



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월08일

(11) 등록번호 10-2275513

(24) 등록일자 2021년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) **C07K 16/30** (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6817 (2017.08)
A61K 47/6847 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2021-7009876(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년04월27일
심사청구일자 2021년04월02일
(85) 번역문제출일자 2021년04월02일
(65) 공개번호 10-2021-0040182
(43) 공개일자 2021년04월12일
(62) 원출원 특허 10-2016-7033089
원출원일자(국제) 2015년04월27일
심사청구일자 2020년04월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/027791
(87) 국제공개번호 WO 2015/168019
국제공개일자 2015년11월05일
(30) 우선권주장
61/986,520 2014년04월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02012112943 A1
US20130129753 A1
US20130122020 A1

(73) 특허권자
화이자 인코포레이티드
미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트 235
애브비 스템센트알렉스 엘엘씨
미국 일리노이주 60064 노쓰 시카고 노쓰 위키건 로드 1
(72) 발명자
다멜린, 마크 이삭
미국 07656 뉴저지주 파크 릿지 파인 드라이브 10
사프라, 푸자
미국 07661 뉴저지주 리버 엡지 웨인 애비뉴 254
(릿면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **항-PTK7 항체-약물 접합체**

(57) 요약

본 발명은 항-PTK7 항체-약물 접합체 및 그의 제조 및 사용 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6889 (2017.08)

C07K 16/30 (2013.01)

C07K 16/40 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

반코비치, 알렉산더 존

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 넘버 204

테네시 스트리트 635

덜라, 스코트 제이.

미국 94062 캘리포니아주 에메랄드 힐스 덴포드 코
트 25

명세서

청구범위

청구항 1

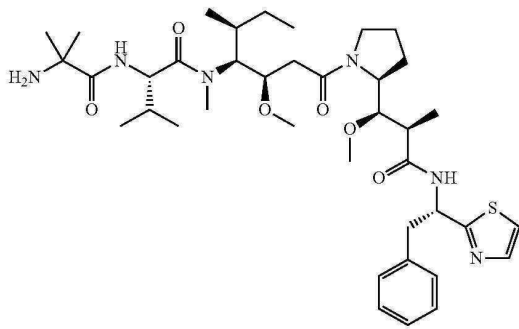
하기 식의 항체-약물 접합체.

Ab-(L-D)

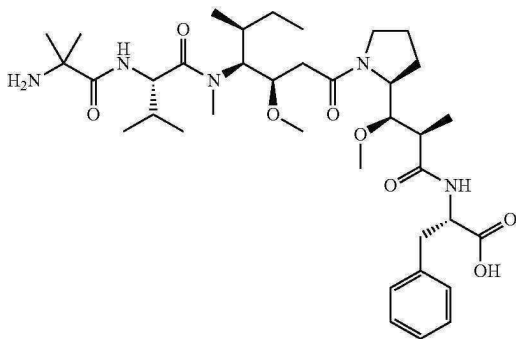
여기서:

(a) Ab는 서열식별번호: 13으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 23으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 인간 단백질 티로신 키나제 7 (PTK7)에 결합하는 항체이고;

(b) L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc) 및 말레이미도카프로일 (mc)로 이루어진 군으로부터 선택되는 링커이고, D는 하기 화학식을 갖는 0101



및 하기 화학식을 갖는 8261



로 이루어진 군으로부터 선택되는 아우리스타틴이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 링커가 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)인 항체-약물 접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 링커가 말레이미도카프로일 (mc)인 항체-약물 접합체.

청구항 14

제10항에 있어서, 유방암이 삼중-음성 유방암 (TNBC), 프로게스테론-수용체 양성 유방암 (PR+), 에스트로겐-수용체 양성 유방암 (ER+) 및 이중 양성 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서, 간암이 간세포성 암종 (HCC)인 제약 조성물.

청구항 16

제10항에 있어서, 폐암이 비소세포 폐암 (NSCLC)인 제약 조성물.

청구항 17

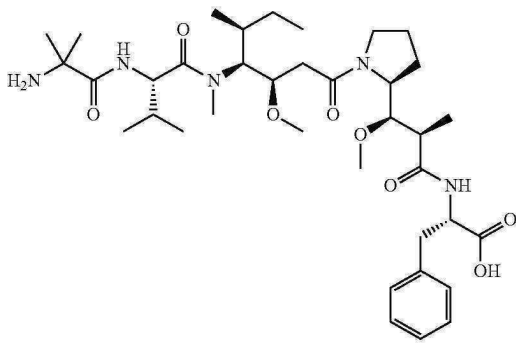
하기 식의 항체-약물 접합체.

Ab-(L-D)

여기서:

(a) Ab는 서열식별번호: 13으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 23으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 인간 단백질 티로신 키나제 7 (PTK7)에 결합하는 항체이고;

(b) L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고, D는 아우리스타틴이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일 (mc)이고, 아우리스타틴은 하기 화학식을 갖는 8261이며:



항체-약물 접합체는 1 내지 8의 약물-대-항체 비 (DAR)를 갖는다.

청구항 18

(a) 링커를 약물에 연결시키는 단계;

(b) 링커-약물 모이어티를 항체에 접합시키는 단계; 및

(c) 항체-약물 접합체를 정제하는 단계

를 포함하는, 제17항의 항체-약물 접합체를 생성하는 방법.

청구항 19

암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제17항의 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 암이 고형 종양인 제약 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 고형 종양이 유방암, 난소암, 결장직장암, 식도암, 위암, 흑색종, 육종, 신장암, 췌장암, 전

림선암, 간암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서, 암이 혈액 악성종양인 제약 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 혈액 악성종양이 백혈병인 제약 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 백혈병이 성인 골수성 백혈병 (AML) 또는 급성 림프모구성 백혈병 (ALL)인 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원
- [0002] 2014년 4월 30일에 출원된 미국 가출원 번호 61/986,520을 우선권 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 서열 목록
- [0004] 본 출원은 EFS-웹을 통해 전자적으로 출원되었고, .txt 포맷의 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함한다. 이러한 .txt 파일은 표제 "PC072045_Sequence_Listing.txt"으로 2014년 4월 30일에 작성된, 57.7 KB의 크기를 갖는 서열 목록을 함유하고 있다. 이러한 .txt 파일 내에 함유된 서열 목록은 본 명세서의 일부이고 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0005] 기술분야
- [0006] 본 발명은 단백질 티로신 키나제 7 (PTK7) 항체 및 항체-약물 접합체에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 암을 치료하기 위해 이러한 항체 및 항체-약물 접합체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 결장 암종 키나제 4 (CCK4)로도 공지되어 있는 단백질 티로신 키나제 7 (PTK7)은 원래 정상 인간 멜라닌세포로부터 및 개별적으로 결장 암종 조직으로부터 클로닝된 수용체 티로신 키나제이다. 높은 수준의 PTK7은 방광암, 유방암, 결장직장암, 신장암 및 폐암 및 흑색종을 포함하여 수많은 종양 세포에서 확인된 바 있다. PTK7 발현은 또한 성인 골수성 백혈병 (AML) 및 급성 림프모구성 백혈병 (ALL) 세포에서 관찰된 바 있다.
- [0008] 암의 치료는 지난 10년에 걸쳐 1차 치료 옵션으로서 수술, 방사선 요법, 및 화학요법에 의해 개선되어 왔다. 이러한 치료는 많은 환자에서 생존을 연장시키고/거나 증상을 완화시킬 수 있지만, 많은 환자를 치유하지 못할 가능성이 있다. 따라서, 암에 대한 추가의 치료 옵션에 대한 유의한 필요가 여전히 존재한다.
- [0009] 이를 위해, 본 발명은 PTK7-양성 암을 표적화하는 신규 항체-약물 접합체를 제공한다. 개시된 항-PTK7 항체-약물 접합체는 비-PTK7 발현 세포에 대해 바람직하지 않은 효과를 발휘하지 않으면서 PTK7 발현 종양 세포에 대해 임상적으로 유용한 세포독성 효과를 발휘할 수 있다.

발명의 내용

- [0010] 본 발명은 PTK7 항체-약물 접합체 및 PTK7 연관 장애의 검출, 예방 및 요법에 있어서의 그의 용도를 제공한다. 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 일반적으로 하기 식을 갖는다: Ab-(L-D), 여기서 Ab는 PTK7 또는 그의 PTK7-결합 단편에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고; L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이다.
- [0011] 개시된 항체-약물 접합체의 Ab는 임의의 PTK7-결합 항체일 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, Ab는 키메라, CDR-그래프트된, 인간화, 또는 재조합 인간 항체, 또는 그의 PTK7-결합 단편이다. 본 발명의 일부 측면에서, Ab는 내재화 항체 및/또는 중화 항체이다.

- [0012] 본 발명은 또한, PTK7 항체-약물 접합체 및 PTK7 연관 장애의 검출, 예방 및 요법에 있어서의 그의 용도를 제공한다. 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 일반적으로 하기 식을 갖는다: Ab-(L-D), 여기서 Ab는 PTK7 또는 그의 PTK7-결합 단편에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고; L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고 D는 아우리스타틴이다.
- [0013] 본 발명의 특정한 측면에서, Ab는 hu23, hu24 또는 hu58 항체, 또는 인간 PTK7에의 결합에 대해 hu23, hu24 또는 hu58과 경쟁하는 항체, 및/또는 hu23, hu24 또는 hu58 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체이다. 예를 들어, Ab는 (a) 서열식별번호: 1로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 15로서 제시된 경쇄 가변 영역; (b) 서열식별번호: 25로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 39로서 제시된 경쇄 가변 영역; 또는 (c) 서열식별번호: 49로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 PTK7에의 결합에 대해 경쟁하고/거나, 상기 항체와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0014] 인간 PTK7에의 결합에 대해 hu23과 경쟁하고/거나 hu23과 동일한 에피토프에 결합하는 Ab 중에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체를 제조하는데 유용한 대표적인 Ab는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 적어도 1개의 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 3, 7, 및 11에 의해 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 추가의 Ab는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 적어도 1개의 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 17, 19, 및 21로서 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 추가의 Ab는 (a) 서열식별번호: 3, 7, 및 11로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열식별번호: 17, 19, 및 21로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0015] 본 발명의 다른 PTK7 항체-약물 접합체에서, Ab는 서열식별번호: 1과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 15와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변, 예를 들어 서열식별번호: 1로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 15로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0016] 인간 PTK7에의 결합에 대해 hu24와 경쟁하고/거나 hu24와 동일한 에피토프에 결합하는 Ab 중에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체를 제조하는데 유용한 대표적인 Ab는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 적어도 1개의 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 27, 31, 및 35에 의해 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 추가의 Ab는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 적어도 1개의 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 41, 43, 및 45로서 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 추가의 Ab는 (a) 서열식별번호: 27, 31, 및 35로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열식별번호: 41, 43, 및 45로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0017] 본 발명의 다른 PTK7 항체-약물 접합체에서, Ab는 서열식별번호: 25와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 39와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 예를 들어 서열식별번호: 25로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 39로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0018] 인간 PTK7에의 결합에 대해 hu58과 경쟁하고/거나 hu58과 동일한 에피토프에 결합하는 Ab 중에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체를 제조하는데 유용한 대표적인 Ab는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 적어도 1개의 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 51, 55, 및 59에 의해 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 추가의 Ab는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 적어도 1개의 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 65, 67, 및 69로서 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 추가의 Ab는 (a) 서열식별번호: 51, 55, 및 59로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열식별번호: 65, 67, 및 69로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 다른 PTK7 항체-약물 접합체에서, Ab는 서열식별번호: 49와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 예를 들어 서열식별번호: 49로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0020] 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 IgG1 중쇄 불변 영역, 카파 경쇄 불변 영역, 또는 IgG1 중쇄 불변 영역 및 카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 Ab를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체를 제조하는데 유용한 Ab는 서열식별번호: 13으로서 제시된 중쇄, 서열식별번호: 23으로서 제시된 경쇄, 또는 서열식별번호: 13으로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 23으로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체를 포함한다. 추

가의 예는 서열식별번호: 37로서 제시된 중쇄, 서열식별번호: 47로서 제시된 경쇄, 또는 서열식별번호: 37로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 47로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체를 포함한다. 추가의 예는 서열식별번호: 61로서 제시된 중쇄, 서열식별번호: 71로서 제시된 경쇄, 또는 서열식별번호: 61로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 71로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체를 포함한다.

[0021] 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 서열식별번호: 1, 25, 또는 49로서 제시된 중쇄 가변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 서열식별번호: 15, 39, 또는 63으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 포함한다.

[0022] 본 발명의 특정한 측면에서, Ab는 hu23, hu24 또는 hu58 항체, 또는 인간 PTK7에의 결합에 대해 hu23, hu24 또는 hu58 항체와 경쟁하는 항체, 및/또는 hu23, hu24, 또는 hu58 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체이다. 예를 들어, Ab는 (a) 서열식별번호: 13의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 23의 경쇄 가변 영역; (b) 서열식별번호: 25의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 39의 경쇄 가변 영역; 또는 (c) 서열식별번호: 49의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 PTK7에의 결합에 대해 경쟁하고/거나, 상기 항체와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 측면에서, Ab는 인간화 모노클로날 항체, 예컨대 hu23, hu24 또는 hu58 항체이다.

[0024] 본원에 개시된 임의의 PTK7 항체-약물 접합체는 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커에 의해 제조될 수 있다. 한 측면에서 절단가능한 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)일 수 있다. 또 다른 측면에서 절단가능한 링커는 4 (4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)일 수 있다. 또 다른 측면에서 비-절단가능한 링커는 말레이미도카프로일 (mc)일 수 있다.

[0025] 본원에 개시된 임의의 PTK7 항체 약물 접합체는 아우리스타틴인 약물과 함께 제조될 수 있다. 한 측면에서, 아우리스타틴은 0101 (2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-3-메톡시-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-[(1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]아미노}프로필]피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드)일 수 있다. 또 다른 측면에서, 아우리스타틴은 8261 2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-카르복시-2-페닐에틸]아미노]-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필]피롤리딘-1-일]-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드일 수 있다.

[0026] 본원에 개시된 임의의 PTK7 항체 약물 접합체는 칼리케아미신 (칼리케아미신의 N 아세틸 유도체, 예컨대 N-아세틸-γ-칼리케아미신 및 N-아세틸-γ-칼리케아미신 디메틸 히드라지드 (CM) 포함)인 약물과 함께 제조될 수 있다.

[0027] 본원에 개시된 임의의 PTK7 항체는 항체-약물 접합체에서 링커-약물 모이어티 (L-D)와의 결합에 의해 사용될 수 있다. 한 측면에서, L-D는 vc0101 (N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-L-발린-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-부탄-2-일]-25-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-[(1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]아미노}프로필]피롤리딘-1-일]-2-옥소에틸]-18,18,23-트리메틸-3,16,19,22-테트라옥소-21-(프로판-2-일)-2,7,10,13,26-펜타옥사-4,17,20,23-테트라아자헵타코스-1-일]페닐}-N-5-~카르바모일-L-오르니틴아미드)일 수 있다. 또 다른 측면에서, L-D는 mc8261 (N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-카르복시-2-페닐에틸]아미노]-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필]피롤리딘-1-일]-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드)일 수 있다. 또 다른 측면에서, L-D는 AcButCM (4 (4'아세틸페녹시)부탄산 N-아세틸-γ-칼리케아미신 디메틸 히드라지드)일 수 있다. 본원에 개시된 임의의 PTK7 항체-약물 접합체는 1 내지 8의 약물-대-항체 비 (DAR)를 가질 수 있다.

[0028] 본 발명의 특정한 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 13으로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 23으로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)이고 약물은 0101이다.

[0029] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 37로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 47로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)이고 약물은 0101이다.

[0030] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 61로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 71로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이

어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)이고 약물은 0101이다.

[0031] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 13으로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 23으로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일 (mc)이고 약물은 8261이다.

[0032] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 37로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 47로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일 (mc)이고 약물은 8261이다.

[0033] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 61로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 71로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일 (mc)이고 약물은 8261이다.

[0034] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 13으로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 23으로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 AcBut (4 (4'아세틸페녹시)부탄산)이고 약물은 CM (N-아세틸- γ -칼리케아미신 디메틸 히드라지드)이다.

[0035] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 37로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 47로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 AcBut (4 (4'아세틸페녹시)부탄산)이고 약물은 CM (N-아세틸- γ -칼리케아미신 디메틸 히드라지드)이다.

[0036] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 61로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 71로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 AcBut (4 (4'아세틸페녹시)부탄산)이고 약물은 CM (N-아세틸- γ -칼리케아미신 디메틸 히드라지드)이다.

[0037] 본 발명은 본원에 개시된 복수개의 항체-약물 접합체 및 임의로 제약 담체를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 1 내지 8의 범위 내의 평균 DAR을 갖는다. 본 발명의 특정한 측면에서, 상기 조성물은 3 내지 5의 범위 내의 평균 DAR을 가질 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 3 내지 4의 범위 내의 평균 DAR을 가질 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 약 4의 평균 DAR을 가질 수 있다.

[0038] 본 발명은 추가로, 본원에 개시된 복수개의 항체-약물 접합체 및 임의로 제약 담체를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 3 내지 5의 DAR을 갖는 적어도 50% 항체-약물 접합체를 갖는다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 3 내지 5의 DAR을 갖는 적어도 60% 항체-약물 접합체를 갖는다.

[0039] 본 발명은 추가로, 일반적으로 식 Ab-(L-D)를 갖는 PTK7 항체-약물 접합체를 제공하며, 여기서 Ab는 PTK7 또는 그의 PTK7-결합 단편에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고; L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 vc 또는 mc 또는 AcBut 이고, D는 약물이다.

[0040] 본 발명은 추가로, 일반적으로 식 Ab-(L-D)를 갖는 PTK7 항체-약물 접합체를 제공하며, 여기서 Ab는 PTK7 또는 그의 PTK7-결합 단편에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고; L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고, D는 아우리스타틴 (예컨대 0101 또는 8261) 또는 CM이다.

[0041] 본 발명은 추가로, 본원에 개시된 PTK7 항체-약물 접합체를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 항체-약물 접합체를 생성하는 방법은 (a) 링커를 약물에 연결시키는 단계; (b) 링커-약물 모이어티를 항체에 접합시키는 단계; 및 (c) 항체-약물 접합체를 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 개시된 항체-약물 접합체의 제작 방법, 제조 방법, 합성 방법, 접합 방법, 및 정제 방법, 및 본원에 개시된 항체-약물 접합체의 제조, 합성 및 접합을 위한 중간체를 포함한다.

[0043] 추가로, 본원에 개시된 PTK7 항체-약물 접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

- [0044] 다른 측면에서, 본원에 개시된 PTK7 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여함으로써, PTK7 연관 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 대표적인 PTK7 연관 장애는 과다증식성 장애, 예컨대 신생물성 장애, 예컨대 고형 종양 (예를 들어, 유방암, 예컨대 삼중-음성 유방암 (TNBC), 프로게스테론-수용체 양성 유방암 (PR+), 에스트로겐-수용체 양성 유방암 (ER+) 및 이중 양성 유방암; 난소암; 결장직장암; 식도암; 위암; 흑색종; 육종; 신장암; 췌장암; 전립선암; 간암, 예컨대 간세포성 암종 (HCC); 및 폐암, 예컨대 비소세포 폐암 (NSCLC) 및 소세포 폐암 (SCLC) 등) 및 혈액 악성종양 (예를 들어, 백혈병, 예컨대 성인 골수성 백혈병 (AML) 또는 급성 림프모구성 백혈병 (ALL) 등)을 포함한다. 또한, 대상체에서 PTK7 연관 장애를 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 개시된 PTK7 항체-약물 접합체의 용도가 제공된다. 또한, PTK7 연관 장애의 치료에 사용하기 위한 PTK7 항체-약물 접합체가 제공된다.
- [0045] 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 PTK7 항체-약물 접합체 및 화학요법제를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여함으로써, 대상체에서 PTK7 연관 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 개시된 항체-약물 접합체를 사용하여, 환자에서 PTK7의 과다발현을 특징으로 하는 장애를 치료하는 방법을 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항체-약물 접합체를 사용하여, 환자에서 PTK7의 과다발현을 특징으로 하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0047] 다른 측면에서, 본 발명은 종양 세포 집단에서 종양 개시 세포를 감소시키는 방법을 제공한다. 예를 들어, 상기 방법은 종양 개시 세포 및 종양 개시 세포 이외의 종양 세포를 포함하는 종양 세포 집단을 PTK7 항체-약물 접합체와 접촉시키고; 그에 의해 종양 세포 집단에서 종양 개시 세포의 빈도가 감소되는 것인 단계를 포함할 수 있다. 접촉시키는 단계는 시험관내 또는 생체내에서 수행될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 개시된 화합물 및 조성물에 대한 진단 및 치료 용도를 포함한다.
- [0049] 본 발명의 다른 측면은 본원에 개시된 항체-약물 접합체, 용기, 및 치료를 표시하는 패키지 삽입물 또는 라벨을 포함하는 제조 물품, 즉 키트를 포함한다.
- [0050] 본 발명의 이들 측면 및 다른 측면은 본 출원을 전체로서 고찰함으로써 인지될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1은 대표적인 전장 PTK7 단백질의 아미노산 서열 (서열식별번호: 73)을 제공한다.
- 도 2a-b는 hu24 결합이 PTK7의 세포 발현과 상관됨을 보여준다. (a) 항-PTK7 및 항-GAPDH 항체를 사용한 전세포 용해물의 면역노블롯. 면역노블롯 신호는 이전에, PTK7 유전자 발현이 siRNA에 의해 억제되었을 때 신호의 상실을 입증하는 것에 의해 검증된 바 있다. (b) 면역노블롯에서와 같은, 동일한 암 세포주에 대한 항-PTK7 (hu24)을 사용한 유동 세포측정법으로부터의 평균 형광 강도 값. 점선은 1차 항체가 hu24가 아닌 음성 대조군 항체일 때의 신호를 나타낸다.
- 도 3은 면역조직화학에 의한 7개의 PDX 모델로부터의 조직 샘플 상에서의 PTK7 발현을 보여준다. 염색은 PTK7을 나타낸다. 대표적인 현미경사진을 각 모델에 대해 제시한다. 축척 막대, 100 μ m.
- 도 4a-c는 원발성 종양에서의 PTK7 mRNA 발현을 보여주는 그래프이다. (a) 유방암; (b) NSCLC 암 및 (c) 난소암이 제시된다.
- 도 5는 NSCLC 환자에서의 보다 높은 PTK7 mRNA 발현과 보다 나쁜 전체 생존율 사이의 상관관계를 보여주는 그래프이다.
- 도 6은 건강한 인간 및 8종의 상이한 종양 유형을 대표하는 암 환자로부터의 혈청 중 PTK7 단백질 수준을 보여주는 그래프이다. 수평선은 각 군에 대한 평균 값을 나타낸다.
- 도 7은 hu24-vc0101의 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) 분석을 제공한다.
- 도 8은 유방-13 (BR13) 삼중-음성 유방암 (TNBC) PDX에서의 항-PTK7-vc0101 ADC의 효능을 보여주는 그래프이다.
- 도 9는 BR13 TNBC PDX에서의 hu24-vc0101 및 항-PTK7-mc8261 ADC의 효능을 보여주는 데이터 표이다.
- 도 10은 BR13 TNBC PDX에서의 hu24-vc0101 및 항-PTK7-mc8261 ADC의 효능을 보여주는 도 9의 데이터의 그래프이다.

도 11은 유방-22 (BR22) TNBC PDX에서의 항-PTK7-vc0101 ADC의 효능을 보여주는 그래프이다.

도 12는 BR22 TNBC PDX에서의 hu23-vc0101 및 항-PTK7-mc8261 ADC의 효능을 보여주는 데이터 표이다.

도 13은 BR22 TNBC PDX에서의 hu23-vc0101 및 항-PTK7-mc8261 ADC의 효능을 보여주는 도 12의 데이터의 그래프이다.

도 14는 유방-31 (BR31) TNBC PDX에서의 항-PTK7-vc0101 ADC의 효능을 보여주는 그래프이다.

도 15는 유방-64 (BR64) TNBC PDX에서의 hu24-vc0101 ADC의 효능을 보여주는 그래프이다.

도 16은 BR5 TNBC PDX에서의 hu24-vc0101 ADC의 효능을 보여주는 그래프이다.

도 17은 BR36 PR+ TNBC PDX에서의 hu24-vc0101 ADC의 효능을 보여주는 그래프이다.

도 18a-b는 2종의 상이한 SCLC PDX 모델 (a) H1048 PDX 모델 및 (b) SCLC 95 PDX 모델에서의 hu24-vc0101 및 hu23-AcBut CM의 효능을 보여주는 그래프이다.

도 19a-b는 2종의 상이한 SCLC PDX 모델 (a) SCLC 117 PDX 모델 및 (b) SCLC 102 PDX 모델에서의 hu24-AcButCM의 효능을 보여주는 그래프이다.

도 20은 폐-135 (LU135) 비소세포 폐암 (NSCLC) PDX에서의 hu24-vc0101 ADC의 효능을 보여주는 그래프이다.

도 21은 폐-176 (LU176) 비소세포 폐암 (NSCLC) PDX에서의 hu24-vc0101 ADC의 효능을 보여주는 그래프이다.

도 22는 4 μ g/mL hu24-vc0101 ADC, 4 μ g/mL 비접합된 hu24 mAb, 4 μ g/mL 음성 대조군 ADC, 또는 0.1 nM 유리 0101 아우리스타틴으로의 처리 후 미세관 구조의 현미경사진을 보여준다. H661 세포를 48시간 동안 처리한 다음, 항-튜불린 및 DAPI에 대해 염색하여 DNA를 시각화하였다.

도 23은 시험관내 내피 세포에 대한 hu24-vc0101 ADC의 효과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 본 발명은 PTK7에 결합하는 항체-약물 접합체, PTK7 항체, 링커, 및 약물을 사용하여 접합체를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 항체-약물 접합체는 PTK7 발현을 특징으로 하는 과다증식성 장애의 진단, 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있는 조성물, 예컨대 의학의 제조 및 제작에 유용하다. 본 발명의 일부 측면에서, 개시된 항체-약물 접합체는 종양 영속 세포 (TPC) 및 고도의 증식성 종양 전구 세포 (TProg) 둘 다를 포괄하는 종양 개시 세포 (TIC)의 빈도를 감소시킬 수 있다.

[0053] I. PTK7 생리학

[0054] 결장 암종 키나제 4 (CCK4)로도 공지되어 있는 단백질 티로신 키나제 7 (PTK7)은 원래 정상 인간 멜라닌세포로부터 (Lee et al., Oncogene 8(12):3403-3410, 1993) 및 개별적으로 결장 암종 조직 (Mossie et al., Oncogene 11(10):2179-2184, 1995)으로부터 클로닝된 수용체 티로신 키나제이다. PTK7 유전자는 6p21.1-p12.2에 위치한다. 인간 PTK7의 5종의 스플라이스 이소형이 고환 cDNA로부터 클로닝된 바 있다 (Jung, et al., Biochim Biophys Acta 1579, 2002). 상호 관련하여 이소형의 상대적 존재비는 고환 및 간세포암 또는 결장 암종 세포주 사이에 상이하지만, 이들 이소형의 기능적 유의성은, 존재하는 경우에도, 공지되어 있지 않다. 생물정보 분석은, 마우스가 대안적으로 스플라이싱된 mRNA로부터 가용성 PTK7 이소형을 발현할 수 있음을 제시한다 (Forrest, Taylor et al., Genome Biol 7, 2006).

[0055] 전장 PTK7 단백질은 674개의 아미노산 세포외 도메인 (ECD)에 이어서 짧은 TM 스패닝 부분 및 345개의 아미노산 세포질 도메인을 갖는 I형 막횡단 단백질이다. PTK7의 대표적인 전장 아미노산 서열이 도 1에 제시된다 (서열 식별번호: 73). 대표적인 PTK7 이소형의 아미노산 서열은 진뱅크(GenBank) 수탁 번호 EAX04154.1 (이소형 a), EAX04155.1 (이소형 b), EAX04156.1 (이소형 c), EAX04157.1 (이소형 d), EAX04158.1 (이소형 e), EAX04159.1 (이소형 f), 및 EAX04160.1 (이소형 g)에서 확인된다. 모든 이소형은 동일한 세포내 도메인을 코딩한다. 인간 PTK7의 대표적인 이소형 (즉 전사체 변이체 PTK7-1)의 완전한 핵산 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM_002821을 갖는다.

[0056] 성숙 전장 PTK7 ECD는 7개의 이류노글로불린-유사 도메인을 포함하는 반면에, 다양한 스플라이스 변이체는 그의 ECD 구조에서 상이한 PTK7 이소형을 코딩한다. 모든 이소형은 일반적 부류의 티로신 키나제에서 발견되는 것과 실질적 상동성을 갖는 세포질 도메인을 함유한다. 그러나, PTK7은 검출가능한 티로신 키나제 활성이 결여되어

있고, 따라서 슈도키나제의 서프패밀리에 속하며, 여기서 다양한 보존된 키나제 하위도메인에서의 여러 아미노산 변화는 ATP의 손상된 결합으로 이어진다 (Boudeau, et al., Trends Cell Biol. 16, 2006). 특히, 서브도메인 I 및 VII에서의 주요 잔기는 ATP의 비-전달가능한 포스페이트와의 직접적인 상호작용뿐만 아니라 이들 포스페이트를 가교하는 Mg^{2+} 보조인자의 킬레이트화가 손상되도록 PTK7에서 변경된다.

[0057] PTK7 기능의 생물학적 중요성은 히드라부터 드로소필라에서 닭 및 인간까지 보존된 오르토로그의 존재로부터 추론될 수 있고, 서열 분석에 의해 이들 각각은 키나제 활성이 결여된 것으로 예측된다. 헬릭스-헬릭스 회합에 대한 성향과 연관된 특정 TM 도메인 모티프의 높은 보존성에 기초하여, TM 도메인은 PTK7 이량체화를 매개할 수 있는 것으로 시사되고 있다. PTK7 슈도키나제 도메인 그 자체는 신호를 직접 전달하는 것으로 예상되지 않지만, 이는 신호전달 경로에서 다른 분자에 대한 스캐폴드로서 상호작용할 수 있거나, 또는 다른 티로신 키나제(들)를 동원할 수 있다. PTK7은 세포 부착, 세포 이동, 세포 극성, 증식, 액틴 세포골격 재구성 및 아포토시스에서 기능하여 배아발생, 상피 조직 구성, 뉴런 관 폐쇄, 뉴런 능선 형성 및 축삭 안내를 조절할 수 있는 것으로 밝혀진 바 있다 (Peradziryi, H. et al. Arch Biochem Biophys. 524, 2012).

[0058] PTK7을 발현하는 것으로 보고된 정상 조직 및 세포는 폐, 갑상선, 난소, CD4+ 최근 흉선 이주 T-세포 및 정상 골수 전구세포 및 CD34+CD38-골수 세포를 포함한다. 암성 조직과 관련하여, PTK7 발현은 또한 결장 암종 세포, 성인 골수성 백혈병 (AML) 샘플, CD34- 전-TALL 세포 및 위 암종에서 발견된 바 있다. PTK7은 유방암 세포주에서 발현이 가변적이지만, 염색체 6p21의 결실을 함유하는 특정 유방암에서 상실될 수 있다. PTK7은 또한 폐 선암종에서 발현된다. 골육종에서 6p1 2-p21 영역의 증폭의 세밀한 맵핑은, qRT-PCR에 의해 결정된 바와 같이, 유전자 카피수에서의 증가가 반드시 PTK7의 과다발현을 발생시키지는 않는다는 것을 제시한다.

[0059] PTK7이 다양한 생물학적 신호전달 경로 및 발생 과정과 연결되어 있지만, PTK7에 대한 리간드 또는 리간드들은 공지되어 있지 않다. 예를 들어, PTK7은 비-정규 (또한 Wnt/평면 세포 극성 신호전달로서 공지됨) 및 정규 Wnt 신호전달 경로 둘 다에서 보조-수용체로서 작용한다. 비-정규 Wnt 경로에서, PTK7은 RACK1과의 직접 상호작용 및 DSH의 막 국재화된 수용체 복합체로의 동원에 의해 하류 신호전달을 활성화한다. PTK7은 막 표면에서 프리즐드 수용체 결합에 대한 경쟁을 통해 정규 Wnt 경로 신호 전달에 대한 억제 효과를 발휘한다. PTK7 유전자 발현은 Cdx에 의해 조절되고, 단백질 안정성은 막 회합된 프로테이나제 분해에 의해 조절된다. PTK7은 메탈로프로테이나제 MMP14 및 Adam17에 의해 단백질분해적 분해 및 세포의 도메인 shedding에 대해 표적화되고, 이는 증진된 세포 증식, 이동, 및 용이화된 암 세포 침습으로 이어진다 (Peradziryi, et al. Arch Biochem Biophys. 524, 2012). 가용성 PTK7 (sPTK7)은 VEGF-유도된 혈관신생, 뿐만 아니라, 시험관내 튜브 형성, 이동 및 인간 내피 세포의 침습에서의 PTK7에 대한 역할을 제시하기 위해 사용되었다.

[0060] Wnt 경로를 조정하는 것에 대한 그의 잠재력에 더하여, 암성 조직 내에서 PTK는 HCT116 결장 암종 세포주에서 증식촉진 및 항아포토시스 신호를 전달하는 것으로 보이고, 그의 표현형은 PTK7의 RNAi 매개된 녹-다운에 의해 역전될 수 있다 (Meng, et al., 2010, PLoS One 5(11):e14018). PTK7 항아포토시스 신호는 성인 골수성 백혈병 (AML) 모세포에서 안타라시클린-매개 세포 사멸에 대해 저항성을 전달하였고, 이는 가용성 PTK7-Fc 단백질을 사용하여 역전될 수 있었다 (Prebet, et al., 2010, Blood 116(13):2315-23). 특정 암 세포에 의한 PTK7의 과다발현은 PTK7에 결합하고 후속적으로 내재화되는 암타머를 사용하여 배양물 중 T-ALL 세포에 다우노루비신의 전달을 표적화하기 위한 전략에서 활용되어 왔다.

[0061] II. PTK7 항체-약물 접합체

[0062] 본 발명은 식 Ab-(L-D)의 항체-약물 접합체를 제공하며, 여기서 (a) Ab는 PTK7에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, (b) L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이다. 또한, 이러한 항체-약물 접합체의 제조 및 제작 방법, 및 임상 적용에서의 그의 용도가 제공된다. "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"는 PTK7에 결합하고 약물, 예컨대 본원에서 하기에 추가로 기재되는 바와 같은 세포독성제, 세포증식억제제 및/또는 치료제에 접합되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (항체 유도체 포함)을 지칭한다. 예를 들어, 세포독성제는 세포독성제를 중앙 (예를 들어, PTK7 발현 중앙)에 표적화 국부 전달하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 항-PTK7 항체에 연결 또는 접합될 수 있다.

[0063] 본원에 사용된 용어 "PTK7"은 변이체, 이소형, 상동체, 오르토로그 및 파라로그를 포함한다. PTK7은 또한 결장 암종 키나제 4 (CCK4 또는 CCK-4)로서 관련 기술분야에 공지되어 있다. 본 출원의 목적상, 용어 "PTK7" 및 "CCK4"는 상호교환가능하게 사용되고, 인간 PTK7 또는 인간 CCK4의 스플라이스 변이체, 이소형, 종 오르토로그 및 상동체를 포함하는 것으로 인식될 것이다. 상기 용어는 또한, PTK7 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 에피토프를 함유하는 PTK7 또는 CCK4의 천연 또는 변이체 형태의 임의의 유도체 또는 단편을 지칭할 수 있는 것으로

추가로 인식될 것이다.

- [0064] 본 발명의 일부 측면에서, 항체 및 항체-약물 접합체는 인간 이외의 종으로부터의 PTK7, 예컨대 마우스, 래트, 또는 영장류의 PTK7 뿐만 아니라 상이한 형태의 PTK7 (예를 들어, 글리코실화 PTK7)과 교차 반응한다. 다른 측면에서, 항체 및 항체-약물 접합체는 인간 PTK7에 대해 완전히 특이적일 수 있고, 종 또는 다른 유형의 교차 반응성을 나타내지 않을 수 있다. 본원에 사용된 용어 PTK7은 문맥상 달리 표시되지 않는 한 자연 발생 인간 PTK7을 지칭한다. 따라서, "PTK7 항체" 또는 "항-PTK7 항체" 또는 다른 유사한 명칭은 인간 PTK7 또는 그의 단편 또는 유도체와 회합, 결합 또는 반응하는 임의의 항체 (본원에 정의된 바와 같음)를 의미한다. 추가로, "PTK7 항체-약물 접합체" 또는 "항-PTK7 항체-약물 접합체"는 인간 PTK7 또는 그의 단편 또는 유도체와 회합, 결합 또는 반응하는 임의의 항체-약물 접합체 또는 ADC (본원에 정의된 바와 같음)를 의미한다.
- [0065] "링커 (L)"는 약물에 대한 항체의 직접 또는 간접 연결을 기재한다. 항체에 대한 링커의 부착은 다양한 방식으로, 예컨대 표면 리신, 산화된 탄수화물에 대한 환원-커플링, 쇠간 디설피드 연결을 환원시키는 것에 의해 유려된 시스템인 잔기, 특정 부위에서 조작된 반응성 시스템인 잔기, 및 아실 공여자 글루타민-함유 태그 또는 트랜스글루타미나제 및 아민의 존재 하에 폴리펩티드 공학에 의해 반응성으로 만든 내인성 글루타민을 통해 달성될 수 있다. 히드라존-, 디설피드- 및 펩티드-기반 연결을 포함하는, 다양한 ADC 연결 시스템이 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0066] "약물 (D)"은 생물학적 또는 검출가능한 활성을 갖는 임의의 물질, 예를 들어 치료제, 검출가능한 표지, 결합제 등, 및 생체 내에서 활성제로 대사되는 전구약물이다. 용어 약물, 페이로드 및 화합물은 상호교환가능하게 사용된다.
- [0067] "L-D"는 링커 (L)에 연결된 약물 (D)로부터 생성된 링커-약물 모이어티이다.
- [0068] 본 발명과 관련하여 사용된 추가의 과학 기술 용어는 본원에 달리 나타내지 않는 한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 추가로, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수형을 포함할 것이고, 복수 용어는 단수형을 포함할 것이다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련되어 사용되는 명명법 및 그의 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0069] 본 발명의 특정한 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 1로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 15로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)이고 약물은 0101이다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 13으로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 23으로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)이고 약물은 0101이다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 25로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 39로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)이고 약물은 0101이다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 37로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 47로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)이고 약물은 0101이다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 49로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)이고 약물은 0101이다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 61로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 71로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, Ab; 및 (b) 링커-약물 모이

어티, L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이며, 여기서 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc)이고 약물은 0101이다.

[0075] 항체당 접합된 약물 분자의 수를 나타내는 DAR (약물-대-항체 비) 또는 약물 로딩은 1 내지 8일 수 있다. 복수 개의 항체-약물 접합체의 조성, 배치 및/또는 제제는 평균 DAR에 의해 특징화될 수 있다. DAR 및 평균 DAR은 다양한 통상적인 수단, 예컨대 UV 분광분석법, 질량 분광분석법, ELISA 검정, 방사측정 방법, 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 전기영동 및 HPLC에 의해 결정될 수 있다.

[0076] 본 발명의 특정한 측면에서, 정제된 항-PTK7 ADC는 비접합 항체 (유리 항체)가 전혀 존재하지 않을 수 있다. 본 발명의 다른 측면에서, 정제된 항-PTK7 ADC는 단량체 ADC일 수 있고, 응집체 및 이량체는 부재한다. 본 발명의 다른 측면에서, 정제된 항-PTK7 ADC는 유리 약물이 전혀 존재하지 않을 수 있다. 본 발명의 추가 측면에서, 정제된 항-PTK7 ADC는 단량체 ADC일 수 있고, 유리 약물을 전혀 갖지 않는다.

[0077] IIA. PTK7 항체

[0078] 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체를 제조하는 경우에, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 PTK7에 특이적으로 결합하는 임의의 항체 또는 그의 항원-결합 단편일 수 있다. 본 발명의 항체는 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943에 추가로 개시되어 있고 특징화되어 있다. 보다 특히, 그에 개시된 완전한 중쇄 및 경쇄, 그의 가변 영역, 및 그의 CDR을 포함하는 PTK7 항체의 서열이 본원에 참조로 포함된다. PTK7 항체-약물 접합체의 제조에 사용하기 위해, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 단리, 정제 또는 유도체화될 수 있다.

[0079] "항체" 또는 "Ab"는 이뮤노글로불린 분자의 가변 영역에 위치한, 적어도 1개의 항원 인식 부위를 통해 특이적 표적 또는 항원, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 폴리펩티드 등을 인식하고 이에 결합할 수 있는 이뮤노글로불린 분자이다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 주어진 항원 (예를 들어, PTK7)에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유하는 무손상 항체의 "항원-결합 단편" (또는 부분), 예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, Fc 등, 단리된 상보성 결정 영역 (CDR), 이중특이적 항체, 이중접합체 항체, 그의 돌연변이체, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (예를 들어, 도메인 항체)을 갖는 융합 단백질, 단일 쇠 (ScFv) 및 단일 도메인 항체 (예를 들어, 상어 및 낙타류 항체), 맥시바디, 미니바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, v-NAR 및 비스-scFv (예를 들어, 문헌 [Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136] 참조), 인간화 항체, 키메라 항체 및 요구되는 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 이뮤노글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 형상 (항체의 글리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체 및 공유적으로 변형된 항체 포함)을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 유형의 항체를 포괄할 수 있다. 항체는 무인, 래트, 인간, 또는 임의의 다른 기원 (키메라 또는 인간화 항체 포함)일 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 상기 개시된 PTK7 항체-약물 접합체의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 키메라, 인간화, 또는 재조합 인간 항체, 또는 그의 PTK7-결합 단편이다.

[0080] 표적 또는 항원 (예를 들어, PTK7 단백질)에 "특이적으로 결합" 또는 "우선적으로 결합"하는 (본원에서 상호교환가능하게 사용됨) 항체, 항체-약물 접합체, 또는 폴리펩티드는 관련 기술분야에서 널리 이해되는 용어이고, 이러한 특이적 또는 우선적 결합을 결정하는 방법이 또한 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 분자는 이것이 대안적 세포 또는 물질과의 경우보다 더 빈번하게, 더 신속하게, 더 긴 지속기간으로 및/또는 더 큰 친화도로 특정한 세포 또는 물질과 반응 또는 회합하는 경우에 "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"을 나타내는 것으로 언급된다. 항체는 이것이 다른 물질에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합력으로, 더 신속하게 및/또는 더 긴 지속기간으로 결합하는 경우에 표적 또는 항원에 "특이적으로 결합" 또는 "우선적으로 결합"한다. 예를 들어, PTK7 에피토프에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체는, 다른 PTK7 에피토프 또는 비-PTK7 에피토프에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합력으로, 더 신속하게 및/또는 더 긴 지속기간으로 이러한 에피토프에 결합하는 항체이다.

[0081] 본원에 사용된 용어 "결합 친화도" 또는 "K_D"는 특정한 항원-항체 상호작용의 평형 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. K_D는 "오프-레이트" 또는 "K_d"로도 불리는 해리 속도 대 회합 속도, 또는 "온-레이트" 또는 "K_a"의 비이다. 따라서, K_D는 K_d/K_a와 동등하고, 몰 농도 (M)로서 표현된다. K_D가 작을수록 결합 친화도는 더 강력해지는 결과가 된다. 따라서, 1 μM의 K_D는 1 nM의 K_D와 비교하여 약한 결합 친화도를 나타낸다. 항체에 대한 K_D 값은 관련 기술분야에 널리 확립된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 항체의 K_D를 결정하는 하나의 방법은, 전

형적으로 바이오센서 시스템, 예컨대 비아코어(BIACORE)® 시스템을 사용하여 표면 플라즈몬 공명을 사용하는 것에 의한다.

[0082] 게시된 PTK7 항체-약물 접합체의 특이적 결합은 다중의 상이한 항원을 갖는 불균질 샘플 중 인간 PTK7 항원에 대한 항체-약물 접합체의 우선적 결합을 지칭한다. 전형적으로, 항체-약물 접합체, 또는 그의 항체 부분 (Ab)의 결합 친화도가 적어도 약 10^{-7} M 이상, 예컨대 적어도 약 10^{-8} M 이상 (적어도 약 10^{-9} M 이상, 적어도 약 10^{-10} M 이상, 적어도 약 10^{-11} M 이상, 또는 적어도 약 10^{-12} M 이상 포함)인 경우에, 특이적 결합이 발생한다. 예를 들어, 인간 PTK7 항원에 대한 본 발명의 항체-약물 접합체, 또는 그의 항체 부분 (Ab)의 특이적 결합은 적어도 약 1×10^{-7} M 내지 약 1×10^{-12} M의 범위, 예컨대 약 1×10^{-8} M 내지 약 1×10^{-12} M 범위 내, 또는 약 1×10^{-8} M 내지 약 1×10^{-11} M 범위 내, 또는 약 1×10^{-8} M 내지 약 1×10^{-10} M 범위 내, 또는 약 1×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-10} M 범위 내의 결합을 포함한다. 특이적 결합은 또한 PTK7 항체-약물 접합체 또는 그의 항원 부분 (Ab)을 대상체에게 투여한 후의 PTK7-발현 세포에 대한 상기 항체의 선택적 표적화를 지칭한다.

[0083] 또한, 제1 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체 (또는 모이어티 또는 에피토프)는 제2 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있거나 또는 결합할 수 없다고 이해된다. 따라서, "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 배타적 결합을 (포함할 수는 있지만) 반드시 필요로 하지는 않는다. 일반적으로, 반드시 그러한 것은 아니지만, 결합에 대한 언급은 우선적 결합을 의미한다.

[0084] 본원에 사용된 바와 같은, "에피토프"는 이뮤노글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있거나 또는 달리 분자와 상호작용할 수 있는 임의의 단백질 결정기를 포함한다. 에피토프 결정기는 일반적으로 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹, 예컨대 아미노산 또는 탄수화물 또는 당 측쇄로 이루어지고, 일반적으로 특이적 3차원 구조적 특징 뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 갖는다. 에피토프는 '선형' 또는 '입체형태적'일 수 있다. 선형 에피토프에서, 단백질 및 상호작용하는 분자 (예컨대, 항체) 사이의 상호작용 지점 모두는 단백질의 1차 아미노산 서열을 따라 선형으로 발생한다. 입체형태적 에피토프에서, 상호작용 지점은 서로 분리되어 있는 단백질 상의 아미노산 잔기를 포함한다. 일단 항원 상의 목적하는 에피토프가 결정되면, 예를 들어 본 발명에 기재된 기술을 사용하여 그러한 에피토프에 대한 항체를 생성하는 것이 가능하다. 대안적으로, 발견 과정 동안 항체의 생산 및 특징화는 바람직한 에피토프에 관한 정보를 밝혀낼 수 있다. 이러한 정보로부터, 이어서 동일한 에피토프에의 결합에 대해 항체를 경쟁적으로 스크리닝하는 것이 가능하다. 이를 달성하기 위한 접근법은 서로 경쟁적으로 결합하는 항체, 즉 항원에의 결합에 대해 경쟁하는 항체를 발견하기 위해 교차-경쟁 연구를 수행하는 것이다. 그들의 교차-경쟁에 기초한 '비닝' 항체에 대한 고처리량 과정이 PCT 국제 공개 번호 WO 03/48731에 기재되어 있다. 본원에 사용된 용어 '비닝'은 항원 결합 특징 및 서로와의 경쟁에 기초하여 항체를 그룹화하는 방법을 지칭한다.

[0085] 본원에 사용된 바와 같은 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭한다 (예를 들어, PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 PTK7 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음). 또한, 단리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 그러나, PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원, 예컨대 다른 종으로부터의 PTK7 분자 (즉 오르토 로그)에 대해 또는 PTK7의 1종 초과이 이소형과 교차-반응성을 가질 수 있다.

[0086] 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 서열식별번호: 1로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 15로서 제시된 경쇄 가변 영역; 또는 (c) 서열식별번호: 25로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 39로서 제시된 경쇄 가변 영역; 또는 (c) 서열식별번호: 49로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 인간 PTK7에의 결합에 대해 경쟁하고/거나 상기 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.

[0087] 항체와 관련하여 본원에 사용된 용어 "경쟁하다"는 제1 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 제2 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 결합과 충분히 유사한 방식으로 에피토프에 결합하여, 제1 항체와 그의 동족 에피토프와의 결합에 따른 결과가 제2 항체의 부재 하에서의 제1 항체의 결합과 비교하여 제2 항체의 존재 하에서 검출가능한 수준으로 감소되는 것을 의미한다. 제2 항체의 그의 에피토프에 대한 결합이 또한 제1 항체의 존재 하에서 검출가능한 수준으로 감소되는 대안적인 것도 이 경우일 수 있지만, 반드시 필요하지는 않다. 즉, 제2 항체가 제1 항체의 그의 각각의 에피토프에 대한 결합을 억제하지 않으면서, 제1 항체가 제2 항체의 그의 에피토프에 대한 결합을 억제할 수 있다. 그러나, 각 항체가 다른 항체와 그의 동족 에피토프 또는 리간드의 결합을 검출가

능하게 억제하는 경우에, 동일한 정도인지, 보다 큰 정도인지 또는 보다 적은 정도인지 관계없이, 항체는 그들의 각각의 에피토프(들)의 결합에 대해 서로 "교차-경쟁"하는 것으로 언급된다. 경쟁 및 교차-경쟁 항체 둘 다 가 본 발명에 포괄된다. 이러한 경쟁 또는 교차-경쟁이 일어나는 메카니즘 (예를 들어, 입체 장애, 입체형태적 변화, 또는 공통의 에피토프 또는 그의 부분과의 결합)과 관계없이, 통상의 기술자는 본원에 제공된 교시에 기초하여, 이러한 경쟁 및/또는 교차-경쟁 항체가 포괄되고 본원에 개시된 방법에 유용할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0088] 천연 또는 자연 발생 항체, 및 천연 이뮤노글로불린은 전형적으로, 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각 경쇄는 1개의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 디설피드 연결의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄 사이에 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠내 디설피드 가교를 갖는다. 각 중쇄는 한 말단에 가변 도메인 (VH)에 이어 수많은 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 한 말단에 가변 도메인 (VL) 및 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기가 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체들 사이의 서열에 있어서 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다.

[0089] 항체 및 상기 언급된 항체 도메인은 "폴리펩티드", "올리고펩티드", "펩티드" 및 "단백질", 즉 임의의 길이, 바람직하게는 비교적 짧은 아미노산 (예를 들어, 10-100개 아미노산)의 쇠로서 기재될 수 있다. 쇠는 선형 또는 분지형일 수 있고, 이는 변형된 아미노산을 포함할 수 있고/거나 비-아미노산에 의해 개재될 수 있다. 추가로 폴리펩티드는 단일 쇠 또는 회합된 쇠로서 발생할 수 있는 것으로 이해된다. 아미노산은 통상적으로 공지된 그의 3 문자 기호에 의해 또는 IUPAC-IUB 바이오케미칼(Biochemical)에 의해 권장되는 1-문자 기호에 의해 본원에서 지칭될 수 있다. 용어 "폴리펩티드", "올리고펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 또한 자연적으로 또는 개재에 의해; 예를 들어 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지 성분과의 접합에 의해 변형된 아미노산 쇠를 포괄한다. 또한 상기 정의 내에는, 예를 들어 아미노산의 1개 이상의 유사체 (예를 들어, 비천연 아미노산 등 포함) 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩티드가 포함된다. 아미노산 변형은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 이루어질 수 있고, 많은 이러한 방법은 널리 공지되어 있고 통상의 기술자에게 일상적이다. 예를 들어, 비제한적으로, 아미노산 치환, 결실 및 삽입은 임의의 널리 공지된 PCR-기반 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 아미노산 치환은 부위-지정 돌연변이유발에 의해 이루어질 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Zoller and Smith, 1982, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500; 및 Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:488] 참조).

[0090] 항체의 "불변 영역"은 단독으로 또는 조합하여, 항체 경쇄의 불변 영역 또는 항체 중쇄의 불변 영역을 지칭한다. 키메라 및 인간화 PTK7 항체의 불변 영역은 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, 그의 임의의 이소형 (예를 들어, IgG의 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소형) 뿐만 아니라 그의 하위부류 및 돌연변이된 버전 중 어느 하나의 불변 영역으로부터 유래될 수 있다. 그의 중쇄의 불변 영역의 항체 아미노산 서열에 따라서, 이뮤노글로불린은 상이한 부류로 배정될 수 있다. 5가지 주요 부류의 이뮤노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 나눌 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 영역은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 불린다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 널리 공지되어 있다.

[0091] 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 Fc 수용체 (FcR) 결합, 항체-의존성 세포 독성에 있어서의 항체의 참여, 옵소닌화, 보체 의존성 세포독성의 개시, 및 비만 세포 탈과립화를 나타낸다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 용어 "Fc 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 위치 Cys226에서의 아미노산 잔기로부터 또는 Pro230으로부터 그의 카르복실-말단까지의 스트레치로 정의된다. Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트(Kabat)에서와 같은 EU 인덱스의 넘버링이다. 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991]. 이뮤노글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 영역, CH2 및 CH3을 갖는다.

[0092] 관련 기술분야에 사용된 바와 같이, "Fc 수용체" 및 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체와 결합하는 것이고 (감마 수용체), Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII 하위부류의 수용체 (이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태 포함)를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제성 수용체")를

포함하며, 이는 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92, 1991; Capel et al., Immunomethods, 4:25-34, 1994; 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41, 1995]에서 검토되어 있다. "FcR"은 또한 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다 (Guyer et al., J. Immunol., 117:587-593 (1976); 및 Kim et al., European J. Immunol., 24:2429-2434 (1994)).

