



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0088940  
(43) 공개일자 2009년08월20일

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7014232

(22) 출원일자 2007년12월13일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년07월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/087393

(87) 국제공개번호 WO 2009/054863

국제공개일자 2009년04월30일

(30) 우선권주장

60/869,904 2006년12월13일 미국(US)

60/991,700 2007년11월30일 미국(US)

(71) 출원인

메다텍스, 인코포레이티드

미국 08540-1437 뉴저지주 프린스턴 스테이트 로드 707

(72) 발명자

킹, 데이비드, 존

미국, 94002 캘리포니아, 벨몬트, 테라스 드라이브 1744

라오-나익, 체타나

미국, 94598 캘리포니아, 월넛 크리크, 비아 아피아 562

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

조용식

전체 청구항 수 : 총 52 항

(54) 씨디19에 결합하는 인간 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 고친화도로 CD19에 특이적으로 결합하는 분리된 단일클론 항체, 특히 인간 단일클론 항체를 제공한다. 바람직하게, 상기 항체는 인간 CD19에 결합한다. 소정 구체예에서, 상기 항체는 CD19-발현 세포로 내재화될 수 있거나 항원 의존성 세포 독성을 매개할 수 있다. 본 발명의 상기 항체를 암호화하는 핵산 분자, 발현 벡터, 숙주 세포 및 본 발명의 상기 항체를 발현하는 방법 또한 제공된다. 본 발명의 상기 항체를 포함하는 항체-파르트너 분자 접합체, 이중특이적 분자 및 약제학적 조성물 또한 제공된다. 본 발명은 또한 CD19를 검출하는 방법, 뿐만 아니라 본 발명의 항-CD19 항체를 이용하여, B 세포 악성종양, 예를 들어, 비-호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 여포 림프종, B형의 미만성 거대세포 림프종, 및 다발성 골수종과 같은 암을 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1A

