94 ℃, 1 분; 2) 94 ℃, 15 초; 3) 55 ℃, 1 분; 4) 72 ℃, 1 분; 5) 2)번 단계로 복귀 후 29회 반복; 6) 72 ℃에서 4분 동안 최종 연장 단계를 수행하여 종료. PCR 산물은 대응하는 제한효소로 잘려졌고 pBluescript 클로닝 벡터로 클로닝되었다. 클론은 아미노산 변경을 확인하기 위해 시퀀싱되었다.

[0401] 중쇄 잔기 P73의 변경은 과거에 문제를 야기했기 때문에 두 종류의 중쇄를 구축하였는데, 하나는 인간 28E4 T73을 갖는 것이고 또 하나는 쥐의 P73을 보유하는 것이다. 상기 2종류의 인간화된 DS6 모두에서 다른 10개의 표면잔기가 쥐의 것으로부터 인간의 28E4 잔기로 변경되었다(표 2). 일반적인 명명법에 따르면, 대부분의 인간 버전은 모두 11개의 인간 표면잔기를 가지기 때문에 1.0 버전이다. 추가의 버전이 요구되는 경우, 즉 최대수의 쥐의 잔기를 포함하는 버전에 대해 버전 1.1을 확보해 두는 경우에 쥐의 P73을 보유하는 중쇄는 1.2 버전이다. 두 개의 인간화 버전의 아미노산 서열은 쥐의 아미노산 서열과 정렬되어 도 15A 및 도 15B에 도시되어 있다. 인간화된 DS6 항체 유전자 모두는 일시적이면서도 안정된 트랜스펙션을 위해 항체 발현 플라스미드로 클로닝되었다(도 14). 인간화된 항체 버전 1.0 및 1.2의 cDNA 및 아미노산 서열은 경쇄 가변영역이 동일하고 도 16에 도시되어 있다. 인간화된 항체 버전 1.0 및 1.2의 중쇄 cDNA 및 아미노산 서열은 도 17A 및 도 17B에 도시되어 있다.

[0402] 실시예 13: CHO 세포 내의 huDS6 의 발현, 정제 및 친화도 측정

[0403] 인간화 DS6 가 muDS6에 대한 결합 친화도를 보유하는지 결정하기 위해서는 항체 발현 및 정제가 필요했다. CHO 세포는 각각의 항체 발현 플라스미드로 트랜스펙션되었다. huDS6 의 일시적 발현 수치가 매우 낮았기 때문에 고정 세포 라인이 선택되었다.

[0404] CHODG44 세포 (4.32 X 10^6세포/플레이트)가 비선택성 배지에서 15 cm 플레이트에 뿌려졌고 (4 mM L-글루타민, 50 U/ml 페니실린, 50 g/ml 스트렙토마이신, 10% v/v FBS로 보충된 Alpha MEM + 뉴클레오티드 (Gibco)) 37℃, 5% CO_2 습한 배양기에 놓여졌다. 다음날 세포는 Polyfect 트랜스펙션용으로 추천된 변형된 Qiagen 를 사용하여 huDS6 v1.0 및 v1.2 발현 플라스미드로 트랜스펙션되었다. 비선택적 배지가 세포로부터 흡출되었다. 플레이트는 예열된 (37℃) 7 ml PBS로 세척되고 20 ml 비선택적 배지가 재보충되었다. 플라스미드 DNA (11 g)는 800 ㎕ 하이브리도마 SFM (Gibco) 속으로 희석되었다. 그런 다음 70 ㎕ Polyfect (Qiagen)가 DNA/SFM 혼합물에 첨가되었다. Polyfect 혼합물은 수초 동안 휘저어졌고 10 분 동안 대기온도에서 배양되었다. 비선택적 배지 (2.7 ml)가 혼합물에 추가되었다. 최종 혼합물은 플레이트 상의 세포와 함께 24 시간 동안 배양되었다.

[0405] 트랜스펙션 혼합물/배지가 플레이트에서 제거되었고, 세포가 트립신 처리되었으며 계수되었다. 그리고 나서, 세포는 96-웰 플레이트(250 ㎕/웰)에서 선택 배지(4 mM L-글루타민, 50 U/ml 페니실린, 50 ㎍/ml 스트렙토마이신, 10% v/v FBS, 1.25 mg/ml G418가 보충된 알파 MEM-뉴클레오티드)에 다양한 농도(1800, 600, 200, 67 세포수/웰)로 플레이트되었다. 세포는 필요한 경우 배지를 보충하면서 2-3 주 동안 배양되었다. 웰은 정량 ELISA를 사용하여 항체 생산수치에 대해 검색되었다. 이뮬론(Immulon) 2HB 96-웰 플레이트는 염소의 항-인간 IgG $F(ab)_2$ 항체로 코팅되었고(Jackson Immunoresearch; 100㎕의 50mM 탄산나트륨 완충용액(pH 9.6)에서 1㎍/웰), 대기온도 하에서 흔들면서 1.5 시간 동안 배양되었다. 이후의 모든 단계는 대기온도 하에서 실시되었다. 웰은 T-TBS (0.1% Tween-20, TBS)로 두 번 세척되었고 200㎕의 차단완충용액 (1% BSA, T-TBS)으로 1시간 동안 차단되었다. 웰은 T-TBS로 두 번 세척되었다. 별도의 플레이트에서 항체 표준, EM164 (100 ng/ml) 및 배양 상층액이 차단완충용액으로 순차적으로 희석되었다(1:2 또는 1:3). 상기 희석액(100 ㎕)은 ELISA 플레이트로 이동되었고 1시간 동안 인큐베이션되었다. 웰은 T-TBS로 세 번 세척되었고, 차단완충용액으로 1:3000으로 희석된 100㎕의 염소의 항-인간 IgG Fc-AP(Jackson ImmunoResearch)와 함께 45 분간 인큐베이션되었다. T-TBS로 5회 세척 후, 웰은 100 ㎕의 PNPP 현상제[10 mg/ml PNPP(p-니트로페닐 포스페이트, 디소디움 염(Disodium salt); Pierce), 0.1 M 디에탄올아민 pH 10.3 완충용액]를 사용하여 25분 동안 현상하였다. 405nm에서의 흡광도가 ELISA 플레이트 리더로 측정되었다. 표준곡선의 직선 부분에서의 흡광도 값(배양 상층액)이 항체 수준을 결정하기 위해 사용되었다.

[0406] ELISA에 의해 밝혀진 최고의 생산 클론은 확대되고 냉동 세포들이 준비되었다. 정제용 항체를 충분히 생산하기 위해 세포는 30 ml의 선택 배지를 가진 15 cm 플레이트(~ 1× 10^6 세포수/플레이트)로 확장되었고, 1주일간 배양되었다. 배양 상층액은 250 ml의 원추형 튜브에 모아졌고, 테이블 탑 원심분리기에서 회전하강시킨 다음 (2000 rpm, 5분, 4℃), 0.2 μm 여과장치로 살균여과되었다.

[0407] DS6 정제를 위해 NaOH 펠릿이 여과된 배양 상층액에 추가되어 최종 pH 8.0 이 되도록 하였다. 하이 트랩 알프로틴 에이 칼럼(Hi Trap rProtein A column) (Amersham)은 20-50 칼럼 부피의 결합완충용액으로 평형상태로 하였다. 상층액은 튜브연동식 펌프를 사용하여 칼럼 상에 놓여졌다. 그런 다음, 칼럼은 50 칼럼부피의 결합완충용액으로 세척되었다. 결합된 항체는 유리완충용액(100 mM 아세트산, 50 mM NaCl, pH 3)을 사용하여 칼럼에서 유리시켜 분획 콜렉터에 세팅된 튜브로 옮겼다. 유리된 항체는 중화완충용액(2M K_2HPO_4, pH 10.0)을 사용하여 중화되었고, PBS로 밤새 투석되었다. 투석된 항체는 0.2μm 주사 여과기를 통해 여과되었다. 280nm에서의 흡광도가 최종 단백질 농도를 결정하기 위해 측정되었다.

[0408] 정제된 huIgG 의 친화도는 유세포 분석기를 통해 muDS6 와 비교되었다. 1차 실험에서 CA6-발현 세포 라인, WISH, 에 대한 직접결합이 측정되었다. 도 18A에 나타난 바와 같이 쉬메릭 DS6, huDS6 v1.0, 및 huDS6 v1.2 는 적정 KDs 3.15 nM, 3.71 nM, 4.2 nM로서 매우 유사한 친화도를 보여주며 각각 재표면화가 CDRs를 붕괴하지 않음을 보여주었다. 친화도는 도 18B에 나타난 muDS6 (Kd = 1.93 nM) 경우보다 근소하게 작다.

[0409] huDS6 버전이 muDS6의 친화도를 가짐을 확인하기 위해 경쟁적 결합실험이 행해졌다. 본 유형의 장점은 동일한 탐지 시스템이 생쥐 및 인간 항체 모두에서 사용된다는 점이다; 즉 비오틴-muDS6/스트렙타비딘-DTAF이다. 몇몇 경우에 실험으로 측정된 적정 Kd 는 단지 결합을 간접적으로 탐지하기 위해 사용된 2차 반응시약 때문에 변한다. 이는 적정 Kd 의 비오틴-DS6를 염소 항마우스-FITC가 사용되거나 (Kd = 2.80 nM; 도 18B) 스트렙타비딘-DTAF 가 사용될 때 (Kd = 6.76 nM; Figure 19A)를 비교함으로써 알 수 있다. 비오틴-DS6 와 경쟁 목적으로 muDS6, huDS6 v1.0, huDS6 v1.2 의 능력을 비교하는 경쟁 결합분석의 결과가 도 19B에 기재되어 있다. muDS6, huDS6 v1.0, 및 huDS6 v1.2 각각에 대해 적정 EC_{50}는 12.18 nM, 37.07 nM, 및 22.64 nM 이다. 본 결과는 인간화 DS6 를 생산 목적의 muDS6 의 재표면화가 결합 친화도를 거의 감소시키지 않음을 의미한다.

[0410] 실시예 14: DS6-DM1 세포독성 접합체의 제조

[0411] DS6 항체 (8 mg/ml)는 디티오피리딜기(dithiopyridyl)를 도입하기 위해 8배 몰 과량의 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오) 펜타노에이트(SPP)를 사용하여 변형시켰다. 반응은 95% v/v 완충용액 A(50 mM KPi , 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.5) 및 5% v/v DMA에서 실온에서 2시간 동안 진행되었다. 다소 팽창한 반응 혼합물은 NAP 또는 세파덱스(Sephadex) G25 칼럼(완충용액 A로 평형상태로 된 것)을 통해 겔여과 되었다. 변형 정도는 280nm에서의 항체 흡광도를 측정함으로써 결정되었으며, DTT 방출 2-머캅토피리딘(Spy)은 280 및 343 nm에서 측정하였다. 변형된 DS6는 Spy에 대해 1.7배 몰 과량의 $N^{2'}$-데아세틸-N-$^{2'}$(3-머캅토-1-옥소프로필)-메이탄신 (L-DM1)을 사용하여 2.5mg Ab/mL 농도로 접합되었다. 반응은 DMA(3% v/v)를 갖는 완충용액 A (97% v/v)에서 진행되었다. 상기 반응물은 실온에서 ?20시간 동안 밤새 인큐베이션되었다. 혼탁한 반응 혼합물은 원심분리되었으며(1162 x g, 10 분), 상층액은 완충용액 B (1X PBS pH 6.5)로 평형상태로 된 NAP-25 또는 S300 (탠덤 3, 3x 26/10 탈염된 칼럼, G25 매체) 칼럼을 겔여과되었다. 펠릿(pellet)은 버렸다. 접합체는 0.22 μm 밀렉스(Millex) GV 필터를 사용하여 멸균여과되었으며, 슬라이드 에이 라이저(Slide-A-Lyzer)를 이용하여 완충용액 B로 투석하였다. DS6 분자 당 연결된 DM1 분자 수는 여과된 물질의 252nm 및 280nm에서의 흡광도를 측정하여 결정되었다. DM1/Ab 비율은 4.36인 것으로 확인되었으며 접합된 DS6의 단계 수율은 55%이었다. 접합된 항체 농도는 1.32 mg/mL이었다. 정제된 접합체는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)(SEC)에 의해 생화학적으로 특성이 밝혀졌는데, 92% 단량체인 것으로 밝혀졌다. 정제된 접합체 내에서의 DM1 분석에 의하면 99%가 항체에 공유결합된 것으로 나타났다. 도 20에서는 Caov-3 세포에 대한 DS6-DM1 접합체 및 변형되지 않은 DS6의 유세포분석 결합에서 DS6의 접합이 약간의 친화도 감소만을 유발하는 것을 나타내고 있다.