- [0093] 항체의 중쇄의 CH2 또는 CH3 도메인의 표면 상 또는 경쇄의 불변 도메인 상 또는 달리 접근가능한 곳에 존재할 가능성이 있는 특정 잔기가 자연 발생 야생형 아미노산의, 예를 들어 시스테인에 의한 치환에 적합하고, 따라서 다양한 작용제에 접합될 수 있는 부위로 조작하는데 유용하다는 것이 이전에 보고된 바 있다.
- [0094] 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 용어 "조작된 Fc 폴리펩티드", "조작된 Fc 영역" 및 "조작된 Fc"는 접합을 위한 부위를 도입하는 적어도 1개의 돌연변이, 예를 들어 아미노산 치환을 포함하는 Fc 폴리펩티드 또는 그의 부분을 의미한다. 돌연변이는 자연 발생 아미노산 잔기 대신 그 위치에 시스테인을 도입하고, 여기서 돌연변이는 Fc에 대한 모이어티의 접합을 위한 반응성 부위 (예를 들어, 반응성 술폰히드릴 기)를 생성한다.
- [0095] 본원에 사용된 용어 "아실 공여자 글루타민-함유 태그" 또는 "글루타민 태그"는 트랜스글루타미나제 아민 수용자로서 작용하는 1개 이상의 Gln 잔기(들)를 함유하는 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다.
- [0096] 항체의 "가변 영역"은 단독으로 또는 조합하여, 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각, 초가변 영역으로도 공지된 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역 (FR)으로 이루어진다. 각 채 내의 CDR은 FR에 의해 함께 매우 근접하여 유지되고, 다른 채로부터의 CDR과 함께, 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 적어도 2가지 기술이 존재한다: (1) 교차-종 서열 가변성에 기초한 접근법 (즉, 문헌 [Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)]); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기초한 접근법 (Al-Lazikani et al., J. Molec. Biol. 273:927-948 (1997)). 본원에 사용된 바와 같은, CDR은 어느 하나의 접근법에 의해 또는 둘 다의 접근법의 조합에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다.
- [0097] 가변 도메인의 CDR은 카바트, 코티아(Chothia), 카바트 및 코티아 둘 다의 누적, VBASE2, AbM, 접촉의 정의, 및/또는 입체형태적 정의에 따라 또는 관련 기술분야에 널리 공지된 임의의 CDR 결정 방법에 따라 확인되는 가변 영역 내의 아미노산 잔기이다. 항체 CDR은 카바트 등에 의해 원래 정의된 초가변 영역으로서 확인될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.]을 참조한다. CDR의 위치는 또한 코티아 등에 의해 원래 기재된 구조적 루프 구조로서 확인될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Chothia et al., Nature 342:877-883, (1989)]을 참조한다. CDR 위치는 또한, VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래될 수 있다. (예를 들어, 문헌 [Retter et al., 2005, Nucleic Acids Res. 33(Database Issue):D671-D674] 참조).
- [0098] CDR 확인에 대한 다른 접근법은, 카바트와 코티아 사이의 절충안으로 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어 (현재, 액셀리스(ACCELRYS)®)를 사용하여 유래되는 "AbM 정의", 또는 문헌 [MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, (1996)]에 제시된, 관찰된 항원 접촉에 기초한 CDR의 "접촉 정의"를 포함한다. 본원에서 CDR의 "입체형태적 정의"로서 지칭되는 또 다른 접근법에서, CDR의 위치는 항원 결합에 대해 엔탈피 기여를 하는 잔기로서 확인될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008]을 참조한다. 다른 CDR 경계 정의는 상기 접근법 중 하나를 엄격하게 따르지 않을 수 있지만, 그럼에도 불구하고, 특정한 잔기 또는 잔기의 군 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 유의한 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험적 발견에 비추어 단축되거나 연장될 수 있을지라도, 카바트 CDR의 적어도 일부와 중첩될 것이다. 본원에 사용된 바와 같은, CDR은 관련 기술분야에 공지된 임의의 접근법 (접근법의 조합 포함)에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다. 본원에 사용된 방법은 임의의 이들 접근법에 따라 정의된 CDR을 사용할 수 있다. 본원에 기재된 PTK7 항체-약물 접합체의 경우에, CDR은 카바트, 코티아, 연장된, VBASE2, AbM, 접촉, 및/또는 입체형태적 정의 중 어느 것에 따라 정의될 수 있다.
- [0099] 본 발명의 다른 측면에서, PTK7 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 항체의 1개 이상의 CDR(들) (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5 또는 모든 6개의 CDR)을 포함한다.
- [0100] 본 발명의 경우에, 하기 표 1에 제시된 hu23, hu24, 및 hu58의 CDR (서열식별번호: 1-72)은 카바트 및 코티아를 사용하여 유래되었다. 본원에 참조로 포함되는 PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943의 도 6에 제시된 바와 같은

CDR은 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래되었다. 따라서, 모든 이러한 명명법에 의해 정의된 CDR을 갖는 항체가 본 발명의 범주 내에 분명하게 포함된다. 보다 광범위하게, 용어 "가변 영역 CDR 아미노산 잔기"는 상기 제시된 바와 같은 임의의 서열 또는 구조 기반 방법을 사용하여 확인된 바와 같은 CDR 내의 아미노산을 포함한다.

[0101] 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 hu23 항체의 CDR을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 중쇄 가변 영역은 서열 식별번호: 3, 7, 및 11로서 제시된 3개의 CDR을 갖는다. 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하며, 여기서 적어도 1개의 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 17, 19, 및 21로서 제시된 3개의 CDR을 갖는다. 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 또한, (a) 서열식별번호: 3, 7, 및 11로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열식별번호: 17, 19, 및 21로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다.

[0102] 본 발명의 다른 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 코티아에 따라 정의되거나 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 1개 이상의 hu23 CDR을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 중쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 hu23 CDR (표 1 참조) 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu23 CDR (PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943 참조)을 포함한다. 또 다른 예로서, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 경쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 hu23 CDR (표 1 참조) 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu23 CDR (PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943 참조)을 포함한다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 코티아에 따라 정의된 3개의 hu23 CDR (표 1 참조)을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 코티아에 따라 정의된 3개의 hu23 CDR (표 1 참조)을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu23 CDR (PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943 참조)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu23 CDR (PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943 참조)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다.

[0103] 본 발명의 다른 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 hu24 항체의 CDR을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 27, 31, 및 35로서 제시된 3개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하며, 여기서 적어도 1개의 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 41, 43, 및 45로서 제시된 3개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 또한, (a) 서열식별번호: 27, 31, 및 35로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열식별번호: 41, 43, 및 45로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0104] 본 발명의 다른 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 코티아에 따라 정의되거나 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 1개 이상의 hu24 CDR을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 중쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 hu24 CDR (표 1 참조) 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu24 CDR (PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943 참조)을 포함한다. 또 다른 예로서, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 경쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 hu24 CDR (표 1 참조) 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu24 CDR (PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943 참조)을 포함한다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 코티아에 따라 정의된 3개의 hu24 CDR (표 1 참조)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 코티아에 따라 정의된 3개의 hu24 CDR (표 1 참조)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a)

VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu24 CDR (PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943 참조)을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu24 CDR (PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943 참조)을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다.

[0105] 본 발명의 다른 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 hu58 항체의 CDR을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 51, 55, 및 59로서 제시된 3개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하며, 여기서 적어도 1개의 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 65, 67, 및 69로서 제시된 3개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 또한, (a) 서열식별번호: 51, 55, 및 59로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열식별번호: 65, 67, 및 69로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0106] 본 발명의 다른 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 코티아에 따라 정의되거나 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 1개 이상의 hu58 CDR을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 중쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 hu58 CDR 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu58 CDR을 포함한다. 또 다른 예로서, PTK7 항체-약물 접합체는 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1개의 경쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 hu58 CDR 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu58 CDR을 포함한다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) 코티아에 따라 정의된 3개의 hu58 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 코티아에 따라 정의된 3개의 hu58 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 (a) VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu58 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 hu24 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다.

[0107] 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체를 제조하기 위해 사용되는 항체는 모노클로날 항체일 것이다. 용어 "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 실질적으로 동종인 항체 집단, 즉 집단을 구성하는 개별 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일한 집단으로부터 수득된 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고, 단일 항원 부위에 대해 지시된다. 또한, 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시되는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득되는 바와 같은 항체의 특징을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용하고자 하는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법, 예컨대 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 사용하여 생성된 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0108] 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 항체-약물 접합체를 제조하기 위해 사용되는 항체는 1가, 즉 분자 (예를 들어, IgG 또는 Fab) 당 1개의 항원 결합 부위를 가질 것이다. 일부 경우에, 1가 항체는 1개 초과 항원 결합 부위를 가질 수 있지만, 결합 부위는 상이한 항원으로부터의 것이다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 항체-약물 접합체의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 "2가 항체", 즉 분자 (예를 들어, IgG) 당 2개의 항원 결합 부위를 갖는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 2개의 결합 부위는 동일한 항원 특이성을 갖는다. 대안적으로, 2가 항체는 이중특이적일 수 있다. "이중특이적", "이중-특이적" 또는 "이관능성" 항체는 2개의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 하이브리드 항체이다. 이중특이적 항체의 2개의 항원 결합 부위는 동일하거나 상이한 단백질 표적 상에 존재할 수 있는 2개의 상이한 에피토프에 결합한다.

[0109] 용어 "키메라 항체"는 가변 영역 서열의 일부 또는 전부가 한 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열이 또 다른 종으로부터 유래된 항체, 예컨대 가변 영역 서열이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열이 인간 항체로부터 유래된 항체를 지칭하는 것으로 의도된다.

- [0110] 본원에 사용된 바와 같은 "인간화" 또는 "CDR 그래프트된" 항체는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린쇄 또는 그의 단편 (예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원 결합 하위서열)인 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 형태를 지칭한다. 바람직하게는, 인간화 항체는 수용자의 1개 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 중, 예컨대 마우스, 래트 또는 토끼의 1개 이상의 CDR (공여자 항체)로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다.
- [0111] 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체에서 발견되지 않거나 또는 유입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않지만 항체 성능을 추가로 정밀화하고 최적화하기 위해 포함되는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 것이다. 인간화 항체는 최적으로 또한, 이뮤노글로불린 불변 영역 또는 도메인 (Fc), 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역 또는 도메인의 적어도 일부를 포함할 것이다. 본 발명의 일부 측면에서 항체는 PCT 국제 공개 번호 WO 99/58572에 기재된 바와 같이 변형된 Fc 영역을 갖는다. 다른 형태의 인간화 항체는 원래 항체와 관련하여 변경될 수 있는 1개 이상의 CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, 또는 CDR H3)을 갖고, 이는 또한 원래 항체로부터의 1개 이상의 CDR"로부터 유래된" 1개 이상의 CDR로 명명된다.
- [0112] 인간화는 본질적으로, 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 또는 돌연변이체 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 대체함으로써, 윈터(Winter)와 그 동료의 방법 (Jones et al. Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al. Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al. Science, 239:1534-1536 (1988))에 따라 수행될 수 있다. 또한, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205를 참조한다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 1개 이상의 가변 영역의 프레임워크 영역 내의 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 및 6,180,370 참조). 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정밀화하기 위해 (예를 들어, 목적하는 친화성을 수득하기 위해) 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 프레임워크 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 임의로 또한, 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 세부사항에 대해, 문헌 [Jones et al. Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al. Nature 332:323-327(1988); 및 Presta Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조하고; 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜한 무손상 인간 가변 도메인을 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 대체시킨 항체를 포함할 수 있다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로, 일부 CDR 잔기와 가능하게는 일부 프레임워크 잔기를 설치류 항체 내의 유사한 부위로부터의 잔기로 대체시킨 인간 항체이다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205를 참조한다. 또한, 미리 결정된 항원에 대한 개선된 친화도를 갖는 인간화 항체, 및 인간화 항체를 생성하기 위한 기술이 개시되어 있는 미국 특허 번호 6,180,370, 및 PCT 국제 공개 번호 WO 01/27160을 참조한다.
- [0113] "재조합 인간 항체" 또는 "완전 인간 항체"는 인간에 의해 생성되고/되거나 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있거나 본원에 개시된 임의의 인간 항체의 제조 기술을 사용하여 제조된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 지칭한다. 이러한 인간 항체의 정의는 적어도 1개의 인간 중쇄 폴리펩티드 또는 적어도 1개의 인간 경쇄 폴리펩티드를 갖는 항체를 포함한다. 이러한 한 가지 예는 뮤린 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 갖는 항체이다. 인간 항체는 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선택되고, 이러한 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다 (Vaughan et al., Nature Biotechnology, 14:309-314, (1996); Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162, (1998); Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227(2):381-388 (1992); Marks et al., J. Mol. Biol., 222(3):581-597 (1991)). 인간 항체는 또한 내인성 유전자좌 대신 인간 이뮤노글로불린 유전자좌를 트랜스제닉 도입한 동물, 예를 들어 내인성 이뮤노글로불린 유전자를 부분적으로 또는 완전히 불활성화시킨 마우스를 면역화함으로써 제조할 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016에 기재되어 있다. 대안적으로, 인간 항체는 표적 항원에 대

해 지시된 항체를 생산하는 인간 B 림프구를 불멸화시킴으로써 제조될 수 있다 (이러한 B 림프구는 개체로부터 또는 cDNA의 단세포 클로닝으로부터 회수할 수 있거나 또는 시험관 내에서 면역시킬 수 있음). 예를 들어, 문헌 [Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95, (1991)]; 및 미국 특허 번호 5,750,373을 참조한다.

[0114] 본 발명의 항체는 관련 기술분야에 널리 공지된 기술, 예를 들어 재조합 기술, 파지 디스플레이 기술, 합성 기술 또는 이러한 기술의 조합, 또는 관련 기술분야에 용이하게 공지된 다른 기술을 사용하여 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Jayasena, S.D., Clin. Chem., 45: 1628-50 (1999) 및 Fellouse, F.A., et al., J. Mol. Biol., 373(4):924-40 (2007)] 참조). 추가의 안내는 문헌 [Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); 및 Coligan et al., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003)]에서 찾아볼 수 있다. 대표적인 방법이 또한, 본원의 다음 실시예 1에 기재되어 있다.

[0115] 일반적으로, 하이브리도마 세포주의 생성을 위한 숙주 동물의 면역화 경로 및 스케줄은 일반적으로, 항체 자극과 생성을 위해 확립된 통상적인 기술에 따른다. 인간을 포함한 모든 포유동물 대상체 또는 그로부터의 항체 생산 세포를, 포유동물 (인간 포함) 및 하이브리도마 세포주의 생성을 위한 기준으로서 제공되도록 조작할 수 있는 것으로 고려된다. 전형적으로, 숙주 동물에게 본원에 기재된 바와 같은 것을 포함하는 면역원의 양을 복강내로, 근육내로, 경구로, 피하로, 족저내로, 및/또는 피내로 접종한다.

[0116] 하이브리도마는 문헌 [Kohler, B. and Milstein, C., Nature 256:495-497, 1975]의 일반적 체세포 혼성화 기술을 사용하거나 또는 문헌 [Buck, D. W., et al., In Vitro, 18:377-381, 1982]에 의해 변형된 바와 같이, 림프구 및 불멸화 골수종 세포로부터 제조할 수 있다. X63-Ag8.653 및 스크 인스티튜트, 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute, Cell Distribution Center; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)로부터의 것을 포함하나 이에 제한되지 않는, 이용가능한 골수종 세포주를 상기 혼성화에 사용할 수 있다. 일반적으로, 이러한 기술은 폴리에틸렌 글리콜과 같은 융합생성제를 사용하거나 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 전기적 수단에 의해 골수종 세포와 림프성 세포를 융합시키는 것을 수반한다. 이러한 융합 후, 상기 세포를 융합 배지로부터 분리시키고, 선택적 성장 배지, 예컨대 하이포크산틴-아미노프테린-티미딘 (HAT) 배지에서 성장시켜 혼성화되지 않은 모 세포를 제거한다. 혈청으로 보충되거나 보충되지 않은, 본원에 기재된 임의의 배지가 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 배양하기 위해 사용될 수 있다. 세포 융합 기술에 대한 또 다른 대안으로서, EBV 불멸화 B 세포를 사용하여 본 발명의 PTK7 모노클로날 항체를 생산할 수 있다. 하이브리도마를 확장 및 서브클로닝하고, 원하는 경우에, 상청액을 통상적인 면역검정 절차 (예를 들어, 방사성면역검정, 효소 면역검정, 또는 형광 면역검정)에 의해 항-면역원 활성화에 대해 검정한다. 항체의 공급원으로서 사용될 수 있는 하이브리도마는 PTK7에 대해 특이적인 모노클로날 항체를 생산하는 모 하이브리도마의 모든 유도체, 자손 세포, 또는 그의 부분을 포괄한다.

[0117] 이러한 항체를 생산하는 하이브리도마는 공지된 절차를 사용하여 시험관내 또는 생체내에서 성장될 수 있다. 모노클로날 항체는 원하는 경우에, 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예컨대 황산암모늄 침전, 겔 전기영동, 투석, 크로마토그래피, 및 한외여과에 의해 배양 배지 또는 체액으로부터 분리할 수 있다. 원하지 않는 활성은, 존재하는 경우에, 예를 들어 고체 상에 부착된 면역원으로 제조된 흡착제 전반에 걸친 제조를 수행하고, 이러한 면역원으로부터 목적 항체를 용리 또는 방출시킴으로써 제거할 수 있다. 이관능성 또는 유도체화제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서, R 및 R^1 은 상이한 알킬 기임)을 사용하여, 면역시키고자 하는 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 또는 대두 트립신 억제제와 접합된 표적 아미노산 서열을 함유하는 인간 PTK7, 또는 그의 단편으로 숙주 동물을 면역시키면, 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체) 집단이 생성될 수 있다.

[0118] 원하는 경우에, 관심 PTK7 항체 (모노클로날 또는 폴리클로날)를 서열분석할 수 있고, 이어서 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현 또는 증식을 위해 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 관심 항체를 코딩하는 서열을 숙주 세포 내의 벡터에 유지시킨 다음, 이러한 숙주 세포를 나중의 사용을 위해 확장 및 동결시킬 수 있다. 세포 배양물 중에서 재조합 모노클로날 항체를 생성하는 것은 관련 기술분야에 공지된 수단에 의해 B 세포로부터 항체 유전자를 클

로닝함으로써 수행할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Tiller et al., J. Immunol. Methods 329:112-124 (2008)]; 미국 특허 번호 7,314,622를 참조한다.

- [0119] "숙주 세포"는 폴리뉴클레오티드 삽입물의 혼입을 위해 벡터(들)에 대한 수용자일 수 있거나 또는 이러한 수용자였던 개개의 세포 또는 세포 배양물을 포함한다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함하고, 이러한 자손은 자연적, 우발적 또는 고의적 돌연변이로 인해 원래의 모 세포와 (형태학적 또는 게놈 DNA 상보성 측면에서) 반드시 완전하게 동일하지 않을 수 있다. 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드(들)로 생체내 형질감염된 세포를 포함한다.
- [0120] 용어 "벡터"는 숙주 세포에 1종 이상의 관심 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달할 수 있고, 바람직하게는 이들을 발현할 수 있는 구축물을 의미한다. 벡터의 예는 바이러스 벡터, 네이키드 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온성 축합제와 회합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜 내에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 특정 진핵 세포, 예컨대 생산자 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0121] 용어 "발현 제어 서열"은 핵산의 전사를 지시하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 제어 서열은 프로모터, 예컨대 구성적 또는 유도성 프로모터, 또는 인핸서일 수 있다. 발현 제어 서열은 전사시키고자 하는 핵산 서열과 작동 가능하게 연결된다.
- [0122] 대안적으로, 폴리뉴클레오티드 서열은 항체를 "인간화"시키거나 또는 항체의 친화도 또는 다른 특징을 개선시키기 위한 유전자 조작을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 불변 영역은 항체가 인간에서의 임상 시험 및 치료에 사용되는 경우에, 면역 반응을 회피하기 위해 인간 불변 영역과 더 거의 유사하도록 조작될 수 있다. PTK7에 대한 보다 큰 친화도 및 PTK7을 억제하는데 있어서 보다 큰 효능을 획득하도록 항체 서열을 유전적으로 조작하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0123] 모노클로날 항체를 인간화하기 위해 사용될 수 있는 4가지 일반적인 단계가 존재한다: (1) 출발 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오티드 및 예측 아미노산 서열을 결정하는 단계; (2) 인간화 항체를 설계하는 단계, 즉 인간화 과정 동안 사용하기 위해 항체 프레임워크 영역을 결정하는 단계; (3) 실제적 인간화 방법론/기술; 및 (4) 인간화 항체의 형질감염 및 발현. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; 및 6,180,370을 참조한다.
- [0124] 인간화 항체는 다음에 기재되는 바와 같은, 베니어링, 상보성 결정 영역 (CDR)의 그래프팅, 단축 CDR의 그래프팅, 특이성 결정 영역 (SDR)의 그래프팅, 및 프랑켄슈타인 어셈블리를 포함한 다양한 방법 중 어느 하나를 사용하여 제조될 수 있다. 인간화 항체는 또한, 하나 이상의 변화를 CDR 내에 도입시킨 초인간화 항체를 포함한다. 예를 들어, CDR 내의 비-인간 잔기를 인간 잔기로 대체할 수 있다. 이들 일반적 접근법을 표준 돌연변이유발 및 합성 기술과 조합하여 임의의 바람직한 서열의 항-PTK7 항체를 생산할 수 있다.
- [0125] 베니어링은 항체의 용매 접근 가능한 외부를 인간 아미노산 서열로 재표면화함으로써 설치류 또는 다른 비-인간 항체 내의 잠재적으로 면역원성인 아미노산 서열을 감소시키는 개념에 기초한다. 따라서, 베니어링된 항체는 변형되지 않은 비-인간 항체보다 인간 세포에 대해 덜 외래인 것으로 보인다. 문헌 [Padlan (1991) Mol. Immunol. 28:489-98]을 참조한다. 비-인간 항체는, 인간 항체의 프레임워크 영역 내의 동일한 위치에서의 것과 상이한, 비-인간 항체 내의 노출된 외부 프레임워크 영역 잔기를 확인하고; 이와 같이 확인된 잔기를, 인간 항체 내의 상기 동일한 위치를 전형적으로 점유하고 있는 아미노산으로 대체함으로써 베니어링된다.
- [0126] CDR의 그래프팅은 수용자 항체 (예를 들어, 목적하는 프레임워크 잔기를 갖는 인간 항체 또는 다른 항체)의 1개 이상의 CDR을 공여자 항체 (예를 들어, 비-인간 항체)의 CDR로 대체함으로써 수행된다. 수용자 항체는 후보 수용자 항체와 공여자 항체 간의 프레임워크 잔기의 유사성에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 프랑켄슈타인 접근법에 따라, 인간 프레임워크 영역은 관련 비-인간 항체의 각 프레임워크 영역과 실질적인 서열 상동성을 갖는 것으로서 확인되고, 비-인간 항체의 CDR은 상이한 인간 프레임워크 영역의 복합체 상으로 그래프팅된다. 본 발명의 항체를 제조하는데 또한 유용한 관련 방법이 미국 특허 번호 7,321,026에 기재되어 있다.
- [0127] 단축 CDR의 그래프팅이 관련 접근법이다. 단축 CDR은 특이성 결정 잔기 및 인접한 아미노산을 포함하고, 이는 경쇄 내의 위치 27d-34, 50-55 및 89-96에서의 잔기, 및 중쇄 내의 위치 31-35b, 50-58 및 95-101에서의 잔기를 포함한다 (문헌 [Kabat et al. (1987)]의 넘버링 협정). 문헌 [Padlan et al. (1995) FASEB J. 9:133-9]을 참조한다. 특이성 결정 잔기 (SDR)의 그래프팅은 항체 결합 부위의 결합 특이성 및 친화도가 각각의 상보성 결정 영역 (CDR) 내의 가장 고도로 가변적인 잔기에 의해 결정된다는 이해를 전제로 한다. 항체-항원 복합체의 3차원 구조의 분석을 입수가 가능한 아미노산 서열 데이터의 분석과 조합하여 사용하여, CDR 내의 각 위치에 존재하

는 아미노산 잔기의 구조적 비유사성에 기초한 서열 가변성을 모델링할 수 있다. SDR은 접촉 잔기로 이루어진 최소한으로 면역원성인 폴리펩티드 서열로서 확인된다. 문헌 [Padlan et al. (1995) FASEB J. 9: 133-139]을 참조한다.

[0128] 일반적으로, 인간 수용자 프레임워크는 이들이 공여자 항체의 프레임워크 영역과 실질적으로 유사하거나 또는 가변 영역 서브패밀리의 컨센서스 서열과 가장 유사하다는 사실에 기초하여 선택된다. 그래프팅 후, 공여자 및/또는 수용자 서열에서 추가의 변화를 가하여 항체 결합, 기능성, 코돈 용법, 발현 수준 등을 최적화시킬 수 있고, 비-인간 잔기를 프레임워크 영역 내로 도입하는 것을 포함한다. 예를 들어, PCT 국제 공개 번호 WO 91/09967을 참조한다.

[0129] CDR을 중쇄 가변 프레임워크 영역 상으로 그래프팅하는 경우에, 유용한 프레임워크 서열은 DP-21 (VH7), DP-54 (VH3-07), DP-47 (VH3-23), DP-53 (VH-74), DP-49 (VH3-30), DP-48 (VH3-13), DP-75, DP-8(VH1-2), DP-25, VI-2b 및 VI-3 (VH1-03), DP-15 및 V1-8 (VH1-08), DP-14 및 V1-18 (VH1-18), DP-5 및 V1-24P (VH1-24), DP-4 (VH1-45), DP-7 (VH1-46), DP-10, DA-6 및 YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH1-e), DP-3 및 DA-8 (VH1-f)로부터 유래될 수 있다. CDR을 경쇄 가변 프레임워크 영역 상으로 그래프팅하는 경우에, 유용한 프레임워크 서열은 DPK24 하위군 IV 배선 클론, 윌(Wi11) 하위군 (DPK23, DPK22, DPK20, DPK21), 또는 V_KI 하위군 배선 클론 (DPK9, DPK1, 02, DPK7)으로부터 유래될 수 있다.

[0130] 항원-결합 단편 또는 항체 단편은 항체의 단백질분해 또는 다른 분해에 의해, 상기 언급된 바와 같은 재조합 방법에 의해 (즉, 단일 또는 융합 폴리펩티드), 또는 화학적 합성에 의해 생산될 수 있다. 항체의 폴리펩티드, 특히 약 50개 이하의 아미노산의 보다 짧은 폴리펩티드는 화학적 합성에 의해 편리하게 제조된다. 화학적 합성 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고 상업적으로 입수가 가능하다. 예를 들어, 항체 또는 항체 단편은 고체 상 방법을 사용하는 자동화 폴리펩티드 합성기에 의해 생산될 수 있다. 또한, 미국 특허 번호 5,807,715; 4,816,567; 및 6,331,415를 참조한다.

[0131] 본 발명의 다른 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 hu23, hu24, 또는 hu58 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 갖거나 또는 hu23, hu24, 또는 hu58 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 실질적으로 유사한 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0132] 폴리펩티드에 적용되는 바와 같은 용어 "실질적 동일성" 또는 "실질적 유사성"은 예컨대 프로그램에 공급된 바와 같은 디폴트 갭 중량을 사용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬된 경우에, 2개의 아미노산 서열이 적어도 70%, 75% 또는 80% 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성, 및 보다 바람직하게는 적어도 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 공유하는 것을 의미한다. 일부 실질적으로 유사한 아미노산 서열에서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 차이가 난다.

[0133] 실질적으로 유사한 폴리펩티드는 또한, 1개 이상의 잔기를 기능적으로 유사한 잔기로 보존적으로 치환시킨, 보존적으로 치환된 변이체를 포함한다. 보존적 치환의 예는 1개의 비-극성 (소수성) 잔기, 예컨대 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌을 또 다른 잔기로 치환하는 것; 1개의 극성 (친수성) 잔기를 또 다른 잔기로 치환하는 것, 예컨대 아르기닌과 리신 간의 치환, 글루타민과 아스파라긴 간의 치환, 글리신과 세린 간의 치환; 1개의 염기성 잔기, 예컨대 리신, 아르기닌 또는 히스티딘을 또 다른 잔기로 치환하는 것; 또는 1개의 산성 잔기, 예컨대 아스파르트산 또는 글루탐산을 또 다른 잔기로 치환하는 것을 포함한다.

[0134] 2개의 단백질이 실질적으로 동일하다는 추가의 표시는 이들이 전반적인 3차원 구조를 공유하고 있거나 또는 생물학적 기능적 등가물이라는 것이다.

[0135] 본 발명의 일부 측면에서, PTK7에 결합하는 항체-약물 접합체는 서열식별번호: 1, 25, 또는 49 중 어느 하나로서 제시된 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 15, 39, 또는 63 중 어느 하나로서 제시된 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 서열식별번호: 1과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 15와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편; 또는 서열식별번호: 1로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 15로서 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 서열식별번호: 25와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 39와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편; 또는 서열식별번호: 25로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 39로서 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-

결합 단편을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 서열식별번호: 49와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편; 또는 서열식별번호: 49로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63으로서 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다.

[0136] 항체는 또한, 예를 들어 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인에서, 예를 들어 항체의 결합 특성을 변경시키기 위해 변형될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 CDR 영역 중 1개 이상에서 PTK7에 대한 항체의 K_D 가 증가 또는 감소하도록, K_{off} 가 증가 또는 감소하도록, 또는 항체의 결합 특이성이 변경되도록 이루어질 수 있다. 부위-지정 돌연변이유발의 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 문헌 [Sambrook et al. 및 Ausubel et al.]을 참조한다.

[0137] 변형 또는 돌연변이는 또한 PTK7 항체의 반감기를 증가시키기 위해 프레임워크 영역 또는 불변 영역에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, PCT 국제 공개 번호 WO 00/09560을 참조한다. 프레임워크 영역 또는 불변 영역에서의 돌연변이는 또한 항체의 면역원성을 변경시키거나, 또 다른 분자에의 공유 또는 비-공유 결합을 위한 부위를 제공하거나, 또는 보체 고정, FcR 결합 및 항체-의존성 세포-매개 세포독성과 같은 특성을 변경시키기 위해 이루어질 수 있다. 본 발명에 따르면, 단일 항체는 가변 도메인의 CDR 또는 프레임워크 영역 중 어느 하나 이상에서 또는 불변 영역에서 돌연변이를 가질 수 있다.

[0138] "배선화"로 공지된 과정에서, VH 및 VL 서열 내의 특정 아미노산이 배선 VH 및 VL 서열에서 자연적으로 발견되는 것과 매칭되도록 돌연변이될 수 있다. 특히, VH 및 VL 서열 내의 프레임워크 영역의 아미노산 서열은 항체 투여시 면역원성의 위험을 감소시키기 위해 배선 서열과 매칭되도록 돌연변이될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "배선"은 부모로부터 자손에게 생식 세포를 통해 전달되는 것에 따른 항체 유전자 및 유전자 절편의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열을 지칭한다. 이러한 배선 서열은 B 세포 성숙의 과정 동안 재조합 및 과다돌연변이 사건에 의해 변경된 성숙한 B 세포에서의 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 구별된다. 특정한 배선을 "이용"하는 항체는 그러한 배선 뉴클레오타이드 서열과 또는 이를 구체화하는 아미노산 서열과 가장 근접하게 정렬되는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 갖는다. 이러한 항체는 배선 서열과 비교하여 빈번하게 돌연변이된다. 인간 VH 및 VL 유전자에 대한 배선 DNA 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, "Vbase" 인간 배선 서열 데이터베이스 참조; 또한 문헌 [Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication number 91-3242; Tomlinson et al., J. Mol. Biol. 227:776-798, 1992; 및 Cox et al., Eur. J. Immunol. 24:827-836, 1994] 참조).

[0139] 이루어질 수 있는 또 다른 유형의 아미노산 치환은 항체 내의 잠재적인 단백질분해 부위를 제거하는 것이다. 이러한 부위는 가변 도메인의 CDR 또는 프레임워크 영역에서 또는 항체의 불변 영역에서 발생할 수 있다. 시스템인 잔기의 치환 및 단백질분해 부위의 제거는 항체 생성물 내 이질성의 위험을 감소시킬 수 있고, 따라서 그의 동질성을 증가시킬 수 있다. 또 다른 유형의 아미노산 치환은 잔기 중 하나 또는 둘 다를 변경시킴으로써 잠재적인 탈아미드화 부위를 형성하는 아스파라긴-글리신 쌍을 제거하는 것이다. 또 다른 예에서, 본 발명의 PTK7 항체의 중쇄의 C-말단 리신은 절단될 수 있다. 본 발명의 다양한 측면에서, PTK7 항체의 중쇄 및 경쇄는 임의로 신호 서열을 포함할 수 있다.

[0140] 본 발명의 PTK7 항체를 발현하기 위해, VH 및 VL 영역을 코딩하는 DNA 단편을 먼저 임의의 상기 언급된 방법을 사용하여 수득할 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, "폴리뉴클레오타이드", "핵산/뉴클레오타이드" 및 "올리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체성 형태, 테옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 그의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 쇠 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 공지 또는 비공지된 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 비-제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편, 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전이 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, DNA, cDNA, 게놈 DNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 자연 발생, 합성, 재조합 또는 그의 임의의 조합일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화 뉴클레오타이드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우에, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 쇠의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 중합 후에, 예컨대 표지화 성

분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 다른 유형의 변형은, 예를 들어 "캡", 자연 발생 뉴클레오타이드 중 하나 이상의 유사체로의 치환, 뉴클레오타이드간 변형, 예컨대 예를 들어 비전하된 연결 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등) 및 전하된 연결 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 갖는 것, 펜던트 모이어티, 예컨대 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 삽입제 (예를 들어, 아크리딘, 프소칼렌 등)를 갖는 것, 킬레이트화제 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화 금속 등)를 함유하는 것, 알킬화제를 함유하는 것, 변형된 연결 (예를 들어, 알파 아노머 핵산 등)을 갖는 것 뿐만 아니라 비변형된 형태의 폴리뉴클레오타이드(들)를 포함한다. 추가로, 당에 통상적으로 존재하는 임의의 히드록실 기가, 예를 들어 포스포네이트 기, 포스페이트 기에 의해 대체될 수 있거나, 표준 보호 기에 의해 보호될 수 있거나, 추가의 뉴클레오타이드에 대한 추가의 연결을 제조하기 위해 활성화될 수 있거나, 또는 고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화될 수 있거나, 또는 아민 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑 기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 또한 표준 보호 기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한, 관련 기술분야에 일반적으로 공지되어 있는 유사한 형태의 리보스 또는 데옥시리보스 당을 함유할 수 있고, 예를 들어, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, 알파- 또는 베타-아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 크실로스 또는 리소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스, 비-시클릭 유사체 및 무염기성 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 메틸 리보시드를 포함한다. 1개 이상의 포스포디에스테르 연결을 대안적 연결 기에 의해 대체할 수 있다. 이들 대안적 연결 기는 포스페이트가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S("디티오에이트"), (O)NR₂("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로, H, 또는 에테르 (-O-) 연결을 임의로 함유하는 치환 또는 비치환된 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알킬임)에 의해 대체된 특색을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리뉴클레오타이드 내의 모든 연결이 동일한 필요는 없다. 앞서의 설명은 RNA 및 DNA를 포함하는 본원에 언급된 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0141] 항-PTK7 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 대표적인 DNA는 서열식별번호: 2 (hu23 VH DNA), 서열식별번호: 16 (hu23 VL DNA), 서열식별번호: 26 (hu24 VH DNA), 서열식별번호: 40 (hu24 VL DNA), 서열식별번호: 50 (hu58 VH DNA) 및 서열식별번호: 64 (hu58 VL DNA)로서 제시된다. 항-PTK7 항체 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 대표적인 DNA는 서열식별번호: 14 (hu23 HC DNA), 서열식별번호: 24 (hu23 LC DNA), 서열식별번호: 38 (hu24 HC DNA), 서열식별번호: 48 (hu24 LC DNA), 서열식별번호: 62 (hu58 HC DNA), 및 서열식별번호: 72 (hu58 LC DNA)로서 제시된다.

[0142] 또한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 사용하여, 다양한 변형, 예를 들어 돌연변이, 치환, 결실, 및/또는 부가를 hu23, hu24, 및 hu58 DNA 서열 내로 도입할 수 있다. 예를 들어, 표준 방법, 예컨대 돌연변이된 뉴클레오타이드를 PCR 프라이머 내로 혼입하여, PCR 생성물이 목적하는 돌연변이 또는 부위-지정 돌연변이유발을 함유하도록 하는 PCR-매개 돌연변이유발을 사용하여 돌연변이유발을 수행할 수 있다.

[0143] 따라서, 본 출원의 개시내용에 기초하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 hu23, hu24, 및 hu58 DNA와 실질적으로 유사한 DNA의 서열을 용이하게 인식할 것이다. 핵산 또는 그의 단편을 지칭하는 경우의 용어 "실질적 유사성" 또는 "실질적 서열 유사성"은 또 다른 핵산 (또는 그의 상보적 가닥)을 갖는 적절한 뉴클레오타이드 삽입물 또는 결실물과 최적으로 정렬한 경우에, 서열 동일성의 임의의 널리 공지된 알고리즘, 예컨대 FASTA, BLAST 또는 Gap에 의해 측정된 바와 같이, 뉴클레오타이드 염기의 적어도 약 85%, 바람직하게는 적어도 약 90%, 및 보다 바람직하게는 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%에서 뉴클레오타이드 서열 동일성이 존재한다.

[0144] 핵산 서열과 관련하여 용어 "퍼센트 서열 동일성"은 최대 상응을 위해 정렬된 경우에 동일한 2개의 서열 내의 잔기를 의미한다. 서열 동일성 비교의 길이는 적어도 약 9개 뉴클레오타이드, 통상적으로 적어도 약 18개 뉴클레오타이드, 보다 통상적으로 적어도 약 24개 뉴클레오타이드, 전형적으로 적어도 약 28개 뉴클레오타이드, 보다 전형적으로 적어도 약 32개 뉴클레오타이드, 및 바람직하게 적어도 약 36, 48개 또는 그 초과 뉴클레오타이드의 스트레치 전반에 걸쳐질 수 있다. 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 수많은 상이한 알고리즘이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열은 위스콘신주 매디슨 소재의 위스콘신 패키지 버전 10.0, 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group) (GCG)의 프로그램인 FASTA, Gap 또는 Bestfit를 사용하여 비교할 수 있다. 예를 들어, 프로그램 FASTA2 및 FASTA3을 포함하는 FASTA는 질의 서열과 검색 서열 간의 가장 우수한 중첩 영역의 정렬 및 퍼센트 서열 동일성을 제공한다 (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998); 그 전문은 본원에 참조로 포함됨). 달리 명시되지 않

는 한, 특정한 프로그램 또는 알고리즘에 대한 디폴트 파라미터가 사용된다. 예를 들어, 핵산 서열들 간의 퍼센트 서열 동일성은 그의 디폴트 파라미터 (6의 워드 크기 및 스코어링 매트릭스를 위한 NOPAM 인자)를 갖는 FASTA를 사용하거나 또는 그의 전문이 본원에 참조로 포함되는 GCG 버전 6.1에 제공된 바와 같은 그의 디폴트 파라미터를 갖는 Gap를 사용하여 결정될 수 있다.

[0145] 2개의 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 추가의 표시는 이러한 핵산에 의해 코딩된 단백질이 실질적으로 동일하거나, 전반적인 3차원 구조를 공유하거나 또는 생물학상 기능적 등가물이라는 것이다. 이들 용어는 다음에 추가로 정의된다. 엄격한 조건 하에 서로 혼성화되지 않는 핵산 분자는, 상응하는 단백질이 실질적으로 동일한 경우에 여전히 실질적으로 동일하다. 이는, 예를 들어 2개의 뉴클레오타이드 서열이 유전자 코드에 의해 허용되는 바와 같은, 보존적으로 치환된 변이체를 포함하는 경우에 일어날 수 있다.

[0146] 보존적으로 치환된 변이체는 1개 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치를 혼합-염기 및/또는 테옥시아노신 잔기로 치환시킨 축중성 코돈 치환을 갖는 핵산 서열이다. 문헌 [Batzner et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; 및 Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell Probes* 8:91-98]을 참조한다.

[0147] 예를 들어, 이루어질 수 있는 한 가지 유형의 치환은 화학적으로 반응성일 수 있는 항체 내의 1개 이상의 시스테인을 또 다른 잔기, 예컨대 제한 없이 알려진 또는 세린으로 변화시키는 것이다. 예를 들어, 비-정규 시스테인의 치환이 있을 수 있다. 치환은 항체의 가변 도메인의 CDR 또는 프레임워크 영역에서 또는 불변 영역에서 이루어질 수 있다. 또 다른 예로서, 시스테인이 표준일 수 있다.

[0148] 본 발명의 VH 및 VL 절편을 코딩하는 DNA 단편이 수득되면, 이들 DNA 단편을 표준 제조법 DNA 기술에 의해 추가로 조작하여, 예를 들어 가변 영역 유전자를 전장 항체쇄 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시킬 수 있다. 이들 조작에서, VL- 또는 VH-코딩 DNA 단편은 또 다른 단백질, 예컨대 항체 불변 영역 또는 가요성 링커를 코딩하는 또 다른 DNA 단편에 작동가능하게 연결된다. 이러한 문맥에서 사용된 바와 같은 용어 "작동가능하게 연결된"은 2개의 DNA 단편에 의해 코딩된 아미노산 서열이 인-프레임으로 유지되도록 2개의 DNA 단편이 연결되는 것을 의미하는 것으로 의도된다.

[0149] VH 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 VH-코딩 DNA를 중쇄 불변 영역 (CH1, CH2 및 CH3)을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시킴으로써 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고 (예를 들어, 문헌 [Kabat, E. A., et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 공개 번호 91-3242] 참조), 이들 영역을 포괄하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 수득될 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG2 불변 영역이다. IgG 불변 영역 서열은 상이한 개체 간에 발생하는 것으로 공지된 임의의 다양한 대립유전자 또는 동종이형, 예컨대 Gm(1), Gm(2), Gm(3), 및 Gm(17)일 수 있다. 이들 동종이형은 IgG1 불변 영역에서의 자연 발생 아미노산 치환물을 나타낸다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우에, VH-코딩 DNA는 중쇄 CH1 불변 영역만을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결될 수 있다. CH1 중쇄 불변 영역은 임의의 중쇄 유전자로부터 유래될 수 있다.

[0150] VL 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 VL-코딩 DNA를 경쇄 불변 영역 CL을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결함으로써 전장 경쇄 유전자 (뿐만 아니라 Fab 경쇄 유전자)로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고 (예를 들어, 문헌 [Kabat, E. A., et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 공개 번호 91-3242] 참조), 이들 영역을 포괄하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 수득될 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다. 카파 불변 영역은 상이한 개체 간에 발생하는 것으로 공지된 임의의 다양한 대립 유전자, 예컨대 Inv(1), Inv(2), 및 Inv(3)일 수 있다. 람다 불변 영역은 임의의 3종의 람다 유전자로부터 유래될 수 있다.

[0151] scFv 유전자를 생성하기 위해, VH- 및 VL-코딩 DNA 단편을 가요성 링커를 코딩하는 또 다른 단편에 작동가능하게 연결시켜, VH 및 VL 서열이 가요성 링커에 의해 연결된 VL 및 VH 영역을 갖는 인접 단일-쇄 단백질로서 발현될 수 있게 한다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, *Nature* 348:552-554] 참조). 단일쇄 항체는 단일 VH 및 VL 만이 사용되는 경우에는 1가, 2개의 VH 및 VL이 사용되는 경우에는 2가, 또는 2개 초과 VH 및 VL이 사용되는 경우에는 다가일 수 있다. PTK7 및 또 다른 분자에 특이적으로 결합하는 이종특이적 또는 다가

항체가 생성될 수 있다.

- [0152] 본 발명의 또 다른 측면에서, 또 다른 폴리펩티드에 연결된 본 발명의 PTK7 항체의 전부 또는 일부를 포함하는 융합 항체 또는 이뮤노어드레신을 제조할 수 있다. 또 다른 측면에서, PTK7 항체의 가변 도메인만이 상기 폴리펩티드에 연결된다. 또 다른 측면에서, PTK7 항체의 VH 도메인은 제1 폴리펩티드에 연결되는 한편 PTK7 항체의 VL 도메인은 제2 폴리펩티드에 연결되고, 이는 VH 및 VL 도메인이 서로 상호작용하여 항원 결합 부위를 형성할 수 있도록 하는 방식으로 제1 폴리펩티드와 회합된다. 또 다른 측면에서, VH 도메인은 링커에 의해 VL 도메인으로부터 분리되어, VH 및 VL 도메인이 서로 상호작용할 수 있도록 한다. 이어서, VH-링커-VL 항체가 관심 폴리펩티드에 연결된다. 또한, 2개 (또는 그 초과)의 단일-쇄 항체가 서로 연결된 융합 항체가 생성될 수 있다. 이는 단일 폴리펩티드 쇠에 2가 또는 다가 항체를 생성하고자 하는 경우, 또는 이중특이적 항체를 생성하고자 하는 경우에 유용하다.
- [0153] 다른 변형된 항체를 PTK7 항체를 코딩하는 핵산 분자를 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, "카파 바다" (Ill et al., Protein Eng. 10:949-57, 1997), "미니바디" (Martin et al., EMBO J. 13:5303-9, 1994), "디아바디" (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993), 또는 "야누신(Janusin)" (Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659, 1991 및 Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52, 1992)은 본 명세서의 교시에 따라 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0154] 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단편은 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함한 다양한 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, 1990, Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992]을 참조한다. 또한, 이중특이적 항체는 "디아바디" 또는 "야누신"으로서 형성될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 이중특이적 항체는 PTK7의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. 다른 측면에서, 상기 언급된 변형된 항체는 본원에 제공된 PTK7 항체로부터의 가변 도메인 또는 CDR 영역 중 1개 이상을 사용하여 제조한다.
- [0155] 항체-약물 접합체의 제조에 사용하기 위해, 본원에 기재된 PTK7 항체는 실질적으로 순수할 수 있고, 즉 적어도 50% 순수 (즉, 오염물이 없음), 보다 바람직하게는 적어도 90% 순수, 보다 바람직하게는 적어도 95% 순수, 보다 더 바람직하게는 적어도 98% 순수, 가장 바람직하게는 적어도 99% 순수할 수 있다.
- [0156] 표 1은 본 발명의 인간화 항-PTK7 항체의 아미노산 (단백질) 서열 및 연관 핵산 (DNA) 서열을 제공한다. 카바트 및 코티아에 의해 정의된 바와 같은 hu23 VH, hu23 VL, hu24 VH, hu24 VL, hu58 VH, 및 hu58 VL의 CDR이 개별 서열로서 제시된다.

[0157] <표 1> 인간화 항-PTK7 항체의 서열.

서열 식별번호	설명	서열
1	hu23 VH 단백질	QITLKESGPTLVKPTQLTLTCTFSGFSLSTSNMGVGWIRQPPGKALEWLA HIWWDDDKYYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCVRN YGYAWFAYWGQGLVTVSS
2	hu23 VH DNA	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAG ACCCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTA ACATGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGAAAGGCCCTGGAG TGGCTTGACACATTGGTGGGATGATGATAAGTACTACAGCCCATCTC TGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGG TCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTG TGTTCAAGTAAGTATGGTTACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACGTCTCTTCA
3	hu23 VH CDR1 단백질 -카바트	TSNMGVG
4	hu23 VH CDR1 단백질 -코티아	GFSLSSTSNM
5	hu23 VH CDR1 DNA -카바트	ACTAGTAACATGGGTGTGGGC
6	hu23 VH CDR1 DNA -코티아	GGGTTCTCACTCAGCACTAGTAACATG
7	hu23 VH CDR2 단백질 -카바트	HIWWDDDKYYSPSLKS
8	hu23 VH CDR2 단백질 -코티아	WWDDD
9	hu23 VH CDR2 DNA -카바트	CACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTACAGCCCATCTCTGAAGAGC
10	hu23 VH CDR2 DNA -코티아	TGGTGGGATGATGAT
11	hu23 VH CDR3 단백질 -카바트 및 코티아	SNYGYAWFAY
12	hu23 VH CDR3 DNA -카바트 및 코티아	AGTAACTATGGTTACGCCTGGTTTGCTTAC
13	hu23 HC 단백질-HuIgG1	QITLKESGPTLVKPTQLTLTCTFSGFSLSTSNMGVGWIRQPPGKALEWLA HIWWDDDKYYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCVRN YGYAWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0158]

14	hu23 HC DNA- Hulg1	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCTACGCTGGTGAAACCCACACAG ACCCCTACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTA ACATGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCAGGAAAGGCCCTGGAG TGGCTTGACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTACAGCCCATCTC TGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGG TCCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTG TGTTCCGAAGTAACTATGGTTACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTTACGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCTGGCACCCCTCGAGCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGTGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGTCTG GGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCGGGTGTCTC CTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGAGAC AAAAGTCAACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA CCGTCAAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAA GACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACACGAGCTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCCCTCTCCCTGTCTCC GGGT
15	hu23 VL 단백질	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDIYPYLNWFQQKPGKAPKTLIYRT NRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYYCLQYDEFPLTFGAGTK LEIK
16	hu23 VL DNA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG ATAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTTATCCCTATTT AAACTGGTTCCAACAAAAACAGGGAAAGCTCCTAAGACCCTGATCTAT CGTACAAATAGATTGCTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGT GGATCTGGAACAGATTTTACTTTCAACATCAGCAGCCTGCAACCTGAAG ATATTGCAACTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGCTCACGTTT GGTGCTGGGACCAAGCTGGAATCAAA
17	hu23 VL CDR1 단백질 -카바트 및 코터아	KASQDIYPYLN
18	hu23 VL CDR1 DNA -카바트 및 코터아	AAGGCGAGTCAGGACATTTATCCCTATTTAAAC
19	hu23 VL CDR2 단백질 -카바트 및 코터아	RTNRLLD
20	hu23 VL CDR2 DNA -카바트 및 코터아	CGTACAAATAGATTGCTAGAT
21	hu23 VL CDR3 단백질 -카바트 및 코터아	LQYDEFPLT

[0159]

22	hu23 VL CDR3 DNA -카바트 및 코티아	CTACAGTATGATGAGTTTCCGCTCACG
23	hu23 LC 단백질 -카파	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDIYPYLNWFQQKPGKAPKTLIYRT NRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYYCLQYDEFPLTFGAGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
24	hu23 LC DNA- 카파	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG ATAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTTATCCCTATTT AAACTGGTTCCAAACAAAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGACCCGTATCTAT CGTACAAATAGATTGCTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGT GGATCTGGAACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAACCTGAAG ATATTGCAACTTATTA TTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGCTCACGTTC GGTGCTGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCACCAAGT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG GGGAGAGTGT
25	hu24 VH 단백질	QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYFTFDYAVHWV/RQAPGKRLEWIG VISTYNDYTYNNQDFKGRVTMTRDTSASTAYMELSRLRSEDYAVYYCARG NSYFYALDYWGQGTSTVTVSS
26	hu24 VH DNA	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC CTCAGTGAAGGTTTCTTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGACTAT GCTGTGCATTGGGTGCGCCAGGCCCGGAAAAAGGCTTGAGTGGATT GGAGTGATCAGCACTTACAATGATTACACATACAATAACCAGGACTTCA AGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGACTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGTAACCTCTACTTCTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAA CCTCAGTCACCGTCTCCTCA
27	hu24 VH CDR1 단백질 -카바트	DYAVH
28	hu24 VH CDR1 단백질 -코티아	GYFTDY
29	hu24 VH CDR1 DNA-카바트	GACTATGCTGTGCAT
30	hu24 VH CDR1 DNA -코티아	GGATACACCTTCACTGACTAT
31	hu24 VH CDR2 단백질 -카바트	VISTYNDYTYNNQDFKG
32	hu24 VH CDR2 단백질 -코티아	STYNDY
33	hu24 VH CDR2 DNA-카바트	GTGATCAGCACTTACAATGATTACACATACAATAACCAGGACTTCAAGG GC
34	hu24 VH CDR2 DNA -코티아	AGCACTTACAATGATTAC
35	hu24 VH CDR3 단백질 -카바트 및 코티아	GNSYFYALDY

[0160]

36	hu24 VH CDR3 DNA -카바트 및 코티아	GGTAACTCCTACTTCTATGCTTTGGACTAC
37	hu24 HC 단백질-HuIgG1	QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSKASGYFTFDYAVHWVRQAPGKRLEWIG VISTYNDYTYNNQDFKGRVTMTTRDTSASTAYMELSRRLSEDTAVYYCARG NSYFYALDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	hu24 HC DNA- HuIgG1	CAGGTCCAGCTTGTCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC CTCAGTGAAGGTTTCC TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGACTAT GCTGTGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGAAAAAGGCTTGAGTGGATT GGAGTGATCAGCACTTACAATGATTACACATACAATAACCAGGACTTCA AGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGACTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGTAACCTCTACTTCTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAA CCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCTGGCACCCCTCGAGCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGTGTCTC TACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGTTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGGTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGA
39	hu24 VL 단백질	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFMHYQKPGQAPRL LIYRASNLSEGIPARFSGSGSDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSNEDPWTF GGGTKLEIK
40	hu24 VL DNA	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTGACAGCTATG GCAAAAGTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATAGGGCATCCAACCTGGAATCTGGCATCCCAAGCCA GGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGTCAGCAGAGTAATGA GGATCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAATCAAA
41	hu24 VL CDR1 단백질 -카바트 및 코티아	RASESVDSYGKSFMH

[0161]

42	hu24 VL CDR1 DNA -카바트 및 코티아	AGGGCCAGTGAGAGTGTGACAGCTATGGCAAAAGTTTTATGCAC
43	hu24 VL CDR2 단백질 -카바트 및 코티아	RASNLES
44	hu24 VL CDR2 DNA -카바트 및 코티아	AGGGCATCCAACCTGGAATCT
45	hu24 VL CDR3 단백질 -카바트 및 코티아	QQSNEDPWT
46	hu24 VL CDR3 DNA -카바트 및 코티아	CAGCAGAGTAATGAGGATCCGTGGACG
47	hu24 LC 단백질-카파	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASEVSDSYGKSFMHWYQQKPGQAPRL LIYRASNLGIPARFSGSGSGDTFTLTISLEPEDFAVYYCQQSNEDPWTF GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
48	hu24 LC DNA- 카파	GAAATGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTGAGAGTGTGACAGCTATG GCAAAAGTTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATAGGGCATCCAACCTGGAATCTGGCATCCCAGCCA GGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGAGTAATGA GGATCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCCAACGCTGGAATCAAACGGA CTGTGGCTGCACCAAGTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC ACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
49	hu58 VH 단백질	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRYWMSWVRQAPGKGLEWI GDLNPDSSAINYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLIT TLVPYTMDFWQGQTSVTVSS
50	hu58 VH DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCACTTTAGTAGATAT TGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAT CGGCGACCTAAACCCAGATTCAAGTGCATAAACTATGTGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT CTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT ACACTCATTACTACGTTAGTACCCTATACTATGGACTTCTGGGGTCAAG GAACCTCAGTACCGTCTCCTCA
51	hu58 VH CDR1 단백질 -카바트	RYWMS
52	hu58 VH CDR1 단백질 -코티아	GFDFSRVY
53	hu58 VH CDR1 DNA -카바트	AGATATTGGATGAGC
54	hu58 VH CDR1 DNA -코티아	GGATTCGACTTTAGTAGATAT

[0162]

55	hu58 VH CDR2 단백질 -카바트	DLNPDSSAINYVDSVKG
56	hu58 VH CDR2 단백질 -코티아	NPDSSA
57	hu58 VH CDR2 DNA- 카바트	GACCTAAACCCAGATTCAAGTGCATAAACTATGTGGACTCTGTGAAGG GC
58	hu58 VH CDR2 DNA -코티아	AACCCAGATTCAAGTGCG
59	hu58 VH CDR3 단백질 -카바트 및 코티아	ITTLVPYTMDF
60	hu58 VH CDR3 DNA -카바트 및 코티아	ATTACTACGTTAGTACCCTATACTATGGACTTC
61	hu58 HC 단백질 -HulG1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDPSRYWMSWVRQAPGKGLEWI GDLNPDSSAINYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLIT TLVPYTMDFWGGGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
62	hu58 HC DNA- HulG1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCACTTTAGTAGATAT TGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAT CGGGCAGCTAAACCCAGATTCAAGTGCATAAACTATGTGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT ACACTCATTACTACGTTAGTACCCTATACTATGGACTTCTGGGGTCAAG GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCACCCTCGAGCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGTG GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCCGGCTG TCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTG ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCGAGCACCTGAACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAGGACACCCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGAATCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGT

[0163]

63	hu58 VL 단백질	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCITNTDIDDDMNWYQKPGEAAILISEGN GLRPGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCLQSDNLPLTFSGTKL EIK
64	hu58 VL DNA	GAAACGACACTCAGCAGTCTCCAGCATTTCATGTCAGCGACTCCAGGA GACAAAGTCAACATCTCCTGCATAACCAACACAGACATTGATGATGATA TGAACCTGGTACCAACAGAAACCAGGAGAGCTGCTATTCTCCTTATTTTC AGAAGGTAATGGTCTCCGTCTGGAATCCCACCTCGATTTCAGTGGCAG CGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAG GATGCTGCATATTACTTCTGCTACAAAGTGATAAATTGCCTCTCACGTT CGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA
65	hu58 VL CDR1 단백질-카바트 및 코티아	ITNTDIDDDMN
66	hu58 VL CDR1 DNA-카바트 및 코티아	ATAACCAACACAGACATTGATGATGATGAAC
67	hu58 VL CDR2 단백질-카바트 및 코티아	EGNGLRP
68	hu58 VL CDR2 DNA-카바트 및 코티아	GAAGGTAATGGTCTCCGTCT
69	hu58 VL CDR3 단백질-카바트 및 코티아	LQSDNLPLT
70	hu58 VL CDR3 DNA-카바트 및 코티아	CTACAAAGTGATAAATTGCCTCTCACG
71	hu58 LC 단백질-카파	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCITNTDIDDDMNWYQKPGEAAILISEGN GLRPGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCLQSDNLPLTFSGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
72	hu58 LC DNA- 카파	GAAACGACACTCAGCAGTCTCCAGCATTTCATGTCAGCGACTCCAGGA GACAAAGTCAACATCTCCTGCATAACCAACACAGACATTGATGATGATA TGAACCTGGTACCAACAGAAACCAGGAGAGCTGCTATTCTCCTTATTTTC AGAAGGTAATGGTCTCCGTCTGGAATCCCACCTCGATTTCAGTGGCAG CGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAG GATGCTGCATATTACTTCTGCTACAAAGTGATAAATTGCCTCTCACGTT CGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAACGACTGTGGCTGCACCAAG TGCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTG

[0164]

[0165]

II.B. 링커

[0166]

본 발명의 항-PTK7 항체-약물 접합체는 약물을 항-PTK7 항체에 연결 또는 접합시키기 위해 링커를 사용하여 제조될 수 있다. 링커는 항체 약물 접합체 (ADC)를 형성하기 위해 약물 및 항체를 연결시키는데 사용될 수 있는 이관능성 화합물이다. 이러한 접합체는, 예를 들어 종양 연관 항원에 대해 지시되는 면역접합체의 형성에 유용하다. 이러한 접합체는 세포독성 약물의 종양 세포로의 선택적 전달을 가능하게 한다. 적합한 링커는 예를 들어 절단가능한 및 비-절단가능한 링커를 포함한다. 절단가능한 링커는 전형적으로 세포내 조건 하에서의 절단에 감수성이다. 접합된 약물이 항체로부터 절단되는 주요 메카니즘은 리소솜의 산성 pH에서의 가수분해 (히드라존, 아세트알 및 시스-아코니테이트-유사 아미드), 리소솜 효소에 의한 펩티드 절단 (카텝신 및 다른 리소솜 효소), 및 디설피드의 환원을 포함한다. 이들 다양한 절단 메카니즘의 결과로서, 약물을 항체에 연결시키는 메카니즘 또한 광범위하게 다양하고, 임의의 적합한 링커가 사용될 수 있다.