항-CD19 21D4 및 21D4a VH

V 분열: 5-51  
D 분열: 3-10  
J 분열: JH4b

```

1      E V Q L V Q S G A E V K K F G E S L
   GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

   ----- CDR1 -----
55      K I S C K G S G V S F S S S W I G W
   AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT AGC AGC AGC TGG ATC GGC TGG

   ----- CDR2 -----
109     V R Q M P G K G L E W M G I I Y P D
   GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCI GAT

   ----- CDR2 -----
163     D S D T R V S P S F Q G Q V T I S A
   GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGT CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GGC

217     D K S I R T A Y L Q W S S L K A S D
   GAG AAG TCC ATC AAG ACC GGC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GGC TCG GAC

   ----- CDR3 -----
271     T A M Y Y C A R H V I M I W G V I I
   ACC GGC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAT GGT ACT ATG ATT TGG GGA GTT ATT ATT

   ----- CDR3 -----
325     D F W G Q G T L V T V S S
   GAC TTC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

(72) 발명자

**판, 친**

미국, 94024 캘리포니아, 로스 알토스, 헤리티지  
코트 1235

**카다렐리, 조세핀**

미국, 94070 캘리포니아, 산 칼로스, 레슬리에 드  
라이브 126

**블란셋, 다이앤**

미국, 08844 뉴저지, 힐스보러, 클로슨 애브뉴 839

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

분리된 인간 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합부 및 파트너 분자를 포함하는 항체-파트너 분자 접합체로서,  
상기 항체는 인간 CD19에 결합하고 다음의 성질들 중 적어도 하나를 나타내며:

- (a)  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합함;
  - (b) 라지 및/또는 다우디 B-세포 종양 세포에 결합함;
  - (c) CD19-발현 세포에 의하여 내재화됨;
  - (d) CD19 발현 세포에 대항하여 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 나타냄; 및
  - (e) 세포독소에 접합될 때 생체 내에서 CD19-발현 세포의 성장을 억제함,
- 상기 파트너 분자는 치료적 제제인 항체-파트너 분자 접합체.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 항체는 성질들 (a), (b), (c), (d), 및 (e) 중 적어도 둘을 나타내는 항체-파트너 접합체.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 항체는 성질들 (a), (b), (c), (d), 및 (e) 중 적어도 셋을 나타내는 항체-파트너 접합체.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 항체는 성질들 (a), (b), (c), (d), 및 (e) 중 적어도 넷을 나타내는 항체-파트너 접합체.

### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 성질들 (a), (b), (c), (d), 및 (e) 중 다섯 모두를 나타내는 항체-파트너 접합체.

### 청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 항체는  $5 \times 10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하는 항체-파트너 접합체.

### 청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 항체는  $5 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하는 항체-파트너 접합체.

### 청구항 8

참조 항체에 의하여 인식된 인간 CD19 상의 에피토프에 결합하는, 분리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합부 및 파트너 분자를 포함하는 항체-파트너 분자 접합체로서,

상기 참조 항체는 다음을 포함하며:

- (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

- (b) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
  - (c) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
  - (d) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
  - (e) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
  - (f) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
  - (g) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
  - (h) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,
- 상기 파트너 분자는 치료적 제제인 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 참조 항체가 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 참조 항체가 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 11

청구항 8에 있어서,

상기 참조 항체가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 12

청구항 8에 있어서,

상기 참조 항체가 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 13

청구항 8에 있어서,

상기 참조 항체가 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 14

청구항 8에 있어서,

상기 참조 항체가 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 아미노산 서열을

포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 15

청구항 8에 있어서,

상기 참조 항체가 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 16

청구항 8에 있어서,

상기 참조 항체가 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 17

인간  $V_H$  5-51 유전자, 인간  $V_H$  5-51 유전자 또는 인간  $V_H$  1-69 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합부 및 파트너 분자를 포함하는 항체-파트너 분자 집합체로서, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합하고 상기 파트너 분자는 치료적 제제인 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 18

인간  $V_K$  L18 유전자, 인간  $V_K$  A27 유전자, 또는 인간  $V_K$  L15 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합부 및 파트너 분자를 포함하는 항체-파트너 분자 집합체로서, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합하고 상기 파트너 분자는 치료적 제제인 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 19

청구항 1에 있어서, 상기 항체가,

- (a) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
  - (b) 서열번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
  - (c) 서열번호 30을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
  - (d) 서열번호 37을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
  - (e) 서열번호 44를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
  - (f) 서열번호 51을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,
- 을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 20

청구항 1에 있어서, 상기 항체가,

- (a) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- (b) 서열번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- (c) 서열번호 30을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- (d) 서열번호 37을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- (e) 서열번호 44를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- (f) 서열번호 52를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,

을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 21

청구항 1에 있어서, 상기 항체가,

- (a) 서열번호 17을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- (b) 서열번호 24를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- (c) 서열번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- (d) 서열번호 38을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- (e) 서열번호 45를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- (f) 서열번호 53을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,

을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 22

청구항 1에 있어서, 상기 항체가,

- (a) 서열번호 18을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- (b) 서열번호 25를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- (c) 서열번호 32를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- (d) 서열번호 39를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- (e) 서열번호 46을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- (f) 서열번호 54를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,

을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 23

청구항 1에 있어서, 상기 항체가,

- (a) 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- (b) 서열번호 26을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- (c) 서열번호 33을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- (d) 서열번호 40을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- (e) 서열번호 47을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- (f) 서열번호 55를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,

을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 24

청구항 1에 있어서, 상기 항체가,

- (a) 서열번호 20을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- (b) 서열번호 27을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- (c) 서열번호 34를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- (d) 서열번호 41을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- (e) 서열번호 48을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

(f) 서열번호 56을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,  
을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 25

청구항 1에 있어서, 상기 항체가,

- (a) 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- (b) 서열번호 28을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- (c) 서열번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- (d) 서열번호 42를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- (e) 서열번호 49를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- (f) 서열번호 57을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,  
을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 26

청구항 1에 있어서, 상기 항체가,

- (a) 서열번호 22를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- (b) 서열번호 29를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- (c) 서열번호 36을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- (d) 서열번호 43을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- (e) 서열번호 50을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- (f) 서열번호 58을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,  
을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 27

분리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부 및 파트너 분자를 포함하는 항체-파트너 분자 집합체로서, 다음을 포함하며:

- (a) 서열번호 1-7로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 서열번호 8-15로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,

상기 항체는 인간 CD19 단백질에 특이적으로 결합하고,

상기 파트너 분자는 치료적 제제인 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 28

청구항 27에 있어서,

상기 항체가, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

#### 청구항 29

청구항 27에 있어서,

상기 항체가, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

### 청구항 30

청구항 27에 있어서,

상기 항체가, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

### 청구항 31

청구항 27에 있어서,

상기 항체가, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

### 청구항 32

청구항 27에 있어서,

상기 항체가, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

### 청구항 33

청구항 27에 있어서,

상기 항체가, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

### 청구항 34

청구항 27에 있어서,

상기 항체가, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

### 청구항 35

청구항 27에 있어서,

상기 항체가, 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체-파트너 분자 집합체.

### 청구항 36

분리된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합부 및 파트너 분자를 포함하는 항체-파트너 분자 집합체로서, 다음을 포함하는 항체에 의하여 인식된 인간 CD19 단백질 상의 에피토프에 결합하며:

- (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- (b) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- (c) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- (d) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- (e) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- (f) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;



가변 영역;

(g) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

(h) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,

상기 파트너 분자는 치료적 제제인 항체-파트너 분자 접합체.

#### 청구항 37

청구항 1의 항체-파트너 분자 접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 38

청구항 1에 있어서,

상기 치료적 제제는 세포독소인 항체-파트너 분자 접합체.

#### 청구항 39

청구항 38의 항체-파트너 분자 접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 40

청구항 1에 있어서,

상기 치료적 제제는 방사성 동위원소인 항체-파트너 분자 접합체.

#### 청구항 41

청구항 40의 항체-파트너 분자 접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 42

CD19-발현 종양 세포의 성장을 억제하기 위하여 CD19-발현 종양 세포를 청구항 1의 항체-파트너 분자 접합체와 접촉시키는 것을 포함하는 CD19-발현 종양 세포의 성장을 억제하는 방법.

#### 청구항 43

대상체로부터 B 세포를 격감(depleting)시키기 위한 효과적인 양으로 대상체에 청구항 1의 항체-파트너 분자 접합체를 투여하는 것을 포함하는 대상체에 B세포를 격감시키는 방법.

#### 청구항 44

청구항 43에 있어서,

상기 CD19-발현 종양 세포는 B-세포 악성종양 세포인 방법.

#### 청구항 45

청구항 44에 있어서,

상기 B-세포 악성종양은 비-호지킨 림프종인 방법.

#### 청구항 46

청구항 44에 있어서,

상기 B-세포 악성종양은 맨틀 세포 림프종(mantle cell lymphoma)인 방법.

#### 청구항 47

대상체 내에서 암을 치료하기 위하여 대상체에 청구항 1의 항체-파트너 분자 접합체를 투여하는 것을 포함하는

대상체에 암을 치료하는 방법.

#### 청구항 48

청구항 47에 있어서,

상기 암은 비-호지킨 림프종인 방법.

#### 청구항 49

청구항 47에 있어서,

상기 암은 맨틀 세포 림프종인 방법.

#### 청구항 50

청구항 1에 있어서,

상기 파트너 분자는 키메릭 링커에 의하여 항체에 접합되는 항체-파트너 분자 접합체.

#### 청구항 51

청구항 50에 있어서,

상기 키메릭 링커는 펩티딜 링커, 하이드라진 링커, 및 디설파이드 링커로 구성되는 군으로부터 선택되는 항체-파트너 분자 접합체.

#### 청구항 52

청구항 1에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합부는 비푸코실화되는 항체-파트너 분자 접합체.

### 명세서

#### 기술분야

<1> 본 발명은 고친화도로 CD19에 특이적으로 결합하는 분리된 단일클론 항체, 특히 인간 단일클론 항체를 제공한다. 본 발명의 상기 항체를 암호화하는 핵산 분자, 발현 벡터, 숙주 세포 및 본 발명의 상기 항체를 발현하는 방법 또한 제공된다. 본 발명의 상기 항체를 포함하는 항체-파트너 분자 접합체, 이중특이적 분자 및 억제학적 조성물 또한 제공된다. 본 발명은 또한 CD19를 검출하는 방법, 뿐만 아니라 본 발명의 항-CD19 항체를 이용하여, B 세포 악성종양과 같은 암을 치료하는 방법을 제공한다.

#### 배경기술

- <2> <관련 출원>
- <3> 본 출원은 2006년 12월 13일 출원된 미국 임시 특허출원 일련번호 제60/869,904호 및 2007년 11월 30일 출원된 미국 임시 특허출원 일련번호 제60/991,700호의 우선권을 주장하며, 그들의 내용은 참고로 본 명세서에 병합된다.
- <4> <배경기술>
- <5> CD19는 B 세포 분화 초기에 발현되며, B 세포가 마지막에 분화하도록 유발될 때까지 계속 발현되는 95 kDa 막 수용체이다(Pezzutto 등, (1987) *J Immunol.* 138:2793; Tedder 등, (1994) *Immunol Today* 15:437). CD19 세포 외 도메인은 더 작은 잠재적인 디설파이드-연결 도메인(potentially disulfide-linked domain)에 의해서 분리된 두 개의 C2-유형 면역글로불린(IG)-유사 도메인(immunoglobulin (IG)-like domains)을 포함한다. CD19 세포 질성 도메인은 구조적으로 독특하지만, 인간, 마우스 및 기니아 피그 사이에서 고도로 보존된다(Fujimoto 등, (1998) *Semin Immunol.* 10:267). CD19는 B 림프구의 세포 표면 상에서 발견되는 단백질 복합체(protein complex)의 일부분이다. 단백질 복합체는 CD19, CD21(보체 수용체, 제 2 형), CD81(TAPA-1) 및 CD225(Leu-13)(상기 Fujimoto)를 포함한다.

<6> CD19는 B 세포에서 트랜스멤브레인 신호(transmembrane signal)의 중요한 조절자이다. CD19의 세포 표면 밀도의 증가 또는 감소는 B 세포 발생 및 기능에 영향을 주어, 자가면역 또는 저감마글로불린혈증과 같은 질환을 야기한다(상기 Fujimoto). CD19 복합체는 B 세포막 상에서 발견되는 두 개의 별개의 신호 전달 복합체의 교차-연결(cross-linking)을 통해서 생체내에서 항원에 대한 B 세포의 반응을 강화시킨다. 막 IgM 및 CD19와 결합된 두 개의 신호 전달 복합체는 상이한 메커니즘에 의하여 포스포리파제 C(phospholipase C, PLC)를 활성화시킨다. CD19 및 B 세포 수용체 교차-연결은 PLC를 활성화시키는데 필요한 IgM 분자의 수를 감소시킨다(상기 Fujimoto; 상기 Ghetie). 추가로, CD19는 Arc 패밀리의 키나제의 증폭을 위해 특수화된 어댑터 단백질(adapter protein)로서 기능한다(Hasegawa 등, (2001) *J Immunol* 167:3190).

<7> CD19 결합은, 일어나는 교차-연결의 양에 따라, B-세포 활성화 및 증식을 증진시키기도 억제하기도 하는 것으로 보였다(상기 Tedder). CD19는 B-세포 림프종의 90% 이상에서 발현되며, 시험관내 및 생체내에서 림프종의 성장에 영향을 주는 것으로 예상되었다(상기 Ghetie). CD19에 대해 생성된 항체는 무린(murine) 항체였다. 인간 대상체의 치료에서 무린 항체를 사용하는 것의 단점은 환자에게로의 투여에 대한 인간 항-마우스(human anti-mouse, HAMA) 반응이다. 따라서, CD19에 의해서 매개된 질환을 치료 및/또는 예방하는데 더 효과적인, CD19에 대하여 개선된 치료학적 항체에 대한 필요성이 존재한다.

### 발명의 상세한 설명

<8> <발명의 개요>

<9> 본 발명은 CD19에 특이적으로 결합하며 많은 바람직한 성질들을 나타내는 분리된 단일클론 항체, 특히 인간 단일클론 항체를 제공한다. 이러한 성질들은 인간 CD19에 대한 고친화도 결합, CD19를 발현하는 세포에 의한 내재화, 및/또는 항원 의존성 세포 독성을 매개하는 능력을 포함한다. 본 발명의 항체는, 예를 들어, CD19 단백질을 검출하거나 CD19를 발현하는 종양 세포와 같은, CD19를 발현하는 세포의 성장을 억제하는데 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 및 조성물을 이용하여 다양한 CD19 매개 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

<10> 한 관점에서, 본 발명은 분리된 단일클론 인간 항체 또는 이의 항원 결합부에 관한 것인데, 상기 항체는 인간 CD19에 결합하고 다음의 성질들 중 적어도 하나를 나타낸다:

<11> (a)  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합함;

<12> (b) 라지(Raji) 및 다우디(Daudi) B-세포 종양 세포에 결합함;

<13> (c) CD19-발현 세포에 의하여 내재화됨;

<14> (d) CD19 발현 세포에 대항하여 항체 의존성 세포 독성(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 나타냄; 및

