



등록특허 10-2736878



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월05일
(11) 등록번호 10-2736878
(24) 등록일자 2024년11월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 38/05* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/6871 (2017.08)
A61K 38/05 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7001376
- (22) 출원일자(국제) 2018년06월22일
심사청구일자 2021년06월22일
- (85) 번역문제출일자 2020년01월15일
- (65) 공개번호 10-2020-0062161
- (43) 공개일자 2020년06월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/039112
- (87) 국제공개번호 WO 2018/237335
국제공개일자 2018년12월27일
- (30) 우선권주장
62/524,382 2017년06월23일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문현
W02017127664 A1
Blood, 제122권, 제21호, 제1637면 (2013년)
KR1020150046111 A

(73) 특허권자
밸로스바이오 인코포레이티드
미국 92121 캘리포니아주 샌디에이고 로젤 스트리트
11045 스위트 130

(72) 발명자
란누티, 브라이언
미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 메리필드 로
우 3210 벨로스바이오 인코포레이티드. 내
제순, 카티
미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 메리필드 로
우 3210 벨로스바이오 인코포레이티드. 내
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

전체 청구항 수 : 총 5 항

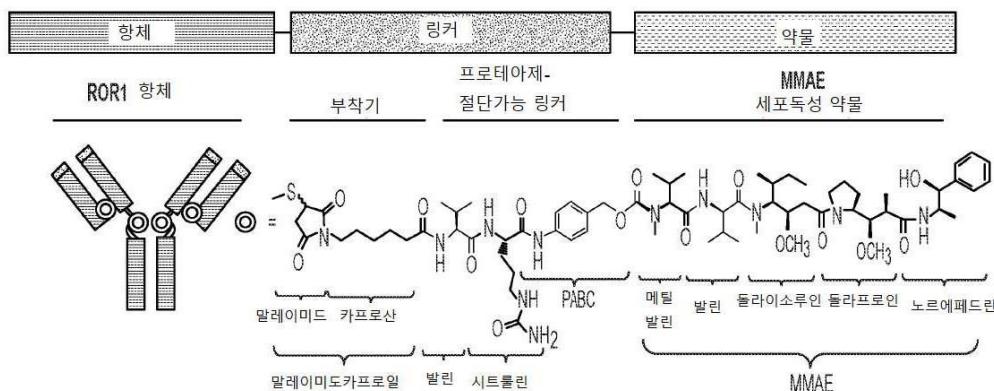
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 ROR1 항체 면역접합체

(57) 요약

본 발명은 항-ROR1 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 약물 모이어티를 포함하는 면역접합체를 제공한다. 이를 면역접합체는 ROR1 발현 암의 치료를 위해 유용하다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/6811 (2017.08)
A61K 47/6817 (2017.08)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/02 (2018.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/572 (2013.01)

(72) 발명자

보, 탄-트랑

미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 메리필드 로
우 3210 벨로스바이오 인코포레이티드. 내

왓킨스, 제프리 딘

미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 메리필드 로
우 3210 벨로스바이오 인코포레이티드. 내

(30) 우선권주장

62/524,386 2017년06월23일 미국(US)
62/524,388 2017년06월23일 미국(US)

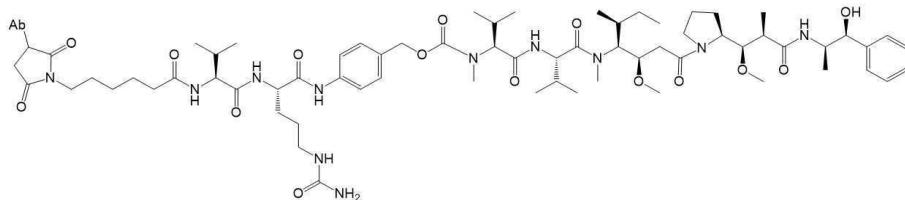
명세서

청구범위

청구항 1

링커 및 세포독성 약물 모이어티에 접합된 항체를 포함하고, 항체의 V_H 및 V_L 은 각각 서열 번호 5 및 6의 아미노산 서열을 포함하고, 링커는 항체 상의 시스테인 잔기와 공유결합을 형성하고, 항체에 대한 세포독성 약물 모이어티의 비(DAR)가 3 내지 6이고,

하기 구조를 갖는 ADC-A인 면역접합체:



상기 구조에서, Ab가 항체이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

항체의 중쇄 및 경쇄가 각각 서열 번호 3 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 면역접합체.

청구항 3

제1항의 면역접합체 및 약학적 허용 부형제를 포함하는, ROR1-발현 암을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

브루톤스 티로신 키나제(BTK) 억제제, B-세포 림프종 2(Bcl-2) 억제제, 라파마이신의 포유동물 타겟(mTOR) 억제제 및 포스포이노시티드 3-키나제(PI3K) 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 추가의 치료제를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 5

인간 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1)에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는 단계; 및

모노메틸 오리스타틴 E(MMAE)를 항체에 접합시키는 단계

를 포함하며;

여기서 항체의 중쇄가 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하고 항체의 경쇄가 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하고, 링커는 항체 상의 시스테인 잔기와 공유결합을 형성하고, 항체에 대한 세포독성 약물 모이어티의 비(DAR)가 3 내지 6인,

제1항의 면역접합체의 제조 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

관련 출원에의 교차-참고

[0002]

본 출원은 미국 특허 출원 62/524,382호, 62/524,386호, 및 62/524,388호로부터의 우선권을 주장하며, 이들 모두는 2017년 6월 23일에 출원되었다. 이를 우선권 출원의 내용은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0003]

서열 목록

[0004]

본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되었으며 그 전체가 참고로 본원에 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2018년 6월 21일에 생성된 상기 ASCII 카피는 명칭이 024651_W0002_SL.txt이고 크기가 58,100 바이트이다.

배경 기술

[0005]

암은 관상동맥 질병 다음으로 두번째의 인간 사망의 주된 원인이다. 수용체 티로신 키나제(RTK)가 종양형성 형질전환, 성장 및 전이에서 핵심 역할을 한다. RTK는 세포 분화, 증식, 이동, 혈관신생 및 생존을 조절한다. 수용체 티로신 키나제-유사 고아(orphan) 수용체 1(ROR1)은 ROR 서브페밀리에 속하는, 진화적으로-보존된 타입 I 막 단백질이며, 면역글로불린(Ig)-유사, 프리즐드(Frizzled), 및 크링글(Kringle) 도메인을 함유하는 세포외 도메인을 가진다. ROR1-결핍 마우스는 골격계 및 비뇨생식계내에서의 다양한 표현형 결함 및 출생후 성장 지연을 나타낸다. ROR1은 배발생동안 그리고 다양한 상이한 암에 의해 발현되지만, 정상적인 산후 조직에 대해서는 발현되지 않으며, 종양-배아 표면 항원으로 고려될 수 있다. 기능적 데이터는 ROR1이 비-표준적 WNT-시그널링에서 기능하여 악성 세포의 생존을 촉진할 수 있음을 제안한다.

[0006]

ROR1 발현 및 활성화는 만성 림프구성 백혈병(CLL), 유방암, 폐암, 위암, 및 후색종의 모델에서 종양 악성도 (aggressiveness)의 특징과 상관되는 것으로 나타난다(Li et al., *PLoS One* 5(7):e11859 (2010); Gentile et al., *Cancer Res.* 71(8):3132-41 (2011); Zhang et al., *PLoS One* 7(3):e31127 (2012); Yamaguchi et al., *Cancer Cell*. 21(3):348-61 (2012); Daneshmanesh et al., *Leukemia* 26(6):1348-55 (2012); Daneshmanesh et al., *Leuk Lymphoma* 54(4):843-50 (2013); O'Connell et al., *Cancer Discov.* 3(12):1378-93 (2013); Hojjat-Farsangi et al., *PLoS One* 8(4):e61167 (2013); Hojjat-Farsangi et al., *PLoS One* 8(10):e78339 (2013); Ida et al., *Cancer Sci.* 107(2):155-61 (2016); 및 Janovska et al., *Clin Cancer Res.* 22(2):459-69 (2016)). 환자 및 세포주에서 상승된 수준의 ROR1 발현은 상피-간엽 변성(epithelial-mesenchymal transition)(EMT)에 관련된 유전자와 연관된다(Cui et al., *Cancer Res.* 73(12):3649-60 (2013)). CLL을 가진 환자에서, 높은 수준의 ROR1 발현은 더 짧은 무치료 생존 및 전체 생존(OS)과 연관된다(Cui et al., *Blood* 128(25):2931-2940 (2016)). 유사하게, 난소암을 가진 환자에서, 높은 ROR1 발현은 좋지 못한 임상 결과와 연관된다(Zhang et al., *Sci Rep.* 4:5811 (2014)).

[0007]

암에서 ROR1의 역할에 비추어 볼때, ROR1-양성 암세포를 타겟팅하는 새롭고 개선된 치료법이 필요하다.

발명의 내용**과제의 해결 수단**

[0008]

본 발명은 $Ab-((L)m-(D))n$ 의 식을 갖는 면역접합체를 제공하며, 여기서 Ab는 인간 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이며; L은 링커이고, m은 0 또는 1이며; D는 세포독성 약물 모이어티(moiety)이고; n은 1 내지 10의 정수이다.

[0009]

세포독성 약물 모이어티는 예를 들어, 항-튜불린 약제, DNA 알킬화제, DNA 가교제, DNA 삽입제(intercalating agent) 및 RNA 폴리머라제 II 억제제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포독성 약

물 모이어티는 모노메틸 오리스타틴(auristatin) E(MMAE), 아조나피드(azonafide), α -아마니틴(amanitin), 듀오카르마이신(duocarmycin) TM, 피롤로벤조다이아제핀(pyrrolobenzodiazepine)(PBD), PNU-159682, 및 그의 약학적 허용 염, 에스테르 및 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0010] 면역접합체내의 링커는 절단가능 모이어티를 포함할 수 있다. 이것은 타겟 세포내에서 절단될 수 있다. 대안적으로, 링커는 절단가능하지 않다. 링커는 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 발린-시트룰린(VC), 발린-알라닌(VA), 파라-아미노벤질옥시카르보닐(PAB), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 다이아미노프로페온산(DPR), Phe-C₄, C₂-Gly₃, C₆ 알킬, 다이메틸에틸아민(DMEA), 및 에틸렌 다이아민(EDA)으로부터 선택된 하나 이상의 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 링커의 석신이미드, 카르보닐 또는 시클로옥텐 또는 트라이아졸 기에서 항체 또는 항원-결합 단편에 공유적으로 결합된다.

[0011] 일부 실시형태에서, 면역접합체내의 항체 또는 단편은 6-말레이미도카프로일(MC)-VC-PAB; 6-MC-C₆; 6-MC-PEG4-VC-PAB-DMEA; 6-MC-PEG4-VA; 6-MC-DPR-VC-PAB; 6-MC-Phe-C₄-VC-PAB; 6-MC-Phe-C₄-VC-PAB-DMEA; 6-MC-C₂-Gly₃-EDA; 다이벤질시클로옥틴(DBCO)-(PEG2-VC-PAB)₂; DBCO-PEG4-VC-PAB-DMEA; 및 N-석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트-VC-PAB로 이루어진 군으로부터 선택되는 모이어티와의 반응에 의해 링커에 공유적으로 결합된다. 본 명세서에서 사용될 때, VC는 발린-시트룰린 디펩티드를 나타내며; VA는 발린-알라닌 디펩티드를 나타내며; PEG는 폴리에틸렌 글리콜을 나타내며; PAB는 파라-아미노-벤질옥시카르보닐을 나타내며; DMEA는 다이메틸에틸아민을 나타내며; Phe는 벤질기를 나타내며; 그리고 EDA는 에틸렌 다이아민을 나타낸다.

[0012] 본 발명은 또한 Ab-((L)_m-(D))_n의 식을 가진 면역접합체를 제공하며, 여기서 Ab는 인간 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이며; L은 절단가능 링커이고, m은 0 또는 1이며; D는 오리스타틴(예를 들어, MMAE)이고; n은 1 내지 10의 정수이다.

[0013] 본 발명의 면역접합체에서, 링커는 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편에 공유적으로 결합된 헤테로사이클 또는 카르보닐, 헤테로사이클 또는 카르보닐에 공유적으로 결합된 스페이서(spacer)기, 및 세포독성 약물 모이어티에 공유적으로 결합된 에스테르, 티오에스테르, 아미드, 카보네이트, 티오카보네이트 또는 카바메이트를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스페이서기는 아미노산, 폴리아미노산 또는 아미노 벤질기, 또는 그의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체내의 링커는 항체 또는 단편상의 시스테인 또는 리신 잔기와 공유결합을 형성한다.

[0014] 본 발명의 면역접합체의 Ab(항체 또는 그의 단편) 성분은 각각 서열 번호 3 및 4의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체와 동일한 ROR1 에피토프에 결합할 수 있다. 항체 또는 단편은 서열 번호 3에서의 중쇄 상보성-결정 영역(CDR) 1-3(HCDR1-3) 및 서열 번호 4에서의 경쇄 CDR1-3(LCDR1-3)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 단편은 서열 번호 7-9의 아미노산 서열을 포함하며, 항체의 경쇄는 서열 번호 10-12의 아미노산 서열을 포함한다. 항체 또는 단편은 인간화될 수 있다. 항체 또는 단편은 하기 특성 중 하나 이상을 가질 수 있다: a) 인간 세포에서의 ROR1 내부화(internalization)를 촉진함; b) 100 nM 미만(예를 들어, 50, 40, 30, 20, 또는 10 nM 미만)의 K_D로 인간 ROR1에 결합함; 및 c) 500 nM 이하(예를 들어, 400 nM 이하, 300 nM 이하, 200 nM 이하 또는 100 nM 이하)의 EC₅₀으로 시험관내에서 ROR1⁺ 인간 암세포의 성장을 억제함.

[0015] 일부 실시형태에서, 면역접합체내의 항체의 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)은 a) 각각 서열 번호 5 및 6; b) 각각 서열 번호 5 및 50; c) 각각 서열 번호 48 및 6; 또는 d) 각각 서열 번호 48 및 50의 아미노산 서열을 포함한다. 항체는 인간 IgG₁ 불변 영역 및 선택적으로 또한 인간 κ 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시형태에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 a) 각각 서열 번호 3 및 4; b) 각각 서열 번호 3 및 49; c) 각각 서열 번호 47 및 4; 또는 d) 각각 서열 번호 47 및 49의 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 일부 실시형태에서, 면역접합체의 Ab 성분은 Fab, F(ab)₂, 또는 scFv, 예를 들어, Fab, F(ab)₂, 또는 scFv이다.

[0017] 본 발명의 구체적 실시형태는 세포독성 약물 모이어티에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체를 포함하며, 여기서 항체의 V_H 및 V_L은 각각 서열 번호 5 및 6의 아미노산 서열을 포함한다. 그러한 면역접합체의 예는 하기의 표 2와 3에 나타나며, 항체-약물 접합체(ADC)-A, E, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, 및 R을 포함한다. 추가 실시 형태에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 각각 서열 번호 3 및 4의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0018] 본 발명의 면역접합체에서, 항체 또는 단편 당 약물 모이어티의 수, 또는 항체 또는 단편에 대한 세포독성 약물 모이어티의 비(DAR)는 1 내지 10, 예를 들어, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 2 내지 7, 2 내지 6, 또는 2 내지 5일 수 있다.
- [0019] 본 발명은 또한 본 발명의 면역접합체 및 약학적 허용 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 약학 조성물은 추가로 브루톤스 티로신 키나제(Bruton's tyrosine kinase)(BTK) 억제제, B-세포 림프종 2(Bcl-2) 억제제, 라파마이신(rapamycin)의 포유동물 타겟(mTOR) 억제제, 및 포스포이노시티드 3-키나제(PI3K) 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 추가의 치료제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 치료제는 이브루티닙(ibrutinib), 아칼라브루티닙(acalabrutinib), 베네토클랙스(venetoclax), 에버롤리무스(everolimus), 사파니세르틴(sapanisertib) 및 이델랄리십(idelalisib)으로부터 선택된다.
- [0020] 본 발명은 또한 본 발명의 면역접합체의 치료적 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 치료법 또는 방법을 제공한다. 암은 ROR1 발현에 대해 동종성이거나 이종성(heterogeneous)일 수 있으며 예를 들어, 백혈병, 림프종 또는 고형 종양일 수 있다. 일부 실시형태에서, 암은 만성 림프구성 백혈병(CLL), T-세포 백혈병(TCL), 외투 세포 림프종(MCL), 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 다발성 골수종(MM), 변연부 림프종(marginal zone lymphoma)(MZL), 소 림프구성 림프종(small lymphocytic lymphoma)(SLL), 또는 리히터 형질전환(Richter's transformation)을 거친 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma)(NHL)이다. 일부 실시형태에서, 암은 비-소세포 폐암(NSCLC), 간세포 암종, 췌장암, 골육종, 두경부암, 난소암, 유방암 또는 삼중 음성 유방암(triple negative breast cancer)(TNBC)이다.
- [0021] 본 발명의 치료법 또는 치료 방법은 추가로 예를 들어, 브루톤스 티로신 키나제(BTK) 억제제, B-세포 림프종 2(Bcl-2) 억제제, 라파마이신의 포유동물 타겟(mTOR) 억제제, 및 포스포이노시티드 3-키나제(PI3K) 억제제일 수 있는 추가의 항암 치료제를 환자에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 추가의 치료제는 이브루티닙, 아칼라브루티닙, 베네토클랙스, 에버롤리무스, 사파니세르틴 및 이델랄리십으로부터 선택된다.
- [0022] 본 치료법 또는 치료 방법의 일부 실시형태에서, 암은 CLL, MCL 또는 리히터 형질전환을 일으킨 NHL이다.
- [0023] 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 치료법 또는 치료 방법에서 암의 치료에 사용하기 위한 본 명세서에 개시된 면역접합체 및 약학 조성물을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암의 치료에 사용하기 위한, $Ab-((L)m-(D))n$ 의 식을 가진 면역접합체를 제공하며, 여기서 Ab는 인간 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이며; L은 링커이고, m은 0 또는 1이며; D는 세포독성 약물 모이어티이고; n은 1 내지 10의 정수이다. 면역접합체 및 치료의 예시적인 실시형태가 상기에 개시되며 하기에서 더 개시될 것이다.
- [0024] 본 발명은 또한 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암의 치료에 사용하기 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 면역접합체의 용도를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 환자에서의 암의 치료에서 의약의 제조를 위한, $Ab-((L)m-(D))n$ 의 식을 가진 면역접합체의 용도를 제공하며, 여기서 Ab는 인간 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이며; L은 링커이고, m은 0 또는 1이며; D는 세포독성 약물 모이어티이고; n은 1 내지 10의 정수이다. 면역접합체 및 치료의 예시적인 실시형태가 상기에 개시되며 하기에서 더 개시될 것이다.
- [0025] 본 발명은 또한 인간 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하고; 항체에 항-튜불린 약제, DNA 알킬화제, DNA 가교제, DNA 삼입제 및 RNA 폴리머라제 II 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 세포독성 약물 모이어티를 접합시키는 것을 포함하는, 면역접합체의 제조 방법을 제공하며, 여기서 항체의 중쇄는 서열 번호 7-9의 아미노산 서열을 포함하고, 항체의 경쇄는 서열 번호 10-12의 아미노산 서열을 포함한다. 면역접합체의 예시적인 실시형태가 상기에 개시되며 하기에서 더 개시될 것이다.
- [0026] 본 발명은 또한 본 발명의 면역접합체를 포함하는, 키트와 같은 제조 물품을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 본 발명의 면역접합체의 비-제한적인 예를 보여주는 구성도이다.
- 도 2a 및 2b는 ROR1-양성 세포 Jeko-1(2a) 및 MDA-MB-231(2b)에의 다양한 농도의 Ab1 및 ADC-A의 결합을 보여

주는 그래프이다. Ab1 및 ADC-A에 대한 EC₅₀ 값이 각 그래프 아래에 나타난다. 비접합 Ab1 및 ADC-A에 대한 EC₅₀ 값 사이의 유사성은 약물 접합이 타겟 세포에의 Ab1의 결합에 대해 최소의 영향을 미침을 입증한다.

도 3a 및 3b는 Jeko-1 세포에의 Ab1, 4A5, ADC-A 및 ADC-T(3a), 및 Ab1, ADC-A, D10 및 ADC-S(3b)의 결합을 보여주는 그래프이다. 항체 및 면역접합체에 대한 EC₅₀ 값이 각 그래프의 아래에 나타난다. 비접합 항체 및 상응하는 ADC 작제물의 EC₅₀ 값 사이의 유사성은 약물 접합이 타겟 세포에의 항체의 결합에 대해 최소의 영향을 미침을 입증한다. Ab1/ADC-A와 D10/ADC-S 사이의 EC₅₀ 값의 차이는 D10에 비교할 때, ROR1에 대한 Ab1의 더 높은 친화성을 반영한다.

도 4a 및 4b는 Jeko-1 세포내로의 Ab1, ADC-A, 및 ADC-B의 내부화(4a), 및 MDA-MB-231 세포내로의 Ab1 및 ADC-A의 내부화(4b)를 보여주는 그래프이다. ADC-A 및 ADC-B에서 입증된 바와 같이, Ab1에의 링커 및 탑재물(payload)의 추가는 그의 결합 또는 내부화에 부정적으로 영향을 미치지 않았다.

도 5는 MDA-MB-231 세포에서 Ab1의 내부화 속도를 보여주는 그래프이다. 그래프는 초기에는 빠른 속도의, 그리고 그 후에는 더 느린 속도의 세포 표면 수용체 소거(clearance)를 보여준다.

도 6은 Jeko-1 세포내로의 Ab1 내부화동안 ROR1의 세포 표면 발현을 보여주는 그래프이다. Ab1은 신속하게 내부화되는 반면, 세포 표면 ROR1의 정량은 처음 10분에는 작은 감소를 보여주며, 후속 측정은 처음 또는 약간 더 높은 수준으로의 ROR1 표면 발현의 회복을 나타낸다.

도 7a-c는 Jeko-1 세포(7a), MDA-MB-468 세포(7b), 및 MDA-MB-231 세포(7c)에서의 Ab1 내부화동안 ROR1의 세포 표면 발현을 보여주는 그래프이다.

도 8a-8i는 암세포주 TMD-8(8a), HBL-1(8b), DOHH2(8c), MDA-MB-468(8d), Bt549(8e), TOV112D(8f), JHOM1(8g), SKOvr3(8h), 및 Mino(8i)에서, 비접합 MMAE뿐만 아니라 본 발명의 면역접합체에 의한 ROR1 결합을 보여주는 대표적인 IC₅₀ 플롯이다.

도 9는 100 µg/mL Ab1으로 전처리하거나 전처리없이, Jeko-1 세포에서 3, 10, 또는 30 µg/mL의 ADC-A에 의한 세포 증식 억제를 보여주는 그래프이다. ADC-A는 용량-의존 방식으로 세포 증식을 억제하였다. Ab1과 함께 세포를 사전-항온처리하면 이 활성이 감소되는데, 세포 증식에 대한 ADC-A의 억제 활성이 ROR1에의 ADC-A의 결합에 의해 매개되었음을 입증한다.

도 10은 비히클, 10 mg/kg Ab1, 또는 1 mg/kg, 2 mg/kg, 또는 5 mg/kg ADC-A로 처리시에 TCL1-ROR1 만성 림프 구성 백혈병 마우스 모델에서 백혈병 세포 종양 부담의 용량-의존적 억제를 보여주는 그래프이다.

도 11은 비히클, 5 mg/kg ADC-A 또는 ADC-Q를 4일마다(Q4D) 정맥내로(IV), 1주일에 한번씩 IV로 10 mg/kg Ab1을, 또는 매일(QD) 20 mg/kg 이브루티닙을 경구로(PO), 처리시에 MCL 이종이식 모델에서 종양 성장 억제를 보여주는 그래프이다. ADC-A 처리는 종양 퇴행을 야기하였다.

도 12는 ROR1 발현(좌측 패널), 및 대조군, 10 mg/kg QW Ab1, 50 mg/kg 베네토클렉스 QD, Ab1 + 베네토클렉스, 또는 5 mg/kg ADC-A QW 처리시에 DLBCL-GCB 이종이식 마우스 모델에서 종양 성장 억제(우측 패널)를 보여주는 그래프 쌍이다. ADC-A 처리는 처리된 모든 동물에서 완전한 종양 퇴행을 야기하였다. Ab1 단독, 베네토클렉스 단독 및 Ab1과 베네토클렉스의 조합은 비효과적이었다.

도 13은 화학요법-저항성 리히터 형질전환 이종이식 마우스 모델에서, ROR1 발현(좌측 패널), 및 비히클, 2.5 또는 5 mg/kg ADC-A, 또는 10 mg/kg Ab1로 처리시에 종양 성장의 억제(우측 패널)를 보여주는 그래프 세트이다. 종양내 세포의 20-30%만이 ROR1-양성이었음에도 불구하고, 5 mg/kg ADC-A에서 완전하고 지속적인 종양 퇴행이 관찰되었다.

도 14는 MDA-MB-231 삼중 음성 유방암(TNBC) 유방 지방 패드(mammary fat pad) 이종이식 마우스 모델에서 비히클, 1 또는 5 mg/kg ADC-A IV QW, 1 또는 5 mg/kg ADC-B IV QW, 또는 10 mg/kg Ab1 IV QW 처리시에 종양 성장 억제를 보여주는 그래프이다.

도 15는 BR5011 인간 TNBC 이종이식 마우스 모델에서 비히클, 1 또는 5 mg/kg ADC-A IV Q4D, 또는 10 mg/kg Ab1 IV QW 처리시에 종양 성장 억제를 보여주는 그래프이다. 종양내 세포의 58%만이 ROR1-양성이었음에도 불구하고, 5 mg/kg ADC-A에서 완전하고 지속적인 퇴행이 관찰되었으며, 여기서 종양 퇴행은 마지막 용량 후 적어도 28일동안 유지되었다.

도 16은 BR5015(낮은 ROR1 발현) 인간 TNBC 이종이식 마우스 모델에서 비히클, 1 또는 5 mg/kg ADC-A IV Q4D, 또는 10 mg/kg Ab1 IV QW 처리시에 종양 성장 억제를 보여주는 그래프이다. 종양내 세포의 58%만이 ROR1-양성이었음에도 불구하고, 종양 퇴행이 관찰되었다.

도 17은 Jeko-1 인간 외투 세포 램프종 이종이식 마우스 모델에서 종양 성장 억제를 보여주는 그래프이다. 마우스를 비히클; 1 mg/kg ADC-N, ADC-P, 또는 ADC-R; 또는 5 mg/kg ADC-A, ADC-L, ADC-M, ADC-S 또는 ADC-T로 처리하였다. 비히클 및 ADC 작제물을 IV Q4D 투여하였다. ADC-A, ADC-L, ADC-M 및 ADC-S로 처리된 동물에서 상당한 종양 퇴행이 관찰된 한편, ADC-N, ADC-P, ADC-R 및 ADC-T로 처리된 동물에서 종양 성장의 억제가 관찰되었다.

도 18a 및 18b는 다양한 세포주에서 ADC-A 및 BTK 억제제 이브루티닙(18a) 또는 ACP-196/아칼라브루티닙(18b)의 처리의 조합 지수(combination index)를 보여주는 그래프이다. ADC-A는 세포 증식의 억제에 대해 이브루티닙 및 ACP-196/아칼라브루티닙 둘 모두와 상승적 효과를 나타냈다.

도 19a 및 19b는 ADC-A, 이브루티닙("Ib"), 또는 ADC-A와 이브루티닙의 조합(19a); 또는 ADC-A, ACP-196/아칼라브루티닙("ACP196" 또는 "196"), 또는 ADC-A와 ACP-196/아칼라브루티닙의 조합(19b)으로 처리시에 Jeko-1 세포 증식의 억제를 보여주는 그래프이다.

도 20a-c는 다양한 세포주에서 ADC-A 및 Bcl-2 억제제 ABT-199/베네토클랙스("ABT199")의 처리(20a)의, 또는 Jeko-1 세포(20b) 또는 Mino 세포(20c)에서 ADC-A와 Bcl-2 억제제 Bcl-2i-1 또는 Bcl-2i-2의 처리의, 조합 지수를 보여주는 그래프이다. ADC-A는 MCL 및 DLBCL 세포 증식 둘 모두의 억제에 대해 ABT-199와 상승적 효과를 나타냈다. ADC-A는 또한 Jeko-1 세포 증식의 억제에 대해 다른 Bcl-2 억제제(Bcl-2i-1 및 Bcl-2i-2)와 상승적 효과를 나타냈으며, Mino 세포 증식의 억제에 대해 두 억제제와 상가 효과를 나타냈다.

도 21은 ADC-A, ABT-199, 또는 ADC-A와 ABT-199의 조합으로 처리시에 Jeko-1 세포 증식의 억제를 보여주는 그래프이다.

도 22는 다양한 세포주에서 ADC-A 및 mTOR1/2 억제제 INK128/사파니세르팁("INK128")의 처리의 조합 지수를 보여주는 그래프이다. ADC-A는 MCL 및 DLBCL 세포 증식 둘 모두의 억제에 대해 INK128과 상승적 효과를 나타냈다.

도 23은 ADC-A, INK128, 또는 ADC-A와 INK128의 조합의 처리시에 Jeko-1 세포 증식의 억제를 보여주는 그래프이다.

도 24는 다양한 세포주에서 ADC-A 및 PI3K 억제제 CAL-101/이델랄리십("CAL101")의 처리의 조합 지수를 보여주는 그래프이다. ADC-A는 MCL 및 DLBCL 세포 증식 둘 모두의 억제에 대해 CAL101과 상승적 효과를 나타냈다.

도 25a 및 25b는 DLBCL-ABC 세포주 TMD-8에서(25a) 또는 DLBCL-GCB 세포주 DOHH2에서(25b), ADC-A, PI3K 억제제 CAL-101/이델랄리십("CAL101" 또는 "101") 또는 ADC-A와 CAL101의 조합으로 처리시에 세포 증식의 억제를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

본 발명은 식 $Ab-((L)_m-(D))_n$ 의 면역접합체를 제공하며, 여기서 Ab는 ROR1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이며; L은 링커이고; D는 암에서 치료 활성을 갖는 약물 모이어티이고; m은 0 또는 1이며; 그리고 n은 1 내지 10의 정수이다. 식에서, 대시 기호 "-"는 공유 또는 비-공유 결합을 나타낸다. 항체 또는 단편은 인간 ROR1에의 결합을 위해 항체 D10 또는 Ab1과 경쟁하거나, 또는 D10 또는 Ab1과 동일한 애피토프에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약물 모이어티는 다른 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 폴리펩티드, 소분자 화합물, 핵산 분자, 예를 들어, 소 간섭 RNA 분자 또는 안티센스 분자를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 면역접합체는 ROR1-양성 암과 같은 다양한 암을 치료하기 위해 이용될 수 있다.

[0029]

1. 면역접합체

[0030]

"항체-약물 접합체" 또는 "ADC" 또는 "면역접합체"는 하나 이상의 생물학적 활성 분자(들)에, 링커가 있거나 없이, 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합되는 항체 분자 또는 그의 항원-결합 단편을 말한다. 본 면역접합체는 인간 ROR1에 대해 특이적인 항체 또는 그의 단편을 포함하며, 따라서 접합된 탑재물을 ROR1-양성 세포로 전달하기 위한 우수한 타겟팅 모이어티로서 작용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 ROR1 면역접합체는 인간 ROR1에 대해 약 1 μM , 100 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM,

0.1 nM, 0.05 nM, 0.01 nM, 또는 0.001 nM 또는 그 미만(예를 들어, 10^{-8} M 이하, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 또는 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 평형 해리 상수(K_D)를 갖는다. K_D 는 (예를 들어, 비아코어(BIACORE)®-2000 또는 비아코어®-3000을 이용하는) 표면 플라즈몬 공명 분석과 같은 임의의 적합한 분석에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체의 K_D 는 D10 항체를 위한 K_D 보다 적다. 일부 실시형태에서, 인간 ROR1에 대한 본 발명의 면역접합체의 K_D 는 약 50, 40, 30, 20, 또는 10 nM 미만(예를 들어, 40 nM)이다. 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 ROR1 면역접합체는 시험관내에서 $ROR1^+$ 인간 암세포의 성장을 약 500, 400, 350, 300, 또는 250 nM 또는 그 미만(예를 들어, 300 nM 이하)의 EC_{50} 으로 억제한다. 본 명세서에서 사용될 때, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 또는 생물층 간섭계(Bio-Layer Interferometry)에 의해 결정할 때, 항체가 100 nM 이하의, 예를 들어, 10 nM 이하보다 적은(예를 들어, 1~5 nM), K_D 로 항원에 결합할 때, 항체는 항원에 특이적으로 결합한다고 한다.

[0031] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 면역접합체는 주로 리소좀/엔도좀 경로를 통해 ROR1-양성 세포에 의해 내부화된다. 구체적 실시형태에서, 내부화는 세포 표면상의 ROR1 발현 수준과는 독립적이다.

[0032] 면역접합체에 사용되는 항체 또는 그의 단편, 링커, 및 약물 모이어티의 실시형태는 하기에서 더 상세하게 개시된다.

1.1. 항체의 타입 및 구조

[0034] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 본 명세서에서 사용되며 다클론 및 단클론 항체, 예를 들어, 그대로의 항체 및 그의 기능성(항원-결합) 단편을 포함한다. 이 용어는 면역글로불린의 유전적 조작된 및/또는 다르게 변형된 형태, 예를 들어, 인트라바디(intrabody), 펩티바디(peptibody), 키메릭 항체(chimeric antibody), 완전 인간 항체, 인간화 항체, 및 이종접합체 항체, 다중-특이적(예를 들어, 이종특이적) 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 및 테트라바디(tetraabody), 텐덤(tandem) di-scFv, 및 텐덤 tri-scFv를 포함한다. 달리 나타내지 않으면, 이 용어는 임의의 클래스 또는 서브클래스의 항체(예를 들어, IgG 및 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 및 IgG₄; IgM; IgE; IgA; 및 IgD와 같은 그의 서브-클래스)를 비롯한 그대로의 또는 전장 항체, 및 항체 단편을 포함한다.

[0035] 항체는 중쇄(또는 그로부터 유래된 폴리펩ти드 서열) 및 경쇄(또는 그로부터 유래된 폴리펩티드 서열)을 포함할 수 있다. 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항원에의 항체의 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 말한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 V_H 및 V_L)은 일반적으로 유사한 구조를 가져서, 각 도메인은 4개의 보존된 골격 영역 및 3개의 상보성-결정 영역을 포함한다. 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 때로는 항체의 항원-결합 특이성의 전부 또는 대부분을 부여하기에 충분할 수 있다. 더욱이, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각 상보성 V_L 또는 V_H 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 그 항원에 결합하는 항체로부터의 V_H 또는 V_L 도메인을 이용하여 분리될 수 있다. 예를 들어, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)를 참고한다.

[0036] "초가변 영역" 또는 "HVR"과 동의어인 용어 "상보성-결정 영역" 및 "CDR"은 그의 항원에 대한 항체의 특이성 및/또는 친화성을 부여하는, 항체 가변 도메인내의 하위영역을 말한다. 일반적으로, 각 중쇄 가변 도메인에 3개의 CDR(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 그리고 각 경쇄 가변 도메인에 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)이 있다. "골격 영역"(FR)은 가변 도메인의 비-CDR 부분을 말한다. 일반적으로, 각 전장 중쇄 가변 도메인에 4개의 FR 그리고 각 전장 경쇄 가변 도메인에 4개의 FR이 있다. 주어진 CDR 또는 FR의 정확한 아미노산 서열 경계는 Kabat et al., 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)(("카밧(Kabat)" 넘버링 체계); Al-Lazikani et al., *JMB* 273:927-948 (1997)(("초티아(Chothia)" 넘버링 체계)); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996)(("접촉(contact)" 넘버링 체계)); Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27(1):55-77 (2003)(("IMGT" 넘버링 체계)); 및 Honegger and Pluckthun, *J Mol Biol.* 309(3):657-70 (2001)(("아호(Aho)" 넘버링 체계))에 의해 개시된 것을 비롯한, 잘 알려진 여러가지의 체계 중 어느 것을 이용하여 쉽게 결정될 수 있다.

[0037] 주어진 CDR 또는 FR의 경계는 확인을 위해 이용되는 체계에 따라 변할 수 있다. 예를 들어, 카밧 체계는 서열 배열에 기초하는 한편, 초티아 체계는 구조적 정보에 기초한다. 카밧 및 초티아 체계 둘 모두를 위한 넘버링은

가장 일반적인 항체 영역 서열 길이에 기초하며, 삽입 문자, 예를 들어, "30a"에 의해 삽입이 수용된다. 두 체계는 일부 삽입과 결실("indels")을 상이한 위치에 두어, 차등적 넘버링을 야기한다. 접촉 체계는 복잡한 결정 구조의 분석에 기초하며 많은 점에서 초티아 넘버링 체계와 유사하다. 달리 나타내지 않으면, 본 명세서에서 언급되는 항체의 CDR은 카밧, 초티아, IMGT, 및 접촉 방법 중 어느 것에 따라 확인될 수 있다.

[0038] 전장 항체의 항원-결합 단편은 본 발명의 면역접합체의 제조에서 사용될 수 있다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 재조합 IgG(rIgG) 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자(예를 들어, scFv 또는 sFv); 단일 도메인 항체(예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디(nanobody)); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중-특이적 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 단편은 가변 중쇄 영역 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함하는 단일쇄 항체 단편, 예를 들어, scFv이다.

1.2 예시적인 ROR1 항체

[0040] 본 발명의 면역접합체는 ROR1, 예를 들어, 인간 ROR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 항체 또는 단편은 ROR1 단백질의 면역글로불린(Ig)-유사, 프리즐드, 및 크링글 도메인 중 하나 이상 내의 에피토프와 같은, ROR1 단백질의 세포외 부분에 결합한다. 일부 실시형태에서, ROR1-결합 항체 또는 단편은 서열 번호 1 또는 2에 나타난 ROR1의 아미노산 서열(접합 편의성을 위해 첨가된 말단 시스테인은 포함하지 않음)에 결합하며, ROR1⁺ 세포에 의해 내부화될 수 있으며; 그러한 항체의 예는 뮤린 항체 D10 및 99961이다. 미국 특히 9,217,040호 및 9,758,591호를 참고하며, 이들의 내용은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 단편은 인간 ROR1에의 결합을 위해 D10 또는 99961과 경쟁한다. 본 발명의 면역접합체에서 사용되는 예시적인 항-ROR1 항체의 아미노산 서열이 하기 표 1에 나타나며, 여기서 Ab1-Ab4는 항체 99961의 인간화 변이체이다.

[표 1] 예시적인 항-ROR1 항체의 서열 번호

Ab	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VH	HC	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VL	LC
99961	7	8	9	45	--	10	11	12	46	--
Ab1	7	8	9	5	3	10	11	12	6	4
Ab2	7	8	9	5	3	10	11	12	50	49
Ab3	7	8	9	48	47	10	11	12	6	4
Ab4	7	8	9	48	47	10	11	12	50	49
D10	27	28	29	25	--	30	31	32	26	--

[0042]

[0043] 일부 실시형태에서, 면역접합체내의 항체 또는 항체 단편은 인간 ROR1에 특이적으로 결합하며, 그의 중쇄 및 경쇄는 각각 하기를 포함한다:

- a) 서열 번호 3에서의 중쇄 CDR1-3(HCDR1-3) 아미노산 서열, 및 서열 번호 4에서의 경쇄 CDR1-3(LCDR1-3) 아미노산 서열;
- b) 각각 서열 번호 7-9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1-3, 및 각각 서열 번호 10-12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1-3;
- c) 서열 번호 13-15내의 HCDR1-3 아미노산 서열, 및 서열 번호 16-18내의 LCDR1-3 아미노산 서열;
- d) 각각 서열 번호 27-29의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1-3, 및 각각 서열 번호 30-32의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1-3;
- e) 각각 서열 번호 37-39의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1-3, 및 각각 서열 번호 40-42의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1-3;
- f) 각각 서열 번호 5의 잔기 26-33, 51-58, 및 97-105를 포함하는 HCDR1-3, 및 각각 서열 번호 6의 잔기 27-32, 50-52, 및 89-97을 포함하는 LCDR1-3;
- g) 각각 서열 번호 5의 잔기 26-32, 52-57, 및 99-105를 포함하는 HCDR1-3, 및 각각 서열 번호 6의 잔기 24-34, 50-56, 및 89-97을 포함하는 LCDR1-3;
- h) 각각 서열 번호 5의 잔기 31-35, 50-66, 및 99-105를 포함하는 HCDR1-3, 및 각각 서열 번호 6의 잔기

24-34, 50-56, 및 89-97을 포함하는 LCDR1-3;

[0052] i) 각각 서열 번호 5의 잔기 26-32, 52-57, 및 99-105를 포함하는 HCDR1-3, 및 각각 서열 번호 6의 잔기 27-32, 50-52, 및 89-97을 포함하는 LCDR1-3; 또는

[0053] j) 각각 서열 번호 5의 잔기 31-35, 52-57, 및 99-105를 포함하는 HCDR1-3, 및 각각 서열 번호 6의 잔기 27-32, 50-52, 및 89-97을 포함하는 LCDR1-3.

[0054] 일부 실시형태에서, 항체 또는 단편은 인간화되거나 또는 인간 불변 영역을 가진 키메릭이다. 추가 실시형태에서, 항체 또는 단편은 인간 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄ 불변 영역 및 선택적으로 인간 κ 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0055] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체는 항-ROR1 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하며, 여기서 항체는 하기를 포함한다:

[0056] a) 서열 번호 5의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%(예를 들어, 적어도 90%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 또는 영역(V_H), 및 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%(예를 들어, 적어도 90%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 또는 영역(V_L);

[0057] b) 각각 서열 번호 5와 6의 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 V_L;

[0058] c) 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%(예를 들어, 적어도 90%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%(예를 들어, 적어도 90%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(LC); 또는

[0059] d) 각각 서열 번호 3과 4의 아미노산 서열을 포함하는 HC 및 LC.

[0060] 일부 실시형태에서, 항체의 V_H 및 V_L 은 각각

[0061] a) 서열 번호 5 및 50;

[0062] b) 서열 번호 48 및 6; 또는

[0063] c) 서열 번호 48 및 50의 아미노산 서열을 포함한다.

[0064] 일부 실시형태에서, 항체 또는 단편은 인간 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄ 불변 영역 및 선택적으로 인간 κ 불변 영역을 포함한다.

[0065] 일부 실시형태에서, 항체의 HC 및 LC는 각각

[0066] a) 서열 번호 3 및 49;

[0067] b) 서열 번호 47 및 4; 또는

[0068] c) 서열 번호 47 및 49의 아미노산 서열을 포함한다.

[0069] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체는 (i) 각각 서열 번호 25 및 26; (ii) 각각 서열 번호 35 및 36; 또는 (iii) 각각 서열 번호 45 및 46의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 가진 뮤린 항체로부터 유래된 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 이들 서열로부터 유래된 항체는 예를 들어, 인간화되거나 또는 인간 Fc 영역에 연결된(예를 들어, 키메릭) 항체일 수 있다. 예를 들어, 면역접합체내의 항체 또는 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0070] a) 서열 번호 45의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열 번호 46의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L;

[0071] b) 서열 번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 V_L;

[0072] c) 서열 번호 25의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또

는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열 번호 26의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L ; 또는

[0073] d) 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 V_L .