[0167]

적합한 절단가능한 링커는, 예를 들어 세포내 프로테아제, 예컨대 리소솜 프로테아제 또는 엔도솜 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티드 링커를 포함한다. 본 발명의 측면에서, 링커는 디펩티드 링커, 예컨대 발린-시트룰린 (val-cit), 페닐알라닌-리신 (phe-lys) 링커, 또는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc) 링커일 수 있다. 또 다른 측면에서, 링커는 술포숙신이미딜-4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트 (smcc)이다. 술포-smcc 접합은, 술포히드릴 (티올, -SH)과 반응하지만 그의 술포-NHS 에스테르는 (리신 및 단백질 또는 펩티드 N-말단에서 발견되는 바와 같은) 1급 아민에 대해 반응성인 말레이미드기를 통해 이루어진다. 추가로, 링커는 말레이미도카프로일 (mc)일 수 있다.

[0168]

다른 적합한 링커는 특정 pH 또는 pH 범위에서 가수분해 가능한 링커, 예컨대 히드라존 링커를 포함한다. 추가의 적합한 절단가능한 링커는 디설피드 링커를 포함한다. 링커, 예를 들어 mc 링커 등은 약물이 방출되도록 하기 위해 항체가 세포내에서 분해되어야 하는 정도로 항체에 공유 결합될 수 있다.

[0169]

본 발명의 특정한 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체의 링커는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-

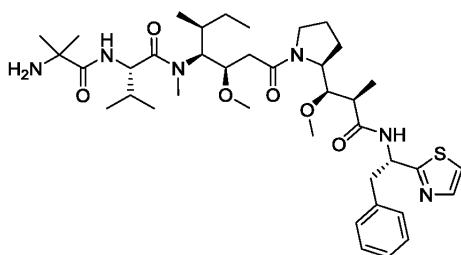
p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc), 말레이미도카프로일 (mc) 또는 AcBut 일 수 있다.

- [0170] 적합한 접합 절차의 한 예는 히드라지드 및 다른 친핵체가, 항체 상의 자연 발생 탄수화물의 산화에 의해 생성된 알데히드에 접합되는 것에 의존한다. 목적하는 약물-방출 특성을 제공하는 카르보닐기가 도입된 히드라존-함유 접합체를 제조할 수 있다. 또한, 한 말단에 디설피드, 중간에 알킬쇄, 및 다른 말단에 히드라진 유도체를 갖는 링커를 사용하여 접합체를 제조할 수 있다. 안트라시클린은 이러한 기술을 사용하여 항체에 접합될 수 있는 세포독소의 한 예이다.
- [0171] 히드라존 이외의 관능기를 함유하는 링커는 리소솜의 산성 환경에서 절단될 수 있는 잠재력을 지니고 있다. 예를 들어, 세포내 절단가능한 히드라존 이외의 부위를 함유하는 티올-반응성 링커, 에센대 에스테르, 아마이드 및 아세탈/케탈로부터 접합체를 제조할 수 있다. 캄프토테신은 이들 링커를 사용하여 접합될 수 있는 하나의 세포독성제이다. 5 내지 7원 고리 케톤으로부터 제조되고, 세포독성제에 부착된 산소 중 1개를 갖고, 항체 부착을 위해 링커에 부착된 다른 것을 갖는 케탈을 또한 사용할 수 있다. 안트라시클린은 또한, 이들 링커와 함께 사용하는데 적합한 세포독소의 예이다.
- [0172] pH 감수성 링커 부류의 또 다른 예는 아마이드 결합에 병치되는 카르복실산을 갖는 시스-아코니테이트이다. 카르복실산은 산성 리소솜 내에서의 아마이드 가수분해를 가속화시킨다. 여러 다른 유형의 구조를 갖는, 유사한 유형의 가수분해 속도 가속화를 달성하는 링커를 또한 사용할 수 있다. 메이탄시노이드는 C-9에 부착된 링커와 접합될 수 있는 세포독소의 예이다.
- [0173] 약물 접합체에 대한 또 다른 잠재적 방출 방법은 리소솜 효소에 의한 펩티드의 효소적 가수분해이다. 한 예에서, 펩티드를 아마이드 결합을 통해 파라-아미노벤질 알콜에 부착시킨 다음, 이러한 벤질 알콜과 세포독성제 간에 카르바메이트 또는 카르보네이트를 만든다. 펩티드의 절단은 아미노벤질 카르바메이트 또는 카르보네이트의 붕괴 또는 자기-희생으로 이어진다. 이러한 전략과 함께 예시된 세포독성제는 안트라시클린, 탁산, 미토마이신 C, 및 아우리스타틴을 포함한다. 한 예에서, 페놀이 또한 카르바메이트 대신 링커의 붕괴에 의해 방출될 수 있다. 또 다른 변형법에서, 디설피드 환원을 사용하여 파라-메르캅토벤질 카르바메이트 또는 카르보네이트의 붕괴를 개시한다.
- [0174] 항체에 접합된 많은 세포독성제는 수중 용해도가 있더라도 매우 낮고, 접합체의 응집으로 인해 접합체에 대한 약물 로딩이 제한될 수 있다. 이를 극복하기 위한 하나의 접근법은 가용화기를 링커에 추가하는 것이다. PEG 및 디펩티드로 이루어진 링커로 제조된 접합체를 사용할 수 있고, 이는 항체에 부착된 PEG 이-산, 티올-산, 또는 말레이미드-산; 디펩티드 스페이서; 및 안트라시클린 또는 두오카르마이신 유사체의 아민에 대한 아마이드 결합을 갖는 것을 포함한다. 또 다른 예는 세포독성제에 결합된 PEG-함유 링커 디설피드 및 항체에 결합된 아마이드로 제조된 접합체이다. PEG기를 혼입시키는 접근법이 응집 및 약물 로딩에 있어서의 제한을 극복하는데 유익할 수 있다.
- [0175] 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,773,001은 칼리케아미신으로부터 제조된 친핵성 약물, 특히 히드라지드 및 관련 친핵체와 함께 사용될 수 있는 링커를 개시한다. 이들 링커는 약물과 링커 간에 형성된 연결이 가수분해 가능할 때 보다 우수한 활성이 수득되는 경우에 특히 유용하다. 이들 링커는 2개의 관능기를 함유하고, 이는 (1) 항체와 반응하기 위한 기 (예를 들어, 카르복실산), 및 (2) 약물과 반응하기 위한 카르보닐기 (예를 들어, 알데히드 또는 케톤)를 포함한다. 카르보닐기는 약물 상의 히드라지드기와 반응하여 히드라존 연결을 형성할 수 있다. 이러한 연결은 절단가능하고 가수분해가능하여, 표적 세포에의 결합 후 접합체로부터 치료제가 방출되게 할 수 있다. 본 발명의 특정한 측면에서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체의 링커는 4-(4-아세틸페녹시) 부탄산 (AcBut)이다. 본 발명의 다른 측면에서, 항체-약물 접합체는 링커 분자로서 (3-아세틸페닐) 아세트산 (AcPac) 또는 4-메르캅토-4-메틸-펜탄산 (아미드)을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0176] N-히드록시숙신이미드 (OSu) 에스테르 또는 다른 동등하게 활성화된 에스테르를 사용하여, 활성화된 가수분해가능한 링커-약물 모이어티를 생성할 수 있다. 다른 적합한 활성화 에스테르의 예는 NHS (N-히드록시숙신이미드), 술폰-NHS (술폰화 NHS), PFP (펜타플루오로페닐), TFP (테트라플루오로페닐), 및 DNP (디니트로페닐)를 포함한다.
- [0177] 본 발명의 일부 측면에서, 항체-약물 접합체는 칼리케아미신 또는 그의 유도체, AcBut 링커 및 본 발명의 항-PTK7 항체를 반응시킴으로써 제조된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,773,001을 참조한다. AcBut 링커는 순환 중 실질적으로 안정한 접합체를 생성하여, 시험관내 인간 혈장에서 37°C에서의 검정 시 매일 추정 2%의 칼리케아미신을 방출한다. 접합체는 산성 리소솜 내에서 칼리케아미신을 방출시킨다.

- [0178] 본 발명의 일부 측면에서, AcButCM 모이어티는 관련 기술분야, 예컨대 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 PCT 국제 공개 번호 WO 08/147765 및 미국 특허 번호 8,273,862에 기재된 방법 및 공정을 사용하여 생성될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, AcButCM 모이어티는 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 가출원 번호 61/899,682에 기재된 바와 같은, 개선된 합성 공정을 사용하여 생성될 수 있다.
- [0179] 방사성동위원소의 접합에 유용한 대표적인 링커는 디에틸렌트리아민 펜타아세테이트 (DTPA)-이소티오시아네이트, 숙신이미딜 6-히드라지늄 니코티네이트 히드로클로라이드 (SHNH), 및 헥사메틸프로필렌 아민 옥심 (HMPAO)을 포함한다 (Bakker et al. (1990) J. Nucl. Med. 31: 1501-1509, Chattopadhyay et al. (2001) Nucl. Med. Biol. 28: 741-744, Dewanjee et al. (1994) J. Nucl. Med. 35: 1054-63, Krenning et al. (1989) Lancet 1: 242-244, Sagiuchi et al. (2001) Ann. Nucl. Med. 15: 267-270); 미국 특허 번호 6,024,938). 대안적으로, 표적화 분자를 유도체화하여, 방사성동위원소가 그에 직접적으로 결합될 수 있도록 할 수 있다 (Yoo et al. (1997) J. Nucl. Med. 38: 294-300). 아이오딘화 방법이 또한 관련 기술분야에 공지되어 있고, 대표적인 프로토콜은, 예를 들어 문헌 [Krenning et al. (1989) Lancet 1:242-4 및 Bakker et al. (1990) J. Nucl. Med. 31:1501-9]에서 찾아볼 수 있다.
- [0180] II.C. 약물
- [0181] 개시된 PTK7 항체-약물 접합체의 제조에 유용한 약물은 생물학적 또는 검출가능한 활성을 갖는 임의의 물질, 예를 들어 치료제, 검출가능한 표지, 결합제 등, 및 생체 내에서 활성제로 대사되는 전구 약물을 포함한다. 약물은 또한 약물 유도체일 수 있으며, 여기서 약물은 본 발명의 항체와 접합될 수 있도록 관능화되었다. 개시된 방법에 따라, 약물을 사용하여 식 Ab-(L-D)의 항체-약물 접합체를 제조하며, 여기서 (a) Ab는 PTK7에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, (b) L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이다. 약물-대-항체 비 (DAR) 또는 약물 로딩은 항체당 접합된 약물 (D) 분자의 수를 나타낸다. 본 발명의 항체-약물 접합체는 1 내지 8 범위 내인 DAR을 갖는다. 따라서, 본 발명의 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 1개 약물 분자 (DAR 1), 또는 2개 약물 분자 (DAR 2), 또는 3개 약물 분자 (DAR 3), 또는 4개 약물 분자 (DAR 4), 또는 5개 약물 분자 (DAR 5), 또는 6개 약물 분자 (DAR 6), 또는 7개 약물 분자 (DAR 7), 또는 8개 약물 분자 (DAR 8)를 포함할 수 있다. DAR은 다양한 통상적인 수단, 예컨대 UV 분광분석법, 질량 분광분석법, ELISA 검정, 방사측정 방법, 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 전기영동 및 HPLC에 의해 결정될 수 있다.
- [0182] 식 Ab-(L-D)의 항체-약물 접합체 (ADC)의 조성, 배치 및/또는 제제는 각각의 항체가 특정한 수의 약물 분자에 접합된 (DAR 1 내지 8) 복수개의 항체를 포함할 수 있다. 조성, 배치 및/또는 제제는 평균 DAR을 갖는다.
- [0183] 본 발명의 특정한 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성, 배치 및/또는 제제는 약 1 내지 약 8의 범위의 평균 DAR, 예를 들어 약 2 내지 약 7의 범위의 평균 DAR, 또는 약 3 내지 약 6의 범위의 평균 DAR, 또는 약 4 내지 약 5의 범위의 평균 DAR, 또는 약 5 내지 약 7의 범위의 평균 DAR, 또는 약 6 내지 약 8의 범위의 평균 DAR을 특징으로 할 수 있다. 일부 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성, 배치 및/또는 제제는 약 1의 평균 DAR, 또는 약 2의 평균 DAR, 또는 약 3의 평균 DAR, 또는 약 4의 평균 DAR, 또는 약 5의 평균 DAR, 또는 약 6의 평균 DAR, 또는 약 7의 평균 DAR, 또는 약 8의 평균 DAR을 가질 수 있다. 평균 DAR의 상기 범위에 사용된 용어 "약"은 $\pm 0.5\%$ 를 의미한다.
- [0184] 또한, 항체-약물 접합체의 조성, 배치 및/또는 제제는 평균 DAR의 바람직한 범위, 예를 들어 약 3 내지 약 5의 범위의 평균 DAR, 약 3 내지 약 4의 범위의 평균 DAR, 또는 약 4 내지 약 5의 범위의 평균 DAR을 특징으로 할 수 있다. 추가로, 항체-약물 접합체의 조성, 배치 및/또는 제제는 평균 DAR의 바람직한 범위, 예를 들어 3 내지 5의 범위의 평균 DAR, 3 내지 4의 범위의 평균 DAR, 또는 4 내지 5의 범위의 평균 DAR을 특징으로 할 수 있다.
- [0185] 식 Ab-(L-D)의 ADC의 조성, 배치 및/또는 제제는 DAR 분포를 특징으로 할 수 있다. DAR 분포는 ADC의 조성, 배치 및/또는 제제에 존재할 수 있는 다양한 ADC 종의 퍼센트 또는 분획, 예를 들어 DAR 1 내지 8을 제공한다. ADC의 조성, 배치 및/또는 제제의 DAR 분포는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 모세관 등전 포커싱 (cIEF)에 의해 결정될 수 있다.
- [0186] 본 발명의 한 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 ADC의 조성, 배치 및/또는 제제의 DAR 분포는, 일반적으로 DAR 1 내지 8을 갖는 광범위한 ADC 종을 함유하는, 넓은 DAR 분포를 갖는 ADC의 고도로 불균질한 혼합물을 특징으로 할 수 있다.
- [0187] 본 발명의 또 다른 측면에서, ADC의 조성, 배치 및/또는 제제의 DAR 분포는, 일반적으로 특정한 DAR, 예컨대

DAR 3 내지 5를 갖는 협소한 범위의 ADC 중을 함유하는, 협소한 DAR 분포를 갖는 고도로 균질한 혼합물을 특징으로 할 수 있다.

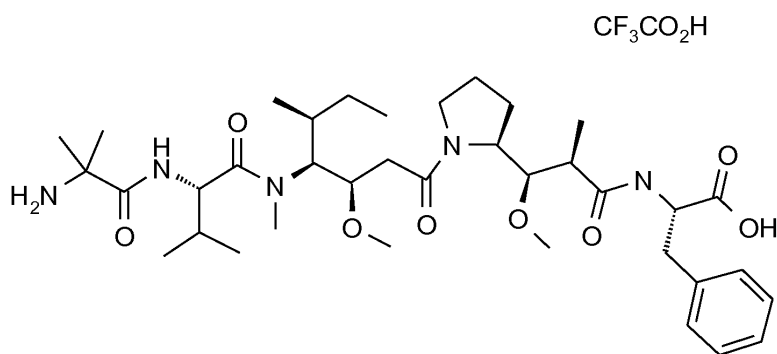
- [0188] 예를 들어, 치료제는 암 세포 또는 활성화된 면역 세포에 대한 세포독성, 세포증식억제성 및/또는 면역조정 효과를 발휘하는 작용제이다. 치료제의 예는 세포독성제, 화학요법제, 세포증식억제제, 및 면역조정제를 포함한다. 화학요법제는 암을 치료하는데 유용한 화학적 화합물이다.
- [0189] 치료제는 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 이러한 장애를 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있는 조성물이다. 본 발명에 유용한 치료제는 항암제, 즉 PTK7-발현 세포, 예컨대 유방암, 예컨대 삼중-음성 유방암 (TNBC), 프로게스테론-수용체 양성 유방암 (PR+), 에스트로겐-수용체 양성 유방암 (ER+) 및 이중 양성 유방암; 난소암; 결장직장암; 백혈병, 예컨대 급성 골수성 백혈병 (AML) 및 급성 림프모구성 백혈병 (ALL); 식도암; 위암; 흑색종; 육종; 신장암; 췌장암; 전립선암; 간암, 예컨대 간세포성 암종 (HCC); 및 폐암, 예컨대 비소세포 폐암 (NSCLC) 및 소세포 폐암 (SCLC)으로부터의 암 세포에서 항암 활성을 갖는 작용제를 포함한다.
- [0190] 대표적인 치료제는 세포독소, 세포독성제, 및 세포증식억제제를 포함한다. 세포독성 효과는 표적 세포(들)의 고갈, 제거 및/또는 사멸을 지칭한다. 세포독성제는 세포에 대해 세포독성 및/또는 세포증식억제성 효과를 갖는 작용제를 지칭한다. 세포증식억제성 효과는 세포 증식의 억제를 지칭한다. 세포증식억제제는 세포에 대해 세포증식억제성 효과를 가짐으로써, 세포의 특이적 하위세트의 성장 및/또는 확장을 억제하는 작용제를 지칭한다.
- [0191] 추가의 대표적인 치료제는 방사성동위원소, 화학요법제, 면역조정제, 항혈관신생제, 항증식제, 아포토시스 촉진제, 및 세포용해 효소 (예를 들어, RNase)를 포함한다. 작용제는 또한, 치료용 핵산, 예컨대 면역조정제, 항혈관신생제, 항증식제, 또는 아포토시스 촉진제를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 이들 약물 기술어는 상호 독점적이지 않으므로, 치료제는 상기 언급된 용어들 중 하나 이상을 사용하여 기재될 수 있다. 예를 들어, 선택된 방사성동위원소는 또한 세포독소이다. 치료제는 상기 중 어느 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체로서 제조될 수 있다. 일반적으로, 약물로서 방사성동위원소를 갖는 접합체는 방사성면역접합체로서 지칭되고, 약물로서 화학요법제를 갖는 접합체는 화학면역접합체로서 지칭된다.
- [0192] 세포독성제의 예는 안트라시클린, 아우리스타틴, CC-1065, 돌라스타틴, 두오카르마이신, 에네디인, 겔다나마이신, 메타탄신, 퓨로마이신, 탁산, 빈카 알칼로이드, SN-38, 튜부리신, 헤미아스텔린, 및 그의 입체이성질체, 동배체, 유사체 또는 유도체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 화학요법제, 식물 독소, 다른 생물활성 단백질, 효소 (즉, ADEPT), 방사성동위원소, 광증감제 (즉, 광역학 요법용)가 또한 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포독성제는 리보솜 불활성화 단백질이 아니다. 보다 구체적인 실시양태에서, 세포독성제는 사포린이 아니다.
- [0193] 안트라시클린은 박테리아 스트렙토미세스(*Streptomyces*)로부터 유래되고, 광범위한 암, 예컨대 백혈병, 림프종, 유방암, 자궁암, 난소암, 및 폐암을 치료하기 위해 사용되어 왔다. 예시적인 안트라시클린은 다우노루비신, 독소루비신 (즉, 아드리아마이신), 에피루비신, 이다루비신, 발루비신, 및 미톡산트론을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0194] 돌라스타틴 및 그의 펩티드성 유사체 및 유도체인 아우리스타틴은 항암 및 항진균 활성을 갖는 것으로 밝혀진 고도로 강력한 항유사분열제이다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,663,149 및 문헌 [Pettit et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965, (1998)]을 참조한다. 예시적인 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 돌라스타틴 10, 아우리스타틴 E, 아우리스타틴 EB (AEB), 아우리스타틴 EFP (AEFP), MMAD (모노메틸 아우리스타틴 D 또는 모노메틸 돌라스타틴 10), MMAF (모노메틸 아우리스타틴 F 또는 N-메틸발린-발린-돌라이소류인-돌라프로인-페닐알라닌), MMAE (모노메틸 아우리스타틴 E 또는 N-메틸발린-발린-돌라이소류인-돌라프로인-노르에페드린), 5-벤조일발레르산-AE 에스테르 (AEVB)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0195] 본 발명의 일부 측면에서, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 PCT 국제 공개 번호 WO 2013/072813에 기재된 아우리스타틴, 및 이들 아우리스타틴의 생성 방법이 본원에 사용된다.
- [0196] 예를 들어, 아우리스타틴은 하기 구조를 갖는 0101, (2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-3-메톡시-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-[(1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]아미노}프로필]피롤리딘-1-일)-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드)이다:



[0197]

[0198]

또 다른 예에서, 아우리스타틴은 하기 구조를 갖는 8261, (8261 2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-카르복시-2-페닐에틸]아미노]-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필]피롤리딘-1-일]-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드)이다:



[0199]

[0200]

두오카르마이신 및 CC-1065는 세포독성 효력을 갖는 DNA 알킬화제이다. 문헌 [Boger and Johnson, PNAS 92:3642-3649, 1995]을 참조한다. 예시적인 둘라스타틴 및 아우리스타틴은 (+)-두오카르마이신 A 및 (+)-두오카르마이신 SA, 및 (+)-CC-1065를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0201]

에네디인은 9- 및 10-원 고리 또는 접합된 삼중-이중-삼중 결합의 시클릭계의 존재를 특징으로 하는 항종양 박테리아 생성물 부류이다. 예시적인 에네디인은 칼리케아미신, 에스페라미신, 및 디네미신을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0202]

본 발명의 일부 측면에서, 세포독성제는 항생제, 예컨대 LL-E33288 복합체로도 불리는 칼리케아미신, 예를 들어 β-칼리케아미신, γ-칼리케아미신 또는 N-아세틸-γ-칼리케아미신 (감마-칼리케아미신 (γ₁))이다. 본 발명에 사용하기 적합한 칼리케아미신의 예는, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 4,671,958 4,970,198, 5,053,394, 5,037,651, 5,079,233 및 5,108,912에 개시되어 있다. 이들 화합물은 칼리케아미신을 항-PTK7 항체에 접합시키는데 유용한 관능기, 예컨대 히드라지드 또는 다른 관능기를 도입함과 동시에, 디설피드를 형성하기 위해 적절한 티올과 반응할 수 있는 메틸트리설피드를 함유한다. 칼리케아미신의 디설피드 유사체, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,606,040 및 5,770,710에 기재된 유사체를 또한 사용할 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 디설피드 유사체는 N-아세틸-γ-칼리케아미신 디메틸 히드라지드 (이하 "CM")이다.

[0203]

겔다나마이신은 Hsp90 (열 쇼크 단백질 90)에 결합하고 항종양 약물로 사용되어 온 벤조퀴논 안사마이신 항생제이다. 예시적인 겔다나마이신은 17-AAG (17-N-알릴아미노-17-데메톡시겔다나마이신) 및 17-DMAG (17-디메틸아미노에틸아미노-17-데메톡시겔다나마이신)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0204]

메이탄신 또는 그의 유도체 메이탄시노이드는 튜불린의 중합 억제를 통해 유사분열 동안 미세관 형성을 억제함으로써 세포 증식을 억제한다. 문헌 [Remillard et al., Science 189:1002-1005, 1975]을 참조한다. 예시적인 메이탄신 및 메이탄시노이드는 메르탄신 (DM1) 및 그의 유도체 뿐만 아니라 안사미토신을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0205]

탁산은 항튜불린제 또는 유사분열 억제제로서 작용하는 디테르펜이다. 예시적인 탁산은 파클리탁셀 (예를 들어, 탁솔(TAXOL)®) 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0206]

빈카 알칼로이드가 또한 항튜불린제이다. 예시적인 빈카 알칼로이드는 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 및 비

노렐빈을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0207] 본 발명의 일부 측면에서, 작용제는 면역조절제이다. 면역조절제의 예는 간시클로비르, 에타네르셉트, 타크롤리무스, 시클리무스, 보클로스포린, 시클로스포린, 라파마이신, 시클로포스파미드, 아자티오프린, 미코페놀게이트 모페틸, 메토티렉스레이트, 글루코코르티코이드 및 그의 유사체, 시토카인, 크산틴, 줄기 세포 성장 인자, 림프독소, 종양 괴사 인자 (TNF), 조혈 인자, 인터류킨 (예를 들어, 인터류킨-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, 및 IL-21), 콜로니 자극 인자 (예를 들어, 과립구-콜로니 자극 인자 (G-CSF) 및 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF)), 인터페론 (예를 들어, 인터페론- α , - β 및 - γ), "S 1 인자"로 지정된 줄기 세포 성장 인자, 에리트로포이에틴 및 트롬보포이에틴, 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0208] 본 발명에 유용한 면역조절제는 또한, 종양에 대한 호르몬 작용을 차단하는 항호르몬제, 및 시토카인 생성을 억제하거나, 자기 항원 발현을 하향 조절하거나 또는 MHC 항원을 차폐시키는 면역억제제를 포함한다. 대표적인 항호르몬제는 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나폰스톤, 및 토레미펜; 및 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 항부신제를 포함한다. 대표적인 면역억제제는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘, 아자티오프린, 시클로포스파미드, 브로모크립틴, 다나졸, 답손, 글루타르알데히드, MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체, 시클로스포린 A, 스테로이드, 예컨대 글루코코르티코스테로이드, 시토카인 또는 시토카인 수용체 길항제 (예를 들어, 항-인터페론 항체, 항-IL10 항체, 항-TNF α 항체, 항-IL2 항체), 스트렙토키나제, TGF β , 라파마이신, T-세포 수용체, T-세포 수용체 단편, 및 T 세포 수용체 항체를 포함한다.
- [0209] 본 발명의 일부 측면에서, 약물은 독소, 호르몬, 효소, 및 성장 인자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 치료 단백질이다.
- [0210] 독소 단백질 (또는 폴리펩티드)의 예는 디프테리아 (예를 들어, 디프테리아 A 쇄), 슈도모나스(Pseudomonas) 외 독소 및 내독소, 리신 (예를 들어, 리신 A 쇄), 아브린 (예를 들어, 아브린 A 쇄), 모데신 (예를 들어, 모데신 A 쇄), 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 리보뉴클레아제 (RNase), DNase I, 스타필로코쿠스(Staphylococcal) 장독소-A, 미국자리공 항바이러스 단백질, 겔로닌, 디프테린 독소, 피토라카 아메리카나(Phytolacca americana) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오퍼시날리스(sapaonaria officinalis) 억제제, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 트리코테센, 억제제 시스템 knot (ICK) 펩티드 (예를 들어, 세라토톡신), 및 코노톡신 (예를 들어, KIIIA 또는 SmIIIA)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0211] 호르몬의 예는 에스트로겐, 안드로겐, 프로게스틴 및 코르티코스테로이드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0212] 본 발명의 일부 측면에서, 세포독성제는 리포솜 또는 생체적합성 중합체를 사용하여 제조할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 항-PTK7 항체는 생체적합성 중합체와 접합하여, 혈청 반감기 및 생물활성을 증가시킬 수 있고/있거나 생체내 반감기를 연장시킬 수 있다. 생체적합성 중합체의 예는 수용성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 그의 유도체, 및 쯔비터이온-함유 생체적합성 중합체 (예를 들어, 포스포릴콜린 함유 중합체)를 포함한다.
- [0213] 본 발명의 일부 측면에서, 약물은 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0214] 본 발명에 유용한 추가의 약물은 혈관 형성을 억제하는 항혈관신생제, 예를 들어 파르네실트랜스퍼라제 억제제, COX-2 억제제, VEGF 억제제, bFGF 억제제, 스테로이드 술파타제 억제제 (예를 들어, 2-메톡시에스트라디올 비스-술파메이트 (2-MeOE2bisMATE)), 인터류킨-24, 트롬보스폰딘, 메탈로스폰딘 단백질, 부류 I 인터페론, 인터류킨 12, 프로타민, 안지오테틴, 라미닌, 엔도스테틴, 및 프로락틴 단편을 포함한다.
- [0215] 항증식제 및 아포토시스 촉진제는 PPAR-감마의 활성화제 (예를 들어, 시클로펜테논 프로스타글란딘 (cyPG)), 레티노이드, 트리테르페노이드 (예를 들어, 시클로아르탄, 루판, 우르산, 올레아난, 프리에텔란, 담마란, 쿠쿠르비타신, 및 리모노이드 트리테르페노이드), EGF 수용체의 억제제 (예를 들어, HER4), 람파마이신, 칼시트리올 (CALCITRIOL)® (1,25-디히드록시콜레칼시페롤 (비타민 D)), 아로마타제 억제제 (페마라(FEMARA)® (레트로존)), 텔로머라제 억제제, 철 킬레이트화제 (예를 들어, 3-아미노피리딘-2-카르복스알데히드 티오세미카르바존 (트리아핀)), 아포프틴 (닭 빈혈 바이러스로부터의 바이러스 단백질 3 - VP3), Bcl-2 및 Bcl-X(L), TNF-알파, FAS 리간드, TNF-관련 아포토시스-유도 리간드 (TRAIL/Apo2L)의 억제제, TNF-알파/FAS 리간드/TNF-관련 아포토

시스-유도 리간드 (TRAIL/Apo2L) 신호전달의 활성화제, 및 PI3K-Akt 생존 경로 신호전달의 억제제 (예를 들어, UCN-01 및 겔다나마이신)를 포함한다.

[0216] 대표적인 화학요법제는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부숄판, 임프로숄판 및 피로숄판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노뎀비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사제, 예컨대 메토타렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토타렉세이트, 프테로프테린, 트리메타렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'-트리클로로트리메틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 (Ara-C); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®; 브리스톨-마이어 스킵 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology) 뉴저지주 프린스턴) 및 독세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®; 롱-프란 로러(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니); 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토타렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소메라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 및 카페시타빈을 포함한다.

[0217] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 추가의 치료제는 광역학 요법을 위한 광증감제, 예컨대 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 7,498,029 및 5,952,329; 화학요법을 위한 자기 입자, 예컨대 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 6,997,863; 결합제, 예컨대 펩티드, 리간드, 세포 부착 리간드 등, 및 전구약물, 예컨대 보다 활성인 세포독성 유리 약물로 전환될 수 있는, 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트 함유 전구약물, 펩티드 함유 전구약물, β -락탐-함유 전구약물, 치환된 페닐아세트아미드-함유 전구약물 또는 치환된 페닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함한다.

[0218] 항-PTK7 항체를 사용하는 진단 방법의 경우에, 약물은 시험관내 또는 생체 내에서 PTK7-발현 세포의 존재를 검출하기 위해 사용되는 검출가능한 표지를 포함할 수 있다. 생체내에서 검출가능한 방사성동위원소, 예컨대 섬광조영, 자기 공명 영상화, 또는 초음파를 사용하여 검출가능한 표지를 임상 진단 적용에 사용할 수 있다. 유용한 신틸그래피 표지는 양전자 방출체 및 γ -방출체를 포함한다. 자기 공급원 영상화를 위한 대표적인 조영제는 상자성 또는 초상자성 이온 (예를 들어, 철, 구리, 망가니즈, 크로뮴, 에르븀, 유로퓸, 디스프로슘, 홀뮴 및 가돌리늄), 산화철 입자, 및 수용성 조영제이다. 초음파 검출의 경우에, 기체 또는 액체를 다공성 무기 입자 내에 봉입시킬 수 있고, 이는 마이크로버블 조영제로서 방출된다. 시험관내 검출의 경우에, 유용한 검출가능한 표지는 형광단, 검출가능한 에피토프 또는 결합제, 및 방사성 표지를 포함한다.

[0219] 따라서, 본 발명의 일부 측면에서, 약물은 영상화제 (예를 들어, 형광단 또는 PET (양전자 방출 단층촬영) 표지, SPECT (단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영) 표지), 또는 MRI (자기 공명 영상화) 표지이다.

[0220] 본원에 사용된 용어 "표지"는 "표지된" 항체를 생성하도록 항체와 직접 또는 간접적으로 접합되는 검출가능한

화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 그 자체가 검출가능할 수 있거나 (예를 들어, 방사성동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소적 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변경을 촉매할 수 있다. 검출가능한 표지로서 역할을 할 수 있는 방사성핵종은, 예를 들어 I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, 및 Pd-109를 포함한다. 표지는 또한, 비-검출가능한 엔티티, 예컨대 독소일 수 있다.

[0221] 형광단의 예는 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) (예를 들어, 5-FITC), 플루오레세인 아미다이트 (FAM) (예를 들어, 5-FAM), 에오신, 카르복시플루오레세인, 에리트로신, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® (예를 들어, 알렉사 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700, 또는 750), 카르복시테트라메틸로다민 (TAMRA) (예를 들어, 5-TAMRA), 테트라메틸로다민 (TMR), 및 술포로다민 (SR) (예를 들어, SR101)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0222] 치료 또는 진단 방사성동위원소 또는 다른 표지 (예를 들어, PET 또는 SPECT 표지)를 본원에 기재된 바와 같은 항-PTK7 항체에 접합하기 위한 작용제에 혼입시킬 수 있다. 동위원소는, 예를 들어 항체에 존재하는 시스테인 잔기에서 항체에 직접적으로 결합될 수 있거나, 또는 킬레이트화제를 사용하여 항체와 방사성동위원소의 결합을 매개할 수 있다. 방사선요법에 적합한 방사성동위원소는 α -방출체, β -방출체, 및 오거 전자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 진단 용도를 위해, 유용한 방사성동위원소는 양전자 방출체 및 γ -방출체를 포함한다. 본 발명의 항-PTK7 항체는, 예를 들어 항체의 티로신 잔기 상에서 추가로 요오드화되어, 이러한 항체의 검출 또는 치료 효과를 용이하게 할 수 있다.

[0223] 방사성동위원소 또는 다른 표지의 예는 ^3H , ^{11}C , ^{13}N , ^{14}C , ^{15}N , ^{15}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Se , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{94}Tc , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{103}Ru , ^{105}Rh , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{113}In , ^{121}Te , ^{122}Te , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{125}Te , ^{126}I , ^{131}I , ^{131}In , ^{133}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{153}Pb , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{165}Tm , ^{166}Dy , ^{166}H , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{169}Yb , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{197}Pt , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{224}Ac , 및 ^{225}Ac 를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0224] II.D. PTK7 항체-약물 접합체의 제조 방법

[0225] 또한, 본 발명의 항체-약물 접합체의 제조 방법이 제공된다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 PTK7 항체-약물 접합체의 생성 방법은 (a) 링커를 약물에 연결시키는 단계; (b) 이러한 링커-약물 모이어티를 항체에 접합시키는 단계; 및 (c) 항체-약물 접합체를 정제하는 단계를 포함할 수 있다. vc0101 및 mc8261의 합성에 대한 대표적인 방법이 실시예 9에 기재되어 있고, 항-PTK7-vc0101, 항-PTK7-mc8261 ADC 및 항-PTK7-AcButCM ADC의 접합에 대한 대표적인 방법이 실시예 10에 기재되어 있다.

[0226] 한 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 항체-약물 접합체는 (a) 링커-약물 모이어티 (예를 들어 vc0101 또는 mc8261)를 항-PTK7 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 부가하는 단계에 의해 제조될 수 있고, 여기서 항-PTK7 항체는 2-10몰 과량의 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP), 6-9의 pH를 갖는 100 mM의 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술포산 완충제 (HEPES) 및 1 mM 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA)을 함유하는 용액 중에서 약 30분 내지 16시간 범위의 시간 동안 약 0-37°C 범위의 온도에서 부분적으로 환원될 수 있다. 이어서 vc0101 또는 mc8261 링커-페이로드가 약 4-10의 링커-페이로드/항체 몰비로 디메틸아세트아미드 (DMA)와 함께 약 30분 내지 16시간 범위의 인큐베이션 시간 동안 약 0-37°C 범위의 온도에서 부가될 수 있다. 후속적으로, 미반응 티올이 N-에틸말레이미드에 의해 캡핑될 수 있고, 미반응 링커-페이로드가 L-Cys에 의해 켄칭될 수 있다.

[0227] 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 항체-약물 접합체는 (a) 링커-약물 모이어티 (예를 들어, AcButCM)를 항-PTK7 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 부가하는 단계 (여기서, 항체의 농도는 1 내지 25 mg/ml의 범위일 수 있고, 링커-약물 모이어티는 항-PTK7 항체 1에 대해 약 1-15 범위의 몰비로 존재함); (b) 링커-약물 모이어티 및 항-PTK7 항체를, 약 7 내지 9의 범위의 pH를 갖는 비-친핵성 단백질-상용성 완충 용액에서 인큐베이션하여 단량체 항체-약물 접합체를 생성하는 단계 (여기서, 용액은 (i) 적합한 유기 공용매, 및 (ii) 적어도 1개의 C₆-C₁₈ 카르복실산 또는 그의 염을 갖는 첨가제를 추가로 포함하고, 여기서 인큐베이션은 약 1분 내지 약 24시간의 범위의 시간 동안 약 0°C 내지 약 45°C의 범위의 온도에서 수행됨); 및 (c) 단계 (b)에서 생성된 접합체를 크로마토그래피 분리 공정에 적용하여 1 내지 8의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 분리하는 단계에 의해 제조될 수 있고; 이는 비접합된 항-PTK7 항체, 링커-약물 모이어티, 및 응집된 접합체로부터 10% 미만의 낮은 접합 분획 (LCF)을

제공한다.

- [0228] 접합체를 형성하기 위한 최적의 반응 조건은 반응 변수, 예컨대 온도, pH, 링커-페이로드 모이어티 유입량, 및 첨가제 농도를 변경함으로써 실험적으로 결정될 수 있다. 다른 약물을 접합하는데 적합한 조건은 과도한 실험 없이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.
- [0229] 일부 측면에서, 약물은 항체 상의 접합 지점과 반응성인 기를 포함하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 약물은 알킬화 (예를 들어, 항체의 엡실론아미노 기 리신 또는 N-말단에서), 산화된 탄수화물의 환원성 아미노화, 히드록실 기와 카르복실 기 사이의 에스테르교환, 아미노 기 또는 카르복실 기에서의 아미드화, 및 티올에의 접합에 의해 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 분자당 접합되는 약물 (D) 모이어티의 수는 1 내지 8; 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 또는 1 내지 2의 범위이다. 다른 실시양태에서, 항체당 접합되는 약물 (D) 분자의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이다. 일부 실시양태에서, 복수개의 항체-약물 접합체의 조성, 배치 및/또는 제제는 평균 DAR에 의해 특징화될 수 있다. 평균 DAR은 약 1 내지 약 8, 약 1 내지 약 7, 약 1 내지 약 6, 약 1 내지 약 5, 약 1 내지 약 4; 약 1 내지 약 3, 약 1 내지 약 2의 범위이다. 일부 실시양태에서, 복수개의 항체-약물 접합체의 조성, 배치 및/또는 제제에 대한 평균 DAR은 약 2 내지 약 8, 약 2 내지 약 7, 약 2 내지 약 6, 약 2 내지 약 5, 약 2 내지 약 4, 약 2 내지 약 3 또는 약 3 내지 약 5의 범위이다. 상기 평균 DAR의 범위에 사용된 용어 "약"은 $\pm 0.5\%$ 를 의미한다. 접합에 사용될 수 있는 화학의 예에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Current Protocols in Protein Science (John Wiley & Sons, Inc.), 챕터 15 (Chemical Modifications of Proteins)]을 참조한다.
- [0230] 항체-약물 접합체를 제조하는 다른 방법이 다양한 공보에 기재되어 있다. 예를 들어, 접합 반응이 발생하도록 왜간 디설파이드 결합을 환원시킴으로써 활성화된 시스테인 술폰히드릴 기를 통해 또는 리신 측쇄 아민을 통해 항체에서 화학적 변형이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Tanaka et al., FEBS Letters 579:2092-2096, 2005, 및 Gentle et al., Bioconjugate Chem. 15:658-663, 2004]을 참조한다. 추가로, 규정된 화학량론을 사용한 특이적 약물 접합을 위해 항체의 특이적 부위에서 조작된 반응성 시스테인 잔기가 또한 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Junutula et al., Nature Biotechnology, 26:925-932, 2008]을 참조한다.
- [0231] 추가로 국제 공개 번호 WO 2013/093809에 기재되어 있는 바와 같이, 아마도 항체의 중쇄의 CH2 또는 CH3 도메인의 표면 상에, 또는 경쇄의 불변 도메인 상에, 또는 다른 접근가능한 곳에 존재하는 특정 잔기가 예를 들어 시스테인에 의한 자연 발생 야생형 아미노산의 치환에 적합하고, 따라서 다양한 작용제에 접합할 수 있는 부위를 조작하는데 유용하다.
- [0232] 일부 측면에서, 본 발명의 조작된 Fc 폴리펩티드는 PTK7 항체 또는 항체-약물 접합체를 제조하는데 사용될 수 있고, 이에 의해 항체 또는 그의 단편은 조작된 잔기 (즉, 야생형 비변형된 Fc와 비교하여 치환된 아미노산)에서 매우 다양한 작용제를 접합시키는데 사용될 수 있는 조작된 Fc 영역을 포함한다.
- [0233] 본 발명의 PTK7 항체 및 항체-약물 접합체는 모, 천연, 또는 야생형 항체의 항체 중쇄 (HC)의 위치: 347, 392, 398, 422 및 443으로부터 선택된 1, 2개 또는 그 초과 아미노산이 또 다른 아미노산 (천연 및 비-천연/합성 아미노산 포함)에 의해 치환된 조작된 Fc 폴리펩티드를 포괄할 수 있으며, 여기서 불변 영역의 넘버링 시스템은 카바트에 따른 EU 인덱스의 넘버링 시스템이다.
- [0234] Fc 폴리펩티드에서의, 예를 들어 시스테인 잔기의 단일 치환은 통상적으로, IgG 항체 분자의 동종이량체 속성으로 인해, 생성된 IgG 항체에서 2개의 상응하는 잔기의 디스플레이를 발생시킨다는 점에 주목해야 한다. 따라서, 생성된 본 발명의 조작된 IgG 항체는 약물 또는 화합물에 대한 접합 목적을 위해 적어도 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과 반응성 기를 디스플레이할 수 있다. 한 측면에서, 치환 중 1개 이상은 시스테인 잔기로 이루어지며, 생성된 조작된 항체는 약물 또는 화합물에 대한 접합 목적을 위해 적어도 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과 티올 기를 디스플레이할 수 있다.
- [0235] 또 다른 측면에서, 본 개시내용의 조작된 Fc 폴리펩티드는 항체의 중쇄 (HC)의 위치 347, 392, 398, 422 및 443으로부터 선택된 1개 이상의 치환을 포함할 수 있으며, 여기서 불변 영역의 넘버링 시스템은 카바트에서 제시된 바와 같은 EU 인덱스의 넘버링 시스템이고, 여기서 중쇄의 아미노산 서열은 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 37, 및 서열식별번호: 61로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0236] 본 발명의 PTK7 항체 및 항체-약물 접합체는 조작된 항체 경쇄 불변 영역 (LC) 또는 그의 부분을 포괄할 수 있으며, 여기서 모, 천연 또는 야생형 항체의 항체 경쇄의 위치 111, 183, 또는 188로부터 선택된 1, 2, 또는 3개의 아미노산은 (여기서 경쇄 불변 영역의 넘버링 시스템은 카바트의 넘버링 시스템임) 또 다른 아미노산 (천연

및 비-천연/합성 아미노산 포함)에 의해 치환된다.

- [0237] 일부 측면에서, 본 개시내용의 조작된 LC 폴리펩티드는 항체 경쇄의 위치 111, 183, 또는 188로부터 1개 이상의 치환을 포함하며, 여기서 경쇄의 아미노산 서열은 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 47, 및 서열식별번호: 71로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0238] 다른 측면에서, 많은 항체의 이량체 속성으로 인해 (예를 들어, IgG는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하고, 각각의 중쇄는 Fc 폴리펩티드를 포함함), 본 발명의 항체는 적어도 1개의 조작된 Fc 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 적어도 1개의 조작된 경쇄 불변 폴리펩티드를 추가로 포함할 수 있으며, 이에 의해 적어도 2개의 부위-특이적 접합 부위 - Fc 폴리펩티드에서 1개 및 LC 폴리펩티드에서 또 다른 것을 제공한다.
- [0239] 본 발명의 일부 측면에서, 개시된 PTK7 항체-약물 접합체의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG1 중쇄 불변 영역, 예를 들어 서열식별번호: 13으로서 제시된 hu23 중쇄, 서열식별번호: 37로서 제시된 hu24 중쇄, 또는 서열식별번호: 61로서 제시된 hu58 중쇄를 포함한다. 다른 측면에서, 개시된 PTK7 항체-약물 접합체의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 카파 경쇄 불변 영역, 예를 들어 서열식별번호: 23으로서 제시된 hu23 경쇄, 서열식별번호: 47로서 제시된 hu24 경쇄, 또는 서열식별번호: 71로서 제시된 hu58 경쇄를 포함한다. 본 발명의 특정한 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 IgG1 중쇄 불변 영역 및 카파 경쇄 불변 영역, 예를 들어 서열식별번호: 13으로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 23으로서 제시된 경쇄; 또는 또 다른 예로서, 서열식별번호: 37로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 47로서 제시된 경쇄; 또는 또 다른 예로서, 서열식별번호: 61로서 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 71로서 제시된 경쇄를 포함할 수 있다.
- [0240] 또한, 국제 공개 번호 W02012/059882에 기재된 바와 같이, 접합 방법은 트랜스글루타미나제 및 아민 (예를 들어, 반응성 아민을 포함하거나 그에 부착된 세포독성제)의 존재 하에서의 폴리펩티드 조작에 의해 반응성이게 하는 (즉, 아실 공여자로서 공유 결합을 형성하는 능력) 아실 공여자 글루타민-함유 태그 또는 내인성 글루타민의 사용을 포함한다.
- [0241] 일부 측면에서, PTK7 항체 또는 항체-약물 접합체는 PTK7 항체의 항체의 특정 부위에서 (예를 들어, 카르복실 말단, 아미노 말단, 또는 또 다른 부위에서) 조작된 아실 공여자 글루타민-함유 태그를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 태그는 아미노산 글루타민 (Q) 또는 아미노산 서열 GLLQGG (서열식별번호: 74), LLQGA (서열식별번호: 75), GLLQGA (서열식별번호: 76), LLQ, LLQGPGK (서열식별번호: 77), LLQGP (서열식별번호: 78), LLQGPA (서열식별번호: 79), LLQGP (서열식별번호: 80), LLQP (서열식별번호: 81), LLQPGK (서열식별번호: 82), LLQGAPGK (서열식별번호: 83), LLQGAPG (서열식별번호: 84), LLQGAP (서열식별번호: 85), LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (여기서 X₁은 G 또는 P이고, 여기서 X₂는 A, G, P, 또는 부재이고, 여기서 X₃은 A, G, K, P, 또는 부재이고, 여기서 X₄는 G, K 또는 부재이고, 여기서 X₅는 K 또는 부재임) (서열식별번호: 86), 또는 LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (여기서 X₁은 임의의 자연 발생 아미노산이고, 여기서 X₂, X₃, X₄, 및 X₅는 임의의 자연 발생 아미노산 또는 부재임) (서열식별번호: 87)를 포함한다. 일부 실시양태에서, PTK7 항체 또는 항체-약물 접합체는 PTK7 항체의 위치 297에서 아스파라긴 (N)에서 글루타민 (Q)으로의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [0242] 또 다른 측면에서, PTK7 항체 또는 항체-약물 접합체는 아실 공여자 글루타민-함유 태그 및 항체의 위치 222, 340, 또는 370 (EU 넘버링 스킴)에서의 아미노산 변형을 포함할 수 있고, 여기서 변형은 아미노산 결실, 삽입, 치환, 돌연변이 또는 그의 임의의 조합이다. 따라서, 일부 측면에서, PTK7 항체 또는 항체-약물 접합체는 PTK7 항체의 특정 부위에서 (예를 들어, 중쇄 또는 경쇄의 카르복실 말단에서 또는 또 다른 부위에서) 접합된 아실 공여자 글루타민-함유 태그 (예를 들어, Q, GLLQGG (서열식별번호: 74), LLQGA (서열식별번호: 75), GLLQGA (서열식별번호: 76), LLQ, LLQGPGK (서열식별번호: 77), LLQGP (서열식별번호: 78), LLQGPA (서열식별번호: 79), LLQGP (서열식별번호: 80), LLQP (서열식별번호: 81), LLQPGK (서열식별번호: 82), LLQGAPGK (서열식별번호: 83), LLQGAPG (서열식별번호: 84), LLQGAP (서열식별번호: 85), LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (여기서 X₁은 G 또는 P이고, 여기서 X₂는 A, G, P, 또는 부재이고, 여기서 X₃은 A, G, K, P, 또는 부재이고, 여기서 X₄는 G, K 또는 부재이고, 여기서 X₅는 K 또는 부재임) (서열식별번호: 86), 또는 LLQX₁X₂X₃X₄X₅ (여기서 X₁은 임의의 자연 발생 아미노산이고, 여기서 X₂, X₃, X₄, 및 X₅는 임의의 자연 발생 아미노산 또는 부재임) (서열식별번호: 87) 및 항체의 위치 222, 340, 또는 370 (EU 넘버링 스킴)에서의 아미노산 변형을 포함할 수 있다.
- [0243] 항체-약물 접합체당 약물 분자의 수를 추가로 증가시키기 위해, 약물을 직쇄형 또는 분지형 폴리에틸렌 글리콜

중합체 및 단량체를 포함한 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)에 접합시킬 수 있다. PEG 단량체는 식: $-(CH_2CH_2O)-$ 을 갖는다. 약물 및/또는 펩티드 유사체는 직접 또는 간접적으로, 즉 적절한 스페이서 기, 예컨대 당을 통해 PEG에 결합될 수 있다. PEG-항체-약물 조성물은 또한, 약물 안정성을 용이하게 하고 생체내 표적 부위로 전달하는 추가의 친지성 및/또는 친수성 모이어티를 포함할 수 있다. PEG-함유 조성물을 제조하기 위한 대표적인 방법은 특히, 미국 특허 번호 6,461,603; 6,309,633; 및 5,648,095에서 찾아볼 수 있다.