<15> (e) 세포독소에 접합될 때 생체 내에서 CD19-발현 세포의 성장을 억제함.

<16> 바람직하게, 상기 항체는 성질들 (a), (b), (c), (d), 및 (e) 중 적어도 둘을 나타낸다. 더 바람직하게, 상기 항체는 성질들 (a), (b), (c), (d), 및 (e) 중 적어도 셋을 나타낸다. 더욱 바람직하게, 상기 항체는 성질들 (a), (b), (c), (d), 및 (e) 중 넷을 나타낸다. 더욱 더 바람직하게, 상기 항체는 성질들 (a), (b), (c), (d), 및 (e) 중 다섯 모두를 나타낸다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체가 세포독소에 접합될 때 상기 항체는 생체내에서 CD19-발현 종양 세포의 성장을 억제한다.

<17> 한 구체예에서, 상기 항체는  $5 \times 10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $2 \times 10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $1 \times 10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $5 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $4 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $3 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $2 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합한다.

<18> 대안적인 구체예에서, 상기 항체가 무린 항체, 키메릭 항체 또는 인간화 항체일 수 있다 하더라도, 바람직하게 상기 항체는 인간 항체이다.

<19> 다른 관점에서, 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부에 관한 것으로, 상기 항체는 참조 항체(reference antibody)에 의하여 인식된 인간 CD19 상의 에피토프에 결합하는 것에 대하여 교차-경쟁하는데,

여기에서 상기 참조 항체는 다음을 포함하고:

- <20> (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <21> 또는 상기 참조 항체가 다음을 포함하고: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <22> 또는 상기 참조 항체가 다음을 포함하고: (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <23> 또는 상기 참조 항체가 다음을 포함하고: (a) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <24> 또는 상기 참조 항체가 다음을 포함하고: (a) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <25> 또는 상기 참조 항체가 다음을 포함하고: (a) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <26> 또는 상기 참조 항체가 다음을 포함하고: (a) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <27> 또는 상기 참조 항체가 다음을 포함한다: (a) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <28> 다른 관점에서, 본 발명은 분리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부에 관한 것으로, 상기 항체는 인간  $V_H$  5-51 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다. 또한 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며, 상기 항체는 인간  $V_H$  1-69 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다. 또한 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며, 상기 항체는 인간  $V_K$  L18 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다. 또한 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며, 상기 항체는 인간  $V_K$  A27 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다. 또한 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며, 상기 항체는 인간  $V_K$  L15 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다.
- <29> 바람직한 구체예에서, 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하는데, 상기 항체는 (a) 인간  $V_H$  5-51 또는 1-69 유전자의 중쇄 가변 영역; 및 (b) 인간  $V_K$  L18, A27 또는  $V_K$  L15의 경쇄 가변 영역을 포함하며; 여기에서 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다.
- <30> 다른 관점에서, 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하는데, 상기 항체는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기에서: (a) 상기 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 35 및 36의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며; (b) 상기 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 및 58의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며; (c) 상기 항체는  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하며; 라지 및 다우디 B-세포 종양 세포에 결합한다.
- <31> 바람직하게, 상기 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 23, 24, 25, 26, 27, 28 및 29의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며; 상기 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게, 상기 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며; 상기 경

쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 42 및 43의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

<32> 바람직한 조합은 다음을 포함한다:

<33> (a) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

<34> (b) 서열번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

<35> (c) 서열번호 30을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

<36> (d) 서열번호 37을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

<37> (e) 서열번호 44를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

<38> (f) 서열번호 51을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.

<39> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:

<40> (a) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

<41> (b) 서열번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

<42> (c) 서열번호 30을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

<43> (d) 서열번호 37을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

<44> (e) 서열번호 44를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

<45> (f) 서열번호 52를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.

<46> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:

<47> (a) 서열번호 17을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

<48> (b) 서열번호 24를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

<49> (c) 서열번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

<50> (d) 서열번호 38을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

<51> (e) 서열번호 45를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

<52> (f) 서열번호 53을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.

<53> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:

<54> (a) 서열번호 18을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

<55> (b) 서열번호 25를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

<56> (c) 서열번호 32를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

<57> (d) 서열번호 39를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

<58> (e) 서열번호 46을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

<59> (f) 서열번호 54를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.

<60> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:

<61> (a) 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

<62> (b) 서열번호 26을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

<63> (c) 서열번호 33을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

<64> (d) 서열번호 40을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

<65> (e) 서열번호 47을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

- <66> (f) 서열번호 55를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <67> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- <68> (a) 서열번호 20을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <69> (b) 서열번호 27을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <70> (c) 서열번호 34를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <71> (d) 서열번호 41을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <72> (e) 서열번호 48을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <73> (f) 서열번호 56을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <74> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- <75> (a) 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <76> (b) 서열번호 28을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <77> (c) 서열번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <78> (d) 서열번호 42를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <79> (e) 서열번호 49를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <80> (f) 서열번호 57을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <81> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- <82> (a) 서열번호 22를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <83> (b) 서열번호 29를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <84> (c) 서열번호 36을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <85> (d) 서열번호 43을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <86> (e) 서열번호 50을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <87> (f) 서열번호 58을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <88> 다른 바람직한 항체 또는 이의 항원 결합부는 다음을 포함하며:
- <89> (a) 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- <90> (b) 서열번호 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 및 15로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <91> 여기에서 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다.
- <92> 바람직한 조합은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <93> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <94> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <95> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <96> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.



- <97> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <98> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <99> 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <100> 본 발명의 다른 관점에서, CD19에 결합하는 것에 대하여 앞에서 언급한 항체들 중 임의의 것과 경쟁하는 항체, 또는 이의 항원-결합부 또는 단편이 제공된다.
- <101> 본 발명의 항체는, 예컨대, 전장 항체, 예를 들어, IgG1 또는 IgG4 이소타입일 수 있다. 대안적으로, 상기 항체는 Fab, Fab' 또는 Fab' 2 단편과 같은 항체 단편, 또는 단일 사슬 항체일 수 있다.
- <102> 또한 본 발명은, 세포독소 또는 방사성 동위원소와 같은, 치료적 제제에 연결된, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 면역접합체를 제공한다.
- <103> 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명은 세포독소(예를 들어, 본 명세서에서 또는, 전체가 본 명세서에 참고로서 병합되는, 2006년 12월 28일에 출원된 미국 특허 출원 번호 제 60/882,461호 또는 2007년 11월 30일에 출원된 미국 특허 출원 번호 제 60/991,300호에서 설명된 세포독소)에 연결된(예, 티올 연결(linkage)를 통하여), 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 면역접합체를 제공한다. 예를 들어, 다양한 구체예에서, 본 발명은 다음의 바람직한 면역접합체를 제공한다:
- <104> (i) 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 면역접합체:
- <105> (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <106> (b) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <107> (c) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <108> (d) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <109> (e) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <110> (f) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <111> (g) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- <112> (h) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,
- <113> 여기에서, 상기 항체 및 이의 항원 결합부는 세포독소에 연결되며;
- <114> (ii) 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 면역접합체:
- <115> (a) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <116> (b) 서열번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <117> (c) 서열번호 30을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <118> (d) 서열번호 37을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <119> (e) 서열번호 44를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

- <120> (f) 서열번호 51을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,
- <121> 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합부:
- <122> (a) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <123> (b) 서열번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <124> (c) 서열번호 30을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <125> (d) 서열번호 37을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <126> (e) 서열번호 44를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <127> (f) 서열번호 52를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,
- <128> 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합부:
- <129> (a) 서열번호 17을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <130> (b) 서열번호 24를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <131> (c) 서열번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <132> (d) 서열번호 38을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <133> (e) 서열번호 45를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <134> (f) 서열번호 53을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,
- <135> 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합부:
- <136> (a) 서열번호 18을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <137> (b) 서열번호 25를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <138> (c) 서열번호 32를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <139> (d) 서열번호 39를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <140> (e) 서열번호 46을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <141> (f) 서열번호 54를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,
- <142> 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합부:
- <143> (a) 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <144> (b) 서열번호 26을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <145> (c) 서열번호 33을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <146> (d) 서열번호 40을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <147> (e) 서열번호 47을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <148> (f) 서열번호 55를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,
- <149> 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합부:
- <150> (a) 서열번호 20을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <151> (b) 서열번호 27을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <152> (c) 서열번호 34를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <153> (d) 서열번호 41을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <154> (e) 서열번호 48을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <155> (f) 서열번호 56을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,



- <156> 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합부:
- <157> (a) 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <158> (b) 서열번호 28을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <159> (c) 서열번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <160> (d) 서열번호 42를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <161> (e) 서열번호 49를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <162> (f) 서열번호 57을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3, 또는
- <163> 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합부:
- <164> (a) 서열번호 22를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <165> (b) 서열번호 29를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <166> (c) 서열번호 36을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <167> (d) 서열번호 43을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <168> (e) 서열번호 50을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <169> (f) 서열번호 58을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3,
- <170> 여기에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합부는 세포독소에 연결되며; 및
- <171> (iii) 다음을 포함하는 항체에 의하여 인식된 동일한 에피토프에 결합하는(예컨대, 인간 CD19에 결합하는데 있어서 교차-경쟁함), 항체 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 면역접합체:
- <172> (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <173> (b) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <174> (c) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <175> (d) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <176> (e) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <177> (f) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- <178> (g) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- <179> (h) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,