[0412] 실시예 15: DS6-DM1의 시험관 내 세포독성

[0413] 접합되지 않은 상태의 항체로서 DS6는 세포배지에서 증식 활성이나 생장 억제 활성을 나타내지 않는다(도 21). 그러나, 염소의 항-마우스 IgG 중쇄 및 경쇄에 대한 DM1 접합체의 존재 하에서 DS6가 세포와 함께 인큐베이션될 때, DS6는 이러한 접합체를 세포에 표적화시켜 전달하여 간접적인 세포독성을 일으키는 데에 매우 효과적이다(도 21). 접합되지 않은 DS6의 고유 활성을 추가로 테스트하기 위해 쥐 및 인간화 DS6을 사용한 보체-의존적인 세포독성 어세이(CDC)가 행해졌다. HPAC 및 ZR-75-1 세포(25000개 세포수/웰)는 200 ㎕의 RHBP 배지(RPMI-1640, 0.1% BSA, 20mM HEPES (pH 7.2-7.4), 100 U/ml 페니실린 및 100 ug/ml 스트렙토마이신)에서

5% 인간 혈청 또는 토끼 혈청, 및 다양하게 희석된 쥐나 인간화 DS6의 존재 하에 96-웰 플레이트에 놓여졌다. 세포는 2시간 동안 37°C에서 배양되었다. 그런 다음, 알라마 블루(Alamar Blue) (최종농도 10%) 반응시약(Biosource)이 상층액에 첨가되었다. 세포는 형광값 측정 전 5-24 시간 동안 배양되었다. 쥐 및 인간화 DS6는 모두 보체-의존적인 세포독성 어세이(CDC)에서 아무런 영향도 미치지 않았다(도 22). 이는 DS6의 치료적 응용이 독성 효과 분자의 접합을 필요로 함을 의미한다.

[0414] 메이탄시노이드가 접합된 DS6 항체의 세포독성은 다양한 DS6 양성 세포주에서 2개의 상이한 어세이를 사용하여 조사되었다. 배양 배지로 희석된 2ml의 접합체가 있는 6-웰 플레이트상에 세포(1000-2500개 세포수/웰)들이 플레이팅된 상태에서 집락형성 분석법이 실시되었다. 세포는 다양한 농도, 일반적으로 3 X 10^{-11} M 에서 3 X 10^{-9} M 까지의 접합체에 지속적으로 노출되었으며, 37℃, 6% CO_2 의 습도조절된 챔버에서 5-9일 동안 배양되었다. 웰은 PBS로 세척되었고, 집락은 1% w/v 크리스탈 바이올렛/10% v/v 포름알데히드/PBS 용액으로 염색되었다. 결합되지 않은 염색제는 증류수로 웰로부터 세척되었으며 플레이트는 건조시켰다. 집락의 수는 라이카 스테레오줌 4(Leica StereoZoom 4) 해부 현미경을 사용하여 계수되었다.

[0415] 플레이팅 효율(PE)은 플레이트된 세포수 대 집락수로 계산되었다. 생존 비율(surviving fraction)은 "처리된 세포의 PE/비처리된 세포의 PE"로서 산출되었다. IC_{50} 농도는 세포 생존비율 대 접합체의 몰 농도를 그래프로 그려서 결정되었다. 집락형성 분석법(도 23)에 있어서, DS6-DM1은 Caov-3 세포사멸에 효율적이었는데, 평가된 IC_{50}이 800 pM이었다. 항원 음성 세포인 A375는 테스트된 DS6-DM1의 최고 농도인 3 x 10^{-9}M의 컨쥬게이트에 의해 약간만 영향을 받았는데, 이는 접합체의 세포사멸능력이 항원 발현 세포에 대해서만 특이하게 진행됨을 보여준다. 그러나, 메이탄신에 대한 분명한 민감성에도 불구하고 다수의 다른 DS6 양성 세포주는 면역 접합체에 대해 특별히 민감하지 않았다. 모든 자궁경부암 세포주 (HeLa, KB, 및 WISH)는 접합체에 대해 민감한 반면에, 난소암 및 유방암 세포주는 소수만이 접합체에 의한 세포독성 효과를 나타냈다. 췌장암 세포주는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

[0416] MTT 실험에서 세포는 1000-5000개 세포수/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 뿌려졌다. 세포는 200㎕의 배양 배지에서 접합되지 않은 DS6 또는 DS6-DM1 면역 접합체의 순차 희석액으로 플레이팅되었다. 샘플은 3개로 나누어 실험하였다. 세포 및 항체/접합체 혼합물은 2-7일간 배양되었으며, 이 기간 동안 세포 생존율이 MTT([3(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드)]어세이에 의해 평가되었다. MTT(50 ㎍/웰)가 배양 상층액에 첨가되었으며 3-4 시간 동안 37℃에서 인큐베이션되었다. 배지는 제거되었고 MTT 포르마잔(formazan)은 DMSO (175㎕/웰)에서 용해되었다. 540-545nm에서의 흡광도가 측정되었다. MTT 세포 생존율 어세이(도 24C)에서 면역 접합체는 효과적으로 Caov-3 세포를 사멸시킬 수 있었는데, 평가된 IC_{50}이 약 1.61 nM이었다. 최고 농도의 접합체를 가진 웰은 접합되지 않은 항체(아무런 영향 없음)를 가진 웰과 비교할 때 생존 세포를 포함하고 있지 않았다 (도 21 및 도 24).

[0417] 다른 세포주에 대한 MTT 어세이 결과는 약간 상이했다(도 24A, 도 24B, 및 도 24D-I). 많은 경우에 있어서, 비록 약간의 세포독성이 관찰되었지만 접합체는 전체 세포 집단을 완벽하게 사멸시킬 수는 없었다(WISH 세포의 경우 예외임). BT-20, OVCAR5, 및 HPAC 세포는 특히 저항성을 가졌다: 최고 접합체 농도(32 nM)의 웰에서 50% 이상의 세포가 여전히 생존하였다.

[0418] 실시예 16: 생체내에서의 접합체 항종양 활성

[0419] DS6-DM1 접합체의 생체 내 활성을 설명하기 위해 인간 종양 이종이식이 SCID 마우스에서 이루어졌다. 인간의 자궁경부암 세포주인 KB의 피하주입 모델이 개발되었다. KB 세포는 시험관 내에서 생장되어 수집되었으며, 100 μL 무혈청 배지 내의 5 X 10^{6}개 세포를 각각의 마우스의 우측 어깨 아래에 주입하여 6일 동안 생장시켰고, 평균 종양 용적이 144 ± 125 mm^{3}이 되는 시점에 약물처리가 개시되었다. 마우스에게 5일 동안 매일 PBS, 150 μg/kg DM1 농도의 접합체, 또는 225 μg/kg DM1 농도의 접합체(그룹 당 2 마리)가 정맥 내로 투여되었다. 독성 반응은 처치 과정 중 매일 관찰되었다. 종양 용적 (도 25A) 및 대응 체중 (도 25B)은 연구기간 전체를 통해 관찰되었다.

[0420] PBS 대조군으로 처리한 KB 종양은 약 4일 동안 두배가 되면서 급속하게 성장하였다. 반면에, 접합체로 처리된

마우스 그룹에서는 225㎍/kg 및 150㎍/kg 투여량 그룹의 경우 처치를 시작한 후 각각 14일째 및 18일째에 완전한 종양 감소를 보여주었다. 150 ㎍/kg 투여량에서 종양 지연은 약 70일이었다. 225㎍/kg에서의 처리는 120일째의 연구 종료 시점까지 종양 재발의 증거가 없어 치료효과를 나타냈다. 도 25B에서 확인되는 바와 같이, 150 ㎍/kg 그룹의 마우스는 체중 감소를 나타내지 않았는데, 이로부터 상기 투여량이 견딜만하다는 것을 알 수 있다. 보다 고농도의 투여량에서도 마우스는 일시적으로 3% 체중감소만을 경험하게 된다. 5일 치료과정 동안에 마우스는 아무런 가시적인 독성 신호를 보여주지 않았다. 본 연구는 DS6-DM1 처리가 KB 이종이식 종양을 가진 마우스를 비독성 투여량으로 치료할 수 있음을 보여준다.

[0421] DS6-DM1 활성은 피하 이종이식 모델에 대해 추가로 테스트되었다(도 26 참조). 이종이식 목적으로 사용된 종양 세포주는 일정한 범위의 시험관 내 메이탄신 민감성 및 CA6 에피토프 농도를 보여주었다(하기 표9). OVCAR5 세포 및 TOV-21G는 난소 종양 세포주이고, HPAC는 췌장 종양 세포주이며, HeLa은 자궁경부 종양 세포주이다. OVCAR5 및 TOV-21G 세포는 낮은 표면 CA6 발현을 나타내며, HeLa 세포는 중간 수준의 표면 CA6 발현을 나타내고, HPAC 세포는 높은 CA6 표면 발현 밀도를 나타낸다. TOV-21G 및 HPAC 세포는 메이탄신 민감성이고, OVCAR5 및 HeLa 세포는 2-7배 적은 메이탄신 민감성을 가진다.

표 9

[0422]

세포라인	MMF*	적정 Kd (M)	집락형성시험 메이탄신 IC_{50} (M)	집락형성시험 접합체 IC_{50} (M)	MTT 실험 접합체 EC_{50} (M)
BT-20	232.20	9.14×10^{-10}	3.50×10^{-10}	$> 3.00 \times 10^{-09}$	1.44×10^{-08}
BT-483	1911.00	1.37×10^{-08}	1.50×10^{-10}	1.00×10^{-10}	N/A
Caov-3	465.20	5.48×10^{-09}	3.20×10^{-11}	8.00×10^{-10}	1.61×10^{-09}
Caov-4	149.00	4.04×10^{-09}	6.00×10^{-10}	$> 3.00 \times 10^{-09}$	N/A
HeLa	242.50	6.94×10^{-10}	1.00×10^{-10}	1.80×10^{-09}	N/A
HPAC	2228.00	2.35×10^{-08}	5.50×10^{-11}	1.80×10^{-09}	1.84×10^{-09}
HPAF-II	266.50	2.81×10^{-09}	6.00×10^{-10}	$> 3.00 \times 10^{-09}$	1.00×10^{-08}
Hs766T	182.90	2.32×10^{-09}	$> 3.00 \times 10^{-09}$	$> 3.00 \times 10^{-09}$	$> 3.20 \times 10^{-08}$
KB	119.56	1.11×10^{-10}	3.00×10^{-11}	1.40×10^{-09}	3.01×10^{-09}
OVCAR5	97.10	1.47×10^{-09}	3.20×10^{-10}	$> 3.00 \times 10^{-09}$	8.46×10^{-07}
T-47D	559.58	3.42×10^{-09}	1.20×10^{-10}	$> 3.00 \times 10^{-09}$	N/A
TOV-21G	87.79	3.07×10^{-10}	4.80×10^{-11}	2.00×10^{-09}	6.88×10^{-09}
WISH	1133.55	2.38×10^{-09}	9.00×10^{-11}	4.60×10^{-10}	6.69×10^{-10}
ZR-75-1	811.67	4.30×10^{-09}	1.00×10^{-10}	N/A	9.45×10^{-10}

[0423] *average maximum relative mean fluorescence

[0424] 4개의 세포주를 시험관 내에서 생장시켜 수집하였으며, 100 ㎕ 무혈청 배지내의 1×10^{7}개의 세포를 각각의 마우스의 우측 어깨 아래에 주입하였고(모델당 6 마리), 6일간 생장시켜 평균 종양용적이 다음과 같이 되면 약물 처리를 개시하였다: OVCAR5의 경우, 시험 및 대조군으로 각각 평균 종양용적이 57.6±6.7 및 90.2±13.4 mm^3이 되는 경우; HPAC의 경우, 시험 및 대조군으로 각각 평균 종양용적이 147.1±29.6 및 176.2±18.9 mm^3이 되는 경우; HeLa의 경우, 시험 및 대조군으로 각각 평균 종양용적이 194.3±37.2 및 201.7±71.7mm^3이 되는 경우; TOV-21G의 경우, 시험 및 대조군으로 각각 평균 종양용적이 96.6±22.8 및 155.6± 13.4 mm^3 이 되는 경우. 각각의 모델에 대해 세 마리의 대조군 마우스가 매주 두 번의 PBS 투약 처리되었으며, 세 마리 시험용 마우스에는 매주 두 번 접합체(600㎍/kg DM1)를 정맥 내 투여하였다. 독성 반응은 처리 중 매일 관찰되었으며, 종양용적 및 체중은 전체 연구과정을 통해 관찰되었다. 다양한 모델에 대한 접합체 효율이 도 26A, 도

26C, 도 26E 및 도 26G에서 그래프로 나타나며, 대응되는 체중은 도 26B, 도 26D, 도 26F, 및 도 26H에 표시되어 있다. OVCAR5, TOV-21G 및 HPAC 세포주는 각 모델의 PBS 대조군에서 확인되는 바와 같이 심각한 종양을 형성한다. HeLa 모델은 급격한 성장을 개시하기 전에 약 3주간의 지연기간을 가졌다. 모든 모델에서 DS6-DM1 접합체 처리는 모든 마우스에서 완전한 종양의 감소를 가져왔다. TOV-21G, HPAC 및 HeLa 모델에 대해 마우스는 61일째에 종양이 없는 상태를 유지한다. OVCAR5 모델에서 종양 투여 후 약 45일 만에 종양이 재발했다. 따라서, 이 모델에서의 DS6-DM1 처리는 종양 성장을 약 34일 지연시키는 결과를 가져온다. 이러한 성장 지연은 OVCAR5 세포가 메이탄신에 덜 민감하고 낮은 CA6 에피토프 발현을 가지기 때문에 의미가 있는 것이다. CA6 에피토프 밀도(농도)가 높거나 메이탄신에 보다 더 민감한 경우의 모델에서 종양 감소는 보다 명백하다. 단지 2회의 투약이 실시되었다는 것이 주목할 만하다. 체중감소가 관찰되지 않았기 때문에 본 연구에서 사용된 투약 일정은 마우스에게 독성적인 것이 아닌 것이 명백하다. 추가의 투여 또는 고농도의 접합체 투여로 치료가 달성될 수 있을 것이다.