[0244] 예를 들어, 본원에 개시된 PTK7 항체-약물 접합체에서 아우리스타틴 또는 칼리케아미신의 양을 증가시키기 위해, 항체를 약물과 접합시키기 전에, 예를 들어 PEG-SPA, PEG-SBA, 또는 PEG-비스-말레이미드를 사용하여 PEG에 접합시킬 수 있다. PEG를 사용하여 제조된 항체-약물 접합체는 표적 항원에 대해 감소된 결합 친화도를 나타낼 수 있지만, 증가된 약물 로딩의 결과로서 여전히 효과적이다.

[0245] 접합 후, 접합체를 통상적인 방법에 의해 비접합된 반응물 및/또는 응집된 형태의 접합체로부터 분리 및 정제할 수 있다. 이는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 한외여과/투석여과, 이온 교환 크로마토그래피 (IEC), 크로마토포커싱 (CF) HPLC, FPLC, 또는 세파크틸 S-200 크로마토그래피와 같은 과정을 포함할 수 있다. 분리는 또한 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 달성될 수 있다. 적합한 HIC 매질은 페닐 세파로스 6 고속 유량 크로마토그래피 매질, 부틸 세파로스 4 고속 유량 크로마토그래피 매질, 옥틸 세파로스 4 고속 유량 크로마토그래피 매질, 토요필 에테르-650M 크로마토그래피 매질, 마크로-정제용 메틸 HIC 매질 또는 마크로 정제용 t-부틸 HIC 매질을 포함한다.

[0246] 본 발명의 일부 측면에서, 분리는 부틸 세파로스 4 고속 유량 크로마토그래피 매질을 사용하여 수행될 수 있다. 맞춤형 구배를 사용하는 경우에, 칼럼에 여전히 결합되어 있는 보다 높은 DAR 종이 제거된다. 일부 측면에서 정제 공정은 원심분리 세포 제거 단계, 임의로 단백질 A 친화도 포획 단계에 이은 1 또는 2회 직교 크로마토그래피 연마 단계, 바이러스 여과 단계, 및 농축 및 제제화를 위한 접선 흐름 여과 단계를 포함할 수 있다.

[0247] III. PTK7 항체-약물 접합체의 특징화를 위한 기능적 검정

[0248] 본 발명은 추가로, PTK7 결합 활성, 세포 표면 상에 존재하는 PTK7 항원과의 결합 후 세포 내재화, 및 대상체에서 PTK7-발현 세포에 대한 표적화를 포함한, PTK7 항체-약물 접합체의 활성을 특징화하기 위한 시험관내 및 생체내 검정을 개시한다. 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 중화 또는 고갈 측면에 의해 특징화된다. 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 대안적 약물의 효능의 기여와 비교하여 특정한 약물의 예상치 못한 효능에 의해 특징화된다. 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체-약물 접합체는 약물과 동일한 작용 방식을 갖는 표준 치료제를 능가하는 것으로서 특징화된다.

[0249] PTK7 항원, 또는 다른 PTK7 항원에 대한 PTK7 항체-약물 접합체의 결합을 검출하는 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 비아코어(BIACORE)® 검정을 포함한다. 추가의 대표적인 기술은 원심분리, 친화성 크로마토그래피 및 다른 면역화학 방법을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Manson (1992) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa, N.J., United States of America; Ishikawa (1999) Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Elsevier, Amsterdam/New York]을 참조한다. 단리된 PTK7 항원 또는 PTK7-발현 세포를 사용하여 항원 결합 검정을 수행할 수 있다.

[0250] PTK7 항체-약물 접합체의 결합 특이성은 결합 에피토프의 정의, 즉 항원 결합에 참여하는 비인접 잔기를 포함한 잔기의 확인, 및/또는 항원 결합에 영향을 미치는 잔기의 정의에 의해 추가로 설명될 수 있다.

[0251] PTK7-발현 세포에 의한 PTK7 항체-약물 접합체의 내재화는 시간 경과에 따른 PTK7-발현 세포의 표면에 결합된 항체 또는 접합체의 양을 관찰함으로써 검정할 수 있다. 예를 들어, 실시예 7을 참조한다. 선택된 PTK7 리간드 또는 그의 이소형은 가용성 형태로 존재할 수 있고, 적어도 일부 PTK7은 세포 표면과 여전히 회합되는 것으로 예상되므로, 본원에 개시된 항체의 내재화가 허용된다. 따라서, 본 발명의 항-PTK7 항체-약물 접합체는 PTK7을 발현하는 세포에 의해 내재화될 수 있다. 예를 들어, 종양 개시 세포의 표면 상의 PTK7에 결합하는 항-PTK7 항체-약물 접합체는 종양 개시 세포에 의해 내재화될 수 있다. 내재화되는 ADC 분자의 수는 PTK7 발현 세포, 특히 PTK7 발현 종양 세포를 사멸시키는데 충분하거나 적당할 수 있다. ADC의 효력에 따라, 일부 경우에, 세포 내로의 단일 ADC 분자의 흡수는 ADC가 결합하는 표적 세포를 사멸시키는데 충분하다. 예를 들어, 특정 독소는 항체에 결합된 독소의 1개의 분자의 내재화가 종양 세포를 사멸시키는데 충분하도록 사멸에 있어서 고도로 강력하다.

[0252] PTK7 항체의 내재화는 세포를 사포린 독소에 접합되는 2차 항체 Fab 단편 및 PTK7 항체와 함께 인큐베이션하는 기능적 검정을 사용하여 평가할 수 있다. 이어서, 임의의 적합한 방법에 의해 세포 생존율을 측정하고, 세포성

세포독성은 항체 내재화를 암시한다. 실시예 7을 참조한다.

- [0253] 본 발명의 일부 측면에서, 상기 개시된 PTK7 항체-약물 접합체의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 가장 광범위한 의미로 사용된 바와 같은 "길항제", 즉 본원에 개시된 천연 표적의 생물학적 활성, 또는 그의 전사 또는 번역을 부분적으로 또는 완전히 차단, 억제 또는 중화시키는 임의의 분자이다. 본 발명의 항체의 생물활성과 관련하여 본원에 사용된 용어 "억제하다" 또는 "중화시키다"는 예를 들어 생물학적 활성을 포함하나 이에 제한되지 않는, 억제하고자 하는 진행 또는 중증도를 실질적으로 길항시키거나, 금지하거나, 방지하거나, 제어하거나, 느리게 하거나, 파괴하거나, 제거하거나, 정지시키거나, 감소시키거나 또는 역전시키는 항체의 능력을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 일부 측면에서, 항-PTK7 항체-약물 접합체는 항체-약물 접합체의 내재화 시 세포 사멸을 용이하게 한다. 예를 들어, 중화 항체 또는 길항제는 바람직하게는 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 초과만큼 PTK7 기능을 감소시킬 것이다.
- [0254] 본 발명의 다른 측면에서 본 발명의 항-PTK7 항체-약물 접합체는 고갈 항체일 수 있다. 용어 고갈 항체는 세포 표면 상에서 또는 근처에서 PTK7에 결합하거나 또는 이와 회합되고, 세포의 사멸 또는 제거를 (예를 들어, 보체-의존성 세포독성 또는 항체-의존성 세포성 세포독성에 의해) 유도하거나, 증진시키거나 또는 유발하는 항체를 지칭한다. 바람직하게는 고갈 항체는 규정된 세포 집단에서 종양 연속 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99%를 제거하거나, 없애거나 또는 사멸시킬 수 있을 것이다.
- [0255] 기능적 검정은 또한, 항체-약물 접합체의 항암 활성, 예를 들어 기존 암 세포를 파괴하거나 또는 암 세포의 성장을 지연 또는 방지하는 능력을 평가하는 방법을 포함한다. 본 발명의 항체-약물 접합체에 의해 표적화된 암은 원발성 및 전이된 종양 둘 다, 및 대상체의 임의의 조직의 암종을 포함하고, 이는 암종 및 조혈 악성종양, 예컨대 백혈병 및 림프종을 포함한다.
- [0256] 성장 억제 활성을 갖는 PTK7 항체-약물 접합체는 PTK7-발현 세포를 제거할 수 있거나 또는 PTK7-발현 암 세포의 증식을 방지 또는 감소시킬 수 있다. 세포 성장 억제의 신속한 시험관내 평가를 위한 대표적인 방법이 문헌 [Jones et al. (2001) J. Immunol. Methods 254:85-98]에 기재되어 있다.
- [0257] PTK7 항체-약물 접합체는 또한, 세포 사멸, 예를 들어 핵 DNA 분해, 핵 변성 및 응축, 막 완전성의 상실, 및 식세포작용을 특징으로 하는 프로그램화된 세포 사멸을 유도하는 능력을 포함할 수 있다. 세포를 평가하는 대표적인 검정이 문헌 [Hoves et al. (2003) Methods 31:127-34; Peng et al. (2002) Chin. Med. Sci. J. 17:17-21; Yasuhara et al. (2003) J. Histochem. Cytochem. 51:873-885]에 기재되어 있다.
- [0258] 예를 들어, 시험관 내에서 PTK7 항체-약물 접합체의 세포독성을 평가하기 위해, PTK7-발현 암 세포 및 대조군 세포를 PTK7 항체-약물 접합체의 존재 하에, 유리 약물과 별개로 배양한다. 각 작용제의 세포독성이 ED50 (ng/ml)으로서 보고되고, 이는 비처리 대조군 대비 세포 배양물의 50% 감소를 유발하는, 접합체로서 또는 유리 약물로서 제공된 약물의 양이다. 배양물 내의 세포 수는 약물 노출 후 생체 염료 (MTS)를 사용하여 결정된다. 실시예 12를 참조한다.
- [0259] 생체내 PTK7 항체-약물 접합체의 세포독성을 평가하기 위해, 다양한 암 세포를 피하 주사함으로써 NOD/SCID, 누드 (nu/nu) 또는 다른 계통의 면역-손상된 마우스에서 종양을 제조한다. PTK7 항체-약물 접합체 및 대조군 화합물을, 예를 들어 2주 동안 1주에 2회 (q4dx4) 복강내 주사함으로써 종양-보유 마우스에 투여할 수 있다. 측정가능한 치료 성과는 종양 세포 성장의 억제를 포함한다. 실시예 13을 참조한다.
- [0260] 추가로, 본 발명은, 예를 들어 항-PTK7 항체, 또는 전달 투여 및 방법에 따라 선택된 경로를 효능화 또는 길항시키는 것 또는 특이적 세포를 제거하는 것을 포함하는 다양한 메커니즘을 통해, 종양 개시 세포 (TIC)를 포함한 종양 세포 및/또는 연관 신생물의 성장, 증식 또는 생존을 고갈, 침묵, 중화, 제거 또는 억제할 수 있는 PTK7 항체-약물 접합체를 제공한다.
- [0261] 본원에 사용된 용어 종양 개시 세포 (TIC)는 종양 연속 세포 (TPC; 즉, 암 줄기 세포 또는 CSC) 및 고도의 증식성 종양 전구 세포 (TProg) 둘 다를 포괄하고, 이는 함께 일반적으로, 벌크 종양 또는 덩어리의 고유한 하위집단 (즉, 0.1 - 40%)을 포함한다. 본 개시내용의 목적상, 용어 종양 연속 세포 및 암 줄기 세포는 동등하고, 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 반대로, TPC는 이것이 종양 내에 존재하는 종양 세포의 구성을 완전하게 재현할 수 있고 적은 수의 단리된 세포의 일련의 이식 (마우스를 통한 2회 이상의 계대)에 의해 입증된 바와 같이 무제한 자기-재생 능력을 갖는다는 점에서 TProg와 상이하다. 본원에 사용된 용어 "종양 개시 세포"는 또한, 종양 그 자체를 특징으로 하지 않는, 다양한 혈액 악성종양의 암 줄기 세포를 지칭한다.
- [0262] 본 발명은 종양 개시 세포 (TIC), 및 특히 종양 연속 세포 (TPC)를 표적화함으로써 신생물성 장애 및 과다증식

성 장애의 치료, 관리 및 예방을 용이하게 하는 PTK7 항체-약물 접합체를 제공한다. 보다 구체적으로, 특이적 종양 세포 하위집단은 PTK7을 발현하고, 이는 아마도 암 줄기 세포 자기-재생 및 세포 생존에 중요한 모르포겐 신호 전달의 국한된 협조를 변형시킨다. 따라서, PTK7 항체-약물 접합체를 사용하여, 대상체로의 투여시 TIC의 빈도를 감소시킬 수 있다. 종양 개시 세포 빈도에서의 감소는 a) 종양 개시 세포의 제거, 고갈, 감작화, 침묵 또는 억제; b) 종양 개시 세포의 성장, 확장 또는 재발의 제어; c) 종양 개시 세포의 개시, 전파, 유지 또는 증식의 중단; 또는 d) 달리 종양발생 세포의 생존, 재생 및/또는 전이의 방해에 의한 결과로서 일어날 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 종양 개시 세포 빈도에서의 감소는 1개 이상의 생리학적 경로에서의 변화의 결과로서 일어난다. 이러한 경로에서의 변화는 이것이 종양 개시 세포의 감소 또는 제거에 의해서든지 아니면 그의 잠재력의 변형 (예를 들어, 분화 유도, 틈새 파괴) 또는 달리 종양 환경 또는 다른 세포에 대해 효과를 발휘하는 그의 능력의 방해에 의해서든지 관계없이, 궁극적으로 종양발생, 종양 유지 및/또는 전이 및 재발을 억제함으로써 PTK7-연관 장애를 보다 효과적으로 치료할 수 있게 한다.

[0263] 이러한 종양 개시 세포의 빈도에서의 감소를 평가하기 위해 사용될 수 있는 방법 중에서, 시험관내 또는 생체내에서 한계 희석 분석한 다음, 바람직하게는 포아송 분포 통계를 사용하거나 또는 미리 규정된 결정적 사건의 빈도, 예컨대 생체내에서 종양을 생성할 수 있거나 또는 그렇지 않은 능력을 평가함으로써 계산하는 방법이 있다. 널리 공지된 유동 세포측정 또는 면역조직화학적 수단을 통해 빈도 값 감소를 결정하는 것이 또한 가능하다. 상기 언급된 모든 방법에 대해, 예를 들어 문헌 [Dylla et al. 2008, PMID: PMC2413402 & Hoey et al. 2009, PMID: 19664991]을 참조하고, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 종양 개시 세포 빈도를 계산하기 위해 사용될 수 있는, 본 발명과 상용가능한 다른 방법은 정량화가능한 유동 세포측정 기술 및 면역조직화학적 염색 절차를 포함한다.

[0264] 임의의 상기 언급된 방법을 사용하여, 본원의 교시에 따라 상기 개시된 PTK7 항체-약물 접합체에 의해 제공된 TIC (또는 그 안의 TPC)의 빈도에서의 감소를 정량화하는 것이 가능하다. 일부 경우에, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 TIC의 빈도를 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 또는 심지어 35% 감소시킬 수 있다 (제거, 분화 유도, 틈새 파괴, 침묵 등을 포함한 상기 언급된 다양한 메카니즘에 의함). 본 발명의 다른 측면에서, TIC의 빈도에서의 감소는 대략 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 또는 65%일 수 있다. 본 발명의 특정 측면에서, 상기 개시된 화합물은 TIC의 빈도를 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 심지어 95% 감소시킬 수 있다. TIC의 빈도의 임의의 감소는 신생물의 종양발생, 지속성, 재발성 및 공격성에 있어서의 상응하는 감소를 발생시키는 것으로 인식될 것이다.

[0265] 축적된 증거는 종양 성장, 요법에 대한 저항성, 및 장애 재발이 TPC에 의해 제어된다는 가설을 지지한다. TPC의 빈도는 종양 유형에서, 또는 장애 병기의 결과 및/또는 종양 내 분화의 정도가 동일한 종양 유형을 갖는 환자 사이에서 달라질 수 있다. TPC는 특정 유형의 암을 갖는 환자들 사이에 그의 발현에 있어서 종종 중첩되는 세포 표면 마커의 패널을 사용하여 확인 및 풍부화될 수 있다. TPC는 일련의 이식 시 종양을 개시할 수 있는 그들의 기능적 능력에 의해 가장 잘 규정되는 반면, 비-종양발생 (NTG) 세포는 이러한 능력이 없다. 그들의 고유한 종양 개시 능력에 대해 풍부화된 고품종 종양 세포는 유방암에서 최초로 확인되었지만, 유방암은 악성종양의 스펙트럼을 포함한다. 지금까지, 과학계는 특이적 TPC 실체를 특정한 장애 하위유형과 연관시키는데 실패했고, 이는 군의 전반에 걸쳐 그리고 군 내에서 모순된 결과의 기초를 이룰 수 있고 또한 임상으로의 이식 실패 가능성을 증가시킬 수 있다.

[0266] 본 발명은 TPC의 풍부화를 개선시키는 새로운 세포 표면 마커의 조합을 제공한다. 특정한 측면에서, 본 발명은 삼중 음성 유방암 (TNBC) TPC의 풍부화를 용이하게 하는 새로운 세포 표면 마커의 조합을 제공한다. 본 발명은 추가로, TNBC에서 신규 TPC-연관 치료 표적으로서의 PTK7의 확인을 제공하며; 그의 발현 수준은 다른 유방암 하위유형 및 정상 조직에서보다 유의하게 더 높다.

[0267] PTK7 항체-약물 접합체의 약동학은 다양한 동물에서 평가되고, 비접합된 항체의 약동학과 비교될 수 있다. 예를 들어, 이는 암컷 NOD/SCID, 누드 (nu/nu) 또는 다른 계통의 면역-손상된 마우스, 수컷 스프라그-돌리 래트, 및 암컷 시노폴구스 원숭이에서 단일 정맥내 볼루스 투여 후에 이루어질 수 있다. PTK7 항체-약물 접합체의 약동학은 일반적으로, 다양한 종에서의 낮은 클리어런스, 낮은 분포 부피, 및 긴 걸보기 말단 반감기를 특징으로 한다. 비접합된 아우리스타틴 유도체의 혈청 농도는 정량화 한계 미만인 것으로 예상된다. 단일-용량 독성 범위 연구에서 이들 접합체에 대한 독성 프로파일은 동등한 용량에서 다른 항체-약물 접합체에 대해 수득된 것과 유사한 것으로 예상된다.

[0268] "아포토시스를 유도하는" 항체, 항체-약물 접합체 또는 다른 작용제는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수

축, 세포질 세망의 팽창, 세포 단편화, 및/또는 막 소포 (아포토시스체로 불림)의 형성에 의해 결정되는 바와 같은 프로그램화된 세포 사멸을 유도하는 것이다. 세포는 종양 세포, 예를 들어, 유방, 난소, 결장직장, 전립선, 간 및 폐이다. 아포토시스와 연관된 세포 사건을 평가하기 위한 다양한 방법이 이용가능하다. 예를 들어, 포스파티딜 세린 (PS) 전위는 아넥신 결합에 의해 측정될 수 있고; DNA 단편화는 DNA 래더링을 통해 평가될 수 있고; 핵/염색질 응축은 DNA 단편화와 함께, 저이배체 세포에서의 임의의 증가에 의해 평가될 수 있다.

[0269] 본원에 사용된 "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 호중구, 및 대식 세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식한 다음, 표적 세포의 용해를 유발하는 세포-매개 반응을 지칭한다. 관심 분자의 ADCC 활성은 시험관내 ADCC 검정, 예컨대 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 검정을 사용하여 평가할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 NK 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA), 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같이 동물 모델에서 평가될 수 있다.

[0270] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서 표적을 용해시키는 것을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 보체계의 제1 성분 (C1q)이, 동족 항원과 복합체화된 분자 (예를 들어, 항체)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163-171 (1997)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0271] "인간 이펙터 세포"는 1개 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 상기 세포는 Fc γ RIII를 발현하고 항원-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 이펙터 기능을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 대식세포, 호산구 및 호중구를 포함하나 이에 제한되지 않고, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. ADCC 활성을 갖는 항체는 전형적으로, IgG1 또는 IgG3 이소형이다. 이러한 ADCC-매개 항체는 또한, 비-ADCC 항체로부터의 가변 영역 또는 가변 영역 단편을 IgG1 또는 IgG3 이소형 불변 영역으로 조작함으로써 제조될 수 있다.

[0272] IV. PTK7 항체-약물 접합체의 용도

[0273] 본 발명의 항체 및 항체 약물-접합체는 치유적 치료 방법 및 진단적 치료 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는, 다양한 적용에 유용하다.

[0274] IV.A. 시험관내 적용

[0275] 본 발명은 PTK7 항체-약물 접합체를 사용하는 시험관내 방법을 제공한다. 예를 들어, 상기 개시된 항체는 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 PTK7-양성 암 세포와 특이적으로 결합하여 이러한 세포가 세포 샘플로부터 고갈되도록 하는 세포독성제 또는 다른 약물과 조합하여 사용될 수 있다. PTK7-발현 세포를 PTK7 항체-약물 접합체와 접촉시키는 것을 통해, 아포토시스를 유도하고/거나 세포 증식을 억제하는 방법이 또한 제공된다. 대표적인 시험관내 방법이 "PTK7 항체-약물 접합체의 특징화를 위한 기능적 검정"이란 표제 하에 상기 기재되어 있다.

[0276] 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 또한, PTK7 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 그의 능력에 기초하여 시험관내에서 PTK7-양성 세포를 검출하는데 유용성을 갖는다. PTK7-발현 세포를 검출하는 방법은 (a) 세포를 갖는 생물학적 샘플을 제조하는 단계; (b) PTK7 항체-약물 접합체를 시험관내에서 상기 생물학적 샘플과 접촉시키는 단계 (여기서, 약물은 검출가능한 표지임); 및 (c) PTK7 항체-약물 접합체의 결합을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0277] 본원에 개시된 PTK7 항체-약물 접합체는 또한, 종양 샘플에서 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는데 유용하다. 예를 들어, 상기 방법은 시험관내에서 종양 세포 집단 (여기서, 이러한 집단은 종양 개시 세포, 및 종양 개시 세포 이외의 종양 세포를 포함함)을 PTK7 항체-약물 접합체와 접촉시키고, 그에 의해 세포 집단에서 종양 개시 세포의 백분율이 감소되는 것인 단계를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "종양 개시 세포"는 또한, 종양 그 자체를 특징으로 하지 않는 다양한 혈액 악성종양의 암 줄기 세포를 지칭한다. 대표적인 종양 샘플은 종양 세포를 함유하는 임의의 생물학적 또는 임상 샘플, 예를 들어 조직 샘플, 생검, 혈액 샘플, 혈장, 타액, 소변, 정액 등을 포함한다.

[0278] IV.B. 치료적 적용

[0279] PTK7 연관 장애 또는 상태는 중피종, 간담도 (간 및 담관), 간세포성 암종, 원발성 또는 속발성 CNS 종양, 원발성 또는 속발성 뇌 종양, 폐암 (NSCLC 및 SCLC), 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 결장암, 직

장암, 항문부암, 위암, 위장암 (예컨대 위, 결장직장 및 십이지장암), 유방암 (예컨대 삼중-음성 유방암 (TNBC), 프로게스테론-수용체 양성 유방암 (PR+), 에스트로겐-수용체 양성 유방암 (ER+) 및 이중 양성 유방암), 자궁암, 난관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 고환암, 백혈병 (예컨대, 급성 골수성 백혈병 (AML) 및 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 골수성 백혈병), 림프구성 림프종, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신세포 암종, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 비-호지킨 림프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 부신피질암, 담낭암, 다발성 골수종, 담관암종, 섬유육종, 신경모세포종, 망막모세포종, 및 표 8 및 9에 제시된 PTK7-발현 세포 유형에 의해 나타내어지는 모든 암 또는 본원에 개시된 암 중 1종 이상의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0280] 본원에 사용된 어구 "유효량", "유효 투여량"은 어느 하나 이상의 유익하거나 목적하는 치료 결과를 달성하는데 필요한 약물, 화합물 또는 제약 조성물의 양을 지칭한다. 예방적 사용의 경우에, 유익하거나 목적하는 결과는 장애의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동적 증상, 그의 합병증 및 장애의 발생 동안 제시되는 중간 병리학적 표현형을 포함한, 장애의 위험을 제거 또는 감소시키거나, 중증도를 줄이거나 또는 장애의 개시를 지연시키는 것을 포함한다. 치료적 사용의 경우에, 유익하거나 목적하는 결과는 임상 결과, 예컨대 다양한 PTK7 연관 장애의 1종 이상의 증상의 발생률을 감소 또는 개선시키고/거나, 장애를 치료하는데 요구되는 다른 의약의 용량을 감소시키고/거나, 또 다른 의약의 효과를 증진시키고/거나, 환자의 PTK7 연관 장애의 진행을 지연시키는 것을 포함한다.

[0281] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 PTK7 발현과 연관된 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 대상체에서 PTK7 발현과 연관된 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체, 또는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 추가로, 대상체에서 PTK7 발현과 연관된 장애를 치료하기 위한 의약을 제조하는데 있어서의, 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체, 또는 제약 조성물의 용도를 제공한다.

[0282] 본 발명의 일부 측면에서, 대상체에서 PTK7 발현과 연관된 장애를 치료하는 방법은 상기 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 PTK7 항체-약물 접합체를 갖는 조성물 (예를 들어, 제약 조성물)의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. PTK7 발현과 연관된 장애는 비정상적인 PTK7 발현, 변경된 또는 이상 PTK7 발현, PTK7 과다발현, 및 증식성 장애 (예를 들어, 암)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0283] 본 발명의 한 측면에서, 상기 장애는 중피종, 간담도 (간 및 담관), 간세포성 암종, 원발성 또는 속발성 CNS 종양, 원발성 또는 속발성 뇌 종양, 폐암 (NSCLC 및 SCLC), 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 결장암, 직장암, 항문부암, 위암, 위장암 (예컨대 위, 결장직장 및 십이지장암), 유방암 (예컨대 삼중-음성 유방암 (TNBC), 프로게스테론-수용체 양성 유방암 (PR+), 에스트로겐-수용체 양성 유방암 (ER+) 및 이중 양성 유방암), 자궁암, 난관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 고환암, 백혈병 (예컨대 급성 골수성 백혈병 (AML) 및 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 골수성 백혈병), 림프구성 림프종, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신세포 암종, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 비-호지킨 림프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 부신피질암, 담낭암, 다발성 골수종, 담관암종, 섬유육종, 신경모세포종, 망막모세포종, 및 표 8 및 9에 제시된 PTK7-발현 세포 유형에 의해 나타내어지는 모든 암 또는 본원에 개시된 암 중 1종 이상의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 암이다.

[0284] 또 다른 실시양태에서, 항-PTK7 항체-약물 접합체를 사용하여 표적화하는데 적합한 암은 PTK7-발현 원발성 및 전이성 암, 예컨대 유방암 (예컨대 삼중-음성 유방암 (TNBC), 프로게스테론-수용체 양성 유방암 (PR+), 에스트로겐-수용체 양성 유방암 (ER+) 및 이중 양성 유방암); 난소암; 결장직장암; 식도암; 위암; 흑색종; 육종; 신장암; 췌장암; 전립선암; 간암, 예컨대 간세포성 암종 (HCC); 및 폐암, 예컨대 비소세포 폐암 (NSCLC) 및 소세포 폐암 (SCLC)을 포함한다.

[0285] 보다 구체적인 실시양태에서, 항-PTK7 항체-약물 접합체를 사용하여 표적화하는데 적합한 암은 PTK7-발현 원발성 및 전이성 암, 예컨대 유방암 (예컨대 삼중-음성 유방암 (TNBC), 프로게스테론-수용체 양성 유방암 (PR+), 에스트로겐-수용체 양성 유방암 (ER+) 및 이중 양성 유방암), NSCLC, 전립선암 및 식도암을 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항-PTK7 항체-약물 접합체를 사용하여 표적화하는데 적합한 암은 PTK7-발현 원발성 및 전이성 암, 예컨대 유방암 (예컨대 삼중-음성 유방암 (TNBC)) 및 NSCLC를 포함한다.

[0286] 본 발명의 일부 측면에서, 종양 성장 또는 진행의 억제를 필요로 하는 PTK7 발현 종양을 갖는 대상체에게 본원

에 기재된 바와 같은 PTK7 항체-약물 접합체를 갖는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 종양 성장 또는 진행을 억제하는 방법이 제공된다. 본 발명의 다른 측면에서, PTK7 발현 암 세포의 전이의 억제를 필요로 하는 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 PTK7 항체-약물 접합체를 갖는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 PTK7 발현 암 세포의 전이를 억제하는 방법이 제공된다. 본 발명의 다른 측면에서, PTK7 발현 종양의 퇴행의 유도를 필요로 하는 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 PTK7 항체-약물 접합체를 갖는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 PTK7 발현 종양의 퇴행을 유도하는 방법이 제공된다. 다른 측면에서, 본 발명은 상기 언급된 바와 같은 방법에 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체, 또는 제약 조성물을 제공한다. 다른 측면에서 본 발명은 상기 언급된 방법에 사용하기 위한 의약을 제조하는데 있어서의, 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체, 또는 제약 조성물의 용도를 제공한다.

[0287] 따라서, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체를 사용하여 치료하고자 하는 환자는 종양 기원 또는 조직학보다 오히려, 벌크 종양 샘플의 mRNA (qPCR) 및 풍부화된 표적 발현에 대해 선택된 환자 집단을 발생시키는 PTK7 항원의 상승된 발현을 포함하나 이에 제한되지 않는 바이오마커 발현에 기초하여 선택될 수 있다. 표적 발현은 세포 염색의 강도와 조합된 세포 염색의 수의 함수로서 측정될 수 있다. 예를 들어, PTK7의 높은 발현의 분류는 3+의 수준 (1부터 4의 척도로)에서 PTK7에 대해 양성인 것으로 면역조직화학적 염색에 의해 시험된 세포를 30% 초과 (즉, 40%, 50% 또는 60%)하여 갖는 환자를 포함하고, PTK7의 중간 수준의 발현은 1+ 내지 2+로 세포 염색되는 세포를 20% 초과하여 갖는 환자를 포함할 수 있다. 표적 발현은 또한, 본원에 기재된 바와 같은 종양 개시 세포 (TIC) 상에서의 PTK7 발현을 검출함으로써 측정할 수 있다.

[0288] 예를 들어 다중 약물 저항성 (MDR)에 기초한 종양의 특징화를 포함하는, PTK7의 발현 이외의 바이오마커를 또한 환자 선택에 사용할 수 있다. 인간 암의 거의 50%가 화학요법에 대해 완전히 저항성이거나, 또는 일시적으로만 반응하고, 그 후에는 통상적으로 사용되는 항암 약물에 의해 더 이상 영향을 받지 않는다. 이러한 현상은 MDR로서 지칭되고, 일부 종양 유형에 의해서는 선천적으로 나타나는 반면에, 다른 것은 화학요법 치료에 노출된 후 MDR을 획득한다. 약물 유출 펌프 P-당단백질은 세포독성 화학요법제와 연관된 대다수의 MDR을 매개한다. 특이적 MDR 메카니즘(들)을 특이적 종양 유형에서의 화학요법에 대한 저항성과 관련시키기 위해, 암 환자 종양 시편에 존재하는 MDR 메카니즘의 표현형 및 기능적 분석을 수행할 수 있다.

[0289] 암 성장 또는 비정상적 증식은 세포 내에서 보다 발달된 암 형태 또는 질환 상태로 변화된 것을 시사하는 수많은 지표 중 어느 하나를 지칭한다. 암 세포 또는 비-신생물성 증식성 장애의 세포의 성장 억제, 예컨대 지연된 종양 성장 및 전이의 억제는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 검정될 수 있다. 암 성장 억제를 측정하는 다른 지표는 암 세포 생존에 있어서의 감소, 종양 부피 또는 형태학에서의 감소 (예를 들어, 컴퓨터 단층촬영 (CT), 초음파검사 또는 다른 영상화 방법을 사용하여 결정된 바와 같음), 종양 혈관계의 파괴, 지연형 과민성 피부 검사에 있어서의 개선된 성능, 세포용해 T-림프구의 활성화에 있어서의 증가, 및 종양-특이적 항원의 수준에서의 감소를 포함한다.

[0290] 상기 개시된 치료 방법의 목적하는 결과는 일반적으로, 대조군 또는 기준선 측정과 비교하여 정량화가능한 측정치이다. 본원에 사용된 바와 같은, 상대적 용어, 예컨대 "개선시키다", "증가시키다" 또는 "감소시키다"는 대조군, 예컨대 본원에 기재된 치료의 개시 전 동일한 개체에서의 측정치, 또는 본원에 기재된 치료의 부재 하에 대조군 개체 (또는 다수의 대조군 개체)에서의 측정치에 대비한 값을 나타낸다. 대표적인 대조군 개체는 처리되는 개체와 동일한 형태의 과다증식성 장애를 앓고 있는 개체이고, (처리된 개체 및 대조군 개체의 장애의 병기가 대등하다는 것을 보장하기 위해) 처리되는 개체와 대략 동일한 연령이다.

[0291] 요법에 반응한 변화 또는 개선은 일반적으로 통계적으로 유의하다. 본원에 사용된 용어 "유의성" 또는 "유의한"은 2가지 이상의 실체 간의 비-무작위적인 연관성이 있다는 확률의 통계적 분석에 관한 것이다. 관계가 "유의하"거나 또는 "유의성"을 갖는지 여부를 결정하기 위해, 데이터를 통계적으로 조작한 것이 "p-값"일 수 있다. 사용자-정의 컷-오프 지점 아래에 속하는 p-값은 유의한 것으로 간주된다. 0.1 이하, 0.05 미만, 0.01 미만, 0.005 미만, 또는 0.001 미만의 p-값이 유의한 것으로 간주될 수 있다.

[0292] 표제 "III. PTK7 항체-약물 접합체의 특징화를 위한 기능적 검정" 하에 상기 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 또한 종양 개시 세포를 표적화하는 방법을 제공한다. 보다 특히, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 종양 개시 세포를 포함한 종양 세포의 성장, 증식 또는 생존을 고갈, 침묵, 중화, 제거 또는 억제시킬 수 있다.

[0293] 따라서, 본원에 개시된 PTK7 항체-약물 접합체는 또한, 종양 샘플에서 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는데 유용하다. 예를 들어, 상기 방법은 종양 세포 집단 (여기서, 이러한 집단은 종양 개시 세포, 및 종양 개시 세

포 이외의 종양 세포를 포함함)을 PTK7 항체-약물 접합체와 접촉시키고, 그에 의해 세포 집단에서 종양 개시 세포의 백분율이 감소되는 것인 단계를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "종양 개시 세포"는 또한, 종양 그 자체를 특징으로 하지 않는 다양한 혈액 악성종양의 암 줄기 세포를 지칭한다. 접촉시키는 단계는 시험관내에서 수행될 수 있으며, 여기서 종양 세포 집단은 상기 본원에 기재된 바와 같이 생물학적 샘플 내에 함유되어 있다. 대안적으로, 접촉시키는 단계는 PTK7 항체-약물 접합체를 대상체에게 투여한 후에 일어나는 바와 같이 생체내에서 수행될 수 있다.

[0294] IV.C. 생체내 검출 및 진단

[0295] 또 다른 측면에서, PTK7 발현과 연관된 장애를 검출, 진단 및/또는 모니터링하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 PTK7 항체는 검출가능한 모이어티, 예컨대 영상화제 및 효소-기질 표지로 표시될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 항체는 또한, 생체내 진단 검정, 예컨대 생체내 영상화 (예를 들어, PET 또는 SPECT), 또는 염색 시약에 사용될 수 있다.

[0296] PTK7 항체-약물 접합체 (여기서, 약물은 검출가능한 표지임)를 대상체에게 투여한 후, 및 결합을 위한 충분한 시간 후, 상기 항체에 의해 결합된 PTK7-발현 세포의 생체분포를 시각화할 수 있다. 상기 개시된 진단 방법은 치료 방법과 조합되어 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 검출 및 요법의 이중 목적을 위해 투여될 수 있다.

[0297] 대표적인 비-침습적 검출 방법은 섬광조영 (예를 들어, SPECT (단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영), PET (양전자 방출 단층촬영), 감마 카메라 영상화, 및 직선 스캐닝), 자기 공명 영상화 (예를 들어, 통상적인 자기 공명 영상화, 자화 전달 영상화 (MTI), 양성자 자기 공명 분광분석법 (MRS), 확산-가중 영상화 (DWI) 및 기능적 MR 영상화 (fMRI)), 및 초음파를 포함한다.

[0298] IV.D. 제제

[0299] 본 발명은 추가로, 본원에 개시된 임의의 PTK7 항체-약물 접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 추가로, 조성물은 1종 초과 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체 (예를 들어, PTK7의 상이한 에피토프를 인식하는 PTK7 항체의 혼합물)를 포함할 수 있다. 다른 예시적인 조성물은 동일한 에피토프 (들)를 인식하는 1종 초과 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체, 또는 PTK7 (예를 들어, 인간 PTK7)의 상이한 에피토프에 결합하는 상이한 종의 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체를 포함한다.

[0300] 본 발명에 사용된 조성물은 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington: The Science and practice of Pharmacy 21st Ed., 2005, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover)를 동결건조 제제 또는 수용액 형태로 추가로 포함할 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트란; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN)TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "제약상 허용되는 염"은 분자 또는 거대분자의 제약상 허용되는 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 제약상 허용되는 부형제는 본원에 추가로 기재되어 있다.

[0301] PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체의 다양한 제제가 투여에 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체는 순수하게 투여될 수 있다. PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체, 및 제약상 허용되는 부형제는 다양한 제제 내에 존재할 수 있다. 제약상 허용되는 부형제는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 약리학상 유효한 물질의 투여를 용이하게 하는 비교적 불활성 물질이다. 예를 들어, 부형제는 형태 또는 점도도를 제공할 수 있거나 또는 희석제로서 작용할 수 있다. 적합한 부형제는 안정화제, 습윤제 및 유화제, 다양한 오스몰농도를 위한 염, 캡슐화제, 완충제, 및 피부 침투 증강제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 부형제 뿐만 아니라 비경구 및 경구 약물 전달을 위한 제제가 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000]에 제시되어 있다.

- [0302] 본 발명의 일부 측면에서, 이들 작용제는 주사에 의한 투여 (예를 들어, 복강내로, 정맥내로, 피하로, 근육내로 등)를 위해 제제화된다. 따라서, 이들 작용제는 제약상 허용되는 비히클, 예컨대 염수, 링거액, 텍스트로스 용액 등과 조합될 수 있다. 특정한 투여 요법, 즉 용량, 시기 및 반복은 특정한 개체 및 그러한 개체의 병력에 따라 달라질 것이다.
- [0303] 본 발명에 따라 사용되는 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체의 치료 제제는 목적하는 순도를 갖는 항체를 임의적인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005)와 혼합하여, 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 저장하기 위해 제조한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 염, 예컨대 염화나트륨; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈™, 플루로닉스™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다.
- [0304] PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체를 함유하는 리포솜은 관련 기술분야에 공지된, 예컨대 문헌 [Eppstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030-4034 (1980)]; 및 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545에 기재된 방법에 의해 제조된다. 순환 시간이 증진된 리포솜은 미국 특허 번호 5,013,556에 개시되어 있다. 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함한 지질 조성물을 사용하는 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 규정된 세공 크기의 필터를 통해 압출시켜, 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 생성한다.
- [0305] 활성 성분은 또한, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노-캡슐) 또는 마크로에멀전 내의, 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 각각 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005]에 개시되어 있다.
- [0306] 지속-방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산과 7-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로구체), 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.
- [0307] 생체내 투여에 사용하고자 하는 제제는 멸균이어야 한다. 이는 예를 들어, 멸균 여과 막을 통해 여과시킴으로써 용이하게 달성된다. 치료 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체 조성물은 일반적으로, 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 배치된다.
- [0308] 본 발명에 따른 조성물은 단위 투여 형태, 예컨대 경구, 비경구 또는 직장 투여용, 또는 흡입 또는 취입에 의한 투여용의, 정제, 환제, 캡슐, 분말, 과립, 용액 또는 현탁액, 또는 좌제일 수 있다.
- [0309] 고체 조성물, 예컨대 정제를 제조하기 위해, 주요 활성 성분을 제약 담체, 예를 들어 통상적인 정제화 성분, 예컨대 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 소르비톨, 활석, 스테아르산, 스테아르산마그네슘, 인산이칼슘 또는 검, 및 다른 제약 희석제, 예를 들어 물과 혼합하여, 본 발명의 화합물 또는 그의 비독성 제약상 허용되는 염의 균질 혼합물을 함유하는 고체 예비제제 조성물을 형성한다. 이들 예비제제 조성물을 균질한 것으로서 지칭하는 경우에, 활성 성분이 조성물 전반에 걸쳐 균일하게 분포되어 이러한 조성물이 동등하게 유효한 단위 투여 형태, 예컨대 정제, 환제 및 캡슐로 용이하게 세분될 수 있다는 것을 의미한다. 이어서, 이러한 고체 예비제제 조성

물을, 본 발명의 활성 성분을 0.1 내지 약 500 mg 함유하는 상기 기재된 유형의 단위 투여 형태로 세분한다. 신규 조성물의 정제 또는 환제를 코팅하거나 또는 달리 배합하여, 지속 작용의 장점을 제공하는 투여 형태를 제공할 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 환제는 내부 투여 및 외부 투여 성분을 포함할 수 있고, 후자는 전자를 덮는 외피 형태이다. 2개의 성분은 위에서의 붕괴에 저항하는 작용을 하고 내부 성분이 무손상 상태로 십이지장을 통과되게 하거나 또는 방출 지연될 수 있도록 하는 장용 층에 의해 분리될 수 있다. 이러한 장용 층 또는 코팅에 다양한 물질을 사용할 수 있고, 이러한 물질은 수많은 중합체 산, 및 중합체 산과 셀락, 세틸 알콜 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 물질의 혼합물을 포함한다.

[0310] 적합한 표면-활성제는 특히, 비이온성 작용제, 예컨대 폴리옥시에틸렌소르비탄 (예를 들어, 트윈™ 20, 40, 60, 80 또는 85) 및 다른 소르비탄 (예를 들어 스팬(Span)™ 20, 40, 60, 80 또는 85)을 포함한다. 표면-활성제를 함유하는 조성물은 편리하게, 0.05 내지 5%의 표면-활성제를 포함할 것이고, 0.1 내지 2.5%일 수 있다. 다른 성분, 예를 들어 필요에 따라, 만니톨 또는 다른 제약상 허용되는 비히클이 첨가될 수 있다는 것이 인지될 것이다.

[0311] 적합한 에멀전은 상업적으로 입수가 가능한 지방 에멀전, 예컨대 인트라리피드(INTRALIPID)™, 리포신(LIPOSYN)™, 인포뉴트롤(INFONUTROL)™, 리포펀딘(LIPOFUNDIN)™ 및 리피피산(LIPIPHYSAN)™을 사용하여 제조할 수 있다. 활성 성분을 미리 혼합된 에멀전 조성물에 용해시킬 수 있거나 또는 대안적으로, 이를 오일 (예를 들어, 대두 오일, 홍화 오일, 목화씨 오일, 참깨 오일, 옥수수 오일 또는 아몬드 오일)에 용해시킬 수 있고, 인지질 (예를 들어, 난 인지질, 대두 인지질 또는 대두 레시틴) 및 물과의 혼합시 에멀전이 형성된다. 다른 성분, 예를 들어 글리세롤 또는 글루코스를 부가하여, 에멀전의 장성을 조정할 수 있다는 것이 인지될 것이다. 적합한 에멀전은 전형적으로, 20% 이하의 오일, 예를 들어 5 내지 20%의 오일을 함유할 것이다. 지방 에멀전은 0.1 내지 1.0 μ m, 특히 0.1 내지 0.5 μ m의 지방 액적을 포함할 수 있고, 5.5 내지 8.0의 범위의 pH를 가질 수 있다.

[0312] 에멀전 조성물은 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체를 인트라리피드™ 또는 그의 성분 (대두 오일, 난 인지질, 글리세롤 및 물)과 혼합함으로써 제조될 수 있다.

[0313] 흡입 또는 취입용 조성물은 제약상 허용되는 수성 또는 유기 용매, 또는 그의 혼합물 중의 용액 및 현탁액, 및 분말을 포함한다. 액체 또는 고체 조성물은 상기 제시된 바와 같은 적합한 제약상 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 조성물은 국부 또는 전신 효과를 위한 구강 또는 비강 호흡 경로에 의해 투여된다. 바람직하게는 멸균 제약상 허용되는 용매 중의 조성물은 기체의 사용에 의해 분무될 수 있다. 분무되는 용액은 분무 장치로부터 직접적으로 호흡될 수 있거나, 또는 이러한 분무 장치를 페이스 마스크, 텐트 또는 간헐적 양압 호흡 기계에 부착시킬 수 있다. 용액, 현탁액 또는 분말 조성물은 제제를 적절한 방식으로 전달하는 장치로부터, 바람직하게 경구로 또는 비강으로 투여될 수 있다.

[0314] 본 발명은 또한, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 본원에 기재된 바와 같은 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체를 포함하는 1개 이상의 용기, 및 본원에 기재된 본 발명의 임의의 방법에 따르는 사용 지침서를 포함한다. 일반적으로, 이러한 지침서는 상기 언급된 치유적 치료를 위해 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체를 투여하는 것에 관한 설명을 포함한다.

[0315] 본원에 기재된 바와 같은 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체의 사용과 관련한 지침서는 일반적으로, 의도한 처치를 위한 투여량, 투여 스케줄 및 투여 경로에 관한 정보를 포함한다. 용기는 단위 용량, 벌크 패키지 (예를 들어, 다중-용량 패키지) 또는 서브유닛 용량일 수 있다. 본 발명의 키트에 공급된 지침서는 전형적으로, 표지 또는 패키지 삽입물 (예를 들어, 키트에 포함된 종이 시트) 상에 작성된 지침서이지만, 기계-판독가능한 지침서 (예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크 상에 수반된 지침서)가 또한 허용된다.

[0316] 본 발명의 키트는 적합하게 포장되어 있다. 적합한 포장은 바이알, 병, 자르, 가요성 포장 (예를 들어, 밀봉된 마일라 또는 플라스틱 백) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 장치, 예컨대 흡입기, 비강 투여 장치 (예를 들어, 아토마이저) 또는 주입 장치, 예컨대 미니펌프와 조합하여 사용하기 위한 포장이 또한 고려된다. 키트는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 용기는 또한, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 적어도 1종의 활성제는 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체이다. 용기는 제2 제약 활성제를 추가로 포함할 수 있다.

[0317] 키트는 임의로, 추가의 성분, 예컨대 완충제 및 해석 정보를 제공할 수 있다. 정상적으로, 키트는 용기, 및 이

러한 용기 상에 있거나 이와 회합된 표지 또는 패키지 삽입물(들)을 포함한다.

[0318] IV.E. 용량 및 투여

[0319] 시험관내 및 생체내 적용을 위해, PTK7 항체-약물 접합체는 유효 투여량으로 제공 또는 투여된다. 임상 환경에서, 약물, 화합물, 또는 제약 조성물의 유효 투여량이 직접 또는 간접적으로 예방적 또는 치료적 치료를 달성하는데 충분한 양이다. 유효 투여량은 1회 이상 투여로 투여될 수 있다. 약물, 화합물, 또는 제약 조성물의 유효 투여량은 또 다른 약물, 화합물, 또는 제약 조성물과 연계해서 달성될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 따라서, "유효 투여량"은 1종 이상의 치료제를 투여하는 맥락에서 고려될 수 있고, 단일 작용제는 이것이 1종 이상의 다른 작용제와 연계해서 목적하는 결과를 달성할 수 있거나 또는 달성되는 경우에, 유효량으로 제공되는 것으로 간주될 수 있다. 상기 개시된 PTK7 항체-약물 접합체를 사용하여 PTK7-양성 세포를 검출하기 위해, 본 발명의 조성물의 검출가능한 양을 대상체에게 투여하고, 즉 상기 접합체의 존재가 시험관내 또는 생체내에서 결정될 수 있게 하는 접합체의 용량을 투여한다.

[0320] 예를 들어, 암 보유 대상체에게 투여되는 경우에, 유효량은 암 세포 세포용해, 암 세포 증식의 억제, 암 유발 세포 아포토시스, 암 세포 항원의 감소, 종양 성장 지연, 및/또는 전이의 억제를 포함하는 항암 활성을 도출하기에 충분한 양을 포함한다. 종양 수축이 효능에 대한 임상 대용물 마커로서 널리 허용된다. 효능에 대해 널리 허용되는 또 다른 마커는 무진행 생존이다.

[0321] PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체는 임의의 적합한 경로를 통해 개체에게 투여될 수 있다. 본원에 기재된 예는 사용가능한 기술을 제한하는 것이 아니라 이의 예시라는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해해야 할 것이다. 따라서, 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체는 공지된 방법에 따라서, 예컨대 정맥내 투여, 예를 들어 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 두개내, 경피, 피하, 관절내, 설하, 활막내, 취입을 통해, 척추강내, 경구, 흡입 또는 국소 경로에 의해 개체에게 투여된다. 투여는 전신, 예를 들어 정맥내 투여이거나 또는 국부적일 수 있다. 액체 제제를 위한 상업적으로 입수가능한 네블라이저, 예를 들어 제트 네블라이저 및 초음파 네블라이저가 투여에 유용하다. 액체 제제는 직접 분무될 수 있고, 동결건조 분말은 재구성 후에 분무될 수 있다. 대안적으로, PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체는 플루오로카본 제제 및 계량 용량 흡입기를 사용하여 에어로졸화될 수 있거나, 또는 동결건조되고 분쇄된 분말로서 흡입될 수 있다.

[0322] 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체는 부위-특이적 또는 표적화된 국부 전달 기술을 통해 투여된다. 부위-특이적 또는 표적화된 국부 전달 기술의 예는 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체의 다양한 이식가능한 데포 공급원, 또는 국부 전달 카테터, 예컨대 주입 카테터, 유지 카테터, 또는 바늘 카테터, 합성 이식편, 외막 랩, 셉트 및 스텐트, 또는 다른 이식가능한 장치, 부위 특이적 담체, 직접 주사 또는 직접 적용을 포함한다. 예를 들어, PCT 국제 공개 번호 WO 2000/53211 및 미국 특허 번호 5,981,568을 참조한다.

[0323] 본원에 기재된 바와 같은 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체는 주사 (예를 들어, 복강내로, 정맥내로, 피하로, 근육내로 등)에 의한 것을 포함한, 임의의 적합한 방법을 사용하여 투여될 수 있다. PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체는 또한, 본원에 기재된 바와 같은 흡입을 통해 투여될 수 있다. 일반적으로, PTK7 항체 및 PTK7 항체-약물 접합체를 투여하는 경우, 초기 후보 투여량은 약 2 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 목적상, 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라, 약 3 µg/kg 내지 30 µg/kg 내지 300 µg/kg 내지 3 mg/kg, 내지 30 mg/kg, 내지 100 mg/kg 또는 그 초과 범위일 것이다. 예를 들어, 약 1 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 및 약 25 mg/kg의 투여량을 사용할 수 있다. 장애에 따라 수일에 걸쳐 또는 그 보다 더 길게 반복 투여하는 경우에, 증상의 목적하는 억제가 일어나거나 또는 충분한 치료 수준이 달성될 때까지 치료를 지속하여, 예를 들어 종양 성장/진행 또는 암 세포의 전이를 억제 또는 지연시킨다. 예시적인 투여 요법은 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체의 약 2 mg/kg의 초기 용량을 투여한 다음, 매주 약 1 mg/kg의 유지 용량을 투여하거나 또는 격주마다 약 1 mg/kg의 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 다른 예시적인 투여 요법은 용량을 증가시키면서 투여하는 것을 포함한다 (예를 들어, 1 mg/kg의 초기 용량을 투여하고, 매주 또는 그 보다 더 긴 기간 동안 1회 이상의 더 높은 용량으로 점차적으로 증가시켜 투여함). 진료가 달성하기를 원하는 약 동학적 붕괴 패턴에 따라 다른 투여 요법이 유용할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 일부 측면에서, 1주에 1회 내지 4회 투여하는 것이 고려된다. 다른 측면에서, 1개월에 1회, 또는 격월로 1회, 또는 3개월 마다 1회 투여하는 것 뿐만 아니라 매주, 격주 및 3주마다 투여하는 것이 고려된다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링될 수 있다. 투여 요법 (사용된 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체 포함)은 시간의 경과에 따라 달라질 수 있다.