[0074] 전술한 항체의 예시적인 코딩 서열은 하기 표 12에 나타난다. 예를 들어, 면역접합체내의 항체는 하기를 포함할 수 있다:

[0075] a) (i) 서열 번호 21의 뉴클레오티드 73-420, 또는 (ii) 서열 번호 23에 의해 인코딩된 V_H ; 및 서열 번호 22 또는 24에 의해 인코딩된 V_L ;

[0076] b) 서열 번호 52에 의해 인코딩된 V_H 및 서열 번호 54에 의해 인코딩된 V_L ;

[0077] c) 서열 번호 33에 의해 인코딩된 V_H 및 서열 번호 34에 의해 인코딩된 V_L ;

[0078] d) 서열 번호 19의 뉴클레오티드 73-1,410에 의해 인코딩된 HC 및 서열 번호 20의 뉴클레오티드 73-714에 의해 인코딩된 LC; 또는

[0079] e) 서열 번호 51에 의해 인코딩된 HC 및 서열 번호 53에 의해 인코딩된 LC.

[0080] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체는 항-ROR1 항체의 항원-결합 단편을 포함하며, 여기서 항원-결합 단편은 서열 번호 64-68 중 어느 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원-결합 단편은

[0081] a) 서열 번호 5 및 6;

[0082] b) 서열 번호 5 및 50;

[0083] c) 서열 번호 48 및 6;

[0084] d) 서열 번호 48 및 50;

[0085] e) 서열 번호 45 및 46; 또는

[0086] f) 서열 번호 25 및 26의 V_H 및 V_L 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 V_H 아미노산 서열은 선택적으로 서열 번호 62의 아미노산 서열에 연결되고/되거나 V_L 아미노산 서열은 선택적으로 서열 번호 63의 아미노산 서열에 연결된다.

1.3 항체 서열 비교

[0088] 기준 폴리펩티드 서열에 대한 퍼센트(%) 서열 동일성은 서열을 배열하고 만일 필요하면 최대 퍼센트 서열 동일성을 이루기 위하여 갭(gap)을 도입한 후, 기준 서열내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열내의 아미노산 잔기의 비율을 말한다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정할 목적을 위한 배열은 알려진 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, 또는 Megalign(DNASTAR)과 같은 공중이 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여, 이루어질 수 있다. 하지만, 본 발명의 목적을 위하여, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.)에 의해 만들어졌으며, 소스 코드는 미국 위성턴 디.씨. 20559 소재의 미국 저작권청(U.S. Copyright Office)에서 사용자 문서와 제출되었으며, 저작권청에 미국 저작권 등록 No. TXU510087호로 등록된다. ALIGN-2 프로그램은 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재의 제넨테크, 인크.로부터 공중이 이용가능하거나, 또는 소스 코드로부터 컴파일될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 비롯한 UNIX 운영 체제에서 사용하기 위하여 컴파일되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 변하지 않는다.

[0089] 아미노산 서열 비교를 위하여 ALIGN-2가 이용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성은 $100 \times$ 분수 X/Y와 같이 계산되며, 여기서 X는 서열 배열 프로그램 ALIGN-2에 의해 A와 B의 그 프로그램의 배열에서 동일한 매치로서 기록된 아미노산 잔기의 수이며, 그리고 Y는 B에서 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 같지 않을 것임이 이해될 것이다. 달리 구체적으로 명시하지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프

로그램을 이용하여 직전 문단에서 개시된 대로 수득된다.

[0090] 일부 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 변이체는 전형적으로 본 명세서에 구체적으로 개시된 폴리펩티드와 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에서 상이하다. 그러한 변이체는 자연 발생일 수 있거나 또는 예를 들어, 본 발명의 상기 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 변경하고 본 명세서에 개시된 폴리펩티드의 하나 이상의 생물 활성을 평가하고/하거나 많은 알려진 기술 중 어느 것을 이용하여 합성적으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열내로 적절한 변형을 도입하거나 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 그러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열로부터의 결실, 및/또는 서열내로의 삽입 및/또는 서열 내의 잔기의 치환을 포함한다. 최종 작제물이 원하는 특성, 예를 들어, 항원-결합을 보유한다면, 최종 작제물에 도달하기 위하여 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 만들어질 수 있다.

[0091] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "실질적으로 동일한"은 비교 알고리즘을 이용하여 측정할 때 비교 윈도우 또는 지정된 영역에 걸쳐 최대 대응을 위해 비교되고 배열될 때 동일한 서열 단위(예를 들어, 아미노산 잔기)의 비율을 가진 둘 이상의 서열을 말한다. 예를 들어, 만일 특정 영역에 걸쳐 서열 단위가 약 60% 동일, 약 65% 동일, 약 70% 동일, 약 75% 동일, 약 80% 동일, 약 85% 동일, 약 90% 동일, 약 95% 동일, 약 96% 동일, 약 97% 동일, 약 98% 동일, 또는 약 99% 동일하면 둘 이상의 서열은 "실질적으로 동일"할 수 있다. 그러한 비율은 두 서열 간의 "퍼센트 동일성"을 개시한다.

1.4 ROR1 항체의 제조 및 변형

[0093] 본 발명의 면역접합체에서 사용하기 위한 항-ROR1 항체는 인간 ROR1 또는 인간 ROR1 단백질의 단편으로 동물을 면역시켜서 만들 수 있다. 높은 친화성으로(예를 들어, nM 또는 더 낮은 범위의 K_D) 면역화 단편에 결합하는 항체는 ELISA와 같은 일상적 방법을 이용하여 스크리닝될 수 있다.

[0094] 만일 항체가 비-인간 항체라면, 이것은 인간화될 수 있다. "인간화" 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 아미노산 잔기가 비-인간(예를 들어, 마우스 또는 래트) 항체로부터 유래되고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 아미노산 잔기가 인간 FR로부터 유래되는 항체이다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 항체로부터 유래된 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 전형적으로 인간에 대해 면역원성을 감소시키기 위하여 인간화를 거친 한편, 모(parental) 비-인간 항체의 항원-결합 특이성과 친화성을 유지하는, 비-인간 항체의 변이체를 말한다. 일부 실시형태에서, 인간화 항체내의 일부 FR 잔기는 생성되는 항체의 항원-결합 특이성 및/또는 친화성을 회복하거나 개선하기 위하여 동족 비-인간 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0095] ROR1 항체 또는 단편은 ROR1 항체 또는 단편을 위한 코딩 서열을 함유하는 포유동물 숙주 세포에서 재조합적으로 제조될 수 있으며, 여기서 코딩 서열은 숙주 세포에서의 발현을 위해 적합한 전사-조절 요소에 작동가능하게 연결된다. 코딩 서열은 하나 이상의 벡터상에서 숙주 세포내로 도입될 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포는 특히, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary)(CHO) 세포, NS0 세포, SP2 세포, HEK-293T 세포, 293 프리스타일(Freestyle) 세포(인비트로겐(Invitrogen)), NIH-3T3 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장(baby hamster kidney)(BHK) 세포, 아프리카 녹색 원숭이(African green monkey) 신장 세포 (COS), 인간 간세포 암종 세포(예를 들어, Hep G2), 및 A549 세포를 포함한다. 세포주는 그들의 발현 수준에 기초하여 선택될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 세포주는 Sf9 또는 Sf21 세포와 같은 곤충 세포주, 및 효모 세포주를 포함한다.

[0096] 일부 실시형태에서, 모 ROR1 항체는 항체의 항원 결합을 개선하기 위하여, 면역원성을 감소시키기 위하여(예를 들어, 탈-면역화; 예를 들어, Jones *et al.*, *Methods Mol Biol.* 525:405-23 (2009) 참고), 및/또는 항체-의존성 세포독성(ADCC) 또는 보체-의존성 세포독성(CDC)을 개선하기 위하여, 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 조작될 수 있다.

[0097] 일부 실시형태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 하나 이상의 CDR내에서 만들어질 수 있으며, 여기서 돌연변이는 항체의 그의 항원에 대한 결합을 실질적으로 감소시키지 않는다. 예를 들어, 결합 친화성을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 치환이 만들어질 수 있다.

[0098] 항체 친화성을 개선하기 위하여 CDR에서 변화(예를 들어, 치환)가 만들어질 수 있다. 항원 결합에 관련된 CDR 잔기는 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 컴퓨터 모델링을 이용하여 확인될 수 있다. HCDR3 및 LCDR3가 특히 종종 타겟팅된다. 항원-항체 복합체의 결정 구조가 또한 항체와 그의 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 그러한 접촉 잔기 및 그들의 이웃 잔기가 돌연변이를 위해 타겟팅될 수 있다. 변

이체는 그들이 원하는 특성을 수득하는지 여부를 결정하기 위하여 스크리닝될 수 있다. 시험관내 친화성 성숙(예를 들어, 에러-프론(error-prone) PCR, 쇄 셔플링(chain shuffling), CDR의 무작위화 또는 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이유발을 이용)이 또한 항체 친화성을 개선하기 위하여 사용될 수 있다(예를 들어, Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001) 참고).

[0099] 항체 또는 항체 단편에 만들어진 아미노산 서열 삽입 및 결실은 길이가 하나 또는 여러개 잔기에서 백개 이상 잔기를 함유한 폴리펩티드까지 범위인 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 및 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입 및 결실을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 가진 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소(예를 들어, ADEPT를 위해) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에의 항체의 N- 또는 C-말단의 융합을 포함한다. 항체 분자의 서열내 삽입 변이체의 예는 경쇄에서 3개 아미노산의 삽입을 포함한다. 말단 결실의 예는 경쇄의 단부에서 7개 이하의 아미노산의 결실 및 중쇄에서 C-말단 리신의 제거를 가진 항체를 포함한다.

[0100] 일부 실시형태에서, ROR1 항체는 (예를 들어, 하나 이상의 당화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변화시킴으로서) 그들의 당화를 증가시키거나 감소시키기 위하여 변화된다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물이 변화될 수 있다. 포유동물 세포로부터의 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH₂ 도메인의 Asn₂₉₇에 N-연결에 의해 부착된 분지형의 바이안테너리(biantennary) 올리고당을 포함한다(예를 들어, Wright et al., *TIBTECH* 15:26-32 (1997) 참고). Asn₂₉₇은 Fc 영역에서 약 위치 297에 위치한 아스파라긴 잔기를 말한다(Fc 영역 잔기의 EU 넘버링; 예를 들어, Edelman et al. *PNAS* 63(1):78-85 (1969) 참고). 하지만, Asn₂₉₇은 또한 항체에서 작은 서열 변이로 인해, 위치 297의 약 ±3 아미노산 업스트림 또는 다운스트림에, 즉, 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다. 올리고당은 다양한 탄수화물 중 어느 것, 예를 들어, 바이안테나(biantennar) 올리고당 구조의 줄기내의 GlcNAc에 부착된 만노스, N-아세틸 글루코스아민(GlcNAc), 갈락토스, 시알산 또는 푸코스일 수 있다. 항체내의 올리고당의 변형은 예를 들어, 일부 개선된 특성을 가진 항체 변이체를 생성하기 위하여 만들어질 수 있다. 항체 당화 변이체는 개선된 ADCC 및/또는 CDC 기능을 가질 수 있다.

[0101] 일부 실시형태에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스 수준이 감소된 탄수화물 구조를 가진 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 그러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65%, 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 Asn₂₉₇에 부착된 모든 당구조의 합에 비하여, Asn₂₉₇에서의 당 쇄내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 결정된다(예를 들어, PCT 국제 공개 WO 2008/077546호 참고). 그러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다(예를 들어, Okazaki et al., *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); 및 Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004) 참고). 세포주(예를 들어, 네아웃 세포주)는 탈푸코실화된 항체를 생산하기 위하여 사용될 수 있으며, 예를 들어, 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 및 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자(FUT8) 네아웃 CHO 세포가 있다(예를 들어, Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004); 및 Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.* 94(4):680-688 (2006) 참고). 예를 들어, 미국 특허 6,602,684호에 개시된 다른 항체 당화 변이체가 또한 본 면역접합체에서 사용하기 위한 ROR1 항체 또는 항체 단편에 만들어질 수 있다.

[0102] 일부 실시형태에서, 항체에 새로운 특성을 부여하는 변이체 Fc 영역을 가진 ROR1 항체를 생성하기 위하여 ROR1 항체의 Fc 영역내로 하나 이상의 아미노산 변형이 도입될 수 있다. 변이체 Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄ Fc 영역)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 변이체 Fc 영역을 가진 ROR1 항체는 일부의 그러나 전부는 아닌 이펙터 기능을 보유할 수 있는데, 이는 상기 항체를 생체내에서 항체의 반감기가 중요하지만 일부 이펙터 기능(예를 들어, 보체 및 ADCC)은 불필요하거나 해로운 적용례를 위한 바람직한 후보로 만든다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석은 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위하여 수행될 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체(FcR) 결합 분석은 항체가 Fc γ R 결합이 결핍(따라서 ADCC 활성이 결핍될 가능성 있음)되지만, FcRn 결합 능력을 유지함을 확실히 하기 위하여 수행될 수 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 비제한적인 예가 미국 특허 5,500,362호 및 5,821,337호에 개시된다. 대안적으로, 비-방사성 분석 방법이 이용될 수 있다(예를 들어, 액티(ACTI)TM 및 사이토톡스(CytoTox) 96® 비-방사성 세포독성 분석). 그러한 분석을 위한 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 단핵구, 대식세포 및 천연 킬러(NK) 세포를 포함한다.

[0103] 항체는 증가된 반감기 및 신생아 Fc 수용체(FcRn)에의 개선된 결합을 가질 수 있다(예를 들어, 미국 특허 공개 2005/0014934호 참고). 그러한 항체는 FcRn에의 Fc 영역의 결합을 개선하는 그안의 하나 이상의 치환을 가진 Fc 영역을 포함할 수 있으며, Fc 영역 잔기: EU 넘버링 시스템에 따라 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 및 434 중 하나 이상에서 치환을 가진 것들을 포함한다(예를 들어, 미국 특허 7,371,826호 참고). Fc 영역 변이체의 다른 예가 또한 고려된다(예를 들어, Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); 미국 특허 5,648,260호 및 5,624,821호; 및 PCT 공개 WO 94/29351호 참고).

[0104] 일부 실시형태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환되는, 시스테인 조작된 항체, 예를 들어, "thioMAb"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시형태에서, 치환된 잔기는 항체의 접근가능 부위에서 발생한다. 반응성 티올기가, 면역접합체를 생성하기 위하여 약물 모이어티 또는 링커 약물 모이어티와 같은 다른 모이어티에의 접합을 위한 부위에 위치될 수 있다. 하기 잔기 중 어느 하나 이상이 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205(카밧 넘버링); 중쇄의 A118(EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 넘버링).

[0105] 본 발명에서 제공되는 항체는 비-단백질성 모이어티를 포함하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화를 위해 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "중합체"는 반복된 서브유닛으로 구성된 분자를 말하며; 그러한 분자는 폴리펩ти드, 폴리뉴클레오티드 또는 다당류, 또는 폴리알킬렌 글리콜을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 수용성 중합체의 비제한적인 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-다이옥솔란, 폴리-1,3,6-트라이옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동종중합체 또는 무작위 공중합체) 및 텍스트란 또는 폴리(N-비닐 피롤리돈)-폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 동종중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그 혼합물이다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 그의 안정성으로 인하여 제조시에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있으며, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있으며, 만일 둘 이상의 중합체가 부착되면, 그들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다.

1.5 세포독성 약물 모이어티

[0106] [0107] 본 발명의 면역접합체는 화학요법제, 성장 억제제, 독소(예를 들어, 단백질 독소; 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소; 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소와 같은 하나 이상의 세포독성제(cytotoxic agent)에 접합된 항-ROR1 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 세포독성제(들)는 항체의 아미노산 잔기에 공유적으로 결합된 링커에 의해 항-ROR1 항체 또는 단편에 접합될 수 있다. 면역접합체에서 세포독성 모이어티로서 작용할 수 있는 많은 약물이 독립적으로는 너무 독성이어서 암 치료를 위해 사용될 수 없으며, 따라서 항체 또는 항체 단편에 의해 암세포에 특이적으로 타겟팅될 경우 더욱 효과적이다.

[0108] 용어 "세포독성 약물 모이어티" 또는 "세포독성제"는 세포에 해로움, 장애 또는 사멸을 야기할 수 있는 화합물을 말한다. ROR1 면역접합체의 일부로서 사용될 수 있는 세포독성 약물 모이어티의 예는 NCA1, 오리스타틴, 오리스타틴 E, DNA 마이너 그루브(minor groove) 결합제, DNA 마이너 그루브 알킬화제, 에네다이인(enediyne), 렉시트롭신(lexitropsin), 듀오카르마이신(duocarmycin), 택산(taxane), 퓨로마이신(puromycin), 돌라스타틴(dolastatin), 메이탄시노이드(maytansinoid), 빈카 알카로이드(vinca alkaloid), AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, 택소이드(taxoid)(예를 들어, 파클리타كس(paclitaxel) 및 파클리타كس 유도체(탁솔(TAXOL)® 브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스턴), 아브락산(ABRAXANE)®(아메리칸 파카슈티컬 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 일리노이주 샤움베르그), 및 도세탁셀(docetaxel) 및 도세탁셀 유도체), CC-1065, SN-38, 토포테칸(topotecan), 모르폴리노-독소루비신(morpholino-doxorubicin), 리족신(rhizoxin), 시아노모르폴리노-독소루비신(cyanomorpholino-doxorubicin), 돌라스타틴(dolastatin)-10, 에치노마이신(echinomycin), 콤브레타스타틴(combretatstatin), 칼리키아마이신(chalicheamicin), 메이탄신(maytansine), DM-1, 네트롭신(netropsin), 포도필로톡신(podophyllotoxin)(예를 들어, 에토포시드(etoposide) 및 테니포시드(teniposide)), 바카틴(baccatin) 및 그 유도체, 항-튜불린 약제, 크립토피신(cryptophysin), 콤브레타스타틴(combretastatin), 빈크리스틴(vincristine), 빈크리스틴 설레이트, 빈블라스틴(vinblastine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), VP-16, 캄프토테신(camptothecin), 에포티론(epothilone) A, 에포티론(epothilone) B, 노코다졸(nocodazole), 콜히친(colchicine), 콜시미드(colicimid), 에스트라무스틴(estramustine), 세마도틴(cemadotin), 디스코데르모리드(discodepodolide), 엘류테로빈(eleutherobin), 메클로르에타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜파란

(melphalan), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 세무스틴(semustine), 스트렙토조신(streptozocin), 클로로조토신(chlorozotocin), 우라실 머스타드(uracil mustard), 클로르메틴(chlormethine), 클로람부실(chlorambucil), 피포브로만(pipobroman), 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌티오포스포르아민, 부설판(busulfan), 다카르바진(dacarbazine), 테모졸로미드(temozolomide), 이타라빈(ytarabine), 시토신 아라비노시드(cytosine arabinoside), 플루오로우라실, 5-플루오로우라실(5-FU), 플록스우리딘(floxuridine), 6-티오구아닌, 6-머캡토퓨린, 펜토스타틴(pentostatin), 메토트렉세이트(methotrexate), 10-프로파길-5,8-다이데아자풀레이트, 5,8-다이데아자테트라하이드로풀산, 류코보린(leucovorin), 플루다라빈 포스페이트, 펜토스타틴(pentostatine), 켐시타빈(gemcitabine), Ara-C, 데옥시코포르마이신(deoxycytoformycin), 미토마이신(mitomycin), 예를 들어, 미토마이신-C, L-아스파라기나제, 아자티오프린(azathioprine), 브레퀴나르(brequinar), 항생제(예를 들어, 안트라사이클린(anthracycline), 젠타마이신(gentamicin), 세팔로틴(cefalotin), 반코마이신(vancomycin), 테라반신(telavancin), 덱토마이신(daptomycin), 아지트로마이신(azithromycin), 에리트로마이신(erythromycin), 로시트로마이신(roci thromycin), 푸라졸리돈(furazolidone), 아목시실린(amoxicillin), 암피실린(ampicillin), 카르베니실린(carbenicillin), 플루클록사실린(Flucloxacillin), 메티실린(methicillin), 페니실린, 시프로플록사신(ciprofloxacin), 목시플록사신(moxifloxacin), 오플록사신(ofloxacin), 독시사이클린(doxycycline), 미노사이클린(minocycline), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline), 테트라사이클린(tetracycline), 스트렙토마이신(streptomycin), 리파부틴(rifabutin), 에탐부톨(ethambutol), 및 리파시민(rifaximin)), 에네다이인 항생제(예를 들어, 칼리키아마이신, 칼리키아마이신 감마II 및 칼리키아마이신 오메가I1, 및 디인마이신(dynemicin) A를 비롯한 디인마이신), 항바이러스 약물(예를 들어, 아바카버(abacavir), 아시클로버(acyclovir), 앰플리젠(ampligen), 시도포버(cidofovir), 델라비르딘(delavirdine), 다이다노신(didanosine), 에파비렌즈(efavirenz), 엔테카버(entecavir), 포스포네트(fosfonet), 간시클로버(ganciclovir), 이바시타빈(ibacicabine), 임뮤노버(immunovir), 이독스우리딘(idoxuridine), 이노신(inosine), 로피나버(lopinavir), 메티사존(methisazone), 넥사버(nexavir), 네비라핀(nevirapine), 오셀타미버(oseltamivir), 펜시클로버(penciclovir), 스타부딘(stavudine), 트라이플루리딘(trifluridine), 트루바다(truvada), 발라시클로버(valaciclovir), 및 자나미버(zanamivir)), 다우노루비신(daunorubicin) 하이드로클로라이드, 다우노리이신(daunorycin), 루비도마이신(rubidomycin), 세루비딘(cerubidine), 이다루비신(idarubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin) 및 모르폴리노 유도체, 폐녹시존(phenoxyzone) 비스시클로펩티드(예를 들어, 닉티노마이신(dactinomycin)), 염기성 글리코펩티드(예를 들어, 블레오마이신(bleomycin)), 안트라퀴논 글리코시드(예를 들어, 플리카마이신(plicamycin) 및 미트라마이신(mithramycin)), 안트라센다이온(예를 들어, 미토잔트론(mitoxantrone)), 아지리노피롤로 인돌레다이온(예를 들어, 미토마이신(mitomycin)), 대환식 면역억제제(예를 들어, 시클로스포린(cyclosporine), FK-506, 타크로리무스(tacrolimus), 프로그라프(prograf), 및 라파마이신(rapamycin)), 나벨벤(navabene), CPT-11, 아나스트라졸(anastrazole), 레트라졸(letrazole), 카페시타빈(capecitabine), 레록사핀(reloxafine), 드롤록사핀(droloxafine), 알로콜히친(allocolchicine), 할리콘드린(Halichondrin) B, 콜히친 및 콜히친 유도체, 리족신, 티오콜히친, 트라이틸 시스테린(trityl cysterin), 빈블라스틴(vinblastine) 설페이트, 하이드록시우레이, N-메틸하이드라진, 에피도필로톡신(epidophyllotoxin), 프로카르바진(procabazine), 미토잔트론, 류코보린, 및 테가푸르(tegafur)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. "탁산"은 파클리탁셀, 및 임의의 활성 탁산 유도체 또는 전구약물을 포함한다. 예를로티닙(erlotinib)(타르세바(TARCEVA)®, 제넨테크/OSI 팜(Pharm).), 보르테조닙(bortezomib)(벨케이드(VELCADE)®, 밀레니엄 팜(Millenium Pharm).), 풀베스트란트(fulvestrant)(파스로덱스(FASLODEX)®, 아스트라제네카(AstraZeneca)), 수니티닙(sunitinib)(수텐트(Sutent)®, 화이저(Pfizer)), 레트로졸(letrozole)(페마라(FEMARA)®, 노바티스(Novartis)), 이미티닙 메실레이트(imatinib mesylate)(글리벡(GLEEVEC)®, 노바티스), PTK787/ZK 222584(노바티스), 옥살리플라틴(oxaliplatin)(엘록사틴(Eloxatin)®, 사노피(Sanofi)), 류코보린(leucovorin), 라파티닙(lapatinib)(티케르브(TYKERB)®, GSK572016, 글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)), 로나파르닙(ronafarnib)(SCH 66336), 소라페닙(sorafenib)(BAY43-9006, 바이엘 랩스(Bayer Labs).), 및 제피티닙(gefitinib)(이레사(IRESSA)®, 아스트라제네카), AG1478, AG1571(SU 5271; 수겐(Sugen))과 같은 화학요법제, 티오템파(thiotepa) 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide)(시톡산(CYTOXAN))®와 같은 알킬화제; 부설판, 임프로설판(improsulfan) 및 피포설판(piposulfan)과 같은 알킬 설포네이트; 페메트렉세드(pemetrexed)(올림타(ALIMTA)® 일라이 릴리(Eli Lilly))와 같은 엽산길항제 항종양약; 벤조도파(benzodopa), 카르보쿠온(carboquone), 메트우레도파(meturedopa), 및 우레도파(uredopa)와 같은 아지리딘; 알트레타민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포르아미드, 트라이에틸렌티오포스포르아미드 및 트라이메틸오멜라민을 비롯한 에틸렌아민 및 메틸아멜라민; 아세토제닌(acetogenin)(예를 들어, 불라타신(bullatacin) 및 불라타시논

(bullatacinone)); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴(bryostatin); 칼리스타틴(callystatin); CC-1065(그의 합성 유사체 아도젤레신(adozelesin), 카르젤레신(carzelesin) 및 비젤레신(bizelesin) 포함); 크립토피신(cryptophycin)(예를 들어, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신(그의 합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류테로빈; 판크라티스타틴(pancratistatin); 사르코딕틴(sarcodictyin); 스폰지스타틴(spongistatin); 질소 머스타드(nitrogen mustard), 예를 들어, 클로람부실(chlorambucil), 클로르나파진(chlornaphazine), 콜로포스파미드(cholophosphamide), 에스트라무스틴(estramustine), 이포스파미드(ifosfamide), 메클로르에타민(mechlorethamine), 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜파란(melphalan), 노벰비친(novembichin), 페네스테린(phenesterine), 프레드니무스틴(prednimustine), 트로포스파미드(trofosfamide), 및 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어, 카르무스틴(carmustine), 클로로조토신(chlorozotocin), 포테무스틴(fotemustine), 로무스틴(lomustine), 니무스틴(nimustine), 및 라니무스틴(ranimustine); 클로드로네이트(clodronate)와 같은 비스포스포네이트; 에스페라마이신(esperamicin); 및 네오카르지노스타틴(neocarzinostatin) 발색단 및 관련 색소단백질 에네다이인 항생제 발색단, 아클라시노마이신(acalinomycin), 액티노마이신(actinomycin), 안트라마이신(anthramycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신, 캐티노마이신(cactinomycin), 카라비신(carabacin), 카미노마이신(caminomycin), 카르지노필린(carzinophilin), 크로모마이시니스(chromomycinis), 닥티노마이신, 다우노루비신, 테토루비신(detorubicin), 6-다이아조-5-옥소-L-노르루이신, 독소루비신(아드리아마이신(ADRIAMYCIN)®)(모르풀리노-독소루비신, 시아노모르풀리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신(esorubicin), 이다루비신(idarubicin), 마르셀로마이신(marcellomycin), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 노갈라마이신(nogalamycin), 올리보마이신(olivomycin), 페플로마이신(peplomycin), 포트피로마이신(potfiromycin), 퓨로마이신(puromycin), 쿠엘라마이신(quelamycin), 로도루비신(rodorubicin), 스트렙토니그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 투베르시딘(tubercidin), 유베니멕스(ubenimex), 지노스타틴(zinostatin), 조루비신(zorubicin); 메토트렉세이트 및 5-FU와 같은 대사길항물질; 데노프테린(denopterin), 메토트렉세이트, 프테로프테린(pteropterin), 트라이메트렉세이트(trimetrexate)와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈(fludarabine), 6-머캡토퓨린, 티아미프린(thiamiprime), 티오구아닌과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈(ancitabine), 아자시티딘(azacitidine), 6-아자우리딘(azauridine), 카르모푸르(carmofur), 시타라빈(cytarabine), 다이데옥시우리딘, 독시플루리딘(doxifluridine), 에노시타빈(enocitabine), 플록스우리딘(floxuridine)과 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론(calusterone), 드로모스타노론 프로피오네이트(dromostanolone propionate), 에피티오스탄(epitiostanol), 메피티오스탄(mepitiostane), 테스토락톤(testolactone)과 같은 안드로겐; 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 미토탄(mitotane), 트릴로스탄(trilostane)과 같은 항-부신; 프롤린산(frolinic acid)과 같은 엽산 보충제; 에이스글라톤(aceglatone); 알도포스파미드 글리코시드(aldophosphamide glycoside); 아미노레볼린산; 에닐우라실(eniluracil); 암사크린(amsacrine); 베스트라부실(bestrabucil); 비산트렌(bisantrene); 에다트랙세이트(edatraxate); 테포파민(defofamine); 데메콜신(demecolcine); 디아지쿠온(diaziquone); 엘포르미틴(elformithine); 엘립티늄 아세테이트(elliptinium acetate); 에포틸론(epothilone); 에토글루시드(etoglucid); 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난(lentinan); 로니다이닌(lonidainine); 메이탄신 및 안사미토신(ansamitocin)과 같은 메이탄시노이드; 미토구아존(mitoguazone); 미토잔트론; 모피단몰(mopidanmol); 니트라에린(nitraerine); 펜토스타틴(pentostatin); 페나메트(phoramet); 피라루비신(pirarubicin); 로소잔트론(losoxantrone); 포도필린산(podophyllinic acid); 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진(procarbazine); PSK® 다당류 복합체(JHS 내츄럴 프로덕츠(Natural Products), 오레곤주 유진); 라족산(razoxane); 리족신; 시조푸란(sizofuran); 스피로게르마늄(spirogermanium); 테누아존산(tenuazonic acid); 트라이아지쿠온(triaziquine); 2,2',2"-트라이클로로트라이에틸아민; 트리초테센(trichothecene)(특히, T-2 독소, 베라쿠린(verracurin) A, 로리딘(roridin) A 및 안구이딘(anguidine)); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴(mannomustine); 미토브로니톨(mitobronitol); 미토락톨(mitolactol); 피포브로만(pipobroman); 가시토신(gacytosine); 아라비노사이드(arabinoside)("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오태파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀(탁솔® 브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지, 뉴저지주 프린스턴), 아브락산(ABRAXANE)TM 파클리탁셀의 무-크레모포어(Cremophor-free) 일부민 나노입자 제형(아메리칸 파마슈티컬 파트너스, 일리노이주 샤움베르그), 및 탁소텔(TAXOTERE)® 독세탁셀(doxetaxel)(롱-프랑 로레(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니); 클로란부실(chlorambucil); 쟈자(GEMZAR)® 쟈시타빈; 6-티오구아닌; 머캡토퓨린; 메토트렉세이트; 시스플라틴(cisplatin) 및 카르보플라틴(carboplatin)과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 미토잔트론; 나벨빈(NAVELBINE)® 비노렐빈; 노반트론(novantrone); 테니포시드; 에다트렉세이트(edatrexate); 다우

노마이신(daunomycin); 아미노프테린(aminopterin); 젤로다(xeloda); 이반드로네이트(ibandronate); 토포이소머라제(topoisomerase) 억제제 RFS 2000; 다이플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노산과 같은 레티노이드; 및 상기 중 어느 것의 약학적 허용 염, 에스테르, 산, 전구약물 또는 유도체.

[0109] 일부 실시형태에서, ROR1 면역접합체에서 사용하기에 적합한 세포독성제는

[0110] a) 항-튜불린 약제(예를 들어, 오리스타틴 E, 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE) 또는 모노메틸 오리스타틴 F(MMAF), 다이메틸발린-발린-돌라이소루인-돌라프로인-페닐알라닌-p-페닐렌디아이아민(AFP), 5-벤조일발레르산-오리스타틴 E 에스테르(AEVb), AEB, 메이탄시노이드, 안사미토신, 메르탄신/엠탄신(DM1), 또는 라브탄신(ravtansine)/소라브탄신(soravtansine)(DM4)과 같은 오리스타틴 또는 돌라스타틴),

[0111] b) DNA 알킬화제 또는 DNA 마이너 그루브 알킬화제(예를 들어, 듀오카르마이신),

[0112] c) DNA 가교제(예를 들어, 피롤로벤조다이아제핀(PBD)),

[0113] d) DNA 삽입제(예를 들어, PNU-159682),

[0114] e) DNA 마이너 그루브 결합제(예를 들어, CC-1065), 또는

[0115] f) RNA 폴리머라제 II 억제제(예를 들어, α -아마니틴(amanitin)과 같은 아마니틴)이다.

[0116] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "삽입제"는 문자의 문자내 공간 또는 문자 사이의 문자간 공간내로 삽입될 수 있는 화학물질을 말한다. 예를 들어, DNA 삽입제는 DNA 이중 나선의 적층된 염기내로 삽입되는 문자일 수 있다.

[0117] 일부 실시형태에서, ROR1 면역접합체에서 사용되는 세포독성제는 에네다이인, 렉시트롭신, 듀오카르마이신, 탁산, 퓨로마이신, 포도필로톡신, 바카틴 유도체, 크립토피신, 콤브레스타틴, 돌라스타틴, 메이탄시노이드, 빈카알카로이드, 파클리탁셀, 도세탁셀, 안사미토신, CC-1065, SN-38, 토포테칸, 모르폴리노-독소루비신, 리족신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 돌라스타틴-10, 에치노마이신, 콤브레타트스타틴, 칼리키아마이신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 비노렐빈, VP-16, 캄프토테신, 에포ти론 A, 에포티론 B, 노코다졸, 콜히친, 콜시미드, 에스트라무스틴, 세마도틴, 디스코데르모리드 메이탄신, 엘류테로빈 및 네트롭신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0118] 일부 실시형태에서, 면역접합체내의 세포독성 약물 모이어티는 전구약물이다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "전구약물" 또는 "약학적 허용 전구약물"은 생체내 또는 시험관내에서 모 약물로 전환되며 상대적으로 비독성인 약제를 말한다. 즉, 면역접합체는 원치않는 생물학적 효과를 야기하거나 그것이 함유된 조성물의 성분 중 어느 것과 해로운 방식으로 상호작용하는 것 없이 대상에게 투여될 수 있다. 전구약물은 일반적으로 대상에게의 투여 및 후속 흡수 후, 대사적 경로에 의한 전환과 같은 일부 과정을 통해 활성인 또는 더욱 활성인 종으로 전환되는 약물 전구체이다. 일부 전구약물은 그것이 덜 활성이도록 하고/하거나 약물에 가용성 또는 일부 다른 특성을 부여하는, 전구약물상에 존재하는 화학기를 가진다. 일단 화학기가 전구약물로부터 절단되고/되거나 변형되면, 활성 약물이 생성된다. 전구약물은 효소적 또는 비-효소적 반응을 통해 신체내에서 활성 약물로 전환될 수 있다. 전구약물은 약물의 더 나은 가용성, 향상된 전달 특성(예를 들어, 특정 세포, 조직, 장기 또는 리간드를 타겟팅), 및 개선된 치료 갱과 같은 그들의 모 약물에 비하여 개선된 생리화학적 특성을 제공할 수 있다. 그러한 전구약물의 이득은 (i) 모 약물과 비교할 때 투여의 용이성; (ii) 모 약물이 생물학적으로 이용가능하지 않은 경구 투여에 의해 생물학적으로 이용가능할 수 있음; 및 (iii) 전구약물은 모 약물에 비교할 때 약학 조성물에서 개선된 가용성을 가질 수 있음을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 전구약물은 약물의 약리학적으로 비활성인 또는 덜 활성인 유도체를 포함한다. 전구약물은 생리화학적, 생물약제학적, 또는 약동학적 특성과 같은 약물의 특성의 조작을 통해 원하는 작용 부위에 도달하는 약물 또는 생물학적 활성 분자의 양을 조절하기 위하여 설계될 수 있다.

[0119] 일부 실시형태에서, 면역접합체내의 항체에 대한 약물 모이어티의 평균 수(즉, 약물-대-항체 비 또는 DAR)는 1; 또는 적어도 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다. DAR을 측정하기 위한 예시적인 방법은 하기의 실시예에서 개시된다.

1.6 링커

[0120] 본 발명의 면역접합체의 일부 실시형태에서, 항체는 세포독성제에 직접적으로 접합되거나 링커를 통해 접합될 수 있다. 적합한 링커는 예를 들어, 절단가능 및 비-절단가능 링커를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 절

단가능 링커이다. 절단가능 링커는 절단가능 모이어티를 포함하며 전형적으로 세포내 조건하에서 절단에 민감한 링커를 말한다. 적합한 절단가능 링커는 예를 들어, 세포내 프로테아제(예를 들어, 리소좀 프로테아제 또는 엔도좀 프로테아제)에 의해 절단가능한 웹티드 링커 및 산-절단가능 링커를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 링커는 다이펩티드, 예를 들어, 발린-시트롤린(val-cit 또는 VC) 또는 페닐알라닌-리신(phe-lys) 링커일 수 있다. 링커는 또한 트라이펩티드 또는 4개 이상의 아미노산 잔기를 가진 폴리펩티드일 수 있다. 다른 적합한 링커는 하이드라존 링커와 같은, 5.5 미만의 pH에서 가수분해가능한 링커를 포함한다. 추가의 적합한 절단가능 링커는 다이설파이드 링커를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 비-중합체성 링커이다. 일부 경우에, 링커는 비-펩티드 링커 또는 아미노산 잔기를 함유하지 않는 링커이다.

[0122] 일부 실시형태에서, 링커는 C₁-C₆ 알킬기(예를 들어, C₅, C₄, C₃, C₂, 또는 C₁ 알킬기)를 포함한다. 본 명세서에서 사용될 때 용어 "알킬"은 탄소와 수소 원자만으로 이루어지며 불포화를 함유하지 않는 직쇄 또는 분지형 탄화수소쇄 라디칼을 말한다. C₁-C_x는 C₁-C₂, C₁-C₃, ..., C₁-C_x를 포함하며 여기서 x는 정수이다. C₁-C_x는 지정된 기내의 탄소 원자의 수를 말한다. 일부 실시형태에서, 알킬은 1 내지 8개 탄소 원자를 포함한다(C₁-₈알킬). 일부 실시형태에서, 알킬은 2 내지 6개 탄소 원자를 포함한다(C₂-₆알킬).

[0123] 본 명세서에서 사용될 때, 면역접합체의 Ab(항체 또는 단편)와 D(탑재물) 성분을 연결하기 위한 화학 반응 전의 링커는 또한 "링커 전구체"로 불린다. 본 명세서에 개시된 일부 화학적 물질(entity)이 그의 반응 능력에 기초할 때 링커 전구체인지 또는 최종 면역접합체 생성물내의 링커 성분인지 여부는 ADC 분야의 당업자에게 자명할 것이다.

[0124] 일부 실시형태에서, 면역접합체의 Ab와 D 성분 사이의 연결은 동종이작용성(homobifunctional) 링커와 성분의 반응을 통해 형성될 수 있다. 예시적인 동종이작용성 링커는 로만트(Lomant's) 시약 다이티오비스(석신이미딜프로페오네이트) DSP, 3',3' 다이티오비스(설포석신이미딜 프로페오네이트)(DTSSP), 다이석신이미딜 수버레이트(DSS), 비스(설포석신이미딜)수버레이트(BS), 다이석신이미딜 타르트레이트(DST), 다이설포석신이미딜 타르트레이트(설포 DST), 에틸렌 글리코비스(석신이미딜석시네이트)(EGS), 다이석신이미딜 글루타레이트(DSG), N,N'-다이석신이미딜 카보네이트(DSC), 다이메틸 아디프이미데이트(DMA), 다이메틸 피멜이미데이트(DMP), 다이메틸 수베르이미데이트(DMS), 다이메틸-3,3'-다이티오비스프로페온이미데이트(DTBP), 1,4-다이-3'-(2'-페리딜다이티오)프로페온아미도부탄(DPDPB), 비스말레이미도헥산(BMH), 아릴 할라이드-함유 화합물(DFDNB), 예를 들어, 1,5-다이플루오로-2,4-다이니트로벤젠 또는 1,3-다이플루오로-4,6-다이니트로벤젠, 4,4'-다이플루오로-3,3'-다이니트로페닐설휠(DFDNPS), 비스-[β-(4-아지도살리실아미도)에틸]다이설파이드(BASED), 포름알데히드, 글루타르알데히드, 1,4-부탄다이올 디아글리시딜 에테르, 아디프산 디아하이드라지드, 카르보하이드라지드, o-톨루이딘, 3,3'-다이메틸벤자린, 벤자린, α, α'-p-다이아미노다이페닐, 다이요오도-p-자일렌 설휠산, N,N'-에틸렌-비스(요오도아세트아미드) 및 N,N'-헥사메틸렌-비스(요오도아세트아미드)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0125] 일부 실시형태에서, 면역접합체의 Ab와 D 성분 사이의 연결은 이종이작용성 링커와 성분의 반응을 통해 형성될 수 있다. 예시적인 이종이작용성 링커는 아민-반응성 및 설프하이드릴 가교제, 예를 들어, N-석신이미딜 3-(2-페리딜다이티오)프로페오네이트(sPDP), 장쇄 N-석신이미딜 3-(2-페리딜다이티오)프로페오네이트(LC-sPDP), 수용성-장쇄 N-석신이미딜 3-(2-페리딜다이티오) 프로페오네이트(설포-LC-sPDP), 석신이미딜옥시카르보닐-α-메틸-α-(2-페리딜다이티오)톨루엔(sMPT), 설포석신이미딜-6-[α-메틸-α-(2-페리딜다이티오)톨루아미도]헥사노에이트(설포-LC-sMPT), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), 설포석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(설포-sMCC), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르(MBs), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시설포석신이미드 에스테르(설포-MBs), N-석신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(sIAB), 설포석신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(설포-sIAB), 석신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(sMPB), 설포석신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(설포-sMPB), N-(γ-말레이미도부티릴혹시)석신이미드 에스테르(GMBs), N-(γ-말레이미도부티릴혹시)설포석신이미드 에스테르(설포-GMBs), 석신이미딜 6-((요오도아세틸)아미노)헥사노에이트(sIAX), 석신이미딜 6-[6-((요오도아세틸)아미노)헥사노일)아미노]헥사노에이트(sIAXX), 석신이미딜 4-(((요오도아세틸)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sIAC), 석신이미딜 6-(((4-요오도아세틸)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르보닐)아미노) 헥사노에이트(sIACX), p-니트로페닐 요오도아세테이트(NPIA), 카르보닐-반응성 및 설프하이드릴-반응성 가교제, 예를 들어, 4-(4-N-말레이미도페닐)부티르산 하이드라지드(MPBH), 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실-하이드라지드-8(M₂C₂H), 3-(2-페리딜다이티오)프로페오닐 하이드라지드(PDPH), 아민-반응성 및 광반응성 가교제, 예

를 들어, N-하이드록시석신이미딜-4-아지도살리실산(NHs-AsA), N-하이드록시설포석신이미딜-4-아지도살리실산(설포-NHs-AsA), 설포석신이미딜-(4-아지도살리실아미도)헥사노에이트(설포-NHs-LC-AsA), 설포석신이미딜-2-(p-아지도살리실아미도)에틸-1,3'-다이티오프로피오네이트(sAsD), N-하이드록시석신이미딜-4-아지도벤조에이트(HsAB), N-하이드록시설포석신이미딜-4-아지도벤조에이트(설포-HsAB), N-석신이미딜-6-(4'-아지도-2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(sANPAH), 설포석신이미딜-6-(4'-아지도-2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(설포-sANPAH), N-5-아지도-2-니트로벤조일옥시석신이미드(ANB-NOs), 설포석신이미딜-2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미도)-에틸-1,3'-다이티오프로피오네이트(sAND), N-석신이미딜-4(4-아지도페닐)1,3'-다이티오프로피오네이트(sADP), N-설포석신이미딜(4-아지도페닐)-1,3'-다이티오프로피오네이트(설포-sADP), 설포석신이미딜 4-(p-아지도페닐)부티레이트(설포-sAPB), 설포석신이미딜 2-(7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세트아미드)에틸-1,3'-다이티오프로피오네이트(sAED), 설포석신이미딜 7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세테이트(설포-sAMCA), p-니트로페닐 다이아조페루베이트(pNPDP), p-니트로페닐-2-다이아조-3,3,3-트라이플루오로프로피오네이트(PNP-DTP), 설프하이드릴-반응성 및 광반응성 가교체, 예를 들어, 1-(p-아지도살리실아미도)-4-(요오도아세트아미도)부탄(AsIB), N-[4-(p-아지도살리실아미도)부틸]-3'-(2'-파리딜다이티오)프로파온아미드(APDP), 벤조페논-4-요오도아세트아미드, 벤조페논-4-말레이미드 카르보닐-반응성 및 광반응성 가교체, 예를 들어, p-아지도벤조일 하이드라지드(ABH), 카르복실레이트-반응성 및 광반응성 가교체, 예를 들어, 4-(p-아지도살리실아미도)부틸아민(AsBA), 및 아르기닌-반응성 및 광반응성 가교체, 예를 들어, p-아지도페닐 글리옥살(APG)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0126]

일부 실시형태에서, 면역접합체의 Ab와 D 성분 사이의 연결은 예를 들어, 결합 모이어티상에 존재하는 친전자성기에 반응성인 친핵성 기를 포함할 수 있는 반응성 작용기를 가진 링커와 성분의 반응을 통해 형성될 수 있다. 예시적인 친전자성기는 카르보닐기, 예를 들어, 알데히드, 케톤, 카르복실산, 에스테르, 아미드, 에논, 아실 할라이드 및 산 무수물을 포함한다. 구체적 실시형태에서, 반응성 작용기는 알데히드이다. 예시적인 친핵성기는 하이드라지드, 옥심, 아미노, 하이드라진, 티오세미카르바존, 하이드라진 카르복실레이트, 및 아릴하이드라지드를 포함한다.