[0425] 인간 난소암은 대개 복막성이다. OVCAR5 세포는 인간의 질병과 유사한 방식으로 종양 및 복수를 형성하는 SCID 마우스에서 복막내(IP) 모델로서 강력하게 생장한다. IP 모델에서의 활성을 설명하기 위해, DS6-DM1는 OVCAR5 IP 종양을 갖는 마우스를 치료하는 데에 사용되었다(도 27). OVCAR5 세포는 시험관 내에서 생장되어 수확되었으며, 100 μL 무혈청 배지 내의 1 X 10^7 개의 세포가 복막 내로 주입되었다. 종양은 6일 동안 생장시킨 후 이 시점에서 처치가 개시되었다. 마우스는 2주 동안 매주 PBS 또는 DS6-DM1 접합체(600㎍/kg DM1 투여량)로 처리되었고 복막염으로 인한 체중감소를 모니터링하였다. 28일째에 PBS 마우스 그룹은 20% 이상의 체중감소를 보였고 안락사되었다. 처치된 그룹은 20%를 초과하는 체중감소를 보인 45일째에 희생되었다. 본 연구는 OVCAR5 세포가 메이탄신에 덜 민감하고 세포당 CA6 에피토프 밀도가 희박함에도 불구하고, 악성의 OVCAR5 IP 모델에 있어서 DS6-DM1가 종양 성장을 지연시킬 수 있음을 보이고 있다. 사용된 투약 일정은 어떠한 가시적인 독성도 나타내지 않았기 때문에 추가 투여 및 고농도 투여로 종양 성장 지연 또는 치료가 달성될 수 있을 것이다.

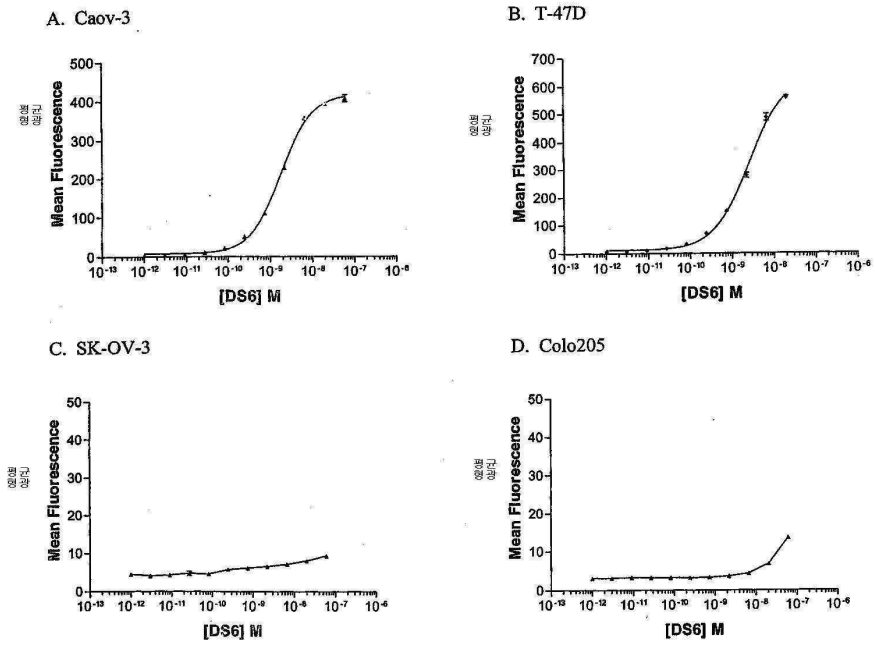
[0426] 실시예 17: DS6-SPP-MM1-202 탁소이드 세포독성 접합체의 합성 및 특정화

[0427] DS6는 *N*-설포숙신이미딜 4-니트로-2-피리딜-펜타노에이트(SSNPP) 연결기(링커)에 의해 변형되었다. 90% 완충용액 A, 10% DMA 내의 50 mg DS6 항체에 DMA 내의 10 당량 SSNPP이 첨가되었다. 항체의 최종농도는 8 mg/ml이었다. 반응은 실온에서 4시간 동안 휘저으면서 수행되었고, 반응물은 G25 크로마토그래피로 정제되었다. 항체 변형의 정도는 280nm(항체) 및 325nm(연결기)에서의 흡광도를 이용하여 분광기로 측정되었으며, 그 결과 3.82 연결기/항체를 갖는 것으로 나타났다. 항체의 회수는 43.3 mg 이었고, 수율은 87% 이었다. DS6-니트로SPP의 접합은 탁소이드 MM1-202(1812 P.16)와 접합되었다. 접합은 90% 완충용액 A, 10% DM1에서 42 mg 규모로 진행되었다. 탁소이드는 0.43 당량/연결기(각 분취액)의 4 분취액(aliquot)으로 약 20시간에 걸쳐 첨가되었다. 이때 반응물은 눈에 띠게 탁하게 변했다. G25 정제 후에 얻은 접합체는 약 4.3 탁소이드/항체로서 약 64% 수율로 회수되었고, 약 1 당량의 연결기(링커)가 반응하지 않고 남겨졌다. 반응하지 않은 연결기를 제거하기 위해, 반응하지 않은 연결기에 대해 1 당량의 시스테인이 접합체에 첨가되었고 밤새 휘저어졌다. 시스테인 첨가에 의해 황색 색조가 눈에 띠는데, 이는 티오피리딘의 방출을 의미한다. 그런 다음, 반응 용액은 수일에 걸쳐 완충용액 B/0.01% 트윈 20에서 투석되었고 추가로 단독의 완충용액 B로 재투석되었다. 최종 접합체는 2.86 약제/항체를 갖는다. 회수된 항체는 14.7 mg이었으며 총 35% 수율을 보였다. 또한, 접합체는 SEC에 의해 생화학적으로 특성이 밝혀졌으며, 89%의 단량체, 10.5%의 이량체 및 0.5%의 보다 큰 분자량 집합체를 갖는 것으로 밝혀졌다.

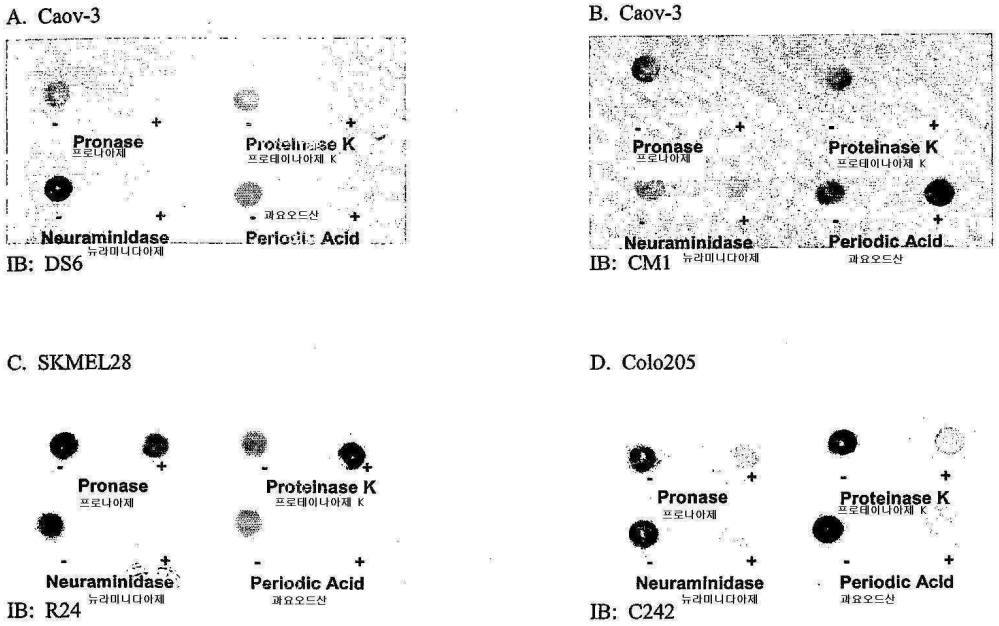
[0428] HeLa 세포 상에서 DS6-SPP-MM1-202 탁소이드 대 DS6 항체의 결합을 비교하는 유세포분석 결과가 도 28에 도시되어 있다. 상기 결과에 의하면 DS6가 탁산에 접합될 때 결합 활성을 유지함을 알 수 있다.

도면

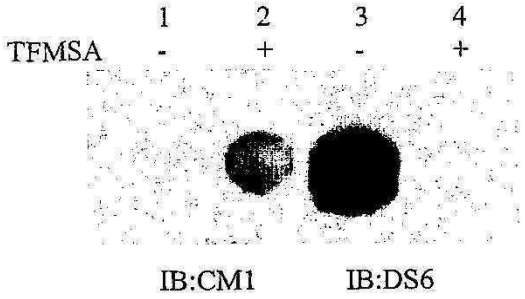
도면1


A. Caov-3
B. T-47D
C. SK-OV-3
D. Colo205
Mean Fluorescence
[DS6] M

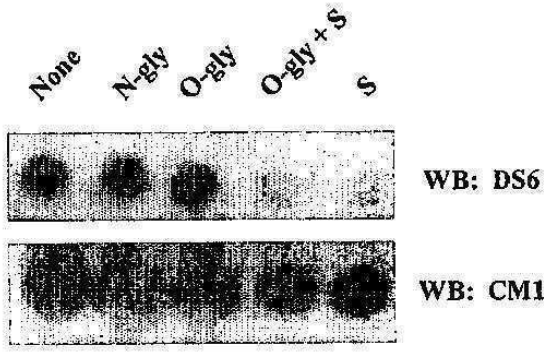
도면2


A. Caov-3
Pronase
프로나이제
Proteinase K
프로테이나이제 K
Neuraminidase
뉴라미니다이제
Periodic Acid
과요오드산
IB: DS6
B. Caov-3
IB: CM1
C. SKMEL28
IB: R24
D. Colo205
IB: C242