- <180> 여기에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합부는 세포독소에 연결된다.
- <181> 본 발명은 또한 상기 항체, 또는 이의 항원 결합부와는 다른 결합 특이성을 갖는 제2 기능적 부분(moiety)에 연결되는, 본 발명의, 항체 또는 이의 항원-결합부 또는 단편을 포함하는 이중특이적 분자를 제공한다.
- <182> 본 발명의 항체, 또는 이의 항원-결합부, 또는 면역접합체 또는 이중특이적 분자 및 약제학적 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이 또한 제공된다.
- <183> 본 발명의, 항체, 또는 이의 항원-결합부를 암호화하는 핵산 분자 또한 본 발명에 포함되며, 뿐만 아니라 그러

한 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 그러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포도 본 발명에 포함된다. 또한 그러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 이용하여 항-CD19 항체를 제조하는 방법이 제공되며, 이것은 (i) 상기 숙주 세포에서 상기 항체를 발현시키고 (ii) 상기 숙주 세포로부터 상기 항체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

<184> 또한 다른 관점에서, 본 발명은 항-CD19 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 다음을 포함한다:

<185> (a) (i) 서열번호 16-22로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR1 서열, 서열번호 23-29로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR2 서열, 및/또는 서열번호 30-36으로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 항체 서열; 및/또는 (ii) 서열번호 37-43으로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR1 서열, 서열번호 44-50으로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR2 서열, 및/또는 서열번호 51-58로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 항체 서열을 제공하고;

<186> (b) 상기 중쇄 가변 영역 항체 서열 및/또는 상기 경쇄 가변 영역 항체 서열내에서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변경하여 적어도 하나의 변경된 항체 서열을 만들고; 및

<187> (c) 단백질로서 상기 변경된 항체 서열을 발현시킨다.

<188> 또한 본 발명은 고친화도로 CD19에 특이적으로 결합하는 분리된 항-CD19 항체-파트너 분자 접합체, 특히 인간 단일클론 항체를 포함하는 것들을 제공한다. 그러한 항체-파트너 분자 접합체 중 어떤 것은 CD19-발현 세포로 내재화될 수 있고 항원의 의존성 세포 독성을 매개할 수 있다. 본 발명은 또한 본 명세서에 공지된 항-CD19 항체-파트너 분자 접합체를 이용하여, 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemias), 여포 림프종(follicular lymphomas), B 형의 미만성 거대세포 림프종(diffuse large cell lymphomas of B lineage), 및 다발성 골수종(multiple myelomas)을 포함하는, B 세포 악성종양을 치료하는 것과 같은, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

<189> 본 발명의 파트너 분자에 접합되는, 항체, 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 조성물을 또한 제공한다. 본 명세서에 공지된 항체 파트너 분자 접합체에서 항체에 유리하게 접합될 수 있는 파트너 분자들은 약물, 세포독소, 마커 분자(예, 방사성동위원소), 단백질 및 치료적 제제로서의 분자들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 또한 항체-파트너 분자 접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물이 본 명세서에 공지된다.

<190> 한 관점에서, 그러한 항체-파트너 분자 접합체는 화학적 링커를 통하여 접합된다. 어떤 구체예에서, 링커는 펩티딜 링커이고, 본 명세서에  $(L^4)_p$ -F- $(L^1)_m$ 로 표시된다. 다른 링커는 하이드라진 및 디설파이드 링커들을 포함하고, 본 명세서에서, 각각,  $(L^4)_p$ -H- $(L^1)_m$  또는  $(L^4)_p$ -J- $(L^1)_m$ 로 표시된다. 파트너에 부착된 링커에 부가하여, 본 발명은 또한 필수적으로 임의의 분자 종에 부착하기에 적절한 분리가능한(cleavable) 링커 가지(arm)를 제공한다.

<191> 다른 관점에서, 본 발명은 CD19-발현 종양 세포의 성장을 억제하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 CD19-발현 종양 세포의 성장을 억제하기 위하여 CD19-발현 종양 세포를 본 발명의 항체-파트너 분자 접합체와 접촉시키는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 파트너 분자는 세포독소와 같은, 치료적 제제이다. 특히 바람직한 CD19-발현 종양 세포는 B-세포 종양 세포이다.

<192> 다른 관점에서, 본 발명은 대상체 내에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 대상체 내에서 암을 치료하기 위하여 본 발명의 항체-파트너 분자 접합체를 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 파트너 분자는 세포독소와 같은, 치료적 제제이다. 치료를 위한 특히 바람직한 암은 B 세포 악성종양, 예를 들어, 비-호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 여포 림프종, B 형의 미만성 거대세포 림프종, 및 다발성 골수종이다.

<193> 본 발명의 다른 특징 및 장점은 제한적으로 해석되어서는 안 될 하기의 상세한 설명 및 실시예로부터 명확해질 것이다. 본 명세서 전체에 인용된 모든 참조 문헌, 진뱅크(Genbank) 등록 번호, 특허 및 공개 특허 출원서의 내용은 참조를 위하여 본 명세서에 명백히 포함된다.

<194> <상세한 설명>

<195> 본 발명은 고친화도로 인간 CD19에 특이적으로 결합하며 바람직한 기능적 성질을 갖는 분리된 단일클론 항체, 특히 인간 단일클론 항체에 관한 것이다. 소정 구체예에서, 본 발명의 항체는 특정 중쇄 및 경쇄 생식계열(germline) 서열로부터 유래되며 및/또는 특정의 아미노산 서열을 포함하는 CDR 영역과 같은 특정의 구조적 특

징을 포함한다. 본 발명은 분리된 항체, 상기 항체를 제조하는 방법, 상기 항체를 포함하는 항체-파트너 분자 접합체 및 이중특이적 분자, 그리고 본 발명의 항체, 항체-파트너 분자 접합체 또는 이중특이적 분자를 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은, 예를 들어, CD19를 검출하기 위하여, 뿐만 아니라 CD19를 발현하는 B 세포 악성종양과 같이 CD19의 발현과 관련된 질환을 치료하기 위하여, 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한, 비-호지킨 림프종, 만성 림프성 백혈병, 여포 림프종, B 형(lineage)의 미만성 거대세포 림프종 및 다발성 골수종의 치료시에, B 세포 악성종양을 치료하기 위하여 본 발명의 항-CD19 항체 및 항체-파트너 분자 접합체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

<196> 본 발명을 좀 더 쉽게 이해시키기 위하여, 우선 소정의 용어를 정의한다. 추가 정의는 상세한 설명 전체에 걸쳐 설명한다.

<197> 본 명세서에 사용되는, 용어 “CD19”는, 예를 들어, 인간 CD19의 변이체(variants), 이소형태(isoforms), 동족체(homologs), 오솔로그(orthologs) 및 파라로그(paralogs)를 지칭한다. 따라서, 본 발명의 인간 항체는, 소정의 경우에, 인간 이외의 종으로부터의 CD19와 교차-반응할 수 있다. 소정 구체예에서, 항체는 하나 이상의 인간 CD19 단백질에 완전히 특이적일 수 있고 비-인간 교차-반응성의 종 또는 다른 유형을 나타내지 않을 수 있거나, 또는 다른 모든 종은 아니지만 소정의 다른 종들로부터의 CD19와 교차-반응할 수 있다(예, 영장류 CD19와 교차-반응하나 마우스 CD19와는 그렇지 않음). 용어 “인간 CD19”는 진뱅크(Genbank) 등록 번호 NM\_001770(서열번호 79)를 갖는 인간 CD19의 완전한 아미노산 서열과 같은, 인간 서열 CD19를 지칭한다. 용어 “마우스 CD19”는 진뱅크 등록 번호 AAA37390을 갖는 마우스 CD19의 완전한 아미노산 서열과 같이, 마우스 서열 CD19를 지칭한다. 인간 CD19 서열은, 예를 들어, 보존형 돌연변이 또는 비-보존적 영역에서의 돌연변이를 가짐으로써 진뱅크 등록 번호 NM\_001770의 인간 CD19와는 다를 수 있으며, CD19는 진뱅크 등록 번호 NM\_001770의 인간 CD19와 실질적으로 동일한 생물학적 기능을 가진다.

<198> 특정 인간 CD19 서열은 진뱅크 등록 번호 NM\_001770의 인간 CD19와는 아미노산 서열에 있어서 일반적으로 적어도 90% 동일하며 다른 종(예, 뮌)의 CD19 아미노산 서열과 비교할 때 인간으로서의 아미노산 서열을 정의하는 아미노산 잔기를 포함한다. 소정 경우, 인간 CD19는 진뱅크 등록 번호 NM\_001770의 CD19와는 아미노산 서열에 있어서 적어도 95%, 또는 심지어 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 소정 구체예에서, 인간 CD19 서열은 진뱅크 등록 번호 NM\_001770의 CD19 서열과는 단지 10개의 아미노산 차이를 보여줄 것이다. 소정 구체예에서, 인간 CD19는 진뱅크 등록 번호 NM\_001770의 CD19 서열과는 단지 5개, 또는 심지어는 단지 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 차이를 보여줄 수 있다. 백분율 동일성은 본 명세서에 기술된 바와 같이 정의될 수 있다.

<199> 용어 “면역 반응”은, 예를 들어, 림프구, 항원 제시 세포, 식세포, 과립구, 및 상기 세포들 또는 간(항체, 사이토카인(cytokines) 및 보체를 포함)에 의하여 생산되는 가용성 거대분자의 거동을 말하는데, 침입 병원체, 병원체에 감염된 세포 또는 조직, 암세포, 또는 자가면역 또는 병리적 염증의 경우에서 있어서 정상 인간 세포 또는 조직에 선택적으로 손상을 주거나 그것을 파괴하거나 또는 그것을 인간 신체로부터 제거하는 결과를 가져온다.

<200> “신호 전달 경로”는 세포의 한 부분에서 세포의 또 다른 부분으로의 신호 전달에 있어서 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들 사이의 생화학적 관계를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같은, 어구 “세포 표면 수용체”는, 예를 들어, 신호를 받고 그 신호를 세포의 원형질 막을 가로질러 전달할 수 있는 분자 및 분자의 복합체를 포함한다. 본 발명의 “세포 표면 수용체”의 예는 CD19 수용체이다.

<201> 본 명세서에서 지칭되는 용어 “항체”는, 온전한 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편(즉, “항원-결합부”) 또는 단일 사슬을 포함한다. “항체”는 디설파이드 결합에 의해 상호 연결된 적어도 두개의 중쇄(H) 및 적어도 두개의 경쇄(L), 또는 이의 항원 결합부를 포함하는 당단백질을 지칭한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역( $V_H$ 로 약자화) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 세가지 도메인,  $C_H1$ ,  $C_H2$  및  $C_H3$ 으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역( $V_L$ 로 약자화) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인  $C_L$ 로 구성된다.  $V_H$  및  $V_L$  영역들은, 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리워지는, 조가변 영역들로 더 나눌 수 있는데, 이들은 골격 영역(framework region, FR)으로 불리우는 더 보존적인 영역과 섞여있다. 각  $V_H$  및  $V_L$ 은 세 개 CDR과 네 개 FR로 구성되고, 이들은 아미노 말단에서부터 카르복시 말단방향으로 다음 순서로 정렬되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 상기 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 상기 항체들의 불변 영역은, 면역계(예, 작동자(effector) 세포)의 다양한 세포 및 전통적인 보체계(classical

complement system)의 제 1 요소(C1q)를 포함한, 숙주 조직 또는 인자에 면역글로불린을 결합시키는 것을 매개할 수 있다.

<202> 본 명세서에서 사용되는, 용어 항체의 “항체 단편” 및 “항원-결합부” (간단히 “항원부”)는, 항원(예컨대, CD19)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편들을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의하여 수행될 수 있음을 보여 주었다. 용어 항체의 “항원-결합부” 내에 포함되는 결합 단편들의 예는, (i) Fab 단편, 즉  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  및  $C_H1$  도메인으로 구성되는 1가 단편; (ii)  $F(ab')_2$  단편, 즉, 힌지 영역에서 디설파이드 다리(disulfide bridge)에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) Fab' 단편, 즉, 본질적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab(FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, Paul ed., 제3판. 1993을 참조); (iv)  $V_H$  및  $C_H1$  도메인으로 구성되는 Fd 단편; (v) 항체의 단일 가지(arm)의  $V_L$ 와  $V_H$  도메인으로 구성되는 Fv 단편; (vi)  $V_H$  도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward 등 (1989) *Nature* 341:544-546); (vii) 분리된 상보성 결정 영역(CDR); 및 (viii) 나노바디, 즉 단일 가변 도메인 및 두 개의 불변 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 두 개 도메인,  $V_L$  및  $V_H$ 가 별개의 유전자에 의해 암호화 되어 있지만, 그것들은 재조합 방법들을 사용하여, 합성 링커에 의해 결합되어 단일 단백질 사슬로서 만들어 질 수 있고, 여기에서  $V_L$  및  $V_H$  영역들은 짝을 이뤄 단일가 분자(단일 사슬 Fv(scFv)로서 공지됨; 예, Bird 등 (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston 등 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 참조)를 형성하게 된다. 그러한 단일 사슬 항체들은 또한 용어 항체의 “항원-결합부”의 범위내에 내포되는 것으로 의도된다. 이러한 항체 단편들은 당해 분야의 숙련자들에게 공지된 기술을 사용하여 얻어질 수 있고, 상기 단편들을 본래의 항체들과 동일한 방식으로 스크리닝하여 이용할 수 있다.

<203> “분리된 항체”는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 상이한 항원 특이성들을 갖는 다른 항체들이 실질적으로 없는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다(예, CD19와 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 CD19 이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체들이 실질적으로 없다). 그러나, CD19에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 중으로부터 유래한 CD19 분자와 같은, 다른 항원에 교차 반응성(cross-reactivity)을 가진다. 더욱이, 분리된 항체는 다른 세포성 물질 및/또는 화합물이 실질적으로 없을 수 있다.

<204> 본 명세서에서 사용되는, 용어 “단일클론 항체” 또는 “단일클론 항체 조성물”은, 단일 분자 조성물의 항체 분자들의 제조물을 지칭한다. 단일클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대하여 단일 결합 특이성 및 친화도를 보인다.

<205> 용어 “인간 항체”는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 골격 영역 및 CDR 영역 둘 다가 인간 생식계열 면역글로불린 서열들로부터 유래하는 가변 영역을 갖는 항체들을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 상기 항체가 불변 영역을 포함한다면, 그 불변 영역 또한 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래한다. 본 발명의 인간 항체들은 인간 생식계열 면역글로불린 서열들에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기들(예, 시험관 내 랜덤 또는 특정 부위 돌연변이유발(site-specific mutagenesis)에 의해 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이들)을 포함할 수 있다. 그러나, 본 명세서에서 사용되는, 용어 “인간 항체”는, 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열들이 인간 골격 서열들에 이식된 항체들을 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

<206> 용어 “인간 단일클론 항체”는, 골격 영역 및 CDR 영역 둘 모두 인간 생식계열 면역글로불린 서열들로부터 유래된, 가변 영역을 가지는 단일 결합 특이성을 보이는 항체들을 지칭한다. 한 구체예에서, 상기 인간 단일클론 항체들은, 무한증식 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스유전자 및 경쇄 트랜스유전자를 포함하는 계놈을 가지는, 트랜스유전자성(transgenic) 비인간 동물, 예를 들어, 트랜스유전자성 마우스로부터 얻어진 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

<207> 본 명세서에서 사용되는, 용어 “재조합 인간 항체”는, 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 만들어지거나 또는 분리된 모든 인간 항체들, 예를 들어, (a) 인간 면역글로불린 유전자들에 대하여 트랜스유전자성(transgenic)이거나 트랜스염색체성(transchromosomal)인 동물(예, 마우스)로부터 또는 이로부터 제조된 하이브리도마(하기에 더 설명됨)로부터 분리된 항체들, (b) 형질전환되어 인간 항체를 발현하는 숙주세포로부터, 예를 들어 트랜스펙토마로부터 분리된 항체들, (c) 재조합, 조합성 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체들, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열들을 다른 DNA 서열들로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 만들어지거나 또는 분리된 항체들을 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체들은, 골격 영역 및 CDR 영역이 인간 생식계열 면역글로불린 서열들로부터 유래되는 가변 영역을 가진다. 그러나 소정



구체예에서, 그러한 재조합 인간 항체들은 시험관 내 돌연변이유발(mutagenesis)(또는 인간 Ig 서열들에 대해 트랜스유전자성인 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)로 처리될 수 있고, 따라서 재조합 항체들의  $V_H$  및  $V_L$  영역의 아미노산 서열들은, 인간 생식계열  $V_H$  및  $V_L$  서열들로부터 유래되고 이에 관련된 것인 반면에, 생체 내에서 인간 항체 생식계열 원천에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열들이다.

- <208> 본 명세서에서 사용되는, “이소타입”은 중쇄 불변 영역 유전자들에 의해 암호화되는 항체 부류(예, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다.
- <209> 본 명세서에서, 어구 “항원을 인식하는 항체” 및 “항원에 특이적인 항체”는 용어 “항원에 특이적으로 결합하는 항체”와 함께 상호교환적으로 이용된다.
- <210> 용어 “인간 항체 유도체”는 인간 항체의 임의의 변형된 형태, 예를 들어, 항체 및 다른 제제나 또는 항체의 접합체를 지칭한다.
- <211> 용어 “인간화 항체”는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열들이 인간 골격 서열들에 접합된 항체를 지칭하는 것으로 의도된다. 추가의 골격 영역 변형이 인간 골격 서열 내에서 이루어질 수 있다.
- <212> 용어 “키메라 항체”는 가변 영역 서열들이 하나의 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 다른 종으로부터 유래된 항체들, 예를 들어, 가변 영역 서열들이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 인간 항체로부터 유래된 항체를 지칭하는 것으로 의도된다.
- <213> 용어 “항체 의태체”는 항원을 결합하는 항체의 능력을 의태할 수 있는 분자들을 지칭하는 것으로 의도되나, 천연 항체 구조에 한정되지 않는다. 그러한 항체 의태체의 예들은 어피바디(Affibodies), 디에이알핀(DARPins), 안티칼린(Anticalins), 아비머(Avimers), 및 베르사바디(Versabodies)를 포함하나 이에 제한되지 않는데, 이들 모두는, 일반적인 항체 결합을 의태하나, 구별된 메커니즘으로부터 생성되고 그것을 통해 기능하는 결합 구조를 사용한다.
- <214> 본 명세서에서 사용되는, 용어 “파트너 분자”는 항체-파트너 분자 접합체에서 항체에 접합하는 개체를 지칭한다. 파트너 분자의 예들은 약물, 세포독소, 마커 분자(펩티드 및 형광색소 마커와 같은 소분자 마커, 뿐만 아니라 방사성동위원소와 같은 단일 원자 마커를 포함하나 이에 한정되지 않음), 단백질 및 치료적 제제를 포함한다.
- <215> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, “인간 CD19에 특이적으로 결합하는” 항체는  $1 \times 10^{-7}$  M 이하, 더 바람직하게  $5 \times 10^{-8}$  M 이하, 더 바람직하게  $3 \times 10^{-8}$  M 이하, 더 바람직하게  $1 \times 10^{-8}$  M 이하, 더욱 더 바람직하게  $5 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다.
- <216> 본 명세서에서 사용되는, 단백질 또는 세포에 “실질적으로 결합하지 않는”이라는 용어는, 단백질 또는 세포에 결합하지 않거나 또는 높은 친화도로 결합하지 않는 것, 즉, 단백질 또는 세포에  $1 \times 10^{-6}$  M 이상, 더 바람직하게는  $1 \times 10^{-5}$  M 이상, 더욱 바람직하게는  $1 \times 10^{-4}$  M 이상, 더욱더 바람직하게는  $1 \times 10^{-3}$  M 이상, 더욱더 바람직하게는  $1 \times 10^{-2}$  M 이상의  $K_D$ 로 결합하는 것을 의미한다.
- <217> 본 명세서에서 사용되는, 용어 “ $K_{assoc}$ ” 또는 “ $K_a$ ”는, 특정 항체-항원 상호작용의 결합 속도(association rate)를 지칭하는 것이고, 본 명세서에서 사용되는, 용어 “ $K_{dis}$ ” 또는 “ $K_d$ ”는, 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도를 지칭하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 “ $K_D$ ”는,  $K_d$  대  $K_a$ 의 비율(즉,  $K_d/K_a$ )로부터 얻어지고, 몰 농도(M)로 표시되는 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. 항체들에 대한  $K_D$  값은 당해 분야에 설정된 방법들을 사용하여 결정될 수 있다. 항체의  $K_D$ 를 결정하는 바람직한 방법은 표면 플라즈몬(plasmon) 공명, 바람직하게, 비아코어(Biacore<sup>®</sup>) 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하여 수행될 수 있다.
- <218> 본 명세서에서 사용되는, IgG 항체에 대한 “고친화도”라는 용어는 표적 항원에 대하여  $1 \times 10^{-7}$  M 이하, 더 바람직하게는  $5 \times 10^{-8}$  M 이하, 그리고 더욱 더 바람직하게는  $1 \times 10^{-9}$  M 이하, 그리고 더욱 더 바람직하게는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하의  $K_D$ 를 갖는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다.

<sup>9</sup> M 이하의  $K_D$ 를 가지는 항체를 지칭한다. 그러나, “고친화도” 결합은 다른 항체 이소타입(isotypes)에 대하여 다양해질 수 있다. 예를 들어, IgM 이소타입에 대한 “고친화도” 결합은  $10^{-6}$  M 이하, 더 바람직하게는  $10^{-7}$  M 이하, 더욱 더 바람직하게는  $10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 를 가지는 항체를 지칭한다.