[0127]

일부 실시형태에서, 항체 또는 단편에의 링커/탑재물의 접합은 말레이미드기(또한 말레이미드 스페이서로 불릴 수도 있음)와의 반응을 통해 형성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 말레이미드기는 말레이미도카프로일(mc)이며; 따라서, 링커/탑재물은 항체 또는 단편상의 잔기와 링커 전구체내의 mc기 사이의 반응을 통해 항체 또는 단편에 접합된다. 일부 실시형태에서, 말레이미드기는 본 명세서에 개시된 대로, 말레이미도메틸기, 예를 들어, 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC) 또는 설포석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(설포-SMCC)를 포함한다.

[0128]

일부 실시형태에서, 말레이미드기는 자가-안정화 말레이미드이다. 일부 실시형태에서, 자가-안정화 말레이미드는 티오석신이미드 고리 가수분해의 분자내 촉매를 제공하여 말레이미드가 레트로-마이클(retro-Michael) 반응을 통한 제거 반응을 거치는 능력을 감소시키기 위하여, 말레이미드에 이웃한 염기성 아미노기를 통합하기 위하여 다이아미노프로피온산(DPR)을 이용한다. 일부 실시형태에서, 자가-안정화 말레이미드는 Lyon *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 32(10):1059-1062 (2014)에 개시된 말레이미드기이다. 일부 실시형태에서, 링커 전구체는 자가-안정화 말레이미드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커 전구체는 자가-안정화 말레이미드이다.

[0129]

일부 실시형태에서, 링커는 웨티드 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 웨티드 모이어티는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 더 많은 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 웨티드 모이어티는 (예를 들어, 효소적으로 또는 화학적으로) 절단가능하다. 일부 실시형태에서, 웨티드 모이어티는 비-절단가능성이다. 일부 실시형태에서, 웨티드 모이어티는 Val-Cit(발린-시트룰린), Gly-Gly-Phe-Gly(서열 번호 55), Phe-Lys, Val-Lys, Gly-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, Ala-Lys, Val-Arg, Phe-Cit, Phe-Arg, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Ala-Leu-Ala-Leu(서열 번호 56), 또는 Gly-Phe-Leu-Gly(서열 번호 57)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 Val-Cit(VC)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 Val-Cit (VC)이다.

[0130]

일부 실시형태에서, 링커는 벤조산 또는 벤질옥시기 또는 그 유도체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 링커는 파라-아미노-벤조산(PABA)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 파라-아미노-벤질옥시카르보닐(PAB)기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 감마-아미노-부티르산(GABA)을 포함한다.

[0131]

일부 실시형태에서, 면역접합체의 Ab와 D 성분 사이의 연결은 임의의 조합의, 말레이미드기, 웨티드 모이어티 및/또는 벤조산(예를 들어, PABA) 또는 벤질옥시카르보닐기를 포함하는 링커와 성분의 반응을 통해 형성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 말레이미드기는 말레이미도카프로일(mc)이다. 일부 실시형태에서, 웨티드기는 Val-

Cit(VC)이다. 일부 실시형태에서, 링커는 Val-Cit-PABA기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 단편에의 링커의 접합은 mc-Val-Cit-PABA기로부터 형성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 단편에의 링커 접합은 mc-Val-Cit기로부터 형성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 단편과 약물 모이어티 사이의 연결은 mc-Val-Cit-PAB기로부터 형성될 수 있다.

[0132] 일부 실시형태에서, 링커는 자가-희생(self-immolative) 링커 또는 자가-제거 링커(예를 들어, 고리화 자가-제거 링커)이다. 일부 실시형태에서, 링커는 미국 특허 9,089,614호 또는 PCT 공개 WO 2015/038426호에 개시된 링커일 수 있다.

[0133] 일부 실시형태에서, 링커는 수지상(dendritic) 타입 링커이다. 일부 실시형태에서, 수지상 타입 링커는 분지성의 다작용성 링커 모이어티를 포함한다. 수지상 링커는 둘 이상의 가지(branch)를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 수지상 타입 링커는 항체 또는 단편에 대한 약물 모이어티의 몰 비를 증가시키기 위하여 이용된다. 일부 실시형태에서, 수지상 타입 링커는 PAMAM 덴드리머(dendrimer)를 포함한다.

[0134] 일부 실시형태에서, 링커는 무흔적(traceless) 링커 또는 절단 후 링커 모이어티(예를 들어, 원자 또는 링커기)를 뒤에 남기지 않는 링커이다. 예시적인 무흔적 링커는 게르마늄 링커, 규소 링커, 황 링커, 셀레늄 링커, 질소 링커, 인 링커, 붕소 링커, 크롬 링커 및 페닐하이드라지드 링커를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 링커는 Hejesen *et al.*, *Org Biomol Chem* 11(15):2493-2497 (2013)에서 개시된 무흔적 아릴-트라이아젠 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 Blaney *et al.*, *Chem. Rev.* 102:2607-2024 (2002)에서 개시된 무흔적 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 미국 특허 6,821,783호에 개시된 무흔적 링커이다.

[0135] 일부 실시형태에서, 링커는 링커와 접합 모이어티(예를 들어, 본 명세서에 개시된 ADC-A, B, C, E, F, 및 H-T 중 어느 것) 사이의 결합 부위에서 입체 장해를 나타내는 작용기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 입체 장해는 다이설파이드 결합 주위의 입체 장해이다. 입체 장해를 나타내는 예시적인 링커는 예를 들어, 이종이작용성 링커(예를 들어, 본 명세서에 개시됨)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 입체 장해를 나타내는 링커는 SMCC 및 SPDB를 포함한다.

[0136] 일부 실시형태에서, 링커는 산 절단가능 링커이다. 일부 실시형태에서, 산 절단가능 링커는 하이드라존 연결을 포함하며, 이것은 가수분해 절단에 민감하다. 일부 실시형태에서 산 절단가능 링커는 티오말레암산 링커를 포함한다. 일부 실시형태에서, 산 절단가능 링커는 Castaneda *et al.*, *Chem. Commun.* 49:8187-8189 (2013)에 개시된 티오말레암산 링커이다.

[0137] 일부 실시형태에서, 링커는 미국 특허 6,884,869호, 7,498,298호, 8,288,352호, 8,609,105호, 및 8,697,688호 중 어느 것; 미국 특허 공개 2014/0127239호, 2013/028919호, 2014/286970호, 2013/0309256호, 2015/037360호; 및 2014/0294851호 중 어느 것; 또는 PCT 공개 WO 2015/057699호, WO 2014/080251호, WO 2014/197854호, WO 2014/145090호, 및 WO 2014/177042호 중 어느 것에 개시된 링커이다.

[0138] 본 발명의 면역접합체에 사용하기 적합한 링커는 예를 들어, 높은 세포외 안정성으로 세포내에서 절단가능한 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 본 명세서에 개시된 항체 또는 단편 중 어느 것에 링커의 부착을 허용하는 작용기(예를 들어, 말레이미드 유도체)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커(또는 전구체)는 6-말레이미도카프로일(MC), 말레이미도프로파노일(MP), 밸린-시트룰린(VC), 알라닌-페닐알라닌(AP), p-아미노벤질옥시카르보닐(PAB), N-석신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트(SPP), N-석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), N-석신이미딜 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트(SIAB), 6-말레이미도카프로일-밸린-시트룰린(MC-VC), 6-말레이미도카프로일-밸린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(MC-VC-PAB), N-석신이미딜-1-카르복실레이트-밸린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(SC-VC-PAB), 6-말레이미도카프로일-폴리에틸렌 글리콜-밸린-시트룰린(MC-PEG4-VC), 6-말레이미도카프로일-폴리에틸렌 글리콜-밸린-알라닌(MC-PEG4-VA), 또는 MC-PEG8-VC-PAB를 포함한다. 일부 실시형태에서, 접합 반응 전 링커(링커 전구체로도 알려짐)는 6-말레이미도카프로일-밸린-시트룰린(MC-VC-PAB), 또는 N-석신이미딜-1-카르복실레이트-밸린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(SC-VC-PAB)이다. 일부 실시형태에서, 링커는 6-말레이미도카프로일(MC) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 말레이미도프로파노일(MP) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 밸린-시트룰린(VC) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 알라닌-페닐알라닌(AP) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 p-아미노벤질옥시카르보닐(PAB) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 N-석신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트(SPP) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 N-석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 N-석신이미딜 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트(SIAB) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 6-말레이미도카프로일-밸린-시트룰린(MC-VC) 링커이다. 일부 실시형태에서,

링커는 6-말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(MC-VC-PAB) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 N-석신이미딜-1-카르복실레이트-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(SC-VC-PAB) 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 추가로 링커와 세포독성 모이어티 사이에 스페이서를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 헤테로원자이다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 알킬쇄이다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 알킬쇄이다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 카르보닐기이다. 일부 실시형태에서, 링커는 동종이작용성 링커 또는 이종이작용성 링커이다.

[0139]

일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 링커는 리신 또는 환원된 시스테인과 같은 자연 발생 아미노산 잔기에서 본 명세서에 개시된 항체 또는 항원-결합 단편에 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 알킨/아지드 "클릭(click)" 반응, 카르보닐 축합, 마이클-타입(Michael-type) 부가 및 미조로키-헥(Mizoroki-Heck) 치환에 의해 비-천연 아미노산(예를 들어, 아지도페닐알라닌, p-아세틸페닐알라닌, 또는 p-아지도메틸페닐알라닌)에 부착될 수 있다. 추가의 링커 부위가 유전적으로 첨가될 수 있으며, 링커의 효소적 첨가를 허용하는 폴리펩티드 모티프를 포함할 수 있다. 그러한 폴리펩티드 모티프는 예를 들어, 글루타민 태그(tag)(예를 들어, LLQGA(서열 번호 58)), 알데하이드 태그(예를 들어, CxPxR, 여기서 x는 임의의 아미노산임), 솔타제(sortase) 모티프(예를 들어, LPxTG(서열 번호 59, 여기서 x는 임의의 아미노산임), NPQTN(서열 번호 60)), 또는 BirA 태그(예를 들어, GFEIDKVWYDLDA(서열 번호 61))를 포함할 수 있다. 글루타민 태그에 링커를 부착하는 것은 세균 트랜스글루타미나제를 이용하여 이루어질 수 있다. 알데하이드 태그에 링커를 부착하는 것은 포르밀글리신-생성 효소(FGE)를 이용하여 이루어지며, 이것은 컨센서스(consensus) 서열의 시스테인 잔기를 산화시켜 알데하이드를 생성하며; 이 알데하이드는 링커상의 아미노옥시기와 반응하여 안정한 옥심을 형성할 수 있다. 솔타제 모티프에 링커를 부착하는 것은, C-말단 LPxTG 서열(서열 번호 59) 또는 NPQTN 서열(서열 번호 60)을 인식하고, TG 또는 TN 결합을 절단하며, -티오아실 효소-트레오닌 중간체를 통해- 트레오닌에 대한 들어오는(incoming) 단백질 알파 아민의 친핵성 공격을 촉진하는 세균 트랜스펩티다제를 이용하여 이루어질 수 있다. 공격 잔기는 링커의 글리신 이량체 또는 삼량체이거나 링커에 추가될 수 있다. 솔타제 모티프 또는 BirA 태그에 링커를 부착하는 것은 비오틴 리가제를 이용하여 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 리신 잔기에서 부착되지 않는다. 일부 실시형태에서, 링커는 시스테인 잔기에만 부착된다. 일부 실시형태에서, 시스테인 잔기는 경쇄 및/또는 중쇄상의 하나 이상의 비-시스테인 잔기를 시스테인으로 전환함으로써 항체내로 조작되었다. 일부 실시형태에서, 시스테인 전환은 항원 결합을 방해하지 않는다. 일부 실시형태에서, 셀레노시스테인이 유전적 변형에 의해 항체내로 통합된다. 예를 들어, Sochaj *et al.*, *Biotechnology Advances* 33:775-784 (2015)를 참고한다.

[0140]

일부 실시형태에서, 링커는 화학적 결찰 과정에 의해 항-ROR1 항체 또는 단편에 접합된다. 일부 실시형태에서, 링커는 천연 결찰에 의해 항-ROR1 항체 또는 단편에 접합된다. 일부 실시형태에서, 접합은 Dawson *et al.*, *Science* 266:776-779 (1994); Dawson *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 119:4325-4329 (1997); Hackeng *et al.*, *PNAS* 96:10068-10073 (1999); 또는 Wu *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45:4116-4125 (2006)에서 개시된 대로이다. 일부 실시형태에서, 접합은 미국 특허 8,936,910호에 개시된 대로이다. 일부 실시형태에서, 링커는 천연 결찰 화학을 통해 부위-특이적으로 또는 비-특이적으로 항-ROR1 항체 또는 단편에 접합된다.

[0141]

일부 실시형태에서, 링커는 "무흔적" 커플링 기술(필로켐(Philochem))을 이용하여 부위-지시된 방법에 의해 항-ROR1 항체 또는 항원-결합 단편에 접합된다. 일부 실시형태에서, "무흔적" 커플링 기술은 결합 모이어티상의 N-말단 1,2-아미노티올기를 이용하며 이것은 그 후 알데하이드기를 함유하는 항체 또는 그 단편과 접합된다. 예를 들어, Casi *et al.*, *JACS* 134(13):5887-5892 (2012)를 참고한다. 일부 실시형태에서, 링커는 결합 모이어티내로 통합된 비천연 아미노산을 이용하여 부위-지시된 방법에 의해 항-ROR1 항체 또는 단편에 접합된다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 p-아세틸페닐알라닌(pAcPhe)을 포함한다. 일부 실시형태에서, pAcPhe의 캐토기는 알록시-아민 유도체화된 접합 모이어티에 선택적으로 커플링되어 옥심 결합을 형성한다. 예를 들어, Axup *et al.*, *PNAS* 109(40):16101-16106 (2012)를 참고한다.

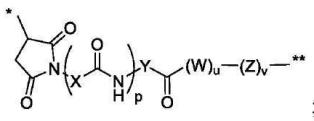
[0142]

일부 실시형태에서, 링커는 효소-촉매된 과정을 이용하여 부위-지시된 방법에 의해 항-ROR1 항체에 시스 접합되어 항-ROR1 항체 또는 항원-결합 단편에 접합된다. 일부 실시형태에서, 부위-지시된 방법은 스마태그(SMARTag)TM 기술(레드우드(Redwood))을 이용한다. 일부 실시형태에서, 스마태그TM 기술은 알데하이드 태그의 존재하에서의 산화 과정을 통해 포르밀글리신-생성 효소(FGE)에 의한 시스테인으로부터 포르밀글리신(FGly) 잔기의 생성 및 하이드라지노-픽테트-스朋글러(hydrazino-Pictet-Spengler)(HIPS) 결찰을 통한 알킬하이드라인-작용화된 아미노산 분자에의 FGly의 후속 접합을 포함한다. 예를 들어, Wu *et al.*, *PNAS* 106(9):3000-3005 (2009) 및 Agarwal *et al.*, *PNAS* 110(1):46-51 (2013))을 참고한다.

[0143] 일부 실시형태에서, 효소-촉매된 과정은 미생물 트랜스글루타미나제(mTG)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 미생물 트랜스글루타미나제 촉매된 과정을 이용하여 항-ROR1 항체 또는 단편에 접합된다. 일부 실시형태에서, mTG는 인식 서열내의 글루타민의 아미드 측쇄와 작용화된 아미노산 분자의 일차 아민 사이의 공유 결합의 형성을 촉매한다. 일부 실시형태에서, mTG는 스트렙토마이세스 모바렌시스(*Streptomyces mobarensis*)로부터 생산된다. 예를 들어, Strop et al., *Chemistry and Biology* 20(2):161-167 (2013)을 참고한다. 일부 실시형태에서, 링커는 탄수화물-기반 화학 반응에 의해 항-ROR1 항체에 접합된다. 탄수화물-기반 접합의 전략에서는, 제1 단계는 보통 새로운 생물직교성(bioorthogonal) 작용기를 도입하여 약물에의 항체의 접합을 촉진하는 것이다. 생물접합(글리코-접합)을 위하여 탄수화물 모이어티상에 생물직교성 작용기를 도입하기 위해 사용될 수 있는 전략은 글리칸의 화학적 산화; 글리칸의 효소적 및 화학-효소적 변형; 및 탄수화물 모이어티의 대사적 조작을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 화학적 접근법은 소듐 폐리오데이트(NaIO4)를 이용하여 예를 들어, 갈락토스 또는 시알산의 *cis*-글리콜기를 산화시켜 알데히드를 생성할 수 있으며, 이것은 그 후 하이드라지드- 또는 일차 아민 작용화된 분자와 커플링되어 산-라벨링된 하이드라존을 생성하거나 아미노옥시기와 커플링되어 옥심을 형성할 수 있다. 효소적 및 화학-효소적 접근법은 당 잔기를 뉴라미니다제(Neu) 및 갈락토스 옥시다제(Gal Oxi)로 처리하여 알데히드 작용기를 형성한다. β 1,4-갈락토실트랜스퍼라제(GaIT)/ α 2,6-시알릴트랜스퍼라제(SiaIT)로 항체를 연속 처리하면 균질하게 시알화된 항체를 생성할 수 있다. 생성되는 항체는 그 후 상응하는 알데히드 작용기로 선택적으로 산화될 수 있으며, 만일 시알산 유도체가 사용되면, 이를 항체는 선택적 생물직교성 핸들로서 사용될 수 있다. 유사하게, 항체는 비-천연 작용기를 보유하는 동종성 G2 글리칸 패턴을 생성하기 위하여 생물직교성 아지드- 또는 캐토-갈락토스의 부착을 매개하기 위하여 β -갈락토시다제(Gal) 및 돌연변이체 Gal T로 처리될 수 있다. 다른 방법은 세포에게 생물직교성 당을 공급함으로써 항체의 글리칸내로 통합될 수 있는 비-규범적 티오-푸코스 유도체를 만들어서 티올 작용기를 나타내는 발현된 항체를 생성한다.

[0144] 링커는 여러 방식으로 본 발명의 항-ROR1 항체 및 항원-결합 단편에 접합될 수 있다. 일반적으로 링커 및 세포독성 모이어티는 항체에 부착되기 전에 합성되고 접합된다. 항체에 링커-약물 접합체를 부착하는 한 가지 방법은 다이티오톤(DTT) 또는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)을 이용한 용매-노출된 다이설파이드의 환원, 및 이어서 말레이미드-함유 링커-약물 모이어티(예를 들어, 6-말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(MC-VC-PAB))를 이용한 생성 티올의 변형에 관련된다. 천연 항체는 4개의 쇄간 다이설파이드 결합 및 12개의 쇄내 다이설파이드 결합, 및 쌍을 이루지 않은 시스테인을 함유한다. 따라서, 이 방식으로 변형된 항체는 항체 당 하나보다 많은 링커-약물 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 면역접합체는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8, 9, 또는 10개 링커/약물 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 면역접합체는 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2개 링커/약물 모이어티 또는 1개 링커/약물 모이어티를 포함한다. 링커가 분지형이고 다수의 약물 모이어티에 각각 부착될 수 있는 경우에, 항체에 대한 약물 모이어티의 비는 비분지형 링커를 이용하는 것보다 높을 것이다.

[0145] 일부 실시형태에서, 링커는 하기 식을 가진다:



[0146]

[0147] 상기 식에서,

[0148]

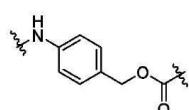
X는 C_{2~8}알킬이고;

[0149]

Y는 -(CH₂CH₂O)_qCH₂CH₂-이며;

[0150]

W는 아미노산 단위이고;



[0151]

Z는 이며;

[0152]

n은 0 또는 1이고;

[0153] p는 0 또는 1이며;

[0154] q는 0 내지 12의 정수이고;

[0155] u는 0 내지 5의 정수이며; 그리고

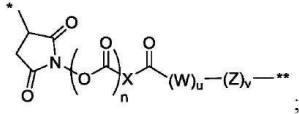
[0156] v는 0 또는 1이고;

[0157] 여기서 **는 약물 모이어티(D)에의 부착점을 나타내며; 그리고

[0158] *는 황체 또는 단편(Ab)에의 부착점을 나타낸다.

[0159] 일부 실시형태에서, p는 0이다. 일부 실시형태에서, p는 1이다. 일부 실시형태에서, p는 1이며 X는 $-(CH_2)_2-$ 이다. 일부 실시형태에서, p는 1이고 X는 $-(CH_2)_3-$ 이다. 일부 실시형태에서, p는 1이고 X는 $-(CH_2)_4-$ 이다. 일부 실시형태에서, p는 1이고 X는 $-(CH_2)_5-$ 이다. 일부 실시형태에서, p는 1이고 X는 $-(CH_2)_6-$ 이다. 일부 실시형태에서, q는 1 내지 12의 정수이다. 일부 실시형태에서, q는 4 내지 12의 정수이다. 일부 실시형태에서, q는 4 내지 8의 정수이다. 일부 실시형태에서, q는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12이다. 일부 실시형태에서, W는 자연 발생 아미노산 잔기, 및 소수(minor) 아미노산 및 비-자연 발생 아미노산 유사체를 포함하는 아미노산 단위이다. 일부 실시형태에서, W는 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 아세틸 또는 포르밀로 보호되거나 보호되지 않은 리신, 아르기닌, 토실 또는 니트로기로 보호되거나 보호되지 않은 아르기닌, 히스티딘, 오르니틴, 아세틸 또는 포르밀로 보호된 오르니틴, 및 시트룰린으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, u는 1, 2, 3, 4, 또는 5이다. 일부 실시형태에서, u는 0이다. 일부 실시형태에서, v는 0이다. 일부 실시형태에서, v는 1이다.

[0160] 일부 실시형태에서, 링커는 하기 식을 갖는다:



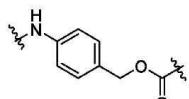
[0161]

[0162] 상기 식에서,

[0163] X는 C_{2-8} 알킬이며;

[0164] Y는 $-(CH_2CH_2O)_qCH_2CH_2-\circ]$ 고;

[0165] W는 아미노산 단위이며;



[0166] Z는

[0166]이고;

[0167] n은 0 또는 1이며;

[0168] p는 0 또는 1이고;

[0169] q는 0 내지 12의 정수이며;

[0170] u는 0 내지 5의 정수이고;

[0171] v는 0 또는 1이고;

[0172] 여기서 **는 약물 모이어티(D)에의 부착점을 나타내며; 그리고

[0173] *는 황체 또는 단편(Ab)에의 부착점을 나타낸다.

[0174] 일부 실시형태에서, n은 0이다. 일부 실시형태에서, n은 1이다. 일부 실시형태에서, X는 $-(CH_2)_2-$ 이다. 일부 실시형태에서, X는 $-(CH_2)_3-$ 이다. 일부 실시형태에서, X는 $-(CH_2)_4-$ 이다. 일부 실시형태에서, X는 $-(CH_2)_5-$ 이다. 일부 실시형태에서, X는 $-(CH_2)_6-$ 이다. 일부 실시형태에서, W는 자연 발생 아미노산 잔기, 및 소수 아미노산 및 비

-자연 발생 아미노산 유사체를 포함하는 아미노산 단위이다. 일부 실시형태에서, W는 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 아세틸 또는 포르밀로 보호되거나 보호되지 않은 리신, 아르기닌, 토실 또는 니트로기로 보호되거나 보호되지 않은 아르기닌, 히스티딘, 오르니틴, 아세틸 또는 포르밀로 보호된 오르니틴, 및 시트룰린으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, w는 1, 2, 3, 4, 또는 5이다. 일부 실시 형태에서, w는 0이다. 일부 실시형태에서, v는 0이다. 일부 실시형태에서, v는 1이다.

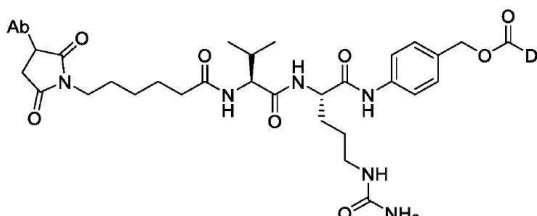
[0175] 일부 실시형태에서, 면역접합체는 선택적으로 엔도소모리티c(endo-somolytic) 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 엔도소모리티c 모이어티는 세포 구획의 방출 성분(cellular compartmental release component), 예를 들어, 세포내의 엔도좀, 리소좀, 소포체(ER), 골지체, 미세소관, 폐옥시좀 또는 다른 소낭체와 같은 당업계에 알려진 세포 구획 중 어느 것으로부터 방출될 수 있는 화합물이다. 일부 경우에, 엔도소모리티c 모이어티는 엔도소모리티c 폴리펩티드, 엔도소모리티c 중합체, 엔도소모리티c 지질 또는 엔도소모리티c 소분자를 포함한다. 일부 경우에, 엔도소모리티c 모이어티는 엔도소모리티c 폴리펩티드를 포함한다. 다른 경우에, 엔도소모리티c 모이어티는 엔도소모리티c 중합체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 엔도소모리티c 중합체는 pH-반응성 엔도소모리티c 중합체이다. pH-반응성 중합체는 환경의 pH에 따라 크기가 증가(팽윤)하거나 붕괴하는 중합체를 포함한다. 폴리아크릴산 및 키토산이 pH-반응성 중합체의 예이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 엔도소모리티c 모이어티는 막-파괴성 중합체이다. 일부 경우에, 막-파괴성 중합체는 양이온성 중합체, 중성 또는 소수성 중합체 또는 음이온성 중합체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 막-파괴성 중합체는 친수성 중합체이다. 일부 실시형태에서, p(알킬아크릴산)은 폴리(프로필아크릴산)(polyPAA), 폴리(메타크릴산)(PMAA), 폴리(에틸아크릴산)(PEAA), 및 폴리(프로필 아크릴산)(PPAA)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 p(알킬아크릴산)은 Jones, et al., *Biochemistry Journal* 372:65-75 (2003)에 개시된 p(알킬아크릴산)일 수 있다. 일부 실시형태에서, pH-반응성 막-파괴성 중합체는 p(부틸 아크릴레이트-co-메타크릴산)을 포함한다. 예를 들어, Bulmus, et al., *Journal of Controlled Release* 93:105-120 (2003); 및 Yessine et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1613:28-38 (2003)을 참고한다. 일부 실시형태에서, pH-반응성 막-파괴성 중합체는 p(스티렌-알트-말레산 무수물)을 포함한다. 예를 들어, Henry et al., *Biomacromolecules* 7:2407-2414 (2006)을 참고한다. 일부 실시형태에서, pH-반응성 막-파괴성 중합체는 피리딜다이설파이드 아크릴레이트(PDSA) 중합체, 예를 들어, 폴리(MAA-co-PDSA), 폴리(EAA-co-PDSA), 폴리(PAA-co-PDSA), 폴리(MAA-co-BA-co-PDSA), 폴리(EAA-co-BA-co-PDSA), 또는 폴리(PAA-co-BA-co-PDSA) 중합체를 포함한다. 예를 들어, El-Sayed et al., *Journal of Controlled Release* 104:417-427 (2005); 또는 Flanary et al., *Bioconjugate Chem.* 20:241-248 (2009)를 참고한다. 일부 실시형태에서, 엔도소모리티c 모이어티는 지질(예를 들어, 융합원성(fusogenic) 지질)이다. 일부 실시형태에서, 식 (I): A-X-B-Y-C의 분자는 엔도소모리티c 지질(예를 들어, 융합원성 지질)과 추가로 접합된다. 예시적인 융합원성 지질은 1,2-다이레오일-sn-3-포스포에탄올아민(DOPE), 포스파티딜에탄올아민(POPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), (6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트라이아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-올(Di-Lin), N-메틸(2,2-다이((9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이에닐))-1,3-다이옥솔란-4-일)에탄아민(XTC)을 포함한다. 엔도소모리티c 모이어티로서 적합한 예시적인 소분자는 퀴닌(quinine), 클로로퀸(chloroquine), 하이드록시클로로퀸, 아모다이아퀸(amodiaquin)(카르노퀸(carnoquine)), 아모피로퀸(amopyroquine), 프리마퀸(primaquine), 메플로퀸(mefloquine), 니바퀸(nivaquine), 할로판트린(halofantrine), 퀴논 이민, 또는 임의의 그의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0176] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "연결"은 하나의 분자 물질의 작용기와 다른 분자 물질 사이의 화학적 반응으로부터 형성된 결합 또는 화학적 모이어티를 말한다. 그러한 결합은 공유 및 비-공유 결합을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는 한편, 그러한 화학적 모이어티는 에스테르, 카보네이트, 카바메이트, 이민 포스페이트 에스테르, 하이드라존, 아세탈, 오르то에스테르, 웹터드 연결 및 올리고뉴클레오티드 연결을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 가수분해적으로 안정한 연결은 연결이 물에서 실질적으로 안정하며, 연장된 기간동안, 아마도 심지어 무한하게, 생리학적 조건을 포함하지만 이에 제한되지 않는 유용한 pH 값에서 물과 반응하지 않음을 의미한다. 가수분해적으로 불안정하거나 분해가능한 연결은 연결이 물에서 또는 예를 들어 혈액을 비롯한 수용액에서 분해가능함을 의미한다. 효소적으로 불안정하거나 분해가능한 연결은 연결이 하나 이상의 효소에 의해 분해될 수 있음을 의미한다. 단지 예로서, PEG 및 관련 중합체는 중합체 백본내에 또는 중합체 백본과 중합체 분자의 말단 작용기 중 하나 이상 사이의 링커 기내에 분해가능한 연결을 포함할 수 있다. 그러한 분해가능한 연결은 PEG 카르복실산 또는 활성화된 PEG 카르복실산과 생물학적 활성제상의 알콜기의 반응에 의해 형성된 에스테르 연결을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 여기서 그러한 에스테르기는 일반적으로 생리학적 조건하에서 가수분해되어 생물학적 활성제를 방출한다. 다른 가수분해적으로 분해가능한 연결은 카보네이트 연결; 아민과

알데히드의 반응으로부터 야기된 이민 연결; 알콜을 포스페이트기와 반응시켜 형성된 포스페이트 에스테르 연결; 하이드라지드와 알데히드의 반응 생성물인 하이드라존 연결; 알데히드와 알콜의 반응 생성물인 아세탈 연결; 포르메이트와 알콜의 반응 생성물인 오르토에스테르 연결; PEG와 같은 중합체의 단부에서를 포함하지만 이에 제한되지 않는 아민기, 및 펩티드의 카르복실기에 의해 형성된 웨티드 연결; 및 중합체의 단부에서를 포함하지만 이에 제한되지 않는 포스포르아미다이트기 및 올리고뉴클레오티드의 5' 하이드록실기에 의해 형성된 올리고뉴클레오티드 연결을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

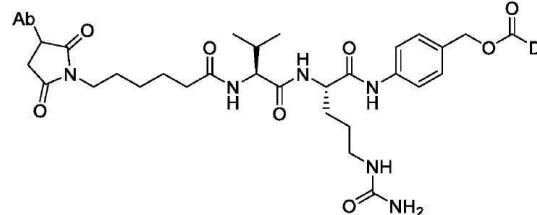
[0177] 1.7 예시적인 ROR1 면역접합체

[0178] 일부 실시형태에서, 본 발명의 ADC는 하기 구조를 가진다:



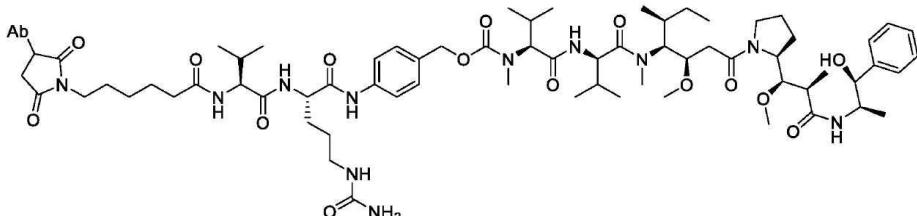
[0179]

[0180] 상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 약물 모이어티이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



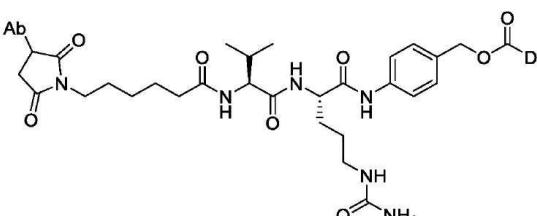
[0181]

[0182] 상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE)이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



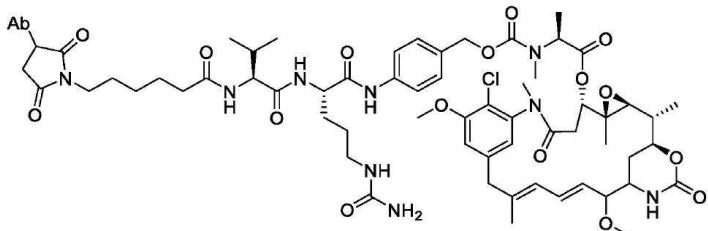
[0183]

[0184] 상기 식에서, Ab는 항체이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0185]

[0186] 상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 메르탄신(DM1로도 불림)이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:

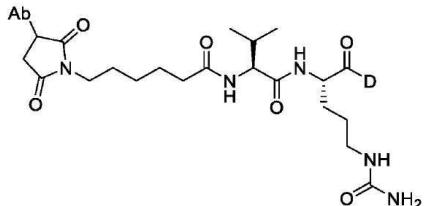


[0187]

상기 식에서, Ab는 항체이다.

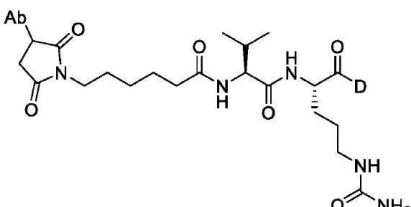
[0189]

일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



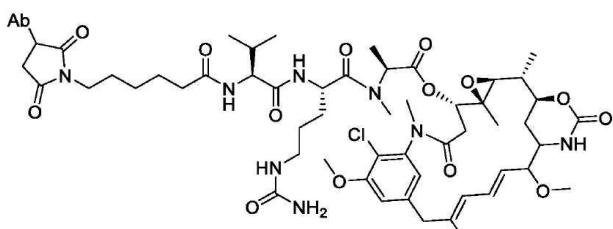
[0190]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 약물 모이어티이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0192]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 메르탄신이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:

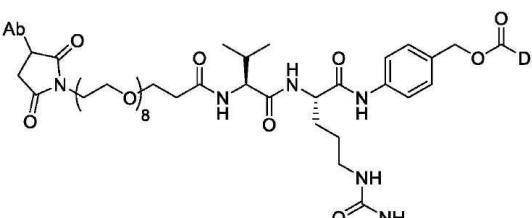


[0194]

상기 식에서, Ab는 항체이다.

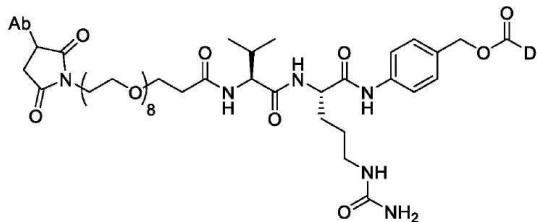
[0196]

일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



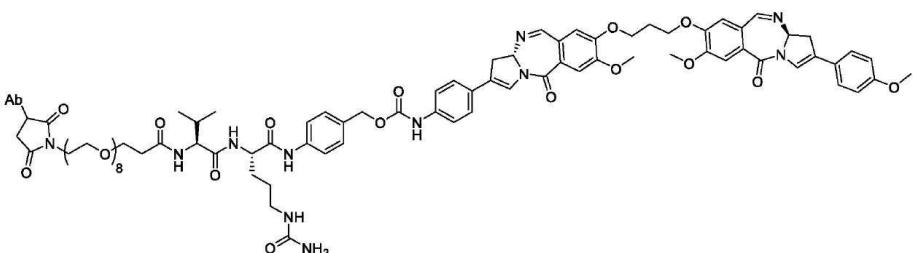
[0197]

[0198] 상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 약물 모이어티이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0199]

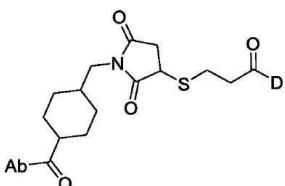
[0200] 상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 이량체 피롤로벤조다이아제핀(PBD)이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0201]

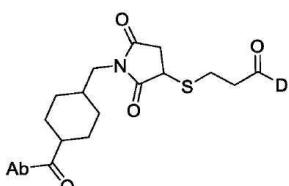
[0202] 상기 식에서, Ab는 항체이다.

[0203] 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 가진다:



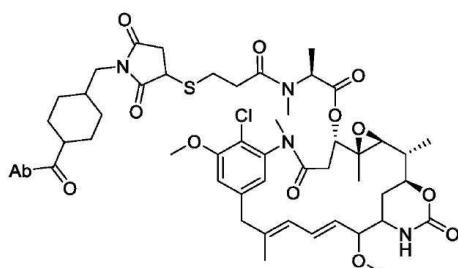
[0204]

[0205] 상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 약물 모이어티이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0206]

[0207] 상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 메르탄신이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:

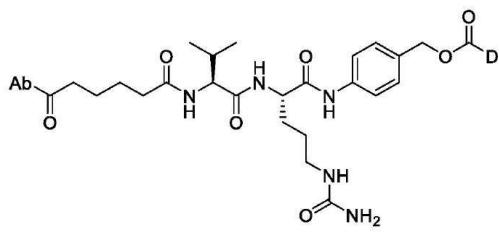


[0208]

[0209] 상기 식에서, Ab는 항체이다.

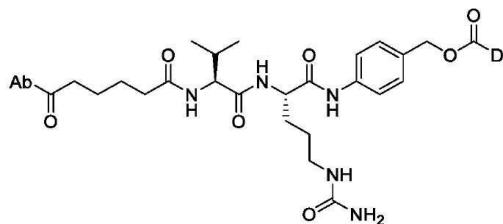
[0210]

일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



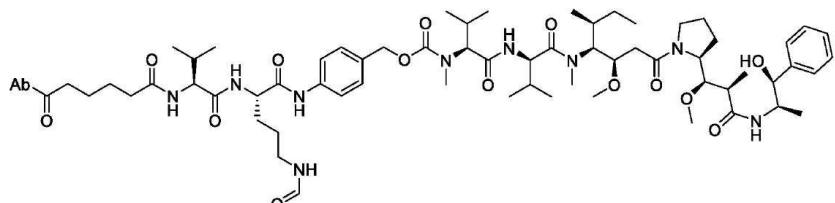
[0211]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 약물 모이어티이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



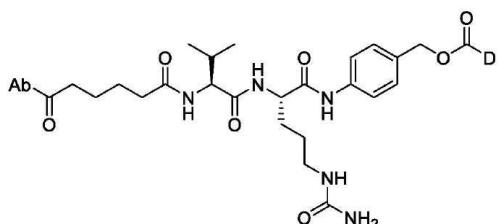
[0213]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 MMAE이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



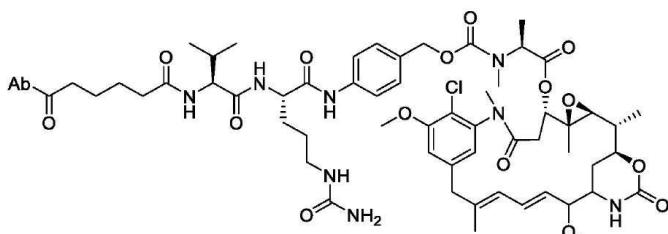
[0215]

상기 식에서, Ab는 항체이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0217]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 메르탄신이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:

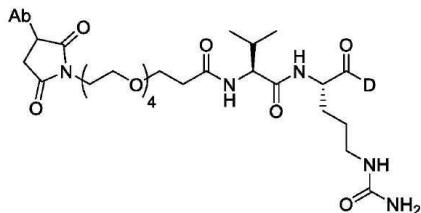


[0219]

상기 식에서, Ab는 항체이다.