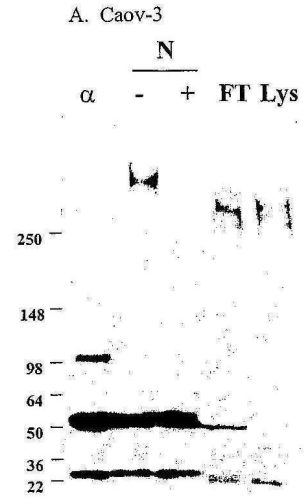
도면3



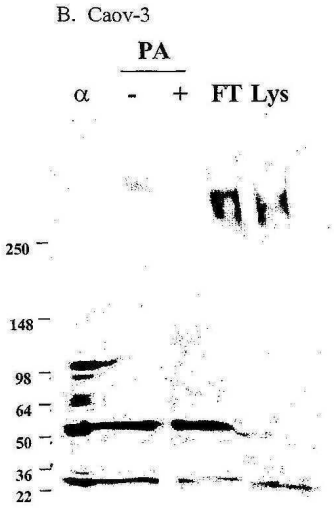
도면4



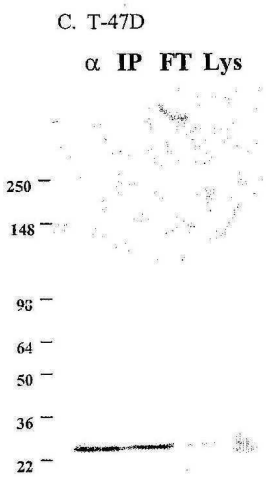
도면5a



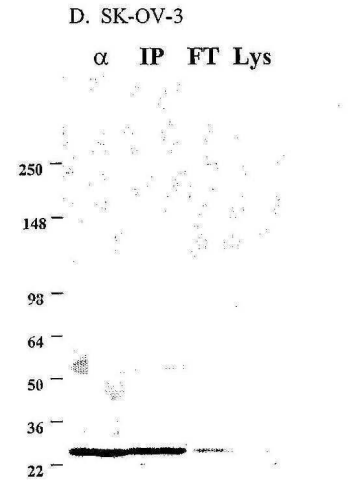
도면5b



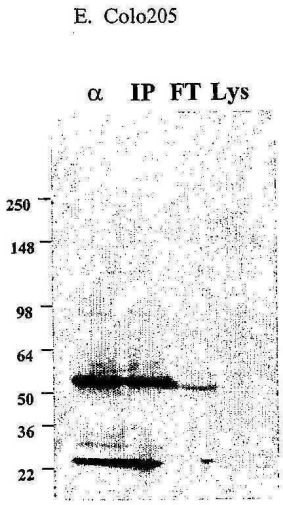
도면5c



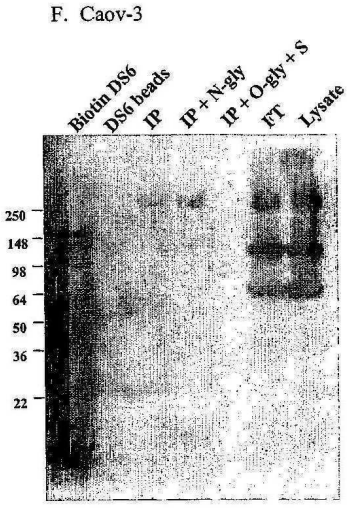
도면5d



도면5e

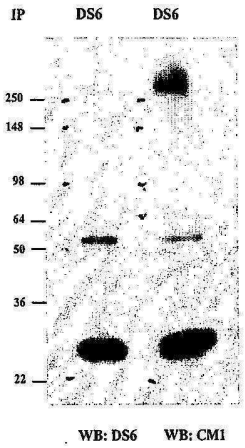


도면5f

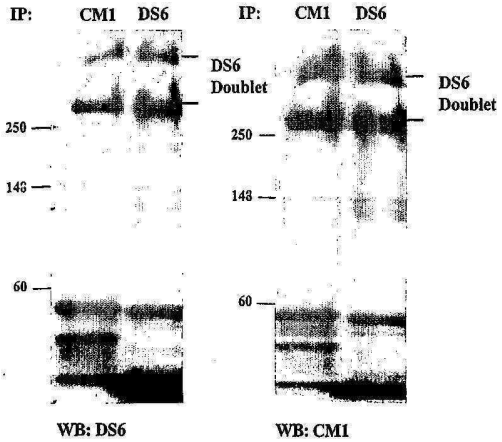


도면6

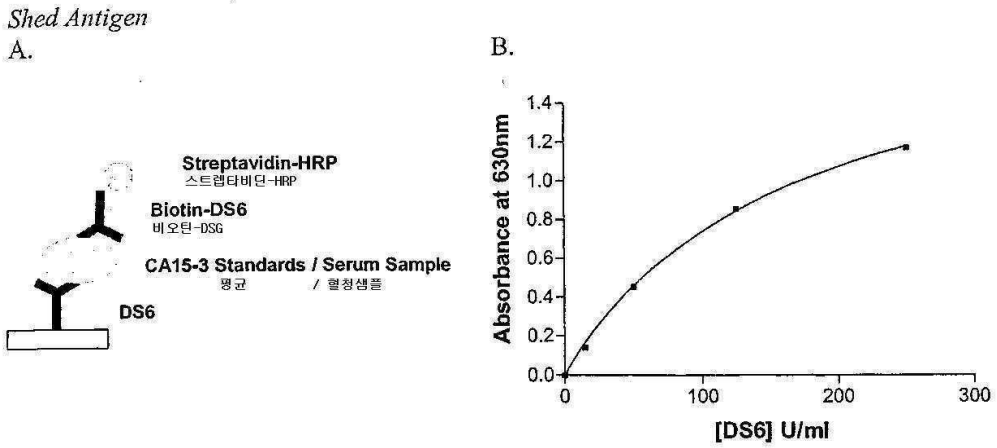
A. Caov-3



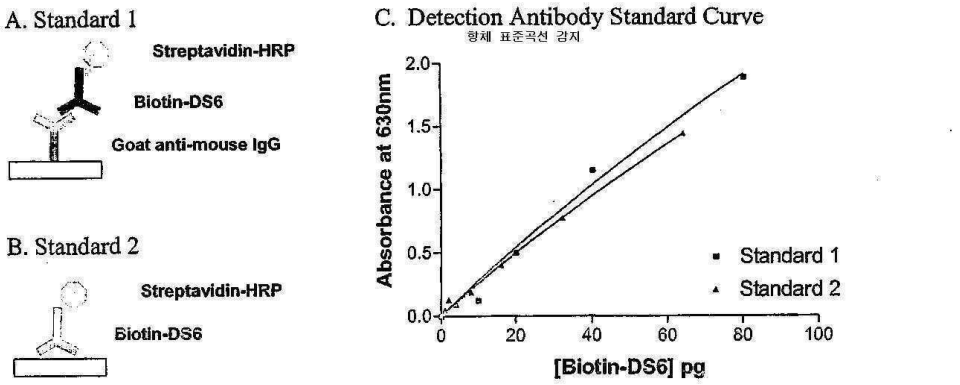
B. HeLa



도면7


Shed Antigen
A.
Streptavidin-HRP
스트렙타비딘-HRP
Biotin-DS6
비오틴-DS6
CA15-3 Standards / Serum Sample
평균 / 혈청샘플
DS6
B.
Absorbance at 630nm
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
100
200
300
[DS6] U/ml

도면8


A. Standard 1
Streptavidin-HRP
Biotin-DS6
Goat anti-mouse IgG
B. Standard 2
Streptavidin-HRP
Biotin-DS6
C. Detection Antibody Standard Curve
항체 표준곡선 검지
Absorbance at 630nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
20
40
60
80
100
[Biotin-DS6] pg
Standard 1
Standard 2

도면9

A. Light Chain - SEQ ID NO:7

경쇄

```
      Q  I  V  L     T  Q  S     P  A  I     M  S  A  S     P  G  E
  1 CAAATTGTTC TCACCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA

                                          CDR1
      K  V  T     I  T  C  S     A  H  S     S  V  S     F  M  H
 51 GAAGGTCACC ATAACCTGCA GTGCCCACTC AAGTGTAAGT TTCATGCACT

      W  F  Q  Q     K  P  G     T  S  P  K     L  W  I     Y  S  T
101 GGTTCCAGCA GAAGCCAGGC ACTTCTCCCA AACTCTGGAT TTATAGCACA

         CDR2
      S  S  L  A     S  G  V     P  A  R     F  G  G  S     G  S  G
151 TCCAGCCTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC TTCGGTGGCA GTGGATCTGG

      T  S  Y     S  L  T  I     S  R  M     E  A  E     D  A  A
201 GACCTCTTAC TCTCTCACAA TCAGCCGAAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA

                                          CDR3
      T  Y  Y  C     Q  Q  R     S  S  F  P     L  T  F     G  A  G
251 CTTATTACTG CCAGCAAAGG AGTAGTTTCC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG

      T  K  L  E     L  K  R
301 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG T
```

B. Heavy Chain - SEQ ID NO:9

중쇄

```
      Q  A  Y  L     Q  Q  S     G  A  E     L  V  R  S     G  A  S
  1 CAGGCTTATC TCCAGCAGTC TGGGGCTGAG CTGGTGAGGT CTGGGGCCTC

                                                      CDR1
      V  K  M     S  C  K  A     S  G  Y     T  F  T     S  Y  N
 51 AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACATTTACC AGTTACAATA

      M  H  W  V     K  Q  T     P  G  Q  G     L  E  W     I  G  Y
101 TGCACTGGGT AAAGCAGACA CCTGGACAGG GCCTGGAATG GATTGGATAT

                  CDR2
      I  Y  P  G     N  G  A     T  N  Y     N  Q  K  F     K  G  K
151 ATTTATCCTG GAAATGGTGC TACTAACTAC AATCAGAAGT TCAAGGGCAA

      A  T  L     T  A  D  P     S  S  S     T  A  Y     M  Q  I
201 GGCCACATTG ACTGCAGACC CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA

      S  S  L  T     S  E  D     S  A  V  Y     F  C  A     R  G  D
251 GCAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGAGAT

         CDR3
      S  V  P  F     A  Y  W     G  Q  G     T  L  V  T     V  S  A
301 TCGGTCCCGT TTGCTTACTG GGGCCAAGGG ACTCTTGTCA CTGTCTCTGC A
```

도면10

A. Light Chain 경쇄

CDR1: S A H S S V S F M H - SEQ ID NO:4

CDR2: S T S S L A S - SEQ ID NO:5

CDR3: Q Q R S S F P L T - SEQ ID NO:6

B. Heavy Chain 중쇄

CDR1: S Y N M H - SEQ ID NO:1

CDR2: Y I Y P G N G A T N Y N Q K F K G - SEQ ID NO:2

CDR3: G D S V P F A Y - SEQ ID NO:3

C. AbM Heavy Chain 중쇄

CDR1: G Y T F T S Y N M H - SEQ ID NO:20

CDR2: Y I Y P G N G A T N - SEQ ID NO:21

CDR3: G D S V P F A Y - SEQ ID NO:22

도면11

Light Chain 경쇄

```
                1                                                  50
IgVKap4   (1)  QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYST
muDS6LC   (1)  QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYST

               51                                              95
IgVKap4  (51)  SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPP
muDS6LC  (51)  SSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFPL
```

Heavy Chain 중쇄

```
                1                                                  50
IgVh J558.41   (1)QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY
     muDS6HC   (1)QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY

               51                                                  98
IgVh J558.41  (51)IYPGNGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR
     muDS6HC  (51)IYPGNGATNYNQKFKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR
```

도면12

중쇄 열개의 가장 근접한 서열

Light Chain Ten Most Homologous Sequences with Structures

```
                1                                                          60
muDS6LC    (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHS--SVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLASGVP
   1for    (1) QIVLTQSPAIMSAFPGEKVTITCSATS--SVNYMHWFQQKPGTSPKLWIYSSSNLASGVP
   1psk    (1) XIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASS--SVSNIHWFQQKPGTFPKLWIYSTSTLASGVP
   1ayl    (1) DIQMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS--SVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDSTNLASGVP
   1baf    (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS--SVYYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVP
   1mim    (1) QIVSTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSRS--YMQWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVP
   1clo    (1) QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASS--SVTYIHWYQQKPGSSPKSWIYATSNLASGVP
   1a6t    (1) QSVLSQSPAILSASPGEKVIMTCSPSS--SVSYMQWYQQKPGSSPKPWIYSTSNLASGVP
   1fig    (1) ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMACRASSSVSSTYLHWYQQKSGASPKLLIYSTSNLASGVP
   15c8    (1) DIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSNLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVP
   1iai    (1) DIQLTQSPAFMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQQKSETSPKPWIYGTSNLASGVP

                61                                                  111
muDS6LC   (59) ARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFP-LTFGAGTKLELK--   (SEQ ID NO:7)
   1for   (59) ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYP-ITFGSGTKLEIKR-   (SEQ ID NO:44)
   1psk   (59) GRFSGSGSGTSYSLTISRMGAEDAATYYCQQRSGYP-FTFGSGTKLEIKR-   (SEQ ID NO:45)
   1ayl   (59) VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSTYP-LTFGAGTKLELKR-   (SEQ ID NO:46)
   1baf   (59) VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPPITFGVGTKLELKR-   (SEQ ID NO:47)
   1mim   (59) ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSS---YTFGGGTKLEIKR-   (SEQ ID NO:48)
   1clo   (59) ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQHWSSKP-PTFGGGTKLEIKR-   (SEQ ID NO:49)
   1a6t   (59) GRFSGGGSGTSFSLTISGVEAEDAATYYCQQYSSHP-LTFGGGTKLELKR-   (SEQ ID NO:50)
   1fig   (61) ARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYP-LTFGAGTKLELKR-   (SEQ ID NO:51)
   15c8   (61) ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSP-YTFGGGTKLEIKRA   (SEQ ID NO:52)
   1iai   (61) VRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWNSYP-YTFGGGTKLEIKR-   (SEQ ID NO:53)
```