- [0324] 본 발명의 목적상, PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체의 적절한 투여량은 사용된 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체 (또는 그의 조성물), 치료하고자 하는 증상의 유형 및 중증도, 작용제가 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 상기 작용제에 대한 반응, 투여된 작용제에 대한 환자의 클리어런스율, 및 담당 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 임상의는 목적하는 결과 및 그 이상의 것을 달성하는 투여량에 도달할 때까지 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체를 투여할 수 있다. 용량 및/또는 빈도는 치료 과정에 따라 달라질 수 있지만, 일정하게 유지될 수도 있다. 실험적 고려 사항, 예컨대 반감기가 일반적으로, 투여량을 결정하는데 기여할 것이다. 예를 들어, 인간 면역계와 상용가능한 항체, 예컨대 인간화 항체 또는 완전 인간 항체를 사용하여, 이러한 항체의 반감기를 연장시키고 항체가 숙주의 면역계에 의해 공격받는 것을 방지할 수 있다. 투여 빈도는 요법의 과정에 따라 결정 및 조정될 수 있고, 반드시 아니지만 일반적으로, 증상의 치료 및/또는 억제 및/또는 호전 및/또는 지연, 예를 들어 종양 성장 억제 또는 지연 등에 기초한다. 대안적으로, PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체의 지속적인 연속적 방출 제제가 적절할 수 있다. 지속 방출을 달성하기 위한 다양한 제제 및 장치는 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0325] 본 발명의 일부 측면에서, PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체에 대한 투여량은 이러한 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체를 1회 이상 투여한 개체에서 실험적으로 결정될 수 있다. PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체의 증분 투여량이 개체에게 제공된다. 효능을 평가하기 위해, 장애의 지표를 추적할 수 있다.
- [0326] 본 발명의 방법에 따라 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체를 투여하는 것은, 예를 들어 수용자의 생리학적 장애, 투여 목적이 치료적 또는 예방적인지의 여부, 및 숙련된 진료의에게 공지된 다른 인자에 따라 연속적 또는 간헐적일 수 있다. PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체의 투여는 본질적으로, 미리 선택된 기간에 걸쳐 연속적일 수 있거나 또는 일련의 이격된 용량일 수 있다.
- [0327] IV.F. 조합 요법
- [0328] 본 발명의 일부 측면에서, 본원에 기재된 방법은 대상체를 추가의 형태의 요법으로 치료하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 추가의 형태의 요법은 화학요법, 방사선, 수술, 호르몬 요법, 및/또는 추가의 면역요법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 추가의 항암 요법이다.
- [0329] 상기 개시된 PTK7 항체-약물 접합체는 초기 치료로서 투여될 수 있거나, 또는 통상적인 요법에 비반응성인 장애를 치료하기 위해 투여될 수 있다. 또한, PTK7 항체-약물 접합체는 다른 요법 (예를 들어, 외과적 절제, 방사선, 추가의 항암 약물 등)과 조합되어 사용됨으로써, 추가적 또는 증강된 치료 효과를 도출할 수 있고/거나 일부 항암제의 간세포독성을 감소시킬 수 있다. 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 추가의 작용제와 공-투여 또는 공동-제제화될 수 있거나, 또는 추가의 작용제와 임의의 순서로의 연속 투여를 위해 제제화될 수 있다.
- [0330] 조합 요법에 유용한 대표적인 작용제는 부제 "약물" 하에 PTK7 항체-약물 접합체의 제조에 유용한 것으로서 상기 본원에 기재된 임의의 약물을 포함한다. 본 발명의 PTK7 항체-약물 접합체는 또한 다른 치료 항체 및 항체-약물 접합체와 조합되어 사용될 수 있고, 이는 상기 개시된 항-PTK7 항체 이외의 항-PTK7 항체 뿐만 아니라 상이한 항원을 표적화하는 항체 및 접합체를 포함한다. 단독으로 또는 항체-약물 접합체로서 사용될 수 있는 대표적인 항체는 항-5T4 항체 (예를 들어, A1, A2, 및 A3), 항-CD19 항체, 항-CD20 항체 (예를 들어, 리툭산(RITUXAN)®, 제발린(ZEVALIN)®, 벅사르(BEXXAR)®), 항-CD22 항체, 항-CD33 항체, 항-CD33 항체-약물 접합체 (예를 들어, 밀로타르그(MYLOTARG)®), 항-루이스 Y 항체 (예를 들어, Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), 항-HER-2 항체 (예를 들어, 헤르셉틴(HERCEPTIN)® (트라스투주맵), MDX-210, 옴니타르그(OMNITARG)® (페르투주맵, rhuMab 2C4)), 항-CD52 항체 (예를 들어, 캄파트(CAMPATH)®), 항-EGFR 항체 (예를 들어, 에르비투스(ERBITUX)® (세특시맵), ABX-EGF (파니투무맵)), 항-VEGF 항체 (예를 들어, 아바스틴(AVASTIN)® (베바시주맵)), 항-DNA/히스톤 복합 항체 (예를 들어, ch-TNT-1/b), 항-CEA 항체 (예를 들어, CEA-Cide, YMB-1003) hLM609, 항-CD47 항체 (예를 들어, 6H9), 항-VEGFR2 (또는 키나제 삽입 도메인-함유 수용체, KDR) 항체 (예를 들어, IMC-1C11), 항-Ep-CAM 항체 (예를 들어, ING-1), 항-FAP 항체 (예를 들어, 시브로투주맵)), 항-DR4 항체 (예를 들어, TRAIL-R), 항프로게스테론 수용체 항체 (예를 들어, 2C5), 항-CA19.9 항체 (예를 들어, 기바렉스(GIVAREX)®) 및 항-피브린 항체 (예를 들어, MH-1)를 포함한다.
- [0331] 상기 개시된 PTK7 항체-약물 접합체는 또한, 치료 요법의 일부로서 세포독성제의 1종 이상의 조합물과 함께 투여될 수 있다. 이러한 목적에 유용한 세포독성제는 CHOPP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 및 프레드니손); COP (시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손); CAP-BOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 프로카르바진, 블레오마이신, 빈크리스틴 및 프레드니손); m-BACOD (메토트렉세이트, 블레오마이신, 독소루비신, 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 텍

사메타손, 및 류코보린); ProMACE-MOPP (프레드니손, 메토티렉세이트, 독소루비신, 시클로포스파미드, 에토포시드, 류코보린, 메클로에타민, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); ProMACE-CytaBOM (프레드니손, 메토티렉세이트, 독소루비신, 시클로포스파미드, 에토포시드, 류코보린, 시타라빈, 블레오마이신 및 빈크리스틴); MACOP-B (메토티렉세이트, 독소루비신, 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손, 블레오마이신 및 류코보린); MOPP (메클로에타민, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); ABVD (아드리아마이신/독소루비신, 블레오마이신, 빈블라스틴 및 다카르바진); ABV (아드리아마이신/독소루비신, 블레오마이신, 빈블라스틴)와 교대하는 MOPP (메클로에타민, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); ABVD (아드리아마이신/독소루비신, 블레오마이신, 빈블라스틴 및 다카르바진)와 교대하는 MOPP (메클로에타민, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); ChIVPP (클로람부실, 빈블라스틴, 프로카르바진, 프레드니손); IMVP-16 (이포스파미드, 메토티렉세이트, 에토포시드); MIME (메틸-개그, 이포스파미드, 메토티렉세이트, 에토포시드); DHAP (텍사메타손, 고-용량 시타라빈 및 시스플라틴); ESHAP (에토포시드, 메틸프레디솔론, HD 시타라빈, 및 시스플라틴); CEPP(B) (시클로포스파미드, 에토포시드, 프로카르바진, 프레드니손 및 블레오마이신); CAMP (로무스틴, 미톡산트론, 시타라빈 및 프레드니손); 및 CVP-1 (시클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손); DHAP (시스플라틴, 고-용량 시타라빈 및 텍사메타손); CAP (시클로포스파미드, 독소루비신, 시스플라틴); PV (시스플라틴, 빈블라스틴 또는 빈데신); CE (카르보플라틴, 에토포시드); EP (에토포시드, 시스플라틴); MVP (미토마이신, 빈블라스틴 또는 빈데신, 시스플라틴); PFL (시스플라틴, 5-플루오로우라실, 류코보린); IM (이포스파미드, 미토마이신); IE (이포스파미드, 에토포시드); IP (이포스파미드, 시스플라틴); MIP (미토마이신, 이포스파미드, 시스플라틴); ICE (이포스파미드, 카르보플라틴, 에토포시드); PIE (시스플라틴, 이포스파미드, 에토포시드); 비오렐빈 및 시스플라틴; 카르보플라틴 및 파클리탁셀; CAV (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴); CAE (시클로포스파미드, 독소루비신, 에토포시드); CAVE (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 에토포시드); EP (에토포시드, 시스플라틴); 및 CMCv (시클로포스파미드, 메토티렉세이트, 로무스틴, 빈크리스틴)를 포함한다.

[0332] PTK7 항체-약물 접합체는 전신 항암 약물, 예컨대 에피틸론 (BMS-247550, Epo-906), 탁산의 재제제 (아브락산 (Abraxane), 크시오탁스(Xyotax)), 마이크로튜블린 억제제 (MST-997, TTI-237)와 조합되어 사용되거나, 또는 표적화된 세포독소, 예컨대 CMD-193 및 SGN-15와 조합되어 사용될 수 있다. 추가의 유용한 항암제는 탁소테레®, 타르세마(TARCEVA)®, 겐자르(GEMZAR)® (젠티타빈), 5-FU, 아바스틴(AVASTIN)®, 에르비투스(ERBITUX)®, 트로박스(TROVAX)®, 아나투모맵 메페나톡스, 레트라졸, 도세탁셀, 및 안트라시클린을 포함한다.

[0333] 조합 요법의 경우에, PTK7 항체-약물 접합체 및/또는 1종 이상의 추가의 치료제 또는 진단제는 의도한 요법 또는 진단의 성능에 적합한 임의의 시간 프레임 내에 투여된다. 따라서, 단일 작용제는 실질적으로 동시에 (즉, 단일 제제로서 또는 수분 또는 수시간 내에) 투여될 수 있거나 또는 임의의 순서로 연속적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 단일 작용제 치료는 서로 약 1년 이내, 예컨대 약 10, 8, 6, 4, 또는 2개월 이내, 또는 4, 3, 2 또는 1주(들) 이내, 또는 약 5, 4, 3, 2 또는 1일(들) 이내에 투여될 수 있다. PTK7 항체-약물 접합체를 제2 치료제와 조합하여 투여하는 것은, 바람직하게는 어느 하나의 단독 투여보다 더 큰 효과를 도출한다.

[0334] 본 발명의 일부 측면에서, 추가의 형태의 요법은 본원에 기재된 바와 같은 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체에 더하여 1종 이상의 치료제를 투여하는 것을 포함한다. 치료제는 제2 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 항-HER2 항체, 항-CD25 항체, 및/또는 항-CD20 항체), 혈관신생 억제제, 세포독성제, 항염증제 (예를 들어, 파클리탁셀, 도세탁셀, 시스플라틴, 독소루비신, 프레드니손, 미토마이신, 프로게스테론, 타목시펜, 또는 플루오로우라실)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0335] 본 발명의 일부 측면에서, 1개 초과 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체가 존재할 수 있다. 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5개의 상이한 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체가 존재할 수 있다. 일반적으로, 이들 PTK7 항체 또는 PTK7 항체-약물 접합체는 서로에 대해 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, 다음 PTK7 항체 중 1개 이상을 사용할 수 있다: PTK7 상의 1개의 에피토프에 대해 지시된 제1 PTK7 항체, 및 PTK7 상의 상이한 에피토프에 대해 지시된 제2 PTK7 항체.

[0336] 개시된 조합 요법은 상승작용적 치료 효과, 즉 그들 개개의 효과 또는 치료 결과의 합보다 더 큰 효과를 도출할 수 있다. 측정가능한 치료 결과는 본원에 기재되어 있다. 예를 들어, 상승작용적 치료 효과는 단일 작용제에 의해 도출된 치료 효과 또는 주어진 조합의 단일 작용제에 의해 도출된 치료 효과의 합보다 적어도 약 2-배 더 크거나, 또는 적어도 약 5-배 더 크거나, 또는 적어도 약 10-배 더 크거나, 또는 적어도 약 20-배 더 크거나, 또는 적어도 약 50-배 더 크거나, 또는 적어도 약 100-배 더 큰 효과일 수 있다. 상승작용적 치료 효과는 또한, 단일 작용제에 의해 도출된 치료 효과 또는 주어진 조합의 단일 작용제에 의해 도출된 치료 효과의 합과 비교하여 적어도 10%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도

60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 100% 또는 그 초과의 치료 효과에서의 증가로서 관찰될 수 있다. 상승작용적 효과는 또한, 이들을 조합하여 사용하는 경우에 치료제의 감소된 투여를 허용하는 효과이다.

[0337] 상세한 설명 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 용어 "약"은 달리 표시되지 않는 한, 용어 "약" 다음의 값의 +/- 1% 값을 의미한다.

[0338] 실시예

[0339] 하기 실시예는 단지 예시 목적으로 제공되고, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 실제로, 본원에 제시되고 기재된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형이 상기 언급된 설명으로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 이는 첨부된 청구범위의 범위 내에 속한다.

[0340] 실시예 1

[0341] 항-PTK7 항체의 생성 및 인간화

[0342] 무린 항체의 형태로의 PTK-7 항체를 관련 기술분야에 공지된 절차에 따라 및 PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943에 기재된 바와 같이 생산하였다. 생성된 무린 항체를 상보성 결정 영역 (CDR) 그래프팅을 사용하여 인간화하였다. 기능적 인간 배선 유전자에 관한 서열 및 구조 유사성에 기초하여, 중쇄 및 경쇄에 대한 인간 프레임워크를 선택하였다. 상기 문헌 [Chothia et al.]에 기재된 바와 같이, 마우스 정규 CDR 구조를 동일한 정규 구조를 갖는 인간 후보와 비교함으로써 구조적 유사성을 평가하였다.

[0343] 보다 특히, PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943에 기재된, 본원에서 mu23, mu24, 및 mu58로 지칭된 무린 항체를, 컴퓨터 보조 CDR-그래프팅 방법 (아비시스(Abysis) 데이터베이스, 유씨엘 비즈니스 피아씨(UCL Business Pic.)) 및 표준 분자 공학 기술을 사용하여 인간화하여, 인간화 mu23, mu24, 및 mu58 (이하 각각 hu23, hu24, 및 hu58)을 제공하였다. 마우스 프레임워크 서열 및 그의 정규 구조와 가장 높은 서열 상동성에 기초하여 가변 영역의 인간 프레임워크 영역을 선택하였다. 분석 목적으로, CDR 도메인 각각에 대한 아미노산의 할당은 카바트 등의 넘버링에 따랐다. 최적의 인간화 항체를 생성하기 위해 몇몇 인간화 항체 변이체를 제조하였고, 인간화 항체는 일반적으로 인간 프레임워크 영역과 회합된 마우스 하이브리도마로부터 항원-결합 상보성 결정 영역 (CDR)을 보유하였다. hu23, hu24, 및 hu58 mAb는 비아코어(BIACORE)® 시스템을 사용한 측정 시, 인간 PTK7 항원에 그의 무린 대응물과 유사한 친화도로 결합하였다.

[0344] 관련 기술분야에서 인식되는 기술을 사용하여 분자 공학 절차를 수행하였다. 제조업자의 프로토콜 (트리졸 (TRIZOL)® 플러스 RNA 정제 시스템, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies))에 따라 하이브리도마로부터 전체 mRNA를 추출하였다. 각각의 하이브리도마를 증폭시키기 위해 설계된 서열 특이적 5' 리더 서열 프라이머를 3' 인간 C γ 1 프라이머와 조합하여 사용하여 각각의 인간화 항체의 가변 영역을 증폭시키고 클로닝하였다. 유사하게, 각각의 V κ 영역을 증폭시키기 위해 특이적으로 설계된 5' V κ 리더 서열을 인간 카파 불변 영역에 특이적인 단일 역방향 프라이머와 조합하여 사용하여 카파 경쇄를 증폭시키고 클로닝하였다. 증폭된 단편을 키메라 인간 감마1/카파 쇄로서 클로닝하고, 이는 각각 인간화 mAb에 대한 벤치 마크로서의 역할을 하였다.

[0345] 뉴클레오타이드 서열 정보로부터, 무린 항체 mu23, mu24, 및 mu58의 중쇄 및 경쇄의 V, D 및 J 유전자 절편에 관한 데이터를 획득하였다. 서열 데이터에 기초하여, 재조합 모노클로날 항체의 클로닝을 위해 항체의 Ig VH 및 V κ 쇄의 리더 서열에 특이적인 신규한 프라이머 세트를 설계하였다. 이어서 V-(D)-J 서열을 마우스 Ig 배선 서열과 정렬하였다.

[0346] mu23의 중쇄 유전자를 VH3609 (V), DSP2.3 (D) 및 JH3으로서 확인하였다. mu24의 중쇄 유전자를 VHJ558 (V), DSP2.7 (D) 및 JH4로서 확인하였다. mu58의 중쇄 유전자를 IGHV 4-1 (V), DFL 16.1 (D) 및 JH4로서 확인하였다. 모든 3개의 경쇄는 κ 부류였다. 경쇄 유전자를 mu23의 경우에 IGKV14-111 및 JK5로서, mu24의 경우에 IGKV3-5 및 JK1로서, 및 mu58의 경우에 IGKV17-121 및 JK4 배선 서열로서 확인하였다. 이들 결과를 하기 표 2에 요약한다.

[0347] <표 2>

클론	VH	DH	JH	VL	JL
mu23	VH3609	DSP2.3	JH3	IGKV14-111	JK5
mu24	VHJ558	DSP2.7	JH4	IGKV3-5	JK1
mu58	IGHV4-1	DFL16.1	JH4	IGKV17-121	JK4

[0348]

[0349] 모든 3개의 클론으로부터 수득된 중쇄 및 경쇄 서열을 기능적 인간 가변 영역 서열과 정렬하고, 상동성 및 정규 구조에 대해 검토하였다. 인간화 중쇄 및 경쇄 분석의 결과를 인간화 항-PTK7 항체 hu23, hu24, 및 hu58에 대해 하기 표 3 및 4에 각각 제시한다.

[0350] <표 3>

인간화 mAb	인간 VH	인간 DH	인간 JH	인간 패전 서열에 대한 % 상동성	마우스 패전 서열에 대한 % 상동성
hu23	VH2-5	IGHD5-5	JH4	91	81
hu24	VH1-3	IGHD4-23	JH6	82	82
hu58	VH3-7	IGHD2-8	JH6	86	88

[0351]

[0352] <표 4>

인간화 mAb	인간 VK	인간 JK	인간 패전 서열에 대한 % 상동성	마우스 서열에 대한 % 상동성
hu23	O8	JK5	91	81
hu24	L6	JK1	82	82
hu58	B2	JK4	86	88

[0353]

[0354] hu23, hu24 및 hu58의 아미노산 서열 및 연관 핵산 서열이 상기 표 1에 제시되어 있다. hu23, hu24, 및 hu58에 대한 VH 영역의 아미노산 서열이 각각 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 25, 및 서열식별번호: 49에 제시되고, 상응하는 핵산 서열이 각각 서열식별번호: 2, 서열식별번호: 26, 및 서열식별번호: 50에 제시된다. hu23, hu24, 및 hu58의 카파 VL 영역의 아미노산 서열이 각각 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 39, 및 서열식별번호: 63에 제시되고, 상응하는 핵산 서열이 각각 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 40, 및 서열식별번호: 64에 제시된다.

[0355] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이 각각의 상기 언급된 인간화 항체는 본원의 교시에 따라 효과적인 항-PTK7 항체-약물 접합체로서 기능한다.

[0356] 실시예 2

[0357] 인간화 항체의 발현

[0358] 항-PTK7 항체 hu23, hu24, 및 hu58을 관련 기술분야에서 인식되는 기술을 사용하여 PCT 국제 공개 번호 WO 2012/112943에 기재된 바와 같이 발현시키고 단리하였다. 중쇄의 합성 인간화 가변 DNA 단편 (인티그레이티드 DNA 테크놀로지스(Integrated DNA Technologies))을 인간 IgG 1 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 가변 경쇄 단편을 인간 C-카파 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 각각의 항체를 상응하는 중쇄 및 경쇄의 CHO 세포 내로의 공동-형질감염에 의해 발현시켰다.

[0359] 보다 특히, 항체 생산을 위해, 인간화 가변 유전자 PCR 생성물의 인간 이뮤노글로불린 발현 벡터 내로의 직접 클로닝을 수행하였다. Ig 유전자-특이적 PCR에 사용된 모든 프라이머는 제한 부위, IgH의 경우에 AgeI 및 XhoI, Igk의 경우에 XmaI 및 DraIII를 포함하였고, 이는 각각 인간 IgG 1, 및 Igk 불변 영역을 함유하는 발현 벡터 내로의 직접 클로닝을 가능하게 하였다. 간략하게, PCR 생성물을 퀴아퀵(Qiaquick) PCR 정제 키트 (퀴아젠, 인크.(Qiagen, Inc.))로 정제한 다음, 각각 AgeI 및 XhoI (IgH), XmaI 및 DraIII (Igk)로 소화시켰다. 소화된 PCR 생성물을 정제한 후, 발현 벡터 내로 라이게이션시켰다. 라이게이션 반응은 200U T4-DNA 리가제 (뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)), 7.5 μ L 소화 및 정제된 유전자-특이적 PCR 생성물 및 25ng 선형화 벡터 DNA와 함께 총 10 μ L 부피로 수행하였다. 적격 이. 콜라이(E. coli) DH10B 박테리아 (라이프 테크놀로지스)를 42°C에서의 열 쇼크를 통해 3 μ L 라이게이션 생성물로 형질전환시키고, 암피실린 플레이트 상에 플레이트링하였다 (100 μ g/mL). 이어서 VH 영역의 AgeI-EcoRI 단편을 pEE6.4HuIgG1 (론자 아게(Lonza AG)) 발현 벡터의 동일한 부위 내로 삽입하고, 합성 XmaI-DraIII V κ 삽입물을 각각의 pEE12.4Hu-카파 발현 벡터의 XmaI-DraIII 부위 내로 클로닝하였다.

[0360] 인간화 항체를 생산하는 세포를 293펙틴(293fectin)을 사용한 적절한 플라스미드로의 HEK 293 세포의 형질감염에 의해 생성하였다. 플라스미드 DNA를 퀴아프랩 스핀 칼럼 (퀴아젠)으로 정제하였다. 인간 배아 신장 (HEK) 293T (ATCC 번호 CRL-11268) 세포를 150mm 플레이트 (팔콘(Falcon), 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))에서 표준 조건 하에 10% 열 불활성화 FCS, 100 μ g/mL 스트렙토마이신, 100 U/mL 페니실린 G (모두 라이프 테크놀로지스로부터의 것)로 보충된 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM)에서 배양하였다.

[0361] 일시적 형질감염을 위해 세포를 80% 전면생장물로 성장시켰다. 동등량의 IgH 및 상응하는 IgL 쇄 벡터 DNA (각 벡터 DNA 12.5 μ g)를, 1.5 mL 옵티-MEM 중의 50 μ L HEK 293 형질감염 시약과 혼합된 1.5 mL 옵티MEM에 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 배양 플레이트에 고르게 분포시켰다. 형질감염 3일 후에 상청액을 수거하고, 10% FBS로 보충된 20 mL의 신선한 DMEM으로 대체하고, 다시 형질감염 후 제6일에 수거하였다. 배양물 상청액을 800xg에서 10분 동안의 원심분리에 의해 세포 파편으로부터 제거하고, 4℃에서 저장하였다. 재조합 키메라 및 인간화 항체를 단백질 G 비드 (지이 헬스케어(GE Healthcare))로 정제하였다. vc0101 및 mc8261로의 지속적, 재현가능한 생물접합을 달성하기 위해 이온 교환 크로마토그래피에 의한 hu23 및 hu24의 추가 정제가 요구되었다. 추가의 정제 단계의 부재 하에, 실시예 10에 기재된 티올 환원의 효율 및 이에 따라 생성된 ADC 약물-대-항체 비 (DAR)는 극적이고 예측불가능하게 변동하였다. 추가의 정제에 대한 필요는 예상되지 않았지만, 실험적으로 결정되었다.

[0362] 실시예 3

[0363] hu24 결합의 특징화

[0364] 키메라 및 인간화 클론 24 mAb의 비교는 비아코어™ 2000 (지이 헬스케어)을 사용한 SPR에 의해 결정되었다. 항인간 항체 포획 키트를 사용하여 포획 mAb를 CM5 바이오센서 칩 상에 고정시켰다. 각각의 항원 주입 주기 전, 2 μ g/mL의 농도의 인간화 mAb를 접촉 시간 2분 및 유량 5 μ L/분으로 표면 상에 포획시켰다. 기준선으로부터 포획된 mAb 로딩은 80-120 반응 단위로 일정하였다. 시험 물품 포획 및 1분 기준선에 따라, 단량체 인간 PTK7 단백질을 50, 25, 및 12.5 nM의 농도로 2-분 회합 단계에 이은 2-분 해리 단계 동안 5 μ L/분의 유량으로 표면 상에서 유동시켰다. 각각의 주기 후에, 항-인간 포획 표면을 10 μ L/분으로의 3M MgCl₂의 30초 접촉 시간으로 재생시켰다.

[0365] 비아코어™ 데이터는 먼저 특이적 mAb 결합 표면으로부터 대조군 IgG 표면을 차감하여 처리하였다. 이어서 반응 데이터를 회합 및 해리 단계로 절단하였다. 3개의 상이한 항원 농도에 의해 생성된 반응 곡선을 사용하여 1:1 랭뮤어 결합 모델에 피팅하고, 계산된 K_{on} 및 K_{off} 동역학 상수 및 $K_d = K_{off}/K_{on}$ 으로서 정의되는 평형 해리 상수에 의해 걸보기 친화도를 생성하였다. 모든 데이터 분석 단계를 비아이벨루에이션 소프트웨어 3.1 (지이 헬스케어)에서 완료하였다.

[0366] 계산된 친화도 및 동역학 상수는 키메라와 인간화 mAb 사이에서 2-배 이내인 것으로 결정되었다 (표 5).

[0367] <표 5> 인간 PTK7에 대한 키메라 및 인간화 클론 24 mAb의 친화도 상수

시험 mAb	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	$K_d (nM)$
키메라 클론 24	3.9 E+05	2.3 E-04	0.6
인간화 클론 24 (hu24)	2.7 E+05	3.1 E-04	1.2

K_{on} = 회합률 상수; K_{off} = 해리율 상수; K_d = 평형 해리 상수; M = 몰; mAb = 모노클로날 항체; s = 초; nM = 나노몰; 재조합 인간 PTK7 엑토도메인을 사용하였음.

[0368]

[0369] hu24 mAb에 의해 인식되는 에피토프를 결정하기 위해, PTK7 엑토도메인의 여러 변이체에 대한 그의 결합을 평가하였다. PTK7 엑토도메인은 7개의 Ig 도메인으로 구성되고, 변이체는 2개 이상의 인접 Ig 도메인을 포함하도록 설계되었다. 변이체는 Fc 융합 단백질로서 발현되었고, hu24 결합을 ELISA에 의해 결정하였다.

[0370] 구조적 상동성에 의해 예측되는 바와 같이 다양한 인접 PTK7 Ig 도메인을 증폭시키는 프라이머로 구축물을 설계하였다. 생성된 서열을 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 인간 이뮤노글로불린 G2 (IgG2) Fc 도메인과 인-프레임으로 그의 상류에 융합시켰다. Fc 융합 단백질을 포유동물 세포 내로 형질감염시키고, 72시간 후에 상청액을 수거하였다. 항-PTK7 mAb hu24를 ELISA에 의해, 규정된 Ig 도메인을 갖는 PTK7 단백질 변이체에 결합하는 그의 능력에 대해 시험하였다.

[0371] 결과는 Ig 도메인 1-4가 PTK7에의 hu24 결합에 필요하다는 것을 보여주고 (표 6), 이는 mAb가 PTK7의 3차 구조적 특징을 인식한다는 것을 암시한다.

[0372] <표 6> PTK7 도메인에 대한 hu24 mAb의 결합

구축물 내 PTK7 ECD Ig 영역	1-2	2-3	1-4	1-5	3-7	6-7	1-7
hu24 mAb 결합	-	-	+	+	-	-	+

ECD = 세포외 도메인. Ig = 이뮤노글로불린.

도메인 1-2 = 잔기 31-236;

도메인 2-3 = 잔기 110-321;

도메인 1-4 = 잔기 31-409;

도메인 1-5 = 잔기 31-510;

도메인 3-7 = 잔기 230-703;

도메인 6-7 = 잔기 503-703;

도메인 1-7 = 전장 ECD, 잔기 31-703.

[0373]

[0374] 항-PTK7 mAb hu24의 세포 결합 특성을 특징화하기 위해 실험을 수행하였다. 항원 특이성을 확인하기 위해, 결합을 이뮤노블롯팅에 의해 결정된 바와 같이 실질적인 또는 무시할 만한 PTK7 발현을 갖는 세포주에서 평가하였다.

[0375] 전세포 추출물을 겔 전기영동에 의해 분해하고, 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 막을 5% 중량/부피 탈지유와 함께 0.1% 트윈-20을 함유하는 트리스-완충 염수 (TBST) 중에서 hu6M024와 인큐베이션한 다음, TBST로 세척하고, 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 염소 항-인간 항체 (산타 크루즈 바이오테크놀로지 No sc-2453)와 함께 인큐베이션하고, 광범위하게 세척한 후 화학발광 기질에 노출시켰다.

[0376] 이뮤노블롯팅은 세포주 BxPC3 및 MDAMB436에서 실질적인 PTK7의 발현 및 세포주 ASPC1에서 무시할 만한 PTK7의 발현을 나타내었다 (도 2a). 유동 세포측정법 기반 hu24와의 세포 결합 결과는 이뮤노블롯팅 데이터와 완전히 일치하였고 (도 2b), 이는 hu24의 항원 특이성을 입증한다.

[0377] 추가의 유동 세포측정 실험을 수행하여 PTK7의 내인성 발현을 갖는 암 세포주에 대한 hu24 mAb의 결합을 평가하였다. 간략하게, 부착 세포를 트리플(TrypLE)TM 익스프레스 (깁코(Gibco)® No 12604-021)로 해리시키고, 이어서 이를 배양 배지로 중화시켰다. 현탁 세포를 원심분리에 의해 수거하였다. 세포를 언급된 농도의 mAb를 갖는 염색 완충제 (3% BSA 함유 PBS) 중에 재현탁시키고, 빙상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 염색 완충제 중에서 세척하고, 피코에리트린 (PE)-표지된 항-인간 항체 (잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch) No 109-115-098)를 함유하는 염색 완충제 중에 재현탁시키고, 빙상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고, 7-AAD 생존 염색제 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences), 파밍겐 No 51-68981E)를 함유하는 염색 완충제 중에 재현탁시키고, BD FACS칼리버TM로 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 생존 세포 집단의 PE 채널에서의 평균 형광 강도 (MFI)를 각각의 샘플에 대해 결정하였다.

[0378] hu24 mAb는 시험된 가장 낮은 농도 (0.1 µg/ml)에서 다양한 암 세포주에 대해 결합을 나타내었다. 대조적으로, 대조군 항체는 시험된 가장 높은 농도 (10 µg/ml)에서 인지가능한 결합을 나타내지 않았다 (표 7).

[0379] <표 7> 암 세포주에 대한 hu24 mAb의 결합 특성

암 세포주 (종양 유형)	MFI, 대조군 mAb	MFI, hu6M024 mAb		
	10 µg/mL	0.1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL
H661 (폐암)	4.2	60	243	309
H446 (폐암)	11	95	342	411
U2OS (골육종)	5.3	122	385	431

mAb = 모노클로날 항체; MFI = 평균 형광 강도; µg/mL = 밀리리터당 마이크로그램.

[0380]

[0381] 실시예 4

[0382] 다양한 암 세포주에서의 PTK7의 발현

[0383] 항-PTK7 항체 hu23 및 hu24는 고형 및 혈액 적응증을 포함하는 광범위한 종양 유형으로부터 확립된 배양된 암 세포주에 대해 특이적 결합을 나타내었고, 하기 표 8을 참조한다. 부착 세포를 트리플 익스프레스 (깁코)를 사용하여 해리시키고, 세포 배양 배지로 중화시키고, 카운팅하였다. 세포를 U-바닥 96-웰 플레이트에 5x10⁵개 세

포/100 μ L 배지/웰로 플레이팅하였다. 플레이트를 300xg에서 5분 동안 4℃에서 원심분리하여 세포를 펠릿화하고, 상청액을 폐기하였다. 각각의 펠릿을 PBS 중 3% BSA 중 10 μ g/mL hu23, hu24 또는 비-결합 대조군 항체 중에 재현탁시키고, 플레이트를 빙상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 원심분리하고, 세포 펠릿을 PBS 중 200 μ L 빙냉 3% BSA 중에서 세척하였다. 각각의 세포 펠릿을 PBS 중 3% BSA 중에 1:50으로 희석된 100 μ L의 R-피코에리트린 (PE)-접합된 염소 항-인간 IgG Fc 단편 중에 재현탁시키고, 플레이트를 빙상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 원심분리하고, 세포 펠릿을 PBS 중 200 μ L의 3% BSA 중에서 4℃에서 세척하였다. 각각의 펠릿을 PBS 중 100 μ L 3% BSA 중에 재현탁시키고, PBS 중 250 μ L 3% BSA를 함유하는 5 mL 폴리카르보네이트 튜브로 옮겼다. 샘플을 생존 염색제로서 샘플당 5 μ L 7-아미노-악티노마이신 D (7-AAD) 염색 용액을 사용하여 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 비-생존 세포를 분석에서 제외시켰다.

[0384] 표 8의 데이터는 유동 세포측정법에 의한 암 세포주에 대한 항체 결합의 평균 형광 강도 (MFI)를 보여준다. 인간화 항체 hu23 및 hu24에 의한 세포 결합은 수많은 세포주에서의 PTK7 발현을 나타낸다. PTK7 발현은 다양한 비소세포 폐암 (NSCLC), 소세포 폐암 (SCLC), 결장, 유방, 췌장 및 적백혈병성 암 세포주에서 현저하다. PTK7에 결합하지 않는 음성 대조군 항체를 비교를 위해 사용하였다.

[0385] <표 8>

세포주	기원 종양 유형	평균 형광 강도 (10 μ g/ml Ab)		
		hu24	hu23	음성 대조군 Ab
H520	폐 (NSCLC)	1384	1212	4.8
H446	폐 (SCLC)	937	915	7.1
H1048	폐 (SCLC)	955	900	4.4
DMS114	폐 (SCLC)	793	568	9.9
HCT116	결장	629	436	17.8
H69	폐 (SCLC)	404	391	11.2
MDAMB468	유방 (BR)	364	302	12
MDAMB361-DYT2	유방 (BR)	295	227	8.7
BxPC3	췌장	207	192	4.6
MDAMB436	유방 (BR)	189	171	3.5
H1299	폐 (NSCLC)	70.9	59.2	3
SKBR3	유방 (BR)	39.7	31.2	14.9
DU4475	유방 (BR)	697	ND	3.8
DMS79	폐 (SCLC)	682	ND	8.5
H522	폐 (NSCLC)	672	ND	3.8
MiaPaca	췌장	611	ND	3.5
H358	폐 (NSCLC)	474	ND	4.5
HCC70	유방 (BR)	474	ND	9.4
H1975	폐 (NSCLC)	444	ND	4.8
H526	폐 (NSCLC)	438	ND	12.2
H661	폐 (NSCLC)	376	ND	3.8
HCC1937	유방 (BR)	370	ND	7.8
H596	폐 (NSCLC)	355	ND	21.4
HCC827	폐 (NSCLC)	251	ND	5.8
Hs700T	췌장	241	ND	4.9
HCC38	유방 (BR)	227	ND	7.2
TF1a	적백혈병 (AML)	208	ND	6.2
H2110	폐 (NSCLC)	171	ND	4.9
KG1	적백혈병 (AML)	159	ND	5.2
TF1	적백혈병 (AML)	135	ND	5.9
Hs578T	유방 (BR)	124	ND	2.7
BT-549	유방 (BR)	114	ND	3.6
HCC1806	유방 (BR)	77.5	ND	4.6
Kasumi-1	적백혈병 (AML)	68.2	ND	5.3
K562	만성 골수 백혈병 (CML)	56.1	ND	54.7
HEL	적백혈병 (AML)	46	ND	15.7
RL	비-호지킨 림프종 (NHL)	44.2	ND	29.8
Raji	비-호지킨 림프종 (NHL)	36.3	ND	20.3
HL60 MX2	전골수구성 백혈병 (AML)	25.7	ND	25.2
HEL92.1	적백혈병 (AML)	23	ND	7.7
NB4	전골수구성 백혈병 (AML)	19.5	ND	6.8
RPMI8226	다발성 골수종	17.8	ND	8.3

[0386]

HL60	전골수구성 백혈병 (AML)	12.7	ND	10.9
MV411	단핵구성 백혈병	10.1	ND	7.7
U937	단핵구성 백혈병	5.8	ND	5.0
ASPC1	췌장	4.5	ND	2.6
THP-1	단핵구성 백혈병	4.0	ND	4.0
EKVX	폐 (NSCLC)	3.8	ND	3.1

[0387]

[0388]

ND= 데이터 없음.

[0389]

29종의 PDX 종양 세포주에 대해 표 9에 제시된 마이크로레이 데이터는 PDX 종양 세포로부터 단리된 총 RNA를 사용한 애질런트 슈어프린트(Agilent SurePrint) GE 8x60 v2 어레이를 사용하여 생성하였다. 단일 색상으로 수집된 원 마이크로레이 데이터의 처리는 배경 차감 및 분위수 정규화를 포함하였다. 정규화된 데이터를 로그 베이스 2 변환하여, 하류 분석에 사용하기 위한 유전자 발현 값을 생성하였다. 이러한 데이터는 제시된 PDX 세포주와 연관된 PTK7 발현의 상대량을 반영한다. BR=유방암, LU=폐암, OV=난소암, SK=흑색종, CR=결장직장암, LIV=간암.

[0390]

<표 9>

PDX 세포주	상대적 mRNA 수준
BR13	484.4
BR22	714.1
BR31	210.8
BR56	393.4
BR64	237.2
BR120	319.6
BR36	324.0
BR133	639.1
LU176	643.6
LU135	576.0
LU58	113.8
OV39	238.9
OV45	410.1
OV55	364.6
SK23	464.7
SK25	171.3
SK19	484.4
LU86	288.0
LU95	377.4
LU64	247.3
LU49	56.5
LU70	221.3
LU50	195.4
CR2	286.0
CR14	187.4
CR42	471.1
CR88	143.0
LIV13	75.6
LIV40	254.2

[0391]

[0392]

PTK7 발현을 또한 면역-손상된 마우스의 7개의 PDX 모델: 4개는 삼중-음성 유방암 PDX (BR13, BR22, BR31 및 BR5); 1개는 프로게스테론 수용체 양성 (PR+) 유방암 PDX (BR36); 및 2개는 NSCLC PDX (NSCLC135 및 NSCLC176)에서 면역조직화학에 의해 평가하였다.

[0393]

간략하게, 각각의 이중이식편으로부터의 조직 단편을 표준 조직학적 절차를 사용하여 포르말린-고정하고, 가공하고, 파라핀 포매하였다 (FFPE). 5-마이크로미터 절편을 하전된 슬라이드 상에서 자르고, 건조시키고, 크실렌 중에서 탈파라핀화하고, 증류수까지 등급화된 알콜로 재수화시켰다. 보르그 데클로아커(Borg Decloaker) (바이오케어 메디칼(Biocare Medical))에서 레트리버(Retriever) 2100 압력 쿨러 (일렉트론 마이크로스코피 사이언시스(Electron Microscopy Sciences))를 사용하여 열-유도된 에피토프 회복을 수행하고, 20분 (min) 동안 실온 (RT)으로 냉각시켰다. 내인성 퍼옥시다제를 퍼옥시다제드(Peroxidized) 1 (바이오케어 메디칼(Biocare Medical))로 RT에서 10분 동안 켄칭시켰다. 비-특이적 단백질 상호작용을 백그라운드 푸니셔(Background Punisher) (바이오케어 메디칼)로 RT에서 10분 동안 차단시켰다. 조직 절편을 1차 항체 0.5 µg/mL와 함께 RT

에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1차 항체는 토끼 항-PTK7 클론 (스텝 CentRx™ 인크.(Stem CentRx™ Inc)) 또는 토끼 이소형 대조군 (DAIE) mAb 이뮤노글로불린 G (IgG) XP® (셀 시그널링 테크놀로지스 no. 3900)였다. 1차 항체의 결합을 시그널스테인(SignalStain)® 부스트 IHC 검출 시약 (셀 시그널링 테크놀로지스 no. 8114)으로 RT에서 30분 동안 검출하였다. 염색을 DAB+ (3',3'-디아미노벤지딘; 다코(DAKO))로 RT에서 5분 동안 발색시켰다. 슬라이드를 간단히 CAT 헤마톡실린 (바이오케어 메디칼) 중에서 대조염색하고, 물 중에서 세척하고, 등급화된 알콜 중에서 탈수시키고, 크실렌 중에서 깨끗하게 하고, 퍼마운트(PermOUNT)™ 마운팅 배지 (피셔 케미칼스(Fisher Chemicals))로 커버슬립하였다.

[0394] PTK7은 모든 PDX 모델에서 형질 막 상에서 관찰되었다 (도 3).

[0395] 실시예 5

[0396] 다양한 종양 조직에서의 PTK7의 발현

[0397] PTK7 mRNA 발현을 원발성 인간 종양에서 결정하였다. 간략하게, 동결된 종양 및 정상 종양을 단편화하고, 쿼아젠 RN이지 미니 키트 (쿼아젠, cat# 74106)를 사용하여 mRNA를 단리하였다. HT RNA 마이크로유체 랩칩 검정 및 랩칩 GX 마이크로유체 모세관 전기영동 기기 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer))를 사용하여 RNA 정량화 및 품질 평가를 수행하였다. 양이 기기의 선형 범위 (25 - 250 ng/μL) 내에 속하도록 각각의 샘플에 대한 RNA를 희석시켰다. 단리된 RNA 샘플을 라이프 테크놀로지스, 고용량 RNA-투-cDNA 키트 (cat # 4387406)를 사용하여 제조업체의 지침에 요약된 프로토콜에 따라 cDNA로 역전사시켰다. 택맨 프로브-기반 유전자 발현 분석 및 ABI ViiA7 실시간 PCR 시스템 (라이프 테크놀로지스)을 사용하여 qRT-PCR 반응을 수행하였다. 표적 유전자 및 내인성 대조군을 사전-제작 택맨 저밀도 어레이 카드 상에서 각각의 프로브 세트에 대해 사중으로 전개시켰다. 익스프레션스위트(ExpressionSuite) 소프트웨어 v1.0.3 (라이프 테크놀로지스)을 사용하여 대부분의 샘플에 대해 신호 증폭에 대해 자동화된 역치 값을 생성하였다. 수동으로 조정되는 자동화된 역치는 거의 없었다. Ct 값 >35를 생성하는 증폭 플롯은, 이것이 Ct 값을 생성하지만 대수적 증폭의 경향을 나타내지 않는 플롯이기 때문에 폐기하였다. 모든 Ct 값을 익스프레션스위트 소프트웨어로부터 내보내고, 마이크로소프트 엑셀 2010 (마이크로소프트 코퍼레이션, 인크.(Microsoft Corporation, Inc))에서 상대적 정량화 계산을 수행하였다.

[0398] 도 4a-c는 (a) 유방암, (b) NSLC 및 (c) 난소암에서의 PTK7 mRNA의 수준을 보여준다. PTK7 발현의 정량화를 상대 배수 차이 (RQ) 또는 비교 Ct 방법, 방정식 $RQ = 2^{-\Delta \Delta Ct}$ 를 사용하는 ($2^{-\Delta \Delta Ct}$) 방법을 사용하여 평가하였다. RQ 데이터는 대조군 RNA 샘플 대비 배수 차이 PTK7 발현을 나타낸다. 유방 암종 샘플의 경우에, 바이오체인 (BioChain)에서 구입한 정상 유방 RNA 샘플 (캘리포니아주 뉴어크, cat# R1234086-50, lot# B610189, 75세 여성)을 사용하여 RQ 데이터를 생성하였다. 폐암의 경우에, 보고된 RQ 데이터는 라이프 테크놀로지스 (cat #AM7968, lot # 1308017, 80세 여성)에서 구입한 정상 폐 RNA 대비 PTK7 발현에서의 배수 차이를 나타낸다. 난소 암종 샘플의 경우에, 보고된 RQ 데이터는 클리블랜드 클리닉(Cleveland Clinic) (오하이오주 클리블랜드)에서 제공된 정상 난소 조직 (조직 ID #0204C011C)으로부터 단리된 RNA 대비 PTK7 발현에서의 배수 차이를 나타낸다. 모든 종양에 대한 RQ 값을 또한 정상 인간 조직 (바이오체인, cat#R4234565, lot #B611043)으로부터의 RNA 풀 대비, 뿐만 아니라 10종의 고유한 암 세포주로부터의 동등한 부분 RNA로 구성된 범용 인간 참조 RNA 풀 (에절런트(Agilent), cat #740000) 대비 계산하였다.

[0399] 유방, NSCLC 및 난소 종양은 상응하는 정상 조직과 비교하여 증가된 PTK7 mRNA 발현을 나타내었다 (도 4a-c). TNBC에서의 과다발현이 가장 주목할 만했고, 난소 종양에서의 과다발현은 적당하였다.

[0400] 도 5는 NSCLC 환자에서의 보다 높은 PTK7 mRNA 발현과 보다 나쁜 전체 생존 사이의 상관관계를 보여준다. PTK7 발현이 폐암에서 생존 종점과 연관되는지 여부를 결정하기 위해, 카플란-마이어 분석을 프리웨어 <http://kmplot.com/analysis> (Gyorffy et al., 2013, PLoS One. 18;8(12):e82241)를 사용하여 생물정보학 데이터 세트에 적용하였다. PTK7 mRNA 수준 및 환자 생존 데이터를 툴 자동-선택 베스트 컷오프를 사용하여 719명의 NSCLC-선암종 환자에 대해 플롯팅하였다. 높은 PTK7 발현은 보다 짧은 생존과 연관되었다 (위험 비 HR = 4.06, 로그순위 P = 1.1E-16).

[0401] PTK7 단백질 발현은 식도암에서 관찰되었다. 조직 마이크로어레이 (유에스 바이오맥스(US Biomax)로부터의 ES1502)를 면역조직화학에 사용하였다. 간략하게, 포르말린-고정 파라핀-포매된 종양 블록으로부터의 절편을 5 마이크로미터로 자르고, 유리 슬라이드 상에서 베이킹하였다. 슬라이드를 크실렌 중에서 깨끗하게 하고, 탈이온수로 종료되는 등급화된 알콜 세척액 중에서 재수화시켰다. 슬라이드를 레트리버 2100 (일렉트론 마이크로스코피)에서 pH6 시트레이트 HIER 완충제 중에서 회복시켰다. 과산화된, 과산화수소 차단 용액 (바이오케어 메디

칼)을 슬라이드에 10분 동안 도포하였다. 슬라이드를 TBST 2x에 이어서 백그라운드 푸니셔, 단백질 차단제 (바이오케어 메디칼)로 10분 동안 세척하였다. 1차 항체, H.235 (Lot #: 110325MM, 원액 농도: 12.7mg/mL)를 2ug/mL의 농도로 60분 동안 적용하였다. TBST (2x)로 세척한 후에, 2차 항체, DAKO 항-마우스 엔비전+를 30분 동안 적용하였다. 다시 TBST (2x)로 세척한 후에, 슬라이드를 베타조이드 DAB+ (바이오케어 메디칼)로 5분 동안 발색시켰다. 이어서 슬라이드를 CAT 헤마톡실린 (바이오케어 메디칼) 중에서 30초 동안 대조염색하고, 커버 슬립하였다.

[0402] 70개 종양 샘플 중 40개가 세포 막 상에서의 PTK7 발현에 대해 양성으로 스코어링되었다. PTK7 양성인 40개 샘플 중, 1개는 높은 발현을 나타내었고, 11개는 중간 정도의 발현을 나타내었고, 28개는 낮은 발현을 나타내었다.

[0403] PTK7 단백질 발현이 전립선암에서 관찰되었다. 조직 마이크로어레이 (바이오맥스로부터의 BC19013)를 식도암에 대해 상기 기재된 바와 같이 면역조직화학에 사용하였다. 26개 종양 샘플 중 11개가 PTK7 발현에 대해 양성으로 스코어링되었다. PTK7 양성인 11개 샘플 중, 2개는 중간 정도의 발현을 나타내었고, 9개는 낮은 발현을 나타내었다.

[0404] 실시예 6

[0405] 혈청 중 PTK7 단백질의 측정

[0406] 문헌에서의 보고는 세포외 도메인의 부분의 shedding을 발생시키는 형질 막에서의 PTK7의 절단을 특징화하고 있다 (Golubkov et al., 2010, J Biol Chem 285(46):35740-9; Golubkov et al., 2012, J Biol Chem 287(50):42009-18; Na et al., 2012, J Biol Chem 287(30):25001-9). 순환 항원은 치료 화합물, 예컨대 PTK7 ADC의 약동학에 영향을 미칠 수 있다. Shedding된 PTK7의 순환 수준이 다양한 혈청 공급원으로부터 평가되었다. PTK7 단백질 수준은 메소 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery) (MSD®) 플랫폼을 사용한 정량적 검정에 의해 측정되었다.

[0407] 건강한 인간으로부터의 혈청 샘플을 스탠포드 대학교 혈액 은행에서 구입하였다. 암 환자로부터의 혈청 샘플은 에스터랜드 인크.(Asterand Inc) 및 바이오리클레메이션 인크.(Bioreclamation Inc)에서 구입하였다. 시노물구스 원숭이 혈청 샘플은 바이오리클레메이션 인크.에서 구입하였다.

[0408] 마우스 혈청 샘플을 인간 종양 이종이식편을 보유하는 면역-손상된 마우스로부터 획득하였다. 암컷 비-비만 당뇨병성-중증 조합 면역결핍 (NOD-scid) 마우스를 하를란 래보러토리즈(Harlan Laboratories)® 에서 구입하고, 동물 실험 윤리 위원회 (IACUC) 가이드라인에 따라 수용하였다. 환자-유래 이종이식편 (PDX)을 새로이 절제된 인간 종양 샘플의 직접 이식에 의해 확립시키고, 이종이식편을 나이브 동물 내에서 계대시킴으로써 증식시켰다. 이종이식편은 인간 대상체 승인의 보호에 대한 임상시험 심사 위원회에 따라, 및 건강 보험 이전 및 책임에 관한 법 (HIPAA) 규정에 따라 임상 현장으로부터 입수한 원발성 종양 절제 샘플로부터 유래되었다.

[0409] PTK7 단백질의 수준을 측정하기 위한 검정은 하이브리도마 기술에 의해 생성된 2개의 특이적 항-PTK7 모노클로날 항체 (mAb)를 이용하였다. mAb는 인간 및 시노물구스 원숭이 PTK7에 결합하지만, 무린 PTK7에는 결합하지 않는다. 검정을 MSD® 플랫폼 상에서 전개시키고, 선형 반응을 위해 최적화하였다. MSD® 고 결합 플레이트를 포스페이트-완충 염수 (PBS) 중 1 µg/ml의 PTK7-특이적 mAb H2.35로 코팅하였다. 플레이트를 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날 플레이트를 세척하고, 제2 mAb를 첨가하였다. 인간 및 원숭이 샘플의 경우에, 25 µl의 술포-태그부착된 PTK7-특이적 mAb 6M38을 MSD® 희석제2 (MSD #R51BB-4) 중 0.5 µg/ml로 첨가하고, 종양-보유 마우스 샘플의 경우에, 비오틴화된 6M38을 MSD® 희석제 2 (MSD #R51BB-4) 중 0.5 µg/ml로 첨가한 다음 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 스트렙타비딘을 첨가하였다. 플레이트를 30분 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 세척 없이, 혈청 샘플 또는 다양한 양의 재조합 PTK7 단백질을 웰에 첨가하고, 플레이트 진탕기 상에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 혈청 샘플을 25% 최종까지 MSD® 희석제 2 중에서 4x 희석하였다. 플레이트를 0.2% 트윈-20을 함유하는 포스페이트-완충 염수로 3회 세척하였다. MSD® 1x 판독 완충제 (MSD #R92TC-3)를 플레이트에 첨가하고 (웰당 150 µl), 플레이트를 MSD® 색터 이미지 상에서 판독하였다. 혈청 샘플에 대한 값을 재조합 단백질에 기초한 표준 곡선으로부터 내삽하였다.

[0410] 인간 혈청 중 PTK7 단백질의 수준을 건강한 인간 및 8종의 종양 유형을 나타내는 암 환자로부터의 샘플에서 측정하였다. 결과를 표 10에 요약한다. 각각의 카테고리에서 보고된 값은 모든 개별 샘플의 평균을 나타낸다. 건강한 인간으로부터의 혈청 중 PTK7의 평균 값은 12.4 ± 3.3 ng/mL였다. 일반적으로, 암 환자에 대한 평균 값은 최대 24.6 ± 3.8 ng/mL 범위로 약간 더 높았고, 개별 값의 보다 넓은 분포를 가졌다 (도 6).

[0411] <표 10> 인간 혈청 중 PTK7 단백질 수준

샘플 유형	샘플의 수	PTK7 단백질 수준 (ng/mL)
건강한 인간	30	12.4 ± 3.3
유방암 환자	29	24.0 ± 24.1
결장직장암 환자	17	13.3 ± 4.3
흑색종 환자	6	15.4 ± 7.4
비소세포 폐암 환자	21	19.8 ± 12.1
난소암 환자	7	17.9 ± 8.1
췌장암 환자	9	20.4 ± 6.5
전립선암 환자	14	16.2 ± 5.7
소세포 폐암 환자	7	24.6 ± 3.8

ng/mL = 밀리리터당 나노그램.

측정치는 독립적인 생물학적 샘플에 대한 평균의 평균 ± 표준 편차로서 제공됨.

[0412]

[0413] 나이브 시노물구스 원숭이 혈청 중 PTK7 단백질의 수준은 29마리의 동물로부터의 샘플에서 측정하였다. 평균 값은 35.8 ± 13.4 ng/mL (표 11)로, 이는 건강한 인간 및 암 환자에 대한 상응하는 값보다 더 높다.

[0414] <표 11> 시노물구스 원숭이 혈청 중 PTK7 단백질 수준

샘플 유형	샘플의 수	PTK7 단백질 수준 (ng/mL)
건강한 시노물구스 원숭이	29	35.8 ± 13.4

ng/mL = 밀리리터당 나노그램.

측정치는 독립적인 생물학적 샘플에 대한 평균의 평균 ± 표준 편차로서 제공됨.

[0415]

[0416] 마우스 혈청 샘플을 인간 종양 이종이식편을 보유하는 면역-손상된 마우스로부터 획득하였다. 구체적으로, 이 종이식편은 전형적으로 그것이 유래된 인간 종양의 아키텍처 및 유전자형을 보존하고 있는 PDX였다 (DeRose et al., 2011, Nat Med 17(11):1514-20). 모든 11종의 종양 유형에 대한 혈청 중 PTK7 단백질의 평균 값은 모든 종양 유형에 대해 < 1 ng/mL였고 (표 12), 따라서 인간 및 원숭이에 대해 획득된 값보다 유의하게 더 낮았다. 검정에 사용된 mAb가 무린 PTK7과 교차-반응하지 않기 때문에, 값은 종양 이종이식편으로부터 채취된 것으로 정상 무린 조직은 아닌 인간 PTK7 단백질로서 해석된다.

[0417] <표 12> 종양-보유 마우스 혈청 중 PTK7 단백질 수준

종양 이종이식편	종양 모델의 수	PTK7 단백질 수준 (ng/mL)
나이트 (이종이식편 없음)	적용가능하지 않음	0 ± 0
유방암	11	0.454 ± 0.872
결장직장암	29	0.023 ± 0.083
두경부암	2	0.355 ± 0.501
신장암	7	0.004 ± 0.009
간암	7	0.008 ± 0.021
비소세포 폐암	20	0.065 ± 0.104
난소암	9	0.053 ± 0.086
췌장암	9	0.018 ± 0.055
전립선암	2	0 ± 0
피부암	9	0.208 ± 0.307
소세포 폐암	10	0.004 ± 0.011

ng/mL = 밀리리터당 나노그램.

측정치는 종양 모델에 대한 평균의 평균 ± 표준 편차로서 제공됨. 개별 모델에 대한 값은 1 내지 12 마리의 종양-보유 동물로부터의 측정치의 중앙값임.

