



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0101124  
(43) 공개일자 2010년09월16일

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7014503

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년11월26일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년06월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/084949

(87) 국제공개번호 WO 2009/073546

국제공개일자 2009년06월11일

(30) 우선권주장

61/005,034 2007년11월30일 미국(US)

(71) 출원인

브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니

미합중국 뉴저지주 08540 프린스턴 루트 206 앤드  
프로빈스 라인 로드

(72) 발명자

테레트, 조너선, 에이.

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라이브 521

팬, 친

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라이브 521 메다렉스, 인크.

라오-나이크, 체타나

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라이브 521

(74) 대리인

양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 17 항

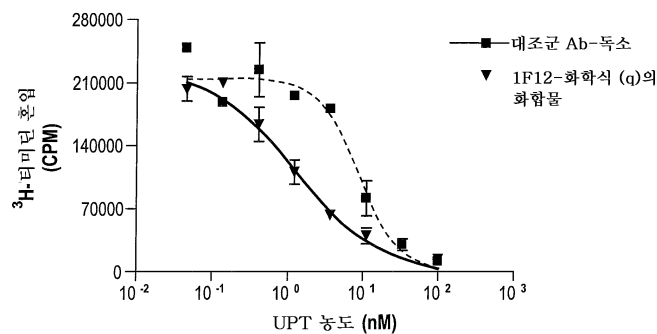
(54) 단백질 티로신 키나제 7 (PTK7)에 대한 모노클로날 항체 파트너 분자 컨쥬게이트

### (57) 요약

본원은 PTK7에 대해 작용하는 항체-파트너 분자 컨쥬게이트에 관한 것이다. 항체-파트너 분자 컨쥬게이트를 사용하여, PTK7을 발현하는 종양 세포의 성장을 특징으로 하는 질병을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 또한 설명한다.

대표도 - 도21

월름 증식 72 h - 미세척



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

PTK-7에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합부, 및 화학식 (m)의 화합물, 화학식 (n)의 화합물, 화학식 (o)의 화합물, 화학식 (p)의 화합물, 및 화학식 (q)의 화합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 파트너 분자를 포함하는 항체-파트너 분자 컨쥬게이트.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합부가 기준 항체에 의해 인식되는 PTK-7 상의 에피토프에 결합하고, 상기 기준 항체가 각각 서열 4 및 10, 서열 1 및 5, 서열 1 및 6, 서열 2 및 7, 서열 3 및 8, 서열 3 및 9, 서열 84 및 85, 또는 서열 84 및 86에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체-파트너 분자 컨쥬게이트.

### 청구항 3

제1항 또는 2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합부가, 각각 서열 4 및 10, 서열 1 및 5, 서열 1 및 6, 서열 2 및 7, 서열 3 및 8, 서열 3 및 9, 서열 84 및 85, 또는 서열 84 및 86에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 구역을 포함하는 것인 항체-파트너 분자 컨쥬게이트.

### 청구항 4

제1항 또는 2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합부가,

- a) 서열 14를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- b) 서열 18을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- c) 서열 22를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- d) 서열 28을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- e) 서열 34를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- f) 서열 40을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3

을 포함하는 것인 항체-파트너 분자 컨쥬게이트.

### 청구항 5

PTK-7에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합부, 및 파트너 분자를 포함하고, 상기 항체가 각각 서열 4 및 10에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 구역을 포함하고, 파트너 분자가 화학식 (m)의 화합물 (도 28)인 항체-파트너 분자 컨쥬게이트.

### 청구항 6

각각 서열 4 및 10에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합부를 포함하는 항체-파트너 분자 컨쥬게이트.

### 청구항 7

제1항 내지 6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체-파트너 분자 컨쥬게이트가 티올 링커, 펩티딜 링커, 히드라진 링커, 및 디설피드 링커로 이루어지는 군 중에서 선택되는 링커에 의해 항체에 컨쥬게이팅되는 것인 항체-파트너 분자 컨쥬게이트.

### 청구항 8

제1항 내지 7항 중 어느 한 항의 항체-파트너 분자 컨쥬게이트 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

### 청구항 9

제2항 내지 4항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합부를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

#### 청구항 10

제10항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 11

제11항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 12

PTK7을 발현하는 종양 세포의 성장을 특징으로 하는 질병의 치료 또는 예방에 효과적인 양의 제1항 내지 7항 중 어느 한 항에 따른 항체-파트너 분자 컨쥬게이트를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 질병의 치료 또는 예방 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 질병이 암인 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 암이 결장암, 폐암, 유방암, 췌장암, 흑색종, 급성 골수성 백혈병, 신장암, 방광암, 난소암, 전립선암, 및 상피세포암으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 암이 췌장암인 방법.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 암이 유방암인 방법.

#### 청구항 17

제14항에 있어서, 암이 폐암인 방법.

### 명세서

#### 배경 기술

- [0001] 수용체 티로신 키나제 (RTK)는 생물학적 신호를 세포외 환경으로부터 세포 내부로 전달하는 막횡단 신호전달 단백질이다. RTK 신호 조절은 세포 성장, 분화, 축삭 성장, 상피 성장, 발생, 부착, 이동 및 세포자멸의 조절에 중요하다 ([Prenzel et al (2001) Endocr. Relat. Cancer 8:11-31]; [Hubbard and Till (2000) Annu. Rev. Biochem. 69:373-98]). RTK는 몇몇 형태의 암의 발병 및 진행에 관여하는 것으로 알려져 있다. 대부분의 RTK-관련 암에서, 유전자의 돌연변이보다는 수용체 단백질의 증폭이 존재하였다 (Kobus and Fleming (2005) Biochemistry 44:1464-70).
- [0002] 수용체 단백질 티로신 키나제 패밀리의 멤버인 단백질 티로신 키나제 7 (PTK7)은 정상 인간 멜라닌세포로부터 처음 단리되고, RT-PCR에 의해 클로닝되었다 ([Lee et al., (1993) Oncogene 8:3403-10]; [Park et al., (1996) J. Biochem 119:235-9]). 별개로, 유전자는 인간 결장 암종-유래 세포주로부터 클로닝되고 결장 암종 키나제 4 (CCK4)로 명명되었다 (Mossie et al. (1995) Oncogene 11:2179-84). PTK7은 검출가능한 촉매활성의 티로신 키나제 활성이 결여되지만 신호 전달 활성을 보유하는 RTK의 하위세트에 속하고, 아마도 세포 부착 분자로서 기능을 하는 것으로 생각된다.
- [0003] PTK7에 대한 mRNA는 결장 암종 유래 세포주에서 가변적으로 발현되는 것으로 밝혀졌지만, 인간 성인 결장 조직에서는 발현되는 것으로 밝혀지지 않았다 (Mossie et al., 상기 문헌). PTK7 발현은 또한 일부 흑색종 세포주 및 흑색종 생검에서 보였다 (Easty, et al. (1997) Int. J. Cancer 71:1061-5). 선택적 스플라이스 (alternative splice) 형태가 간암 및 결장암 세포에서 발현되는 것으로 밝혀졌다 (Jung et al. (2002) Biochim Biophys Acta 1579: 153-63). 또한, PTK7은 급성 골수성 백혈병 샘플에서 매우 과다발현되는 것으로

밝혀졌다 (Muller-Tidow et al., (2004) Clin. Cancer Res. 10:1241-9). 면역조직화학법에 의해, PTK7의 종양 특이적 염색이 PCT 공개 WO 04/17992에 설명된 바와 같이 유방암, 결장암, 폐암, 췌장암, 신장암 및 방광암에서 관찰되었다.

[0004] 따라서, PTK7을 인식하는 물질, 및 그러한 물질의 사용 방법이 요망된다.

## 발명의 내용

[0005] <발명의 개요>

[0006] 본 발명은 PTK7에 결합하고 많은 바람직한 특성을 보이는 단리된 모노클로날 항체, 특히 인간 모노클로날 항체를 제공한다. 이들 특성은 인간 PTK7에 대한 고친화도 결합 및 윌름스 (Wilms) 종양 세포에 대한 결합을 포함한다. 본 발명의 항체 및 조성물을 사용하여 다양한 PTK7 매개 질병을 치료하는 방법을 또한 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부에 관한 것이고, 여기서 항체는

[0007] (a) 인간 PTK7에 특이적으로 결합하고;

[0008] (b) 윌름스 종양 세포주 (ATCC 기탁 번호 CRL-1441)에 결합한다.

[0009] 바람직하게는, 항체는 인간 항체이지만, 별도의 실시태양에서 항체는 쥐 항체, 키메라 (chimera) 항체 또는 인간화 항체일 수 있다.

[0010] 보다 바람직한 실시태양에서, 항체는 윌름스 종양 세포에 4.0 nM 이하의  $EC_{50}$ 으로 결합하거나, 윌름스 종양 세포에 3.5 nM 이하의  $EC_{50}$ 으로 결합한다.

[0011] 다른 실시태양에서, 항체는 A-431 (ATCC 기탁 번호 CRL-1555), Saos-2 (ATCC 기탁 번호 HTB-85), SKOV-3 (ATCC 기탁 번호 HTB-77), PC3 (ATCC 기탁 번호 CRL-1435), DMS 114 (ATCC 기탁 번호 CRL-2066), ACHN (ATCC 기탁 번호 CRL-1611), LNCaP (ATCC 기탁 번호 CRL-1740), DU 145 (ATCC 기탁 번호 HTB-81), LoVo (ATCC 기탁 번호 CCL-229) 및 MIA PaCa-2 (ATCC 기탁 번호 CRL-1420) 세포주로 이루어지는 군 중에서 선택되는 암 세포주에 결합한다.

[0012] 다른 실시태양에서, 본 발명은 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서 항체는 기준 항체에 의해 인식되는 PTK7 상의 에피토프에 대한 결합을 위해 교차-경쟁하고, 여기서 기준 항체는

[0013] (a) 인간 PTK7에 특이적으로 결합하고;

[0014] (b) 윌름스 종양 세포주 (ATCC 기탁 번호 CRL-1441)에 결합한다.

[0015] 다양한 실시태양에서, 기준 항체는

[0016] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및

[0017] (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하거나;

[0018] 기준 항체는

[0019] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및

[0020] (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하거나;

[0021] 기준 항체는

[0022] (a) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및

[0023] (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하거나;

[0024] 기준 항체는

[0025] (a) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및

[0026] (b) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하거나;

[0027] 기준 항체는

[0028] (a) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및

- [0029] (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하거나;
- [0030] 기준 항체는
- [0031] (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및
- [0032] (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함한다.
- [0033] 한 측면에서, 본 발명은 인간  $V_H$  3-30.3 유전자의 산물이거나 그로부터 유래되는 중쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부에 관한 것이고, 여기서 항체는 PTK7에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 또한 인간  $V_H$  DP44 유전자의 산물이거나 그로부터 유래되는 중쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서 항체는 PTK7에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 또한 인간  $V_H$  3-33 유전자의 산물이거나 그로부터 유래되는 중쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서 항체는 PTK7에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 추가로 인간  $V_K$  L15 유전자의 산물이거나 그로부터 유래되는 경쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서 항체는 PTK7에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 추가로 인간  $V_K$  A10 유전자의 산물이거나 그로부터 유래되는 경쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서, 항체는 PTK7에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 추가로 인간  $V_K$  A27 유전자의 산물이거나 그로부터 유래되는 경쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서 항체는 PTK7에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 추가로 인간  $V_K$  L6 유전자의 산물이거나 그로부터 유래되는 경쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서 항체는 PTK7에 특이적으로 결합한다.
- [0034] 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0035] (a) 서열 11을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0036] (b) 서열 15를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0037] (c) 서열 19를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0038] (d) 서열 23을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0039] (e) 서열 29를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0040] (f) 서열 35를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0041] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0042] (a) 서열 11을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0043] (b) 서열 15를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0044] (c) 서열 19를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0045] (d) 서열 24를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0046] (e) 서열 30을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0047] (f) 서열 36을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0048] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0049] (a) 서열 12를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0050] (b) 서열 16을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0051] (c) 서열 20을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0052] (d) 서열 25를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0053] (e) 서열 31을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및

- [0054] (f) 서열 37을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0055] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0056] (a) 서열 13을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0057] (b) 서열 17을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0058] (c) 서열 21을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0059] (d) 서열 26을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0060] (e) 서열 32를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0061] (f) 서열 38을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0062] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0063] (a) 서열 13을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0064] (b) 서열 17을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0065] (c) 서열 21을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0066] (d) 서열 27을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0067] (e) 서열 33을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0068] (f) 서열 39를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0069] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0070] (a) 서열 14를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0071] (b) 서열 18을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0072] (c) 서열 22를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0073] (d) 서열 28을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0074] (e) 서열 34를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0075] (f) 서열 40을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0076] 본 발명의 다른 바람직한 항체 또는 그의 항원 결합부는 다음을 포함한다:
- [0077] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및
- [0078] (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역.
- [0079] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0080] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및
- [0081] (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역.
- [0082] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0083] (a) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및
- [0084] (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역.
- [0085] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0086] (a) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및
- [0087] (b) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역.
- [0088] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0089] (a) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및

- [0090] (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역.
- [0091] 또다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0092] (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및
- [0093] (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역.
- [0094] 본 발명의 항체는 예를 들어, 전장 항체, 예를 들어 IgG1 또는 IgG4 이소형의 전장 항체일 수 있다. 별법으로, 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fab 또는 Fab'2 단편, 또는 단일쇄 항체일 수 있다.
- [0095] 본 발명은 또한 치료제, 예를 들어 세포독소 또는 방사성 동위원소에 결합된 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합부를 포함하는 항체-파트너 분자 컨주게이트를 제공한다. 특히 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 (예를 들어, 티올 연결기를 통해) 화합물 N (도 28)에 결합된, 본원의 항체 또는 그의 항원 결합부를 포함하는 항체-파트너 분자 컨주게이트를 제공한다. 예를 들어, 상이한 실시태양에서, 본 발명은 다음 바람직한 항체-파트너 분자 컨주게이트를 제공한다:
- [0096] (i) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하는 항체, 또는 그의 항원 결합부를 포함하고, 항체 또는 그의 항원 결합부가 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 60/882,461에서 상세히 논의된 화합물 N (도 28)에 연결된 항체-파트너 분자 컨주게이트;
- [0097] (ii) 다음을 포함하고 화합물 N (도 28)에 연결된 항체 또는 그의 항원 결합부를 포함하는 항체-파트너 분자 컨주게이트:
- [0098] (a) 서열 14를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0099] (b) 서열 18을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0100] (c) 서열 22를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0101] (d) 서열 28을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0102] (e) 서열 34를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0103] (f) 서열 40을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0104] 특정 실시태양에서, 항체-파트너 분자 컨주게이트의 항체 또는 그의 항원 결합부는 각각 서열 4 및 10, 서열 1 및 5, 서열 1 및 6, 서열 2 및 7, 서열 3 및 8, 또는 서열 3 및 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 구역을 갖는다.
- [0105] 또한, 항체가 본 발명의 임의의 항체에 의해 결합되는 동일하거나 중첩되는 에피토프에 결합하는 항체-파트너 분자 컨주게이트가 본 발명에 의해 제공된다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 항체-파트너 분자 컨주게이트의 항체 또는 그의 항원 결합부는 각각 서열 4 및 10, 서열 1 및 5, 서열 1 및 6, 서열 2 및 7, 서열 3 및 8, 또는 서열 3 및 9에 제시된 아미노산 서열을 갖는 기준 항체에 의해 인식되는 PTK-7 상의 에피토프에 결합한다 (예를 들어, 교차 경쟁한다).
- [0106] 본 발명의 항체-파트너 분자 컨주게이트는 매우 다양한 링커, 예를 들어 본원의 전반에 걸쳐 설명되는 것 및 당업계에 공지된 것에 의해 연결될 수 있다. 한 실시태양에서, 파트너 분자는 화학적 링커 (즉, 티올 링커, 펩티드 링커, 히드라진 링커 또는 디설피드 링커)에 의해 항체에 컨주게이팅된다.
- [0107] 또다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 상기 언급된 항체-파트너 분자 컨주게이트의 항체 (또는 그의 항원 결합부)를 코딩하는 단리된 핵산, 및 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다.
- [0108] 본원 전체에 걸쳐 논의되는 바와 같이, 본 발명의 항체-파트너 분자 컨주게이트는 매우 다양한 진단 및 치료 용도에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체-파트너 분자 컨주게이트는 PTK7을 발현하는 종양 세포의 성장을 특징으로 하는 질병 (예를 들어, 암)의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 대상에게 투여될 수 있다. 치료 또는 예방할 수 있는 암은 결장암, 폐암, 유방암, 췌장암, 흑색종, 급성 골수성 백혈병, 신장암, 방광암, 난소암 및 전립선암을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.
- [0109] 또한, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합부와 상이한 결합 특이성을 갖는 제2 기능적 모이어티에



연결된 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합부를 포함하는 이중특이적 분자를 제공한다.

- [0110] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합부, 또는 면역결핍제 또는 이중특이적 분자, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 또한 제공한다.
- [0111] 본원은 또한 고친화도로 PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 항-PTK7 항체-파트너 분자 컨주게이트, 특히 인간 모노클로날 항체를 포함하는 컨주게이트를 제공한다. 상기 특정 항체-파트너 분자 컨주게이트는 PTK7-발현 세포 내로 내재화될 수 있고, 항원 의존성 세포성 세포독성을 매개할 수 있다. 또한, 본원의 개시내용은 본원에 개시되는 항-PTK7 항체-파트너 분자 컨주게이트를 사용하여 암, 예를 들어 중피종, 결장암, 폐암, 유방암, 췌장암, 흑색종, 급성 골수성 백혈병, 신장암, 방광암, 난소암 및 전립선암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0112] 파트너 분자에 컨주게이팅된 본원의 항체 또는 그의 항원 결합부를 포함하는 조성물을 또한 제공한다. 본원에 개시된 항체 파트너 분자 컨주게이트에서 항체에 유리하게 컨주게이팅될 수 있는 파트너 분자는 약물, 독소, 마커 분자 (예를 들어, 방사성 동위원소), 단백질 및 치료제를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 항체-파트너 분자 컨주게이트 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 또한 본원에서 개시한다.
- [0113] 한 측면에서, 상기 항체-파트너 분자 컨주게이트는 화학적 링커를 통해 컨주게이팅된다. 일부 실시태양에서, 링커는 펩티딜 링커이고, 본원에서  $(L^4)_p-F-(L^1)_m$  으로 표시된다. 다른 링커는 히드라진 및 디설피드 링커를 포함하고, 본원에서 각각  $(L^4)_p-H-(L^1)_m$  또는  $(L^4)_p-J-(L^1)_m$  으로 표시된다. 파트너에 부착되는 링커 이외에, 본 발명은 또한 본질적으로 임의의 분자종에 대한 부착을 위해 적절한 절단가능한 링커 아암 (arm)을 제공한다.
- [0114] 또한, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원 결합부를 코딩하는 핵산 분자 및 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포도 본 발명에 포함된다. 또한, 본 발명은 본 발명의 항체를 발현하는, 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 트랜스젠 (transgene)을 포함하는 트랜스제닉 (transgenic) 마우스뿐만 아니라, 본 발명의 항체를 생산하는, 상기 마우스로부터 제조된 하이브리도마를 제공한다.
- [0115] 또다른 측면에서, 본 발명은 PTK7을 발현하는 종양 세포의 성장을 특징으로 하는 질병의 치료 또는 예방에 효과적인 양의 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합부를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 질병의 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 질병은 예를 들어, 암, 예를 들어, 결장암 (소장암 포함), 폐암, 유방암, 췌장암, 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 급성 골수성 백혈병, 신장암, 방광암, 난소암 및 전립선암일 수 있다.
- [0116] 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 항-PTK7 항체를 사용하여 생체 내에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 항-PTK7 항체는 쥐, 키메라, 인간화 또는 인간 항체일 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여 치료할 수 있는 다른 암의 예는 신장암 (예를 들어, 신장 세포암종), 아교모세포종, 뇌종양, 급성 림프성 백혈병 (ALL), 성인 T-세포 백혈병 (T-ALL), 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병을 비롯한 만성 또는 급성 백혈병, 림프종 (예를 들어, 호지킨 (Hodgkin) 및 비-호지킨 림프종, 림프성 림프종, 원발성 CNS 림프종, T-세포 림프종, 버킷 (Burkitt) 림프종, 퇴행성 대세포 림프종 (ALCL), 피부 T-세포 림프종, 결절성 소분할-세포 림프종, 말초 T-세포 림프종, 레너트 (Lennert) 림프종, 면역모세포 림프종, T-세포 백혈병/림프종 (ATLL), 중심모세포/중심세포 (cb/cc) 소포 림프종암, B 계통 미만성 대세포 림프종, 혈관면역모구성 림프절증 (AILD)-유사 T 세포 림프종 및 HIV 관련 체강계 림프종), 배아암종, 미분화성 비강인두 암종 (예를 들어, 슈민케 (Schmincke) 종양), 캐슬먼 (Castleman) 병, 카포시 (Kaposi) 육종, 다발 골수종, 발덴스트롬 (Waldenstrom) 마크로글로불린혈증 및 다른 B-세포 림프종, 비강인두 암종, 골암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구내 악성 흑색종, 자궁암, 직장암, 항문 부위의 암, 위암, 고환암, 자궁암, 자궁관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 소아기 고형종양, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우암종, 중추 신경계 (CNS) 신생물, 종양 혈관신생, 척추축 종양, 뇌간 신경아교종, 뇌하수체 선종, 표피양 암, 편평세포암, 석면에 의해 유도된 것을 비롯한 환경 유발암, 예를 들어, 중피종 및 상기 암의 조합을 포함한다.
- [0117] 본 발명의 다른 특징 및 잇점은 제한적 의미로서 해석되지 않아야 하는 하기의 상세한 설명과 실시예로부터 명백해질 것이다. 본원 전체에서 인용된 모든 참조문, Genbank 기재사항, 특허 및 특허 출원 공개의 내용은 본원에 참고로 명백하게 포함된다.

## 도면의 간단한 설명



[0118]

도 1a는 3G8 및 3G8a 인간 모노클로날 항체의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 41) 및 아미노산 서열 (서열 1)을 나타낸다. CDR1 (서열 11), CDR2 (서열 15) 및 CDR3 (서열 19) 구역이 라인으로 표시되어 있고, V, D 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 1b는 3G8 인간 모노클로날 항체의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 45) 및 아미노산 서열 (서열 5)을 나타낸다. CDR1 (서열 23), CDR2 (서열 29) 및 CDR3 (서열 35) 구역은 라인으로 표시되어 있고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 1c는 3G8a 인간 모노클로날 항체의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 46) 및 아미노산 서열 (서열 6)을 나타낸다. CDR1 (서열 24), CDR2 (서열 30) 및 CDR3 (서열 36) 구역은 라인으로 표시되어 있고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 2a는 4D5 인간 모노클로날 항체의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 42) 및 아미노산 서열 (서열 2)을 나타낸다. CDR1 (서열 12), CDR2 (서열 16) 및 CDR3 (서열 20) 구역이 라인으로 표시되어 있고, V, D 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 2b는 4D5 인간 모노클로날 항체의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 47) 및 아미노산 서열 (서열 7)을 나타낸다. CDR1 (서열 25), CDR2 (서열 31) 및 CDR3 (서열 37) 구역이 라인으로 표시되어 있고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 3a는 12C6 인간 모노클로날 항체의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 43) 및 아미노산 서열 (서열 3)을 나타낸다. CDR1 (서열 13), CDR2 (서열 17) 및 CDR3 (서열 21) 구역이 라인으로 표시되어 있고, V, D 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 3b는 12C6 인간 모노클로날 항체의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 48) 및 아미노산 서열 (서열 8)을 나타낸다. CDR1 (서열 26), CDR2 (서열 32) 및 CDR3 (서열 38) 구역이 라인으로 표시되어 있고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 3c는 12C6a 인간 모노클로날 항체의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 49) 및 아미노산 서열 (서열 9)을 나타낸다. CDR1 (서열 27), CDR2 (서열 33) 및 CDR3 (서열 39) 구역이 라인으로 표시되어 있고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 4a는 7C8 인간 모노클로날 항체의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 44) 및 아미노산 서열 (서열 4)을 나타낸다. CDR1 (서열 14), CDR2 (서열 18) 및 CDR3 (서열 22) 구역이 라인으로 표시되어 있고, V, D 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 4b는 7C8 인간 모노클로날 항체의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 서열 (서열 50) 및 아미노산 서열 (서열 10)을 나타낸다. CDR1 (서열 28), CDR2 (서열 34) 및 CDR3 (서열 40) 구역이 라인으로 표시되어 있고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되어 있다.

도 5는 인간 생식계열  $V_H$  3-30.3 아미노산 서열 (서열 51)과 3G8 (서열 1) 및 3G8a (서열 1)의 중쇄 가변 구역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다 (JH4b 생식계열은 서열 59로 개시되어 있다).

도 6은 인간 생식계열  $V_H$  3-30.3 아미노산 서열 (서열 51)과 4D5 (서열 2)의 중쇄 가변 구역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다 (JH4b 생식계열은 서열 60으로 개시되어 있다).

도 7은 인간 생식계열  $V_H$  DP44 아미노산 서열 (서열 52)과 12C6 (서열 3) 및 12C6a (서열 2)의 중쇄 가변 구역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다 (3-7, 3-23, 및 JH4b 생식계열은 각각 서열 61-63으로 개시되어 있다).

도 8은 인간 생식계열  $V_H$  3-33 아미노산 서열 (서열 53)과 7C8 (서열 4)의 중쇄 가변 구역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다 (JH6b 생식계열은 서열 64로 개시되어 있다).

도 9는 인간 생식계열  $V_K$  L15 아미노산 서열 (서열 54)과 3G8 (서열 5) 및 3G8a (서열 6)의 경쇄 가변 구역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다 (JK1 생식계열은 서열 65로 개시되어 있다).

도 10은 인간 생식계열  $V_K$  A10 아미노산 서열 (서열 55)과 4D5 (서열 7)의 경쇄 가변 구역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다 (JK5 생식계열은 서열 66으로 개시되어 있다).

도 11은 인간 생식계열  $V_K$  A27 아미노산 서열 (서열 56)과 12C6 (서열 8)의 경쇄 가변 구역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다 (JK2 생식계열은 서열 67로 개시되어 있다).

도 12는 인간 생식계열  $V_K$  L15 아미노산 서열 (서열 54)과 12C6a (서열 9)의 경쇄 가변 구역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다 (JK2 생식계열은 서열 68로 개시되어 있다).

도 13은 인간 생식계열  $V_K$  L6 아미노산 서열 (서열 57)을 갖는 7C8 (서열 10)의 경쇄 가변 구역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다 (JK3 생식계열은 서열 69로 개시되어 있다).

도 14는 인간 PTK7에 대해 작용하는 인간 모노클로날 항체 7C8이 전장 인간 PTK7로 형질감염된 HEK3 세포의 세포 표면에 결합한다는 것을 입증하는 유동 세포측정 실험 결과를 나타내는 것이다.

도 15는 인간 PTK7에 대한 인간 모노클로날 항체가 PTK7에 특이적으로 결합한다는 것을 입증하는 ELISA 실험 결과를 나타내는 것이다.

도 16은 인간 PTK7에 대해 작용하는 항체가 윌름스 종양 세포의 세포 표면에 결합한다는 것을 입증하는 유동 세포측정 실험 결과를 나타내는 것이다.

도 17은 인간 PTK7에 대해 작용하는 항체가 다양한 암 세포주의 세포 표면에 결합한다는 것을 입증하는 유동 세포측정 실험 결과를 나타내는 것이다.

도 18은 인간 PTK7에 대해 작용하는 항체가 수지상 세포의 세포 표면에 결합한다는 것을 입증하는 유동 세포측정 실험 결과를 나타내는 것이다.

도 19는 인간 PTK7에 대해 작용하는 항체가 CD4+ 및 CD8+ T-림프구에는 결합하지만, B-림프구에는 결합하지 않는다는 것을 입증하는 유동 세포측정 실험 결과를 나타내는 것이다.

도 20은 인간 PTK7에 대한 인간 모노클로날 항체가 PTK7+ 세포 내로 내재화될 수 있음을 입증하는 Hum-Zap 내재화 실험의 결과를 보여준다. (A) 윌름스 종양 세포 내로 인간 항체 3G8, 4D5 및 7C8의 내재화. (B) 윌름스 종양 세포 내로 인간 항체 12C6의 내재화. (C) A-431 종양 세포 내로 인간 항체 7C8 및 12C6의 내재화. (D) PC3 종양 세포 내로 인간 항체 7C8 및 12C6의 내재화.

도 21은 독소-컨쥬게이팅된 인간 모노클로날 항-PTK7 항체가 인간 신장암 세포주를 사멸시킴을 입증하는 세포 증식 분석의 결과를 보여준다.

도 22는 독소-컨쥬게이팅된 인간 모노클로날 항-PTK7 항체가 낮은 내지 높은 수준의 PTK7을 발현하는 세포주를 사멸시킴을 입증하는 세포 증식 분석의 결과를 보여준다.

도 23은 항-PTK7 항체가 세포 표면 상에 PTK7을 발현하는 세포의 침습 (invasion) 이동을 억제하는 것을 입증하는 침습 분석의 결과를 보여준다.

도 24는 독소에 컨쥬게이팅된 항-PTK7 항체가 생체내 이중이식 모델에서 췌장 종양 진행을 늦추었음을 보여준다.

도 25는 독소에 컨쥬게이팅된 항-PTK7 항체가 생체내 이중이식 모델에서 유방암 진행을 늦추었음을 보여준다.

도 26a 및 26b는 상피-유래 A431 및 소세포 폐-유래 DMS79 종양이 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트를 사용하여 생체내 모델에서 감소됨을 보여주는 그래프이다. 도 26a에서, 중간 종양 부피가 비히클 단독, 비변형된 이소형-매칭된 (matched) 대조 항체, 이소형-매칭된 화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트, 및 7C8-화학식 (m)의 화합물로 치료한 마우스에서 측정되었다. 도 26b는 7C8-화학식 (m)의 화합물을 사용한 치료가 SCID 마우스에서 DMS79 소세포 폐 암종 종양의 완전 관해를 일으켰음을 보여준다.

도 27은 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트가 생체내 SCID 이중이식 마우스 모델에서 유의한 체중 감소를 일으키지 않음을 보여주는 그래프이다.

도 28은 화학식 (m)의 화합물의 화학 구조를 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

한 측면에서, 본 발명은 PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체, 특히, 인간 모노클로날 항체에

관한 것이다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 바람직한 기능적 특성, 예를 들어 시험관 내 또는 생체 내에서 PTK7에 대한 고친화도 결합 및/또는 종양 세포의 성장을 억제하는 능력을 나타낸다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 특정 중쇄 및 경쇄 생식계열 서열로부터 유래되고/되거나, 특정 아미노산 서열을 포함하는 특정의 구조적 특징, 예를 들어, CDR 구역을 포함한다. 본 발명은 단리된 항체, 상기 항체를 제조하는 방법, 상기 항체를 포함하는 면역결핍제 및 이중특이적 분자, 항체, 면역결핍제 또는 이중특이적 분자를 함유하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 예를 들어 암과 같은 질환을 치료하기 위하여 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0120] 본 발명을 더욱 잘 이해하기 위해서는 특정 용어에 대한 저의를 먼저 제시한다. 추가의 정의는 상세한 설명 전체에 걸쳐 제시되어 있다.

[0121] 용어 "PTK7" 및 "CCK4"는 상호교환가능하게 사용되며, 인간 PTK7의 변이체, 이소형 및 종간 상동체 (species homolog)를 포함한다. 따라서, 본 발명의 인간 항체는 특정 경우에, 인간을 제외한 다른 종으로부터의 PTK7과 교차-반응할 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 항체는 하나 이상의 인간 PTK7에 완전히 특이적일 수 있고, 인간을 제외한 종 또는 다른 유형과 교차-반응성을 나타내지 않을 수 있다. 예시적인 인간 PTK7의 완전한 아미노산 서열은 Genbank 기탁 번호 NM\_002821 (서열 58)을 갖는다.

[0122] 용어 "면역 반응"은 병원체가 침입한 인체, 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 암성 세포, 또는 자가면역 또는 병적 염증의 경우 정상 인간 세포 또는 조직에 대한 선택적인 손상, 파괴 또는 제거를 초래하는, 예를 들어 림프구, 항원 제시 세포, 식세포, 과립구, 및 상기 세포 또는 간에 의해 생산되는 가용성 거대분자 (항체, 시토킨, 및 보체 포함)의 작용을 지칭한다.

[0123] "신호 전달 경로"는 신호를 세포의 일부에서 세포의 다른 부분으로 전달하는데 일정 역할을 수행하는 다양한 신호 전달 분자 사이의 생화학적 관계를 의미하는 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, "세포 표면 수용체"란 어구는 예를 들어 신호를 수용하고 이 신호를 세포의 형질막을 통과하여 전달할 수 있는 분자 및 이러한 분자의 복합체를 포함한다. 본 발명의 "세포 표면 수용체"의 예는 PTK7 수용체이다.

[0124] 본원에 사용된 용어 "항체"는 전체 항체 및 그의 임의의 항원 결합 단편 (즉, "항원 결합부") 또는 단일쇄를 포함한다. "항체"는 디설피드 결합에 의하여 상호 연결되어 있는 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질 또는 그의 항원 결합부를 의미한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 구역 (이하, "V<sub>H</sub>"라 약칭함) 및 중쇄 불변 구역으로 이루어져 있다. 중쇄 불변 구역은 3개의 도메인, 즉 C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> 및 C<sub>H3</sub>으로 이루어져 있다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 구역 (이하, "V<sub>L</sub>"이라 약칭함) 및 경쇄 불변 구역으로 이루어져 있다. 경쇄 불변 구역은 하나의 도메인, 즉 C<sub>L</sub>로 이루어져 있다. V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 구역은 추가로 프레임워크 구역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 구역이 산재되어 있는 상보성 결정 구역 (CDR)으로 불리는 초가변 구역으로 세분화될 수 있다. V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>은 각각 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어져 있으며, 이들은 아미노-말단에서 카복시-말단의 방향으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서에 따라서 배열되어 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 구역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 구역은 숙주 조직 또는 인자, 예를 들어 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 효과기 세포) 및 전통적 보체계의 제1 성분 (C1q)에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0125] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 항체의 "항원 결합부" (또는 간단히 "항체 부분")는 항원 (예를 들어, PTK7)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 항체의 "항원 결합부"라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) Fab 단편, 즉 V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> 및 C<sub>H1</sub> 도메인으로 구성된 1가 단편; (ii) F(ab')<sub>2</sub> 단편, 즉 힌지 구역에 디설피드 다리에 의해서 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) 본질적으로 힌지 구역의 일부를 갖는 Fab인 Fab' 단편 ([FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3rd ed. 1993)] 참조); (iv) V<sub>H</sub> 및 C<sub>H1</sub> 도메인으로 구성된 Fd 단편; (v) 항체의 한쪽 아암의 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인으로 구성된 Fv 단편; (vi) V<sub>H</sub> 도메인으로 구성된 dAb 단편 [Ward et al., (1989) Nature 341:544-546]; (vii) 단리된 상보성 결정 구역 (CDR); 및 (viii) 단일 가변 도메인 및 2개의 불변 도메인을 함유하는 중쇄 가변 구역인 나노바디 (nanobody)를 포함한다. 추가로, 비록 Fv 단편의 2개의 도메인인 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub>는 별개의 유전자에 의해서 코딩되지만, 이 도메인들은 재조합 방법을 통하여, 상기 도메인들이 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 구역이 쌍을 이루어 1가 분자 (단일쇄 Fv (scFv)로서 알려져 있음; 예를 들어, [Bird et al. (1988) Science 242:423-426]; 및 [Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883] 참조)를 형성한 단일의 단백질 사슬로서 생산되도록 만드는 합성 링커에 의해서 서로 결합될 수 있다.

이러한 단일쇄 항체는 또한 항체의 "항원 결합부"라는 용어에 포함되도록 의도된다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 공지된 종래의 기술을 이용하여 생산되며, 이 단편들은 무손상 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.

- [0126] 본원에서 사용되는 용어 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 존재하지 않는 항체를 의미하는 것이다 (예를 들어, 특이적으로 PTK7에 결합하는 단리된 항체에는 PTK7을 제외한 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 존재하지 않는다). 그러나, PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원, 예를 들어, 다른 종으로부터 유래한 PTK7 분자와의 교차-반응성을 가질 수 있다. 게다가, 단리된 항체에는 실질적으로 다른 세포 물질 및/또는 화학 물질이 존재하지 않을 수 있다.
- [0127] 본원에 사용되는 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일 분자 조성물인 항체 분자 제제를 의미한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.
- [0128] 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 프레임워크 및 CDR 구역 모두가 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래하는 가변 구역을 갖는 항체를 포함하는 의미이다. 추가로, 항체가 불변 구역을 함유할 경우, 이러한 불변 구역도 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래한다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발 또는 생체내 체세포 돌연변이 유발에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 다른 포유동물 중, 예를 들어 마우스의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프팅된 항체를 포함하는 의미는 아니다.
- [0129] "인간 모노클로날 항체"라는 용어는 프레임워크 및 CDR 구역 모두가 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래하는 가변 구역을 갖는 단일 결합 특이성을 보이는 항체를 지칭한다. 한 실시태양에서, 인간의 모노클로날 항체는 무한 증식 세포에 융합된, 인간 중쇄 트랜스젠 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 비인간 트랜스제닉 동물, 예를 들어, 트랜스제닉 마우스로부터 얻어지는 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의하여 생산된다.
- [0130] 본원에서 사용되는 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의하여 제조, 발현, 생산 또는 단리되는 모든 인간 항체, 예를 들어, (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대하여 트랜스제닉이거나, 이에 대한 트랜스염색체 (transchromosomal)를 갖는 동물 (예를 들어, 마우스) 또는 그로부터 생산된 하이브리도마로부터 단리된 항체 (아래에서 상세히 설명함), (b) 인간 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어, 형질감염세포 (트랜스펙토마 (transfectoma))로부터 단리된 항체, (c) 재조합된 조합형 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열로 스플라이싱하는 단계를 포함하는 임의의 다른 방법에 의해 제조, 발현, 생산 또는 단리된 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는 프레임워크 및 CDR 구역이 인간의 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변 구역을 갖는다. 그러나, 특정 실시태양에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내에서 돌연변이가 유발될 수 있으므로 (또는 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우에는, 생체내 체세포 돌연변이가 유발될 수 있으므로), 재조합 항체의  $V_H$  및  $V_L$  구역의 아미노산 서열은 천연적으로 생체 내에서 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 존재할 수 없는 서열임과 동시에, 인간 생식계열  $V_H$  및  $V_L$  서열로부터 유래하고 이와 관련된 서열이다.
- [0131] 본원에서 사용되는 "이소형"은 중쇄 불변 구역 유전자에 의해 코딩되는 항체 클래스 (예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 의미한다.
- [0132] "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"란 어구는 본원에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어와 상호교환가능하게 사용된다.
- [0133] 용어 "인간 항체 유도체"는 인간 항체의 임의의 변형된 형태, 예를 들어, 항체와 다른 물질 또는 항체의 컨주게이트를 의미한다.
- [0134] "인간화 항체"란 용어는 다른 포유동물 중, 예를 들어, 마우스의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 그래프팅된 항체를 의미한다. 추가의 프레임워크 구역 변형은 인간 프레임워크 서열 내에서 일어날 수 있다.
- [0135] 용어 "키메라 항체"는 가변 구역 서열이 하나의 종에서 유래되고 불변 구역 서열은 다른 종으로부터 유래된 항체, 예를 들어, 가변 구역 서열은 마우스 항체로부터 유래되고 불변 구역 서열은 인간 항체로부터 유래된 항체를 지칭한다.
- [0136] 용어 "항체 모방체 (mimetic)"는 항원에 결합하는 항체의 능력을 모방할 수 있지만 천연 항체 구조로 제한되지



않는 분자를 의미하고자 한 것이다. 그러한 항체 모방체의 예는 아피바디 (Affibody), DARPin, 안티칼린 (Anticalin), 아비머 (Avimer), 및 베르사바디 (Versabody)를 포함하고 이로 제한되지 않으며, 이들은 모두 전통적인 항체 결합을 모방하면서, 구분되는 메카니즘으로부터 생성되고 이를 통해 기능하는 결합 구조를 사용한다.

[0137] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "파트너 분자"는 항체 파트너 분자 컨주게이트에서 항체에 컨주게이팅된 엔티티 (entity)를 의미한다. 파트너 분자의 예는 약물, 독소, 마커 분자 (펩티드 및 소분자 마커, 예를 들어 형광색소 마커, 및 단일 원자 마커, 예를 들어 방사성 동위원소를 포함하고 이로 제한되지 않음), 단백질 및 치료제를 포함한다.

[0138] 본원에서 사용되는 바와 같이, "인간 PTK7에 특이적으로 결합하는" 항체는 항체가 인간 PTK7에  $1 \times 10^{-7}$  M 이하, 보다 바람직하게는  $5 \times 10^{-8}$  M 이하, 보다 바람직하게는  $1 \times 10^{-8}$  M 이하, 보다 바람직하게는  $5 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 결합하는 항체를 지칭한다.

[0139] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 단백질 또는 세포"에 실질적으로 결합하지 않는"은 단백질 또는 세포에 결합하지 않거나, 고친화도로 결합하는 것이 아닌 것, 즉, 단백질 또는 세포에  $1 \times 10^{-6}$  M 이상, 보다 바람직하게는  $1 \times 10^{-5}$  M 이상, 보다 바람직하게는  $1 \times 10^{-4}$  M 이상, 보다 바람직하게는  $1 \times 10^{-3}$  M 이상, 훨씬 더 바람직하게는  $1 \times 10^{-2}$  M 이상의  $K_D$ 로 결합함을 의미한다.

[0140] 본원에서 사용되는 용어 " $K_{\text{회합}}$ " 또는 " $K_a$ "는 특정 항체-항원 상호작용의 회합 속도를 지칭하는 것인 반면, 본원에 사용된 " $K_{\text{해리}}$ " 또는 " $K_d$ "란 용어는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도를 지칭하는 것이다. 본원에 사용된 " $K_D$ "란 용어는,  $K_d$  대  $K_a$ 의 비 (즉,  $K_d/K_a$ )로부터 수득되는 해리 상수를 의미하는 것으로서, 몰 농도 (M)로서 표시한다. 항체에 대한  $K_D$  값은 당업계에 널리 확립된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 항체의  $K_D$ 를 측정하기 위한 바람직한 방법으로는 표면 플라즈몬 공명을 이용하는 방법이 있는데, 바람직하게는 바이오센서 시스템, 예를 들어, 바이어코어(Biacore)<sup>®</sup> 시스템을 사용하는 방법이 있다.

[0141] 본원에서 사용되는 바와 같이, IgG 항체에 대한 용어 "고친화도"는 표적 항원에 대한  $K_D$ 값이  $10^{-8}$  M 이하, 보다 바람직하게는  $10^{-9}$  M 이하, 보다 더 바람직하게  $10^{-10}$  M 이하인 항체를 지칭하는 것이다. 그러나, "고친화도" 결합은 다른 항체의 이소형에 있어서 다양할 수 있다. 예를 들어, IgM 이소형에 대한 "고친화도" 결합은 항체의  $K_D$  값이  $10^{-7}$  M 이하, 보다 바람직하게는  $10^{-8}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $10^{-9}$  M 이하인 경우를 지칭한다.

[0142] 본원에서 사용되는 용어 "대상"은 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 "비인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어, 포유동물 및 비-포유동물, 예를 들어, 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류 및 파충류 등을 포함한다.

[0143] 기호 "-"는 결합으로서 이용되든지 결합에 수직으로 제시되든지 상관없이 제시된 모이어티가 분자, 고체 지지체의 나머지에 부착되는 지점을 나타낸다.

[0144] 용어 "알킬"은 단독으로 또는 또다른 치환체의 일부로서, 달리 언급되지 않으면 직쇄 또는 분지쇄, 또는 시클릭 탄화수소 라디칼, 또는 그의 조합을 의미하고, 완전 포화, 일- 또는 다중불포화일 수 있고, 지정된 탄소 원자수를 갖는 2가 및 다가 라디칼을 포함할 수 있다 (즉,  $C_1$ - $C_{10}$ 은 1 내지 10개의 탄소를 의미한다). 포화 탄화수소 라디칼의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 예를 들어, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등의 동족체 및 이성질체와 같은 것을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 불포화 알킬기는 하나 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 갖는 기이다. 불포화 알킬기의 예는 비닐, 2-프로페닐, 크로틸, 2-이소펜테닐, 2-(부타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에틸닐, 1- 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 및 보다 고급 동족체 및 이성질체를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 또한, 용어 "알킬"은 달리 언급되지 않으면, 아래에서 보다 상세히 규정되는 알킬의 유도체, 예를 들어 "헤테로알킬"을 포함하는 의미이다. 탄화수소기로 제한되는 알킬기는 "호모알킬"로 언급된다.

[0145] 용어 "알킬렌"은 단독으로 또는 또다른 치환체의 일부로서,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 로 예시되고 이로 제한되지 않는 알칸

으로부터 유도된 2가 라디칼을 의미하고, "헤테로알킬렌"으로 아래에서 설명되는 기를 추가로 포함한다. 일반적으로, 알킬 (또는 알킬렌) 기는 1 내지 24개의 탄소 원자를 가질 것이고, 10개 이하의 탄소 원자가 본 발명에서 바람직하다. "저급 알킬" 또는 "저급 알킬렌"은 일반적으로 8개 이하의 탄소 원자를 갖는 보다 짧은 사슬의 알킬 또는 알킬렌기이다.

[0146] 용어 "헤테로알킬"은 단독으로 또는 또다른 용어와 조합되어 달리 언급되지 않으면 안정한 직쇄 또는 분지쇄, 또는 시클릭 탄화수소 라디칼, 또는 그의 조합을 의미하고, 이는 언급된 수의 탄소 원자 및 O, N, Si, 및 S로 이루어지는 군 중에서 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자로 구성되고, 질소, 탄소 및 황 원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 헤테로원자는 임의로 4급화될 수 있다. 헤테로원자(들), 즉 O, N, S, 및 Si는 헤테로알킬기의 임의의 내부 위치에 또는 알킬기가 분자의 나머지에 부착되는 위치에 존재할 수 있다. 그 예는  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ , 및  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 2개 이하의 헤테로원자는 예를 들어  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  및  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 과 같이 연속적일 수 있다. 유사하게, 용어 "헤테로알킬렌"은 단독으로 또는 또다른 치환체의 일부로서, 헤테로알킬로부터 유도된 2가 라디칼, 예를 들어  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  및  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 를 의미하고, 이로 제한되지 않는다. 헤테로알킬렌기의 경우, 헤테로원자는 사슬 말단의 어느 하나 또는 둘 모두에 존재할 수 있다 (예를 들어, 알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노 등). 용어 "헤테로알킬" 및 "헤테로알킬렌"은 폴리(에틸렌 글리콜) 및 그의 유도체를 포함한다 (예를 들어, [Shearwater Polymers Catalog, 2001] 참조). 추가로, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결기의 경우, 연결기의 배향은 연결기의 화학식이 표시되는 방향으로 제시되지 않는다. 예를 들어, 화학식  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 는  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  및  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$ 를 모두 나타낸다.

[0147] 용어 "알킬" 또는 "헤테로알킬"과 조합될 때 용어 "저급"은 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 모이어티를 의미한다.

[0148] 용어 "알콕시", "알킬아미노", "알킬술포닐", 및 "알킬티오" (또는 티오알콕시)는 그의 통상적인 의미로 사용되고, 각각 산소 원자, 아미노기,  $\text{SO}_2$ 기 또는 황 원자를 통해 분자의 나머지에 부착된 알킬기를 의미한다. 용어 "아릴술포닐"은  $\text{SO}_2$ 기를 통해 분자의 나머지에 부착된 아릴기를 의미하고, 용어 "술프하이드릴"은 SH기를 의미한다.

[0149] 일반적으로 "아실 치환체"는 또한 상기 기재된 기로부터 선택된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아실 치환체"는 본 발명의 화합물의 폴리시클릭 핵에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된 카르보닐 탄소에 부착되고 그 원자기를 채우는 기를 의미한다.