Heavy Chain Ten Most Homologous Sequences with Structures

```
                1          중쇄 열개의 가장 근접한 서열                    70
muDS6HC    (1) QAYLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGATNYNQKFKGKATL
   1PLG    (1) QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYTFTDYYIHWVKQRPGEGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL
   1NMB    (1) QVQLQQPGAELVKPGASVRMSCKASGYTFTNYNMYWVKQSPGQGLEWIGIFYPGNGDTSYNQKFKDKATL
   1FOR    (1) QGQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSFWVNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDNKYNGKFKGKATL
   1NQB    (1) QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGRGLEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATL
   6FAB    (1) EVQLQQSGVELVRAGSSVKMSCKASGYTFTSNGINWVKQRPGQGLEWIGYNNPGNGYIAYNEKFKGKTTL
   1AE6    (1) QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWMKQKPGQGLEWIGWIDPGSGNTKYNEKFKGKATL
   1D5B    (1) QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSFWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGGTHYNEKFKGKATF
   1FAI    (1) QVQLQQSGAELVRAGSSVKMSCKASGYTFTSYGVNWVKQRPGQGLEWIGYINPGKGYLSYNEKFKGKTTL
   1MLB    (1) QVQLQESGAEVMKPGASVKISCKATGYTFSTYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTYYNEKFKGKATF
   1JHL    (1) QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFISYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKFKDKATL

                71                                                  124
muDS6HC   (71) TADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDSVP------FA-YWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:9)
   1PLG   (71) TVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGK-------FAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:54)
   1NMB   (71) TADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSGGSYRY--DGGFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:55)
   1FOR   (71) TADKSSTTAYMQLYSLTSEDSAVYFCARSGN-Y----PYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:56)
   1NQB   (71) TVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDYYGS----SYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:57)
   6FAB   (71) TVDKSSSTAYMQLRSLTSEDSAVYFCARSEYYG---GSYKFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:58)
   1AE6   (71) TVDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCAREKTTY----YYAMDYWGQGTSVTVSA (SEQ ID NO:59)
   1D5B   (71) TADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGHSYYFY--DG--DYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:60)
   1FAI   (71) TVDRSSSTAYMQLRSLTSEDAAVYFCARSFYGGSDLAVYYFDSWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:61)
   1MLB   (71) TADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNYG--------YWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:62)
   1JHL   (71) TVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRDDNYG------AMDYWGQGTTVTV-- (SEQ ID NO:63)
```

도면13a

A. muDS6 Light Chain Surface Calculations

경쇄 표면 계산

25-35	ave % acc	>30	25-35	flank	surf	Kabat No	SR no	SR surf
Q	53.59	1			1	1	2	2
I	4.63					2	3	
V	35.63	3			3	3	4	4
L	4.02					4	5	
T	30.41	5	*??*	33.144	5	5	6	6
Q	7.10					6	7	
S	29.08		*??*	29.604		7	8	
P	21.80					8	9	
A	31.98	9	*??*	31.567	9	9	10	10
I	37.67	10			10	10	11	11
M	14.99					11	12	
S	27.16		*??*	26.2		12	13	
A	1.99					13	14	
S	17.20					14	15	
P	34.43	15	*??*	33.573	15	15	16	16
G	23.43					16	17	
E	25.59		*??*	25.601		17	18	
K	45.67	18			18	18	19	19
V	2.97					19	20	
T	26.62		*??*	26.845		20	21	
I	0.79					21	22	
T	20.78					22	23	
C	0.13					23	24	
S	25.91		*??*			24	25	
A	3.25					25	26	
H	31.44	26	*??*			26	27	
S	28.15		*??*			27	28	
S	33.75	27A	*??*			27A	29	
V	5.59					27B	30	
S	32.25	27C	*??*			27C	31	
	8.34					27D	32	
	3.70					27E	33	
	0.00					27F	34	
	0.00					28	35	
	0.00					29	36	
	0.00					30	37	
	0.00					31	38	
F	22.65					32	39	
M	0.10					33	40	
H	2.53					34	41	
W	0.30					35	42	
F	1.13					36	43	
Q	3.34					37	44	
Q	8.68					38	45	
K	22.43					39	46	
P	50.82	40			40	40	47	47
G	44.24	41			41	41	48	48
T	25.08		*??*	29.575		42	49	
S	15.21					43	50	
P	2.56					44	51	
K	27.85		*??*	29.675		45	52	
L	9.44					46	53	
W	5.39					47	54	
I	0.34					48	55	
Y	17.69					49	56	
S	13.01					50	57	
T	5.88					51	58	
S	29.44		*??*			52	59	
S	26.16		*??*			53	60	
L	22.15					54	61	
A	9.25					55	62	
S	51.26	56				56	63	
G	38.57	57			57	57	64	64
V	8.76					58	65	

seq	ave % acc	>30	25-35	flank	surf	Kabat No	SR no	SR surf
P	19.01					59	66	
A	47.39	60			60	60	67	67
R	15.49					61	68	
F	2.19					62	69	
G	25.02		*??*	0		63	70	
G	7.03					64	71	
S	26.00		*??*	28.462		65	72	
G	19.35					66	73	
S	38.04	67			67	67	74	74
G	17.95					68	75	
T	24.68					69	76	
S	28.93		*??*	28.059		70	77	
Y	1.55					71	78	
S	12.99					72	79	
L	0.03					73	80	
T	10.88					74	81	
I	0.06					75	82	
S	24.84					76	83	
R	32.14	77	*??*	46.087	77	77	84	84
M	0.87					78	85	
E	24.97					79	86	
A	30.52	80	*??*	27.85		80	87	
E	36.62	81			81	81	88	88
D	1.24					82	89	
A	17.79					83	90	
A	3.37					84	91	
T	11.19					85	92	
Y	0.05					86	93	
Y	4.28					87	94	
C	0.04					88	95	
Q	1.16					89	96	
Q	0.23					90	97	
R	16.47					91	98	
S	22.54					92	99	
S	23.05					93	100	
	3.13					94	101	
	0.89					95	102	
F	22.65					95E	107	
P	9.70					95F	108	
L	6.52					96	109	
T	11.97					97	110	
F	6.15					98	111	
G	1.68					99	112	
A	28.73		*??*	20.74		100	113	
G	4.48					101	114	
T	0.10					102	115	
K	29.39		*??*	29.573		103	116	
L	1.15					104	117	
E	27.47		*??*	27.17		105	118	
L	21.66					106	119	
K	35.78	107			107	107	121	121

도면13b

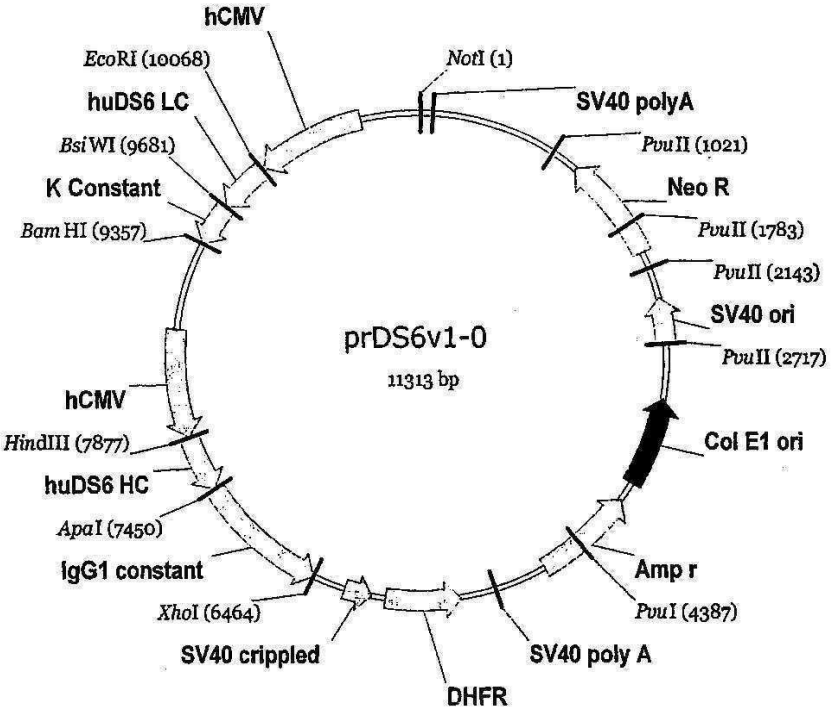
B. muDS6 Heavy Chain Surface Calculations

중쇄 표면 계산

seq	Ave % acc	>30	25-35	flank	surf	Kabat No	SR no	SR surf
Q	64.68	1			1	1	2	2
A	15.65					2	3	
Y	31.88	3	*??*	31.88	3	3	4	4
L	4.156					4	5	
Q	29.83		*??*	30.16	5	5	6	6
Q	5.146					6	7	
S	21.64					7	8	
G	20.31					8	9	
A	36.19	9			9	9	10	10
E	21.29					10	11	
L	49.11	11			11	11	12	12
V	10.25					12	13	
R	50.21	13			13	13	14	14
S	34.2	14	*??*	34.2	14	14	15	15
G	29.89		*??*	29.73		15	16	
A	18.34					16	17	
S	25.54		*??*	27.06		17	18	
V	4.2					18	19	
K	36.48	19			19	19	20	20
M	0.813					20	21	
S	13.11					21	22	
C	0.529					22	23	
K	29.41		*??*	31.18	23	23	24	24
A	3.823					24	25	
S	21.79					25	26	
G	26.57		*??*			26	27	
Y	13.69					27	28	
T	34.52	28	*??*			28	29	
F	3.192					29	30	
T	22.22					30	31	
S	28.17		*??*			31	32	
Y	0					32	33	
N	0					33	34	
M	14.35					34	35	
H	11.38					35	36	
	0.63					35A	37	
	1.018					35B	38	
W	0.18					36	39	
V	0.5					37	40	
K	5.459					38	41	
Q	10.08					39	42	
T	22.08					40	43	
P	46.17	41			41	41	44	44
G	43.05	42			42	42	45	45
Q	42.17	43			43	43	46	46
G	11.9					44	47	
L	6.039					45	48	
E	19.21					46	49	
W	1.433					47	50	
I	0.123					48	51	
G	0					49	52	
Y	4.983					50	53	
I	2.466					51	54	
Y	13.72					52	55	
P	2.199					52A	56	
	22.06					52B	57	
	39.1	52C				52C	58	
G	25.76		*??*			53	59	
N	0					54	60	
G	0					55	61	
A	31.16	56	*??*			56	62	
T	22.29					57	63	
N	21.14					58	64	
Y	14.28					59	65	
N	6.902					60	66	
Q	47.15	61			61	61	67	67
K	43.58	62			62	62	68	68
F	4.24					63	69	

seq	Ave % acc	>30	25-35	flank	surf	Kabat No	SR no	SR surf
K	39.08	64			64	64	70	70
G	39.4	65			65	65	71	71
K	16.66					66	72	
A	2.096					67	73	
T	25.55		*??*	28.08		68	74	
L	3.639					69	75	
T	25.85		*??*	29.56		70	76	
A	13.24					71	77	
D	21.35					72	78	
P	36.15	73			73	73	79	79
S	48.82	74			74	74	80	80
S	24.62					75	81	
S	15.41					76	82	
T	5.116					77	83	
A	0.488					78	84	
Y	15.94					79	85	
M	0.282					80	86	
Q	22.29					81	87	
I	1.738					82	88	
S	20.72					82A	89	
S	31.21	82B	*??*	31.18	82B	82B	90	90
L	0.63					82C	91	
T	26.26		*??*	26.39		83	92	
S	35.72	84			84	84	93	93
E	36.86	85			85	85	94	94
D	3.913					86	95	
S	14.42					87	96	
A	2.996					88	97	
V	16.13					89	98	
Y	1.019					90	99	
F	2.811					91	100	
C	0					92	101	
A	0.198					93	102	
R	5.789					94	103	
G	2.404					95	104	
D	15.92					96	105	
S	25.28		*??*			97	106	
V	29.64		*??*			98	107	
P	23.57					99	108	
	18.79					100	109	
	12.87					100A	110	
	10.47					100B	111	
	2.039					100C	112	
	2.919					100D	113	
	0.252					100E	114	
	0.522					100F	115	
	0					100G	116	
	0					100H	117	
F	0.721					101	120	
A	12.13					102	121	
Y	24.24					103	122	
W	7.003					104	123	
G	1.847					105	124	
Q	36.46	106			106	106	125	125
G	7.55					107	126	
T	1.036					108	127	
L	25.8		*??*	25.8		109	128	
V	1.059					110	129	
T	25.56		*??*	26.55		111	130	
V	7.217					112	131	
S	41.66	113			113	113	132	132
A								

도면14


hCMV
EcoRI (10068)
NotI (1)
huDS6 LC
SV40 polyA
BsiWI (9681)
PvuII (1021)
K Constant
Neo R
BamHI (9357)
PvuII (1783)
PvuII (2143)
SV40 ori
prDS6v1-0
11313 bp
PvuII (2717)
hCMV
Col E1 ori
HindIII (7877)
huDS6 HC
ApaI (7450)
IgG1 constant
Amp r
XhoI (6464)
PvuI (4387)
SV40 crippled
SV40 poly A
DHFR

