



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0113747
(43) 공개일자 2022년08월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 47/65 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/6853 (2017.08)
A61K 31/4745 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7023180
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월15일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년07월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2020/136396
- (87) 국제공개번호 WO 2021/121204
국제공개일자 2021년06월24일
- (30) 우선권주장
201911294912.3 2019년12월16일 중국(CN)

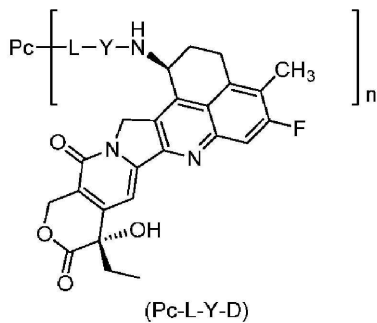
- (71) 출원인
지양수 헨그루이 파마슈티컬스 컴퍼니 리미티드
중국, 지양수 222047, 리안원장, 이코노믹 앤드
테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드
상하이 헨그루이 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드
중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로
드, 279
- (72) 발명자
잉, 후아
중국, 200245 상하이, 민항 디스트릭트, 웬징 로
드 279
마오, 량용
중국, 200245 상하이, 민항 디스트릭트, 웬징 로
드 279
왕, 시지아
중국, 200245 상하이, 민항 디스트릭트, 웬징 로
드 279
- (74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 항 CEA 항체-엑사테칸 유사체의 접합체 및 이의 약학적 용도

(57) 요약

항 CEA 항체-엑사테칸 유사체의 접합체와 이의 약학적 용도가 제공된다. 특히 항 CEA 항체-엑사테칸 유사체의 접합체는 일반식 (Pc-L-Y-D), 즉



으로 보인 바와 같되, 단 Pc는 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고; L은 링커 단위이며; Y는 $-O-(CR^aR^b)_m-$, $CR^1R^2-C(O)-$, $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$, $-O-CR^1R^2-$, $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 및 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 로부터 선택되고; n은 1 내지 10의 소수 또는 정수이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/65 (2017.08)

A61K 47/6817 (2017.08)

A61K 47/6889 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/28 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

선택적으로 링커에 의해 독소 약물과 접합된 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체 약물 접합체로서, 상기 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하되, 단

i) 상기 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3은 서열 번호 7에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3과 동일하고, 상기 중쇄 가변 영역의 HCDR2는 서열 번호 7에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR2와 동일하거나, 1개의 아미노산만큼 차이를 보이고; 상기 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 서열 번호 8에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3과 동일하거나;

ii) 상기 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3은 서열 번호 9에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3과 동일하고, 상기 중쇄 가변 영역의 HCDR2는 서열 번호 9에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR2와 동일하거나, 1개의 아미노산만큼 차이를 보이고; 상기 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 서열 번호 10에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3과 동일하거나;

iii) 상기 중쇄 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 서열 번호 11에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3과 동일하고; 상기 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 서열 번호 12에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3과 동일하거나; 또는

iv) 상기 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3은 서열 번호 13에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3과 동일하고, 상기 중쇄 가변 영역의 HCDR2는 서열 번호 13에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR2와 동일하거나, 1개의 아미노산만큼 차이를 보이고; 상기 경쇄 가변 영역의 LCDR1 및 LCDR3은 서열 번호 14에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1 및 LCDR3과 동일하고, 상기 경쇄 가변 영역의 LCDR2는 서열 번호 14에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR2와 동일하거나, 1개의 아미노산만큼 차이를 보이는 항체 약물 접합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하되, 단

v) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 15, 서열 번호 16 및 서열 번호 17 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 15, 서열 번호 38 및 서열 번호 17 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

vi) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 21, 서열 번호 22 및 서열 번호 23 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 24, 서열 번호 25 및 서열 번호 26 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 21, 서열 번호 47 및 서열 번호 23 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 24, 서열 번호 25 및 서열 번호 26 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

vii) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 27, 서열 번호 28 및 서열 번호 29 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 30, 서열 번호 31 및 서열 번호 32 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는

viii) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 33 및 서열 번호 34 각각에 제시된 HCDR1 및 HCDR3과, 서열 번호 16 또는 서열 번호 38에 제시된 HCDR2를 포함하고; 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 35 및 서열 번호 37에 제시된 LCDR1 및 LCDR3과, 서열 번호 36 또는 서열 번호 64에 제시된 LCDR2를 포함하는 항체 약물 접합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항 CEA 항체는 마우스 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체인 항체 약물 접합

체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하되, 단

- (a) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 8에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지거나;
- (b) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 9에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 9에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 10에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 10에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지거나;
- (c) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지거나; 또는
- (d) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 13에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 13에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지는 항체 약물 접합체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하되, 단

- (e) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 39, 40, 41 또는 42에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 39, 40, 41 또는 42에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 43, 44, 45 또는 46에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 43, 44, 45 또는 46에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지거나;
- (f) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 48, 49, 50, 51 또는 52에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 48, 49, 50, 51 또는 52에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 53, 54 또는 55에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 53, 54 또는 55에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지거나;
- (g) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 56, 57 또는 58에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 56, 57 또는 58에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 59, 60, 61, 62 또는 63에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 59, 60, 61, 62 또는 63에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지거나; 또는
- (h) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 65, 66, 67 또는 68에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 65, 66, 67 또는 68에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 또는 76에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 또는 76에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지는 항체 약물 접합체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항 CEA 항체는 인간 항체 유래 틀 영역 또는 이의 틀 영역 변이체를 포함하는 인간화 항체이고, 상기 틀 영역 변이체는 상기 인간 항체의 경쇄 틀 영역 및/또는 중쇄 틀 영역내 10개 이하의 아미노산의 역 돌연변이를 가지며, 바람직하게 상기 틀 영역 변이체는 이하 (i) 내지 (1), 즉 (i) 46P, 47W, 49Y, 70S 및 71Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 상기 경쇄 가변 영역의 틀 영역; 및/또는

38K 및 46K로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 15에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 16 또는 서열 번호 38에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 17에 제시된 서열을 가지는 HCDR3을 포함하는 상기 중쇄 가변 영역의 틀 영역;

(j) 2V, 42G, 44V 및 71Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 24, 서열 번호 25 및 서열 번호 26 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 상기 경쇄 가변 영역의 틀 영역 및/또는

66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F 및 82A R로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 21에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 22 또는 서열 번호 47에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 23에 제시된 서열을 가지는 HCDR3을 포함하는 상기 중쇄 가변 영역의 틀 영역;

(k) 3V, 43P 및 58V로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 30, 서열 번호 31 및 서열 번호 32 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 상기 경쇄 가변 영역의 틀 영역, 및/또는

38K, 66K 및 71V로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 27, 서열 번호 28 및 서열 번호 29에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 상기 중쇄 가변 영역의 틀 영역; 그리고

(1) 4V, 36Y, 43P, 47V, 49E, 70D 및 87I로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 35에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, 서열 번호 36 또는 서열 번호 64에 제시된 서열을 가지는 LCDR2, 및 서열 번호 37에 제시된 서열을 가지는 LCDR3을 포함하는 상기 경쇄 가변 영역의 틀 영역; 및/또는

2I, 38K 및 46K로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 33에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 16 또는 서열 번호 38에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 34에 제시된 서열을 가지는 HCDR3을 포함하는 상기 중쇄 가변 영역의 틀 영역

중 임의의 하나로부터 선택되되, 단 상기 역 돌연변이 부위는 Kabat 번호매김 체계에 따라서 번호가 매겨지는 항체 약물 접합체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 항체의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하고; 바람직하게 상기 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 불변 영역과 이의 종래의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 경쇄 불변 영역은 인간 항체 κ 및 λ 사슬 불변 영역 및 이의 종래의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되고; 더욱 바람직하게 상기 항체는 서열 번호 77에 제시된 서열을 가지는 중쇄 불변 영역 및 서열 번호 78 또는 서열 번호 79에 제시된 서열을 가지는 경쇄 불변 영역을 포함하고;

가장 바람직하게 상기 항 CEA 항체는

(m) 서열 번호 80에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 중쇄, 및/또는 서열 번호 81에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 경쇄;

(n) 서열 번호 82에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 중쇄, 및/또는 서열 번호 83에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 경쇄;

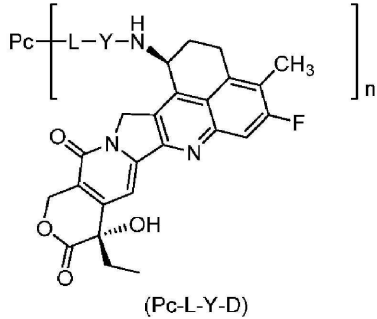
(o) 서열 번호 84에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 중쇄, 및/또는 서열 번호 85에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 경쇄; 또는

(p) 서열 번호 86에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 중쇄, 및/또는

서열 번호 87에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 경쇄를 포함하는 항체 약물 접합체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 약물 접합체는 일반식 (Pc-L-Y-D), 즉



의 항체 약물 접합체로서,

식 중

상기 Y는 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$, $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$, $-O-CR^1R^2-$, $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 및 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

상기 R^a 및 R^b 는 동일하거나 상이하며, 수소, 중수소, 할로젠, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시, 하이드록시, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시알킬, 사이클로알킬 및 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되거나; 또는 상기 R^a 및 R^b 는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬 및 헤테로사이클릴을 형성하고;

상기 R^1 은 할로젠, 할로알킬, 중수소함유 알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 알콕시알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고; 상기 R^2 는 수소, 할로젠, 할로알킬, 중수소함유 알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 알콕시알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 상기 R^1 및 R^2 는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릴을 형성하거나; 또는

상기 R^a 및 R^2 는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릴을 형성하고;

상기 m은 0 내지 4의 정수이고;

상기 n은 1 내지 10의 소수 또는 정수이고;

상기 L은 링커 단위이고;

상기 Pc는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 의한 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 항체 약물 접합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 n은 2 내지 8, 바람직하게는 4 내지 6의 정수 또는 소수인 항체 약물 접합체.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 Y는 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 이고;

상기 R^a 및 R^b는 동일하거나 상이하고, 수소, 중수소, 할로겐 및 알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

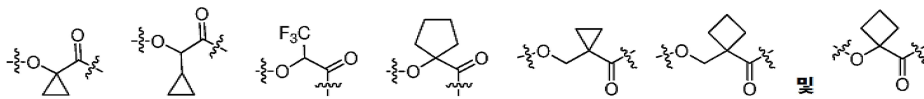
상기 R¹은 할로알킬 또는 C₃₋₆ 사이클로알킬이고;

상기 R²는 수소, 할로알킬 및 C₃₋₆ 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 상기 R¹ 및 R²는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C₃₋₆ 사이클로알킬을 형성하고;

상기 m은 0 또는 1인 항체 약물 접합체.

청구항 11

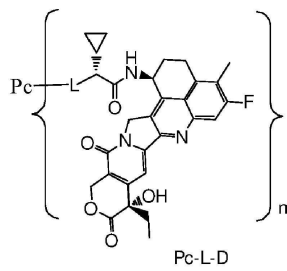
제10항에 있어서, 상기 Y는



으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단 상기 Y의 O 말단은 링커 단위 L과 결합하는 항체 약물 접합체.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 약물 접합체는 일반식 (Pc-L-D), 즉



의 항체 약물 접합체로서,

식 중,

상기 L은 링커 단위이고;

상기 Pc는 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

상기 n은 1 내지 10의 소수 또는 정수인 항체 약물 접합체.

청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 단위 -L-은 -L¹-L²-L³-L⁴-이되, 단

상기 L¹은 -(숙신이미딜-3-일-N)-W-C(O)-, -CH₂-C(O)-NR³-W-C(O)- 및 -C(O)-W-C(O)-로 이루어진 군으로부터 선택되고, W는 C₁₋₈ 알킬, C₁₋₈ 알킬-사이클로알킬 및 1내지 8개의 원자로 이루어진 선형 헤테로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 헤테로알킬은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자 1개 내지 3개를 포함하고, 상기 C₁₋₈ 알킬, C₁₋₈ 알킬-사이클로알킬 및 1 내지 8개의 원자로 이루어진 선형 헤테로알킬은, 선택적으로 할로겐, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 클로로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 각각 독립적으로 추가 치환되고;

상기 L²는 -NR⁴(CH₂CH₂O)_p¹CH₂CH₂C(O)-, -NR⁴(CH₂CH₂O)_p¹CH₂C(O)-, -S(CH₂)_p¹C(O)- 및 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되며, p¹은 1 내지 20의 정수이고;

상기 L³은 2개 내지 7개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 잔기로서, 상기 아미노산은 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산 및 아스파르트산으로부터 유래한 아미노산으로 형성된 아미노산 잔기로 이루어진 군으로부터 선택되고, 선택적으로는 할로젠, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 클로로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 추가 치환되고;

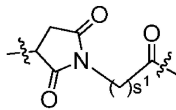
상기 L⁴는 -NR⁵(CR⁶R⁷)_t-, -C(O)NR⁵, -C(O)NR⁵(CH₂)_t- 및 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되며, t는 1 내지 6의 정수이고;

상기 R³, R⁴ 및 R⁵는 동일하거나 상이하고, 수소, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬 및 하이드록시알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

상기 R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이하고, 수소, 할로젠, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬 및 하이드록시알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 항체 약물 접합체.

청구항 14

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 단위 -L-은 -L¹-L²-L³-L⁴-이되, 단



상기 L¹은 이되, s¹은 2 내지 8의 정수이고;

상기 L²는 화학 결합이고;

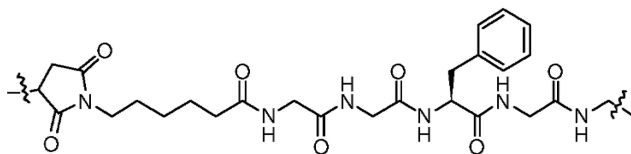
상기 L³은 테트라펩티드 잔기이고; 바람직하게 상기 L³은 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신(GGFG, 서열 번호 9 2)의 테트라펩티드 잔기이고;

상기 L⁴는 -NR⁵(CR⁶R⁷)_t-이되, 상기 R⁵, R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로 수소 또는 알킬이고, 상기 t는 1 또는 2이고;

상기 L¹ 말단은 Pc와 결합하고, 상기 L⁴ 말단은 Y와 결합하는 항체 약물 접합체.

청구항 15

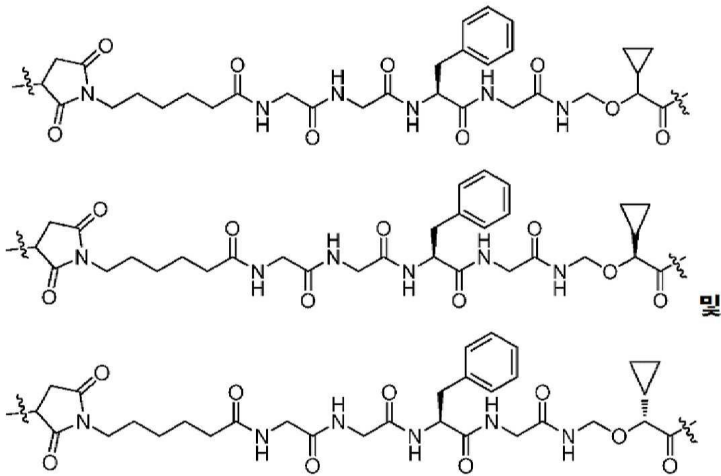
제8항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 -L-은



인 항체 약물 접합체

청구항 16

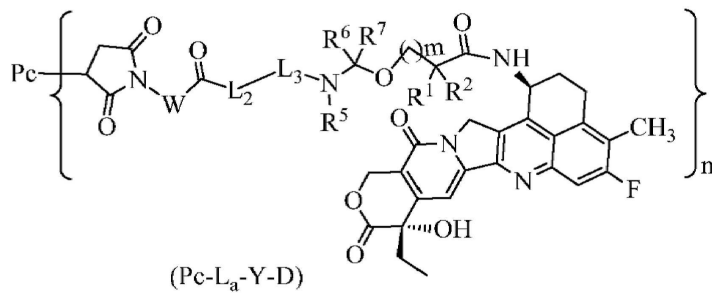
제8항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 -L-Y-는 선택적으로



으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 약물 접합체.

청구항 17

제8항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 약물 접합체는 일반식 (Pc-L_a-Y-D), 즉



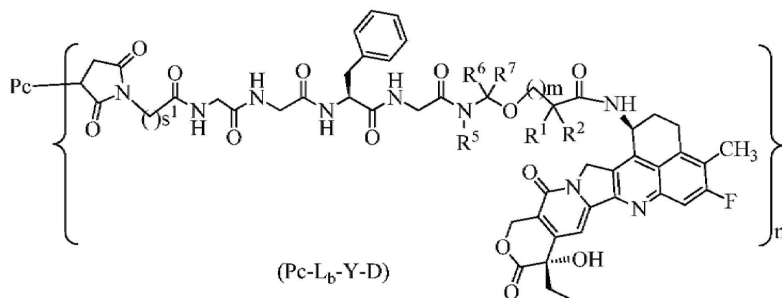
의 항체 약물 접합체로서, 단

상기 W, L², L³, R⁵, R⁶ 및 R⁷ 은 링커 단위 L에 정의된 바와 같고;

상기 Pc, n, R¹, R² 및 m은 제8항에 정의된 바와 같은 항체 약물 접합체.

청구항 18

제8항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 약물 접합체는 일반식 (Pc-L_b-Y-D), 즉



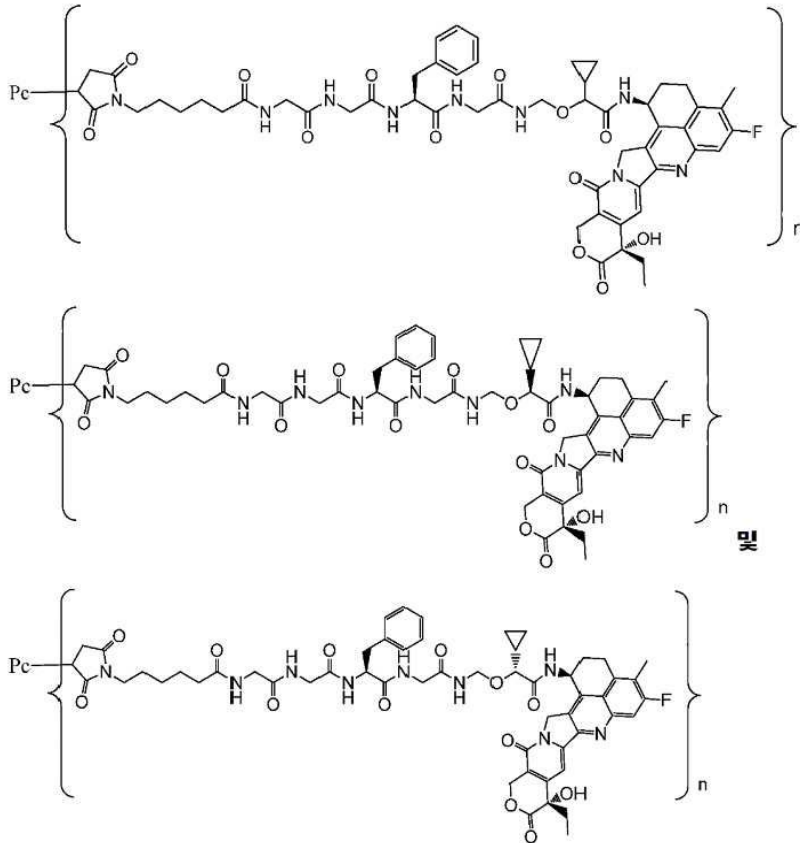
의 항체 약물 접합체로서, 단

상기 s^1 은 2 내지 8의 정수이고;

상기 Pc, R^1 , R^2 , R^5 내지 R^7 , m 및 n은 제17항에 정의된 바와 같은 항체 약물 접합체.

청구항 19

제8항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 약물 접합체는

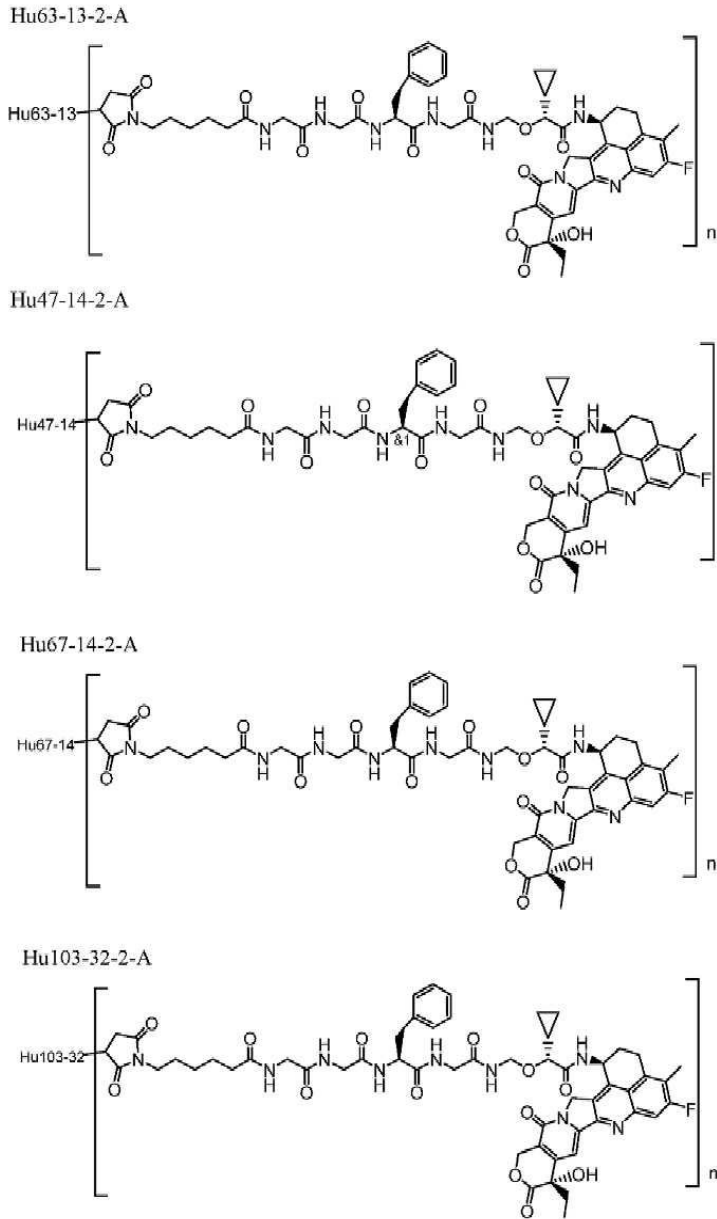


으로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단

상기 Pc 및 n은 제8항에 정의된 바와 같은 항체 약물 접합체.

청구항 20

제8항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 약물 집합체는



으로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단

상기 n은 제8항에 정의된 바와 같고;

상기 Hu63-13은 서열 번호 80에 제시된 서열을 가지는 중쇄, 및 서열 번호 81에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함하고;

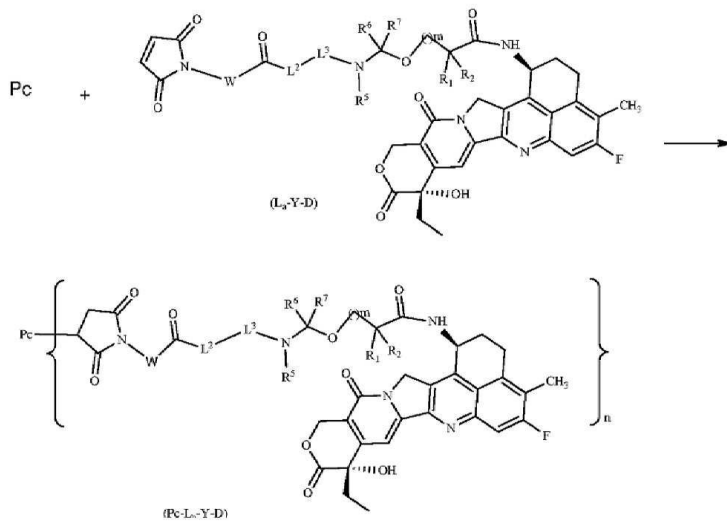
상기 Hu47-14는 서열 번호 82에 제시된 서열을 가지는 중쇄, 및 서열 번호 83에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함하고;

상기 Hu67-14는 서열 번호 84에 제시된 서열을 가지는 중쇄, 및 서열 번호 85에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함하고;

상기 Hu103-32는 서열 번호 86에 제시된 서열을 가지는 중쇄, 및 서열 번호 87에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함하는 항체 약물 집합체.

청구항 21

일반식 (Pc-L_a-Y-D)의 항체 약물 접합체를 제조하기 위한 방법으로서, 하기 단계



, 즉

환원된 Pc 및 일반식 (L_a-Y-D)를 대상으로 커플링 반응을 진행시켜, 일반식 (Pc-L_a-Y-D)의 화합물을 수득하는 단계로서, 단

상기 Pc는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 의한 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

상기 W, L², L³, R¹, R², R⁵ 내지 R⁷, m 및 n은 제17항에 정의된 바와 같은 단계를 포함하는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 의한 항체 약물 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체 1개 이상을 포함하는 약학 조성물.

청구항 23

CEA 매개 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약을 제조함에 있어 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 의한 항체 약물 접합체 또는 제22항에 의한 약학 조성물의 용도.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 CEA 매개 질환 또는 병태는 CEA 발현량이 많은 암인 용도.

청구항 25

종양 및 암을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약을 제조함에 있어 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항체 약물 접합체 또는 제22항에 의한 약학 조성물의 용도로서, 상기 종양 및 암은, 바람직하게 두경부 편평세포암종, 두경부암, 뇌암, 신경교종, 교모세포종 다형체, 신경모세포종, 중추신경계암종, 신경내분비종양, 인후암, 비인두암, 식도암, 갑상선암, 악성흑색종, 폐암, 유방암, 간암, 간담도암, 췌장암, 위암, 위장관암, 소장암, 결장암, 결장직장암, 신장암, 투명세포신세포암종, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 방광암, 전립선암, 고환암, 피부암, 흑색종, 백혈병, 림프종, 골암, 연골육종, 골수종, 다발성골수종, 골수이형성증후군, 크루켄버그종양, 골수증식종양, 편평세포암종, 유잉육종, 전신경쇄아미로이드증 또는 메르켈세포암종이고; 더욱 바람직하게 상기 림프종은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 확산성거대B세포림프종, 여포성림프종, 원발성종격동거대B세포림프종, 맨틀세포림프종, 소형림프구성림프종, 거대B세포림프종(T 세포/조직구 증량) 및 림프형질세포림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 상기 폐암은 비소세포폐암 및 소세포폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 상기 백혈병은 만성 골수성백혈병, 급성 골수성백혈병, 림프구성백혈병, 림프아구성백혈병, 급성 림프아구성백혈병, 만성 림프구성백혈병 및 골수성세포백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2019년 12월 6일에 출원된 중국특허출원(특허출원번호 제 CN201911294912.3호)에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] 기술 분야

[0003] 본 발명은 항 CEA 항체-엑사테칸 유사체의 접합체, 이의 제조 방법, 이를 포함하는 약학 조성물, 그리고 CEA 매개 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약을 제조함에 있어 이의 용도, 특히 항암 의약을 제조함에 있어 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 본원의 진술은 오로지 본 발명과 관련된 배경 정보를 제공하되, 종래 기술을 반드시 구성하는 것은 아닐 수 있다.

[0005] 암배항원(CEA, CEACAM-5 또는 CD66e라고도 공지됨), 즉 분자량 약 180 kDa인 당단백은 가장 일찍 발견된 종양 연관 항원중 하나이다. CEA는 면역글로불린 상과의 일원으로서, 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 앵커를 통해 세포막에 부착된 도메인 7개를 함유한다(Thompson J.A., *J Clin Lab Anal.* 5:344-366, 1991). CEA는 원래 결장암 조직 추출물에서 발견된 것으로서, Gold P 및 Freedman SO에 의해 보고되었으며(Gold and Freedman 1965; Gold and Freedman, 1965), 이후 CEA는 결장암 환자 및 기타 종양 환자의 혈청에서 감수성 방사선면역검정법을 사용하여 검출되는 반면, 건강한 인간 또는 기타 질환 환자의 혈청중 CEA 함량은 매우 적다고 보고되었다(Thomson, Krupay et al., 1969). 암세포에서 CEA 발현은 증가하고, 증가한 CEA는 세포내 부착, 더 나아가 세포 전이를 촉진한다(Marshall J., *Semin Oncol.*, 30(Suppl. 8):30-6, 2003). CEA는 보통 위장관, 호흡기 및 비뇨생식기 세포와, 결장, 자궁경부, 한선 및 전립선 세포를 포함한 상피 조직에서 발현된다(Nap et al, *Tumour biol.*, 9(2-3):145-53, 1988; Nap et al, *Cancer Res.*, 52(8):2329-23339, 1992).

[0006] 항체 약물 접합체(ADC)는 모노클로날 항체 또는 항체 단편을, 안정적인 화학적 링커 화합물을 통해 생물 활성 세포독소와 결합시켜, 정상 세포 및 종양 세포의 표면 항원에 대한 항체의 결합 특이성과, 세포독성 성분의 큰 효율성을 충실히 사용할뿐 더러, 치료 효과가 떨어진다는 전자(모노클로날 항체 또는 항체 단편)의 단점 및 심각한 독성 부작용을 가진다는 후자(생물 활성 세포독소)의 단점 등을 회피한다. 이는, 항체 약물 접합체가 종양 세포와 더욱 정확하게 결합할 수 있으며, 정상 세포에 대한 영향이 과거 종래 화학치료 약물의 영향에 비하여 감소하였음을 의미한다.

[0007] 현재 몇몇 CEA 표적화 항체 및 ADC 약물이 환자들에서 보고되어 있다(예컨대 W02015069430 참조). 그러나 CEA 연관 종양 치료에서 더 잘 사용될, 더욱 효과적이고 더 안전한 항 CEA 항체 약물 접합체의 개발은 여전히 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 항 CEA 항체 약물 접합체 및 이의 약학적 용도에 관한 것으로서, 이 항 CEA 항체 약물 접합체는, 선택적으로 링커에 의해 독소 약물과 접합된 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 이 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 단

[0009] i) 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3은 서열 번호 7에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3과 동일하고, 중쇄 가변 영역의 HCDR2는 서열 번호 7에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR2와 동일하거나, 1개의 아미노산만큼 차이를 보이고; 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 서열 번호 8에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3과 동일하거나;

[0010] ii) 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3은 서열 번호 9에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3과 동일하고, 중쇄 가변 영역의 HCDR2는 서열 번호 9에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR2와 동일하거나, 1개의 아미노산만큼 차이를 보이고; 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 서열 번호 10에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1,

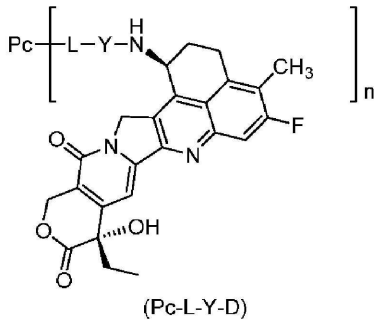
LCDR2 및 LCDR3과 동일하거나;

- [0011] iii) 중쇄 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 서열 번호 11에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3과 동일하고; 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 서열 번호 12에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3과 동일하거나; 또는
- [0012] iv) 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3은 서열 번호 13에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR1 및 HCDR3과 동일하고, 중쇄 가변 영역의 HCDR2는 서열 번호 13에 제시된 중쇄 가변 영역의 HCDR2와 동일하거나, 1개의 아미노산만큼 차이를 보이고; 경쇄 가변 영역의 LCDR1 및 LCDR3은 서열 번호 14에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR1 및 LCDR3과 동일하고, 경쇄 가변 영역의 LCDR2는 서열 번호 14에 제시된 경쇄 가변 영역의 LCDR2와 동일하거나, 1개의 아미노산만큼 차이를 보인다.
- [0013] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체중 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 여기서
- [0014] v) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 15, 서열 번호 16 및 서열 번호 17 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는 중쇄 가변 영역은 서열 번호 15, 서열 번호 38 및 서열 번호 17 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0015] vi) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 21, 서열 번호 22 및 서열 번호 23 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 24, 서열 번호 25 및 서열 번호 26 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는 중쇄 가변 영역은 서열 번호 21, 서열 번호 47 및 서열 번호 23 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 24, 서열 번호 25 및 서열 번호 26 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0016] vii) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 27, 서열 번호 28 및 서열 번호 29 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 30, 서열 번호 31 및 서열 번호 32 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는
- [0017] viii) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 33 및 서열 번호 34 각각에 제시된 HCDR1 및 HCDR3과, 서열 번호 16 또는 서열 번호 38에 제시된 HCDR2를 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 35 및 서열 번호 37에 제시된 LCDR1 및 LCDR3과, 서열 번호 36 또는 서열 번호 64에 제시된 LCDR2를 포함한다.
- [0018] 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체중 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0019] 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체중 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하되, 여기서
- [0020] 중쇄 가변 영역은 서열 번호 33, 서열 번호 16 및 서열 번호 34 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 35, 서열 번호 36 및 서열 번호 37 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는
- [0021] 중쇄 가변 영역은 서열 번호 33, 서열 번호 38 및 서열 번호 34 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 35, 서열 번호 36 및 서열 번호 37 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는
- [0022] 중쇄 가변 영역은 서열 번호 33, 서열 번호 16 및 서열 번호 34 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 35, 서열 번호 64 및 서열 번호 37 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는
- [0023] 바람직하게 중쇄 가변 영역은 서열 번호 33, 서열 번호 38 및 서열 번호 34 각각에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 35, 서열 번호 64 및 서열 번호 37 각각에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체중 항 CEA 항체는 마우스 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체이다.