[0150] 용어 "시클로알킬" 및 "헤테로시클로알킬"은 단독으로 또는 또다른 용어와 조합되어, 달리 언급되지 않으면 각각 치환 또는 비치환된 "알킬" 및 치환 또는 비치환된 "헤테로알킬"의 시클릭 형태를 나타낸다. 추가로, 헤테로시클로알킬의 경우, 헤테로원자는 헤테로사이클이 분자의 나머지에 부착되는 위치에 존재할 수 있다. 시클로알킬의 예는 시클로펜틸, 시클로헥실, 1-시클로헥세닐, 3-시클로헥세닐, 시클로헵틸 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 헤테로시클로알킬의 예는 1-(1,2,5,6-테트라히드로피리딜), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모르폴리닐, 3-모르폴리닐, 테트라히드로푸란-2-일, 테트라히드로푸란-3-일, 테트라히드로티엔-2-일, 테트라히드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 시클릭 구조의 헤테로원자 및 탄소 원자는 임의로 산화된다.

[0151] 용어 "할로" 또는 "할로젠"은 단독으로 또는 또다른 치환체의 일부로서, 달리 언급되지 않으면 불소, 염소, 브롬 또는 요오드 원자를 의미한다. 추가로, "할로알킬"과 같은 용어는 모노할로알킬 및 폴리할로 알킬을 포함하는 의미이다. 예를 들어, 용어 "할로( $\text{C}_1-\text{C}_4$ )알킬"은 트리플루오로메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 4-클로로부틸, 3-브로모프로필 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는 의미이다.

[0152] 용어 "아릴"은 달리 언급되지 않으면 함께 융합되거나 공유 연결되는 단일 고리 또는 다수의 고리 (바람직하게는 1 내지 3개의 고리)일 수 있는 치환 또는 비치환된 다가불포화 방향족 탄화수소 치환체를 의미한다. 용어 "헤테로아릴"은 N, O 및 S 중에서 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 아릴기 (또는 고리)를 의미하고, 여기서 질소, 탄소 및 황 원자는 임의로 산화되고, 질소 원자(들)은 임의로 4급화된다. 헤테로아릴기는 헤테로원자를 통해 분자의 나머지에 부착될 수 있다. 아릴 및 헤테로아릴기의 비-제한적인 예는 페닐, 1-나프틸,



2-나프틸, 4-비페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-이속사졸릴, 4-이속사졸릴, 5-이속사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 2-피리미딜, 4-피리미딜, 5-벤조티아졸릴, 푸리닐, 2-벤즈이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-이소퀴놀릴, 5-이소퀴놀릴, 2-퀴녹살리닐, 5-퀴녹살리닐, 3-퀴놀릴, 및 6-퀴놀릴을 포함한다. 각각의 상기 언급된 아릴 및 헤테로아릴 고리계에 대한 치환체는 아래에서 설명되는 허용되는 치환체의 군 중에서 선택된다. 또한, "아릴" 및 "헤테로아릴"은 하나 이상의 비-방향족 고리계가 아릴 또는 헤테로아릴계에 융합되거나 다른 방식으로 결합되는 고리계를 포함한다.

[0153] 간결하게 하기 위해, 다른 용어와 조합되어 사용될 때 (예를 들어, 아릴옥시, 아릴티옥시, 아릴알킬) 용어 "아릴"은 상기 규정된 바와 같은 아릴 및 헤테로아릴 고리를 모두 포함한다. 따라서, 용어 "아릴알킬"은 탄소 원자 (예를 들어, 메틸렌기)가 예를 들어 산소 원자에 의해 대체된 알킬기 (예를 들어, 페녹시메틸, 2-피리딜옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필 등)를 포함하여, 아릴기가 알킬기에 부착된 라디칼 (예를 들어, 벤질, 펜에틸, 피리딜메틸 등)을 포함하는 의미이다.

[0154] 각각의 상기 용어 (예를 들어, "알킬", "헤테로알킬", "아릴" 및 "헤테로아릴")은 나타난 라디칼의 치환 및 비치환된 형태를 모두 포함한다. 각각의 종류의 라디칼에 대한 바람직한 치환체를 아래에 제시한다.

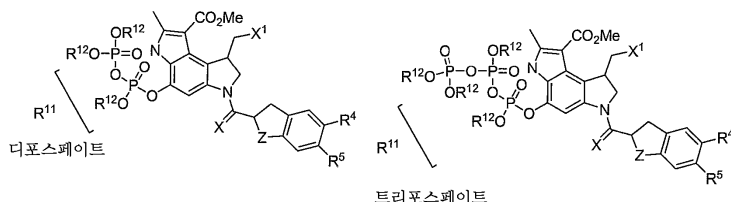
[0155] 알킬, 및 헤테로알킬 라디칼 (중중 알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 시클로알케닐, 및 헤테로시클로알케닐로 언급되는 기 포함)에 대한 치환체는 일반적으로 각각 "알킬 치환체" 및 "헤테로알킬 치환체"로 언급되고, 이들은 0 내지  $(2m'+1)$  (여기서,  $m'$ 는 상기 라디칼 내의 탄소 원자의 총수이다)의 수로  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR'R''$ ,  $-SR'$ ,  $-할로젠$ ,  $-SiR'R''R'''$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR'R''$ ,  $-OC(O)NR'R''$ ,  $-NR''C(O)R'$ ,  $-NR'-C(O)NR'R''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ ,  $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR'R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-CN$  및  $-NO_2$ 로부터 선택되는 하나 이상의 다양한 기 (이로 제한되지 않음)일 수 있다.  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  및  $R''''$ 는 각각 바람직하게는 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 예를 들어 1-3개의 할로젠으로 치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기, 또는 아릴알킬기를 의미한다. 본 발명의 화합물이 예를 들어 하나 초과 R 기를 포함할 때, 각각의 R기는 독립적으로 선택되고, 하나 초과 R',  $R''$ ,  $R'''$  및  $R''''$ 기가 존재할 때 이들 기도 각각 독립적으로 선택된다.  $R'$  및  $R''$ 가 동일한 질소 원자에 부착될 경우, 이들은 질소 원자와 조합되어 5, 6, 또는 7원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어,  $-NR'R''$ 는 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하고 이로 제한되지 않는 의미이다. 치환체에 대한 상기 논의로부터, 당업자는 용어 "알킬"이 수소기 이외의 다른 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기, 예를 들어 할로알킬 (예를 들어,  $-CF_3$  및  $-CH_2CF_3$ ) 및 아실 (예를 들어,  $-C(O)CH_3$ ,  $-C(O)CF_3$ ,  $-C(O)CH_2OCH_3$  등)을 포함하는 의미임을 이해할 것이다.

[0156] 알킬 라디칼에 대해 설명된 바와 유사하게, 아릴 치환체 및 헤테로아릴 치환체는 일반적으로 각각 "아릴 치환체" 및 "헤테로아릴 치환체"로 언급되고, 0 내지 방향족 고리계의 개방 원자가 (open valence)의 총수의 수로, 예를 들어 할로젠,  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR'R''$ ,  $-SR'$ ,  $-할로젠$ ,  $-SiR'R''R'''$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR'R''$ ,  $-OC(O)NR'R''$ ,  $-NR''C(O)R'$ ,  $-NR'-C(O)NR'R''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR'R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-CN$  및  $-NO_2$ ,  $-R'$ ,  $-N_3$ ,  $-CH(Ph)_2$ , 플루오로( $C_1-C_4$ )알콕시, 및 플루오로( $C_1-C_4$ )알킬로부터 선택되고; 여기서  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  및  $R''''$ 는 바람직하게는 수소, ( $C_1-C_8$ )알킬 및 헤테로알킬, 비치환된 아릴 및 헤테로아릴, (비치환된 아릴)-( $C_1-C_4$ )알킬, 및 (비치환된 아릴)옥시-( $C_1-C_4$ )알킬로부터 독립적으로 선택된다. 본 발명의 화합물이 예를 들어 하나 초과 R 기를 포함할 때, 각각의 R기는 독립적으로 선택되고, 하나 초과 R',  $R''$ ,  $R'''$  및  $R''''$ 기가 존재할 때 이들 기도 각각 독립적으로 선택된다.

[0157] 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접 원자 상의 2개의 아릴 치환체는 임의로 화학식  $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$ 의 치환체로 치환될 수 있고, 여기서 T 및 U는 독립적으로  $-NR-$ ,  $-O-$ ,  $-CRR'-$  또는 단일 결합이고, q는 0 내지 3의 정수이다. 별법으로, 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접 원자 상의 2개의 치환체는 임의로 화학식  $-A-(CH_2)_r-B-$ 의 치환체로 치환될 수 있고, 여기서 A 및 B는 독립적으로  $-CRR'-$ ,  $-O-$ ,  $-NR-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NR'-$  또는 단일 결합이고, r은 1 내지 4의 정수이다. 이와 같이 형성된 새로운 고리의 단일 결합 중의 하나는 임의로 이중 결합으로 대체될 수 있다. 별법으로, 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접 원자 상의 2개의 치환체는 임의로 화학식  $-(CRR')_s-X-(CR'R'')_d-$ 의 치환체로 치환될 수 있고, 여기서 s 및 d는 독립적으로 0 내지 3의 정수

이고, X는 -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, 또는 -S(O)<sub>2</sub>NR'-이다. 치환체 R, R', R" 및 R'"은 바람직하게는 수소 또는 치환 또는 비치환된 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0158] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "디포스페이트"는 2개의 포스페이트기를 함유하는 인산의 에스테르를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 용어 "트리포스페이트"는 3개의 포스페이트기를 함유하는 인산의 에스테르를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 디포스페이트 또는 트리포스페이트를 갖는 특정 약물은 다음을 포함한다:



[0159]

[0160] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헤테로원자"는 산소 (O), 질소 (N), 황 (S) 및 규소 (Si)를 포함한다.

[0161] 기호 "R"은 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴기로부터 선택된 치환체기를 나타내는 일반적인 약어이다.

[0162] 본 발명의 다양한 측면에 관하여는 이하 섹션에 보다 상세히 기술한다.

#### [0163] 항-PTK7 항체

[0164] 본 발명의 항체는 항체의 특정한 기능상의 특성 또는 성질을 특징으로 한다. 예를 들어, 항체는 PTK7에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 PTK7과 고친화도, 예를 들어  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의 K<sub>D</sub>로 결합한다. 본 발명의 항-PTK7 항체는 바람직하게는 하기 특징 중 하나 이상을 나타낸다:

[0165] (a) 인간 PTK7에 특이적으로 결합하거나;

[0166] (b) 윌름스 종양 세포주 (ATCC 기탁 번호 CRL-1441)에 결합한다.

[0167] 바람직하게는, 항체는  $5 \times 10^{-8}$  M 이하의 K<sub>D</sub>로 인간 PTK7과 결합하거나,  $1 \times 10^{-8}$  M 이하의 K<sub>D</sub>로 인간 PTK7과 결합하거나,  $5 \times 10^{-9}$  M 이하의 K<sub>D</sub>로 인간 PTK7과 결합하거나,  $1 \times 10^{-8}$  M 내지  $1 \times 10^{-10}$  M 이하의 K<sub>D</sub>로 인간 PTK7과 결합한다. 바람직하게는, 항체는 4.0 nM 이하의 EC<sub>50</sub>으로 윌름스 종양 세포에 결합하거나, 3.5 nM 이하의 EC<sub>50</sub>으로 윌름스 종양 세포에 결합한다. PTK7에 대한 항체의 결합능을 평가하는 표준 분석이 당업계에 공지되어 있는데, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, 및 RIA를 포함한다. 항체의 결합 운동학적 특성 (예를 들어, 결합 친화도)도 당업계에 공지된 표준 분석, 예를 들어, ELISA, 스캐차드 (Scatchard) 및 바이어코어 분석에 의하여 평가할 수 있다. 또다른 예로서, 본 발명의 항체는 신장암종 종양 세포주, 예를 들어, 윌름스 종양 세포주에 결합할 수 있다. 상기한 임의의 특징을 평가하는데 적합한 분석은 실시예에 보다 상세히 기술되어 있다.

#### [0168] 모노클로날 항체 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8

[0169] 본 발명의 바람직한 항체는 실시예 1 및 2에 기술된 바와 같이 단리되고 구조적으로 특성화된 인간 모노클로날 항체 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8이다. 당업계의 통상의 숙련인은 항체 3G8 및 3G8a뿐만 아니라, 항체 12C6 및 12C6a가 동일한 중쇄 서열을 갖는 반면, 그의 경쇄 서열은 상이하다는 것을 이해할 것이다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의 V<sub>H</sub> 아미노산 서열은 서열 1 (3G8 및 3G8a), 2 (4D5), 3 (12C6 및 12C6a) 및 4(7C8)에 제시된다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a, 및 7C8의 V<sub>L</sub> 아미노산 서열은 각각 서열 5, 6, 7, 8, 9 및 10에 제시된다.

[0170] 각각의 상기 항체가 PTK7과 결합할 수 있다면, V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 서열은 "혼합 및 매치되어 (mixed and matched)" 본 발명의 다른 항-PTK7 결합 분자를 생산할 수 있다. 그러한 "혼합 및 매치된" 항체의 PTK7 결합은 상술한 결합 분

석 및 실시예에 기술된 방법 (예를 들어, ELISA)을 이용하여 시험할 수 있다. 바람직하게는,  $V_H$  및  $V_L$  사슬이 혼합 및 매치되는 경우, 특정  $V_H/V_L$  쌍으로부터의  $V_H$  서열은 구조적으로 유사한  $V_H$  서열로 대체된다. 유사하게, 특정  $V_H/V_L$  쌍으로부터의  $V_L$  서열은 구조적으로 유사한  $V_L$  서열로 대체되는 것이 바람직하다.

- [0171] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은
- [0172] (a) 서열 1, 2, 3 및 4로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및
- [0173] (b) 서열 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역
- [0174] 을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서 항체는 PTK7, 바람직하게는 인간 PTK7에 특이적으로 결합한다.
- [0175] 바람직한 중쇄 및 경쇄 조합은 다음을 포함한다:
- [0176] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및 (b) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역; 또는
- [0177] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및 (b) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역; 또는
- [0178] (a) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및 (b) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역; 또는
- [0179] (a) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및 (b) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역; 또는
- [0180] (a) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및 (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역; 또는
- [0181] (a) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역; 및 (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역.
- [0182] 또다른 측면에서, 본 발명은 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의 중쇄 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 그의 조합을 포함하는 항체를 제공한다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의  $V_H$  CDR1의 아미노산 서열은 서열 11 (3G8 및 3G8a), 12 (4D5), 13 (12C6 및 12C6a) 및 14 (7C8)에 제시된다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의  $V_H$  CDR2의 아미노산 서열은 서열 15 (3G8 및 3G8a), 16 (4D5), 17 (12C6 및 12C6a) 및 18 (7C8)에 제시된다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의  $V_H$  CDR3의 아미노산 서열은 서열 19 (3G8 및 3G8a), 20 (4D5), 21 (12C6 및 12C6a) 및 22 (7C8)에 나타낸다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의  $V_K$  CDR1의 아미노산 서열은 각각 서열 23, 24, 25, 26, 27 및 28에 제시된다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의  $V_K$  CDR2의 아미노산 서열은 각각 서열 29, 30, 31, 32, 33 및 34에 제시된다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의  $V_K$  CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열 35, 36, 37, 38, 39 및 40에 제시된다. CDR 구역은 카바트 (Kabat) 시스템을 사용하여 라인으로 표시한다 [Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242].
- [0183] 각각의 상기 항체가 PTK7과 결합할 수 있고 항원-결합 특이성이 주로 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역에 의해 제공될 경우,  $V_H$  CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 및  $V_K$  CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 "혼합 및 매치"되어 (즉, 각각의 항체는  $V_H$  CDR1, CDR2 및 CDR3, 및  $V_K$  CDR1, CDR2 및 CDR3를 함유해야 하지만, 상이한 항체로부터 유래된 CDR은 혼합 및 매치될 수 있음), 본 발명의 다른 항-PTK7 결합 분자를 생산할 수 있다. 이러한 "혼합 및 매치된" 항체의 PTK7 결합은 상기한 결합 분석 및 실시예에 기술된 방법 (예를 들어, ELISA, 바이어코어 분석법)을 이용하여 시험할 수 있다. 바람직하게는,  $V_H$  CDR 서열이 혼합 및 매치될 때, 특정  $V_H$  서열로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 유사하게,  $V_K$  CDR 서열이 혼합 및 매치될 때, 특정  $V_K$  서열로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 신규한  $V_H$  및  $V_L$  서열은 하나 이상의  $V_H$  및/또는  $V_L$  CDR 구역 서열을 모노클로날 항체인 항체 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a

및 7C8에 대해 본원에 개시되어 있는 CDR 서열로부터의 구조적으로 유사한 서열로 치환함으로써 생산될 수 있다는 사실은 당업계의 숙련인에게 자명할 것이다.

- [0184] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은
- [0185] (a) 서열 11, 12, 13 및 14로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0186] (b) 서열 15, 16, 17 및 18로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0187] (c) 서열 19, 20, 21 및 22로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0188] (d) 서열 23, 24, 25, 26, 27 및 28로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0189] (e) 서열 29, 30, 31, 32, 33 및 34로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0190] (f) 서열 35, 36, 37, 38, 39 및 40으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3
- [0191] 을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고; 여기서 항체는 PTK7, 바람직하게는 인간 PTK7에 특이적으로 결합한다.
- [0192] 바람직한 실시태양에서, 항체는 다음을 포함한다:
- [0193] (a) 서열 11을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0194] (b) 서열 15를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0195] (c) 서열 19를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0196] (d) 서열 23을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0197] (e) 서열 29를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0198] (f) 서열 35를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0199] 또다른 바람직한 실시태양에서, 항체는 다음을 포함한다:
- [0200] (a) 서열 11을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0201] (b) 서열 15를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0202] (c) 서열 19를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0203] (d) 서열 24를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0204] (e) 서열 30을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0205] (f) 서열 36을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0206] 또다른 바람직한 실시태양에서, 항체는 다음을 포함한다:
- [0207] (a) 서열 12를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0208] (b) 서열 16을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0209] (c) 서열 20을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0210] (d) 서열 25를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0211] (e) 서열 31을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0212] (f) 서열 37을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0213] 또다른 바람직한 실시태양에서, 항체는 다음을 포함한다:
- [0214] (a) 서열 13을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;

- [0215] (b) 서열 17을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0216] (c) 서열 21을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0217] (d) 서열 26을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0218] (e) 서열 32를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0219] (f) 서열 38을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0220] 또다른 바람직한 실시태양에서, 항체는 다음을 포함한다:
- [0221] (a) 서열 13을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0222] (b) 서열 17을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0223] (c) 서열 21을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0224] (d) 서열 27을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0225] (e) 서열 33을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0226] (f) 서열 39를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0227] 또다른 바람직한 실시태양에서, 항체는 다음을 포함한다:
- [0228] (a) 서열 14를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR1;
- [0229] (b) 서열 18을 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR2;
- [0230] (c) 서열 22를 포함하는 중쇄 가변 구역 CDR3;
- [0231] (d) 서열 28을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR1;
- [0232] (e) 서열 34를 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR2; 및
- [0233] (f) 서열 40을 포함하는 경쇄 가변 구역 CDR3.
- [0234] CDR1 및/또는 CDR2 도메인(들)과는 독립적으로, CDR3 도메인은 단독으로 동족 (cognate) 항원에 대한 항체의 결합 특이성을 결정할 수 있고, 공통 CDR3 서열에 기초하여 동일한 결합 특이성을 갖는 여러 항체들을 예측가능하게 생성할 수 있다는 것이 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [Klimka et al., British J. of Cancer 83(2):252-260 (2000)] (쥐 항-CD30 항체 Ki-4의 중쇄 가변 도메인 CDR3만을 사용하여 인간화 항-CD30 항체를 생산하는 것에 관하여 설명함); [Beiboer et al., J. Mol. Biol. 296:833-849 (2000)] (모 쥐 MOC-31 항-EGP-2 항체의 중쇄 CDR3 서열만을 사용한 재조합 상피 당단백질-2 (EGP-2) 항체에 관하여 설명함); [Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:8910-8915 (1998)] (쥐 항-인테그린  $\alpha_v\beta_3$  항체 LM609의 중쇄 및 경쇄 가변 CDR3 도메인을 사용한 인간화 항-인테그린  $\alpha_v\beta_3$  항체의 패널 (여기에서, 각각의 멤버 항체는 CDR3 도메인 바깥쪽에 있는 별개의 서열을 포함하고, 모 쥐 항체만큼 높거나, 그보다 더 높은 친화도를 갖는 모 쥐 항체와 동일한 에피토프와 결합할 수 있음)에 관하여 설명함); [Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162 (1994)] (항원 결합에 대하여 가장 중요한 것은 CDR3 도메인이라는 것을 개시함); [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:2529-2533 (1995)] (항-과상풍 독소이드 Fab의 중쇄 상에 인간 태반 DNA에 대한 3개의 Fab (SI-1, SI-40, 및 SI-32)의 중쇄 CDR3 서열을 그래프팅함으로써 존재하는 중쇄 CDR3을 대체하는 것에 관하여 설명하고, 오직 CDR3 도메인만이 결합 특이성을 부여함을 입증함); [Ditzel et al., J. Immunol. 157:739-749 (1996)] (모 다중특이성 Fab LNA3의 중쇄 CDR3만을 단일특이성 IgG 과상풍 독소이드-결합 Fab p313 항체의 중쇄로 전달하는 것이 모 Fab의 결합 특이성을 보유하는데 충분하였다는 그래프팅 연구를 설명함); [Berezov et al., BIAjournal 8: Scientific Review 8 (2001)] (항-HER2 모노클로날 항체의 CDR3을 기초로 한 펩티드 모방체를 설명함); [Igarashi et al., J. Biochem (Tokyo) 117:452-7 (1995)] (항-포스포티딜세린 항체의 CDR3 도메인에 대응하는 12개 아미노산의 합성 폴리펩티드를 설명함); [Bourgeois et al., J. Virol 72:807-10 (1998)] (항-호흡기 세포 융합 바이러스 (RSV) 항체의 중쇄 CDR3 도메인으로부터 유도된 단일 펩티드가 시험관 내에서 바이러스를 중화할 수 있음을 보여줌); [Levi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:4374-8 (1993)] (쥐 항-HIV 항체의 중쇄 CDR3 도메인을 기초로 한 펩티드를 설명함); [Polymenis and Stoller, J. Immunol. 152:5218-5329 (1994)] (Z-DNA-결합 항체의 중쇄 CDR3 구역을 그래프팅함으로써 scFv의 결합을 가능



하게 함을 설명함) 및 [Xu and Davis, Immunity 13:37-45 (2000)] (중쇄 CDR3의 다양성이, 그렇지 않으면 동일한 IgM 분자가 다양한 합텐과 단백질 항원을 구별할 수 있도록 하기에 충분함을 설명함)를 참조할 수 있다. 또한, 단일 CDR 도메인에 의해 규정되는, 특허 등록된 항체를 설명하고 있는 미국 특허 6,951,646; 6,914,128; 6,090,382; 6,818,216; 6,156,313; 6,827,925; 5,833,943; 5,762,905 및 5,760,185를 참조한다. 이들 참조문은 각각 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0235] 따라서, 본 발명은 인간 또는 비-인간 동물로부터 유래된 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하고, PTK7에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체를 제공한다. 특정 측면에서, 본 발명은 비-인간 항체, 예를 들어, 마우스 또는 래트 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하고, PTK7에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체를 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 비-인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 본 발명의 항체는 상응하는 비-인간 항체와 (a) 결합을 위해 경쟁할 수 있고/있거나; (b) 그의 기능상의 특징들을 보유하고/하거나; (c) 그와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나; (d) 그와 유사한 결합 친화도를 갖는다.

[0236] 다른 측면에서, 본 발명은 PTK7에 특이적으로 결합할 수 있는 인간 항체, 예를 들어, 비-인간 동물로부터 수득한 인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 모노클로날 항체를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 예를 들어 비-인간 동물로부터 얻은 인간 항체와 같은 제1 인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 모노클로날 항체를 제공하고, 여기에서, 제1 인간 항체는 PTK7에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 제1 인간 항체로부터의 CDR3 도메인은 PTK7에 대한 결합 특이성이 결여되어 있는 인간 항체 내 CDR3 도메인을 대체함으로써 PTK7에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 인간 항체를 생성한다. 일부 실시태양에서, 제1 인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 본 발명의 항체는 상응하는 모 제1 인간 항체와 (a) 결합을 위해 경쟁할 수 있고/있거나; (b) 그의 기능상의 특징들을 보유하고/하거나; (c) 그와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나; (d) 그와 유사한 결합 친화도를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 제1 인간 항체는 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8이다.

[0237] 특정 생식계열 서열을 갖는 항체

[0238] 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 특정 생식계열 중쇄 면역글로불린 유전자로부터의 중쇄 가변 구역 및/또는 특정 생식계열 경쇄 면역글로불린 유전자로부터의 경쇄 가변 구역을 포함한다.

[0239] 예를 들어, 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간  $V_H$  3-30.3 유전자의 산물이거나 그로부터 유래된 중쇄 가변 구역을 포함하고, 항체 PTK7, 바람직하게는 인간 PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간  $V_H$  DP44의 산물이거나 그로부터 유래된 중쇄 가변 구역을 포함하고, 항체 PTK7, 바람직하게는 인간 PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간  $V_H$  3-33 유전자의 산물이거나 그로부터 유래된 중쇄 가변 구역을 포함하고, 항체 PTK7, 바람직하게는 인간 PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간  $V_K$  L15 유전자의 산물이거나 그로부터 유래된 경쇄 가변 구역을 포함하고, 항체 PTK7, 바람직하게는 인간 PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간  $V_K$  A10 유전자의 산물이거나 그로부터 유래된 경쇄 가변 구역을 포함하고, 항체 PTK7, 바람직하게는 인간 PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간  $V_K$  A27 유전자의 산물이거나 그로부터 유래된 경쇄 가변 구역을 포함하고, 항체 PTK7, 바람직하게는 인간 PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 인간  $V_K$  L6 유전자의 산물이거나 그로부터 유래된 경쇄 가변 구역을 포함하고, 항체 PTK7, 바람직하게는 인간 PTK7에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은

[0240] (a)  $V_H$  3-30.3, DP44 또는 3-33 유전자의 산물이거나 그로부터 유래된 중쇄 가변 구역을 포함하고 (상기 유전자는 각각 서열 51, 52 또는 53에 기재된 아미노산 서열을 코딩한다);

[0241] (b) 인간  $V_K$  L15, A10, A27 또는 L6 유전자의 산물이거나 그로부터 유래된 경쇄 가변 구역을 포함하고 (상기 유전자는 각각 서열 54, 55, 56 또는 57에 기재된 아미노산 서열을 코딩한다); 및



- [0242] (c) PTK7에 특이적으로 결합하는, 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공한다.
- [0243] 각각  $V_H$  3-30.3 및  $V_K$  L15의  $V_H$  및  $V_K$ 를 갖는 항체의 예는 3G8 및 3G8a이다.  $V_H$  3-30.3 및  $V_K$  A10의  $V_H$  및  $V_K$ 를 갖는 항체의 예는 4D5이다. 각각  $V_H$  DP44 및  $V_K$  A27의  $V_H$  및  $V_K$ 를 갖는 항체의 예는 12C6이다. 각각  $V_H$  DP44 및  $V_K$  L15의  $V_H$  및  $V_K$ 를 갖는 항체의 예는 12C6a이다. 각각  $V_H$  3-33 및  $V_K$  L6의  $V_H$  및  $V_K$ 를 갖는 항체의 예는 7C8이다.
- [0244] 본원에서 사용되는 바와 같이, 인간의 항체는 항체의 가변 구역이 인간 생식계열 면역글로불린 유전자를 이용하는 시스템으로부터 얻어지는 경우, 특정 생식계열 서열의 "산물"이거나 또는 "그로부터 유래되는" 중쇄 또는 경쇄 가변 구역을 포함한다. 이러한 시스템은 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스를 관심있는 항원으로 면역화시키거나, 또는 파지 상에 제시된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 관심있는 항원으로 스크리닝하는 것을 포함한다. 인간 생식계열 면역글로불린 서열의 "산물"이거나 또는 "그로부터 유래되는" 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 생식계열 면역글로불린의 아미노산 서열과 비교한 후, 인간 항체의 서열과 가장 가까운 서열을 갖는 (즉, 최대 동일성 %) 인간 생식계열 면역글로불린 서열을 선택함으로써 확인될 수 있다. 특정 인간 생식계열 면역글로불린 서열의 "산물"이거나 또는 "그로부터 유래되는" 인간 항체는 예를 들어 천연 발생 체세포 돌연변이 또는 부위 지정 돌연변이의 의도적인 도입으로 인하여, 생식계열 서열과 비교하였을 때, 아미노산에 차이가 있을 수 있다. 그러나, 선택된 인간 항체는 일반적으로 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 비교할 때, 아미노산 서열이 90% 이상 동일하고, 다른 종의 생식계열 면역글로불린 아미노산 서열 (예를 들어, 쥐 생식계열 서열)과 비교할 때, 인간 항체가 인간의 것임을 확인시켜 주는 아미노산 잔기들을 함유한다. 특정 경우에, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 비교할 때, 아미노산 서열이 95% 이상, 또는 심지어 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상 동일할 수 있다. 일반적으로, 특정 인간 생식계열 서열로부터 유래된 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 10개 이하의 아미노산이 상이할 것이다. 특정 경우에 있어서, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 5개 이하, 또는 심지어 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개 이하의 아미노산이 상이할 수 있다.
- [0245] 상동성 항체
- [0246] 또다른 실시태양에서, 본 발명의 항체는 본원에서 설명되는 바람직한 항체의 아미노산 서열과 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 구역을 포함하고, 여기서, 항체는 본 발명의 항-PTK7 항체의 목적하는 기능적 특성을 보유한다.
- [0247] 예를 들어, 본 발명은 중쇄 가변 구역 및 경쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서
- [0248] (a) 중쇄 가변 구역은 서열 1, 2, 3 및 4로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하고;
- [0249] (b) 경쇄 가변 구역은 서열 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하며;
- [0250] 본 항체는 하기 특성 중 하나 이상을 나타낸다:
- [0251] (c) 항체는  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 PTK7과 결합하고;
- [0252] (d) 항체는 윌름스 종양 세포주에 결합한다.
- [0253] 다른 실시태양에서,  $V_H$  및/또는  $V_L$  아미노산 서열은 상기 제시한 서열에 대해 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성일 수 있다. 상기 제시한 서열의  $V_H$  및  $V_L$  구역에 대해서 높은 (즉, 80% 이상) 상동성을 갖는  $V_H$  및  $V_L$  구역을 갖는 항체는 서열 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50을 코딩하는 핵산 분자의 돌연변이 유발 (예를 들어, 부위-지정 또는 PCR-매개 돌연변이 유발), 이어서 코딩되는 변경된 항체를 본원에서 설명되는 기능 분석을 사용하여 보유된 기능 (즉, 상기 (c) 및 (d)에 제시된 기능)에 대해서 시험함으로써 수득할 수 있다.
- [0254] 본원에서 사용되는 바와 같이, 2개의 아미노산 서열 사이의 상동성 %는 2개의 서열 사이의 동일성 %와 동등한

것이다. 2개의 서열 사이의 동일성 %는 서열이 공유하는 동일한 위치의 수에 관한 함수 (즉, 상동성 % = 동일한 위치의 수/위치의 총 수 x 100)로서, 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 갭의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려한다. 서열 비교와 2개 서열 사이의 동일성 %의 결정은 아래의 비-제한적인 예에 설명되어 있는 바와 같은 수학적 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다.

[0255] 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성 %는 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 통합된 이. 메이어 (E. Meyer) 및 더블 유. 밀러 (W. Miller)의 알고리즘 [Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)]을 사용하여 결정될 수 있는데, PAM120 가중치 잔기표, 갭 길이 패널티 12 및 갭 패널티 4를 이용한다. 추가로, 2개 아미노산 서열 사이의 동일성 %는 니들만 (Needleman) 및 분쉬 (Wunsch) [J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)] 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있고, 이 알고리즘은 GCG 소프트웨어 패키지 (www.gcg.com에서 입수 가능)의 GAP 프로그램에 통합되고, 블로섬 (Blossum) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치, 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 이용한다.

[0256] 추가로 또는 별법으로, 본 발명의 단백질 서열은 또한 예를 들어, 관련 서열들을 확인하기 위해 공공 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "질의 서열"로서 사용될 수도 있다. 이러한 검색은 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 통하여 이루어질 수 있다 [Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10]. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램 (스코어 = 50, 단어 길이 = 3)을 통하여 수행되고, 이 예 의해 본 발명의 항체 분자에 상동성인 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교를 위하여 갭 형성 정렬을 얻기 위해서는, 문헌 [Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402]에 기재되어 있는 바와 같이, Gapped BLAST를 사용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 사용할 수 있다 (www.ncbi.nlm.nih.gov 참조).

[0257] 보존적 변형을 갖는 항체

[0258] 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하고, 여기서, 이들 CDR 서열 중 하나 이상은 본원에서 설명되는 바람직한 항체 (예를 들어, 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8)에 기초하여 특정 아미노산 서열, 또는 그의 보존적 변형을 포함하고, 상기 항체는 본 발명의 항-PTK7 항체의 목적하는 기능적 특성을 보유한다. 항원 결합능을 제거하지 않는 특정 보존적 서열 변형을 형성할 수 있음이 당업계에서 이해된다 (예를 들어, 문헌 [Brummell et al. (1993) Biochem 32:1180-8] (살모넬라 (*Salmonella*)에 특이적인 항체의 CDR3 중쇄 도메인에서 돌연변이 분석을 설명함); [de Wildt et al. (1997) Prot. Eng. 10:835-41] (항-UA1 항체에서 돌연변이 연구를 설명함); [Komissarov et al. (1997) J Biol. Chem. 272:26864-26870] (친화도를 제거하거나 약화시키는 HCDR3의 중앙부에서의 돌연변이를 보여줌); [Hall et al. (1992) J. Immunol. 149:1605-12] (CDR3 구역에서의 단일 아미노산 변화가 결합 활성을 제거함을 설명함); [Kelley and O'Connell (1993) Biochem. 32:6862-35] (항원 결합에서 Tyr 잔기의 기능을 설명함); [Adib-Conquy et al. (1998) Int. Immunol. 10:341-6] (결합에서 소수성의 효과를 설명함) 및 [Beers et al. (2000) Clin. Can. Res. 6:2835-43] (HCDR3 아미노산 돌연변이체를 설명함). 따라서, 본 발명은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공하고, 여기서,

[0259] (a) 중쇄 가변 구역 CDR3 서열은 서열 19, 20, 21 및 22의 아미노산 서열로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 및 그의 보존적 변형을 포함하고;

[0260] (b) 경쇄 가변 구역 CDR3 서열은 서열 35, 36, 37, 38, 39 및 40의 아미노산 서열로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 및 그의 보존적 변형을 포함하고;

[0261] 본 항체는 하기 성질 중 하나 이상을 나타낸다:

[0262] (c) 인간 PTK7에 특이적으로 결합하고;

[0263] (d) 윌름스 종양 세포주(ATCC 수탁 번호 CRL-1441)에 결합한다.

[0264] 바람직한 실시태양에서, 중쇄 가변 구역 CDR2 서열은 서열 15, 16, 17 및 18의 아미노산 서열로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 및 그의 보존적 변형을 포함하고; 경쇄 가변 구역 CDR2 서열은 서열 29, 30, 31, 32, 33 및 34의 아미노산 서열로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 및 그의 보존적 변형을 포함한다. 또다른 바람직한 실시태양에서, 중쇄 가변 구역 CDR1 서열은 서열 11, 12, 13 및 14의 아미노산 서열로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 및 그의 보존적 변형을 포함하고; 경쇄 가변 구역 CDR1 서열은 서열 23, 24, 25, 26, 27 및 28의 아미노산 서열로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 및 그의

보존적 변형을 포함한다.

[0265] 상이한 실시태양에서, 항체는 예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0266] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특성에 유의한 영향을 미치지 않거나, 유의하게 이를 변형시키지 않는 아미노산의 변형을 지칭하는 것이다. 그러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 당업계에 공지된 표준 기술, 예를 들어, 부위 지정 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이 유발에 의하여 본 발명의 항체에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되는 경우이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 규명되어 있다. 이러한 패밀리는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산 및 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인 및 트립토판), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌 및 메티오닌), 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린 및 이소류신), 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 및 히스티딘)을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 구역 내에 존재하는 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리에 속하는 다른 아미노산 잔기와 대체될 수 있으며, 변경된 항체는 본원에서 설명되는 기능 분석을 사용하여 보유하고 있는 기능 (즉, 상기 (c) 및 (d)에 제시된 기능)에 대해 시험될 수 있다.

[0267] 본 발명의 항-PTK7 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체

[0268] 또다른 실시태양에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 PTK7 모노클로날 항체에 의해 인식되는, 인간 PTK7 상의 에피토프에 결합하는 항체 (즉, PTK7 결합을 위해 본 발명의 임의의 모노클로날 항체와 교차-경쟁하는 능력을 갖는 항체)를 제공한다. 바람직한 실시태양에서, 교차-경쟁 연구에 대한 기준 항체는 모노클로날 항체 3G8 (각각 서열 1 및 5에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는 항체), 또는 모노클로날 항체 3G8a (각각 서열 1 및 6에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는 항체), 또는 모노클로날 항체 4D5 (각각 서열 2 및 7에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는 항체), 또는 모노클로날 항체 12C6 (각각 서열 3 및 8에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는 항체), 또는 모노클로날 항체 12C6a (각각 서열 3 및 9에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는 항체), 또는 모노클로날 항체 7C8 (각각 서열 4 및 10에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는 항체)일 수 있다.

[0269] 그러한 교차-경쟁 항체는 표준 PTK7 결합 분석에서 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8과 교차-경쟁하는 그의 능력에 기초하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 바이오코어 분석, ELISA 검정법 또는 유동 세포측정은 본 발명의 항체와의 교차-경쟁을 입증하는데에 사용될 수 있다. 시험 항체가 예를 들어 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8의 인간 PTK7에 대한 결합을 억제하는 능력은, 시험 항체가 인간 PTK7에 대한 결합을 위해 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8과 경쟁할 수 있고, 따라서 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8과 동일한, 인간 PTK7 상의 에피토프와 결합함을 입증한다. 바람직한 실시태양에서, 인간 PTK7 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 3G8 (각각 서열 1 및 5에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는), 3G8a (각각 서열 1 및 6에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는), 4D5 (각각 서열 2 및 7에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는), 12C6 (각각 서열 3 및 8에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는), 12C6a (각각 서열 3 및 9에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는) 또는 7C8 (각각 서열 4 및 10에 제시된  $V_H$  및  $V_L$  서열을 갖는)에 의해 인식된다. 바람직한 실시태양에서, 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8에 의해 인식되는 것과 동일한, 인간 PTK7 상의 에피토프와 결합하는 항체는 인간 모노클로날 항체이다. 그러한 인간 모노클로날 항체는 실시예에 설명되어 있는 바와 같이 제조 및 단리될 수 있다.

[0270] 조작 및 변형된 항체

[0271] 본 발명의 항체는 또한 변형된 항체를 조작하기 위해 출발 물질로서 본원에 개시된  $V_H$  및/또는  $V_L$  서열 중 하나 이상을 갖는 항체를 이용하여 제조될 수 있고, 여기서, 변형된 항체는 출발 항체와는 변경된 특성을 가질 수 있다. 항체는 하나 또는 2개의 가변 구역 (즉,  $V_H$  및/또는  $V_L$ ), 예를 들어, 하나 이상의 CDR 구역 및/또는 하나 이상의 프레임워크 구역 내에 존재하는 하나 이상의 잔기를 변형시킴으로써 조작될 수 있다. 추가로 또는 별법으로, 항체는 불변 구역(들) 내에 존재하는 잔기들을 변형시켜 조작함으로써, 예를 들어 항체의 효과기 기능(들)을 변형시킬 수 있다.

- [0272] 수행될 수 있는 가변 구역 조작의 한 유형은 CDR 그래프팅이다. 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 구역 (CDR) 내에 존재하는 아미노산 잔기를 통하여 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 각각의 항체 간에 있어서 CDR 외부의 서열보다 더 다양하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호작용에 관여하므로, 상이한 특성을 갖는 상이한 항체로부터 유래된 프레임워크 서열 상에 그래프팅된, 자연 발생하는 특정 항체로부터 유래된 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 제조함으로써 자연 발생하는 특정 항체의 특성을 모방하는 재조합 항체를 발현시킬 수 있다 (예를 들어, [Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327]; [Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525]; [Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033]; 미국 특허 5,225,539 (Winter), 및 미국 특허 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 (Queen et al.) 참조).
- [0273] 따라서, 본 발명의 또다른 실시태양은 각각 서열 11, 12, 13 및 14, 서열 15, 16, 17 및 18, 및 서열 19, 20, 21 및 22로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역, 및 각각 서열 23, 24, 25, 26, 27 및 28, 서열 29, 30, 31, 32, 33 및 34, 및 서열 35, 36, 37, 38, 39 및 40으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부에 관한 것이다. 따라서, 그러한 항체는 모노클로날 항체 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8의  $V_H$  및  $V_L$  CDR 서열을 함유하고, 이들 항체와 상이한 프레임워크 서열을 함유할 수 있다.
- [0274] 상기 프레임워크 서열은 생식계열 항체 유전자 서열을 포함하는 공공 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참고 문헌으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 구역 유전자에 대한 생식계열 DNA 서열은 "VBase" 인간 생식계열 서열 데이터베이스 (인터넷 상에서 [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)에서 이용가능) 및 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 No. 91-3242]; [Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline  $V_H$  Sequences Reveals about Fifty Groups of  $V_H$  Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798]; 및 [Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line  $V_H$  Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836] (이들 각각의 내용은 본원에서 명백하게 참고로 포함된다)에서 찾아볼 수 있다. 또다른 예에서, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 구역 유전자에 대한 생식계열 DNA 서열은 Genbank 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. 예를 들어, HCo7 HuMAb 마우스에서 발견된 하기 중쇄 생식계열 서열은 첨부하는 Genbank 기탁 번호로 이용가능하다: 1-69 (NG\_0010109, NT\_024637 및 BC070333), 3-33 (NG\_0010109 및 NT\_024637) 및 3-7 (NG\_0010109 및 NT\_024637). 또다른 예로서, HCo12 HuMAb 마우스에서 발견된 하기 중쇄 생식계열 서열은 첨부하는 Genbank 기탁 번호로 이용가능하다: 1-69 (NG\_0010109, NT\_024637 및 BC070333), 5-51 (NG\_0010109 및 NT\_024637), 4-34 (NG\_0010109 및 NT\_024637), 3-30.3 (CAJ556644) 및 3-23 (AJ406678)으로 이용가능하다. 다른 인간 생식계열 서열 데이터베이스, 예를 들어 IMGT (<http://imgt.cines.fr>)로부터 이용가능한 데이터베이스를 상기한 VBASE와 유사하게 검색할 수 있다.
- [0275] 항체 단백질 서열은 당업자에게 잘 알려진 Gapped BLAST [Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402]로 불리는 서열 유사성 검색 방법 중의 하나를 사용하여 컴파일링된 단백질 서열 데이터베이스에 대해 비교한다. BLAST는 항체 서열과 데이터베이스 서열 간에 통계적으로 유의한 정렬이 정렬된 단어의 하이-스코어링 세그먼트 쌍 (HSP: high-scoring segment pair)을 포함하기 쉽다는 점에서 경험적 (heuristic) 알고리즘이다. 그의 스코어가 연장 또는 트리밍에 의하여 개선될 수 없는 세그먼트 쌍은 "히트 (hit)"로 불린다. 간단히 설명하면, VBASE 기원의 뉴클레오티드 서열 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>)는 번역되고, FR1 내지 FR3 프레임워크 구역을 포함하는, 이들 구역 사이의 구역이 보유된다. 데이터베이스 서열은 98개 잔기의 평균 길이를 갖는다. 단백질의 전체 길이에 걸쳐 정확하게 매치하는 중복 서열이 제거된다. 디폴트, 턴 오프된 낮은 복잡도 필터를 제외한 표준 파라미터 및 블로섬62의 치환 매트릭스에서 프로그램 blastp를 사용한 단백질에 대한 BLAST 검색은 서열 매치를 생성시키는 상위 5개의 히트를 여과한다. 뉴클레오티드 서열은 총 6개의 프레임으로 번역되고, 데이터베이스 서열의 매치 세그먼트에 정지 코돈을 갖지 않는 프레임은 잠재적인 히트로 간주된다. 이것은 다시, 총 6개의 프레임에서 항체 서열을 번역하고, 이들 번역물을 총 6개의 프레임에서 동력학적으로 번역된 VBASE 뉴클레오티드 서열과 비교하는 BLAST 프로그램 tblastx를 사용하여 확인된다. 다른 인간 생식계열 서열 데이터베이스, 예를 들어 IMGT (<http://imgt.cines.fr>)로부터 이용가능한 데이터베이스를 상기한 VBASE와 유사하게 검색할 수 있다.



- [0276] 동일성은 서열의 전체 길이에 걸쳐 단백질 데이터베이스와 항체 서열 사이의 정확한 아미노산 매치이다. 양성 (동일성 + 치환 매치)은 블로섬62 치환 매트릭스에 의해서 유도된 동일하지 않은 아미노산 치환이다. 항체 서열이 2개의 데이터베이스 서열과 같은 동일성으로 매치될 경우에는, 가장 양성인 히트가 매치되는 서열 히트인 것으로 결정될 것이다.
- [0277] 본 발명의 항체에 사용하기 위한 바람직한 프레임워크 서열은 본 발명의 선택된 항체에 의해 사용되는 프레임워크 서열과 구조상 유사한 것, 예를 들어, 본 발명의 바람직한 모노클로날 항체에 의해 사용되는  $V_H$  3-30.3 프레임워크 서열 (서열 51) 및/또는  $V_H$  DP44 프레임워크 서열 (서열 52) 및/또는  $V_H$  3-33 프레임워크 서열 (서열 53) 및/또는  $V_K$  L15 프레임워크 서열 (서열 54) 및/또는  $V_K$  A10 프레임워크 서열 (서열 55) 및/또는  $V_K$  L15 프레임워크 서열 (서열 54) 및/또는  $V_K$  A27 프레임워크 서열 (서열 56) 및/또는  $V_K$  L15 프레임워크 서열 (서열 54) 및/또는  $V_K$  L6 프레임워크 서열 (서열 57)과 유사한 것이다.  $V_H$  CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및  $V_K$  CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열은 그로부터 프레임워크 서열이 유도되는 생식계열 면역글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 서열을 갖는 프레임워크 구역 상에 그래프팅될 수 있거나, CDR 서열은 생식계열 서열에 비하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 프레임워크 구역 상에 그래프팅될 수 있다. 예를 들어, 특정 경우에는 항체의 항원 결합능을 유지하거나 증진시키기 위하여 프레임워크 구역 내에서 잔기를 돌연변이시키는 것이 유리하다고 밝혀졌다 (예를 들어, 미국 특허 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 (Queen et al.) 참조).
- [0278] 또다른 유형의 가변 구역 변형은  $V_H$  및/또는  $V_K$  CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 구역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 관심있는 항체의 하나 이상의 결합 특성 (예를 들어, 친화도)을 개선하기 위한 것이다. 부위-지정 돌연변이 유발 또는 PCR-매개 돌연변이 유발은 돌연변이(들)를 도입하기 위해 수행될 수 있고, 항체 결합에 대한 효과, 또는 관심있는 다른 기능적 특성은 본원에 기술되어 있는 것과 같이, 그리고 실시예에서 제공되는 것과 같이 시험관 내 또는 생체 내 분석으로 평가될 수 있다. 바람직하게는, (상기 논의되어 있는 바와 같은) 보존적 변형이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 부가 또는 결실일 수 있지만, 치환이 바람직하다. 또한, 일반적으로 CDR 구역 내에서 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 잔기가 변경된다.
- [0279] 따라서, 다른 실시태양에서, 본 발명은 (a) 서열 11, 12, 13 및 14로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 11, 12, 13 및 14와 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$  CDR1 구역; (b) 서열 15, 16, 17 및 18로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 15, 16, 17 및 18과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$  CDR2 구역; (c) 서열 19, 20, 21 및 22로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 19, 20, 21 및 22와 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$  CDR3 구역; (d) 서열 23, 24, 25, 26, 27 및 28로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 23, 24, 25, 26, 27 및 28과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는  $V_K$  CDR1 구역; (e) 서열 29, 30, 31, 32, 33 및 34로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 29, 30, 31, 32, 33 및 34와 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는  $V_K$  CDR2 구역; 및 (f) 서열 35, 36, 37, 38, 39 및 40으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 35, 36, 37, 38, 39 및 40과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는  $V_K$  CDR3 구역을 포함하는 중쇄 가변 구역을 포함하는, 단리된 항-PTK7 모노클로날 항체, 또는 그의 항원 결합부를 제공한다.
- [0280] 본 발명의 조작된 항체는  $V_H$  및/또는  $V_K$  내의 프레임워크 잔기를 변형시켜, 예를 들어 항체의 특성을 개선하는 것을 포함한다. 일반적으로, 이러한 프레임워크 변형은 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 이루어진다. 예를 들어, 한가지 방법은 하나 이상의 프레임워크 잔기를 상응하는 생식계열 서열로 "복귀 돌연변이 (backmutation)"시키는 것이다. 보다 구체적으로, 체세포 돌연변이를 거친 항체는 항체가 그로부터 유도되는 생식계열 서열과 상이한 프레임워크 잔기를 함유할 수 있다. 이러한 잔기는 항체 프레임워크 서열을 항체가 그로부터 유도되는 생식계열 서열과 비교함으로써 확인될 수 있다.
- [0281] 예를 들어, 3G8 (및 3G8a)의 경우,  $V_H$ 의 28번 아미노산 잔기 (FR1 내의)는 이소류신인 반면, 상응하는  $V_H$  3-30.3 생식계열 서열에서의 잔기는 트레오닌이다. 프레임워크 구역 서열을 그들의 생식계열 입체형태로 복귀시

키기 위해서, 체세포 돌연변이는 예를 들어 부위-지정 돌연변이 유발 또는 PCR-매개 돌연변이 유발에 의해 생식 계열 서열로 "복귀 돌연변이"될 수 있다 (예를 들어, 3G8 (및 3G8a)의  $V_H$ 의 FR1의 28번 잔기는 이소류신으로부터 트레오닌으로 "복귀 돌연변이"될 수 있다).