도면15

A. Light chain amino acid sequence (murine and human residue variability shaded)
경쇄 아미노산 서열 (생쥐 및 인간 잔기 다양성은 음영처리됨)

```
Kabat #          1                                                  51
     muDS6LC     EIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYST
huDS6LC v1.0     EIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYST
huDS6LC v1.2     EIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYST

Kabat #          52                                                 101
     muDS6LC     SSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAG
huDS6LC v1.0     SSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAG
huDS6LC v1.2     SSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAG

Kabat #          102
     muDS6LC     TKLELKR - SEQ ID NO:7
huDS6LC v1.0     TKLELKR - SEQ ID NO:8
huDS6LC v1.2     TKLELKR - SEQ ID NO:8
```

B. Heavy chain amino acid sequence (murine and human residue variability shaded)
중쇄 아미노산 서열 (생쥐 및 인간 잔기 다양성은 음영처리됨)

```
Kabat #          1                                                  50
     muDS6HC     QAYLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY
huDS6HC v1.0     QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY
huDS6HC v1.2     QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY

Kabat #          51                                                 96
     muDS6HC     IYPGNGATNYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD
huDS6HC v1.0     IYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD
huDS6HC v1.2     IYPGNGATNYNQKFQGKATLTADKSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD

Kabat #          97            114
     muDS6HC     SVPFAYWGQGTLVTVSA - SEQ ID NO:9
huDS6HC v1.0     SVPFAYWGQGTLVTVSA - SEQ ID NO:10
huDS6HC v1.2     SVPFAYWGQGTLVTVSA - SEQ ID NO:11
```

도면16

huDS6 Light Chain (v1.0 and v1.2) - SEQ ID NO:8
경쇄

```
      E  I  V  L   T  Q  S   P  A  T   M  S  A  S   P  G  E
    1 GAGATTGTTC TCACCCAGTC TCCAGCAACC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA

      R  V  T   I  T  C  S   A  H  S   S  V  S   F  M  H
   51 GAGGGTCACC ATAACCTGCA GTGCCCACTC AAGTGTAAGT TTCATGCACT

      W  F  Q  Q   K  P  G   T  S  P  K   L  W  I   Y  S  T
  101 GGTTCCAGCA GAAGCCAGGC ACTTCTCCCA AACTCTGGAT TTATAGCACA

      S  S  L  A   S  G  V   P  A  R   F  G  G  S   G  S  G
  151 TCCAGCCTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC TTCGGTGGCA GTGGATCTGG

      T  S  Y   S  L  T  I   S  S  M   E  A  E   D  A  A
  201 GACCTCTTAC TCTCTCACAA TCAGCAGCAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA

      T  Y  Y  C   Q  Q  R   S  S  F  P   L  T  F   G  A  G
  251 CTTATTACTG CCAGCAAAGG AGTAGTTTCC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG

      T  K  L  E   L  K  R
  301 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG T
```

도면17

A. huDS6 Heavy Chain v1.0 - SEQ ID NO:10
중쇄

```
     Q  A  Q  L   V  Q  S   G  A  E   V  V  K  P   G  A  S
  1 CAGGCTCAGC TCGTGCAGTC TGGGGCTGAG GTGGTGAAGC CCGGGGCCTC

     V  K  M   S  C  K  A   S  G  Y   T  F  T   S  Y  N
 51 AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACATTTACC AGTTACAATA

     M  H  W  V   K  Q  T   P  G  Q  G   L  E  W   I  G  Y
101 TGCACTGGGT AAAGCAGACA CCTGGACAGG GCCTGGAATG GATTGGATAT

     I  Y  P  G   N  G  A   T  N  Y   N  Q  K  F   Q  G  K
151 ATTTATCCTG GAAATGGTGC TACTAACTAC AATCAGAAGT TCCAGGGCAA

     A  T  L   T  A  D  T   S  S  S   T  A  Y   M  Q  I
201 GGCCACATTG ACTGCAGACA CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA

     S  S  L  T   S  E  D   S  A  V  Y   F  C  A   R  G  D
251 GCAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGAGAT

     S  V  P  F   A  Y  W   G  Q  G   T  L  V  T   V  S  A
301 TCGGTCCCGT TTGCTTACTG GGGCCAAGGG ACTCTTGTCA CTGTCTCTGC

351 C
```

B. huDS6 Heavy Chain v1.2 - SEQ ID NO:11
중쇄

```
     Q  A  Q  L   V  Q  S   G  A  E   V  V  K  P   G  A  S
  1 CAGGCTCAGC TCGTGCAGTC TGGGGCTGAG GTGGTGAAGC CCGGGGCCTC

     V  K  M   S  C  K  A   S  G  Y   T  F  T   S  Y  N
 51 AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACATTTACC AGTTACAATA

     M  H  W  V   K  Q  T   P  G  Q  G   L  E  W   I  G  Y
101 TGCACTGGGT AAAGCAGACA CCTGGACAGG GCCTGGAATG GATTGGATAT

     I  Y  P  G   N  G  A   T  N  Y   N  Q  K  F   Q  G  K
151 ATTTATCCTG GAAATGGTGC TACTAACTAC AATCAGAAGT TCCAGGGCAA

     A  T  L   T  A  D  P   S  S  S   T  A  Y   M  Q  I
201 GGCCACATTG ACTGCAGACC CATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCAGATCA

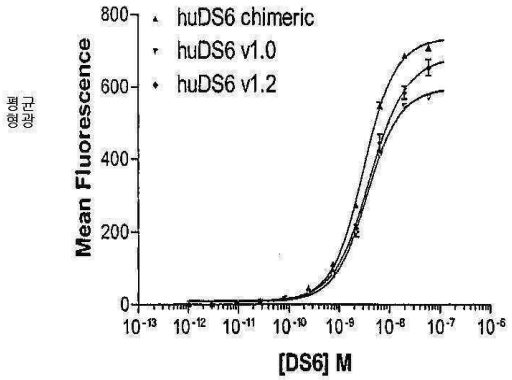
     S  S  L  T   S  E  D   S  A  V  Y   F  C  A   R  G  D
251 GCAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTTCTGTGC AAGAGGAGAT

     S  V  P  F   A  Y  W   G  Q  G   T  L  V  T   V  S  A
301 TCGGTCCCGT TTGCTTACTG GGGCCAAGGG ACTCTTGTCA CTGTCTCTGC

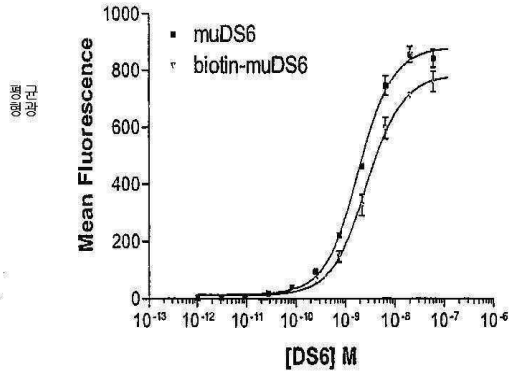
351 C
```

도면18

A.

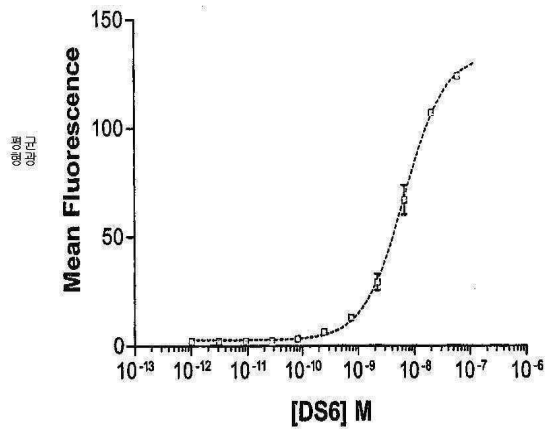

800
600
400
200
0
Mean Fluorescence
huDS6 chimeric
huDS6 v1.0
huDS6 v1.2
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[DS6] M

B.

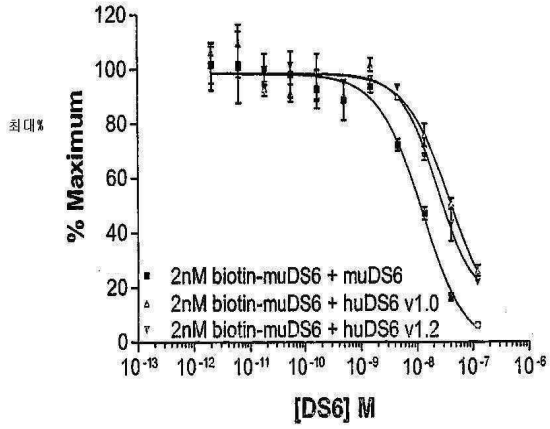

1000
800
600
400
200
0
Mean Fluorescence
muDS6
biotin-muDS6
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[DS6] M

도면19

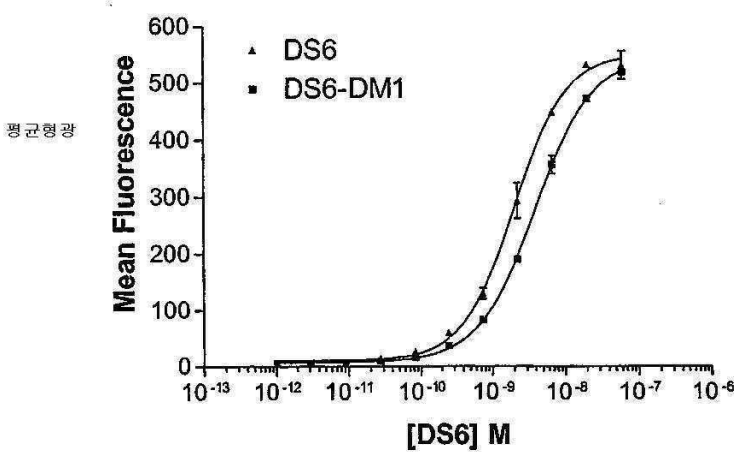
A.


형광단
Mean Fluorescence
150
100
50
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[DS6] M

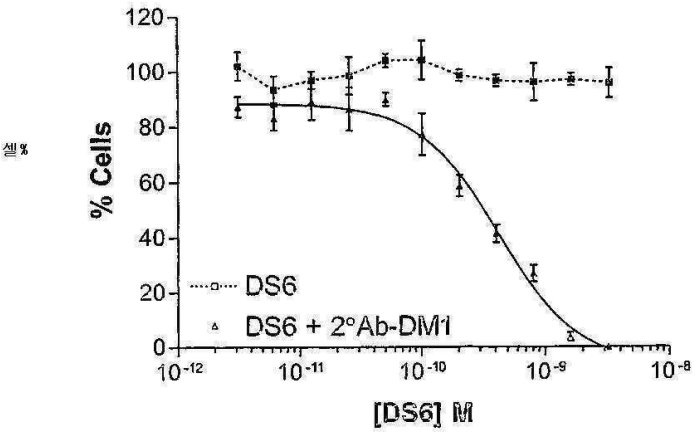
B.


최대%
% Maximum
120
100
80
60
40
20
0
2nM biotin-muDS6 + muDS6
2nM biotin-muDS6 + huDS6 v1.0
2nM biotin-muDS6 + huDS6 v1.2
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
[DS6] M

도면20

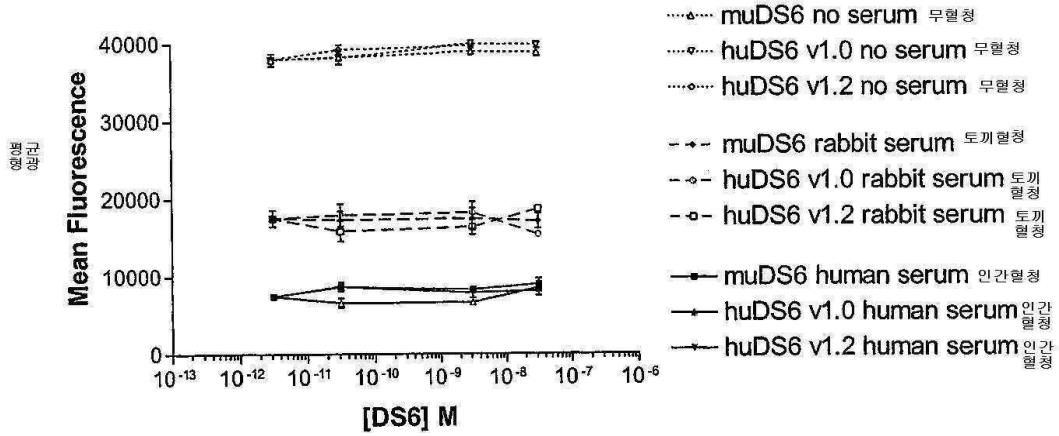

평균형광
Mean Fluorescence
600
500
400
300
200
100
0
DS6
DS6-DM1
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[DS6] M