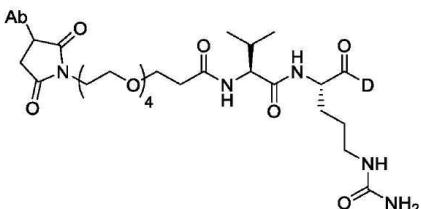
[0221]

일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



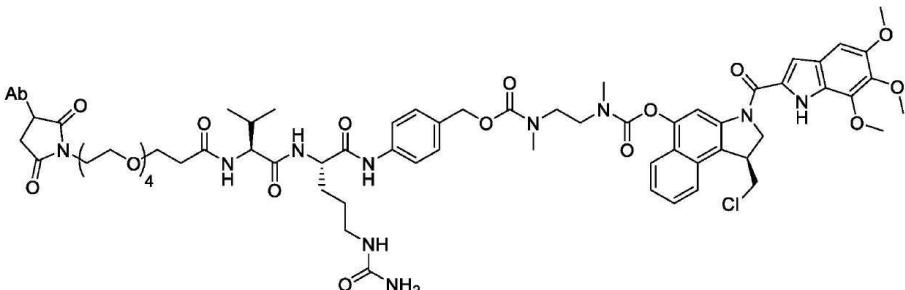
[0222]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 약물 모이어티이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0224]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 듀오카르마이신이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:

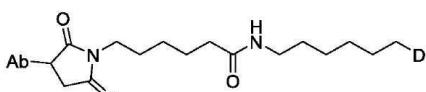


[0226]

상기 식에서, Ab는 항체이다.

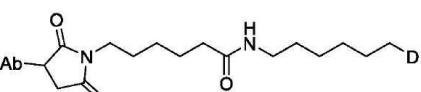
[0228]

일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



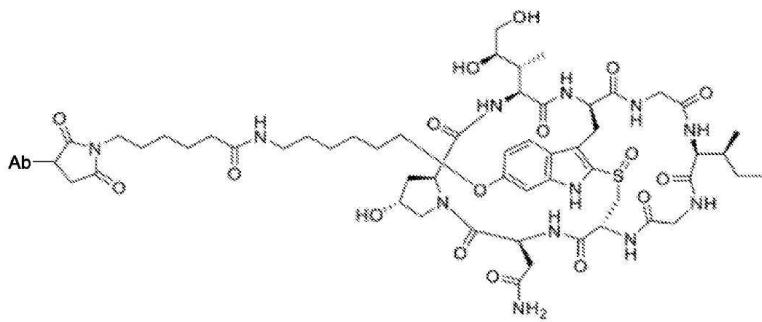
[0229]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 약물 모이어티이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0231]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 α -아마니틴과 같은 아마니틴이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:

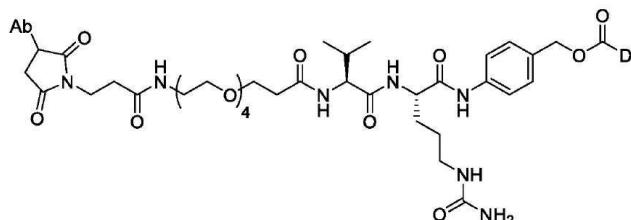


[0233]

상기 식에서, Ab는 항체이다.

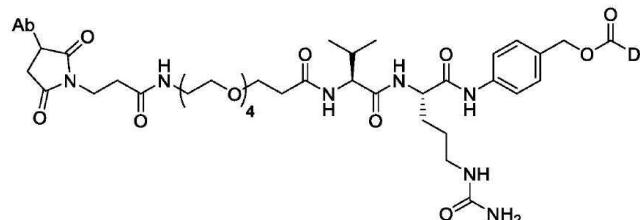
[0235]

일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



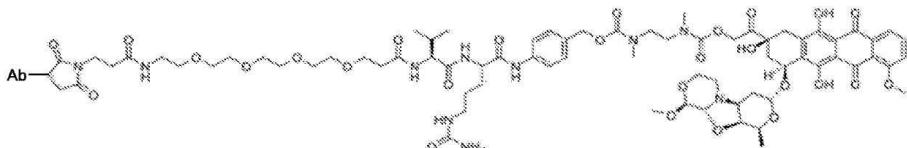
[0236]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 약물 모이어티이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0238]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 PNU159682이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:

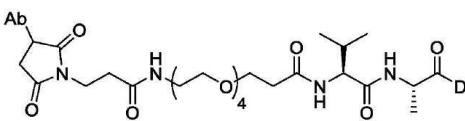


[0240]

상기 식에서, Ab는 항체이다.

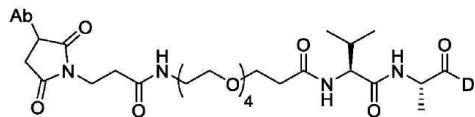
[0242]

일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0243]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 약물 모이어티이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0245]

[0246]

상기 식에서, Ab는 항체이고 D는 PBD이다. 일부 실시형태에서, ADC는 하기 구조를 갖는다:



[0247]

상기 식에서, Ab는 항체이다.

[0249]

본 발명의 예시적인 면역접합체는 하기 표에 나타난다:

[0250]

[표 2] 예시적인 면역접합체

작제물 ID	mAb	접합	링커 성분			탑재물
			VC	PAB		
ADC-A	Ab1	MAL (mc)				MMAE
ADC-E	Ab1	SC	VC	PAB		MMAE
ADC-B	Ab1	SMCC				DM1
ADC-C	Ab1	MAL	VC	PAB		DM1
ADC-F	Ab1	SC	VC	PAB		DM1
ADC-H	Ab1	MAL	VC	PAB		아조나피드
ADC-I	Ab1	MAL (mc)			C6	α-아마니틴
ADC-J	Ab1	MAL	PEG4	VC	PAB	DMEA 듀오카르마이신 TM
ADC-K	Ab1	MAL	PEG4	VA		PBD
ADC-L	Ab1	MAL	DPR	VC	PAB	MMAE
ADC-M	Ab1	MAL	Phe-C4	VC	PAB	MMAE
ADC-N	Ab1	MAL	PEG4	VC	PAB	PNU-159682
ADC-O	Ab1	MAL	C2-Gly3			EDA PNU-159682
ADC-P	Ab1	MAL	Phe-C4	VC	PAB	DMEA PNU-159682
ADC-Q [#]	Ab1*	DBCO	(PEG2	VC	PAB	MMAE)2
ADC-R	Ab1*	DBCO	PEG4	VC	PAB	DMEA PNU-159682
ADC-S	D10	MAL		VC	PAB	MMAE
ADC-T	4A5	MAL		VC	PAB	MMAE

[0251]

[#]분지형 링커-탑재물.

[0253]

*미생물 트랜스글루타미나제를 이용한 부위-특이적 접합.

[0254]

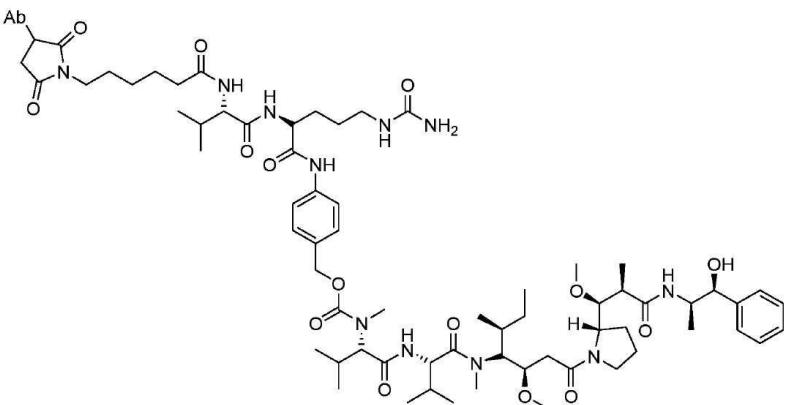
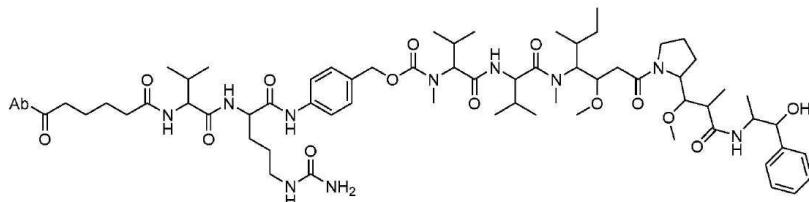
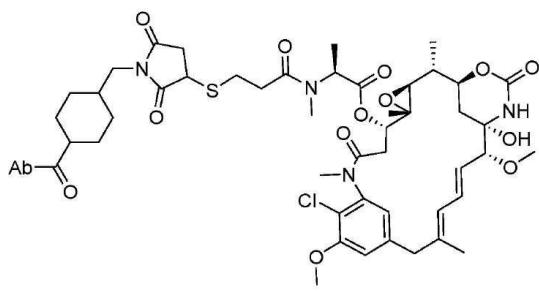
상기 표에서, 약어는 다음과 같이 사용된다: 말레이미드 화학(MAL); 말레이미도카프로일(mc); 석신이미드 화학(SC); 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC); 다이벤질시클로옥틴(DBCO); 다이아미노프로파온산(DPR); 벤질(Phe); 폴리에틸렌 글리콜(PEG); 발린-시트룰린(VC); 발린-알라닌(VA); 파라-아미노-벤질옥시카르보닐(자가 회생 모이어티)(PAB); 다이메틸에틸아민(DMEA); 에틸렌 디아민(EDA); 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE); N2'-데아세틸-N2'-(3-마캡토1-옥소프로필)메이탄신(DM1); 및 피롤로벤조다이아제핀(PBD), [1,2]다이아제피노[3,4-e]인돌. ADC-Q 및 ADC-R의 경우, 탑재물의 부위-특이적 접합은 미생물 트랜스글루타미나제를 이용하여 만들어질 수 있다.

[0255]

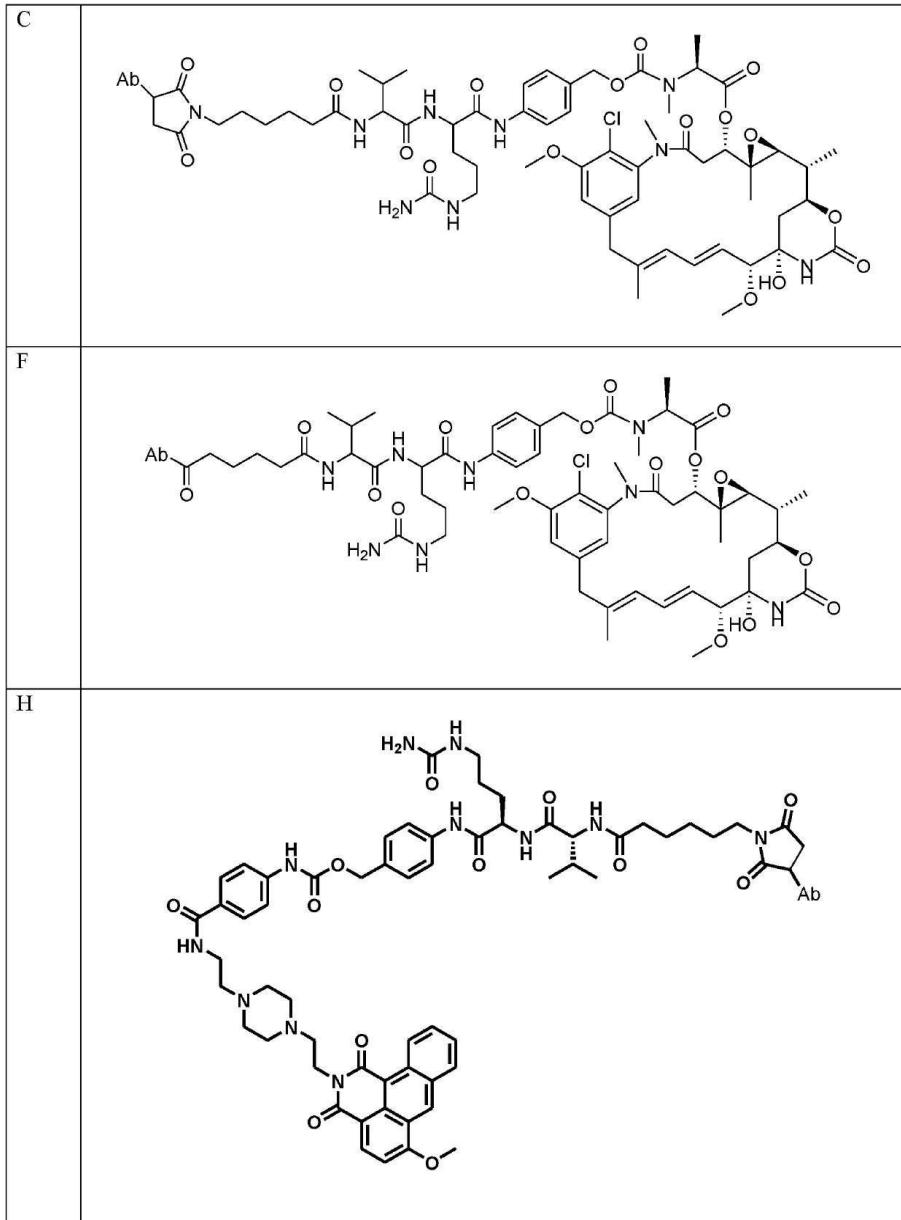
표 2의 면역접합체의 화학 구조는 하기 표에 나타난다:

[0256]

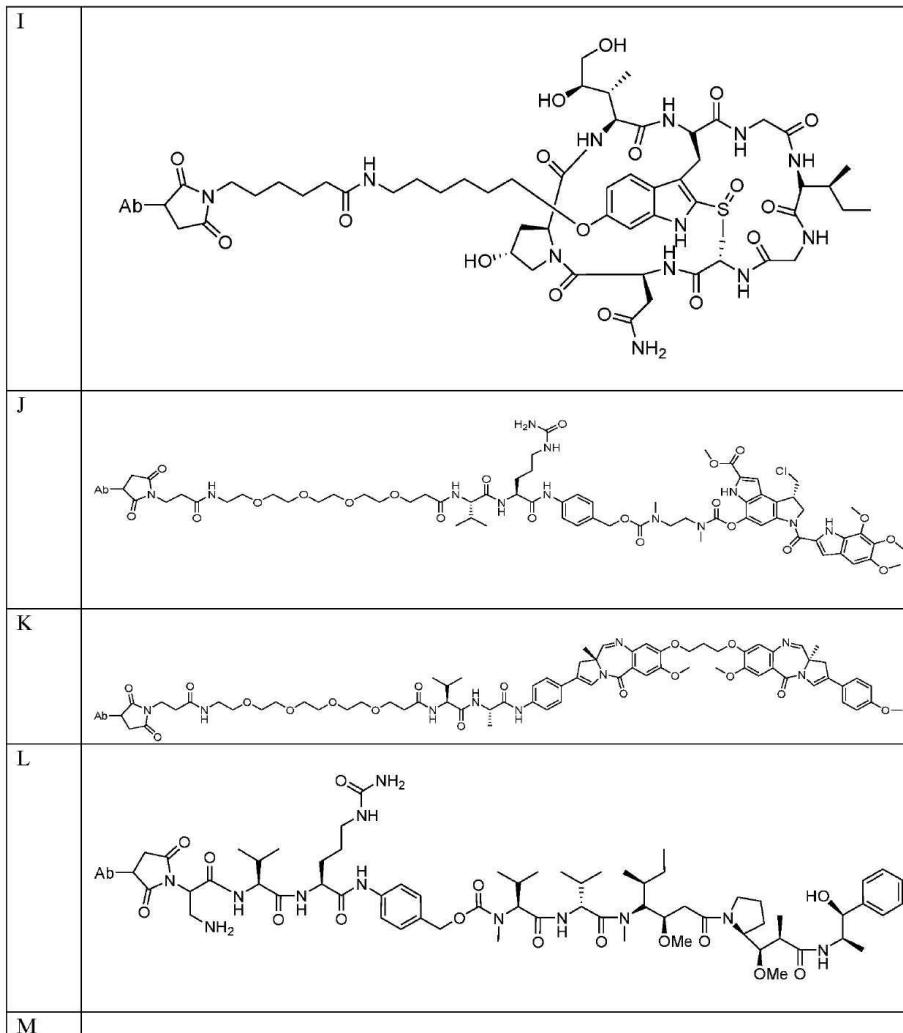
[표 3] 예시적인 면역접합체의 화학 구조

ADC	구조
A	
E	
B	

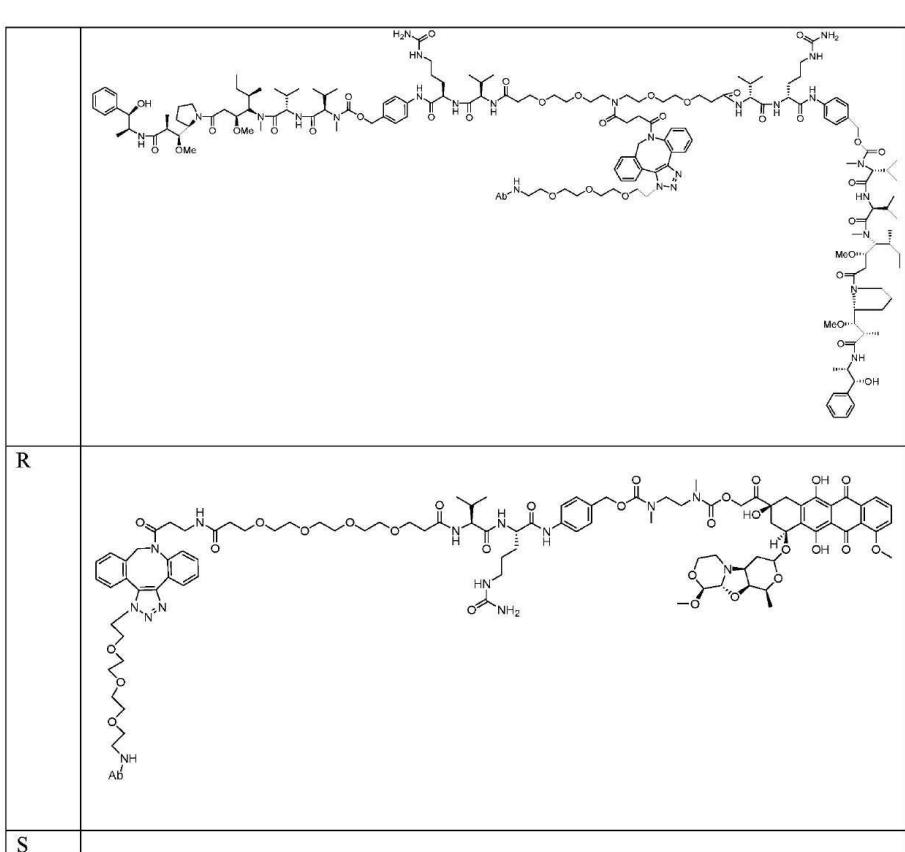
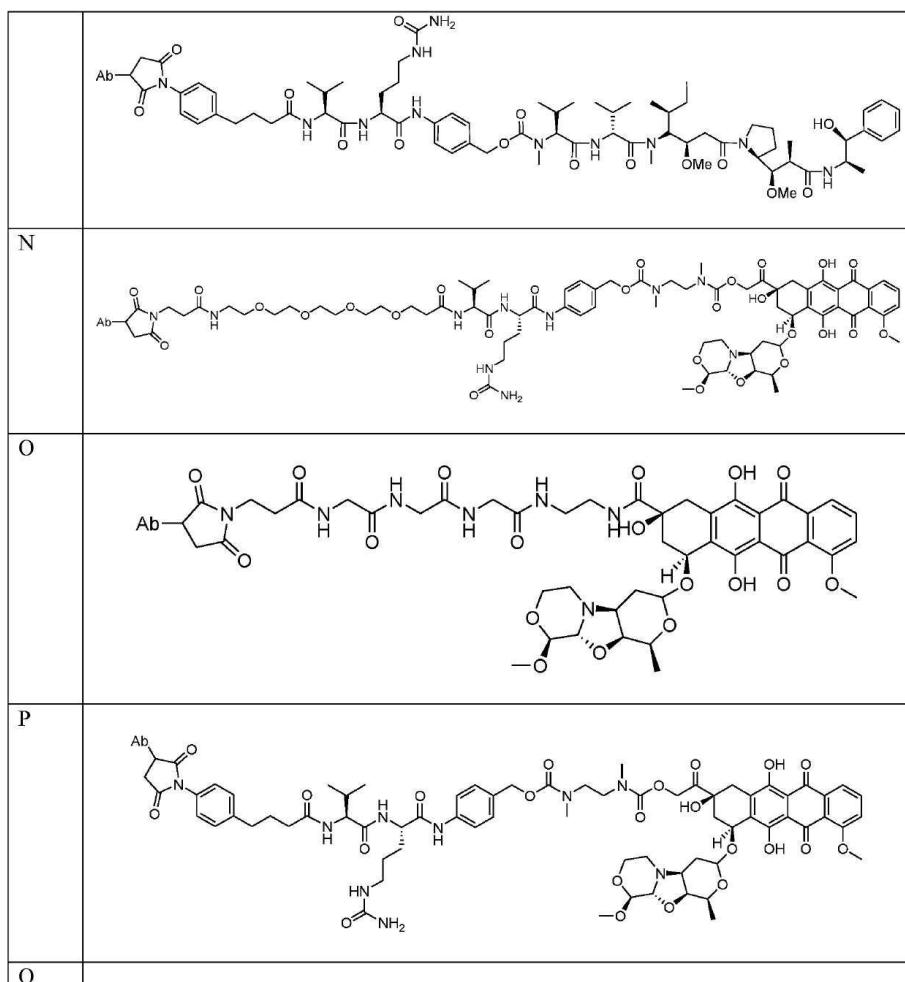
[0257]

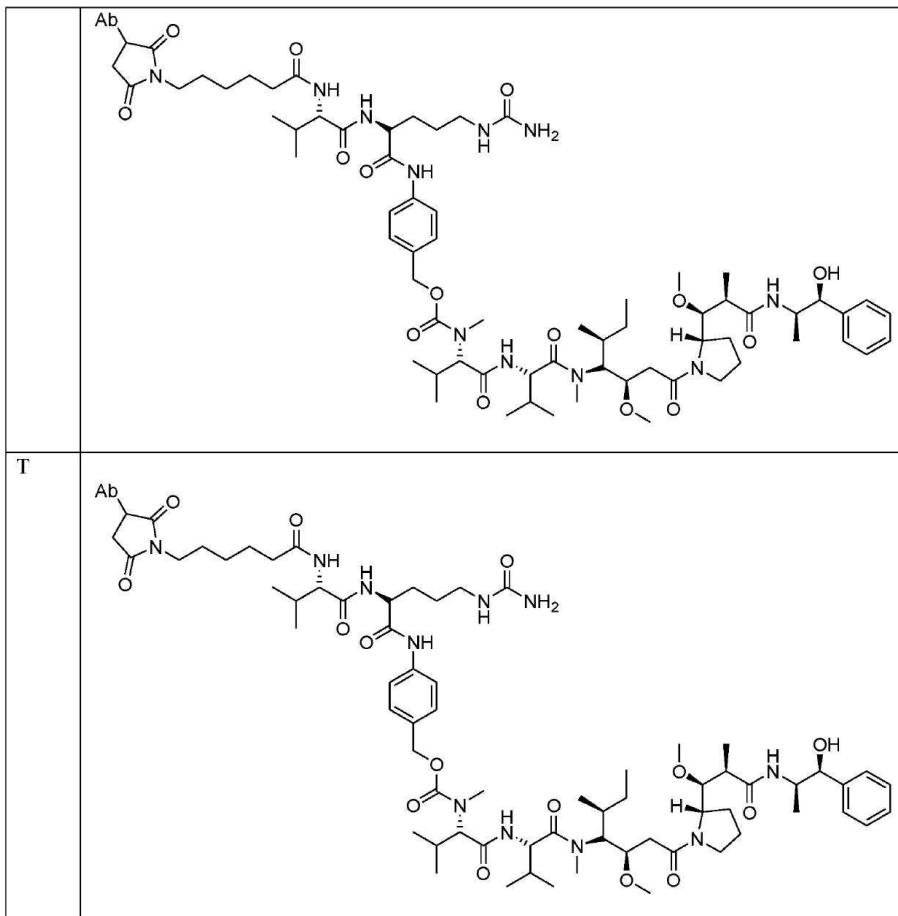


[0258]



[0259]





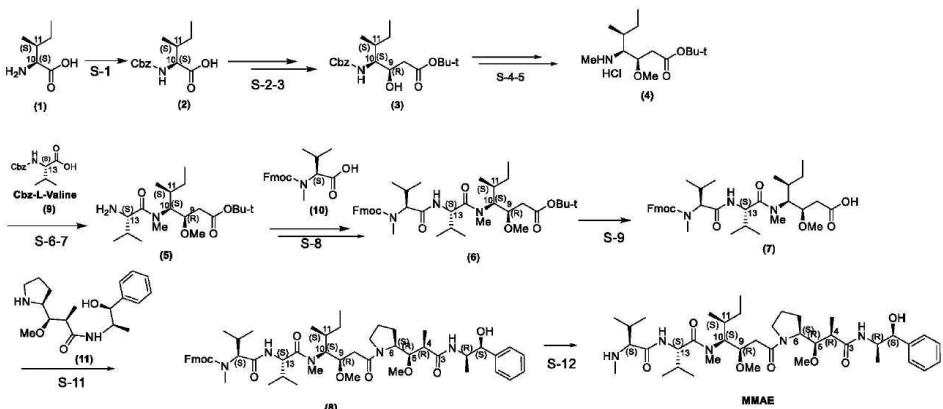
[0262]

[0263] 2. 면역접합체의 합성

[0264]

일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 면역접합체는 도식 1과 2에 나타난 대로 제조된다. MMAE는 도식 1에 나타난 대로 L-이소루이신으로부터 시작하여 12단계로 제조된다. 도식 2에 나타난 대로, 도식 1에서 제조된 MMAE는 Fmoc 보호된 발린-시트률린-p-아미노벤질옥시카르보닐(VC-PAB) 링커의 4-나트로페닐 카보네이트와 커플링된다. Fmoc 기의 탈보호는 VC-PAB-MMAE 링커-MMAE 작제물을 제공한다.

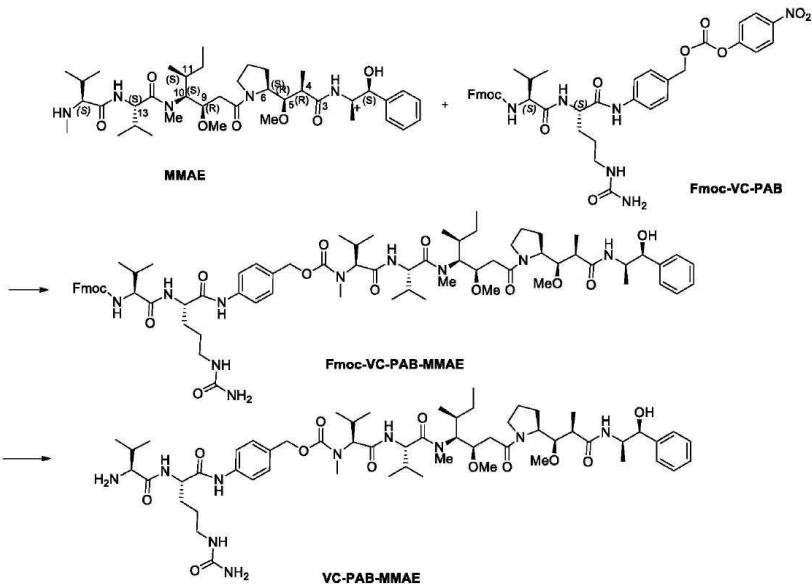
[0265] [도식 1]



[0266]

[0267]

[도식 2]



[0268]

[0269]

표 3에 나타난 ADC를 위한 예시적인 합성 방법이 하기 실시예 1에 설명된다. ADC-A, C, H 내지 P, S 및 T에서, 항체는 시스테인 잔기를 통해 링커/탑재물 모이어티에 공유적으로 결합된다. ADC-B, E, 및 F에서, 항체는 리신 잔기를 통해 링커/탑재물 모이어티에 (또는 B를 위해서는 탑재물에) 공유적으로 결합된다. ADC-Q 및 R에서, 항체는 글루타민 잔기를 통해 링커/탑재물에 공유적으로 결합된다.

[0270]

3. 면역접합체 치료법

[0271]

본 명세서에 개시된 면역접합체는 다양한 암의 치료를 위해 유용하다. ROR1은 림프종 및 고형 종양을 비롯한 많은 타입의 종양에 걸쳐서 발현되는 것으로 나타났다. 높은 비율의 인간 암이 ROR1을 발현한다. 예를 들어, Zhang 등은 그들이 검사한 54% 난소암, 57% 결장암, 77% 폐암, 90% 림프종, 89% 피부암, 83% 췌장암, 73% 고환암, 43% 방광암, 96% 자궁암, 90% 전립선암 및 83% 부신암이 항-ROR1 항체 4A5로 중간-내지-강한 염색을 가졌음을 보여주었다(Zhang et al., *Am J Pathol.* 181(6):1903-10 (2012)). Daneshmanesh 등은 유사하게 CLL 및 모발상 세포 백혈병(HCL)에서 ROR1의 거의 보편적인 발현 및 외투 세포 림프종(MCL), 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)/변연부 림프종(MZL), 소포성 림프종(FL), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 골수성 림프종(AML), 및 골수종과 같은 다른 림프계 암에서 다양한 정도의 발현을 발견하였다(Daneshmanesh et al., *Leuk Lymphoma* 54(4):843-50 (2013)). 본 발명자들의 연구는 유사하게 간세포 암(HCC) 또는 비-소세포 폐암(NSCLC)을 가진 환자의 상당 비율이 ROR1-양성임을 보여주었다. ROR1의 이러한 광범위한 종양 발현 패턴은 본 발명의 면역접합체가 전술한 것들과 같은 많은 혈액암 및 고형 종양의 치료에서 유용하도록 한다. 또한, ROR1 발현이 악성 암에서 증가하며 좋지 못한 예후와 상관되는 것으로 나타났으며; 따라서 본 발명의 면역접합체는 악성 또는 진행된 암을 치료하기에 특히 잘 맞다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체는 부분적 또는 완전한 종양 퇴행으로 유도한다. 구체적 실시형태에서, 부분적 또는 완전한 종양 퇴행은 면역접합체 처리의 최종 용량 후에 지속될 수 있다.

[0272]

서열 번호 1 또는 2에 개시된 ROR1 에피토프에 결합하는 항체(예를 들어, Ab1, Ab2, Ab3, 또는 Ab4)로 만들어진 것과 같은 본 발명의 ROR1 면역접합체는 ROR1 발현에 있어서 이종성인 고형 종양과 같은 암의 치료에 효과적이다. ROR1을 발현하는 종양의 세포가 20%로 적은 종양은 ROR1 면역접합체에 의해 효과적으로 치료될 수 있으며; 예를 들어, 종양은 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 또는 70% 이상의 ROR1을 발현하는 종양의 세포를 가질 수 있다. 이론에 구애됨없이, 본 발명의 ROR1 면역접합체는 방관자 독성 효과(즉, 사멸 종양 세포로부터 방출된 탑재물이 이웃 종양 세포에게 세포독성을 야기함)를 통해, 또는 면역계의 항-종양 면역을 향상시킴으로서, 또는 둘 모두에 의해, ROR1-음성 종양 세포에서 세포 사멸을 야기할 수 있는 것으로 생각된다.

[0273]

"치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 생물학적 질환 및/또는 그의 수반되는 증상 중 적어도 하나를 완화 또는 제거하는 방법을 말한다. 본 명세서에서 사용될 때, 질병, 질환 또는 병태를 "완화"하는 것은 질병, 질환 또는 병태의 증상의 심각성 및/또는 발생 빈도를 감소시키는 것을 의미한다. 또한, 본 명세서에서 "치료"에 대한 언

급은 치유, 일시적 및 예방적 치료에 대한 언급을 포함한다. 암의 치료는 암 성장의 억제(부분적 또는 완전한 암 퇴행의 야기를 포함), 암 진행 또는 전이의 억제, 암 재발 또는 잔존 질병의 예방 및/또는 환자의 생존 연장을 포함한다.

[0274] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 면역접합체에 의해 치료가능한 암은 ROR1-발현 암이다. ROR1-발현 암은 유전자 또는 단백질 발현을 결정하는 임의의 적합한 방법에 의해, 예를 들어, 조직학, 유세포분석, RT-PCR, 또는 RNA-Seq에 의해, 결정될 수 있다. 결정을 위해 사용되는 암 세포는 종양 생검을 통해 또는 순환 종양 세포의 수집을 통해 수득될 수 있다. 일부 실시형태에서, 만일 유세포분석 또는 면역조직화학과 같은 항체-기반 분석이 사용되면, ROR1-발현 암은 동형(isotype) 대조군 항체의 것보다 더 큰 항-ROR1 항체 반응성을 보여주는 세포를 가진 임의의 암이다. 일부 실시형태에서, 만일 RNA-기반 분석이 이용되면, ROR1-발현 암은 ROR1을 발현하지 않는 음성 대조군 세포 또는 암에 비교할 때 상승된 수준의 ROR1 RNA를 나타내는 것들이다.

[0275] 일부 실시형태에서, 항체 및 면역접합체는 혈액 악성종양을 치료하는 데에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 항체 및 면역접합체는 고형 종양을 치료하는 데에 사용하기 위한 것이다. 치료될 암은 예를 들어, 림프종, 소 림프구성 림프종, 변연부 림프종, 변연부 세포 B-세포 림프종, 베켓 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 리히터 형질전환을 거친 비-호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, T 세포 백혈병, 골육종, 신장세포 암종, 간세포 암종, 결장암, 결장직장암, 유방암, 상피 편평세포 암, 흑색종, 골수종, 다발성 골수종, 위암, 뇌암, 폐암, 비-소세포 폐암, 췌장암, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 전립선암, 고환암, 갑상선암 및 두경부암으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료될 암은 다른 치료제로 치료되지 않는 암(예를 들어, 삼중 음성 유방암)일 수 있다.

[0276] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 암의 치료 방법은 본 발명의 면역접합체를 이용한 치료 및 추가의 치료제 또는 생물학적 활성 분자를 이용한 치료를 포함한다. 생물학적 활성 분자의 예는 웨티드, 단백질, 효소, 소분자 약물, 전구약물, 탄수화물, 영상화제, 지질, 뉴클레오시드, 방사성핵종, 올리고뉴클레오티드, 독소, 세포, 항생제, 살진균제, 항-바이러스제, 항-염증제, 항-종양제, 심혈관제, 항-불안제, 호르몬, 성장 인자, 스테로이드제, 미생물 유래된 독소 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 생물학적 활성 분자의 추가 예는 "세포독성 약물 모이어티" 제목하에서 상기에 열거된 것들이다.

[0277] 일부 실시형태에서, 면역접합체 및 추가의 치료제 또는 생물 활성 분자는 동시에, 예를 들어, 동일한 제형으로, 투여된다. 일부 실시형태에서, 그들은 동일하거나 상이한 투약 스케줄로, 별도로 투여된다. 일부 실시형태에서, 추가의 치료제는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 억제제, 브루톤스 티로신 키나제(BTK) 억제제, 라파마이신의 포유동물 타겟(mTOR) 억제제, 포스포이노시티드 3-키나제(PI3K) 억제제, 야누스(Janus) 키나제/신호 전달자(signal transducer) 및 전사의 활성인자(Jak/STAT) 시그널링 억제제, B-세포 림프종 2(Bcl-2) 억제제, 비장 티로신 키나제(SYK) 억제제, 미세소관 억제제, 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 억제제, 폴리 ADP 리보스 폴리머라제(PARP) 억제제, 역형성 림프종 키나제(ALK) 억제제, DNA-회복 억제제, DNA 가교제, 뉴클레오시드 유사체 또는 면역조절제이다.

[0278] 일부 실시형태에서, 추가의 치료제는

- [0279] a) 리툭시맙(rituximab)(항-CD20) 또는 베바시주맙(bevacizumab)(항-VEGF)과 같은 항체;
- [0280] b) 아칼라브루티닙 또는 이브루티닙과 같은 브루톤스 티로신 키나제 억제제;
- [0281] c) 사파니세르틴, 에버롤리무스 또는 BEZ235와 같은 mTOR 억제제;
- [0282] d) 이텔랄리십 또는 부파르리십(buparlisib)과 같은 PI3K 억제제;
- [0283] e) 룩솔리티닙(ruxolitinib)과 같은 Jak/STAT 시그널링 억제제;
- [0284] f) ABT-199/베네토클렉스, Bcl-2i-1, 또는 Bcl-2i-2와 같은 Bcl-2 억제제;
- [0285] g) 포스타마티닙(fostamatinib)과 같은 SYK 억제제;
- [0286] h) 파클리탁셀 또는 빙크리스틴과 같은 미세소관 억제제;
- [0287] i) 에를로티닙과 같은 EGFR 억제제;
- [0288] j) 오라파哩(olaparib)과 같은 PARP 억제제;
- [0289] k) 크리조티닙(crizotinib)과 같은 ALK 억제제;

- [0290] 1) 카르보플라틴과 같은 DNA-회복 억제제;
- [0291] m) 옥살리플라틴/시스플라틴과 같은 DNA 가교제;
- [0292] n) 쟈시타빈과 같은 뉴클레오시드 유사체; 또는
- [0293] o) 레날리도미드(lenalidomide) 또는 포말리도미드(pomalidomide)와 같은 면역조절 약물(IMiD)이다.
- [0294] 구체적 실시형태에서, 추가의 치료제는 베네토클랙스이다.
- [0295] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체 및 추가의 치료제 또는 생물학적 활성 분자는 CLL, MCL, 또는 리처스 형질전환을 거친 비-호지킨 림프종을 치료하기 위하여 조합되어 사용된다. 구체적 실시형태에서, 추가의 치료제 또는 생물학적 활성 분자는 예를 들어, 이브루티닙, 아칼라브루티닙, 베네토클랙스, Bcl-2i-1, Bcl-2i-2, 에버롤리무스, 사파니세르닙, 또는 이델랄리십이다.
- [0296] 추가의 치료제의 추가적인 예는 파크리티닙(pacritinib), 부파르리십, BEZ235, 룩솔리티닙, 포스타마티닙, 리툭시맙, 레날리도미드, 포말리도미드, 파클리탁셀, 빙크리스틴, 에를로티닙, 크리조티닙, 카르보플라틴, 옥살리플라틴/시스플라틴, 베바시주맙, 및 쟈시타빈이다.
- [0297] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체는 환자의 면역계를 향상시키는 면역 관문 조절제와 조합되어 사용된다. 예를 들어, 접합체는 프로그램된 사멸-리간드(programmed death-ligand) 1(PD-L1, B7-H1, CD274로도 알려짐), 프로그램된 사멸 1(PD-1), CTLA-4, PD-L2(B7-DC, CD273), LAG3, TIM3, 2B4, A2aR, B7H1, B7H3, B7H4, BTLA, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD80, CD86, CD137, CD160, CD226, CD276, DR3, GAL9, GITR, HAVCR2, HVEM, IDO1, IDO2, ICOS(유도성 T 세포 공자극인자), KIR, LAIR1, LIGHT, MARCO(콜라겐성 구조를 가진 대식세포 수용체), PS(포스파티딜세린), OX-40, SLAM, TIGHT, VISTA, VTCN1, 또는 임의의 그 조합을 타겟팅하는 항체 또는 항체 유도체, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 소 간섭 RNA, 앱타머(aptamer), 또는 웨პ티드와 같은 면역 관문 억제제와 이용된다.
- [0298] 본 발명의 면역접합체는 본 명세서에 개시된 치료 방법에서 사용될 수 있거나, 본 명세서에 개시된 치료에서 사용하기 위한 것일 수 있거나, 및/또는 본 명세서에 개시된 치료를 위한 의약의 제조에서의 사용을 위한 것일 수 있다. 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 본 발명의 면역접합체를 포함하는 키트 및 제조 물품을 제공한다.
- [0299] **4. 약학 조성물**
- [0300] 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체는 하나 이상의 약학적 허용 부형제, 담체 및 희석제를 추가로 포함하는 약학 조성물내에 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 및 면역접합체는 멸균 용액(예를 들어, 0.9% NaCl을 포함하는 용액)에 혼탁되어 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 용액은 추가로 하기 중 하나 이상을 포함한다: 베퍼(예를 들어, 아세테이트, 시트레이트, 히스티딘, 석시네이트, 포스페이트, 바이카보네이트 및 하이드록시메틸아미노메탄 (Tris) 베퍼); 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트 80(Tween 80), 폴리소르베이트 20(Tween 20), 및 폴록사며 188); 폴리올/이당류/다당류(예를 들어, 글루코스, 멕스트로스, 만노스, 만니톨, 솔비톨, 수크로스, 트레할로스 및 멕스트란 40); 아미노산(예를 들어, 글리신 및 아르기닌); 항산화제(예를 들어, 아스코르브산 및 메티오닌); 및/또는 칼레이팅제(예를 들어, EDTA 및 EGTA). 이들 부형제의 임의의 조합이 또한 고려된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 면역접합체는 동결건조되어 선적/저장되며 투여 전에 재구성된다. 일부 실시형태에서, 동결건조된 항체 또는 면역접합체 제형은 만니톨, 솔비톨, 수크로스, 트레할로스 및/또는 멕스트란 40과 같은 증량제를 포함한다. 동결건조된 제형은 유리 바이알과 같은 바이알에 함유될 수 있다. 제형화될 경우, 면역접합체는, 재구성되건 되지 않건, 일부 pH에서, 예를 들어, 7.0 미만(예를 들어, 4.5 내지 6.5, 4.5 내지 6.0, 4.5 내지 5.5, 4.5 내지 5.0, 또는 5.0 내지 6.0의 pH)에서 베퍼링될 수 있다.
- [0301] 본 발명의 면역접합체는, 본 명세서에서 사용될 때, 접합체의 약학적 허용 염 또는 에스테르를 포함한다. 약학적 허용 염은, 폴리펩티드에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어, 알칼리 금속 이온, 알칼리 토금속 이온, 또는 알루미늄 이온에 의해 치환되거나; 또는 유기 염기와 배위될 때 형성될 수 있다. 또한, 면역접합체의 염 형태는 출발 물질 또는 중간체의 염을 이용하여 제조될 수 있다. 본 명세서에 개시된 면역접합체는 본 명세서에 개시된 폴리펩티드의 유리 염기 형태를 약학적 허용 무기 또는 유기 산과 반응시킴으로써 약학적 허용 산 부가 염(약학적 허용 염의 타입)으로서 제조될 수 있다. 대안적으로, 본 명세서에 개시된 면역접합체는 본 명세서에 개시된 폴리펩티드의 아미노산의 유리 산 형태를 약학적 허용 무기 또는 유기 염기와 반응시킴으로써 약학적 허용 염기 부가 염(약학적 허용 염의 타입)으로서 제조될 수 있다.
- [0302] 약학적 허용 염은 (1) 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등과 같은 무기산으로 형성되거나; 또는

아세트산, 프로피온산, 헥산산, 시클로펜탄프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 락트산, 말론산, 석신산, 말산, 말례산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설플산, 에탄설플산, 1,2-에탄다이설플산, 2-하이드록시에탄설플산, 벤젠설플산, 2-나프탈렌설플산, 4-메틸바이시클로-[2.2.2]옥트-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵تون산, 4,4'-메틸렌비스-(3-하이드록시-2-엔-1-카르복실산), 3-페닐프로피온산, 트라이메틸아세트산, 3차 부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 하이드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 뮤콘산 등과 같은 유기산으로 형성된, 산 부가염; 및 2) 모 화합물에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어, 알칼리 금속 이온, 알칼리 토금속 이온, 또는 알루미늄 이온에 의해 치환되거나; 또는 유기 염기와 배위될 때 형성되는 염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 허용가능한 유기 염기는 에탄올아민, 다이에탄올아민, 트라이에탄올아민, 트로메타민, N-메틸글루카민 등을 포함한다. 허용가능한 무기 염기는 알루미늄 하이드록사이드, 칼슘 하이드록사이드, 포타슘 하이드록사이드, 소듐 카보네이트, 소듐 하이드록사이드 등을 포함한다. 약학적 허용 염의 상응하는 반대이온은 이온 교환 크로마토그래피, 이온 크로마토그래피, 모세관 전기영동, 유도 결합 플라즈마, 원자 흡수 분광법, 질량 분석법, 또는 임의의 그 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 방법을 이용하여 분석되고 확인될 수 있다.