[0282] 또다른 예로서, 12C6 (및 12C6a)의 경우,  $V_H$ 의 (FR2 내의) 44번 아미노산 잔기는 트레오닌인 반면, 상응하는  $V_H$  DP44 생식계열 서열에서의 잔기는 글라이신이다. 프레임워크 구역 서열을 그들의 생식계열 입체형태로 복귀시키기 위해서, 예를 들어, 12C6 (및 12C6a)의  $V_H$ 의 44번 잔기 (FR2의 9번 잔기)는 트레오닌으로부터 글라이신으로 "복귀 돌연변이"될 수 있다. 그러한 "복귀 돌연변이된" 항체도 본 발명에 포함되는 것이다.

[0283] 또다른 유형의 프레임워크 변형은 프레임워크 구역 내의, 또는 심지어 하나 이상의 CDR 구역 내의 하나 이상의 잔기를 돌연변이시켜 T 세포 에피토프를 제거함으로써 항체의 잠재적인 면역원성을 감소시키는 것을 수반한다. 이러한 방법도 "탈면역화 (deimmunization)"로 불리며, 미국 특허 공개 번호 20030153043 (Carr et al.)에 추가로 상세하게 설명되어 있다.

[0284] 프레임워크 또는 CDR 구역 내에서 이루어진 변형에 추가로, 또는 그에 대한 대안으로, 본 발명의 항체는 일반적으로 예를 들어, 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존성 세포성 세포독성과 같은 항체의 하나 이상의 기능적 특성을 변경하기 위하여 Fc 구역 내에 변형을 포함하도록 조작될 수 있다. 추가로, 본 발명의 항체는 화학적으로 변형될 수 있거나 (예를 들어, 하나 이상의 화학적 모이어티를 항체에 부착시킬 수 있다), 그의 글리코실화를 변경시키고, 다시 항체의 하나 이상의 기능적 특성을 변경시키기 위하여 변형될 수 있다. 각각의 상기 실시태양은 아래에 보다 상세하게 설명된다. Fc 구역에서 잔기의 넘버링은 카바트의 EU 인덱스의 것이다.

[0285] 하나의 실시태양에서, CH1의 힌지 구역이 변형되어 힌지 구역 내의 시스테인 잔기의 수가 변경, 예를 들어, 증가 또는 감소된다. 이러한 방법에 관하여는 미국 특허 5,677,425 (Bodmer et al.)에 보다 상세히 설명되어 있다. CH1의 힌지 구역 내의 시스테인 잔기의 수는 예를 들어 경쇄 또는 중쇄의 조립을 촉진하거나, 항체의 안정성을 증가 또는 감소시키도록 변경된다.

[0286] 다른 실시태양에서, 항체의 Fc 힌지 구역은 돌연변이되어 항체의 생물학적 반감기를 감소시킬 수 있다. 보다 구체적으로, 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 Fc-힌지 단편의 CH2-CH3 도메인 계면 구역에 도입되어, 항체는 천연 Fc-힌지 도메인 스태필로코커스 단백질 A (SpA) 결합에 비하여 손상된 SpA 결합을 보이게 된다. 이러한 방법은 미국 특허 6,165,745 (Ward et al.)에 추가로 상세하게 설명되어 있다.

[0287] 다른 실시태양에서, 항체는 변형되어 그의 생물학적 반감기가 증가할 수 있다. 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 6,277,375 (Ward et al.)에 설명되어 있는 바와 같이, 다음 돌연변이 중 하나 이상이 도입될 수 있다: T252L, T254S, T256F. 별법으로, 생물학적 반감기를 증가시키기 위해서, 항체는 미국 특허 5,869,046 및 6,121,022 (Presta et al.)에 기재되어 있는 바와 같이, IgG의 Fc 구역의 CH2 도메인의 2개의 루프로부터 유도된 샬비지 (salvage) 수용체 결합 에피토프를 함유하도록 CH1 또는 CL 부위 내에서 변형될 수 있다.

[0288] 또다른 실시태양에서, Fc 구역은 하나 이상의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체하여 항체의 효과기 기능(들)을 변경시킴으로써 변경된다. 예를 들어, 항체가 효과기 리간드에 대한 친화도는 변경되지만 모 항체의 항원 결합능은 보유하도록, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322 중에서 선택되는 하나 이상의 아미노산이 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 그에 대한 친화도가 변경된 효과기 리간드는 예를 들어 Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이러한 방법은 미국 특허 5,624,821 및 5,648,260 (둘 모두 Winter et al.)에 추가로 상세하게 설명되어 있다.

[0289] 또다른 예에서, 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소되거나 제거된 보체 의존 세포독성 (CDC)을 갖도록 아미노산 잔기 329, 331 및 322 중에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 상이한 아미노산 잔기로 대체시킬 수 있다. 이러한 방법은 미국 특허 6,194,551 (Idusogie et al.)에 추가로 상세하게 설명되어 있다.

[0290] 또다른 예에서, 아미노산 위치 231 및 239 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경시킴으로써 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경시킬 수 있다. 이러한 방법은 PCT 공개 W094/29351 (Bodmer et al.)에 추가로 상세하게 설명되어 있다.

[0291] 추가의 또다른 예에서, Fc 구역은 항체가 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 매개하는 능력을 증가시키고/시키거나, 다음 위치의 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 Fc  $\gamma$  수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시키



도록 변형될 수 있다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439. 이러한 방법은 PCT 공보 WO 00/42072 (Presta)에 추가로 상세하게 설명되어 있다. 게다가, 인간 IgG1 상의 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII 및 FcRn에 대한 결합 위치는 이미 매핑되어 있으며, 결합이 개선된 변이체가 문헌에 기재되어 있다 ([Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604] 참조). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339에서 발생한 특이적 돌연변이는 Fc $\gamma$ RIII에 대한 결합을 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 추가로, 다음 조합 돌연변이체는 Fc $\gamma$ RIII 결합을 개선시키는 것으로 밝혀졌다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

[0292] 또다른 실시태양에서, 본 발명의 항체의 C-말단 단부는 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 가출원 60/957,271에 설명된 바와 같이 시스테인 잔기의 도입에 의해 변형된다. 상기 변형은 전장 중쇄 서열의 C-말단에서 또는 그 근처에서 기존 아미노산 잔기의 치환, 및 전장 중쇄 서열의 C-말단에 대한 시스테인-함유 연장부의 도입을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 바람직한 실시태양에서, 시스테인-함유 연장부는 서열 알라닌-알라닌-시스테인을 포함한다 (N-말단에서 C-말단으로).

[0293] 바람직한 실시태양에서, 그러한 C-말단 시스테인 변형의 존재는 파트너 분자, 예를 들어 치료제 또는 마커 분자의 컨쥬게이션을 위한 위치를 제공한다. 특히, C-말단 시스테인 변형에 의한 반응성 티올기는 아래에서 상세히 설명되는 디설피드 링커를 사용하여 파트너 분자를 컨쥬게이팅하기 위해 사용될 수 있다. 상기 방식으로 항체를 파트너 분자에 컨쥬게이팅하면, 특정 부착 부위에 대한 조절력이 증가할 수 있다. 또한, C-말단에 또는 그 근처에 부착 부위를 도입함으로써, 항체의 기능적 특성의 방해를 감소시키거나 제거하고 컨쥬게이트 제조에 대한 간단한 분석 및 품질 제어가 가능하도록 컨쥬게이션을 최적화할 수 있다.

[0294] 또다른 실시태양에서, 항체의 글리코실화가 변형된다. 예를 들어, 비글리코실화된 항체 (즉, 글리코실화가 일어나지 않는 항체)가 생산될 수 있다. 글리코실화는 예를 들어 항원에 대한 항체의 친화도가 증가하도록 변경될 수 있다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어 항체 서열 내의 하나 이상의 글리코실화 위치를 변경시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 구역 프레임워크 글리코실화 위치를 제거하여 이 위치에서 글리코실화가 일어나지 않도록 만드는 하나 이상의 아미노산 치환이 일어날 수 있다. 이러한 비글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 이러한 방법은 미국 특허 5,714,350 및 6,350,861 (Co et al.)에 추가로 상세하게 설명되어 있다. 글리코실화 변경을 위한 추가의 방법은 각각 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 7,214,775 (Hanai et al.), 미국 특허 6,737,056 (Presta), 미국 특허 공개 20070020260 (Presta), PCT 공개 WO/2007/084926 (Dickey et al.), PCT 공개 WO/2006/089294 (Zhu et al.), 및 PCT 공개 WO/2007/055916 (Ravetch et al.)에 추가로 상세하게 설명되어 있다.

[0295] 추가로 또는 별법으로, 글리코실화 유형이 변경된 항체, 예를 들어, 푸코실 잔기 수가 감소된 저푸코실화 항체 또는 이분화 GlcNAc 구조가 증가한 항체가 생산될 수 있다. 이와 같이 변경된 글리코실화 패턴이 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증된 바 있다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어, 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포 내에서 항체를 발현시킴으로써 이루어질 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 당업계에 기술되어 있으며, 본 발명의 재조합 항체를 발현시켜 글리코실화가 변경된 항체를 생산하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포주 Ms704, Ms705 및 Ms709는 푸코실트랜스퍼라제 유전자인 FUT8 (알파 (1,6) 푸코실트랜스퍼라제)이 결여되어 있어서, Ms704, Ms705 및 Ms709 세포주에서 발현된 항체의 탄수화물에 푸코스가 존재하지 않는다. Ms704, Ms705 및 Ms709 FUT8<sup>-/-</sup> 세포주는 2개의 대체 벡터를 사용하여 CHO/DG44 세포 내의 FUT8 유전자를 표적 파괴하여 생산되었다 (미국 특허 공개 20040110704 (Yamane et al.) 및 [Yamane-Ohnuki et al.(2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22] 참조). 또다른 예로서, EP 1,176,195 (Hanai et al.)에는 FUT8 유전자가 기능상 봉쇄된 세포주가 설명되어 있고, 상기 유전자는 푸코실트랜스퍼라제를 코딩하며, 이러한 세포주에서 발현된 항체는 알파 1,6 결합-관련 효소를 감소시키거나 제거하여 저푸코실화된다. 문헌 (Hanai et al.)에는 항체의 Fc 구역에 결합하는 N-아세틸글루코사민에 푸코스를 부가하는 효소 활성이 낮은 세포주, 또는 효소 활성을 갖지 않는 세포주, 예를 들어, 래트 골수종 세포주 YB2/0 (ATCC CRL 1662)이 기재되어 있다. PCT 공개 WO 03/035835 (Presta)에는 푸코스를 Asn(297)-연결 탄수화물에 부착시키는 능력이 감소되고, 또한 이 숙주 세포에서 발현된 항체를 저푸코실화시키는 변이체 CHO 세포주인 Lec13 세포가 기재되어 있다 (또한, 문헌 [Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740] 참조). PCT 공개 WO 99/54342 (Umana et al.)에는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제 (예를 들어, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 세포주를 조작하여, 조작된 세포주 내에서 발현된 항체의 이분화 GlcNAc 구조가 증가하

도록 만들고, 이에 의해 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 것이 기재되어 있다 (또한, 문헌 [Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180] 참조). 별법으로, 항체의 푸코스 잔기는 푸코시다제 효소를 사용하여 절단 제거할 수 있다. 예를 들어, 푸코시다제 알파-L-푸코시다제는 항체로부터 푸코실 잔기를 제거한다 [Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23].

[0296] 추가로 또는 별법으로, 글리코실화 유형이 변경된 항체를 제조할 수 있고, 이 변경은 항체의 시알릴화 수준에 관련된다. 상기 변경은 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 PCT 공개 WO/2007/084926 (Dickey et al), 및 PCT 공개 WO/2007/055916 (Ravetch et al)에 설명되어 있다. 예를 들어, 아르트로박터 우레아파센스 (*Arthrobacter ureafacens*) 시알리다제와 같은 시알리다제를 사용한 효소 반응을 이용할 수 있다. 상기 반응의 조건은 일반적으로 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 5,831,077에 설명되어 있다. 적합한 효소의 다른 비-제한적인 예는 각각 문헌 ([Schloemer et al., J. Virology, 15(4), 882-893 (1975)] 및 [Leibiger et al., Biochem J., 338, 529-538 (1999)]에 설명된 바와 같은 뉴라미니다제 및 N-글리코시다제 F이다. 탈시알릴화된 항체는 친화도 크로마토그래피에 의해 추가로 정제될 수 있다. 별법으로, 예를 들어 시알릴트랜스퍼라제 효소를 사용하여 시알릴화 수준을 증가시키는 방법을 이용할 수 있다. 상기 반응의 조건은 일반적으로 문헌 [Basset et al., Scandinavian Journal of Immunology, 51(3), 307-311 (2000)]에 설명되어 있다.

[0297] 본 발명에 의해 고려되는 본원의 항체의 다른 변형으로서는 페길화 (pegylation)가 있다. 항체는 페길화되어, 예를 들어 항체의 생물학적 (예를 들어, 혈청) 반감기를 증가시킬 수 있다. 항체를 페길화하기 위해, 일반적으로 항체 또는 그의 단편을, 하나 이상의 PEG 기가 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건 하에서 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 예를 들어 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 반응시킨다. 바람직하게는, 페길화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질을 유도체화하기 위해 사용되는 임의의 형태의 PEG, 예를 들어 모노 (C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 포함하는 의미이다. 특정 실시태양에서, 페길화되는 항체는 비리코실화된 항체이다. 단백질을 페길화하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 항체에 적용할 수 있다. 예를 들어, EP 0 154 316 (Nishimura et al.) 및 EP 0 401 384 (Ishikawa et al.)를 참조한다.

[0298] 항체 단편 및 항체 모방체

[0299] 본원에 개시되는 본 발명은 항원 결합 성분으로서 전통적인 항체로 제한되지 않고, 항체 단편 및 항체 모방체를 사용하여 실시될 수 있다. 매우 다양한 항체 단편 및 항체 모방체 기술이 현재 개발되어 있고, 당업계에 널리 알려져 있다.

[0300] 도메인 항체 (dAb)는 항체의 최소 기능적 결합 단위 (분자량 약 13 kDa)이고, 항체의 중쇄 (VH) 또는 경쇄 (VL)의 가변 구역에 대응한다. 도메인 항체 및 그들의 생산 방법에 대한 추가의 상세한 내용은 그 각각의 전문이 본원에 참고로 포함되는 US 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 및 6,696,245; US 2004/0110941; EP 1433846, 0368684 및 0616640; WO 2005/035572, 2004/101790, 2004/081026, 2004/058821, 2004/003019 및 2003/002609에서 발견된다.

[0301] 나노바디는 천연 발생 중쇄 항체의 특유한 구조적 및 기능적 특성을 갖는 항체-유래 단백질이다. 이들 중쇄 항체는 단일 가변 도메인 (VHH) 및 2개의 불변 도메인 (CH2 및 CH3)을 함유한다. 중요하게는, 클로닝되고 단리된 VHH 도메인은 원래의 중쇄 항체의 전체 항원 결합 능력을 갖는 안정한 폴리펩티드이다. 나노바디는 인간 항체의 VH 도메인과 높은 상동성을 갖고, 임의의 활성 손실 없이 추가로 인간화될 수 있다. 중요하게는, 나노바디는 낮은 면역원성 잠재성을 갖는다.

[0302] 나노바디는 통상적인 항체의 잇점을 소분자 약물의 중요한 특징과 조합한다. 통상적인 항체와 같이, 나노바디는 높은 표적 특이성과 친화도 및 낮은 고유 독성을 보인다. 또한, 나노바디는 극히 안정하고, 주사 이외의 수단으로 의해 투여할 수 있고 (예를 들어, WO 2004/041867 참조), 제조가 용이하다. 나노바디의 다른 잇점은 그들의 작은 크기의 결과로서 드물거나 숨겨진 에피토프를 인식하는 것, 그들의 특유한 3차원 구조로 인해 단백질 표적의 캐비티 (cavity) 또는 활성 부위에 높은 친화도 및 선택성으로 결합하는 것, 약물 포맷 유연성, 반감기의 맞춤형 및 약물 발견의 용이함 및 속도를 포함한다.

[0303] 나노바디는 단일 유전자에 의해 코딩되고, 거의 모든 원핵생물 및 진핵생물 숙주, 예를 들어, 이. 콜라이 (*E. coli*) (예를 들어, 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 US 6,765,087 참조), 곰팡이 (예를 들어 아스페르길러스 (*Aspergillus*) 또는 트리코더마 (*Trichoderma*)) 및 효모 (예를 들어 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 클루이

베로마이세스 (*Kluyveromyces*), 한세누라 (*Hansenula*) 또는 피치아 (*Pichia*))에서 효율적으로 생산된다 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 US 6,838,254 참조).

- [0304] 나노클론 (nanoclone) 방법 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 WO 06/079372 참조)으로 B-세포의 자동화 고출력 (high-throughout) 선택을 기초로 하여 목적하는 표적에 대한 나노바디를 생성하고, 본 발명의 문맥에서 사용할 수 있다.
- [0305] 유니바디 (UniBody)는 IgG4 항체의 힌지 구역의 제거에 기초하는 또다른 항체 단편 기술이다. 힌지 구역의 결실은 본질적으로 전통적인 IgG4 항체 크기의 절반인 분자를 생성시키고, 2가 결합 구역보다는 일가 결합 구역을 가진다. 또한, 유니바디는 보다 작기 때문에, 보다 큰 고형 종양 위로 보다 우수한 분포를 보일 수 있고, 잠재적으로 유리한 효능을 가진다. 유니바디에 대한 추가의 상세한 내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 WO 2007/059782를 참조하여 얻을 수 있다.
- [0306] 아피바디 분자는 스타필로코커스 단백질 A의 3중 나선 다발 IgG-결합 도메인으로부터 유래된 58개 아미노산 잔기의 단백질 도메인에 기초하는 친화도 단백질이다. 상기 도메인은 조합 파지미드 라이브러리의 구성을 위한 스캐폴드 (scaffold)로서 사용되었고, 파지 디스플레이 기술을 이용하여 상기 조합 파지미드 라이브러리로부터 목적하는 분자를 표적으로 하는 아피바디 변이체를 선택할 수 있다 ([Nord et al., Nat Biotechnol 1997;15:772-7]; [Ronmark et al., Eur J Biochem 2002;269:2647-55]). 아피바디 분자의 단순하고 강건한 구조 및 저분자량 (6 kDa)으로 인해 이들은 매우 다양한 용도에, 예를 들어 검출 시약 및 수용체 상호작용의 억제제에 적합하다. 아피바디에 관한 추가의 상세한 내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 US 5,831,012에서 발견된다. 표지된 아피바디는 이소형의 풍부도를 결정하기 위한 영상 용도에서 또한 유용할 수 있다.
- [0307] DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein)은 비-항체 폴리펩티드의 결합 능력을 이용하는 DRP (Designed Repeat Protein) 항체 모방체 기술을 구현한다. 반복 단백질, 예를 들어 안키린 및 류신-풍부 반복 단백질은 항체와는 달리 세포 내에서 및 세포 외에서 발생하는 편재성 결합 분자이다. 그들의 특유한 모듈형 구조는, 함께 쌓여서 가변적인 모듈형 표적 결합 표면을 나타내는 긴 반복 도메인을 형성하는 반복 구조 단위 (반복부)를 특징으로 한다. 상기 모듈 형태를 기초로 하여, 고도로 다양화된 결합 특이성을 갖는 폴리펩티드의 조합 라이브러리를 생성할 수 있다. 상기 전략은 가변적인 표면 잔기를 나타내는 자가-적합성 반복부의 컨센서스 디자인, 및 반복 도메인으로의 그들의 무작위 조립을 포함한다. DARPin 및 다른 DRP 기술에 관한 추가의 정보는 둘 모두 본원에 참고로 포함되는 US 2004/0132028 및 WO 02/20565에서 찾을 수 있다.
- [0308] 안티칼린은 또다른 항체 모방체 기술이다. 이 경우에, 결합 특이성은 리포칼린 (인간 조직 및 체액 내에서 천연으로 풍부하게 발견되는 저분자량 단백질의 패밀리)으로부터 유래한다. 리포칼린은 화학적으로 민감성이거나 불용성 화합물의 생리학적 수송 및 저장과 연관된 넓은 범위의 생체 내 기능을 수행하도록 진화되었다. 리포칼린은 단백질의 하나의 말단에서 4개의 루프를 지지하는 고도로 보존된  $\beta$ -배럴 (barrel)을 포함하는 강건한 고유 구조를 갖는다. 이들 루프는 결합 포켓 (pocket)에 대한 입구를 형성하고, 분자의 상기 부분에서 입체형태 차이가 개별 리포칼린들 사이의 결합 특이성 변이의 원인이다.
- [0309] 보존된  $\beta$ -시트 프레임워크에 의해 지지된 초가변 루프의 전체 구조는 면역글로불린을 연상시키지만, 리포칼린은 크기 면에서 항체와 상당히 상이하여, 160-180개 아미노산의 단일 폴리펩티드 사슬로 구성되고, 이는 단일 면역글로불린 도메인보다 근소하게 더 크다.
- [0310] 리포칼린은 클로닝되고, 그들의 루프는 조작되어 안티칼린을 생성할 수 있다. 구조상 다양한 안티칼린의 라이브러리가 생성되었고, 안티칼린 디스플레이는 결합 기능의 선택 및 스크리닝을 허용하고, 이후, 원핵생물 또는 진핵생물 시스템에서 추가의 분석을 위한 가용형 단백질의 발현 및 생산이 가능하다. 연구에서는 실질적으로 임의의 인간 표적 단백질에 특이적인 안티칼린이 개발될 수 있고, 나노물 또는 그 이상의 범위의 결합 친화도가 얻어질 수 있음이 입증되었다. 안티칼린에 관한 추가의 정보는 둘 모두 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 US 7,250,297 및 WO 99/16873에서 찾을 수 있다.
- [0311] 아비머는 본 발명의 문맥에서 유용한 또다른 종류의 항체 모방체 기술이다. 아비머는 결합 및 억제 특성을 가진 다수도메인 단백질을 생성하는, 시험관내 엑손 셔플링 (shuffling) 및 파지 디스플레이에 의해 큰 패밀리의 인간 세포의 수용체 도메인으로부터 진화된다. 다수의 독립적인 결합 도메인들을 연결하면 결합력을 생성하는 것으로 나타났고, 통상적인 단일-에피토프 결합 단백질에 비해 개선된 친화도 및 특이성을 생성시킨다. 다른 잠재적인 잇점은 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*) 내에서 다수표적-특이적 분자의 간단하고 효율적인 생산, 개선된 열안정성 및 프로테아제에 대한 내성을 포함한다. 다양한 표적에 대해 나노물 단위 미만의 친화

도를 갖는 아비머가 얻어졌다. 아비머에 관한 추가의 정보는 모두 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 US 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756에서 찾을 수 있다.

[0312] 베르사바디는 본 발명의 측면에서 사용될 수 있는 또다른 항체 모방체 기술이다. 베르사바디는 15% 초과인 시스테인을 갖는 3-5 kDa의 작은 단백질이고, 일반적인 단백질이 갖는 소수성 코어를 대체하는 높은 디설피드 밀도의 스캐폴드를 형성한다. 이러한 대체에 의해, MHC 제시에 가장 크게 기여하는 잔기가 소수성이기 때문에, 보다 작고, 보다 친수성이며 (즉, 응집 및 비-특이적 결합의 경향이 작고), 프로테아제 및 열에 보다 저항성이고, 보다 저밀도의 T-세포 에피토프를 갖는 단백질이 생성된다. 이들 특성은 면역원성에 영향을 주는 것으로 알려져 있고, 이들 특성은 함께 면역원성을 크게 감소시키는 것으로 예상된다.

[0313] 베르사바디의 구조를 고려할 때, 이들 항체 모방체는 다가, 다중-특이성, 반감기 메카니즘의 다양성, 조직 표적화 모듈, 및 항체 Fc 구역의 부재를 포함하는 다용도 포맷을 제공한다. 또한, 베르사바디는 이. 콜라이 내에서 고수율로 제조되고, 그들의 친수도 및 작은 크기 때문에, 베르사바디는 고도로 가용성이고, 고농도로 제형화될 수 있다. 베르사바디는 특별히 열 안정성이고, 연장된 저장 수명을 제공한다. 베르사바디에 관한 추가의 정보는 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 US 2007/0191272에서 찾을 수 있다.

[0314] 항체 단편 및 모방체 기술의 상기 설명은 포괄적인 것으로 의도되지 않는다. 문헌 [Qui et al., Nature Biotechnology, 25(8) 921-929 (2007)]에 개략된 상보성 결정 구역의 융합과 같은 대체적인 폴리펩티드-기반 기술, 및 모두 본원에 참고로 포함되는 US 5,789,157; 5,864,026; 5,712,375; 5,763,566; 6,013,443; 6,376,474; 6,613,526; 6,114,120; 6,261,774; 및 6,387,620에 기재되어 있는 RNA 앵타머 (aptamer) 기술과 같은 핵산-기반 기술을 포함한 다양한 추가의 기술이 본 발명의 측면에서 사용될 수 있을 것이다.

[0315] 항체 물리적 특성

[0316] 본 발명에서 사용되는 항체는 다양한 물리적 특성을 특징으로 할 수 있다.

[0317] 항체는  $V_L$  또는  $V_H$  내에 하나 이상의 글리코실화를 함유할 수 있고, 이에 의해 면역원성이 증가하거나 pK가 변경될 수 있다 ([Marshall et al. (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702]; [Gala and Morrison (2004) J Immunol 172:5489-94]; [Wallick et al., (1988) J Exp Med 168:1099-109]; [Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R]; [Parekh et al., (1985) Nature 316:452-7]; [Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706]). 글리코실화는 N-X-S/T 서열을 함유하는 모티프에서 일어나는 것으로 알려져 있다. 가변 구역 글리코실화는 항체를 절단하여 Fab를 생성시킨 후, 과요오드산염 산화 및 슈프 (Schiff) 염기 형성을 측정하는 분석을 사용하여 글리코실화에 대해 시험하는 글리코블롯 (Glycoblots) 분석을 사용하여 시험할 수 있다. 별법으로, 가변 구역 글리코실화는 Fab로부터의 당류를 단당류로 절단하고, 개별 당류 함량을 분석하는 디오넥스 광 크로마토그래피 (Dionex-LC)를 사용하여 시험할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 가변 구역 글리코실화를 함유하지 않는 항-항체를 갖는 것이 바람직하다. 이것은 가변 구역 내에 글리코실화 모티프를 함유하지 않는 항체를 선택하거나, 표준 기술을 사용하여 글리코실화 모티프 내의 잔기를 돌연변이시킴으로써 달성할 수 있다.

[0318] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 아스파라긴 이성체화 위치를 함유하지 않는다. 아스파라긴의 탈아미드화는 N-G 또는 D-G 서열 상에서 나타날 수 있고, 폴리펩티드 사슬 내에 꼬인 구조 (kink)를 도입하고 그의 안정성을 감소시키는 이소아스파르트산 잔기를 생성한다 (이소아스파르트산 효과). 이소아스파르트산의 존재는 역상 HPLC 시험을 사용하여 측정할 수 있다 (이소-퀀트 (iso-quant) 분석).

[0319] 각각의 항체는 특유한 등전점 (pI)을 가질 것이고, 일반적으로 항체는 6 내지 9.5의 pH 범위에 해당한다. IgG1 항체에 대한 pI는 일반적으로 7-9.5의 pH 범위에 해당하고, IgG4 항체에 대한 pI는 전형적으로 6-8의 pH 범위에 해당한다. 정상 범위를 벗어난 pI를 갖는 항체는 생체내 조건 하에 약간의 언폴딩 (unfolding) 및 불안정성을 가질 수 있는 것으로 추측된다. 따라서, 정상 범위에 해당하는 pI 값을 갖는 항-PTK7 항체를 갖는 것이 바람직하다. 이것은 정상 범위 내의 pI를 갖는 항체를 선택하거나, 하전된 표면 잔기를 돌연변이시킴으로써 달성할 수 있다.

[0320] 각각의 항체는 특징적인 용점을 가질 것이고, 여기서 보다 높은 용점은 생체 내에서 보다 큰 전체 안정성을 나타낸다 (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71). 일반적으로,  $T_m$  (초기 언폴딩 온도)이 60°C를 초과하는, 바람직하게는 65°C를 초과하는, 훨씬 더 바람직하게는 70°C를 초과하는 것이 바람직하다. 항체의 용점은 시차 주사 열량분석법 ([Chen et al (2003) Pharm Res 20: 1952-60]; [Ghirlando



et al (1999) Immunol Lett 68:47-52]) 또는 원편광 이색성 (circular dichroism) (Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9)을 이용하여 측정할 수 있다.

[0321] 바람직한 실시태양에서, 빠르게 분해하지 않는 항체가 선택된다. 항체의 단편화는 당업계에서 잘 이해되는 바와 같이 모세관 전기영동 (CE) 및 MALDI-MS를 이용하여 측정할 수 있다 (Alexander AJ and Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32).

[0322] 또다른 바람직한 실시태양에서, 원치않는 면역 반응 및/또는 변경되거나 불리한 약동학적 특성을 촉발할 수 있는 응집 효과가 최소인 항체가 선택된다. 일반적으로, 응집이 25% 이하, 바람직하게는 20% 이하, 훨씬 더 바람직하게는 15% 이하, 훨씬 더 바람직하게는 10% 이하, 훨씬 더 바람직하게는 5% 이하인 항체가 허용된다. 응집은 크기 배제 컬럼 (SEC), 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 및 광 산란을 포함한 몇 가지 기술에 의해 측정할 수 있다.

[0323] 항체의 조작 방법

[0324] 상기 논의한 바와 같이, 본원에 개시되는  $V_H$  및  $V_K$  서열을 갖는 항-PTK7 항체는  $V_H$  및/또는  $V_K$  서열, 또는 그에 부착된 불변 구역(들)을 변형시킴으로써 새로운 항-PTK7 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 또다른 측면에서, 본 발명의 항-PTK7 항체, 예를 들어 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8의 구조 특징은 인간 PTK7에 대한 결합과 같은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 기능적 특성을 보유하는 구조상 관련된 항-PTK7 항체를 생성하기 위해 사용된다. 예를 들어, 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8, 또는 그의 돌연변이의 하나 이상의 CDR 구역은 공지의 프레임워크 구역 및/또는 다른 CDR과 재조합 방식으로 결합되어, 상기 논의한 바와 같이 추가의 재조합 방식으로 조작된 본 발명의 항-PTK7 항체를 생성할 수 있다. 다른 종류의 변형은 선행 섹션에 기재된 것을 포함한다. 조작 방법을 위한 출발 물질은 본원에서 제공되는 하나 이상의  $V_H$  및/또는  $V_K$  서열, 또는 그의 하나 이상의 CDR 구역이다. 조작된 항체를 생성하기 위해, 본원에서 제공되는 하나 이상의  $V_H$  및/또는  $V_K$  서열, 또는 그의 하나 이상의 CDR 구역을 갖는 항체를 실제로 제조하는 (즉, 단백질로서 발현하는) 것은 필요하지 않다. 대신에, 서열(들)에 함유된 정보는 원래의 서열(들)로부터 유래되는 "제2 세대" 서열(들)을 생성하기 위해 출발 물질로서 사용되고, 이어서 "제2 세대" 서열(들)이 제조되고 단백질로서 발현된다.

[0325] 따라서, 다른 실시태양에서, 본 발명은

[0326] (a) (i) 서열 11, 12, 13 및 14로 이루어지는 군 중에서 선택되는 CDR1 서열, 서열 15, 16, 17 및 18로 이루어지는 군 중에서 선택되는 CDR2 서열, 및/또는 서열 19, 20, 21 및 22로 이루어지는 군 중에서 선택되는 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 구역 항체 서열; 및/또는 (ii) 서열 23, 24, 25, 26, 27 및 28로 이루어지는 군 중에서 선택되는 CDR1 서열, 서열 29, 30, 31, 32, 33 및 34로 이루어지는 군 중에서 선택되는 CDR2 서열, 및/또는 서열 35, 36, 37, 38, 39 및 40으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 구역 항체 서열을 제공하고;

[0327] (b) 중쇄 가변 구역 항체 서열 및/또는 경쇄 가변 구역 항체 서열 내에서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변경시켜 적어도 하나의 변경된 항체 서열을 생성하고;

[0328] (c) 변경된 항체 서열을 단백질로서 발현하는 것

[0329] 을 포함하는, 항-PTK7 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0330] 변경된 항체 서열을 제조하고 발현시키기 위해 표준 분자 생물학 기술을 사용할 수 있다.

[0331] 바람직하게는, 변경된 항체 서열(들)에 의해 코딩된 항체는 본원에 기재되는 항-PTK7 항체의 기능적 특성 중 하나, 일부 또는 전부를 보유하는 것이고, 상기 기능적 특성은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0332] (a) 항체는  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 PTK7에 결합한다;

[0333] (b) 항체는 윌름스 종양 세포주에 결합한다.

[0334] 변경된 항체의 기능적 특성은 당업계에서 이용가능하고/하거나 본원에서 설명되는 표준 분석, 예를 들어 실시예에 기재된 것 (예를 들어, 유동 세포측정, 결합 분석)을 이용하여 평가할 수 있다.

[0335] 본 발명의 항체를 조작하는 방법의 특정 실시태양에서, 돌연변이는 항-PTK7 항체 코딩 서열의 전부 또는 일부를

따라서 무작위로 또는 선택적으로 도입될 수 있고, 생성되는 변형된 항-PTK7 항체는 결합 활성 및/또는 본원에 설명되는 다른 기능적 특성에 대해 스크리닝될 수 있다. 돌연변이 방법은 당업계에서 설명되어 있다. 예를 들어, PCT 공개 WO 02/092780 (Short)에서는 포화 돌연변이 유발, 합성 라이게이션 조립, 또는 그의 조합을 이용하여 항체 돌연변이를 생성하고 스크리닝하는 방법을 기재하고 있다. 별법으로, PCT 공개 WO 03/074679 (Lazar et al.)에서는 항체의 물리화학적 특성을 최적화하기 위해 컴퓨터 스크리닝 방법을 사용하는 방법을 기재하고 있다.

[0336] 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자

[0337] 본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 핵산은 전체 세포 내에, 세포 용해물 내에, 또는 부분적으로 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 알칼린/SDS 처리, CsCl 밴딩 (banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당업계에 잘 알려져 있는 다른 방법을 포함한 표준 기술에 의해 다른 세포성 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어, 다른 세포성 핵산 또는 단백질로부터 정제될 때 "단리되거나" 또는 "실질적으로 순수하게" 된다 ([F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York] 참조). 본 발명의 핵산은 예를 들어, DNA 또는 RNA일 수 있고, 인트론 서열을 함유할 수 있거나 함유하지 않을 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 cDNA 분자이다.

[0338] 본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마 (예를 들어, 아래에 더욱 설명하는 바와 같이 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현되는 항체에 대해, 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 얻을 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리로부터 얻어진 항체에 대해 (예를 들어, 파지 디스플레이 기술을 이용하여), 항체를 코딩하는 핵산은 라이브러리로부터 회수할 수 있다.

[0339] 본 발명의 바람직한 핵산 분자는 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 또는 7C8 모노클로날 항체의 VH 및 VL 서열을 코딩하는 것이다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의 VH 서열을 코딩하는 DNA 서열을 서열 41 (3G8 및 3G8a), 42 (4D5), 43 (12C6 및 12C6a) 및 44 (7C8)에 제시한다. 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의 VL 서열을 코딩하는 DNA 서열을 각각 서열 45, 46, 47, 48, 49 및 50에 제시한다.

[0340] 일단 VH 및 VL 세그먼트를 코딩하는 DNA 단편을 수득하면, 예를 들어, 가변 구역 유전자를 전장 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시키기 위해 이들 DNA 단편을 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작할 수 있다. 이들 조작에서, VL- 또는 VH-코딩 DNA 단편은 다른 단백질을 코딩하는 다른 DNA 단편, 예를 들어 항체 불변 구역 또는 가요성 링커에 작동가능하게 연결된다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 본 측면에서 사용될 때 2개의 DNA 단편들에 의해 코딩되는 아미노산 서열들이 인 프레임(in-frame)으로 유지되도록 2개의 DNA 단편들이 연결되는 것을 의미하도록 의도된다.

[0341] VH 구역을 코딩하는 단리된 DNA는 VH-코딩 DNA를 중쇄 불변 구역 (CH1, CH2 및 CH3)을 코딩하는 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결함으로써 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 구역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있고 (예를 들어, [Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조), 이들 구역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다. 중쇄 불변 구역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 구역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 구역이다. Fab 단편 중쇄 유전자에 대해, VH-코딩 DNA는 중쇄 CH1 불변 구역만을 코딩하는 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0342] VL 구역을 코딩하는 단리된 DNA는 VL-코딩 DNA를 경쇄 불변 구역 CL을 코딩하는 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결함으로써 전장 경쇄 유전자 (및 Fab 경쇄 유전자)로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 구역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있고 (예를 들어, [Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조), 이들 구역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다. 경쇄 불변 구역은 카파 또는 람다 불변 구역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 카파 불변 구역이다.

[0343] scFv 유전자를 생성하기 위해, VH- 및 VL-코딩 DNA 단편은 가요성 링커를 코딩하는, 예를 들어, 아미노산 서열 (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>을 코딩하는 다른 단편에 작동가능하게 연결되어, VH 및 VL 서열이 인접한 단일쇄 단백질로서 발현될 수 있고, 여기서 VL 및 VH 구역은 가요성 링커에 의해 연결된다 (예를 들어, [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).

[0344] 본 발명의 모노클로날 항체의 생산

[0345] 본 발명의 모노클로날 항체 (mAb)는 통상적인 모노클로날 항체 방법, 예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495]의 표준 체세포 혼성화 기술을 포함한 다양한 기술에 의해 생산할 수 있다. 체세포 혼성화 절차가 바람직하지만, 원칙적으로, 모노클로날 항체를 생산하기 위한 다른 기술, 예를 들어, B 림프구의 바이러스 또는 종양유전자 형질전환을 사용할 수 있다.

[0346] 하이브리도마를 제조하기 위해 바람직한 동물 시스템은 쥐 시스템이다. 마우스에서 하이브리도마 생산은 매우 잘 확립된 절차이다. 융합을 위한 면역화된 비장세포의 단리를 위한 면역화 프로토콜 및 기술은 당업계에 공지되어 있다. 융합 파트너 (예를 들어, 쥐 골수종 세포) 및 융합 절차도 또한 공지되어 있다.

[0347] 본 발명의 키메라 또는 인간화 항체는 상기 설명된 바와 같이 제조된 쥐 모노클로날 항체의 서열에 기초하여 제조할 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 DNA를 관심있는 쥐 하이브리도마로부터 얻고, 비-쥐 (예를 들어, 인간) 면역글로불린 서열을 함유하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 키메라 항체를 생성하기 위해, 쥐 가변 구역은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 인간 불변 구역에 연결될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 4,816,567 (Cabilly et al.) 참조). 인간화 항체를 생성하기 위해, 쥐 CDR 구역은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 인간 프레임워크 내로 삽입할 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 5,225,539 (Winter), 및 미국 특허 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 (Queen et al.) 참조).

[0348] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 모노클로날 항체이다. PTK7에 대해 작용하는 그러한 인간 모노클로날 항체는 마우스계보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스염색체 마우스를 사용하여 생성할 수 있다. 이들 트랜스제닉 및 트랜스염색체 마우스는 본원에서 각각 HuMAb 마우스 및 KM 마우스<sup>TM</sup>로 칭하는 마우스를 포함하고, 본원에서 "인간 Ig 마우스"로서 총칭한다.

[0349] HuMAb 마우스<sup>®</sup> (메다렉스, 인크. (Medarex, Inc.))는 내인성  $\mu$  및  $\kappa$  사슬 로커스를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께, 재정렬되지 않은 인간 중쇄 ( $\mu$  및  $\gamma$ ) 및  $\kappa$  경쇄 면역글로불린 서열을 코딩하는 인간 면역글로불린 유전자 미니로커스를 함유한다 (예를 들어, [Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859] 참조). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는  $\kappa$ 의 감소된 발현을 보이고, 면역화에 반응하여 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스진에 클래스 스위칭 (switching) 및 체세포 돌연변이를 거쳐 고친화도 인간 IgG $\kappa$  모노클로날 항체를 생성한다 ([Lonberg, N. et al. (1994), 상기 문헌]; [Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101]; [Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93] 및 [Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546]에서 검토됨). HuMAb 마우스의 제조 및 용도, 및 그러한 마우스가 보유하는 게놈 변형은 문헌 ([Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295]; [Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656]; [Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724]; [Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123]; [Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830]; [Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920]; [Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591]; 및 [Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851] (이 모두의 내용은 전체가 본원에 참고로 구체적으로 포함된다)에 추가로 설명된다. 추가로 미국 특허 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 및 5,770,429 (모두 Lonberg and Kay); 미국 특허 5,545,807 (Surani et al.); PCT 공개 WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 및 WO 99/45962 (모두 Lonberg and Kay); 및 PCT 공개 WO 01/14424 (Korman et al.)을 참조한다.

[0350] 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간 항체는 트랜스진 및 트랜스염색체 상에 인간 면역글로불린 서열을 보유하는 마우스, 예를 들어 인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스염색체를 보유하는 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 그러한 마우스 (본원에서 "KM 마우스<sup>TM</sup>"로서 칭함)는 PCT 공개 WO 02/43478 (Ishida et al.)에 상세히 기재되어 있다

[0351] 또한 추가로, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 트랜스제닉 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하고, 본 발명의 항-PTK7 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, Xenomouse (압제닉스 인크. (Abgenix, Inc.))로 언급되는 대안적 트랜스제닉 시스템을 사용할 수 있고; 그러한 마우스는 예를 들어, 미국 특허 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 및 6,162,963 (Kucherlapati et al.)에 기재되어 있다.