- [0025] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체중 전술된 구현예들의 임의의 하나에 따른 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하되, 여기서
- [0026] (a) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 8에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지거나;
- [0027] (b) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 9에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 9에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 10에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 10에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지거나;
- [0028] (c) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지거나; 또는
- [0029] (d) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 13에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 13에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가진다.
- [0030] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체중 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하되, 여기서
- [0031] (e) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 39, 40, 41 또는 42에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 39, 40, 41 또는 42에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 43, 44, 45 또는 46에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 43, 44, 45 또는 46에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지되;
- [0032] 바람직하게 중쇄 가변 영역은 서열 번호 42에 제시된 아미노산 서열을 가지고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 44에 제시된 아미노산 서열을 가지거나; 또는
- [0033] (f) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 48, 49, 50, 51 또는 52에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 48, 49, 50, 51 또는 52에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 53, 54 또는 55에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 53, 54 또는 55에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지되;
- [0034] 바람직하게 중쇄 가변 영역은 서열 번호 52에 제시된 아미노산 서열을 가지고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 53에 제시된 아미노산 서열을 가지거나;
- [0035] (g) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 56, 57 또는 58에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 56, 57 또는 58에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 59, 60, 61, 62 또는 63에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 59, 60, 61, 62 또는 63에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지되;
- [0036] 바람직하게 중쇄 가변 영역은 서열 번호 58에 제시된 아미노산 서열을 가지고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 62에 제시된 아미노산 서열을 가지거나; 또는
- [0037] (h) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 65, 66, 67 또는 68에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 65, 66, 67 또는 68에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지고/가지거나; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 또는 76에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 또는 76에 제시된 아미노산 서열 임의의 하나에 대해 적어도 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가지되;
- [0038] 바람직하게 중쇄 가변 영역은 서열 번호 68에 제시된 아미노산 서열을 가지고, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 76에 제시된 아미노산 서열을 가진다.

- [0039] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체중 전술된 구현예 임의의 하나에 따른 항 CEA 항체는, 인간 항체로부터 유래된 틀 영역 또는 이의 틀 영역 변이체를 포함하는 인간화 항체이고, 틀 영역 변이체는 인간 항체의 경쇄 틀 영역 및/또는 중쇄 틀 영역중 10개 이하의 아미노산의 역 돌연변이를 가지되;
- [0040] 바람직하게 틀 영역 변이체는 하기의 (i) 내지 (m), 즉
- [0041] (i) 46P, 47W, 49Y, 70S 및 71Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 틀 영역, 및/또는 38K 및 46K로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 15에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 16 또는 서열 번호 38에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 17에 제시된 서열을 가지는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 틀 영역;
- [0042] (j) 2V, 42G, 44V 및 71Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 24, 서열 번호 25 및 서열 번호 26 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 틀 영역, 및/또는 48I, 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F 및 82A R로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 21에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 22 또는 서열 번호 47에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 23에 제시된 서열을 가지는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 틀 영역;
- [0043] (k) 3V, 43P 및 58V로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 30, 서열 번호 31 및 서열 번호 32 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 틀 영역, 및/또는 38K, 66K 및 71V로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 27, 서열 번호 28 및 서열 번호 29에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 틀 영역;
- [0044] (l) 4V, 36Y, 43P, 47V, 49E, 70D 및 87I로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 35에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, 서열 번호 36 또는 서열 번호 64에 제시된 서열을 가지는 LCDR2, 및 서열 번호 37에 제시된 서열을 가지는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 틀 영역; 및/또는 2I, 38K 및 46K로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 33에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 16 또는 서열 번호 38에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 34에 제시된 서열을 가지는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 틀 영역; 그리고
- [0045] (m) 2V, 42G, 44V 및 71Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 24, 서열 번호 25 및 서열 번호 26 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 틀 영역, 및/또는 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F 및 82A R로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 21에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 22 또는 서열 번호 47에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 23에 제시된 서열을 가지는 HCDR3
- [0046] 중 임의의 하나로부터 선택되되, 단 역 돌연변이 부위는 Kabat 번호매김 체계에 따라서 번호가 매겨진다.
- [0047] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체중 전술된 구현예의 임의의 하나에 따른 항 CEA 항체는 인간 항체로부터 유래된 틀 영역 또는 이의 틀 영역 변이체를 포함하는 인간화 항체이되, 단 틀 영역 변이체는 인간 항체의 경쇄 틀 영역 및/또는 중쇄 틀 영역중 10개 이하의 아미노산의 역 돌연변이를 가지고;
- [0048] 바람직하게 틀 영역 변이체는 이하 (i) 내지 (l), 즉
- [0049] (i) 46P, 47W, 49Y, 70S 및 71Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 18, 서열 번호 19 및 서열 번호 20 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 틀 영역; 및/또는
- [0050] 38K 및 46K로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 15에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 16 또는 서열 번호 38에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 17에 제시된 서열을 가지는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 틀 영역;
- [0051] (j) 2V, 42G, 44V 및 71Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 24, 서열 번호 25 및 서열 번호 26 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 틀 영역 및/또는

- [0052] 48I, 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F 및 82A R로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 21에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 22 또는 서열 번호 47에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 23에 제시된 서열을 가지는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 틀 영역;
- [0053] (k) 3V, 43P 및 58V로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 30, 서열 번호 31 및 서열 번호 32 각각에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 틀 영역, 및/또는
- [0054] 38K, 66K 및 71V로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 27, 서열 번호 28 및 서열 번호 29 각각에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 틀 영역; 그리고
- [0055] (1) 4V, 36Y, 43P, 47V, 49E, 70D 및 87I로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 35에 제시된 서열을 가지는 LCDR1, 서열 번호 36 또는 서열 번호 64에 제시된 서열을 가지는 LCDR2, 및 서열 번호 37에 제시된 서열을 가지는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역의 틀 영역; 및/또는
- [0056] 2I, 38K 및 46K로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 아미노산 역 돌연변이를 포함하고, 서열 번호 33에 제시된 서열을 가지는 HCDR1, 서열 번호 16 또는 서열 번호 38에 제시된 서열을 가지는 HCDR2, 및 서열 번호 34에 제시된 서열을 가지는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역의 틀 영역
- [0057] 중 임의의 하나로부터 선택되되, 단 역 돌연변이 부위는 Kabat 번호매김 체계에 따라서 번호가 매겨진다.
- [0058] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체중 전술된 구현예들 임의의 하나에 따른 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하고; 바람직하게 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 불변 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 경쇄 불변 영역은 인간 항체 κ 및 λ 사슬 불변 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 더욱 바람직하게 항체는 서열 번호 77에 제시된 서열을 가지는 중쇄 불변 영역 및 서열 번호 78 또는 서열 번호 79에 제시된 서열을 가지는 경쇄 불변 영역을 포함하고;
- [0059] 가장 바람직하게 본 발명에 사용된 항 CEA 항체는
- [0060] (m) 서열 번호 80에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 중쇄, 및/또는 서열 번호 81에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 경쇄;
- [0061] (n) 서열 번호 82에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 중쇄, 및/또는 서열 번호 83에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 경쇄;
- [0062] (o) 서열 번호 84에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 중쇄, 및/또는 서열 번호 85에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 경쇄; 또는
- [0063] (p) 서열 번호 86에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 중쇄, 및/또는 서열 번호 87에 제시된 서열 또는 이에 대해 적어도 85%의 동일성을 보이는 서열을 가지는 경쇄
- [0064] 를 포함한다.
- [0065] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, 단일 사슬 항체(scFv), 이량체화 V 영역(다이아바디) 및 이항화 안정화 V 영역(dsFv)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0066] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체는 일반식 (Pc-L-Y-D), 즉



- [0067]
- [0068] 의 항체 약물 접합체로서,
- [0069] 식 중
- [0070] Y는 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$, $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$, $-O-CR^1R^2-$, $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 및 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0071] R^a 및 R^b 는 동일하거나 상이하며, 수소, 중수소, 할로젠, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시, 하이드록시, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시알킬, 사이클로알킬 및 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되거나; 또는 R^a 및 R^b 는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬 및 헤테로사이클릴을 형성하고;
- [0072] R^1 은 할로젠, 할로알킬, 중수소함유 알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 알콕시알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^2 는 수소, 할로젠, 할로알킬, 중수소함유 알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 알콕시알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 R^1 및 R^2 는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릴을 형성하거나; 또는
- [0073] R^a 및 R^b 는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릴을 형성하고;
- [0074] m은 0 내지 4의 정수이고;
- [0075] n은 1 내지 10의 소수 또는 정수이고;
- [0076] L은 링커 단위이고;
- [0077] Pc는 전술된 바와 같은 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0078] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체에서 n은 0 내지 10의 정수 또는 소수이고, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10, 바람직하게 1 내지 8, 더욱 바람직하게 2 내지 8, 및 가장 바람직하게 4 내지 6의 평균일 수 있으며, n은 소수 또는 정수의 평균이다.
- [0079] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체에서 n은 3 내지 5의 정수 또는 소수의 평균이다.
- [0080] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체에서 n은 6 내지 7의 정수 또는 소수의 평균이다.
- [0081] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체는, Y가 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ 이고;
- [0082] R^a 및 R^b 는 동일하거나 상이하고, 수소, 중수소, 할로젠 및 알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;
- [0083] R^1 은 할로알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬이고;

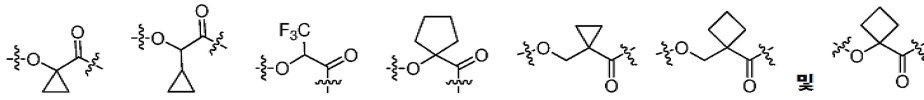
[0084] R^2 는 수소, 할로알킬 및 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는

[0085] R^1 및 R^2 는 이것들과 결합된 탄소 원자와 함께 C_{3-6} 사이클로알킬을 형성하고;

[0086] m은 0 또는 1인,

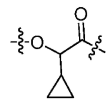
[0087] 일반식 (Pc-L-Y-D)로 표시되는 바와 같다.

[0088] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체의 Y는



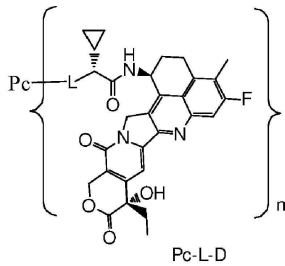
[0089] 으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단 Y의 O 말단은 링커 단위 L과 결합한다.

[0091] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체의 Y는 단 Y의 O 말단은 링커 단위 L과 결합한다.



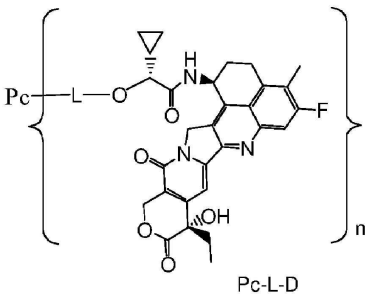
이되,

[0092] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체는



[0093] 로부터 선택되며, 단
 [0094] L은 링커 단위이고;
 [0095] Pc는 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;
 [0096] n은 1 내지 10의 소수 또는 정수이다.

[0098] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체는

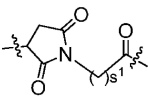


[0099] 로부터 선택되며, 단
 [0100] L은 링커 단위이고;
 [0101] Pc는 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;
 [0102] n은 1 내지 10의 소수 또는 정수이다.

- [0104] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체의 링커 단위 -L-은 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ 이되, 단
- [0105] L^1 은 $-(\text{숙신이미딜-3-일-N})-W-C(O)-$, $-\text{CH}_2-C(O)-\text{NR}^3-W-C(O)-$ 및 $-C(O)-W-C(O)-$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고, W는 C_{1-8} 알킬, C_{1-8} 알킬-사이클로알킬 및 1 내지 8개의 원자로 이루어진 선형 헤테로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 헤테로알킬은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자 1개 내지 3개를 포함하고, C_{1-8} 알킬, 사이클로알킬 및 선형 헤테로알킬은, 선택적으로 할로젠, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 클로로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 각각 독립적으로 추가 치환되고;
- [0106] L^2 는 $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(O)-$, $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p^1\text{CH}_2\text{C}(O)-$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_p^1\text{C}(O)-$ 및 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되되, p^1 은 1 내지 20의 정수이고;
- [0107] L^3 은 2개 내지 7개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 잔기로서, 아미노산은 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산 및 아스파르트산으로부터 유래한 아미노산으로 형성된 아미노산 잔기로부터 선택되고, 선택적으로는 할로젠, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 클로로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 추가 치환되고;
- [0108] L^4 는 $-\text{NR}^5(\text{CR}^6\text{R}^7)_t-$, $-C(O)\text{NR}^5$, $-C(O)\text{NR}^5(\text{CH}_2)_t-$ 및 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되되, t는 1 내지 6의 정수이고;
- [0109] R^3 , R^4 및 R^5 는 동일하거나 상이하고, 수소, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬 및 하이드록시알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;
- [0110] R^6 및 R^7 은 동일하거나 상이하고, 수소, 할로젠, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬 및 하이드록시알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택된다.
- [0111] 몇몇 구현예에서, L^1 은 $-(\text{숙신이미딜-3-일-N})-W-C(O)-$, $-\text{CH}_2-C(O)-\text{NR}^3-W-C(O)-$ 및 $-C(O)-W-C(O)-$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고, W는 C_{1-8} 알킬, C_{1-8} 알킬- C_{3-6} 사이클로알킬 및 1 내지 8개의 사슬 원자로 이루어진 선형 헤테로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 헤테로알킬은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자 1개 내지 3개를 포함하고, C_{1-8} 알킬, C_{1-8} 알킬- C_{3-6} 사이클로알킬 또는 1개 내지 8개의 사슬 원자로 이루어진 선형 헤테로알킬은, 선택적으로 할로젠, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 클로로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 독립적으로 추가 치환된다.
- [0112] 몇몇 구현예에서, L^2 는 $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(O)-$, $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p^1\text{CH}_2\text{C}(O)-$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_p^1\text{C}(O)-$ 및 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되되, p^1 은 1 내지 20의 정수이다.
- [0113] 몇몇 구현예에서, L^3 은 2개 내지 7개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 잔기로서, 아미노산은 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산 및 아스파르트산중 아미노산으로부터 형성된 아미노산 잔기로 이루어진 군으로부터 선택되고, 선택적으로 할로젠, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 클로로알킬, 중수소함유 알킬, 알콕시 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기 1개 이상으로 추가 치환된다.
- [0114] 몇몇 구현예에서, L^4 는 $-\text{NR}^5(\text{CR}^6\text{R}^7)_t-$, $-C(O)\text{NR}^5$, $-C(O)\text{NR}^5(\text{CH}_2)_t-$ 및 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되되, t는 1 내지 6의 정수이다.
- [0115] 몇몇 구현예에서, R^3 , R^4 및 R^5 는 동일하거나 상이하고, 수소, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬 및 하이드록시알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택된다.
- [0116] 몇몇 구현예에서, R^6 및 R^7 은 동일하거나 상이하고, 수소, 할로젠, 알킬, 할로알킬, 중수소함유 알킬 및 하이드

록시알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택된다.

[0117] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체의 링커 단위 -L-은 -L¹-L²-L³-L⁴-이되, 단

[0118] L¹은  이되, s¹은 2 내지 8의 정수이고;

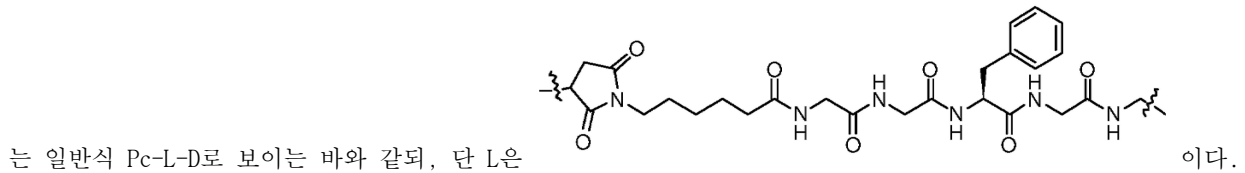
[0119] L²는 화학 결합이고;

[0120] L³은 테트라펩티드 잔기이고; 바람직하게 L³은 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신(GGFG, 서열 번호 92)의 테트라펩티드 잔기이고;

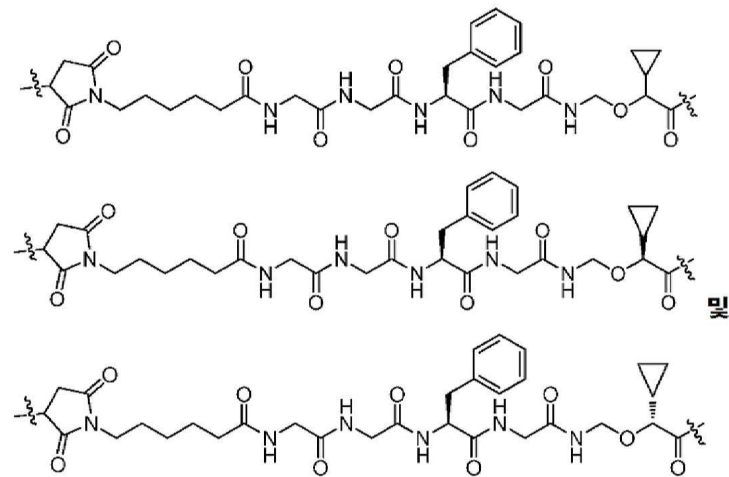
[0121] L⁴는 -NR⁵(CR⁶R⁷)t-이되, R⁵, R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로 수소 또는 알킬이고, t는 1 또는 2이고;

[0122] L¹ 말단은 Pc와 결합하고, L⁴ 말단은 Y와 결합한다.

[0123] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체는 일반식 (Pc-L-Y-D) 또



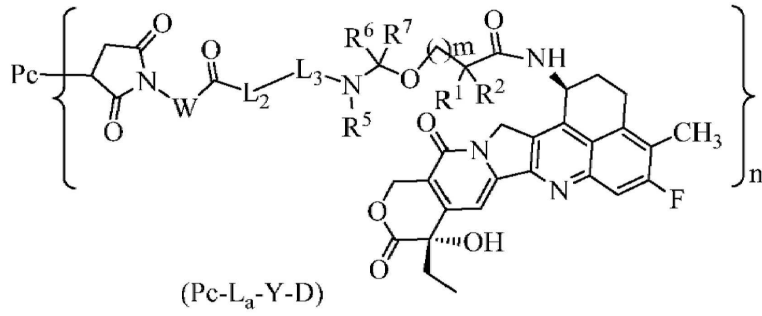
[0124] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체는 일반식 (Pc-L-Y-D) 또 는 일반식 Pc-L-D로 보이는 바와 같되, 단 -L-Y-는 선택적으로



[0125] 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0126] 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0127] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체는 일반식 (Pc-L_a-Y-D), 즉



[0128]

[0129]

의 항체 약물 접합체로서, 단

[0130]

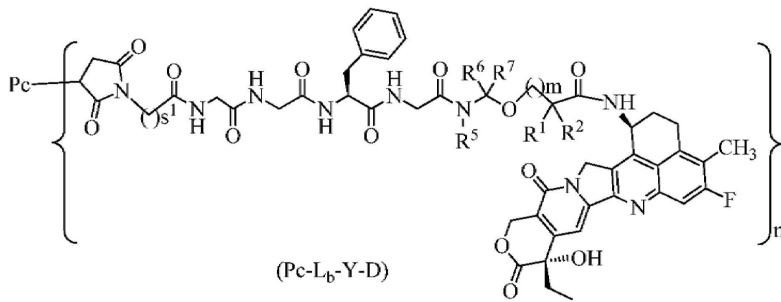
W, L², L³, R⁵, R⁶ 및 R⁷ 은 링커 단위 L에 정의된 바와 같고;

[0131]

Pc, n, R¹, R² 및 m은 일반식 (Pc-L-Y-D)에 정의된 바와 같다.

[0132]

본 발명의 몇몇 구현예에서, 진술된 구현예들중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체는 일반식 (Pc-L_b-Y-D),
즉



[0133]

[0134]

의 항체 약물 접합체로서, 단

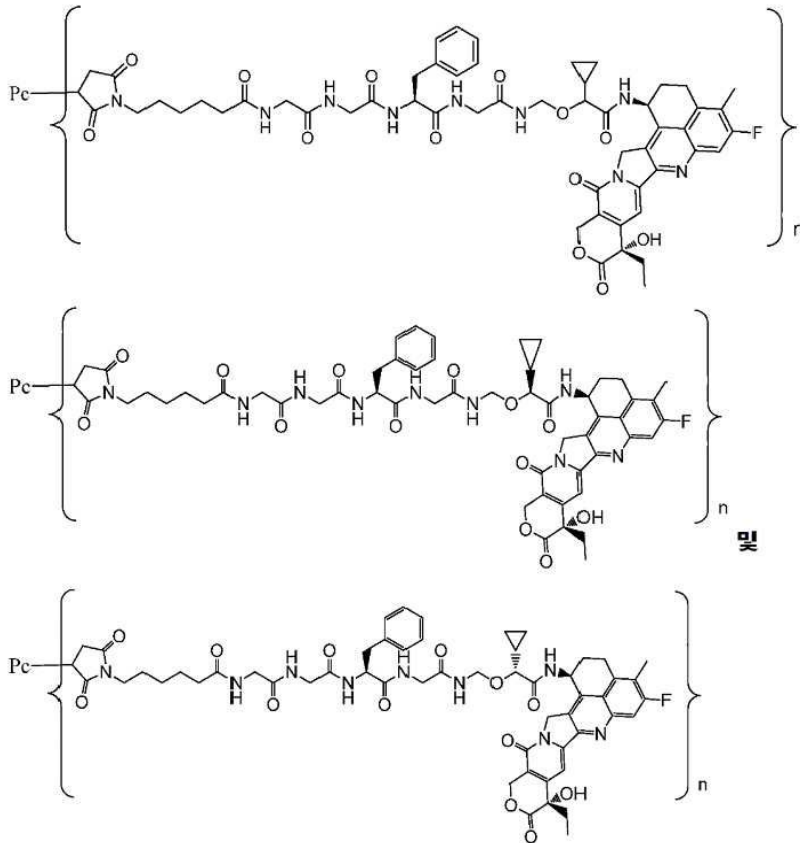
[0135]

s¹은 2 내지 8의 정수이고;

[0136]

Pc, R¹, R², R⁵ 내지 R⁷, m 및 n은 일반식 (Pc-L_a-Y-D)에 정의된 바와 같다.

[0137] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 전술된 구현예들중 임의의 하나에 따른 항체 약물 접합체는



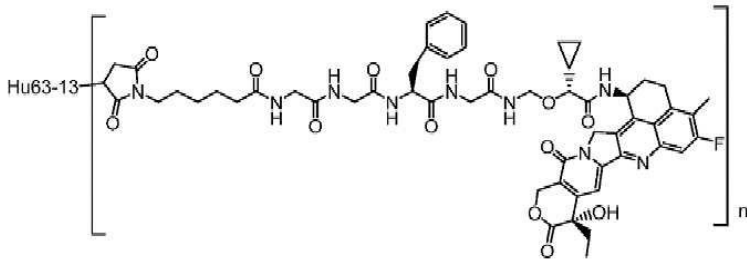
[0138]

[0139] 으로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단

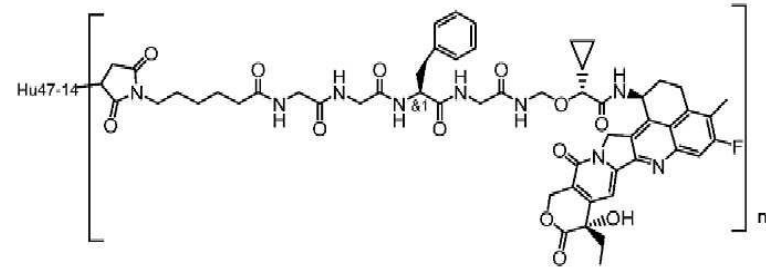
[0140] Pc 및 n은 (Pc-L-Y-D)에 정의된 바와 같다.

[0141] 본 발명의 몇몇 구현예에서, 항체 약물 접합체는

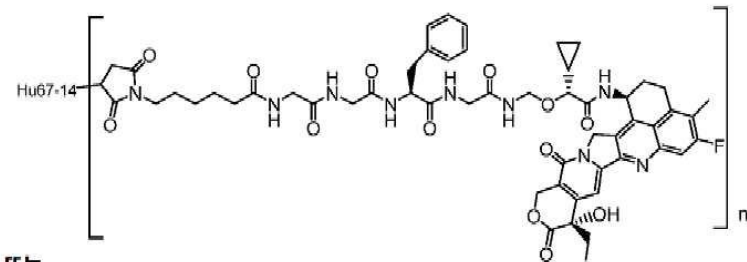
Hu63-13-2-A



Hu47-14-2-A

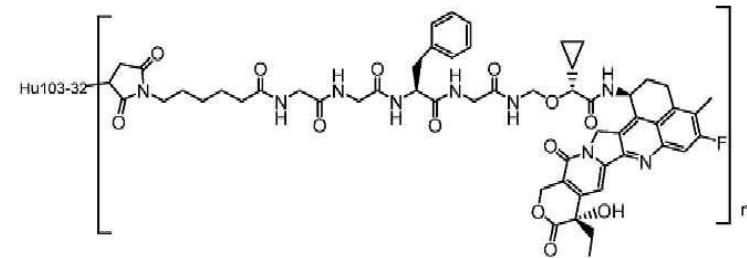


Hu67-14-2-A



또는

Hu103-32-2-A



[0142]

[0143] 으로 이루어진 군으로부터 선택되되, 단

[0144] n은 (Pc-L-Y-D)에 정의된 바와 같고;

[0145] 항체는 이하와 같이 기술된다:

[0146] Hu63-13은 서열 번호 80에 제시된 서열을 가지는 중쇄, 및 서열 번호 81에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함하고;

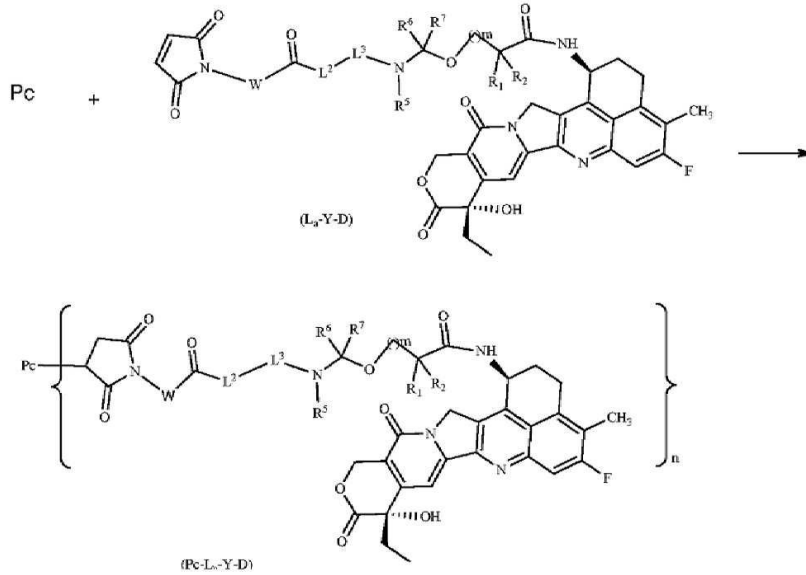
[0147] Hu47-14는 서열 번호 82에 제시된 서열을 가지는 중쇄, 및 서열 번호 83에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함하고;

[0148] Hu67-14는 서열 번호 84에 제시된 서열을 가지는 중쇄, 및 서열 번호 85에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함하고;

[0149] Hu103-32는 서열 번호 86에 제시된 서열을 가지는 중쇄, 및 서열 번호 87에 제시된 서열을 가지는 경쇄를 포함한다.

[0150] 선택적으로 n은 0 내지 10중 0이 아닌 정수 또는 소수, 바람직하게 1 내지 10의 정수 또는 소수; 더욱 바람직하게 2 내지 8의 정수 또는 소수; 및 가장 바람직하게 3 내지 8의 정수 또는 소수일 수 있고; 선택적으로 n은 3 내지 5의 소수 또는 정수일 수 있고; 선택적으로 n은 6 내지 7의 소수 또는 정수일 수 있다.

[0151] 본 발명은 일반식 (Pc-L_a-Y-D)의 항체 약물 접합체를 제조하기 위한 방법으로서, 하기 단계



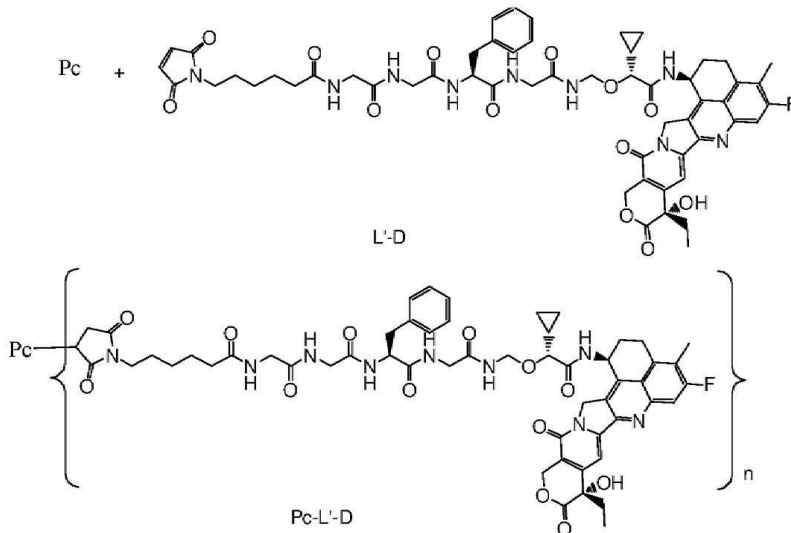
[0152] , 즉

[0153] 환원된 Pc 및 일반식 (L_a-Y-D)를 대상으로 커플링 반응을 진행시켜, 일반식 (Pc-L_a-Y-D)의 화합물을 획득하는 단계로서, 단

[0154] Pc는 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

[0155] W, L², L³, R¹, R², R⁵ 내지 R⁷, m 및 n은 일반식 (Pc-L_a-Y-D)에 정의된 바와 같은 단계를 포함하는 방법으로 제공한다.