<219> 본 명세서에서 사용되는, 용어 “대상체”는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 “비인간 동물”은 모든 척추동물, 예를 들어, 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등과 같은, 포유 동물 및 비포유동물을 포함한다.

<220> 기호 “-”는, 결합함으로써 사용되거나 결합에 수직으로 표시되거나, 표시된 부분이 분자, 고체 지지체 등의 잔여 부분에 부착되는 지점을 나타낸다.

<221> 용어 “알킬”은, 단독으로 또는 다른 치환기의 부분으로서, 다른 언급이 없으면, 직쇄 또는 분지쇄, 또는 사이클릭 탄화수소 라디칼, 또는 이의 조합을 의미하고, 이들은 충분히 포화되거나, 단일불포화되거나 또는 다중불포화되며, 지정된 탄소 수(즉,  $C_1$ - $C_{10}$ 은 한 개부터 열 개의 탄소를 의미함)를 갖는, 이가 및 다가 라디칼을 포함할 수 있다. 포화 탄화수소 라디칼의 예들은, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 사이클로헥실, (사이클로헥실)메틸, 사이클로프로필메틸, 예를 들어, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등의 동족체(homologs) 및 이성질체(isomers)와 같은 것들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 불포화 알킬기는 하나 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 가지는 것이다. 불포화 알킬기의 예들은, 비닐, 2-프로페닐, 크로틸, 2-이소펜테닐, 2-(부타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에티닐, 1- 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 및 고도 동족체 및 이성질체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 또한 용어 “알킬”은, 다르게 기술되지 않으면, “헤테로알킬”과 같은, 하기에 더 자세히 정의되는 알킬의 유도체들을 포함하는 것을 의미한다. 탄화수소기에 한정되는, 알킬기는 “호모알킬(homoalkyl)”로 불리운다.

<222> 용어 “알킬렌”은, 단독으로 또는 다른 치환기의 부분으로서,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 에 의하여 예시되나 이에 한정되지 않는, 알칸으로부터 유도되는 이가 라디칼을 의미하고, “헤테로알킬렌”으로서 하기에 설명된 것들을 포함한다. 일반적으로, 알킬(또는 알킬렌)기는 1개부터 24개의 탄소 원자를 가질 것이며, 10개 이하의 탄소 원자를 갖는 것들이 본 발명에서 바람직하다. “저급 알킬” 또는 “저급 알킬렌”은, 일반적으로 8개 이하의 탄소 원자를 갖는, 더 짧은 사슬 알킬 또는 알킬렌 기이다.

<223> 용어 “헤테로알킬”은, 단독으로 또는 다른 용어와 조합하여, 다른 언급이 없으면, 안정한 직쇄 또는 분지쇄, 또는 사이클릭 탄화수소 라디칼, 또는 이들의 조합을 의미하는데, 정해진 수의 탄소 원자와 O, N, Si, 및 S으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자로 이루어지며, 여기에서 질소, 탄소 및 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있고 질소 헤테로원자는 선택적으로 4급화될(quaternized) 수 있다. 헤테로원자(들) O, N, S, 및 Si는 헤테로알킬기의 임의의 내부 위치에 또는 알킬기가 분자의 잔여 부분에 부착되는 위치에 위치할 수 있다. 예들은,  $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ ,  $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-$ ,  $-S(O)-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ ,  $-CH=CH-O-CH_3$ ,  $-Si(CH_3)_3$ ,  $-CH_2-CH=N-OCH_3$ , 및  $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ 을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어,  $-CH_2-NH-OCH_3$  및  $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ 와 같이, 두 개까지의 헤테로원자가 연속적일 수 있다. 유사하게, 용어 “헤테로알킬렌”은, 단독으로 또는 다른 치환기의 일부로서,  $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$  및  $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 에 의하여 예시되나 이에 한정되지 않는, 헤테로알킬로부터 유래되는 이가 라디칼을 의미한다. 헤테로알킬렌기에 있어서, 헤테로원자는 또한 사슬 말단의 어느 한쪽 또는 둘 다를 차지할 수 있다(예, 알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노, 등등). 용어 “헤테로알킬” 및 “헤테로알킬렌”은 폴리(에틸렌 글리콜) 및 그의 유도체(예를 들어, Shearwater Polymers Catalog, 2001 참조)를 포함한다. 더 나아가, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결기에 있어서, 연결기의 식이 쓰여진 방향에 의하여 연결기의 어떠한 방향도 암시되지 않는다. 예를 들어, 식  $-C(O)_2R'$ 은  $-C(O)_2R'$  및  $-R' C(O)_2-$  둘 다를 나타낸다.

<224> 용어 “저급”은 용어 “알킬” 또는 “헤테로알킬”과 조합하여 1 개부터 6개의 탄소 원자를 갖는 부분을 지칭한다.

<225> 용어들 “알콕시”, “알킬아미노”, “알킬설포닐”, 및 “알킬티오”(또는 티오알콕시)는 그들의 일반적인 의미로 사용되며, 각각, 산소 원자, 아미노기,  $SO_2$ 기, 또는 황 원자를 통하여 분자의 잔여 부분에 부착된 알킬기를 지칭한다. 용어 “아릴설포닐”은  $SO_2$ 기를 통하여 분자의 잔여 부분에 부착된 아릴기를 지칭하며, 용어 “설포

피드릴”은 SH기를 지칭한다.

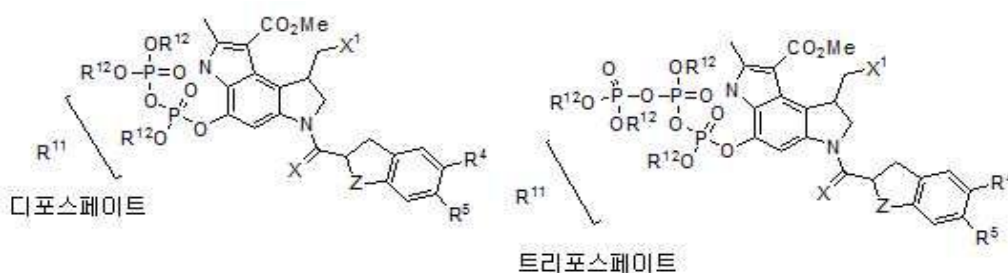
- <226> 일반적으로, “아실 치환기”는 또한 상기에서 서술된 기로부터 선택된다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 “아실 치환기”는 본 발명의 화합물의 다중고리 핵에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된 카르보닐 탄소에 부착되어 그 원자가(valence)를 맞추는 기들을 지칭한다.
- <227> 용어 “사이클로알킬” 및 “헤테로사이클로알킬”은, 단독으로 또는 다른 용어와 조합하여, 다른 언급이 없으면, 각각, 치환 또는 비치환 “알킬” 및 치환 또는 비치환 “헤테로알킬”의 고리 형을 나타낸다. 추가적으로, 헤테로사이클로알킬에 있어서, 헤테로원자는 헤테로사이클이 분자의 잔여 부분에 부착된 위치를 점유할 수 있다. 사이클로알킬의 예는, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 1-사이클로헥세닐, 3-사이클로헥세닐, 사이클로헵틸, 등등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 헤테로사이클로알킬의 예는 1-(1,2,5,6-테트라하이드로피리딜), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모르폴리닐, 3-모르폴리닐, 테트라히드로푸란-2-일, 테트라히드로푸란-3-일, 테트라히드로티엔-2-일, 테트라히드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐, 등등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 고리 구조의 헤테로원자 및 탄소 원자는 임의로 산화될 수 있다.
- <228> 용어 “할로” 또는 “할로겐”은, 단독으로 또는 다른 치환기의 부분으로서, 다른 언급이 없으면, 불소, 염소, 브롬, 또는 요오드 원자를 의미한다. 추가적으로, “할로알킬”과 같은 용어는 모노할로알킬 및 폴리할로알킬을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들면, 용어 “할로(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)알킬”은, 트리플루오로메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 4-클로로부틸, 3-브로모프로필, 등등을 포함하나 이에 한정되지 않는 것으로 의미된다.
- <229> 용어 “아릴”은, 다른 언급이 없으면, 함께 융합되거나 공유 결합되어 단일 고리 또는 다중 고리(바람직하게는 1개부터 3개의 고리)가 될 수 있는 치환 또는 비치환 다중포화, 방향족, 탄화수소 치환기를 의미한다. 용어 “헤테로아릴”은, N, O, 및 S로부터 선택된 1개부터 4개의 헤테로원자를 포함하는 아릴기(또는 고리)를 지칭하는데, 여기에서, 질소, 탄소 및 황 원자는 임의로 산화될 수 있으며, 질소 원자(들)는 임의로 4급화될 수 있다. 헤테로아릴기는 헤테로원자를 통해 분자의 잔여 부분에 부착될 수 있다. 아릴 및 헤테로아릴기들의 비-제한적인 예는 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-비페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-이속사졸릴, 4-이속사졸릴, 5-이속사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 2-피리미딜, 4-피리미딜, 5-벤조티아졸릴, 푸리닐, 2-벤지미다졸릴, 5-인돌릴, 1-이소퀴놀릴, 5-이소퀴놀릴, 2-퀴녹사리닐, 5-퀴녹사리닐, 3-퀴놀릴, 및 6-퀴놀릴을 포함한다. 상기에서 기술된 아릴 및 헤테로아릴 고리계의 각각의 치환기는 하기에서 기술된 허용가능한 치환기들의 군으로부터 선택된다. “아릴” 및 “헤테로아릴”은 또한 하나 이상의 비-방향족 고리계가 융합되거나, 그렇지 않으면, 아릴 또는 헤테로아릴 시스템에 결합된 고리계를 포함한다.
- <230> 요약하면, 용어 “아릴”은 다른 용어들(예, 아릴옥시, 아릴티옥시, 아릴알킬)과 조합하여 사용될 때, 상기에서 정의된 아릴 및 헤테로아릴 고리 둘 다를 포함한다. 따라서, 용어 “아릴알킬”은, 탄소 원자(예, 메틸렌기)가 예를 들면, 산소 원자에 의해 대체된(예, 펜옥시메틸, 2-피리딜옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필, 등등) 알킬기들을 포함하는, 알킬기(예, 벤질, 펜에틸, 피리딜메틸, 등등)에 아릴기가 부착된 라디칼들을 포함하는 것을 의미한다.
- <231> 상기 용어들(예, “알킬”, “헤테로알킬”, “아릴” 및 “헤테로아릴”) 각각은 지시된 라디칼의 치환 및 비치환 형태를 포함한다. 라디칼의 각 유형의 바람직한 치환기는 하기에 제공된다.
- <232> 알킬, 및 헤테로알킬 라디칼의 치환기(알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 사이클로알케닐, 및 헤테로사이클로알케닐로 흔히 지칭되는 그러한 기들을 포함함)는 일반적으로 “알킬 치환기” 및 “헤테로알킬 치환기”로 각각 지칭되고, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -할로겐, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R"', -NR'C(O)<sub>2</sub>R', -NR-C(NR'R"R"')=NR"', -NR-C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R", -NRSO<sub>2</sub>R', -CN 및 -NO<sub>2</sub>로부터 선택되는 여러 가지 기들 중 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 그 수는 0 부터 (2m'+1)의 범위를 가지는데, m'은 그러한 라디칼 내에서 탄소 원자의 총 수이다. R', R", R"' 및 R"" 각각은 바람직하게는 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 예를 들면, 1-3 할로겐으로 치환된 아릴, 치환 또는 비치환 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기, 또는 아릴알킬기를 지칭한다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함할 때, 예를 들면, 각각의 R기들은 하나 이상의 이들 기가 존재할 때 각각의 R', R", R"' 및 R"" 기들로서 독립적으로 선택된다. R' 및 R"가 동일한 질소 원자에 부착되면, 이들은 질소 원

자와 결합되어 5-, 6-, 또는 7-멤버 고리를 형성할 수 있다. 예를 들면, -NR'R"은 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하나 이에 한정되지 않는 것으로 의미된다. 치환기에 대해 상술한 것으로부터, 당업자는 용어 “알킬”이 할로알킬(예, -CF<sub>3</sub> 및 -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) 및 아실(예, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 등등)과 같은, 수소기 이외의 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기를 포함한다는 것을 이해할 것이다.

<233> 알킬 라디칼에 대해 기술된 치환기와 유사하게, 아릴 치환기 및 헤테로아릴 치환기는 일반적으로 “아릴 치환기” 및 “헤테로아릴 치환기”로 각각 지칭되며, 예를 들면, 0부터 방향족 고리계 상의 개방 원자가(open valence)의 총 수까지의 범위에서, 할로젠, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -할로젠, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', -NR"C(O)<sub>2</sub>R', -NR-C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R", -NRSO<sub>2</sub>R', -CN 및 -NO<sub>2</sub>, -R', -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, 플루오로(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)알콕시, 및 플루오로(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)알킬로부터 다양화되고 선택되는데; 여기에서, R', R", R"' 및 R"'"은 바람직하게는 수소, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)알킬 및 헤테로알킬, 비치환 아릴 및 헤테로아릴, (비치환 아릴)-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)알킬, 및 (비치환 아릴)옥시-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)알킬로부터 독립적으로 선택된다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함할 때, 예를 들면, 각각의 R기들은 하나 이상의 이들 기가 존재할 때 각각의 R', R", R"' 및 R"'" 기들로서 독립적으로 선택된다.

<234> 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접한 원자 상의 아릴 치환기들 중 둘은 식 -T-C(O)-(CRR')<sub>q</sub>-U-의 치환기로 임의로 대체될 수 있는데, 여기에서, T 및 U는 독립적으로 -NR-, -O-, -CRR'- 또는 단일 결합이고, q는 0부터 3까지의 정수이다. 대안적으로, 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접한 원자 상의 치환기들 중 둘은 식 -A-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-B-의 치환기로 임의로 대체될 수 있는데, 여기에서, A 및 B는 독립적으로 -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NR'- 또는 단일결합이고, r은 1부터 4까지의 정수이다. 그렇게 형성된 새로운 고리의 단일 결합들 중 하나는 이중결합으로 임의로 대체될 수 있다. 대안적으로 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접한 원자 상의 치환기들 중 둘은 식 -(CRR')<sub>s</sub>-X-(CR"R"')<sub>d</sub>-의 치환기로 임의로 대체될 수 있는데, 여기에서, s 및 d는 독립적으로 0부터 3까지의 정수이고, X는 -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, 또는 -S(O)<sub>2</sub>NR'-이다. 치환기 R, R', R" 및 R"'"은 바람직하게는 수소 또는 치환 또는 비치환 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

<235> 본 명세서에서 사용되는, 용어 “디포스페이트”는 두 개의 포스페이트기를 포함하는 인산의 에스테르를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 용어 “트리포스페이트”는 세 개의 포스페이트기를 포함하는 인산의 에스테르를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들면, 디포스페이트 또는 트리포스페이트를 갖는 특정 약물은 다음을 포함한다.



<236>

<237> 본 명세서에서 사용되는, 용어 “헤테로원자”는 산소(O), 질소(N), 황(S) 및 실리콘(Si)을 포함한다.

<238> 기호 “R”은 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클릴 기들로부터 선택되는 치환기를 나타내는 일반적인 약자이다.

<239> 본 발명의 다양한 관점은 다음의 소단락에서 좀더 자세히 기술된다.

<240> 특정 기능적 성질을 갖는 항-CD19 항체

<241> 본 발명의 항체는 항체의 특정한 기능적 특징 또는 성질에 의하여 특징지어진다. 예를 들어, 항체는 인간 CD19에 특이적으로 결합한다. 바람직하게, 본 발명의 항체는 고친화도로, 예를 들어, 1x10<sup>-7</sup> M 이하의 K<sub>D</sub>로 CD19에



결합한다. 본 발명의 항-CD19 항체는 다음의 특성 중 바람직하게는 하나 이상을 나타낸다:

<242> (a)  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합함;

<243> (b) 라지(Raji) 및 다우디(Daudi) B-세포 종양 세포에 결합함;

<244> (c) CD19-발현 세포에 의하여 내재화됨;

<245> (d) CD19 발현 세포에 대하여 항체 의존성 세포 독성(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)를 나타냄; 및

<246> (e) 세포독소에 접합될 때 생체 내에서 CD19-발현 세포의 성장을 억제함.

<247> 바람직하게, 상기 항체는 성질 (a), (b), (c), (d) 및 (e) 중 적어도 둘을 나타낸다. 더 바람직하게, 상기 항체는 성질 (a), (b), (c), (d) 및 (e) 중 적어도 셋을 나타낸다. 더욱 바람직하게, 상기 항체는 성질 (a), (b), (c), (d) 및 (e) 중 넷을 나타낸다. 심지어, 더욱 바람직하게, 상기 항체는 성질 (a), (b), (c), (d) 및 (e) 중 다섯 모두를 나타낸다. 다른 바람직한 구체예에서, 항체가 세포독소에 접합될 때, 상기 항체는 생체내에서 CD19-발현 종양 세포의 성장을 억제한다.

<248> 바람직하게, 상기 항체는  $5 \times 10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $1 \times 10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $5 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $4 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $3 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $2 \times 10^{-9}$  M의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하거나,  $1 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합한다.

<249> CD19에 대한 본 발명의 항체의 결합을 당해 분야에서 잘 확립된 하나 이상의 기술을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 바람직한 구체예에서, 항체를 유세포 분석법(flow cytometry assay)에 의하여 테스트할 수 있는데, 여기에서 상기 항체는, 형질감염되어 세포 표면 상에서 CD19를 발현하는 CHO 세포주와 같은, 인간 CD19를 발현하는 세포주 또는 OVCAR3, NCI-H226, CFPAC-1 및/또는 KB와 같은 CD19-발현 세포주와 반응한다(예를 들어, 적절한 분석법 및 세포주의 더 자세한 설명은 실시예 3A를 참조). 추가적으로 또는 대안적으로, 결합 동역학(binding kinetics)(예,  $K_D$  값)을 포함하는, 항체의 결합을 비아코어 결합 분석법으로 테스트할 수 있다(예를 들어, 적절한 분석법은 실시예 3B를 참조). 또 다른 적절한 분석법은, 예를 들어 재조합 CD19 단백질을 사용하는, ELISA 분석법을 포함한다(예를 들어, 적절한 분석법은 실시예 1을 참조).

<250> 바람직하게, 본 발명의 항체는  $5 \times 10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 로 CD19 단백질에 결합하거나,  $3 \times 10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 로 CD19 단백질에 결합하거나,  $1 \times 10^{-8}$  M 이하의  $K_D$ 로 CD19 단백질에 결합하거나,  $7 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 CD19 단백질에 결합하거나,  $6 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 CD19 단백질에 결합하거나,  $5 \times 10^{-9}$  M의  $K_D$ 로 CD19 단백질에 결합한다. CD19에 대한 상기 항체의 결합 친화도는, 예를 들어, 표준 비아코어 분석법에 의하여 평가할 수 있다(예를 들어, 실시예 3B를 참조).

<251> CD19-발현 세포에 의한 항-CD19 항체의 내재화를 평가하기 위한 표준 분석법은 당해 분야에 알려져 있다(실시예 5에 기술된 Hum-ZAP 및 면역형광 분석법(immunofluorescence assays)을 참조). 항-CD19 항체에 의한 CA125에 대한 CD19의 결합 및 그의 억제를 평가하기 위한 표준 분석법은 또한 당해분야에 알려져 있다(예를 들어, 실시예 6에 기술된 OVCAR3 세포 부착 분석법을 참조). CD19-발현 세포에 대한 ADCC를 평가하기 위한 표준 분석법 또한 당해 분야에 알려져 있다(예를 들어, 실시예 7에 기술된 ADCC 분석법을 참조). 항-CD19 항체 및 이의 세포독소 접합체에 의한 생체내에서의 종양 세포 성장의 억제를 평가하기 위한 표준 분석법 또한 당해 분야에 알려져 있다(예를 들어, 실시예 8에 기술된 종양 이종이식(xenograft) 마우스 모델을 참조).

<252> 본 발명의 바람직한 항체는 인간 단일클론 항체이다. 추가적으로 또는 대안적으로, 항체는, 예를 들어, 키메라 또는 인간화 단일클론 항체일 수 있다.

<253> 단일클론 항체 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8

<254> 본 발명의 바람직한 항체는 실시예 16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22에 기술된 바와 같이 분리되고 구조적으로 특징지어진, 인간 단일클론 항체 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8이다. 21D4, 21D4a, 47G4,

27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_H$  아미노산 서열은 서열번호 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7에 각각 나타나 있다. 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_L$  아미노산 서열은 서열번호 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 및 15에 각각 나타나 있다.

<255> 이러한 항체 각각이 CD19에 결합할 수 있다면,  $V_H$  및  $V_L$  서열은 “혼합되고 짝지어져서” 본 발명의 다른 항-CD19 결합 분자를 만들 수 있다. 그러한 “혼합되고 짝지어진” 항체의 CD19 결합을 상기 및 실시예들에서 기술된 결합 분석법(예, ELISA)을 이용하여 검사할 수 있다. 바람직하게,  $V_H$  및  $V_L$  사슬이 혼합되고 짝지어질 때, 특정  $V_H/V_L$  접합으로부터의  $V_H$  서열은 구조적으로 유사한  $V_H$  서열로 대체된다. 마찬가지로, 바람직하게 특정  $V_H/V_L$  접합으로부터의  $V_L$  서열은 구조적으로 유사한  $V_L$  서열로 대체된다.

<256> 따라서, 일 관점에서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하고:

<257> (a) 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

<258> (b) 서열번호 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 및 15로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

<259> 여기에서 상기 항체는 CD19, 바람직하게는 인간 CD19에 특이적으로 결합한다.

<260> 바람직한 중쇄 및 경쇄 조합은 다음을 포함한다:

<261> (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

<262> (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

<263> (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

<264> (a) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

<265> (a) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