- [0352] 또한, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 트랜스염색체 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하고, 본 발명의 항-PTK7 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 트랜스염색체 및 인간 경쇄 트랜스염색체를 모두 보유하는 마우스 ("TC 마우스"로서 칭함)를 사용할 수 있고; 그러한 마우스는 문헌 [Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727]에 기재되어 있다. 또한, 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스염색체를 보유하는 소가 당업계에 설명되어 있고 (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894), 본 발명의 항-PTK7 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0353] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 인간 면역글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하기 위한 파지 디스플레이 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 인간 항체를 단리하기 위한 그러한 파지 디스플레이 방법은 당업계에 확립되어 있다 (예를 들어: 미국 특허 5,223,409; 5,403,484; 및 5,571,698 (Ladner et al.); 미국 특허 5,427,908 및 5,580,717 (Dower et al.); 미국 특허 5,969,108 및 6,172,197 (McCafferty et al.); 및 미국 특허 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 및 6,593,081 (Griffiths et al.) 참조).
- [0354] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 면역화 시에 인간 항체 반응이 일어날 수 있도록 인간 면역 세포를 그 내부로 재구성시킨 SCID 마우스를 사용하여 제조할 수 있다. 그러한 마우스 예를 들어 미국 특허 5,476,996 및 5,698,767 (Wilson et al.)에 기재되어 있다.
- [0355] 다른 실시태양에서, 인간 항-PTK7 항체는 미국 특허 6,794,132 (Buechler et al.)에 기재되어 있는 바와 같이 인간 Ig 마우스 및 파지 디스플레이 기술의 조합을 이용하여 제조된다. 보다 구체적으로, 방법은 먼저 마우스를 하나 이상의 PTK7 항원을 사용하여 면역화시킴으로써 인간 Ig 마우스 (예를 들어 상기 설명된 바와 같은 HuMab 마우스 또는 KM 마우스)에서 항-PTK7 항체 반응을 일으킨 후, 마우스의 림프계 세포로부터 인간 항체 사슬을 코딩하는 핵산을 단리하고, 이들 핵산을 디스플레이 벡터 (예를 들어, 파지) 내로 도입하여 디스플레이 패키지의 라이브러리를 제공하는 것을 포함한다. 따라서, 각각의 라이브러리 멤버는 인간 항체 사슬을 코딩하는 핵산을 포함하고, 각각의 항체 사슬은 디스플레이 패키지로부터 디스플레이된다. 이어서, 라이브러리를 PTK7 단백질을 사용하여 스크리닝하여, PTK7에 특이적으로 결합하는 라이브러리 멤버를 단리한다. 이어서, 선택된 라이브러리 멤버의 핵산 삽입체를 단리하고, 표준 방법에 의해 서열결정하여 선택된 PTK7 바인더의 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 결정한다. 가변 구역은 표준 재조합 DNA 기술에 의해, 예를 들어  $V_H$  구역은  $C_H$  구역에 작동가능하게 연결되고,  $V_L$  구역은  $C_L$  구역에 작동가능하게 연결되도록 인간 중쇄 및 경쇄 불변 구역을 보유하는 발현 벡터 내로 가변 구역을 클로닝함으로써 전장 항체 사슬로 전환될 수 있다.
- [0356] 인간 Ig 마우스의 면역화
- [0357] 본 발명의 인간 항체를 생성하기 위해 인간 Ig 마우스를 사용할 때, 그러한 마우스는 문헌 ([Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859]; [Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851]); 및 PCT 공개 WO 98/24884 및 WO 01/14424에 기재되어 있는 바와 같이 PTK7 항원 및/또는 재조합 PTK7, 또는 PTK7 융합 단백질의 정제된 또는 농축된 제제로 면역화시킬 수 있다. 바람직하게는, 마우스는 제1 주입 시에 6-16주령일 것이다. 예를 들어, PTK7 항원의 정제된 또는 재조합 제제 (5- 50  $\mu$ g)를 사용하여 인간 Ig 마우스를 복강내 면역화시킬 수 있다.
- [0358] PTK7에 대한 완전 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위한 상세한 절차는 아래의 실시예 1에 설명되어 있다. 다양한 항원을 사용한 누적된 경험에 의해 트랜스젠릭 마우스는 처음에 완전 프로인트 (Freund) 어쥬번트 (adjuvant) 중의 항원을 사용하여 복강내 (IP) 면역화시킨 후, 불완전 프로인트 어쥬번트 중의 항원을 사용하여 격주로 IP 면역화시킬 때 (총 6회 이하) 반응하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 프로인트 어쥬번트 이외의 어쥬번트도 또한 효과적인 것으로 밝혀졌다. 추가로, 어쥬번트의 부재 하에 전체 세포는 고도로 면역원성인 것으로 밝혀졌다. 면역 반응은 후안와 채혈에 의해 수득한 혈장 샘플을 사용하여 면역화 프로토콜의 과정에 걸쳐 모니터링할 수 있다. 혈장은 ELISA (아래 설명됨)에 의해 스크리닝할 수 있고, 충분한 역가의 항-PTK7 인간 면역글로불린을 갖는 마우스를 융합을 위해 사용할 수 있다. 마우스를 항원을 정맥내 추가접종한 3일 후에 희생시키고, 비장을 제거할 수 있다. 각각의 면역화를 위해 2-3회 융합이 이루어질 필요가 있는 것으로 예상된다. 각각의 항원에 대해 대개 6 내지 24마리의 마우스를 면역화시킨다. 대체로 HCo7 및 HCo12 종을 모두 사용한다. 또한, HCo7 및 HCo12 트랜스진을 모두 2개의 상이한 인간 중쇄 트랜스진을 갖는 단일 마우스 (HCo7/HCo12) 내로 함께 사육할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 실시예 1에 기재되어 있는 바와 같이 KM 마우스™ 종을 사용할 수 있다.
- [0359] 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

- [0360] 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 면역화시킨 마우스로부터의 비장 세포 및/또는 림프절 세포를 단리하고 적절한 불멸화 세포주, 예를 들어 마우스 골수종 세포주에 융합시킬 수 있다. 생성되는 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, 면역화시킨 마우스로부터의 비장 림프구의 단일 세포 현탁액을 50% PEG를 사용하여 1/6 수의 P3X63-Ag8.653 비-분비 마우스 골수종 세포 (ATCC, CRL 1580)에 융합시킬 수 있다. 별법으로, 면역화시킨 마우스로부터의 비장 림프구의 단일 세포 현탁액을 CytoPulse 큰 챔버 세포 융합 전기천공장치 (사이토피스 사이언시즈, 인크. (CytoPulse Sciences, Inc., 미국 매릴랜드주 글렌 버니))를 사용하여 전기장 기반 전기융합 방법을 이용하여 융합시킬 수 있다. 세포를 평저 미세적정 플레이트에 약  $2 \times 10^5$ 로 플레이팅한 후, 20% 태아 클론 (Clone) 혈청, 18% "653" 조건화 배지, 5% 오리젠 (IGEN), 4 mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-머캅토에탄올, 50 단위/ml 페니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신, 50 mg/ml 겐타마이신 및 1X HAT (시그마 (Sigma); HAT는 융합 24시간 후에 첨가한다)를 함유하는 선택 배지 내에서 2주 인큐베이팅한다. 약 2주 후에, 세포를 HAT를 HT로 교체한 배지 내에서 배양할 수 있다. 이어서, 개별 웰을 인간 모노클로날 IgM 및 IgG 항체에 대해 ELISA에 의해 스크리닝할 수 있다. 일단 광범한 하이브리도마 성장이 일어나면, 배지를 대체로 10-14일 후에 관찰할 수 있다. 항체 분비 하이브리도마를 재플레이팅하고 다시 스크리닝할 수 있고, 인간 IgG에 대해 여전히 양성이면, 모노클로날 항체를 제한 희석에 의해 적어도 2회 서브클로닝할 수 있다. 이어서, 안정한 서브클론을 시험관 내에서 배양하여, 특성 결정을 위해 조직 배양 배지 내에서 소량의 항체를 생성할 수 있다.
- [0361] 인간 모노클로날 항체를 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마를 모노클로날 항체 정제를 위한 2리터 스피너 (spinner)-플라스크에서 성장시킬 수 있다. 상등액을 여과하고, 농축시킨 후에, 단백질을 A-세파로즈 (파마시아 (Pharmacia, 미국 뉴저지주 피츠카타웨이))를 사용한 친화도 크로마토그래피를 수행할 수 있다. 용출된 IgG는 순도를 보장하기 위해 겔 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 검토할 수 있다. 버퍼 용액을 PBS로 교환할 수 있고, 농도는 1.43 흡광 계수를 이용하여 OD<sub>280</sub>에 의해 결정할 수 있다. 항체를 분취하고 -80°C에서 저장할 수 있다.
- [0362] 본 발명의 모노클로날 항체를 생산하는 트랜스펙토마의 생성
- [0363] 본 발명의 항체는 또한 예를 들어, 당업계에 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질감염 방법의 조합을 이용하여 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산할 수 있다 (예를 들어, [Morrison, S. (1985) Science 229:1202]).
- [0364] 예를 들어, 항체 또는 그의 항체 단편을 발현시키기 위해, 부분 또는 전장 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA를 표준 분자 생물학 기술 (예를 들어, 관심있는 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용하는 cDNA 클로닝 또는 PCR 증폭)에 의해 수득할 수 있고, 유전자가 전사 및 번역 제어 서열에 작동가능하게 연결되도록 DNA를 발현 벡터 내로 삽입할 수 있다. 본 문맥에서 용어 "작동가능하게 연결된"은 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 그들의 의도된 기능을 수행하도록, 항체 유전자가 벡터 내로 라이게이션되는 것을 의미하도록 의도된다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용되는 발현 숙주 세포와 적합성인 것으로 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 별개의 벡터 내로 삽입될 수 있거나, 보다 일반적으로 두 유전자는 동일한 발현 벡터 내로 삽입된다. 항체 유전자는 표준 방법 (예를 들어, 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보성 제한 부위들의 라이게이션, 또는 제한 부위가 존재하지 않으면 블런트 (blunt) 말단 라이게이션)에 의해 발현 벡터 내로 삽입된다. 본원에 설명되는 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 구역은, V<sub>H</sub> 세그먼트가 벡터 내에서 C<sub>H</sub> 세그먼트(들)에 작동가능하게 연결되고 V<sub>K</sub> 세그먼트가 벡터 내에서 C<sub>L</sub> 세그먼트에 작동가능하게 연결되도록 이들을 이미 목적하는 이소형의 중쇄 불변 구역 및 경쇄 불변 구역을 코딩하는 발현 벡터 내로 삽입함으로써 임의의 항체 이소형의 전장 항체 유전자를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 추가로 또는 별법으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터 항체 사슬의 분비를 촉진하는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 신호 펩티드가 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 인 프레임으로 연결되도록 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중 신호 펩티드 (즉, 비-면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩티드)일 수 있다.
- [0365] 항체 사슬 유전자에 추가로, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포 내에서 항체 사슬 유전자의 발현을 제어하는 조절 서열을 보유한다. 용어 "조절 서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터, 인핸서 (enhancer) 및 다른 발현 제어 요소 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 그러한 조절 서열은 예를 들어, 문헌 [Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185,

Academic Press, San Diego, CA (1990))]에 기재되어 있다. 당업자는 조절 서열의 선택을 포함한 발현 벡터의 설계가 형질전환시킬 숙주 세포의 선택, 목적하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 결정될 수 있음을 이해할 것이다. 포유동물 숙주 세포 발현을 위해 바람직한 조절 서열은 포유동물 세포에서 고수준의 단백질 발현을 지시하는 바이러스 요소, 예를 들어 거대세포바이러스 (CMV), 원숭이 바이러스 40 (SV40), 아데노바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (AdMLP)) 및 폴리오마로부터 유래하는 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 별법으로, 비-바이러스 조절 서열, 예를 들어 유비퀴틴 프로모터 또는  $\beta$ -글로빈 프로모터를 사용할 수 있다. 또한 추가로, SV40 초기 프로모터 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 타입 1의 긴 말단 반복으로부터의 서열을 함유하는 SR $\alpha$  프로모터 시스템과 같은 상이한 공급원으로부터의 서열들로 이루어진 조절 요소 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)를 사용할 수 있다.

[0366] 항체 사슬 유전자 및 조절 서열에 추가로, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 추가의 서열, 예를 들어 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예를 들어, 복제 기원) 및 선택가능한 마커 유전자를 보유할 수 있다. 선택가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다 (예를 들어, 미국 특허 4,399,216, 4,634,665 및 5,179,017 (모두 Axel et al.) 참조). 예를 들어, 일반적으로, 선택가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포에 대해 약물, 예를 들어 G418, 하이그로마이신 또는 메토폭세이트에 대한 내성을 부여한다. 바람직한 선택가능한 마커 유전자는 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR) 유전자 (메토폭세이트 선택/증폭과 함께 dhfr- 숙주 세포에서 사용하기 위해) 및 neo 유전자 (G418 선택을 위해)를 포함한다.

[0367] 경쇄 및 중쇄의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 발현 벡터(들)를 표준 기술에 의해 숙주 세포 내로 형질감염시킨다. 다양한 형태의 용어 "형질감염"은 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포 내로 외인성 DNA의 도입을 위해 일반적으로 사용되는 매우 다양한 기술, 예를 들어, 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-텍스트란 형질감염 등을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 항체를 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포 내에서 발현시키는 것이 이론적으로 가능하지만, 진핵생물 세포, 가장 바람직하게는 포유동물 숙주 세포 내에서 항체 발현이 가장 바람직하고, 이는 그러한 진핵생물 세포, 특히 포유동물 세포가 원핵생물 세포보다 적절하게 접힌 면역화합물 활성 항체를 조립하고 분비하기가 더 쉽기 때문이다. 항체 유전자의 원핵생물 발현은 활성 항체의 고수율 생산을 위해 비효율적인 것으로 보고되었다 (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

[0368] 본 발명의 재조합 항체를 발현하기 위해 바람직한 포유동물 숙주 세포는 차이니스 햄스터 난소 (CHO 세포) (예를 들어, 문헌 [R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621]에 기재된 바와 같이 DHFR 선택가능한 마커와 함께 사용되는, 문헌 [Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기재되어 있는 dhfr-CHO 세포 포함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 특히, NSO 골수종 세포와 함께 사용하기 위해, 또다른 바람직한 발현 시스템은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 EP 338,841에 개시된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 코딩하는 재조합 발현 벡터를 포유동물 숙주 세포 내로 도입할 때, 항체는 숙주 세포에서 항체의 발현을 허용하기 위해, 또는 보다 바람직하게는 숙주 세포를 성장시키는 배양 배지 내로 항체의 분비를 허용하기 위해 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 생산한다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 이용하여 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

[0369] 항원에 대한 항체 결합의 특성 결정

[0370] 본 발명의 항체는 예를 들어, 표준 ELISA에 의해 PTK7에 대한 결합에 대해 시험할 수 있다. 간단히 설명하면, 미세적정 플레이트를 PBS 중의 0.25  $\mu$ g/ml의 정제된 PTK7로 코팅한 후, PBS 중의 5% 소 혈청 알부민으로 차단한다. 항체 희석액 (예를 들어, PTK7-면역화시킨 마우스로부터의 혈장 희석액)을 각각의 웰에 첨가하고, 1-2시간 동안 37°C에서 인큐베이팅한다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세척한 후, 알칼린 포스파타제에 컨쥬게이팅된 2차 시약 (예를 들어, 인간 항체에 대해, 염소-항-인간 IgG Fc-특이적 폴리클로날 시약)과 함께 1시간 동안 37°C에서 인큐베이팅한다. 세척한 후, 플레이트를 pNPP 기질 (1 mg/ml)을 사용하여 발색시키고, 405-650의 OD에서 분석한다. 바람직하게는, 최고 역가를 나타내는 마우스를 융합을 위해 사용할 것이다.

[0371] 상기 설명된 바와 같은 ELISA 분석을 또한 PTK7 면역원과 양성 반응성을 보이는 하이브리도마에 대해 스크리닝하기 위해 사용할 수 있다. PTK7에 높은 결합력으로 결합하는 하이브리도마를 서브클로닝하고 추가로 특성 결정한다. (ELISA에 의해) 모 세포의 반응성을 보유하는, 각각의 하이브리도마로부터의 하나의 클론을 5-10개의 바이알 세포 배양 (-140°C에서 저장됨)를 제조하기 위해, 및 항체 정제를 위해 선택할 수 있다.

[0372] 항-PTK7 항체를 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마를 모노클로날 항체 정제를 위한 2리터 스피너-플라스크에서 성장시킬 수 있다. 상등액을 여과하고, 농축시킨 후에, 단백질 A-세파로즈 (파마시아)를 사용한 친화도 크로마토그래피를 수행할 수 있다. 용출된 IgG는 순도를 보장하기 위해 겔 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그



래피에 의해 검토할 수 있다. 버퍼 용액을 PBS로 교환할 수 있고, 농도는 1.43 흡광 계수를 이용하여 OD<sub>280</sub>에 의해 결정할 수 있다. 모노클로날 항체를 분취하고 -80℃에서 저장할 수 있다.

[0373] 선택된 항-PTK7 모노클로날 항체가 특유한 에피토프에 결합하는지 결정하기 위해, 각각의 항체를 시판 시약 (피어스 (Pierce, 미국 일리노이주 록포드))을 사용하여 비오틴화시킬 수 있다. 비표지된 모노클로날 항체 및 비오틴화 모노클로날 항체를 사용한 경쟁 연구를 상기 설명된 바와 같이 PTK7 코팅된-ELISA 플레이트를 사용하여 수행할 수 있다. 비오틴화 mAb 결합은 스트렙타비딘-알칼린 포스파타제 프로브를 사용하여 검출할 수 있다.

[0374] 정제된 항체의 이소형을 결정하기 위해, 특정 이소형의 항체에 특이적인 시약을 사용하는 이소형 ELISA를 수행할 수 있다. 예를 들어, 인간 모노클로날 항체의 이소형을 결정하기 위해, 미세적정 플레이트를 웰을 1 µg/ml의 항-인간 면역글로불린으로 밤새 4℃에서 코팅할 수 있다. 1% BSA로 차단한 후, 플레이트를 1 µg/ml 이하의 시험 모노클로날 항체 또는 정제된 이소형 대조군과 주변 온도에서 1 내지 2시간 동안 반응시킨다. 이어서, 웰을 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이적 알칼린 포스파타제-컨쥬게이팅된 프로브와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 상기 설명된 바와 같이 발색시키고 분석한다.

[0375] 항-PTK7 인간 IgG는 웨스턴 블롯팅에 의해 PTK7 항원과의 반응성에 대해 추가로 시험할 수 있다. 간단히 설명하면, PTK7을 제조하고 나트륨 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 처리할 수 있다. 전기영동 후에, 분리된 항원을 니트로셀룰로스 막에 옮기고, 10% 우테 혈청으로 차단시키고, 시험할 모노클로날 항체로 프로빙한다. 인간 IgG 결합은 항-인간 IgG 알칼린 포스파타제를 사용하여 검출하고, BCIP/NBT 기질 정제 (시그마 케미컬. 컴퍼니 (Sigma Chem. Co., 미국 미주리주 세인트루이스))를 사용하여 발색시킬 수 있다.

[0376] 이중특이적 분자

[0377] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-PTK7 항체 또는 그의 단편을 포함하는 이중특이적 분자를 특징으로 한다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합부는 다른 기능적 분자, 예를 들어, 다른 펩티드 또는 단백질 (예를 들어, 수용체에 대한 다른 항체 또는 리간드)에 유도체화되거나 연결되어, 적어도 2개의 상이한 결합 부위 또는 표적 분자에 결합하는 이중특이적 분자를 생성할 수 있다. 본 발명의 항체는 실제로 하나 초과와 다른 기능적 분자에 유도체화되거나 연결되어, 2 초과와 상이한 결합 부위 및/또는 표적 분자에 결합하는 다중특이적 분자를 생성할 수 있고; 그러한 다중특이적 분자도 또한 본원에서 사용되는 용어 "이중특이적 분자"에 포함되는 것으로 의도된다. 본 발명의 이중특이적 분자를 생성하기 위해, 본 발명의 항체는 하나 이상의 다른 결합 분자, 예를 들어 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체에 기능적으로 연결될 수 있어서 (예를 들어, 화학적 커플링, 유전자 융합, 비공유 회합 등에 의해), 이중특이적 분자가 생성된다.

[0378] 따라서, 본 발명은 PTK7에 대한 적어도 하나의 제1 결합 특이성 및 제2 표적 에피토프에 대한 제2 결합 특이성을 포함하는 이중특이적 분자를 포함한다. 본 발명의 특정 실시태양에서, 제2 표적 에피토프는 Fc 수용체, 예를 들어, 인간 FcγRI (CD64) 또는 인간 Fcα 수용체 (CD89)이다. 그러므로, 본 발명은 FcγR 또는 FcαR 발현 효과기 세포 (예를 들어, 단핵구, 대식세포 또는 다형핵 세포 (PMN))에, 및 PTK7을 발현하는 표적 세포에 모두 결합할 수 있는 이중특이적 분자를 포함한다. 이들 이중특이적 분자는 PTK7 발현 세포를 효과기 세포에 표적화하고, Fc 수용체-매개 효과기 세포 활성화, 예를 들어 PTK7 발현 세포의 식세포작용, 항체 의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), 시토킨 방출, 또는 과산화물 음이온 생성을 촉발한다.

[0379] 이중특이적 분자가 다중특이적 분자인 본 발명의 실시태양에서, 분자는 항-Fc 결합 특이성 및 항-PTK7 결합 특이성에 추가로 제3 결합 특이성 부분을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시태양에서, 제3 결합 특이성 부분은 항-증진 인자 (EF) 부분, 예를 들어, 세포독성 활성화에 관여되는 표면 단백질에 결합하여 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 분자이다. "항-증진 인자 부분"은 주어진 분자, 예를 들어, 항원 또는 수용체에 결합하여, Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 대한 결합 결정인자의 효과를 증진시키는 항체, 기능적 항체 단편 또는 리간드일 수 있다. "항-증진 인자 부분"은 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 결합할 수 있다. 별법으로, 항-증진 인자 부분은 제1 및 제2 결합 특이성 부분이 결합하는 엔티티와 상이한 엔티티에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-증진 인자 부분은 (예를 들어 CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1, 또는 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 다른 면역 세포를 통해) 세포독성 T-세포에 결합할 수 있다.

[0380] 한 실시태양에서, 본 발명의 이중특이적 분자는 결합 특이성 부분으로서 적어도 하나의 항체 또는 그의 항체 단편, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 또는 단일쇄 Fv를 포함한다. 항체는 또한 그의 내용이 참고로 명백하게 포함되는 미국 특허 4,946,778 (Ladner et al.)에 기재되어 있는 바와 같이, 경쇄 또는 중쇄 이량체, 또는



그의 임의의 최소 단편, 예를 들어 Fv 또는 단일쇄 구성체일 수 있다.

- [0381] 한 실시태양에서, Fc $\gamma$  수용체에 대한 결합 특이성은 모노클로날 항체에 의해 제공되고, 그의 결합은 인간 면역글로불린 G (IgG)에 의해 차단되지 않는다. 본원에서 사용될 때 용어 "IgG 수용체"는 염색체 1 상에 위치하는 8개의  $\gamma$ -쇄 유전자 중 임의의 것을 나타낸다. 이들 유전자는 총 12개의 막형단 또는 가용형 수용체 이소형을 코딩하고, 이들은 3개의 Fc $\gamma$  수용체 클래스로 분류된다: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), 및 Fc $\gamma$ RIII (CD16). 한 바람직한 실시태양에서, Fc $\gamma$  수용체는 인간 고친화도 Fc $\gamma$ RI이다. 인간 Fc $\gamma$ RI은 72 kDa 분자이고, 단량체 IgG에 대해 높은 친화도를 보인다 ( $10^8 - 10^9 M^{-1}$ ).
- [0382] 특정한 바람직한 항-Fc $\gamma$  모노클로날 항체의 생산 및 특성 결정은 그의 교시내용이 본원에 참고로 완전히 포함되는 PCT 공개 WO 88/00052 및 미국 특허 4,954,617 (Fanger et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 수용체의 Fc $\gamma$  결합 부위로부터 구분되는 부위에서 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 또는 Fc $\gamma$ RIII의 에피토프에 결합하고, 따라서, 그들의 결합은 생리학적 수준의 IgG에 의해 실질적으로 차단되지 않는다. 본 발명에 유용한 특이적 항-Fc $\gamma$ RI 항체는 mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 및 mAb 197이다. mAb 32를 생산하는 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection)에서 ATCC 기탁 번호 HB9469로 이용가능하다. 다른 실시태양에서, 항-Fc $\gamma$  수용체 항체는 모노클로날 항체 22의 인간화 형태 (H22)이다. H22 항체의 생산 및 특성 결정은 문헌 [Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10):4996-5002] 및 PCT 공개 WO 94/10332에 기재되어 있다. H22 항체 생산 세포주는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션에 명칭 HA022CL1 하에 기탁되었고, 기탁 번호는 CRL 11177이다.
- [0383] 또다른 바람직한 실시태양에서, Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 인간 IgA 수용체, 예를 들어, Fc-알파 수용체 (Fc $\alpha$ RI (CD89))에 결합하는 항체에 의해 제공되고, 그의 결합은 바람직하게는 인간 면역글로불린 A (IgA)에 의해 차단되지 않는다. 용어 "IgA 수용체"는 염색체 19 상에 위치하는 하나의  $\alpha$ -유전자 (Fc $\alpha$ RI)의 유전자 산물을 포함하도록 의도된다. 상기 유전자는 55 내지 110 kDa의 몇몇 선택적으로 스플라이싱된 막형단 이소형을 코딩하는 것으로 알려져 있다. Fc $\alpha$ RI (CD89)는 단핵구/대식세포, 호산구 및 호중구 과립구 상에서 구성적으로 발현되지만, 비-효과기 세포 집단 상에서는 발현되지 않는다. Fc $\alpha$ RI는 IgA1 및 IgA2 모두에 대해 중간 친화도 (약  $5 \times 10^7 M^{-1}$ )를 갖고, 이는 G-CSF 또는 GM-CSF와 같은 시토킨에 노출시에 증가한다 (Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440). Fc $\alpha$ RI에 IgA 리간드 결합 도메인 외부에서 결합하는 4개의 Fc $\alpha$ RI-특이적 모노클로날 항체 (A3, A59, A62 및 A77로서 확인됨)가 설명되었다 (Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764).
- [0384] Fc $\alpha$ RI 및 Fc $\gamma$ RI는 본 발명의 이중특이적 분자에서 사용하기 위해 바람직한 촉발 수용체이고, 이는 이들이 (1) 주로 면역 효과기 세포, 예를 들어, 단핵구, PMN, 대식세포 및 수지상 세포 상에서 발현되고; (2) 높은 수준 (예를 들어, 세포당 5,000-100,000)으로 발현되고; (3) 세포독성 활성 (예를 들어, ADCC, 식세포작용)의 매개자이고; (4) 수용체에 표적화된, 자가-항원을 포함한 항원의 항상된 항원 제시를 매개하기 때문이다.
- [0385] 인간 모노클로날 항체가 바람직하지만, 본 발명의 이중특이적 분자에서 사용될 수 있는 다른 항체는 쥐, 키메라 및 인간화 모노클로날 항체이다.
- [0386] 본 발명의 이중특이적 분자는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 구성적 결합 특이성 부분, 예를 들어, 항-FcR 및 항-PTK7 결합 특이성 부분을 컨쥬게이팅함으로써 제조할 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 분자의 각각의 결합 특이성 부분은 따로 생성된 후 서로 컨쥬게이팅될 수 있다. 결합 특이성 부분이 단백질 또는 펩티드일 때, 다공유 컨쥬게이션을 위해 양한 커플링제 또는 가교결합제가 사용될 수 있다. 가교결합제의 예는 단백질 A, 카르보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산) (DTNB), o-페닐렌디말레이미드 (oPDM), N-숙신이미딜-3-(2-페리디리티오)프로피오네이트 (SPDP), 및 술포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로hexan-1-카복실레이트 (술포-SMCC)를 포함한다 (예를 들어, [Karpovsky et al. (1984) J Exp. Med. 160:1686]; [Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648] 참조). 다른 방법은 문헌 ([Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132]; [Brennan et al. (1985) Science 229:81-83] 및 [Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375])에 기재된 방법을 포함한다. 바람직한 컨쥬게이팅제는 SATA 및 술포-SMCC (둘 모두 피어스 케미칼 컴퍼니 (Pierce Chemical Co., 미국 일리노이주 록포드)로부터 입수 가능함)이다.
- [0387] 결합 특이성 부분이 항체일 때, 이들은 2개의 중쇄의 C-말단 힌지 구역들의 술포히드릴 결합을 통해 컨쥬게이팅될 수 있다. 특히 바람직한 실시태양에서, 힌지 구역은 컨쥬게이션에 앞서 홀수의 술포히드릴 잔기, 바람직하

게는 1개의 술프히드릴 잔기를 함유하도록 변형된다.

[0388] 별법으로, 두 결합 특이성 부분은 모두 동일한 벡터 내에 코딩되고, 동일한 숙주 세포에서 발현 및 조립될 수 있다. 상기 방법은 이중특이적 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> 또는 리간드 x Fab 융합 단백질인 경우에 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이적 분자는 하나의 단일쇄 항체와 결합 결정인자를 포함하는 단일쇄 분자, 또는 2개의 결합 결정인자를 포함하는 단일쇄 이중특이적 분자일 수 있다. 이중특이적 분자는 적어도 2개의 단일쇄 분자를 포함할 수 있다. 이중특이적 분자를 제조하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 5,260,203; 미국 특허 5,455,030; 미국 특허 4,881,175; 미국 특허 5,132,405; 미국 특허 5,091,513; 미국 특허 5,476,786; 미국 특허 5,013,653; 미국 특허 5,258,498; 및 미국 특허 5,482,858에 기재되어 있다.

[0389] 그들의 특이적 표적에 대한 이중특이적 분자의 결합은 예를 들어, 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA), 방사성 면역분석 (RIA), FACS 분석, 생물분석 (예를 들어, 성장 억제법) 또는 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인할 수 있다. 각각의 이들 분석은 일반적으로 관심있는 복합체에 특이적인 표지된 시약 (예를 들어, 항체)을 사용함으로써 특히 관심있는 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들어, FcR-항체 복합체는 예를 들어, 항체-FcR 복합체를 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 효소-결합된 항체 또는 항체 단편을 사용하여 검출할 수 있다. 별법으로, 복합체는 임의의 다양한 다른 면역분석법을 이용하여 검출할 수 있다. 예를 들어, 항체는 방사성 표지되어 방사성 면역분석 (RIA)에서 사용될 수 있다 (예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 문헌 [Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986] 참조). 방사성 동위원소는  $\gamma$  계수기 또는 섬광계수기의 사용과 같은 수단에 의해 또는 방사능 사진촬영술에 의해 검출할 수 있다.

#### [0390] 컨쥬게이트

[0391] 본 발명의 컨쥬게이트에서, 파트너 분자는 화학적 링커 (때때로 본원에서 간단히 "링커"로서 칭함)에 의해 항체에 컨쥬게이트된다. 파트너 분자는 치료제 또는 마커일 수 있다. 치료제는 예를 들어, 세포독소, 비-세포독성 약물 (예를 들어, 면역억제제), 방사성 물질, 또다른 항체 또는 효소일 수 있다. 바람직하게는, 파트너 분자는 세포독소이다. 마커는 검출가능한 신호를 생성하는 임의의 표지, 예를 들어 방사성 표지, 형광 표지, 또는 기질에 대한 검출가능한 변형을 촉매하는 효소일 수 있다. 항체는 그의 항원이 발견되는 표적 조직 또는 세포에 결합함으로써 표적화 기능을 수행하고, 항체는 컨쥬게이트를 표적 조직 또는 세포로 이끈다. 여기서, 링커가 절단되어, 파트너 분자를 방출하여 그의 목적하는 생물학적 기능을 수행하도록 한다.

[0392] 항체에 부착된 파트너 분자의 비는 컨쥬게이션 반응 동안 사용되는 파트너 분자의 양 및 실험 조건과 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 바람직하게는, 항체에 대한 파트너 분자의 비는 1 내지 3, 보다 바람직하게는 1 내지 1.5이다. 당업자는 항체 Z의 각각의 개별 분자는 정수의 파트너 분자에 컨쥬게이트되는 반면, 컨쥬게이트의 제제는 통계학적 평균을 반영하는 항체에 대한 비-정수비의 파트너 분자에 대해 분석될 수 있음을 알 것이다.

#### [0393] 링커

[0394] 일부 실시태양에서, 링커는 본원에서  $(L^4)_p-F-(L^1)_m$ 으로서 제시되는 펩티딜 링커이다. 다른 링커는 본원에서 각각  $(L^4)_p-H-(L^1)_m$  및  $(L^4)_p-J-(L^1)_m$ 으로서 제시되는 히드라진 및 디술피드 링커를 포함한다. F, H 및 J는 각각 항체로부터 파트너 분자를 방출하도록 절단가능한 펩티딜, 히드라진 및 디술피드 모이어티인 한편,  $L^1$  및  $L^4$ 는 링커기이다. F, H, J,  $L^1$  및  $L^4$ 는 아래첨자 p 및 m과 함께 아래에 보다 충분히 설명된다. 이들 및 다른 링커의 제조 및 용도는 그의 개시내용이 본원에 참고로 포함되는 WO 2005/112919에 기재되어 있다.

[0395] 항체-파트너 컨쥬게이트에서 펩티드 및 다른 링커의 용도는 모두 본원에 참고로 포함되는 US 2006/0004081; 2006/0024317; 2006/0247295; 6,989,452; 7,087,600; 및 7,129,261; WO 2007/051081; 2007/038658; 2007/059404; 및 2007/089100에 기재되어 있다.

[0396] 추가의 링커는 그의 개시내용이 본원에 참고로 포함되는 US 6,214,345; 2003/0096743; 및 2003/0130189; [de Groot et al., J. Med. Chem. 42, 5277 (1999)]; [de Groot et al. J. Org. Chem. 43, 3093 (2000)]; [de Groot et al., J. Med. Chem. 66, 8815 (2001)]; WO 02/083180; [Carl et al., J. Med. Chem. Lett. 24, 479 (1981)]; [Dubowchik et al., Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998)]에 기재되어 있다.

[0397] 항체 및 파트너 분자를 연결하는 것에 추가로, 링커는 파트너 분자에 안정성을 부여하거나, 그의 생체내 독성을

감소시키거나, 달리 그의 약동학, 생체이용률 및/또는 약력학에 유리한 영향을 미칠 수 있다. 컨쥬게이트는 그의 작용 부위에 전달되면, 링커가 절단되어 파트너 분자를 방출하는 것이 일반적으로 바람직하다. 또한 바람직하게는, 링커는 흔적이 없어서, 일단 절단되면 링커의 존재에 대한 흔적이 남아있지 않는다.

[0398] 다른 실시태양에서, 링커는 표적 세포 내의 또는 부근의 부위에서, 예를 들어 파트너 분자의 치료 작용 또는 마커 활성의 부위에서 절단되는 그의 능력을 특징으로 한다. 그러한 절단은 사실상 효소에 의할 수 있다. 이러한 특징은 파트너 분자의 전신 활성화를 감소시켜, 독성 및 전신 부작용을 감소시키는 것을 돕는다. 효소에 의한 절단에 바람직한 절단가능한 기는 펩티드 결합, 에스테르 연결기 및 디설피드 연결기, 예를 들어 상기 언급된 F, H 및 J 모이어티를 포함한다. 다른 실시태양에서, 링커는 pH에 민감하고, pH 변화를 통해 절단된다.

[0399] 중요한 측면은 링커가 절단하는 속도를 제어하는 능력이다. 종종, 빠르게 절단하는 링커가 요망된다. 그러나, 일부 실시태양에서, 보다 느리게 절단하는 링커가 바람직할 수 있다. 예를 들어, 지속 방출 제형에서, 또는 신속 방출 및 서방 성분을 모두 갖는 제형에서, 보다 느리게 절단하는 링커를 제공하는 것이 유용할 수 있다. 상기 인용된 WO 2005/112919에서는 매우 빠르게 내지는 매우 느리게까지 넓은 범위의 속도로 절단하도록 설계될 수 있는 히드라진 링커를 개시하고 있다.

[0400] 링커는 또한 컨쥬게이트가 순환계 내에 있는 동안 표적 조직 또는 세포에 도달하기 전에 분해에 대해 파트너 분자를 안정화시키는 역할을 할 수 있다. 이것은 파트너 분자의 순환 반감기를 연장하므로 중요한 이익이다. 링커는 또한 순환계 내에 있는 동안 컨쥬게이트가 비교적 온화하지만, 목적하는 작용 부위에서 활성화 후에 파트너 분자가 목적하는 효과를 갖도록 - 예를 들어 세포독성을 보이도록 - 파트너 분자의 활성을 약화시키는 기능을 한다. 치료제 컨쥬게이트에 대해서는, 링커의 이러한 특징은 물질의 치료 지수를 증진하는 역할을 한다.

[0401] 절단가능한 펩티드, 히드라진 또는 디설피드기 (각각 F, H 또는 J)에 추가로, 하나 이상의 링커기  $L^1$ 이 임의로 파트너 분자와 경우에 따라서 F, H 또는 J 사이에 도입된다. 이들 링커기  $L^1$ 은 또한 스페이서기로서 설명될 수 있고, 적어도 2개의 관능기를 포함한다. 아래첨자 m의 값 (즉, 존재하는  $L^1$ 기의 수) 및 특징기  $L^1$ 의 위치에 따라서, 기  $L^1$ 의 화학적 관능기는 파트너 분자의, 경우에 따라서 F, H 또는 J의, 또는 또다른 링커기  $L^1$  (하나 초과  $L^1$ 이 존재하면)의 화학적 관능기에 결합할 수 있다. 스페이서기  $L^1$ 에 적합한 화학적 관능기의 예는 히드록시, 머캅토, 카르보닐, 카르복시, 아미노, 케톤, 알데히드 및 머캅토기를 포함한다.

[0402] 링커  $L^1$ 은 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로알킬기일 수 있다. 한 실시태양에서, 알킬 또는 아릴기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 이들은 또한 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함할 수 있다.

[0403] 예시적인 기  $L^1$ 은 예를 들어, 6-아미노헥산을, 6-머캅토헥산을, 10-히드록시데칸산, 글라이신 및 다른 아미노산, 1,6-헥산디올,  $\beta$ -알라닌, 2-아미노에탄올, 시스테인 (2-아미노에탄티올), 5-아미노펜탄산, 6-아미노헥산산, 3-말레이미도벤조산, 프탈리드,  $\alpha$ -치환된 프탈리드, 카르보닐기, 아민 에스테르, 헥산, 펩티드 등을 포함한다.

[0404] 기  $L^1$ 의 하나의 기능은 파트너 분자가 F, H 또는 J에서의 절단 화학을 저해하지 않도록 (예를 들어, 입체 또는 전자 효과를 통해), 경우에 따라서 F, H 또는 J와 파트너 분자 사이에 공간적 분리를 제공하는 것이다. 기  $L^1$ 은 또한 추가의 분자 덩어리 및 화학적 관능기를 컨쥬게이트 내로 도입하는 기능을 할 수 있다. 일반적으로, 추가의 덩어리 및 관능기는 컨쥬게이트의 혈청 반감기 및 다른 특성에 영향을 미친다. 따라서, 스페이서기를 주의하여 선택함으로써, 넓은 범위의 혈청 반감기를 갖는 컨쥬게이트를 생산할 수 있다. 임의로, 하나 이상의 링커  $L^1$ 은 아래에서 설명하는 바와 같은 자기 희생 (self-immolative)기일 수 있다.

[0405] 아래첨자 m은 0, 1, 2, 3, 4, 5 및 6 중에서 선택되는 정수이다. 다수의  $L^1$ 기가 존재할 때, 이들은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0406]  $L^4$ 는 F, H 또는 J가 항체에 의한 항원 결합을 저해하지 않도록 또는 항체가 F, H 또는 J에서의 절단 화학을 저해하지 않도록, 경우에 따라서 F, H 또는 J와 항체 사이에 공간적 분리를 제공하는 링커 모이어티이다. 바람직하게는,  $L^4$ 는 모이어티를 함유하는 링커를 이용하여 컨쥬게이트에 증가된 용해도 또는 감소된 응집 특성을 부여

하거나, 컨주게이트의 가수분해 속도를 변형시킨다.  $L^1$ 의 경우와 같이,  $L^4$ 는 임의로 자기 희생기이다. 한 실시태양에서,  $L^4$ 는 치환된 알킬, 비치환된 알킬, 치환된 아릴, 비치환된 아릴, 치환된 헤테로알킬, 또는 비치환된 헤테로알킬이고, 이들 중 임의의 것은 직쇄, 분지쇄 또는 시클릭일 수 있다. 치환은 예를 들어 저급 ( $C_1$ - $C_6$ ) 알킬, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 또는 디알킬-아미노일 수 있다. 특정 실시태양에서,  $L^4$ 는 비-시클릭 모이어터를 포함한다. 다른 실시태양에서,  $L^4$ 는 양전하 또는 음전하를 띤 아미노산 중합체, 예를 들어 폴리라이신 또는 폴리아르기닌을 포함한다.  $L^4$ 는 폴리에틸렌 글리콜 모이어터와 같은 중합체를 포함할 수 있다. 추가로,  $L^4$ 는 예를 들어, 중합체 성분 및 소분자 모이어터 모두를 포함할 수 있다.

[0407]

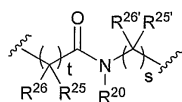
바람직한 실시태양에서,  $L^4$ 는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어터를 포함한다.  $L^4$ 의 PEG 부분은 1 및 50개 단위의 길이일 수 있다. 바람직하게는, PEG는 1-12개의 반복 단위, 보다 바람직하게는 3-12개의 반복 단위, 보다 바람직하게는 2-6개의 반복 단위, 또는 훨씬 더 바람직하게는 3-5개의 반복 단위, 가장 바람직하게는 4개의 반복 단위를 가질 것이다.  $L^4$ 는 전적으로 PEG 모이어터로 이루어질 수 있거나, 추가의 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬을 또한 함유할 수 있다. 복합체의 수용해도를 향상시키기 위해, PEG를  $L^4$  모이어터의 일부로서 조합하는 것이 유용하다. 추가로, PEG 모이어터는 항체에 대한 약물의 컨주게이션 동안 일어날 수 있는 응집 정도를 감소시킨다.

[0408]

아래첨자 p는 0 또는 1이고; 즉,  $L^4$ 의 존재는 선택적이다. 존재하는 경우에,  $L^4$ 는 적어도 2개의 관능기를 갖고, 여기서 하나의 관능기는 경우에 따라서 F, H 또는 J 내의 화학적 관능기에 결합하고, 다른 관능기는 항체에 결합한다. 기  $L^4$ 의 적합한 화학적 관능기의 예는 히드록시, 머캅토, 카르보닐, 카르복시, 아미노, 케톤, 알데히드 및 머캅토기를 포함한다. 항체는 대개 술포히드릴기 (예를 들어, 비산화된 시스테인 잔기로부터, 이미노티올란을 갖는 라이신 잔기에 술포히드릴-함유 연장부의 첨가, 또는 디설피드 다리의 환원), 아미노기 (예를 들어, 라이신 잔기로부터), 알데히드기 (예를 들어, 글리코시드 측쇄의 산화로부터), 또는 히드록실기 (예를 들어, 세린 잔기로부터)를 통해 컨주게이팅되므로, 항체에 부착을 위해 바람직한 화학적 관능기는 상기한 기와 반응성인 것, 예를 들어 말레이미드, 술포히드릴, 알데히드, 히드라진, 세미카르바지드 및 카르복실기이다. 항체 상의 술포히드릴기와  $L^4$  상의 말레이미드기의 조합이 바람직하다.

[0409]

일부 실시태양에서,  $L^4$ 는  $(AA^1)_c$ 의 N-말단에 직접 부착된 다음의 화학식을 포함한다.



[0410]

[0411]

여기서,  $R^{20}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 및 아실 중에서 선택된 멤버이다. 각각의  $R^{25}$ ,  $R^{25'}$ ,  $R^{26}$  및  $R^{26'}$ 는 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬 중에서 독립적으로 선택되고; s 및 t는 독립적으로 1 내지 6의 정수이다. 바람직하게는,  $R^{20}$ ,  $R^{25}$ ,  $R^{25'}$ ,  $R^{26}$  및  $R^{26'}$ 는 소수성이다. 일부 실시태양에서,  $R^{20}$ 은 H 또는 알킬 (바람직하게는, 비치환된 저급 알킬)이다. 일부 실시태양에서,  $R^{25}$ ,  $R^{25'}$ ,  $R^{26}$  및  $R^{26'}$ 는 독립적으로 H 또는 알킬 (바람직하게는, 비치환된  $C_1$  내지  $C_4$  알킬)이다. 일부 실시태양에서,  $R^{25}$ ,  $R^{25'}$ ,  $R^{26}$  및  $R^{26'}$ 는 모두 H이다. 일부 실시태양에서, t는 1이고, s는 1 또는 2이다.

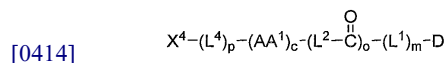
[0412]

펩티드 링커 (F)

[0413]

상기 논의한 바와 같이, 본 발명의 펩티드 링커는 일반식  $(L^4)_p-F-(L^1)_m$ 으로 나타낼 수 있고, 여기서 F는 펩티드 모이어터를 포함하는 부분을 나타낸다. 한 실시태양에서, F 부분은 선택적인 추가의 자기 희생적 링커  $L^2$  및 카르보닐기를 포함하여, 아래 화학식 (a)의 컨주게이트에 상응한다:

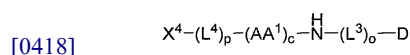




[0415] 본 실시태양에서,  $L^1$ ,  $L^4$ ,  $p$  및  $m$ 은 상기 정의한 바와 같다.  $X^4$ 는 항체이고,  $D$ 는 파트너 분자이다. 아래첨자  $o$ 는 0 또는 1이고,  $L^2$ 는 존재하는 경우에 자기 희생적 링커를 나타낸다.  $AA^1$ 는 하나 이상의 천연 아미노산 및/또는 비-천연  $\alpha$ -아미노산을 나타내고;  $c$ 는 1 및 20의 정수이다. 일부 실시태양에서,  $c$ 는 2 내지 5이거나,  $c$ 는 2 또는 3이다.

[0416] 화학식 (a)에서,  $AA^1$ 은 그의 아미노 말단에서  $L^4$ 에 직접 연결되거나,  $L^4$ 가 부재할 때  $X^4$ 에 직접 연결된다. 일부 실시태양에서,  $L^4$ 가 존재할 때,  $L^4$ 는  $(AA^1)_c$ 의 N-말단에 직접 부착된 카르복실 아실기를 포함하지 않는다.

[0417] 다른 실시태양에서, F 부분은 아미노기 및 선택적인 스페이서기  $L^3$ 을 포함하고,  $L^1$ 은 부재하여 (즉,  $m$ 은 0임), 아래 화학식 (b)의 컨쥬게이트에 대응한다:

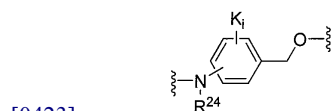


[0419] 본 실시태양에서,  $X^4$ ,  $D$ ,  $L^4$ ,  $AA^1$ ,  $c$  및  $p$ 는 상기 정의한 바와 같다. 아래첨자  $o$ 는 0 또는 1이다.  $L^3$ 은 존재하는 경우에 1차 또는 2차 아민 또는 카르복실 관능기를 포함하는 스페이서기이고,  $L^3$ 의 아민은  $D$ 의 펜던트 (pendant) 카르복실 관능기와 함께 아마이드 결합을 형성하거나,  $L^3$ 의 카르복실은  $D$ 의 펜던트 아민 관능기와 함께 아마이드 결합을 형성한다.

#### [0420] 자기 희생적 링커

[0421] 자기 희생적 링커는 2개의 간격이 있는 화학적 모이어티를 정상적으로 안정한 3원체 분자로 함께 공유 연결하고, 효소에 의한 절단에 의해 3원체 분자로부터 상기 간격이 있는 화학적 모이어티 중 하나를 방출하고; 상기 효소에 의한 절단 후에, 나머지 분자로부터 자발적으로 절단되어 상기 간격이 있는 화학적 모이어티 중 다른 것을 방출할 수 있는 이중기능적 화학적 모이어티이다. 본 발명에 따라, 자기 희생적 스페이서는 그의 단부 중 하나에서 펩티드 모이어티에 공유 연결되고, 그의 다른 단부에서 그의 유도체화가 약물학적 활성을 억제하는 약물 모이어티의 화학적 반응성 부위에 공유 연결됨으로써, 펩티드 모이어티 및 약물 모이어티를 함께 이격된 상태로 3원체 분자로서 공유 연결시키고, 이 3원체 분자는 표적 효소의 부재 하에 안정하고 약물학적 불활성이지만 스페이서 모이어티와 펩티드 모이어티를 공유 연결하는 결합에서 상기 표적 효소에 의해 절단가능하여 3원체 분자로부터 펩티드 모이어티를 방출시킬 수 있다. 그러한 효소에 의한 절단은 차례로 스페이서 모이어티의 자기 희생적 특징을 활성화시키고, 스페이서 모이어티를 약물 모이어티에 공유 연결하는 결합의 자발적인 절단을 개시하여, 약물학적 활성형의 약물을 방출시킬 것이다 (예를 들어, 그의 개시내용이 본원에 참고로 포함되는 문헌 [Carl et al., J. Med. Chem., 24(3), 479-480 (1981)]; [Carl et al., WO 81/01145 (1981)]; [Toki et al., J. Org. Chem. 67, 1866-1872 (2002)]; WO 2005/112919 (Boyd et al.); 및 WO 2007/038658 (Boyd et al.)을 참조한다.

[0422] 하나의 특히 바람직한 자기 희생적 스페이서는 화학식 (c)로 표시될 수 있다:



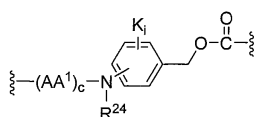
[0424] 아미노벤질기의 방향족 고리는 하나 이상의 "K"기로 치환될 수 있다. "K"기는 고리 구조의 일부인 4개의 비-치환된 탄소 중 하나에 부착된 수소를 교체하는 방향족 고리 상의 치환체이다. "K"기는 단일 원자, 예를 들어 할로젠일 수 있거나, 다수원자기, 예를 들어 알킬, 헤테로알킬, 아미노, 니트로, 히드록시, 알콕시, 할로알킬 및 시아노일 수 있다. 각각의 K는 치환된 알킬, 비치환된 알킬, 치환된 헤테로알킬, 비치환된 헤테로알킬, 치환된 아릴, 비치환된 아릴, 치환된 헤테로아릴, 비치환된 헤테로아릴, 치환된 헤테로시클로알킬, 비치환된 헤테로시클로알킬, 할로젠,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$ ,  $\text{NR}^{21}\text{COR}^{22}$ ,  $\text{OCONR}^{21}\text{R}^{22}$ ,  $\text{OCOR}^{21}$  및  $\text{OR}^{21}$ 로 이루어지는 군 중에서 독립적으로 선택되고, 여기서  $\text{R}^{21}$  및  $\text{R}^{22}$ 는 H, 치환된 알킬, 비치환된 알킬, 치환된 헤테로알킬, 비치환된 헤테로알킬, 치환된 아



릴, 비치환된 아릴, 치환된 헤테로아릴, 비치환된 헤테로아릴, 치환된 헤테로시클로알킬 및 비치환된 헤테로시클로알킬로 이루어지는 군 중에서 독립적으로 선택된다. 예시적인 K 치환체는 F, Cl, Br, I, NO<sub>2</sub>, OH, OCH<sub>3</sub>, NHCOCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NHCOCF<sub>3</sub> 및 메틸을 포함하고 이로 제한되지 않는다. "K<sub>i</sub>"에서, i는 0, 1, 2, 3 또는 4의 정수이다. 한 바람직한 실시태양에서, i는 0이다.

[0425] 상기 구조의 에테르 산소 원자는 카르보닐기에 연결된다 (도시하지 않음). NR<sup>24</sup> 관능기로부터 방향족 고리 내로의 선은 아민 관능기가 둘 모두 고리를 형성하고 -CH<sub>2</sub>-O-기에 의해 치환되지 않도록 5개의 탄소 중 임의의 것에 결합될 수 있음을 나타낸다. 바람직하게는, X의 NR<sup>24</sup> 관능기는 -CH<sub>2</sub>-O- 기에 대해 파라 (para) 위치에서 방향족 고리에 공유 결합된다. R<sup>24</sup>는 H, 치환된 알킬, 비치환된 알킬, 치환된 헤테로알킬, 및 비치환된 헤테로알킬로 이루어지는 군 중에서 선택된 멤버이다. 특정 실시태양에서, R<sup>24</sup>는 수소이다.

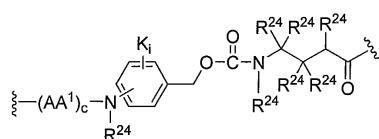
[0426] 한 실시태양에서, 본 발명은 상기 화학식 (a)의 펩티드 링커를 제공하고, 여기서 F는 다음 구조를 포함한다:



[0427] 여기서 R<sup>24</sup>, AA<sup>1</sup>, K, i 및 c는 상기 정의한 바와 같다.

[0428]

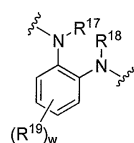
[0429] 다른 실시태양에서, 상기 화학식 (a)의 펩티드 링커는 다음 구조를 포함하는 -F-(L<sup>1</sup>)<sub>m</sub>-을 포함한다:



[0430] 여기서 R<sup>24</sup>, AA<sup>1</sup>, K, i 및 c는 상기 정의한 바와 같다.