[0156] 본 발명은 일반식 (Pc-L'-D)의 항체 약물 접합체를 제조하기 위한 방법으로서, 하기 단계



[0157] , 즉

[0158] 환원된 Pc 및 일반식 (L_a'-D)를 대상으로 커플링 반응을 진행시켜, 화합물을 획득하는 단계로서, 단 Pc는 전술된 바와 같은 항 CEA 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

[0159] n은 일반식 (Pc-L-Y-D)에 정의된 바와 같은 단계

- [0160] 를 포함하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0161] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 집합체 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체 1개 이상을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0162] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 집합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물의 의약으로서의 용도를 제공한다.
- [0163] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 집합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물의, CEA 매개 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약을 제조함에 있어 용도를 제공한다. CEA 매개 질환 또는 병태는 CEA가 다량 발현되는 암이다. 또는 CEA 매개 질환 또는 병태는 CEA가 중간 정도로 발현되는 암이다.
- [0164] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 집합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물의, 종양을 치료 또는 예방하기 위한 의약을 제조함에 있어 용도를 제공하되, 여기서 종양 및 암은, 바람직하게 두경부 편평세포암종, 두경부암, 뇌암, 신경교종, 교모세포종 다형체, 신경모세포종, 중추신경계암종, 신경내분비종양, 인후암, 비인두암, 식도암, 갑상선암, 악성늑막중피종, 폐암, 유방암, 간암, 간담도암, 췌장암, 위암, 위장관암, 소장암, 결장암, 결장직장암, 신장암, 투명세포신세포암종, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 방광암, 전립선암, 고환암, 피부암, 흑색종, 백혈병, 림프종, 골암, 연골육종, 골수종, 다발성골수종, 골수이형성증후군, 크루켈버그종양, 골수증식종양, 편평세포암종, 유잉육종, 전신경쇄아밀로이드증 또는 메르켈세포암종이고; 더욱 바람직하게 림프종은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 확산성거대B세포림프종, 여포성림프종, 원발성종격동거대B세포림프종, 맨틀세포림프종, 소형림프구성림프종, 거대B세포림프종(T 세포/조직구 증량) 및 림프형질세포림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 폐암은 비소세포폐암 또는 소세포폐암으로부터 선택되고; 백혈병은 만성 골수성백혈병, 급성 골수성백혈병, 림프구성백혈병, 림프아구성백혈병, 급성 림프아구성백혈병, 만성 림프구성백혈병 및 골수성세포백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0165] 또 다른 양태에서, 본 발명은 추가로 종양을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 집합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물 치료적 유효량만큼을, 종양의 치료 및/또는 예방이 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 이때의 종양은 바람직하게 CEA 다량 발현과 연관된 암이다.
- [0166] 또 다른 양태에서, 본 발명은 추가로 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 전술된 구현예들 중 임의의 하나에 따른 항체 약물 집합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물 치료적 유효량만큼을, 암의 치료 또는 예방이 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 이때의 종양 및 암은, 바람직하게 두경부 편평세포암종, 두경부암, 뇌암, 신경교종, 교모세포종 다형체, 신경모세포종, 중추신경계암종, 신경내분비종양, 인후암, 비인두암, 식도암, 갑상선암, 악성늑막중피종, 폐암, 유방암, 간암, 간담도암, 췌장암, 위암, 위장관암, 소장암, 결장암, 결장직장암, 신장암, 투명세포신세포암종, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 방광암, 전립선암, 고환암, 피부암, 흑색종, 백혈병, 림프종, 골암, 연골육종, 골수종, 다발성골수종, 골수이형성증후군, 크루켈버그종양, 골수증식종양, 편평세포암종, 유잉육종, 전신경쇄아밀로이드증 또는 메르켈세포암종이고; 더욱 바람직하게 림프종은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 확산성거대B세포림프종, 여포성림프종, 원발성종격동거대B세포림프종, 맨틀세포림프종, 소형림프구성림프종, 거대B세포림프종(T 세포/조직구 증량) 및 림프형질세포림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 폐암은 비소세포폐암 또는 소세포폐암으로부터 선택되고; 백혈병은 만성 골수성백혈병, 급성 골수성백혈병, 림프구성백혈병, 림프아구성백혈병, 급성 림프아구성백혈병, 만성 림프구성백혈병 및 골수성세포백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0167] 활성 화합물(예컨대 본 발명에 따른 리간드-약물 집합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염)은 임의의 적합한 경로에 의한 투여에 적합한 형태, 바람직하게는 단위 용량의 형태, 또는 대상체에 의해 자가 투여될 수 있는 단일 용량의 형태로 제형될 수 있다. 본 발명의 단위 용량은 정제, 캡슐, 사세트, 바이알, 분말, 파립, 로진즈, 좌제, 재생성 분말(regenerating powder) 또는 액체 제형중에 있을 수 있다.
- [0168] 본 발명의 치료 방법에 사용된 활성 화합물 또는 조성물의 투여 용량은, 일반적으로 질환의 중증도, 대상체 체중 및 활성 화합물의 효능에 따라 가변적일 것이다. 그러나 일반 지침으로서 적합한 단위 용량은 0.1 mg 내지 1000 mg일 수 있다.
- [0169] 본 발명의 약학 조성물은 활성 화합물 이외에, 충전제, 희석제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 부형제 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 부형제 1개 이상을 포함할 수 있다. 본 조성물은 투여 방법에 따라서 활성 화합물을

0.1 wt.% 내지 99 wt.% 포함할 수 있다.

[0170] 본 발명에 의해 제공되는 CEA 항체 및 항체 약물 접합체는 세포 표면 항원에 대해 우수한 친화성, 우수한 세포 내이입 효율 및 높은 종양 억제 효율뿐 아니라, 더 넓은 약물 적용 윈도우(drug application window)를 가지고, 임상 약물 적용에 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0171] 도 1은 인간 CEA와 인간화 항체의 세포 수준에서의 결합에 관한 FACS 검출 결과를 보여주는 것이다.

도 2는 ADC 분자의 방관자 효과(bystander effect) 및 세포독성을 보여주는 것으로서; 데이터는 ADC 분자 모두가 강력한 방관자 효과 및 세포독성을 가지고, MKN45 및 HCT116이 공동배양될 때 ADC 분자는 세포의 두 유형의 증식을 억제할 수 있는 반면, HCT116이 단독 배양될 때 2-A와 커플링된 ADC 분자는 근본적으로 세포에 무독성임을 보여준다.

도 3은 LS174T 이종이식 종양 모델에서 종양 부피에 대한 ADC 분자의 효과를 보여주는 것으로서; 데이터는 ADC 분자 모두는 대조군(PBS)과 비교되었을 때 종양 부피 증가를 억제하는 효과를 가지고, 3-mpk 군들의 종양에 대한 억제 효과는 1-mpk 군들의 종양에 대한 억제 효과보다 더 우수하고; 3-mpk 군들 중 Hu63-13-2-A가 종양에 대하여 최선의 억제 효과를 보이고, 그 다음으로 우수한 억제 효과는 Hu47-14-2-A가, 그리고 그 다음으로 우수한 억제 효과는 Hu67-14-2-A가 보이고, Lmab-CL2A-SN38은 종양 대한 억제 효과가 가장 나빴음을 보여준다.

도 4는 LS174T 이종이식 종양 모델에서 종양 중량에 대한 ADC 분자의 효과를 보여주는 것으로서; 데이터는 ADC 분자 모두는 대조군(PBS)과 비교되었을 때 저용량일 때뿐 아니라 고용량일때 종양 중량 증가를 억제함에 있어 효과를 보이고; 3-mpk 군들 중 Hu63-13-2-A가 종양에 대하여 최선의 억제 효과를 보이고, 그 다음으로 우수한 억제 효과는 Hu47-14-2-A가, 그리고 그 다음으로 우수한 억제 효과는 Hu67-14-2-A가 보이고, Lmab-CL2A-SN38은 종양 대한 억제 효과가 가장 나빴음을 보여준다.

도 5는 MKN45 이종이식 종양 모델에서 종양 부피에 대한 ADC 분자의 효과를 보여주는 것으로서; 데이터는 ADC 분자 모두는 대조군(PBS)과 비교되었을 때 종양 부피 증가를 억제하는 효과를 가지고, 3-mpk 군들의 종양에 대한 억제 효과는 1-mpk 군들의 종양에 대한 억제 효과보다 더 우수하고; 3-mpk 군들 중 Hu67-14-2-A가 종양에 대하여 최선의 억제 효과를 보이고, 그 다음으로 우수한 억제 효과는 Hu103-32-2-A가, 그리고 그 다음으로 우수한 억제 효과는 Hu63-13-2-A가 보이고, Lmab-CL2A-SN38은 종양 대한 억제 효과가 가장 나빴다.

도 6은 MKN45 이종이식 종양 모델에서 종양 중량에 대한 ADC 분자의 효과를 보여주는 것으로서; 데이터는 ADC 분자 모두는 대조군(PBS)과 비교되었을 때 저용량일 때뿐 아니라 고용량일때 종양 중량 증가를 억제함에 있어 효과를 보이고; 3-mpk 군들 중 Hu67-14-2-A가 종양에 대하여 최선의 억제 효과를 보이고, 그 다음으로 우수한 억제 효과는 Hu103-32-2-A가, 그리고 그 다음으로 우수한 억제 효과는 Hu63-13-2-A가 보이고, Lmab-CL2A-SN38은 종양 대한 억제 효과가 가장 나빴음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0172] 1. 용어

[0173] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 또한 본 발명을 구현하거나 시험하는데 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 본원에 기재되어 있다. 본 발명을 기술하고 청구함에 있어서, 하기 용어들은 하기 정의에 따라 사용된다.

[0174] 본 발명에서 상품명이 사용될 때, 어떤 상품명도 가지는 상업적 제품의 제형뿐 아니라, 해당 상품명도 가지는 비특허 약물 및 활성 약물 성분을 포함하는 것으로 의도된다. 달리 진술되지 않는 한, 발명의 설명과 청구의 범위에 사용된 용어는 이하의 의미를 가진다.

[0175] "약물"이란 용어는, 유기체의 생리 및 병리 상태를 변경 또는 확인할 수 있고, 질환의 예방, 진단 및 치료에 사용될 수 있는 화학 성분을 지칭한다. 약물은 세포독성 약물을 포함한다. 약물과 독성 성분 간에 명확한 경계는 없다. 독성 성분은 유기체에 독성의 영향을 미치고, 심지어 적은 용량으로조차 인간의 건강에 피해를 줄 수 있는 화학 성분을 지칭한다. 임의의 약물이 대용량일 때, 독성 반응을 유도할 수 있다.

[0176] 세포독성 약물이란, 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/방지하거나 세포 사멸 또는 세포 파괴를 유발하는 성분

을 지칭한다. 원칙적으로 세포독성 약물은 충분히 높은 농도에서 종양 세포를 사멸할 수 있지만; 세포독성 약물은 특이성이 결여된 탓에 종양 세포를 사멸시키면서 정상 세포의 세포사멸을 유도할 수 있으므로 심각한 부작용을 초래한다. 세포독성 약물로서는 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 독소, 예컨대 소분자 독소 또는 효소 활성 독소, 방사성동위원소(예컨대 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 및 Lu의 방사성동위원소), 독소 약물, 화학치료 약물, 항생제 및 핵산분해 효소를 포함한다.

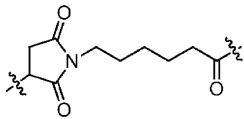
[0177] "링커 단위", "링커" 또는 "링커 단편"이란 용어는, 한쪽 말단은 리간드와 결합하고, 다른 쪽 말단은 약물과 결합할뿐 아니라, 다른 링커들과도 결합하여 약물과 결합할 수도 있는 화학 구조상 단편 또는 결합을 지칭한다.

[0178] 링커는 링커 구성성분 1개 이상을 포함할 수 있다. 예시적 링커 구성성분으로서는 6-말레이미도카프로일("MC"), 말레이미도프로피오닐("MP"), 발린-시트룰린("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌("ala-phe"), *p*-아미노벤질옥시카보닐("PAB"), *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)펜타노에이트("SPP"), *N*-숙신이미딜 4-(*N*-말레이미도메틸)사이클로hex산-1 카복실레이트("SMCC", 본원에서는 "MCC"라고도 지칭됨) 및 *N*-숙신이미딜(4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트("SIAB")를 포함한다. 링커는 연장제(extender), 스페이스(spacer) 및 아미노산 단위를 포함할 수 있으며, 당 분야에 공지된 방법, 예컨대 US2005-0238649A1에 기재된 방법을 사용하여 합성될 수 있다. 링커는 약물이 세포에 방출되는 것을 유리하게 하는 "절단가능 링커"일 수 있다. 예를 들어 산 불안정 링커(예컨대 히드라존), 프로테아제 감수성(예컨대 펩티다아제 감수성) 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 이황화물 함유 링커가 사용될 수 있다(Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131(1992); 미국 특허 제5,208,020호).

[0179] 축약어

[0180] 링커 구성성분으로서는 이하의 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0181] MC = 하기 구조를 가지는 6-말레이미도카프로일:



[0182] Val-Cit 또는 "vc" = 발린-시트룰린(프로테아제 절단가능 링커중 예시적 디펩티드),

[0184] 시트룰린 = 2-아미노-5-우레이도펜탄산,

[0185] PAB = *p*-아미노벤질옥시카보닐("자가희생(self-immolative)" 링커 구성성분의 예),

[0186] Me-Val-Cit = (링커 펩티드 결합이 카텝신 B에 의해 절단되는 것이 방지되도록 변형된) *N*-메틸-발린-시트룰린,

[0187] MC(PEG)6-OH = (항체 시스템에 부착가능한) 말레이미도카프로일-폴리에틸렌글리콜,

[0188] SPP = *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)발레레이트,

[0189] SPDP = *N*-숙신이미딜 3-(2-피리딜티오)프로피오네이트,

[0190] SMCC = 숙신이미딜-4-(*N*-말레이미도메틸)사이클로hex산-1-카복실레이트,

[0191] IT = 이미노티올란.

[0192] "항체 약물 접합체"란 용어는, 안정적인 결합 단위에 의해 생물 활성 약물에 항체가 결합한 경우를 의미한다. 본 발명에서, "항체 약물 접합체" 또는 항체-약물 접합체(ADC)는 모노클로날 항체 또는 항체 단편이 안정적인 결합 단위에 의해 생물 활성 독성 약물에 결합된 경우를 의미한다. 항체는 약물에 직접 접합될 수 있거나, 링커를 통해 접합될 수 있다. 각각의 항체에 접합된 약물 모듈의 평균 수(*n*으로 표시될 수 있음)는 평균 약물 담지 또는 약물 담지는, 예를 들어 약 0개 내지 약 20개 약물 모듈의 범위일 수 있으며; 임의의 구현예에서는 1개 내지 약 10개 약물 모듈의 범위일 수 있고; 임의의 구현예에서는 1개 내지 약 8개 약물 모듈의 범위일 수 있다.

[0193] "평균 약물 담지" 또는 "약물 담지"란 용어는 항체 약물 접합체 분자중 리간드당 담지된 세포독성 약물의 평균 수를 지칭하고, 또한 약물 대 항체 비로서 표시될 수 있다. 약물 담지는 리간드당 세포독성 약물(Pc) 0개 내지 12개, 바람직하게는 1개 내지 10개의 범위일 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 약물 담지는 *n*으로서 표시되는데, 이는 또한 DAR(약물-항체 비; Drug-Antibody Ratio) 값이라 지칭될 수 있으며, 예시적 값은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10의 평균일 수 있다. 커플링 반응 후 ADC 분자당 약물의 평균 수는 종래의 방법들, 예컨대 UV/가시

광선 분광분석법, 질량 분광도, ELISA 검정 및 HPLC에 의해 특징지어질 수 있다.

- [0194] 본 발명에 사용된, 아미노산에 대한 3문자 및 1문자 암호는 문헌[J. *biol. chem*, 243, p3558(1968)]에 기재되어 있다.
- [0195] "항체"란 용어는, 사슬간 이황화 결합에 의해 중쇄 2개와 경쇄 2개가 결합되어 형성된 테트라펩티드 사슬 구조의 면역글로불린을 지칭한다. 면역글로불린은 아미노산 조성과 중쇄 불변 영역들의 배열 순서의 차이에 따라서 면역글로불린의 이소타입(isotype)이라 칭하여지기도 하는 군 5개, 즉 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE(이것들의 대응하는 중쇄는 각각 μ 사슬, δ 사슬, γ 사슬, α 사슬 및 ϵ 사슬임)로 구분될 수 있다. 동일 군의 Ig는 경첩 영역의 아미노산 조성 및 중쇄의 이황화 결합 수 및 위치에 따라서 상이한 하위군으로 구분될 수 있는데; 예를 들어 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 구분될 수 있다. 경쇄는 불변 영역의 차이에 의해 κ 사슬 또는 λ 사슬로 구분된다. Ig 군 5개 각각은 κ 사슬 또는 λ 사슬을 가질 수 있다.
- [0196] 전장 항체의 중쇄 및 경쇄에서 N-말단 근처 약 110개 아미노산으로 이루어진 서열은 상당히 가변적이므로, 가변 영역(Fv 영역)이라 지칭되고; C-말단 근처 나머지 아미노산 서열은 비교적 안정적이므로, 불변 영역이라 지칭된다. 가변 영역들은 초가변 영역(HVR) 3개와 비교적 보존적인 서열로 된 틀 영역(FR) 4개를 포함한다. 초가변 영역 3개는 항체의 특이성을 결정하므로, 상보성결정영역(CDR)이라고도 공지되어 있다. 각각의 경쇄 가변 영역(LCVR) 또는 중쇄 가변 영역(HCVR)은 아미노 말단으로부터 카복시 말단에 이르기까지 CDR 3개 및 FR 4개가 이하의 순서로 이루어져 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 경쇄의 CDR 3개는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 지칭하고, 중쇄의 CDR 3개는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 지칭한다.
- [0197] "전체 인간화 모노클로날 항체"라고도 공지된 "전체 인간화 항체", "전체가 인간의 것인 항체" 또는 "완전 인간의 것인 항체"란 용어는 인간화 가변 영역 및 불변 영역 둘 다를 가져서, 면역원성과 독성 부작용이 제거된 항체이다. 모노클로날 항체의 개발은 4가지 차원, 다시 말해서 마우스 모노클로날 항체, 키메라 모노클로날 항체, 인간화 모노클로날 항체 및 전체 인간화 모노클로날 항체로 이루어지고 있다. 전체가 인간의 것인 항체를 제조하기 위한 주요 유관 기술로서는 인간 하이브리도마 기술, EBV 형질전환 B 림프구 기술, 파아지 전사 기술, 유전자이식 마우스 항체 제조 기술 및 단일 B 세포 항체 제조 기술 등을 포함한다.
- [0198] "항원 결합 단편"이란 용어는, 항원과 결합하는 능력을 보유하는 항체의 단편 1개 이상을 지칭한다. 전장 항체의 단편은 항체의 항원 결합 기능을 수행하는데 사용될 수 있는 것으로 보인다. "항원 결합 단편"에 포함되는 결합 단편은, Fab, Fab', F(ab')₂, 단일 사슬 항체(scFv), 이량체화 V 영역(다이아바디), 이황화물 안정화 V 영역(dsFv)과, CDR을 포함하는 펩티드의 항원 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 그 예로서는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인들로 이루어진 Fab 단편(1가 단편); (ii) 경첩 영역내 이황화물 가교에 의해 결합된 Fab 단편 2개를 포함하는 F(ab')₂ 단편(2가 단편); (iii) VH 및 CH1 도메인들로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체 단일 팔(arm)의 VH 및 VL 도메인들로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 이루어진 단일 도메인 또는 dAb 단편(Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546); 및 (vi) 단리된 상보성결정영역(CDR); 또는 (vii) 선택적으로 합성 링커에 의해 결합될 수 있는, 단리된 CDR 2개 이상의 조합을 포함한다. 더욱이, Fv 단편, VL 및 VH의 도메인 2개는 별도의 유전자에 의해 암호화되지만, 이는 재조합에 의한 합성 링커에 의해 결합될 수 있으므로, VL 및 VH 영역들이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬(단일 사슬 Fv(scFv))라고도 지칭됨; 예컨대 문헌(Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883)을 참조함)을 이룰 수 있다. 이러한 단일 사슬 항체는 또한 항체의 "항원 결합 단편"이란 용어에 포함되도록 의도된다. 이러한 항체 단편은 당 업자들에게 공지된 종래의 기술을 사용하여 수득되고, 비변형 항체에 대한 유용성 스크리닝 방식과 동일한 방식으로 그 유용성에 대해 스크리닝된다. 항원 결합부는 재조합 DNA 기술, 또는 비변형 면역글로불린의 효소 절단 또는 화학 절단에 의해 제조될 수 있다. 항체는 상이한 이소타입의 것, 예컨대 IgG(예컨대 아형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체일 수 있다.
- [0199] 일반적으로 Fab는, IgG 항체 분자를 프로테아제인 파페인(예컨대 H 사슬 224번 위치 아미노산 잔기를 절단하는 효소)으로 처리하여 수득된 단편들 가운데 분자량 약 50,000이고, 항원 결합 활성을 가지며, H 사슬의 N 말단쪽 부분이 이황화 결합에 의해 L 사슬과 조합되어 있는 항체 단편이다.
- [0200] 일반적으로 F(ab')₂는 IgG 경첩 영역중 이황화 결합 아래 부분을, 효소인 펩신으로 분해하여 수득된 항체 단편이다. 이의 분자량은 약 100,000으로서, 항원 결합 활성을 가지고, 경첩 위치에 결합된 Fab 영역 2개를 포함한다.

- [0201] 일반적으로 Fab'는 분자량 약 50,000이고, 전술된 F(ab')₂의 경첩 영역중 이황화 결합을 절단함으로써 수득된, 항원 결합 활성을 가지는 항체 단편이다.
- [0202] 더욱이 Fab'는 Fab' 단편을 암호화하는 DNA를 원핵생물 또는 진핵생물 벡터에 삽입한 다음, 이 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물에 도입하여 Fab'를 발현시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0203] "단일 사슬 항체", "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv"란 용어는, 링커에 의해 결합된 항체 중쇄 가변 도메인(또는 VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(또는 VL)을 포함하는 분자를 의미한다. 이러한 scFv 분자는 일반 구조 NH₂-VL-링커-VH-COOH 또는 NH₂-VH-링커-VL-COOH를 가질 수 있다. 선행 기술의 적합한 링커는 반복된 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체, 예컨대 반복된 변이체 1개 내지 4개로 이루어져 있다(Holliger et al.(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448). 본 발명에 사용될 수 있는 다른 링커는 문헌(Alfthan et al.(1995), *Protein Eng.* 8:725-731; Choi et al.(2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106; Hu et al.(1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov et al.(1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56; 및 Roovers et al.(2001), *Cancer Immunol.*)에 기재되어 있다.
- [0204] "CDR"이란 용어는, 주로 항원 결합에 기여하는, 항체의 가변 도메인내 초가변 영역 6개중 하나를 지칭한다. 일반적으로 각각의 중쇄 가변 영역에는 CDR이 3개(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 존재하고, 각각의 경쇄 가변 영역에는 CDR이 3개(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3) 존재한다. CDR의 아미노산 서열 경계는 널리 공지된 다양한 체계중 임의의 것을 사용하여 결정될수 있다. CDR 6개에 대한 가장 일반적인 정의중 한 가지는 문헌(Kabat E.A. et al.,(1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. NIH Publication 91-3242)에 제공되어 있다. 본원에 사용된 바와 같은 CDR의 Kabat 정의는, 경쇄 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3과, 중쇄 가변 도메인의 CDR2 및 CDR3에만 적용된다. "Chothia" 번호매김 체계, "ABM" 번호매김 체계, "접촉(contact)" 번호매김 체계(문헌(Martin, ACR. *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*[J]. 2001) 참조) 및 ImMunoGenTics(IMG) 번호매김 체계(Lefranc M.P., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77(2003)) 등도 또한 포함된다.
- [0205] "항체 틀"이란 용어는, 가변 도메인의 항원 결합 루프(CDR)에 대한 틀로서 사용되는, 가변 도메인 VL 또는 VH의 한 부분을 지칭한다. 이는 본질적으로 CDR을 포함하지 않는 가변 도메인이다.
- [0206] "에피토프" 또는 "항원 결정기"란 용어는, 면역글로불린 또는 항체가 결합하는 항원상 부위를 지칭한다. 에피토프는, 일반적으로 독특한 공간상 입체배열에 적어도 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개의 연속 또는 불연속 아미노산을 포함한다(예컨대 문헌(*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G.E.Morris, Ed.(1996))을 참조한다).
- [0207] "특이적 결합", "선택적 결합", "선택적으로 결합하다" 및 "특이적으로 결합하다"란 용어는, 예정된 항원상 에피토프에 항체가 결합하는 것을 지칭한다. 일반적으로 항체는 약 10⁻⁷ M 미만, 예컨대 약 10⁻⁸ M, 약 10⁻⁹ M 미만 또는 약 10⁻¹⁰ M 이하의 친화도(KD)로 결합한다.
- [0208] "KD"란 용어는, 항체-항원 상호작용에 대한 해리 평형 상수를 지칭한다. 일반적으로 본 발명의 항체(또는 항원 결합 단편)는 약 10⁻⁷ M 미만, 예컨대 약 10⁻⁸ M 미만 또는 약 10⁻⁹ M 미만의 해리 평형 상수(KD)로 CEA(또는 이의 에피토프)와 결합하는데; 예를 들어 KD값은 FACS 방법을 사용하여 본 발명의 항체의 세포 표면 항원에 대한 친화도에 대해 결정된다.
- [0209] "경쟁하다"라는 용어는, 이 용어가, 항원 결합 단백질(예컨대 중화 항원 결합 단백질 또는 중화 항체)이 동일한 에피토프에 대해 경쟁하는 경우에 사용될 때, 검정될 항원 결합 단백질(예컨대 항체 또는 이의 면역학상 기능성 단편)이, 공통 항원(예컨대 CEA 항원 또는 이의 단편)과 참조기준 항원 결합 단백질(예컨대 리간드 또는 참조기준 항체)의 특이적 결합을 방지 또는 억제하는(예컨대 감소시키는), 이하 검정에 의해 검정되는 항원 결합 단백질들 간의 경쟁관계를 지칭한다. 다수 유형의 경쟁적 결합 검정, 예컨대 고상 직접 또는 간접 방사성면역검정(RIA), 고상 직접 또는 간접 효소면역검정(EIA) 및 샌드위치 경쟁 검정(예컨대 문헌(Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253) 참조), 고상 직접 바이오틴-아비딘 EIA(예컨대 문헌(Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619) 참조), 고상 직접 표지화 검정 및 고상 직접 표지화 샌드위치 검정(예컨대 문헌(Harlow 및 Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press) 참조), 고상 직접 표지화 RIA(I¹²⁵ 표지)(예컨대 문헌(Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15) 참조), 고상 직접 바이오틴

-아비딘 EIA(예컨대 문헌(Cheung, et al, 1990, *Virology* 176:546-552) 참조) 및 직접 표지화 RIA(Moldenhauer et al, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)가 항원 결합 단백질이 또 다른 것과 경쟁하는지 여부를 확정하는데 사용될 수 있다. 일반적으로 검정은 고체 표면이나, 또는 미표지화 검정 항원 결합 단백질 및 표지화 참조기준 항원 결합 단백질중 임의의 것을 보유하는 세포에 결합하는 정제 항원의 용도에 관한 것이다. 경쟁적 억제, 검정 항원 결합 단백질의 존재하에 고체 표면 또는 세포와 결합한 표지의 양을 측정함으로써 측정된다. 일반적으로 검정된 항원 결합 단백질은 과량으로 존재한다. 경쟁적 검정(경쟁적 항원 결합 단백질)에 의해 동정되는 항원 결합 단백질은 참조기준 항원 결합 단백질에 대한 에피토프와 동일한 에피토프와 결합하는 항원 결합 단백질과, 참조기준 항원 결합 단백질이 결합하는 에피토프와 충분히 가까이에 위치하는 인접 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하고, 2개의 에피토프는 결합을 막기 위해 공간상 서로를 방해한다. 경쟁적 결합을 검정하기 위한 방법에 관한 기타 상세한 정보는 본원의 실시예에 제공되어 있다. 일반적으로 경쟁적 항원 결합 단백질이 과량으로 존재할 때, 참조기준 항원 결합 단백질과 공통의 항원간 특이적 결합은 적어도 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 또는 75% 이상만큼 억제(예컨대 감소)될 것이다. 몇몇 경우, 결합은 적어도 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 95% 내지 97% 또는 97% 이상만큼 억제된다.

[0210] "핵산 분자"란 용어는, DNA 분자 또는 RNA 분자를 지칭한다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으나, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다. 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능상 관련이 있도록 배치될 때 "작동 가능하도록 결합"되어 있다고 한다. 예를 들어 프로모터 또는 인핸서는 만일 이것이 암호화 서열의 전사에 영향을 미치면, 암호화 서열과 작동 가능하도록 결합된 것이다.

[0211] 아미노산 서열 "동일성"이란, 제1 서열과 제2 서열이 공유하는 아미노산 잔기의 퍼센트를 지칭하는데, 이때 아미노산 서열을 정렬함에 있어 필요하다면 꺾이 도입되어 최고의 서열 동일성%가 달성될 수 있고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주되지 않는다. 아미노산 서열 동일성%를 확정하기 위해, 당 분야의 기술에 포함되는 다양한 방법, 예컨대 공중이 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어가 사용되어 정렬이 이루어질 수 있다. 당 업자는, 정렬을 측정하기 적합한 매개변수, 예컨대 정렬되는 서열들 전장에 대해 최대의 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 결정할 수 있다.

[0212] "발현 벡터"란 용어는, 이 자체와 결합하였던 또 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 일 구현예에서, 벡터는 추가의 DNA 분절이 결합될 수 있는 것으로서, 원형의 이중 가닥 DNA 루프라 지칭되는 "플러스미드"이다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 추가 DNA 분절이 바이러스 게놈에 결합될 수 있는 바이러스 벡터이다. 본원에 개시된 벡터(예컨대 세균 복제 기원을 가지는 세균 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터)는 그것이 도입된 숙주 세포내에서 자율적으로 복제할 수 있거나, 또는 숙주 세포에 도입된 후 숙주 세포의 게놈에 통합되어, 숙주 게놈과 함께 복제할 수 있다(비 에피솜 포유동물 벡터).

[0213] 항체 및 항원 결합 단편을 제조 및 정제하는 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있는데, 예를 들어 문헌(*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press)의 챕터 5 내지 8에 기재된 방법이 있다. 마찬가지로 항원 결합 단편은 종래의 방법이 사용되어 제조될 수 있다. 본 발명에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 비인간 CDR 영역에 추가의 인간 FR 영역 1개 이상이 함유되도록 유전자 변형된다. 인간 FR 생식계열 서열은 ImMunoGeneTics(IMG) 인간 항체 가변 영역 생식계열 유전자 데이터베이스를 MOE 소프트웨어와 비교함으로써 면역글로불린에 관한 저널(Lefranc, G., *the Immunoglobulin FactsBook*, Academic Press, 2001ISBN012441351)로부터 취득될 수 있거나, 또는 웹사이트(<http://imgt.cines.fr> of ImMunoGeneTics(IMG))에서 취득될 수 있다.

[0214] "숙주 세포"란 용어는, 내부에 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 세균, 미생물, 식물 또는 동물 세포를 포함할 수 있다. 형질전환에 민감한 세균은 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*) 과의 일원, 예컨대 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라(*Salmonella*) 변종, 바실라세아에(*Bacillaceae*) 과의 일원, 예컨대 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 뉴모코커스(*Pneumococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 및 해모필러스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*)를 포함한다. 적합한 미생물로서는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 포함한다. 적합한 동물 숙주 세포주는 CHO(중국햄스터난소세포주) 및 NS0 세포를 포함한다.

[0215] 본 발명의 조작된 항체 또는 항원 결합 단편은 종래의 방법을 사용하여 제조 및 정제될 수 있다. 예를 들어 증쇄 및 경쇄를 암호화하는 cDNA 서열은 발현 벡터에 클로닝되어 재조합될 수 있다. 재조합 면역글로불린 발현 벡터는 숙주 세포를 안정적으로 형질감염시킬 수 있다. 더욱 많이 권장되는 선행 기술인 포유동물 발현계는 항체

의 당화, 구체적으로 Fc 영역의 N 말단 부위의 당화를 초래할 것이다. 양성의 클론은 생물반응기내 배지중에서 증식되어 항체를 생산하게 된다. 분비된 항체를 포함하는 배양액은 종래의 기술, 예컨대 A 또는 G 세파로스 FF 컬럼이 사용되는 기술을 통해 정제될 수 있다. 비특이적으로 결합된 분획들은 세척에 의해 떨어져 나간다. 결합된 항체는 pH 구배 방법이 사용되어 용리되고, 항체 단편은 SDS-PAGE가 사용되어 검출된 후 수집된다. 항체는 종래의 방법이 사용되어 여과 및 농축될 수 있다. 가용성 혼합물 및 중합체는 또한 종래의 방법, 예컨대 분자체 방법 및 이온 교환법이 사용되어 제거될 수 있다. 획득된 생성물은, 예컨대 -70°C에서 즉시 동결되어야 하거나, 동결건조되어야 한다.

[0216] "펩티드"란 용어는, 아미노산과 단백질 사이의 화합물 단편을 지칭한다. 펩티드는 2개 이상의 아미노산 분자를 펩티드 결합에 의해 결합시킴으로써 생성되고, 단백질의 구조적 단편이자 기능적 단편이다.

[0217] "당"이란 용어는, 원소 C, H 및 O로 이루어진 생체거대분자를 지칭한다. 당은 단당체, 이당체 및 다당체 등으로 분류될 수 있다.