도면21

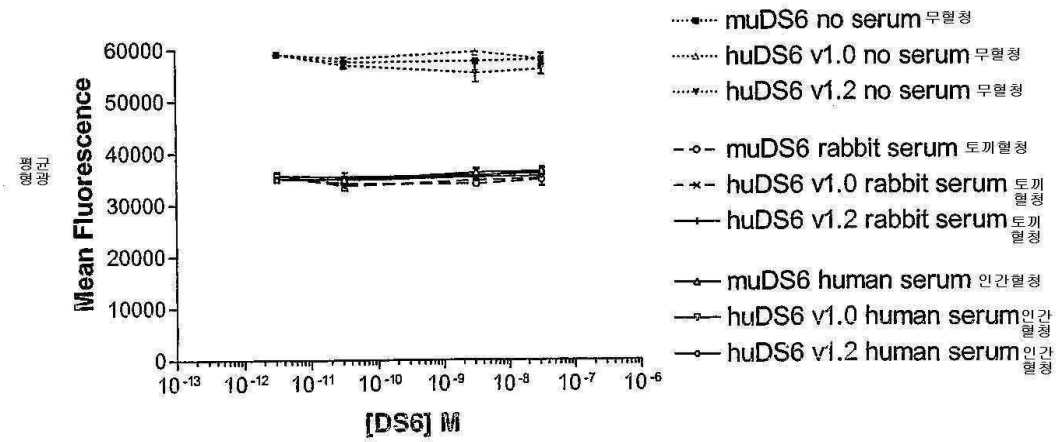

셀%
% Cells
120
100
80
60
40
20
0
DS6
DS6 + 2°Ab-DM1
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
[DS6] M

도면22

A. HPAC

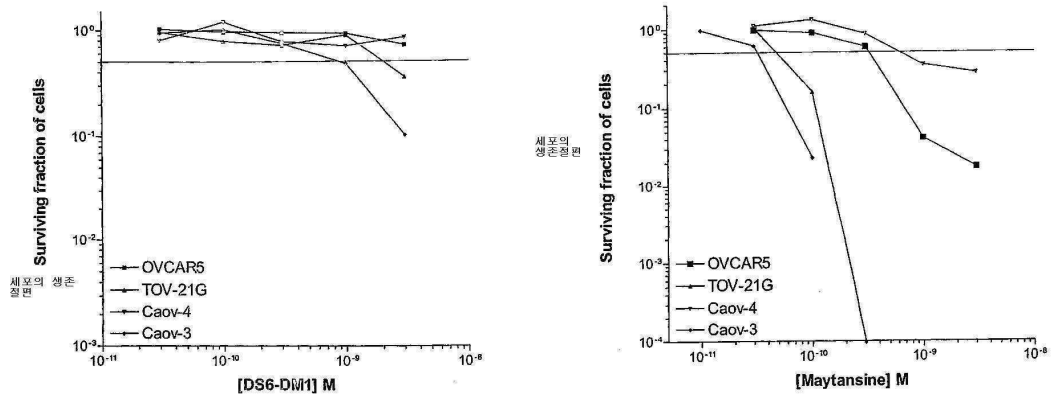


B. ZR-75-1



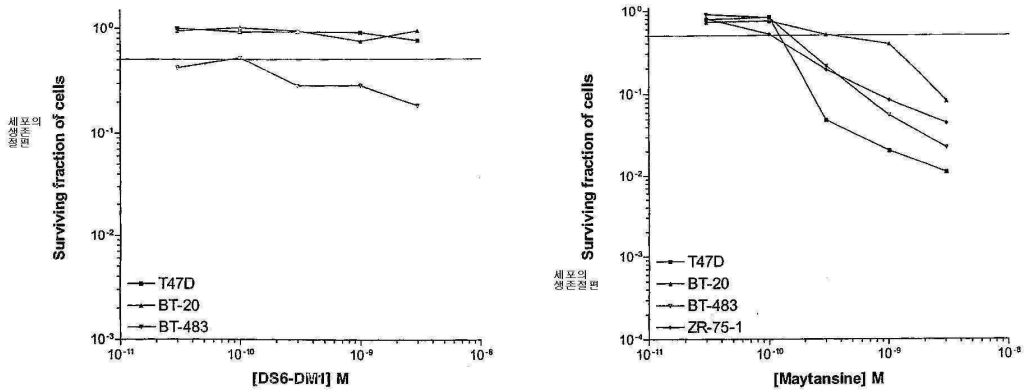
도면23a

A. Human ovarian cancer cell lines

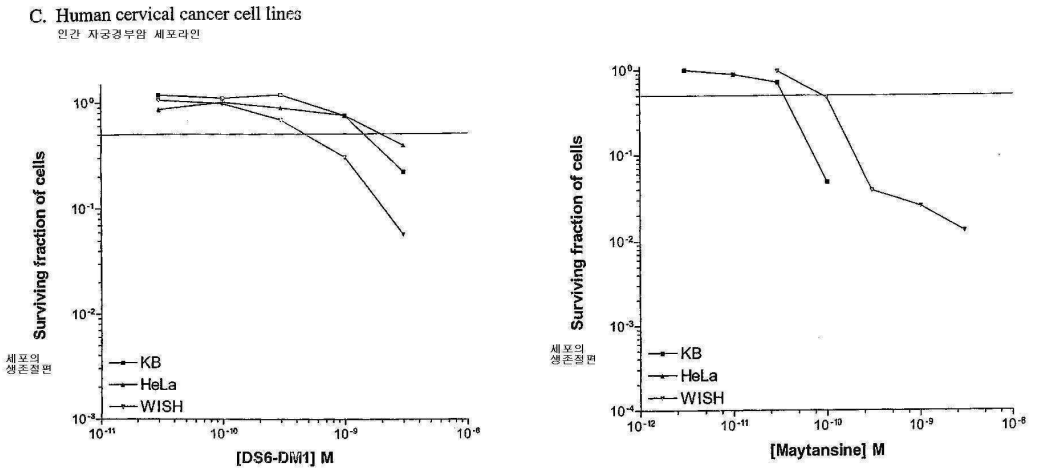


도면23b

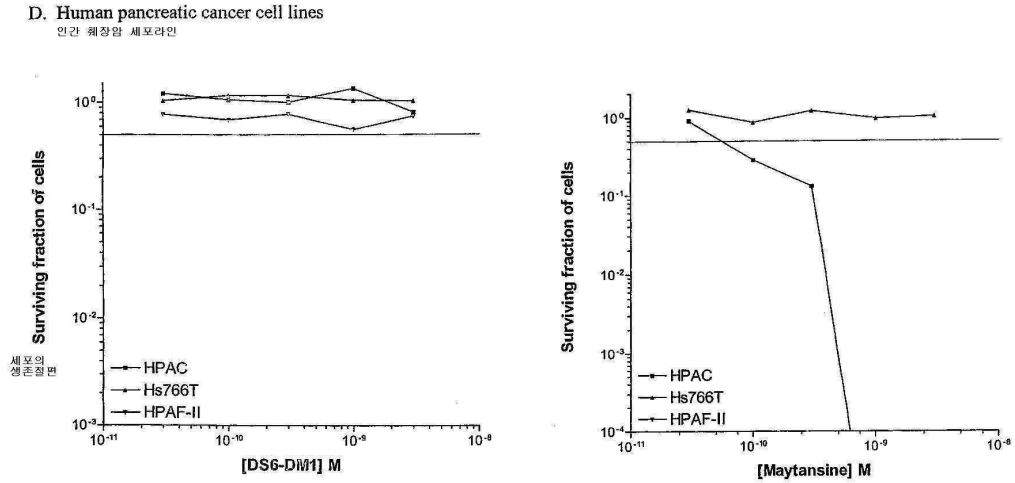
B. Human breast cancer cell lines
인간 유방암 세포라인



도면23c

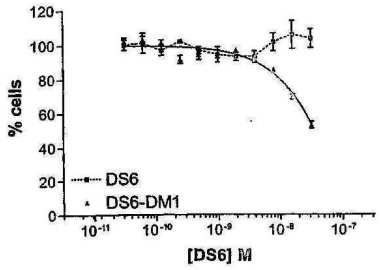

C. Human cervical cancer cell lines
인간 자궁경부암 세포라인
Surviving fraction of cells
세포의 생존절편
KB
HeLa
WISH
[DS6-DM1] M
[Maytansine] M

도면23d


D. Human pancreatic cancer cell lines
인간 췌장암 세포라인
Surviving fraction of cells
세포의 생존절편
HPAC
Hs766T
HPAF-II
[DS6-DM1] M
[Maytansine] M

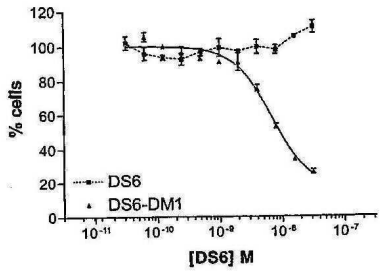
도면24a

A. OVCAR5



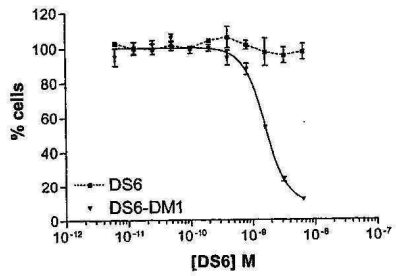
도면24b

B. TOV-21G



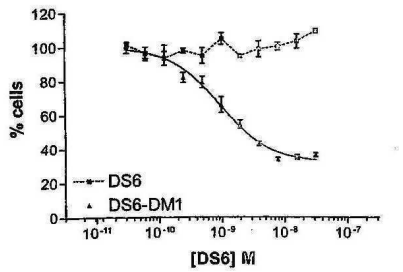
도면24c

C. Caov-3

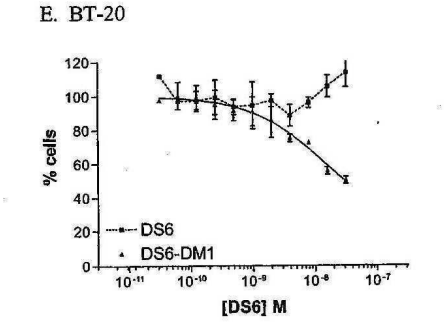


도면24d

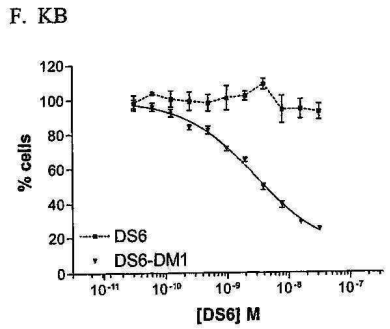
D. ZR-75-1



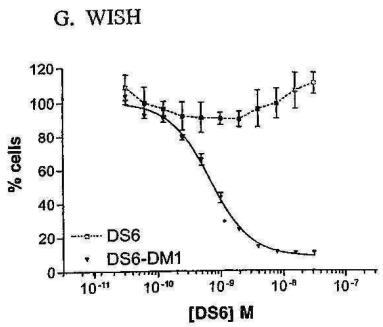
도면24e



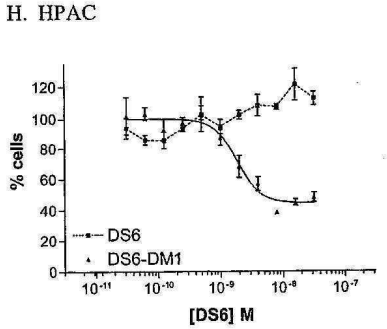
도면24f



도면24g

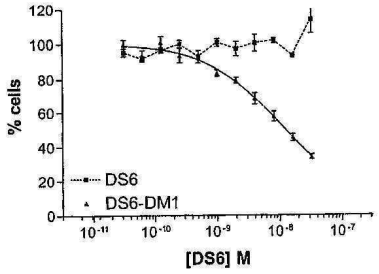


도면24h



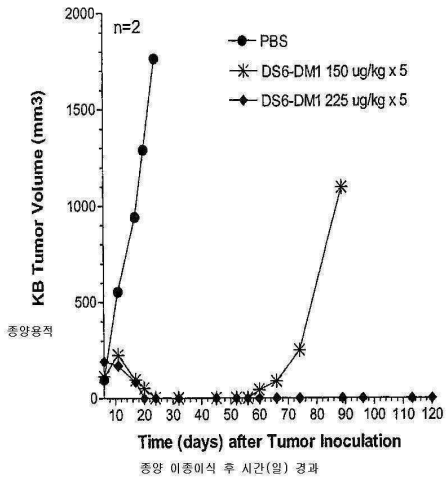
도면24i

I. HPAF-II

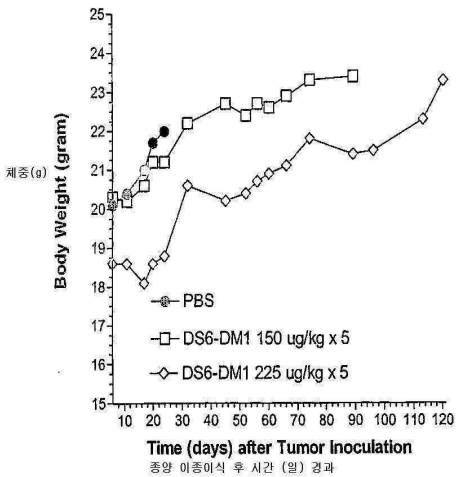


도면25

A.