[0418]

[0419] 실시예 7

[0420] 내재화

[0421] 항체 내재화는 PTK7 발현 세포 내로의 세포독성을 위한 ADC를 전달하기 위한 중요한 특징이다. 항-PTK7 항체 hu24는 암 세포 내로 내재화되는 것으로 관찰되었고, 이는 항체가 세포 내로 독소를 전달하기 위한 적합한 비히클이라는 것을 시사한다. 부착 세포를 트리플 익스프레스 (김코)를 사용하여 해리시키고, 세포 배양 배지로 중화시킨 다음, 카운팅하였다. 세포를 U-바닥 96 웰 플레이트에 웰당 5×10^5 개 세포/100 μ L 배지로 분취하였다. 플레이트를 300xg에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하여 세포를 펠릿화하고, 상청액을 흡인하였다. 모든 시약을 다음 단계 동안 빙상에서 유지시켰다.

[0422] 각각의 세포 펠릿을 PBS 중 100 μ L 3% BSA 중 3 μ g/ml hu24 또는 비-결합 항체 (인간 IgG, 써모 사이언티픽 (Thermo Scientific)) 중에 재현탁시켰다. 플레이트를 빙상에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 원심분리하고, 세포 펠릿을 PBS 중 200 μ L 3% BSA 중에서 세척하였다. 세포 펠릿을 100 μ L 37°C 사전-가온된 세포 배양 배지 중에 재현탁시키고, 37°C 인큐베이터 내에 1 또는 4시간 동안 두었다. 4°C에서 인큐베이션할 세포 펠릿을 유사하게 재현탁시킨 다음, 빙상에 두었다. 인큐베이션 후에, 샘플을 원심분리하고, 상청액을 흡인하고, PBS 중 200 μ L/웰 빙냉 3% BSA로 세척하고, PBS 중 100 μ L/웰 빙냉 3% BSA 중에 재현탁시키고, 빙상에 두었다. 이어서 모든 샘플을 원심분리하고, 상청액을 흡인하고, 각각의 세포 펠릿을 PBS 중 빙냉 3% BSA 중에서 1:50으로 희석시킨 100 μ L의 알로피코시아닌 (APC)-접합된 항-인간 IgG Fc 단편 중에 재현탁시켰다. 플레이트를 빙상에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 원심분리하고, 세포 펠릿을 PBS 중 200 μ L 3% BSA 중에서 세척하고, PBS 중 100 μ L 3% BSA 중에 재현탁시키고, PBS 중 250 μ L 3% BSA를 함유하는 5 mL 폴리카보네이트 튜브로 옮겼다. 샘플을 생존 염색제로서 샘플당 5 μ L 7-AAD를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 평균 형광 강도 (MFI)를 각각의 샘플에 대해 측정하였고, 비-생존 세포는 분석에서 제외시켰다. "% 내재화" 값은 $(100\% - [\text{인큐베이션 후 MFI} / \text{인큐베이션 전 MFI}])$ 로서 계산하였다. 표 13의 결과는 hu24 항체가 시험된 모든 세포주 내로 내재화되었고, 내재화가 온도-의존성이라는 것을 나타내며, 이는 따라서 세포에 의한 능동 (수동이 아님) 내재화를 반영한다.

[0423] <표 13>

세포주	% 내제화 (실험의 출발 대비)				실험의 수
	1 hr, 37°C	4 hr, 37°C	1 hr, 4°C	4 hr, 4°C	
BT549	14.3 ± 9.8	42.5 ± 9.1	4.3 ± 8.1	8.5 ± 7.7	6
H661	21.2 ± 12.7	36 ± 17.4	2.2 ± 11.5	2 ± 5.6	5
MDAMB468	21.7 ± 5.7	34.3 ± 9.0	7.0 ± 0.8	9.3 ± 2.5	3

[0424]

[0425] 실시예 8

[0426] 사포린-접합된 항-인간 Fab 단편에 의해 매개되는 세포독성

[0427] 시험관내 세포독성 검정을 수행하여 hu23 또는 hu24 항체가 세포주로의 세포독성제의 전달을 매개할 수 있는지를 여부를 결정하였다. 이와 관련하여, 사포린 독소에 공유 연결된 항-인간 IgG Fab 단편 (어드밴스드 타겟팅 시스템즈(Advanced Targeting Systems))을 비표지된 hu23, hu24 또는 8.84 Ab (비-결합, 음성 대조군 항체)와 조합한 다음, 세포와 4일 (PTK7 발현 세포 H446 및 DMS114) 또는 7일 (OE19 비-PTK7 발현 세포; OE21 PTK7 발현 세포) 동안 인큐베이션하고, 그 후 세포 생존율을 측정하였다.

[0428] 하나의 실험에서, H446 또는 DMS114 암 세포주를 투명한 편평-바닥 조직 배양 플레이트에 100 μ l의 세포 배양 배지 중 웰당 9600개 세포 (H446) 또는 웰당 6400개 세포 (DMS114)로 플레이트하였다. 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 사포린-접합된 항-인간 IgG Fab (Fab-ZAP; 어드밴스드 타겟팅 시스템즈)와 1:2 몰비로 사전-혼합된 50 μ l의 hu23, hu24 또는 8.84 Ab를, 1 μ g/ml로 출발하여 세포 배양 배지 중 1:3 희석된 삼중 샘플을 사용한 10-지점 농도 곡선으로, 세포에 첨가하였다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 4일 동안 인큐베이션하였다. 세포 생존율을 측정하기 위해, MTS 검정 (프로메가 셀 타이터(Promega Cell Titer) 96 수성 비-방사성 세포 증식 검정)를 공급업체의 지침에 따라 사용하였다. 30 μ L의 조합된 MTS 시약을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 광학 밀도 (OD)를 490 nm에서 96-웰 플레이트 판독기로 결정하였다. 배경 OD에 대한 제어를 위해 배지 단독을 함유하는 웰로부터의 평균 판독치를 세포를 함유하는 웰의 판독치로부터 차감하였다. 세포 생존율이 50% 억제되는 1차 항체의 농도 (IC50)를 결정하기 위해, 데이터를 로지스틱 비-선형 회귀 분석 (그래프패드 프리즘 소프트웨어)에 적용시켰다.

[0429] 표 14의 데이터는 둘 다의 항-PTK7 항체 hu23 및 hu24가 H446 및 DMS114 세포에 대해 사포린-매개 세포독성을 부여하고, 8.84 음성 대조군 항체는 그렇지 않다는 것을 보여준다. 결과는 hu23 및 hu24의 활성이 PTK7 발현 세포에 대해 특이적이라는 것을 입증한다.

[0430] <표 14>

세포주	IC50 값 (ng/mL)		
	hu23+Fab-ZAP	hu24+Fab-ZAP	8.84+Fab-ZAP
H446	44.7	60.3	>1000
DMS114	10.3	12.0	>1000

[0431]

[0432] 또 다른 실험에서, 식도암으로부터 유래된 2종의 세포주, OE19 및 OE21 (시그마 알드리치(Sigma Aldrich))에 대해 사포린 검정을 수행하였다. 세포주 상에서의 PTK7 발현을 결정하기 위해, 세포를 배양하고, 베르센 (Versene) (인비트로젠(Invitrogen))을 사용하여 단세포 현탁액을 단리하였다. 세포를 PBS/2%FCS 중에서 세척하고, 5 μ g/mL 농도의 hu24 항체 또는 HuIgG1 (이소형 대조군)과 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 다시 PBS/2% FCS 중에서 세척한 다음, 항-인간 알렉사 플루오르647 (엑슨 이뮤노리서치)과 1:200으로 20분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 다시 세척하고, DAPI 중에 재현탁시킨 다음, BD FACS칸토 상에서 분석하여 평균 형광 강도에서의 변화 (Δ MFI)를 결정하였다. OE19 세포는 이소형 대조군을 초과하는 염색 형광을 나타내지 않은 반면에 (Δ MFI = 0), OE21 세포는 형광 강도에서 거의 2-로그 증가를 나타내었고 (Δ MFI = 5976), 이는 OE21, 식도 편평 세포 암종의 표면 상에서의 PTK7의 발현을 나타낸다.

[0433] hu24가 세포독성제의 전달을 매개할 수 있는지를 여부를 결정하기 위해, OE21 또는 OE19로부터의 해리된 단세포 현탁액 2500개 세포/웰을 BD 조직 배양 플레이트 (BD 바이오사이언시스) 상 배양 배지 중에 플레이트하였다. 플레이트 1일 후, 사포린에 공유 연결된 다양한 농도의 정제된 hu24 및 고정된 농도의 4 nM 항-HuIgG Fab 단편 (어드밴스드 타겟팅 시스템즈)을 배양물에 첨가하였다. 7-일 인큐베이션 후, 셀 타이터 글로(CELL TITER GLO)

® (프로메가)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 생존 세포 수를 열거하였다. 사포린 Fab 단편을 갖는 세포를 함유하는 배양물을 사용한 원 발광 카운트를 100% 참조 값으로 설정하고, 모든 다른 카운트를 이에 따라 계산하였다 ("정규화된 RLU"로 지칭됨). 이러한 검정을 사용하여, 표 15에 제시된 바와 같이, hu24는 OE21 세포에 대해 세포독성을 매개하지만 OE19 세포에 대해서는 그렇지 않고, 이소형 대조군은 세포 카운트에 영향을 미치지 않는다는 것이 입증되었다. 이들 결과는 항체 hu24의 세포 결합이 PTK7 발현 세포에 대한 사포린-매개 세포독성을 도출하는데 필요하지만, 비-PTK7 발현 세포에 대해서는 어떠한 영향도 갖지 않는다는 것을 나타낸다.

<표 15>

세포주	IC50 값 (µg/ml)	
	hu24+Fab-ZAP	HulgG1 대조군 + Fab-ZAP
OE21	0.5	>100
OE19	>100	>100

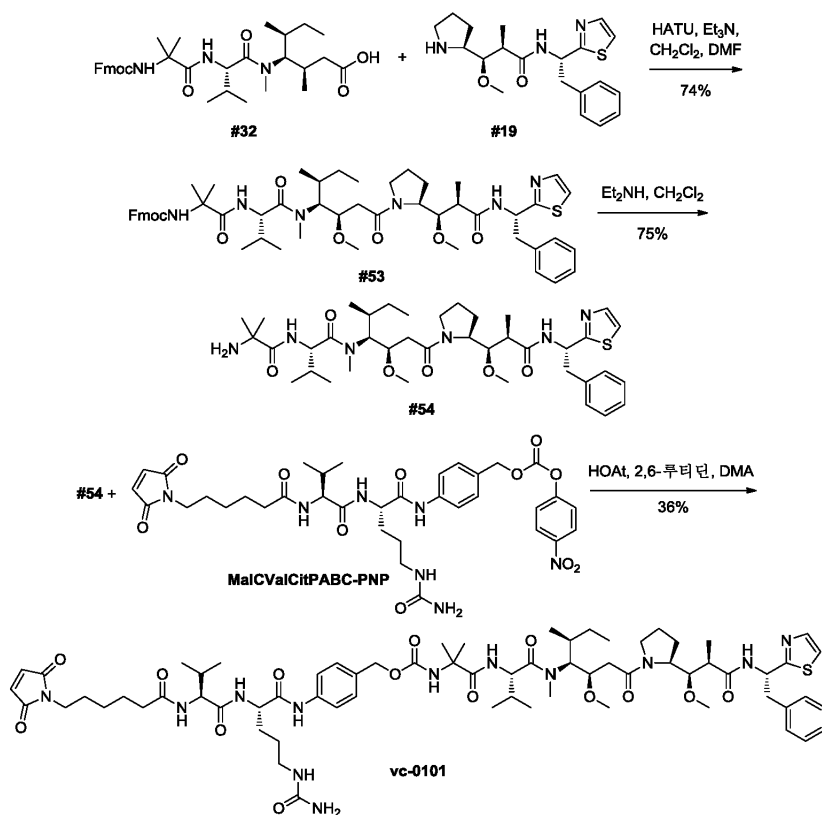
실시예 9

vc0101 및 mc8261의 합성

vc0101 (vc는 링커이고 0101은 약물임) 및 mc8261 (mc는 링커이고 8261은 약물임)의 합성을 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 국제 공개 번호 WO/2013/072813에 기재된 방법에 따라 제조하였다.

A. vc0101의 합성을 위한 실험 방법

N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-L-발릴-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-부탄-2-일]-25-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-[(1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]아미노}프로필]피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-18,18,23-트리메틸-3,16,19,22-테트라옥소-21-(프로판-2-일)-2,7,10,13,26-펜타옥사-4,17,20,23-테트라아자헵타코사-1-일]페닐}-N-5-~카르바모일-L-오르니틴아미드 (vc0101)의 제조.



단계 1. N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-3-메톡시-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-[(1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]아미노}프로필]피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드 (#53)의 합성. 디클로로메탄 (20 mL, 0.1 M) 및 N,N-디메틸포름아미드 (3

mL) 중 화합물 #32 (2.05 g, 2.83 mmol, 1 당량)의 용액에 아민 #19 (2.5 g, 3.4 mmol, 1.2 당량), HATU (1.29 g, 3.38 mmol, 1.2 당량) 및 트리에틸아민 (1.57 mL, 11.3 mmol, 4 당량)을 첨가하였다. 반응 진전을 LC-MS 및 TLC에 의해 모니터링하면서 혼합물을 실온에서 교반하였다. 완료 시, 반응물을 진공 하에 농축시키고, 잔류물을 헵탄과 3회 공비혼합하고, 생성된 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (구배: 헵탄 중 0%에서 55% 아세톤)에 의해 정제하여, 화합물 #53 (2.42 g, 74%)을 고체로서 생성하였다.

[0443] LC-MS: m/z 965.7 [M+H]⁺, 987.6 [M+Na]⁺, 체류 시간 = 1.04분 (프로토콜 H-하기);

[0444] HPLC (프로토콜 A-하기): m/z 965.4 [M+H]⁺, 체류 시간 = 11.344분 (순도 > 97%);

[0445] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), 회전이성질체의 혼합물인 것으로 추정됨, 특징적 신호: δ 7.86-7.91 (m, 2H), [7.77 (d, J=3.3 Hz) 및 7.79 (d, J=3.2 Hz), 총 1H], 7.67-7.74 (m, 2H), [7.63 (d, J=3.2 Hz) 및 7.65 (d, J=3.2 Hz), 총 1H], 7.38-7.44 (m, 2H), 7.30-7.36 (m, 2H), 7.11-7.30 (m, 5H), [5.39 (ddd, J=11.4, 8.4, 4.1 Hz) 및 5.52 (ddd, J=11.7, 8.8, 4.2 Hz), 총 1H], [4.49 (dd, J=8.6, 7.6 Hz) 및 4.59 (dd, J=8.6, 6.8 Hz), 총 1H], 3.13, 3.17, 3.18 및 3.24 (4 s, 총 6H), 2.90 및 3.00 (2 br s, 총 3H), 1.31 및 1.36 (2 br s, 총 6H), [1.05 (d, J=6.7 Hz) 및 1.09 (d, J=6.7 Hz), 총 3H].

[0446] 단계 2. 0101의 합성: 2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-3-메톡시-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-[(1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]아미노}프로필]피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드 (#54).

[0447] 디클로로메탄 (10 mL, 0.07 M) 중 화합물 #53 (701 mg, 0.726 mmol)의 용액에 디에틸아민 (10 mL)을 첨가하고, 반응 진전을 LC-MS 및 TLC에 의해 모니터링하면서 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 완료 시, 반응물을 진공 하에 농축시키고, 잔류물을 헵탄과 3회 공비혼합하고, 생성된 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (구배: 디클로로메탄 중 0%에서 10% 메탄올)에 의해 정제하였다. 잔류물을 디에틸 에테르 및 헵탄으로 희석하고, 진공 하에 농축시켜 #54 (406 mg, 75%)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0448] LC-MS: m/z 743.6 [M+H]⁺, 체류 시간 = 0.70분 (프로토콜 F-하기);

[0449] HPLC (프로토콜 A-하기): m/z 743.4 [M+H]⁺, 체류 시간 = 6.903분, (순도 > 97%);

[0450] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), 회전이성질체의 혼합물인 것으로 추정됨, 특징적 신호: δ [8.64 (br d, J=8.5 Hz) 및 8.86 (br d, J=8.7 Hz), 총 1H], [8.04 (br d, J=9.3 Hz) 및 8.08 (br d, J=9.3 Hz), 총 1H], [7.77 (d, J=3.3 Hz) 및 7.80 (d, J=3.2 Hz), 총 1H], [7.63 (d, J=3.3 Hz) 및 7.66 (d, J=3.2 Hz), 총 1H], 7.13-7.31 (m, 5H), [5.39 (ddd, J=11, 8.5, 4 Hz) 및 5.53 (ddd, J=12, 9, 4 Hz), 총 1H], [4.49 (dd, J=9, 8 Hz) 및 4.60 (dd, J=9, 7 Hz), 총 1H], 3.16, 3.20, 3.21 및 3.25 (4 s, 총 6H), 2.93 및 3.02 (2 br s, 총 3H), 1.21 (s, 3H), 1.13 및 1.13 (2 s, 총 3H), [1.05 (d, J=6.7 Hz) 및 1.10 (d, J=6.7 Hz), 총 3H], 0.73-0.80 (m, 3H).

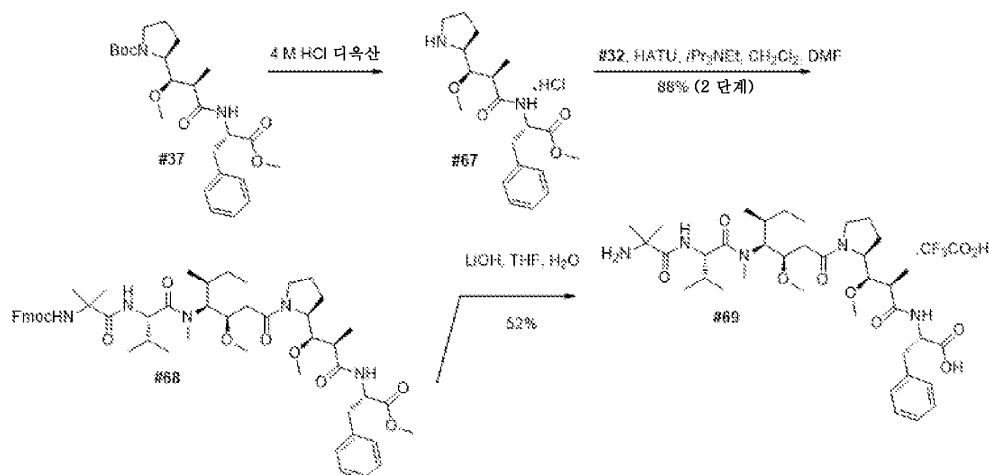
[0451] 단계 3. vc0101의 합성: N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-L-발릴-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-부탄-2-일]-25-(2-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-[(1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]아미노}프로필]피롤리딘-1-일]-2-옥소에틸)-18,18,23-트리메틸-3,16,19,22-테트라옥소-21-(프로판-2-일)-2,7,10,13,26-펜타옥사-4,17,20,23-테트라아자헵타코스-1-일]페닐}-N~5~-카르바모일-L-오르니틴아미드.

[0452] 화합물 0101 (#54)의 링커 vc (N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-L-발릴-N5-카르바모일-N-[4-([[(4-니트로페녹시)카르보닐]옥시}메틸]페닐]-L-오르니틴아미드) (MalcValCitPABC-PNP)에 대한 커플링을 일반적 절차 E (하기)에 따라 용매로서 적절한 양의 DMA 및 첨가제로서 HOAT 및 2,6-루티딘을 사용하여 달성하고, 생성된 조 목적 물질을 방법 D (하기)에 따라 정제하여 목적 생성물 33 mg (36%)을 수득하였다. 칼럼을 45 °C에서 유지시키면서 프로토콜 A (하기)에 명시된 조건 하에서, 이 물질은 9.114분의 HPLC 체류 시간 (프로토콜 A-하기)을 제공하였다.

[0453] LC-MS: m/z 1342.6 [M+H]⁺, 체류 시간 3.48분 (프로토콜 H-하기).

[0454] B. mc8261의 합성을 위한 실험 방법

[0455] N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-카르복시-2-페닐에틸]아미노]-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필]피롤리딘-1-일]-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드 (mc8261)의 제조.



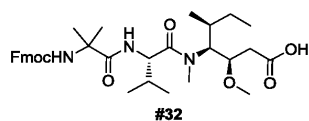
[0456]

[0457] 단계 1. 메틸 N-[(2R,3R)-3-메톡시-2-메틸-3-[(2S)-피롤리딘-2-일]프로파노일]-L-페닐알라니네이트, 히드로클로라이드 염 (#67)의 합성. 일반적 절차 C (하기)에 따라, #37 (2.39 g, 5.33 mmol, 1 당량), 디옥산 (10 mL, 0.53 M) 및 디옥산 중 4 M 염산 용액 (10 mL, 40 mmol, 7.5 당량)으로부터 #67 (2.21 g)을 백색 고체로서 합성하였고, 이를 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

[0458] LC-MS: m/z 349.2 [M+H]⁺, 체류 시간 = 0.53 분;

[0459] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.45-9.58 (br m, 1H), 8.63 (d, J=8.1 Hz, 1H), 8.51-8.62 (br m, 1H), 7.25-7.33 (m, 4H), 7.18-7.25 (m, 1H), 4.50 (ddd, J=10.8, 8.1, 4.5 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.54 (dd, J=6.8, 4.5 Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.11 (dd, J=13.8, 4.5 Hz, 1H), 2.99-3.14 (br m, 3H), 2.89 (dd, J=13.8, 10.9 Hz, 1H), 2.44-2.50 (m, 1H, 가정됨; 용매 피크에 의해 부분적으로 가려짐), 1.77-1.89 (m, 1H), 1.60-1.73 (m, 2H), 1.46-1.57 (m, 1H), 1.05 (d, J=6.8 Hz, 3H).

[0460] 단계 2. N-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-3-메톡시-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-3-[(2S)-1-메톡시-1-옥소-3-페닐프로판-2-일]아미노]-2-메틸-3-옥소프로필]피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드 (#68)의 합성. 일반적 절차 D (하기)에 따라, 디클로로메탄 (10 mL, 0.04 M) 중 #32 (353 mg, 0.488 mmol, 1 당량),



[0461]

[0462] 아민 #67 (271 mg, ≤0.588 mmol, 1.3 당량), HATU (223 mg, 0.586 mmol, 1.2 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (238 μL, 1.71 mmol, 3.5 당량)으로부터 조 목적 물질을 합성하였고, 이를 실리카 겔 크로마토그래피 (구배: 헵탄 중 0%에서 40% 아세톤)에 의해 정제하여 #68 (2 단계에 걸쳐 404 mg, 88%)을 고체로서 수득하였다.

[0463] LC-MS: m/z 940.7 [M+H]⁺, 962.7 [M+Na]⁺, 체류 시간 = 1.04분;

[0464] HPLC (프로토콜 C-하기): 체류 시간 = 9.022분;

[0465] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), 회전이성질체의 혼합물인 것으로 추정됨, 특징적 신호: δ [8.25 (br d, J=8 Hz) 및 8.48 (br d, J=8 Hz), 총 1H], 7.89 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.67-7.75 (m, 2H), 7.38-7.44 (m, 2H), 7.31-7.36 (m, 2H), 7.14-7.24 (m, 5H), 4.43-4.69 (m, 3H), 4.17-4.26 (m, 3H), 3.91-3.99 (br m, 1H), 3.63 및 3.65 (2 s, 총 3H), 3.19 및 3.24 (2 s, 총 3H), 3.14 및 3.15 (2 s, 총 3H), 2.90 및 2.99 (2 br s, 총 3H), 1.36 및 1.37 (2 br s, 총 3H), 1.30 및 1.32 (2 s, 총 3H), [1.02 (d, J=6.8 Hz) 및 1.06 (d, J=6.6 Hz), 총

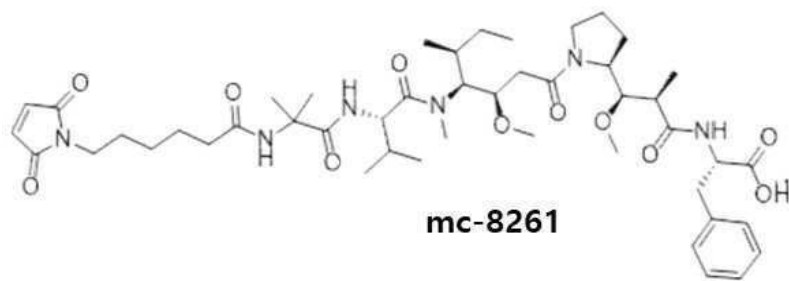
3H].

[0466] 단계 3A. 8261의 합성: 2-메틸알라닌-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-카르복시-2-페닐에틸]아미노}-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필]피롤리딘-1-일}-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드, 트리플루오로아세트산 염 (#69).

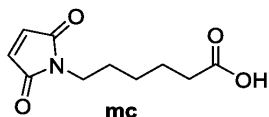
[0467] 테트라히드로푸란 (5 mL, 0.02 M) 중 #68 (143 mg, 0.152 mmol, 1 당량)의 용액에 물 (3 mL) 중 수산화리튬 (9.10 mg, 0.378 mmol, 2.5 당량)의 용액을 첨가하였다. 5시간 후, 반응물을 진공 하에 농축시키고, 헵탄과 3회 공비혼합하고, 디메틸 술폭시드 (2.2 mL) 중에 용해시키고, 역상 크로마토그래피 (방법 C-하기)에 의해 정제하여 #69 (56 mg, 52%)를 수득하였다. HPLC (프로토콜 A-하기, 45℃): 704.4 [M+H⁺], 체류 시간 = 6.623분;

[0468] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), 회전이성질체의 혼합물인 것으로 추정됨, 특징적 신호: δ 8.08-8.22 및 8.37-8.49 (2 m, 총 5H), 7.12-7.28 (m, 5H), 3.18, 3.20 및 3.24 (3 s, 총 6H), 2.95 및 3.04 (2 br s, 총 3H), 1.52 및 1.53 (2 s, 총 3H), 1.39 및 1.41 (2 s, 총 3H), [1.02 (d, J=6.8 Hz) 및 1.05 (d, J=6.6 Hz), 총 3H], 0.74-0.81 (m, 3H).

[0469] 단계 4: mc8261의 합성: N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-2-메틸알라닌-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-카르복시-2-페닐에틸]아미노}-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필]피롤리딘-1-일}-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드.



[0470]  [0471] 화합물 8261 (#69)의 링커 말레이미도카프로일 (mc)에 대한 커플링:



[0472] [0473] 을 일반적 절차 D (하기)에 따라 달성하였고, 생성된 조 목적 물질을 방법 C (하기)에 따라 정제하여 목적 생성물 30.2 mg (24%)을 수득하였다. 칼럼을 45℃에서 유지시키면서 프로토콜 A (하기)에 명시된 조건 하에서, 이 물질은 9.058분의 HPLC 체류 시간 (프로토콜 A-하기)을 제공하였다.

[0474] LC-MS: m/z 897.7 [M+H⁺], 체류 시간 0.81분 (프로토콜 H-하기).

[0475] C. 일반적 절차, 방법 및 프로토콜

[0476] 일반적 절차 C: 디옥산 중 염산을 사용한 Boc 제거 또는 tert-부틸 에스테르 (t-Bu 에스테르로도 지칭됨) 절단. 디옥산 중 Boc-함유 화합물 또는 tert-부틸 에스테르-함유 화합물의 용액 (일부 경우에 용액이 부재하거나 또는, 또는 다른 관련 용매)에 디옥산 중 염산 4 M 용액을 첨가하였다. 반응 진전을 LC-MS (또는 HPLC 또는 TLC)에 의해 모니터링하였다. 반응물을 진공 하에 농축시키고, 일부 경우에 헵탄과 1 내지 4회 공비혼합하였다.

[0477] 일반적 절차 D: O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HATU)와의 커플링. 디클로로메탄, N,N-디메틸포름아미드 (DMF로도 지칭됨), 또는 둘 다의 혼합물 중 아민 (1.0 당량) 및 산 (1.0-2.0 당량)의 교반 용액에, HATU (1.0-2.0 당량)를 첨가한 다음 트리에틸아민 (2.0-4.0 당량) 또는 디이소프로필에틸아민 (2.0-4.0 당량, 휘니그 염기로도 지칭됨)을 첨가하였다. 반응 진전을 LC-MS (또는 HPLC 또는 TLC)에 의해 모니터링하고; 반응은 통상적으로 3시간 내에 완료되었다. 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔류물을 실리카 겔 또는 역상 크로마토그래피에 의해 정제하거나, 또는 일부 경우에 헵탄과 3회 공비혼합하고,

소량의 에틸 아세테이트로 희석한 후, 실리카 또는 C18 결합된 실리카 상에서 환원시키고, 실리카 겔 또는 역상 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

- [0478] 일반적 절차 E: N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-L-발릴-N⁵-카르바모일-N-[4-({[(4-니트로페녹시)카르보닐]옥시}메틸)페닐]-L-오르니틴아미드 (MalcValCitPABC-PNP)와의 커플링. N,N-디메틸포름아미드 또는 디메틸아세트아미드 (DMA로도 지칭됨) 중 페이로드 아민 (1 당량) 및 N-[6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노일]-L-발릴-N⁵-카르바모일-N-[4-({[(4-니트로페녹시)카르보닐]옥시}메틸)페닐]-L-오르니틴아미드 (MalcValCitPABC-PNP, Eur. Pat. Appl. (1994), EP624377, 1.0-2.0 당량)의 혼합물에, 피리딘 (0.0-4.0 당량), 디이소프로필에틸아민 (0.0-4.0 당량), 2,6-디메틸피리딘 (0.0-4.0 당량, 2,6-루티딘으로도 지칭됨) 및 1-히드록시벤조트리아졸 수화물 (0.01-1.1 당량, HOBT로도 지칭됨) 또는 3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-b]피리딘-3-올 (0.01-1.1 당량, HOAT로도 지칭됨)을 첨가하였다. 40℃-50℃에서 1-48시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 진공 하에 농축시키고, 헵탄과 3회 공비혼합하였다. 조 물질을 명시된 방법에 따라 역상 크로마토그래피에 의해 정제하여 목적 물질을 수득하였다.
- [0479] 방법 C: 칼럼: 페노메넥스 루나 C18, 100 x 30 mm, 10 μm; 이동상 A: 물 중 0.02% 트리플루오로아세트산 (v/v); 이동상 B: 메탄올 중 0.02% 트리플루오로아세트산 (v/v); 구배: 20분에 걸쳐 10%에서 90% B; 유량: 20 mL/분. 온도: 제어되지 않음; 검출: DAD 210 nm, 254 nm; 주입 부피: 가변; 기기: 길슨.
- [0480] 방법 D: 칼럼: 페노메넥스 시너지 Max-RP, 150 x 21.2 mm, 4 μm; 이동상 A: 물 중 0.1% 포름산; 이동상 B: 아세트ونی트릴 중 0.1% 포름산; 구배: 1.5분 동안 30% B, 8.5분에 걸쳐 30%에서 60% B, 0.5분에 걸쳐 60%에서 100% B, 이어서 2분에 걸쳐 100% B; 유량: 27 mL/분; 검출: DAD 210-360 nm; MS (+) 범위 150-2000 달톤; 기기: 워터스 프렉션링스.
- [0481] 프로토콜 A: 칼럼: 페노메넥스 루나 C18 (2), 150 x 3.0 mm, 5 μm; 이동상 A: 물 중 0.1% 포름산 (v/v); 이동상 B: 아세트ونی트릴 중 0.1% 포름산 (v/v); 구배: 1.5분에 걸쳐 5% B, 8.5분에 걸쳐 5%에서 100% B, 이어서 1분 동안 100% B; 유량: 0.75 mL/분. 온도: 25℃; 검출: DAD 215 nm; MS (+) 범위 150-2000 달톤; 주입 부피: 10 μL 기기: 애질런트 1200 LCMS.
- [0482] 프로토콜 C: 칼럼: 페노메넥스 루나 C18 (2), 150 x 3.0 mm, 5 μm; 이동상 A: 물 중 0.02% 트리플루오로아세트산 (v/v); 이동상 B: 메탄올 중 0.02% 트리플루오로아세트산 (v/v); 구배: 10분에 걸쳐 50%에서 100% B; 유량: 0.75 mL/분. 온도: 제어되지 않음; 검출: DAD 215 nm, 254 nm; 주입 부피: 10 μL; 기기: 애질런트 1100 HPLC.
- [0483] 프로토콜 F: 칼럼: 워터스 액퀴티 UPLC BEH, C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 μm; 이동상 A: 물 중 0.1% 포름산 (v/v); 이동상 B: 아세트ونی트릴 중 0.1% 포름산 (v/v); 구배: 0.1분에 걸쳐 5% B, 0.7분에 걸쳐 5%에서 95% B, 0.1분에 걸쳐 95% B; 유량: 1.25 mL/분. 온도: 60℃; 검출: 200-450nm; MS (+) 범위 100-1200 달톤; 주입 부피: 5 μL; 기기: 워터스 액퀴티.
- [0484] 프로토콜 H: 칼럼: 페노메넥스 체미니-NX, C18, 4.6 x 50 mm, 3 μm, 110 Å; 이동상 A: 물 중 0.1% 포름산 (v/v); 이동상 B: 아세트ونی트릴 중 0.1% 포름산 (v/v); 구배: 4.10분에 걸쳐 0%에서 100% B, 선형 이어서 0.4분에 걸쳐 100% B; 유량: 1.5 mL/분. 온도: 60℃; 검출: DAD 200-450 nm; MS (+) 범위 100-2000 달톤; 주입 부피: 5 μL; 기기: 애질런트.
- [0485] 실시예 10
- [0486] 항-PTK7 항체의 생물접합
- [0487] A. 항-PTK7-vc0101 항체-약물 접합체
- [0488] 본 발명에서, 항-PTK7 항체 hu23, hu24 및 hu58을 vc0101에 접합시켜 hu23-vc0101 ADC, hu24-vc0101 ADC 및 hu58-vc0101 ADC를 생성하거나, 또는 mc8261에 접합시켜 hu23-mc8261 ADC, hu24-mc8261 ADC 및 hu58-mc8261 ADC를 생성하였다. vc0101 mc8261에 대한 hu23, hu24, 및 hu58의 접합은 시스테인 잔기의 측쇄의 유도체화에 의해 달성하였다. 이들 시스테인은 통상적으로 쇠간 시스테인 디설피드 가교로서 쌍형성하고, IgG1 항체에 대해 4개의 보존된 쌍 (8개의 시스테인 잔기를 수반함)이 존재한다. 이들 디설피드 연결의 부분 환원은 vc 링커에 대해 말레이미드 핸들로 관능화될 수 있는 유리 티올의 분포를 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 항-PTK7 항체를 37℃에서 2시간 동안 100 mM HEPES (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산 완충제), pH 7.0 및 1

mM 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA) 중 2.4 몰 과량의 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP)의 첨가를 통해 부분 환원시켰다. 이어서 vc0101 또는 mc8261 링커-페이로드를 반응 혼합물에 링커-페이로드/항체 몰비 7로 첨가하고, 15% v/v의 디메틸아세트아미드 (DMA)의 존재 하에 25℃에서 추가 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 인큐베이션 기간 후에, 3-배 과량의 N-에틸말레이미드를 첨가하여 미반응 티올을 캡핑하고, 15분 동안 반응하게 한 다음, 6-배 과량의 L-Cys를 첨가하여 임의의 미반응 링커-페이로드를 켜팅시켰다.

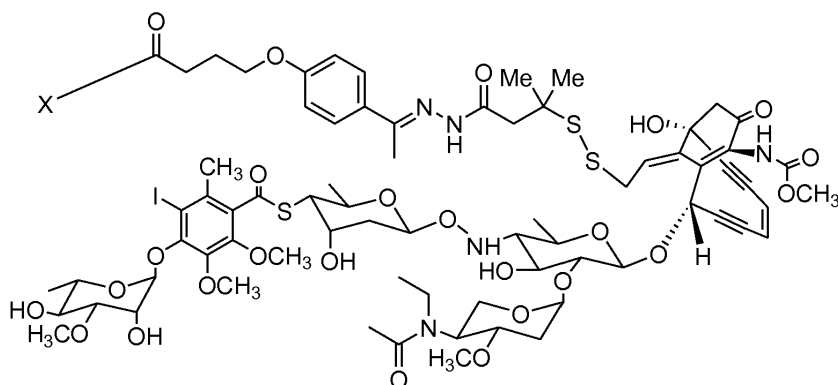
[0489] 반응 혼합물을 포스페이트 완충 염수 (PBS), pH 7.4 중 4℃에서 밤새 투석하고, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC; 악타 익스플로러(AKTA explorer), 슈퍼텍스 200)를 통해 정제하였다. 최종 ADC 약물 물질을 20mM 히스틴딘, 85mg/mL 슈크로스, pH 5.8 완충제 중에 제제화하였다.

[0490] 항-PTK 항체-약물 접합체를 SEC를 통해 순도에 대해 추가로 특징화하고, 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) 및 액체 크로마토그래피 전기분무 이온화 질량 분광측정법 (LC-ESI MS)을 사용하여 약물-항체 비 (약물 로딩)를 계산하였다. 단백질 농도는 자외선 (UV) 분광광도측정법을 통해 결정하였다. 이 방법은 항체-약물 접합체를 대략 4 mol/mol의 평균 약물-대-항체 비 (DAR)를 함유하는 관능화된 항체의 불균질 혼합물로서 제공한다.

[0491] 약물 분포 프로파일을 hu24-vc0101에 대해 HIC를 통해 평가하고, 도 7의 크로마토그램에 나타내었다. 간략하게, 분석 HIC를 TSK 겔 부틸-NPR 칼럼 상에서 수행하였다. ADC는 1.5 M 황산암모늄, 50 mM 인산칼륨 이염기성, pH 7 중에서 칼럼에 결합하였고, 50 mM 인산칼륨 이염기성 및 20% 이소프로판올 (IPA), pH 7에 의해 용리되었다.

[0492] B. 항-PTK7-AcBut CM 항체-약물 접합체

[0493] 본 발명에서, 항-PTK7 항체 hu23, hu24 및 hu58을 AcBut-N-아세틸-γ-칼리케아미신 디메틸 히드라이드 (AcButCM) OSu 에스테르에 접합시켜 하기 제시된 바와 같은 hu23-AcButCM ADC, hu24-AcButCM ADC 및 hu58-AcButCM ADC를 생성하였고, 여기서 X는 임의의 항체, 예컨대 hu23, hu24 및 hu58일 수 있다.



[0494]

[0495] 반응 혼합물은 10 mg/ml 이하의 항-PTK7 항체 및 AcButCM OSu 에스테르를 4- 4.5 대 1의 몰비로 포함하였다. 혼합 볼텍스에 AcButCM을 첨가하는 동안 빠른 교반을 수행하였다. 반응물 pH는 8.3이었고, 다른 반응 성분의 농도는 하기와 같았다: 180mM HEPES 완충제, 41mM 소듐 데카노에이트, 및 8% (v/v) 에탄올. 반응을 33℃에서 5분 동안 수행하였다. 접합 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 pH 8.5로 조정된 1.3 부피의 1M K₂HPO₄로 혼합하면서 천천히 희석시켰다.

[0496] 정제를 위해, 희석된 상기 반응 혼합물을 5 칼럼 부피 (cv)의 0.52M 인산칼륨 완충제, pH 8.5 중에서 사전 평형화된 부틸 세파로스-4 고속 유동 HIC 칼럼 (지이 헬스케어) 상에 2개의 배치로 로딩하였다. 칼럼 상에 로딩된 단백질은 3.5 mg/ml 베드 부피였다. 유량은 샘플 로딩 동안 15 ml/분이었고, 크로마토그래피의 세척 및 용리 단계 동안 22 ml/분이었다. 이러한 개선된 구배는 칼럼에 결합된 보다 높은 DAR ADC를 제거하였다.

[0497] 로딩 동안의 미결합 분획은 우세하게는 반응 시약이었고, 대부분 비접합 항체였으며, 이들을 폐기하였다. 이어서 칼럼을 0.3 cv의 0.52M 인산칼륨 완충제, pH 8.5로 세척하여 임의의 남은 시약을 제거하였다. 이어서 0.52M에서 0.4M 인산칼륨 완충제, pH 8.5로의 1 cv에 의한 단계 구배를 사용하여, 존재하는 경우에, 적게 로딩된 항-PTK7-AcButCM과 함께 임의의 느슨하게 결합된 비접합 항체를 용리시켰다. 이어서 0.4M에서 5mM 인산칼륨 완충제, pH 8.5로의 1 cv의 단계 구배를 사용하여 주요 분획을 용리시켜, 구배의 말미 무렵에 3 내지 5 범위의 DAR을 갖는 항-PTK7-AcButCM을 제공하였다. 보다 높은 DAR을 갖는 항-PTK7-AcButCM 접합체가 존재하는 경우에, 5mM 인산칼륨 완충제, pH 8.5의 2 cv의 구배를 사용하여 분획을 용리시킨 다음, 순수한 탈이온수 용리를 행하였

다. 탈이온수 용리 후에 결합된 채로 남아있는 보다 높은 DAR을 갖는 임의의 항-PTK7-AcButCM 접합체는 20% 에탄올을 함유하는 10mM 수산화나트륨 2 cv를 사용하여 용리하였다. 정제된 배치는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항-PTK7-AcButCM 접합체를 함유하였다.

[0498] 이러한 개선된 접합 및 정제 방법은 6 미만, 및 일부 측면에서 3 내지 5의 범위의 DAR을 갖는 ADC를 생성하였다. 추가로, 방법은 보다 좁은 로딩 분포, 예를 들어 생성물 내 보다 낮은 불균질성을 생성하였다. 접합 및 정제 방법에 대한 개선은 하기를 추가로 포함하였다: 1) AcButCM 대 항-PTK7 항체 비를 4-4.5 대 1로 감소시켜 보다 낮은 DAR을 갖는 ADC를 생성함, 2) 항-PTK7 항체와의 AcButCM의 첨가 동안 빠른 교반을 수행하여 비접합 항체 (유리 항체)의 양이 적은 ADC를 생성함, 3) 60-90분과 비교하여 인큐베이션 시간을 5분으로 감소시켜 적은 응집체를 제공함 및 4) 에탄올 양을 6-8%로 감소시켜 적은 응집체를 제공함. 둘 다의 배치로부터의 정제된 폴링된 피크를 제제화된 완충제에 대해 2회 투석하여 동결 상태로의 저장을 용이하게 하였다. 제제화된 완충제 조성은 20mM 트리스, 7.5% 수크로스, 0.01% 폴리소르베이트 80, 10mM NaCl, pH 8.0이었다.

[0499] 실시예 11

[0500] hu24 mAb 및 hu24 ADC의 결합 특징

[0501] hu24 mAb 및 hu24-vc0101 ADC가 PTK7의 시노물구스 원숭이 오르토로그에 결합하는지 여부를 결정하기 위해, 시노물구스 원숭이 PTK7 단백질을 클로닝하고 발현시켰다. 서열 분석은 단백질이 인간 PTK7 단백질과 97.9% 동일하다는 것을 밝혀내었다.

[0502] 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 분석을 수행하여 인간 및 시노물구스 원숭이 PTK7 단백질 엑토도메인에 대한 mAb 및 ADC의 결합 특징을 특징화하였다. 결합은 SPR 분석에 의해 대등한 것으로 결정되었다. 인간 또는 시노물구스 원숭이 PTK7 단백질에 대해 mAb 및 ADC 사이에 친화도에서 어떠한 유의한 차이도 존재하지 않았다 (표 16). 모든 K_{on} 측정치는 3-배 이내, 및 모든 K_{off} 측정치는 2-배 이내로, 기술분야에서 전형적인 체계적 오차 내인 것으로 간주되는 범위였고, 따라서 생리학상 유의하지 않을 수 있다.

[0503] <표 16> 인간 PTK7 및 시노물구스 원숭이 PTK7에 대한 hu24 및 hu24-vc0101의 친화도 상수

시험 물질	항원 종	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	$K_d (nM)$
hu24 mAb	인간	7.9 E+05	5.4 E-04	0.7
	시노물구스	4.3 E+05	5.2 E-04	1.2
hu24-vc0101	인간	5.1 E+05	5.3 E-04	1.4
	시노물구스	2.8 E+05	1.0 E-03	3.6

K_{on} = 회합률 상수; K_{off} = 해리율 상수; K_d = 평형 해리 상수; M = 몰; mAb = 모노클로날 항체; nM = 나노몰; s = 초

[0504]

[0505] 항-PTK7 mAb가 PTK7 오르토로그에 결합하는 능력을 또한 샌드위치 ELISA에 의해 평가하였다. 간략하게, 인간, 시노물구스 원숭이, 래트 또는 마우스 PTK7-His 태그부착된 단백질을 직접 코팅에 의해 ELISA 플레이트 상에 포획시켰다. 모든 항원을 1 μ g/ml, 100 μ l/웰로 포획시켰다. hu24 mAb 및 hu24-vc0101 ADC를 810 ng/ml로 출발하여 연속 희석하고, 세척 및 차단된 웰에 첨가하여 항원에 대한 결합에 대해 시험하였다. mAb 및 ADC 결합을 폴리클로날 항-인간 IgG 양고추냉이 퍼옥시다제 접합체에 의해 검출하고, TMB 기질을 사용하여 판독하였다.

[0506] mAb 및 ADC 둘 다 ELISA에 의해 인간 및 시노물구스 원숭이 PTK7 단백질에 대등하게 결합하였다 (표 17). SPR 결과와 함께, 이들 결과는 시노물구스 원숭이 PTK7에 대한 교차-반응성을 확인시켜주었고, 생물접합 방법이 mAb의 관찰된 결합 특징을 변화시키지 않는다는 것을 입증하였다. 그러나, mAb도 ADC도 래트 또는 마우스 PTK7 단백질에 대해서는, 인간 PTK7에 대한 결합을 관찰하는데 필요한 것보다 100-배 더 높은 항원 농도에서 검출가능한 결합을 나타내지 않았다 (표 17). 래트 및 마우스 항원은 공지된 교차 반응성 항원에 결합함으로써 정확하게 폴딩되는 것으로 확인되었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0507] <표 17> ELISA에 의한 PTK7 단백질에 대한 hu24 및 hu24-vc0101의 결합

	ED50 값 (ng/mL)			
	인간 PTK7	시노플구스 PTK7	랫트 PTK7	마우스 PTK7
hu24 mAb	4.7	5.0	결합 없음	결합 없음
hu24-vc0101	6.6	7.4	결합 없음	결합 없음

ADC = 항체-약물 접합체; ED50 = 50% 최대 신호를 제공하는 유효 용량; mAb = 모노클로날 항체; ng/mL = 밀리리터당 나노그램

[0508]

[0509] 비접합 hu24 및 vc0101에 접합된 hu24를, 실시예 3에 기재된 방법을 사용하여 유동 세포측정법에 의해 PTK7 발현 세포에 대한 그의 결합 능력에 대해 비교하였다. 간략하게, 배양된 H1975 또는 EKVX 세포를 수거하고, 4℃에서 hu24-vc0101 ADC 또는 비접합된 hu24 mAb와 함께 인큐베이션한 다음, 형광단-접합된 2차 mAb와 인큐베이션하고, 생존 염색한 후 유동 세포측정법에 의해 분석하였다.

[0510] 표 18은 생존 세포 집단의 평균 채널 형광을 제공한다. 독립적인 반복 실험에서 대등한 데이터가 획득되었고, 이에 따라 링커 페이로드에의 hu24의 접합은 PTK7 발현 세포에 대한 그의 결합을 변경시키지 않았다.

[0511] <표 18> 접합 및 비접합된 hu24의 대등한 세포 결합

세포주	시험 물질	hu24-vc0101 ADC 또는 hu24 mAb 의 농도			
		0.1 µg/mL	0.3 µg/mL	1 µg/mL	3 µg/mL
H1975	hu24-vc0101 ADC	94	196	302	341
	hu24 mAb	91	183	310	348
EKVX	hu24-vc0101 ADC	4	4	4	5
	hu24 mAb	4	4	4	5

[0512]

[0513] 실시예 12

[0514] 시험관내 세포독성 검정

[0515] 항체-약물 접합체 hu24-vc0101의 세포독성을 표적 PTK7을 발현하는 세포주에 대해 평가하였다. 조작된 HEK293T-PTK7 과다-발현 세포주를 투명한 편평-바닥 조직 배양 플레이트 (BD 팔콘)에 웰당 180 µL의 세포 배양 배지당 500개 세포로 플레이트링하였다. 또한 인간 암 세포주를 이 검정에서 시험하고, 그의 성장 속도에 따라 각각의 세포주에 대해 최적의 것으로 사전 결정된 밀도로 플레이트링하였다 (150 µl 중, H661 1500개 세포/웰 및 H446 9600개 세포/웰). 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, hu24-vc0101 ADC 및 8.84 Ab-vc0101 ADC (음성 대조군)를, 3 또는 10 µg/mL로 출발하여 세포 배양 배지 중 1:3 희석된 삼중 샘플의 10 지점 농도 곡선으로, 세포에 첨가하였다. 플레이트를 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 4 일 동안 인큐베이션하였다. MTS 검정 (프로메가 셀타이터 96 수성 비-방사성 세포 증식 검정)을 공급업체의 지침에 따라 사용하였다. 30 µL (H446, H661) 또는 40 µL (HEK293T-PTK7)의 조합된 MTS 시약을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. OD를 490 nm에서 96-웰 플레이트 판독기로 결정하였다. 배경 OD에 대한 제어를 위해 배지 단독을 함유하는 웰로부터의 평균 판독치를 세포를 함유하는 웰의 판독치로부터 차감하였다. 세포 생존율이 50% 억제되는 항체-약물 접합체의 농도 (IC₅₀)를 결정하기 위해, 데이터를 로지스틱 비-선형 회귀 분석 (그래프패드 프리즘 소프트웨어)에 적용시켰다.

[0516] 표 19는 세포독성 검정에서의 hu24-vc0101 ADC에 대한 IC₅₀ 값을 제공한다. 모든 3종의 세포주에서, hu24-vc0101은 강력한 세포독성을 도출한 반면에, 비-결합 8.84 Ab-vc0101은 그렇지 않았고; 이들 데이터는 hu24-vc0101의 강력한 세포독성이 항-PTK7 항체 의존성이라는 것을 입증한다.

[0517] <표 19>

세포주	IC50 값 (ng/mL)		
	hu24-vc0101 ADC	8.84 Ab-vc0101 ADC	유리 0101
HEK293-PTK7	1.7	>3000	ND
H661	27.5 ± 20.5	>10000	0.33
H446	7.6 ± 5.0	>10000	0.59

[0518]

[0519] ND = 결정되지 않음

[0520] 실시예 13

[0521] 항-PTK7 항체-약물 접합체의 생체내 효능

[0522] 항-PTK7 항체-약물 접합체의 효과를 인간 종양 환자-유래 이종이식편 (PDX)의 생체내 성장에 대해 추가로 평가하였다. 원발성 종양 절제 샘플은 인간 대상체 승인의 보호에 대한 임상시험 심사 위원회에 따라, 및 HIPAA 규정에 따라 임상 현장으로부터 입수하였다. 종양 단편을 저장하고, 병상의 히포터마솔(Hypothermasol) (바이오라이프 솔루션즈(Biolife Solutions)) 중에서 운반하고, 성장 인자의 독점적 혼합물을 함유하는 매트릭스 (BD) 중에 포매하고, 절제 24시간 이내에 암컷 NOD/SCID 마우스의 유방 지방패드 내로 피하로 이식하였다. 마우스를 매일의 건강 상태 및 종양 성장에 대해 초기에는 1주에 2회 시각적 검사에 의해 모니터링하였다. 종양이 촉진 가능하면, 종양 부피의 측정을 시작하여 종양 성장을 추적하고 세포 배가 시간을 추정하였다. 방정식 $V = (A \cdot B^2)/2$ (여기서, A는 장축이고 B는 단축임)를 사용하여 종양 부피를 추정하였다. 종양이 500 mm³ 내지 1,500mm³의 부피에 도달한 경우에, 연구 및 재이식을 위해 이를 환자-유래 이종이식편 (PDX)으로서 수거하였다. 세포주에 따라, 기계적 및/또는 화학적 해리를 사용하여 계대를 위한 개별 세포를 분리할 수 있다. 살아있는 세포를 나일론 동물 내로 동물당 10,000 내지 50,000개 세포로 접종하였다.

[0523] 효능 연구를 위해, 종양을 계대 연구로부터 수거하고, 세포를 단세포 현탁액으로 해리시켰다. 트리판 블루 배제를 사용하여 체제를 살아있는 세포에 대해 카운팅하고, 매트릭스 중 마우스당 10,000 내지 50,000개 세포로 접종하였다. PDX의 차등 성장 속도를 고려하여, 무작위 시 최소 종양 부피 분산이 가능하도록 적어도 25% 초과 동물에 출발시켰다. 종양 부피가 약 30mm³에 도달하면 측정을 시작하였고 종양 성장은 초기에 촉진가능하였다. 종양-보유 마우스의 코호트가 140 mm³ 내지 180mm³에 도달하면, 종양 크기에 기초하여 연구를 무작위화하였다. 동물에게 2주 동안 1주에 2회 (q4dx4) 복강내 주사에 의해 투여하였다. IACUC 프로토콜에 따라 희생이 제시되는 경우인 개별 마우스 또는 전체 군 종양 측정치가 1200mm³에 도달할 때까지 연구 군을 추적하였다. 선택된 투여 연구를 위해, 약동학적 약화 출혈을 2시간, 36시간 및 72시간째에 수행하였다. 혈액 10 µL 부피를 90 µL의 HBS-P (지이 헬스케어) 내로 즉시 피펫팅하였다. 샘플을 -80℃에서 저장한 후 분석하였다. 각각의 종양 측정을 위해, 종양 부피 ± 평균의 표준 오차 (SEM)를 제공한다. GT = 큰 종양 크기로 인해 종결된 군. 모든 연구는 대등한 약물-대-항체 비 (DAR) 및 로딩 분포를 갖는, 분석되는 동일한 링커-페이로드에 접합된 비-결합 hIgG1 항체로 구성된 대조군 항체 약물 접합체를 포함하였다.

[0524] 표 20-37은 상대적 PTK7 발현이 낮은, 중간, 또는 높은 것으로 결정된 다양한 인간 종양 세포를 사용하여 확립된 PDX 모델에서의 항체-약물 접합체 hu24-vc0101, hu24-vc0101, hu58-vc0101, hu23-AcButCM, hu24-AcButCM 및 hu58-AcButCM의 유효성을 입증한다.

[0525] A. 유방암 (BR)

[0526] 표 20 및 도 8은 hu23-vc0101, hu24-vc0101, 및 hu58-vc0101 ADC가 비히클 및 약물 대조군과 비교하여 인간 유방-13 (BR13) 삼중-음성 유방암 (TNBC) PDX 모델 (높은 PTK7 발현)을 사용한 PDX 모델에서 모두 효과적이라는 것을 제시한다. hu24-vc0101 ADC는 BR13 PDX 모델에서 hu23-vc0101 및 hu58-vc0101 둘 다보다 더 효과적이었다. 시험된 모든 PTK7 ADC는 TNBC의 표준 관리 치료인 독소루비신보다 더 효과적이었다.