[0431]

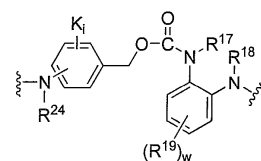
[0432] 일부 실시태양에서, 자기 희생적 스페이서 L<sup>1</sup> 또는 L<sup>2</sup>는 다음을 포함한다:



[0433]

[0434] 각각의 R<sup>17</sup>, R<sup>18</sup> 및 R<sup>19</sup>는 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 및 치환 또는 비치환된 아릴 중에서 독립적으로 선택되고, w는 0 내지 4의 정수이다. 일부 실시태양에서, R<sup>17</sup> 및 R<sup>18</sup>은 독립적으로 H 또는 알킬 (바람직하게는, 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬)이다. 바람직하게는, R<sup>17</sup> 및 R<sup>18</sup>은 C<sub>1-4</sub> 알킬, 예를 들어 메틸 또는 에틸이다. 일부 실시태양에서, w는 0이다. 실험에 의해 상기 특정 자기 희생적 스페이서가 비교적 빠르게 고리화하는 것으로 밝혀졌다.

[0435] 일부 실시태양에서, L<sup>1</sup> 또는 L<sup>2</sup>는 다음을 포함한다:

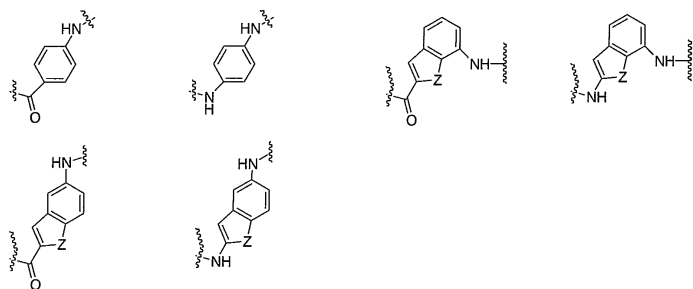


[0436] 여기서, R<sup>17</sup>, R<sup>18</sup>, R<sup>19</sup>, R<sup>24</sup> 및 K는 상기 정의한 바와 같다.

[0437]

[0438] 스페이서기

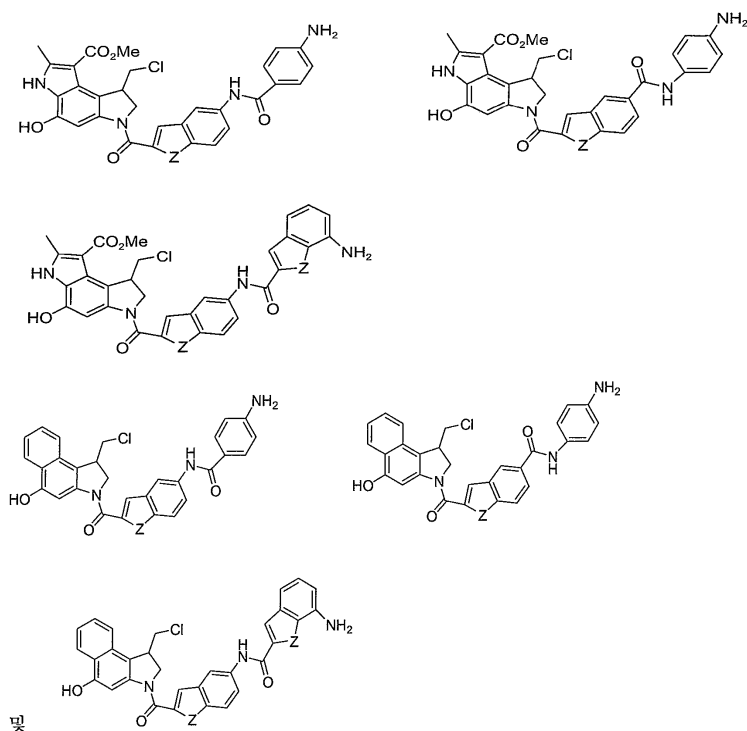
[0439] 스페이서기  $L^3$ 은 1차 또는 2차 아민 또는 카르복실 관능기를 포함하는 것을 특징으로 하고,  $L^3$ 의 아민은 D의 펜던트 카르복실 관능기와 함께 아마이드 결합을 형성하거나,  $L^3$ 의 카르복실은 D의 펜던트 아민 관능기와 함께 아마이드 결합을 형성한다.  $L^3$ 은 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬로 이루어지는 군 중에서 선택될 수 있다. 바람직한 실시태양에서,  $L^3$ 은 방향족기를 포함한다. 보다 바람직하게는,  $L^3$ 은 벤조산기, 아닐린기 또는 인돌기를 포함한다.  $-L^3-NH-$ 스페이서로서 역할을 할 수 있는 구조의 비-제한적인 예는 다음 구조를 포함한다:



[0440]

[0441] 여기서, Z는 O, S 및  $NR^{23}$  중에서 선택된 멤버이고,  $R^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 및 아실 중에서 선택된 멤버이다.

[0442]  $L^3$ 을 함유하는 본 발명의 링커의 절단 시에,  $L^3$  모이어티는 약물 D에 부착된 상태로 남는다. 따라서,  $L^3$  모이어티는 D에 대한 그의 부착이 D의 활성을 유의하게 변경시키지 않도록 선택된다. 다른 실시태양에서, 약물 D의 일부 자체가  $L^3$  스페이서로서 기능을 한다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 약물 D는 듀오카르마이신 유도체이고, 여기서 약물의 일부가  $L^3$  스페이서로서 기능을 한다. 그러한 실시태양의 비-제한적인 예는  $NH_2-(L^3)-D$ 가 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택된 구조를 갖는 것을 포함한다:



[0443]

[0444] 여기서, Z는 O, S 또는  $NR^{23}$  이고, 여기서  $R^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬,

또는 아실이고; 각각의 구조 상의  $\text{NH}_2$ 기는  $(\text{AA}^1)_c$ 와 반응하여  $-(\text{AA}^1)_c\text{-NH-}$ 를 형성한다.

[0445] 펩티드 서열  $(\text{AA}^1)_c$ .

[0446] 기  $\text{AA}^1$ 은 단일 아미노산, 또는 아미드 결합에 의해 함께 연결된 다수의 아미노산을 나타낸다. 아미노산은 천연 아미노산 및/또는 비-천연  $\alpha$ -아미노산일 수 있다. 이들은 L 또는 D 입체형상으로 존재할 수 있다. 한 실시태양에서, 적어도 3개의 상이한 아미노산이 사용된다. 다른 실시태양에서, 2개의 아미노산만이 사용된다.

[0447] 용어 "아미노산"은 자연 발생하는 아미노산 및 합성 아미노산, 및 자연 발생하는 아미노산과 유사한 방식으로 기능을 하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 나타낸다. 자연 발생하는 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩되는 아미노산, 및 나중에 변형된 아미노산, 예를 들어, 히드록시프롤린,  $\gamma$ -카복시글루타메이트, 시트룰린 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연 발생하는 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉, 수소, 카르복실기, 아미노기, 및 R기에 결합된  $\alpha$  탄소를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술포시드, 메티오닌 메틸 술포늄을 나타낸다. 그러한 유사체는 변형된 R기 (예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 갖지만, 자연 발생하는 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. 특히 사용될 수 있는 하나의 아미노산은 시트룰린이고, 이는 아르기닌에 대한 전구체이고 간에서 요소 형성에 관여한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반적인 화학 구조와 상이한 구조를 갖지만 자연 발생하는 아미노산과 유사한 방식으로 기능을 하는 화학적 화합물을 나타낸다. 용어 "비-천연 아미노산"은 상기 설명되는 20개의 자연 발생하는 아미노산의 "D" 입체화학 형태를 나타내도록 의도된다. 용어 비-천연 아미노산은 천연 아미노산의 상동체, 및 합성 방식으로 변형된 형태의 천연 아미노산을 포함하는 것으로 추가로 이해된다. 합성 방식으로 변형된 형태는 2개 이하의 탄소 원자에 의해 짧아지거나 길어진 알킬렌 사슬을 갖는 아미노산, 임의로 치환된 아릴기를 포함하는 아미노산, 및 할로젠화기, 바람직하게는 할로젠화 알킬 및 아릴기를 포함하는 아미노산을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 링커 또는 컨주게이트에 부착될 때, 아미노산은 "아미노산 측쇄" 형태이고, 여기서 아미노산의 카르복실산기는 케토 ( $\text{C}(\text{O})$ )기로 교체되었다. 따라서, 예를 들어 알라닌 측쇄는  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_3$  등이다.

[0448] 펩티드 서열  $(\text{AA}^1)_c$ 는 기능적으로 단일 아미노산의 아미드화 잔기 ( $c=1$ 인 경우), 또는 아미드 결합에 의해 함께 연결된 다수의 아미노산이다. 펩티드 서열  $(\text{AA}^1)_c$ 는 바람직하게는 생물학적 시스템 내에서 관심있는 위치에서 효소에 의한 효소 촉매된 절단을 위해 선택된다. 예를 들어, 세포에 표적화되지만 세포에 의해 내재화되지 않는 컨주게이트에 대해서, 세포의 매트릭스 내의 프로테아제, 예를 들어, 근처의 사멸하는 세포에 의해 방출된 프로테아제 또는 중앙-연관 프로테아제에 의해 절단되는 펩티드가 선택되어, 펩티드는 세포 외에서 절단된다. 세포에 의해 내재화하도록 설계된 컨주게이트에 대해서, 서열  $(\text{AA}^1)_c$ 는 바람직하게는 엔도솜 또는 리소솜 프로테아제에 의한 절단을 위해 선택된다. 펩티드 내에 있는 아미노산의 수는 1 내지 20개일 수 있지만; 보다 바람직하게는  $(\text{AA}^1)_c$ 를 포함하는 1-8개의 아미노산, 1-6개의 아미노산, 또는 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산이 존재할 것이다. 특정한 효소 또는 효소의 클래스에 의한 절단에 감수성인 펩티드 서열은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0449] 바람직하게는,  $(\text{AA}^1)_c$ 는 프로테아제에 의한 절단 부위인 아미노산 서열 ("절단 인식 서열")을 함유한다. 많은 프로테아제 절단 서열은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, [Matayoshi et al. Science 247: 954 (1990)]; [Dunn et al. Meth. Enzymol. 241:254 (1994)]; [Seidah et al. Meth. Enzymol. 244:175 (1994)]; [Thornberry, Meth. Enzymol. 244:615 (1994)]; [Weber et al. Meth. Enzymol. 244:595 (1994)]; [Smith et al. Meth. Enzymol. 244:412 (1994)]; [Bouvier et al. Meth. Enzymol. 248:614 (1995)], [Hardy et al., in Amyloid Protein Precursor in Development, Aging, and Alzheimer's Disease, ed. Masters et al. pp. 190-198 (1994)] 참조).

[0450] 펩티드는 일반적으로 3-12개 (이상)의 아미노산을 포함한다. 특정 아미노산의 선택은 적어도 부분적으로 펩티드를 절단하기 위해 사용할 효소, 및 생체 내에서 펩티드의 안정성에 따라 결정될 것이다. 적합한 절단가능한 펩티드의 한 예는  $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (서열 27)이다. 이는 안정화기와 결합하여 숙시닐- $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (서열 30)을 형성할 수 있다. 적합한 절단가능한 펩티드의 다른 예는 아래 인용된 참조문에서 제공된다. 별법으로, 그의 개시내용이 본원에 참고로 포함되는 WO 2008/103693에 개시된 바와 같이 단일 아미노산 잔기를 포함

하는 링커가 사용될 수 있다.

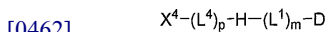
- [0451] 바람직한 실시태양에서, 펩티드 서열 (AA)<sup>1</sup><sub>c</sub>는 리소솜 프로테아제 (그의 예는 카텡신 B, C, D, H, L 및 S를 포함한다)에 의해 절단되는 그의 능력에 기초하여 선택된다. 바람직하게는, 펩티드 서열 (AA)<sup>1</sup><sub>c</sub>는 시험관 내에서 카텡신 B에 의해 절단될 수 있다. 카텡신 B는 리소솜 프로테아제이지만, 특정 농도가 종양 조직을 둘러싸는 세포 외 매트릭스에서 발견되는 것으로 생각된다.
- [0452] 다른 실시태양에서, 펩티드 서열 (AA)<sup>1</sup><sub>c</sub>는 종양-연관 프로테아제, 예를 들어 종양 세포 부근에서 세포 외에서 발견되는 프로테아제 (그의 예는 티메트 (thimet) 올리고펩티다제 (TOP) 및 CD10을 포함한다)에 의해 절단되는 그의 능력에 기초하여 선택된다. 또는 서열 (AA)<sup>1</sup><sub>c</sub>는 유로키나제 또는 트립타제에 의한 선택적 절단을 위해 설계된다.
- [0453] 하나의 예시적인 예로서, CD10 (네프리라이신, 중성 엔도펩티다제 (NEP), 및 일반적 급성 림프구성 백혈병 항원 (CALLA)으로도 알려짐)은 타입 II 세포-표면 아연-의존성 메탈로프로테아제이다. CD10과 함께 사용하기에 적합한 절단가능한 기질은 Leu-Ala-Leu 및 Ile-Ala-Leu를 포함한다.
- [0454] 또다른 예시적인 예는 기질 메탈로프로테아제 (MMP)에 기반한다. 아마도 종양과 연관된 가장 잘 특성이 결정된 단백분해 효소에서, 종양 미세환경 내에서 MMP의 활성화의 명백한 상호관계가 존재한다. 특히, 가용형 매트릭스 효소 MMP2 (젤라티나제 A) 및 MMP9 (젤라티나제 B)가 집중적으로 연구되었고, 종양 성장을 포함한 조직 재형성 동안 선택적으로 활성화되는 것으로 나타났다. MMP2 및 MMP9에 의해 절단되도록 설계된 펩티드 서열은 텍스트란 및 메토크세이트 (Chau et al., Bioconjugate Chem. 15:931-941 (2004)); PEG (폴리에틸렌 글리콜) 및 독소루비신 (Bae et al., Drugs Exp. Clin. Res. 29:15-23 (2004)); 및 알부민 및 독소루비신 (Kratz et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2001-2006 (2001))의 컨쥬게이트에 대해 설계되고 시험되었다. MMP와 함께 사용하기 위해 적합한 서열의 예는 Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly (서열 21), Gly-Pro-Leu-Gly-Val (서열 22), Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln (서열 23), Pro-Leu-Gly-Leu (서열 24), Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Leu-Ser-Gln (서열 25) 및 Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Gln (서열 26)을 포함하고 이로 제한되지 않는다 (예를 들어, 앞서 인용된 참조문 및 [Kline et al., Mol. Pharmaceut. 1:9-22 (2004)] 및 [Liu et al., Cancer Res. 60:6061-6067 (2000)] 참조).
- [0455] 또다른 예는 타입 II 막횡단 세린 프로테아제이다. 이 군의 효소는 예를 들어, 헵신, 테스티신, 및 TMPRSS4를 포함한다. Gln-Ala-Arg가 마트립타제/MT-SP1 (유방암 및 난소암에서 과다발현되는)을 사용할 때 유용한 하나의 기질 서열이고, Leu-Ser-Arg는 헵신 (전립선암 및 몇몇 다른 종양 종류에서 과다발현되는)을 사용할 때 유용하다 (예를 들어, [Lee et al., J. Biol. Chem. 275:36720-36725] 및 [Kurachi and Yamamoto, Handbook of Proeolytic Enzymes Vol. 2, 2<sup>nd</sup> edition (Barrett AJ, Rawlings ND & Woessner JF, eds) pp. 1699-1702 (2004)] 참조).
- [0456] 본 발명의 컨쥬게이트에서 사용하기에 적합한 펩티드 서열의 적합하지만 비-제한적인 예는 Val-Cit, Cit-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N<sup>9</sup>-토실-Arg, Phe-N<sup>9</sup>-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu (서열 27), Gly-Phe-Leu-Gly (서열 28), Val-Ala, Leu-Leu-Gly-Leu (서열 29), Leu-Asn-Ala 및 Lys-Leu-Leu를 포함한다. 바람직한 펩티드 서열은 Val-Cit 및 Val-Lys이다.
- [0457] 다른 실시태양에서, 약물 모이어티에 가장 가까이 위치하는 아미노산은 Ala, Asn, Asp, Cit, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 및 Val로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 또다른 실시태양에서, 약물 모이어티에 가장 가까이 위치하는 아미노산은 Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 및 Val로 이루어지는 군 중에서 선택된다.
- [0458] 당업자는 과도한 실험 없이도 본 발명에서 그들의 효용성을 결정하기 위해 펩티드 서열의 어레이를 쉽게 평가할 수 있다 (예를 들어, [Zimmerman, M., et al., (1977) Analytical Biochemistry 78:47-51]; [Lee, D. et al., (1999) Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9:1667-72]; 및 [Rano, T.A. et al., (1997) Chemistry and Biology 4:149-55] 참조).



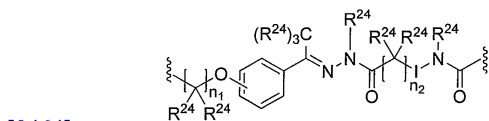
[0459] 본 발명의 컨쥬게이트는 임의로 2개 이상의 링커를 함유할 수 있다. 이들 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 펩티딜 링커가 약물을 리간드에 연결시키기 위해 사용될 수 있고, 제2 펩티딜 링커가 진단제를 복합체에 부착시킬 수 있다. 추가의 링커에 대한 다른 용도는 분석제, 생체분자, 표적화제 및 검출가능한 표지를 항체-파트너 복합체에 연결시키는 것을 포함한다.

[0460] 히드라진 링커 (H)

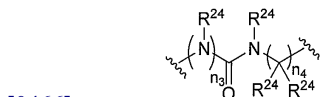
[0461] 다른 실시태양에서, 본 발명의 컨쥬게이트는 히드라진 자기 희생적 링커를 포함하고, 여기서 컨쥬게이트는 다음 구조를 갖는다:



[0463] 식에서, D, L<sup>1</sup>, L<sup>4</sup>, p, m 및 X<sup>4</sup>는 상기 정의한 바와 같고 본원에서 추가로 설명되며, H는 다음 구조를 갖는 링커이다:



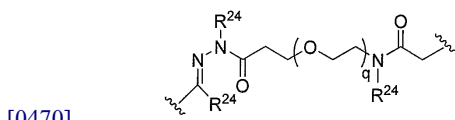
[0465] 여기서, n<sub>1</sub>은 1 - 10의 정수이고; n<sub>2</sub>는 0, 1 또는 2이고; 각각의 R<sup>24</sup>는 H, 치환된 알킬, 비치환된 알킬, 치환된 헤테로알킬, 및 비치환된 헤테로알킬로 이루어지는 군 중에서 독립적으로 선택된 멤버이고; I는 결합 (즉, 백본의 탄소와 인접 질소 사이의 결합)이거나 또는 하기 구조를 갖는 것이다:



[0467] 여기서, n<sub>3</sub>은 0 또는 1이되, n<sub>3</sub>이 0이면, n<sub>2</sub>는 0이 아니고; n<sub>4</sub>는 1, 2 또는 3이다.

[0468] 한 실시태양에서, 페닐 고리 상의 치환은 파라 치환이다. 바람직한 실시태양에서, n<sub>1</sub>은 2, 3 또는 4이거나, n<sub>1</sub>은 3이다. 바람직한 실시태양에서, n<sub>2</sub>는 1이다. 바람직한 실시태양에서, I는 결합 (즉, 백본의 탄소와 인접 질소 사이의 결합)이다. 한 측면에서, 히드라진 링커 H는 예를 들어 n<sub>3</sub>이 0이고 n<sub>4</sub>가 2인 경우에, 절단 시에 6원의 자기 희생적 링커를 형성할 수 있다. 다른 측면에서, 히드라진 링커 H는 절단 시에 2개의 5원의 자기 희생적 링커를 형성할 수 있다. 또 다른 측면에서, H는 5원의 자기 희생적 링커를 형성하거나, H는 7원의 자기 희생적 링커를 형성하거나, H는 절단 시에 5원의 자기 희생적 링커 및 6원의 자기 희생적 링커를 형성한다. 절단 속도는 절단 시에 형성된 고리의 크기에 의해 영향을 받는다. 따라서, 목적하는 절단 속도에 따라, 절단 시에 형성될 적절한 크기 고리가 선택될 수 있다.

[0469] 또다른 히드라진 구조 H는 다음 화학식을 갖는다:



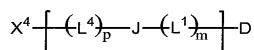
[0471] 식에서, q는 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고; 각각의 R<sup>24</sup>는 H, 치환된 알킬, 비치환된 알킬, 치환된 헤테로알킬, 및 비치환된 헤테로알킬로 이루어지는 군 중에서 독립적으로 선택된 멤버이다. 상기 히드라진 구조는 또한 5원, 6원, 또는 7원 고리를 형성할 수 있고, 추가의 성분이 첨가되어 다수의 고리를 형성할 수 있다.

[0472] 다양한 히드라진 링커의 제조, 절단 화학 및 고리화 운동학은 그의 개시내용이 본원에 참고로 포함되는 WO 2005/112919에 개시되어 있다.

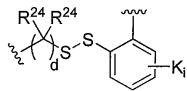
[0473] 디설피드 링커 (J)

[0474] 또다른 실시태양에서, 링커는 효소에 의해 절단가능한 디설피드기를 포함한다. 한 실시태양에서, 본 발명은 화

학식 (d)의 구조를 갖는 세포독성 항체-파트너 화합물을 제공한다:



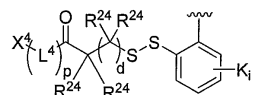
식에서, D,  $L^1$ ,  $L^4$ , p, m 및  $X^4$ 는 상기 정의한 바와 같고 본원에서 추가로 설명되고, J는 다음 구조의 기를 포함하는 디설피드 링커이다:



여기서, 각각의  $R^{24}$ 는 H, 치환된 알킬, 비치환된 알킬, 치환된 헤테로알킬, 및 비치환된 헤테로알킬로 이루어지는 군 중에서 독립적으로 선택된 멤버이고; 각각의 K는 치환된 알킬, 비치환된 알킬, 치환된 헤테로알킬, 비치환된 헤테로알킬, 치환된 아릴, 비치환된 아릴, 치환된 헤테로아릴, 비치환된 헤테로아릴, 치환된 헤테로시클로알킬, 비치환된 헤테로시클로알킬, 할로젠,  $NO_2$ ,  $NR^{21,22}$ ,  $NR^{21}COR^{22}$ ,  $CONR^{21,22}R$ ,  $OCOR^{21}$ , 및  $OR^{21}$ 로 이루어지는 군 중에서 독립적으로 선택되고, 여기서  $R^{21}$  및  $R^{22}$ 는 H, 치환된 알킬, 비치환된 알킬, 치환된 헤테로알킬, 비치환된 헤테로알킬, 치환된 아릴, 비치환된 아릴, 치환된 헤테로아릴, 비치환된 헤테로아릴, 치환된 헤테로시클로알킬 및 비치환된 헤테로시클로알킬로 이루어지는 군 중에서 독립적으로 선택되고; i는 0, 1, 2, 3 또는 4의 정수이고; d는 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 정수이다.

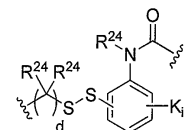
디설피드 링커의 방향족 고리는 하나 이상의 "K"기로 치환될 수 있다. "K"기는 고리 구조의 일부인 4개의 비치환된 탄소 중 하나에 부착된 수소를 교체하는 치환체이다. "K"기는 단일 원자, 예를 들어 할로젠일 수 있거나, 다수원자기, 예를 들어 알킬, 헤테로알킬, 아미노, 니트로, 히드록시, 알콕시, 할로알킬 및 시아노일 수 있다. 예시적인 K 치환체는 F, Cl, Br, I,  $NO_2$ , OH,  $OCH_3$ ,  $NHCOCH_3$ ,  $N(CH_3)_2$ ,  $NHCOCF_3$  및 메틸을 포함하고 이로 제한되지 않는다. "Ki"에서, i는 0, 1, 2, 3 또는 4의 정수이다. 특정한 실시태양에서, i는 0이다.

바람직한 실시태양에서, 링커는 다음 화학식의 효소에 의해 절단가능한 디설피드기를 포함한다:



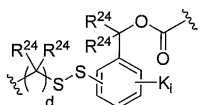
식에서,  $L^4$ ,  $X^4$ , p 및  $R^{24}$ 는 상기 설명된 바와 같고, d는 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 특정 실시태양에서, d는 1 또는 2이다.

보다 특정한 디설피드 링커는 아래 화학식에 제시된다:



바람직하게는, d는 1 또는 2이고, 각각의 K는 H이다.

또다른 디설피드 링커는 아래 화학식에 제시된다:



바람직하게는, d는 1 또는 2이고, 각각의 K는 H이다.

다양한 실시태양에서, 디설피드는 아민에 대해 오르쏘 (ortho) 위치이다. 또다른 특정한 실시태양에서, a는 0

이다. 바람직한 실시태양에서, R<sup>24</sup>는 H 및 CH<sub>3</sub> 중에서 독립적으로 선택된다.

[0490] 상기 설명된 것과 같은 디술피드 링커의 제조 및 사용은 그의 개시내용이 본원에 참고로 포함되는 WO 2005/112919에 개시되어 있다.

[0491] 세포독소의 종류, 링커 및 항체에 대한 치료제의 컨쥬게이션에 대한 추가의 논의에 대해서는 또한 각각 본원에 참고로 포함되는 US 7,087,600; US 6,989,452; US 7,129,261; US 2006/0004081; US 2006/0247295; WO 02/096910; WO 2007/051081; WO 2005/112919; WO 2007/059404; WO 2008/083312; WO 2008/103693; [Saito et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215]; [Trail et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337]; [Payne. (2003) Cancer Cell 3:207-212]; [Allen (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763]; [Pastan and Kreitman (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091]; [Senter and Springer (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264]을 참조한다.

[0492] 파트너 분자로서의 세포독소

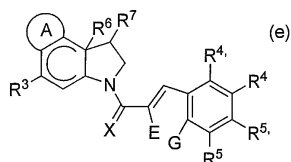
[0493] 한 측면에서, 본 발명은 파트너 분자, 예를 들어 세포독소, 약물 (예를 들어, 면역억제제) 또는 방사선 독소에 컨쥬게이팅된 항체를 특징으로 한다. 그러한 컨쥬게이트는 또한 "면역독소"로서 칭한다. 세포독소 또는 세포 독성제는 세포에 유해한 (예를 들어, 사멸시키는) 임의의 물질을 포함한다. 본원에서, "세포독소"는 전구약물 형태로 존재하고 생체 내에서 실제 독성 중으로 전환되는 화합물을 포함한다.

[0494] 본 발명의 파트너 분자의 예는 탁솔, 시토크알라신 B, 그라미시딘 D, 브롬화에티듬, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 퓨로마이신 및 그의 유사체 또는 상동체를 포함한다. 파트너 분자의 예는 또한 예를 들어, 대사길항물질 (예를 들어, 메토타렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 데카바진), 알킬화제 (예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 투볼리신, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 시스플라틴, 안트라사이클린 (예를 들어, 다우노루비신 (이전에 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어, 닥티노마이신 (이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신 (AMC)) 및 항-유사 분열제 (예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 포함한다. 본 발명의 항체에 컨쥬게이팅될 수 있는 파트너 분자의 다른 바람직한 예는 칼리케아미신, 메이탄신 및 오리스타틴, 및 그의 유도체를 포함한다.

[0495] 파트너 분자의 바람직한 예는 CC-1065 및 구조상 관련된 듀오카르마이신의 유사체 및 유도체이다. 그의 강력하고 넓은 항종양 활성에도 불구하고, CC-1065는 실험 동물에서 지연된 사망을 일으키므로 인간에서 사용될 수 없고, 이는 보다 우수한 치료 지수를 갖는 유사체 또는 유도체에 대한 탐색을 촉진하였다.

[0496] CC-1065 및 듀오카르마이신의 많은 유사체 및 유도체는 당업계에 공지되어 있다. 많은 화합물의 구조, 합성 및 특성에 대한 연구가 검토되었다 (예를 들어, [Boger et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 1438 (1996)]; 및 [Boger et al., Chem. Rev. 97: 787 (1997) 참조]. CC-1065 유사체 또는 유도체에 관련한 다른 개시문은 US 5,101,038; US 5,641,780; US 5,187,186; US 5,070,092; US 5,703,080; US 5,070,092; US 5,641,780; US 5,101,038; US 5,084,468; US 5,739,350; US 4,978,757, US 5,332,837 및 US 4,912,227; WO 96/10405; 및 EP 0,537,575 A1을 포함한다.

[0497] 특히 바람직한 측면에서, 파트너 분자는 다음 화학식 (e)의 구조를 갖는 CC-1065/듀오카르마이신 유사체이다:



[0498]

[0499] 식에서, 고리계 A는 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환된 헤테로 시클로알킬기 중에서 선택된 멤버이다. 예시적인 고리계 A는 페닐 및 피롤을 포함한다.

[0500] 기호 E 및 G는 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 헤테로원자, 단일 결합 (single bond) 중에서 독립적으로 선택되거나, E 및 G는 임의로 연결되어 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된

헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬 중에서 선택된 고리계를 형성한다.

[0501] 기호 X는 O, S 및  $\text{NR}^{23}$  중에서 선택된 멤버를 나타낸다.  $\text{R}^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 및 아실 중에서 선택된 멤버이다.

[0502] 기호  $\text{R}^3$ 은 (=O),  $\text{SR}^{11}$ ,  $\text{NHR}^{11}$  및  $\text{OR}^{11}$  중에서 선택된 멤버를 나타내고, 여기서  $\text{R}^{11}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 술포네이트, 아실,  $\text{C(O)R}^{12,13}$ ,  $\text{C(O)OR}^{12}$ ,  $\text{C(O)NR}^{12,13}$ ,  $\text{P(O)(OR}^{12})_2$ ,  $\text{C(O)CHR}^{12,13}$ ,  $\text{SR}^{12}$  또는  $\text{SiR}^{12,13,14}$ 이다. 기호  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$  및  $\text{R}^{14}$ 는 독립적으로 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 및 치환 또는 비치환된 아릴을 나타내고, 여기서  $\text{R}^{12}$  및  $\text{R}^{13}$ 은 그들이 부착한 질소 또는 탄소 원자와 함께 임의로 연결되어 4 내지 6개의 멤버를 갖고, 임의로 2개 이상의 헤테로원자를 함유하는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬 고리계를 형성한다.

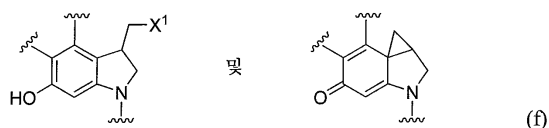
[0503]  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^5$  및  $\text{R}^{5'}$ 는 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬, 할로젠,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NR}^{15,16}$ ,  $\text{NC(O)R}^{15}$ ,  $\text{OC(O)NR}^{15,16}$ ,  $\text{OC(O)OR}^{15}$ ,  $\text{C(O)R}^{15}$ ,  $\text{SR}^{15}$ ,  $\text{OR}^{15}$ ,  $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ , 및  $\text{O(CH}_2)_n\text{N(CH}_3)_2$  (여기서 n은 1 내지 20의 정수임) 중에서 독립적으로 선택된 멤버이거나, 또는  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^5$  및  $\text{R}^{5'}$  중 임의의 인접한 쌍은 그들이 부착한 탄소 원자와 함께 연결되어 4 내지 6개의 멤버를 갖는 치환 또는 비치환된 시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬 고리계를 형성한다.  $\text{R}^{15}$  및  $\text{R}^{16}$ 은 독립적으로 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬, 및 치환 또는 비치환된 펩티드를 나타내고, 여기서  $\text{R}^{15}$  및  $\text{R}^{16}$ 은 그들이 부착한 질소 원자와 함께 임의로 연결되어 4 내지 6개의 멤버를 갖고, 임의로 2개 이상의 헤테로원자를 함유하는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬 고리계를 형성한다. 하나의 예시적인 구조는 아닐린이다.

[0504]  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^5$  및  $\text{R}^{5'}$  중 하나는 세포독소를 본원에 설명된 바와 같이 본 발명의 링커 또는 효소 절단가능한 기질에, 예를 들어 존재하는 경우에  $\text{L}^1$  또는  $\text{L}^3$ 에 또는 F, H 또는 J에 연결시킨다.

[0505]  $\text{R}^6$ 은 존재하거나 부재하는 단일 결합이다.  $\text{R}^6$ 이 존재하면,  $\text{R}^6$  및  $\text{R}^7$ 은 연결되어 시클로프로필 고리를 형성한다.  $\text{R}^7$ 은  $\text{CH}_2\text{-X}^1$  또는  $\text{-CH}_2\text{-}$ 이다.  $\text{R}^7$ 이  $\text{-CH}_2\text{-}$ 이면, 이는 시클로프로판 고리의 성분이다. 기호  $\text{X}^1$ 은 할로젠, 예를 들어 Cl, Br 또는 F와 같은 이탈기 (leaving group)를 나타낸다.  $\text{R}^6$  및  $\text{R}^7$ 의 조합은 화학 원자의 원리를 위반하지 않는 방식으로 해석된다.

[0506]  $\text{X}^1$ 은 임의의 이탈기일 수 있다. 유용한 이탈기는 할로젠, 아지드, 술포산 에스테르 (예를 들어, 알킬술포닐, 아릴술포닐), 옥소늄 이온, 알킬 퍼클로레이트, 암모니오알칸술포네이트 에스테르, 알킬플루오로술포네이트 및 플루오르화 화합물 (예를 들어, 트리플레이트, 노나플레이트, 트레실레이트) 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 이탈기로서 유용한 특정 할로젠은 F, Cl 및 Br이다.

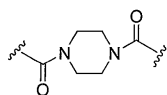
[0507] 6원 고리 내의 곡선은 고리가 하나 이상의 불포화도를 가질 수 있고, 방향족일 수 있음을 나타낸다. 따라서, 아래 제시된 것과 같은 고리 구조 및 관련 구조는 화학식 (f)의 범위 내에 있다:



[0508]

[0509] 한 실시태양에서,  $\text{R}^{11}$ 은 자가-고리화하지 않고 약물을 존재하는 경우에  $\text{L}^1$  또는  $\text{L}^3$ 에, 또는 F, H 또는 J에 연결하는 모이어티  $\text{X}^5$ 를 포함한다. 모이어티  $\text{X}^5$ 는 바람직하게는 효소를 이용하여 절단가능하고, 절단되는 경우에는 활성 약물을 제공한다. 한 예로서,  $\text{R}^{11}$ 은 다음 구조를 가질 수 있다 (우측이 약물의 나머지에 커플링된다):

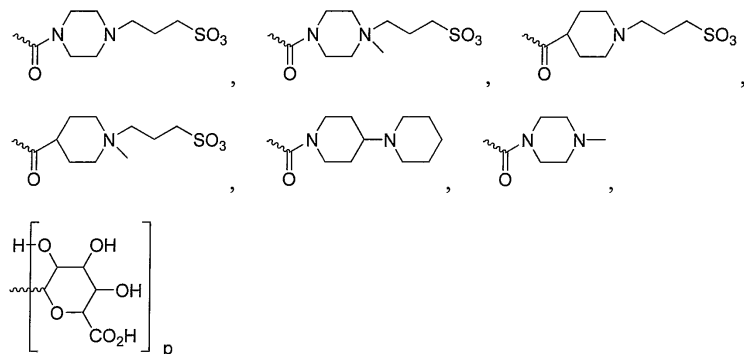




[0510]

[0511]

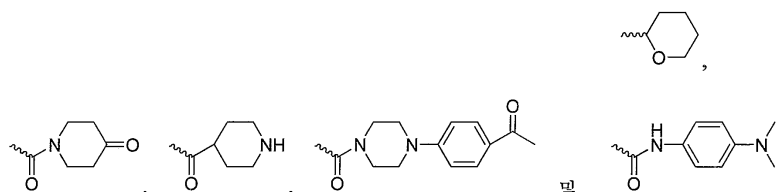
일부 실시태양에서,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$  중 적어도 하나는 상기 약물을 존재하는 경우에  $L^1$ 에, 또는 F, H, J 또는  $X^2$ 에 연결시키고,  $R^3$ 은  $SR^{11}$ ,  $NHR^{11}$  및  $OR^{11}$  중에서 선택된다.  $R^{11}$ 은  $-SO(OH)_2$ ,  $-PO(OH)_2$ ,  $-AA_n$ ,  $-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ,  $-C(O)OPhNH(AA)_m$ ,



[0512]

[0513]

또는 임의의 다른 당 또는 당들의 조합,



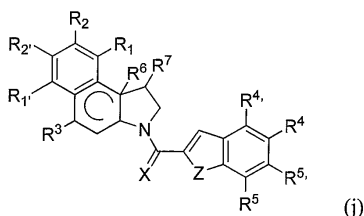
[0514]

[0515]

및 그의 제약상 허용되는 염 중에서 선택되고, 여기서 n은 1 내지 10의 임의의 정수이고, m은 1 내지 4의 임의의 정수이고, p는 1 내지 6의 임의의 정수이고, AA는 임의의 천연 또는 비-천연 아미노산이다. 화학식 (e)의 화합물이  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$  또는  $R^{5'}$ 을 통해 컨쥬게이팅되는 경우에,  $R^3$ 은 바람직하게는 절단가능한 차단기를 포함하고, 상기 절단가능한 차단기의 존재는 화합물의 세포독성 활성을 차단하지만, 세포독소를 항체에 컨쥬게이팅하는 링커를 절단하기 위한 것과는 상이한 메카니즘에 의해 의도된 작용 부위에서 발견되는 조건 하에 절단가능하다. 상기 방식으로, 혈장 내에서 컨쥬게이트의 우발적인 절단이 존재하는 경우에, 차단기는 방출된 세포독소의 세포독성을 약화시킨다. 예를 들어, 컨쥬게이트가 히드라존 또는 디술피드 링커를 가지면, 차단기는 효소에 의해 절단가능한 아마이드일 수 있다. 또는, 링커가 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커이면, 차단기는 카르복시에스테라제에 의해 절단가능한 에스테르 또는 카르바메이트일 수 있다.

[0516]

예를 들어, 바람직한 실시태양에서, D는 구조 (j)를 갖는 세포독소이다:



[0517]

[0518]

상기 구조에서,  $R^3$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5'}$  및 X는 화학식 (e)에 대해 상기 설명된 바와 같다. Z는 O, S 및  $NR^{23}$  중에서 선택된 멤버이고, 여기서  $R^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 및 아실 중에서 선택된 멤버이다.

[0519]

$R^1$ 은 H, 치환 또는 비치환된 저급 알킬,  $C(O)R^8$ , 또는  $CO_2R^8$ 이고, 여기서  $R^8$ 은  $NR^9R^{10}$  및  $OR^9$  중에서 선택된 멤버

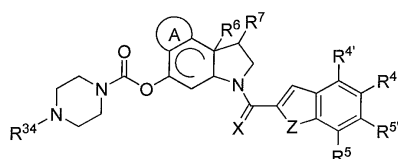
이고, 여기서  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 및 치환 또는 비치환된 헤테로알킬 중에서 독립적으로 선택된 멤버이다.

[0520]  $R^{1'}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 저급 알킬, 또는  $C(O)R^8$ 이고, 여기서  $R^8$ 은  $NR^9R^{10}$  및  $OR^9$  중에서 선택된 멤버이고, 여기서  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 및 치환 또는 비치환된 헤테로알킬 중에서 독립적으로 선택된 멤버이다.

[0521]  $R^2$ 은 H, 또는 치환 또는 비치환된 저급 알킬, 또는 비치환된 헤테로알킬 또는 시아노 또는 알콕시이고;  $R^{2'}$ 은 H, 또는 치환 또는 비치환된 저급 알킬, 또는 비치환된 헤테로알킬이다.

[0522]  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$  또는  $R^{5'}$  중 하나는 세포독소를 존재하는 경우에  $L^1$  또는  $L^3$ 에, 또는 F, H, 또는 J에 연결한다.

[0523] 추가의 실시태양은 다음 화학식을 갖는다:



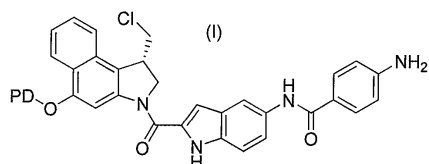
[0524]

[0525] 상기 구조에서, A,  $R^6$ ,  $R^7$ , X,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$ 는 화학식 (e)에 대해 상기 설명된 바와 같다. Z는 O, S 및  $NR^{23}$  중에서 선택된 멤버이고, 여기서  $R^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 및 아실 중에서 선택된 멤버이고;

[0526]  $R^{34}$ 는  $C(=O)R^{33}$  또는  $C_1-C_6$  알킬이고, 여기서  $R^{33}$ 은 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬, 할로젠,  $NO_2$ ,  $NR^{15,16}$ ,  $NC(O)R^{15}$ ,  $OC(O)NR^{15,16}$ ,  $OC(O)OR^{15}$ ,  $C(O)R^{15}$ ,  $SR^{15}$ ,  $OR^{15}$ ,  $CR^{15}=NR^{16}$ , 및  $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$  (여기서, n은 1 내지 20의 정수임)로부터 선택된다.  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 독립적으로 H, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬, 및 치환 또는 비치환된 펩티드를 나타내고, 여기서  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 그들이 부착한 질소 원자와 함께 임의로 연결되어, 4 내지 6개의 멤버를 갖고, 임의로 2개 이상의 헤테로원자를 함유하는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬 고리계를 형성한다.

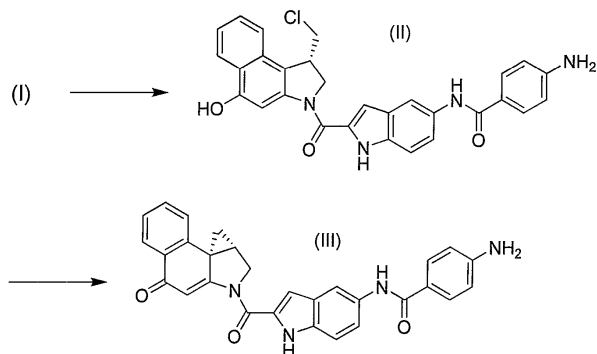
[0527] 바람직하게는, A는 치환 또는 비치환된 페닐 또는 치환 또는 비치환된 피롤이다. 또한,  $R^{11}$ 에 대해 본원에 기재되는 치환체의 임의의 선택은 또한  $R^{33}$ 에 적용가능하다.

[0528] 바람직한 파트너 분자는 하기 화학식 (I)로 표시되는 구조를 갖는다



[0529]

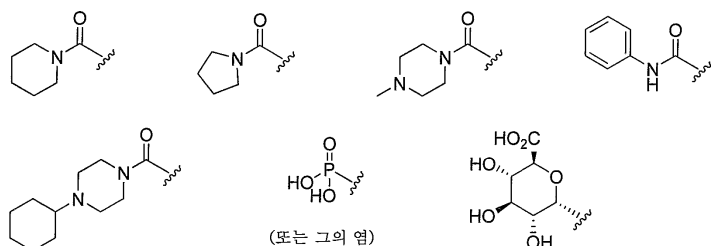
[0530] 화학식 (I)에서, PD는 전구약물기 (때때로 보호기로도 칭함)를 나타낸다. 화합물 (I)은 계내에서 가수분해되어 (바람직하게는 효소에 의해), 화학식 (II)의 화합물을 방출한다. 당업자가 알 수 있는 바와 같이, 화합물 (I)은 CBI 화합물로서 공지된 화합물의 클래스에 속한다 ([Boger et al., J. Org. Chem. 2001, 66, 6654-6661] 및 US 2005/0014700 A1 (2005, Boger et al.)). CBI 화합물은 계내에서 (또는 환자에게 투여될 때 생체 내에서) 화합물 (III)과 같은 그들의 시클로프로필 유도체로 전환되고, DNA의 마이너 그루브에 결합한 후, DNA를 아데닌기 상에서 알킬화시키고, 여기서 시클로프로필 유도체는 실제 알킬화 종인 것으로 생각된다.



[0531]

[0532]

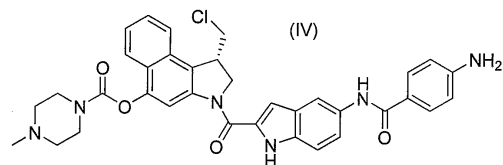
적합한 전구약물기 PD의 비-제한적인 예는 다음으로 예시되는 에스테르, 카르바메이트, 포스페이트 및 글리코시드를 포함한다:



[0533]

[0534]

바람직한 전구약물기 PD는 카르바메이트 (상기 처음 5개 구조로 예시됨) (카르복시에스테라제에 의해 가수분해 가능함); 포스페이트 (상기 6번째 구조) (알칼린 포스파타제에 의해 가수분해가능함), 및  $\beta$ -글루쿠론산 유도체 ( $\beta$ -글루쿠로니다제에 의해 가수분해가능함)이다. 구체적인 바람직한 파트너 분자는 하기 화학식 (IV)로 표시되는 카르바메이트 전구약물을 갖는 분자이다:



[0535]

[0536]

파트너 분자로서의 마커

[0537]

파트너 분자가 마커인 경우에는 검출가능한 물리적 또는 화학적 특성을 갖거나 생성할 수 있어서, 그에 의해 특정 조직 또는 세포 내의 그의 존재를 나타내는 임의의 모이어티일 수 있다. 마커 (때때로 리포터기로도 불림)는 면역분석, 생물학적 연구, 및 의학 진단 분야에서 충분히 개발되었다. 마커는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학, 전기, 광학 또는 화학적 수단에 의해 검출될 수 있다. 그 예로는 자기 비드 (예를 들어, DYNABEADS™), 형광 염료 (예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 텍사스 레드 (Texas red), 로다민 등), 방사성 표지 (예를 들어,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  또는  $^{32}\text{P}$ ), 효소 (예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타제 및 ELISA에서 일반적으로 사용되는 다른 것), 및 비색 표지, 예를 들어 콜로이드성 금 또는 착색 유리 또는 플라스틱 비드 (예를 들어, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등)를 포함한다.

[0538]

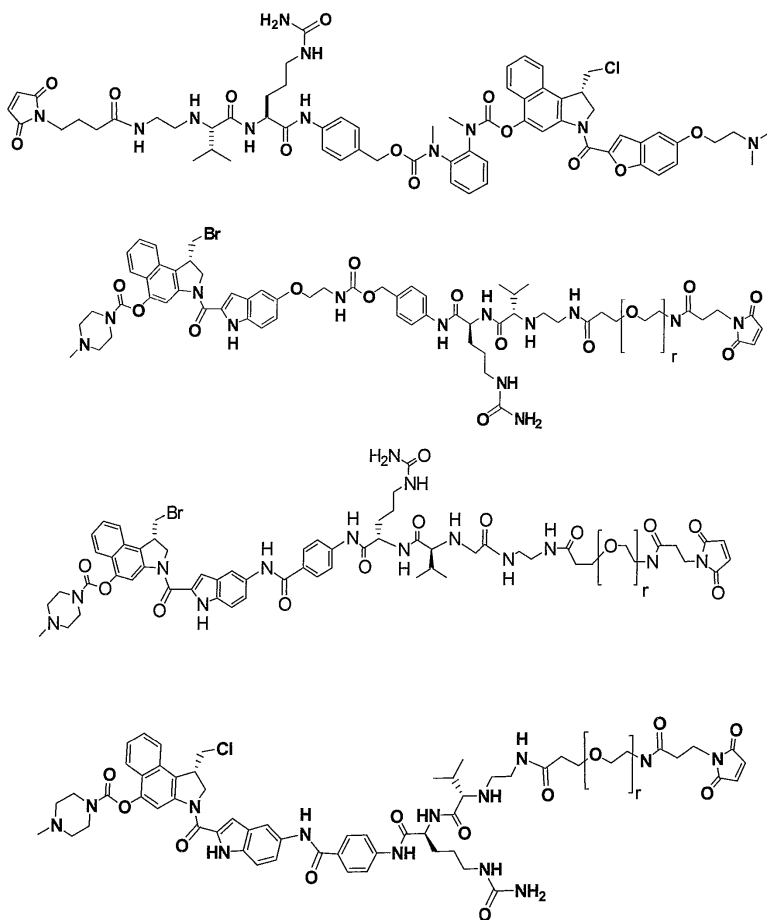
마커는 바람직하게는 방사성 동위원소, 형광제, 형광제 전구체, 발색체, 효소 및 그의 조합으로 이루어지는 군 중에서 선택된 멤버이다. 적합한 효소의 예는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타제,  $\beta$ -갈락토시다제, 및 글루코스 옥시다제이다. 형광제는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움벨리페론 등을 포함한다. 화학발광 화합물은 루시페린 및 2,3-디히드로프탈라진디온, 예를 들어, 루미놀을 포함한다. 사용할 수 있는 다양한 표지화 또는 신호 생산 시스템에 관한 검토를 위해 US 4,391,904를 참조한다.