[0218] "알킬"이란 용어는, 탄소 원자를 1개 내지 20개 함유하는 선형 또는 분지형 기인 포화 지방족 탄화수소기, 바람직하게는 탄소 원자를 1개 내지 12개 함유하는 알킬, 더욱 바람직하게는 탄소 원자를 1개 내지 10개 함유하는 알킬, 그리고 가장 바람직하게는 탄소 원자를 1개 내지 6개 함유하는(탄소 원자를 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 함유하는) 알킬을 지칭한다. 비제한적 예로서는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, *sec*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 2,2-디메틸프로필, 1-에틸프로필, 2-메틸부틸, 3-메틸부틸, *n*-헥실, 1-에틸-2-메틸프로필, 1,1,2-트리메틸프로필, 1,1-디메틸부틸, 1,2-디메틸부틸, 2,2-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸, 2-에틸부틸, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸, 2,3-디메틸부틸, *n*-헵틸, 2-메틸헥실, 3-메틸헥실, 4-메틸헥실, 5-메틸헥실, 2,3-디메틸펜틸, 2,4-디메틸펜틸, 2,2-디메틸펜틸, 3,3-디메틸펜틸, 2-에틸펜틸, 3-에틸펜틸, *n*-옥틸, 2,3-디메틸헥실, 2,4-디메틸헥실, 2,5-디메틸헥실, 2,2-디메틸헥실, 3,3-디메틸헥실, 4,4-디메틸헥실, 2-에틸헥실, 3-에틸헥실, 4-에틸헥실, 2-메틸-2-에틸펜틸, 2-메틸-3-에틸펜틸, *n*-노닐, 2-메틸-2-에틸헥실, 2-메틸-3-에틸헥실, 2,2-디에틸펜틸, *n*-데실, 3,3-디에틸헥실, 2,2-디에틸헥실 및 이의 다양한 측쇄 이성체 등을 포함한다. 탄소 원자를 1개 내지 6개 가지는 저급 알킬이 더욱 바람직하고, 비제한적 예로서는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, *sec*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 2,2-디메틸프로필, 1-에틸프로필, 2-메틸부틸, 3-메틸부틸, *n*-헥실, 1-에틸-2-메틸프로필, 1,1,2-트리메틸프로필, 1,1-디메틸부틸, 1,2-디메틸부틸, 2,2-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸, 2-에틸부틸, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸 및 2,3-디메틸부틸 등을 포함한다. 알킬은 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있다. 치환될 때, 치환기는 이용 가능한 임의의 결합 부위에서 치환될 수 있되, 단 치환기는, 바람직하게는 하기 기, 즉 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 머캡토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오, 헤테로사이클로알킬티오 및 옥소로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 기 중 1개 이상이다.

[0219] "헤테로알킬"이란 용어는, N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자 1개 이상을 함유하며, 상기 정의된 바와 같은 알킬을 지칭한다.

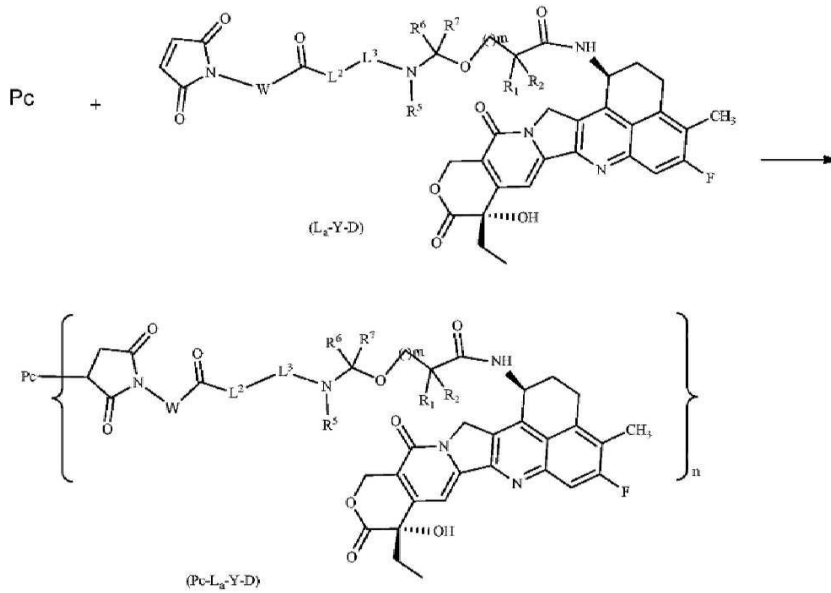
[0220] "알킬렌"이란 용어는, 동일한 탄소 원자 또는 상이한 탄소 원자 2개로부터 수소 원자 2개가 제거됨으로 말미암아 부모 알칸으로부터 유래하게 된 잔기 2개를 가지는 포화 선형 또는 분지형 지방족 탄화수소기를 지칭한다. 이는 탄소 원자를 1개 내지 20개 함유하는 선형 또는 분지형 기로서, 바람직하게는 탄소 원자를 1개 내지 12개 함유하는 알킬렌, 더욱 바람직하게는 탄소 원자를 1개 내지 6개 함유하는 알킬렌(탄소 원자를 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 함유하는 알킬렌)이다. 알킬렌의 비제한적 예로서는 메틸렌(-CH₂-), 1,1-에틸리렌(-CH(CH₃)-), 1,2-에틸리렌(-CH₂CH₂-), 1,1-프로필리렌(-CH(CH₂CH₃)-), 1,2-프로필리렌(-CH₂CH(CH₃)-), 1,3-프로필리렌(-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-부틸리렌(-CH₂CH₂CH₂CH₂-) 및 1,5-부틸리렌(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 알킬렌은 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있다. 치환될 때, 치환기는 이용 가능한 임의의 결합 부위에서, 선택적으로는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 머캡토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오, 헤테로사이클로알킬티오 및 옥소로 이루어진 군으로부터 바람직하게는 독립적으로 선택되는 치환기 1개 이상으로 치환될 수 있다.

[0221] "알콕시"란 용어는, -O-(알킬) 및 -O-(치환되지 않는 사이클로알킬)을 지칭하는데, 여기서 알킬 또는 사이클로

알킬은 상기 정의된 바와 같다. 알콕시의 비제한적 예로서는 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 부톡시, 사이클로프로필옥시, 사이클로부톡시, 사이클로펜틸옥시 및 사이클로헥실옥시를 포함한다. 알콕시는, 선택적으로 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있으며, 치환될 때 이 치환기는, 바람직하게 하기 기, 즉 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 머캡토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 기 1개 이상이다.

- [0222] "할로알킬"이란 용어는, 수소가 할로겐 1개 이상으로 치환된 알킬기를 지칭하며, 여기서 알킬은 상기 정의된 바와 같다.
- [0223] "중수소함유 알킬"이란 용어는, 수소가 중수소 원자 1개 이상으로 치환된 알킬기를 지칭하며, 여기서 알킬은 상기 정의된 바와 같다.
- [0224] "하이드록시알킬"이란 용어는, 수소가 하이드록시기 1개 이상으로 치환된 알킬기를 지칭하며, 여기서 알킬은 상기 정의된 바와 같다.
- [0225] "하이드록시"란 용어는, -OH기를 지칭한다.
- [0226] "할로겐"이란 용어는, 플루오르, 염소, 브롬 또는 요오드를 지칭한다.
- [0227] "아미노"란 용어는, -NH₂를 지칭한다.
- [0228] "니트로"란 용어는, -NO₂를 지칭한다.
- [0229] "시아노"란 용어는, -CN을 지칭한다.
- [0230] 본 발명은 또한 화학식 I의 화합물의 다양한 중수소함유 형태를 포함한다. 탄소 원자에 결합한, 이용 가능한 수소 원자 각각은 중수소 원자로 독립적으로 치환될 수 있다. 당 업자는 유관 문헌을 참조하여 화학식 I의 화합물을 중수소함유 형태로 합성할 수 있다. 상업상 이용 가능한 중수소함유 출발 재료가 화학식 I의 화합물의 중수소함유 형태를 제조하는데 사용될 수 있거나, 또는 중수소함유 보란, 테트라하이드로푸란중 트리-중수소함유 보란, 중수소함유 리튬알루미늄 수소화물, 중수소함유 요오도에탄 및 중수소함유 요오도메탄 등을 포함하되, 이에 한정되지 않는 중수소함유 시약이 사용되는 종래 기술이 사용되어 합성될 수 있다.
- [0231] "선택적" 또는 "선택적으로"란 용어는, 이후 기재될 이벤트나 환경이 발생/조성될 수 있지만 반드시 그러한 것은 아닌 경우, 그리고 그 기재가 이벤트나 환경이 발생/조성되거나 발생하지 않는/조성되지 않는 경우를 포함함을 의미한다. 예를 들어 "알킬로 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴기"란, 알킬이 존재할 수 있되 반드시 그러한 것은 아님과, 그 기재가 헤테로사이클릴기가 알킬로 치환되거나 치환되지 않는 경우를 포함함을 의미한다.
- [0232] "치환된"이란 용어는, 기내 수소 원자 1개 이상, 바람직하게는 5개 이하, 더욱 바람직하게는 1개, 2개 또는 3개가 어떤 치환기로 독립적으로 치환되는 경우를 의미한다. 치환기는 오로지 자체의 가능한 화학적 위치에 있으며, 당 업자는 과도한 노력을 들이지 않고 실행 가능하거나 불가능한 치환을 (실험에 의하거나 이론상으로) 확정할 수 있을 것이다. 예를 들어 자유 수소를 가지는 아미노 또는 하이드록시가 불포화 결합을 가지는 탄소 원자(예컨대 올레핀)와 결합할 때, 치환은 불안정할 수 있다.
- [0233] "약학 조성물"이란 용어는, 본원에 기재된 화합물 또는 이의 생리학적/약학적으로 허용 가능한 염 또는 전구약물중 1개 이상과, 기타 화학적 성분, 예컨대 생리학적/약학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제를 함유하는 혼합물을 지칭한다. 약학 조성물의 용도는, 유기체로의 투여를 촉진하여, 활성 성분의 흡수를 가속화하고, 이로써 생물 활성을 발휘시키기 위함이다.
- [0234] "약학적으로 허용 가능한 염"이란 용어는, 본 발명의 항체 약물 접합체의 염, 또는 본 발명에 기재된 활성 화합물의 염을 지칭한다. 이러한 염은 대상체에서 사용될 때 안전하고 유효하며, 필요한 생물 활성을 보유한다. 본 발명의 리간드 약물 접합체는 적어도 1개의 아미노기를 포함하므로, 산과 염을 형성할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염의 비제한적 예로서는 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오데이트, 설페이트, 비설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 숙시네이트, 아스코르베이트, 옥살레이트, 나이트레이트, 술페이트, 하이드로포스페이트, 디하이드로포스페이트, 살리실레이트, 하이드로시트레이트, 타르트레이트, 말레이트, 푸마레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 메실레이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트 및 *p*-톨루엔설포네이트를 포함한다.

- [0235] 본 발명의 일 구현예에서, 세포독성 약물은 링커 단위에 의해 항체의 머캡토기에 접합된다.
- [0236] 리간드 세포독성 약물 접합체의 담지는 하기 비제한적 방법, 예컨대
- [0237] (1) 결합 시약 대 모노클로날 항체의 몰비를 제어하고,
- [0238] (2) 반응 시간과 온도를 제어하고,
- [0239] (3) 상이한 시약을 선택함으로써 제어될 수 있다.
- [0240] 종래의 약학 조성물을 제조하기 위해, 중국 약전이 참조된다.
- [0241] 본 발명의 약물에 대한 "약학적으로 허용 가능한 담체"란 용어는, 약물이 대상체에 도입되고, 대상체내 약물 분포가 약물의 방출율을 제어하며, 약물이 표적화된 장기에 전달되는 방식을 변경할 수 있는 시스템을 지칭한다. 약물 담체 방출 및 표적화 시스템은 약물의 분해와 소실을 감소시킬 수 있고, 부작용을 줄일 수 있으며, 생체내 이용가능성을 개선할 수 있다. 예를 들어 담체로서 사용될 수 있는 중합체 계면활성제는 자체의 독특한 양친매성 구조로 말미암아 자가 조립되어, 바람직한 예를 들자면 미셀, 마이크로에멀전, 젤, 액정 및 소포체와 같이 다양한 형태의 응집체로 형성될 수 있다. 응집체는 약물 분자를 캡슐화하는 역량을 가지고, 막에 대해 우수한 투과성을 가지므로, 유효한 약물 담체로서 사용될 수 있다.
- [0242] "부형제"란 용어는, 활성 화합물과는 별도로 약학 조성물에 부가되는 것이다. 이는 또한 애주반트라 지칭될 수 있다. 예를 들어 정제의 경우에는 결합제, 충전제, 붕해제, 윤활제; 반고체 연고 및 크림 제제의 경우에는 베이스 부분; 액체 제형의 경우에는 보존제, 향산화제, 교정제, 향수, 공용매, 유화제, 가용화제, 등장성 조정제 및 착색제 등은 모두 부형제라 지칭될 수 있다.
- [0243] 충전제라고도 지칭되는 "회석제"란 용어는, 주로 정제의 중량 및 부피를 증가시키는데 사용된다. 회석제의 부가는 임의의 부피를 보장할뿐 더러, 주요 성분의 용량 편차를 감소시키고, 약물의 압축 성형성 등을 개선한다. 정제 형태중 약물이 유성의 성분을 함유하면, 흡수제는 반드시 유성의 성분을 흡수하여 "건조된" 상태를 유지하고, 정제의 제조를 가속화하도록 첨가되어야 한다. 그 예로서는 전분, 락토스, 갈슘의 무기 염 및 미세결정 셀룰로스 등을 포함한다.
- [0244] 약학 조성물은 주사가 가능한 멸균 수용액의 형태를 가질 수 있다. 이용 가능하고 허용 가능한 비이클 또는 용매는 물, 링거(Ringer) 용액 및 등장성 염화나트륨 용액을 포함한다. 주사가 가능 멸균 제형은 유상에 활성 성분이 용해된 주사가 가능 멸균 수중유 마이크로에멀전일 수 있다. 예를 들어 활성 성분은 대두유 및 레시틴 혼합물중에 용해된다. 그 다음, 오일 용액은 물과 글리세롤의 혼합물에 첨가되고, 마이크로에멀전이 형성되도록 처리된다. 주사액 또는 마이크로에멀전은 대상체의 혈류에 다량으로 국소 주사될 수 있다. 대안적으로 본 발명의 화합물의 순환 농도를 일정하게 유지시키는 방식으로 용액과 마이크로에멀전을 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 이처럼 일정한 농도를 유지시키기 위해 연속 정맥내 전달 디바이스가 사용될 수 있다. 이러한 디바이스의 예로서는 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 정맥내 주사 펌프가 있다.
- [0245] 약학 조성물은 근육내 및 피하 투여를 위한 주사가 가능 멸균 수성 또는 유성 현탁액의 형태를 가질 수 있다. 현탁액은 선행 기술에 따라 상기 언급된 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 제조될 수 있다. 주사가 가능 멸균 제형도 또한 비경구상 허용 가능한 무독성 회석제 또는 용매중 제조된 멸균 주사액 또는 현탁액, 예컨대 1,3-부탄디올중 제조된 용액일 수 있다. 뿐만 아니라, 멸균 불휘발성 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 통상 사용될 수 있다. 이러한 목적으로, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함하는 임의의 배합 불휘발성 오일이 사용될 수 있다. 또한 지방산, 예컨대 올레산도 또한 주사액을 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0246] 본 발명은 절단가능하고, 특이한 구조를 가지는 결합 팔, 특이한 구조를 가지는 활성 성분 및 결합 팔, 활성 성분 및 항체로 이루어진 항체 약물 접합체(ADC)에 관한 것이다. 이러한 ADC는 독성 성분을 스페이서를 통해 항체에 결합시켜 형성된 복합체이다. 항체 약물 접합체(ADC)는 생체내 분해되어, 활성 분자를 방출하고, 이로써 종양을 억제하는 역할을 하게 된다.
- [0247] 2. 합성 방법
- [0248] 합성을 위하여, 하기 기술상의 합성 반응식이 채택된다.
- [0249] 일반식 (Pc-L_a-Y-D)의 화합물을 제조하기 위한 방법은 하기 단계들



[0250]

, 즉

[0251]

환원된 Pc 및 일반식 (L_a-Y-D)를 대상으로 커플링 반응을 진행시켜, 일반식 (Pc-L_a-Y-D)의 화합물을 획득하는 단계로서, 단 환원제는, 바람직하게 TCEP이고, 특히 항체중 이황화 결합은 바람직하게 환원되며, Pc, W, L², L³, R¹, R², R⁵ 내지 R⁷, m 및 n은 일반식 (Pc-L_a-Y-D)에 정의된 바와 같은 단계를 포함한다.

[0252]

본 발명의 구현예 1개 이상은 상기 발명의 설명에 상세히 기재되어 있다. 바록 본원에 기재된 방법과 재료와 유사하거나 동일한 임의의 방법과 재료도 또한 본 발명을 수행하거나 시험하는데 사용될 수 있지만, 바람직한 방법과 재료가 이하에 기재되어 있다. 본 발명의 기타 특징, 목적 및 이점은 발명의 설명과 청구의 범위로부터 명백할 것이다. 발명의 설명과 청구의 범위에서, 맥락중 달리 명확하게 명시되어 있지 않는 한 단수 형태는 복수의 대상을 포함한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명의 속하는 분야의 통상의 지식을 가지는 자들에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가진다. 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 간행물은 참고문헌으로 인용된다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 더욱 완전하게 예시하기 위해 제시된다. 이들 실시예는 어떤 식으로든 청구의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0253]

실시예 1: CEA 재조합 단백질 및 안정적으로 형질감염된 세포의 제조

[0254]

I. 재조합 CEA 항원 및 세포 표면에 발현된 CEA 단백질의 서열

[0255]

Fc 및 His 태그를 가지는 인간 CEA의 아미노산 서열을 포유동물 세포 발현 벡터에 클로닝한 다음, 293E 세포내에서 발현 및 정제하여 재조합 단백질을 획득한 후, 후속 실시예의 실험에 사용하였다. 그러는 와중에 표지를 가지지 않는 인간 CEA 유전자, 인간 CEACAM1 유전자 및 원숭이 CEA 유전자로 CHO 세포를 형질감염시켜, 세포 표면에 CEA 단백질을 발현하는 CHO 세포 변종을 제조함으로써, 후속 항체 스크리닝 및 동정을 도모하였다. 관련 단백질의 아미노산 서열은 이하와 같다:

[0256] 1. 인간 CEA-His(hCEA-His)의 아미노산 서열:

KLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNLPQHLLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIG
 TQQATPGPAYSGREIIPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYP
 ELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWVWVNNQSLPVSRLQLSNG
 NRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRS
 GENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSD
 TGLNRTTVTTITVYAEPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWVWVNN
 QSLPVSRLQLSNDNRTLTLSSVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGP
 DDPTISPSYTYRPGVNLSSLCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKN
 SGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEA
 QNTTYLWVWVNGQSLPVSRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSAN
 RSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLCHSASNPSPQYSWRINGIPQQH
 TQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAHHHHHH

(서열 번호 1)

[0257]

[0258] 2. 인간 CEA-Fc(hCEA-Fc)의 아미노산 서열:

KLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNLPQHLLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIG
 TQQATPGPAYSGREIIPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYP
 ELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWVWVNNQSLPVSRLQLSNG
 NRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRS
 GENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSD
 TGLNRTTVTTITVYAEPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWVWVNN
 QSLPVSRLQLSNDNRTLTLSSVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGP
 DDPTISPSYTYRPGVNLSSLCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKN
 SGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEA
 QNTTYLWVWVNGQSLPVSRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSAN
 RSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLCHSASNPSPQYSWRINGIPQQH
 TQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAEPKSSDK
 THTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(서열 번호 2)

[0259]

[0260] 3. 사이노몰거스 원숭이 CEA-His(사이노CEA-His)의 아미노산 서열:

QLTIESRPFNVAEGKEVLLLAHNVSQNLFGYIWKGERVDASRRIGSCVIR
 TQQITPGPAHSGRETIDFNASLLIQNVTQSDTGSYTIQVIKEDLVNEEATGQFRVY
 PELPKPYITSNNSNPIEDKDAVALTCEPETQDITYLWVWVNNQSLPVSRLQLSSD
 NRTLTVFNIPRNDTTSYKCETQNPVSVRRSDPVTNLNVLYGPDAPTISPLNTPYRA
 GEYLNLTCHAASNPTAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSA
 TGLNRTTVTAITVYAELPKPYITSNNSNPIEDKDAVTLTCEPETQDITYLWVWVNN
 QRLSVSSRLELSNDNRTLTVFNIPRNDTTFYECETQNPVSVRRSDPVTNLNVLYGP
 DAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASNPAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVN
 NSGYSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVYVELPKPYISSNNSNPIEDKDAVTLTCEP
 VAENTTYLWVWVNNQSLVSPRLQLSNGNRILTLLSVTRNDTGPYECGIQNSESA
 KRSDPVTNLNVTYGPDTPHSPDLSYRSGANLNLCHSDSNPSPQYSWLINGTLR
 QHTQVLFISKITSNNGAYACFVSNLATGRNNSIVKNISVSSGDSAPGSSGLSAH
 HHHHHH (서열 번호 3)

[0261]

[0262] 4. CHO 세포 표면에 발현된 인간 CEA(hCEA-CHO)의 아미노산 서열:

MESPSAPPHRW CIPWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVL
 LLVHNL PQHLFGYSWYKGERVDG NRQIIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIPNASL
 LIQNIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAV
 AFTCEPETQDATYLWVWVNNQSLPVS PRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCET
 QNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNL SCHAASNPPAQYSWF
 VNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTT VTTITVYAEPKPFIT
 SNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWVWVNNQSLPVS PRLQLSNDNRRTL LLS
 VTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDPTISPSYTYRPGVNL SLSC
 HAASNPPAQYSWLIDGNIQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVK
 TITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWVWVNGQSLPVS PRL
 QLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTL DVLYGPDTPHSPD
 SSYLSGANLNL SCHSASNPSQYSWRINGIPQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFV
 SNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATV GIMIGVLVGVALI (서열 번호 4)

[0263]

[0264] 5. CHO 세포 표면에 발현된 원숭이 CEA(사이노CEA-CHO)의 아미노산 서열:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQLTIESRPFNVAEGKEVLLLAHNVSQNLFGYI
 WYKGERVDASRRIGSCVIRTQQITPGPAHSGRETIDFNASLLIQNV TQSDTGSYTI
 QVIKEDLVNEEATGQFRVYPELPKPYITSNNSNPIEDKDAVALTCEPETQD TTYL
 WVWVNNQSLPVS PRLQLSNDNRRTLTLFNVTRNDTTSYKCETQNPVSVRRSDP VTL
 NVLYGPDAPTISPLNTPYRAGEYLNLTCHAASNPTAQYFWFVNGTFQQSTQELFI
 PNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTT VTAITVYAELPKPYITSNNSNPIEDKDAV
 TLTCEPETQD TTYLWVWVNNQRLSVSSRLELSNDNRRTLTLFNVTRNDTTFYECET
 QNPVSVRRSDP VTLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNL SCHAASNPAAQYFW
 FVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTT VTAITVYVELPKPY
 ISSNNSNPIEDKDAVTLTCEPVAENTTYLWVWVNNQSLSVSPRLQLSNGNRIL LLS
 VTRNDTGPYECGIQNSESAKRSDPVTLNVTYGPDPHSPDLSYRSGANLNL SC
 HSDSNPSQYSWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNNGAYACFVSNLATGRNNSIVK
 NISVSSGDSAPGSSGLSARATVGHIGMLVGV ALM (서열 번호 5)

[0265]

[0266] 6. CHO 세포 표면에 발현된 인간 CEACAM1(CEACAM1-CHO)의 아미노산 서열:

MGHLSAPLHRVRVPWQGLLLTASLLTFWNPPTAQLTTESMPFNVAEGKE
 VLLL VHNLPQQLFGYSWYKGERVDG NRQIVGYAIGTQQATPGPANS GRETIYPN
 ASLLIQNV TQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVED
 KDAVAFTCEPETQD TTYLWVWVNNQSLPVS PRLQLSNGNRTL LLSVTRNDTGPY
 ECEIQNPVSANRSDP VTLNVTYGPDP TPTISPSDYRPGANLSLSCYAASNPPAQ
 YSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCHANN SVTGCNRTTVKTIIVTELS PV
 VAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNT
 TLSINPVKREDAGTYWCEVFNPIKSNQSDPIMLVN VYNALPQENGLSPGAIAGIV
 IGVVALVALIAVALACFLHFGKTGRASDQRDLTEHKPSVSNHTQDHSNDPPNKM
 NEVTYSTLNFEAQPTQPTSASP SLTATEIHYSEVKKQ (서열 번호 6)

[0267]

[0268] II. 관련 단백질의 정제

[0269] 1. His 태그를 가지는 단백질의 정제

[0270] 세포 발현 상청액 시료를 고속으로 원심분리하여 불순물을 제거하였다. PBS 완충제(pH 7.4)로 니켈 컬럼을 평형화한 다음, 2 내지 5 컬럼 부피만큼으로 세척하고 나서, 상청액 시료를 Ni 세파로스 엑셀 컬럼에 임의의 유량으로 적용하였다. A₂₈₀ 판독결과가 기준선으로 떨어질 때까지 이 컬럼을 PBS 완충제로 세척하였다. 그 다음, 크로마토그래피 컬럼을 PBS + 10 mM 이미다졸로 세척하여, 비특이적으로 결합한 불순물 단백질을 제거하였고, 유출된 유체를 수집하였다. 마지막으로 300 mM 이미다졸을 함유하는 PBS 용액과 함께 표적 단백질을 용리시켰으며,

용리 피크일 때의 용리물을 수집하였다. 수집한 용리물을 농축하였으며, 탈염 컬럼을 통해 시료 완충제를 PBS 용액으로 변경하여, 후속 실험에 사용할 혼합물을 획득하였다.

[0271] 2. Fc를 포함하는 단백질, 키메라 항체 및 하이브리도마 항체의 정제

[0272] 세포 발현 상청액 시료를 고속으로 원심분리하여 불순물을 제거하였고, Fc를 포함하는 재조합 단백질과 키메라 항체 발현 상청액은 단백질 A 컬럼을 사용하여 정제하였으며, 하이브리도마 발현 상청액은 단백질 G 컬럼을 사용하여 정제하였다. 상청액을 컬럼에 임의의 유량으로 적용하였다. A₂₈₀ 관독결과가 기준선으로 떨어질 때까지 이 컬럼을 PBS로 세척하였다. 100 mM 아세트산(pH 3.0)과 함께 표적 단백질을 용리하고 나서, 1 M Tris-HCl(pH 8.0)로 중화하였다. 용리한 시료를 농축하였으며, 시료 완충제를 PBS로 변경하여 혼합물을 획득하였는데, 이 혼합물을 추후 사용을 위해 분액하였다.

[0273] **실시예 2: 마우스 항 인간 CEA 모노클로날 항체의 제조**

[0274] **1. 면역화 및 융합**

[0275] 마우스를 hCEA-His 단백질 및 사이노-CEA-His 단백질로 면역화하였거나, 또는 hCEA-CHO 세포 및 사이노CEA-CHO 세포로 교차 면역화하였다. 단백질 면역화에 필요한 단백질 양은, 1차 면역화의 경우에는 50 µg이었고, 후속 면역화의 경우에는 25 µg이었으며, 세포 면역화는 면역화 1회차당 10⁷개 세포로 이루어졌고, 면역화는 2주마다 1회 수행하였다. 3차 면역화 이후, 혈액을 채취하여 혈청중 항체의 역가를 확정하였다. 혈청중 항체가가 증가하여 안정기에 도달한 마우스를 비장세포 융합을 위해 선택하였다. 비장 림프구 및 골수종 세포, 즉 Sp2/0 세포(ATCC® CRL-8287™)를 PEG 매개 융합 절차에 의해 융합하여, 하이브리도마 세포를 획득하였다. 융합한 하이브리도마 세포를 MC 반고체 완전 배지(20% FBS, 1x HAT, 1x OPI 및 2% 메틸 셀룰로스 함유 RPMI-1640 배지) 중에 0.5 내지 1 x 10⁶개 세포/mL의 밀도가 되도록 재현탁하였고, 현탁액을 35 mm 세포 배양 접시에 분액하여 37°C에서 항온처리하였다(5% CO₂, 7일 내지 9일). 융합후 7일 내지 9일차에 세포 클론의 크기에 따라 단일 세포 클론을 찍어내어 96웰 세포 배양 평판에 접종하고 나서, 여기에 웰당 HT 완전 배지(20% FBS, 1xHT 및 1xOPI 함유 RPMI-1640 배지) 200 µL를 첨가하여, 37°C에서 배양한 다음(5% CO₂, 3일), 검출하였다.

[0276] **2. 하이브리도마 세포의 스크리닝**

[0277] 세포 표면 항원의 효소결합면역흡착제검정(ELISA)을 기반으로 항체의 1차 스크리닝을 수행하였다. 세포를 Elisa 평판(Corning, Cat # 3599)에 적용한 다음, 항온처리(37°C에서 밤새도록 배양하였다. 세포가 벽에 완전히 부착하여, 전체 벽을 거의 채웠을 때, 상청액을 제거하였다. 세포를 PBS로 1회 세척한 다음, 세포 고정 완충제(Beyotime, Cat # P0098)로 고정하였다(실온, 45분). 고정 완충제를 제거한 다음, 평판 세척제를 사용하여 평판을 3회 세척하고 나서, 37°C에서 5% 탈지 분유로 3시간을 초과하여 차단하였다. 차단 완충제를 제거하고, 평판 세척제를 사용하여 평판을 3회 세척하였다. 차단한 세포 평판을 -20°C에 보관하거나, 또는 바로 사용하였다. 평판을 사용할 때, 구배 희석 하이브리도마 세포 배양 상청액을 첨가하였으며, 평판을 37°C에서 1시간 동안 항온처리한 다음, 평판 세척제를 사용하여 평판을 3회 세척하였다. 10,000배 희석한 염소 항 마우스 IgG H&L(HRP) 2차 항체(Abcam, Cat # ab205719) 100 µL를 첨가한 후, 평판을 37°C에서 1시간 동안 항온처리한 다음, 평판 세척제를 사용하여 평판을 3회 세척하였다. 여기에 TMB(KPL, Cat # 5120-0077) 100 µL를 첨가하고 나서, 평판을 37°C에 방치하여 10분 동안 발색을 진행시켰다. 여기에 1 M 황산 100 µL를 첨가하여 반응을 종결시켰으며, 미세평판 관독기를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 관독하였다. 시험 항체가 가용성 CEA(sCEA)와는 완전히 결합하지 않고 세포 표면상 CEA에 결합하였을 때, 항체를 sCEA와 함께 30분 동안 항온처리한 다음, 세포 평판에 첨가하였다.