<266> (a) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

<267> (a) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

<268> (a) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.

<269> 다른 관점에서, 본 발명은 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8, 또는 이들의 조합의 중쇄 및 경쇄 CDR1들, CDR2들 및 CDR3을 포함하는 항체를 제공한다. 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_H$  CDR1들의 아미노산 서열은 서열번호 16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22에 보인다. 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_H$  CDR2들의 아미노산 서열은 서열번호 23, 24, 25, 26, 27, 28 및 29에 보인다. 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_H$  CDR3들의 아미노산 서열은 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 35 및 36에 보인다. 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_K$  CDR1들의 아미노산 서열은 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 42 및 43에 보인다. 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_K$  CDR2들의 아미노산 서열은 서열번호 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50에 보인다. 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_K$  CDR3들의 아미노산 서열은 서열번호 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 및 58에 보인다. 카밧 시스템(Kabat system)을 이용하여 CDR 영역이 묘사되어 있다(Kabat, E. A., 등 (1991) Sequences of

Proteins of Immunological Interest, 제5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

- <270> 이러한 항체 각각이 CD19에 결합할 수 있고 항원-결합 특이성이 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역들에 의하여 일차적으로 제공된다면,  $V_H$  CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열들과  $V_k$  CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열들은 “혼합되고 짝지어져서” (즉, 비록 각 항체가  $V_H$  CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열들과  $V_k$  CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하더라도, 상이한 항체들로부터의 CDR들이 혼합되고 짝지어질 수 있음), 본 발명의 다른 항-CD19 결합 분자를 만들 수 있다. 그러한 “혼합되고 짝지어진” 항체의 CD19 결합은 상기 및 실시예에서 기술된 결합 분석법(예, ELISAs, 비아코어(Biacore<sup>®</sup>)분석)을 이용하여 검사할 수 있다. 바람직하게,  $V_H$  CDR 서열이 혼합되고 짝지어질 때, 특정  $V_H$  서열의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 마찬가지로,  $V_k$  CDR 서열이 혼합되고 짝지어질 때, 특정  $V_k$  서열의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열들은 바람직하게는 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 단일클론 항체 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8에 대하여 하나 이상의  $V_H$  및/또는  $V_L$  CDR 영역 서열을 본 명세서에 공지된 CDR 서열로부터의 구조적으로 유사한 서열로 치환함으로써 신규한  $V_H$  및  $V_L$  서열을 만들 수 있다는 것은 통상적으로 숙련된 기술자에게는 확실히 명백하다.
- <271> 따라서, 다른 관점에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공한다:
- <272> (a) 서열번호 16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <273> (b) 서열번호 23, 24, 25, 26, 27, 28 및 29로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <274> (c) 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 35 및 36으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <275> (d) 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 42 및 43으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <276> (e) 서열번호 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <277> (f) 서열번호 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 및 58로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;
- <278> 여기에서 상기 항체는 CD19, 바람직하게는 인간 CD19에 특이적으로 결합한다.
- <279> 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- <280> (a) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <281> (b) 서열번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <282> (c) 서열번호 30을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <283> (d) 서열번호 37을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <284> (e) 서열번호 44를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <285> (f) 서열번호 51을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <286> 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- <287> (a) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <288> (b) 서열번호 23을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <289> (c) 서열번호 30을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

- <290> (d) 서열번호 37을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <291> (e) 서열번호 44를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <292> (f) 서열번호 52를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <293> 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- <294> (a) 서열번호 17을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <295> (b) 서열번호 24를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <296> (c) 서열번호 31을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <297> (d) 서열번호 38을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <298> (e) 서열번호 45를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <299> (f) 서열번호 53을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <300> 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- <301> (a) 서열번호 18을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <302> (b) 서열번호 25를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <303> (c) 서열번호 32를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <304> (d) 서열번호 39를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <305> (e) 서열번호 46을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <306> (f) 서열번호 54를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <307> 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- <308> (a) 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <309> (b) 서열번호 26을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <310> (c) 서열번호 33을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <311> (d) 서열번호 40을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <312> (e) 서열번호 47을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <313> (f) 서열번호 55를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <314> 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- <315> (a) 서열번호 20을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <316> (b) 서열번호 27을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <317> (c) 서열번호 34를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <318> (d) 서열번호 41을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <319> (e) 서열번호 48을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <320> (f) 서열번호 56을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <321> 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- <322> (a) 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <323> (b) 서열번호 28을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <324> (c) 서열번호 35를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <325> (d) 서열번호 42를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

- <326> (e) 서열번호 49를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <327> (f) 서열번호 57을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <328> 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- <329> (a) 서열번호 22를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <330> (b) 서열번호 29를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <331> (c) 서열번호 36을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <332> (d) 서열번호 43을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <333> (e) 서열번호 50을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <334> (f) 서열번호 58을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- <335> CDR3 도메인은, CDR1 및/또는 CDR2 도메인(들)과 독립적으로, 단독으로 동종(cognate) 항원에 대한 항체의 결합 특이성을 결정지을 수 있다는 것과 공통의 CDR3 서열에 근거하여 동일한 결합 특이성을 가지는 다중 항체들이 예상대로 발생될 수 있다는 것이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Klimka 등, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) 참조(뮤린 항-CD30 항체 Ki-4의 중쇄 가변 도메인 CDR3만을 사용한 인간화 항-CD30 항체의 생산을 설명함); Beiboer 등, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (부모 뮤린 MOC-31 항-EGP-2 항체의 중쇄 CDR3 서열만을 사용한 재조합 상피 당단백질-2(EGP-2) 항체를 설명함); Rader 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (뮤린 항-인테그린  $\alpha_v\beta_3$  항체 LM609의 중쇄 및 경쇄 가변 CDR3 도메인을 사용한 인간화 항-인테그린  $\alpha_v\beta_3$  항체들의 패널을 설명하고 있고 여기에서 각 항체 구성원은 CDR3 도메인 외부에 있고 부모 뮤린 항체와 동일하거나 더 높은 친화도를 가지고 부모 뮤린 항체와 동일한 에피토프를 결합할 수 있는 고유의 서열을 포함함); Barbas 등, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (CDR3 도메인은 항원 결합에 가장 중대한 공헌을 한다는 것을 설명함); Barbas 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) (인간 태반 DNA에 대한 세 개 Fab(SI-1, SI-40, 및 SI-32)의 중쇄 CDR3 서열들을 항-파상풍 유독소(toxoid) Fab의 중쇄에 접합하고 이로써 기존의 중쇄 CD3를 대체하는 것을 설명하고, CDR3 도메인 단독으로 결합 특이성을 부여한다는 것을 증명함); 그리고 Ditzel 등, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996) (부모 다중특이성 Fab LNA3의 중쇄 CDR3 만을 단일특이적인 IgG 파상풍 유독소-결합 Fab p313 항체의 중쇄에 전달하는 것으로도 부모 Fab의 결합 특이성을 유지하는 데 충분하다는 결과를 나타낸 이식 연구를 설명함); Berezov 등, *BIAjournal* 8:Scientific Review 8 (2001) (항-HER2 단일클론 항체의 CDR3에 근거한 펩티드 유사체를 설명함); Igarashi 등, *J. Biochem (Tokyo)* 117:452-7 (1995) (항-포스파티딜세린 항체의 CDR3 도메인에 해당하는 12 아미노산 합성 폴리펩티드를 설명함); Bourgeois 등, *J. Virol* 72:807-10 (1998) (항-호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 항체의 중쇄 CDR3 도메인으로부터 유래된 단일 펩티드가 시험관내에서 바이러스를 중화할 수 있다는 것을 보여줌); Levi 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4374-8 (1993) (뮤린 항-HIV 항체의 중쇄 CDR3 도메인에 근거한 펩티드를 설명함); Polymenis와 Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994) (Z-DNA-결합 항체의 중쇄 CDR3 영역을 접합함으로써 scFv의 결합을 가능하게 함을 설명함); 및 Xu와 Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000) (중쇄 CDR3에서의 다양성이 동일한 IgM 분자가 다양한 합텐(hapten)과 단백질 항원을 구별하도록 하는데 충분하다는 것을 설명함)을 참조. 또한, 단일 CDR 도메인에 의하여 정의된 특허된 항체를 설명하는, 미국 특허 번호 제6,951,646호; 제6,914,128호; 제6,090,382호; 제6,818,216호; 제6,156,313호; 제6,827,925호; 제5,833,943호; 제5,762,905호 및 제5,760,185호를 참조. 이러한 참고 문헌 각각은 전체적으로 본 명세서 상에 참조로서 통합되어 있다.
- <336> 따라서, 본 발명은 인간 또는 비-인간 동물로부터 유래되는 항체로부터 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론 항체를 제공하는데, 여기에서 단일클론 항체는 CD19에 특이적으로 결합할 수 있다. 어떤 관점 내에서, 본 발명은 마우스 또는 래트 항체와 같은, 비-인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론 항체를 제공하는데, 여기에서 단일클론 항체는 CD19에 특이적으로 결합할 수 있다. 어떤 구체예 내에서, 비-인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 그러한 독창적인 항체는 (a) 해당 부모 비-인간 항체와 결합을 위한 경쟁을 할 수 있고; (b) 해당 부모 비-인간 항체와 같은 기능적 특징을 보유하며; (c) 해당 부모 비-인간 항체와 동일한 에피토프에 결합하고; 및/또는 (d) 해당 부모 비-인간 항체와 유사한 결합 친화도를 가진다.
- <337> 다른 관점 내에서, 본 발명은 인간 항체, 예를 들어, 비-인간 동물로부터 얻은 인간 항체로부터의 하나 이상의



중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론 항체를 제공하는데, 상기 인간 항체는 CD19에 특이적으로 결합할 수 있다. 다른 관점 내에서, 본 발명은, 예를 들어, 비-인간 동물로부터 얻은 인간 항체와 같은, 제 1 인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론 항체를 제공하는데, 상기 제 1 인간 항체는 CD19에 특이적으로 결합할 수 있고 제 1 인간 항체로부터의 상기 CDR3 도메인은 CD19에 대한 결합 특이성이 부족한 인간 항체에서 CDR3 도메인을 대체하여 CD19에 특이적으로 결합할 수 있는 제 2 인간 항체를 생성한다. 어떤 구체예 내에서, 제 1 인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 그러한 독창적인 항체는 (a) 해당 부모 제 1 인간 항체와 결합을 위한 경쟁을 할 수 있고; (b) 해당 부모 제 1 인간 항체와 같은 기능적 특징을 보유하고; (c) 해당 부모 제 1 인간 항체와 동일한 에피토프에 결합하고; 및/또는 (d) 해당 부모 제 1 인간 항체와 동일한 결합 친화도를 가진다.

#### <338> 특정 생식계열 서열을 갖는 항체

<339> 소정 구체예에서, 본 발명의 항체는 특정 생식계열 중쇄 면역글로불린 유전자로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 특정 생식계열 경쇄 면역글로불린 유전자로부터의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

<340> 예를 들어, 바람직한 구체예에서, 본 발명은, 인간  $V_H$  5-51 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은, 인간  $V_H$  1-69 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은, 인간  $V_K$  L18 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은, 인간  $V_K$  A27 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은, 인간  $V_K$  L15 유전자의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 상기 항체는 CD19에 특이적으로 결합한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 상기 항체는:

<341> (a) 인간  $V_H$  5-51 또는 1-69 유전자(상기 유전자는 각각 서열번호 74 및 75에 기술된 아미노산 서열을 암호화함)의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하고;

<342> (b) 인간  $V_K$  L18,  $V_K$  A27 또는  $V_K$  L15 유전자(상기 유전자는 각각 서열번호 76, 77 및 78에 기술된 아미노산 서열을 암호화함)의 생성물인 또는 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하며; 및

<343> (c) CD19, 바람직하게는 인간 CD19에 특이적으로 결합한다.

<344> 그러한 항체는 또한 인간 CD19로의 고친화도 결합, CD19-발현 세포에 의한 내재화, CD19-발현 세포에 대하여 ADCC를 매개하는 능력, 및/또는 세포독소에 접합될 때 생체내에서 CD19-발현 종양 세포의 종양 성장을 억제하는 능력과 같은, 상기에서 자세히 서술된 기능적 특성들 중 하나 이상을 가질 수 있다.

<345>  $V_H$  5-51 및  $V_K$  L18의  $V_H$  및  $V_K$ 를 각각 갖는 항체들의 예는 21D4, 21D4a, 27F3, 5G7, 13F1 및 46E8이다.  $V_H$  1-69 및  $V_K$  A27의  $V_H$  및  $V_K$ 를 각각 갖는 항체의 예는 47G4이다.  $V_H$  1-69 및  $V_K$  L15의  $V_H$  및  $V_K$ 를 각각 갖는 항체의 예는 3C10이다.

<346> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 인간 항체는, 항체의 가변 영역들이 인간 생식계열 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 얻어진다면, 특정 생식계열 서열의 “생성물”인 또는 “이로부터 유래된” 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 그러한 시스템들은 인간 면역글로불린 유전자를 가지는 유전자 이식 마우스를 관심의 항원으로 면역화하거나 또는 파지 상에 전사된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 관심의 항원으로 스크리닝하는 것을 포함한다. 인간 생식계열 면역글로불린 서열의 “생성물”인 또는 “이로부터 유래된” 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 생식계열 면역글로불린의 아미노산 서열들과 비교하고 서열에 있어서 인간 항체의 서열과 가장 가까운(즉, 최대 % 상동성) 인간 생식계열 면역글로불린 서열을 선택함으로써 그러한 것으로 확인될 수 있다. 특정 인간 생식계열 면역글로불린 서열의 “생성물”인 또는 “이로부터 유래된” 인간 항체는, 예를 들어, 자연발생적 체세포 변이 또는 부위-지정 돌연변이(site-directed mutation)의 인위적 도입으로 인해 생식계열 서열과 비교하여 상이한 아미노산을 포함할 수 있다. 그러나, 선택된 인간 항체는 일반적

으로는 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 아미노산 서열에 있어서 적어도 90% 동일하고 다른 종의 생식계열 면역글로불린 아미노산 서열들(예, 뮤린(murine) 생식계열 서열들)과 비교할 때, 인간 항체를 인간이라는 것으로 확인하는 아미노산 잔기들을 포함한다. 특정 경우, 인간 항체는, 아미노산 서열에 있어서, 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과, 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있다. 일반적으로, 특정 인간 생식계열 서열로부터 유래된 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 단지 10개 아미노산 차이만을 보인다. 특정의 경우, 상기 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 단지 5 개, 또는 심지어 4, 3, 2, 또는 1 개 아미노산 차이만을 보인다.

#### <347> 상동성 항체(Homologous Antibodies)

<348> 또 다른 실시예에서, 본 발명의 항체는 본 명세서에서 설명된 바람직한 항체들의 아미노산 서열들에 상동성인 아미노산 서열들을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 항체들은 본 발명의 항-CD19 항체들의 바람직한 기능적 성질을 보유한다.

<349> 예를 들어, 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며, 여기에서:

<350> (a) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성인 아미노산 서열을 포함하고;

<351> (b) 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 및 15로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성인 아미노산 서열을 포함하며;

<352> (c) 상기 항체는  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하고;

<353> (d) 라지 및 다우디 B-세포 종양 세포에 결합한다.