[0303] 일부 실시형태에서, 본 발명의 약학 조성물은 다중입자(multiparticulate) 제형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 나노입자 제형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 cMAP, 시클로덱스트린, 및/또는 지질을 포함한다. 일부 경우에, 나노입자는 고형 지질 나노입자, 중합체성 나노입자, 자가-유화 나노입자, 리포좀, 마이크로에멀젼 및/또는 미셀 용액(micellar solution)을 포함한다. 추가의 예시적인 나노입자는 상자성 나노입자, 초상자성 나노입자, 금속 나노입자, 풀러렌(fullerene)-유사 물질, 무기 나노튜브, 텐드리머(예를 들어, 공유적으로 부착된 금속 킬레이트에서처럼), 나노섬유, 나노혼(nanohorn), 나노-어니언(nano-onion), 나노로드(nanorod), 나노로프(nanorope) 및/또는 콘텀 닷(quantum dot)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 금속 나노입자, 예를 들어, 스칸듐, 티타늄, 바나듐, 크롬, 망간, 철, 코발트, 니켈, 구리, 아연, 이트륨, 지르코늄, 니오븀, 몰리브데늄, 루테늄, 로듐, 팔라듐, 은, 카드뮴, 하프늄, 탄탈륨, 텉스텐, 레늄, 오스뮴, 이리듐, 백금, 금, 가돌리늄, 알루미늄, 갈륨, 인듐, 주석, 탈륨, 납, 비스무스, 마그네슘, 칼슘, 스트론튬, 바륨, 리튬, 소듐, 포타슘, 봉소, 규소, 인, 게르마늄, 비소, 안티몬, 및 그의 조합, 핵금 또는 산화물의 나노입자이다.

[0304] 당업계에서 허용되는 면역접합체 투여를 위한 임의의 방법이 이용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 전형적으로 비경구 투여에 적합하다. 본 명세서에서 사용될 때, 약학 조성물의 "비경구 투여"는, 대상의 조직의 물리적 틀형성(physical breaching) 및 조직내의 틀을 통한 약학 조성물의 투여를 특징으로 하며 따라서 일반적으로 혈류내로, 근육내로, 또는 내부 장기내로 직접 투여를 야기하는, 투여의 임의의 경로를 포함한다. 비경구 투여는 따라서 조성물의 주사에 의한, 수술적 절개를 통한 조성물의 적용에 의한, 조직-침투 비-수술적 상처를 통한 조성물의 적용 등에 의한 약학 조성물의 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 비경구 투여는 피하, 복강내, 근육내, 흉골내, 정맥내, 동맥내, 척추강내, 뇌실내, 요도내, 두개내, 종양내 및 윤활막내 주사 또는 주입; 및 신장 투석 주입 기술을 포함하는 것으로 고려되지만 이에 제한되지 않는다. 국소 관류법 또한 고려된다. 구체적 실시형태는 정맥내 및 피하 경로를 포함한다.

5. 제조 물품 및 키트

[0305] 본 발명은 또한 본 면역접합체의 약학 조성물, 선택적으로 추가의 생물학적 활성 분자(예를 들어, 다른 치료제) 및 사용 설명서를 함유하는 용기(예를 들어, 단일-사용 또는 다중-사용 용기)를 포함하는 제조 물품, 예를 들어, 키트를 제공한다. 면역접합체 및 추가의 생물학적 활성 분자는 비-반응성 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 바이알 또는 앰플과 같은 적합한 포장재내에 별도로 포장될 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이알 또는 앰플은 면역접합체 또는 추가의 치료제 또는 생물학적 활성 분자를 포함하는 동결건조된 스톡(stock)(예를 들어, 2x, 5x, 10x 또는 더 많이)을 보유한다. 일부 실시형태에서, 키트와 같은 제조 물품은 면역접합체 및/또는 생물학적 활성 분자를 투여하기 위한 의료 장치(예를 들어, 시린지 및 바늘); 및/또는 적절한 희석제(예를 들어, 멸균수 및 생리식염수)를 포함한다. 본 발명은 또한 상기 물품의 제조 방법을 포함한다.

6. 일부 실시형태

[0306] 본 발명의 일부 실시형태는 하기에 추가로 예시된다.

[0307] 1. 하기 화학식의 면역접합체 또는 그의 약학적 허용 염:

- [0310] $\text{Ab}-((\text{L})_m-(\text{D}))_n$
- [0311] 상기 식에서,
- [0312] i. Ab는 ROR1 단백질에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이고;
- [0313] ii. L은 링커이며;
- [0314] iii. D는 항-튜불린 약제, DNA 알킬화제, DNA 가교제, DNA 삽입제 및 RNA 폴리머라제 II 억제제로부터 선택되는 약물 모이어티이고;
- [0315] iv. m은 0 또는 1이며; 그리고
- [0316] v. n은 1 내지 10의 정수이다.
- [0317] 2. 식 $\text{Ab}-((\text{L})_m-(\text{D}))_n$ 의 면역접합체 또는 그의 약학적 허용 염:
- [0318] 상기 식에서,
- [0319] i. Ab는 ROR1 단백질에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이고;
- [0320] ii. L은 절단가능 링커이며;
- [0321] iii. D는 항-튜불린 약제, DNA 알킬화제, DNA 가교제, DNA 삽입제 및 RNA 폴리머라제 II 억제제로부터 선택되는 약물 모이어티이고;
- [0322] iv. m은 0 또는 1이며; 그리고
- [0323] v. n은 1 내지 10의 정수이다.
- [0324] 3. 식 $\text{Ab}-((\text{L})_m-(\text{D}))_n$ 의 면역접합체 또는 그의 약학적 허용 염:
- [0325] 상기 식에서,
- [0326] i. Ab는 ROR1 단백질에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이고;
- [0327] ii. L은 링커이며, 여기서 링커는 리신 아미노산 잔기에 부착되지 않으며;
- [0328] iii. D는 항-튜불린 약제, DNA 알킬화제, DNA 가교제, DNA 삽입제 및 RNA 폴리머라제 II 억제제로부터 선택되는 약물 모이어티이고;
- [0329] iv. m은 0 또는 1이며; 그리고
- [0330] v. n은 1 내지 10의 정수이다.
- [0331] 4. 실시형태 1-3 중 어느 하나에 있어서, D는 항-튜불린 약제인 면역접합체.
- [0332] 5. 실시형태 4에 있어서, 항-튜불린 약제는 오리스타틴, 돌라스타틴 또는 그의 유사체를 포함하는 면역접합체.
- [0333] 6. 실시형태 5에 있어서, 오리스타틴 또는 돌라스타틴은 오리스타틴 E, 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE) 또는 모노메틸 오리스타틴 F(MMAF), 다이메틸발린-발린-돌라이소루인-돌라프로인-페닐알라닌-p-페닐렌다이아민(AFP), 5-벤조일발레르산-오리스타틴 E 에스테르(AEVB), 또는 (AEB)를 포함하는 면역접합체.
- [0334] 7. 실시형태 6에 있어서, 오리스타틴은 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE)를 포함하는 면역접합체.
- [0335] 8. 실시형태 4에 있어서, 항-튜불린 약제는 메이탄신, 메이탄시노이드 또는 그의 유사체를 포함하는 면역접합체.
- [0336] 9. 실시형태 8에 있어서, 메이탄시노이드는 안사미토신, 메르탄신/엠탄신(DM1) 또는 라브탄신/소라브탄신(DM4)을 포함하는 면역접합체.
- [0337] 10. 실시형태 9에 있어서, 메이탄시노이드는 메르탄신/엠탄신(DM1)을 포함하는 면역접합체.
- [0338] 11. 실시형태 9에 있어서, 메이탄시노이드는 라브탄신/소라브탄신(DM4)을 포함하는 면역접합체.
- [0339] 12. 실시형태 1에 있어서, D는 DNA 알킬화제인 면역접합체.

- [0340] 13. 실시형태 12에 있어서, DNA 알킬화제는 듀오카르마이신을 포함하는 면역접합체.
- [0341] 14. 실시형태 1에 있어서, D는 DNA 가교제인 면역접합체.
- [0342] 15. 실시형태 14에 있어서, DNA 가교제는 피롤로벤조다이아제핀(PBD)을 포함하는 면역접합체.
- [0343] 16. 실시형태 1에 있어서, D는 DNA 삽입제인 면역접합체.
- [0344] 17. 실시형태 16에 있어서, DNA 삽입제는 PNU-159682를 포함하는 면역접합체.
- [0345] 18. 실시형태 1에 있어서, D는 RNA 폴리머라제 II 억제제인 면역접합체.
- [0346] 19. 실시형태 18에 있어서, RNA 폴리머라제 II 억제제는 α -아마니틴을 포함하는 면역접합체.
- [0347] 20. 실시형태 1에 있어서, D는 공유적으로 연결된 2가지 상이한 약물 모이어티인 면역접합체.
- [0348] 21. 실시형태 20에 있어서, D는 서로 공유적으로 연결된 DNA 알킬화제, DNA 가교제, DNA 삽입제, RNA 폴리머라제 II 억제제 또는 항-튜불린 약제 중 임의의 둘 이상인 면역접합체.
- [0349] 22. 실시형태 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 키메릭, 인간화, 탈면역화 또는 인간 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 면역접합체.
- [0350] 23. 실시형태 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 Fab, F(ab)₂, 또는 scFv를 포함하는 면역접합체.
- [0351] 24. 실시형태 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 면역접합체는 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 추가로 포함하며, 여기서 제2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 상기 항체 또는 항원 결합 단편과 구별되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 면역접합체.
- [0352] 25. 실시형태 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 하기를 포함하는 면역접합체:
- [0353] a. 서열 번호 7에 개시된 중쇄 CDR1(HCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 8에 개시된 중쇄 CDR2(HCDR2) 아미노산 서열, 서열 번호 9에 개시된 중쇄 CDR3(HCDR3) 아미노산 서열, 서열 번호 10에 개시된 경쇄 CDR1(LCDR1) 아미노산 서열, 서열 번호 11에 개시된 경쇄 CDR2(LCDR2) 아미노산 서열, 및 서열 번호 12에 개시된 경쇄 CDR3(LCDR3) 아미노산 서열;
- [0354] b. 서열 번호 27에 개시된 HCDR1 아미노산 서열, 서열 번호 28에 개시된 HCDR2 아미노산 서열, 서열 번호 29에 개시된 HCDR3 아미노산 서열, 서열 번호 30에 개시된 LCDR1 아미노산 서열, 서열 번호 31에 개시된 LCDR2 아미노산 서열 및 서열 번호 32에 개시된 LCDR3 아미노산 서열; 또는
- [0355] c. 서열 번호 37에 개시된 HCDR1 아미노산 서열, 서열 번호 38에 개시된 HCDR2 아미노산 서열, 서열 번호 39에 개시된 HCDR3 아미노산 서열, 서열 번호 40에 개시된 LCDR1 아미노산 서열, 서열 번호 41에 개시된 LCDR2 아미노산 서열, 및 서열 번호 42에 개시된 LCDR3 아미노산 서열.
- [0356] 26. 실시형태 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 서열 번호 6에 개시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 5에 개시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 면역접합체.
- [0357] 27. 실시형태 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 항체가 약 40 nM 미만의 K_D로 ROR1에 결합하는 면역접합체.
- [0358] 28. 실시형태 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 항체가 약 1 nM 미만의 K_D로 ROR1에 결합하는 면역접합체.
- [0359] 29. 실시형태 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 항체가 항체 D10의 친화성의 약 10배보다 큰 친화성으로 ROR1에 결합하며, 여기서 항체 D10은 서열 번호 25에 개시된 면역글로불린 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 26에 개시된 면역글로불린 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 면역접합체.
- [0360] 30. 실시형태 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 항체가 항체 D10의 친화성의 약 50배보다 큰 친화성으로 ROR1에 결합하며, 여기서 항체 D10은 서열 번호 25에 개시된 면역글로불린 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 26에 개시된 면역글로불린 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 면역접합체.
- [0361] 31. 실시형태 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, L은 절단가능 링커, 비-절단가능 링커, 친수성 링커, 프로차징

된(procharged) 링커, 및 다이카르복실산 기반 링커로부터 선택되는 면역접합체.

[0362] 32. 실시형태 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, L은 6-말레이미도카프로일(MC), 말레이미도프로파노일(MP), 발린-시트룰린(VC), 알라닌-페닐알라닌(AP), p-아미노벤질옥시카르보닐(PAB), N-석신이미딜 4-(2-페리딜티오)펜타노에이트(SPP), N-석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), N-석신이미딜(4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트(SIAB), 6-말레이미도카프로일-발린-시트룰린(MC-VC), 6-말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(MC-VC-PAB), 및 N-석신이미딜-1-카르복실레이트-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(SC-VC-PAB)로부터 선택되는 면역접합체.

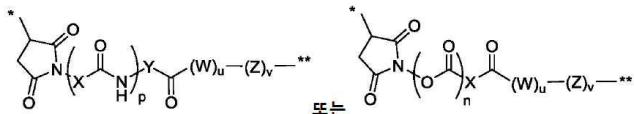
[0363] 33. 실시형태 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, L은 6-말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(MC-VC-PAB)인 면역접합체.

[0364] 34. 실시형태 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, L은 N-석신이미딜-1-카르복실레이트-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐(SC-VC-PAB)인 면역접합체.

[0365] 35. 실시형태 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, L은 6-말레이미도카프로일-발린-시트룰린(MC-VC)인 면역접합체.

[0366] 36. 실시형태 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, L은 N-석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC)인 면역접합체.

[0367] 37. 실시형태 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, L은 하기 식의 링커인 면역접합체:



[0368]

[0369] 상기 식에서,

[0370]

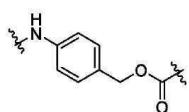
X는 C₂₋₈알킬이며;

[0371]

Y는 -(CH₂CH₂O)_qCH₂CH₂-○]고;

[0372]

W는 아미노산 단위이며;



[0373]

Z는 이고;

[0374]

n은 0 또는 1이며;

[0375]

p는 0 또는 1이고;

[0376]

q는 0 내지 12의 정수이며;

[0377]

u는 0 내지 5의 정수이고;

[0378]

v는 0 또는 1이고;

[0379]

여기서 **는 D에의 부착점을 나타내며; 그리고

[0380]

*는 Ab에의 부착점을 나타낸다.

[0381]

38. 실시형태 37에 있어서, X는 -(CH₂)₂-인 면역접합체.

[0382]

39. 실시형태 37에 있어서, X는 -(CH₂)₃-인 면역접합체.

[0383]

40. 실시형태 37에 있어서, X는 -(CH₂)₄-인 면역접합체.

[0384]

41. 실시형태 37에 있어서, X는 -(CH₂)₅-인 면역접합체.

- [0385] 42. 실시형태 37 내지 41 중 어느 하나에 있어서, p는 0인 면역접합체.
- [0386] 43. 실시형태 37 내지 41 중 어느 하나에 있어서, p는 1인 면역접합체.
- [0387] 44. 실시형태 37 내지 43 중 어느 하나에 있어서, q는 4 내지 8의 정수인 면역접합체.
- [0388] 45. 실시형태 37 내지 43 중 어느 하나에 있어서, q는 4인 면역접합체.
- [0389] 46. 실시형태 37 내지 43 중 어느 하나에 있어서, q는 8인 면역접합체.
- [0390] 47. 실시형태 37 내지 46 중 어느 하나에 있어서, n은 0인 면역접합체.
- [0391] 48. 실시형태 37 내지 46 중 어느 하나에 있어서, n은 1인 면역접합체.
- [0392] 49. 실시형태 37 내지 48 중 어느 하나에 있어서, v는 0인 면역접합체.
- [0393] 50. 실시형태 37 내지 48 중 어느 하나에 있어서, v는 1인 면역접합체.
- [0394] 51. 실시형태 37 내지 50 중 어느 하나에 있어서, u는 2 내지 4의 정수인 면역접합체.
- [0395] 52. 실시형태 37 내지 51 중 어느 하나에 있어서, W는 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 아세틸 또는 포르밀로 보호되거나 보호되지 않은 리신, 아르기닌, 토실 또는 니트로기로 보호되거나 보호되지 않은 아르기닌, 히스티딘, 오르니틴, 아세틸 또는 포르밀로 보호된 오르니틴, 및 시트룰린으로부터 선택되는 면역접합체.
- [0396] 53. 실시형태 37 내지 52 중 어느 하나에 있어서, u는 0인 면역접합체.
- [0397] 54. 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, L과 D 사이에 스페이서를 추가로 포함하는 면역접합체.
- [0398] 55. 실시형태 1 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 면역접합체는 하기 화학식의 적어도 하나의 추가의 링커-약물 모이어티를 추가로 포함하는 면역접합체:
- [0399] $-(((L)_m-(D))_n)_x$
- [0400] 상기 식에서,
- [0401] L은 링커이고;
- [0402] D는 항-튜불린 약제, DNA 알킬화제, DNA 가교제, DNA 삽입제 또는 RNA 폴리머라제 II 억제제로부터 선택되는 약물 모이어티이며;
- [0403] m은 0 또는 1이고;
- [0404] n은 1 내지 10의 정수이며; 그리고
- [0405] x는 1 내지 10의 정수이다.
- [0406] 56. 실시형태 1 내지 55 중 어느 하나의 면역접합체 및 약학적 허용 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0407] 57. 실시형태 56에 있어서, 약학 조성물은 정맥내 투여를 위해 제형화되는 약학 조성물.
- [0408] 58. 실시형태 56에 있어서, 약학 조성물은 피하 투여를 위해 제형화되는 약학 조성물.
- [0409] 59. 실시형태 1 내지 55 중 어느 하나의 면역접합체 또는 실시형태 56 내지 58 중 어느 하나의 약학 조성물의 치료 용량을 암의 치료를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법.
- [0410] 60. 암을 치료하기 위한 실시형태 1 내지 55 중 어느 하나의 면역접합체 또는 실시형태 56 내지 58 중 어느 하나의 약학 조성물의 용도.
- [0411] 61. 암이 ROR1을 발현하는, 실시형태 59의 방법 또는 실시형태 60의 용도.
- [0412] 62. 실시형태 61에 있어서, 암은 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 소 림프구성 림프종, 변연부 세포 B-세포 림프종, 버켓 림프종, 신장세포 암종, 결장암, 결장직장암, 유방암, 상피 편평세포 암, 흑색종, 골수종, 위암, 뇌암, 폐암, 췌장암, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 전립선암, 고환암, 갑상선암 및 두경부암으로부터 선택되는 방법 또는 용도.

- [0413] 63. a. 실시형태 1 내지 55 중 어느 하나의 면역접합체; 및
- [0414] b. 추가의 치료제를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 가진 개체를 치료하는 방법.
- [0415] 64. 실시형태 63에 있어서, 추가의 치료제는 아칼라브루티닙, 이텔랄리십, 사파니세르닙, 파크리티닙, ABT-199, 부파를리시브, 에버를리무스, BEZ235, 룩솔리티닙, 포스타마티닙, 리툭시맙, 레날리도미드, 파클리탁셀, 빙크리스틴, 이브루티닙, 에를로티닙, 크리조티닙, 카르보플라틴, 옥살리플라틴/시스플라틴, 베바시주맙, 또는 쟈시타빈을 포함하는 방법.
- [0416] 65. 실시형태 63 또는 64에 있어서, 암은 ROR1을 발현하는 방법.
- [0417] 66. 실시형태 65에 있어서, 암은 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 소 림프구성 림프종, 변연부 세포 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 신장세포 암종, 결장암, 결장직장암, 유방암, 상피 편평세포 암, 흑색종, 골수종, 위암, 뇌암, 폐암, 췌장암, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 전립선암, 고환암, 갑상선암 및 두경부암을 포함하는 방법.
- [0418] 67. 실시형태 63 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 면역접합체와 추가의 치료제는 암을 가진 개체에게 별도로 투여되는 방법.
- [0419] 68. 실시형태 1 내지 55 중 어느 하나에서 개시된 면역접합체 및 실시형태 64에 개시된 추가의 치료제를 포함하는 약학 조성물.
- [0420] 69. 실시형태 68에 있어서, 실시형태 63 내지 67 중 어느 하나의 방법에서 사용하기 위한 약학 조성물.
- [0421] 70. 실시형태 1 내지 55 중 어느 하나에 개시된 면역접합체 및 실시형태 64에 개시된 추가의 치료제를 포함하며, 여기서 상기 면역접합체와 추가의 치료제는 적합한 포장내에 있는, 키트.
- [0422] 71. 실시형태 70에 있어서, 실시형태 63 내지 67 중 어느 하나의 방법에서 사용하기 위한 키트.
- [0423] 문맥이 달리 요구하지 않으면, 명세서와 청구범위에 걸쳐서, 단어 "포함하다" 및 그의 변형, 예를 들어, "포함한다" 및 "포함하는"은 개방의 포괄적인 의미, 즉, "포함하지만, 이에 제한되지 않는"으로 이해되어야 한다. 본 명세서와 첨부된 청구범위에서 사용될 때, 단수 형태 "a", "an", 및 "the"는 내용이 명확하게 달리 나타내지 않으면 복수의 지시대상을 포함한다. 또한, 용어 "또는"은 내용이 명확하게 달리 나타내지 않으면 일반적으로 "및/또는"을 포함하는 의미로 이용된다. 본 명세서에서 사용될 때 용어 "약"은 특정 용법의 문맥내에서 명시된 수치로부터 10%, 5%, 또는 1% 플러스 또는 마이너스인 수치 범위를 말한다. 또한, 본 명세서에서 제공되는 제목은 단지 편의를 위한 것이며 청구된 실시형태의 범위 또는 의미를 설명하지 않는다.
- [0424] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물과 특허는 개시된 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는, 예를 들어 간행물에서 개시된 작제물 및 방법을 설명하고 개시할 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 본 명세서에서 토의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전의 그들의 내용에 대해서만 제공된다. 본 명세서의 어떤 것도 본 발명의 발명자들이 선행 발명때문에 또는 임의의 다른 이유로 그러한 내용보다 앞설 자격이 없음을 인정하는 것으로 이해되어서는 안된다.
- [0425] 달리 정의되지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 명세서에 개시된 발명이 속하는 분야의 당업자에게 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 개시된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법, 장치 및 재료가 본 명세서에 개시된 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있다.
- [0426] 실시예
- [0427] 하기 실시예는 본 발명의 대표적인 실시형태를 예시하며 어떤 방식으로도 제한하는 것을 의미하지 않는다.
- [0428] **실시예 1: 예시적인 면역접합체의 합성**
- [0429] **1. ADC-A, C, 및 H 내지 P에서 Ab1 시스테인의 접합**
- [0430] Ab1과 MC-VC-PAB-MMAE(ADC-A)의 접합을 여러 규모(2 mg, 30 mg, 및 350 mg)로 수행하였고, 유사한 결과를 얻었다. 최소 규모를 위하여, 2 mg Ab1(PBS내에 10 mg/mL, pH 6.5)을 2시간동안 37°C의 수조에서 접합 버퍼액내의 2.50 당량(eq)의 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP, 5 mM)으로 처리하였다. PBS 버퍼는 15.75 mM Na₂HPO₄, 34.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, 및 50 mM NaCl을 pH 6.5에서 함유하였다. 이어서, 반응을 4°C로 냉각하였다. 다음으로, N,N-다이메틸아세트아미드(DMA)내의 7 eq MC-VC-PAB-MMAE를 첨가하고 혼합물을 추가 1시간 동안 4°C에

두었다. 벼페를 스판 탈염 칼럼(spin desalting column)(40 kD, 0.5 mL)을 이용하여 20 mM 히스티딘, pH 5.5(MMAE 벼페)로 교환하였다. 항체 분자 당 연결된 MMAE 약물 분자의 수(DAR)를 HIC-HPLC, SEC-HPLC, RP-HPLC, 및 UV/Vis를 이용하여 결정하였으며 표 4에 요약한다. 모든 규모에 대해 일관된 결과가 수득되었으며, DAR은 사용된 방법에 따라, 평균하여 3.89 내지 5.09 범위였다.

[표 4] ADC-A의 특성규명

규모 (mg)	응집률 (%)	회수율 (%)	D0* (%)	DAR			
				UV	SEC	HIC	RP
2	3.47	85.6	6.06	4.33	4.81	3.95	3.89
30	3.50	86.1	4.75	4.44	5.09	4.21	4.09
350	3.51	90.2	5.12	4.40	4.96	4.12	3.99

* D0: 비접합 항체.

[0434] 다른 링커 및 탑재물(ADC-C, 및 ADC-H 내지 ADC-P)을 유사한 방식으로 Ab1에 접합시켰으며, 생성된 DAR은 표 5에 요약된다.

[표 5] 추가의 ADC 작제물을 위한 평균 DAR

작제물	DAR	방법
ADC-C	6.33	UV
	6.62	SEC
	3.97	HIC
	4.15	RP
	4.24	MS
ADC-H	1.98	UV
	1.93	SEC
ADC-I	4.1	SEC/UV
ADC-J	2.1	HIC
ADC-K	1.9	PLRP
ADC-L	3.9	HIC
ADC-M	4.1	HIC
ADC-N	4.1, 1.9	PLRP
ADC-O	1.8	SEC
ADC-P	1.9	PLRP

[0436]

2. ADC-B, E, 및 F에서 Ab1 리신의 접합

[0438] PBS(pH 6.5)내의 Ab1을 DMA내의 SC-VC-PAB-MMAE(ADC-E) 또는 SC-VC-PAB-DM1 (ADC-F)과 조합하고 2-4시간동안 22°C에서 10 rpm의 회전 플랫폼상에 두었다. ADC-B의 경우, PBS(pH 7.0)내의 Ab1을 SMCC-DM1과 조합하고 2-4시간동안 22°C에서 10 rpm의 회전 플랫폼상에 두었다. 아미콘(Amicon) 한외여과(50 kDa, 0.5 mL)를 이용하여, 벼페 교환을 통해 미반응 탑재물을 제거하였다. ADC-B를 20 mM 석산산(pH 5.0)내로 교환하였다. SEC-HPLC, MS, 및 UV/Vis를 이용하여 DAR 값을 결정하였으며 표 6에 요약된다. 링커-탑재물을 ~11 eq로 이용할 경우, DAR은 4시간 항온처리 후 4.0에 가까워졌다.

[표 6] ADC-B, ADC-E 및 ADC-F의 특성규명

작제물	규모 (mg)	응집률 (%)	회수율 (%)	D0 (%)	DAR		
					UV	SEC	MS
ADC-B	80	2.93	-	5.86	3.18	3.20	3.0
ADC-E	60	3.94	82.1	1.85	5.08	6.14	4.2
ADC-F	75	2.92	59.0	7.44	5.51	5.72	3.0

[0440]

3. ADC-Q 및 R에서 Ab1의 부위-특이적 접합

[0442] 부위-특이적 접합 기술을 이용하여(Dennler et al., *Bioconjugate Chemistry*, 25(3):569-578 (2014) 및 미국 특허 공개 2016/0022833호) ADC-Q 및 ADC-R을 합성하였다. 37°C에서 밤새 6 U/mg 단백질의 N-글리코시다제 F(PNGase F)와 항온처리하여 Ab1을 먼저 탈글리코실화하였다. 탈글리코실화된 항체를 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제하고 세균 트랜스글루타미나제 변형 반응을 위해 조제하였다. 다음으로, 글루타민 당 10-40 eq의 11-아지도-3,6,9-트라이옥사운데칸-1-아민(아지도-PEG3-아민)을 PBS(pH 7.4)내의 1-5 mg/ml의 Ab1에 첨가하고, 2-6 U/mL의 미생물 트랜스글루타미나제의 첨가에 의해 반응을 시작하고, 37°C에서 밤새 항온처리하였다.

이어서, 과량의 아지도-PEG3-아민을 단백질 A 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 마지막으로, 50–200 μM 다이벤질시클로옥틴(DBCO)-함유 약물 탑재물(1.25 내지 5 mol equiv./아지도기)을 20 μM 아지도-활성화된 Ab1에 첨가하고 0.5–6시간동안 실온에서 항온처리하여, 트라이아졸 모이어티를 통해 연결된 Ab1-탑재물 접합체를 형성하였다. 과량의 DBCO-함유 탑재물을 제거하였다. 이 방식으로 합성된 ADC의 특성규명은 ADC-Q에 대해서는 4.4이고 ADC-R에 대해서는 2.1의 DAR을 입증하였다(표 7).

[0443] [표 7] 추가의 ADC 작제물에 대한 평균 DAR

작제물	DAR	방법
ADC-Q	4.4	HIC
ADC-R	2.1	PLRP

[0444]

실시예 2: ROR1-양성 세포에 결합하는 항체 및 면역접합체

항체 Ab1 및 4A5, 및 이들 항체로부터 유도된 ADC 작제물(ADC-A 및 ADC-T)에 의한 종양 세포에의 결합을 평가하였다. 먼저, 상이한 암 타입을 대표하는 2가지 ROR1-양성 인간 종양 세포주에의 Ab1의 결합을 시험하였다. 외투 세포 림프종으로부터의 Jeko-1 세포주는 혼탁 세포주인 한편, 삼중 음성 유방암으로부터의 MDA-MB-231 세포주는 부착성 세포주이다. 세포주들은 상이한 수준의 ROR1 발현을 가져서, Jeko-1 세포는 약 13507 세포 표면 카페를 나타내고 MDA-MB-231 세포는 약 21015 세포 표면 카페를 나타낸다. Jeko-1(ATCC Cat. No. CRL-3006) 및 MDA-MB-231(ATCC Cat. No. CCL-227) 세포주를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 구입하여 ATCC 권장사항에 따라 유지하였다.

[0445] Jeko-1 세포(도 2a) 또는 MDA-MB-231 세포(도 2b)를 열음에서 20분동안 0, 1, 10, 100, 또는 1000 ng/mL의 Ab1과 함께 항온처리하였다. 미결합 항체를 씻어낸 후, 세포를 피코에리트린(PE)으로 라벨링된 이차 항-인간 IgG 항체와 추가 20분동안 항온처리하였다. PE 형광의 양을 BD FACS 벌스(Verse) 분석기 및 플로우조(FlowJo) V10 소프트웨어를 이용하여 측정하였다. 최고 농도를 위한 PE 시그널을 최대 결합 시그널로 이용하여 % 최대 결합을 계산하였다. 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 7을 이용하여 EC₅₀을 계산하였다. 수용체 결합 분석 결과 Jeko-1 세포에서 13.6 ng/ml 그리고 MDA-MB-231 세포에서 32.8 ng/ml의 EC₅₀ 값을 얻었다.

[0446] 다음으로, Ab1의 결합을 ADC-A에 비교하였다(도 2a 및 2b). Jeko-1 및 MDA-MB-231 세포주 둘 모두에서 결합을 비교하였다. Jeko-1 세포(도 2a, 사각형) 및 MDA-MB-231 세포(도 2b, 사각형)에의 ADC-A의 결합은 비접합 모 항체 Ab1의 결합과 매우 유사하였다(도 2a, 17 ng/mL vs. 13.6 ng/mL 및 도 2b, 48.5 ng/mL vs. 32.8 ng/mL). 비접합 Ab1과 ADC-A의 EC₅₀ 값 사이의 유사성은 약물 접합이 타겟 세포에의 Ab1의 결합에 대해 최소의 영향을 미침을 입증한다.

[0447] Ab1의 결합을, Ab1의 에피토프와 구별되는 ROR1상의 에피토프에 결합하는 항체인 4A5에 비교하였다(도 3a). Ab1(EC₅₀ = 16.39 ng/mL; 도 3a, 백색 원)은 4A5(EC₅₀ = 120.6 ng/mL; 도 3a, 백색 사각형)보다 더 높은 친화성/결합성(avidity)으로 Jeko-1 세포에 결합하였다. ADC 작제물의 결합을 상응하는 비접합 모 항체에 비교하였다 (Ab1 대 ADC-A, 및 4A5 대 ADC-T). ADC-A는 21.57 ng/mL의 EC₅₀으로 결합한 반면, ADC-T는 192.7 ng/mL의 EC₅₀으로 결합하였다. 비접합 항체와 상응하는 ADC 작제물의 EC₅₀ 값 사이의 유사성은 약물 접합이 타겟 세포에의 항체의 결합에 대해 최소의 영향을 미침을 다시 입증한다.

[0448] 상이한 실험에서, Jeko-1 세포에의 Ab1의 결합을 또한, Ab1과 동일한 에피토프에 결합하는 더 낮은 친화성 항체인 D10의 결합과 비교하였다(도 3b). Ab1(EC₅₀ = 16.5 ng/mL; 도 3b, 백색 원)은 D10(EC₅₀ = 250 ng/mL; 도 3b, 백색 삼각형)보다 더 높은 친화성/결합성으로 Jeko-1 세포에 결합하였다. 또한, ADC 작제물의 결합을 상응하는 비접합 모 항체의 결합에 비교하였다(Ab1 대 ADC-A 및 D10 대 ADC-S). ADC-A는 22.1 ng/mL의 EC₅₀(도 3b, 흑색 원)으로 결합한 한편, ADC-S는 150 ng/mL의 EC₅₀(도 3b, 흑색 삼각형)으로 결합하였다. 비접합 항체와 상응하는 ADC 작제물의 EC₅₀ 값 사이의 유사성은 약물 접합이 타겟 세포에의 항체의 결합에 대해 최소의 영향을 미침을 다시 입증한다.

[0449] 유사한 방식으로, 모든 다른 ADC 작제물의 ROR1-양성 세포에의 결합을 평가하였다. 본 명세서에 개시된 모든 작제물이 ROR1-양성 세포에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[0452] 실시예 3: ROR1 항체 및 면역접합체의 내부화

[0453] 여러 방법을 이용하여 항체 내부화를 결정하였다. 한 가지 접근법에서는, 유세포분석을 이용하여 15, 30, 60, 120, 및 240분에 비-내부화 세포 표면 항체를 정량하는 펄스-추적(pulse-chase) 방법을 이용하여 내부화를 측정하였다. Jeko-1 세포를 성장시키고 컨플루언시(confluence) 전에 수집하고, 차가운 PBS로 세척하고 차가운 FACS 버퍼(PBS+2% FBS - 피셔/깁코(Fisher/Gibco) Cat. No. 16140071)에서 1×10^7 으로 재현탁시켰다. 1×10^6 세포를 마이크로원심분리 투브 또는 웰에 첨가하였다. Jeko-1 세포를 위해서 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 그리고 MDA-MB-231 세포를 위해서 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 을 이용하여, 포화 항체 농도에서 세포에 의한 Ab1 및 ADC 작제물의 내부화를 결정하였다. ADC 작제물 또는 Ab1의 10X 스톡 용액을 제조하고(Jeko-1 세포와 함께 사용하기 위해서는 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 MDA-MB-231 세포와 함께 사용하기 위해서는 $1 \text{ mg}/\text{ml}$) $10 \mu\text{L}$ 의 샘플 또는 버퍼 대조군을 하기에 첨가하였다(각 시점은 위해 추가의 투브를 첨가):

[0454] a) 미염색됨

[0455] b) 이차 항체 단독

[0456] c) $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 음성 대조군 hIgG mAb - 시간 0

[0457] d) $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 양성 대조군 ADC 작제물 또는 Ab1 - 시간 0

[0458] e) ADC 작제물 또는 Ab1 - 시점 1

[0459] f) ADC 작제물 또는 Ab1 - 시점 2, 등.

[0460] 세포와 항체를 20분 동안 얼음에서 항온처리하고, 4분 동안 $300 \times g$ 로 회전시키고, $200 \mu\text{L}$ 의 FACS 버퍼로 2회 세척한 후, $100 \mu\text{L}$ 의 FACS 버퍼에서 재현탁시켰다. 샘플을 상기에 나타난 대로, 15, 30, 60, 120, 및 240분 동안 37°C 에서 항온처리하였다. 샘플을 얼음으로 옮겨서 내부화를 종결시켰다. 항체 내부화의 시간 과정을 상기한 대로 각 시험 물품에 대해 생성하고, 그 후 세포 표면에 남은 항체를 PE-라벨링된 이차 항체를 이용하여 검출하였다. 세포를 $250 \times g$ 에서 회전시키고, FACS 버퍼로 2회 세척하고 $100 \mu\text{L}$ 의 FACS 버퍼에서 재현탁시켰다. 이차 항체 (염소 항-인간 IgG-PE, Fc-감마 특이적 - 이바이오사이언시즈(eBiosciences), Cat. No. 12-4998)를 FACS 버퍼에서 1:2000(10X 스톡) 희석하고 $10 \mu\text{L}$ /튜브를 적절한 투브에 첨가하였다. 20분 동안 얼음에서 세포를 항온처리하고, FACS 버퍼로 2회 세척하고 $100 \mu\text{L}$ 의 고정 버퍼(PBS내의 4% 파라포름알데히드)에서 재현탁시켰다. 이어서, FACS 분석을 수행하였다. 중앙값 형광 강도(MFI)를 정량하고, 시간 = 0에서 존재하는 양에 비교할 때 각 시점에서 존재하는 항체 또는 ADC의 양을 이용하여 수용체 내부화 정도를 결정하였다. 점선은 배경 염색(이차 항체 단독)을 나타낸다.

[0461] Ab1은 Jeko-1(도 4a) 및 MDA-MB-231(도 4b) 세포 둘 모두에 결합하고 신속하게 내부화되었다. 결합된 항체의 80-90%의 내부화가 MDA-MB-231에 대해서는 60분 미만에, 또는 Jeko-1에 대해서는 120분 미만에 관찰되었다. 주목할만하게는, Ab1에 링커 및 탑재물의 추가는, ADC-A 및 ADC-B에서 입증된 대로, 결합 또는 내부화에 부정적으로 영향을 주지 않았다(도 4a, ADC-A 및 ADC-B를 Ab1과 비교, 그리고 도 4b, ADC-A를 Ab1과 비교).

[0462] 유사한 방식으로, 상이한 링커와 탑재물을 가진 다른 ADC 작제물의 내부화 특성을 Jeko-1 세포를 이용하여 평가하였다. 모든 작제물이 Ab1과 비교할 때 유사한 내부화 동력학을 나타내어, 사용된 링커와 탑재물이 항체 특성에 영향을 주지 않았다는 상기 관찰과 일치하였다(데이터 도시 안함).

[0463] 본 발명자들은 또한 Ab1과 구별되는 에피토프를 인식하지만 ADC-A의 링커 및 탑재물 화학과 동일한 링커 및 탑재물 화학을 가진 ROR1 항체(4A5)를 이용하여 ADC 작제물(ADC-T)의 내부화 특성을 평가하였다. ADC-T는 Jeko-1 세포에 결합하였으나 ADC-A보다 더 느린 속도로 그리고 더 적은 정도로 내부화되었다(데이터 도시 안함). 이들 데이터는 ADC 작제물의 내부화 특성의 결정에서 항체 및 그의 에피토프의 중요성을 입증한다.

[0464] 통상적인 면역형광 염색 방법 및 MDA-MB-231 세포를 이용하여 Ab1의 내부화를 또한 특성규명하였다. 이 접근법에서는, Ab1을 세포 표면에 로딩하고 이어서 세포를 고정하고 표면 Ab1을 정량하였다. 또한, 두번째 세포 샘플을 투과화시키고 총 Ab1(표면 및 세포내)을 정량하였다. 이 프로토콜에서는, 일차 항체를 이차 항체없이 항온처리하여, 이차 항체가 내부화에 영향을 미칠 수 있는 가능성을 제거하였다. 표면 염색을 관찰하였다. 투과화 후, Ab1의 또렷하고 구별되는 반점의 세포내 염색이 관찰되었다. 또한, 리소좀-특이적 추적자를 이용함으로써, 내부화된 Ab1이 리소좀 경로와 공동-국소화되었음이 입증되었다. 이 발견은 리소좀/엔도좀 경로에 의해 주로 발생하는 항체 내부화 양식과 일치한다. 마지막으로, 내부화 속도를 정량하였다. 세포가 Ab1에 연속 노출되었을 경우,

초기 속도는 평균 속도의 대략 2배였으며, 마지막 속도는 평균 속도의 대략 절반이었다(도 5). 이것은 세포 표면 수용체를 제거하는 초기의 신속한 단계에 이어 세포 표면상에 새롭게 발현되는 수용체의 결합 및 내부화의 더 느린 과정이 있음을 나타낸다. 새롭게 발현된 세포 표면 수용체는 재순환되거나, 세포내 저장소로부터 발현되거나, 및/또는 새롭게 합성될 수 있다. Ab1의 공동-국소화의 정도와 특징은 EGFR과 유사하여, 4시간 후에 실질적으로 리소좀 공동-국소화를 보여준다.

[0465] 실시예 4: 세포 표면 ROR1 발현의 측정

다양한 시점(2, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 및 240분)에서 비-내부화 세포 표면 항체를 검출하는 펠스-추적 접근법을 이용하여 항체의 내부화를 측정하였다. 이 연구에서는, 비-내부화 세포 표면 항체를 측정하는 것에 더하여, 세포 표면상의 ROR1의 발현을, (1) Ab1 및 이차 항체로 재-염색에 의해 또는 (2)Ab1의 에피토프와 구별되는 에피토프를 인식하는 제2의 라벨링된 항-ROR1 항체를 이용함으로써 정량하였다.

첫번째 접근법의 경우, Jeko-1 세포상의 Ab1의 내부화를 실시예 3에 개시된 대로 수행하였다(세포 표면 상에 남은 항체를 정량하기 위하여 각 시점에서 하나의 샘플을 처리하였음). 부가적으로, 얼음에서 세포를 유지하는 한편, 각 시점에서의 두번째 샘플을 포화 수준의 Ab1($30 \mu\text{g/mL}$)을 이용하여 신속하게 재염색시켰다. 이어서, 세포를 세척하고, 내부화 측정을 위해 사용된 동일한 이차 항체를 이용하여 표면 항체를 정량하였다. 앞서 나타난 대로, Ab1은 신속하게 내부화되었다(도 6, 사각형). 대조적으로, 세포 표면 ROR1의 정량은 처음에는 처음 10분 내에 작은 감소를 나타낸 반면, 후속 측정은 ROR1 표면 발현이 처음의 또는 약간 더 높은 수준으로 회복되었음을 나타냈다(도 6, 원). 이들 데이터는 항체로부터 해리된 세포 표면으로의 ROR1의 재순환, 또는 드 노보(*de novo*) 합성 또는 세포내 저장물의 수송을 통한 ROR1의 신속한 상향조절과 일치한다. 이 실험을 Jeko-1(도 7a), MDA-MB-468(도 7b), 및 MDA-MB-231(도 7c) 세포를 이용하여 반복하였으며, 유사한 결과를 얻었다.