[0278] 스크리닝한 양성 클론을 증식시키고 나서, 접종 보존을 위해 동결시킨 후, 2회 내지 3회 서브클로닝하여 단일 세포 클론이 획득되도록 만들었다. 스크리닝한 하이브리도마 클론을 추가로 제조한 다음, 무혈청 세포 배양액으로 정제하였다. 획득한 하이브리도마 항체와, 세포 표면상 CEA 단백질의 결합을 유세포분석법(이 방법은 본 발명의 시험 실시예 1에 보임)을 사용하여 검출하였으며, 결합 활성이 우수한 하이브리도마 세포 변종을 선택하였다. 모노클로날 하이브리도마 세포 변종 mAb47, mAb63, mAb67 및 mAb103의 결합 활성 검출 결과를 표 1에 보았다:

[0279] [표 1]

세포 표면 CEA 단백질과 마우스 항체의 결합에 대한 실험 결과			
항체	EC50 (nM)		
	MKN45	사이노CEA-CHO	CEACAM1-CHO
mAb47	2.10	1.66	미결합
mAb63	3.62	2.88	미결합
mAb67	1.90	6.00	미결합
mAb103	3.94	0.71	미결합

[0280]

[0281] 3. 하이브리도마 항체의 서열 결정

[0282] 모노클로날 하이브리도마 세포 변종 mAb47, mAb63, mAb67 및 mAb103을 선택한 다음, 모노클로날 항체의 서열을 클로닝하였다. 클로닝 과정은 이하와 같았다: 대수기 성장중에 있는 하이브리도마 세포를 수집한 다음, Trizol(Invitrogen, Cat #15596-018)을 사용하여 RNA를 추출하고 나서, cDNA로 역전사시켰다. cDNA를 주형으로 사용하여 PCR 증폭을 수행한 후, 서열결정 회사에 의뢰해 cDNA를 서열결정하였으며, 수득한 DNA 서열에 대응하는, 항체의 아미노산 서열을 이하 표 2에 보였다:

[0283] [표 2]

마우스 항 CEA 항체의 가변 영역 서열		
항체	중쇄 가변 영역 서열 VH	경쇄 가변 영역 서열 VL
mAb47	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF TTYGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYS GVPTYADDFKGRFAFSLTSASTAYLQIN NLKNEATATYFCARRGNYGRWDFDVG TGTTVTYSS (서열 번호 7)	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSS TISSSNLHWYQQKSETSPKPWIYGT NLASGVPVRFSGSGSGTYSYSLTIS EAEDAATYVCQQWSIYPLTFGAGTK LELK (서열 번호 8)
mAb63	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYT FTDFYMNWVRQSHGKSLWIGDIFPKNG NTDYNRKFKDKATLTVDKSSNTVYMEFR SLTLEDSAIYFCARSGYGNVYFDYWGQ GTFYSS (서열 번호 9)	DVQMTQTPSALSASLGDRVTISCRS QDINIYLNWYQQKPDGTVKLLIYR SGLLSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS EPEDIATYFCQQGNTLPPTFGGK EIK (서열 번호 10)
mAb67	EVQLQQSGPELVKPGASVKIYCKASGYTF TDYHMNVVKQSHGKSLWIGDINPDIGG TSYNQNFKGAATLTVDKSSSTAYMELRSL TSEDSAVYYCSRWFDFSFANWGQGLV TVSA (서열 번호 11)	DIVMTQSPASLMSLGKRATISCRAS ESVSIIGTNIHWWYQQKPGQPPKLLI YHASNLETGVPARFSGSGSGADFTLT IDPVEGDDVALYQLSRKIPYTFGG GTKMEIK (서열 번호 12)
mAb103	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF TTYGVIVVKQAPGKGLKWMGWINTYSG VPTYADDFKGRFAFSLTSASTAYLQINNL KNEATATYFCARKKTLTTPWFAYWGQ GTLVTVSA (서열 번호 13)	DLVVTQSSSAFSLGASAKLTCTLS QHSTYTIIEWYQQPLKPPKYVMELK KDGSHSTGDGIPDRFSGSSGADRYL TISNIQPEDEAIYICGVGNTIKEQFVY VFGGKTKVTVL (서열 번호 14)

[0284]

[0285] [표 3]

항 CEA 항체의 CDR 서열				
항체	중쇄 CDR 서열		경쇄 CDR 서열	
mAb47	HCDR1	TYGMS (서열 번호 15)	LCDR1	SVSSTISSSNLH (서열 번호 18)
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (서열 번호 16)	LCDR2	GTSNLAS (서열 번호 19)
	HCDR3	RGNYGRWDFDV (서열 번호 17)	LCDR3	QQWSIYPLT (서열 번호 20)
mAb63	HCDR1	DFYMN (서열 번호 21)	LCDR1	RTSQDINIYLN (서열 번호 24)
	HCDR2	DIFPKNGNTDYNRKFKD (서열 번호 22)	LCDR2	YRSGLLS (서열 번호 25)
	HCDR3	SGYGNVYFDY (서열 번호 23)	LCDR3	QQGNTLPPT (서열 번호 26)
mAb67	HCDR1	DYHMN (서열 번호 27)	LCDR1	RASESVSIIGTNLIH (서열 번호 30)
	HCDR2	DINPDIGGTSYNQNFKG (서열 번호 28)	LCDR2	HASNLET (서열 번호 31)
	HCDR3	WDFDSFAN (서열 번호 29)	LCDR3	LQSRKIPYT (서열 번호 32)
mAb103	HCDR1	TYGVI (서열 번호 33)	LCDR1	TLSSQHSTYIE (서열 번호 35)
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (서열 번호 16)	LCDR2	LKKDGSHTGD (서열 번호 36)
	HCDR3	KKTLTTPWFAY (서열 번호 34)	LCDR3	GVGNTIQEYVYV (서열 번호 37)
주의: 본 표에 제시된 항체 CDR 서열은 Kabat 번호매김 체계에 따라 확정됨				

[0286]

[0287]

4. 인간 IgG1 키메라 항체의 제조

[0288]

하이브리도마를 스크리닝하여 수득한 후보 분자 mAb47, mAb63, mAb67 및 mAb103을 증식 및 서열결정하여 가변 영역 암호화 유전자 서열을 수득하였으며, 서열 결정하여 수득한 서열을 사용함으로써 수미 프라이머(head-tail primer)를 디자인하였고, 서열결정한 유전자를 주형으로 사용하는 PCR에 의해 각각의 항체에 대해 VH/VK 유전자 단편을 구성하여, 발현 벡터 pHr(신호 펩티드 및 hIgG1/h카파/h람다 불변 영역 유전자(CH1-Fc/CL) 단편 포함)와 상동 재조합함으로써, 재조합 키메라 항체 전장 발현 플라스미드 VH-CH1-Fc-pHr/VL-CL-pHr을 구성하였고, 키메라 항체 Ch47, Ch63, Ch67 및 Ch103을 추가로 수득하였다.

[0289]

실시예 3: 마우스 항 CEA 모노클로날 항체의 인간화

[0290]

IMGT 인간 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자 데이터베이스와, MOE 소프트웨어를 비교하여, 상동성이 큰 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자를 주형으로 선택하였으며, 마우스 항체의 CDR을 대응 인간화 주형에 그래프팅(grafting)하여, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 서열내 가변 영역 서열을 형성하였다. 이하 실시예들의 항체중 CDR 아미노산 잔기를 확정하여, Kabat 번호매김 시스템으로 주석을 달았다.

[0291]

1. 마우스 항체 mAb47의 인간화

[0292]

상동성이 큰 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자를 주형으로 선택하였는데; 예를 들어 마우스 항체 mAb47의 경우, IGKV6-21*01 및 IGKJ2*01을 인간화 경쇄 주형으로 선택하였고, IGHV7-4-1*02 및 IGHJ6*01을 인간화 중쇄 주형으로 선택하였다. 인간화를 도모하기 위해 마우스 항체 mAb47의 CDR을 대응 인간화 주형으로 그래프팅하였으며, 마우스 항체 mAb47에 대한 인간화 역 돌연변이 디자인을 이하 표 4에 보였다:

[0293] [표 4]

마우스 항체 mAb47에 대한 인간화 디자인			
인간화 항체 mAb47의 경쇄 가변 영역		인간화 항체 mAb47의 중쇄 가변 영역	
h47VL1	(IGKV6-21*01+IGKJ2*01) 그래프팅	h47VH1	(IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01) 그래프팅
h47VL2	(IGKV6-21*01+IGKJ2*01) 그래프팅+L46P, K49Y, F71Y	h47VH2	(IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01) 그래프팅+E46K
h47VL3	(IGKV6-21*01+IGKJ2*01) 그래프팅+L46P, L47W, K49Y, F71Y	h47VH3	(IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01) 그래프팅+R38K, E46K
h47VL4	IGKV6-21*01+IGKJ2*01) 그래프팅+L46P, L47W, K49Y, D70S, F71Y	h47VH4	(IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01) 그래프팅+R38K, E46K
주의: 본 표의 아미노산 위치는 Kabat 번호매김 체계를 이용하여 번호가 매겨진 것으로서; 예를 들어 L46P는, 48번 위치의 L이 Kabat 번호매김 체계에 따른 P로 다시 돌연변이되었음을 의미하고; 그래프팅되었다 함은 마우스 항체 CDR이 인간 생식계열 FR 영역 서열로 그래프팅되었음을 의미함			

[0294]

[0295] 또한, D61S 돌연변이를 중쇄 가변 영역 h47VH3로 추가 도입하여 (즉 아미노산 돌연변이를 항체 HCDR2에 도입함으로써, 항체 HCDR2의 서열을, WINTYSGVPTYADDFKG(서열 번호 16)에서 WINTYSGVPTYASDFKG(서열 번호 38)로 변경하여), 우수한 항체 활성을 보유하는 중쇄 가변 영역 h47VH4를 획득하였다.

[0296] 인간화 마우스 항체 mAb47의 특이적 서열을 표 5에 보였다:

[0297] [표 5]

인간화 마우스 항체 mAb47의 가변 영역 서열	
가변 영역 번호	인간화 항체 mAb47의 가변 영역 서열
h47VH1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMSWVRQAPGQGLEWMGWIN TYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRGNYGRWD FDVWGQGTITVTVSS (서열 번호 39)
h47VH2	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMSWVRQAPGQGLKWMGWIN TYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRGNYGRWD FDVWGQGTITVTVSS (서열 번호 40)
h47VH3	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMSWVVKQAPGQGLKWMGWIN TYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRGNYGRWD FDVWGQGTITVTVSS (서열 번호 41)
h47VH4	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGMSWVVKQAPGQGLKWMGWIN TYSGVPTYASDEKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRGNYGRWDF DVWGQGTITVTVSS (서열 번호 42)
h47VL1	EIVLTQSPDFQSVPKPKVITCSVSSITSSSNLHWYQOKPDQSPKLLIKGTSNLS GVPSRFSGSGSDFTLTINSLEAEDAATYYCQQWSIYPLTFGQGTKLEIK (서열 번호 43)
h47VL2	EIVLTQSPDFQSVPKPKVITCSVSSITSSSNLHWYQOKPDQSPKPLIFGTSNLS GVPSRFSGSGSDYTLTINSLEAEDAATYYCQQWSIYPLTFGQGTKLEIK (서열 번호 44)
h47VL3	EIVLTQSPDFQSVPKPKVITCSVSSITSSSNLHWYQOKPDQSPKPHIYGTSNLS GVPSRFSGSGSDYTLTINSLEAEDAATYYCQQWSIYPLTFGQGTKLEIK (서열 번호 45)
h47VL4	EIVLTQSPDFQSVPKPKVITCSVSSITSSSNLHWYQOKPDQSPKPHIYGTSNLS GVPSRFSGSGSDSYTLTINSLEAEDAATYYCQQWSIYPLTFGQGTKLEIK (서열 번호 46)
주의: 본 표에서 (Kabat 번호매김 체계에 의해 확정된) CDR 영역에는 밑줄 표시되어 있으며, 돌연변이 부위는 굵은 이탤릭체로 표시됨	

[0298]

[0299] 2. 마우스 항체 mAb63의 인간화

[0300] 상동성이 큰 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자를 주형으로 선택하였는데; 예를 들어 마우스 항체 mAb63의 경우, IGKV1-39*01 및 IGKJ4*01를 인간화 경쇄 주형으로 선택하였고, IGHV1-46*01 및 IGHJ1*01을 인간화 중쇄 주형으로 선택하였다. 인간화를 도모하기 위해 마우스 항체 mAb63의 CDR을 대응하는 인간화 주형에 그래프팅하였으며, 마우스 항체 mAb63에 대한 인간화 역 돌연변이 디자인을 이하 표 6에 보였다:

[0301] [표 6]

마우스 항체 mAb63에 대한 인간화 디자인			
인간화 항체 mAb63의 경쇄 가변 영역		인간화 항체 mAb63의 중쇄 가변 영역	
h63VL1	(IGKV1-39*01+IGKJ4*01) 그래프팅	h63VH1	(IGHV1-46*01+IGHJ1*01) 그래프팅
h63VL2	(IGKV1-39*01+IGKJ4*01) 그래프팅+I2V, F71Y	h63VH2	(IGHV1-46*01+IGHJ1*01) 그래프팅+M69L, R71V, T73K
h63VL3	(IGKV1-39*01+IGKJ4*01) 그래프팅+I2V, K42G, P44V, F71Y	h63VH3	(IGHV1-46*01+IGHJ1*01) 그래프팅+M48I, V67A, M69L, R71V, T73K, L82F
		h63VH4	(IGHV1-46*01+IGHJ1*01) 그래프팅+M48I, R66K, V67A, M69L, R71V, T73K, L82F, S 82A R

주의: 본 표의 아미노산 위치는 Kabat 번호매김 체계를 이용하여 번호가 매겨진 것으로서; 예를 들어 S82AR은, 82A번 위치의 S가 Kabat 번호매김 체계에 따른 R로 다시 돌연변이되었음을 의미하고; 그래프팅되었다 함은 마우스 항체 CDR이 인간 생식계열 FR 영역 서열로 그래프팅되었음을 의미함

[0302]

[0303] 또한, N54S 돌연변이를 중쇄 가변 영역 h63VH1로 추가 도입하여 (즉 아미노산 돌연변이를 항체 HCDR2에 도입함으로써, 항체 HCDR2의 서열을, DIFPKNGNTDYNRKFKD(서열 번호 22)에서 DIFPKSGNTDYNRKFKD(서열 번호 47)로 변경하여), 우수한 항체 활성을 달성하였다.

[0304] 인간화 및 돌연변이된 마우스 항체 mAb63의 특이적 서열을 표 7에 보였다:

[0305] [표 7]

인간화 마우스 항체 mAb63의 가변 영역 서열	
가변 영역 번호	인간화 항체 mAb63의 가변 영역 서열
h63VH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEWMGDI F PKNGN T DYNRKFKDRVTMTRDTSSTVYME L SSLRSEDTAVYYCARSGYGN V FDYWGQGLTVSS (서열 번호 48)
h63VH2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEWMGDI F PKNGN T DYNRKFKDRV T L T VDKSTSTVYME L SSLRSEDTAVYYCARSGYGN V FDYWGQGLTVSS (서열 번호 49)
h63VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEW G DI F PKNGN T DYNRKFKDR A T L TVDKSTSTVYME F SSLRSEDTAVYYCARSGYGN V FDYWGQGLTVSS (서열 번호 50)
h63VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEW G DI F PKNGN T DYNRKFKD A T L TVDKSTSTVYME F SSLRSEDTAVYYCARSGYGN V FDYWGQGLTVSS (서열 번호 51)
h63VH5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEWMGDI F PK S GN T DYNRKFKDRVTMTRDTSSTVYME L SSLRSEDTAVYYCARSGYGN V FDYWGQGLTVSS (서열 번호 52)
h63VL1	DIQMTQSPSSLSASVGD R VTITCR T SQDINIYLNWYQKPGKAPK L LIY R SGLLSGVPS R FSGSGSDT F LT I SS L Q P EDFATY Y CQ Q GN L P P T F GGG T K V E I K (서열 번호 53)
h63V L2	DIQMTQSPSSLSASVGD R VTITCR T SQDINIYLNWYQKPGKAPK L LIY R SGLLSGVPS R FSGSGSDT F LT I SS L Q P EDFATY Y CQ Q GN L P P T F GGG T K V E I K (서열 번호 54)
h63VL3	DIQMTQSPSSLSASVGD R VTITCR T SQDINIYLNWYQKPG G A V K L LIY R SGLLSGVPS R FSGSGSDT F LT I SS L Q P EDFATY Y CQ Q GN L P P T F GGG T K V E I K (서열 번호 55)

주의: 본 표에서 (Kabat 번호매김 체계에 의해 확정된) CDR 영역에는 밑줄 표시되어 있으며, 돌연변이 부위는 굵은 이탤릭체로 표시됨

[0306]

[0307] 3. 마우스 항체 mAb67의 인간화

[0308] 상동성이 큰 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자를 주형으로 선택하였는데; 예를 들어 마우스 항체 mAb67의 경우, IGKV4-1*01 및 IGKJ4*01, IGKV3-15*01 및 IGKJ4*01, 또는 IGKV1-39*01 및 IGKJ4*01를 인간화 경쇄 주형으로 선택하였고, IGHV1-3*01 및 IGHJ1*01, 또는 IGHV5-51*01 및 IGHJ1*01을 인간화 중쇄 주형으로 선택하였다. 인간화를 도모하기 위해 마우스 항체 mAb67의 CDR을 대응하는 인간화 주형에 그래프팅하였으며, 마우스 항체 mAb67에 대한 인간화 역 돌연변이 디자인을 이하 표 8에 보였다:

[0309] [표 8]

마우스 항체 mAb67에 대한 인간화 디자인			
인간화 항체 mAb67의 경쇄 가변 영역		인간화 항체 mAb67의 중쇄 가변 영역	
h67VL1	(IGKV4-1*01+IGKJ4*01) 그래프팅	h67VH1	(IGHV1-3*01+IGHJ1*01) 그래프팅
h67VL2	(IGKV3-15*01+IGKJ4*01) 그래프팅	h67VH2	(IGHV5-51*01+IGHJ1*01) 그래프팅
h67VL3	(IGKV3-15*01+ IGKJ4*01) 그래프팅+A43P, I58V	h67VH3	(IGHV5-51*01+IGHJ1*01) 그래프팅+R38K, Q66K, A71V
h67VL4	(IGKV1-39*01+IGKJ4*01) 그래프팅		
h67VL5	(IGKV1-39*01+ IGKJ4*01) 그래프팅+Q3V, A43P		

주의: 본 표의 아미노산 위치는 Kabat 번호매김 체계를 이용하여 번호가 매겨진 것으로서; 예를 들어 A43P는, 43번 위치의 A가 Kabat 번호매김 체계에 따른 P로 다시 돌연변이되었음을 의미하고; 그래프팅되었다 함은 마우스 항체 CDR이 인간 생식계열 FR 영역 서열로 그래프팅되었음을 의미함

[0310]

[0311] 인간화 마우스 항체 mAb67의 특이적 서열을 표 9에 보였다:

[0312] [표 9]

인간화 마우스 항체 mAb67의 가변 영역 서열	
가변 영역 번호	인간화 항체 mAb67의 가변 영역 서열
h67VH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYHMNWVRQAPGQRLEWMGDIN PDIGGTSYNQNFKGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWDFDSFAN WGQGTLLTVSS (서열 번호 56)
h67VH2	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYHMNWVRQMPGKGLEWMGDIN PDIGGTSYNQNFKGRVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARWDFDSFAN WGQGTLLTVSS (서열 번호 57)
h67VH3	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYHMNWVRQMPGKGLEWMGDIN PDIGGTSYNQNFKGRVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARWDFDSFAN WGQGTLLTVSS (서열 번호 58)
h67VL1	DIQMTQSPDLSAVSLGERATINCRASESVSIIGTNIHWHYQKPGQPPKLLIYHAS NLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYCLQSRKIPYTFGGGTKVEIK (서열 번호 59)
h67VL2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSIIGTNIHWHYQKPGQAPRLLIYHASN LEIGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCLQSRKIPYTFGGGTKVEIK (서열 번호 60)
h67VL3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSIIGTNIHWHYQKPGQPPRLLIYHASN LEIGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCLQSRKIPYTFGGGTKVEIK (서열 번호 61)
h67VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVSIIGTNIHWHYQKPGKAPKLLIYHAS NLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQSRKIPYTFGGGTKVEIK (서열 번호 62)
h67VL5	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVSIIGTNIHWHYQKPGKPPKLLIYHAS NLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQSRKIPYTFGGGTKVEIK (서열 번호 63)
주의: 본 표에서 (Kabat 번호매김 체계에 의해 확정된) CDR 영역에는 밑줄 표시되어 있으며, 돌연변이 부위는 굵은 이탤릭체로 표시됨	

[0313]

[0314] 4. 마우스 항체 mAb103의 인간화

[0315] 상동성이 큰 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자를 주형으로 선택하였는데; 예를 들어 마우스 항체 mAb103의 경우, IGLV4-69*01 및 IGLJ2*01을 인간화 경쇄 주형으로 선택하였고, IGHV7-4-1*02 및 IGHJ1*01을 인간화 중쇄 주형으로 선택하였다. 인간화를 도모하기 위해 마우스 항체 mAb103의 CDR을 대응하는 인간화 주형에 그래프팅하였으며, 마우스 항체 mAb103에 대한 인간화 역 돌연변이 디자인을 이하 표 10에 보였다:

[0316] [표 10]

마우스 항체 mAb103에 대한 인간화 디자인			
인간화 항체 mAb103의 경쇄 가변 영역		인간화 항체 mAb67의 중쇄 가변 영역	
h103VL1	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) 그래프팅+ K49E	h103VH1	(IGHV7-4-1*02+ IGHJ1*01) 그래프팅
h103VL2	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) 그래프팅+H36Y, K49E	h103VH2	IGHV7-4-1*02+ IGHJ1*01) 그래프팅+R38K, E46K
h103VL3	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) 그래프팅+H36Y, L47V, K49E	h103VH3	(IGHV7-4-1*02+ IGHJ1*01) 그래프팅+V2I, R38K, E46K
h103VL4	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) 그래프팅+L4V, H36Y, L47V, K49E		
h103VL5	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) 그래프팅+H36Y, G43P, L47V, K49E, Y87I		
h103VL6	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) 그래프팅+L4V, H36Y, G43P, L47V, K49E, Y87I		
h103VL7	(IGLV4-69*01+ IGLJ2*01) 그래프팅+L4V, H36Y, G43P, L47V, K49E, E70D, Y87I		
주의: 본 표의 아미노산 위치는 Kabat 번호매김 체계를 이용하여 번호가 매겨진 것으로서; 예를 들어 K49E는, 49번 위치의 K가 Kabat 번호매김 체계에 따른 E로 다시 돌연변이되었음을 의미하고; 그래프팅되었다 함은 마우스 항체 CDR이 인간 생식계열 FR 영역 서열로 그래프팅되었음을 의미함			

[0317]

[0318]

또한, D61S 돌연변이를 중쇄 h103VH1로 추가 도입하고(즉 아미노산 돌연변이를 항체 HCDR2에 도입함으로써, 항체 HCDR2의 서열을, WINTYSGVPTYADDFKG(서열 번호 16)에서 WINTYSGVPTYASDFKG(서열 번호 38)로 변경하고), D56E 돌연변이를 경쇄 h103VL3로 도입하여(즉 아미노산 돌연변이를 항체 LCDR2에 도입함으로써, 항체 LCDR2의 서열을, LKKDGSHTGD(서열 번호 36)에서 LKKDGSHTGE (서열 번호 64)로 변경하여), 우수한 항체 활성을 달성하였다.

[0319]

인간화 마우스 항체 mAb103의 특이적 서열을 표 11에 보였다:

[0320] [표 11]

인간화 마우스 항체 mAb103의 가변 영역 서열	
가변 영역 번호	인간화 항체 mAb103의 가변 영역 서열
h103VH1	EVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYFTFTYGVIVWRQAPGQGLEWMGWJ NTYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARKKTLTIV TPWFAYWGQGLVTVSS (서열 번호 65)
h103VH2	EVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYFTFTYGVIVWRQAPGQGLAWMGWI NTYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARKKTLTIV TPWFAYWGQGLVTVSS (서열 번호 66)
h103VH3	EVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYFTFTYGVIVWRQAPGQGLAWMGWI NTYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARKKTLTIV PWFAYWGQGLVTVSS (서열 번호 67)
h103VH4	EVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYFTFTYGVIVWRQAPGQGLEWMGWJ NTYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARKKTLTIV TPWFAYWGQGLVTVSS (서열 번호 68)
h103VL1	ELVLTQSPASASLGLASVKLTCTLSSQHSYTIIEWHQQQPEKGPARYLMEIKKDG SHSTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEADYYCGVGNITKEQFVYVFGG GTKLTVL (서열 번호 69)
h103VL2	ELVLTQSPASASLGLASVKLTCTLSSQHSYTIIEWHQQQPEKGPARYLMEIKKDG SHSTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEADYYCGVGNITKEQFVYVFGG GTKLTVL (서열 번호 70)
h103VL3	ELVLTQSPASASLGLASVKLTCTLSSQHSYTIIEWHQQQPEKGPARYLMEIKKDG SHSTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEADYYCGVGNITKEQFVYVFGG GTKLTVL (서열 번호 71)
h103VL4	ELVLTQSPASASLGLASVKLTCTLSSQHSYTIIEWHQQQPEKGPARYLMEIKKDG SHSTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEADYYCGVGNITKEQFVYVFGG GGTKLTVL (서열 번호 72)
h103VL5	ELVLTQSPASASLGLASVKLTCTLSSQHSYTIIEWHQQQPEKGPARYLMEIKKDG SHSTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEADYYCGVGNITKEQFVYVFGG TKLTVL (서열 번호 73)
h103VL6	ELVLTQSPASASLGLASVKLTCTLSSQHSYTIIEWHQQQPEKGPARYLMEIKKDG SHSTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEADYYCGVGNITKEQFVYVFGG TKLTVL (서열 번호 74)
h103VL7	ELVLTQSPASASLGLASVKLTCTLSSQHSYTIIEWHQQQPEKGPARYLMEIKKDG SHSTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEADYYCGVGNITKEQFVYVFGG TKLTVL (서열 번호 75)
h103VL8	ELVLTQSPASASLGLASVKLTCTLSSQHSYTIIEWHQQQPEKGPARYLMEIKKDG SHSTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEADYYCGVGNITKEQFVYVFGG TKLTVL (서열 번호 76)
주의: 본 표에서 (Kabat 번호매김 체계에 의해 확정된) CDR 영역에는 밑줄 표시되어 있으며, 돌연변이 부위는 굵은 이탤릭체로 표시됨	

[0321]

[0322] 5. 인간화 항체의 제조

[0323]

항체의 경쇄 및 중쇄 발현 벡터를 각각 구성하였으며; 인간화 항체의 경쇄 및 중쇄를 대상으로 교차 쌍형성 조합(cross-pairing combination)을 수행하였는데, 293E 세포가 형질감염된 후 배양 상청액을 수집하여 정제함으로써 인간화 전장 항체를 수득하였다. 인간화 항체의 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 불변 영역 및 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택할 수 있었는데; 예시적으로 항체의 전장을 형성하기 위해 (서열 번호 77에 제시된 바와 같은) 인간 중쇄 IgG1 불변 영역을 전술한 인간화 중쇄 가변 영역에 연결하였다. 인간화 항체의 경쇄 불변 영역은 인간 κ 및 λ 사슬의 불변 영역 또는 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택할 수 있었는데; 예시적으로 항체의 전장을 형성하기 위해 (서열 번호 78에 제시된 바와 같은) 인간 경쇄 불변 영역 κ 사슬 또는 (서열 번호 79에 제시된 바와 같은) 인간 경쇄 불변 영역 λ 사슬을 연결하였다.

[0324]

예시적 항체의 불변 영역 서열은 이하와 같다:

[0325] 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHQ
KLSLSLSPGK (서열 번호 77)

[0326]

[0327] 인간 경쇄 불변 영역 κ 사슬:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (서열 번호 78)

[0328]

[0329] 인간 경쇄 불변 영역 λ 사슬:

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA
GVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
(서열 번호 79)

[0330]

[0331] 예시적으로, 표 5에 보인 바와 같은 mAb47 유래 인간화 항체의 상기 언급한 중쇄 가변 영역을, 서열 번호 77에 제시된 서열을 가지는 인간 중쇄 IgG1 불변 영역의 아미노 말단에 연결시켜, 항체의 전장 중쇄를 형성하고, 표 5에 보인 바와 같은 인간화 항체의 경쇄 가변 영역을, 서열 번호 78에 제시된 서열을 가지는 인간 경쇄 κ 불변 영역의 아미노 말단에 연결시켜 항체의 전장 경쇄를 형성하여, 이하 표 12에 보인 mAb47의 다양한 인간화 항체를 획득하였다:

[0332]

[표 12]

mAb47의 인간화 항체				
VH \ VL	h47VH1	h47VH2	h47VH3	h47VH4
h47VL1	Hu47-1	Hu47-5	Hu47-9	Hu47-13
h47VL2	Hu47-2	Hu47-6	Hu47-10	Hu47-14
h47VL3	Hu47-3	Hu47-7	Hu47-11	Hu47-15
h47VL4	Hu47-4	Hu47-8	Hu47-12	Hu47-16

주의: 본 표에서, 예를 들어 "Hu47-14"라 함은, Hu47-14라 번호가 매겨진 인간화 항체의 경쇄 가변 영역은 h47VL2이고, 중쇄 가변 영역은 h47VH4임을 나타내고; 중쇄 불변 영역 서열은 서열 번호 77에 제시되어 있으며, 경쇄 불변 영역 서열은 서열 번호 78에 제시되어 있음

[0333]

[0334] 예시적으로, 표 7에 보인 바와 같은 mAb63 유래 인간화 항체의 상기 언급한 중쇄 가변 영역을, 서열 번호 77에 제시된 서열을 가지는 인간 중쇄 IgG1 불변 영역의 아미노 말단에 연결시켜, 항체의 전장 중쇄를 형성하고, 표 7에 보인 바와 같은 인간화 항체의 경쇄 가변 영역을, 서열 번호 78에 제시된 서열을 가지는 인간 경쇄 κ 불변 영역의 아미노 말단에 연결시켜 항체의 전장 경쇄를 형성하여, 이하 표 13에 보인 mAb63의 다양한 인간화 항체를 획득하였다:

[0335] [표 13]

mAb63의 인간화 항체					
VH \ VL	h63VH1	h63VH2	h63VH3	h63VH4	h63VH5
	h63VL1	Hu63-1	Hu63-4	Hu63-7	Hu63-10
h63VL2	Hu63-2	Hu63-5	Hu63-8	Hu63-11	Hu63-14
h63VL3	Hu63-3	Hu63-6	Hu63-9	Hu63-12	Hu63-15

주의: 본 표에서, 예를 들어 "Hu63-13"이라 함은, Hu63-130이라 번호가 매겨진 인간화 항체의 경쇄 가변 영역은 h63VL1이고, 중쇄 가변 영역은 h63VH5임을 나타내고; 중쇄 불변 영역 서열은 서열 번호 77에 제시되어 있으며, 경쇄 불변 영역 서열은 서열 번호 78에 제시되어 있음

[0336]

[0337]

예시적으로, 표 9에 보인 바와 같은 mAb67 유래 인간화 항체의 상기 언급한 중쇄 가변 영역을, 서열 번호 77에 제시된 서열을 가지는 인간 중쇄 IgG1 불변 영역의 아미노 말단에 연결시켜, 항체의 전장 중쇄를 형성하고, 표 9에 보인 바와 같은 인간화 항체의 경쇄 가변 영역을, 서열 번호 78에 제시된 서열을 가지는 인간 경쇄 κ 불변 영역의 아미노 말단에 연결시켜 항체의 전장 경쇄를 형성하여, 이하 표 14에 보인 mAb67의 다양한 인간화 항체를 획득하였다:

[0338]

[표 14]

mAb67의 인간화 항체			
VH \ VL	h67VH1	h67VH2	h67VH3
	h67VL1	Hu67-1	Hu67-6
h67VL2	Hu67-2	Hu67-7	Hu67-12
h67VL3	Hu67-3	Hu67-8	Hu67-13
h67VL4	Hu67-4	Hu67-9	Hu67-14
h67VL5	Hu67-5	Hu67-10	Hu67-15

주의: 본 표에서, 예를 들어 "Hu67-14"라 함은, Hu67-14라 번호가 매겨진 인간화 항체의 경쇄 가변 영역은 h67VL4이고, 중쇄 가변 영역은 h67VH3임을 나타내고; 중쇄 불변 영역 서열은 서열 번호 77에 제시되어 있으며, 경쇄 불변 영역 서열은 서열 번호 78에 제시되어 있음

[0339]

[0340]

예시적으로, 표 11에 보인 바와 같은 mAb103 유래 인간화 항체의 상기 언급한 중쇄 가변 영역을, 서열 번호 77에 제시된 서열을 가지는 인간 중쇄 IgG1 불변 영역의 아미노 말단에 연결시켜, 항체의 전장 중쇄를 형성하고, 표 11에 보인 바와 같은 인간화 항체의 경쇄 가변 영역을, 서열 번호 79에 제시된 서열을 가지는 인간 경쇄 λ 불변 영역의 아미노 말단에 연결시켜 항체의 전장 경쇄를 형성하여, 이하 표 15에 보인 mAb103의 다양한 인간화 항체를 획득하였다:

[0341] [표 15]

mAb103의 인간화 항체				
VH \ VL	h103VH1	h103VH2	h103VH3	h103VH4
h103VL1	Hu103-1	Hu103-9	Hu103-17	Hu103-25
h103VL2	Hu103-2	Hu103-10	Hu103-18	Hu103-26
h103VL3	Hu103-3	Hu103-11	Hu103-19	Hu103-27
h103VL4	Hu103-4	Hu103-12	Hu103-20	Hu103-28
h103VL5	Hu103-5	Hu103-13	Hu103-21	Hu103-29
h103VL6	Hu103-6	Hu103-14	Hu103-22	Hu103-30
h103VL7	Hu103-7	Hu103-15	Hu103-23	Hu103-31
h103VL8	Hu103-8	Hu103-16	Hu103-24	Hu103-32

주의: 본 표에서, 예를 들어 "Hu103-32"라 함은, Hu103-32라 번호가 매겨진 인간화 항체의 경쇄 가변 영역은 h103VL8이고, 중쇄 가변 영역은 h103VH4임을 나타내고; 중쇄 불변 영역 서열은 서열 번호 77에 제시되어 있으며, 경쇄 불변 영역 서열은 서열 번호 79에 제시되어 있음

[0342]

[0343] 예시적으로, 인간화 항체의 경쇄/중쇄 전장 서열을 이하 표 16에 보였다:

[0344] [표 16]

인간화 항체의 경쇄 및 중쇄 서열		
항체 번호	중쇄 서열	경쇄 서열
Hu63-13	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDF YMNWVVRQAPGQGLEWMGDIFPKSGNTDYNR KFKDRVTMTRDTSSTSTVYMESSLRSEDVAVY YCARSGYGNVYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTYSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKLSLSPGK 서열 번호 80	DIQMTQSPSSLSASVGDRTV TCRTSQDINIYLNWYQQKPG KAPKLLIYYRSGLLSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQGNTLPPTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCCLNNFYPREA VQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKSDSTYLSLSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC 서열 번호 81
Hu47-14	EVQLVQSGSELKPKPGASVKVSCKASGYTFTTY GMSWVKQAPGQGLKWMGWINTYSGVPTYAS DFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARRGNYGRWDFDVGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTYSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK LSLSPGK 서열 번호 82	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTI TCSVSSSTISSNLHWYQQK DQSPKPLIYGTSNLSAGVPS RFGSGSGTDYTLTINSLEAE DAATYYCQQWSIYPLTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPSD EQKSGTASVVCCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKSDSTYLSLSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV KSFNRGEC 서열 번호 83
Hu67-14	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYH MNVWVKQMPGKGLEWMGDINPDIGGTSYNQNF KKGKVTISVDKISSTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RWFDFSFANWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTYSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSL SPGK 서열 번호 84	DIQMTQSPSSLSASVGDRTV TCRAESVSHIGTNLHWYQ QKPGKAPKLLIYHASNLETG VPSRFSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQSRKIPYTF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PSDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSDSTYLSLSTL KADYERHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC 서열 번호 85
Hu103-32	EVQLVQSGSELKPKPGASVKVSCKASGYTFTTY GVIWVVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYASD FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA RKKTLTTPWFAFWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTYSWNS	ELVLTQSPSASASLGASVKL TCLSSQHSYTIIEWYQQP EKGPVYVMEKDKDGHSTG EGIPDRFSGSSGAERYLTISS LQSEDEADYYCGVGNITKE

[0345]

	GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK LSLSPGK 서열 번호 86	QFVYVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKAL VCLISDFYPGAVTVAWKADGS PVKAGVETTKPSKQSNKYYAA SSVLSLTPEQWKSRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS 서열 번호 87
주의: 본 표에서, 이탤릭체는 불변 영역 서열을 나타내고, 비로선 문자는 가변 영역 서열을 나타냄		

[0346]

[0347]

현재 공지된 CEA 표적 ADC 분자 2개는 항체의 경쇄 및 중쇄 서열이 이하와 같은, SAR-408701 및 라베투주맙 고 비테칸(Lmab-CL2A-SN38이라고도 지칭됨)이다:

[0348] SAR-408701(Sanofi)중 항체의 중쇄 서열:
 EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSYDMSWVRQTPERGLEWVAYI
 SSGGGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNLSLSEDTAVYYCAAHYFGSSG
 PFAYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
 KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK **서열 번호 88**

[0349]
 [0350] SAR-408701(간단히 Sanofi)중 항체의 경쇄 서열:
 DIQMTQSPASLSASVGDRTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTR
 TLAEGVPSRFSGSGTDFSLTISSLPEDFATYYCQHHYGTPTFGSGTKLEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYAPREKQVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
서열 번호 89

[0351]
 [0352] Lmab-CL2A-SN38(간단히 Lmab)중 항체 라베투주맙의 중쇄 서열:
 EVQLVESGGGVVQPGRLRLSCSASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWIG
 EIHPDSSSTINYAPSLKDRFTISRDNKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCASLYFGFP
 WFAYWGGQTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK **서열 번호 90**

[0353]
 [0354] Lmab-CL2A-SN38(Lmab)중 라베투주맙의 경쇄 서열
 DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWT
 STRHTGVPSRFSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQYSLYRSFGQGTKVEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYAPREKQVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
서열 번호 91

[0355]
 [0356] 상기 항체는 종래의 유전자 클로닝 방법 및 재조합체 발현 방법을 사용하여 클로닝, 발현 및 정제하였다.