<354> 추가적으로 또는 대안적으로, 상기 항체는 인간 CD19로의 고친화도 결합, CD19-발현 세포에 의한 내재화, CD19-발현 세포에 대항하여 ADCC를 매개하는 능력 및/또는 세포독소에 접합될 때 생체내에서 CD19-발현 종양 세포의 종양 성장을 억제하는 능력과 같은, 상술된 다음의 기능적 특징들 중 하나 이상을 가질 수 있다.

<355> 다양한 구체예들에서, 상기 항체는, 예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

<356> 다른 구체예에서,  $V_H$  및/또는  $V_L$  아미노산 서열들은 상기 설명된 서열들에 대하여 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성일 수 있다. 상기 설명된 서열들의  $V_H$  및  $V_L$  영역에 대하여 높은 (즉, 80% 이상) 상동성을 가지는  $V_H$  및  $V_L$  영역을 갖는 항체는 서열번호 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 및 73 을 암호화하는 핵산 분자의 돌연변이유발(예, 부위-지정 돌연변이 유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발)에 의하여 얻은 후, 본 명세서에서 설명된 기능적 분석법을 사용하여 보유된 기능(즉, 상기 (c) 부터 (d)에서 설명된 기능)에 대하여 상기 암호화된 변경된 항체를 테스트할 수 있다.

<357> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 두 개의 아미노산 서열 간의 상동성 백분율은 두 서열 간의 동일성 백분율에 대응된다. 두 서열 간의 동일성 백분율은, 두 서열의 최적 정렬에 대하여 도입될 필요가 있는, 간격들의 수 및 각 간격의 길이를 고려하여, 상기 서열들에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다(즉, % 상동성 = 동일한 위치의 수/위치의 총 수 x 100). 두 서열 간 서열의 비교 및 백분율 동일성의 결정은, 하기 비-제한적 실시예에서 설명된 바와 같이, 수학적 알고리즘을 사용하여 이를 수 있다.

<358> 두 개 아미노산 서열간의 동일성 백분율은 E. Meyers 및 W. Miller의 알고리즘 (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988))을 사용하여 결정될 수 있고, 이 알고리즘은 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합되어 있으며, PAM120 가중치 잔기 표, 12의 간격 길이 페널티 및 4의 간격 페널티를 사용한다. 또한, 두 개 아미노산 서열 간의 동일성 백분율은 Needleman 및 Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있고, 이 알고리즘은 GCG 소프트웨어 패키지([www.gcg.com](http://www.gcg.com)에서 이용가능) 내의 GAP 프로그램에 통합되어 있으며, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스와, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 간격 가중치와 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 가중치를 사용한다.

<359> 추가적으로 또는 대안적으로, 본 발명의 단백질 서열들을 “조회(query) 서열”로 사용하여 공공 데이터베이스에 대하여 검색을 수행함으로써, 예를 들어, 연관 서열들을 확인할 수 있다. 그러한 검색은 Altschul, 등

(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10의 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행될 수 있다. XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 단어길이= 3을 사용하여 BLAST 단백질 검색을 수행하여 본 발명의 항체 분자와 상동성인 아미노산 서열들을 얻을 수 있다. 비교 목적상 이격된 정렬들을 얻기 위해, Gapped BLAST를 Altschul 등 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402에서 설명된 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램(예, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트(default) 변수들이 유용하다. www.ncbi.nlm.nih.gov 참조.

<360> 보존적 변형체(conservative modifications)를 갖는 항체

<361> 소정의 구체예에서, 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 이러한 CDR 서열들의 하나 이상은 공지된 항-CD19 항체 또는 이의 보존적 변형체에 기초한 특정 아미노산 서열을 포함하며, 그리고 상기 항체는 본 발명의 항-CD19 항체들의 바람직한 기능적 성질을 유지한다. 항원 결합을 제거하지 않는 소정의 보존적 서열 변형체가 만들어질 수 있다는 것은 당해 분야에서 이해되고 있다. 예를 들어, Brummell 등. (1993) *Biochem* 32:1180-8(살모넬라에 특이적인 항체의 CDR3 중쇄 도메인에서 돌연변이 분석법을 설명함); de Wildt 등 (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41(항-UA1 항체에서 돌연변이 연구를 설명함); Komissarov 등 (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870 (HCDR3의 중앙부에서의 돌연변이가 친화도를 없애거나 감소시켰음을 보여줌); Hall 등 (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12(CDR3 영역에서의 단일 아미노산 변화가 결합 활성도를 없앴음을 설명함); Kelley와 O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35(항원 결합에서 Tyr 잔기의 기여를 설명함); Adib-Conquy 등 (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 (결합에서 소수성의 영향을 설명함) 및 Beers 등 (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43 (HCDR3 아미노산 돌연변이를 설명함)을 참조. 따라서, 본 발명은 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공하며:

<362> (a) 상기 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 35 및 36의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형체로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

<363> (b) 상기 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 및 58의 아미노산 서열들 및 이의 보존적 변형체로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며;

<364> (c) 상기 항체는  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하고;

<365> (d) 라지 및 다우디 B-세포 종양 세포에 결합한다.

<366> 추가적으로 또는 대안적으로, 상기 항체는 인간 CD19로의 고친화도 결합, CD19-발현 세포에 의한 내재화, CD19-발현 세포에 대항하는 ADCC를 매개하는 능력 및/또는 세포독소에 접합될 때 생체내에서 CD19-발현 종양 세포의 종양 성장을 억제하는 능력과 같은, 상술된 기능적 특징들 중 하나 이상을 가질 수 있다.

<367> 바람직한 구체예에서, 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 23, 24, 25, 26, 27, 28 및 29의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형체로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 및 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형체로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22의 아미노산 서열들 및 이의 보존적 변형체로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 및 경쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 42 및 43의 아미노산 서열들 및 이의 보존적 변형체로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

<368> 다양한 구체예에서, 상기 항체는, 예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

<369> 본 명세서에서 사용되는, 용어 “보존적 서열 변형체”는 그 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성을 유지하게 작용 또는 변경하지 않는 아미노산 변형체를 지칭하는 것으로 의도된다. 그러한 보존적 변형체는 아미노산 치환, 첨가 및 결실을 포함한다. 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같이, 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여, 본 발명의 항체에 변형을 도입할 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기의 일 군은 당해 분야에 정의되어 있다. 이러한 군들은 염기성 측쇄(예, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지 측쇄(예,



트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가진 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 영역내에서 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 군으로부터 나온 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 이러한 변경된 항체는 본 명세서에서 설명된 기능 분석법을 사용하여 보유된 기능 (즉, 상기 (c) 부터 (d)에서 설명된 기능들)에 대하여 테스트할 수 있다.

<370> 본 발명의 항-CD19 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체

<371> 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 CD19 단일클론 항체(즉, CD19에 결합하는 것에 대하여 본 발명의 임의의 단일클론 항체와 교차-경쟁하는 능력을 가진 항체)에 의하여 인식된 인간 CD19 상의 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 교차-경쟁 연구를 위한 참조 항체는 단일클론 항체 21D4(서열번호 1 및 8에서 각각 보여주는 바와 같은  $V_H$  및  $V_L$  서열을 가짐), 또는 단일클론 항체 21D4a(서열번호 1 및 9에서 각각 보여주는 바와 같은  $V_H$  및  $V_L$  서열을 가짐), 또는 단일클론 항체 47G4(서열번호 2 및 10에서 각각 보여주는 바와 같은  $V_H$  및  $V_L$  서열을 가짐), 또는 단일클론 항체 27F3(서열번호 3 및 11에서 각각 보여주는 바와 같은  $V_H$  및  $V_L$  서열을 가짐), 또는 단일클론 항체 3C10(서열번호 4 및 12에서 각각 보여주는 바와 같은  $V_H$  및  $V_L$  서열을 가짐), 또는 단일클론 항체 5G7(서열번호 5 및 13에서 각각 보여주는 바와 같은  $V_H$  및  $V_L$  서열을 가짐), 또는 단일클론 항체 13F1(서열번호 6 및 14에서 각각 보여주는 바와 같은  $V_H$  및  $V_L$  서열을 가짐), 또는 단일클론 항체 46E8(서열번호 7 및 15에서 각각 보여주는 바와 같은  $V_H$  및  $V_L$  서열을 가짐)일 수 있다. 그러한 교차-경쟁하는 항체들은 표준 CD19 결합 분석법에서 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 또는 46E8과 교차-경쟁하는 그들의 능력에 기반하여 확인할 수 있다. 표준 ELISA 분석법이 이용될 수 있는데, 이 분석법에서, 제조한 인간 CD19 단백질은 플레이트 상에 고정되고, 항체들 중 하나가 형광적으로 표지되며, 표지 항체의 결합을 경쟁하는 비-표지 항체의 능력이 평가된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 비아코어 분석법을 이용하여 교차-경쟁하는 항체의 능력을 평가할 수 있다. 예를 들어, 실시예 3에 설명된 바와 같이, 비아코어를 이용하는 에피토프 비닝(epitope binning) 실험은 3C10, 6A4 및 7B1 항체가 CD19 상의 특징적인 에피토프를 인식하고 이에 결합한다는 것을 증명하였다. 인간 CD19에 대한, 예를 들어 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 또는 46E8의 결합을 억제하는 테스트 항체의 능력은, 상기 테스트 항체가 인간 CD19에 결합하는 것에 대하여 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 또는 46E8와 경쟁할 수 있고 그럼으로써 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 또는 46E8와 인간 CD19 상의 동일한 에피토프에 결합한다는 것을 증명한다. 바람직한 구체예에서, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 또는 46E8와 인간 CD19 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 인간 단일클론 항체이다. 그러한 인간 단일클론 항체를 실시예들에서 기술된 바와 같이 제조 및 분리할 수 있다.

<372> 조작되고 변형된 항체

<373> 본 발명의 항체는 변형된 항체를 조작하기 위하여 하나 이상의 공지된 CD19 항체  $V_H$  및/또는  $V_L$  서열들을 갖는 항체를 출발 물질로 이용하여 제조될 수 있는데, 상기 변형된 항체는 출발 항체와 비교하여 변경된 성질을 가질 수 있다. 하나 또는 양 쪽 가변 영역(즉,  $V_H$  및/또는  $V_L$ ) 내에서, 예를 들어, 하나 이상의 CDR 영역 내에서 및/또는 하나 이상의 골격 영역 내에서 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 항체를 조작할 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 불변 영역(들) 내의 잔기들을 변형시켜 항체를 조작하여, 예를 들어, 항체의 작동자(effector) 기능(들)을 바꿀 수 있다.

<374> 소정의 구체예에서, CDR 접합은 항체의 가변 영역을 조작하는 데 사용될 수 있다. 항체들은 주로, 여섯 개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)에 위치하는 아미노산 잔기를 통해서 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내에 있는 아미노산 서열들은 CDR바깥의 서열들보다 개별적 항체들 간에 있어서 더욱 다양하다. CDR 서열들이 대부분 항체-항원 상호작용을 담당하기 때문에, 상이한 특성을 가지는 상이한 항체로부터 유래된 골격 서열들에 접합된, 특이적 자연발생 항체들로부터 나온 CDR 서열들을 포함하는 발현 벡터들을 제작함으로써 특이적 자연 발생 항체들의 특성을 의태하는 재조합 항체들을 발현하는 것이 가능하다(예, Riechmann, L. 등 (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. 등 (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. 등 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; Winter의 미국 특허번호 제 5,225,539 호, 및 Queen 등의 미국 특허번호 제5,530,101 호; 제5,585,089호; 제5,693,762호 및 제6,180,370호 참조).

<375> 따라서, 본 발명의 다른 구체예는 서열번호 16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22, 서열번호 23, 24, 25, 26, 27, 28 및 29, 및 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 35 및 36으로 각각 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열들을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 42 및 43, 서

열번호 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50, 및 서열번호 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 및 58로 각각 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부에 관한 것이다. 따라서, 그러한 항체들은 단일클론 항체 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 또는 46E8의  $V_H$  및  $V_L$  CDR 서열들을 포함하나, 이러한 항체들로부터의 상이한 골격 서열들을 포함할 수 있다.

<376> 그러한 골격 서열들은, 생식계열 항체 유전자 서열들을 포함하는 공공 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참조문헌으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식계열 DNA 서열들은 Kabat, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판, U.S. Department of Health 및 Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., 등 (1992) "The Repertoire of Human Germline  $V_H$  Sequences Reveals about Fifty Groups of  $V_H$  Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 및 Cox, J. P. L. 등 (1994) "A Directory of Human Germ-line  $V_H$  Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836에서는 물론 "VBase" 인간 생식계열 서열 데이터베이스([www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)에서 인터넷 상으로 이용가능)에서 발견될 수 있고, 이들 각각의 내용은 참조문헌으로 본 명세서에 명백하게 병합된다. 다른 예로서, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자들에 대한 생식계열 DNA 서열들은 진뱅크(Genbank) 데이터베이스에서 발견될 수 있다. 예를 들어, HCo7 HuMAb 마우스에서 발견되는 하기 중쇄 생식계열 서열들은 첨부한 진뱅크(Genbank) 등록 번호: 1-69(NG\_0010109, NT\_024637 및 BC070333), 3-33(NG\_0010109 및 NT\_024637) 및 3-7(NG\_0010109 및 NT\_024637)에서 입수할 수 있다. 다른 예로서, HCo12 HuMAb 마우스에서 발견되는 하기 중쇄 생식계열 서열들은 첨부한 진뱅크(Genbank) 등록 번호: 1-69(NG\_0010109, NT\_024637 및 BC070333), 5-51(NG\_0010109 및 NT\_024637), 4-34(NG\_0010109 및 NT\_024637), 3-30.3(CAJ556644) 및 3-23(AJ406678)에서 입수할 수 있다. 그러나 인간 중쇄 및 경쇄 생식계열 서열의 다른 소스(source)는 IMGT(<http://imgt.cines.fr>)에서 입수가능한 인간 면역글로불린 유전자의 데이터베이스이다.

<377> 항체 단백질 서열들을 축적된 단백질 서열 데이터베이스와 비교하는 데 있어서 당해 분야의 숙련자들에게는 잘 알려진, 서열 유사성 검색 방법들 중 하나인, Gapped BLAST으로 불리는 방법을 사용할 수 있다(Altschul 등 (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402). BLAST는 발견적(heuristic) 알고리즘으로, 여기에서 항체 서열 및 데이터베이스 서열 간의 통계적으로 유의한 정렬은 정렬된 단어들의 고-득점 분절 쌍 (high-scoring segment pairs, HSP)을 포함할 수 있을 것이다. 연장 또는 가지치기(trimming)에 의해서 그 득점을 향상시키지 못하는 분절 쌍(segment pair)을 히트(hit)라고 칭한다. 간략하게, VBASE 기원의 뉴클레오타이드 서열들 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>)은 번역되어 있고, FR1 내지 FR3 골격 영역간 및 이를 포함하는 영역은 유지되어 있다. 상기 데이터베이스 서열들은 98 잔기의 평균 길이를 가진다. 단백질의 전체 길이에 걸쳐서 정확히 들어맞는 이중 서열들은 제외된다. 저 복잡도 필터(complexity filter)를 정지시킨 것을 제외하고는 기설정된(default), 표준 변수들을 가지고 blastp 프로그램 및 BLOSUM62의 치환 매트릭스를 사용하여 단백질들에 대하여 BLAST 검색을 실시하여 5 등까지의 히트를 걸러내어, 서열 짝(match)들을 생성하였다. 그 뉴클레오타이드 서열들을 6 개 모든 프레임에서 번역하고 상기 데이터베이스 서열의 매칭 분절에서 정지 코돈이 없는 프레임이 잠재적인 히트로 고려된다. 이를, 다음, BLAST 프로그램 tblastx를 사용하여 확정하였고, 이것은 상기 항체 서열을 6 개 모든 프레임에서 번역하며 이러한 번역물을 6 개 모든 프레임에서 동적으로 번역된 VBASE 뉴클레오타이드 서열들과 비교한다. IMGT(<http://imgt.cines.fr>)로부터 입수가능한 것과 같은, 다른 인간 생식계열 서열 데이터베이스는, 상기한 바와 같은 VBASE와 유사하게 검색될 수 있다.

<378> 아이덴티티들(identities)은 서열의 전체 길이에 걸쳐서 항체 서열과 단백질 데이터베이스 간의 아미노산이 정확하게 들어맞는 것들이다. 양성적인 것들(아이덴티티들+치환 짝)은 일치하지는 않으나 BLOSUM62 치환 매트릭스에 의해 가이드되는 아미노산 치환물이다. 만약 항체 서열이 동일한 아이덴티티를 가진 두 데이터베이스 서열과 매치된다면, 가장 양성적인 것들을 가지는 히트는 매칭 서열 히트(matching sequence hit)인 것으로 결정될 수 있다.

<379> 본 발명의 항체에 사용하기에 바람직한 골격 서열들은 본 발명의 선택된 항체들에 의해 사용된 골격 서열들과 구조적으로 유사한데, 예를 들어, 본 발명의 바람직한 단일클론 항체들에 의해 사용되는  $V_H$  5-51 골격 서열(서열번호 74) 및/또는  $V_H$  1-69 골격 서열(서열번호 75) 및/또는  $V_K$  L18 골격 서열(서열번호 76) 및/또는  $V_K$  A27 골격 서열(서열번호 77) 및/또는  $V_K$  L15 골격 서열(서열번호 78)에 유사하다.  $V_H$  CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및

$V_k$  CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열은, 골격 서열이 유래하는 생식계열 면역글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 서열을 가지는 골격 영역 상에 접합될 수 있거나, 또는 상기 CDR 서열들은 생식계열 서열들에 비하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 골격 영역 상에 접합될 수 있다. 예를 들어, 소정의 경우, 골격 영역 내의 잔기를 돌연변이시켜 항체의 항원 결합능을 유지 또는 강화시키는 것이 유익한 것으로 알려져 있다(예를 들어, Queen 등의 미국 특허번호 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호 및 제6,180,370호 참조).

<380> 다른 유형의 가변 영역 변형은  $V_H$  및/또는  $V_k$  CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 변이시켜 관심의 항체의 하나 이상의 결합 성질(예, 친화도)을 향상시키는 것이다. 부위-지정 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발을 수행하여 돌연변이(들)를 도입하고 항체 결합, 또는 다른 관심의 기능적 성질에 대한 효과는 본 명세서에서 설명되고 실시예에서 제공된 바와 같이, 시험관내 또는 생체내 분석법으로 평가할 수 있다. 바람직하게는, 보존적 변형체(상기에서 기술된 바와 같이)가 도입된다. 이러한 돌연변이는 아미노산 치환, 첨가 또는 결실일 수 있지만, 바람직하게는 치환이다. 더욱이, 일반적으로, 하나의 CDR 영역 내에서 단지 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 잔기만이 변경된다.

<381> 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 항-CD19 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공한다: (a) 서열번호16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$  CDR1 영역; (b) 서열번호23, 24, 25, 26, 27, 28 및 29로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 23, 24, 25, 26, 27, 28 및 29에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$  CDR2 영역; (c) 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 35 및 36으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 35 및 36에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는  $V_H$  CDR3 영역; (d) 서열번호37, 38, 39, 40, 41, 42 및 43으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 42 및 43에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는  $V_k$  CDR1 영역; (e) 서열번호44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는  $V_k$  CDR2 영역; (f) 서열번호51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 및 58로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 및 58에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는  $V_k$  CDR3 영역.