[0468] Ab1 내부화 연구와 함께 세포 표면 ROR1 발현을 측정하기 위한 대안적 접근법을 시험하였다. 구체적으로, Ab1의 에피토프와 구별되는 에피토프에 결합하는 라벨링된 항-ROR1 항체로 세포를 직접 염색함으로써 세포 표면 ROR1 발현을 0, 0.5, 1, 2, 및 4시간에 정량하였다. ADC-A, M, N, 및 P로 처리된 Jeko-1 세포에서의 ROR1 표면 발현을 평가하였다. 이전에 개시된 접근법을 이용하여 수득된 결과와 일치하게, 세포가 Ab1-기반 ADC 작제물로 처리되고 있는 동안 ROR1 발현은 유지되거나 약간 증가하였다(데이터 도시 안함).

[0469] 이들 데이터는 Ab1 및 그의 면역접합체가 ROR1-양성 세포에 의해 효과적으로 내부화될 수 있음을 나타낸다. 또한, 세포 표면상의 ROR1의 지속적인 발현은 ROR1이 본 발명의 ADC를 통해 암 세포에 세포독성제를 전달하기 위해 훌륭한 타겟임을 입증한다.

[0470] 실시예 5: 시험관내에서 면역접합체의 효능

[0471] 상이한 세포독성 모이어티 및 링커 화학을 가진 ADC-A, B, C, E, 및 F 면역접합체를 본 실시예를 위해 분석하였다. 이들 접합체에 의한 ROR1 결합을 세포 배양물에서 시험하여 다양한 링커-세포독성제 조합의 효능을 정의하였다. 세 가지 상이한 타입의 암세포주를 시험하였다: B-림프종 세포주 TMD-8, HBL-1, 및 DOHH2; 삼중 음성 유방암 세포주 HCC1187, MDA-MB-468, Bt549; 및 난소암 세포주 A2008, TOV112D, JHOM1, 및 SKOvr3.

[0472] 세포를 로그 단계 성장에서 배양하고 96-웰 플레이트내로 분배하였다. 각 세포주를 5×10^3 내지 50×10^3 세포/웰 범위의 약간 상이한 세포 밀도로 도말하였다. 두벌씩의 세포를 특정 면역접합체의 3-배 계대 희석물(10, 3.33, 1.11, 0.37, 0.12, 0.041, 0.014, 및 $0.0045 \mu\text{M}$)과 72시간 동안 37°C 및 5% CO_2 에서 항온처리하였다. 처리후, 세포를 동일한 부피의 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)® 시약(프로메가 인크.(Promega Inc.))과 실온에서 15분 동안 항온처리하고 광도계에 의해 생존능을 결정하였다. S자 용량 응답 비-선형 회귀 풋(sigmoidal dose response non-linear regression fit)을 이용하여 그래프패드 프리즘에서 곡선 및 EC_{50} 값을 생성하였다. 이들 실험으로부터의 데이터가 표 8에 요약된다. 도 8a-8i는 표시된 세포주에 대해 시험된 모든 다섯 가지 면역접합체를 위한 대표적인 IC_{50} 곡선을 보여준다.

[0473] [표 8] 시험관내에서 예시적인 면역접합체의 세포독성^{*}

암 타입	세포주	ADC-A	ADC-B	ADC-C	ADC-E	ADC-F
B-세포 림프종	TMD-8	122	50	>1000	94.3	>1000
	HBL-1	118	70.1	>1000	147	>1000
	DOHH2	129	78.3	>1000	89.6	>1000
삼중 음성 유방암	HCC1187	6.8	6.2	>1000		>1000
	MDA-MB-468	23.5	18.8	>1000	80.1	>1000
	Bt549	13.5	20.2	>1000	74.4	>1000
난소암	A2008	125	49	>1000		>1000
	TOV112D	62.4	34.2	>1000	57.8	>1000
	JHOM1	15.6	24.3	>1000	32.9	>1000
	SKOvr3	62.6	78.7	>1000	200.6	>1000

[0474] [0475] *데이터는 nM의 IC₅₀으로 제시됨. 빈 칸: 실시안됨.

[0476] 실시예 6: 시험관내에서 면역접합체의 효능에 대한 추가 데이터

[0477] 본 실시예는 다양한 암 세포주의 세포 사멸을 유도함에 있어서 다양한 ADC의 효능에 대한 추가 데이터를 제시하였다. 실시예 5에 개시된 대로 세포를 성장시키고 96-웰 플레이트내로 분배하였다. 두벌씩의 세포를 특정 면역접합체의 3-배 계대 희석물(660, 220, 73.3, 24.4, 8.14, 2.71, 0.91, 및 0.3 nM)과 72시간 동안 37°C 및 5% CO₂에서 항온처리하였다. 일부 실험에서는, 세포를 72시간 대신 96시간 동안 면역접합체와 항온처리하였다(값은 "*"로 강조됨). 처리 후, 세포 생존능을 실시예 5에 개시된 대로 결정하였다. 이를 실험으로부터의 데이터가 하기의 표 9.1 내지 9.17에 요약된다. 세포 표면 ROR1 발현은 정량적 유세포분석에 의해 평가하였으며 ROR1 발현은 MFI>30 또는 MFI<30(MFI: 평균 형광 강도)으로 특성규명하였다. 데이터는 ROR1을 발현하는 탑재물-민감성 암 세포가 본 명세서에 개시된 세포 사멸 분석에서 시험된 많은 ADC에 반응하였음을 입증한다. 많은 ADC-반응성 암 세포가 높은 수준의 ROR1을 발현한 한편(MFI>30), 더 낮은 수준의 ROR1을 발현하는 일부 세포(MFI<30) 또한 일부 ADC에 민감하였다.

[0478] 프로리포사이토이드(prolymphocytoid) 형질전환에서 B-만성 림프구성 백혈병으로부터 유래된 MEC1 세포주를 인간 ROR1을 인코딩하는 발현 벡터 또는 대조군 벡터로 형질감염시키고, G418을 함유하는 선택 배지를 이용하여 안정한 세포주를 생성하였다. ROR1-형질감염된 MEC1 세포는 무혈청 배지에서 완전 성장 배지로 옮겨진 후 16시간에 대조군-형질감염된 세포보다 상당히 더 큰 비율의 세포가 S/G2/M 단계에 있었으며, 이것은 ROR1의 발현이 세포 분열을 진행중인 세포의 상대적 비율을 증가시켰음을 의미한다. 이것과 일치하게, ROR1⁺ MEC1 세포는 무혈청 배지로부터 옮겨진 후 ≥48시간에, ROR1을 발현하지 않는 MEC1 세포의 견줄만하게 접종된 배양물보다 상당히 더 큰 수의 세포를 가졌다. 대조군 벡터로 형질감염된 MEC1 세포에 비하여 ROR1을 발현하도록 만들어진 MEC1 세포에서 증가된 수준의 p-AKT 및 p-CREB이 또한 관찰되었다.

[0479]

[표 9.1] 시험관내에서 ADC-A의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-A 결합 K_D (nM)	ADC-A EC_{50} (nM)	MMAE EC_{50} (nM)	ROR1 발현
Mcc- 벡터	CLL		558	0.5	MFI<30
Mcc-ROR	CLL		208	0.6	MFI>30
Jeko-1	MCL	0.10	22.4*, 40.4*, 186.7	<0.0001	MFI>30
Mino	MCL		19.5, 27.7*	<0.0001	MFI>30
TMD-8	DLBCL		122*	<0.0001	MFI<30
HBL-1	DLBCL		118*	<0.0001	MFI>30
DOHH2	DLBCL		129, 48.3*	0.007	MFI>30
OCI-Ly18	DLBCL		95	0.003	MFI>30
U2932	DLBCL		176	0.006	MFI<30
OCI-Ly19	DLBCL		199		
WSU-DLCL	DLBCL		68	0.06	MFI>30
KMS-PE	MM		43.3, 89		
RPMI-8229	MM		174		
OPM2	MM		123		
L363	MM		244		
NCI-H929	MM		179		
HCC1187	TNBC		2.3*, 6.8	<0.0001	MFI>30
HCC1806	TNBC		13.4*, 38.1	<0.0001	MFI>30
MDA-MB-468	TNBC		23.4, 21.7*, 82.5, 23.5*	<0.0001	MFI>30
MDA-MB-231	TNBC	0.32	58.4*, 106, 46.7*	<0.0001	MFI>30
Bt549	TNBC		13.5	0.047	MFI>30
Hs578T	TNBC		22.9	<0.0001	
DU4475	TNBC		248	2.5	MFI>30
HCC1937	TNBC		>1,000	>1,000	MFI>30
MCF-7	유방		198.4*, 289.0, >1000*	<0.0001	MFI<30
H1975	NSCLC		9.7	<0.0001	MFI>30
H460	NSCLC		61.5	<0.0001	MFI>30
A549	NSCLC		53.4	0.06	MFI>30
Hep-G2	HCC		>1,000	>1,000	
A4573	EWS		15.3	<0.0001	MFI>30
SKES	EWS		15.3	0.03	MFI>30
U2OS	OS		223	1.2	MFI>30
HOS	OS		126, 148	0.06	MFI>30
SAOS	OS		15.6, 26.3	0.05	MFI>30
FaDu	HN		>1,000	>1,000	

[0480]

세포주	암 타입	ADC-A 결합 K_D (nM)	ADC-A EC_{50} (nM)	MMAE EC_{50} (nM)	ROR1 발현
A2008	난소		125	0.03	
OvCar4	난소		283	24.2	MFI>30
TOV112D	난소		62.4	0.04	MFI>30
JHOM1	난소		15.6	0.01	MFI>30
SKOvr3	난소		62.6	0.01	MFI>30
ES2	난소		170	1.1	MFI>30
A2780	난소		64	0.08	MFI>30
Bx-PC3	췌장		47.4	0.04	MFI>30
As-PC1	췌장		>1,000	0.04	MFI>30
Ramos	버킷		649.8	<0.0001	MFI<30

[0481]

[표 9.2] 시험관내에서 ADC-E의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-E EC_{50} (nM)	MMAE EC_{50} (nM)
TMD-8	DLBCL	94.3	<0.0001
HBL-1	DLBCL	147	<0.0001
DOHH2	DLBCL	89.6	0.007
HCC1187	TNBC		<0.0001
MDA-MB-468	TNBC	80.1	<0.0001
Bt549	TNBC	74.4	0.047
A2008	난소		0.03
TOV112D	난소	57.8	0.04
JHOM1	난소	32.9	0.01
SKOvr3	난소	200.6	0.01

[0483]

[0484]

[표 9.3] 시험관내에서 ADC-B의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-B EC ₅₀ (nM)	DM1 EC ₅₀ (nM)
TMD-8	DLBCL	50	1.4
HBL-1	DLBCL	70.1	9.3
DOHH2	DLBCL	78.3	1.78
OCI-Ly18	DLBCL	40	
U2932	DLBCL	53.9	
OCI-Ly19	DLBCL	40	
WSU-DLCL	DLBCL	>1,000	
KMS-12PE	MM	72	
RPMI-8229	MM	91	
OPM2	MM	108	
L363	MM	177	
NCI-H929	MM	90	

[0485]

세포주	암 타입	ADC-B EC ₅₀ (nM)	DM1 EC ₅₀ (nM)
HCC1187	TNBC	6.2, 25.1	3.9
HCC1806	TNBC	23.1	
MDA-MB-468	TNBC	18.8, 70.1	15.2
MDA-MB-231	TNBC	67.5	
Bt549	TNBC	20.2	0.047
Hs578T	TNBC	11.7	
DU4475	TNBC	105	
HCC1937	TNBC	>1,000	
MCF-7	ER+/PR+/HER2- Breast	>1,000	
A2008	난소	49	
OvCar4	난소	291	>1,000
TOV112D	난소	34.2	2.4
JHOM1	난소	24.3	0.01
SKOvr3	난소	78.7	9.1
ES2	난소	117	
A2780	난소	36	

[0486]

[0487]

[표 9.4] 시험관내에서 ADC-C의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-C EC ₅₀ (nM)	DM1 EC ₅₀ (nM)
TMD-8	DLBCL	>1,000	1.4
HBL-1	DLBCL	>1,000	9.3
DOHH2	DLBCL	>1,000	1.78
HCC1187	TNBC	>1,000	3.9
MDA-MB-468	TNBC	>1,000	15.2
Bt549	TNBC	>1,000	0.047
A2008	난소	>1,000	
TOV112D	난소	>1,000	2.4
JHOM1	난소	>1,000	0.01
SKOvr3	난소	>1,000	9.1

[0488]

[0489]

[표 9.5] 시험관내에서 ADC-F의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-F EC ₅₀ (nM)	DM1 EC ₅₀ (nM)
TMD-8	DLBCL	>1,000	1.4
HBL-1	DLBCL	>1,000	9.3
DOHH2	DLBCL	>1,000	1.78
HCC1187	TNBC	>1,000	3.9
MDA-MB-468	TNBC	>1,000	15.2
Bt549	TNBC	>1,000	0.047
A2008	난소	>1,000	
TOV112D	난소	>1,000	2.4

[0490]

세포주	암 타입	ADC-F EC ₅₀ (nM)	DM1 EC ₅₀ (nM)
JHOM1	난소	>1,000	0.01
SKOvr3	난소	>1,000	9.1

[0491]

[0492]

[표 9.6] 시험관내에서 ADC-H의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-H EC ₅₀ (nM)	아조나피드 EC ₅₀ (nM)
Jeko	MCL	170	
MDA-MB-231	TNBC	>1,000	
A549	NSCLC	>1,000	>1,000
Hep-3B	HCC	>1,000	>1,000

[0493]

[0494]

[표 9.7] 시험관내에서 ADC-I의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-I EC ₅₀ (nM)
Jeko	MCL	>1000
DOHH2	DLBCL	>1000
KMS-PE	MM	266
MDA-MB-468	TNBC	>1000
MDA-MB-231	TNBC	>1000
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방	>1,000
A549	NSCLC	>1,000
Hep-G2	HCC	>1,000
U2OS	OS	>1,000
FaDu	HN	>1,000

[0495]

[0496]

[표 9.8] 시험관내에서 ADC-J의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-J EC ₅₀ (nM)
Jeko	MCL	59.35
DOHH2	DLBCL	5.975
KMS-PE	MM	362
MDA-MB-468	TNBC	146
MDA-MB-231	TNBC	>1000
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방	268
A549	NSCLC	>1,000
Hep-G2	HCC	>1,000
U2OS	OS	>1,000
FaDu	HN	658.5

[0497]

[0498]

[표 9.9] 시험관내에서 ADC-K의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-K EC ₅₀ (nM)
Jeko	MCL	761.5
DOHH2	DLBCL	247
KMS-PE	MM	1,000
MDA-MB-468	TNBC	>1000
MDA-MB-231	TNBC	>1000
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방	363
A549	NSCLC	>1,000
Hep-G2	HCC	>1,000
U2OS	OS	>1,000
FaDu	HN	>1,000

[0499]

[0500]

[표 9.10] 시험관내에서 ADC-L의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-L 결합 K _D (nM)	ADC-L EC ₅₀ (nM)	MMAE EC ₅₀ (nM)
Mec-백터	CLL		535	0.5
Mec-ROR	CLL		192	0.6
Jeko	MCL	0.15	81.1	<0.0001
Mino	MCL		20.5	<0.0001
MDA-MB-468	TNBC		141.5	<0.0001
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방		232.5*	<0.0001

[0501]

[0502]

[표 9.11] 시험관내에서 ADC-M의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-M 결합 K _D (nM)	ADC-M EC ₅₀ (nM)	MMAE EC ₅₀ (nM)
Mcc- 벡터	CLL		569	0.5
Mcc-ROR	CLL		170	0.6
Jeko	MCL	0.12	112.3	<0.0001
Mino	MCL		15.8	<0.0001
MDA-MB-468	TNBC		53.1	<0.0001
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방		164.1	<0.0001

[0503]

[0504]

[표 9.12] 시험관내에서 ADC-N의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-N 결합 K _D (nM)	ADC-N EC ₅₀ (nM)	PNU-159682 EC ₅₀ (nM)
Mcc- 벡터	CLL		772	
Mcc-ROR	CLL		262	
Jeko	MCL	0.13	31.7, 20.3	
Mino	MCL		7.7	
DOHH2	DLBCL		3.8	
KMS-PE	MM		26.75	
MDA-MB-468	TNBC		4.1, 29.4	
MDA-MB-231	TNBC		71.	0.005
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방		78.6	
H460	NSCLC		84.4	0.001
A549	NSCLC		30.7	
Hep-G2	HCC		20.8	
U2OS	OS		11.25	
FaDu	HN		27.05	

[0505]

[0506]

[표 9.13] 시험관내에서 ADC-O의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-O 결합 K _D (nM)	ADC-O EC ₅₀ (nM)	PNU-159682 EC ₅₀ (nM)
Mcc- 벡터	CLL		296	
Mcc-ROR	CLL		116	
Jeko	MCL	0.12	71.7	
Mino	MCL		28	
MDA-MB-468	TNBC		85.8	
MDA-MB-231	TNBC		782	0.005
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방		12.65	
H460	NSCLC		365	0.002

[0507]

[0508]

[표 9.14] 시험관내에서 ADC-P의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-P 결합 K _D (nM)	ADC-P EC ₅₀ (nM)	PNU-159682 EC ₅₀ (nM)
Mcc- 벡터	CLL		30.3	
Mcc-ROR	CLL		10.4	
Jeko	MCL	0.11	2.4	
Mino	MCL		1.2	
MDA-MB-468	TNBC		10.4	
MDA-MB-231	TNBC		24.7	0.005
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방		30.9	

[0509]

세포주	암 타입	ADC-P 결합 K _D (nM)	ADC-P EC ₅₀ (nM)	PNU-159682 EC ₅₀ (nM)
H460	NSCLC		39.6	0.001

[0510]

[0511]

[표 9.15] 시험관내에서 ADC-Q의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-Q 결합 K_D (nM)	ADC-Q EC_{50} (nM)	MMAE EC_{50} (nM)
Jeko	MCL	0.23	265*	<0.0001
Mino	MCL		139*	<0.0001
HCC1187	TNBC		5.3*	<0.0001
HCC1806	TNBC		56.1*	<0.0001
MDA-MB-468	TNBC		79.7*	<0.0001
MDA-MB-231	TNBC		167.8*	<0.0001
HCC1937	TNBC		>1,000*	>1,000
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방		>1,000*	<0.0001
H1975	NSCLC		26.8*	<0.0001
H460	NSCLC		180.1*	<0.0001
Bx-PC3	췌장		45.6*	0.04

[0512]

[0513]

[표 9.16] 시험관내에서 ADC-R의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-R 결합 K_D (nM)	ADC-R EC_{50} (nM)	PNU- 159682 EC_{50} (nM)
Mcc- 벡터	CLL		183	
Mcc-ROR	CLL		44.6	
Jeko	MCL	0.25	53.3	
Mino	MCL		15	
MDA-MB-468	TNBC		44.3	
MDA-MB-231	TNBC		203	0.005
MCF-7	ER+/PR+/HER2- 유방		167*	
H460	NSCLC		191	0.001

[0514]

[0515]

[표 9.17] 시험관내에서 ADC-S의 세포독성

세포주	암 타입	ADC-S EC_{50} (nM)	MMAE EC_{50} (nM)
Mino	MCL	83.3	<0.0001

[0516]

[0517]

표의 데이터는 시험된 ADC가 상이한 ROR1 발현 수준 및 다양한 탑재물에 대한 상이한 민감성을 가진 다양한 암 세포주에 대해 효과적임을 입증한다.

[0518]

실시예 7: 예시적인 ADC의 항-증식 효과의 항원 의존성

[0519]

본 실시예에 개시된 연구는 시험된 ADC의 항-증식 효과를 위한 그들의 ROR1에 대한 의존성을 평가하였다. Jeko-1 세포를 실험 설정 전에 로그 단계 성장에서 배양하였다. 경쟁 실험을 위하여, 5×10^4 세포를 37°C 및 5% CO_2 에서 2시간 동안 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Ab1 또는 비히를 대조군과 항온처리하였다. 이어서, 3, 10, 및 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ADC-A를 첨가하고 세포를 37°C 및 5% CO_2 에서 추가 72시간 동안 항온처리하였다. 각 조건을 두별로 시험하였다. 세포 생존능을 실시예 5에 개시된 대로 결정하였다.

[0520]

데이터는 ADC-A가 용량-의존 방식으로 세포 증식을 억제하였음을 보여준다(도 9, 흑색 막대). 비-접합 모 항체 Ab1과 세포의 사전-항온처리는 시험된 모든 ADC-A 농도에서 이러한 항-증식 활성을 억제하여(도 9, 회색 막대), 세포 사멸이 그의 타겟인 ROR1에의 ADC-A의 결합에 의해 막개되었음을 입증한다.

[0521]

실시예 8: 생체내에서 예시적인 면역접합체의 항-종양 활성

[0522]

1. *TCL1 x ROR1 CLL* 마우스 모델에서 ADC-A의 효능

[0523]

ROR1은 T-세포 백혈병 1 종양유전자(TCL1)와 상호작용하며 Em-TCL1 트랜스제닉 마우스에서 백혈병유발을 향상시키며, 항-ROR1 항체로 처리하면 ROR1 x TCL1 백혈병 세포의 생착을 손상시킬 수 있음이 입증되었다(Widhopf et al., PNAS 111: 793-798 (2014)). 본 연구는 TCL1 x ROR1 CLL 마우스 모델에서 비히를 및 비접합 Ab1에 비교할 때 ADC-A의 활성을 평가하였다. 본 연구에서는, ROR1 x TCL1 백혈병 세포를 꼬리 정맥 주사를 통해 마우스내로 생착시키고, 주사된 마우스를 8마리/그룹의 다섯 그룹으로 무작위화하였다. 그룹은 비히를 대조군, 10 mg/kg Ab1, 및 1, 2, 및 5 mg/kg ADC-A였다. 총 4회 용량을 위해 마우스에게 매주 IV 투약하였다. 본 연구의 결과는 하기 표 10에 나타난다.

[0524] **2. MCL 이종이식 마우스 모델에서 ADC-A 및 ADC-Q의 효능**

[0525] Jeko-1(MCL) 세포를 마우스내로 피하로 생착시키고, 생착된 마우스를 9마리 마우스/그룹의 다섯 그룹으로 무작위화하였다. 그룹은 비히클 대조군, 10 mg/kg Ab1, 20 mg/kg 이브루티닙, 5 mg/kg ADC-A, 및 5 mg/kg ADC-Q였다. 마우스에게 IV q4d 투약하였다. 본 연구의 결과는 하기 표 10에 나타난다.

[0526] **3. DLBCL-GCB PDX 마우스 모델에서 ADC-A의 효능**

[0527] 배중심 B-세포 유사 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL-GCB) 세포를 마우스내로 피하로 생착시키고, 생착된 마우스를 6마리 마우스/그룹의 다섯 그룹으로 무작위화하였다. 그룹은 비히클 대조군, 10 mg/kg Ab1, 50 mg/kg 베네톤클랙스, 10 mg/kg Ab1 + 50 mg/kg 베네톤클랙스, 및 5 mg/kg ADC-A였다. Ab1 및 ADC-A를 IV, qw 투여하고 베네톤클랙스를 PO qd 투여하였다. 본 연구의 결과는 하기 표 10에 나타난다.

[0528] **4. ROR1-양성 리처 증후군 PDX 마우스 모델에서 ADC-A의 효능**

[0529] NSG 마우스에게 매트리젤내의 세포 혼탁액내의 RS9373 세포(환자-유래된 이종이식편 또는 PDX)를 양 옆구리 영역에 피하로 주사하였다. 뚜렷한 종양이 관찰될 때(대략 50 mm³), 동물을 4마리 마우스/그룹의 세 그룹으로 무작위화하였다. 처리 그룹은 비히클 대조군, 2.5 mg/kg ADC-A IV q4d, 및 5 mg/kg ADC-A IV q4d였다. 마우스를 총 3회 처리하였으며 마지막 처리 후 24시간에 종양을 수집하였다. 평균 종양 성장 억제(TGI)는 하기 식을 이용하여 계산하였다:

$$\text{TGI} = [1 - \frac{(\bar{\chi}_{\text{처리됨(최종)}} - \bar{\chi}_{\text{처리됨(제1일)}})}{(\bar{\chi}_{\text{대조군(최종)}} - \bar{\chi}_{\text{대조군(제1일)}})}] \times 100\%$$

[0530]

[0531] 대부분의 종양 타입에서, 이종성 ROR1 발현이 종양내 수준으로 관찰되었다. 그럼에도 불구하고, 종양 퇴행이 ADC-A 처리된 그룹에서 관찰되었다. 리처 림프종의 RS101 PDX 모델에서, 세포의 20-30%가 ROR1-양성이었으나, 완전하고 지속적인 퇴행이 관찰되었다(도 13). 본 연구의 결과는 하기 표 10에 나타난다.

[0532] **5. ROR1-양성 인간 TNBC 이종이식 모델에서 ADC-A의 효능**

[0533] NCR 마우스에게 매트리젤내의 세포 혼탁액내의 MDA-MB-231 세포(ROR1-양성 인간 삼중 음성 유방암(TNBC) 세포)를 가진 유방 지방 패드를 피하 주사하였다. 뚜렷한 종양이 관찰되면(대략 250 mm³), 동물을 9마리 마우스/그룹의 세 가지 상이한 그룹으로 무작위화하였다: 비히클 대조군, 1 mg/kg ADC-A IV qw, 및 5 mg/kg ADC-A IV qw. 마우스를 총 5회 처리하였으며 마지막 처리 후 24 h에 종양을 수집하였다. 상기 식을 이용하여 평균 종양 성장 억제(TGI)를 계산하였다. 본 연구의 결과가 하기 표 10에 나타난다.

[0534] **6. 두 ROR1-양성 인간 TNBC PDX 모델에서 ADC-A의 효능**

[0535] 상이한 수준의 ROR1 발현을 나타내는 두 PDX 모델을 본 연구를 위해 선택하였다. ROR1 발현은 TNBC PDX 모델의 세별 핵심(triplicate core)을 나타내는 조직 마이크로어레이의 IHC를 통한 ROR1 염색의 수준에 기초하였다. % ROR1-양성 세포에 의해 평가할 때 ROR1 발현의 평균 수준은 각각 인간 TNBC 세포 BR5011 및 BR5015를 위해 58% 및 38%였다.

[0536] NOD/SCID 누드 마우스에게 유방 지방 패드내의 BR5011 또는 BR5015 세포를 피하로 주사하였다. 뚜렷한 종양이 관찰될 때(BR5011에 대해 대략 150 mm³ 및 BR5015에 대해 대략 250 mm³의 평균 종양 부피), 동물을 세 그룹으로 무작위화하였다. BR5011 PDX 모델을 위한 그룹은 비히클 대조군, 1 mg/kg ADC-A IV q4d, 및 5 mg/kg ADC-A IV q4d였다. BR5015 PDX 모델을 위한 그룹은 비히클 대조군, 1 mg/kg ADC-A IV qw, 및 5 mg/kg ADC-A IV qw였다. 평균 TGI를 상기한 대로 계산하였다.

[0537] 종양 억제 및/또는 퇴행이 ADC-A 처리된 그룹에서 관찰되었다. 예를 들어, 암세포의 58%에서 ROR1 발현을 보여준 BR5011 TNBC PDX 모델에서, 완전하고 지속적인 퇴행이 관찰되었다(도 15). 본 연구의 결과는 하기 표 10에 나타난다.

[0538] **7. Jeko-1 인간 MCL 이종이식 모델에서 ADC-A, L, M, N, P, R, S 및 T의 효능**

[0539] Jeko-1(MCL) 세포를 마우스내로 피하로 생착시켰다. 종양 크기가 100 mm³에 도달했을 때, 마우스를 9마리 마우

스/그룹의 9 그룹으로 무작위화하였다. 그룹은 비하를 대조군; 1 mg/kg ADC-N, ADC-P 또는 ADC-R; 또는 5 mg/kg ADC-A, ADC-L, ADC-M, ADC-S, 또는 ADC-T였다. 마우스에게 IV q4d 투약하였다. 본 연구의 잠정적 결과가 하기 표 10에 나타난다.

[표 10] 예시적인 면역접합체를 이용한 생체내 연구의 결과

연구	ADC	동물 모델	기간	결과	도면
1	ADC-A	TCL1 x ROR1 백혈병 세포	1 개월	ADC-A는 용량-이존 방식으로 백혈병 세포 종양 부담을 억제함(1, 2, 및 5 mg/kg).	10
2	ADC-A ADC-Q	Jeko-1 MCL 이종이식	3 주	ADC-A는 종양 퇴행을 야기한 한편 ADC-Q는 종양 성장 저연을 야기함.	11
3	ADC-A	DLBCL-GCB PDX	24 일	ADC-A는 종양 퇴행(104%)을 야기하여 모든 동물에서 완전 퇴행을 가짐. Ab1(비접합) 단독, 베네토클락스 단독, 또는 Ab1(비접합) + 베네토클락스는 비효과적임.	12
4	ADC-A	화학요법-저항성인 리처 형질전환의 PDX 모델	48 일	종양내 세포의 20-30%가 ROR1-양성이었으나, 완전하고 지속적인 퇴행이 관찰됨. ADC-A 평균 TGI: 2.5 mg/kg에서 78%; 5mg/kg에서 90%.	13
5	ADC-A ADC-B	MDA-MB-231 이종이식	47 일	ADC-A 평균 TGI: 1 mg/kg에서 56.4%; 5mg/kg에서 94.2%.	14
6	ADC-A	인간 TNBC PDX 모델, BR5011	56 일 투약; 84 일 관찰 (5 mg/kg 그룹)	종양내 세포의 58%가 ROR1-양성이었으나, 완전하고 지속적인 퇴행이 5 mg/kg ADC-A에서 관찰됨. ADC-A 평균 TGI: 1 mg/kg에서 40.1%. 5mg/kg에서 완전한 퇴행. 마지막 용량 후 28 일동안 5 mg/kg 그룹이 모니터되었으며 관찰 기간 동안 종양 퇴행이 유지되었음.	15
		인간 TNBC PDX, BR5015 (낮은 ROR1 발현)	17 일	ADC-A 평균 TGI: 1 mg/kg에서 22%; 5 mg/kg에서 75.6%.	16

[0541]

연구	ADC	동물 모델	기간	결과	도면
7	ADC-A ADC-L ADC-M ADC-N ADC-P ADC-R ADC-S ADC-T	Jeko-1 MCL 이종이식	잠정적 결과 14 일	제 11 일과 14 일에서의 잠정적 분석은 모든 ADC 작제물이 종양 성장을 억제하였으며 모든 ADC-처리된 동물이 제 11 일에 비하여 제 14 일에 평균 종양 크기의 감소를 나타냈음을 보여줌. 이것은 연구 마지막에(제 14 일 이후) 모든 처리 그룹에서 퇴행이 관찰될 수 있음을 제안함. ADC-A, L, M, 및 S로 처리된 동물은 모두 제 0 일에서의 처리전에 비하여 제 14 일에서의 평균 종양 크기 감소에 의해 나타난 대로, 상당한 종양 퇴행을 나타냄.	17

[0542]

생체내 연구 1-7은 종양내의 ROR1 발현의 이종성 및 암 타입에 걸친 ROR1 발현의 변하는 수준에도 불구하고, ADC-A의 처리는 다양한 암에서 종양 성장 억제 및 심지어 지속적이고 완전한 퇴행을 야기하였음을 보여준다. 예를 들어, 종양 세포의 58%에서 ROR1의 발현을 보여준 TNBC PDX 모델에서, 모든 종양에서 완전하고 지속적인 퇴행이 관찰되었다(도 15). 유사하게, 리처 림프종의 RS101 PDX 모델에서, 세포의 20-30%가 ROR1-양성이었으나, 모든 종양에서 완전하고 지속적인 퇴행이 관찰되었다(도 13). 이들 결과는 항-ROR1 면역접합체가 결합된 암 세포에 대한 세포독성뿐만 아니라 종양 미세환경내의 이웃 암세포에 대한 방관자 독성에 의해, 또는 면역계의 항

암 효과를 상향조절함으로써, 또는 이들 기전의 조합에 의해 암을 박멸함을 제안한다. 이 발견은 본 발명의 면역접합체가 ROR1의 중양내 이종성 발현을 가진 종양을 치료하기 위하여 사용될 수 있음을 나타내므로 중요하다.

[0544] 본 생체내 연구는 또한 ADC-A가 약물-저항성 암의 치료에서 효과적이었음을 보여준다. 본 발명자들은 이브루티닙(Jeko-1 MCL 모델)에 또는 리툭시맙-CHOP 면역화학요법(리히터 형질전환 모델)에 저항성이었던 인간 종양 이종이식편에서 퇴행을 관찰했다. ROR1이 진행된 암을 위한 마커이고 이전의 화학요법은 ROR1 발현을 증가시키는 것으로 보이므로, 본 발명자들의 발견은 진행된 또는 악성 암의 치료에서 본 발명의 면역접합체의 잠재력을 입증한다.

8. ADC의 추가 생체내 평가

[0545] ADC, 예를 들어, ADC-A, E, F, L, M, N, P, Q, 및 R의 생체내 효능은 Jeko-1 세포를 이용하여 ROR1-양성 피하 인간 MCL 이종이식 모델에서 추가로 평가될 수 있다. 동물은 비히를, 1 mg/kg ADC, 또는 5 mg/kg ADC로 IV q4d 투약된다. 2-3일마다 종양 성장 및 체중을 측정한다. 본 발명의 ADC의 약동학적 분석은 항체 C_{max} 및 반감기와 같은 표준 약동학적 파라미터를 결정하기 위하여 수행될 수 있다.

실시예 9: 조합 치료법

[0546] ADC-A를 다른 항-종식제와 조합하는 효과를 검사하였다. 초기 연구는 BTK(이브루티닙, ACP-196/아칼라브루티닙), Bcl-2(ATB-199/베페토클랙스), mTOR(INK128), 또는 PI3K(이델랄리십)의 억제제와 조합된 ADC-A의 효과에 초점을 맞추었다. 추가적인 연구는 ADC-A를 Bcl-2i-1과 Bcl-2i-2로 불리는 두 가지 추가의 Bcl-2 억제제와 조합하는 효과를 검사하였다. 세포주를 두 가지 구별되는 DLBCL 서브타입 - 배중심 B-세포(GCB) 및 활성화된 B-세포(ABC)에 대해 시험하였다. 중앙값-효과 분석(median-effect analysis)을 이용하여 항-종식제와 조합된 ADC-A로 처리된 다양한 세포주의 종식 억제의 상승작용, 길항작용 또는 상가성을 결정하였다. 조합 지수(Combination Index)(CI)는 초우/탈라레이(Chou/Talalay) 식을 이용하여 결정하였다. 각 화합물에 대한 IC₅₀은 72시간 셀타이터-글로® 분석에서 결정하였다. 조합 분석을 위하여, 약물을 동물 비로(즉, 그들의 IC₅₀ 값의 비로) 이용하였다. 용량 효과 분석을 위하여 캘큐신(CalcuSyn) 소프트웨어(바이오소프트(Biosoft))를 이용하였다. 1.1 미만의 조합 지수는 치료가 상승적임을 나타내며; 0.9 - 1.1은 치료가 상가성임을 나타내며; 그리고 1.1보다 큰 지수는 치료가 길항적임을 나타낸다.

[0547] ADC-A는 2가지 상이한 BTK 억제제인 이브루티닙(**도 18a**) 및 ACP-196/아칼라브루티닙(**도 18b**)에서 상승적 효과를 나타냈다. 상승적 효과는 아칼라브루티닙에서 그리고 MCL 세포주에서 더욱 커졌다. MCL 세포주 Jeko-1에 대한 이브루티닙 및 아칼라브루티닙과 조합된 ADC-A를 위한 대표적인 데이터가 각각 **도 19a** 및 **19b**에 나타난다.

[0548] ADC-A는 또한 Bcl-2 억제제 ABT-199/베페토클랙스와 상승적 효과를 나타냈다(**도 20a**). 상승적 효과는 MCL 및 DLBCL 세포주 둘 모두에서 커졌다. 추가의 Bcl-2 억제제인 Bcl2i-1 및 Bcl2i-2와 조합된 ADC-A의 활성을 Jeko-1(**도 20b**) 및 Mino(**도 20c**) 세포(둘 모두 MCL 세포 타입임)에서 검사하였다. ADC-A는 Jeko-1 세포에서 두 억제제 모두와 상승적 효과를 그리고 Mino 세포에서 두 억제제 모두와 상가 효과를 나타냈다. Jeko-1에 대한 베페토클랙스와 조합된 ADC-A를 위한 대표적인 데이터가 **도 21**에 나타난다.

[0549] ADC-A는 mTOR1/2 억제제 INK128/사파니세르팀과 상승적 효과를 나타냈다(**도 22**). 상승적 효과는 MCL 및 DLBCL 세포주 둘 모두에서 관찰되었다. Jeko-1에 대한 사파니세르팀과 조합된 ADC-A를 위한 대표적인 데이터가 **도 23**에 나타난다.

[0550] ADC-A는 PI3K 억제제 CAL-101/이델랄리십과 상승적 효과를 나타냈다(**도 24**). 상승적 효과는 MCL 및 DLBCL 세포주 둘 모두에서 관찰되었다. DLBCL의 두 서브타입 모두에 대한 상승적 효과를 나타내는, 이델랄리십과 조합된 ADC-A를 위한 대표적인 데이터가 **도 25a**(TMD 세포, DLBCL-ABC) 및 **도 25b**(DOHH2 세포, DLBCL-GCB)에 나타난다.

실시예 10: 조합 치료법의 추가 평가

[0551] Bcl-2 억제제와 조합된 ADC의 생체내 효능은 Jeko-1 세포를 이용하여 ROR1-양성 인간 MCL 이종이식 모델에서 또는 PDX 모델에서 추가로 평가될 수 있다. ADC 및 Bcl-2 억제제 둘 모두를 반복 용량 연구에서, 하기에 요약된 대로 최대 허용 및 최적-이하 용량으로, 단독으로 그리고 조합하여 투약한다. 종양 성장 및 체중을 2-3일마다 측정한다.

[0552] · ADC-A 및 Bcl-2 억제제 MTD 투약

- [0556] o 5 mg/kg ADC-A, IV, q4d
- [0557] o 100 mg/kg 베네토클락스(ABT-199), 매주
- [0558] · ADC-A 및 Bcl-2 억제제 최적-이하 및 조합 투약
- [0559] o 1 mg/kg ADC-A, IV, q4d
- [0560] o 2 mg/kg ADC-A, IV, q4d
- [0561] o 50 mg/kg ABT-199, PO, qd
- [0562] o 100 mg/kg ABT-199, PO, qd
- [0563] o 1 mg/kg ADC-A, IV, q4d + 50 mg/kg ABT-199, PO, qd
- [0564] o 2 mg/kg ADC-A, IV, q4d + 50 mg/kg ABT-199, PO, qd
- [0565] o 1 mg/kg ADC-A, IV, q4d + 100 mg/kg ABT-199, PO, qd
- [0566] o 2 mg/kg ADC-A, IV, q4d + 100 mg/kg ABT-199, PO, qd
- [0567] 항체 C_{max} 및 반감기와 같은 표준 약동학적 파라미터를 결정하기 위하여 약동학적 분석이 수행된다.

실시예 11: 항-ROR1-MMAE 면역접합체의 임상 2상 연구

하기는 항 ROR1-MMAE 면역접합체 치료법을 위한 전향 개방형 라밸 1b/2상 임상 시험을 위한 프로토콜을 개시한다.

포함 기준:

- [0571] · 0, 1, 또는 2의 동부 공동 종양학 그룹(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG) 기능 상태(performance status)
- [0572] · 의료 기록에 기록된 CLL/SLL 또는 MCL의 조직학적 진단
- [0573] · CLL/SLL 또는 MCL이 이전에 치료되었으며 이전 치료법 후에 재발하거나 이전 치료 동안 진행하였음
- [0574] · 방사선사진술로 측정가능한 임파선염 또는 림프절외 림프구성 악성 종양의 존재(컴퓨터 단층촬영[CT] 또는 자기공명영상화[MRI]에 의해 평가할 때 최장 치수[LD]가 ≥ 2.0 cm이고 최장 수직 치수[LPD]가 ≥ 1.0 cm로 측정되는 비-생검, 비-조사 병변이 ≥ 1 존재하는 것으로 정의됨).
- [0575] · 질병-관련 증상, 임파선염, 장기종대, 림프절외 장기 관련 또는 진행성 질병으로 인하여 치료법에 대한 현재의 의료적 필요성.
- [0576] · 연구 치료법의 시작 전 1주일에 암의 치료를 위한 모든 이전 치료법(수술, 방사선요법, 화학요법, 면역요법, 또는 검사성 치료법 포함)의 완료.
- [0577] · 연구 치료법의 시작 전에 임의의 이전 항종양 치료법의 모든 급성 독성 효과가 1등급으로 해결됨(탈모[1 또는 2 등급 허용됨], 또는 신경독성[1 또는 2 등급 허용됨], 또는 선택된 실험실 파라미터[하기에 기재된 예외를 가지고서 1등급 또는 2등급 허용됨]의 예외를 가짐).

적절한 골수 기능:

- [0579] o a) 절대호중구수(ANC) $\geq 1.0 \times 10^9/L$ (등급 ≤ 2). b) 혈소판수 $\geq 50 \times 10^9/L$ (등급 ≤ 2). b) 임의의 이전 수혈로부터 ≥ 1 주 동안 해모글로빈 ≥ 8.0 g/dL(등급 ≤ 2)이 유지됨.

- [0580] · 노트: (마지막 이전 치료법 이후에 수득된 골수 생검/흡인물에 의해 기록된 대로) 만일 이상이 혈액 악성 종양과의 골수 관련성에 관한 것이면 등급 ≥ 3 호중구감소증, 혈소판감소증, 또는 빈혈이 허용됨.

적절한 간 프로파일:

- [0582] o 혈청 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) $\leq 3 \times$ 정상의 상한(ULN)(등급 ≤ 1).
- [0583] o 혈청 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) $\leq 3 \times$ ULN(등급 ≤ 1).