[0357] **실시예 4: 화합물의 제조**

[0358] 일반적으로 종래의 조건, 또는 출발 재료 또는 시판 제품의 제작자(제조사)에 의해 권장되는 조건에 따르고 본 발명의 실시예에 명시된 조건이 적용되지 않는 실험 절차를 수행하였다. 특별한 공급원이 명시되지 않은 시약은 상업상 이용 가능한 종래의 시약이다.

[0359] 핵자기공명(NMR) 또는 질량분광도법(MS)에 의해 화합물 구조를 확정하였다. Bruker AVANCE-400 핵자기공명장치를 사용하여 NMR 스펙트럼을 측정하였는데, 이 때 중수소 함유 설폭시화디메틸(DMSO-d6), 중수소 함유 클로로포름(CDC13) 및 중수소 함유 메탄올(CD3OD)을 용매로 사용하였고, 테트라메틸실란(TMS)은 내부 표준으로 사용하였다. 화학 이동은 10⁻⁶(ppm) 단위로 제시하였다.

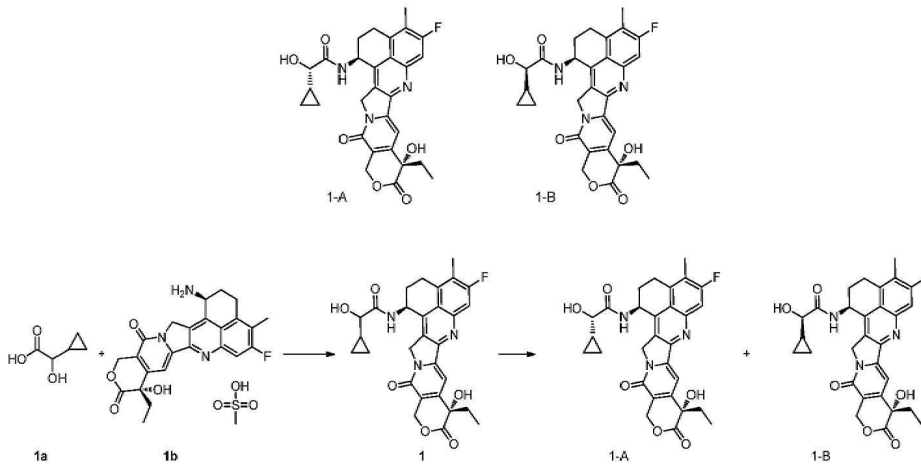
[0360] FINNIGAN LCQAd(ESI) 질량 분광계(제조사: Thermo, 모델명: Finnigan LCQ 어드밴티지 MAX)를 사용하여 MS 분석을 수행하였다.

[0361] Waters Acquity UPLC SQD 액체크로마토그래피-질량분광시스템을 사용하여 UPLC 분석을 수행하였다.

[0362] Agilent 1200DAD 고압 액체크로마토그래피(Sunfire C18 150 x 4.6 mm 크로마토그래피 컬럼) 및 Waters 2695-2996 고압 액체크로마토그래피(Gimini C18 150 x 4.6 mm 크로마토그래피 컬럼)를 사용하여 HPLC 분석을 수행하

였다.

- [0363] Thermo nanodrop2000 자외선 분광광도계를 사용하여 UV-HPLC 분석을 수행하였다.
- [0364] PHERA starFS 미세평판 판독기(BMG, Germany)를 사용하여 증식 억제율 및 IC₅₀값을 측정하였다.
- [0365] 0.15 mm 내지 0.2 mm 사양의 Qingdao GF254 실리카 겔 평판 또는 Huanghai HSGF254는 박층 크로마토그래피 (TLC) 분석용으로 채택하였고, TLC 분리 및 정제용으로는 0.4 mm 내지 0.5 mm 사양의 평판을 채택하였다.
- [0366] 200 메쉬 내지 300 메쉬의 Yantai Yellow Sea 실리카 겔은, 일반적으로 컬럼 크로마토그래피에서 담체로 사용하였다.
- [0367] 본 발명의 공지된 출발 재료는 당 분야에 공지된 방법에 따르거나 사용하여 합성할 수 있었거나, 또는 ABCR GmbH & Co.KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc. 및 Chembee Chemicals 등으로부터 구입할 수 있었다.
- [0368] 실시예에서, 반응은 달리 진술되지 않는 한 아르곤 대기 또는 질소 대기에서 수행하였다.
- [0369] 아르곤 대기 또는 질소 대기에서 수행하였다 함은, 반응 플라스크를 아르곤 또는 질소 약 1 L를 함유하는 풍선에 연결하였음을 의미한다.
- [0370] 수소 대기에서 수행하였다 함은, 반응 플라스크를 수소 약 1 L를 함유하는 풍선에 연결하였음을 의미한다.
- [0371] Parr 3916EKK 수소화 장치, Qinglan QL-500 수소화 장치 또는 HC2-SS 수소화 장치는 가압 수소화 반응을 위해 사용하였다.
- [0372] 수소화 반응은, 보통 진공화(vacuumization) 및 수소 퍼징(hydrogen purging)으로 이루어진 주기 3회를 포함하였다.
- [0373] CEM Discover-S 908860 극초단파 반응기는, 극초단파 반응을 위해 사용하였다.
- [0374] 실시예에서 반응중 용액은 달리 진술되지 않는 한 수용액을 지칭한다.
- [0375] 실시예에서 반응 온도는 달리 진술되지 않는 한 실온이다.
- [0376] 실온은 20℃ ~ 30℃ 범위의 최적 반응 온도이다.
- [0377] 실시예중 PBS 완충제(pH 6.5)의 제조: KH₂PO₄ 8.5 g, K₂HPO₄·3H₂O 8.56 g, NaCl 5.85 g 및 EDTA 1.5 g을 플라스크에 첨가하여, 부피를 2 L로 만들었다. 첨가물 모두를 초음파로 용해하였으며, 용액은 진탕시켜 잘 혼합함으로써 원하는 완충제를 만들었다.
- [0378] 화합물 정제에 사용된 컬럼 크로마토그래피용 용리 시스템 및 박층 크로마토그래피용 전개 용매 시스템은 이하의 성분들, 즉 A: 디클로로메탄 및 이소프로판올 시스템, B: 디클로로메탄 및 메탄올 시스템, 및 C: 석유 에테르 및 아세트산에틸 시스템을 포함하였다. 화합물의 극성에 따라서, 또는 트리에틸아민과, 산성 또는 염기성 시약 소량을 첨가하여 용매의 부피비를 조정하였다.
- [0379] 본 발명의 화합물들 몇 가지는 Q-TOF LC/MS에 의해 특성구명하였다. Q-TOF LC/MS 분석에서는 Agilent 6530 정밀-질량 사중극자 비행 시간(time-of-flight) 질량분광계 및 Agilent 1290-Infinity 초고성능 액체크로마토그래피(Agilent Poroshell 300SB-C8 5 μm, 2.1 mm x 75 mm 크로마토그래피 컬럼)를 사용하였다.
- [0380] 본 발명의 항체 약물 접합체의 Y-D 약물 부분은 PCT/CN2019/107873에서 찾아볼 수 있고, 유관 화합물의 합성 및 시험은 본원에 참고로 인용되어 있다. 합성의 비제한적 예는 이하와 같이 참고로 인용되어 있다:
- [0381] 1. 본 발명의 독소 약물 합성
- [0382] (S)-2-사이클로프로필-N-((1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)-2-하이드록시아세트아미드 1-A
- [0383] (R)-2-사이클로프로필-N-((1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)-2-하이드록시아세트아미드 1-B



[0384]

[0385] 1b(4 mg, 7.53 μ mol)에, 에탄올 2 mL 및 *N,N*-디메틸포름아미드 0.4 mL를 첨가하였다. 시스템을 아르곤으로 3회 퍼징하였으며, 혼합물을 얼음수조에서 0°C 내지 5°C로 냉각한 다음, *N*-메틸모폴린 0.3 mL를 적가하였다. 반응 혼합물을 투명해질 때까지 교반하였다. 이 반응 혼합물에 2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트산 1a(2.3 mg, 19.8 μ mol, 특허출원 "W02013106717"에 개시된 바와 같이 제조), 1-하이드록시벤조트리아졸(3 mg, 22.4 μ mol) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(4.3 mg, 22.4 μ mol)를 순차적으로 첨가하였다. 첨가 후, 반응 혼합물을 0°C 내지 5°C에서 1시간 동안 교반하였다. 얼음수조를 제거하고 나서, 반응 혼합물을 30°C로 가열한 후, 2시간 동안 교반한 다음, 감압하에서 농축하였다. 생성된 미정제 화합물 1을 고성능 액체크로마토그래피(분리 조건: 크로마토그래피 컬럼: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19 mm x 250 mm; 이동상: A-물(NH₄Oac 10 mmol), B-아세트오니트릴, 구배 용리, 유량: 18 mL/분)로 정제하였으며, 대응하는 분획들을 수집하고 나서, 감압하에서 농축한 결과, 표제 생성물(1-A: 1.5 mg, 1-B: 1.5 mg)을 수득하였다.

[0386]

MS m/z(ESI): 534.0 [M+1].

[0387]

단일 입체배열 화합물 1-B(체류 시간이 더 짧음)

[0388]

UPLC 분석: 체류 시간: 1.06분; 순도: 88%(크로마토그래피 컬럼: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μ m 2.1 mm x 50 mm; 이동상: A-물(NH₄Oac 5 mmol), B-아세트오니트릴).

[0389]

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.37(d, 1H), 7.76(d, 1H), 7.30(s, 1H), 6.51(s, 1H), 5.58-5.56(m, 1H), 5.48(d, 1H), 5.41(s, 2H), 5.32-5.29(m, 2H), 3.60(t, 1H), 3.19-3.13(m, 1H), 2.38(s, 3H), 2.20-2.14(m, 1H), 1.98(q, 2H), 1.87-1.83(m, 1H), 1.50-1.40(m, 1H), 1.34-1.28(m, 1H), 0.86(t, 3H), 0.50-0.39(m, 4H).

[0390]

단일 입체배열 화합물 1-A(체류 시간이 더 김)

[0391]

UPLC 분석: 체류 시간: 1.10분; 순도: 86%(크로마토그래피 컬럼: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μ m 2.1 mm x 50 mm; 이동상: A-물(NH₄Oac 5 mmol), B-아세트오니트릴).

[0392]

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.35(d, 1H), 7.78(d, 1H), 7.31(s, 1H), 6.52(s, 1H), 5.58-5.53(m, 1H), 5.42(s, 2H), 5.37(d, 1H), 5.32(t, 1H), 3.62(t, 1H), 3.20-3.15(m, 2H), 2.40(s, 3H), 2.25-2.16(m, 1H), 1.98(q, 2H), 1.87-1.82(m, 1H), 1.50-1.40(m, 1H), 1.21-1.14(m, 1H), 0.87(t, 3H), 0.47-0.35(m, 4H).

[0393]

2. 본 발명의 링커 독소 약물 합성

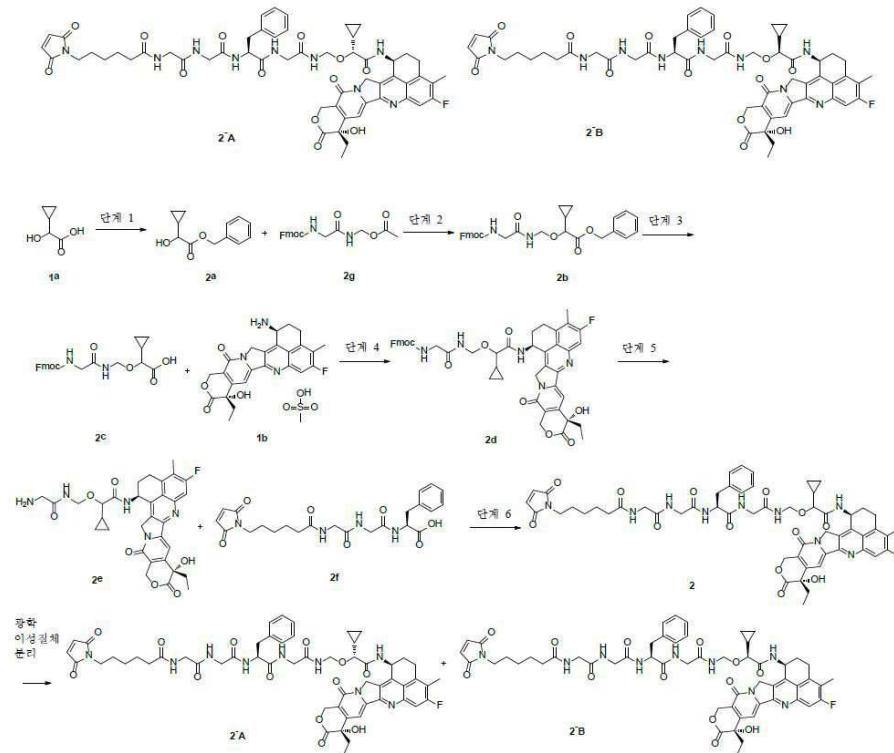
[0394]

N-((2*R*,10*S*)-10-벤질-2-사이클로프로필-1-(((1*S*,9*S*)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1*H*,12*H*-벤조[*de*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-1-일)아미노)-1,6,9,12,15-헥사옥소-3-옥사-5,8,11,14-테트라아자헥사데칸-16-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드 2-A

[0395]

N-((2*S*,10*S*)-10-벤질-2-사이클로프로필-1-(((1*S*,9*S*)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1*H*,12*H*-벤조[*de*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-1-일)아미노)-

1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥사-5,8,11,14-테트라아자헥사데칸-16-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드 2-B



[0396]

[0397]

단계 1: 벤질 2-사이클로프로필-2-하이드록시아세테이트 2a

[0398]

1a(1.3 g, 11.2 mmol; 특허출원 "W02013/106717"에 개시된 바와 같이 제조함)를 아세트니트릴 50 mL에 용해한 다음, 여기에 탄산칼륨(6.18 g, 44.8 mmol), 브롬화벤질(1.33 mL, 11.2 mmol) 및 요오드화테트라부틸암모늄(413 mg, 1.1 mmol)을 순차적으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 48시간 동안 교반한 다음, 셀라이트로 여과하였으며, 필터 케이크를 아세트산에틸(10 mL)로 행구었다. 여과물을 합하고 나서, 감압하에 농축하였으며, 이로부터 생성된 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제한 결과(전개 용매 시스템 C), 표제 생성물 2a(2 g, 수율 86.9%)를 수득하였다.

[0399]

단계 2: 벤질 10-사이클로프로필-1-(9*H*-플루오렌-9-일)-3,6-디옥소-2,9-디옥사-4,7-디아자운데칸-11-오에이트 2b

[0400]

2a(120.9 mg, 0.586 mmol) 및 2g(180 mg, 0.489 mmol, 특허출원 "CN105829346A"에 개시된 바와 같이 제조)를 반응 플라스크에 첨가한 다음, 여기에 테트라하이드로푸란 4 mL를 첨가하였다. 시스템을 아르곤으로 3회 퍼징한 다음, 반응 혼합물을 얼음수조에서 0°C 내지 5°C로 냉각한 다음, *tert*-부톡시화칼륨(109 mg, 0.98 mmol)을 첨가하였다. 얼음조를 제거한 다음, 반응 혼합물을 실온으로 승온시키고 나서, 40분 동안 교반한 후, 여기에 얼음물 10 mL를 첨가한 다음, 아세트산에틸(20 mL x 2) 및 클로로포름(10 mL x 5)으로 추출하였다. 유기상들을 합한 다음, 농축하였다. 이로부터 생성된 잔류물을 디옥산 4 mL 및 물 2 mL에 용해한 후, 여기에 중탄산나트륨(49.2 mg, 0.586 mmol) 및 클로로포름산9-플루오레닐메틸(126 mg, 0.49 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 물 20 mL를 첨가한 다음, 아세트산에틸로 추출하였다(10 mL x 3). 유기상을 염화나트륨 포화 용액(20 mL)으로 세척한 후, 무수 황산나트륨상에서 건조한 다음, 여과하였다. 여과물을 감압하에 농축하였다. 이로부터 생성된 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제한 결과(전개 용매 시스템 C), 표제 생성물 2b(48 mg, 수율 19%)를 수득하였다.

[0401]

MS m/z(ESI): 515.0 [M+1].

[0402]

단계 3: 10-사이클로프로필-1-(9*H*-플루오렌-9-일)-3,6-디옥소-2,9-디옥사-4,7-디아자운데칸-11-온산 2c

[0403]

2b(20 mg, 0.038 mmol)를, 테트라하이드로푸란 및 아세트산에틸의 용매 혼합물(V:V = 2:1) 4.5 mL에 용해하고 나서, 탄소상 팔라듐(12 mg, 담지율 10%, 건조 중량 기반)을 첨가하였다. 시스템을 수소로 3회 퍼징하였으며, 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트로 여과하고 나서, 필터 케이크를 아세

트산에틸로 행구었다. 여과물을 농축한 결과, 미정제 표제 생성물 **2c**(13 mg)가 수득되었는데, 이는 정제를 거치지 않고 다음 단계에 바로 사용하였다.

- [0404] MS m/z(ESI): 424.9 [M+1].
- [0405] 단계 4: (9*H*-플로오렌-9-일)메틸(2-(((1-사이클로프로필-2-(((1*S*,9*S*)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1*H*,12*H*-벤조[*de*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-1-일)아미노)-2-옥소에톡시)메틸)아미노)-2-옥소에틸)카바메이트 **2d**
- [0406] **1b**(10 mg, 18.8 μmol)를 반응 플라스크에 첨가한 다음, 여기에 *N,N*-디메틸포름아미드 1 mL를 첨가하였다. 시스템을 아르곤으로 3회 퍼징하였으며, 혼합물을 얼음수조에서 0°C 내지 5°C로 냉각한 다음, 여기에 트리에틸아민, 미정제 **5c**(13 mg, 30.6 μmol), 및 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모폴리늄 클로라이드(16.9 mg, 61.2 μmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 얼음수조에서 40분 동안 교반하였다. 여기에 물 10 mL를 첨가한 다음, 아세트산에틸로 추출하였다(10 mL x 3). 유기상들을 합한 다음, 염화나트륨 포화 용액으로 세척한 후(10 mL x 2), 무수황산나트륨상에서 건조하여 여과하였다. 여과물을 감압하에 농축하였다. 이로부터 생성된 잔류물을 박층 크로마토그래피로 정제한 결과(전개 용매 시스템 B), 표제 생성물 **2d**(19 mg, 수율 73.6%)를 수득하였다.
- [0407] MS m/z(ESI): 842.1 [M+1].
- [0408] 단계 5: 2-((2-아미노아세트아미드)메톡시)-2-사이클로프로필-*N*-(((1*S*,9*S*)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1*H*,12*H*-벤조[*de*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-1-일)아세트아미드 **2e**
- [0409] **2d**(19 mg, 22.6 μmol)를 디클로로메탄 2 mL에 용해한 다음, 여기에 디에틸아민 1 mL를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 다음, 감압하에 농축하였다. 여기에 톨루엔 1 mL를 첨가하고 나서, 감압하에 농축하였는데; 이 과정을 2회 반복하였다. 잔류물을 *n*-헥산 3 mL와 함께 슬러리화하고 나서, 방치하여 두었다. 그 다음, 상청액을 제거하고 나서, 고체를 방치하여 두었다. 고체 잔류물을 감압하에 농축한 후, 오일 펌프를 사용하여 건조한 결과, 미정제 표제 생성물 **2e**(17 mg)을 수득하였는데, 이는 정제 과정을 거치지 않고 다음 단계에 바로 사용하였다.
- [0410] MS m/z(ESI): 638.0 [M+18].
- [0411] 단계 6: *N*-((2*R*,10*S*)-10-벤질-2-사이클로프로필-1-(((1*S*,9*S*)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1*H*,12*H*-벤조[*de*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-1-일)아미노)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥사-5,8,11,14-테트라아자헥사데칸-16-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드 **2-A**
- [0412] *N*-((2*S*,10*S*)-10-벤질-2-사이클로프로필-1-(((1*S*,9*S*)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1*H*,12*H*-벤조[*de*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-1-일)아미노)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥사-5,8,11,14-테트라아자헥사데칸-16-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드 **2-B**
- [0413] 미정제 **2e**(13.9 mg, 22.4 μmol)를 *N,N*-디메틸포름아미드 0.6 mL에 용해하였다. 시스템을 아르곤으로 3회 퍼징하였으며, 용액을 얼음수조에서 0°C 내지 5°C로 냉각하였다. 여기에 *N,N*-디메틸포름아미드 0.3 mL중 **2f**(21.2 mg, 44.8 μmol, 특허출원 "EP2907824"에 개시된 바와 같이 제조) 용액을 첨가한 다음, 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모폴리늄 클로라이드(18.5 mg, 67.3 μmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 얼음수조에서 10분 동안 교반하였다. 그 다음, 얼음조를 제거하고 나서, 반응 혼합물을 실온으로 승온한 다음, 1시간 동안 교반한 결과, 화합물 **2**를 수득하였다. 반응 혼합물을 고성능 액체크로마토그래피에 의해 정제하였다(분리 조건: 크로마토그래피 컬럼: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19 x 250 mm; 이동상: A-물(NH₄OAc 10 mmol), B-아세트오니트릴, 구배 용리, 유량: 18 mL/분). 대응하는 분획들을 수집한 다음, 감압하에 농축한 결과, 표제 생성물들(**2-A**: 2.4 mg, **2-B**: 1.7 mg)을 수득하였다.
- [0414] MS m/z(ESI): 1074.4 [M+1].
- [0415] 단일 입체배열 화합물 **2-A**(체류 시간이 더 짧음):
- [0416] UPLC 분석: 체류 시간: 1.14분; 순도: 85%(크로마토그래피 컬럼: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μm 2.1 x 50 mm; 이동상: A-물(NH₄OAc 5 mmol), B-아세트오니트릴).

[0417] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.60(t, 1H), 8.51-8.49(d, 1H), 8.32-8.24(m, 1H), 8.13-8.02(m, 2H), 8.02-7.96(m, 1H), 7.82-7.75(m, 1H), 7.31(s, 1H), 7.26-7.15(m, 4H), 6.99(s, 1H), 6.55-6.48(m, 1H), 5.65-5.54(m, 1H), 5.41(s, 2H), 5.35-5.15(m, 3H), 4.74-4.62(m, 1H), 4.54-4.40(m, 2H), 3.76-3.64(m, 4H), 3.62-3.48(m, 2H), 3.20-3.07(m, 2H), 3.04-2.94(m, 1H), 2.80-2.62(m, 12H), 2.45-2.30(m, 3H), 2.25-2.15(m, 2H), 2.15-2.04(m, 2H), 1.93-1.78(m, 2H), 1.52-1.39(m, 3H), 1.34-1.12(m, 5H), 0.87(t, 3H), 0.64-0.38(m, 4H).

[0418] 단일 입체배열 화합물 2-B(체류 시간이 더 김):

[0419] UPLC 분석: 체류 시간: 1.16분; 순도: 89%(크로마토그래피 컬럼: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μm 2.1 x 50 mm; 이동상: A-물(NH_4OAc 5 mmol), B-아세트니트릴).

[0420] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.68-8.60(m, 1H), 8.58-8.50(m, 1H), 8.32-8.24(m, 1H), 8.13-8.02(m, 2H), 8.02-7.94(m, 1H), 7.82-7.75(m, 1H), 7.31(s, 1H), 7.26-7.13(m, 3H), 6.99(s, 1H), 6.55-6.48(m, 1H), 5.60-5.50(m, 1H), 5.41(s, 2H), 5.35-5.15(m, 2H), 4.78-4.68(m, 1H), 4.60-4.40(m, 2H), 3.76-3.58(m, 4H), 3.58-3.48(m, 1H), 3.20-3.10(m, 2H), 3.08-2.97(m, 2H), 2.80-2.72(m, 2H), 2.45-2.30(m, 3H), 2.25-2.13(m, 2H), 2.13-2.04(m, 2H), 2.03-1.94(m, 2H), 1.91-1.78(m, 2H), 1.52-1.39(m, 3H), 1.34-1.12(m, 4H), 0.91-0.79(m, 3H), 0.53-0.34(m, 4H).

[0421] 실시예 5: 항체 약물 접합체(ADC)의 제조

[0422] ADC 모액(stock solution)의 약물 담지 분석

[0423] 실험의 목적과 원리

[0424] ADC 모액은 항체 가교 약물이고, 대상 질환을 치료하는 기작은 항체의 표적화 성능에 따라 독소 분자를 세포에 운반하여, 세포를 사멸시키는 것이다. 약물 담지는 약물 효능에 결정적인 역할을 한다. ADC 모액중 약물 담지는 UV 방법을 사용하여 확인하였다.

[0425] 실험 절차

[0426] 숙신산나트륨 완충제가 담긴 큐벳을 참조기준 셀과 시료 셀에 넣은 다음, 용매 블랭크의 흡광도를 공제하였다. 그 다음, 시험 용액이 담긴 큐벳을 시료 셀에 넣은 후, 280 nm 및 370 nm에서의 흡광도를 확인하였다.

[0427] 결과에 대한 추산: ADC 모액의 담지 용량을, 임의의 과정에서 ADC 모액의 총 흡광도는 해당 과정에서 약물 및 모노클로날 항체의 흡광도 값의 합이라는 원리, 즉

[0428] (1) $A_{280\text{nm}} = \epsilon_{\text{mab-280}}bC_{\text{mab}} + \epsilon_{\text{약물-280}}bC_{\text{약물}}$

[0429] [식 중,

[0430] $\epsilon_{\text{약물-280}}$ 은 280 nm에서의 평균 몰 소광 계수(5,100)이고;

[0431] $C_{\text{약물}}$ 은 약물의 농도이며;

[0432] $\epsilon_{\text{mab-280}}$ 는 280 nm에서의 모노클로날 항체 모액의 평균 몰 소광 계수(214,600)이고;

[0433] C_{mab} 은 모노클로날 항체 모액의 농도이며;

[0434] b는 광학 통로(1 cm)임]

[0435] 에 입각하여 자외선 분광광도법으로 확인하였다(사용 장치: Thermo nanodrop2000 자외선 분광광도계).

[0436] 마찬가지로, 370 nm에서의 시료의 총 흡광도에 대한 등식은 이하와 같이 주어질 수 있다:

[0437] (2) $A_{370\text{nm}} = \epsilon_{\text{mab-370}}bC_{\text{mab}} + \epsilon_{\text{약물-370}}bC_{\text{약물}}$

[0438] [식 중,

[0439] $\epsilon_{\text{약물-370}}$ 은 370 nm에서의 약물의 평균 몰 소광 계수(19,000)이고;

- [0440] C_{약물}은 약물의 농도이며;
- [0441] $\epsilon_{\text{mab-370}}$ 은 370 nm에서의 모노클로날 항체 모액의 소광 계수(0)이고;
- [0442] C_{mab}은 모노클로날 항체 모액의 농도이며;
- [0443] b는 광학 통로(1 cm)임]
- [0444] 약물 담지는 상기 등식 (1) 및 (2) 둘 다뿐 아니라, 두 파장에서의 모노클로날 항체 및 약물의 소광 계수, 그리고 모노클로날 항체와 약물의 농도를 사용하여 추산될 수 있다.
- [0445] 약물 담지 = $C_{\text{약물}}/C_{\text{mab}}$.

[0446] **1. 본 발명의 항체 약물 접합체(ADC)의 제조**

[0447] 독소 화합물 1-B는 DNA 토포이소머라아제 I 억제제였고, 독소 화합물, 토포이소머라아제 I 및 DNA에 의해 형성된 복합체는 DNA에서 단일 가닥 파괴를 유발시켜, DNA 복제를 막고, 세포내 세포 증식을 효과적으로 억제하였다.

[0448] ADC를 이하와 같이 제조하였다: 인간화 항체(Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14 및 Hu103-32로 이루어진 군으로부터 선택)를 0.05 M 수성 PBS 완충제(pH 6.5)중에 넣고(항체 농도는 10 mg/mL), 여기에 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)(Innochem, CAS: 51805-45-9, Cat # B45573) 10 mM 수용액을, 항체 물량의 5.3배인 물량으로 첨가하였으며; 혼합물을 진탕 항온처리기내 일정한 온도(37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 상기 반응 혼합물을 얼음조에서 25°C로 냉각하였다.