[0539]

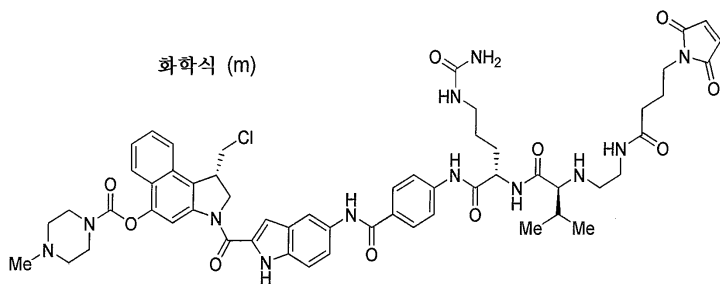
마커는 간접적 수단에 의해 부착될 수 있다: 리간드 분자 (예를 들어, 비오틴)는 항체에 공유 결합된다. 이어서, 리간드는 고유하게 검출가능하거나 신호 시스템, 예를 들어 검출가능한 효소, 형광 화합물, 또는 화학발광 화합물에 공유 결합되는 또다른 분자 (예를 들어, 스트렙타비딘)에 결합된다.

[0540] 컨쥬게이트의 예

[0541] 본 발명의 항체에의 컨쥬게이션에 적합한 파트너 분자-링커 조합의 구체적인 예를 다음에 제시한다:

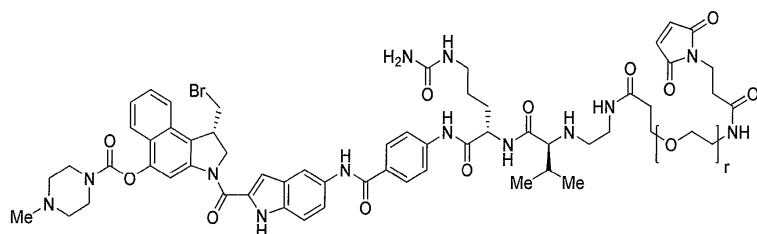


화학식 (m)

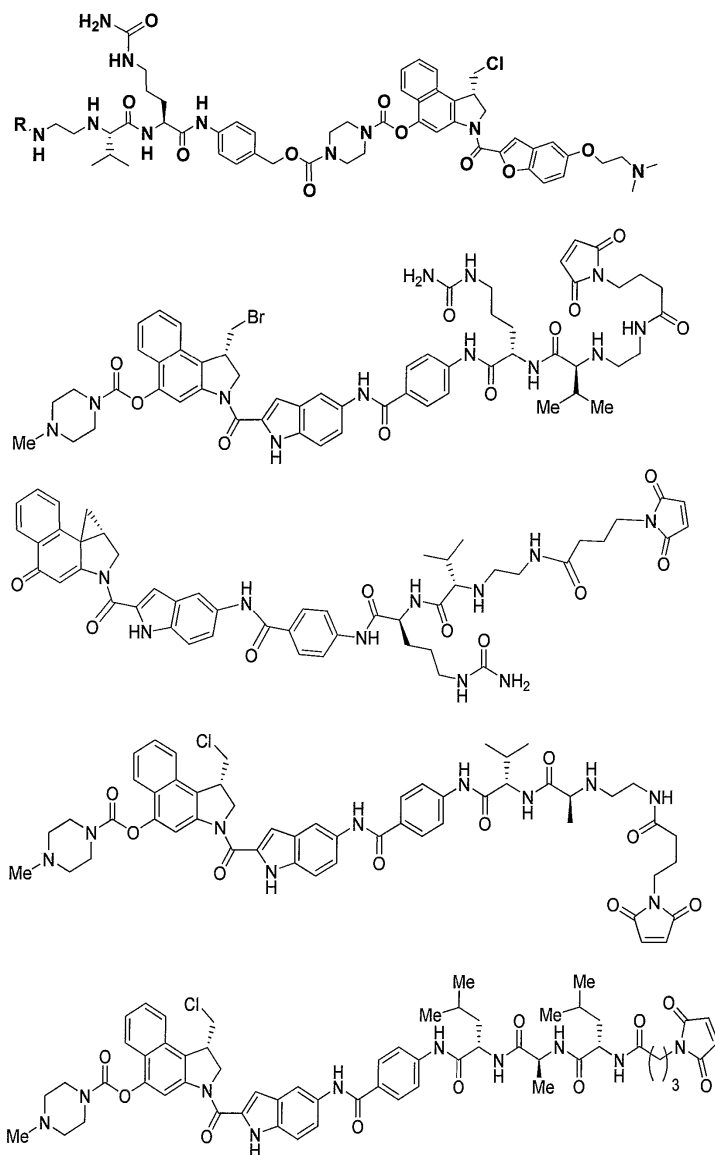


[0542]

[0543] 화학식 (o)를 아래에 제시한다:

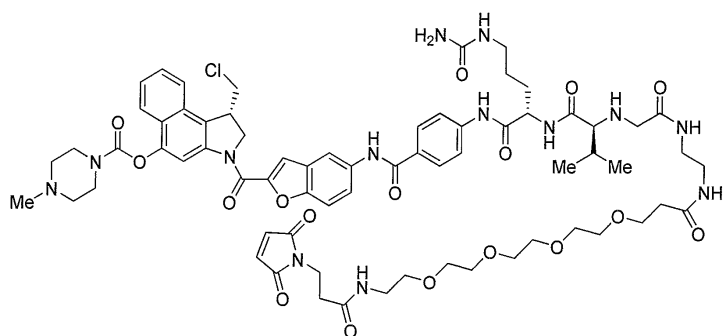
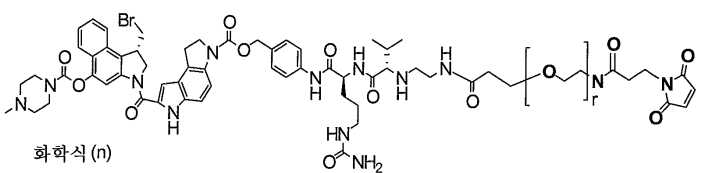
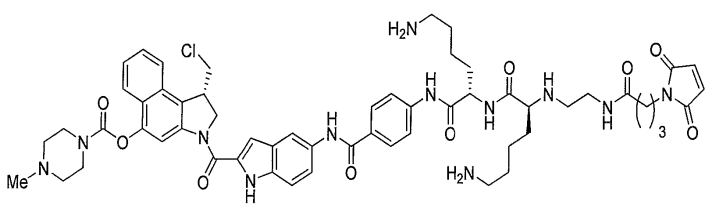
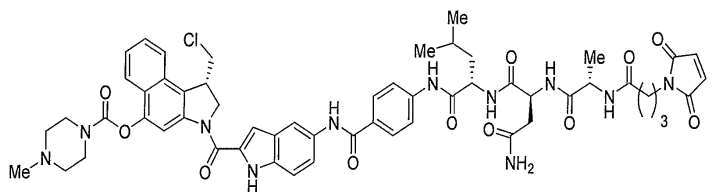
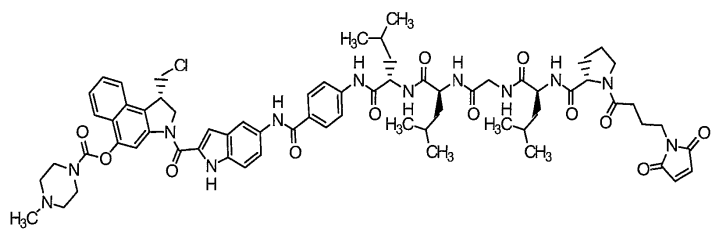


[0544]



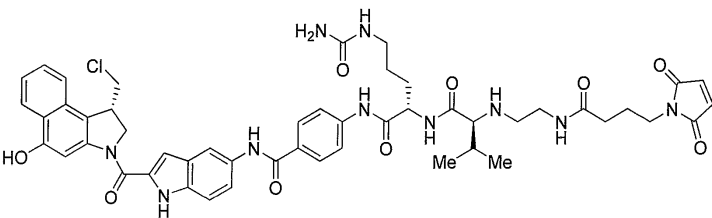
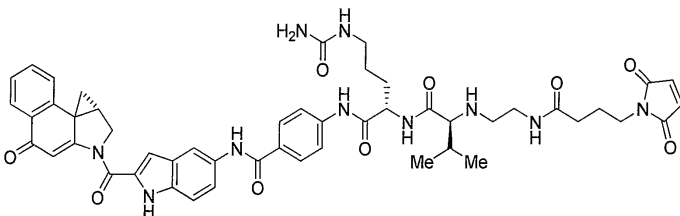
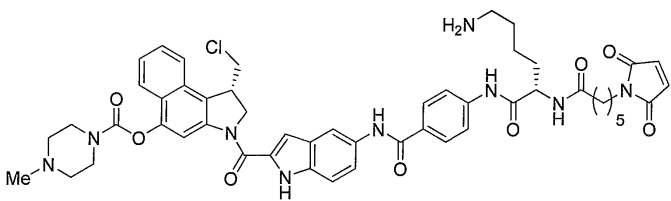
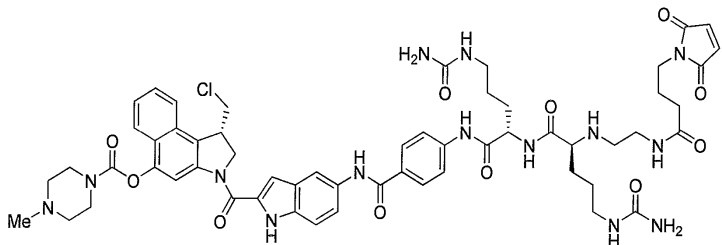
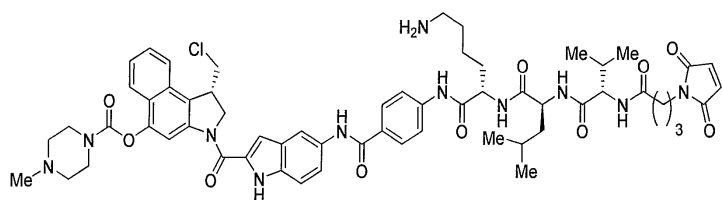
[0545]



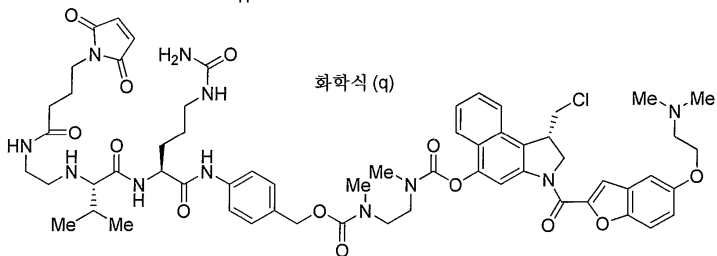
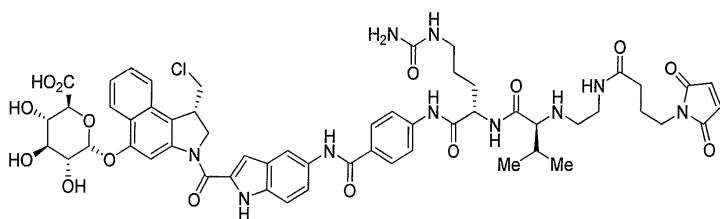


[0546]





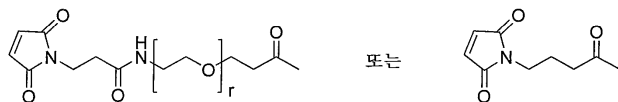
[0549]



[0550]

[0551]

상기 화합물에서, 아래첨자 r이 화학식 내에 존재하면, 이는 0 내지 24 범위의 정수이다. R은 존재할 때마다 다음 화학식의 것이다:



[0552]

[0553]

각각의 상기 화합물은 말레이미드기를 갖고, 항체의 술포히드릴기를 통해 항체에 컨쥬게이션될 수 있는 상태이다.

[0554]

#### 제약 조성물

[0555]

또다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 임의로 다른 활성 또는 불활성 성분과 함께 제형화된 본 발명의 컨쥬게이트를 함유하는 제약 조성물을 제공한다.

[0556]

본 발명의 제약 조성물은 또한 다른 물질과 조합 요법으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 적어도 하나의 다른 소염제 또는 면역억제제와 조합된 본 발명의 컨쥬게이트를 포함할 수 있다. 조합 요법으로 사용될 수 있는 치료제의 예는 아래에 보다 상세히 설명한다.

[0557]

본원에서 사용되는 바와 같이, "제약상 허용되는 담체"는 생리학상 적합성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅물, 향균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여를 위해 적합하다 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의해). 투여 경로에 따라, 활성 화합물은 산의 작용 및 화합물을 불활성화시킬 수 있는 다른 천연 조건으로부터 상기 화합물을 보호하는 물질 내에 코팅될 수 있다.

[0558]

본 발명의 제약 화합물은 하나 이상의 제약상 허용되는 염을 포함할 수 있다. "제약상 허용되는 염"은 모 화합물의 목적하는 생물학적 활성을 보유하고, 임의의 바람직하지 않은 독성학 효과를 나타내지 않는 염을 나타낸다 (예를 들어, [Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조). 그러한 염은 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 무독성 무기산, 예를 들어, 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등으로부터 유래하는 것과 무독성 유기산, 예를 들어, 지방족 모노카르복실산 및 디카르복실산, 페닐-치환 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등으로부터 유래하는 것을 포함한다. 염기 부가염은 알칼리성 토금속, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 마그네슘 및 칼슘 등으로부터 유래하는 것과 무독성 유기 아민, 예를 들어, N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유래하는 것을 포함한다.

[0559]

본 발명의 제약 조성물은 또한 제약상 허용되는 항산화제를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 항산화제의 예는 (1) 수용성 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 시스테인 염산염, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 유용성 항산화제, 예를 들어 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이팅제, 예를 들어 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함한다.

[0560]

적합한 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리에틸렌 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 혼합물, 식물유, 예를 들어 올리브유, 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트를 포함한다. 적합한 유동성은 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용하거나, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지하거나, 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

[0561]

조성물은 또한 보조제, 예를 들어, 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재를 예방하는 것은 멸균에 의해, 및 향균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등을 포함시킴으로써 보장될 수 있다. 또한, 등장제, 예를 들어 설탕 및 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것도 바람직할 수 있다. 또한, 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 주사가 가능한 제약 형태의 흡수를 연장시킬 수 있다.

[0562]

제약상 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 그러한 매질 및 물질의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 지금까지 임의의 통상적인 매질 또는 물질이 활성 화합물과 비혼화성인 점을 제외하면, 본 발명의 제약 조성물에서 그의 사용도 고려된다. 보충적인 활성 화합물이 또한 포함될 수 있다.

[0563]

치료 조성물은 일반적으로 멸균성이고, 제조 및 보관 조건 하에 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 정렬된 구조 물질로서 제형화될 수 있다. 담체는 예를 들어

물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 분산매 또는 용매일 수 있다. 적합한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅을 사용하거나, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지하거나, 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장제, 예를 들어, 설탕, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물 중에 포함시키는 것이 바람직한 것이다. 조성물 내에 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 주사가 가능한 조성물의 흡수를 연장시킬 수 있다.

[0564] 멸균 주사 용액은 필요에 따라 상기 나열한 성분들 중 하나 또는 이들의 조합물과 함께 적절한 용매 내에 요구되는 양의 활성 화합물을 포함시킨 후, 멸균 미세여과함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을, 기본 분산 매질 및 상기 나열한 것으로부터의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 포함시킴으로써 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 미리 멸균 여과시킨 그의 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 냉동-건조 (동결건조)이다.

[0565] 단일 투여 형태를 생산하기 위해 담체와 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료할 대상 및 특정 투여 방식에 따라 변할 것이고, 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 중에서 제약상 허용되는 담체와 조합으로 상기 양은 약 0.01% 내지 약 99%의 활성 성분, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 1% 내지 약 30%의 활성 성분일 것이다.

[0566] 투여 방식은 최적의 목적하는 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스 (bolus)가 투여될 수 있거나, 수회 분할 투여량이 시간에 걸쳐 투여될 수 있거나, 투여량은 치료 상황의 응급성에 따라 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 투여 용이성 및 용량 균일성을 위해 비경구 조성물을 단위 투여 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용될 때 단위 투여 형태는 치료할 대상에 대한 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 구분되는 단위를 나타내고; 여기서 각각의 단위는 요구되는 제약 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 단위 투여 형태의 상세한 내역은 (a) 활성 화합물의 특유한 특징 및 달성하려는 특정 치료 효과, 및 (b) 개체에서 민감성을 치료하기 위한 상기 활성 화합물의 화합 분야의 고유한 한계에 의해 설명되고 또한 이에 직접 의존한다.

[0567] 컨쥬게이트의 투여에 대해, 용량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 보다 대체로 0.01 내지 5 mg/kg (숙주 체중) 범위이다. 예를 들어, 용량은 0.3 mg/kg (체중), 1 mg/kg (체중), 3 mg/kg (체중), 5 mg/kg (체중) 또는 10 mg/kg (체중)일 수 있거나, 1-10 mg/kg 범위 내일 수 있다. 예시적인 치료 방식은 매주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 매달 1회, 3개월마다 1회, 또는 3 내지 6개월마다 1회 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 컨쥬게이트에 대한 바람직한 투여 방식은 정맥내 투여를 통해 1 mg/kg (체중) 또는 3 mg/kg (체중)로 투여하는 것을 포함하고, 여기에서, 컨쥬게이트는 다음 투여 스케줄 중 하나를 이용하여 제공된다: (i) 4주마다 6회 용량에 대해, 이어서, 3개월마다; (ii) 3주마다 투여; (iii) 3 mg/kg (체중)으로 1회, 이어서 3주마다 1 mg/kg (체중). 일부 방법에서, 용량은 약 1-1000  $\mu$ g/ml, 일부 방법에서는 약 25-300  $\mu$ g/ml의 혈장 컨쥬게이트 농도를 달성하도록 조정된다.

[0568] 별법으로, 항체는 지속 방출 제형으로서 투여될 수 있고, 이 경우에 덜 빈번한 투여가 요구된다. 용량 및 빈도는 환자에서 항체 반감기에 따라 변한다. 일반적으로, 인간 항체가 최장 반감기를 보이고, 이어서 인간화 항체, 키메라 항체, 및 비-인간 항체 순이다. 용량 및 투여 빈도는 처치가 예방 목적인지 치료 목적인지에 따라 변할 수 있다. 예방 용도에서, 비교적 낮은 용량이 장기간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여된다. 일부 환자는 나머지 생애 동안 계속하여 처치를 받는다. 치료 용도에서, 질병 진행이 감소하거나 종결될 때까지 및 바람직하게는 환자가 질병 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 보일 때까지 비교적 짧은 간격에서 비교적 고용량이 때때로 요구된다. 그 후에, 환자는 예방 방식으로 투여받을 수 있다.

[0569] 비정상적인 세포 증식에 관련된 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위해, 투여된 화합물의 순환 농도가 약 0.001  $\mu$ M 내지 20  $\mu$ M인 것이 바람직하고, 약 0.01  $\mu$ M 내지 5  $\mu$ M인 것이 바람직하다.

[0570] 본원에 설명되는 화합물의 경구 투여를 위한 환자 투여량은 일반적으로 약 1 mg/일 내지 약 10,000 mg/일, 보다 일반적으로 약 10 mg/일 내지 약 1,000 mg/일, 가장 일반적으로 약 50 mg/일 내지 약 500 mg/일이다. 환자 체중의 면에서 설명할 때, 전형적인 용량은 약 0.01 내지 약 150 mg/kg/일, 보다 일반적으로 약 0.1 내지 약 15 mg/kg/일, 가장 일반적으로 약 1 내지 약 10 mg/kg/일, 예를 들어 5 mg/kg/일 또는 3 mg/kg/일이다.

[0571] 일부 실시태양에서, 종양 성장을 지연 또는 억제하는 환자 투여량은 1  $\mu$ mol/kg/일 이하일 수 있다. 예를



들어, 환자 투여량은 0.9, 0.6, 0.5, 0.45, 0.3, 0.2, 0.15 또는 0.1  $\mu\text{mol/kg/일}$  이하일 수 있다 (약물의 물을 참조함). 바람직하게는, 항체-약물 컨쥬게이트는 적어도 5일에 걸쳐 매일 용량으로 투여될 때 종양 성장을 지연시킨다. 적어도 일부 실시태양에서, 종양은 SCID 마우스 내의 인간형 종양이다. 한 예로서, SCID 마우스는 CB17.SCID 마우스 (타코닉 (Taconic, 미국 뉴욕주 저먼타운)으로부터 이용가능함)일 수 있다.

[0572] 실제 용량 수준은 환자에게 독성을 미치지 않으면서 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 목적하는 치료 반응을 달성하기 위해 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 변할 수 있다. 선택된 용량 수준은 사용되는 특정 조성물 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 배설 속도, 치료 지속 기간, 사용되는 특정 조성물과 조합으로 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강 및 이전의 약물력 등의 인자를 포함한 다양한 약동학적 인자에 따라 결정될 것이다.

[0573] 본 발명의 컨쥬게이트의 "치료 유효 용량"은 바람직하게는 질병 증상의 중증도 감소, 질병 증상이 없는 기간의 빈도 및 지속 기간 증가, 및/또는 질병 이환으로 인한 손상 또는 장애의 예방을 일으킨다. 예를 들어, 종양 치료에 대해, "치료 유효 용량"은 바람직하게는 비처리 대상에 비해 세포 성장 또는 종양 성장을 적어도 약 20%, 보다 바람직하게는 적어도 약 40%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 60%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 80% 억제한다. 종양 성장을 억제하는 컨쥬게이트의 능력은 인간 종양에서 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가할 수 있다. 별법으로, 조성물의 이러한 특성은 세포 성장을 억제하는 그의 능력을 검사함으로써 평가할 수 있고, 그러한 능력은 당업자에게 공지된 분석에 의해 시험관 내에서 측정가능하다. 치료 유효량의 치료 화합물은 종양 크기를 감소시키거나, 달리 대상에서 증상을 개선할 수 있다. 당업자는 대상의 체격, 증상의 중증도, 및 선택된 특정 조성물 또는 투여 경로와 같은 인자에 기초하여 그러한 양을 결정할 수 있다.

[0574] 본 발명의 컨쥬게이트는 당업계에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 이용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자가 이해할 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 변할 것이다. 본 발명의 항체에 대한 바람직한 투여 경로는 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 피하, 척수 또는 다른 비경구 투여 경로를 포함한다. 어구 "비경구 투여"는 본원에서 사용될 때 대체로 주사에 의한, 장내 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 비제한적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 정맥내, 피막내, 안와내, 심장내, 피부내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 거미막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 별법으로, 본 발명의 조성물은 비-비경구 경로를 통해, 예를 들어 국소, 표피 또는 점막 투여 경로로, 예를 들어, 비내, 경구, 질내, 직장내, 설하 또는 국소로 투여될 수 있다.

[0575] 활성 화합물은 화합물이 이르게 방출하는 것을 막아줄 담체를 사용하여, 예를 들어, 제어 방출 제형, 임플란트 (implant), 경피 패취 및 미세캡슐화 전달 시스템으로서 제조될 수 있다. 생분해성 생체적합성 중합체, 예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이트, 다가 무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

[0576] 치료 조성물은 당업계에 공지된 의학 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 치료 조성물은 US 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; 또는 4,596,556에 개시된 것과 같은 무침 (needleless) 피하 주사 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 다른 적합한 장치의 예는 US 4,487,603; US 4,486,194; US 4,447,233; US 4,447,224; US 4,439,196; 및 US 4,475,196에 개시된 것을 포함한다. 이들 특허는 본원에 참고로 포함된다.

[0577] 특정 실시태양에서, 본 발명의 컨쥬게이트는 생체 내에서 적합한 분포를 보장하도록 제형화될 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽 (BBB)은 많은 고도의 친수성 화합물을 차단한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 가로지르도록 (원하는 경우에) 보장하기 위해, 이들을 예를 들어, 리포솜 내에 제형화할 수 있다. 리포솜의 제조 방법에 대해서는 예를 들어, US 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331을 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 장기 내로 선택적으로 수송되어, 표적화된 약물 전달을 향상시키는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다 (예를 들어, [V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685] 참조). 예시적인 표적화 모이어티는 플레이트 또는 비오틴 (예를 들어, US 5,416,016 (Low et al) 참조); 만노시드 (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 항체 ([P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140]; [M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]); 계면활성 단백질 A 수용체 (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)을 포함하고; 또한 문헌 ([K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123]; [J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273]을 참조한다.

[0578] 본 발명의 용도 및 방법

[0579] 본 발명의 항체, 항체 조성물 및 방법은 PTK7 매개된 질환의 진단 및 치료를 포함한, 많은 시험관내 및 생체내 진단 및 치료 효용성을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다. 예를 들어, 이들 분자는 다양한 질환을 치료, 예방 및 진단하기 위해 배양액 내에서, 시험관 내에서 또는 생체 외에서 세포에, 또는 인간 대상에게, 예를 들어, 생체 내에서 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상"은 인간 및 비-인간 동물을 포함하도록 의도된다. 비-인간 동물은 모두 척추동물, 예를 들어, 포유동물 및 비-포유동물, 예를 들어 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 바람직한 대상은 PTK7 활성화에 의해 매개되는 질환이 있는 인간 환자를 포함한다. 본 발명의 방법은 비정상적 PTK7 발현과 연관된 질환이 있는 인간 환자를 치료하기 위해 특히 적합하다. PTK7에 대한 항체를 다른 물질과 함께 투여할 때, 2가지 물질은 임의의 순서로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0580] PTK7에 대한 본 발명의 항체의 특이적 결합을 감안하면, 본 발명의 항체는 세포 표면 상의 PTK7 발현을 특이적으로 검출하기 위해 사용될 수 있고, 또한, 면역친화도 정제를 통해 PTK7을 정제하기 위해 사용될 수 있다.

[0581] 본 발명은 항체 또는 그의 일부와 인간 PTK7 사이에서 복합체 형성을 허용하는 조건 하에 샘플 및 대조 샘플을 인간 PTK7에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부와 접촉시키는 것을 포함하는, 샘플 내에서 인간 PTK7 항원의 존재를 검출하거나 인간 PTK7 항원의 양을 측정하는 방법을 추가로 제공한다. 이어서, 복합체 형성이 검출되고, 여기서 대조 샘플에 비해 샘플 사이의 복합체 형성 차이는 샘플 내에 인간 PTK7 항원의 존재를 표시한다.

[0582] PTK7은 결장 암종 유래 세포주에서 발현되지만, 인간 성인 결장 조직에서는 발현되는 것으로 밝혀지지 않았다 (Mossie et al. (1995) Oncogene 11:2179-84). PTK7 발현은 또한 일부 흑색종 세포주 및 흑색종 생검에서 보였다 (Easty, et al. (1997) Int. J. Cancer 71:1061-5). 또한, PTK7은 급성 골수성 백혈병 샘플에서 매우 과다발현된 것으로 밝혀졌다 (Muller-Tidow et al., (2004) Clin. Cancer Res. 10:1241-9). 항-PTK7 항체는 암성 종양의 성장을 억제하기 위해 단독으로 사용될 수 있다. 별법으로, 항-PTK7 항체는 아래 설명되는 바와 같이 다른 면역원성 물질, 표준 암 치료 또는 다른 항체와 함께 사용될 수 있다.

[0583] 그의 성장이 본 발명의 항체를 사용하여 억제될 수 있는 바람직한 암은 면역요법에 일반적으로 반응성인 암을 포함한다. 치료를 위해 바람직한 암의 비제한적인 예는 결장암 (소장암 포함), 폐암, 유방암, 췌장암, 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 급성 골수성 백혈병, 신장암, 방광암, 난소암 및 전립선암을 포함한다. 본 발명의 방법을 사용하여 치료할 수 있는 다른 암의 예는 신장암 (예를 들어, 신장 세포암종), 아교모세포종, 뇌종양, 급성 림프성 백혈병 (ALL), 성인 T-세포 백혈병 (T-ALL), 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병을 비롯한 만성 또는 급성 백혈병, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종, 림프성 림프종, 원발성 CNS 림프종, T-세포 림프종, 버킷 림프종, 퇴행성 대세포 림프종 (ALCL), 피부 T-세포 림프종, 결절성 소분할-세포 림프종, 말초 T-세포 림프종, 레너트 림프종, 면역모세포 림프종, T-세포 백혈병/림프종 (ATLL), 중심모세포/중심세포 (cb/cc) 소포 림프종암, B 계통 미만성 대세포 림프종, 혈관면역모구성 림프절증 (AILD)-유사 T 세포 림프종 및 HIV 관련 체강계 림프종), 배아암종, 미분화성 비강인두 암종 (예를 들어, 슈민케 종양), 캐슬먼 병, 카포시 육종, 다발 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 및 다른 B-세포 림프종, 비강인두 암종, 골암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구내 악성 흑색종, 자궁암, 직장암, 항문 부위의 암, 위암, 고환암, 자궁암, 자궁관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 소아기 고형 종양, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우암종, 중추 신경계 (CNS) 신생물, 종양 혈관신생, 척추축 종양, 뇌간 신경아교종, 뇌하수체 선종, 표피양암, 편평세포암, 석면에 의해 유도된 것을 비롯한 환경 유발암, 예를 들어, 중피종 및 상기 암의 조합을 포함한다.

[0584] 또한, 다양한 종양 세포 상의 PTK7의 발현을 고려하면, 본 발명의 인간 항체, 항체 조성물 및 방법은 종양 형성 질환, 예를 들어, PTK7을 발현하는 종양 세포의 존재를 특징으로 하는 질환, 예를 들어, 결장암 (소장암 포함), 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 급성 골수성 백혈병, 폐암, 유방암, 방광암, 췌장암, 난소암 및 전립선암이 있는 대상을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 종양 형성 질환이 있는 다른 대상의 예는 신장암 (예를 들어, 신장 세포암종), 아교모세포종, 뇌종양, 급성 림프성 백혈병 (ALL), 성인 T-세포 백혈병 (T-ALL), 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병을 비롯한 만성 또는 급성 백혈병, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종, 림프성 림프종, 원발성 CNS 림프종, T-세포 림프종, 버킷 림프종, 퇴행성 대세포 림프종 (ALCL), 피부 T-세포 림프종, 결절성 소분할-세포 림프종, 말초 T-세포 림프종, 레너트 림프종, 면역모

세포 림프종, T-세포 백혈병/림프종 (ATLL), 중심모세포/중심세포 (cb/cc) 소포 림프종암, B 계통 미만성 대세포 림프종, 혈관면역모구성 림프절증 (AILD)-유사 T 세포 림프종 및 HIV 관련 체강계 림프종), 배아암종, 미분화성 비강인두 암종 (예를 들어, 슈민케 종양), 캐슬먼 병, 카포시 육종, 다발 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 및 다른 B-세포 림프종, 비강인두 암종, 골암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구내 악성 흑색종, 자궁암, 직장암, 항문 부위의 암, 위암, 고환암, 자궁암, 자궁관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 소아기 고형종양, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우암종, 중추 신경계 (CNS) 신생물, 종양 혈관신생, 척추축 종양, 뇌간 신경아교종, 뇌하수체 선종, 표피양 암, 편평세포암, 석면에 의해 유도된 것을 비롯한 환경 유발암, 예를 들어, 중피종 및 상기 암의 조합이 있는 대상을 포함한다.

[0585] 따라서, 한 실시태양에서, 본 발명은 대상에게 치료 유효량의 항-PTK7 항체 또는 그의 항원 결합부를 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 종양 세포 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 항체는 인간 항-PTK7 항체 (예를 들어 본원에 설명되는 임의의 인간 항-인간 PTK7 항체)이다. 추가로 또는 별법으로, 항체는 키메라 또는 인간화 항-PTK7 항체일 수 있다.

[0586] 한 실시태양에서, 본 발명의 항체 (예를 들어, 인간 모노클로날 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 조성물)는 PTK7의 수준, 또는 그들의 막 표면 상에 PTK7을 함유하는 세포의 수준을 검출하기 위해 사용될 수 있고, 이어서 상기 수준을 특정 질병 증상에 연관시킬 수 있다. 별법으로, 항체는 PTK7 기능을 억제 또는 차단하기 위해 사용될 수 있고, 이는 차례로 특정 질병 증상의 예방 또는 개선에 연관되어, PTK7을 질병의 매개자로서 암시할 수 있다. 이것은 항체와 PTK7 사이에서 복합체 형성을 허용하는 조건 하에 실험 샘플 및 대조 샘플을 항-PTK7 항체와 접촉시킴으로써 달성할 수 있다. 항체 및 PTK7 사이에서 형성된 임의의 복합체를 검출하고, 실험 샘플 및 대조군에서 비교한다.

[0587] 다른 실시태양에서, 본 발명의 항체 (예를 들어, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 조성물)는 처음에 시험관 내에서 치료 또는 진단 용도와 연관된 결합 활성에 대해 시험될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 아래 실시예에서 설명되는 유동 세포측정 분석을 사용하여 시험할 수 있다.

[0588] 본 발명의 항체 (예를 들어, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자, 면역결핍제이트 및 조성물)는 PTK7-관련 질병의 치료 및 진단에서 추가의 효용을 갖는다. 예를 들어, 인간 모노클로날 항체, 다중특이적 또는 이중특이적 분자 및 면역결핍제이트는 생체 내에서 또는 시험관 내에서 하나 이상의 다음 생물학적 활성을 유도하기 위해 사용될 수 있다: 예를 들어, PTK7을 발현하는 세포의 성장을 억제하고/하거나 그러한 세포를 사멸시키기 위해; 인간 효과기 세포의 존재 하에 PTK7을 발현하는 세포의 식세포작용 또는 ADCC를 매개하기 위해; 또는 PTK7에 대한 PTK7 리간드 결합을 차단하기 위해 사용될 수 있다.

[0589] 특정 실시태양에서, 항체 (예를 들어, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 조성물)는 다양한 PTK7-관련 질병을 치료, 예방 또는 진단하기 위해 생체 내에서 사용된다. PTK7-관련 질병의 예는 특히 결장암 (소장암 포함), 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 급성 골수성 백혈병, 폐암, 유방암, 방광암, 췌장암, 난소암 및 전립선암을 포함한다.

[0590] 생체 내에서 및 시험관 내에서 본 발명의 항체 조성물 (예를 들어, 인간 모노클로날 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 면역결핍제이트)을 투여하는 적합한 경로는 당업계에 잘 알려져 있고, 당업자가 선택할 수 있다. 예를 들어, 항체 조성물은 주사 (예를 들어, 정맥내 또는 피하)에 의해 투여될 수 있다. 사용된 분자의 적합한 용량은 대상의 연령 및 체중, 및 항체 조성물의 농도 및/또는 제형에 따라 결정될 것이다.

[0591] 이전에 설명된 바와 같이, 본 발명의 인간 항-PTK7 항체는 하나 이상의 다른 치료제, 예를 들어, 세포독성제, 방사성 독성제 또는 면역억제제와 동시투여될 수 있다. 항체는 상기 물질에 연결될 수 있거나 (면역복합체로서), 상기 물질과 별도로 투여될 수 있다. 후자의 경우 (별도 투여), 항체는 상기 물질 전에, 후에 또는 동시에 투여될 수 있거나, 다른 공지의 요법, 예를 들어, 항암 요법, 예를 들어 방사선 요법과 함께 동시-투여될 수 있다. 그러한 치료제에는 특히 항-신생물제, 예를 들어, 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 술페이트, 카르무스틴, 클로람부실 및 시클로포스파미드 하이드록시우레아를 포함하고, 이들은 단독으로는 환자에게 독성 또는 아급성 독성인 수준에서만 효과적이다. 시스플라틴은 100 mg/ml 투여량으로 4 주마다 1회 정맥내 투여되고, 아드리아마이신은 60-75 mg/ml 투여량으로 21일마다 1회 정맥내 투여된다. 본 발명의 인간 항-PTK7 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 화학치료제의 동시투여는 인간 종양 세포에 세포독성 효과를 나타내는 상이한 메커니즘을 통해 작용하는 2종의 항암제를 제공한다. 그러한 동시투여는 약물에 대한 내성 또는 종양 세포의 항원성의 변화로 인한 (종양 세포를 항체에 비반응성이 되도록 할) 문제를 해결할 수 있다.



- [0592] 비정상적인 세포 증식에 관련된 질병의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위해 본 발명의 항체-파트너 분자 컨쥬게이트를 투여할 때, 투여되는 화합물의 순환 농도는 약 0.001  $\mu\text{M}$  내지 20  $\mu\text{M}$ 인 것이 바람직하고, 약 0.01  $\mu\text{M}$  내지 5  $\mu\text{M}$ 인 것이 바람직하다.
- [0593] 본원에 설명되는 화합물의 경구 투여를 위한 환자 투여량은 일반적으로 약 1 mg/일 내지 약 10,000 mg/일, 보다 일반적으로 약 10 mg/일 내지 약 1,000 mg/일, 가장 일반적으로 약 50 mg/일 내지 약 500 mg/일이다. 환자 체중의 측면에서 설명할 때, 전형적인 용량은 약 0.01 내지 약 150 mg/kg/일, 보다 일반적으로 약 0.1 내지 약 15 mg/kg/일, 가장 일반적으로 약 1 내지 약 10 mg/kg/일, 예를 들어 5 mg/kg/일 또는 3 mg/kg/일이다.
- [0594] 적어도 일부 실시태양에서, 종양 성장을 지연 또는 억제하는 환자 투여량은 1  $\mu\text{mol/kg/일}$  이하일 수 있다. 예를 들어, 환자 투여량은 0.9, 0.6, 0.5, 0.45, 0.3, 0.2, 0.15, 또는 0.1  $\mu\text{mol/kg/일}$  이하일 수 있다 (약물의 물을 참조함). 바람직하게는, 항체-약물 컨쥬게이트는 적어도 5일에 걸쳐 매일 용량으로 투여될 때 종양 성장을 지연시킨다. 적어도 일부 실시태양에서, 종양은 SCID 마우스 내의 인간-형 종양이다. 한 예로서, SCID 마우스는 CB17.SCID 마우스 (타코닉(미국 뉴욕주 저먼타운)으로부터 이용가능함)일 수 있다.
- [0595] 한 실시태양에서, 본 발명의 면역컨쥬게이트는 화합물을 항체에 연결함으로써 화합물 (예를 들어, 치료제, 표지, 세포독소, 방사선 독소, 면역억제제 등)을 PTK7 세포 표면 수용체를 갖는 세포에 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-PTK7 항체는 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 US 특허 6,281,354 및 6,548,530, US 특허 공개 20030050331, 20030064984, 20030073852 및 20040087497에 기재되거나 WO 03/022806에 공개된 임의의 독소 화합물에 컨쥬게이팅될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 PTK7을 발현하는 세포를 생체 외에서 또는 생체 내에서 국제화시키는 방법을 제공한다 (예를 들어, 방사성 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조 인자와 같은 검출가능한 표지를 사용하여). 별법으로, 면역컨쥬게이트는 세포독소 또는 방사선 독소를 PTK7에 표적화함으로써 PTK7 세포 표면 수용체를 갖는 세포를 사멸시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0596] 표적-특이적 효과기 세포, 예를 들어, 본 발명의 조성물 (예를 들어, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자)에 연결된 효과기 세포가 또한 치료제로서 사용될 수 있다. 표적화를 위한 효과기 세포는 인간 백혈구, 예를 들어 대식세포, 호중구 또는 단핵구일 수 있다. 다른 세포는 호산구, 내추럴 킬러 세포 및 다른 IgG- 또는 IgA-수용체 보유 세포를 포함한다. 원하는 경우에, 효과기 세포는 치료하려는 대상으로부터 얻을 수 있다. 표적-특이적 효과기 세포는 생리학상 허용되는 용액 중의 세포 현탁액으로서 투여될 수 있다. 투여되는 세포의 수는 약  $10^8$ - $10^9$ 일 수 있지만, 치료 목적에 따라 변할 것이다. 일반적으로, 상기 양은 표적 세포, 예를 들어, PTK7을 발현하는 종양 세포에 국제화하기 위해 및 예를 들어, 식세포작용에 의해 세포를 사멸시키기 위해 충분할 것이다. 투여 경로는 또한 변할 수 있다.
- [0597] 표적-특이적 효과기 세포를 사용하는 요법은 표적화된 세포의 제거를 위한 다른 기술과 함께 수행될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 (예를 들어, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자) 및/또는 이들 조성물로 보강된 효과기 세포를 사용하는 항-종양 요법은 화학요법과 함께 사용될 수 있다. 추가로, 조합 면역요법이 종양 세포 거부를 향해 2가지 구분되는 세포독성 효과기 집단을 유도하도록 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-Fc-감마 RI 또는 항-CD3에 연결된 항-PTK7 항체는 IgG- 또는 IgA-수용체 특이적 결합제와 함께 사용될 수 있다.
- [0598] 본 발명의 이중특이적 및 다중특이적 분자는 또한 예를 들어, 세포 표면 상의 수용체를 캐핑 (capping)하고 제거함으로써 효과기 세포에 대한 Fc $\gamma$ R 또는 Fc $\gamma$ R 수준을 조정하기 위해 사용될 수 있다. 항-Fc 수용체의 혼합물이 또한 상기 목적을 위해 사용될 수 있다.
- [0599] 보체 결합 부위, 예를 들어 보체에 결합하는 IgG1, -2 또는 -3 또는 IgM으로부터의 부분을 갖는 본 발명의 조성물 (예를 들어, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 면역컨쥬게이트)은 또한 보체의 존재 하에 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 표적 세포를 포함하는 세포 집단을 본 발명의 결합제 및 적절한 효과기 세포로 생체 외에서 처리하는 것은 보체 또는 보체를 함유하는 혈청을 첨가하여 보충될 수 있다. 본 발명의 결합제로 코팅된 표적 세포의 식세포작용은 보체 단백질의 결합에 의해 개선될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 본 발명의 조성물 (예를 들어, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자)로 코팅된 표적 세포는 또한 보체에 의해 용해될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 본 발명의 조성물은 보체를 활성화시키지 않는다.
- [0600] 본 발명의 조성물 (예를 들어, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 면역컨쥬게이트)는 또한 보체와 함께 투여될 수 있다. 따라서, 인간 항체, 다중특이적 또는 이중특이적 분자, 및 혈청 또는 보체를 포함하는 조성물은 본 발명의 범위 내에 있다. 이들 조성물은 보체가 인간 항체, 다중특이적 또는 이중특이적 분자에 근접하게 위치한다는 점에서 유리하다. 별법으로, 본 발명의 인간 항체, 다중특이적 또는 이중특이적 분자, 및

보체 또는 혈청은 따로 투여될 수 있다.

- [0601] 따라서, 본 발명의 항체 조성물로 치료받는 환자에게 인간 항체의 치료 효과를 향상 또는 증대시키는 또다른 치료제, 예를 들어, 세포독성제 또는 방사성 독성제를 추가로 (본 발명의 인간 항체의 투여 전에, 그와 동시에, 또는 그 이후에) 투여할 수 있다.
- [0602] 다른 실시태양에서, 예를 들어 대상을 시토킨으로 치료함으로써 Fc $\gamma$  또는 Fc $\gamma$  수용체의 발현 또는 활성을 조정, 예를 들어 향상 또는 억제하는 물질로 대상을 추가로 치료할 수 있다. 다중특이적 분자로 치료하는 동안 투여하기 위해 바람직한 시토킨은 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 및 종양 괴사 인자(TNF)를 포함한다.
- [0603] 본 발명의 조성물 (예를 들어, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자)은 또한 Fc $\gamma$ R 또는 PTK7을 발현하는 세포를 표적화하도록, 예를 들어, 그러한 세포를 표지하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 용도를 위해, 결합제는 검출될 수 있는 분자에 연결될 수 있다. 따라서, 본 발명은 Fc 수용체, 예를 들어, Fc $\gamma$ R 또는 PTK7을 발현하는 세포를 생체 외에서 또는 시험관 내에서 국재화시키는 방법을 제공한다. 검출가능한 표지는 예를 들어, 방사성 동위원소, 형광 화합물, 효소, 또는 효소 보조 인자일 수 있다.
- [0604] 본 발명의 항체 조성물 (예를 들어, 인간 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 분자, 또는 면역결핍제) 및 사용 지시서를 포함하는 키트가 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 키트는 하나 이상의 추가의 시약, 예를 들어, 면역억제 시약, 세포독성제 또는 방사성 독성제, 또는 하나 이상의 추가의 본 발명의 인간 항체 (예를 들어, 제 1 인간 항체와 상이한, PTK7 항원 내의 에피토프에 결합하는 상보적 활성을 갖는 인간 항체)를 추가로 함유할 수 있다. 키트는 일반적으로 키트의 내용물의 의도된 용도를 나타내는 라벨을 포함한다. 용어 라벨은 키트 상에 또는 키트와 함께 공급되거나 달리 키트에 부착되는 임의의 기입 또는 기록물을 포함한다.
- [0605] 본 발명은 다음 실시예에 의해 추가로 예시되지만, 이에 의해 추가로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본원 전체에서 인용된 모든 도면 및 모든 참조문, 특허 및 특허 출원 공개의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 명백하게 포함된다.
- [0606] **실시예**
- [0607] **실시예 1: PTK7에 대해 작용하는 인간 모노클로날 항체의 생성**
- [0608] **항원**
- [0609] 면역화 프로토콜에서는 항원으로서 (i) myc 및 his 태그 모두와 함께 PTK7의 세포의 부분을 포함하는 재조합 융합 단백질, 및 (ii) 막 결합된 전장 PTK7을 모두 사용하였다. 두 항원은 모두 CHO 세포주에서 재조합 형질감염 방법에 의해 생성하였다.
- [0610] **트랜스제닉 HuMab 및 KM 마우스™**
- [0611] PTK7에 대한 완전 인간 모노클로날 항체는 각각 인간 항체 유전자를 발현하는 HuMab 트랜스제닉 마우스의 HCo7 및 HCo12 종, 및 트랜스제닉 트랜스염색체 마우스의 KM 종을 사용하여 제조하였다. 각각의 이들 마우스 종에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자는 문헌 [Chen et al (1993) EMBO J. 12:811-820]에 기재되어 있는 바와 같이 동형접합 방식으로 파괴되어 (homozygously disrupted) 있고, 내인성 마우스 중쇄 유전자는 PCT 공개 WO 01/09187의 실시예 1에 기재되어 있는 바와 같이 동형접합 방식으로 파괴되어 있다. 각각의 이들 마우스 종은 문헌 [Fishwild et al (1996) Nature Biotechnology 14:845-851]에 기재되어 있는 바와 같이 인간 카파 경쇄 트랜스진, KCo5를 보유한다. HCo7 종은 미국 특허 5,770,429; 5,545,806; 5,625,825; 및 5,545,807에 기재되어 있는 바와 같이 HCo7 인간 중쇄 트랜스진을 보유한다. HCo12 종은 WO 01/09187의 실시예 2 또는 WO 01/14424의 실시예 2에 기재되어 있는 바와 같이 HCo 12 인간 중쇄 트랜스진을 보유한다. KM 종은 PCT 공개 WO 02/43478에 기재되어 있는 바와 같이 SC20 트랜스염색체를 함유한다.
- [0612] **HuMab 및 KM 면역화:**
- [0613] PTK7에 대한 완전 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위해, HuMab 마우스 및 KM 마우스™를 정제된 재조합 PTK7 융합 단백질 및 PTK7-형질감염된 CHO 세포를 항원으로 사용하여 면역화시켰다. HuMab 마우스에 대한 일반적인 면역화 방법은 문헌 ([Lonberg, N. et al (1994) Nature 368(6474): 856-859]; [Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851]) 및 PCT 공개 WO 98/24884에 기재되어 있다. 항원의 1차 주입 시에 마우스는 6-16주령이었다. PTK7 융합 단백질 항원의 정제된 재조합 제제 (5-50  $\mu$ g) 및  $5 - 10 \times 10^6$  개의 세포를 사



용하여 복강내, 피하 (Sc) 또는 발바닥 주사를 통해 HuMab 마우스 및 KM 마우스<sup>TM</sup>를 면역화시켰다.