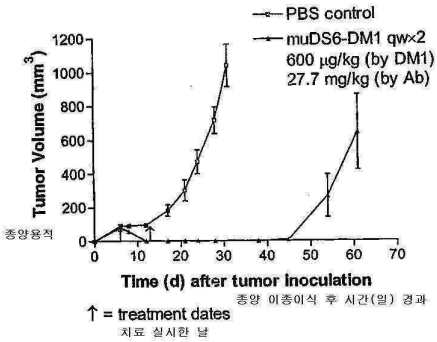
B.



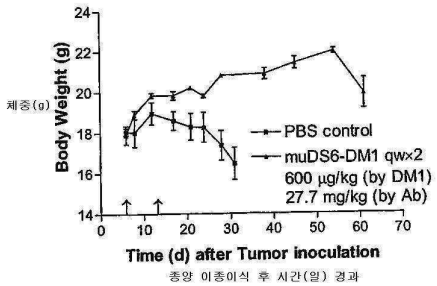
도면26ab

OVCAR5

A.



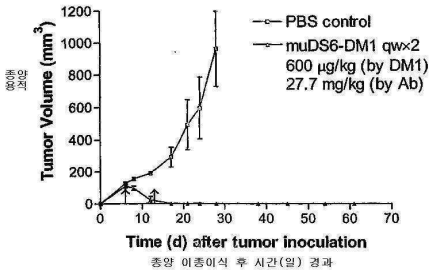
B.



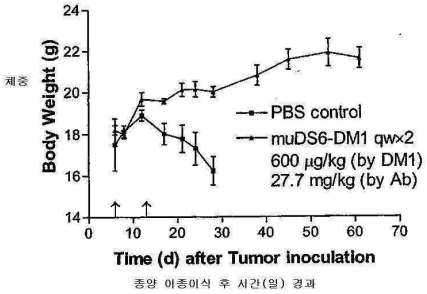
도면26cd

TOV-21G

C.



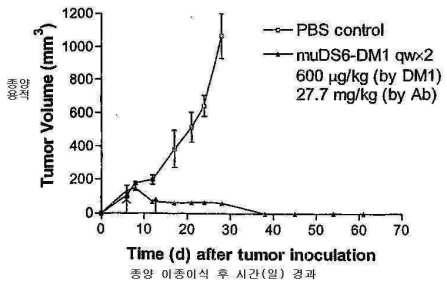
D.



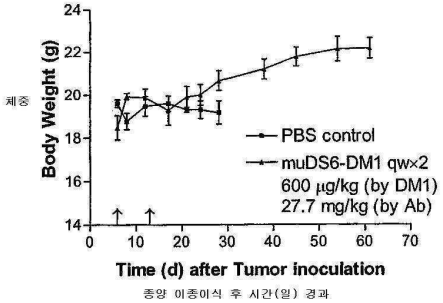
도면26ef

HPAC

E.



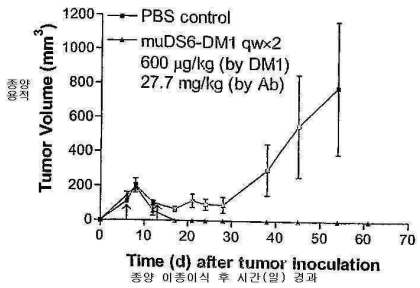
F.



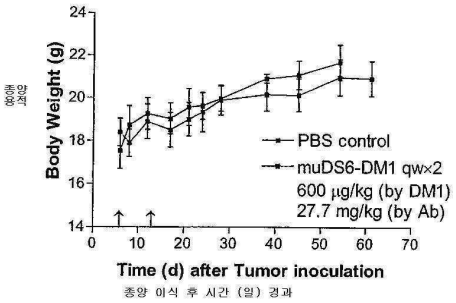
도면26gh

HeLa

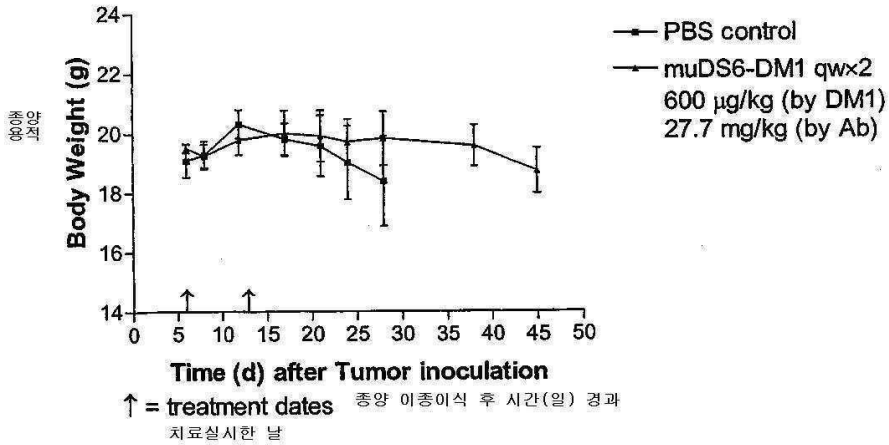
G.



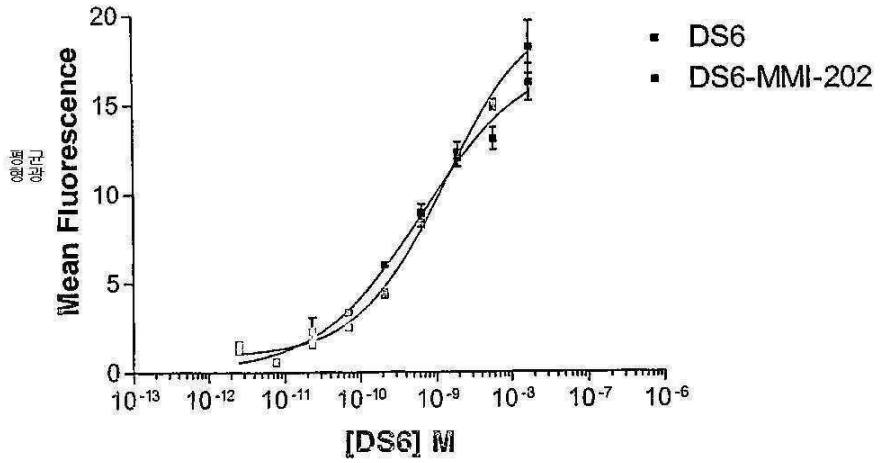
H.



도면27



도면28



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ImmunoGen, Inc.

PAYNE, Gillian

CHUN, Philip

TAVARES, Daniel

<120> A CA6 ANTIGEN-SPECIFIC CYTOTOXIC CONJUGATE AND METHODS OF USING THE SAME

<130> F179122

<140> PCT/US2004/023340

<141> 2004-07-21

<150> 60/488,447

<151> 2003-07-21

<160> 63

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 2

<211
> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met His

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> exon

<222> (1)..(321)

<400> 7

caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cca ggg 48

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

1 5 10 15

gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc cac tca agt gta agt ttc atg 96

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met

20 25 30

cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act tct ccc aaa ctc tgg att tat 144

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

agc aca tcc agc ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc ggt ggc agt 192

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

50 55 60

gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag gct gaa 240

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg agt agt ttc ccg ctc acg 288

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr

85 90 95

ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt 321

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 8

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized murine antibody sequence

<220><221> exon

<222> (1)..(321)

<400> 8

gag att gtt ctc acc cag tct cca gca acc atg tct gca tct cca ggg 48

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

1 5 10 15

gag agg gtc acc ata acc tgc agt gcc cac tca agt gta agt ttc atg 96

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met

20 25 30

cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act tct ccc aaa ctc tgg att tat 144

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

agc aca tcc agc ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc ggt ggc agt 192
Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60
gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag gct gaa 240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg agt agt ttc ccg ctc acg 288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95
ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt 321
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 9
<211> 351
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220
><221> exon
<222> (1)..(351)
<400> 9
cag gct tat ctc cag cag tct ggg gct gag ctg gtg agg tct ggg gcc 48
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15
tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac 96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att 144

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc 192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
aag ggc aag gcc aca ttg act gca gac cca tcc tcc agc aca gcc tac 240

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

65 70 75 80

atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt 288

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

85 90 95

gca aga gga gat tcg gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt 336

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

100 105 110

gtc act gtc tct gca 351

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 10

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized murine antibody sequence

<220><221> exon

<222> (1)..(351)

<400> 10

cag gct cag ctc gtg cag tct ggg gct gag gtg gtg aag ccc ggg gcc 48

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

1 5 10 15

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac 96

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

20 25 30

aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att 144

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc 192

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

50 55 60

cag ggc aag gcc aca ttg act gca gac aca tcc tcc agc aca gcc tac 240

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

65 70 75 80

atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt 288

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

85 90 95

gca aga gga gat tcg gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt 336

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

100 105 110

gtc act gtc tct gcc 351

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 11

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized murine antibody sequence

<220><221> exon

<222> (1)..(351)

<400> 11

cag gct cag ctc gtg cag tct ggg gct gag gtg gtg aag ccc ggg gcc 48

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

1 5 10 15

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac 96

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

20 25 30

aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att 144

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

gga tat att tat cct gga aat ggt gct act aac tac aat cag aag ttc 192

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

50 55 60

cag ggc aag gcc aca ttg act gca gac cca tcc tcc agc aca gcc tac 240
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg cag atc agc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc tat ttc tgt 288
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

gca aga gga gat tcg gtc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctt 336
Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

gtc act gtc tct gcc 351
Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400>
12

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

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13

Glu Val Thr Ala Thr Pro Arg Pro Gly Gly Ala Ser Ser Glu Lys
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

Glu Val Thr Gly Thr Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Arg Glu Lys
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Val Thr Gly Thr Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Arg Glu Lys

1 5 10 15

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Gln Tyr Gln Ala Leu Arg Ser Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Lys Gly

1 5 10 15

Pro Ser Ser Ser Glu Gln Ser

20

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly

1 5 10 15

Thr Ser Ser Ser Glu Gln Ser

20

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly Glu

1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Gln Ser

20

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Gln Val Ala Val Lys Pro Lys Lys Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly Glu

1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Gln Ser

20

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His

1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn

1 5 10

<210

> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr

1 5

<210> 23

<211> 95

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

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

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

<210> 24

<211> 98

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg

<210> 25

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 25

tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tggtgc 46

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 26

ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt tttggc 36

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 27

gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca 32

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

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

<400> 28

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

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

<400> 29

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Degenerate primer

<400> 30

ttttgaattc aataactaca ggtgtccact 30

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Degenerate primer

<400> 31

ttttgagctc cagattttca gcttcctgct 30

<210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 32

cgatgggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga 40

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 33

ttttcgtacg tttcagctcc agcttggt 28

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 34

caggtgtaca ctcccaggct tatctccagc agtct 35

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 35

cgatgggccc ttggtggagg cggcagagac agtgaccaga 40

<210> 36

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 36

caggtgtaca ctccgagatt gttctcaccc agtctccagc aaccatgtct gcatct 56

<210> 37

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 37

ggcactgcag gttatggtga ccctctcccc tggaga 36

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 38

caatcagcag catggaggct gaaga 25

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 39

gcctccatgc tgctgattgt gaga 24

<210> 40

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 40

caggtgtaca ctcccaggct cagctcgtg cagtctggggc tgaggtggtg aagcccgggg 60

cctcagt 67

<210> 41

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 41

ttgactgcag acacatcctc cagcaca 27

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 42

gtgtctgcag tcaatgtggc cttgccctgg aacttctgat 40

<210> 43

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 43

cgatgggccc ttggtggagg cggcagagac agtgacaaga 40

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

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

Ser Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 45

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Asn Ile
20 25 30

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

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

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 46
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

<210> 47
<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Ile
85 90 95

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

<210> 48

<211> 105

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Arg Ser Tyr Met
20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Tyr Thr Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

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

Glu Lys Val Ile Met Thr Cys Ser Pro Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

<210> 51
<211> 109

<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 51
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ala Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

<210> 52
<211> 110
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 52

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 53

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Thr Ser Pro Lys Pro Trp

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 54

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 55

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Ser Tyr Arg Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 57

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

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

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

20 25 30

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

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

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Val Glu Leu Val Arg Ala Gly Ser
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Asn Asn Pro Gly Asn Gly Tyr Ile Ala Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 59

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Lys Thr Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 60

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 60

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly His Ser Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ala Gly Ser
1 5 10 15

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

Gly Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Gly Lys Gly Tyr Leu Ser Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Phe Tyr Gly Gly Ser Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Phe Asp

100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 62

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 63

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

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

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

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Thr Val
115