- [0584] o 혈청 빌리루빈 $\leq 1.5 \times \text{ULN}$ (등급 ≤ 1).
- [0585] · 적절한 신장 기능:
 - o a) 추정된 크레아티닌 청소율(eGFR) $>45 \text{ mL/분}$ (eGFR은 코크로프트-가울트 식(Cockcroft-Gault formula)에 의해 계산됨), 또는 b) 측정된 크레아티닌 청소율 $>45 \text{ mL/분}$ (24시간 소변 수집으로 평가됨).
- [0587] · 적절한 응고 프로파일:
 - o 프로트롬빈 시간(PT) $\leq 1.5 \times \text{ULN}$ (등급 ≤ 1).
 - o 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) $\leq 1.5 \times \text{ULN}$ (등급 ≤ 1).
- [0590] · 음성 바이러스 혈청학:
 - o 음성 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 항체.
- [0592] o 정량적 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 시험에 의해 음성 B형 간염 표면 항원(HBsAg) 및 음성 B형 간염 코어 (HBc) 항체 또는 미검출 B형 간염(HBV) 데옥시리보핵산(DNA).
- [0593] o 정량적 PCR에 의해 음성 C형 간염 바이러스(HCV) 항체 또는 음성 HCV 리보핵산(RNA).
- [0594] · 임신 가능성있는 여성 대상의 경우, 연구 치료법의 시작 전에 음성 소변 또는 혈청 임신 시험.
- [0595] · 조사자의 판단으로, 프로토콜에의 참여는 현재의 질병 상태, 의학적 상태 및 대상의 암을 위한 대안적 치료의 잠재적 이득과 위험을 고려할 때 허용가능한 이득-대-위험 비를 제공함.
- [0596] · 대상이 스케줄된 방문, 약물 투여 계획, 프로토콜-특화된 실험실 시험, 다른 연구 절차(모든 골수 생검/흡입 물 및 방사성사진 연구 포함) 및 연구 제한에 순응할 의지와 능력.
- [0597] 배제 기준:
 - [0598] · 악성 림프종으로의 알려진 조직학적 형질전환(즉, 리히터 형질전환). 노트: 형질전환의 부재 또는 존재의 생검 기록은 요구되지 않음.
 - [0599] · 알려진 중추신경계 악성종양. 노트: 중추신경계 영상화는 중추신경계 악성종양이 의심되는 대상에서만 요구됨.
 - [0600] · 하기를 제외한 다른 악성종양의 이력: 적절하게 치료된 피부의 국소 기저 세포 또는 편평세포 암종; 질병의 증거없이 제자리에서 적절하게 처리된 암종; 적절하게 처리된, 유두상, 비침습성 방광암; ≥ 2 년 동안 완전 관해 였던 다른 암.
 - [0601] · 연구 치료법의 시작 전 3개월 이내에 상당한 심혈관 질병(예를 들어, 심근경색, 동맥 혈전색전증, 뇌혈관 혈전색전증); 치료법을 요하는 협심증; 증상을 보이는 말초 혈관 질병; 뉴욕 심장 협회 클래스 3 또는 4 울혈성 심부전; 또는 혈압강하제 치료법에도 불구하고 비제어된 등급 ≥ 3 고혈압(확장기 혈압 $\geq 100 \text{ mmHg}$ 또는 수축기 혈압 $\geq 160 \text{ mmHg}$).
 - [0602] · 의약을 요구하는 불안정한 부정맥, 심방 세동/조동, 좌각차단, 2도 방설(AV) 차단 타입 II, 3도 AV 차단, 등급 ≥ 2 서맥, 또는 보정된 QT(QTc) $>450 \text{ msec}$ (남성의 경우) 또는 $>470 \text{ msec}$ (여성의 경우)를 비롯한 상당한 스크리닝 ECG 이상.
 - [0603] · 약 흡수 또는 위장관 AE의 해석을 방해할 수 있는 위장관 질병(예를 들어, 위 또는 장 우회로조성술(bypass surgery), 췌장 효소 불충분, 흡수불량 증후군, 증상을 보이는 염증성 장 질병, 만성 설사병, 장 폐색).
 - [0604] · 활성 소화성 궤양 질병으로 인한 출혈에 대한 진행중인 위험; 출혈 체질; 또는 항혈소판 약물(예를 들어, 아스피린, 트리플루살(triflusal), 클로피도그렐(clopidogrel), 프라수그렐(prasugrel), 티카그레롤(ticagrelor), 티클로피딘(ticlopidine), 실로스타졸(cilostazol), 보라파사르(vorapaxar), 다이피리다몰(dipyridamole)); 또는 혜파린, 저분자량 혜파린 또는 혜파린 일부(예를 들어, 에녹사파린(enoxaparin), 달테파린(dalteparin), 혼다파리뉴스(fondaparinux)) 또는 경구 항응고제(예를 들어, 아피사반(apixaban), 리바록사반(rivaroxaban), 다비가트란 에텍실레이트(dabigatran etexilate), 와파린(warfarin))를 이용한 전신성 항응고에 대한 요구. 노트: 중심 정맥관의 국소 유지 또는 제거를 위한 혜파린 또는 혈전용해제의 사용이 허용됨.
 - [0605] · 연구 치료법의 시작시에 진행중인 전신성 세균, 진균, 또는 바이러스 감염의 증거(상부 호흡기 감염 포함).

노트: 피부 또는 손톱의 국소화 진균 감염을 가진 대상은 참여로부터 배제되지 않음.

[0606] · 이전의 조혈모세포 이식을 가진 대상에서, 진행중인 이식편대속주 질병(GVHD)의 증거.

[0607] · 임신 또는 모유수유.

[0608] · 연구 치료법의 시작 전 4주 이내에 주요 수술.

[0609] · 이전의 고형 장기 이식.

[0610] · 연구 치료법의 시작 전 12주 이내에 이전의 항-ROR1 치료법.

[0611] · 전신성 또는 장 코르티코스테로이드를 비롯한 진행중인 면역억제 치료법. 노트: 스크리닝시에, 대상은 국소 또는 흡입 코르티코스테로이드를 이용중일 수 있음. 연구 치료법 동안, 주입 반응을 위한 예방으로서 코르티코스테로이드의 사용이 최소화될 것임. 하지만, 대상은 치료가 급한 병태를 위해 요구될 경우 전신성, 장, 국소 또는 장 코르티코스테로이드를 사용할 수 있음.

[0612] 일차 평가 지표(Primary Outcome Measures):

[0613] · 1b상: 권장 투약 요법(RDR)[시간 프레임(Time Frame): 기준선부터 52주까지] 시름투주맙(cirmtuzumab) 용량-약력학 및 약동학-약력학 관계 및 안전성의 평가.

[0614] · 2상: 완전 반응(CR) 비율[시간 프레임: 모든 연구 대상의 무작위화부터 치료 중단까지 또는 최종 대상의 발생(accrual) 후 72주] 림프종을 위해 사전-획립된 반응 기준에 따라 CR을 이루는 대상의 비율(Cheson, J Clin Oncol. 32(27):3059-68 (2014)).

[0615] [표 11] 예시적인 투약 요법

환자군(Arm)	할당된 개입
1b 상- ROR1-MMAE를 위한 용량 발견	5회 투여동안 2주마다 그리고 그 후 4주마다 IV 투여됨
1b 상 - ROR1-MMAE를 위한 용량 확장	3회 투여동안 2주마다 그리고 그 후 4주마다 IV 투여됨
2 상 - ROR1-MMAE를 위한 안전성 및 효능 평가	3회 투여동안 2주마다 그리고 그 후 4주마다 IV 투여됨

[0616]

[0617] 용량 발견 상은 1.0, 2.0, 및 3.0 mg/kg에서 병행 용량 비교에 의해 수행될 것이다.

[0618]

본 발명의 바람직한 실시형태가 본 명세서에 나타나고 개시되었지만, 그러한 실시형태는 단지 예로서 제공됨이 당업자에게 자명할 것이다. 이제 많은 변형, 변화 및 치환이 본 발명에서 벗어나지 않고 당업자에게 떠오를 것이다. 본 명세서에 개시된 본 발명의 실시형태에 대한 다양한 대안이 본 발명의 실시에서 이용될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0619]

본 명세서에 개시된 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열이 하기 표 12에 열거된다.

[0620]

[표 12] 서열의 목록

SIN	설명	서열
1	인간 ROR1 단편	VATNGKEVVS STGVLFVKFG PC
2	인간 ROR1 단편	EVVSSTGVLF VKFGPC
3	Ab1 중쇄	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVSGY AFTAYNIHWVRQAPGQGLEWM GSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC ARGWYYFDYWGHTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTWSWNNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSLGTQ TYICVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQP REPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAWEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK
4	Ab1 경쇄	DIVMTQTPLSLPVTGEPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGQAPRLIYSG STLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYFCQHQHDESPYTFGEGT KVEIKRTVAAPSFIGPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFRNRGEC
5	Ab1 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVSGY AFTAYNIHWVRQAPGQGLEWM GSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC ARGWYYFDYWGHTLTVSS
6	Ab1 VL	DIVMTQTPLSLPVTGEPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGQAPRLIYSG STLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYFCQHQHDESPYTFGEGT

[0621]

SIN	설명	서열
		KVEIK
7	Ab1 HCDR1	GYAFTAYN
8	Ab1 HCDR2	FDPYDGGS
9	Ab1 HCDR3	GWYYFDY
10	Ab1 LCDR1	KSISKY
11	Ab1 LCDR2	SGS
12	Ab1 LCDR3	QQHDESPY
13	Ab1 VH 단편	SGYAFTAYNIHWVRQ
14	Ab1 VH 단편	GSFDPYDGGSSYNQKF
15	Ab1 VH 단편	YYCARGWYYFDYWGHGTLTVSS
16	Ab1 VL 단편	CRASKSISKYLAWY
17	Ab1 VL 단편	LLIYSGSTLQSG
18	Ab1 VL 단편	CQQHDESPYTFGEGETKVEIK
19	Ab1 종쇄 코딩 서열	AAGCTTACCGCCACCATGGGCTGGAGCTGTATCATCCTCTTCCTGGTGCGACCGCGACGGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTCCAGGAGTCCGGCCCCGGGCTTGTGAAGCCGTACAAACCCCTGTCCCTGACGTGCACGGTCTCCGGTACGCCCTCACGGCTACAACATACATTGGGTCCGGCAGGCGCCGGCAGGGGCTGGAGTGGATGGGTTCTCGACCCGTACGATGGCGGGGAGCTCGTACAACCAAGAGTTCAAAGACCCGCTGACGATCTCAAGGACACCTCGAAAAAACAGGTGCTCTGACCATGACCAACATGGACCCGGTGGACACGGCGACTACTATTGCGCCCGGGCTGGTACTACTCGACTACTGGGGCCACGGGACCCCTGGTCAACCGTGTCTCCGCTTCGACCAAGGGCCCCAGCGTCTCCCGCTCGCGCCCTCCTCGAAGTCCACCCTCGGGCGGCACTGCCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCGGAGCCGGTGAACCGTCTCGTGGAACAGCGGGGACTCACCTCCGGCTGCACACCTTCCGGCGTGCAGTCCTCGGGGCTGTATTCACTCAGTCGGTCTCGTACCGTCCCCCTCGTCTCGTCCCTCGGCACGCAGACGTACA TCTGCAACCGTAACCAAGCCCTCGAACACCCAAGGTGGACAAGAACG GTCGAGGCCGAAGTCTCGGATAAGACCCACACCTGCCCGGGCTGGCCGGCCCCCGAGCTCCTGGGGCTCCGTCTGGTATTCCCTTCCCGCCCAA GCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGCACGCCGGAGGTGACCTGCGTCGCTGGACGGTCTCCACGAGGATCCCGAGGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGGAGGTCCACAACGCCAAGACAAAGCCGGGAAAGAGCAGTACAACCTCGACCTACCGCGTCAGCGTGTGACGGCTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAATGCAAGGTGTC

[0622]

SIN	설명	서열
		CAACAAGGCCCTGCCGCACCATCGAGAAGACCACATCTCCAAGGCCA AGGGACAGCCGCGGAGCCGAGGTCTACACGCTGCCCTCCCGG GACGAGCTCACGAAGAACCCAGGTATCGCTCACCTGCCGTGAAGGG CTTCTACCCGAGCGACATGCCGTGAGTGGGAGAGCAACGCCAGC CCGAGAACAACTACAAAACCACGCCCGGTCTGACTCTGACGGG TCCTCTCTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGACAGTGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTGTTCTGTGCTGGTCATGCACGAGGCCGTTGACAA CCACTACACCCAGAAGTCACTCTCCCTGAGGCCGGCAAGTATAAT CTAGAGTCGGGGCGGCCGCC
20	Ab1 경쇄 코딩 서열	AAGCTTACCGCCACCATGGGCTGGTATGCATCATCCTGTTCTGGTC GCCACCGCGACGGGGTCCACAGTATATCGTCATGACGAGACGCC GCTGAGCCTCCCGGTGACGCCGGAGGCCGAGCATCTCTGCC GCGCTCCAAGTCCATCTCGAAGTACCTGGCGTGTATCAGCAGAAG CCCCGCCAGGGCCCGCCTGCTCATCTACTCTGGTCCACGCCAG TCGGGCATCCCCTGGGTTCTGGGTTCTGGGATAACGGCACCGACTTC ACCTGACCATCAACAAACATCGAGAGCGAAGACGCCGCTACTACTT CTGCCAGCAGCACGAGTCCCCGTACACCTTCCGGGAGGGGACCA AGTCAGATCAAGCGTACCGTGCACGCCGAGCGTCTTCATCTTC CCCCCGTCCGACGAGCAGCTCAAGTCTGGCACCGCCCTCGGTCTGT CTCCTGAACAACCTCTACCCCAGGGAAAGCCAAGGTTCAAGTGGAAAGGT GGACAACGCGCTGCACTGGGAAATAGCCAGGAGTCGGTACGGAG CAGGACTCCAAGGACTCACGTACTCGCTCTCGTCCACCCGTACCCCTC TCCAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTACCGCTCGAGGTGAC GCACCAAGGCCGTCTCCCTCCAGTGACCAAGTCGTTCAACCGCCGCG AGTGTGATAATCTAGAGTCGGGGCGGCCGCC
21	Ab1 VH 코딩 서열 1	AAGCTTACCGCCACCATGGGCTGGAGCTGTATCATCCTCTCTGGTG GGCACCGCGACGGGTGTCACCTCCAGGTGCAGCTCCAGGAGTCCGG CCCCGGGCTTGTGAAGGCCCTACAAACCTGTCCCTGACGTGACGG TCTCCGGCTACGCCCTCACGGGCTTACAAACATGGGTCGGGAG CGCCGGGGCAGGGGCTGGAGTGGATGGGTTCTCGACCGTACGAT GGCGGGAGCTCGTACAACAGAAGTCAAAGACGCCCTGACGATCTC CAAGGACACCTCGAAAACCAGGTGCTCTGACCATGACCAACATGG ACCCGGTGGACACGGCAGCTACTATTCGCCCCGGCTGGTACTAC TTCGACTACTGGGCCACGGGACCGTGTCTCC
22	Ab1 VL 코딩 서열 1	GATATCGTCATGACGCAGACGCCGCTGAGCCTCCGGTGACGCCGG CGAGCCGCCAGCATCTCTGCCGCTTCAAGTCCATCTCGAAGTA CTGGCGTGGTATCAGCAGAAGGCCGCCAGGCCGCGCTGCTCA TCTACTCTGGTCCACGCTCCAGTCGGGATCCGCCGCTGGTCTCGG GTTGGGATACGGCACCGACTTCACCCGACCATCAACAACATCGAG AGCGAAGACGCCGCTACTACTTCTGCCAGCAGCACGAGTCCCC GTACACCTCGCGAGGGGACCAAGGTGAGATCAAG
23	Ab1 VH 코딩 서열 2	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACA GACCTIGTCCCTCACCTGCACTGTCTGGTTATGCATTCACTGCC CAACATACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGG

SIN	설명	서열
		TGGGTCTTTGATCCTTACGATGGTGGTAGTAGTTACAACCAGAAGT TCAAGGACAGACTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTG GTCCTTACAATGCCAACATGGACCCCTGTGGACACAGGCCACGTATT CTGTGCAAGAGGGTGGTACTACTTGAECTACTGGGCCACGAAACCC TGGTCACCGTCTCCTCA
24	Ab1 VL 코딩 서열 2	GATATTGTGATGCCAGACTCCACTCCCCGTCACCCCTGGAG GAGCCGGCCCTCATCTCTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAATA TTAGCCTGGTACCAAGCAGAAACCTGCCAGGCTCCACGGCTCCTCAT CTATTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGATCCCACCTCGATTCACTGG CAGCGGGTATGGAACAGATTITACCCCTACAATTAAACATAGAAT CTGAGGATGCTGCATATTACTTCTGTCAACAGCATGATGAATCCCCGT ACACGTTCCGGCAGGGGACCAAGGTGAAATCAAA
25	D10 VH	QVQLKESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTSYGVHWRQPPGKGLEWLGV VIWAGGFTNYSALKSRLSISKDNKSQVLLKMTSLQTDATMYYCARR GSSYSMDYWGQGTSIVSS
26	D10 VL	EIVLSQSPAITAASLGQKVITCSASSNVSYIHWYQQRSGTSPRPWIYEISK LASGPVPVRFSGSQGTSYSLTISSMEAEDAAIYYCQQWNYPLITFGSGTK LEIQ
27	D10 HCDR1	GFSLTSYG
28	D10 HCDR2	WAGGFT
29	D10 HCDR3	RGSSYSMDY
30	D10 LCDR1	SNVSYI
31	D10 LCDR2	EIS
32	D10 LCDR3	QQWNYPLI
33	D10 VH 코딩 서열	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAG GACTCTGTCATCACTTGCACTGTCTCTGGTTTCTATTAAACCAGTTAT GGTGTACACTGGGTCGCCAGCCTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCT GGGAGTAATATGGGCTGGATTACAATTATAATTGGCTCTCA AGTCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCCAAGAGCCAAGTTCTC TTAAAAATGACCACTGCAAACGTGACACAGCCATGTACTACTG TGCAGGAGAGGTAGTTCTATTCTATGGACTATTGGGTCAAGGAA CCTCAGTCACCGTCTCCTCA
34	D10 VL 코딩 서열	GAAATTGTGCTCTCTCAGTCTCCAGGCCATCACAGCTGCATCTGGGC CAAAAGGTACCATCACCTGCAGTGCAGTTCAAATGTAAGTTACAT CCACTGGTACCAAGCAGAGGTCAAGGCACCTCCCCAGACCATGGATT ATGAAATATCCAAACTGGCTCTGGAGTCCAGTCAGTGGCA GTGGGTCTGGACCTTACTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTG

[0624]

SIN	설명	서열
		AAGATGCTGCCATTATTATTGTCAAGCAGTGGAAATTATCCTTATCACGTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATACAA
35	4A5 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSKAASGFTFSSYAMSWVRQIPEKRLEWVAISRGGTTYPDSVKGRTISRDNVRNILYQMSSLSEDTAMYCGRYD YDGYYAMDYWGQGTSVTVSS
36	4A5 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRNRLVDGVPSRFSGGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGG GTKLEMK
37	4A5 HCDR1	GFTESSYA
38	4A5 HCDR2	ISRGGTT
39	4A5 HCDR3	YDYDGYYAMDY
40	4A5 LCDR1	PDINSY
41	4A5 LCDR2	RAN
42	4A5 LCDR3	LQYDEFPYT
43	4A5 VH 코딩 서열	GAAGTGAAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAG GGTCCCTGAAAATCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTAGCT ATGCCATGTCTGGGTTGCCAGATTCCAGAGAAAGAGGCTGGAGTGG GTCGCATCATTAGTCGTGGTACCACTACTATCCAGACAGTGTG AAGGGCCGATTCAACCATCTCAGAGATAATGTCAGGAACATCCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGCCATGTATTACT GTGGAAGATAATGATTACGACGGGTACTATGCAATGGACTACTGGGT CAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCA
44	4A5 VL 코딩 서열	GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGA GAGAGAGTCACTATCACTGCAAGCGAGTCCGGACATTAATAGCTA TTTAAGCTGGTICCAAGCAGAAACCAGGGAAATCTCTAACAGCCTGA TCTATCGTCAAACAGATTGGTGTGGGTCACCATCAAGGTTAGTG GCGGTGGATCTGGCAAGATTATTCTCACCACAGCCTGGAG TATGAAGATAATGGAATTATTATTGCTACAGTATGATGAATTCCG TACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATGAAAC
45	99961 VH	EIQLQQSGPVLVKPGASVKVSCKASGYAFTAYNIHWVRQSHGKRLEWIG SFDPYDGGSSYNQKFKDATALTVDSSTTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAR GWYYFDYWGHGTTLVSS
46	99961 VL	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGBTNKLLIYSG STLQSGIPSFRGSGSGTDFTLTISSLPEDFAMYYCQQHDESPYTFGEGT

[0625]

SIN	설명	서열
		KLEIKR
47	Ab4 중쇄	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGY AFTAYNIHWIRQPPGKGLEWIGS FDPYDGGSSYNQKFDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR GWYYFDYWGHTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKD YFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP VLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
48	Ab4 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGY AFTAYNIHWIRQPPGKGLEWIGS FDPYDGGSSYNQKFDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR GWYYFDYWGHTLTVSS
49	Ab4 경쇄	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASICRASKSISKYLAZYQQKPGKAPKLLIYS GSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDESPYTFGEG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
50	Ab4 VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASICRASKSISKYLAZYQQKPGKAPKLLIYS GSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDESPYTFGEG TKVEIK
51	Ab4 중쇄 코딩 서열	CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAGGTCCCGGACTGGTCAAGCCGTCGCA GACGCTGTCCCTCACCTGACCGTGTCGGGCTACGCCCTCACGCCCTA CAACATCCA CACTGGATCCGT CAGCCCCCTGGGAAGGGCCTGAGTGG TCGGCAGCTTGACCCGTACGACGGCGGGTCGTCCTACAACCAGAAAG TTCAAGGACCGCCTCACCATCAGCAAGGACACCTCCAAGAACCCAGGT CGTCCTCACCATGACCAACATGGACCCCGTGGACACCGCCACCGTACT ACTGCGCGCGGGCTGGTACTACTTCGACTACTGGGGCACGGCACC CTCGTCACGGTCTCGTCGGGAGCACCAAGGGTCCGGAGCGTCTICCCC CTGCCCCCTCCAGCAAGTCCACCTCGGGGGCACCGCCGCCCCGG CTGCGTCAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGAACCGTGAGCTGGA ACTCCGGCCCTCACCGCGGGTCCACCTCCGGGAGCGTCTCCGGGCTCTGC AGTCATCCGGTCTACTCCCTGAGCTCAGTCGTACCGTCCCCAGCT CCTCCCTCGGAACGACACTACATCTGCAACGTCAACCACAAGCCG TCCAAACACCAAGGTGACAAGAAGGTGGAGGCCAAATCGTGCAGCA AGACCCACACCTGCCCGCCGTGCCCCGGGAACACTGTCGGCGGC CCCTCGGTGTTCTGTTCCCCCGAAGGCCAAAGGACACCCCTCATGATC TCCCGCACCCCGAGGTACCTGCGTGTTGGATGTCTCCACGA GGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTCGAGGTGC ACAACGCCAAGACCAAGCCCCGAGAGGAACAGTATAACTCGACGTA CCGCGTGGTCAGCGTCTGACCGTGCTCCACCAAGGACTGGCTGAACG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CAGCAACAAGGCCCTGCCGGCCCC

[0626]

SIN	설명	서열
		ATCGAGAAGACGATCTCAAGGCAGGGCAGCCGCGAGCCGC AGGTCTACACCCCTGCCGCCAGCCGGACGAGTCACGAAGAATCAG GTCTCGCTCACCTGCCTCGTAAGGGTTCTACCCGTCGGACATCGCG GTCGAATGGGAGTCGAACGGTCAGCCCAGAATAACTACAAGACGA CCCCGCCGTCTGGACTCGGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCGAACG TGACGGTCGACAAGTCGCGCTGGCAGCAGGGCAACGTCTCTCGTGC TCGGTATGCACGAGGCCCTCCACAACCACACACAGAACGAGCCT CTCGTTTCGCCGGCAAG
52	Ab4 VH 코딩 서열	CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAGGTCCCGGACTGGTCAAGCCGTCGCA GACGCTGTCCCTCACCTCACCGTGTCCGGCTACGCCCTCACCGCCA CAACATCCACTGGATCCGTACGCCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG TCGGCAGCTTCGACCCGTACGACGGCGGGTCTCTACAACCCAGAAG TTCAAGGACCCCTCACCATCAGCAAGGACACCTCAAGAACCCAGT CGTCTCACCATGACCAACATGGACCCCGTGGACACCGCCACGTACT ACTGCGCGCGGGCTGGTACTACTTCGACTACTGGGGCACGGCACC CTCGTCACGGTCTCGTC
53	Ab4 경쇄 코딩 서열	GACGTCTGTGATGACCCAGTCGCCCCCTCTCCCTGCCGGTTACCCGG CAGCCCGCCTCCATCAGCTGCCGTGCCCTCAAGTCCATTCCAAGTAC CTGGCCTGGTACCGAGCAGAAGCCGGGAAGGCCCCAAAGCTCTCAT CTACTCCGGCTCCACCCCTCACAGCGGCATCCCCCCCCGCTTCAGCG CTCCGGCTACGGCACCGACTTCACCCCTACCATATAAACATCGAGTC GGAGGACGCCCGTACTACTCTGCCAGCAGCACGAATGCCGT ACACCTTCGGGGAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGGACGGTCGC CGCGCCCTCCGTGTTATCTCCCCCCTCGGACGAACAGCTGAAGTC CGGGACCGCCCTCGCTGCTGCCCTCAACAACTTCTACCCGCGCG GGCCAAGGTGCACTGGAAAGGTGACAAACGGCTCCAGTGGCAACT CCCAGGAGTCGGTGACCGAGCAGGACTCGAAGGACAGTACCTACTCG CTGAGCTCCACACTGACGCTCTCGAAGGCCGACTACGAGAACCAA GGTGTACGCATGCGAGGTGACCCACCAAGGGCTGAGCTGCCGGTGA CTAAGTCGTTAACAGGGGCAATGC
54	Ab4 VL 코딩 서열	GACGTCTGTGATGACCCAGTCGCCCCCTCTCCCTGCCGGTTACCCGG CAGCCCGCCTCCATCAGCTGCCGTGCCCTCAAGTCCATTCCAAGTAC CTGGCCTGGTACCGAGCAGAAGCCGGGAAGGCCCCAAAGCTCTCAT CTACTCCGGCTCCACCCCTCACAGCGGCATCCCCCCCCGCTTCAGCG CTCCGGCTACGGCACCGACTTCACCCCTACCATATAAACATCGAGTC GGAGGACGCCCGTACTACTCTGCCAGCAGCACGAATGCCGT ACACCTTCGGGGAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
55	링커 펩티드 모이어티 서열	GGFG
56	링커 펩티드 모이어티 서열	ALAL
57	링커 펩티드 모이어티	GFLG

[0627]

SIN	설명	서열
	서열	
58	글루타민 태그	LLQGA
59	솔타제 모티프	LPxTG
60	솔타제 모티프	NPQTN
61	BirA 태그	GFEIDKVVWYDLDA
62	인간 CH ₁ 도메인 + 상부 힌지 영역	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
63	인간 카파 불변 도메인	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFRNGEC
64	인간화 4A5 scFv	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASPDINSYLSWFQQRPGQSPRLLIYRANRLVDGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEADVGVYYCLQYD EFPYTFGGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSEV QLVQSGAEVKPGESLRISCKGSFTFSSYAMSWIRQSPSRGLEWL GSISRGGTTYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCGRYDYDGYYAMDYWQGQGTLTVSS
65	Ab1 scFv	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGQAPRL LIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDES PYTFGEGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSQVQL QESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYAFTAYNIHWVRQAPGQGLEWM GSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARGWYYFDYWGHTLTVSS
66	Ab2 scFv	DVVMQTQSPSLPVTLGQPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPK LLIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDES PYTFGEGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSQVQL QLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYAFTAYNIHWVRQAPGQGLEWM MGSDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARGWYYFDYWGHTLTVSS
67	Ab3 scFv	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGQAPRL LIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDES PYTFGEGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSQVQL QESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYAFTAYNIHWIRQPPGKGLEWIGSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARGWYYFDYWGHTLTVSS

[0628]

SIN	설명	서열
		YCARGWYYFDYWGHTLTVSS
68	Ab4 scFv	DVVMQTQSPSLPVTLGQPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPK LLIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDES PYTFGEGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSQVQL QLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYAFTAYNIHWIRQPPGKGLEWIGSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARGWYYFDYWGHTLTVSS

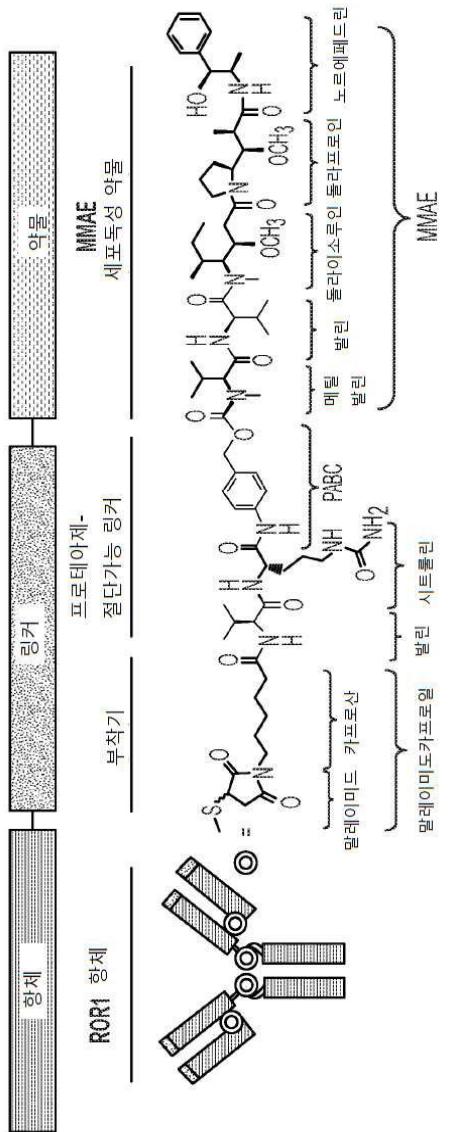
[0629]

[0630]