[0527] <표 20> BR13 TNBC PDX에서의 항-PTK7-vc0101 ADC의 효능.

일	비히클	1 mg/kg 독소루비신	3mg/kg 대조군-vc0101	3mg/kg hu23-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu58-vc0101
0	144 ± 13	156 ± 13	153 ± 9	154 ± 9	153 ± 10	151 ± 10
7	174 ± 13	219 ± 29	211 ± 17	199 ± 12	194 ± 12	183 ± 14
14	255 ± 22	295 ± 39	277 ± 28	206 ± 16	175 ± 17	159 ± 15
21	349 ± 40	353 ± 45	323 ± 44	116 ± 16	97 ± 11	110 ± 12
28	428 ± 48	432 ± 50	413 ± 48	48 ± 7	41 ± 4	61 ± 13
35	734 ± 74	696 ± 84	537 ± 66	39 ± 6	37 ± 5	37 ± 3
42	940 ± 105	1001 ± 159	591 ± 74	23 ± 7	20 ± 5	27 ± 3
49	GT	GT	775 ± 87	23 ± 7	19 ± 7	40 ± 5
56	GT	GT	952 ± 89	15 ± 6	4 ± 4	32 ± 3
63	GT	GT	1181 ± 119	6 ± 4	0 ± 0	40 ± 6
70	GT	GT	1287 ± 98	7 ± 5	0 ± 0	48 ± 7
77	GT	GT	1449 ± 125	8 ± 5	0 ± 0	64 ± 10
84	GT	GT	GT	14 ± 10	0 ± 0	85 ± 15
91	GT	GT	GT	20 ± 11	0 ± 0	119 ± 28
98	GT	GT	GT	39 ± 18	0 ± 0	165 ± 26
105	GT	GT	GT	52 ± 22	0 ± 0	236 ± 29
112	GT	GT	GT	94 ± 41	0 ± 0	314 ± 37
119	GT	GT	GT	116 ± 50	0 ± 0	389 ± 51
126	GT	GT	GT	123 ± 52	0 ± 0	538 ± 73
133	GT	GT	GT	152 ± 71	0 ± 0	624 ± 76
140	GT	GT	GT	204 ± 97	0 ± 0	849 ± 78
147	GT	GT	GT	257 ± 125	0 ± 0	935 ± 74
154	GT	GT	GT	318 ± 141	0 ± 0	954 ± 65
161	GT	GT	GT	352 ± 148	0 ± 0	GT

[0528]

[0529] 도 9 및 10은 hu24-vc0101과 비교하여 BR13 TNBC PDX 모델 (높은 PTK7 발현)에서의 hu23-mc8261, hu24-mc8261, 및 hu58-mc8261 ADC의 효능을 제시한다. hu24-vc0101에 의한 처리는 200일을 넘는 동안 지속된 종양 퇴행을 발생시켰고, 항-PTK7-mc8261 ADC와 비교하여 종양 성장의 보다 큰 억제를 입증하였다.

[0530] 표 21 및 도 11은 hu23-vc0101, hu24-vc0101, 및 hu58-vc0101 ADC가 비히클 및 약물 대조군과 비교하여 인간 유방-22 (BR22) TNBC PDX 모델 (높은 PTK7 발현)을 사용한 PDX 모델에서 모두 효과적이라는 것을 제시한다. 이 모델에서 hu23-vc0101 및 hu24-vc0101 ADC는 hu58-vc0101보다 더 효과적이었고, 이는 동일한 표적 (PTK7)에 대한 유사한 항체가 다양한 정도의 효능을 갖는다는 것을 입증한다. 시험된 모든 PTK7 ADC는 TNBC에 대한 표준 관리 치료인 도세탁셀보다 더 효과적이었다. 명백하게, 도세탁셀 및 ADC의 약물 성분, 아우리스타틴 0101은 그들이 튜블린 중합을 억제한다는 점에서 유사한 작용 메커니즘을 갖는다.

[0531] <표 21> BR22 TNBC PDX에서의 항-PTK7-vc0101 ADC의 효능.

일	비히클	20mg/kg 도세탁셀	3mg/kg 대조군- vc0101	1mg/kg hu24- vc0101	3mg/kg hu24- vc0101	3mg/kg hu58- vc0101	3mg/kg hu23- vc0101
0	171 ± 19	182 ± 21	164 ± 14	172 ± 22	170 ± 19	143 ± 7	150 ± 9
7	354 ± 52	154 ± 23	221 ± 34	245 ± 28	89 ± 22	169 ± 13	100 ± 11
14	655 ± 99	107 ± 51	207 ± 49	157 ± 48	21 ± 5	49 ± 12	10 ± 6
21	1028 ± 142	218 ± 98	129 ± 40	213 ± 97	0 ± 0	38 ± 24	1 ± 1
28	GT	418 ± 165	209 ± 71	266 ± 114	0 ± 0	84 ± 55	0 ± 0
35	GT	1191 ± 264	482 ± 142	357 ± 156	0 ± 0	157 ± 91	0 ± 0
42	GT	GT	724 ± 212	758 ± 225	0 ± 0	301 ± 178	0 ± 0
49	GT	GT	1054 ± 308	912 ± 203	0 ± 0	584 ± 339	0 ± 0
56	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	813 ± 381	0 ± 0
63	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	943 ± 409	0 ± 0
70	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
77	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
84	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
91	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
98	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
105	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
112	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
119	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
126	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
133	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
140	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
147	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
154	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
161	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0

[0532]

[0533] 표 22는 hu23-AcButCM, hu24-AcButCM, 및 hu58-AcButCM ADC가 비히클 및 약물 대조군과 비교하여 BR22 TNBC PDX 모델 (높은 PTK7 발현)에서 모두 효과적이라는 것을 제시한다. 그러나, hu58-AcButCM은 hu23-AcButCM 및 hu24-AcButCM 둘 다보다 더 효과적이었고, 이는 동일한 표적에 대한 유사한 항체와 다양한 페이로드의 사용의 예측불가능한 속성을 예시한다. hu23-vc0101 및 hu24-vc0101 ADC는 hu58-vc0101보다 더 효과적인 반면에, hu58-AcButCM은 hu23-AcButCM 및 hu24-AcButCM ADC 둘 다보다 더 효과적이다. 시험된 모든 PTK7 ADC는 TNBC에 대한 표준 관리 치료인 도세탁셀보다 더 효과적이었다.

[0534] <표 22> BR22 TNBC PDX에서의 ADC의 효능.

일	비히클	1.5mg/kg 독소루비신	0.3mg/kg 대조군- AcButCM	0.3mg/kg hu23- AcButCM	0.3mg/kg hu58- AcButCM	0.3mg/kg hu24- AcButCM
0	303 ± 16	297 ± 17	186 ± 16	186 ± 15	157 ± 13	193 ± 16
14	797 ± 71	641 ± 39	456 ± 55	140 ± 15	30 ± 5	185 ± 71
28	GT	GT	1019 ± 148	11 ± 2	0 ± 0	32 ± 28
63	GT	GT	GT	100 ± 83	10 ± 10	118 ± 117
91	GT	GT	GT	652 ± 479	67 ± 67	723 ± 695
119	GT	GT	GT	999 ± 527	125 ± 125	862 ± 797
133	GT	GT	GT	GT	125 ± 125	968 ± 794
161	GT	GT	GT	GT	125 ± 125	1538 ± 1098
175	GT	GT	GT	GT	150 ± 150	GT

[0535]

[0536] 도 12 및 13은 hu23-vc0101과 비교하여 BR22 TNBC PDX 모델 (높은 PTK7 발현)에서의 hu23-mc8261, hu24-mc8261, 및 hu58-mc8261 ADC의 효능을 제시한다. hu23-vc0101에 의한 처리는 200일을 넘는 동안 지속된 종양 퇴행을 발생시켰고, 항-PTK7-mc8261 ADC와 비교하여 종양 성장의 보다 큰 억제를 입증하였다.

[0537] 표 23-25 및 도 14는 유방-31 (BR31) TNBC PDX 모델 (높은 PTK7 발현)에서의 hu23-vc0101, hu24-vc0101, hu58-vc0101, hu23-mc8261 및 hu24-mc8261, hu58-mc8261 및 hu23-AcButCM, hu24-AcButCM, hu58-AcButCM ADC의 효능을 제시한다. 이 모델에서, vc0101 링커-페이로드를 갖는 모든 3종의 ADC는 AcButCM 또는 mc8261을 갖는 ADC보다 더 효과적이었다. 이러한 결과는 AcButCM 링커 페이로드가 일반적으로 시험된 생체내 PDX 모델에서 vc0101 링커 페이로드보다 더 강력하기 때문에 예상치 못한 것이다. 또한, PTK7-vc0101 ADC는 도세탁셀보다 더 효과적

이었고, PTK7-AcButCM ADC는 독소루비신보다 더 효과적이었다. 도세탁셀 및 독소루비신은 둘 다 TNBC에 대한 표준 관리이다.

[0538] <표 23> BR31 TNBC PDX에서의 항-PTK7-vc0101 ADC의 효능.

일	비히클	20mg/kg 도세탁셀	3mg/kg 대조군-vc0101	3mg/kg hu23-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu58-vc0101
0	159 ± 10	259 ± 47	148 ± 12	164 ± 14	159 ± 15	158 ± 12
7	269 ± 17	331 ± 70	227 ± 23	178 ± 23	188 ± 12	170 ± 25
14	425 ± 32	371 ± 82	133 ± 10	79 ± 8	82 ± 7	100 ± 11
21	668 ± 50	451 ± 91	101 ± 21	28 ± 7	21 ± 3	38 ± 3
28	1088 ± 93	510 ± 103	70 ± 17	8 ± 3	0 ± 0	21 ± 7
35	GT	614 ± 117	105 ± 28	0 ± 0	0 ± 0	8 ± 5
42	GT	790 ± 117	21 ± 76	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
49	GT	837 ± 126	234 ± 83	2 ± 0	0 ± 0	30 ± 18
56	GT	ND	393 ± 103	2 ± 1	0 ± 0	3 ± 1
63	GT	1131 ± 148	680 ± 181	2 ± 1	0 ± 0	17 ± 9
70	GT	1317 ± 182	1169 ± 300	8 ± 3	0 ± 0	35 ± 18
77	GT	GT	1300 ± 331	13 ± 4	1 ± 1	70 ± 24
84	GT	GT	GT	32 ± 10	2 ± 2	108 ± 32
91	GT	GT	GT	59 ± 24	10 ± 10	143 ± 36
98	GT	GT	GT	59 ± 15	13 ± 13	213 ± 46
105	GT	GT	GT	115 ± 35	111 ± 92	295 ± 68
112	GT	GT	GT	249 ± 75	370 ± 269	551 ± 155
119	GT	GT	GT	293 ± 72	521 ± 429	691 ± 143
126	GT	GT	GT	449 ± 100	551 ± 428	826 ± 155
133	GT	GT	GT	541 ± 135	745 ± 499	914 ± 155
140	GT	GT	GT	658 ± 130	765 ± 494	GT
147	GT	GT	GT	810 ± 145	794 ± 488	GT

[0539]

[0540] <표 24> BR31 TNBC PDX에서의 항-PTK7-mc8261 ADC의 효능.

일	비히클	10mg/kg hu23-mc8261	10mg/kg hu24-mc8261	10mg/kg hu58-mc8261
0	159 ± 10	154 ± 8	154 ± 9	161 ± 13
7	269 ± 17	238 ± 7	202 ± 20	225 ± 21
14	425 ± 32	304 ± 12	275 ± 35	280 ± 29
21	668 ± 50	383 ± 32	370 ± 53	390 ± 39
28	1088 ± 93	601 ± 70	609 ± 81	635 ± 55
35	GT	857 ± 88	862 ± 139	889 ± 118

[0541]

[0542] <표 25> BR31 TNBC PDX에서의 항-PTK7-AcButCM ADC의 효능.

일	비히클	1.5mg/kg 독소루비신	0.3mg/kg 대조군- AcButCM	0.3mg/kg hu58- AcButCM	0.3mg/kg hu23- AcButCM	0.3mg/kg hu24- AcButCM
0	159 ± 10	160 ± 11	145 ± 11	145 ± 12	144 ± 9	149 ± 11
7	269 ± 17	304 ± 20	223 ± 25	199 ± 21	236 ± 20	188 ± 14
28	1088 ± 93	759 ± 111	675 ± 158	270 ± 42	236 ± 36	106 ± 7
35	GT	GT	869 ± 204	381 ± 46	339 ± 69	139 ± 15
63	GT	GT	GT	885 ± 150	920 ± 208	299 ± 41
77	GT	GT	GT	GT	GT	590 ± 104
84	GT	GT	GT	GT	GT	882 ± 183

[0543]

[0544] 표 26 및 도 15는 hu24-vc0101 ADC가 비히클 및 약물 대조군과 비교하여 인간 유방-64 (BR64) TNBC PDX 모델 (중간 PTK7 발현)에서 효과적이라는 것을 제시한다. 데이터는 PTK7 표적의 중간 정도의 발현을 갖는 PDX 모델이 hu24-vc0101에 의해 효과적으로 표적화된다는 것을 입증한다. hu24-vc0101은 TNBC에 대한 표준 관리인 도세탁셀보다 더 효과적이었다.

[0545] <표 26> BR64 TNBC PDX에서의 hu24-vc0101의 효능.

일	비히클	20mg/kg 도세탁셀	3mg/kg 대조군-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101
0	499 ± 36	543 ± 46	190 ± 30	173 ± 24
7	832 ± 119	1112 ± 97	418 ± 62	271 ± 30
14	1768 ± 284	1805 ± 206	839 ± 91	180 ± 55
21	GT	GT	1907 ± 576	96 ± 30
28	GT	GT	GT	53 ± 21
35	GT	GT	GT	15 ± 6
42	GT	GT	GT	27 ± 22
49	GT	GT	GT	65 ± 58
56	GT	GT	GT	144 ± 141
63	GT	GT	GT	394 ± 392
70	GT	GT	GT	422 ± 385
77	GT	GT	GT	690 ± 460
84	GT	GT	GT	1094 ± 594

[0546]

[0547] 도 16은 BR5 TNBC PDX 모델에서의 hu24-vc0101의 효능 및 비접합된 hu24의 효능의 결여를 제시한다. Br5 인간 유방암 이종이식편을 보유하는 마우스에게 4주기 동안 4일마다 (Q4Dx4) hu24-vc0101 ADC, 비접합된 hu24 mAb 또는 비히클을 투여하였다. 디지털 캘리퍼를 사용하여 종양 측정치를 1주에 2회 기록하고, 평균 ± SEM으로서 제시한다. 3 mg/kg 용량의 hu24-vc0101 ADC는 제49일까지 종양 성장 없이 종양 퇴행을 유발하였다. 대조적으로, 비접합된 hu24 mAb는 종양 성장을 억제하지 않았다 (도 16). 따라서, 관찰된 효능은 링커-페이로드의 전달에 의존적이다.

[0548] 도 17은 BR36 PR+ TNBC PDX 모델에서의 파클리탁셀과 비교한 hu24-vc0101의 효능을 제시한다. BR36 인간 유방암 이종이식편을 보유하는 마우스에게 Q4Dx4로 hu24-vc0101 ADC, 파클리탁셀, 음성 대조군 ADC 또는 비히클을 투여하였다. 디지털 캘리퍼를 사용하여 종양 측정치를 1주에 2회 기록하고, 평균 ± SEM으로서 제시한다. 3 mg/kg 용량의 hu24-vc0101 ADC는 제103일까지 종양 성장 없이 종양 퇴행을 유발하였다. hu24-vc0101은 MTD에서 투여된 파클리탁셀을 능가하였다. 음성 대조군 ADC는 단지 적당한 활성을 나타내었다 (도 17).

[0549] B. 소세포 폐암 (SCLC)

[0550] 표 27-28의 데이터는 소세포 폐암-64 (LU64) PDX 모델 (낮은 PTK7 발현)에서의 hu24-vc0101 및 hu24-AcButCM ADC의 유효성을 예시한다. 이 모델에서, 둘 다의 ADC는, AcButCM 링커 페이로드를 갖는 ADC가 vc0101 링커 페이로드를 갖는 ADC보다 더 효과적이기는 하지만, 낮은 PTK7 발현의 이러한 PDX에서 효과적이라는 것을 제시하였다. 둘 다의 hu24-vc0101 및 hu24-AcButCM은 SCLC에 대한 표준 관리 (시스플라틴 플러스 에토포시드)보다 더 효과적이었다.

[0551] <표 27> LU64 PDX에서의 hu24-vc0101 ADC의 효능.

일	비히클	5mg/kg 시스플라틴 + 24mg/kg 에토포시드	3mg/kg 대조군-vc0101	10mg/kg 대조군-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101	10mg/kg hu24-vc0101
0	139 ± 12	139 ± 10	156 ± 11	168 ± 14	166 ± 15	178 ± 19
7	241 ± 25	25 ± 5	255 ± 26	312 ± 38	252 ± 11	348 ± 32
14	376 ± 33	31 ± 5	379 ± 26	433 ± 49	310 ± 38	391 ± 42
21	613 ± 39	77 ± 22	493 ± 38	619 ± 72	389 ± 35	377 ± 66
28	1087 ± 86	151 ± 38	718 ± 92	824 ± 85	537 ± 67	500 ± 76
35	GT	214 ± 54	912 ± 158	GT	651 ± 70	618 ± 113
42	GT	285 ± 72	GT	GT	932 ± 128	773 ± 141
49	GT	738 ± 127	GT	GT	GT	838 ± 171
56	GT	1011 ± 172	GT	GT	GT	1054 ± 185
63	GT	GT	GT	GT	GT	1367 ± 290

[0552]

[0553] <표 28> LU64 PDX에서의 hu24-AcButCM ADC의 효능.

일	비히클	5mg/kg 시스플라틴 + 24mg/kg 에토포시드	0.1mg/kg 대조군- AcButCM	0.02mg/kg hu24- AcButCM	0.05mg/kg hu24- AcButCM	0.1mg/kg hu24- AcButCM
0	139 ± 12	139 ± 10	171 ± 11	137 ± 10	137 ± 10	136 ± 9
21	613 ± 39	77 ± 22	575 ± 45	13 ± 4	1 ± 1	0 ± 0
28	1087 ± 86	151 ± 38	723 ± 77	12 ± 4	0 ± 0	0 ± 0
35	GT	214 ± 54	998 ± 107	24 ± 10	0 ± 0	0 ± 0
42	GT	285 ± 72	GT	36 ± 17	0 ± 0	0 ± 0
56	GT	1011 ± 172	GT	168 ± 55	0 ± 0	0 ± 0
63	GT	GT	GT	274 ± 89	0 ± 0	0 ± 0
105	GT	GT	GT	760 ± 206	0 ± 0	0 ± 0
112	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0
168	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0

[0554]

[0555] 표 29는 LU64 PDX 모델 (낮은 PTK7 발현)에서의 hu23-mc8261, hu24-mc8261, 및 hu58-mc8261 ADC의 효능을 제시한다. hu24-vc0101에 의한 처리는 이 모델에서 항-mc8261 ADC보다 종양 성장의 더 큰 억제를 입증하였다.

[0556] <표 29> LU64 PDX에서의 항-PTK7-mc8261 ADC의 효능.

일	비히클	10mg/kg hu23-mc8261	10mg/kg hu24-mc8261	10mg/kg hu58-mc8261
0	184 ± 24	171 ± 11	170 ± 12	177 ± 15
7	269 ± 26	239 ± 14	257 ± 29	279 ± 32
14	417 ± 16	311 ± 19	330 ± 45	364 ± 31
21	591 ± 37	455 ± 38	435 ± 76	517 ± 47
28	738 ± 103	572 ± 51	622 ± 119	760 ± 74
35	771 ± 92	770 ± 92	903 ± 197	1029 ± 95
42	970 ± 64	1088 ± 116	GT	GT

[0557]

[0558] 표 30-31은 소세포 폐암-86 (LU86) PDX 모델 (높은 PTK7 발현)에서의 hu24-vc0101, hu23-vc0101 및 hu24-AcButCM ADC의 효능을 제시한다. 이 모델에서, 둘 다의 hu24-vc0101 및 hu23-vc0101은 종양 성장을 억제하는데 효과적이었다. hu24-vc0101은 대조군-vc0101 ADC보다 더 효과적이었다. 그러나, hu24-AcButCM ADC는 vc0101 링커 페이로드를 갖는 둘 다의 ADC보다 더 강력하였고 (표 22), 이는 SCLC 모델에서 vc0101과 비교하여 AcButCM의 일반적인 보다 큰 효력의 추가의 예를 제공한다. hu24-AcButCM은 SCLC에 대한 표준 관리인 시스플라틴 플러스 에토포시드보다 더 효과적이었다.

[0559] <표 30> LU86 PDX에서의 항-PTK7-vc0101 ADC의 효능.

일	비히클	3mg/kg 대조군-vc0101	0.3mg/kg hu24- vc0101	1mg/kg hu24- vc0101	3mg/kg hu24- vc0101	3mg/kg hu23- vc0101
0	139 ± 11	164 ± 19	145 ± 11	143 ± 12	141 ± 11	200 ± 23
7	334 ± 44	228 ± 45	362 ± 39	282 ± 46	194 ± 24	42 ± 11
14	758 ± 100	310 ± 39	758 ± 62	363 ± 77	56 ± 11	0 ± 0
21	1213 ± 140	394 ± 57	1441 ± 97	420 ± 115	5 ± 4	0 ± 0
28	GT	748 ± 102	GT	621 ± 159	0 ± 0	0 ± 0
35	GT	1279 ± 198	GT	784 ± 141	0 ± 0	0 ± 0
42	GT	GT	GT	915 ± 105	0 ± 0	0 ± 0
49	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0
56	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0
63	GT	GT	GT	GT	17 ± 17	0 ± 0
70	GT	GT	GT	GT	73 ± 45	0 ± 0
77	GT	GT	GT	GT	121 ± 67	0 ± 0
84	GT	GT	GT	GT	204 ± 90	0 ± 0
91	GT	GT	GT	GT	477 ± 272	0 ± 0
98	GT	GT	GT	GT	570 ± 270	0 ± 0
105	GT	GT	GT	GT	689 ± 281	19 ± 19
112	GT	GT	GT	GT	GT	72 ± 72
119	GT	GT	GT	GT	GT	154 ± 154
203	GT	GT	GT	GT	GT	154 ± 154

[0560]

[0561] <표 31> LU86 PDX에서의 hu24-AcButCM ADC의 효능.

일	비히클	5mg/kg 시스플라틴 + 24mg/kg 에토포시드	0.3mg/kg 대조군- AcButCM	0.03mg/kg hu24- AcButCM	0.1mg/kg hu24- AcButCM	0.3mg/kg hu24- AcButCM
0	206 ± 25	149 ± 13	158 ± 20	147 ± 13	143 ± 12	150 ± 13
14	1019 ± 6	468 ± 47	393 ± 115	756 ± 79	443 ± 90	73 ± 25
21	GT	946 ± 77	571 ± 173	1245 ± 138	548 ± 120	18 ± 5
28	GT	GT	788 ± 166	GT	761 ± 154	3 ± 2
35	GT	GT	962 ± 176	GT	908 ± 155	0 ± 0
42	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
112	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
140	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
154	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
203	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0

[0562]

[0563] 표 32는 LU86 PDX 모델 (높은 PTK7 발현)에서의 hu23-mc8261, hu24-mc8261, 및 hu58-mc8261 ADC의 효능을 보여준다. hu23-vc0101에 의한 처리는 LU86 PDX 모델에서 지속된 종양 퇴행을 발생시켰고, 항-PTK7-mc8261 ADC와 비교하여 종양 성장의 더 큰 억제를 입증하였다.

[0564] <표 32> LU86 PDX에서의 항-PTK7-mc8261 ADC의 효능.

일	비히클	10mg/kg hu23-mc8261	10mg/kg hu24-mc8261	10mg/kg hu58-mc8261
0	147 ± 11	159 ± 13	159 ± 14	158 ± 15
7	317 ± 33	228 ± 29	257 ± 27	225 ± 20
14	672 ± 62	256 ± 30	300 ± 37	321 ± 34
21	1233 ± 83	340 ± 48	383 ± 65	425 ± 42
28	GT	455 ± 68	544 ± 90	574 ± 57
35	GT	740 ± 78	815 ± 117	736 ± 76
42	GT	870 ± 99	903 ± 157	887 ± 106
49	GT	1165 ± 137	1333 ± 173	1265 ± 206

[0565]

[0566] 도 18a-b는 2종의 상이한 SCLC PDX 모델, H1048 PDX 모델 (높은 PTK7 발현) 및 SCLC 95 PDX 모델 (높은 PTK7 발현) 각각에서의 0101 또는 CM에 접합된 PTK7 ADC의 효능을 보여준다.

[0567] 도 19a-b는 2종의 상이한 SCLC PDX 모델, SCLC 117 PDX 모델 (중간 정도의 PTK7 발현) 및 SCLC 102 PDX 모델 (낮은 PTK7 발현) 각각에서의 hu24-AcBut CM의 효능을 보여준다. 결과는 hu24-AcButCM 또는 hu23-AcButCM ADC가 SCLC에 대해 hu24-vc0101 ADC보다 더 효과적이라는 것을 입증한다. 이러한 발견은 다른 종양 유형, 예컨대 TNBC 및 NSCLC의 PDX 모델에서의 hu24-vc0101의 강력한 항종양 활성에 비추어 예상치 못한 것이다. 또한, 결과는, hu24-AcButCM ADC가 낮은 PTK7 발현을 갖는 SCLC102에서 가장 약한 반응을 도출하였기 때문에, ADC의 활성이 PTK7의 발현과 상관된다는 것을 시사한다.

[0568] C. 비소세포 폐암 (NSCLC)

[0569] 표 33 및 도 20은 hu24-vc0101 ADC가 비히클 및 약물 대조군과 비교하여 인간 비소세포 폐암-135 (LU135) PDX 모델 (높은 PTK7 발현)에서 효과적이라는 것을 보여준다. 이러한 데이터는 NSCLC PDX에서 종양 성장을 억제하는데 있어서의 hu24-vc0101의 유효성을 입증한다. hu24-vc0101은 NSCLC에서의 표준 관리인 파클리탁셀보다 더 효과적이었다.

[0570] <표 33> LU135 PDX에서의 hu24-vc0101의 효능.

일	비히클	20mg/kg 파클리탁셀	1mg/kg 대조군-vc0101	3mg/kg 대조군-vc0101	1mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101
0	162 ± 17	175 ± 24	161 ± 15	168 ± 18	158 ± 18	186 ± 23
7	446 ± 28	77 ± 13	461 ± 19	329 ± 39	369 ± 53	79 ± 6
14	615 ± 34	58 ± 12	655 ± 39	337 ± 50	520 ± 81	41 ± 4
21	830 ± 71	60 ± 11	752 ± 46	414 ± 31	651 ± 95	60 ± 8
28	982 ± 68	93 ± 20	815 ± 101	488 ± 40	838 ± 133	84 ± 15
35	GT	110 ± 31	GT	627 ± 60	GT	104 ± 17
42	GT	184 ± 48	GT	871 ± 117	GT	175 ± 26
49	GT	284 ± 78	GT	GT	GT	244 ± 19
56	GT	384 ± 106	GT	GT	GT	347 ± 34
63	GT	538 ± 178	GT	GT	GT	387 ± 47
70	GT	667 ± 174	GT	GT	GT	502 ± 96
77	GT	724 ± 171	GT	GT	GT	628 ± 152

[0571]

[0572] 표 34 및 도 21은 hu24-vc0101 ADC가 비히클 및 약물 대조군과 비교하여 인간 비소세포 폐암-176 (LU176) PDX 모델 (높은 PTK7 발현)에서 효과적이라는 것을 보여준다. 이러한 데이터는 NSCLC PDX에서 종양 성장을 억제하는데 있어서의 hu24-vc0101의 유효성을 입증한다. hu24-vc0101은 NSCLC에서의 표준 관리인 시스플라틴보다 더 효과적이었다.

[0573] <표 34> LU176 PDX에서의 hu24-vc0101의 효능.

일	비히클	5mg/kg 시스플라틴	3mg/kg 대조군-vc0101	1mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101
0	262 ± 17	259 ± 26	139 ± 9	148 ± 12	138 ± 10
7	658 ± 71	124 ± 30	245 ± 29	446 ± 222	77 ± 21
14	964 ± 196	97 ± 22	208 ± 26	401 ± 214	27 ± 6
21	2087 ± 381	102 ± 24	244 ± 54	458 ± 204	34 ± 9
28	GT	179 ± 71	366 ± 88	685 ± 193	21 ± 3
35	GT	207 ± 69	679 ± 154	1046 ± 288	22 ± 8
42	GT	297 ± 97	955 ± 129	GT	20 ± 7
49	GT	619 ± 262	GT	GT	28 ± 14
56	GT	GT	GT	GT	14 ± 4
63	GT	GT	GT	GT	10 ± 4
70	GT	GT	GT	GT	5 ± 2
77	GT	GT	GT	GT	9 ± 5
84	GT	GT	GT	GT	8 ± 8
91	GT	GT	GT	GT	11 ± 11
98	GT	GT	GT	GT	21 ± 16
105	GT	GT	GT	GT	28 ± 27
112	GT	GT	GT	GT	46 ± 44
119	GT	GT	GT	GT	140 ± 140
126	GT	GT	GT	GT	281 ± 281
133	GT	GT	GT	GT	366 ± 366
140	GT	GT	GT	GT	649 ± 649

[0574]

[0575] D. 난소암 (OV)

[0576] 표 35는 비히클 및 약물 대조군과 비교하여 난소-55 (OV55) PDX 모델 (중간 PTK7 발현)에서의 hu24-vc0101 및 hu24-AcButCM ADC의 효능을 보여준다. 이러한 데이터는 PTK7 표적의 중간 정도의 발현을 갖는 난소 PDX 모델이 둘 다의 ADC에 의해 효과적으로 표적화된다는 것을 입증한다. 놀랍게도, hu24-vc0101에 의해 처리된 동물은 실험을 종결했을 때 종양이 없었고, hu24-AcButCM ADC는 이 모델에서 덜 효과적이었다.

[0577] <표 35> OV55 PDX에서의 hu24 ADC의 효능.

일	0.1mg/kg 대조군- AcButCM	3mg/kg 대조군-vc0101	0.1mg/kg hu24- AcButCM	3mg/kg hu24-vc0101
0	168 ± 7	167 ± 7	162 ± 6	166 ± 8
14	438 ± 58	134 ± 46	105 ± 15	33 ± 6
35	1204 ± 46	427 ± 196	137 ± 101	0 ± 0
42	GT	564 ± 210	194 ± 158	0 ± 0
49	GT	807 ± 265	294 ± 204	0 ± 0
77	GT	GT	895 ± 169	0 ± 0
84	GT	GT	GT	0 ± 0
133	GT	GT	GT	0 ± 0
168	GT	GT	GT	0 ± 0
182	GT	GT	GT	0 ± 0

[0578]

[0579] E. 흑색종 (SK)

[0580] 표 36은 hu24-vc0101 ADC가 비히클 및 약물 대조군과 비교하여 인간 흑색종-23 (SK23) PDX 모델 (중간 PTK7 발현)에서 효과적이라는 것을 보여준다. 이러한 데이터는 PTK7 표적의 중간 정도의 발현을 갖는 흑색종 PDX 모델에서 hu24-vc0101의 유효성을 입증하고, 이는 ADC의 사용에 대한 잠재적 적응증을 제공한다.

[0581] <표 36> SK23 PDX에서의 hu24-vc0101의 효능.

일	2mg/kg 대조군-vc0101	4mg/kg 대조군-vc0101	2mg/kg hu24-vc0101	4mg/kg hu24-vc0101
0	183 ± 20	184 ± 14	187 ± 11	196 ± 17
7	587 ± 82	541 ± 54	432 ± 28	356 ± 45
14	871 ± 107	697 ± 61	456 ± 36	227 ± 45
21	1123 ± 86	910 ± 93	509 ± 51	150 ± 33
28	GT	GT	679 ± 65	135 ± 41
35	GT	GT	793 ± 65	166 ± 58
42	GT	GT	868 ± 63	178 ± 62
49	GT	GT	GT	228 ± 81
56	GT	GT	GT	250 ± 93
63	GT	GT	GT	295 ± 103
70	GT	GT	GT	398 ± 130
77	GT	GT	GT	568 ± 181
84	GT	GT	GT	688 ± 167

[0582]

[0583] F. 유방 및 NSCLC PDX 모델에서의 종양 성장 억제

[0584] 동일한 스케줄로 정맥내 주사에 의하는 BR5 연구를 제외하고, 동물에게 4주기 동안 4일마다 (Q4Dx4) 복강내 주사에 의해 투여하였다. 디지털 캘리퍼를 사용하여 종양 측정치를 1주에 1 또는 2회 기록하고, 방정식 $V=(A \times B^2)/2$ (여기서, A는 장축이고 B는 단축임)를 사용하여 종양 부피를 추정하였다. 동물 체중을 측정하고, 적어도 1주에 1회 기록하였다. IACUC 프로토콜에 따라 희생이 제시되는 경우인 개별 마우스 또는 전체 군 종양 측정치가 1200 mm^3 에 도달할 때까지 연구 군을 추적하였다. BR5 연구의 경우에, IACUC 프로토콜에 따라 병기결정 시 종양 부피가 체중의 15%에 접근하면 동물을 희생시켰다.

[0585] 방정식 % TGI= $[1-(\text{처리된 평균 종양 부피})/(\text{비히클의 평균 종양 부피})]$ 를 사용하여 종양 성장 억제 (TGI)를 계산하였다. TGI는 전형적으로 상기 기재된 바와 같이 대조군이 중단되기 전의 마지막 측정인 가장 마지막의 가능한 시점에 계산하였다. 종양 퇴행은 투여 후 평균 종양 부피에서의 감소로서 정의되었다. 종양이 퇴행한 경우에, 진행까지의 시간 (TTP)은 최초 투여와, 평균 종양 부피가 이전 측정으로부터 통계적으로 유의한 정도로 증가된 시간 사이의 일수를 나타낸다. 종양이 실험 과정 동안 재성장하지 않은 경우에, TTP는 최초 투여와 실험 종료 사이의 일수이다.

[0586] 효능 연구에서 hu24-vc0101 ADC의 노출을 확인하기 위해, 2종의 PDX 모델, BR13 PDX 및 BR22 PDX에 대해 ADC 및 총 항체의 혈장 농도를 결정하였다. ADC의 제3 투여 후 3개의 시점에 샘플을 수집하고, 리간드 결합 검정 (LBA)에 의해 농도를 측정하였다 (데이터는 제시되지 않음). 데이터는 약물 노출이 이들 종양 모델에서 대등하다는 것을 나타낸다.

[0587] hu24-vc0101 ADC는 유방암 및 NSCLC 종양 모델에서 항종양 활성을 도출하였다. 종양은 처리 시 퇴행하였고,

전형적으로 ADC의 마지막 투여 후 수개월 동안 재성장하지 않았다. 비접합된 hu24 mAb는 시험된 모델에서 항종양 활성을 도출하지 않았고, 이는 아우리스타틴-의존성 작용 메커니즘을 입증한다. 결과를 표 37에 요약한다.

[0588] <표 37> hu24-vc0101 ADC를 사용한 생체내 약리학 연구의 요약

종양 모델	IHC 에 의한 표적 발현	투여 요법	노출 데이터	hu24-vc0101 용량 수준 (mg/kg)	퇴행 (TTP, 일) 또는 % TGI
BR13 TNBC PDX	높음	Q4Dx4 ip	예	1	37% TGI
				2	퇴행 (35)
				4	퇴행 (105)
BR22 TNBC PDX	높음	Q4Dx4 ip	예	0.3	없음
				1	퇴행 (21)
				3	퇴행 (205)
BR31 TNBC PDX	중간 정도	Q4Dx4 ip	아니오	3	퇴행 (105)
BR5 TNBC PDX	높음	Q4Dx4 iv	아니오	3	퇴행 (49)
				hu24 mAb, 3 mg/kg	없음
BR36 PR+ PDX	높음	Q4Dx4 ip	아니오	3	퇴행 (103)
NSCLC135 PDX	높음	Q4Dx4 ip	아니오	1	15% TGI
				3	퇴행 (32)
NSCLC176 PDX	높음	Q4Dx4 ip	아니오	1	78% TGI
				3	퇴행 (98)

% = 퍼센트; BR = 유방암; IHC = 면역조직화학; ip = 복강내; iv = 정맥내; mAb = 모노클로날 항체; mg/kg = 킬로그램당 밀리그램; NSCLC = 비소세포 폐암; PDX = 환자-유래 이종이식편; PR+ = 프로게스테론 수용체 양성; Q4Dx4 = 4 주기 동안 4 일 마다의 용량; TGI = 종양 성장 억제; TNBC = 삼중-음성 유방암; TTP = 진행까지의 시간.

[0589]

[0590] 실시예 14

[0591] 0101의 작용 메커니즘

[0592] hu24-vc0101 ADC의 작용 메커니즘을 연구하기 위해, 세포를 ADC로 처리한 다음 그의 미세관 구조를 평가하였다. 아우리스타틴은 낮은 피코몰 세포내 농도에서 G2/M 세포 주기 정지 및 세포 사멸을 유도하는, 튜불린 중합의 완전 합성 돌라스타틴-기반 펜타펩티드 억제제이다 (Sapra et al., 2011, Expert Opin Investig Drugs 20(8):1131-49 및 Turner et al., 1998, Prostate 34(3):175-81).

[0593] H661 폐암 세포를 CC2 코팅된 성장 표면을 갖는 4-웰 챔버 슬라이드 시스템 (썬모 사이언티픽) 상에 시딩하고, hu24-vc0101, 음성 대조군 ADC, 비접합된 hu24mAb 0 - 4 µg/mL 또는 유리 0101 아우리스타틴 0.1 - 10 nM로 48시간 동안 처리하였다. 이어서 세포를 3% 파라포름알데히드 중에 고정시키고, PBS로 세척하고, PBS 중 0.5% 트리톤-X® (시그마 케미칼(Sigma Chemical))로 투과화하고, PBS로 세척하고, 차단 완충제 (PBS 중 5% 정상 염소 혈청 및 0.2% 트윈-20)와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 차단 완충제 중 1차 항-α-튜불린 항체 (시그마 NoT9026, 클론 DM1A)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 PBS로 세척하고, 알렉사 플루오르® 488-접합된 2차 항체 (인비트로젠 코포레이션) 및 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)과 함께 30분 동안 인큐베이션하여 DNA를 염색하였다. 세포는 자이스 LSM 510 메타 공초점 현미경 상에서 시각화되었다.

[0594] 유리 0101 또는 hu24-vc0101 ADC에 의한 세포의 처리는 미세관 구조를 파괴하였고, G2/M 세포 주기 정지로 이어졌다. 대조적으로, 비접된 hu24 mAb도 음성 대조군 mAb도 이들 반응을 도출하지 않았다 (도 22). 이들 결과는 hu24-vc0101 ADC가 미세관 구조의 파괴 및 G2/M 정지의 유발에 의해 항원-의존성 방식으로 세포독성을 도출할 수 있다는 것을 입증한다. 이러한 메커니즘은 비접합된 아우리스타틴에 대한 이전 연구와 일치한다.

[0595] 실시예 15

[0596] 내피 세포에 대한 hu24-vc0101 ADC 효과

[0597] 도 23은 hu24-vc0101 ADC가 표준 시험관내 HUVEC 발아 검정에서 혈관신생을 억제한다는 것을 보여준다. 간략하게, HUVEC 세포 (론자 - #CC-2517)를 사용하여 시토크스 비드 (시그마 #C0646-5G)를 대략 1×10^6 개 세포/2500 비드의 비로 코팅한 다음, 내피 세포 성장 배지 (론자 # CC-3162)를 함유하는 37°C/5% CO2 인큐베이터 내에 밤새

두었다. 다음날 비드를 내피 세포 성장 배지로 세척하고, DPBS 중 2.0mg/ml 피브리노젠 유형 I (필터 멸균됨) 및 0.15단위/ml 아프로티닌 용액 중에 재현탁시켰다. 24 웰 플레이트의 각각의 웰에, 0.3125 단위의 트롬빈을 첨가한 후 500u1의 비드 용액을 첨가하였다. 응고를 용이하게 하기 위해, 플레이트를 37℃ 인큐베이터 내에 15 분 동안 두었다. 마지막으로 내피 세포 성장 배지 중에 현탁된 피부 섬유모세포 (디트로이트(Detroit) 551 - ATCC #CCL-110)를 형성된 피브리노젠 혈병의 상부에 조심스럽게 놓았다. 세포에게 그의 각각의 약물 처리를 격 일마다 공급하고, 8일 동안 성장시켰다. HUVEC 발아 및 분지 혈관의 형성의 정도를 관찰하였다.

[0598] hu24-vc0101 ADC는 본 검정에서 1 µg/mL에서 발아 혈관신생을 억제하였지만, 음성 대조군 ADC는 그렇지 않았다. 이러한 결과는 항-PTK7 ADC가 표적-특이적 방식으로 혈관신생을 억제할 수 있다는 것을 입증한다.

[0599] 실시예 16

[0600] 종양-개시 세포 (TIC)의 감소

[0601] 항-PTK7 항체-약물 접합체 처리가 종양에서 종양-개시 세포 (TIC) 빈도를 감소시키는지 여부를 결정하기 위해, BR13 TNBC 유방 종양을 4 mg/kg hu24-vc0101 ADC, 4 mg/kg 대조군 IgG ADC, 또는 20 mg/kg 도세탁셀 화학요법 으로 총 3 용량 (제0일, 제3일 & 제7일) 동안 매주 2회 처리하였다. 살아있는, 잔여 인간 종양 세포 (즉 hESA⁺ mCD45⁻ mH-2Kd⁻)를 해리된 종양으로부터 제10일에 분리하고, 한계 희석 분석 (LDA)에서 나이브 동물 내로 재-이식하였다. 생성된 종양 발생률을 이식후 최대 40주까지 모니터링하였다. 종양 수거일 (제10일) 및 연속 이식 일은 종양이 hu24-vc0101 노출 후 퇴행이 시작되는 때를 기초로 선택하였다. 종양을 해리하고, 항-인간 ESA, 항-마우스 CD45, 및 항-마우스 H-2Kd 항체로 염색하였다. 처리군당 3개의 종양을 풀링하고, 살아있는 인간 종양 세포를 유동 세포측정법에 의해 분리하였다. 10마리의 마우스의 군에게 대조군 IgG ADC 처리된 종양으로부터 분류된 293, 73, 37 또는 15개의 종양 세포; hu24-vc0101 처리된 종양으로부터 분류된 159, 90, 40 또는 10개의 종양 세포; 또는 도세탁셀-처리된 종양으로부터 분류된 257, 33 또는 15개의 종양 세포를 주사하였다. 수용자 마우스에서 종양을 매주 측정하고, 수용자 마우스에서 200 mm³를 초과하는 종양은 양성으로 스코어링하였다. 포아송 분포 통계를 사용하여, L-Calc 소프트웨어 (스텝셀 테크놀로지스, 브리티시콜롬비아주 밴쿠버)를 통해, 이식후 40주째에 종양이 있는 수용자 및 종양이 없는 수용자의 주사된 세포 용량을 사용하여 각 처리 후의 TIC의 빈도를 계산하였다.

[0602] hu24-vc0101 처리된 종양에서 TIC 빈도는 대조군 IgG ADC 처리된 종양에서보다 5.5배 더 낮았다 (p = 0.0013; 표 38). 도세탁셀-처리된 종양에서의 TIC 빈도는 대조군 IgG ADC 처리된 종양에서보다 2.1배 더 낮았다 (p = 0.09; 표 38). 요약하면, hu24-vc0101 처리된 종양 세포가 주사된 마우스는 유사한 수의 대조군 IgG ADC 처리된 종양 세포가 주사된 마우스보다 일관되게 더 적은 종양을 생산하였고, 이는 hu24-vc0101 처리가 TIC를 특히 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0603] <표 38> BR13 종양 모델에서의 종양-개시 세포 (TIC) 빈도.

전처리	군	동물당 이식된 세포 #	종양을 갖는 동물 #	군내 동물 #	TIC 빈도	대조군 ADC 대비 p-값
대조군 ADC (4 mpk)	A1	293	9	9	71 중 1	적용가능하지 않음
	A2	73	6	8		
	A3	37	3	8		
	A4	15	0	8		
hu24-vc0101 (4 mpk)	B1	159	3	7	393 중 1	0.0013
	B2	90	2	8		
	B3	40	0	10		
	B4	10	0	8		
도세탁셀 (20 mpk)	C1	257	8	9	149 중 1	0.09
	C2	33	1	8		
	C3	15	0	6		

[0604]

도면

도면1

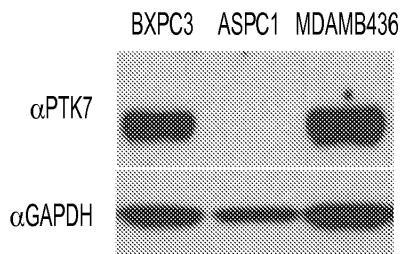
>gi | 47938093 | gb | AAH71557.1 | PTK7 단백질 티로신 키나제 7 [호모 사피엔스]

```

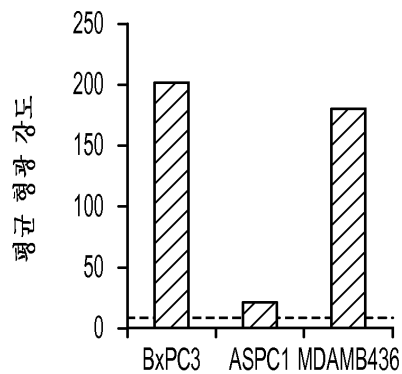
1  MGAARGSPAR PRRLPLLSVL LLPLLGGTQT AIVFIKQPSS QDALQGRRAL LRCEVEAPGP
61  VHVVWLLDGA PVQDTERRFA QGSSLSFAAV DRPQDSGTFQ CVARDDVTGE EARSANASFN
121 IKWIEAGPVV LKHPASEAEI QPQTQVTLRC HIDGHPRTY QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
181 KERNLTLRPA GPEHSGLYSC CAHSAFGQAC SSQNFTLSIA DESFARVLA PQDVVVARYE
241 EAMFHCQFSA QPPPSLQWLF EDETPITNRS RPPHLRRATV FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR
301 CIGQGQRGPP IILEATLHLA EIEDMPLFEP RVFTAGSEER VTCLPPKGLP EPSVWWEHAG
361 VRLPTHGRVY QKGHELVLAN IAESDAGVYT CHAANLAGQR RQDVNITVAT VPSWLKKPQD
421 SQLEEGKPGY LDCLTQATPK PTVVWYRNQM LISEDSRFEV FKNGTLRINS VEVDGTWYR
481 CMSSTPAGSI EAQARVQVLE KLKFTPPPQP QQCMEFDKEA TVPCSATGRE KPTIKWERAD
541 GSSLPEWVTD NAGTLHFARV TRDDAGNYTC IASNGPQGQI RAHVQLTVAV FITFKVEPER
601 TTVYQGHYAL LQCEAQGDPK PLIQWKGKDR ILDPKTLGPR MHIFQNGSLV IHDVAPEDSG
661 RYTCIAGNSC NIKHTEAPLY VVDKPVPEES EGPGSPPPYK MIQTIGLSVG AAVAYIIAVL
721 GLMFYCKKRC KAKRLQKQPE GEEPEMECLN GGPLQNGQPS AEIQEEVALT SLGSGPAATN
781 KRHSTSDKMH FPRSSLQPIIT TLGKSEFGEV FLAKAQGLEE GVAETLVLVK SLQSKDEQQQ
841 LDFRRELEMF GKLNHANVVR LLGLCREAEP HYMVLEYVDL GDLKQFLRIS KSKDEKLKSQ
901 PLSTKQKVAL CTQVALGMEH LSNRNFVHKD LAARNCLVSA QRQVKVSALG LSKDVYNSEY
961 YHFRQAWVPL RWMSPEAILE GDFSTKSDVW AFGVLMWEVF THGEMPHGGQ ADDEVLADLQ
1021 AGKARLPQPE GCPSKLYRLM QRCWALSPKD RPSFSEIASA LGDSTVDSKP
(SEQ ID NO 73)