- [0614] 트랜스제닉 마우스를 완전 프로인트 어쥬번트 또는 리비 (Ribi) 어쥬번트 중의 항원으로 2회 IP 면역화시킨 후, 불완전 프로인트 어쥬번트 또는 리비 어쥬번트 중의 항원으로 3-21일 동안 IP 면역화시켰다 (총 11회 이하의 면역화). 면역 반응은 후안와 채혈에 의해 모니터링하였다. 혈장은 ELISA (아래 설명됨)에 의해 스크리닝하고, 충분한 역가의 항-PTK7 인간 면역글로불린을 갖는 마우스를 융합을 위해 사용하였다. 마우스를, 항원을 정맥내 추가접종한 3일 후에 희생시키고, 비장을 제거하였다. 일반적으로, 각각의 항원에 대해 10-35회 융합을 수행하였다. 각각의 항원에 대해 수십 마리의 마우스를 면역화시켰다.
- [0615] 항-PTK7 항체를 생산하는 HuMab 또는 KM 마우스<sup>TM</sup>의 선택:
- [0616] PTK7에 결합된 항체를 생산하는 HuMab 또는 KM 마우스<sup>TM</sup>를 선택하기 위해, 면역화시킨 마우스로부터 얻은 혈청을 문헌 [Fishwild, D. et al. (1996)]에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 시험하였다. 간단히 설명하면, 미세적정 플레이트를 형질감염된 CHO 세포로부터의 정제된 재조합 PTK7 융합 단백질 (PBS 중 1-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 100  $\mu\text{l}$ /웰로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이팅한 후, PBS/Tween (0.05%) 중 5% 우태아 혈청 (200  $\mu\text{l}$ /웰)으로 차단시켰다. PTK7-면역화시킨 마우스로부터의 혈청 희석액을 각각의 웰에 첨가하고, 주변 온도에서 1-2시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세척한 후, 양고추냉이 피옥시다제 (HRP)와 키뉴제이팅된 염소-항-인간 IgG 폴리클로날 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 세척한 후, 플레이트를 ABTS 기질 (시그마, A-1888, 0.22 mg/ml)로 발색시키고, OD 415-495에서 분광광도계로 분석하였다. 최고 역가의 항-PTK7 항체를 나타낸 마우스를 융합을 위해 사용하였다. 융합은 아래에 설명된 바와 같이 수행하였고, 하이브리도마 상등액은 항-PTK7 활성에 대해 ELISA에 의해 시험하였다.
- [0617] PTK7에 대한 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성:
- [0618] HuMab 마우스로부터 단리된 마우스 비장 세포를 PEG를 사용하여 표준 프로토콜에 기초한 마우스 골수종 세포주에 융합시켰다. 이어서, 생성되는 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝하였다. 면역화시킨 마우스로부터의 비장 세포의 단세포 현탁액을 50% PEG (시그마)를 사용하여 SP2/0 비-분비형 마우스 골수종 세포 (ATCC, CRL 1581)의 수에 1/4로 융합시켰다. 세포를 약  $1 \times 10^5$ /웰로 평저 미세적정 플레이트에 플레이트한 후, 10% 우태아 혈청, 10% P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) 조건화 배지, DMEM (미디어테크 (Mediatech), CRL 10013, 고 농도 글루코스, L-글루타민 및 피루브산나트륨 함유) 중 3-5% 오리젠 (IGEN) + 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-머캅토에탄올, 50 mg/ml 겐타마이신 및 1x HAT (시그마, CRL P-7185)를 함유하는 선별 배지 중에서 약 2주 인큐베이팅하였다. 1-2주 후에, HAT를 HT로 대체한 배지 중에서 세포를 배양하였다. 이어서, 개별 웰을 ELISA (상기 설명함)에 의해 인간 항-PTK7 모노클로날 IgG 항체에 대해 스크리닝하였다. 일단 광범위한 하이브리도마 성장이 일어나면, 대체로 10-14일 후에 배지를 모니터링하였다. 항체-분비 하이브리도마를 재플레이트하고 다시 스크리닝하고, 인간 IgG에 대해 여전히 양성이면 항-PTK7 모니터링 항체를 제한 희석에 의해 적어도 2회 서브클로닝하였다. 이어서, 안정한 서브클론을 시험관 내에서 배양하여 추가의 특성 결정을 위해 조직 배양 배지 내에 소량의 항체를 생성하였다.
- [0619] 하이브리도마 클론 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8을 추가의 분석을 위해 선택하였다.
- [0620] **실시예 2: 인간 모노클로날 항체 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8의 구조적 특성 결정**
- [0621] 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 구역을 코딩하는 cDNA 서열은 각각 3G8, 3G8a, 4D5, 12C6, 12C6a 및 7C8 하이브리도마로부터 표준 PCR 기술을 이용하여 수득하고, 이를 표준 DNA 서열결정 기술을 이용하여 서열결정하였다.
- [0622] 3G8의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 1a, 및 각각 서열 41 및 1에 제시한다.
- [0623] 3G8의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 1b, 및 각각 서열 45 및 5에 제시한다.
- [0624] 3G8 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열에 비교하면, 3G8 중쇄는 인간 생식계열 VH 3-30.3으로부터의 VH 세그먼트, 미결정된 D 세그먼트, 및 인간 생식계열 JH 4b로부터의 JH 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VH 3-30.3 서열에 대한 3G8 VH 서열의 정렬을 도 5에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 3G8 VH 서열의 추가의 분석을 통해, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 1a 및 5, 및 각각 서열 11, 15 및 19에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.
- [0625] 3G8 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열에 비교하면, 3G8 경쇄는 인간 생

식계열 VK L15로부터의 VL 세그먼트 및 인간 생식계열 JK1로부터의 JK 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VK L15 서열에 대한 3G8 VL 서열의 정렬을 도 9에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 3G8 VL 서열의 추가의 분석을 통해, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 1b 및 9, 및 각각 서열 23, 29 및 35에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.

- [0626] 3G8a의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 1a, 및 각각 서열 41 및 1에 제시한다.
- [0627] 3G8a의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 1c, 및 각각 서열 46 및 6에 제시한다.
- [0628] 3G8a 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열에 비교하면, 3G8a 중쇄는 인간 생식계열 VH 3-30.3으로부터의 VH 세그먼트, 미결정된 D 세그먼트, 및 인간 생식계열 JH 4b로부터의 JH 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VH 3-30.3 서열에 대한 3G8a VH 서열의 정렬을 도 5에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 3G8a VH 서열의 추가의 분석을 통해, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 1a 및 5, 및 각각 서열 11, 15 및 19에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.
- [0629] 3G8a 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열에 비교하면, 3G8a 경쇄는 인간 생식계열 VK L15로부터의 VL 세그먼트 및 인간 생식계열 JK 3으로부터의 JK 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VK L15 서열에 대한 3G8a VL 서열의 정렬을 도 9에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 3G8a VL 서열의 추가의 분석을 통해, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 1c 및 9, 및 각각 서열 24, 30 및 36에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.
- [0630] 4D5의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 2a, 및 각각 서열 42 및 2에 제시한다.
- [0631] 4D5의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 2b, 및 각각 서열 47 및 7에 제시한다.
- [0632] 4D5 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열에 비교하면, 4D5 중쇄는 인간 생식계열 VH 3-30.3으로부터의 VH 세그먼트, 미결정된 D 세그먼트, 및 인간 생식계열 JH 4b로부터의 JH 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VH 3-30.3 서열에 대한 4D5 VH 서열의 정렬을 도 6에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 4D5 VH 서열의 추가의 분석을 통해, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 2a 및 6, 및 각각 서열 12, 16 및 20에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.
- [0633] 4D5 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열에 비교하면, 4D5 경쇄는 인간 생식계열 VK A10으로부터의 VL 세그먼트 및 인간 생식계열 JK 5로부터의 JK 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VK A10 서열에 대한 4D5 VL 서열의 정렬을 도 10에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 4D5 VL 서열의 추가의 분석을 통해, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 2b 및 10, 및 각각 서열 25, 31 및 37에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.
- [0634] 12C6의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 3a, 및 각각 서열 43 및 3에 제시한다.
- [0635] 12C6의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 3b, 및 각각 서열 48 및 8에 제시한다.
- [0636] 12C6 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열에 비교하면, 12C6 중쇄는 인간 생식계열 VH DP44로부터의 VH 세그먼트, 미결정된 D 세그먼트, 및 인간 생식계열 JH 4b로부터의 JH 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VH DP44 서열에 대한 12C6 VH 서열의 정렬을 도 7에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 12C6 VH 서열의 추가의 분석을 통해, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 3a 및 7, 및 각각 서열 13, 17 및 21에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.
- [0637] 12C6 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열에 비교하면, 12C6 경쇄는 인간 생식계열 VK A27로부터의 VL 세그먼트 및 인간 생식계열 JK 2로부터의 JK 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VK A27 서열에 대한 12C6 VL 서열의 정렬을 도 11에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 12C6 VL 서열의 추가의 분석을 통해, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 3b 및 11, 및 각각 서열 26, 32 및 38에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.
- [0638] 12C6a의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 3a, 및 각각 서열 43 및 3에 제시한다.
- [0639] 12C6a의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 3c, 및 각각 서열 49 및 9에 제시한다.
- [0640] 12C6a 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열에 비교하면, 12C6a 중쇄는 인간 생식계열 VH DP44로부터의 VH 세그먼트, 미결정된 D 세그먼트, 및 인간 생식계열 JH 4b로부터의 JH 세그먼트를

이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VH DP44 서열에 대한 12C6a VH 서열의 정렬을 도 7에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 12C6a VH 서열의 추가의 분석을 통해, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 3a 및 7, 및 각각 서열 13, 17 및 21에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.

[0641] 12C6a 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열에 비교하면, 12C6a 경쇄는 인간 생식계열 VK L15로부터의 VL 세그먼트 및 인간 생식계열 JK 2로부터의 JK 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VK L15 서열에 대한 12C6a VL 서열의 정렬을 도 12에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 12C6a VL 서열의 추가의 분석을 통해, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 3c 및 12, 및 각각 서열 27, 33 및 39에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.

[0642] 7C8의 중쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 4a, 및 각각 서열 44 및 4에 제시한다.

[0643] 7C8의 경쇄 가변 구역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 4b, 및 각각 서열 50 및 10에 제시한다.

[0644] 7C8 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열에 비교하면, 7C8 중쇄는 인간 생식계열 VH 3-33으로부터의 VH 세그먼트, 인간 생식계열 3-10으로부터의 D 세그먼트, 및 인간 생식계열 JH 6b로부터의 JH 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VH 3-33 서열에 대한 7C8 VH 서열의 정렬을 도 8에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 7C8 VH 서열의 추가의 분석을 통해, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 4a 및 8, 및 각각 서열 14, 18 및 22에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.

[0645] 7C8 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열에 비교하면, 7C8 경쇄는 인간 생식계열 VK L6으로부터의 VL 세그먼트 및 인간 생식계열 JK 3으로부터의 JK 세그먼트를 이용함을 알 수 있었다. 생식계열 VK L6 서열에 대한 7C8 VL 서열의 정렬을 도 13에 제시한다. CDR 구역 결정의 카바트 시스템을 이용하는 7C8 VL 서열의 추가의 분석을 통해, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 구역을 도 4b 및 13, 및 각각 서열 28, 34 및 40에 제시된 바와 같이 묘사할 수 있었다.

#### [0646] 실시예 3: mAb 12C6의 돌연변이 및 대체 생식계열 용도

[0647] 상기 실시예 2에서 논의된 바와 같이, 모노클로날 항체 12C6 및 12C6a는 HuMab 마우스® 종의 HCo7 트랜스진 내에 존재하는 인간 DP-44 생식계열 서열로부터 유래된 중쇄 가변 구역을 이용한다. DP-44는 천연 인간 면역 글로불린 레퍼토리에서 이용되는 생식계열 서열이 아니므로, 12C6 또는 12C6a의 VH 서열을 돌연변이시켜 잠재적인 면역원성을 감소시키는 것이 유리할 수 있다. 바람직하게는, 12C6 또는 12C6a VH 서열의 하나 이상의 프레임워크 잔기는 천연 인간 면역글로불린 레퍼토리에서 이용되는 구조상 관련된 VH 생식계열 서열의 프레임워크 내에 존재하는 잔기(들)로 돌연변이된다. 예를 들어, 도 7에서는 DP44 생식계열 서열, 및 또한 2개의 구조상 관련된 인간 생식계열 서열, VH 3-23 및 VH 3-7에 대한 12C6 및 12C6a VH 서열의 정렬을 보여준다. 이들 서열의 관련성을 감안하면, 인간 PTK7에 특이적으로 결합하고 VH 3-23 또는 VH 3-7 생식계열 서열로부터 유래된 VH 구역을 이용하는 인간 항체를 선택할 수 있음을 예측할 수 있다. 또한, VH 3-23 또는 VH 3-7 서열 내의 동등한 위치의 잔기(들)와 상이한 12C6 또는 12C6a VH 서열 내의 하나 이상의 잔기를 VH 3-23 또는 VH 3-7 내에 존재하는 잔기(들), 또는 그의 보존적 아미노산 치환체로 돌연변이시킬 수 있다.

#### [0648] 실시예 4: 항-PTK7 인간 모노클로날 항체의 결합 특이성 및 결합 운동학의 특성 결정

[0649] 본 실시예에서는 항-PTK7 항체의 결합 친화도 및 결합 운동학을 바이오코어 분석에 의해 검사하였다. 결합 특이성 및 교차-경쟁은 유동 세포측정에 의해 검사하였다.

#### [0650] 유동 세포측정에 의한 결합 특이성

[0651] 세포 표면에서 재조합 인간 PTK7을 발현하는 HEK3 세포주를 개발하여, 유동 세포측정에 의한 PTK7 인간 모노클로날 항체의 특이성을 결정하기 위해 사용하였다. HEK3 세포를 막횡단 형태의 PTK7을 코딩하는 전장 cDNA를 함유하는 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 10 µg/ml 농도의 항-PTK7 인간 모노클로날 항체와 함께 인큐베이션함으로써 7C8 항-PTK7 인간 모노클로날 항체의 결합을 평가하였다. 세포를 세척하고, FITC-표지된 항-인간 IgG Ab를 사용하여 결합을 검출하였다. 유동 세포측정 분석은 FACSscan 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson, 미국 캘리포니아주 산호세))를 사용하여 수행하였다. 결과를 도 14에 도시한다. 항-PTK7 인간 모노클로날 항체 7C8은 PTK7로 형질감염된 HEK3 세포에는 결합하지만, 인간 PTK7로 형질감염되지 않은 HEK3 세포에는 결합하지 않았다. 상기 데이터는 PTK7에 대한 항-PTK7 인간 모노클로날 항체의 특이성을 입증한다.

- [0652] ELISA에 의한 결합 특이성
- [0653] 항-PTK7 항체의 결합을 PTK7에 대한 결합 특이성을 검사하기 위해 표준 ELISA에 의해 또한 평가하였다.
- [0654] PTK7의 재조합 세포의 도메인을 상이한 농도에서 항-PTK7 인간 모노클로날 항체 3G8, 4D5, 12C6 및 12C6a에 대한 결합에 대해 시험하였다. 표준 ELISA 절차를 수행하였다. 항-PTK7 인간 모노클로날 항체를 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 출발 농도에서 첨가하고, 1:2 희석비로 연속 희석하였다. 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 컨쥬게이팅된 염소-항-인간 IgG (카파 사슬-특이적) 폴리클로날 항체를 2차 항체로서 사용하였다. 결과를 도 15에 나타낸다. 각각의 항-PTK7 인간 모노클로날 항체 3G8, 4D5, 12C6 및 12C6a는 PTK7에 결합하였다. 상기 데이터는 PTK7에 대한 항-PTK7 인간 모노클로날 항체의 특이성을 입증한다.
- [0655] 항-PTK7 항체의 에피토프 매핑
- [0656] 유동 세포측정을 사용하여 항-PTK7 HuMAb의 에피토프 분류를 결정하였다. 윌름스 종양 세포 G-401 (ATCC 기탁 번호 CRL-1441)을 막획단 형태의 PTK7을 코딩하는 전장 cDNA를 함유하는 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 각각의 항-PTK7 인간 모노클로날 항체의 에피토프 결합은  $1 \times 10^5$ 개의 형질감염된 세포를 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 냉 항-PTK7 인간 모노클로날 항체와 함께 인큐베이팅하고 세척한 후, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 형광-컨쥬게이팅된 항-PTK7 인간 모노클로날 항체를 첨가함으로써 평가하였다. FITC-표지된 항-인간 IgG Ab를 사용하여 결합을 검출하였다. 유동 세포측정 분석은 FACSscan 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨)를 사용하여 수행하였다. 데이터의 분석 시에, 항-PTK7 항체는 3개의 에피토프 군으로 분류되었다 - 7D11을 포함하는 A군, 3G8 및 3G8a를 포함하는 B군, 및 7C8, 12C6 및 12C6a를 포함하는 C군.
- [0657] **실시예 5: 인간 암세포의 표면에서 발현되는 PTK7에 대한 항-PTK7 항체 결합의 특성 결정**
- [0658] 신장모세포종 윌름스 종양 세포주 G-401 (ATCC 기탁 번호 CRL-1441)을 상이한 농도의 HuMAb 항-PTK7 인간 모노클로날 항체 12C6 및 7C8의 결합에 대해 시험하였다. 항-PTK7 인간 모노클로날 항체의 결합은  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 출발 농도 30  $\mu\text{g/ml}$ 의 항체와 함께 인큐베이팅하고 항체를 1:10 희석비로 연속 희석함으로써 평가하였다. 세포를 세척하고, 결합을 PE-표지된 항-인간 IgG Ab를 사용하여 검출하였다. 유동 세포측정 분석은 FACSscan 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨)를 사용하여 수행하였다. 결과를 도 16에 나타낸다. 항-PTK7 모노클로날 항체 12C6 및 7C8은 염색의 평균 형광 강도 (MFI)에 의해 측정할 때 신장모세포종 윌름스 종양 세포주에 농도 의존 방식으로 결합하였다. 항-PTK7 모노클로날 항체 12C6 및 7C8의  $\text{EC}_{50}$  값은 각각 4.0 nM 및 3.4 nM이었다.
- [0659] 이들 데이터는 항-PTK7 HuMAb가 신장암 세포주에 결합하는 것을 입증한다.
- [0660] **실시예 6: 암 세포주에 대한 인간 항-PTK7 항체의 결합**
- [0661] 항-PTK7 항체를 유동 세포측정에 의해 다양한 암 세포주에 대한 결합에 대해 시험하였다.
- [0662] 암 세포주의 패널에 대한 3G8, 12C6a, 4D5 및 12C6 항-PTK7 인간 모노클로날 항체의 결합을, 암 세포주를 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 항-PTK7 인간 모노클로날 항체와 인큐베이팅함으로써 평가하였다. 시험된 암 세포주는 A-431 (ATCC 기탁 번호 CRL-1555), 윌름스 종양 세포 G-401 (ATCC 기탁 번호 CRL-1441), Saos-2 (ATCC 기탁 번호 HTB-85), SKOV-3 (ATCC 기탁 번호 HTB-77), PC3 (ATCC 기탁 번호 CRL-1435), DMS 114 (ATCC 기탁 번호 CRL-2066), ACHN (ATCC 기탁 번호 CRL-1611), LNCaP (ATCC 기탁 번호 CRL-1740), DU 145 (ATCC 기탁 번호 HTB-81), LoVo (ATCC 기탁 번호 CCL-229) 및 MIA PaCa-2 (ATCC 기탁 번호 CRL-1420)이었다. 이소형 대조 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. 세포를 세척하고, FITC-표지된 항-인간 IgG Ab를 사용하여 결합을 검출하였다. 유동 세포측정 분석은 FACSscan 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨)를 사용하여 수행하였다. 결과를 도 17에 제시한다. 항-PTK7 모노클로날 항체 3G8, 12C6a, 4D5 및 12C6은 염색의 평균 형광 강도 (MFI)에 의해 측정할 때 암 세포주 A-431, 윌름스 종양 세포 G-401, Saos-2, SKOV-3, PC3, DMS 114, ACHN, LNCaP, DU 145, LoVo 및 MIA PaCa-2에 결합하였다. 이들 데이터는 항-PTK7 HuMAb가 세포 표면 PTK7을 발현하는 다양한 암 세포에 결합하는 것을 입증한다.
- [0663] **실시예 7: 인간 T, B 및 수지상 세포에 대한 항-PTK7의 결합**
- [0664] 항-PTK7 항체를 그들의 세포 표면에 PTK7을 발현하는 CD4+, CD8+ T-세포, CD19+ B-세포 및 인간 혈액 골수성 수지상 세포에 대한 결합에 대해 유동 세포측정에 의해 시험하였다.
- [0665] 인간 T 세포를 항-CD3 항체에 의해 활성화시켜, 인간 항-PTK7 모노클로날 항체와의 결합 전에 T 세포 상에서 PTK7 발현을 유도하였다. 7C8 항-PTK7 인간 모노클로날 항체의 결합은 세포를 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 항-PTK7 인간



모노클로날 항체와 인큐베이팅함으로써 평가하였다. 일부 실험에서, T 및 B-세포 특이적 마커에 결합하는 공지의 항체를 양성 대조군으로서 사용하였다. 세포를 세척하고, FITC-표지된 항-인간 IgG Ab를 사용하여 결합을 검출하였다. 유동 세포측정 분석은 FACScan 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨)를 사용하여 수행하였다. 결과들도 18 (활성화된 인간 T 세포 및 B-세포) 및 도 19 (수지상 세포)에 제시한다. 항-PTK7 모노클로날 항체 7C8은 염색의 평균 형광 강도 (MFI)에 의해 측정할 때 활성화된 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포 및 수지상 세포에 결합하지만, B 세포에는 결합하지 않았다. 이들 데이터는 항-PTK7 HuMAb가 인간 T-세포 및 수지상 세포에 결합하는 것을 입증한다.

[0666] **실시예 8: 항-PTK7 모노클로날 항체의 내재화**

[0667] 항-PTK7 HuMAb을 PTK7-발현 세포주 내로 내재화하는 능력에 대해 Hum-Zap 내재화 분석을 이용하여 시험하였다. Hum-Zap 분석은 세포독소 사포린에 컨쥬게이팅된 인간 IgG에 대한 친화도로 2차 항체의 결합을 통한 1차 인간 항체의 내재화에 대해 시험한다.

[0668] PTK7-발현 암 세포주 윌름스 종양 G-401 (ATCC 기탁 번호 CRL-1441), A-431 (ATCC 기탁 번호 CRL-1555) 및 PC3 (ATCC 기탁 번호 CRL-1435)을  $1 \times 10^4$ 개의 세포/웰로 100  $\mu$ l 웰 내에 직접 접종하였다. 항-PTK7 HuMAb 항체 3G8, 4D5, 12C6 또는 7C8을 30 nM의 출발 농도로 웰에 첨가하고, 1:3 연속 희석으로 적정하였다. PTK7에 비-특이적인 이소형 대조 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. Hum-Zap (어드밴스트 타게팅 시스템즈 (Advanced Targeting Systems, 미국 캘리포니아주 샌디에고), IT-22-25)를 11 nM의 농도로 첨가하고, 플레이트를 72시간 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트에 24시간 동안 1.0  $\mu$ Ci의  $^3$ H-티미딘으로 펄싱하고, 수거하여 탑카운트 (Top Count) 섬광계수기 (팩카드 인스트루먼트 (Packard Instruments, 미국 커넥티컷주 메리덴))에서 관독하였다. 결과들도 20a-d에 제시한다. 항-PTK7 항체 3G8, 4D5, 12C6 및 7C8은 PTK7-발현 윌름스 종양 암 세포주 내에  $^3$ H-티미딘 혼입에서 항체 농도 의존적 감소를 보였다. 항-PTK7 항체 12C6 및 7C8은 PTK7-발현 암 세포주 A-431 및 PC3에서  $^3$ H-티미딘 혼입에서 항체 농도 의존적 감소를 보였다. 윌름스 종양 세포에서 항-PTK7 항체 3G8, 4D5, 12C6 및 7C8에 대한 EC<sub>50</sub> 값은 각각 0.6 nM, 0.3 nM, 0.2 nM 및 0.2 nM이었다. A-431 세포에서 항-PTK7 항체 12C6 및 7C8의 EC<sub>50</sub> 값은 각각 0.2 nM 및 0.2 nM이었다. PC3 종양 세포에서 항-PTK7 항체 12C6 및 7C8에 대한 EC<sub>50</sub> 값은 각각 0.3 nM 및 0.3 nM이었다. 이 데이터는 항-PTK7 항체 3G8, 4D5, 12C6 및 7C8이 암 세포 내로 내재화함을 입증한다.

[0669] **실시예 9: 인간 암 세포주에 대한 세포독소-컨쥬게이팅된 항-PTK7 항체의 세포 사멸 평가**

[0670] 본 실시예에서, 세포독소에 컨쥬게이팅된 항-PTK7 모노클로날 항체는 세포 증식 분석에서 PTK7+ 인간 암 세포주를 사멸시키는 것으로 나타났다. 항-PTK7 항체는 링커, 예를 들어, 펩티드, 히드라존 또는 디술피드 링커를 통해 세포독소에 컨쥬게이팅될 수 있다. 본 발명의 항체에 컨쥬게이팅될 수 있는 세포독소 화합물 및 링커의 예는 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 60/720,499 (2005년 9월 26일 출원)에 기재되어 있다.

[0671] 항-PTK7 항체 1F12 (서열 84-98)을 본원에 개시되는 화학식 (q)의 화합물에 컨쥬게이팅시켜 1F12-화학식 (q)의 화합물을 제조하였다. 컨쥬게이션은 다음과 같이 수행하였다: 100 mM Na-포스페이트, 50 mM NaCl, 2 mM DTPA (pH 8.0) 중의 약 5 mg/ml의 항체를 15배 물 과량의 2-이미노티올란을 사용하여 1시간 동안 실온에서 연속적으로 혼합하면서 티올화하였다. 티올화 후에, 티올화된 1F12를 PD10 컬럼 (Sephadex G-25)에 의해 컨쥬게이션 버퍼 (50 mM HEPES, 5 mM 글라이신, 3% 글리세롤 (pH 6.0))로 버퍼 교환하였다. 티올화된 항체의 농도 및 티올 농도를 결정하였다. DMSO 중의 화학식 (q)의 화합물의 5 mM 원액을 항체의 티올당 3배 물 과량으로 첨가하고, 90분 동안 실온에서 혼합하였다. 컨쥬게이팅된 항체를 0.2  $\mu$ m 필터를 통해 여과하였다. 생성되는 컨쥬게이트를 50 mM HEPES, 5 mM 글라이신, 100 mM NaCl (pH 7.2) 내에서 전개시키는 세파크릴-200 크기 배제 컬럼 상에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 단량체성 항체 컨쥬게이트를 함유하는 분획들을 모으고 한외여과에 의해 농축하였다. 항체 컨쥬게이트 농도 및 치환비는 280 및 340 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다.

[0672] PTK7-발현 윌름스 종양 인간 신장암 세포주 G-401 (ATCC 기탁 번호 CRL-1441)을 3시간 동안 100  $\mu$ l 웰 내에  $10^4$ 개 세포/웰로 접종하였다. 1F12-화학식 (p)의 화합물을 100 nM의 출발 농도에서 웰에 첨가하고 1:3의 연속 희석비로 적정하였다. 플레이트를 48시간 동안 인큐베이팅시켰다. 이어서, 플레이트를 배양 종결 전에 24시간 동안 1  $\mu$ Ci의  $^3$ H-티미딘으로 펄싱시킨 후, 수거하고 탑 카운트 섬광계수기 (팩카드 인스트루먼트)에서 관독하였



다. 도 21은 1F12-화학식 (q)의 화합물의 농도의 증가와 함께 PTK7-발현 윌름스 종양 인간 신장암 세포주 내로 <sup>3</sup>H-티미딘 혼입의 감소를 보여준다. 이들 데이터는 세포독소에 컨쥬게이팅된 항-PTK7 항체가 인간 신장암 세포에 대해 특이적인 세포독성을 보임을 입증한다.

[0673] **실시예 10: 인간 종양 세포주에 대한 세포독소-컨쥬게이팅된 항-PTK7 항체의 세포 사멸 평가**

[0674] 본 실시예에서, 세포독소에 컨쥬게이팅된 항-PTK7 모노클로날 항체는 세포 증식 분석에서 PTK7의 세포 표면 발현이 낮거나 중간 정도이거나 높은 PTK7<sup>+</sup> 인간 종양 세포주를 사멸시키는 것으로 나타났다.

[0675] 항-PTK7 HuMAb 항체 12C6a를 화학식 (p)의 화합물에 컨쥬게이팅시켜 12C6a-화학식 (p)의 화합물로 본원에서 언급되는 항체 컨쥬게이트를 제조하였다. 화학식 (p)의 화합물에 대한 12C6a의 컨쥬게이션은 다음과 같이 수행하였다: 100 mM Na-포스페이트, 50 mM NaCl, 2 mM DTPA (pH 8.0) 중의 약 5 mg/ml의 12C6a를 15배 물 과량의 2-이미노티올란을 사용하여 티올화하였다. 티올화 반응은 1시간 동안 실온에서 연속적으로 혼합하면서 진행시켰다. 티올화 후에, 항체를 PD10 컬럼 (Sephadex G-25)에 의해 컨쥬게이션 버퍼 (50 mM HEPES, 5 mM 글라이신, 3% 글리세롤 (pH 6.0))로 버퍼 교환하였다. 티올화된 항체의 농도 및 티올 농도를 결정하였다.

[0676] 이어서, DMSO 중의 화학식 (p)의 화합물의 5 mM 원액을 항체의 티올당 3배 물 과량으로 첨가하고, 90분 동안 실온에서 혼합하였다. 컨쥬게이팅된 항체를 0.2 µm 필터를 통해 여과하였다. 생성되는 컨쥬게이트를 50 mM HEPES, 5 mM 글라이신, 100 mM NaCl (pH 7.2) 내에서 전개시키는 세파크릴-200 크기 배제 컬럼 상에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 단량체성 항체 컨쥬게이트를 함유하는 분획들을 모으고 한외여과에 의해 농축하였다. 항체 컨쥬게이트 농도 및 치환비는 280 및 340 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다.

[0677] PTK7-발현 인간 종양 암 세포주 A-431, SKOV3 및 LoVo를 100 µl 웰 내에 10<sup>4</sup>개 세포/웰로 접종하였다. 세포주를 표준 FACS 분석으로 PTK7의 세포 표면 발현에 대해 미리 시험하였다. A-431 세포주가 최고 수준의 PTK7 세포 표면 발현을 나타냈고, LoVo 세포주가 최저 수준의 PTK7 세포 표면 발현을 나타냈다. 12C6a-화학식 (p)의 화합물을 20 nM의 출발 농도로 웰에 첨가하고 1:2의 연속 희석비로 적정하였다. 이소형 대조 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. 플레이트를 3시간 동안 인큐베이팅하고, 비결합된 (유리) 항체-세포독소 컨쥬게이트를 세척 제거하였다. 플레이트를 96 시간 동안 계속 인큐베이팅하고, 세포 사멸 활성 (FU, 형광 단위)을 셀타이터-글로<sup>®</sup> 발광 분석 (프로메가 (Promega, 미국 위스콘신주), Technical bulletin No. 288) 및 BIO-TEK 판독기 (바이오-테크 인스트루먼트, 인크. (Bio-Tek Instruments, Inc, 미국 버몬트주)를 이용하여 측정하였다. 결과를 도 22에 제시한다. 12C6a-화학식 (p)의 화합물은 3개의 모든 세포주를 사용할 때 살아있는 세포에서 농도-의존적 감소를 보였고, 이는 세포독소에 컨쥬게이팅된 항-PTK7 항체가 다양한 인간 암 세포에 대해 특이적 세포독성을 보임을 입증한다.

[0678] **실시예 11: 3G8, 12C6a, 2E11 및 7C8를 사용한 면역조직화학법**

[0679] 면역조직화학법에 의해 PTK7을 인식하는 항-PTK7 HuMAb 3G8, 12C6a, 2E11 및 7C8의 능력을 폐암, 유방암, 신장암, 방광암, 췌장암, 결장암, 난소암, 소장암, 전립선암, 흑색종 및 두경부암으로부터의 임상 생검을 사용하여 검사하였다.

[0680] 면역조직화학법을 위해, 5 µm 동결 절편을 사용하였다 (아르다이스 인크. (Ardais Inc., 미국)). 30분 동안 건조한 후, 절편을 아세톤으로 고정하고 (실온에서 10분 동안), 5분 동안 공기 건조시켰다. 슬라이드를 PBS 내에서 세정한 후, PBS 중의 10% 정상 염소 혈청과 함께 20분 동안 예비-인큐베이팅한 후, 10% 정상 염소 혈청을 함유하는 PBS 중의 10 µg/ml의 FITC화된 (fitylated) 3G8, 12C6a 또는 2E11 항체와 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 슬라이드를 PBS로 3회 세척하고, 실온에서 마우스 항-FITC (10 µg/ml, 다코 (DAKO))와 함께 30분 동안 인큐베이팅하였다. 슬라이드를 다시 PBS로 세척하고, 염소 항-마우스 HRP 컨쥬게이트 (다코)와 함께 30분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 슬라이드를 다시 PBS로 3x 세척하였다. 디아미노벤지딘 (시그마)을 기질로서 사용하여, 갈색 염색을 획득하였다. 증류수로 세척한 후, 슬라이드를 1분 동안 헤마톡실린으로 대조 염색하였다. 후속적으로, 슬라이드를 흐르는 증류수에서 10초 동안 세척하고, 글리세롤 (다코) 내에 마운팅하였다. 임상 생검 면역조직화학 염색에서는 폐암, 유방암, 방광암, 췌장암, 결장암, 난소암, 소장암 및 전립선암 절편에서 양성 염색을 나타냈다. 정상 조직은 PTK7 염색에 대해 항상 음성인 반면, 악성 조직 내에서 암 활성화된 섬유모세포 및 암성 상피세포는 둘 모두 PTK7 염색에 대해 양성인 것으로 관찰되었다. 암 활성화된 섬유모세포의 정체는 섬유모세포 활성화 단백질 항체 (FAP, 알렉시스 바이오케미칼스 (Alexis Biochemicals, 미국 캘리포니아주 샌디에고))를 사용한 염색에 의해 방광암 및 유방암 절편에서 확인되었다.

FAP는 암 활성화된 섬유모세포의 공지의 마커이다 (Hofheinz et al. (2003) Oncologie 26:44-48).

[0681] 7C8은 FITC-표지된 염소 항-인간 Fab (Jackson # 109-097-003)와 예비-복합체화시켜, 7C8의 최종 농도를 5  $\mu\text{g}$  /ml로 하였다. 이어서, 상기 복합체를 표준 IHC 방법에서 사용하여 결합을 결정하였다. 7C8은 난소암, 췌장암, 폐암 (소세포 및 비-소세포), 흑색종, 신장암, 결장암, 유방암, 방광암 및 두경부암에 결합하였다.

[0682] **실시예 12: 침습 분석**

[0683] 본 실시예에서, PTK7에 대해 작용하는 항체를 PTK7로 형질감염된 CHO 세포주에서 세포 침습에 영향을 미치는 능력에 대해 시험하였다.

[0684] 본 분석은 프로토콜에 따라 HTS 96-멀티웰 삽입 시스템 (Insert System) (Cat# 351162, 비디 바이오사이언시스 (BD Biosciences, 미국 캘리포니아주))를 사용하여 수행하였다. CHO 모 세포주, 전장 PTK7로 형질감염된 CHO 세포, 또는 대조군 HEK293 세포주를 항-PTK7 HuMab 또는 이소형 대조 항체의 풀 (pool)과 혼합한 후, 세포를 삽입 웰에 첨가하였다. 혼합물 (세포 + Ab 풀)을 침습 플레이트에서 삽입 웰에 첨가하였다. 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 24시간 동안 인큐베이팅한 후, 세포를 형광 염료로 표지하고, 막의 바닥에 침습한 세포를 형광 플레이트 판독기를 사용하여 정량하였다. 결과를 도 23에 제시한다. 이 데이터는 항-PTK7 항체가 세포 표면 상에 PTK7을 발현하는 세포의 침습 이동을 억제하는 것을 입증한다.

[0685] **실시예 13: 비변형된 및 세포독소-컨쥬게이팅된 항-PTK7 항체를 사용한 생체내 췌장암 세포 이종이식 모델의 치료**

[0686] 본 실시예는 세포독소-컨쥬게이팅된 항-PTK7 항체가 췌장 세포 암종 종양을 이식한 마우스에서 종양 성장을 억제함을 보여준다. 본 발명의 항체에 컨쥬게이팅될 수 있는 세포독소 화합물의 예는 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 계류 중인 미국 특허 출원 11/134,826에 기재되어 있다. 본원에 설명되는 2개의 HuMab 항-PTK7 항체-독소 컨쥬게이트를 검사하였다: 7C8-화학식 (o)의 화합물 및 7C8-화학식 (p)의 화합물.

[0687] 화학식 (p)의 화합물을 상기 실시예 10에서 설명되는 프로토콜을 이용하여 7C8에 컨쥬게이팅시켰다. 화학식 (o)의 화합물은 다음과 같이 7C8에 컨쥬게이팅시켰다: 100 mM Na-포스페이트, 50 mM NaCl, 2 mM DTPA (pH 8.0) 중의 약 5 mg/ml의 7C8을 15배 물 과량의 2-이미노티올란을 사용하여 1시간 동안 실온에서 연속적으로 혼합하면서 티올화하였다. 이어서, 항체를 PD10 컬럼 (Sephadex G-25)에 의해 컨쥬게이션 버퍼 (50 mM HEPES, 5 mM 글라이신, 0.5% 포비돈 (10K), 2 mM DTPA (pH 5.5))로 버퍼 교환하였다. 티올화된 항체의 농도 및 티올 농도를 결정하였다. DMSO 중의 화학식 (o)의 화합물의 5 mM 원액 (r = 4)을 항체의 티올당 3배 물 과량으로 첨가하고, 90분 동안 실온에서 혼합하였다. 컨쥬게이팅된 항체를 0.2  $\mu\text{m}$  필터를 통해 여과하였다. 컨쥬게이션 후에, DMSO 중의 100 mM N-에틸말레이미드를 항체당 10배 물 과량의 티올로 첨가하여, 임의의 미반응된 티올을 켜청하였다. 상기 켜청 반응은 1시간 동안 실온에서 연속적으로 혼합하면서 수행하였다. NEM의 존재 하에 인큐베이팅한 후, 생성되는 컨쥬게이트를 50 mM HEPES, 5 mM 글라이신, 100 mM NaCl (pH 6.0) 내에서 전개시키는 세파크릴-200 크기 배제 컬럼 상에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 단량체성 항체 컨쥬게이트를 함유하는 분획들을 모으고 한외여과에 의해 농축하였다. 항체 컨쥬게이트 농도 및 치환비는 280 및 340 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다.

[0688] 항-PTK7 항체-독소 컨쥬게이트가 종양을 억제하는 것을 보여주기 위해 많은 췌장암 세포 종류가 사용될 수 있다. 본 실시예에서, HPAC (인간 췌장 선암종, ATCC 기탁 번호 CRL-2119)을 선택하고 표준 실험실 절차를 이용하여 시험관 내에서 팽창시켰다. 6-8주령의 수컷 Ncr 무홍선 누드 마우스 (타코닉 (Taconic, 미국 뉴욕주 허드슨))에 마우스당 0.2 ml PBS/마트리젤 (Matrigel) (1:1) 중의  $2.5 \times 10^6$ 개의 HPAC 세포를 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 마우스의 체중을 측정하고, 종양을 이식 후 매주 2회씩 전기 캘리퍼 (caliper)를 사용하여 3차원으로 측정하였다. 종양 부피는 높이 x 폭 x 길이/2로 계산하였다. 평균 90 mm<sup>3</sup>의 HPAC 종양이 있는 마우스를 치료군에 임의 배정하였다. 도 24에 제시된 바와 같이, 제0일에, 마우스에게 PBS 비히클, 비변형된 항-PTK7 항체, 7C8-화학식 (o)의 화합물, 또는 7C8-화학식 (p)의 화합물의 단일 정맥내 투여량을 지시된 용량 ( $\mu\text{mol/kg}$ )으로 투여하였다. 투여 후 61일 동안 종양 성장에 대하여 마우스를 모니터링하였다. 종양이 종양 종점 (2000 mm<sup>3</sup>)에 도달하였을 때 또는 궤양을 형성하였을 때, 마우스를 희생시켰다. 7C8 항체는 종양 성장 진행을 억제하였고, 7C8 컨쥬게이트에 의해 유의하게 증가된 억제가 나타났다 (도 24). 7C8 컨쥬게이트의 항-종양 효과는 투여량 의존성이었고, 최대 효과는 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ 의 투여량에서 관찰되었다. 항체 컨쥬게이트를 사용한 치료는 잘 견뎌졌고, 여기서 대사는 5% 초과 중량 체중 감소를 경험하지 않았다 (데이터를 제시하지 않음). 따라서,

항-PTK7 항체-세포독소 컨쥬게이트를 사용한 치료는 췌장암 종양 성장에 대해 직접적인 생체내 억제 효과를 갖는다.

[0689] **실시예 14: 비변형된 및 세포독소-컨쥬게이팅된 항-PTK7 항체를 사용한, 생체내 유방암 세포 이종이식 모델의 치료**

[0690] 본 실시예는 항-PTK7 항체 컨쥬게이트가 생체 내에서 유방암 종양의 성장을 억제함을 보여준다.

[0691] MCF7-adr 세포 (아드리아마이신에 내성인 인간 유방암 세포)를 표준 실험실 절차를 이용하여 시험관 내에서 팽창시켰다. 6-8주령의 암컷 CB17.SCID 마우스 (타코닉)에게 1.7 mg의 90일 방출형 에스트로겐 펠렛 (3.0 mm 크기, 이노베이트 리서치 오브 아메리카 (Innovative Research of America, 미국 플로리다주 사라소타))을 피하 이식하였다. 에스트로겐을 목 부위에 투여한 1일 후에, 마우스당 0.2 ml PBS/마트리젤 (1:1) 중의  $10 \times 10^6$  개의 MCF7-Adr 세포를 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 마우스의 체중을 측정하고, 종양을 이식 후 매주 2회씩 전기 캘리퍼를 사용하여 3차원으로 측정하였다. 종양 부피는 높이 x 폭 x 길이/2로 계산하였다. 평균  $160 \text{ mm}^3$ 의 MCF7-adr 종양이 있는 마우스를 치료군에 임의 배정하였다. 마우스에게 제0일에 PBS 비히클,  $0.1 \mu\text{mol/kg}$ 의 비변형된 7C8 또는 7C8-화학식 (o)의 화합물의 단일 정맥내 투여량을 투여하였다. 투여 후 63일 동안 종양 성장에 대하여 마우스를 모니터링하였다. 종양이 궤양을 형성하였을 때, 마우스를 희생시켰다. 결과를 도 25에 제시한다. 7C8-화학식 (o)의 화합물은 종양 성장을 억제하였다. 따라서, 항-PTK7 항체-세포독소 컨쥬게이트를 사용한 치료는 유방암 종양 성장에 대해 직접적인 생체내 억제 효과를 갖는다.

[0692] **실시예 15: 7C8 독소 컨쥬게이트에 의한 생체 내 종양 억제**

[0693] 본 실시예에서, 독소 컨쥬게이팅된 7C8은 생체내 SCID 마우스 모델에서 상피세포 및 폐 종양 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 본 실시예에서, 7C8을 화학식 (m)의 화합물에 컨쥬게이팅시켰다. 화학식 (m)의 화합물의 구조를 도 28에 제시한다. 화학식 (m)의 화합물, 및 그의 제조법은 그 전체 내용이 본원에 참고로 구체적으로 포함된 미국 특허 출원 60/882,461 (2006년 12월 28일 출원)에 추가로 설명되어 있다. 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트는 다음과 같이 제조하였다:

[0694] 항-PTK7 항체 7C8을 약 5 mg/ml로 농축시키고, 100 mM 포스페이트 버퍼, 50 mM NaCl, 2 mM DTPA (pH 8.0) 내로 버퍼 교환하고, 8 내지 10배 물 과량의 2-이미노티올란을 첨가하여 60분 동안 실온에서 티올화하였다. 티올화 후에, 항체를 300 mM 글라이신, 2 mM DTPA 및 0.5% 포비돈 (10 K)을 함유하는 50 mM HEPES 버퍼 (pH 5.5) 내로 버퍼 교환하였다. 티올화는 324 nM에서 티오피리딘 방출을 측정함으로써 4,4"-디티오디피리딘을 사용하여 정량하였다. 컨쥬게이션은 말레이미드 함유 화학식 (m)의 화합물을 3:1 몰비의 약물 대 티올로 첨가하여 달성하였다. 인큐베이션은 실온에서 60분이고, 이어서, 티올에 대해 10:1 몰비의 N-에틸말레이미드 (NEM)를 반응 혼합물에 첨가하여 임의의 미반응된 티올을 켄칭하였다. 상기 켄칭 반응은 1시간 동안 실온에서 연속적으로 혼합하면서 수행하였다.

[0695] 이어서, 항체 약물 컨쥬게이트를 0.2  $\mu\text{m}$  여과한 후, 양이온-교환 크로마토그래피로 정제하였다. SP 세파로즈 고성능 양이온 교환 컬럼 (CEX)을 5 CV (컬럼 부피)의 50 mM HEPES, 5 mM 글라이신, 1 M NaCl (pH 5.5)로 재생시켰다. 재생 후에, 컬럼을 3 CV의 평형화 버퍼 (50 mM HEPES, 5 mM 글라이신 (pH 5.5))로 평형화시켰다. 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트를 로딩하고, 컬럼을 평형화 버퍼로 1회 세척하였다. 컨쥬게이트를 50 mM HEPES, 5 mM 글라이신, 230 mM NaCl (pH 5.5)로 용출시켰다. 용출물을 분획으로 모았다. 이어서, 컬럼을 50 mM HEPES, 5 mM 글라이신, 1 M NaCl (pH 5.5)로 재생시켜 단백질 응집물 및 임의의 미반응된 화학식 (m)의 화합물을 제거하였다. 용출물 분획을 모으는 것은 응집 수준 및 치환비 (SR), 즉, 항체 1몰 당 약물의 몰수에 기초하였다. 모으는 기준은 1-2의 SR 범위와 함께 SEC-HPLC에 의해 결정된  $\geq 95\%$  단량체이었다. 정제된 CEX 용출물 풀을 PES 막이 있는 10 NMWCO 플랫시트 (flat-sheet) TFF 카세트에서 벌크 (bulk) 투석여과 버퍼 (30 mg/ml 수크로스, 10 mg/ml 글라이신 (pH 6.0)) 내로 버퍼 교환하였다. 벌크 제제는 단백질 농도를 5 mg/ml로 희석하고, 텍스트란 40을 투석여과된 컨쥬게이트 용액에 10 mg/ml의 최종 농도로 첨가함으로써 완료하였다. 제제화된 벌크를 0.2  $\mu\text{m}$  PES 필터를 통해 멸균 PETG 병 내로 여과하고, 2°C 내지 8°C에서 저장하였다.

[0696] 이어서, 생체내 쥐 모델에서 A431 이종이식 종양의 성장에 대한 7C8 및 7C8-화학식 (m)의 화합물의 효과를 검사하였다. A431은 PTK-7을 발현하는 상피 세포주이고, 따라서 유방암, 결장암, 폐암, 위암, 신장암, 두경부암, 방광암, 전립선암 및 췌장암을 포함한, PTK-7 단백질을 발현하는 상피암을 대표한다. 또한, 7C8은 FACS 및 IHC에 의해, 이들 질병을 나타내는 세포주 및 암에 결합하는 것으로 나타났다. PTK7은 때때로 또한 상피암의 활성화된 간질 상에서 발현된다. 항-PTK7 항체 약물 컨쥬게이트, 예를 들어 7C8-화학식 (m)의 화합물은 이들 암에

서 항암 활성을 가질 것이다. 이는 항-RG1 독소 컨쥬게이트의 활성과 유사하다. RG-1은 또한 세포 간질 상에서 발현된다. 전립선암의 이종이식 모델에서 항-RG-1 항체 약물 컨쥬게이트의 항암 활성은 미국 특허 출원 60/991,690에 설명되어 있다.

[0697] A431 이종이식 모델에서, SCID 마우스 (CB17 SCID, 타코닉 팜스 (Taconic Farms, 미국 뉴욕주 저먼타운))에 A431 세포를 이식하고, 종양이 약 90 mm<sup>3</sup>에 도달할 때까지 성장시켰다. 이어서, 마우스를 무작위로 배정하고, 비히클 단독, 화학식 (m)의 화합물에 연결된 이소형-매칭된 인간 IgG 항체 (이소-화학식 (m)의 화합물) 0.3 μmole/kg, 비변형된 7C8, 또는 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트 (0.3 μmole/kg)의 단일 투여량으로 복강내 처리하였다. 종양 부피를 35일 이상 규칙적인 간격에서 측정하였다 (도 26).

[0698] 비변형된 7C8 항체 또는 이소형 매칭된 항체-화학식 (m)의 화합물을 사용한 처리에서는 A431 종양 세포 부피에 대한 영향을 보이지 않은 (즉, 종양 성장을 억제하지 않은) 반면, 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트를 사용한 처리는 도 26a에 예시된 바와 같이 종양 성장을 유의하게 억제하였다. 추가로, 체중에 의해 측정할 때 마우스에 투여할 때 독성은 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트와 연관되지 않았다 (도 27).