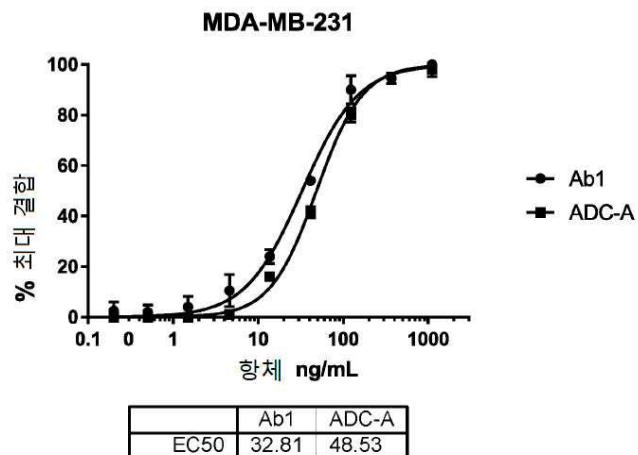
*SIN : 서열 번호

도면

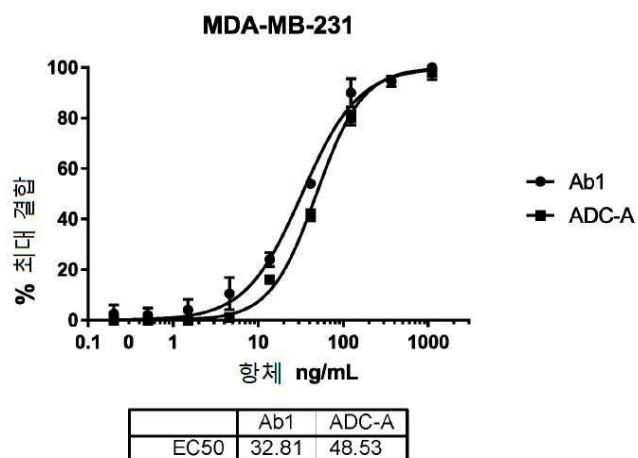
도면1



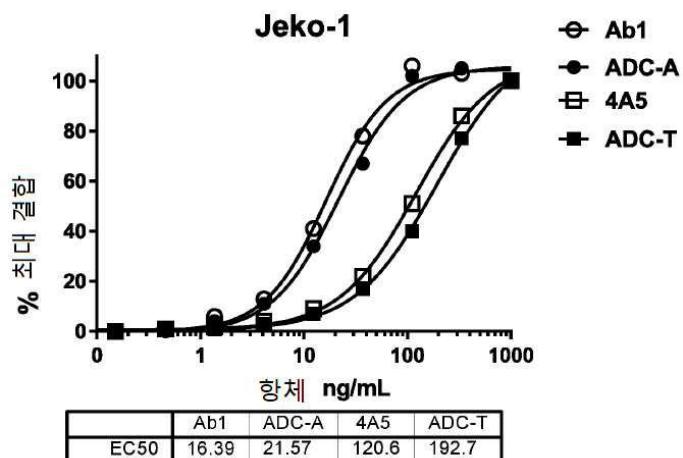
도면2a



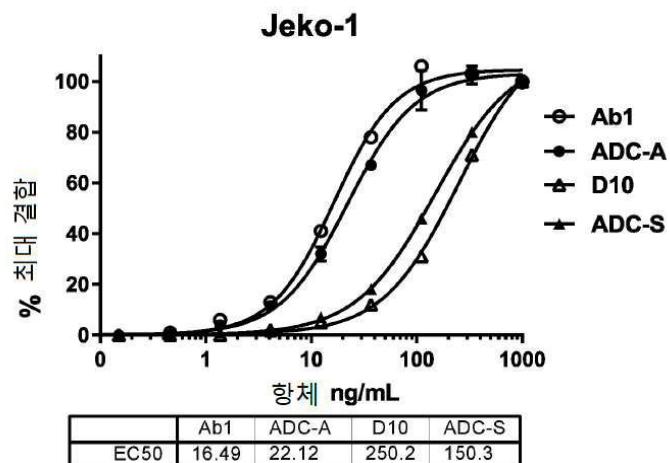
도면2b



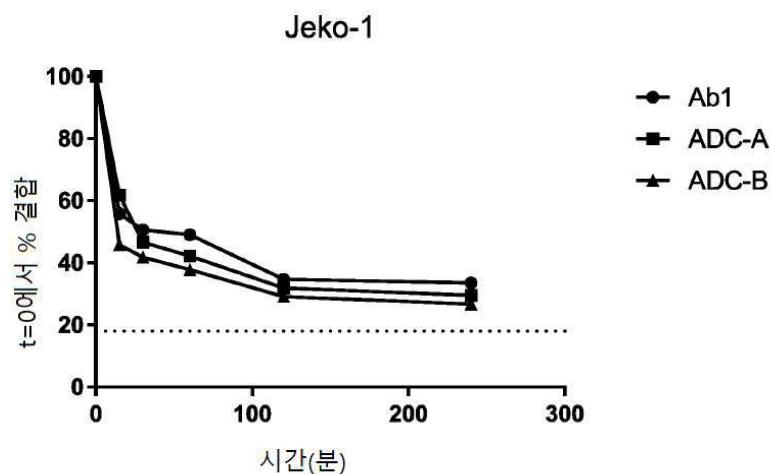
도면3a



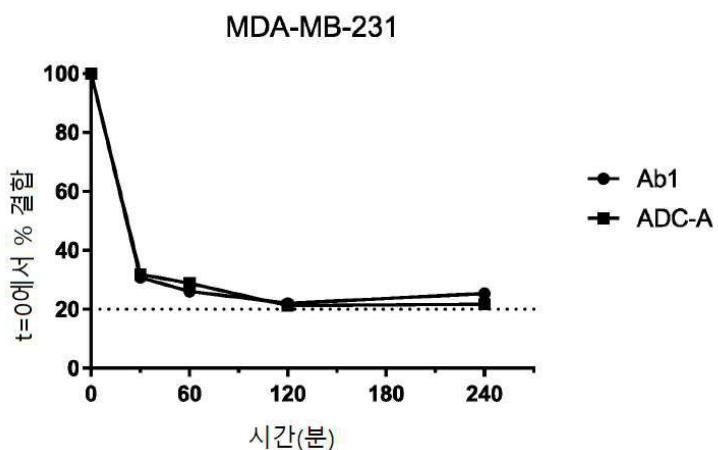
도면3b



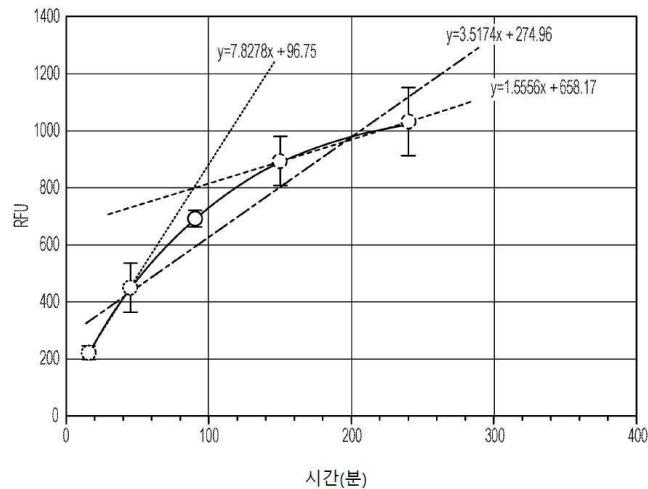
도면4a



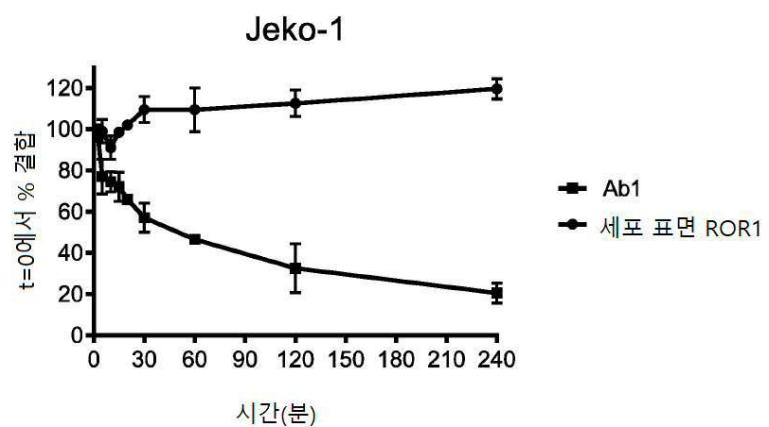
도면4b



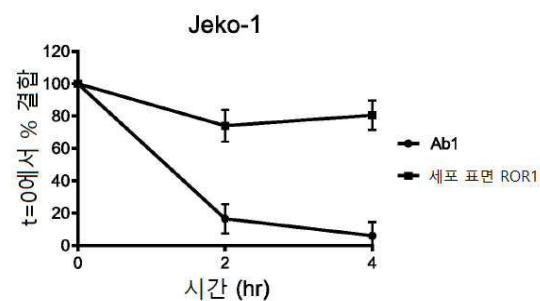
도면5



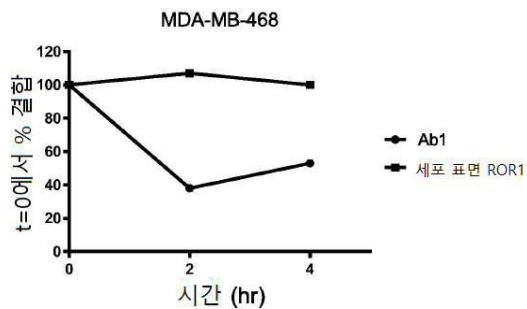
도면6



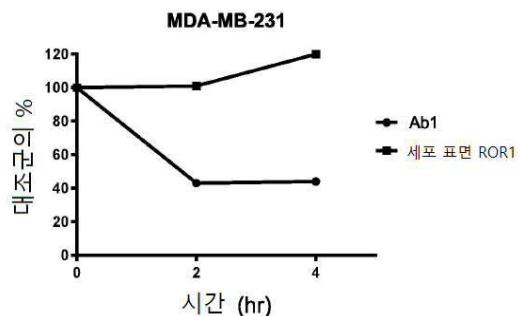
도면7a



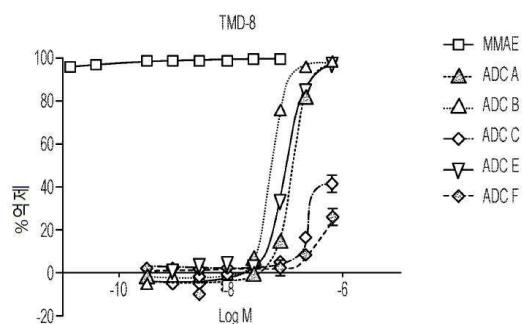
도면7b



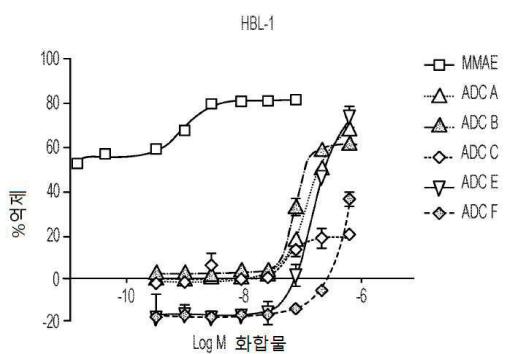
도면7c



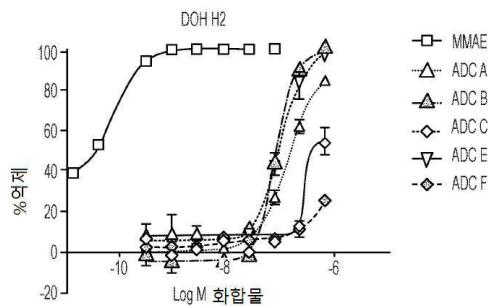
도면8a



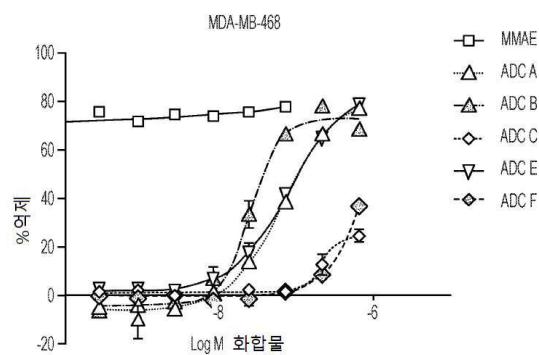
도면8b



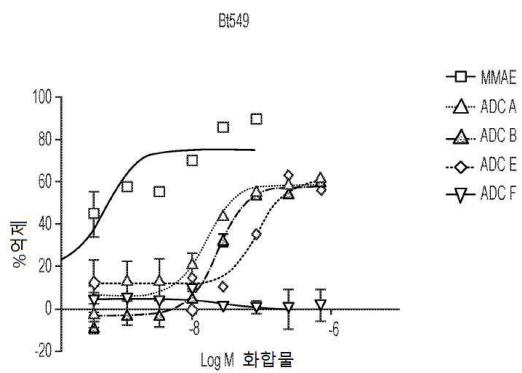
도면8c



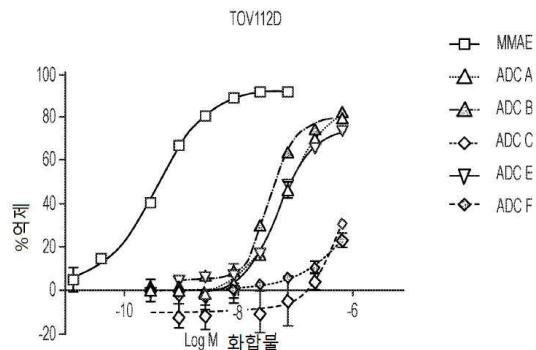
도면8d



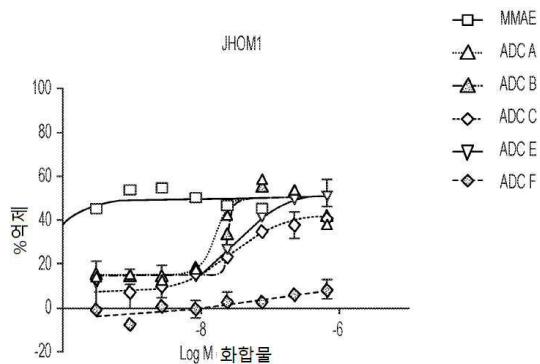
도면8e



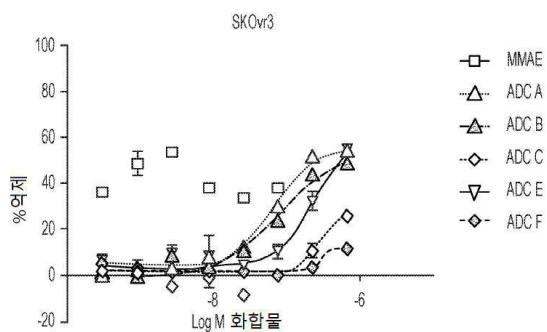
도면8f



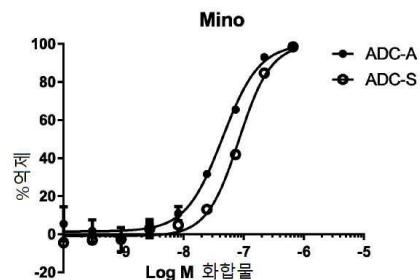
도면8g



도면8h

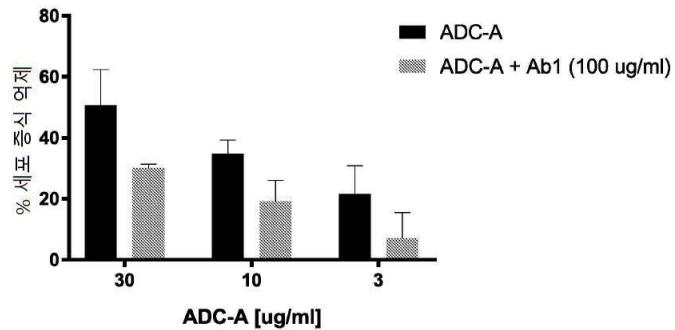


도면8i

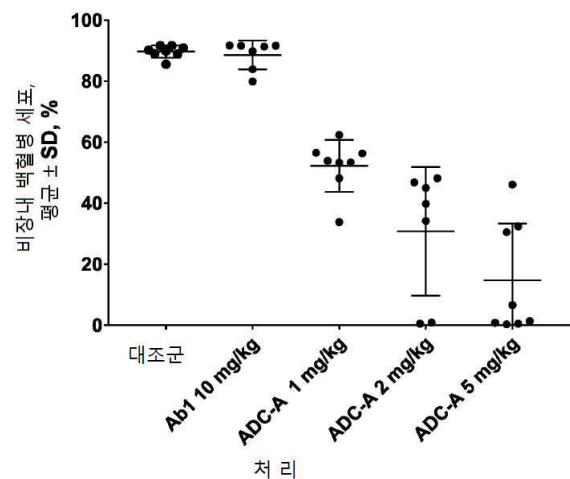


	ADC-A	ADC-S
IC50	4.462e-008	8.331e-008

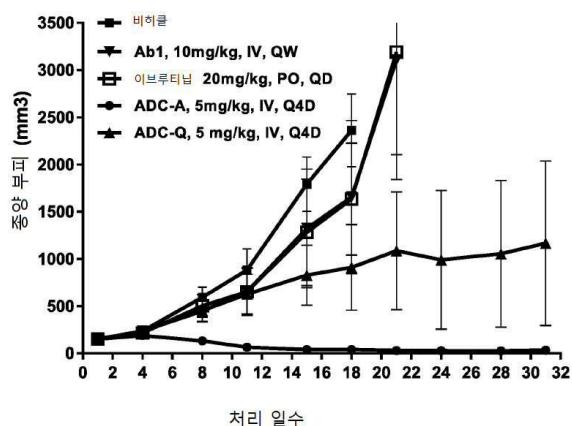
도면9



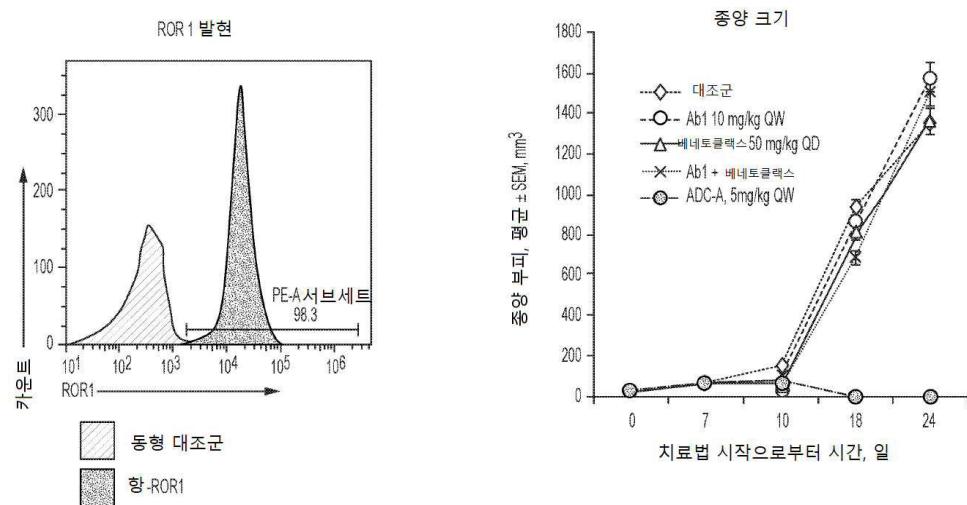
도면10



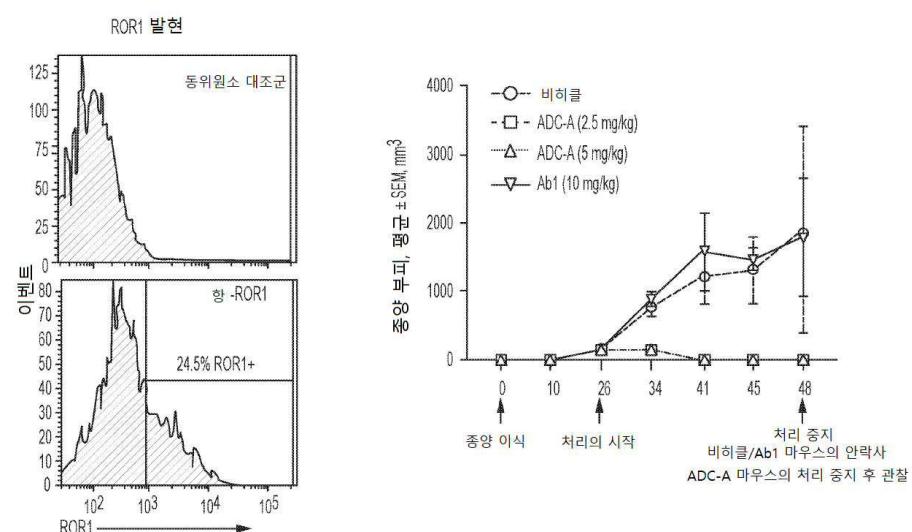
도면11



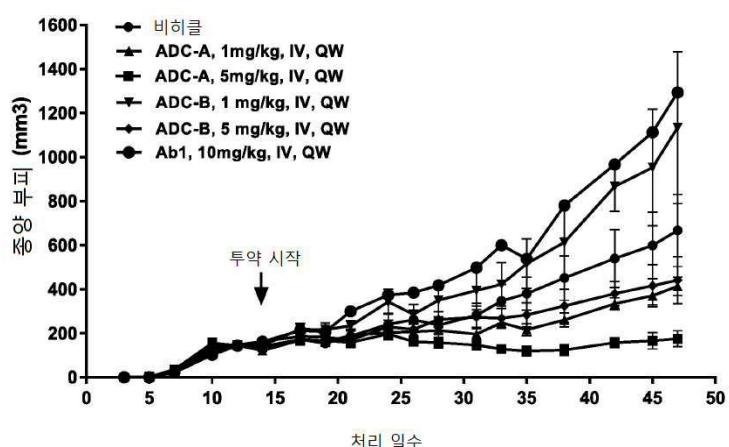
도면12



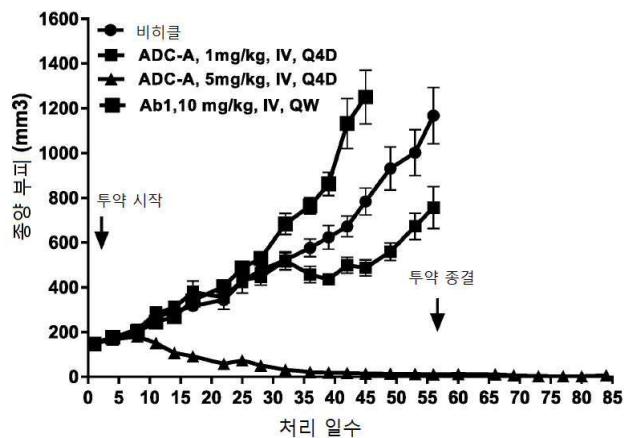
도면13



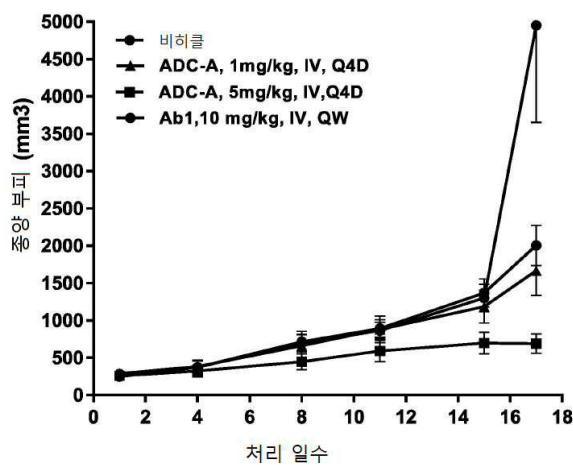
도면14



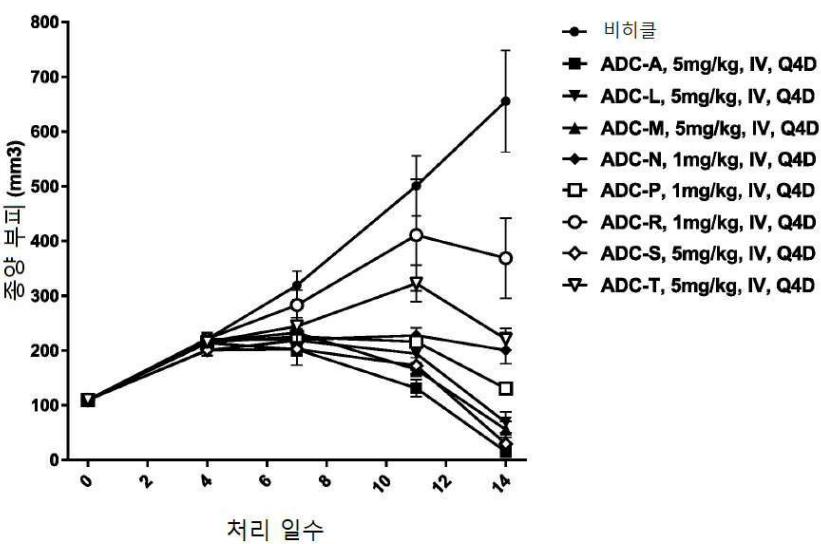
도면15



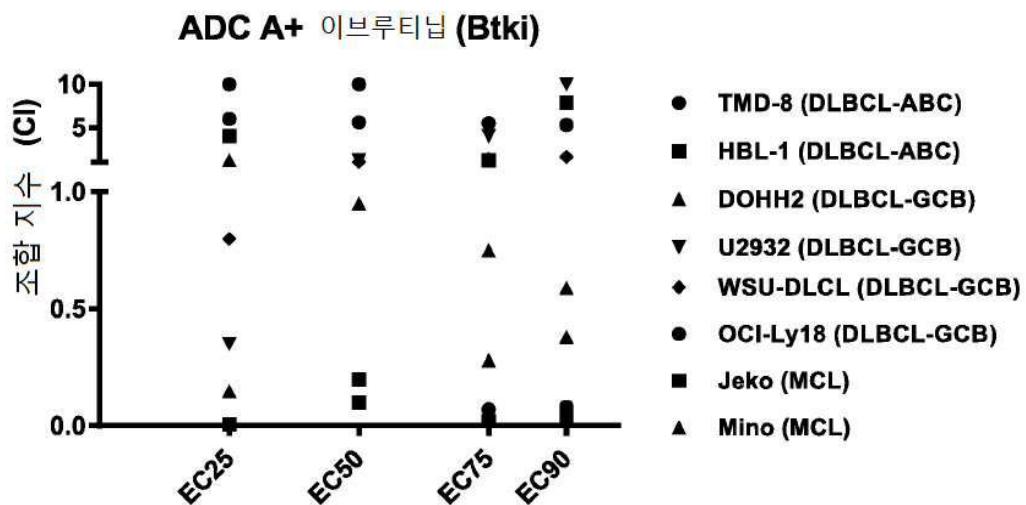
도면16



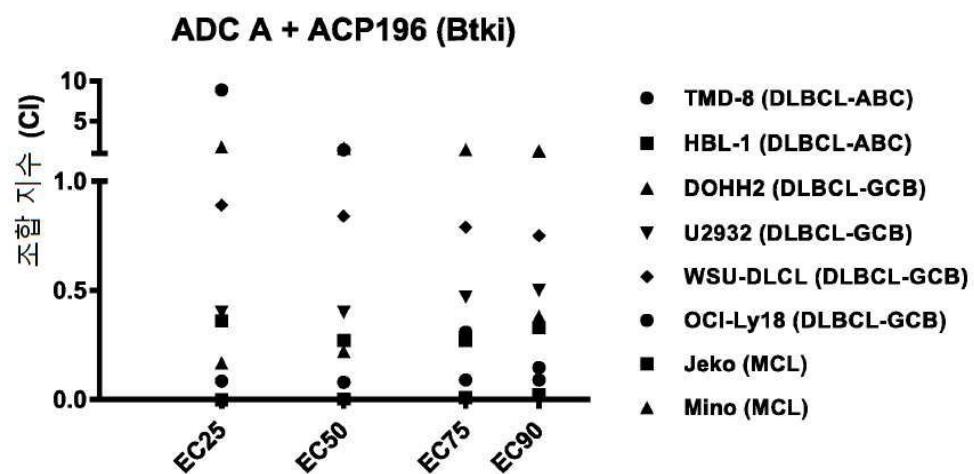
도면17



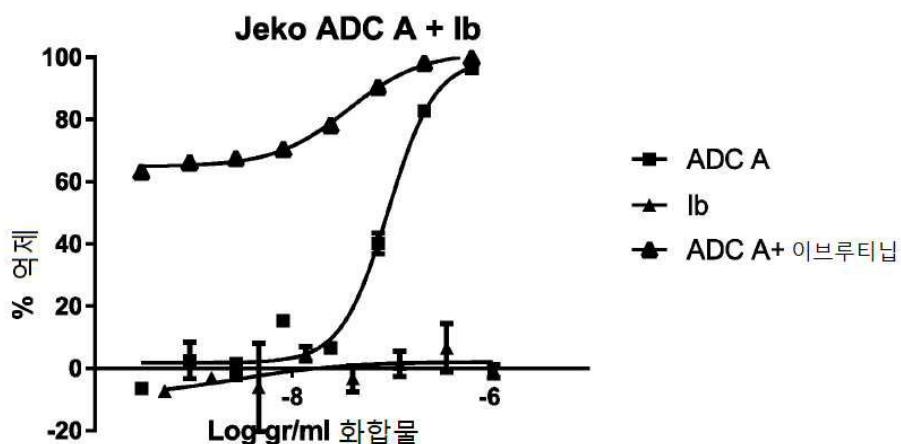
도면18a



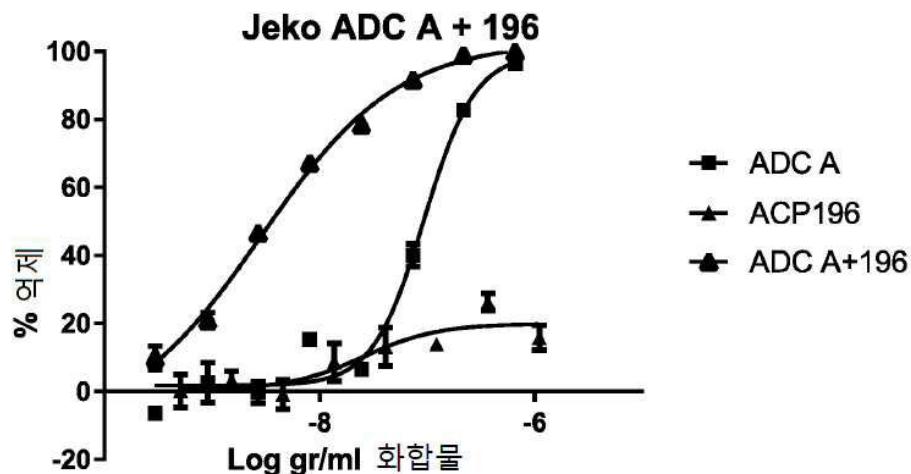
도면18b



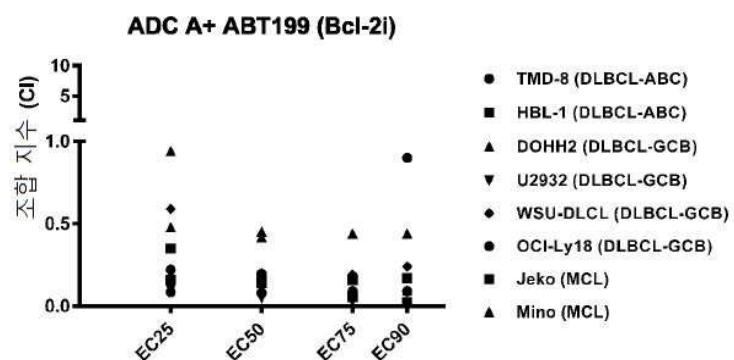
도면19a



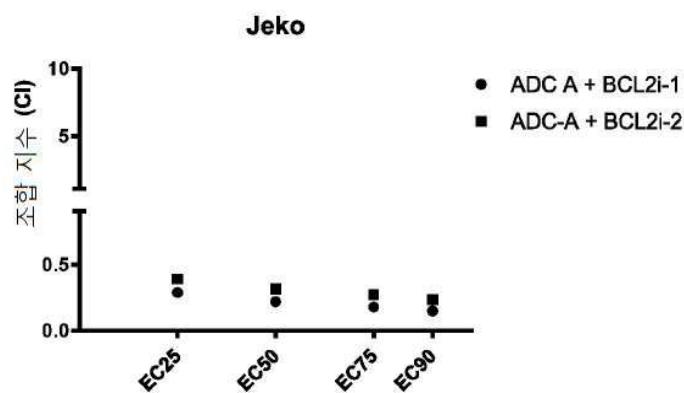
도면19b



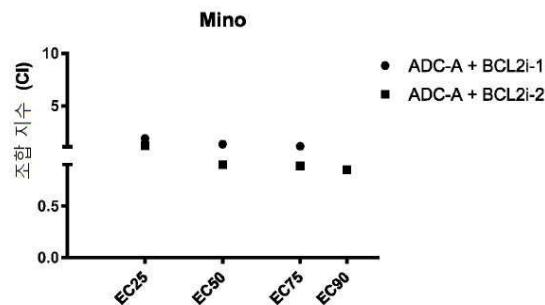
도면20a



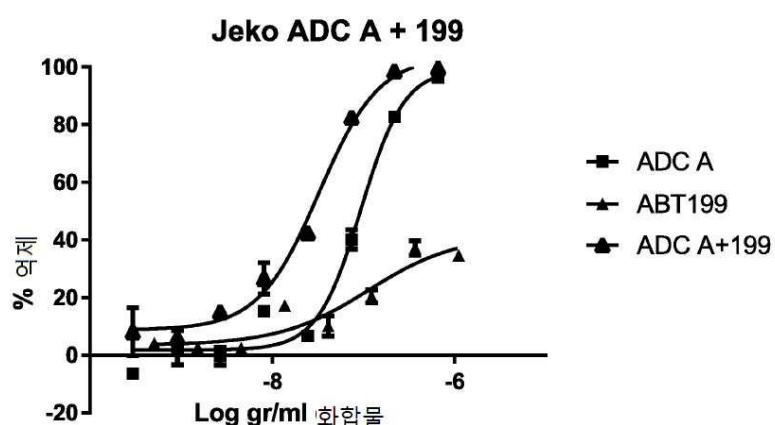
도면20b



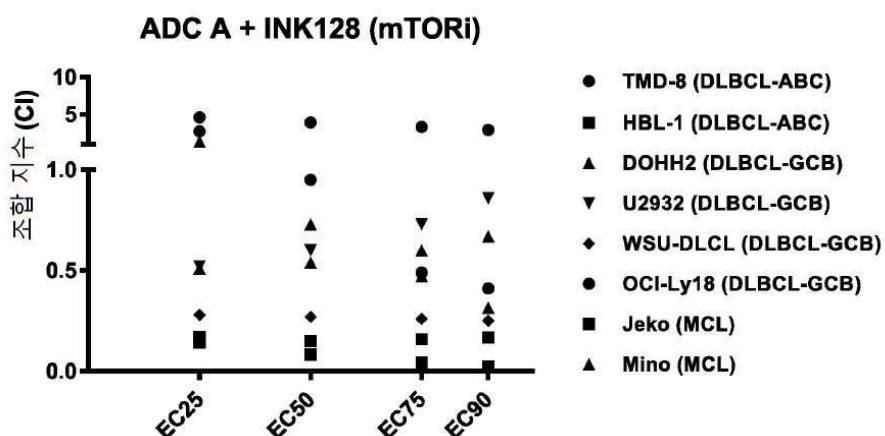
도면20c



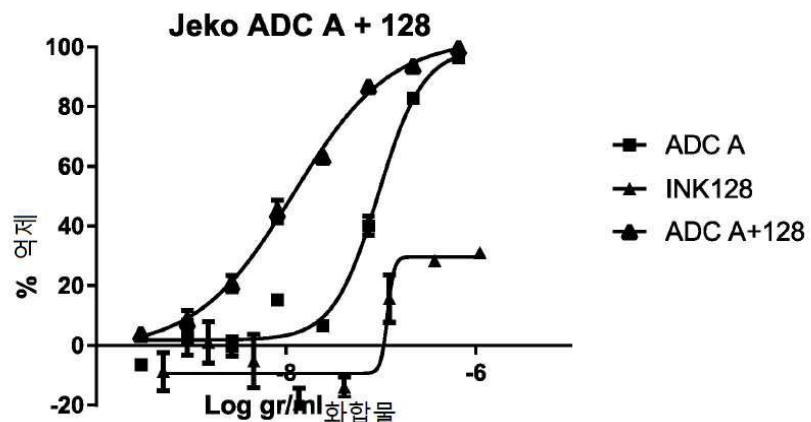
도면21



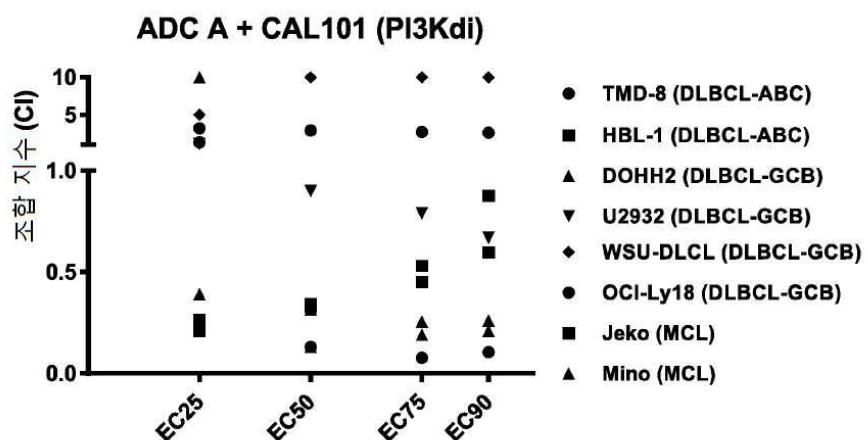
도면22



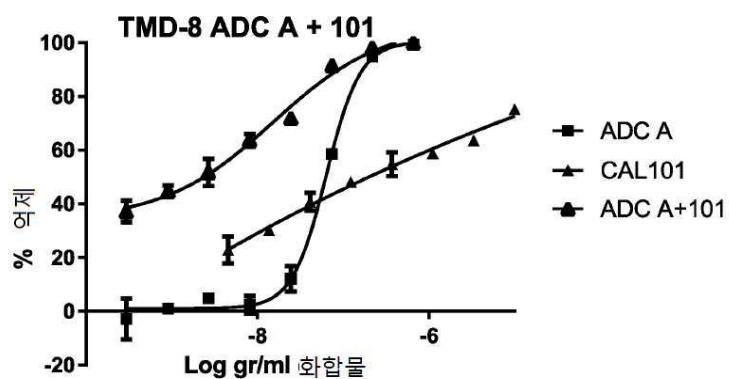
도면23



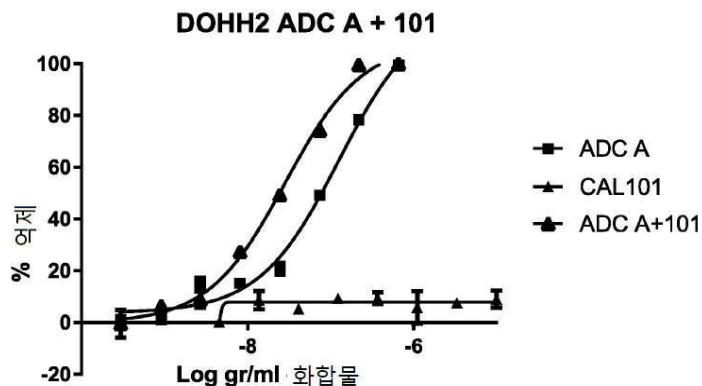
도면24



도면25a



도면25b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> VELOSBIOD INC.

<120> ROR1 ANTIBODY IMMUNOCONJUGATES

<130> 024651.W0002

<140><141><150> 62/524,388

<151> 2017-06-23

<150> 62/524,386

<151> 2017-06-23

<150> 62/524,382

<151> 2017-06-23

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Val Lys Phe Gly Pro Cys

20

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

<210> 3

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Glu 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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Val Ser Ser

115		
-----	--	--

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 6

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

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75
----	----	----

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105	
-----	-----	--

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 7

Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 8

Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 9

Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 10

Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

1 5

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 11

Ser Gly Ser

1

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12

Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

1 5

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13

Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln

1 5 10 15

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14

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

1 5 10 15

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly

1 5 10 15

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

20

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 17

Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly

1 5 10

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 18

Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys

1 5 10 15

Val Glu Ile Lys

20

<210> 19

<211> 1438

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 19

aagcttaccg ccaccatggg ctggagctgt atcatcctct tcctggtggc gaccgcgacg 60

ggtgtccact cccagggtgca gctccaggag tccggcccg ggcttgtcaa gccgtcacaa 120

accctgtccc tgacgtgcac ggtctccggc tacgccttca cggcctacaa catacatgg 180

gtccggcagg cgccgggcca ggggctggag tggatgggtt cttcgaccc gtacgtggc 240

gggagctcgt acaaccagaa gttcaaagac cgcctgacga tctccaagga cacctcgaaa 300

aaccaggctcg tcctgaccat gaccaacatg gacccgggtgg acacggcgac ctactattgc	360
gcccggcgtt ggtactactt cgactactgg ggccacggga ccctggtcac cgtgtttcc	420
gcttcgacca agggccccag cgtttcccg ctgcgcctt cctcgaagtc cacctggc	480
ggcacatggc cccatggctg cctggtaag gactacttcc cggagccgg gaccgttcg	540
tggAACAGCG gggcactcac ctccggcgtg cacacccccc cggccgtgct gcagtcccg	600
gggcgtgtatt cactcagctc ggtcgtaacc gtccctcg cgtccctcg cacgcagac	660
tacatctgca acgtcaacca caagccctcg aacaccaagg tggacaagaa ggtcgagcc	720
aagtccctcg ataagaccca cacctgcccc ccgtgcccc ccccccggact cctggccgt	780
ccgtccgtgt ttcccttccc gcccaagccc aaggacaccc tggatgtatcg ccgcacgccc	840
gaggtgacct gcgtcgtcggt ggacgtctcc cacgaggatc ccgagggtgaa gttcaactgg	900
taatgtggacg ggggtggaggt ccacaacgccc aagacaaagc cgccggaaaga gcagtacaac	960
tcgacacctacc gcgtcgtag cgtgctgacg gtcctccacc aggactggct gaacggcaag	1020
gagttacaat gcaagggtgtc caacaaggcc ctgccccgc ccatcgagaa gaccatctcc	1080
aaggccaaagg gacagccgcg cgagccgcag gtctacacgc tgctccctc ccgggacgag	1140
ctcacgaaga accaggtatc gtcacactc ctcgtgaagg gtttctaccc gagcgcacatc	1200
gccgtcgagt gggagagcaa cggccagecc gagaacaact acaaaaccac gcccgggtc	1260
ctcgactctg acgggtcctt ttccctgtac tccaaatgtca ccgtggacaa gtcgcgggtgg	1320
cagcaggggaa acgtgttctc gtgctcggtc atgcacgagg ctttgacaa ccactacacc	1380
cagaagtac tctccctgag cccggcaag tgataatcta gagtcggggc ggccggcc	1438
<210> 20	
<211> 742	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
<400> 20	
aagcttaccg ccaccatggg ctggcatgc atcatctgt tccctggtcgc caccgcac	60
gggggtccaca gtgatatcgat catgacgcag acgcccgtga gcctccgggt gacccggc	120
gagcccgcca gcatctctg ccgcgttcc aagtccatct cgaagtaccc ggcgtggat	180
cagcagaagc cggcccgaggc cccgcgcctg ctcatctact ctggttccac gtcgcgtcg	240

ggcatccgc cccggtctc gggttcggga tacggcacgg acttcacctt gaccatcaac 300
 aacatcgaga gcgaagacgc ggcgtactac ttctgccagc agcacgacga gtccccgtac 360
 accttcggcg aggggaccaa ggtcgagatc aagcgtaaccg tcgcggcacc gagcgtttc 420
 atcttcccc cgtccgacga cgacgtcaag tctggcacgg ctcggctgt ctgtctctg 480
 aacaacttct accccaggaa agccaagggtc cagtggaaagg tggacaacgc gctgcagtc 540
 ggaaatagcc aggagtgggt gacggagcag gactccaagg actccacgta ctcgcctcg 600
 tccaccctga ccctctcaa ggcggactac gaaaagcaca aggtctacgc ctgcgaggtg 660

acgcaccaag gcctgtcctc cccagtgacc aagtgcgtca accgcggcga gtgcgtataa 720
 tctagagtgc gggggccgg cc

<210> 21

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 21

aagcttacgg ccaccatggg ctggagctgt atcatcctt tcctggggc gaccgcgacg 60
 ggtgtccact cccaggtgca gctccaggag tccggcccg ggcttgtgaa gccgtcaca 120
 accctgtccc tgacgtgcac ggtctccggc tacgcgttca cggcctacaa catacatgg 180

gtccggcagg cgcggggcca ggggctggag tggatgggtt cttcgaccc gtacgtggc 240
 gggagctgt acaaccagaa gttcaaaagac cgcctgacga tctccaagga cacctgaaa 300
 aaccagggtcg tcctgaccat gaccaacatg gacccgggtgg acacggcgac ctactattgc 360
 gcccggcgt ggtactactt cgactactgg ggccacggga ccctggtcac cgtgtttcc 420

<210> 22

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 22

gatatcgta tgacgcagac gcccgtgac ctccggta cgccccgca gcccggcagc 60

atctcctgcc gcgcgtccaa gtccatctcg aagtacctgg cgtggtatca gcagaagccc 120

ggccaggccc cgccgtcgcatctactt gttccacgc tccagtcgg catcccgeccc 180

cgggtctcggttccggata cggcaccgac ttccacctga ccatcaacaa catcgagac 240

gaagacgcgg cgtactactt ctgccagcag cacgacgagt cccgtacac cttccggcag 300

gggaccaagg tcgagatcaa g 321

<210> 23

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 23

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggta tgcattact gcctacaaca tacactgggt ggcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggtct tttgatcctt acatgtgg tagtagttac 180

aaccagaagt tcaaggacag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggc 240

cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagagggtgg 300

tactactttg actactgggg ccacggAAC ctggtcacccg ttcctca 348

<210> 24

<211>

321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 24

gatatgtga tgacccagac tccactctcc ctggccgtca cccctggaga gccggccctcc 60

atctcctgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatttag cctggatcca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctct catctattct ggatccaccc ttcaatctgg gatcccaccc 180

cgattcagtg gcagcggta tggaacagat ttaccctca caattaataa catagaatct 240

gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgatgaat cccgtacac gttcggcgag 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 25

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 25

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Met Thr Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Arg Gly Ser Ser Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Ile Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 26

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

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

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Asn Val Ser Tyr Ile

20	25	30
----	----	----

His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Thr Ser Pro Arg Pro Trp Ile Tyr

35	40	45
----	----	----

Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr

85	90	95
----	----	----

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln

100	105
-----	-----

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 27

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly

1	5
---	---

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 28

Trp Ala Gly Gly Phe Thr

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 29

Arg Gly Ser Ser Tyr Ser Met Asp Tyr

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 30

Ser Asn Val Ser Tyr Ile

1 5

<210> 31

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 31

Glu Ile Ser

1

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 32

Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile

1 5

<210> 33

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 33

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggggcgcc cttcacagac tctgtccatc	60
acttgcactg tctctgggtt ttcatataacc agtttatggtg tacactgggt tcggccagect	120
ccagggaaagg gtcggagtg gctgggagta atatgggctg gtggattcac aaattataat	180
tccggctctca agtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagagcca agttcttta	240
aaaatgacca gtcgtcaaac tgcgtacaca gccatgtact actgtgccag gagaggtgt	300
tcctattcta tggactattg gggtaagga acctcagtca ccgtctccctc a	351

<210> 34

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 34

gaaatttgtc tctctcagtc tccagccatc acagctgcat ctctggccca aaaggtcacc	60
---	----

atcacctgca gtgccagttc aaatgttaat tacatccact ggtaccagca gaggtcaggc	120
acctccccca gaccatggat ttatgaaata tccaaactgg cttctggagt cccagttcg	180
ttagtggca gtgggtctgg gacctttac tctctacaa tcagcagcat ggaggctgaa	240
gatgcigcca ttatatttg tcagcagtg aattatcctc ttatcacgtt cggctcgaaa	300

acaagaatgg aaatacaa	318
---------------------	-----

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 35

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 36

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Pro Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys

100 105

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 38

Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr

1 5

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 39

Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<

400> 40

Pro Asp Ile Asn Ser Tyr

1 5

<210> 41

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 41

Arg Ala Asn

1

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 42

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 43

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 43

gaagtgaaac tggtgagtc tggggaggc ttatgtaaac ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcc a tgtcttgggt tcgcccatt	120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtcgt gtggtaacc ac taatcca	180
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg tcaggaacat cctgtacctg	240
caa atgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgaaag atatgattac	300

gacgggtact atgcaatgga ctactgggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca	357
---	-----

<210> 44

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 44

gacatcaaga tgaccaggc tccatcttcc atgtatgcattcttaggaga gagagtca	60
atcacitgca aggcgagtcggacattaaat agctatcaa gctggttcca gcagaaacca	120
gggaaatctctaagaccct gatctatcgatcaaacagat tggttatgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcggtggatc tggcaagat tattctctca ccatcaacag cctggagat	240

gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgtataat ttccgtacac gttcgagg	300
gggaccaagc tgaaatgaa ac	322

<210> 45

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 45

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

	20	25	30
--	----	----	----

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

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

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

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
---	--

	85	90	95
--	----	----	----

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr Leu		
100	105	110

Thr Val Ser Ser	
-----------------	--

115

<210> 46

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 46

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

1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Arg Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

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

100 105

<210> 47

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 47

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

1 5 10 15

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

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

 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

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

260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

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

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 48

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 49

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 49

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Glu 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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 50

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 51

<211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 51

cagggtccagc tgcaggagtc aggtcccgga ctggtaagc cgtcgacac gctgtccctc	60
acctgcaccg tgtcgggcta cgccttcacc gcctacaaca tccactggat ccgtcagccc	120

cctgggaagg gcctcgagtg gatcgccagc ttgcacctgt acgacggcgg gtcgtctac	180
aaccagaagt tcaaggaccg cctcaccatc agcaaggaca cctccaagaa ccaggtcgtc	240
ctcaccatga ccaacatgga cccctggac accgccacgt actactgcgc gcggggctgg	300
tactactcg actactgggg gcacggcacc ctgcgtcacgg tctcgtcgcc gagcaccaag	360
ggtccgagcg tcttccccct ggccccctcc agcaagtcca cctcgggggg caccggcc	420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gagccctgta ccgtgagctg gaactccggc	480
gcctcacca gccccgtcca cacctcccg gccgtctgc agtcatccgg tctctactcc	540

ttgagctcag tcgtcacgt cccgagctcc tccctcgaa cgccacata catctgcaac	600
gtcaaccaca agccgtccaa caccaaggtc gacaagaagg tggagccaa atcgtgcac	660
aagacccaca cctgcccggc gtccccggcc cccggactgc tcggccggcc ctgggtgttc	720
ctgttcccc cgaagcccaa ggacaccctc atgatctccc gcaccccgaa ggtcacctgc	780
gtgggtgtgg atgtctccca cgaggacccc gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggg	840

gtcgagggtgc acaacgccaa gaccaageccc cgagaggaac agtataactc gacgtaccgc	900
gtggtcagcg tcctgaccgt gctccaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	960

aaggtcagca acaaggccct gcccggcccc atcgagaaga cgatctccaa ggcgaagggg	1020
cagccgcgcg agccgcaggt ctacaccctg cgcggccagcc gggacgagct cacgaagaat	1080
caggtctcgc tcacactgcct cgtcaagggt ttctaccgt cgacatcgc ggtcaatgg	1140
gagtcgaacg gtcagcccga gaataactac aagacgaccc cggccgtcct ggactcggac	1200
ggcagcttct tcctgtactc gaagctgacg gtcgacaagt cgcgctggca gcagggcaac	1260
gtcttctcggt gtcgggtat gcacgaggcc ctccacaacc actacacaca gaagagcctc	1320
tcgcgttcgc cggcaag	1338

<210> 52

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 52

cagggtccagc tgcaaggagtc aggtcccgga ctggtaaagc cgatcgac gctgtccctc	60
acctgcaccc tgcgggcta cgccttcacc gcctacaaca tccactggat ccgtcageccc	120
cctggaaagg gcctcgagtg gatcgccagc ttgcaccgt acgacggcgg gtcgtctac	180
aaccagaagt tcaaggaccc cctcaccatc agcaaggaca cctccaagaa ccaggctgtc	240
ctcaccatga ccaacatgga ccccggtggac accgccacgt actactgcgc gcggggctgg	300

tactacttcg actactgggg gcacggcacc ctgtcacgg ttcgtcg	348
--	-----

<210> 53

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 53

gacgtcgtga tgacccagtc gcccctctcc ctgcccgtta ccctggccca gcccgcctcc	60
---	----

atcagctgcc gtgcctcaa gtccattcc aagtacctgg cctggtagca gcagaagccg	120
gggaaggccc caaagctcct catctactcc ggctccaccc tccagagcgg catcccccc	180
cgcttcagcg gctccggcta cggcaccgac ttcaccctca ccatcaataa catcgatcg	240

gaggacgccc cgtaactactt ctgccagcag cacgacgaat cgccgtacac cttcgaaaa	300
ggcaccaagg tggagatcaa gaggacggc gccgcgcct ccgtgtcat cttcccccc	360
tccggacgaac agctgaagtc cgggaccgccc tccgtcgct gcctcctcaa caacttctac	420
ccgcgcgagg ccaagggtca gtggaaaggc gacaacgcgc tccagtcgg caactccag	480
gagtcggtaa ccgagcagga ctcgaaggac agtacctact cgctgagctc cacactgacg	540
ctctcgaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcat gcgagggtac ccaccagggg	600
ctgagctcgc cggtgactaa gtcgttcaac aggggcgaat gc	642

<210> 54

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 54

gacgtcgta tgacccagtc gcccctctcc ctggcgtaa ccctggcca gcccgcctcc	60
atcagctgcc gtgcctcaa gtccattcc aagtacctgg cctggtagca gcagaagccg	120
gggaaggccc caaagctcct catctactcc ggctccaccc tccagagcgg catcccccc	180
cgcttcagcg gctccggcta cggcaccgac ttcaccctca ccatcaataa catcgatcg	240
gaggacgccc cgtaactactt ctgccagcag cacgacgaat cgccgtacac cttcgaaaa	300

ggcaccaagg tggagatcaa g	321
-------------------------	-----

<210> 55

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 55

Gly Gly Phe Gly

1

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 56

Ala Leu Ala Leu

1

<210> 57

<211> 4

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 57

Gly Phe Leu Gly

1

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 58

Leu Leu Gln Gly Ala

1 5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

sortase motif"

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 59

Leu Pro Xaa Thr Gly

1 5

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

sortase motif"

<400> 60

Asn Pro Gln Thr Asn

1 5

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 61

Gly Phe Glu Ile Asp Lys Val Trp Tyr Asp Leu Asp Ala

1 5 10

<210> 62

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 62

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

100

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 63

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> 64

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 64

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

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

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser

145 150 155 160

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro

165 170 175

Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Ser Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr

180 185 190

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

195 200 205

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala

225 230 235 240

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

245 250

<210> 65

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 65

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

145 150 155 160

Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro

165 170 175

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly

180 185 190

Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp

195 200 205

Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val

210 215 220

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

225 230 235 240

Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 66

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 66

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

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro

165	170	175
-----	-----	-----

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly

180	185	190
-----	-----	-----

Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp

195	200	205
-----	-----	-----

Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val

210	215	220
-----	-----	-----

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

225 230 235 240

Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 67

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 67

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

145 150 155 160

Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro

165	170	175
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly		
180	185	190

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

<210> 68

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 68

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

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

100	105	110
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr		
115	120	125
Lys Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro		
130	135	140
Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser		
145	150	155
Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro		
165	170	175
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly		
180	185	190
Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp		
195	200	205
Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val		
210	215	220
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr		
225	230	235
Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
245	250	