```

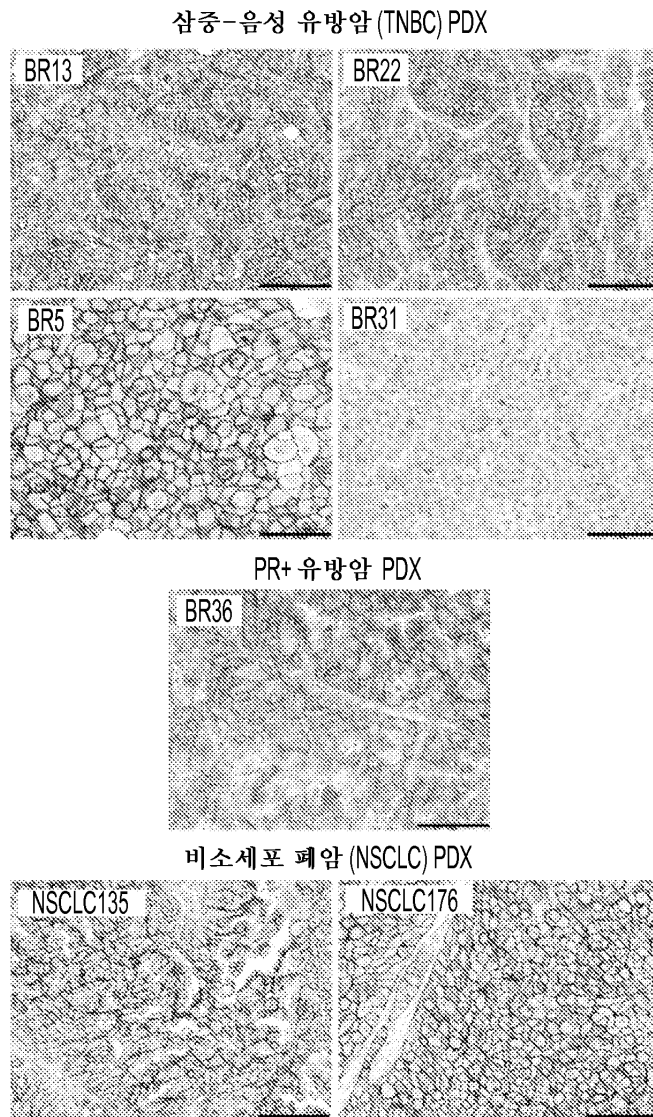
도면2a



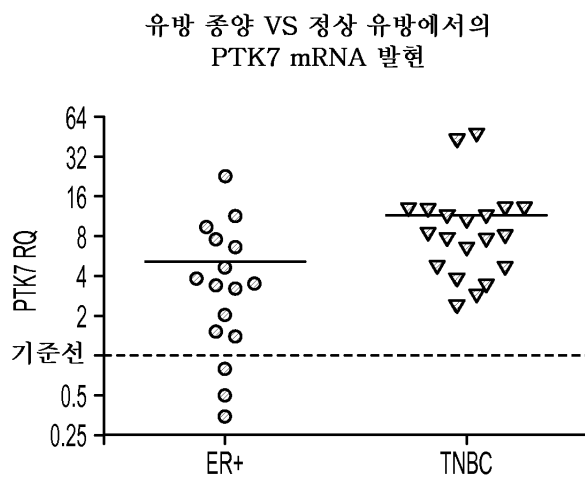
도면2b



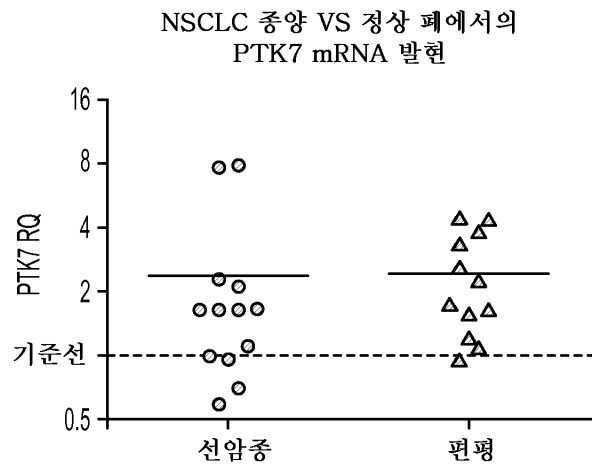
도면3



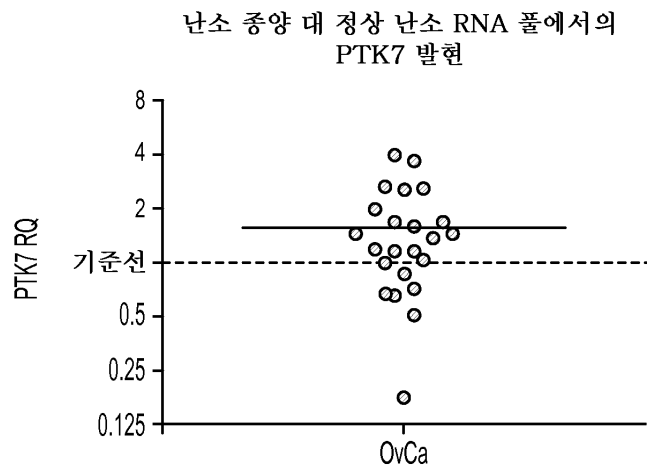
도면4a



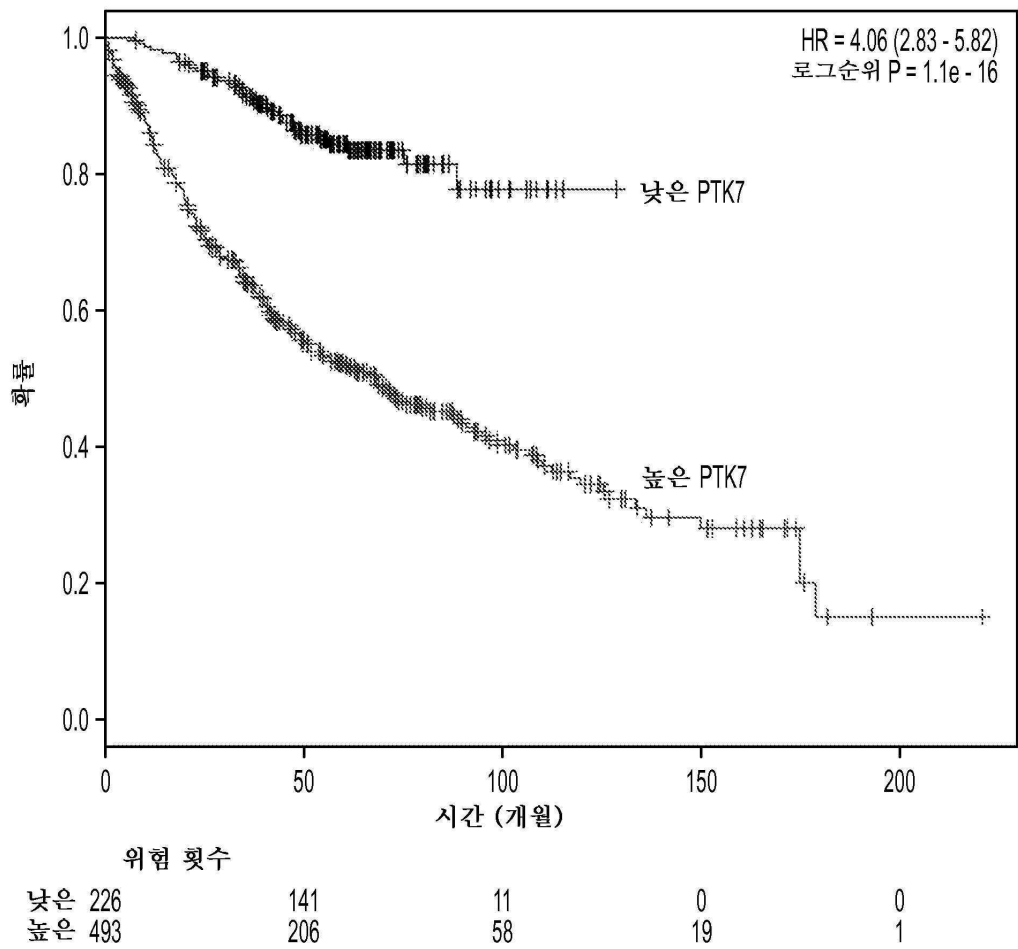
도면4b



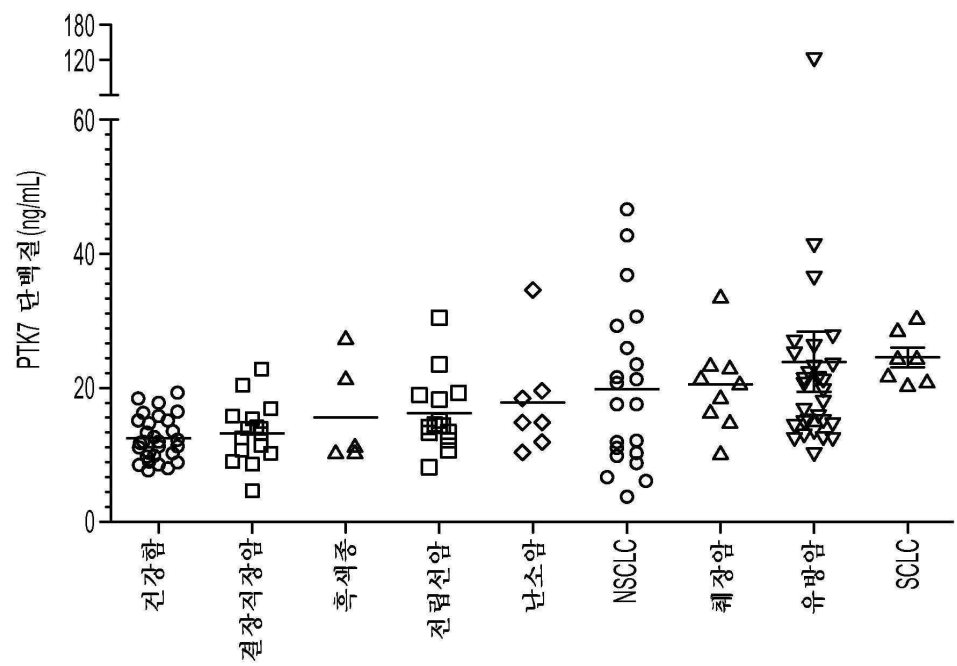
도면4c



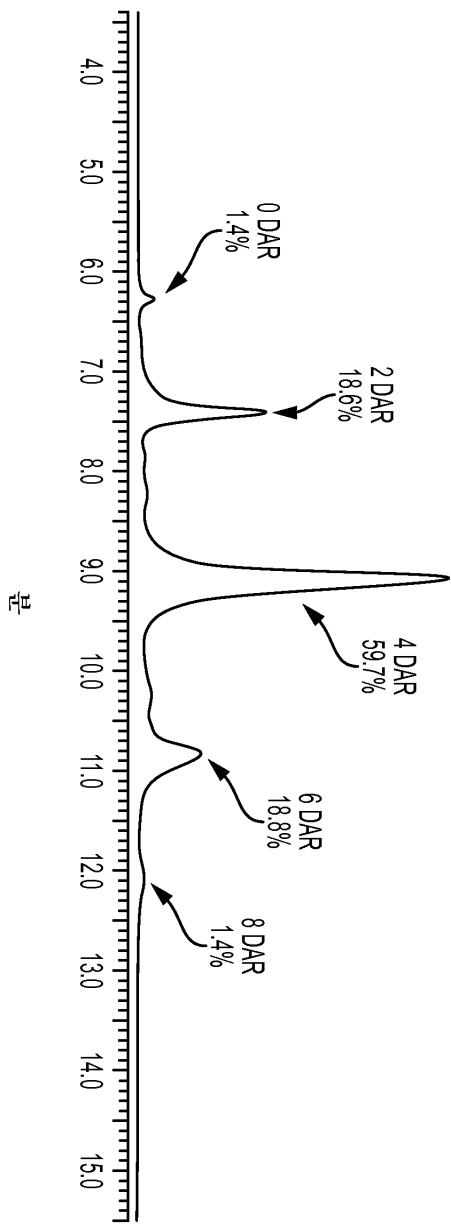
도면5



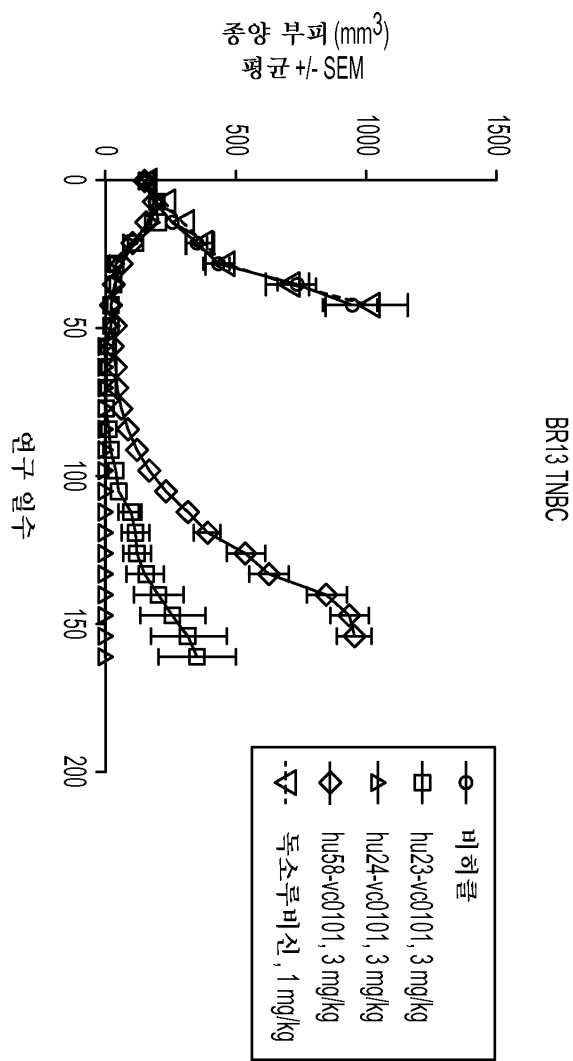
도면6



도면7



도면8

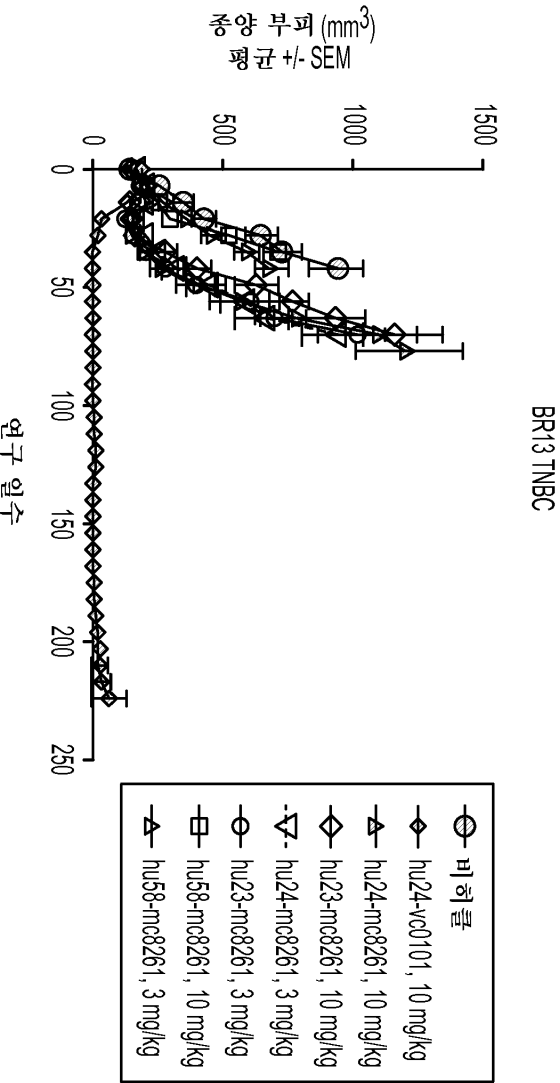


도면9

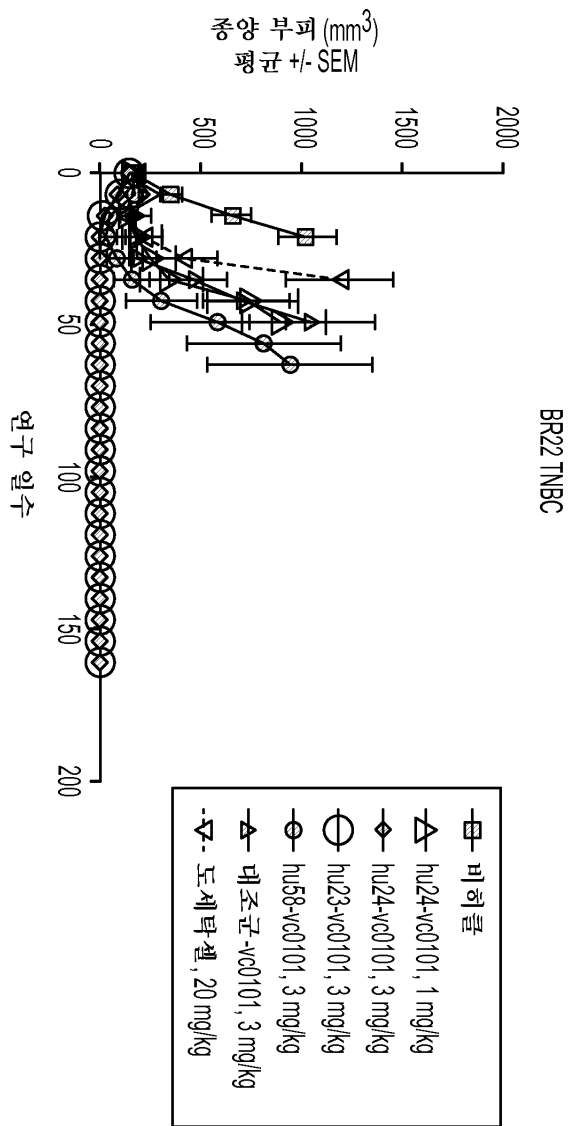
BR13 TNBC PDX 에서의 항-PTK7 ADC의 효능

일	비히클	10mg/kg hu24- vc0101	10mg/kg hu23- mc8261	3mg/kg hu23- mc8261	10mg/kg hu24- mc8261	3mg/kg hu24- mc8261	10mg/kg hu58- mc8261	3mg/kg hu58- mc8261
0	144 ± 13	192 ± 23	157 ± 11	162 ± 8	196 ± 26	160 ± 12	163 ± 14	153 ± 8
7	255 ± 22	203 ± 30	205 ± 12	188 ± 11	248 ± 23	196 ± 21	233 ± 15	230 ± 20
14	349 ± 40	136 ± 14	142 ± 12	203 ± 13	243 ± 30	188 ± 23	249 ± 20	277 ± 29
21	428 ± 48	36 ± 6	148 ± 21	125 ± 12	166 ± 19	150 ± 15	301 ± 24	366 ± 26
28	650 ± 62	20 ± 5	169 ± 19	159 ± 15	158 ± 23	187 ± 25	525 ± 77	463 ± 51
35	734 ± 74	4 ± 2	286 ± 41	207 ± 26	216 ± 41	237 ± 37	717 ± 78	599 ± 55
42	940 ± 105	6 ± 3	404 ± 53	286 ± 40	276 ± 53	310 ± 46	GT	688 ± 64
49	GT	5 ± 2	629 ± 83	394 ± 54	419 ± 97	435 ± 76	GT	GT
56	GT	3 ± 3	776 ± 54	611 ± 63	582 ± 130	587 ± 95	GT	GT
63	GT	3 ± 2	935 ± 115	700 ± 76	798 ± 53	650 ± 102	GT	GT
70	GT	0 ± 0	1166 ± 81	1024 ± 100	1107 ± 240	924 ± 117	GT	GT
77	GT	4 ± 2	GT	GT	1215 ± 207	GT	GT	GT
84	GT	3 ± 2	GT	GT	GT	GT	GT	GT
91	GT	3 ± 3	GT	GT	GT	GT	GT	GT
98	GT	5 ± 5	GT	GT	GT	GT	GT	GT
105	GT	5 ± 5	GT	GT	GT	GT	GT	GT
112	GT	9 ± 9	GT	GT	GT	GT	GT	GT
119	GT	10 ± 10	GT	GT	GT	GT	GT	GT
126	GT	11 ± 11	GT	GT	GT	GT	GT	GT
133	GT	1 ± 1	GT	GT	GT	GT	GT	GT
140	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
147	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
154	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
161	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
168	GT	5 ± 5	GT	GT	GT	GT	GT	GT
175	GT	9 ± 9	GT	GT	GT	GT	GT	GT
182	GT	10 ± 10	GT	GT	GT	GT	GT	GT
189	GT	15 ± 15	GT	GT	GT	GT	GT	GT
196	GT	19 ± 19	GT	GT	GT	GT	GT	GT
203	GT	28 ± 28	GT	GT	GT	GT	GT	GT
210	GT	30 ± 30	GT	GT	GT	GT	GT	GT
217	GT	34 ± 34	GT	GT	GT	GT	GT	GT
224	GT	65 ± 65	GT	GT	GT	GT	GT	GT
231	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT

도면10



도면11

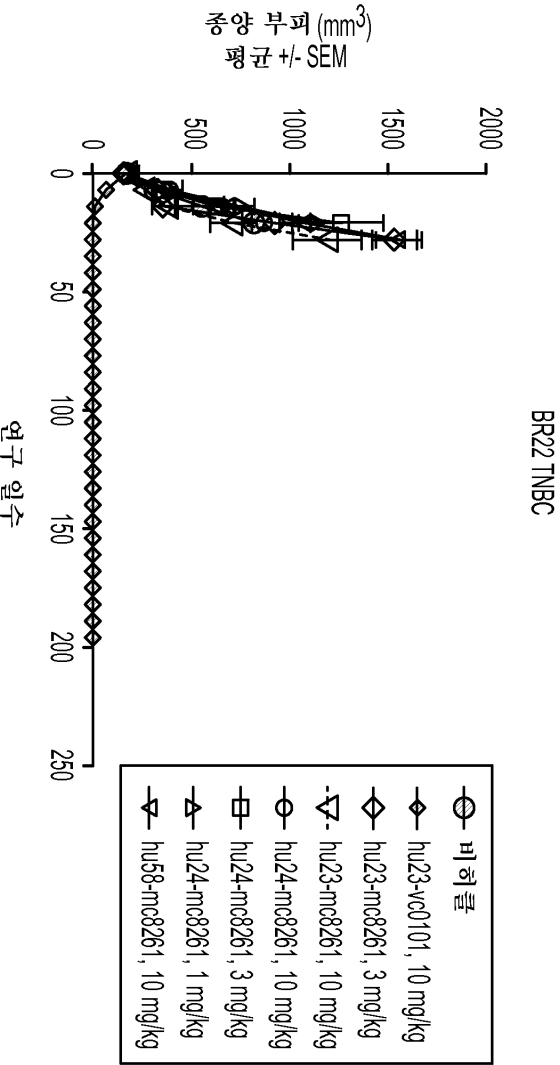


도면12

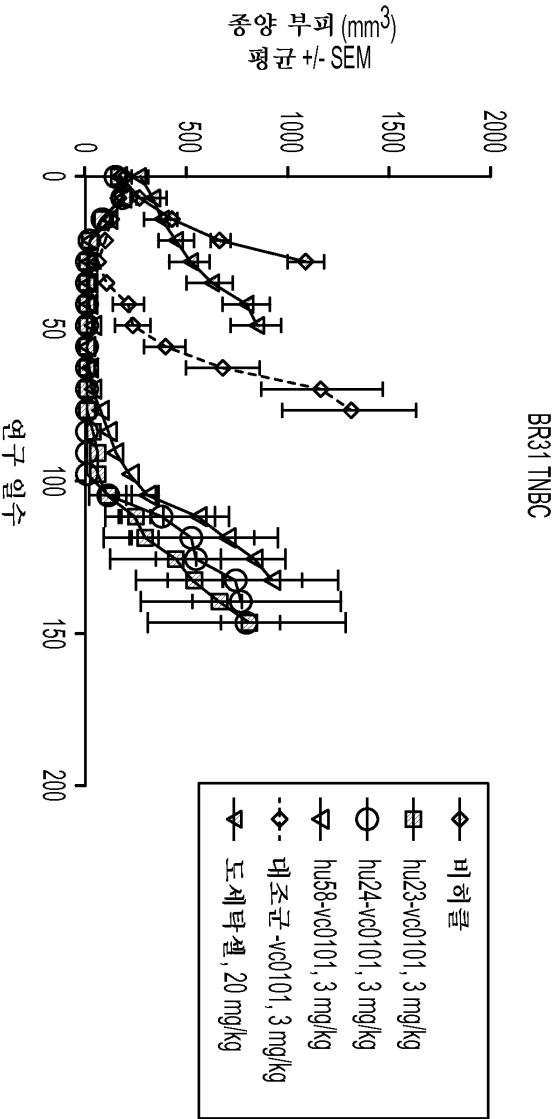
BR22 TNBC PDX에서의 항-PTK7 ADC의 효능

일	비하클	10mg/kg hu23- vc0101	10mg/kg hu23- mc8261	3mg/kg hu23- mc8261	10mg/kg hu24- mc8261	3mg/kg hu24- mc8261	1mg/kg hu24- mc8261	10mg/kg hu58- mc8261	3mg/kg hu58- mc8261
0	195 ± 17	166 ± 24	164 ± 19	156 ± 12	188 ± 13	185 ± 10	184 ± 13	164 ± 17	149 ± 12
7	376 ± 43	69 ± 14	258 ± 50	335 ± 41	359 ± 24	315 ± 17	413 ± 44	289 ± 35	370 ± 19
14	564 ± 54	12 ± 3	364 ± 40	360 ± 59	588 ± 42	633 ± 55	750 ± 69	563 ± 69	672 ± 39
21	819 ± 97	0 ± 0	701 ± 106	916 ± 93	878 ± 79	1265 ± 218	1134 ± 112	1133 ± 133	984 ± 65
28	GT	0 ± 0	1189 ± 176	1534 ± 112	GT	GT	GT	GT	1555 ± 121
35	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
42	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
49	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
56	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
63	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
70	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
77	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
84	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
91	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
98	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
105	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
112	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
119	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
126	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
133	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
140	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
147	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
154	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
161	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
168	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
175	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
182	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
189	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
196	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT

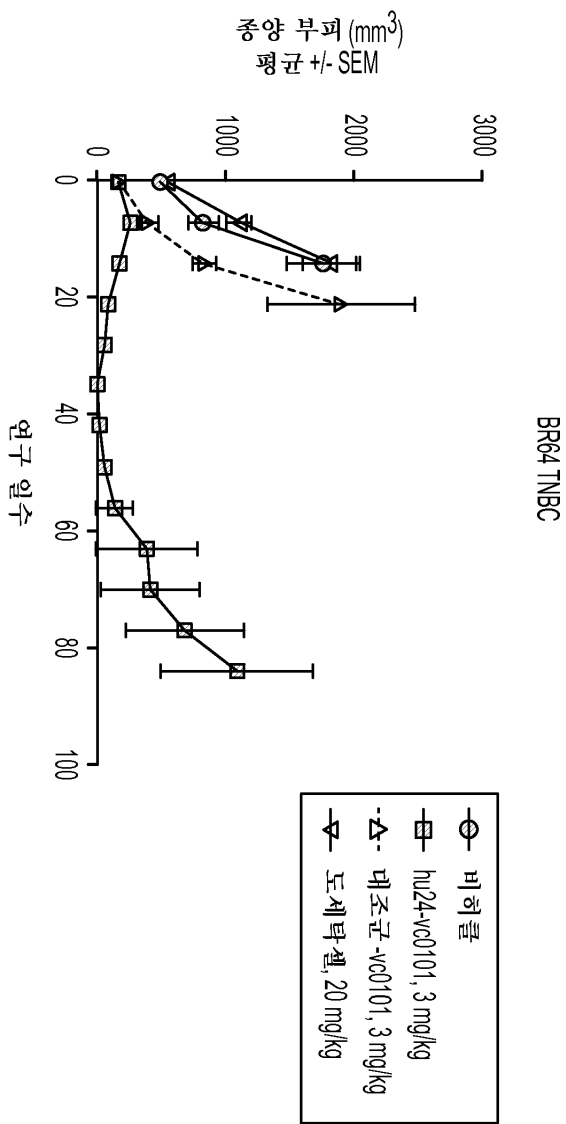
도면13



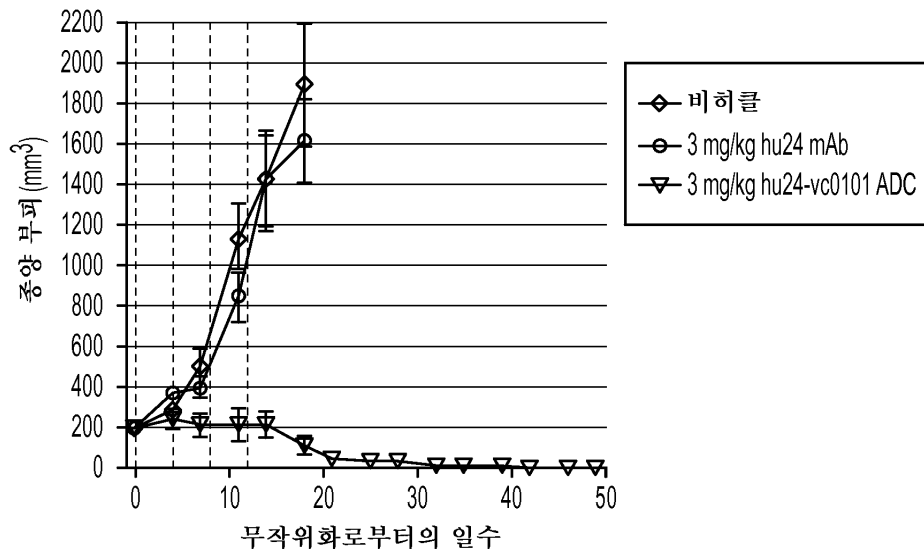
도면14



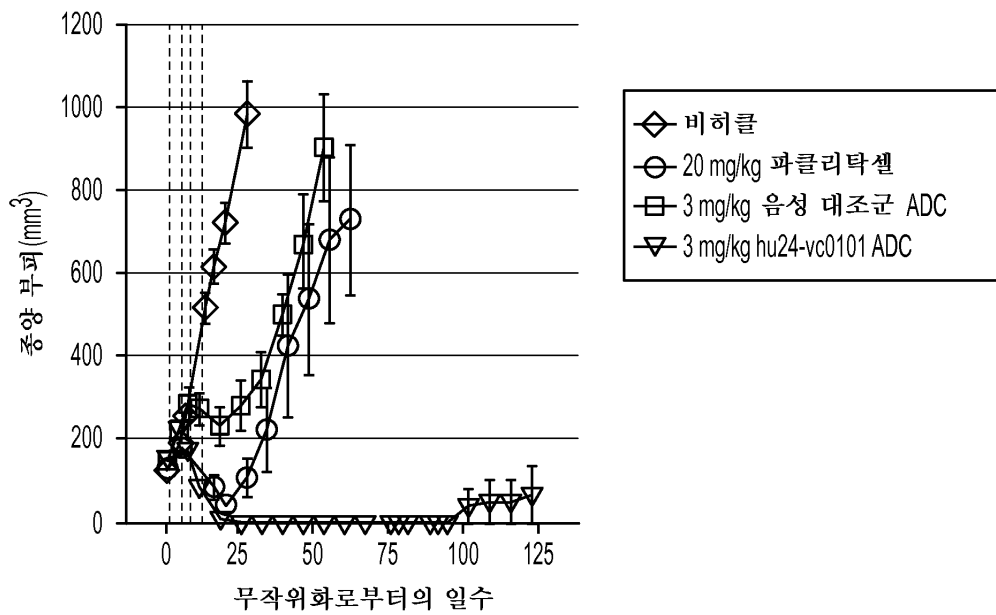
도면15



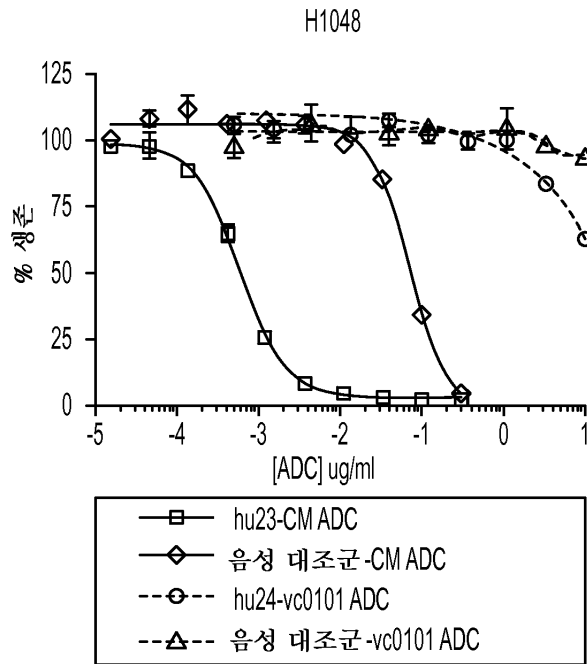
도면16



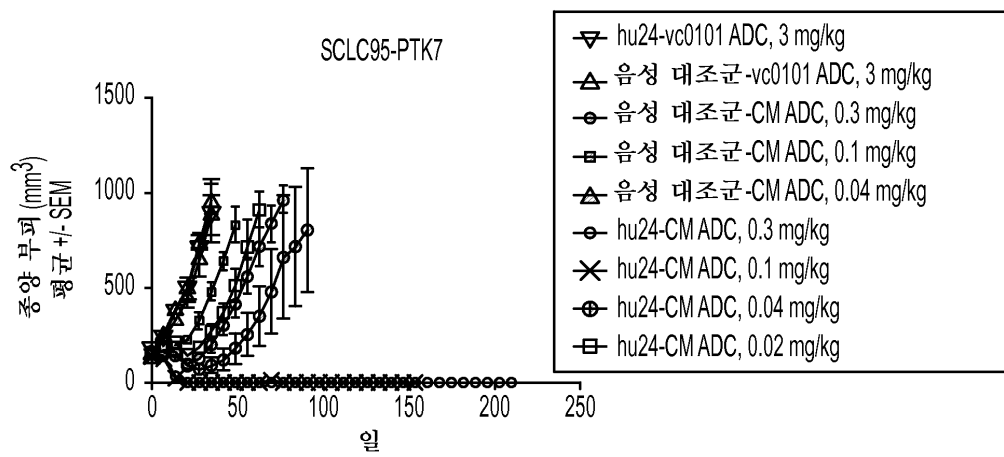
도면17



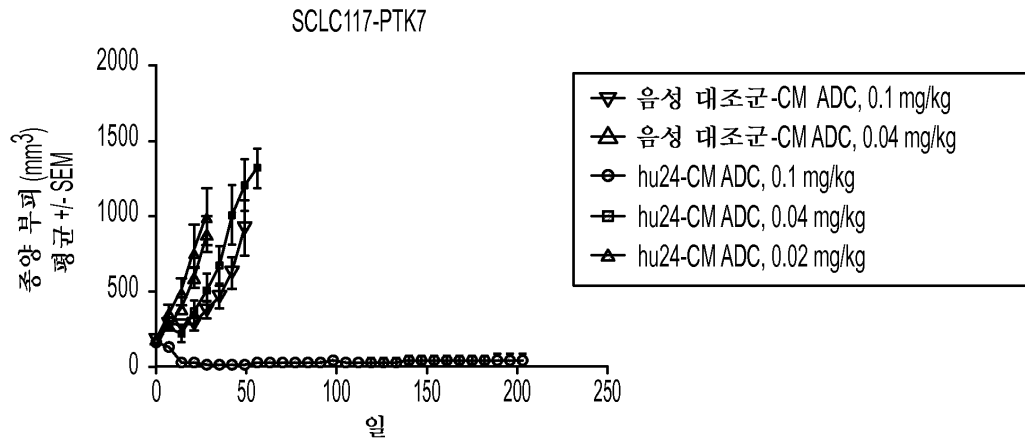
도면18a



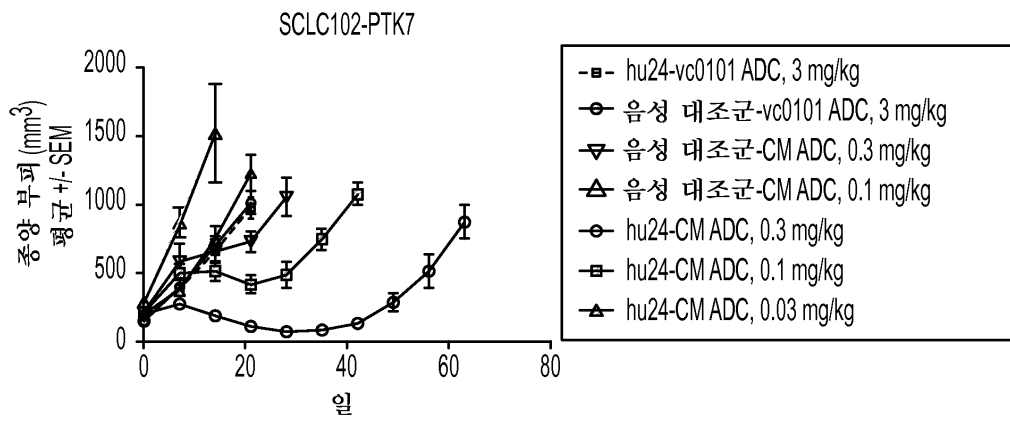
도면18b



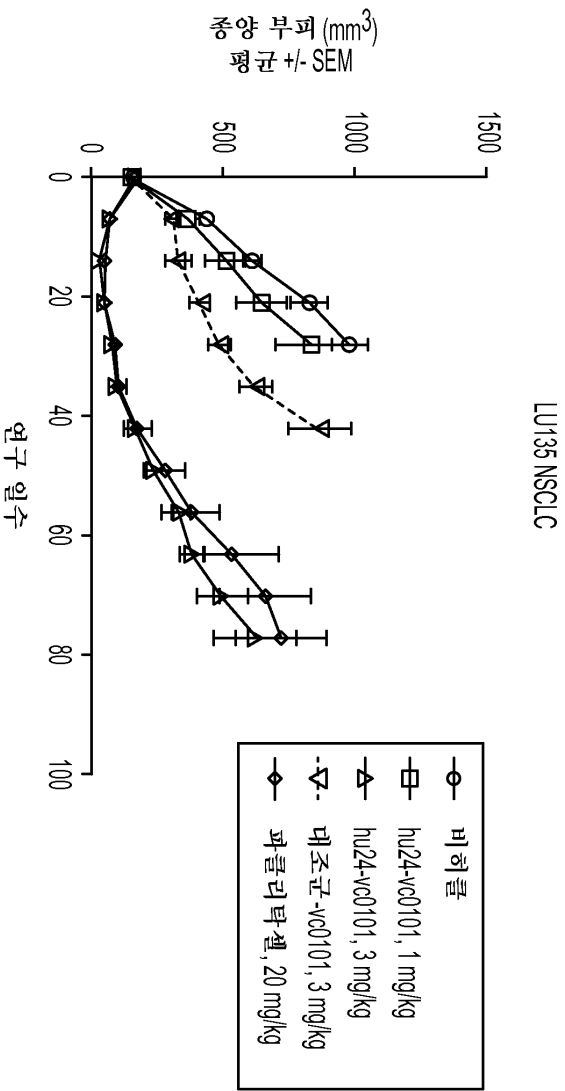
도면19a



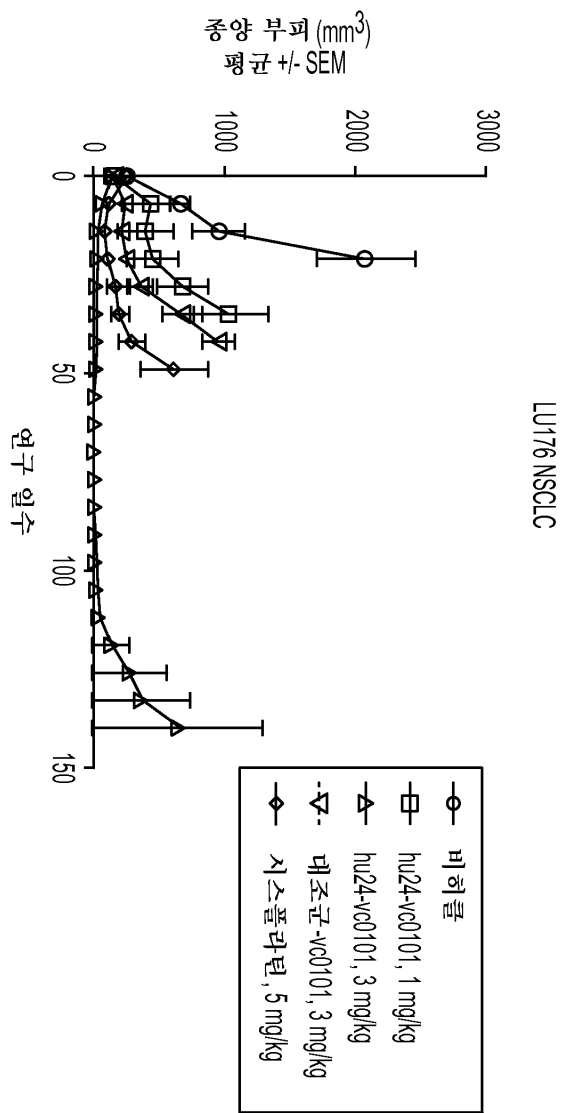
도면19b



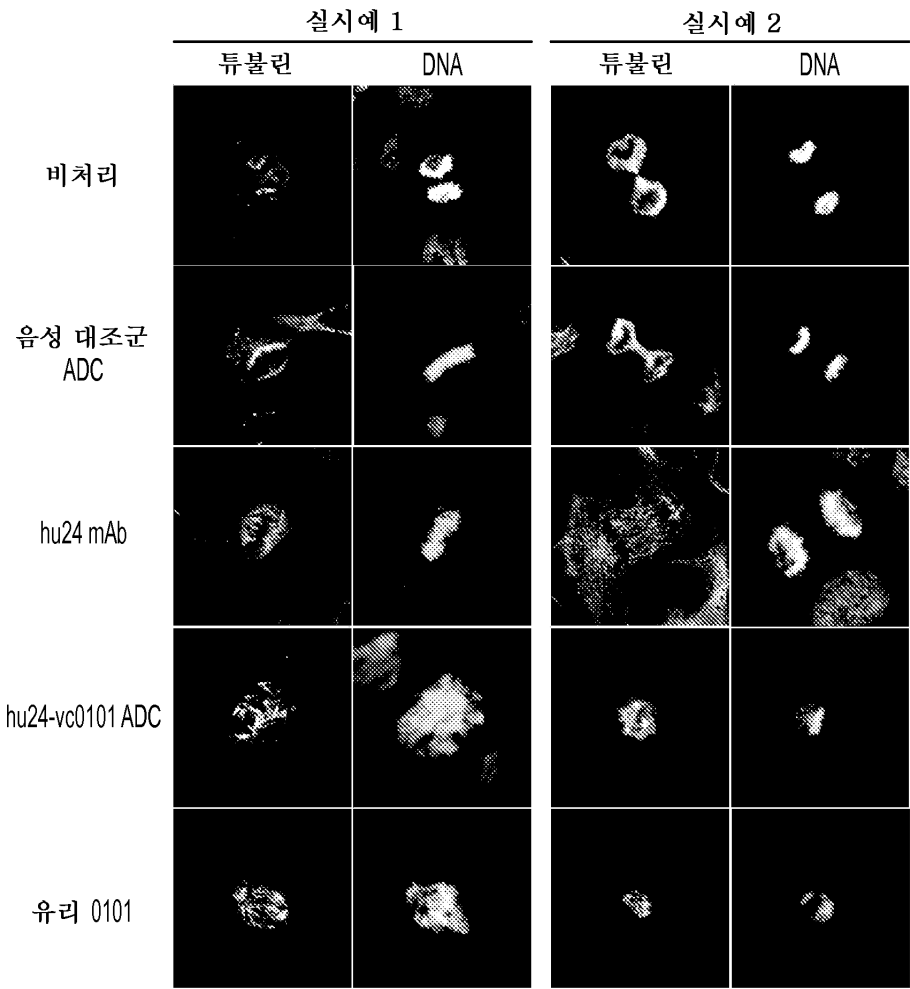
도면20



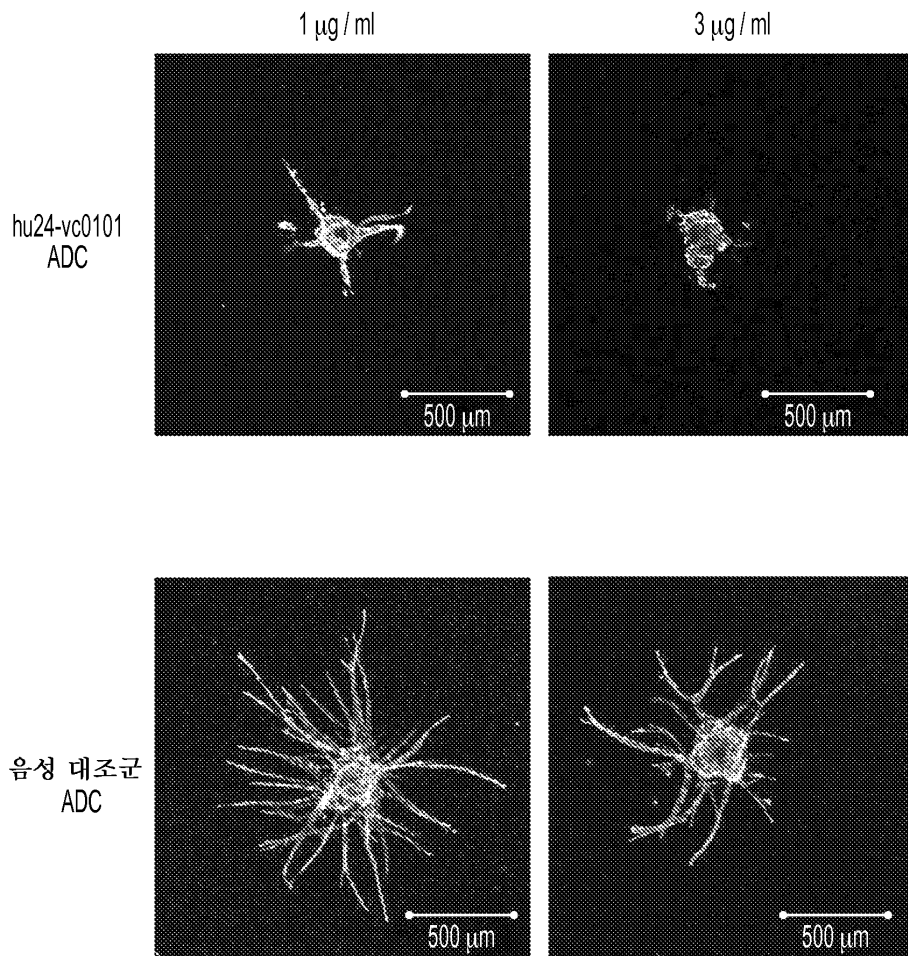
도면21



도면22



도면23



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc.

Damelin, Marc

<120> ANTI-PTK7 ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

<130> PC72045

<160> 87

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 1

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

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

Cys Val Arg Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 2

cagatcacct tgaaggagtc tggctctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60
 acctgcacct tctctgggtt ctactcagc actagtaaca tgggtgtggg ctggatccgt 120
 cagccccag gaaaggccct ggagtggcct gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180

tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240
 gtcttataa tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca catattactg tgttcgaagt 300
 aactatgggtt acgcctgggt tgcctactgg ggccaaggga ctcgtgtcac tgtctcttca 360

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 3

Thr Ser Asn Met Gly Val Gly

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asn Met

1 5

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 5

actagtaaca tgggtgtggg c 21

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 6

gggtttctcac tcagcactag taacatg 27

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 7

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

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

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 8

Trp Trp Asp Asp Asp

1	5		
---	---	--	--

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 9

cacatttggt gggatgatga taagtactac agcccatctc tgaagagc 48

<210> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 10

tggtgggatg atgat 15

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 11

Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr

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

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 12

agtaactatg gttacgcctg gtttgcttac

30

<210> 13

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 13

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Val Arg Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

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

 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445
Gly

<210> 14

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 14

cagatcacct tgaaggagtc tggctctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60
acctgcacct tctctgggtt ctcactcagc actagtaaca tgggtgtggg ctggatccgt 120
cagcccccag gaaaggccct ggagtggtt gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180

tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctccaa aaaccaggtg 240
gtccttaaca tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca catattactg tgttcgaagt 300
aactatggtt acgcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca 360
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctc cgagcaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccttgggtg cctggtcaag gactacttcc cggagccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 540
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720
ccgtcagttt tctcttccc cccaaaacc aaggacacce tcatgatctc ccggaccctt 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggacgccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 1347

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 15

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Pro Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 16

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 16

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga tagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtcg ggacatttat cctatttaa actggttcca acaaaaacca 120

gggaaagctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgctagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tggaacagat ttactttca ccatcagcag cctgcaacct 240
 gaagatatcg caacttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggtgct 300
 gggaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 17

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Pro Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 18

aaggcgagtc aggacattta tccctattta aac 33

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 19

Arg Thr Asn Arg Leu Leu Asp

1 5

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 20

cgtacaaata gattgctaga t 21

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 21

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 22

ctacagtatg atgagtttcc gctcacg 27

<210> 23

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 23

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Pro Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210
<210> 24
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide sequence
<400> 24
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga tagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtc ggacatttat ccctatttaa actggttcca acaaaaacca 120
gggaaagctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgctagatgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggaaacagat ttactttca ccatcagcag cctgcaacct 240
gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggaaatcaa acggactgtg gctgcaccaa gtgtcttcat cttcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtggtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 25

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Ser Tyr Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 26

caggtccagc ttgtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg ctcttgata caccttcaact gactatgctg tgcattgggt gcgccaggcc 120

cccggaaaaa ggcttgagtg gattggagtg atcagcactt acaatgatta cacatacaat 180

aaccaggact tcaagggcag agtcaccatg accagggaca catccgcgag cacagcctac 240

atggagctga gcagactgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggtaac 300

tcctacttct atgcttttga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 27

Asp Tyr Ala Val His

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

1 5

<210> 29

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 29

gactatgctg tgcac 15

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 30

ggatacacct tcactgacta t

21

<

210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 31

Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 32

Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr

1 5

<210> 33

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 33

gtgatcagca cttacaatga ttacacatac aataaccagg acttcaaggg c

51

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 34

agcacttaca atgattac 18

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 35

Gly Asn Ser Tyr Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 36

ggtaactcct acttctatgc ttggactac 30

<210> 37

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Ser Tyr Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 38

caggtccagc ttgtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gactatgctg tgcattgggt gcgccaggcc 120

cccggaaaaa ggcttgagtg gattggagtg atcagcactt acaatgatta cacatacaat 180

aaccaggact tcaagggcag agtcaccatg accagggaca catccgcgag cacagcctac 240

atggagctga gcagactgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggtaac 300

tcctacttct atgcttttga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcga gcaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg agccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
 gtcacatgcg tgggtgggga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtag 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctatccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgag 1320
 aagagcctct ccctgtctcc ggga 1344

<210> 39

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Lys Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 40

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 40

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtga gagggttgac agctatggca aaagttttat gcactggtac	120
caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctata gggcatccaa cctggaatct	180
ggcatccag ccaggttcag tggcagtgga tctgggacag acttcactct caccatcagc	240
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc agagtaatga ggatccgtgg	300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa	333

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 41

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Lys Ser Phe Met His

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

<210> 42

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 42

agggccagtg agagtgttga cagctatggc aaaagtttta tgcac	45
---	----

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide sequence

<400> 43

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 44

agggcaccca acctggaatc t 21

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 45

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr

1 5

<210> 46

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 46

cagcagagta atgaggatcc gtggacg 27

<210> 47

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 47

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Lys Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 48

<211> 654

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 48

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtga gagtgttgac agctatggca aaagttttat gcactggtac 120
caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctata gggcatccaa cctggaatct 180
ggcatcccag ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc 240
agcctagagc ctgaagatit tgcagtttat tactgtcagc agagtaatga ggatccgtgg 300
acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacggactg tggctgcacc aagtgtcttc 360

atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggagg tggataacgc cctccaatcg 480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 49

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 50

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<

400> 50

gaggtgcagc tggctggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cgactttagt agatattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gatcggcgac ctaaaccagc attcaagtgc gataaactat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac actcattact 300
acgttagtac cctatactat ggacttctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 51

Arg Tyr Trp Met Ser

1

5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 52

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr

1

5

<210> 53

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 53

agatatggga tgagc

15

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 54

ggattcgact ttagtagata t

21

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 55

Asp Leu Asn Pro Asp Ser Ser Ala Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 56

Asn Pro Asp Ser Ser Ala

1 5

<210> 57

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 57

gacctaaacc cagattcaag tgcgataaac tatgtggact ctgtgaaggg c 51

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 58

aaccagatt caagtgcg 18

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 59

Ile Thr Thr Leu Val Pro Tyr Thr Met Asp Phe

1 5 10

<210> 60

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 60

attactacgt tagtaccta tactatggac ttc 33

<210> 61

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 61

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

1 5 10 15

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

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Leu Ile Thr Thr Leu Val Pro Tyr Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 62

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 62

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag ccctcggatt cgactttagt agatattgga tgagctgggt cgcagggt 120
ccagggaagg ggctggagt gatcgcgac cttaaccag attcaagtgc gataaactat 180
gtggactctg tgaaggcg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac actcattact 300

acgttagtac cctatactat ggacttctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cgagcaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgagccggt gacgggtgcg 480
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 540
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720

ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcattgatct ccggaccct 780
gaggtcacat gcgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggagt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtag cgtctcacc gtctgcacc agactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctc 1020
aaagccaaag ggagccccc agaaccacag gtgtacacce tgccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt ggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccctg 1200
ctggactccg acggctcctt ctctcttac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgtccctg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 1347

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 63

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly

1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 64

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 64

gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac 60
atctcctgca taaccaacac agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca 120
ggagaagctg ctatttctct tatttcagaa ggtaatggtc tccgtctctgg aatcccacct 180

cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat ttaccctca caattaataa catagaatct 240
gaggatgctg catattactt ctgtctacaa agtgataact tgcctctcac gttcggctcg 300
gggacaaaagt tggaaataaa a 321

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 65

Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn
1 5 10

<210> 66

<211> 33

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 66
 ataaccaaca cagacattga tgatgatatg aac 33
 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide sequence
 <400> 67
 Glu Gly Asn Gly Leu Arg Pro
 1 5
 <210> 68
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 68
 gaaggtaatg gtctccgtcc t 21
 <210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide sequence
 <400> 69
 Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 70
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 70

ctacaaagtg ataacttgcc tctcacg

27

<210> 71

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 71

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly

1 5 10 15
Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp

20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Leu Leu Ile

35 40 45
Ser Glu Gly Asn Gly Leu Arg Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu

85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 72

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 72

gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac 60

atctcctgca taaccaacac agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca 120

ggagaagctg ctattctcct tatttcagaa ggtaatggtc tccgtcctgg aatcccacct 180

cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat ttaccctca caattaataa catagaatct 240

gaggatgctg catattactt ctgtctacaa agtgataact tgcctctcac gttcggctcg 300

gggacaaaagt tggaataaaa acggactgtg gctgcaccaa gtgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 73

<211> 1070

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Met Gly Ala Ala Arg Gly Ser Pro Ala Arg Pro Arg Arg Leu Pro Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Phe Ile Lys Gln Pro Ser Ser Gln Asp Ala Leu Gln Gly Arg Arg

35 40 45

Ala Leu Leu Arg Cys Glu Val Glu Ala Pro Gly Pro Val His Val Tyr

50

55

60

Trp Leu Leu Asp Gly Ala Pro Val Gln Asp Thr Glu Arg Arg Phe Ala

65

70

75

80

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

85

90

95

Gly Thr Phe Gln Cys Val Ala Arg Asp Asp Val Thr Gly Glu Glu Ala

100

105

110

Arg Ser Ala Asn Ala Ser Phe Asn Ile Lys Trp Ile Glu Ala Gly Pro

115

120

125

Val Val Leu Lys His Pro Ala Ser Glu Ala Glu Ile Gln Pro Gln Thr

130

135

140

Gln Val Thr Leu Arg Cys His Ile Asp Gly His Pro Arg Pro Thr Tyr

145

150

155

160

Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln Ser Asn His

165

170

175

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

180

185

190

Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala Phe Gly Gln

195

200

205

Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu Ser Phe

210

215

220

Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg Tyr Glu

225

230

235

240

Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ser Leu

245

250

255

Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser Arg Pro

260

265

270

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

275

280

285

Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile Gly Gln

290 295 300
 Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala

 305 310 315 320
 Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly
 325 330 335
 Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro
 340 345 350
 Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg
 355 360 365
 Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser

 370 375 380
 Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg
 385 390 395 400
 Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys
 405 410 415
 Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp
 420 425 430
 Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn

 435 440 445
 Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly
 450 455 460
 Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg
 465 470 475 480
 Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val
 485 490 495
 Gln Val Leu Glu Lys Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln

 500 505 510
 Cys Met Glu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly
 515 520 525
 Arg Glu Lys Pro Thr Ile Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu
 530 535 540

Pro Glu Trp Val Thr Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val
 545 550 555 560
 Thr Arg Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro

 565 570 575
 Gln Gly Gln Ile Arg Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile
 580 585 590
 Thr Phe Lys Val Glu Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr
 595 600 605
 Ala Leu Leu Gln Cys Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln
 610 615 620
 Trp Lys Gly Lys Asp Arg Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg

 625 630 635 640
 Met His Ile Phe Gln Asn Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro
 645 650 655
 Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile
 660 665 670
 Lys His Thr Glu Ala Pro Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu
 675 680 685
 Glu Ser Glu Gly Pro Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr

 690 695 700
 Ile Gly Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu
 705 710 715 720
 Gly Leu Met Phe Tyr Cys Lys Lys Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln
 725 730 735
 Lys Gln Pro Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly
 740 745 750
 Pro Leu Gln Asn Gly Gln Pro Ser Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala

 755 760 765
 Leu Thr Ser Leu Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser
 770 775 780
 Thr Ser Asp Lys Met His Phe Pro Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr

785 790 795 800
 Thr Leu Gly Lys Ser Glu Phe Gly Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln
 805 810 815
 Gly Leu Glu Glu Gly Val Ala Glu Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu

 820 825 830
 Gln Ser Lys Asp Glu Gln Gln Gln Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu
 835 840 845
 Met Phe Gly Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu
 850 855 860
 Cys Arg Glu Ala Glu Pro His Tyr Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu
 865 870 875 880
 Gly Asp Leu Lys Gln Phe Leu Arg Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys

 885 890 895
 Leu Lys Ser Gln Pro Leu Ser Thr Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr
 900 905 910
 Gln Val Ala Leu Gly Met Glu His Leu Ser Asn Asn Arg Phe Val His
 915 920 925
 Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Ala Gln Arg Gln Val
 930 935 940
 Lys Val Ser Ala Leu Gly Leu Ser Lys Asp Val Tyr Asn Ser Glu Tyr

 945 950 955 960
 Tyr His Phe Arg Gln Ala Trp Val Pro Leu Arg Trp Met Ser Pro Glu
 965 970 975
 Ala Ile Leu Glu Gly Asp Phe Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe
 980 985 990
 Gly Val Leu Met Trp Glu Val Phe Thr His Gly Glu Met Pro His Gly
 995 1000 1005
 Gly Gln Ala Asp Asp Glu Val Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Lys

 1010 1015 1020
 Ala Arg Leu Pro Gln Pro Glu Gly Cys Pro Ser Lys Leu Tyr Arg
 1025 1030 1035

Leu Met Gln Arg Cys Trp Ala Leu Ser Pro Lys Asp Arg Pro Ser

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

Lys Pro

1070

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 74

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Gly

1 5

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 75

Leu Leu Gln Gly Ala

1 5

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 76

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Ala

1 5

<210> 77

<211> 7

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 77

Leu Leu Gln Gly Pro Gly Lys

1 5

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 78

Leu Leu Gln Gly Pro Gly

1 5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 79

Leu Leu Gln Gly Pro Ala

1 5

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 80

Leu Leu Gln Gly Pro

1 5

<210> 81

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 81

Leu Leu Gln Pro

1

<210> 82

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 82

Leu Leu Gln Pro Gly Lys

1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 83

Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly Lys

1 5

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 84

Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly

1 5

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 85

Leu Leu Gln Gly Ala Pro

1 5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be G or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be A, G, P, or absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be A, G, K, P, or absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be G, K, or absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be K or absent

<400> 86

Leu Leu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or absent
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or absent

 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or absent
 <400> 87
 Leu Leu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5