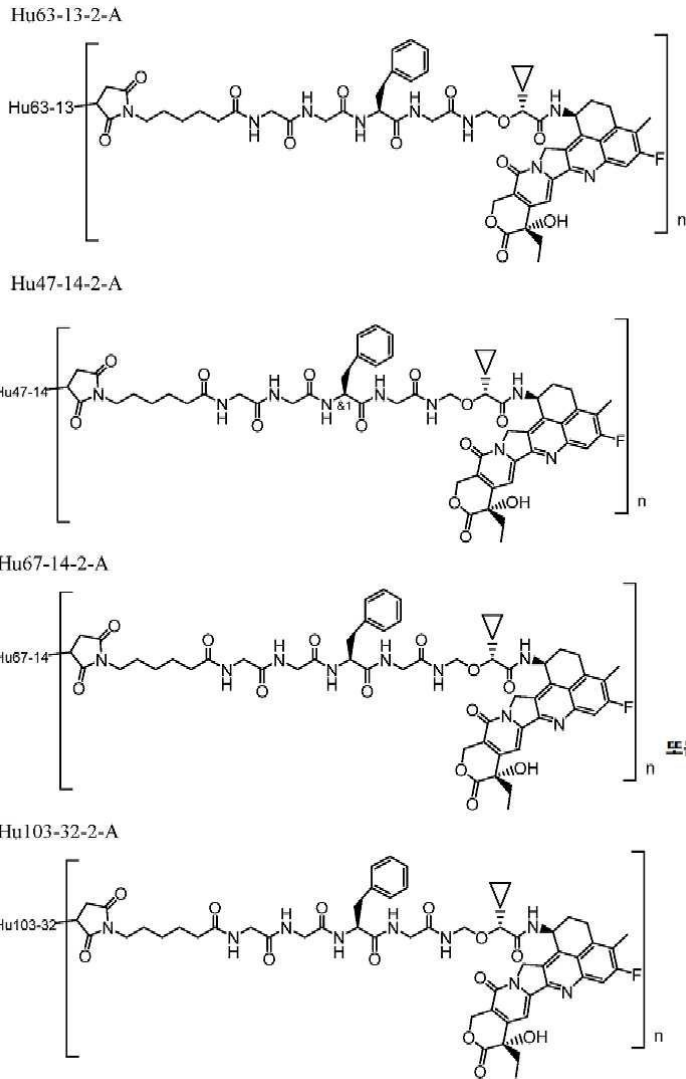
[0449] 독소 화합물 2-A를, 항체 물량의 15배인 물량으로 설폭시화디메틸중에 용해하였으며, 이로부터 생성된 용액을 상기 반응 혼합물에 첨가하였는데, 이후 이 반응 혼합물을 진탕기내 실온에서 3시간 동안 반응이 진행되도록 허용한 후, 반응을 종결시켰다. 반응 혼합물을 탈염시키고, Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: 0.01 M EDTA 함유 0.05 M PBS 완충제(pH 6.5))으로 정제한 결과, 표적 항체 약물 접합체 분자(약물 대 항체 비(DAR, n값) 6 내지 8)를 수득하였다.

[0450] 당 업자는, 반응 조건과 시약을 조정함으로써 DAR값이 상이한 접합체들을 수득할 수 있었다. 예를 들어 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 10 mM 수용액을, 항체 물량의 2.5배인 물량으로 첨가하고, 독소 화합물 2-A를 항체 물량의 10배인 물량으로 첨가하여, 항체 대 TCEP 대 독소 화합물 몰 비를 조정함으로써, 약물 대 항체 몰비(DAR, n값) 3 내지 5인 ADC 분자를 수득하였다

[0451] 제조된 특이적 ADC는 이하와 같았다:

ADC 시료	포함된 항체	DAR값(n)
Hu47-14-2-A	Hu47-14	6.6
Hu63-13-2-A	Hu63-13	6.29
Hu67-14-2-A	Hu67-14	6.41
Hu103-32-2-A	Hu103-32	6.94
Hu63-13-2-A	Hu63-13	3.97
Hu67-14-2-A	Hu67-14	4.28
Hu103-32-2-A	Hu103-32	4.8

[0452]



[0453]

[0454] 본 발명은 또한 시험 실시예가 필요로 하는 바에 따라 기타 DAR값을 가지는 ADC를 제조하였는데, 상세하게는 이하 시험 실시예들을 참조한다.

[0455] **2. 대조군 ADC Lmab-CL2A-SN38(ADC-4)의 제조**

[0456] 본 발명에서 구성한 ADC와 대조군 ADC 분자 Lmab-CL2A-SN38 간 차이를 평가하기 위해, 문헌(*WHO Drug Information* Vol. 30, No. 1, 2016)에 기재된 구조와, 문헌(*Mol pharm.* 2015 Jun 1;12(6):1836-47)에 기재된 방법을 참고하여 독소 CL2A-SN38을 합성한 다음, 이를 Lmab에 접합시킨 후, 상기 ADC 제조와 관련하여 기재된 바와 같은 반응 조건을 조정하여 DAR값이 상이한 ADC 분자 Lmab-CL2A-SN38을 제조하였다. 제조한 ADC 분자를 추후 사용을 대비해 -20℃에 보관하여 두었다.

[0457] **시험 실시예**

[0458] **시험 실시예 1: FACS 결합 검정**

[0459] 세포 표면상 CEA 단백질과 항체의 결합을 검출하기 위해, 세포 표면상에 CEA를 발현하는 세포를 사용하여 FACS로 항체의 결합 활성을 확정하였다. 세포를 수집한 다음, 4℃ 및 400 g에서 5분 동안 원심분리하였다. FBS 함유(최종 농도 10%) 예비 냉각 PBS를 첨가하고 나서, 혼합물을 4℃ 및 400 g에서 5분 동안 원심분리하였는데; 이 절차를 2회 반복하였다. 세포를 96웰 평판에 접종(10⁵개 세포/웰)하고 나서, 각각의 웰에 구배 희석 항체 용액 100 μL를 첨가하였다. 평판을 4℃에서 60분 동안 항온처리한 다음, 원심분리하고 나서, 상청액을 제거하였다. FBS 함유(최종 농도 10%) 예비 냉각 PBS 250 μL를 각각의 웰에 첨가하여 세포를 재현탁하였으며, 이 현탁액을 4℃ 및 400 g에서 5분 동안 원심분리한 후, 상청액을 제거하였는데; 이 절차를 2회 반복하였다. 여기에 1:200 희석 2차 항체 Alexa Fluor@488 염소 항 인간 IgG(H+L)(Lifetechnologies, Cat # A11013) 50 μL를 첨가하였다.

평판을 4℃의 어두운 곳에서 45분 동안 항온처리한 후, 원심분리하고 나서, 상청액을 제거하였다. FBS 함유(최종 농도 10%) 예비 냉각 PBS 250 μL를 각각의 웰에 첨가하여, 세포를 재현탁하였으며, 현탁액을 4℃ 및 400 g에서 5분 동안 원심분리하였는데; 이 절차를 2회 반복하였다. 예비 냉각 PBS 100 μL를 각각의 웰에 첨가하여, 세포를 재현탁하였다. 유세포분석기(BD, FACSverse)에 의하여 형광 신호값에 대해 평판을 분석하였다. 그 값이 더 크다는 것은 세포 표면상 단백질에 대한 항체의 결합 활성이 더 크다는 것을 나타낸다. 검정 결과를 토대로 PRISM 분석 소프트웨어를 사용하여 결합 곡선을 플롯 작성하였으며, 세포 표면 단백질 인간 CEA(MKN45 인간 위암 세포, Nanjing Kebai Biotechnology Co., Ltd., Cat # CBP60488), 사이노CEA-CHO 및 CEACAM1-CHO에 대한 항체의 결합 활성에 대한 EC₅₀값을 피팅(fitting)을 통해 수득하였다. 인간화 항체의 결합 활성을 이하 표 17 및 표 18에 보였다:

[표 17]

상이한 종의 세포 표면 CEA 단백질에 대한 인간화 항체의 결합 활성			
항체	EC ₅₀ (nM)		
	MKN45	사이노CEA-CHO	CEACAM1-CHO
Hu63-13	2.93	1.71	미결합
Hu47-14	4.19	2.70	미결합
Hu67-14	1.58	2.89	미결합
Hu103-32	1.79	1.24	미결합
Sanofi	2.64	17.27	미결합
Lmab	2.45	미결합	미결합

세포 표면 CEA 단백질(MKN45 및 사이노CEA-CHO)에 대한 다른 인간화 항체의 결합 활성에 대한 결과를 이하 표 18에 보였다:

[0463] [표 18]

세포 표면 CEA 단백질에 대한 인간화 항체의 결합 활성					
항 체	EC ₅₀ (nM)		항 체	EC ₅₀ (nM)	
	MKN45	사이노CEA-CHO		MKN45	사이노CEA-CHO
Hu103-1	2.37	2.49	Hu47-6	2.50	0.30
Hu103-2	2.18	1.26	Hu47-10	2.27	0.27
Hu103-3	1.91	1.18	Hu63-1	4.23	1.24
Hu103-4	2.62	1.32	Hu63-2	3.73	2.64
Hu103-5	2.38	1.47	Hu63-3	3.56	2.01
Hu103-6	1.27	1.56	Hu63-4	5.18	1.95
Hu103-7	2.20	1.62	Hu63-5	3.70	2.14
Hu103-9	2.95	1.61	Hu63-6	3.71	2.88
Hu103-10	2.23	1.00	Hu63-8	3.24	2.43
Hu103-11	2.71	0.92	Hu63-9	4.87	2.47
Hu103-12	2.38	1.08	Hu63-10	4.95	1.88
Hu103-13	2.53	1.01	Hu63-11	4.35	2.29
Hu103-14	2.41	1.37	Hu63-12	4.04	2.23
Hu103-15	2.13	1.36	Hu67-1	2.46	4.57
Hu103-17	2.92	1.52	Hu67-4	3.25	3.06
Hu103-18	2.75	0.89	Hu67-5	2.86	3.50
Hu103-19	2.42	0.96	Hu67-7	3.88	7.20
Hu103-20	2.19	0.98	Hu67-9	3.75	3.72
Hu103-21	1.34	1.17	Hu67-10	3.19	5.37
Hu103-22	3.64	1.02	Hu67-11	2.26	4.66
Hu103-23	2.90	0.93	Hu67-12	3.20	5.31

[0464]

[0465]

실험 결과는, 본 발명에서 스크리닝한 인간화 항체가 마우스 항체의 결합 활성과 유사한 결합 활성을 유지하였고, 모두 세포 표면상 인간 CEA 단백질과 결합할 수 있었음과, 본 발명에서 스크리닝한 인간화 항체는 세포 표면상 원숭이 CEA 단백질과 결합할 수 있었고, 원숭이 CEA 단백질에 대한 인간화 항체의 결합 활성은 원숭이 CEA 단백질에 대한 양성 대조군 항체의 결합 활성보다 더 우수하였음을 보여준다.

[0466]

시험 실시예: 가용성 CEA(sCEA)와의 경쟁에 대한 실험

[0467]

항체가, sCEA 존재하에 세포막 표면상 CEA와 우선적으로 결합하였는지 여부를 시험하기 위해, 구배 희석 항체 및 임의의 용해도를 보이는 sCEA(5 µg/mL)를 30분 동안 예비항온처리한 후, MKN45 세포를 수집하여 96웰 평판에 접종하였다. 구배 희석 항체와, 항체 및 sCEA의 예비 항온처리 혼합 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. 평판을 4°C에서 60분 동안 항온처리하고 나서, 원심분리한 다음, 상청액을 제거하였다. FBS 함유(최종 농도 10%) 예비 냉각 PBS로 세포를 2회 세척하였다. 여기에 1:200 희석 2차 항체 Alexa Fluor@488 염소 항 인간 IgG(H+L)(Lifetechnologies, Cat # A11013) 50 µL를 첨가하였다. 평판을 4°C의 어두운 곳에서 45분 동안 항온처리한 후, 원심분리하고 나서, 상청액을 제거하였다. 세포를, FBS 함유(최종 농도 10%) 예비 냉각 PBS 250 µL로 2회 세척하였다. 예비 냉각 PBS 100 µL를 각각의 웰에 첨가하여, 세포를 재현탁하였다. 유세포분석기(FACS; BD, FACVerse)에 의하여 형광 신호값에 대해 현탁액을 분석하였다. 만일 sCEA 부재시 수득한 신호값 대 sCEA 존재시 수득한 신호값의 비가 각각의 항체 농도에 대해 2 미만이면, 이는 항체의 결합 곡선이 sCEA 존재시 크게 변하지 않음을 나타내고, 세포막 표면상 CEA에 여전히 우선 결합함을 나타낸다. 실험 결과를 표 19 및 표 20에 보였는데, 여기서 Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14, Hu103-32 및 양성 대조군 Lmab 항체의 상이한 농도에 대한, sCEA 부재시 수득한 형광 신호값 대 sCEA 존재시 수득한 형광 신호값의 비는 이하 표 19에 보였으며, sCEA 부재시 수득한 형광 신호값 대 sCEA 존재시 수득한 형광 신호값의 최고 비를 이하 표 20에 보였다.

[0468] [표 19]

sCEA 부재시 수득한 형광 신호값 대 sCEA 존재시 수득한 형광 신호값의 인간화 항체에 대한 비					
항체 농도($\mu\text{g/mL}$)	형광 신호값들의 비				
	Hu63-13	Hu47-14	Hu67-14	Hu103-32	Lmab
40	0.92	1.09	0.94	0.91	1.10
1.6	1.36	1.18	1.73	1.67	2.78
0.32	1.59	1.23	1.78	1.24	5.18
0.064	1.59	1.24	1.25	1.44	4.15
0.0128	1.43	1.09	1.50	1.28	2.72
0.00256	1.24	1.15	1.58	1.09	1.74
0.000512	1.02	1.07	1.08	0.86	1.20

[0469]

[0470] [표 20]

sCEA 부재시 수득한 형광 신호값 대 sCEA 존재시 수득한 형광 신호값의 항체에 대한 최고 비			
항체	형광 신호들의 최고 비	항체	형광 신호들의 최고 비
Hu47-2	1.04	Hu103-1	1.30
Hu47-3	1.10	Hu103-2	1.17
Hu47-4	1.13	Hu103-3	1.14
Hu47-6	1.26	Hu103-4	1.17
Hu47-7	1.11	Hu103-5	1.15
Hu47-8	1.04	Hu103-6	1.15
Hu47-10	1.13	Hu103-7	1.07
Hu47-12	1.08	Hu103-9	1.57
Hu63-1	1.31	Hu103-10	1.19
Hu63-3	1.14	Hu103-11	1.16
Hu67-1	1.35	Hu103-12	1.24
Hu67-2	1.21	Hu103-13	1.16
Hu67-4	1.25	Hu103-14	1.10
Hu67-5	1.09	Hu103-15	1.23
Hu67-6	1.22	Hu103-17	1.12
Hu67-7	1.03	Hu103-18	1.22
Hu67-9	1.10	Hu103-19	1.36
Hu67-10	1.34	Hu103-20	1.22
Hu67-11	1.18	Hu103-21	1.27
Hu67-12	1.31	Hu103-22	1.33
Hu67-15	1.05	Hu103-23	1.31
mAb63	1.43	mAb103	1.02
mAb47	1.08	Sanofi	2.65

[0471]

[0472] 실험 결과는, sCEA 부재시 수득한 형광 신호값 대 sCEA 존재시 수득한 형광 신호값의 비가, 인간화 항체 Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14 및 Hu103-32 상이한 농도에 대해 모두 2 미만임을 보여주었는데; 예를 들어 Hu63-13에 대한 최고 비는 1.59였던 한편, 양성 대조군 Lmab에 대한 최고 비는 5.18이었다. 본 발명에서 스크리닝한 항체는 대조군 항체보다 월등하였다. sCEA 부재시 수득한 형광 신호값 대 sCEA 존재시 수득한 형광 신호값의, 본 발명에서 스크리닝한 인간화 항체에 대한 최고 비는 모두 2 미만으로, sCEA 부재시 수득한 형광 신호값 대 sCEA 존재시 수득한 형광 신호값의 양성 대조군 항체에 대한 최고 비에 못미쳤는데, 이는 본 발명에서 스크리닝한 인간화 항체가 sCEA 존재하에 세포막 표면상 CEA와 여전히 우선 결합하고, 양성 대조군 항체보다 월등함을 나타낸다.

[0473] **시험 실시예 3: Biacore를 사용한, 가용성 CEA에 대한 항체의 친화성 확정**

[0474] Biacore(GE, T200) 장치를 사용하여 인간 및 원숭이 가용성 CEA에 대한 시험 인간화 항체의 친화성을 확정하였다. 인간 항체 포획 키트(GE, Cat # BR-1008-39)의 지침에 있는 방법에 따라서, 인간 항체 포획 항체를 Biacore 장치의 바이오센서 칩 CM5(GE, Cat # BR-1005-30)에 공유 접합시켜, 임의의 양만큼의 시험 항체를 친화성 포획한 후, 일련의 농도 구배 가용성 CEA 항원이 칩의 표면을 통해 흐르도록 허용하였으며, Biacore를 사용하여 반응 신호를 실시간으로 검출하여, 결합 및 해리 곡선을 작성하였다. 해리 주기가 끝날 때마다 바이오칩을 세척한 후, 인간 항체 포획 키트에서 제조한 재생 용액으로 재생하였다. 실험에서 수득한 데이터를, BIAevaluation 버전 4.1 소프트웨어를 사용하여 (1:1) 랑뮈르 모델(Langmuir model)로 피팅함으로써, 친화성값을 수득하였다. 본 발명에서 스크리닝한 항체의, 세포막 표면상 CEA에 대한 결합 활성은 가용성 CEA에 대한 항체의 결합 활성보다 더 큰 것이 바람직하므로, 가용성 CEA에 대한 항체의 더 낮은 친화성이 바람직하다. 인간화 항체의 가용성 CEA에 대한 친화성 검정 결과를 이하 표 21에 보였다:

[0475] [표 21]

인간 가용성 CEA에 대한 인간화 항체의 친화성			
항체	인간 가용성 CEA		
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
Hu63-13	2.99E+04	4.31E-03	1.44E-07
Hu47-14	1.31E+05	1.88E-01	1.43E-06
Hu67-14	3.76E+04	8.59E-03	2.28E-07
Hu103-32	3.33E+04	1.03E-03	3.11E-08
Sanofi	5.95E+04	3.08E-03	5.17E-08
Lmab	5.58E+04	3.31E-04	5.93E-09

[0476]

[0477] 시험 결과는, 인간화 항체 Hu63-13, Hu47-14 및 Hu67-14 모두 가용성 CEA 단백질에 대한 친화성이 더 작았음(대조군 항체 Sanofi 및 Lmab의 가용성 CEA 단백질에 대한 친화성보다 유의미하게 더 작았음)을 보여준다. 이는, Hu63-13, Hu47-14 및 Hu67-14는 혈중 가용성 CEA를 생체내 용이하게 중화하지 않으며, 다량의 항체가 세포막 표면에 CEA를 발현하는 세포와 결합할 수 있음을 나타낸다.

[0478] **시험 실시예 4: CEA를 다량 발현하는 세포 MKN45에 있어 항 CEA 항체의 세포내이입 활성**

[0479] 본 발명의 항 CEA 항체 접합체가 세포에 의해 세포내이입된 후, 접합체는 독소를 방출하여 세포를 사멸시킬 수 있었다. 그러므로 CEA 발현 세포내 CEA 항체의 세포내이입 활성은 ADC가 활성을 발휘하도록 촉진할 수 있었다. MKN45 세포에서 인간화 항체의 세포내이입 활성을 평가하기 위해, MKN45 세포를 96웰 평판(Corning, Cat # 3795)에 도말하고 나서, 밤새도록 배양하였는데; 그 다음 날 인간화 CEA 항체 Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14 및 Hu103-32를 iFL Green Human IgG 표지화 시약(Invitrogen, Cat # Z25611)과 함께 15분 동안 예비 항온처리하였는데, 이 때 iFL 시약은 인간화 항체의 Fc에 결합할 것이고; 이후 항체와 iFL의 복합체를 세포 배양 평판에 첨가하고 나서, 6시간 및 24시간 후 세포 배양 용액을 제거하였으며; 세포를 PBS로 2회 세척한 다음, 분해 및 수집하였고, 세포내 형광 신호 세기를 FACS로 검출하였다. 항체가 세포내이입된 후 항체의 Fc에 결합한 iFL은 세포에 도입되었으며, 형광 신호는 iFL이 세포에 의해 세포내이입된 후 산성 환경에서만 검출될 수 있었으므로; 검출된 신호가 더 강하다는 것은, 항체의 세포내이입 활성이 더 크다는 것을 나타낸다. 인간화 항체의 세포내이입 활성을 도 1에 보였는데: 여기서 인간화 항체 모두는 MKN45 세포에 의해 세포내이입될 수 있었고, 시간이 경과함에 따라 더 많은 항체들이 세포내이입되었다.

[0480] **시험 실시예 5: 상이한 CEA 발현 수준을 보이는 암세포에 대한 ADC의 세포독성**

[0481] 인간화 CEA 항체를 독소 2-A에 접합한 후, CEA 발현 수준이 상이한 암세포주에 대한 ADC 각각의 세포독성을 평가하였다. CEA를 다량 발현하는 세포 MKN45, CEA를 중간정도로 발현하는 세포 LS174T, 그리고 CEA를 발현하지 않는 세포 HCT116을 96웰 평판에 도말하였고; 그 다음 날 구배 희석 ADC 시료를 세포에 첨가하고 나서, 세포를 37°C에서 5일 동안 배양하였다. Cell Titer-Glo 시약(Promega, Cat # G9242) 50 μL를 각각의 웰에 첨가하고 나서, 어두운 곳에서 10분 동안 항온처리한 후, 세포 영상화 검출기(BioTek, Cytation5)로 발광 신호를 검출하였다. 역제 곡선을 PRISM 분석 소프트웨어를 사용하여 검출 결과로써 플롯 작성하였으며, 피팅하여 세포 증식에

대한 ADC의 억제 활성 IC₅₀값을 획득하였다. ADC 각각의 세포독성을 이하에 보였다:

[0482] [표 22]

CEA 발현 수준이 상이한 세포에 대한 ADC의 세포독성						
ADC 시료	DAR	IC ₅₀ (nM)			IC ₅₀ ratio	
		(CEA 발현량이 많은) MKN45	(CEA 발현량이 중간정도인) LS174T	(CEA가 발현되지 않는) HCT116	HCT116/LS174T	HCT116/MKN45
Hu47-14-2-A	6.6	6.58	10.3	106.3	10.32	16.16
Hu63-13-2-A	6.29	3.933	13.08	87.64	6.70	22.28
Hu67-14-2-A	6.41	3.331	9.236	71.83	7.78	21.56
Hu103-32-2-A	6.94	2.998	2.374	78.1	32.90	26.05
Lmab-CL2A-SN38	7	0.665	0.3456	0.4276	1.24	0.64
Hu63-13-2-A	3.97	34.02	19.76	165.1	8.36	4.85
Hu67-14-2-A	4.28	9.388	15.58	71.95	4.62	7.66
Hu103-32-2-A	4.8	2.863	3.076	83.58	27.17	29.19
Lmab-CL2A-SN38	4.15	1.595	0.6618	1.059	1.60	0.66

[0483]

[0484] 독소 2-A에 접합된 ADC 분자는 CEA 발현 수준 의존적 세포독성을 보였는데; CEA 발현 수준이 더 높으면, 세포에 대한 ADC 독성은 더 컸다. 한편, DAR값이 큰 ADC와 DAR값이 작은 ADC는 CEA 발현 세포에 대해서는 더 강력한 세포독성을 보였고, CEA 미발현 세포에 대해서는 더 약한 세포독성을 보였다. 대조군 ADC 분자 Lmab-CL2A-SN38은 3개의 세포주 모두에 대한 세포독성과 유사한 세포독성을 보이되, 비특이적인 세포독성을 보였다. IC₅₀ 비는 ADC 분자의 안전성을 간접적으로 반영할 수 있다. 그 비가 더 크다는 것은, CEA를 발현하지 않는 세포에 대한 ADC 분자의 독성이 더 작으며, 생체내 더 안전할 수 있음을 나타낸다.

[0485] **시험 실시예 6: ADC의 방관자 효과 및 세포독성**

[0486] ADC가 세포로 세포내이입된 후 ADC로부터 독소가 방출되어, 세포에 독성 효과를 발휘하게 된다. 세포 사멸 및 용해후, 독소는 세포로부터 방출되어, 근처 세포에 추가로 도입되고 이 세포에도 독성 효과를 발휘하게 된다.

[0487] ADC의 방관자 효과 및 세포독성을 평가하기 위해, CEA를 다량 발현하는 세포주 MKN45와, CEA를 발현하지 않는 세포주 HCT116을 6웰 세포 배양 평판에서 24시간 동안 배양한 다음, ADC 시료를, 최종 농도 4 nM이 되도록 첨가하였다. 세포를 37℃의 세포 항온처리기에서 5일 더 배양하였다. 세포를 판크레아틴으로 분해한 다음, 수집하고 나서, 여기에 CEA 모노클로날 항체 FITC(ThermoFisher, Cat # MA1-80578)를, 최종 농도 10 µg/mL가 되도록 첨가하였다. 세포를 어두운 곳 얼음상에서 1시간 동안 항온처리한 다음, PBS로 2회 세척하고 나서, 유세포분석기로 계수하였다. 형광 신호를 발생시켰던 세포는 CEA 발현 MKN45 세포였으며, 신호를 발생시키지 않았던 세포는 CEA 미발현 HCT116 세포였다.

[0488] ADC 시료의 방관자 효과 및 세포독성의 결과를 도 2에 보였는데; ADC 분자 모두는 강력한 방관자 효과 및 세포독성을 보였다. MKN45 및 HCT116이 공동배양될 때, ADC 분자는 두 유형의 세포의 증식을 억제할 수 있었던 반면, HCT116이 단독 배양될 때 2-A와 커플링된 ADC 분자는 세포에 근본적으로 무독성이었다. 대조군 ADC 분자 Lmab-CL2A-SN38은 공동배양된 세포와 단독 배양된 세포 둘 다에 대한 독성이 매우 컸다.

[0489] 실험에 사용된 ADC 분자의 DAR값은 이하와 같았다:

[0490] Hu63-13-2-A DAR 6.29; Hu47-14-2-A DAR 6.6; Hu67-14-2-A DAR 6.41; Lmab-CL2A-SN38 DAR 7.0.

[0491] **시험 실시예 7: 종양에 대한 ADC 분자의 생체내 억제 활성**

[0492] LS174T 및 MKN45 이종이식 종양 모델을 사용하여 ADC 분자의 생체내 효능을 평가하였다. BALB/c 누드 마우스 (SPF 등급, Shanghai Slac Laboratory Animal Co., Ltd., 인증 번호: 201833814, 허가 번호: SCXK(Jiangsu) 2016-0010)를 12시간/12시간 명/암 주기하에 수용하였는데(온도 23±1℃, 습도 40% 내지 50%), 이때 먹이(마우스용 표준 멸균 사료)와 물은 자율급식으로 제공하였다. 마우스를 10일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험

을 실시하였으며, 이후 마우스 우측 옆구리에 LS174T 세포(5×10^5 개 세포/마우스) 또는 MKN45 세포(4×10^6 개 세포/마우스)를 피하 접종하였다. 종양이 크기 약 150 mm^3 로 성장하도록 허용하였으며, 이후 마우스를 8마리씩 여러 군에 무작위로 분배하였다. 군을 나눈 후 실험군 마우스에 ADC 시료를 1 mg/kg 또는 3 mg/kg의 용량으로 복막내 주사하였으며, 블랭크 대조군에 속한 마우스에는 PBS를 복막내 단 1회 주사하였다. 마우스 종양 크기를 관찰하여, 측정된 다음, 기록하였다. 종양 부피(V)는 이하와 같이 산정하였다: $V = 1/2 \times L_{\text{장}} \times L_{\text{단}}^2$; 상대적 종양 부피(RTV) = V_T/V_0 ; 종양 억제율(%) = $(C_{\text{RTV}} - T_{\text{RTV}})/C_{\text{RTV}}(\%)$ [식중, V_0 및 V_T 는 각각 실험 개시시 종양 부피 및 실험 막바지 종양 부피이고; C_{RTV} 및 T_{RTV} 는 각각 실험 막바지에서의 블랭크 대조군의 상대적 종양 부피 및 실험군의 상대적 종양 부피임].

[0493] 대조군에서 PBS의 생체내 효능과 비교되는 생체내 효능의 관점에서, ADC 분자 모두는 종양 부피 및 중량 증가를 용량 의존적 방식으로 어느 정도 억제하는 효과를 보였는데: 3-mpk 군에서의 종양에 대한 억제 효과는 1-mpk 군에서의 종양에 대한 억제 효과보다 더 우수하였다. LS174T 이종이식 종양 모델에서의 결과를 도 3(종양 부피의 변화)과 도 4(마지막날 종양의 중량)에 보였는데: 3-mpk군에서, 가장 우수한 종양 억제 효과는 Hu63-13-2-A가 보였고, 그 다음으로 우수한 종양 억제 효과는 Hu47-14-2-A가 보였으며, 그 다음으로 우수한 종양 억제 효과는 Hu67-14-2-A가 보였고, Lmab-CL2A-SN38은 종양 억제 효과가 가장 나빴다. MKN45 이종이식 종양 모델에 있어, 결과를 도 5(종양 부피 변화) 및 도 6(마지막날 종양의 중량)에 보였는데: 3-mpk군에서, 가장 우수한 종양 억제 효과는 Hu67-14-2-A가 보였고, 그 다음으로 우수한 종양 억제 효과는 Hu103-32-2-A가 보였으며, 그 다음으로 우수한 종양 억제 효과는 Hu63-13-2-A가 보였고, Lmab-CL2A-SN38은 종양 억제 효과가 가장 나빴다.

[0494] ADC 분자의 생체내 종양 억제율을 이하 표 23 및 표 24에 보였는데: ADC의 종양 억제율은 유의미한 용량 효과를 보여주며; 특히 LS174T 이종이식 종양 모델에서 저용량군(1 mpk)중 종양 억제율이 가장 높은 것은 Hu63-13-2-A(55.95%)였고, 종양 억제율이 그 다음으로 높은 것은 Hu67-14-2-A(43.71%)였으며, 종양 억제율이 가장 낮은 것은 Hu47-14-2-A(23.04%)였으며; 고용량군(3 mpk)중 종양 억제율이 가장 높은 것은 Hu63-13-2-A(77.13%)였고, 종양 억제율이 그 다음으로 높은 것은 Hu47-14-2-A(66.87%)였으며, 종양 억제율이 그 다음으로 높은 것은 Hu67-14-2-A(47.66%)였고, 종양 억제율이 가장 낮은 것은 Lmab-CL2A-SN38(33.44%)였으며; MKN45 이종이식 종양 모델에서 저용량군(1 mpk)중 종양 억제율이 가장 높은 것은 Hu67-14-2-A(15.88%)였고, 종양 억제율이 그 다음으로 높은 것은 Hu103-32-2-A(11.39%)였으며, 종양 억제율이 가장 낮은 것은 Hu63-13-2-A(9.89%)였으며; 고용량군(3 mpk)중 종양 억제율이 가장 높은 것은 Hu67-14-2-A(79.51%)였고, 종양 억제율이 그 다음으로 높은 것은 Hu103-32-2-A(74.66%)였으며, 종양 억제율이 그 다음으로 높은 것은 Hu63-13-2-A(60.26%)였고, 종양 억제율이 가장 낮은 것은 Lmab-CL2A-SN38(13.51%)였다.