[0699] 제2 세트의 분석에서, 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트는 마우스 이종이식 모델에서 소세포 폐암 유래된 DMS79 세포의 성장을 억제하였다. 이종이식 모델에서, SCID 마우스에게 마우스당 5 x 10<sup>6</sup>개의 DMS79 세포를 이식하고, 평균 종양 부피가 약 200 mm<sup>3</sup>일 때까지 성장시켰다. 이어서, 마우스를 무작위로 배정하고, 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트 (0.3 μmol/kg)로 복강내 처리하였다. 도 27C에 도시된 바와 같이, 7C8-화학식 (m)의 화합물 컨쥬게이트를 사용한 처리는 제81일까지 모든 마우스에서 완전 종양 관해를 일으켰다.

[0700] 요약하면, 항-PTK7 항체 독소 컨쥬게이트는 생체 내에서 상피 종양 및 폐 종양 성장을 유의하게 억제하였고, 마우스에서 유의한 독성을 나타내지 않았다.

#### [0701] 실시예 16: 사이노몰거스 (cynomolgus) 원숭이에서 7C8-화학식 (m)의 화합물의 독성 평가

[0702] 사이노몰거스 원숭이 및 인간은 유사한 PTK7 발현 패턴을 보인다. 면역조직화학 분석에서는 7C8이 인간에서처럼 사이노몰거스 원숭이에서 동일한 조직에 결합하는 것을 보여준다. 따라서, 사이노몰거스 원숭이는 7C8-화학식 (m)의 화합물의 표적상 독성을 평가하기 위해 적합하다.

[0703] 7C8-화학식 (m)의 화합물을 2마리의 수컷 및 2마리의 암컷 사이노몰거스 원숭이에 정맥내 투여하였다. 0.4 μmol/kg의 2회 투여량을 제1일 및 제15일에 제공하였다. 동물을 거동 변화, 독성의 징후에 대해 관찰하고, 분석을 위해 혈액을 채혈하였다. 거동 변화는 인지되지 않았다. 혈액 세포 및 화학 분석에서는 약물 관련 변화가 밝혀지지 않았다. PTK7을 발현하는 것으로 알려진 조직 (예를 들어 난소 섬유모세포)의 병리학적 검사에서는 7C8-화학식 (m)의 화합물에 의해 유도된 독성의 증거를 보이지 않았다. 따라서, 7C8-화학식 (m)의 화합물 독성은 사이노몰거스 원숭이에서 검출되지 않았다.

서열 번호	서열	서열 번호	서열
1	VH a.a. 3G8, 3G8a	22	VH CDR3 a.a. 7C8
2	VH a.a. 4D5	23	VK CDR1 a.a. 3G8
3	VH a.a. 12C6, 12C6a	24	VK CDR1 a.a. 3G8a
4	VH a.a. 7C8	25	VK CDR1 a.a. 4D5
5	VK a.a. 3G8	26	VK CDR1 a.a. 12C6
6	VK a.a. 3G8a	27	VK CDR1 a.a. 12C6a
7	VK a.a. 4D5	28	VK CDR1 a.a. 7C8
8	VK a.a. 12C6	29	VK CDR2 a.a. 3G8

[0704]



서열 번호	서열	서열 번호	서열
9	VK a.a. 12C6a	30	VK CDR2 a.a. 3G8a
10	VK a.a. 7C8	31	VK CDR2 a.a. 4D5
11	VH CDR1 a.a. 3G8	32	VK CDR2 a.a. 12C6
12	VH CDR1 a.a. 4D5	33	VK CDR2 a.a. 12C6a
13	VH CDR1 a.a. 12C6	34	VK CDR2 a.a. 7C8
14	VH CDR1 a.a. 7C8	35	VK CDR3 a.a. 3G8
15	VH CDR2 a.a. 3G8	36	VK CDR3 a.a. 3G8a
16	VH CDR2 a.a. 4D5	37	VK CDR3 a.a. 4D5
17	VH CDR2 a.a. 12C6	38	VK CDR3 a.a. 12C6
18	VH CDR2 a.a. 7C8	39	VK CDR3 a.a. 12C6a
19	VH CDR3 a.a. 3G8	40	VK CDR3 a.a. 7C8
20	VH CDR3 a.a. 4D5	41	VH n.t. 3G8, 3G8a
21	VH CDR3 a.a. 12C6	42	VH n.t. 4D5
43	VH n.t. 12C6, 12C6a	71	펩티드 링커
44	VH n.t. 7C8	72	펩티드 링커
45	VK n.t. 3G8	73	펩티드 링커
46	VK n.t. 3G8a	74	펩티드 링커
47	VK n.t. 4D5	75	펩티드 링커
48	VK n.t. 12C6	76	펩티드 링커
49	VK n.t. 12C6a	77	펩티드 링커
50	VK n.t. 7C8	78	펩티드 링커
51	VH 3-30.3 생식계열 a.a.	79	펩티드 링커
52	VH DP44 생식계열 a.a.	80	펩티드 링커
53	VH 3-33 생식계열 a.a.	81	펩티드 링커
54	VK L15 생식계열 a.a.	82	펩티드 링커
55	VK A10 생식계열 a.a.	83	펩티드 링커
56	VK A27 생식계열 a.a.	84	VH a.a. 1F12
57	VK L6 생식계열 a.a.	85	VK1 a.a. 1F12
58	PTK7 a.a.	86	VK2 a.a. 1F12
59	JH4b 생식계열 a.a.	87	VH CDR1 a.a. 1F12

[0705]

서열 번호	서열	서열 번호	서열
60	JH4b 생식계열 a.a.	88	VH CDR2 a.a. 1F12
61	3-7 생식계열 a.a.	89	VH CDR3 a.a. 1F12
62	3-23 생식계열 a.a.	90	VK1 CDR1 a.a. 1F12
63	JH4b 생식계열 a.a.	91	VK1 CDR2 a.a. 1F12
64	JH6b 생식계열 a.a.	92	VK1 CDR3 a.a. 1F12
65	JK1 생식계열 a.a.	93	VK2 CDR1 a.a. 1F12
66	JK5 생식계열 a.a.	94	VK2 CDR2 a.a. 1F12
67	JK2 생식계열 a.a.	95	VK2 CDR3 a.a. 1F12
68	JK2 생식계열 a.a.	96	VH n.t. 1F12
69	JK3 생식계열 a.a.	97	VK1 n.t. 1F12
70	펩티드 링커	98	VK2 n.t. 1F12

[0706]



**항-PTR7 3g8 VH**

V 세그먼트: 3-30.3  
D 세그먼트: 미결정  
J 세그먼트: JH4b

1 Q V Q L V E S G G V Q P G R S L  
CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

**CDR1**

55 R L S C A A S G F I F S N Y A M H W  
CGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ATC AGT AAC TAT GCT ATG CAC TGG

**CDR2**

109 V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D  
GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

**CDR2**

163 G N N K Y Y A D S V K G R F T I S R  
GGA AAC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

**CDR3**

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D  
GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

271 T A V Y Y C A R E V W S I D N W G Q  
ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GTC TGG AGT ATT GAC AAC TGG GGC CAG

325 G T L V T V S S  
GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

도면  
도면1a

**항-PTK7 3G8 VK**  
V 세그먼트 : L15  
J 세그먼트 : JK1

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R  
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

55 V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y  
GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L  
CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T  
CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q  
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

271 Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K  
TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

도면1b

**항-PYK7 3G8a VK**

V 세그먼트: L15  
J 세그먼트: JK3

1 D I Q M T Q S P S L S A S V G D R  
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

**CDR1**

55 V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y  
GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

**CDR2**

109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L  
CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

**CDR2**

163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T  
CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

**CDR3**

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q  
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

**CDR3**

271 Y N S Y P F T F G P G T K V D I K  
TAT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

도면1c

항-P<sup>TK</sup>7 4D5 VH  
V 세그먼트 : 3-30.3  
D 세그먼트 : 미결정  
J 세그먼트 : JH4b

1 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTG CAG CCT GGG AGG TCC CTG

CDR1

55 R L S C A A S G F T F S S Y A F H W  
AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT TTC CAC TGG

CDR2

109 V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D  
GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

CDR2

163 G S I K Y Y A D S V K G R F T I S R  
GGA AGC ATT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

CDR3

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D  
GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

CDR3

271 T A V Y Y C A R T Y Y F D Y W G Q G  
ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG ACG TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA

도면2a

**형-PTK7 AD5 VK**

V 세그먼트: A10  
J 세그먼트: JK5

1 E I V L L T Q S P D F Q S V T P K E K  
GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CCA GAC TTT CAG TCT GTG ACT CCA AAG GAG AAA

**CDR1**

55 V T I T C R A S Q S I G S L H W Y  
GTC ACC ATC ACC TGC CGG GCC AGT CAG AGC ATT GGT AGT AGC TTA CAC TGG TAC

**CDR2**

109 Q Q K P D Q S P K L L I K Y A S Q S  
CAG CAG AAA CCA GAT CAG TCT CCA AAG CTC CTC ATC AAG TAT GCT TCC CAG TCC

**CDR2**

163 F S G V P S R F S G S G T S G T F T  
TTC TCA GGG GTC CCC TCG AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACC

**CDR3**

217 L T I N S L E A E D A A Y Y C H Q  
CTC ACC ATC AAT AGC CTG GAA GCT GAA GAT GCT GCA GCG TAT TAC TGT CAT CAG

**CDR3**

271 S S S L P I T F G Q G T R L E I K  
AGT AGT AGT TTA CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

도면2b



항-PTK7 12C6 VH

V 세그먼트 : DP-44  
D 세그먼트 : 미결정  
J 세그먼트 : JH4b

1 E V Q L V Q S G G L V H P G G S L  
GAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAT CCT GGG GGG TCC CTG

CDR1

55 R L S C A G S G F T F S T Y L M Y W  
AGA CTC TCC TGT TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT CTT ATG TAC TGG

CDR2

109 V R Q A P G K T L E W V S A I G S G  
GTT CGC CAG GCT GCT CCA GGA AAA ACT CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT GGT TCT GGT

CDR2

163 G D T Y Y A D S V K G R F T I S R D  
GGT GAT ACA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC

CDR3

217 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D M  
AAT GCC AAG AAC ACC TTC TTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ATG

CDR3

271 A V Y Y C A R G L G Y W G Q G T L V  
GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GGA CTG GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG CTC

325 T V S S  
ACC GTC TCC TCA

도면3a

**형-PTK7 12c6 VK**  
V 세그먼트 : A27  
J 세그먼트 : JK2

1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R  
GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

55 A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W  
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

109 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S  
TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

163 R A T G I P D R F S G S G S G T D F  
AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

217 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q  
ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

271 Q Y G S S P M Y T F G Q G T K L E I  
CAG TAT GGT AGC TCA CCC ATG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC

325 K  
AAA

**항-PTK7 12C6a VK**  
V 세그먼트: L15  
J 세그먼트: JK2

1 D I Q M T Q S P S L S A S V G D R  
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

55 V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y  
GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L  
CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

**CDR1**  
~~~~~

**CDR2**  
~~~~~

163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T  
CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

**CDR3**  
~~~~~

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q  
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

**CDR3**  
~~~~~

271 Y N S Y P Y T F G Q G T K L E I K  
TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

항-PTK1 7C8 VH  
V 세그먼트: 3-33  
D 세그먼트: 3-10  
J 세그먼트: JH6b

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L  
CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

CDR1

55 R L S C A A S G F T F S S Y G M H W  
AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG

CDR2

109 V R Q A P G K G L E W V A V I W D D  
GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG GAT GAT

CDR2

163 G S N K Y Y V D S V K G R F T I S R  
GGA AGT AAT AAA TAC TAT GTA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D  
GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

CDR3

271 T A V Y Y C A R D D Y Y G S G S F N  
ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TTT AAC

CDR3

325 S Y Y G T D V W G Q G T T V T V S S  
TCC TAC TAC GGT ACG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACC GTC ACC GTC TCC TCA

도면4a

**항-pTK7 7C8 VK**

V 세그먼트 : L6  
J 세그먼트 : JK3

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R  
GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

**CDR1**

55 A T L S C R A S Q S V S I Y L A W Y  
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC ATC TAC TTA GCC TGG TAC

**CDR2**

109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R  
CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

**CDR2**

163 A T G I P A R F S G S G T S G T F T  
GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

**CDR3**

217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q  
CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

**CDR3**

271 R S N W P P F T F G P G T K V D I K  
CGT AGC AAC TGG CCT CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

도면4b



항-PTK7 3G8 및 3G8a VH 구역

[illegible][illegible]

3-30.3 생식계열	D N S K N T L Y L Q M N S I R A E D T A V Y Y C A R	CDR3	D Y W G Q
JH4b 생식계열	- - - - -		- - - - -
3G8 VH	- - - - -		E V W S I - N - -
3G8a VH	- - - - -		E V W S I - N - -

JH4b 생식계열	G T L V T V S S	
3G8 VH	- - - - - - -	(JH4b)
3G8a VH	- - - - - - -	(JH4b)

영-PTK7 4D5 VH 7.9

[illegible]

3-30.3 생식계열  
AD5 VH

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

CDR2

[illegible]

JH4b 생식계열	S	(JH4b)
4D5 VH	-	

항-PTK7 12C6 및 12C6a VH 구역

DP-44 생식계열  
3-7 생식계열 : E V Q L V Q S G G G L V H P G G S L R L S C A G S G F T F S S Y A M H W V R  
3-23 생식계열 : - - - - E - - - - - Q - - - - - A - - - - - W - S - -  
12C6 VH - - - - L E - - - - - Q - - - - - A - - - - - T - L - Y - -  
12C6a VH - T - L - Y - -

DP-44 생식계열  
3-7 생식계열 : Q A P G K G L E W V S A I G T G G T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N  
3-23 생식계열 : - - - - - - - - - - A N - K Q D - S E K - V - - - - - - - - - - S - -  
12C6 VH - - - - - T - - - - - - - - - - S - - D - - - - - - - - - - - - - - -  
12C6a VH - - - - - T - - - - - - - - - - S - - D - - - - - - - - - - - - - - -

DP-44 생식계열  
3-7 생식계열 : S L Y L Q M N S L R A E D M A V Y Y C A R - CDR3  
3-23 생식계열 : - T - - - - - K  
JH4b 생식계열 : T - T - - - - - Y W G Q G T L V T V S S  
12C6 VH - G L G - - - - - (JH4b)  
12C6a VH - G L G - - - - - (JH4b)

영-PTK7 7C8 VH 구역

3-33 생식계열  
7C8 VH

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

CDR1

3-33 생식계열  
7C8 VH

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

CDR2

[illegible]

**JH6b 생식계열**

X Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S	(JH6b)
S - - - T - - - - - - - - - - - -	

항-PTK7 3G8 및 3G8a VK 구역

L15 생식계열  
3G8 VK  
3G8a VK

D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	S	S
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L15 생식계열  
3G8 VK  
3G8a VK

W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	E	K	A	P	K	S	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L15 생식계열  
3G8 VK  
3G8a VK

S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L15 생식계열  
JK1 생식계열  
3G8 VK  
3G8a VK

Y	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	F	-	-	P	-	-	-	-	D	-	-

(JK1)  
(JK3)



30-PTK7 4D5 VK 7.9

A10 생식계열  
4D5 VR

E I V L T Q S P D F Q S V T P K E K V T I T C R A S Q S I G S

CDR1

**A10 생식계열**  
**AD5 VR**

S	L	H	W	Y	Q	Q	K	P	D	Q	S	P	K	L	I	K	Y	A	S	Q	S	F	S	G	V	P	S	R	F
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CDR2

A10 생식 계열  
AD5 VR

S G S G S G T D F T L T I N S L E A E D A A T Y Y C H Q S S S

CDR3

A10 생식계열	L P
JK5 생식계열	I T F G Q G T R L E I K
AD5 VR	- - - - - - - - - -

(JK5)

항-PTK7 12C6 VK 구역

A27 생식계열  
12C6 VK1  
E I V L L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W

A27 생식계열  
12C6 VK1  
Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G T D F

A27 생식계열  
JK2 생식계열  
12C6 VK1  
T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P Y T F G Q G T K L E I K (JK2)

영-PTK7 12C6a VK 77

L15 생식계열  
12C6 VK2

D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S

CDR1

L15 생식계열  
12C6 VK2

W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F

CDR2

	<u>CDR3</u>
L15 생식계열	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
12C6 VK2	- -

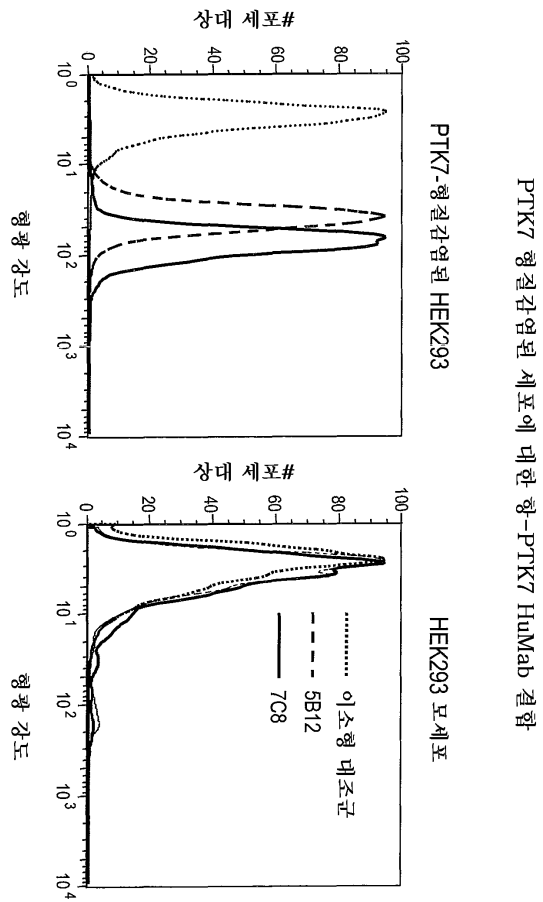
[illegible]

도면13

항-PTK7 7C8 VK 구역	
L6 생식계열 7C8 VK1	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y - - - - - - - - - - - - - - -
L6 생식계열 7C8 VK1	Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G T D F T - - - - - - - - - - - - - - -
L6 생식계열 JK3 생식계열 7C8 VK1	L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P P F T F G P G T K V D I K - - - - - - - - - - - - - - -

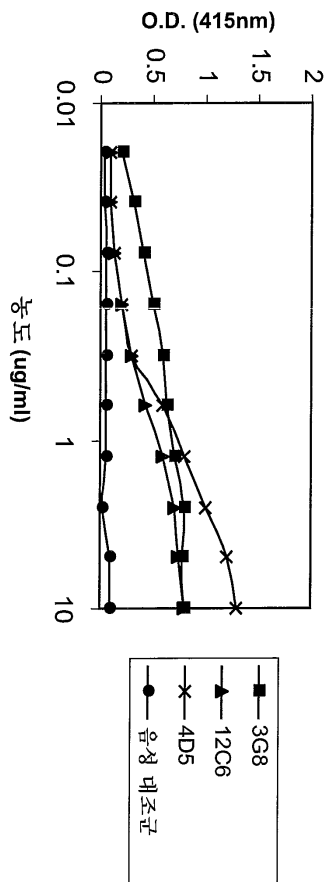
(JK3)

도면14



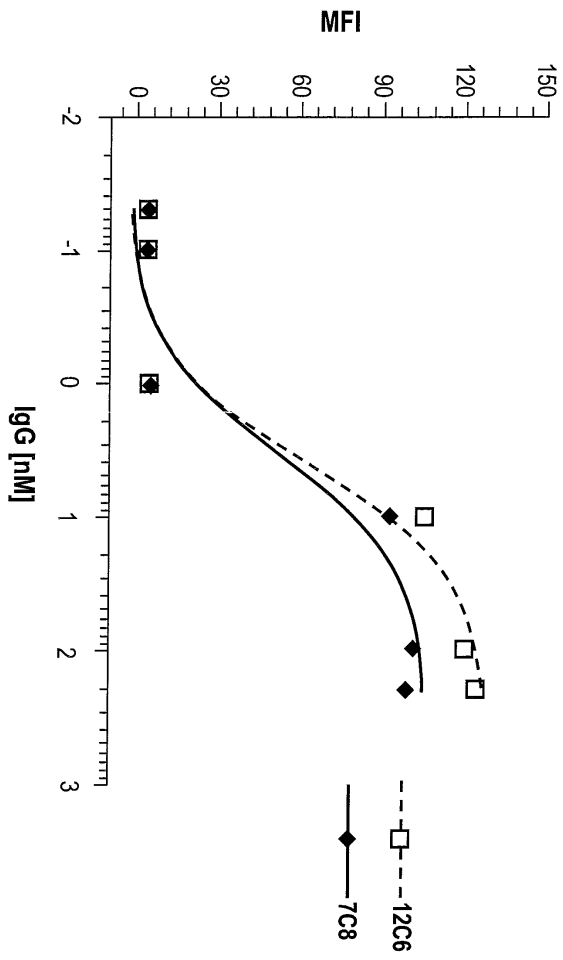


도면15



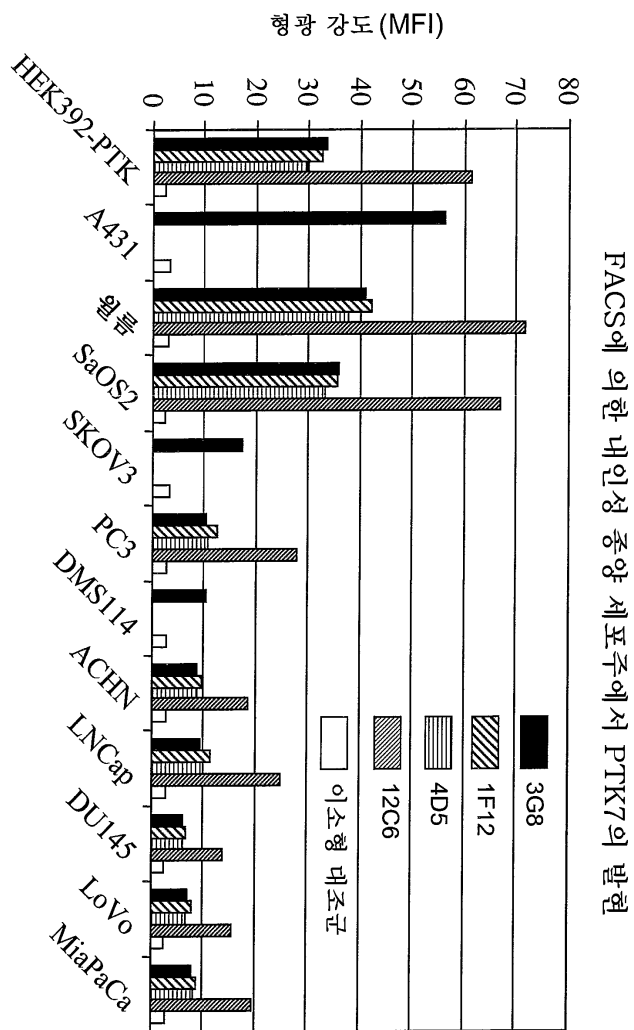
ELISA에 의한 PTK7 단백질에 대한 PTK7 항체 결합

도면16

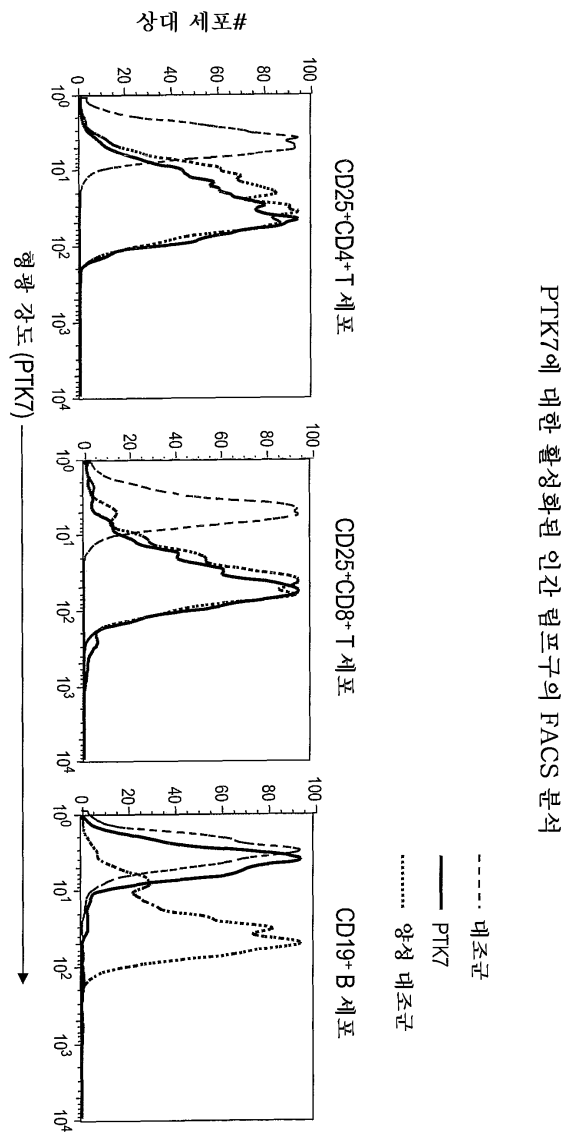


원뿔즈 종양 세포 상에서 FACS 적정

도면17

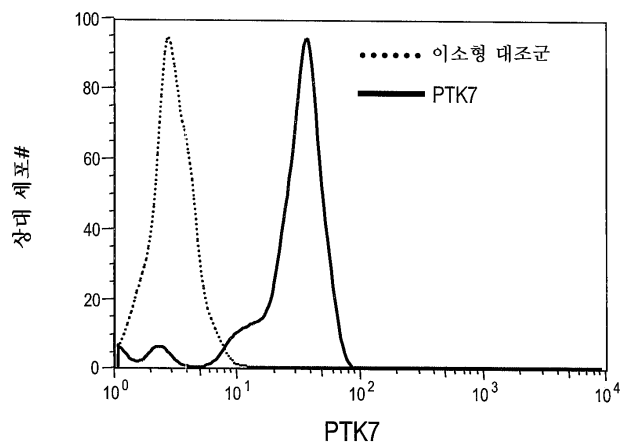


도면18

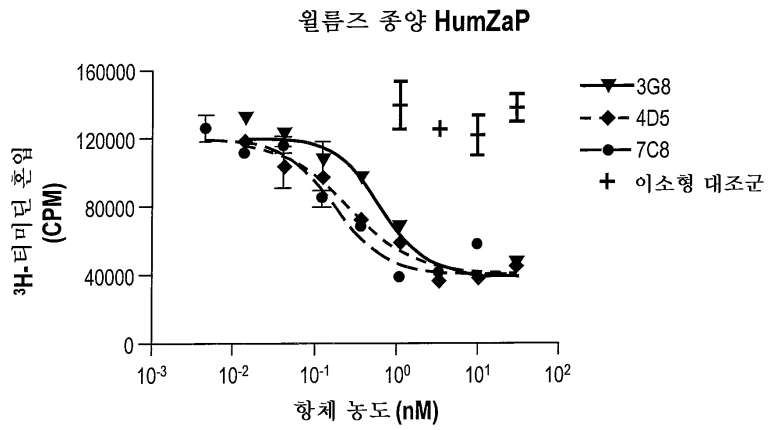


도면19

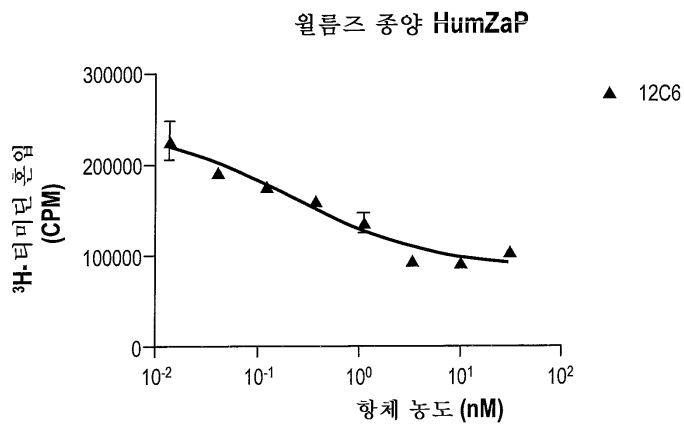
수지 세포 상에서 항-PTK7 HuMab의 FACS 분석



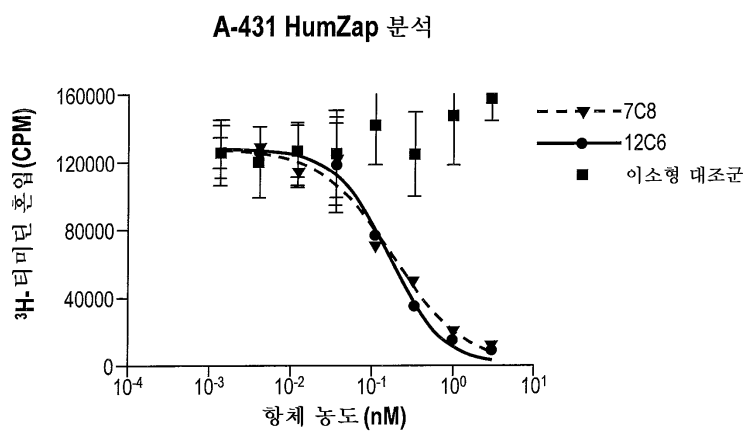
도면20a



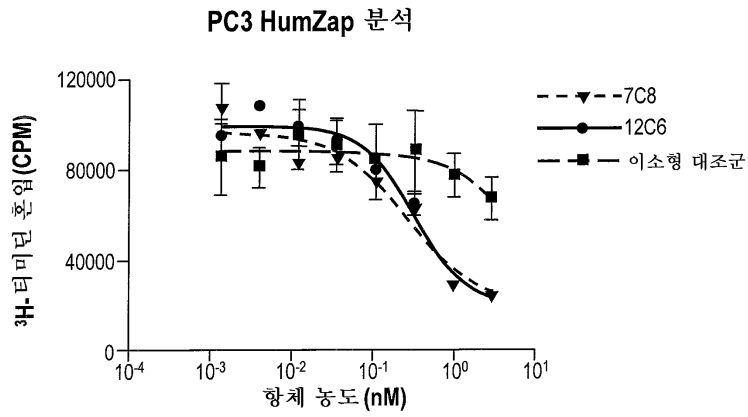
도면20b



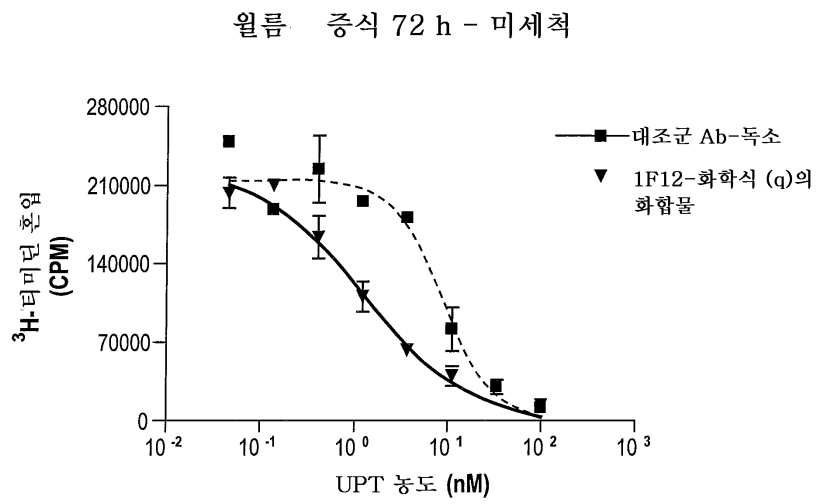
도면20c



도면20d

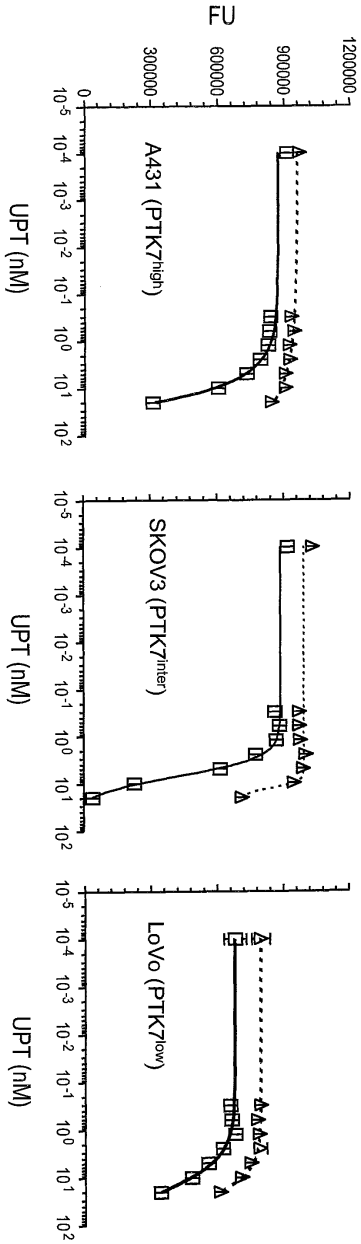


도면21



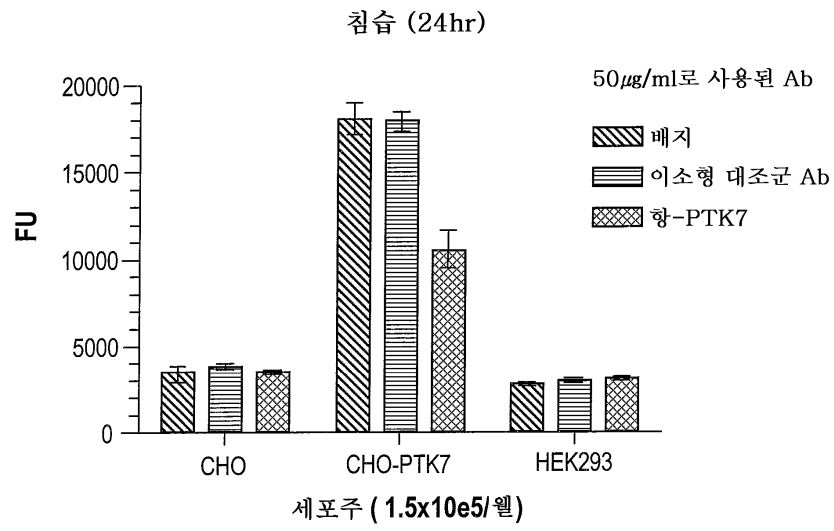


도면22

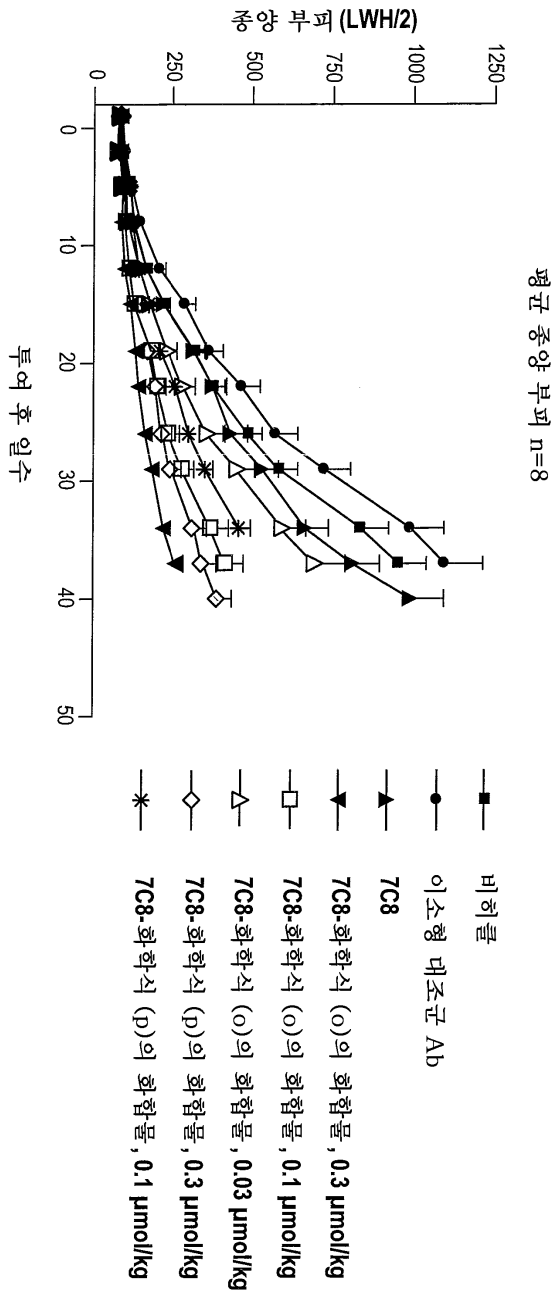


□ 12C6a-화학식 (p) 의 화합물  
Δ 이소형 대조군-화학식 (p) 의 화합물

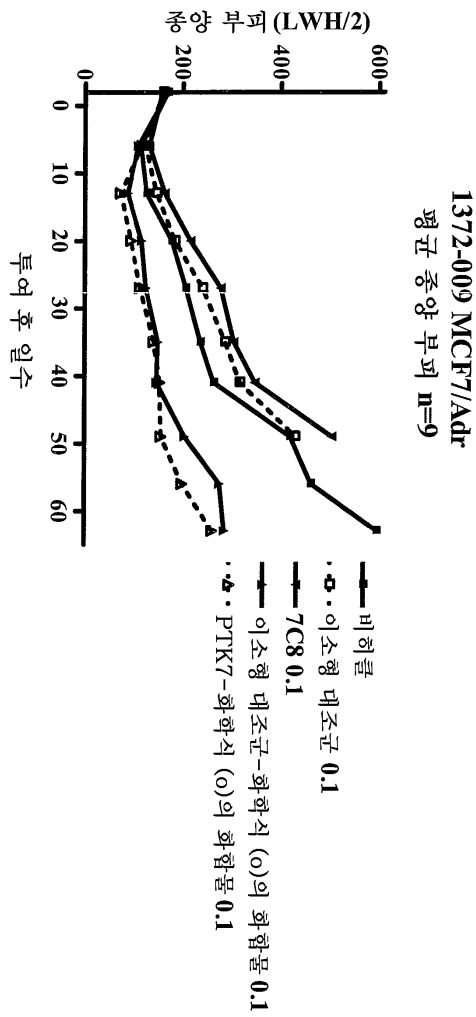
도면23



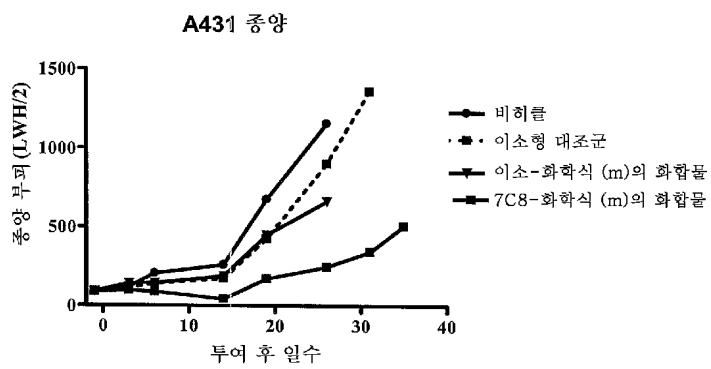
도면24



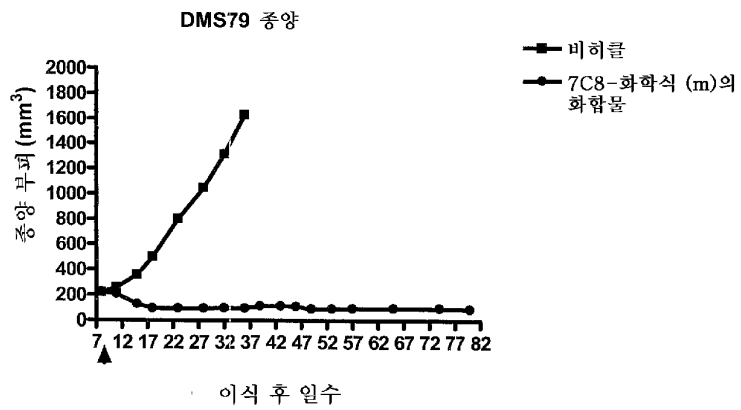
도면25



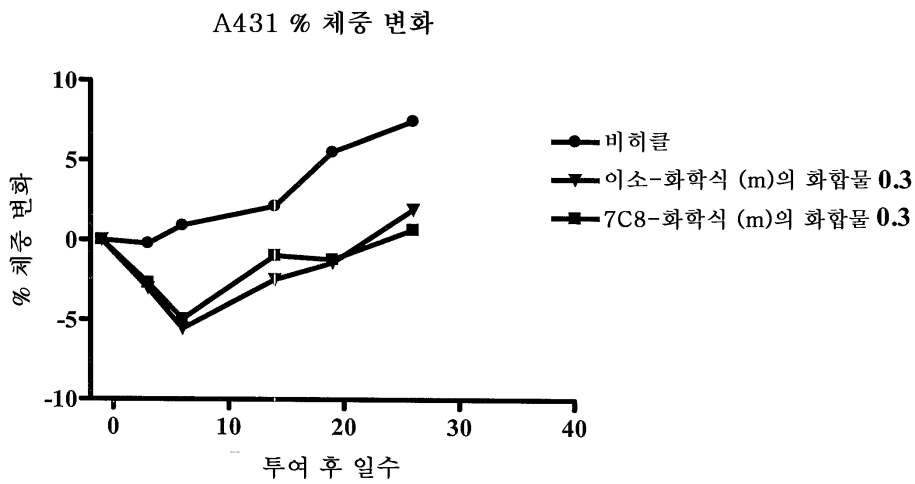
도면26a



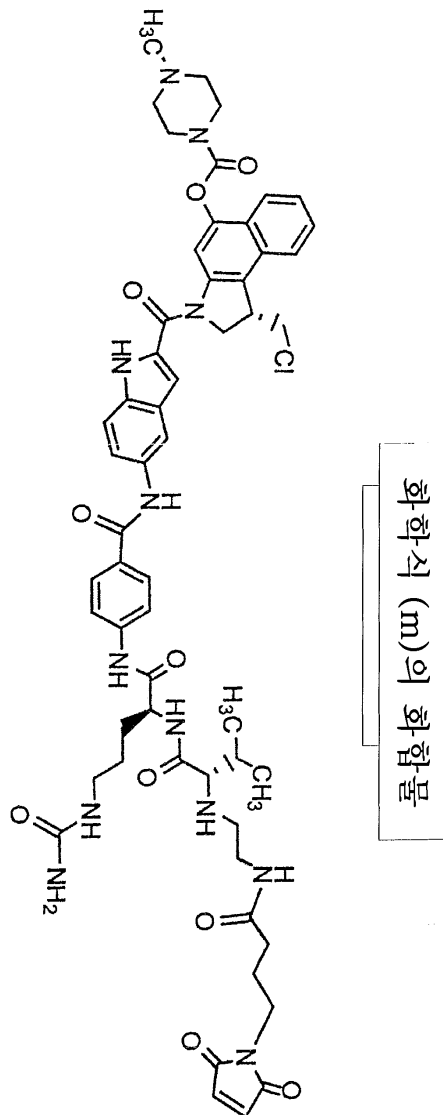
도면26b



도면27



도면28



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Medarex, Inc.  
 Terrett, Jonathan A.  
 Pan, Chin  
 Rao-Naik, Chetana
- <120> MONOCLONAL ANTIBODY PARTNER MOLECULE CONJUGATES DIRECTED TO  
 PROTEIN TYROSINE KINASE 7 (PTK7)
- <130> 0198PC
- <140> PCT/US2008/084949
- <141> 2008-11-26



<150> 61/005034

<151> 2007-11-30

<160> 80

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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  
 Ala Arg Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

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

85 90 95  
 Arg Gly Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Asn Ser Tyr Tyr Gly

100 105 110

Thr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

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

85 90 95  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30  
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45  
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe  
85 90 95  
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
20 25 30

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

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

50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile  
85 90 95

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

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

100

105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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 Gln Ser Val Ser Ile Tyr

20

25

30

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

35

40

45



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

100 105

<210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11

Asn Tyr Ala Met His  
 1 5

<210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12

Ser Tyr Ala Phe His  
 1 5

<210> 13  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13

Thr Tyr Leu Met Tyr  
 1 5

<210> 14  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210

> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1                      5                      10                      15

Gly

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Val Trp Ser Ile Asp Asn

1                      5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1                      5

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gly Leu Gly Tyr

1

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Asn Ser Tyr Tyr Gly Thr Asp

1                      5                      10                      15

Val

<210> 23

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10  
 <210> 24  
 <211> 11  
 <  
 212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10  
 <210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25  
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His  
 1 5 10  
 <210> 26  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10  
 <210> 27  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <  
 213> Homo sapiens  
 <400> 27  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1                    5                    10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Tyr Leu Ala

1                    5                    10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1                    5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1                    5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1                    5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile Thr

1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 38

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr

1 5 10

<210> 41

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgcgactc 60

tcctgtgcag cctctggatt catcttcagt aactatgcta tgcactgggt ccgccagget 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaacaa taaatactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240



ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaggtc 300  
 tggagtattg acaactgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctcctca 348  
 <210> 42  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 42  
 caggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc gtggccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgctt tccactgggt cgcagggt 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcat taaatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaggacgtac 300  
 tactttgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345  
 <210> 43  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 43  
 gaggttcagc tggtagcagtc tgggggaggc ttggtacatc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag gcctctggatt caccttcagt acctatctta tgtactgggt tcgccagggt 120  
 ccaggaaaaa ctctggagtg ggtctcagct attggttctg gtggtgatac atactatgca 180  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc ctgtatctt 240  
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacatg gctgtgtatt actgtgcaag aggactgggc 300  
 tactggggcc aggaaccct ggtcaccgtc tctca 336  
 <210> 44  
 <211> 378  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 44  
 caggtgcaac tggtaggagtc tgggggaggc gtggccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgctctggatt caccttcagt agctatggca tgactagggt cgcagggt 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggatg atggaagtaa taaatactat 180

gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgat 300  
tactatgggt cggggagttt taactcctac tacggtacgg acgtctgggg ccaagggacc 360  
acggtcaccg tctcctca 378

<210> 45

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400

> 45

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggtagca gcagaaacca 120  
gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcggac gttcggccaa 300  
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 46

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggtagca gcagaaacca 120  
gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accattcac tticggccct 300  
gggaccaag tggatatcaa a 321

<210> 47

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120  
gatcagtctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttaccctca ccatcaatag cctggaagct 240  
gaagatgctg cagcgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgatcac cttcgccaa 300  
gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 48

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggga aagagccacc 60  
ctctctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggccac tggcatcca 180  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240  
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacccat gtacactttt 300  
ggccaggga ccaagctgga gatcaaa 327

<210> 49

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgtc gggcgagtc gggatttagc agctggtag cctggtagc gcagaaacca 120  
gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgtacac ttttggccag 300  
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 50

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc atctacttag cctggtacca acagaaacct 120  
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180  
aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 240  
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccatt cactttcggc 300  
cctgggacca aagtgatat caaa 324

<210> 51

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

Ala Arg

<210> 52

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg

<210> 53

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

Ala Arg

<210> 54

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

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

<210> 55

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

85 90 95

<210> 56

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

<210> 57

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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 Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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



65						70										75													80
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro														
				85					90						95														
<210>	58																												
<211>	1070																												
<212>	PRT																												
<213>	Homo sapiens																												
<400>	58																												
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	Leu	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																

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> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10 15

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ala Asn Ala Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val

1 5 10

<210> 62

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ser Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

1 5 10

<210> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

1 5 10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

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

1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

1 5 10

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

1 5 10



<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is beta-alanine

<400> 70

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 71

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is succinyl-beta-alanine

<400> 71

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<400> 72

Pro Val Gly Leu Ile Gly

1 5

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<400> 73

Gly Pro Leu Gly Val

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<400> 74

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln

1 5

<210> 75

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<400> 75

Pro Leu Gly Leu

1

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<400> 76

Gly Pro Leu Gly Met Leu Ser Gln

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<400> 77

Gly Pro Leu Gly Leu Trp Ala Gln

1 5

<210> 78

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<400> 78

Ala Leu Ala Leu

1

<210> 79

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<400> 79

Gly Phe Leu Gly

1

<210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide linker

<400> 80

Leu Leu Gly Leu

1