[0495] [표 23]

ADC의 생체내 종양 억제율				
군	DAR	용량	종양 억제율 (%)	(대조군에 비한) P 값
블랭크 대조군	NA	NA	NA	NA
Hu63-13-2-A	6.3	1 mpk	55.95%*	0.0159
Hu63-13-2-A	6.3	3 mpk	77.13%**	0.0013
Hu47-14-2-A	6.6	1 mpk	23.04%	0.4590
Hu47-14-2-A	6.6	3 mpk	66.87%**	0.0052
Hu67-14-2-A	6.13	1 mpk	43.71%	0.0561
Hu67-14-2-A	6.13	3 mpk	47.66%	0.0794
Lmab-CL2A-SN38	7.0	3 mpk	33.44%	0.1791

주의: *는 P<0.05임을 나타내고, **는 P<0.01임을 나타내며, NA는 적용 불가능을 나타냄

[0496]

[0497] [표 24]

MKN45 이종이식 종양 모델에서 ADC의 생체내 종양 억제율				
군	DAR	용량	종양 억제율 (%)	(대조군에 비한) P 값
블랭크 대조군	NA	NA	NA	NA
Hu63-13-2-A	6.3	1 mpk	9.89%	0.6492
Hu63-13-2-A	6.3	3 mpk	60.26%*	0.0124
Hu67-14-2-A	6.13	1 mpk	15.88%	0.5336
Hu67-14-2-A	6.13	3 mpk	79.51%**	0.0087
Hu103-32-2-A	6.94	1 mpk	11.39%	0.5219
Hu103-32-2-A	6.94	3 mpk	74.66%**	0.0033
Lmab-CL2A-SN38	7.0	3 mpk	13.51%	0.4980

주의: *는 P<0.05임을 나타내고, **는 P<0.01임을 나타내며, NA는 적용 불가능함을 나타냄

[0498]

[0499] 시험 실시예 8: ADC 분자의 생체내 약동학적 연구

[0500] SD 래트에서 생체내 약동학적 연구를 수행하였다. SD 래트(Shanghai Sippr-BK Laboratory Animal Co. Ltd.)를 3마리씩 여러 군에 무작위로 분배하였으며, 약물을 용량 3 mg/kg로 정맥내 주사하여 투여하였다. 투여전, 투여 후 5분 경과시, 8시간 경과시, 1일차, 2일차, 4일차, 7일차, 10일차, 14일차, 21일차 및 28일차와 같은 시점에서 투여군으로부터 전혈 시료 0.3 mL를 채혈하였으며, 항응고제는 첨가하지 않았다. 채혈한 전혈 시료를 4℃에 30분 동안 방치한 다음, 1000 g에서 15분 동안 원심분리하였으며, 상청액을 수집하고, EP 튜브에 넣은 다음, -80℃에 보관하여 두었다. 혈청중 혈액 농도를 ELISA로 확인하였으며, Winnolin 소프트웨어로 시험 약물에 대한 약동학적 매개변수를 산정하였다. 결과를 이하에 보였다:

[0501] [표 25]

ADC 분자의 생체내 약동학적 매개변수								
시료	Hu63-13-2-A (DAR 6.8)		Hu47-14-2-A (DAR 6.72)		Hu67-14-2-A (DAR 6.7)		Hu103-32-2-A (DAR 6.91)	
	비변형 ADC	항체	비변형 ADC	항체	비변형 ADC	항체	비변형 ADC	항체
매개변수	평균값	평균값	평균값	평균값	평균값	평균값	평균값	평균값
t1/2(h)	169.7	192.7	158.5	188.8	170.8	180.6	135.19	157.87
t1/2(d)	7.1	8.0	6.6	7.9	7.1	7.5	5.63	6.58
C _{max} (ug/ml)	62.9	67.6	51.5	55.2	50.8	49.6	64.94	66.35
AUC 0-t(ug/ml·h)	4280	4949	3283	3444	4037	4038	3609	3235
AUC 0-∞(ug/ml·h)	4600	5451	3456	3741	4309	4356	3699	3357
Vz(ml/kg)	159.8	153.0	198.3	218.8	171.9	179.9	160.09	206.29
CL(ml/일/kg)	15.7	13.2	20.9	19.3	16.8	16.6	19.70	21.75
MRT 0-∞(h)	212.1	239.0	184.7	216.6	226.6	237.7	144.63	160.14

[0502]

[0503] ADC 분자 모두는 약동학적 특성이 우수하였고, 항체의 반감기는 ADC 분자의 반감기보다 약간 더 길었다. Hu63-13-2-A의 생체내 반감기는 7.1일이었고, 항체의 반감기는 8일이었으며; Hu47-14-2-A의 생체내 반감기는 6.6일이었고, 항체의 반감기는 7.9일이었으며; Hu67-14-2-A의 생체내 반감기는 7.1일이었고, 항체의 반감기는 7.5일이었으며; Hu103-32-2-A의 반감기는 5.63일이었고, 항체의 반감기는 6.58일이었다.

[0504] **시험 실시예 9: 혈장중 ADC 분자의 시험관내 안정성 연구**

[0505] 혈장중 ADC 분자의 시험관내 안정성을 평가하기 위해, ADC 분자를 인간 및 원숭이 혈장에 100 µg/mL의 농도로 첨가하였으며, 이 혼합물을 37°C에서 21일 동안 방치하여 두었다. 혼합물 시료를 1주일에 1회 취하고, LC/MS/MS(Shimadzu, LC-30AD 초고성능 액체 크로마토그래피 시스템; Applied Biosystems, API4000 삼중 사중극자 질량분광계)로 혈장중 유리 독소 함량에 대해 분석하였다. 검출 결과는 이하와 같았다.

[0506] [표 26]

혈장중 독소의 퍼센트												
혈장중 독소 퍼센트(%)												
일	Hu63-13-2-A (DAR 7.24)			Hu47-14-2-A (DAR 6.85)			Hu67-14-2-A (DAR 6.7)			Hu103-32-2-A (DAR 6.05)		
	BSA	인간	원숭이	BSA	인간	원숭이	BSA	인간	원숭이	BSA	인간	원숭이
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.93	0.38
14	0	0.21	0	0	0.28	0	0	0.18	0.21	0	0.78	0.92
21	0	0.32	0.4	0	0.34	0.29	0	0.4	0.24	0	1.13	0.96

[0507]

[0508] 검출 결과 "0"은, 혈장중 유리 독소 함량이 검출 하한치 이하로서, 검출될 수 없음을 나타내는 것이다. ADC 분자 모두는 인간 및 원숭이 혈장중 안정성이 우수하였다. Hu63-13-2-A의 경우, 21일 동안 37°C에서 항온처리 후 인간 및 원숭이 혈장중 유리 독소 함량은 각각 0.32% 및 0.4%였으며; Hu47-14-2-A의 경우, 인간 및 원숭이 혈장중 유리 독소 함량은 각각 0.34% 및 0.29%였으며; Hu67-14-2-A의 경우, 인간 및 원숭이 혈장중 유리 독소 함량은 각각 0.4% 및 0.24%였고; Hu103-32-2-A의 경우, 인간 및 원숭이 혈장중 유리 독소 함량은 각각 1.13% 및 0.96%였다.

[0509] **시험 실시예 10: 화합물에 의한 종양 세포의 시험관내 증식 억제에 관한 시험**

[0510] I. 목적

[0511] 본 실험은 본 발명의 약학 화합물의, U87MG 세포(세포 은행, Chinese Academy of Sciences, Cat # TCHu138) 및 SK-BR-3 종양 세포(인간 유방암 세포, ATCC, Cat # HTB-30)의 시험관내 증식에 대한 억제 활성을 시험하고자 하였다. 세포를 시험관내에서 상이한 농도의 화합물로 처리하였다. 배양 6일 후, CTG(CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Cat # G7573) 시약을 사용하여 세포 증식을 시험하였으며, IC₅₀값에 따라 화합물의 시험관내 활성을 평가하였다.

[0512] II. 방법

[0513] U87MG 세포의 시험관내 증식 억제에 대한 시험을, 본 발명의 화합물의 종양 세포 시험관내 증식에 대한 억제 활성을 시험하는 것에 관한 본 발명의 방법을 예시하기 위한 일례로서 실시하였다. 본 방법은 또한 다른 종양 세포의 시험관내 증식에 대한 억제 활성 시험(이에 한정되는 것은 아님)에도 적용될 수 있었다.

[0514] 1. 세포 배양액: U87MG 및 SK-BR-3 세포를 각각 10% FBS 함유 EMEM 배지(GE, Cat # SH30024.01) 및 10% FBS 함유 McCoy 5A 배지(Gibco, Cat # 16600-108)중에서 배양하였다.

[0515] 2. 세포 제조: 성장중으로서 대수기에 있는 U87MG 세포 및 SK-BR-3 세포를 PBS(인산염 완충제, Shanghai BasalMedia Technologies Co., LTD.)로 1회 세척한 다음, 트립신(0.25% 트립신-EDTA(1x), Gibco, Life Technologies) 2 내지 3 mL로 2 내지 3분 동안 분해하였다. 세포가 완전히 분해된 후, 여기에 세포 배양 배지 10 내지 15 mL를 첨가하여 분해된 세포를 용리시켰다. 혼합물을 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음, 상청액을 폐기하였다. 그 다음, 세포를 세포 배양 배지 10 내지 20 mL에 재현탁한 결과, 단일 세포 현탁액을 수득하였다.

[0516] 3. 세포 도말: U87MG 및 SK-BR-3 단일 세포 현탁액 각각을 잘 혼합한 다음, 세포 배양 배지로 조정하여, 세포 밀도가 각각 2.75 x 10³개 세포/mL 및 8.25 x 10³개 세포/mL가 되도록 만들었다. 조정한 세포 현탁액 각각을 잘 혼합한 후, 96웰 세포 배양 평판에 웰당 180 µL 첨가하였다. 배지 단 200 µL만큼을, 96웰 평판의 주변 웰에

첨가하였다. 평판을 항온처리기에서 24시간 동안 항온처리하였다(37℃, 5% CO₂).

[0517] 4. 화합물 제조: 화합물을 DMSO(설폰시아디메틸, Shanghai Titan Scientific Co., Ltd.)에 용해하여, 초기 농도 10 mM인 모액을 제조하였다.

[0518] 이와 같이 하여 소분자 화합물을 초기 농도 500 nM로 제조하였다.

[0519] 100 μM(30 μL)의 상이한 시험 시료들을 96웰 U-바닥 평판 첫번째 컬럼에 첨가하였으며, DMSO 20 μL를 두번째 컬럼 내지 열번째 컬럼 각각의 웰에 첨가하였다. 첫번째 컬럼내 시료(10 μL)를 두번째 컬럼내 DMSO 20 μL에 첨가한 다음, 혼합물을 잘 혼합하였다. 혼합물 10 μL를 세번째 컬럼에 첨가하는 식으로 열번째 컬럼까지 진행하였다. 평판내 약물(웰당 5 μL)을 EMEM 배지(95 μL)로 옮겼으며, 추후 사용을 위해 혼합물을 잘 혼합하였다.

[0520] ADC를, 이하와 같이 초기 농도 10 nM 또는 500 nM로 제조하였다.

[0521] 100 nM 또는 5 μM(100 μL)의 상이한 시험 시료를 96웰 평판의 첫번째 컬럼에 첨가하였으며, 두번째 컬럼 내지 열번째 컬럼의 각각의 웰에 PBS 100 μL 를 첨가하였다. 첫번째 컬럼내 시료(50 μL)를 두번째 컬럼내 PBS(100 μL)에 첨가한 후, 혼합물을 잘 혼합하였다. 혼합물 50 μL를 세번째 컬럼에 첨가하는 식으로 3배 희석하여 열번째 컬럼까지 진행하였다.

[0522] 5. 시료 첨가: 상이한 농도로 제조한 시험 시료(20 μL)를 배양 평판에 첨가하였는데, 이때 각각의 시료에 대해 2개씩의 웰을 지정하였다. 평판을 항온처리기에서 6일 동안 항온처리하였다(37℃, 5% CO₂).

[0523] 6. 발색: 96웰 세포 배양 평판을 들어내고, 각각의 웰에 CTG 용액 90 μL를 첨가한 다음, 실온에서 10분 동안 항온처리하였다.

[0524] 7. 평판 판독: 96웰 세포 배양 평판을 들어내고, 미세평판 판독기(BMG labtech, PHERAstar FS) 내에서 화학발광에 대해 시험하였다.

[0525] III. 데이터 분석

[0526] Microsoft Excel 및 Graphpad Prism 5를 사용하여 데이터를 처리하고 분석하였다. 실험 결과를 이하 표에 보았다.

[0527] [표 27]

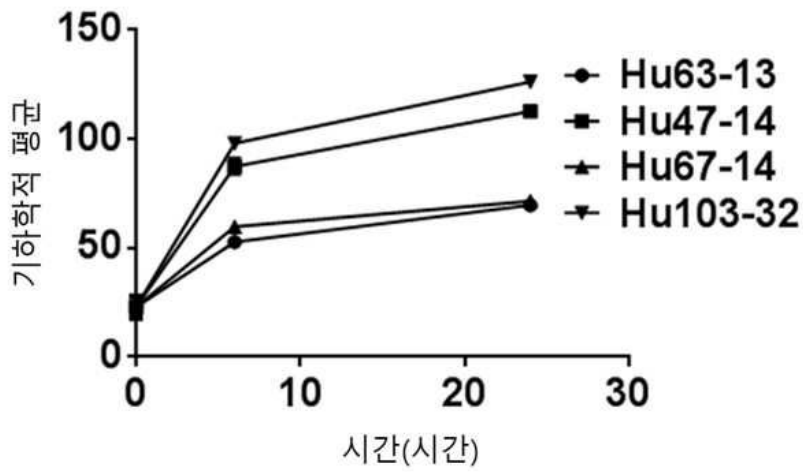
SK-BR-3 세포 및 U87 세포의 시험관내 증식을 억제함에 있어 본 발명의 소분자 단편의 IC ₅₀ 값		
화합물 번호	IC ₅₀ (nM)	
	SK-BR-3	U87
체류시간이 더 짧은 1-B	0.33	0.86
체류시간이 더 긴 1-A	8.11	2.31

[0528]

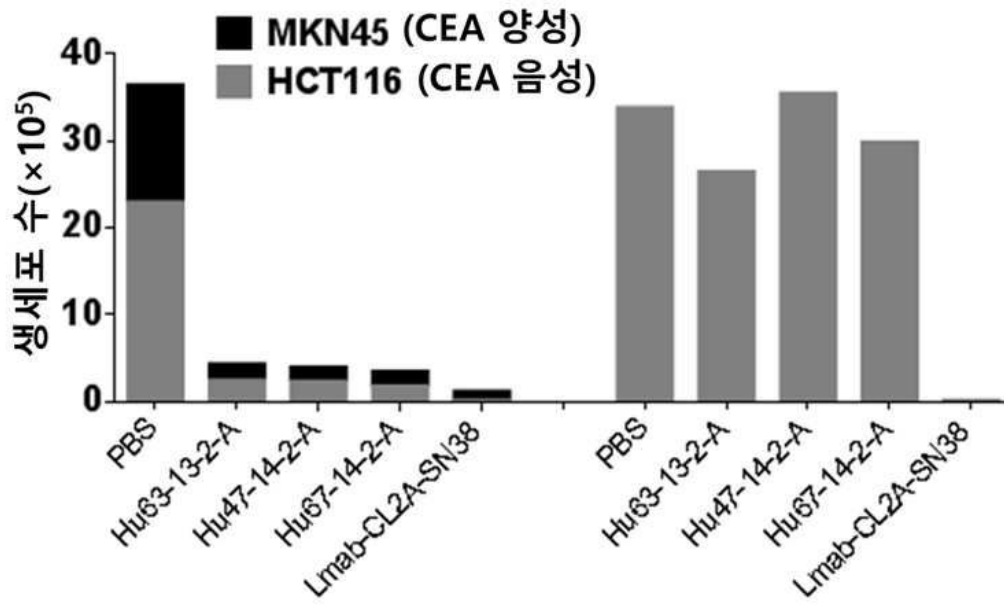
[0529] 결론: 본 발명의 소분자 단편은 SK-BR-3 세포 및 U87 세포의 증식에 대해 유의미한 억제 활성을 가졌으며, 키랄 중심은 화합물 억제 활성에 어떤 영향을 미쳤다.

도면

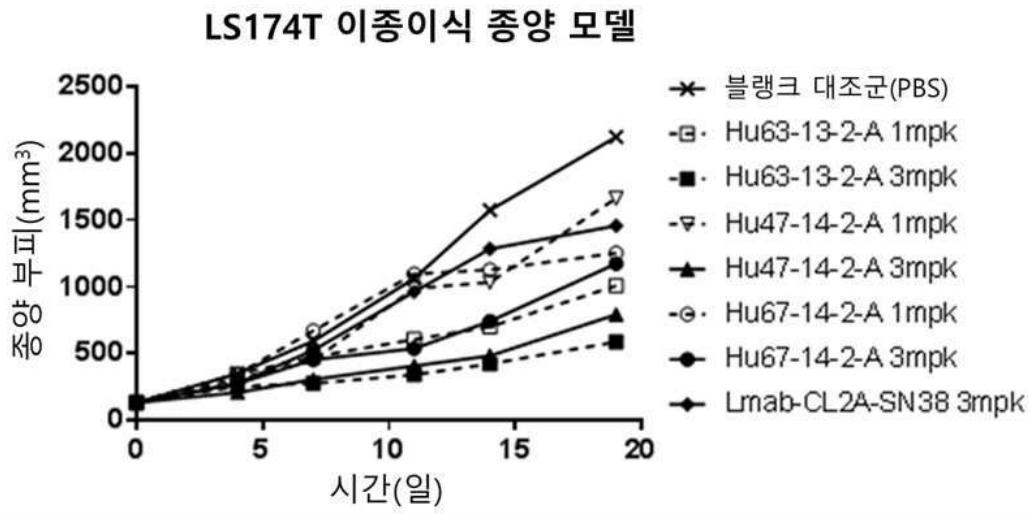
도면1



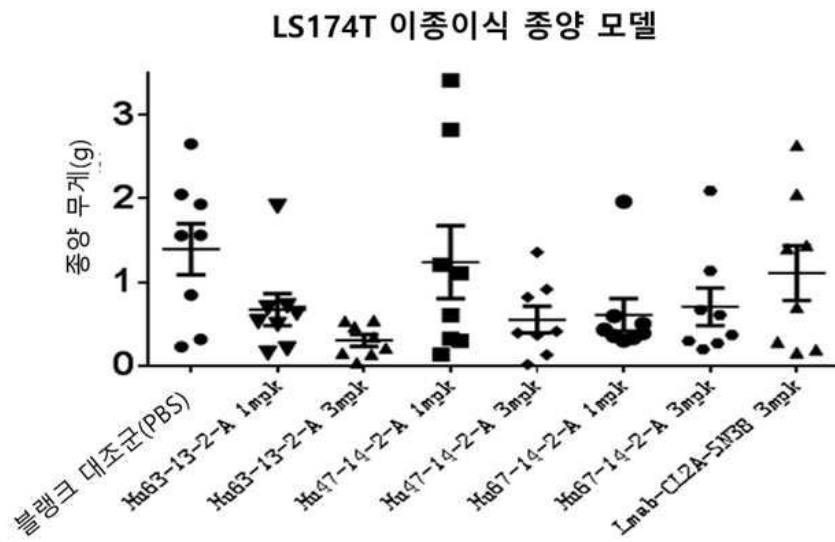
도면2



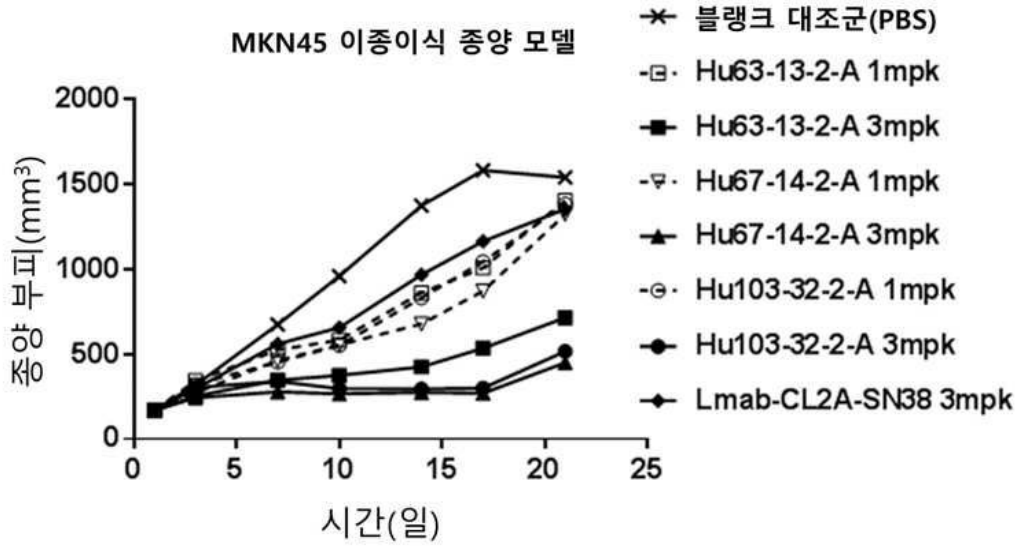
도면3



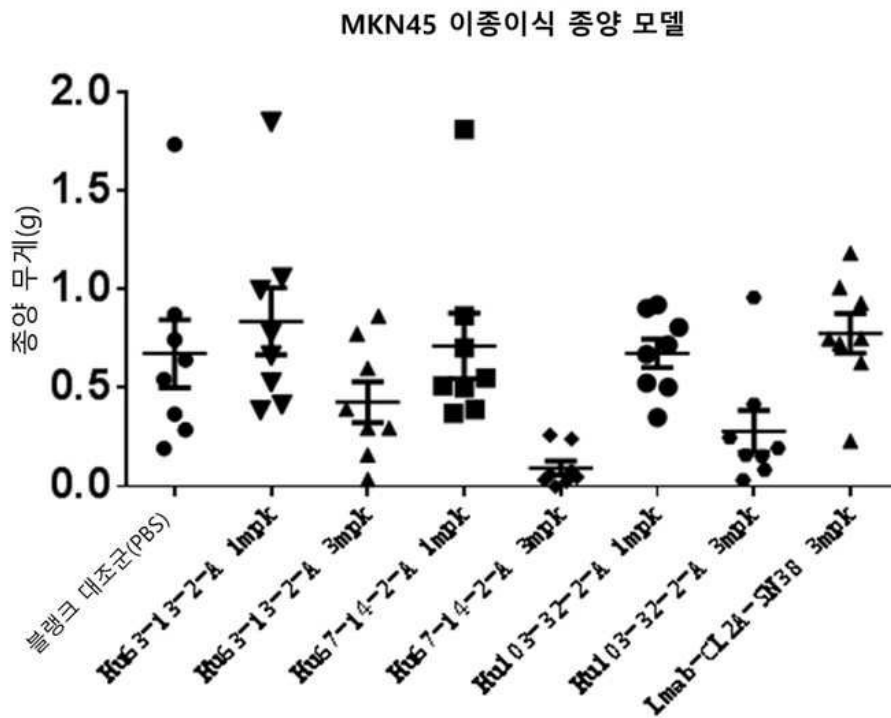
도면4



도면5



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd.

Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> ANTI-CEA ANTIBODY-EXATECAN ANALOG CONJUGATE AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

<130> 702139CPCT

<160> 92
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 657
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> PEPTIDE
 <223> Protein sequence of human CEA-His (hCEA-His)
 <400> 1
 Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15

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

 Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
 85 90 95
 Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110
 Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125
 Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140

 Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 145 150 155 160
 Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr
 165 170 175
 Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser

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

435 440 445

Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala

450 455 460

Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu

465 470 475 480

Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr

485 490 495

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg

500 505 510

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

515 520 525

Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser

530 535 540

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

545 550 555 560

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn

565 570 575

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser

580 585 590

Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile

595 600 605

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

610 615 620

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val

625 630 635 640

Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala His His His His His

645 650 655

His

<210> 2

<211> 883

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> Protein sequence of human CEA-Fc (hCEA-Fc)

<400> 2

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu

1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser

20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr

35 40 45

Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg

50 55 60

Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln

65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val

85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys

100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala

115 120 125

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

130 135 140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser

145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr

165 170 175

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

180 185 190

Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile

195 200 205

Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
 210 215 220

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
 225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
 245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr
 260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Glu Pro
 275 280 285

Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Glu
 290 295 300

Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr Thr Tyr
 305 310 315 320

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 325 330 335

Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 340 345 350

Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser Val Asp
 355 360 365

His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp Pro
 370 375 380

Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu Ser
 385 390 395 400

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 405 410 415

Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile Ser Asn
 420 425 430

Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn Asn Ser
 435 440 445

Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala

450 455 460
 Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu
 465 470 475 480
 Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr
 485 490 495

 Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
 500 505 510
 Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr
 515 520 525
 Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser
 530 535 540
 Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp
 545 550 555 560

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

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

 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 690 695 700

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 705 710 715 720
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 725 730 735
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 740 745 750

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 755 760 765
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 770 775 780
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 785 790 795 800
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 805 810 815

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

Pro Gly Lys

<210> 3

<211> 660

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> Protein sequence of cynomolgus monkey CEA-His (cynoCEA-His)

<400> 3

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

1 5 10 15
 Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile
 20 25 30
 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys
 35 40 45
 Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
 50 55 60
 Glu Thr Ile Asp Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80
 Ser Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Val Ile Lys Glu Asp Leu Val
 85 90 95
 Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110
 Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125
 Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140
 Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser
 145 150 155 160
 Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr
 165 170 175
 Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser
 180 185 190
 Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
 195 200 205
 Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr
 210 215 220
 Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
 245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr
 260 265 270
 Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Glu Leu
 275 280 285
 Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys
 290 295 300
 Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 305 310 315 320
 Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg Leu Glu
 325 330 335
 Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn
 340 345 350
 Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg
 355 360 365
 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
 370 375 380
 Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn Leu Asn
 385 390 395 400
 Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe Trp Phe
 405 410 415
 Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 420 425 430
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser
 435 440 445
 Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Val
 450 455 460
 Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu
 465 470 475 480
 Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr
 485 490 495
 Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val Ser Pro Arg

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

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

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

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

 Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
 260 265 270
 Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn

Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
 530 535 540
 Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
 545 550 555 560
 Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
 565 570 575

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
 580 585 590
 Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
 595 600 605
 Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
 610 615 620
 Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
 625 630 635 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
 645 650 655
 Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
 660 665 670
 Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
 675 680 685
 Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
 690 695 700

<210> 5

<211> 690

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> Protein sequence of cynomolgus monkey CEA expressed on CHO cell surface (cynoCEA-CHO)

<400> 5

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

Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn
 275 280 285
 Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr
 290 295 300
 Ala Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile
 305 310 315 320
 Glu Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp
 325 330 335
 Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser
 340 345 350
 Arg Leu Glu Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile
 355 360 365
 Pro Arg Asn Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val
 370 375 380
 Ser Val Arg Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro
 385 390 395 400
 Asp Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu
 405 410 415
 Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr
 420 425 430
 Phe Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe
 435 440 445
 Ile Pro Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala
 450 455 460
 His Asn Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr
 465 470 475 480
 Val Tyr Val Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn
 485 490 495
 Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala
 500 505 510
 Glu Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
 35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
 50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
 65 70 75 80

Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
 85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205

Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255

Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu

260 265 270
 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285

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

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

 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 420 425 430
 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 435 440 445
 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg
 450 455 460
 Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His
 465 470 475 480

 Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
 485 490 495
 Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
 500 505 510

Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln

515 520 525

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain variable region sequence of mAb47

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Thr

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain variable region sequence of mAb47

<400> 8

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

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain variable region sequence of mAb63

<400> 9

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

85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ile Phe Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain variable region sequence of mAb63

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain variable region sequence of mAb67

<400> 11

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

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

Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain variable region sequence of mAb67

<400> 12

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

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

 100 105 110

<210> 13

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain variable region sequence of mAb103

<400> 13

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

 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp

 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

 115 120

<210> 14

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain variable region sequence of mAb103

<400> 14

Asp Leu Val Val Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

 20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asn

 85 90 95

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

 100 105 110

Thr Val Leu

 115

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR1 sequence of mAb47

<400> 15

Thr Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR2 sequence of mAb47/mAb103

<400> 16

Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR3 sequence of mAb47

<400> 17

Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val

1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR1 sequence of mAb47

<400> 18

Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser Asn Leu His

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR2 sequence of mAb47

<400> 19

Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> DOMAIN
<223> Light chain LCDR3 sequence of mAb47
<400> 20

Gln Gln Trp Ser Ile Tyr Pro Leu Thr

1 5
<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> DOMAIN
<223> Heavy chain HCDR1 sequence of mAb63

<400> 21
Asp Phe Tyr Met Asn

1 5
<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> DOMAIN
<223> Heavy chain HCDR2 sequence of mAb63
<400> 22

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

1 5 10 15
Asp

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR3 sequence of mAb63

<400> 23

Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR1 sequence of mAb63

<400> 24

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR2 sequence of mAb63

<400> 25

Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Ser

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR3 sequence of mAb63

<400> 26

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR1 sequence of mAb67

<400> 27

Asp Tyr His Met Asn

1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR2 sequence of mAb67

<400> 28

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

1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR3 sequence of mAb67

<400> 29

Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn

1 5

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR1 sequence of mAb67

<400> 30

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Ile Gly Thr Asn Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR2 sequence of mAb67

<400> 31

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR3 sequence of mAb67

<400> 32

Leu Gln Ser Arg Lys Ile Pro Tyr Thr

1 5

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR1 sequence of mAb103

<400> 33

Thr Tyr Gly Val Ile

1 5

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR3 sequence of mAb103

<400> 34

Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR1 sequence of mAb103

<400> 35

Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu

1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR2 sequence of mAb103

<400> 36

Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp

1 5 10

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> Light chain LCDR3 sequence of mAb103

<400> 37

Gly Val Gly Asn Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val

1 5 10

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Heavy chain HCDR2 mutant (D61S) sequence of mAb47/mAb103

<400> 38

Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h47VH1 sequence of mAb47

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 40
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> Humanized antibody heavy chain variable region h47VH2 sequence of mAb47

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

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

<210> 41
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> Humanized antibody heavy chain variable region h47VH3 sequence of mAb47

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h47VH4 sequence of mAb47

<400> 42

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

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

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

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h47VL1 sequence of mAb47

<400> 43

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 Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h47VL2 sequence of mAb47

<400> 44

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 Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105

<210> 45

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h47VL3 sequence of mAb47

<400> 45

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 Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu

<400> 47

Asp Ile Phe Pro Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h63VH1 sequence of mAb63

<400> 48

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h63VH2 sequence of mAb63

<400> 49

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h63VH3 sequence of mAb63

<400> 50

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

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

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

85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h63VH4 sequence of mAb63

<400> 51

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h63VH5 sequence of mAb63

<400> 52

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

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

 20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

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

 50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

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

 85 90 95
Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h63VL1 sequence of mAb63

<400> 53

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 Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Arg Ser Gly Leu Leu 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 Gly Asn Thr Leu Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h63VL2 sequence of mAb63

<400> 54

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h63VL3 sequence of mAb63

<400> 55

Asp Val 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 Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 56

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h67VH1 sequence of mAb67

<400> 56

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

1 5 10 15

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h67VH2 sequence of mAb67

<400> 57

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

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210

> 58

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h67VH3 sequence of mAb67

<400> 58

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 59

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h67VL1 sequence of mAb67

<400> 59

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 60

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h67VL2 sequence of mAb67

<400> 60

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

 35 40 45

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

 50 55 60

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

 100 105 110

<210> 61

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h67VL3 sequence of mAb67

<400> 61

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

 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

 100 105 110

<210> 62

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h67VL4 sequence of mAb67

<400> 62

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 Glu Ser Val Ser Ile Ile

 20 25 30

Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 63

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h67VL5 sequence of mAb67

<400> 63

Asp Ile Val 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 Glu Ser Val Ser Ile Ile

 20 25 30

Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro

 35 40 45

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

 50 55 60

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

85 90 95
 Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 66
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> Humanized antibody heavy chain variable region h103VH2 sequence of mAb103

<400> 66
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ile Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

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

<210> 67
 <211> 122
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h103VH3 sequence of mAb103

<400> 67

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Gly Val Ile Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp

 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 68

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody heavy chain variable region h103VH4 sequence of mAb103

<400> 68

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> Humanized antibody light chain variable region h103VL1 sequence of mAb103
 <400> 69

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30

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

Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

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

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

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110

Thr Val Leu

115
 <210> 70
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> Humanized antibody light chain variable region h103VL2 sequence of mAb103
 <400> 70

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

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

115
 <210> 71
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> Humanized antibody light chain variable region h103VL3 sequence of mAb103
 <400> 71

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

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

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

Thr Val Leu
 115

<210> 72

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h103VL4 sequence of mAb103

<400> 72

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

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

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h103VL6 sequence of mAb103

<400> 74

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

 20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Pro Pro Arg Tyr Val Met

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asn

 85 90 95

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

 100 105 110

Thr Val Leu

 115

<210> 75

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h103VL7 sequence of mAb103

<400> 75

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

 20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Pro Pro Arg Tyr Val Met

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

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110

Thr Val Leu
 115

<210> 76

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Humanized antibody light chain variable region h103VL8 sequence of mAb103

<400> 76

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

20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met

35 40 45
 Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Glu Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asn

85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110

Thr Val Leu
 115
 <210> 77
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> Heavy chain constant region of human IgG1
 <400> 77
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

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

275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Human light chain constant region chain sequence

<400> 78

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 79

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Human light chain constant region chain sequence

<400> 79

Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 80

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> chain

<223> Heavy chain sequence of Hu63-13

<400> 80

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

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

 20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

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

 50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

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

 85 90 95
Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

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

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

 130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

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

 165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

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

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

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> chain

<223> Light chain sequence of Hu63-13

<400> 81

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 Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

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

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 83

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> chain

<223> Light chain sequence of Hu47-14

<400> 83

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 Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 84
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> chain
 <223> Heavy chain sequence of Hu67-14
 <400> 84

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

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

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

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

Lys Gly Lys Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

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

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

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

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 85

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> chain

<223> Light chain sequence of Hu67-14

<400> 85

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 Glu Ser Val Ser Ile Ile

20 25 30

Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 86

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> chain

<223> Heavy chain sequence of Hu103-32

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

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

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

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

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

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

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

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

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 89

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> chain

<223> Light chain sequence of Sanofi antibody

<400> 89

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

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

Glu 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 Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

<223> Light chain sequence of Lmab antibody

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 92

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tetrapeptide linker

<400> 92

Gly Gly Phe Gly

1 4