<382> 본 발명의 조작된 항체들은, 예를 들어, 항체의 성질을 향상시키기 위하여,  $V_H$  및/또는  $V_k$  내의 골격 잔기에 변형이 만들어진 것을 포함한다. 일반적으로 그러한 골격 변형들은 항체의 면역원성을 감소시키도록 만들어진다. 예를 들어, 하나의 접근 방법은 하나 이상의 골격 잔기를 해당 생식계열 서열로 “복귀돌연변이” 시키는 것이다. 더욱 상세하게는, 체세포 돌연변이된 항체는 항체가 유래되는 생식계열 서열과는 상이한 골격 잔기를 포함할 수 있다. 그러한 잔기는 항체 골격 서열들을 항체가 유래되는 생식계열 서열들을 비교함으로써 확인할 수 있다.

<383> 예를 들어, 하기 표 1은 중쇄 부모 생식계열 서열과는 다른 항-PD-1 항체 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 및 5F4의 골격 영역에서의 많은 아미노산 변화를 보여준다. 골격 영역 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기들을 그들의 생식계열 배열로 회복시키기 위하여, 체세포 돌연변이를, 예를 들어, 부위-지정 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발에 의하여 생식계열 서열로 “복귀돌연변이” 될 수 있다.

# 표 1

<384> 중쇄 생식계열 배열로부터 항체 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 및 5F4로의 변형

항-CD19 Ab	아미노산 위치	항체의 아미노산	생식계열 배열의 원래 아미노산
21D4	30	S	T

	77	R	S
21D4a	30	S	T
	77	R	S
47G4	24	D	A
3C10	77	N	S
	88	A	S
5G7	19	N	K
	77	N	S
13F1	19	Q	K
	28	T	S
	85	G	S
46E8	19	Q	K
	28	T	S
	85	G	S

- <385> 다른 유형의 골격 변형은 골격 영역 내에 또는 심지어 하나 이상의 CDR 영역 내에 하나 이상의 잔기를 돌연변이시켜 T 세포 에피토프를 제거하고 그것에 의하여 항체의 잠재적 면역원성을 감소시키는 것을 포함한다. 이러한 접근 방법은 또한 “탈면역화”로 지칭되며 Carr 등의 미국 특허 공개 번호 제20030153043 호에 보다 상세히 설명되어 있다.
- <386> 골격 또는 CDR 영역 내에서 만들어진 변형에 더하여 또는 대안적으로, 본 발명의 항체들을 조작하여 Fc 영역 내에서 변형을 만들어, 예를 들어, 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존성 세포 독성과 같은 항체의 하나 이상의 기능적 성질을 일반적으로 변경할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 항체를 화학적으로 변형시키거나(예, 하나 이상의 화학적 분체를 항체에 붙일 수 있다), 글리코실화를 변경하는 것으로 변형시켜 항체의 하나 이상의 기능적 성질을 변경할 수 있다. 이러한 구체예들 각각이 하기에 더 상세히 설명되어 있다. Fc 영역에서의 잔기의 번호매김은 카바트의 EU 인덱스의 것과 같다.
- <387> 한 구체예에서, CH1의 힌지 영역을 변형시켜 힌지 영역에서 시스템인 잔기의 수를 변경, 예를 들어 증가시키거나 감소시킨다. 이러한 접근 방법은 Bodmer 등의 미국 특허번호 제 5,677,425 호에 더 설명되어 있다. CH1의 힌지 영역에서의 시스템인 잔기의 수를 변경하여, 예를 들어, 경쇄 및 중쇄들의 결합을 용이하게 하거나 또는 항체의 안정성을 증가 또는 감소시킨다.
- <388> 다른 구체예에서, 항체의 Fc 힌지 영역을 돌연변이시켜 항체의 생물학적 반감기를 감소시킨다. 더욱 상세하게는, 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 Fc-힌지 단편의 CH2-CH3 도메인 계면 부위에 도입되어 상기 항체가, 천연 Fc-힌지 도메인 SpA 결합에 비하여, 손상된 포도상구균 단백질 A(SpA) 결합을 가진다. 이러한 접근 방법은 Ward 등의 미국 특허번호 제 6,165,745 호에 더욱 상세하게 기술되어 있다.
- <389> 다른 구체예에서, 상기 항체를 변형시켜 생물학적 반감기를 증가시킨다. 다양한 접근 방법이 가능하다. 예를 들어, Ward의 미국 특허번호 제6,277,375호에 기술된 바와 같이, 하나 이상의 하기 돌연변이를 도입할 수 있다: T252L, T254S, 및 T256F. 대안적으로, 생물학적 반감기를 연장시키기 위해, Presta 등의 미국 특허번호 제 5,869,046호 및 제6,121,022호에서 설명된 바와 같이, 항체를 CH1 또는 C<sub>L</sub> 영역에서 변경시켜 IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 두 개 루프로부터 얻은 살비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 포함할 수 있다.
- <390> 다른 구체예에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체하여 항체의 작동자(effector) 기능(들)을 변경하도록 Fc 영역을 변경할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택된 하나 이상의 아미노산들을 상이한 아미노산 잔기로 대체하여 항체가 작동자 리간드에 대한 변경된 친화도를 가지지만, 부모 항체의 항원-결합 능력을 보유하게 한다. 친화도가 변경되는 상기 작동자 리간드는, 예를 들어, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이러한 접근 방법은 Winter 등의 미국 특허번호 제5,624,821호 및 제5,648,260호에 더 상세히 기술되어 있다.
- <391> 다른 실시예에서, 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택된 하나 이상의 아미노산들을 다른 아미노산 잔기로 대체하여 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소되거나 파괴된 보체 의존성 세포독성(CDC)을 가지게 한다. 이러한 접근 방법은 Idusogie 등의 미국 특허번호 제6,194,551호에 더 상세히 설명되어 있다.
- <392> 다른 실시예에서, 아미노산 위치 2316, 17, 18, 19, 20, 21 및 2239내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경하여



보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경한다. 이러한 접근 방법은 Bodmer 등의 PCT 공개번호 제WO 94/29351호에 더 기술되어 있다.

<393> 또 다른 실시예에서, 다음의 위치에서 하나 이상의 아미노산들을 변형함으로써 Fc 영역을 변형시켜 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 매개하는 항체의 능력을 증가시키고 및/또는 Fc $\gamma$  수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시킨다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439. 이러한 접근 방법은 Presta의 PCT 공개 번호 제WO 00/42072호에 더 상세히 기술되어 있다. 더욱이, Fc $\gamma$ R1, Fc $\gamma$ R2, Fc $\gamma$ R3 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 자리가 지도화되어 있고 향상된 결합을 가지는 변이체들(variants)이 기술되어 있다 (Shields, R.L. 등 (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 참조). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339에서의 특이적 돌연변이는 Fc $\gamma$ R3에 대한 결합을 향상시키는 것으로 나타났다. 덧붙여, 다음의 조합 돌연변이체는 Fc $\gamma$ R3 결합을 향상시키는 것으로 나타났다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

<394> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체의 C-말단 끝부분은, 참조로서 그 전체가 본 명세서에 병합되는, 미국 임시 출원 일련번호 제 60/957,271호에 기술된 바와 같은 시스테인 잔기의 도입에 의하여 변형된다. 그러한 변형은 전장 중쇄 서열의 c-말단의 시스테인-함유 확장의 도입뿐만 아니라 전장 중쇄 서열의 C-말단에 또는 근처에 존재하는 아미노산 잔기의 대체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 바람직한 구체예에서, 시스테인-함유 확장은 서열 알라닌-알라닌-시스테인(N-말단부터 C-말단까지)을 포함한다.

<395> 바람직한 구체예에서, 그러한 C-말단 시스테인 변형의 존재는 치료적 제제 또는 마커 분자와 같은, 파트너 분자의 접합을 위한 위치를 제공한다. 특히, 반응성 티올기의 존재는, C-말단 시스테인 변형으로 인하여, 하기에 자세히 기술되는 디설파이드 링커를 채용하는 파트너 분자를 접합하는데 이용될 수 있다. 이러한 방식으로 항체를 파트너 분자에 접합하는 것은 부작의 특정 자리에 대한 증가된 제어를 허용한다. 또한, C-단말에 또는 근처에 부작 자리를 도입함으로써, 접합은 최적화되어 항체의 기능적 성질을 방해하는 것을 줄이거나 제거할 수 있고, 접합체 제조의 단순화된 분석 및 품질 조절을 허용한다.

<396> 또 다른 구체예에서, 항체의 글리코실화를 변형시킨다. 예를 들어, 비글리코실화된 항체를 만들 수 있다(즉, 항체는 글리코실화를 결여함). 글리코실화를 변경하여, 예를 들어, 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 그러한 탄수화물 변경은, 예를 들어, 항체 서열 내에서 하나 이상의 글리코실화의 자리를 변경함으로써 성취될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 영역 골격 글리코실화 자리를 제거하도록 야기하는 하나 이상의 아미노산 치환을 만들어서 그 자리에서 글리코실화를 없애버릴 수 있다. 그러한 비글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 그러한 접근 방법은 Co 등의 미국 특허번호 제5,714,350호 및 제6,350,861호에 더욱 상세하게 기술되어 있다. 글리코실화를 변경하는 추가적 접근 방법은 Hanai 등의 미국 특허번호 제 7,214,775호, Presta의 미국 특허번호 제 6,737,056호, Presta의 미국 특허공개 번호 20070020260호, Dickey 등의 PCT 공개번호 제 WO/2007/084926호, Zhu 등의 PCT 공개번호 제 WO/2006/089294호, 및 Ravetch 등의 PCT 공개번호 제 WO/2007/055916호에 더 자세히 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참고로 본 명세서에 병합된다.

<397> 추가적으로 또는 대안적으로, 변경된 유형의 글리코실화를 가지는 항체, 예를 들어, 감소된 양의 푸코실 잔기를 가지는 저푸코실화 항체, 또는 증가된 두 갈래 GlcNAc 구조를 가지는 항체를 만들 수 있다. 그러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체들의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 나타났다. 그러한 탄수화물 변형은, 예를 들어, 변경된 글리코실화 기계(machinery)를 가진 숙주 세포에서 상기 항체를 발현시킴으로써 이루어 질 수 있다. 변경된 글리코실화 기계를 가진 세포들은 당해 분야에 공지되어 있으며 본 발명의 제조항체들을 발현하여 변경된 글리코실화를 가지는 항체를 생성하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포주 Ms704, Ms705, 및 Ms709는 푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8(알파 (1,6) 푸코실트랜스퍼라제)이 결여되어 있어서, Ms704, Ms705, 및 Ms709 세포주에서 발현되는 항체들은 그들 탄수화물 상에서 푸코스가 결여되어 있다. Ms704, Ms705, 및 Ms709 FUT8<sup>-/-</sup> 세포주들은 두 개의 대체 벡터를 사용하여 CHO/DG44 세포에서 FUT8 유전자를 표적 파괴함으로써 만들 수 있다 (Yamane 등의 미국 특허공개 번호 제20040110704호 및 Yamane-Ohnuki 등 (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22 참조). 다른 예로서, Hanai 등의 EP 제1,176,195호에는 푸코실 트랜스퍼라제를 암호화하는 FUT8 유전자가 기능적으로 파괴되어 있는 세포주가 기술되어 있고, 그러한 세포주에서 발현되는 항체들은 알파 1,6 결합-관련 효소를 감소시키거나 제거함으로써 저푸코실화를 나타내게 된다. Hanai 등은 또한 항체의 Fc 영역에 결합하는 N-아

세틸글루코사민에 푸코스를 첨가하는데 낮은 효소 활성을 가지는 또는 그러한 효소 활성을 가지지 않는 세포주, 예를 들어, 래트 골수종 세포주 YB2/0(ATCC CRL 1662)를 기술하고 있다. Presta의 PCT 공개번호 제WO 03/035835호는 변이체 CHO 세포주인 Lec13 세포에 대해서 기술하고 있는데, 이 세포들은 Asn(297)-연결 탄수화물에 푸코스를 첨부하는 능력이 감소되어 있어서, 그러한 숙주 세포에서 발현된 항체들에 저푸코실화를 야기하게 된다(또한 Shields, R.L. 등 (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 참조). Umana 등의 PCT 공개번호 제WO 99/54342호는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제(예, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 조작된 세포주를 기술하고 있고, 이러한 조작된 세포주에서 발현된 항체들은 증가된 양갈래 GlcNac 구조를 보이고, 결과적으로 상기 항체들의 증가된 ADCC 활성을 나타낸다(Umana 등 (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180을 참조). 대안적으로, 푸코시다제 효소를 사용하여 상기 항체의 푸코스 잔기를 절단할 수 있다. 예를 들어, 푸코시다제 알파-L-푸코시다제는 항체들에서 푸코실 잔기를 제거한다(Tarentino, A.L. 등 (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

<398> 추가적으로 또는 대안적으로, 변경된 유형의 글리코실화를 갖는 항체를 만들 수 있는데, 변경은 항체의 시알릴화(sialylation)의 수준과 관련이 있다. 그러한 변경은 Dickey 등의 PCT 공개번호 제 WO/2007/084926호 및 Ravetch 등의 PCT 공개번호 제 WO/2007/055916호에 기술되어 있는데, 이 둘은 그 전체가 참고로서 본 명세서에 병합되어 있다. 예를 들어, 아스로박터 우레아파센스 시알리다제(*Arthrobacter ureafacens* sialidase)와 같은, 시알리다제와의 효소 반응을 이용할 수 있다. 그러한 반응의 조건은 미국 특허번호 제 5,831,077호에 일반적으로 기술되어 있으며, 이것은 그 전체가 본 명세서에 참고로서 병합되어 있다. 적절한 효소의 다른 비-제한적 예들은, Schloemer 등, *J. Virology*, 15(4), 882-893 (1975) 및 Leibiger 등, *Biochem J.*, 338, 529-538 (1999)에 각각 기술된 바와 같은, 뉴라미니다제(neuraminidase) 및 N-글리코시다제 F이다. 탈시알릴화된 항체를 친화성 크로마토그래피를 이용하여 더 정제할 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 시알트랜스퍼라제(sialyltransferase) 효소를 이용함으로써 시알릴화의 수준을 증가시키는 방법을 이용할 수 있다. 그러한 반응의 조건들이 Basset 등, *Scandinavian Journal of Immunology*, 51(3), 307-311 (2000)에 일반적으로 기술되어 있다.

<399> 본 발명에 의하여 고려될 수 있는 본원 항체들의 다른 변형은 페그화(pegylation)이다. 항체를 페그화시켜, 예를 들어, 항체의 생물학적 반감기(예, 혈청)를 늘릴 수 있다. 항체를 페그화시키기 위해, 항체 또는 이의 단편을, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 같은 PEG와, 하나 이상의 PEG 군이 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건 하에서, 반응시킨다. 바람직하게, 페그화는 반응성 PEG 분자(또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 실시된다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 “폴리에틸렌 글리콜”은 다른 단백질들, 예를 들어, 모노(C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 유도하는 데 사용된 PEG의 임의의 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 소정의 구체예에서, 페그화된 항체는 비글리코실화된 항체이다. 단백질을 페그화시키는 방법은 당해 분야에 알려져 있고, 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어, Nishimura 등의 EP 제0 154 316호 및 Ishikawa 등의 EP 제0 401 384호 참조.

<400> 항체 단편 및 항체 의태체

<401> 본 발명은 전통적인 항체에 한정되지 않고, 항체 단편 및 항체 의태체를 사용하여 실행될 수 있다. 하기에 기술된 바와 같이, 다양한 항체 단편 및 항체 의태 기술이 개발되고 있으며 당해 업계에 널리 공지되어 있다. 도메인 항체, 나노바디 및 유니바디와 같이, 이러한 많은 기술들은, 통상적인 항체 구조의 단편 또는 다른 변형체를 이용하는 반면에, 통상적인 항체 결합을 의태하지만, 독특한 메커니즘들로부터 발생되고 이를 통해 기능하는 결합 구조를 사용하는, 어피타디, 디에이알핀, 안티칼린, 아비머, 및 베르사바디와 같은, 대안적 기술도 있다.

<402> 도메인 항체(dAbs)는 항체의 최소 기능적 결합 유닛으로서, 인간 항체의 중쇄(VH) 또는 경쇄(VL)의 가변 영역에 상응한다. 도메인 항체는 약 13 kDa의 분자량을 가진다. 도만티스(Domantis)는 완전 인간 VH 및 VL dAb들의 일련의 크고 높은 기능적 라이브러리(각 라이브러리당 백억개 이상의 상이한 서열)를 개발하였고, 이러한 라이브러리를 사용하여 치료적 표적에 특이적인 dAb를 선택한다. 많은 통상적인 항체들과는 달리, 도메인 항체들은 박테리아, 효모, 및 포유동물 세포 시스템에서 잘 발현된다. 도메인 항체들 및 이의 제조방법에 대한 상세 설명은 미국 특허 번호 제6,291,158호; 제6,582,915호; 제6,593,081호; 제6,172,197호; 제6,696,245호; 미국 출원 일련 번호 제2004/0110941호; 유럽 특허출원 번호 제1433846호 및 유럽 특허 번호 제0368684호 및 제0616640호; 제W005/035572호, 제W004/101790호, 제W004/081026호, 제W004/058821호, 제W004/003019호 및 제W003/002609호에서 찾을 수 있고, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참조 문헌으로 통합되어 있다.

- <403> 나노바디는 자연적으로-일어나는 중쇄 항체의 특징적인 구조적 및 기능적 성질을 포함하는 항체-유도 치료 단백질이다. 이들 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH) 및 두 개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 포함한다. 중요한 것은, 클론화되고 분리된 VHH 도메인은 원래 중쇄 항체의 전체 항원-결합 능력을 보유하고 있는 완벽하게 안정된 폴리펩티드이다. 나노바디들은 인간 항체들의 VH 도메인과 높은 상동성을 가지며 활성의 임의의 손실 없이 더 인간화될 수 있다. 중요한 것은 나노바디가 낮은 면역원성 잠재능을 가지며, 이는 나노바디가 주된 화합물로 사용된 영장류 실험에서 확인되었다.
- <404> 나노바디는 통상적인 항체들의 장점과 작은 분자 약물의 중요한 성질을 조합한다. 통상적인 항체들과 같이, 나노바디들은 높은 표적 특이성, 이들 표적에 대한 높은 특이성 및 낮은 내재적 독성을 보인다. 그러나, 작은 분자 약물과 같이, 이들은 효소를 억제하며 수용체 틈에 용이하게 접근할 수 있다. 또한, 나노바디들은 매우 안정하고, 주사 외 다른 방식으로 투여될 수 있고(예, 제WO 04/041867호 참조, 본 명세서에 참조 문헌으로 병합됨), 제조하기 쉽다. 나노바디의 다른 장점은 그들의 작은 크기의 결과로서, 공통적이지 않거나 숨겨진 에피토프를 인식하고, 그들의 독특한 삼차원적, 약물 포켓 유연성으로 인하여 높은 친화도 및 선택성으로 단백질 표적의 빈 공간 또는 활성 부위에 결합하며, 약물 전달의 수명, 용이성과 속도를 맞추는 것을 포함한다.
- <405> 나노바디는 단일 유전자에 의해 암호화되며 거의 모든 원핵 및 진핵 숙주, 예를 들어, E. coli(예, 미국 특허 번호 제6,765,087호 참조, 이는 전체적으로 본 명세서에 참조 문헌으로 병합됨), 곰팡이(molds)(예, 아스파질러스 또는 트리코데마) 및 효소(예, 사카로마이세스, 클루이베로마이세스, 한세놀라 또는 피키아)(예, 미국 특허 번호 제6,838,254호 참조, 이는 전체적으로 본 명세서에서 참조문헌으로 병합됨)에서 효과적으로 생산된다. 제조 공정은 증감될 수 있고 수 킬로그램 양의 나노바디들을 생산해왔다. 나노바디들이 통상적인 항체에 비하여, 뛰어난 안정성을 나타내므로, 이들은 긴 보관 수명, 즉시 사용되는 용액으로서 제형화될 수 있다.
- <406> 나노클론 방법(예, 제WO 06/079372호 참조, 이는 전체적으로 본 명세서에 참조문헌으로 병합됨)은 B-세포의 자동화된 고출력 선택에 기초하여, 원하는 표적에 대하여 나노바디를 생성하는 독점적 방법으로서, 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다.
- <407> 유니바디는 또 다른 항체 단편 기술이지만, 이러한 것은 IgG4 항체들의 힌지 영역을 제거하는 것에 기초한다. 힌지 영역을 삭제하면 통상적인 IgG4 항체들의 크기에 실질적으로 절반이고 IgG4 항체들의 이가 결합 영역보다는 일가 결합 영역을 가지는 분자가 생성된다. IgG4 항체들이 비활성적이고 따라서 면역계와 상호작용하지 않는 데, 이는 면역 반응을 원치 않는 질병의 치료에 장점일 수 있고, 이러한 장점은 유니바디에 있는 것이 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 유니바디들은 그들이 결합된 세포를 억제하거나 휴지(silence)시키지만 죽이지는 않게 기능할 수 있다. 부가적으로, 암 세포에 결합하는 유니바디는 증식하도록 그것들을 자극하지 않는다. 더구나, 유니바디는 통상적 IgG4 항체의 크기의 반 정도이기 때문에, 더 큰 고형암에 걸쳐 잠재적으로 유리한 효능으로 더 좋은 분포를 나타낼 수 있다. 유니바디는 온전한 IgG4 항체들과 유사한 속도로 신체에서 제거되며 온전한 항체들과 유사한 항원 친화도로 결합할 수 있다. 유니바디의 상세 설명은 특허출원 제WO2007/059782호를 참조할 수 있고, 이것은 전체적으로 본 명세서에 참조문헌으로 병합된다.
- <408> 어피바디 분자는, 포도상구균의 단백질 A의 IgG-결합 도메인들 중 하나로부터 유래되는, 58-아미노산 잔기 단백질 도메인에 기초한 새로운 형태의 친화성 단백질을 나타낸다. 이러한 세 개 나선 묶음 도메인은 조합성 파지미드 라이브러리의 제작용 골격으로 사용될 수 있고, 그로부터 파지 디스플레이 기술을 사용하여 원하는 분자를 표적하는 어피바디 변이체를 선택할 수 있다(Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain, Nat Biotechnol 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A(IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur J Biochem 2002;269:2647-55). 어피바디 분자의 간단하고 견고한 구조는 이들의 저분자량(6 kDa)과 조합되어 이들을 다양한 적용에, 예를 들어, 검출 시약에 적절하게 하고(Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, 등, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli, J Immunol Methods 2002;261:199-211), 수용체 상호작용을 억제한다(Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng 2003;16:691-7). 어피바디 및 이의 제조 방법의 상세 설명은 미국 특허 번호 제5,831,012호를 참조할 수 있고, 이것은 전체적으로 본 명세서에 참조 문헌으로 병합되어 있다.
- <409> 표지된 어피바디는 또한 이소형태의 풍부함을 결정하기 위한 이미징 어플리케이션에 유용하다.
- <410> 디에이알핀(DARPin, Designed Ankyrin Repeat Proteins)은 항체 의태 DRP(Designed Repeat Protein) 기술의 한



에인테, 이는 비-항체 폴리펩티드의 결합 능력을 이용하기 위해 개발되었다. 안키린 또는 류신이 많은 반복 단백질과 같은 반복 단백질은 편재하는 결합 분자이고, 이는 항체와는 달리, 세포 내 및 세포외적으로 발생한다. 이들의 독특한 모듈식 건축구조는 반복되는 구조적 단위체(반복체)를 특징으로 하고, 이것들은 함께 쌓여져서 가변성 및 모듈식의 표적-결합 표면을 나타내는 연장된 반복 도메인을 형성한다. 이러한 모듈성에 근거하여, 고도로 다양화된 결합 특이성을 가지는 폴리펩티드들의 조합적 라이브러리들을 생성할 수 있다. 이러한 전략은 가변적인 표면 잔기 및 이들이 무작위적으로 반복 도메인으로 결집되는 것을 나타내는 자가-양립성 반복체들의 일치된 구성을 포함한다.

<411> 디에이알핀은 고효율로 박테리아성 발현 시스템에서 생산될 수 있으며, 공지된 가장 안정한 단백질에 속한다. 인간 수용체, 사이토카인, 키나아제, 인간 프로테아제, 바이러스 및 막 단백질을 포함한 광범위한 표적 단백질에 대한 매우 특이적이고 고친화도인 디에이알핀들을 선택하였다. 단단위(single-digit) 나노몰 내지 피코몰 범위의 친화도를 가지는 디에이알핀들을 얻을 수 있다.

<412> 디에이알핀은 ELISA, 샌드위치 ELISA, 유세포 분석법(FACS), 면역조직화학(IHC), 칩 응용, 친화도 정제 또는 웨스턴 블랏팅을 포함하여, 광범위한 범위의 어플리케이션에 사용되어 왔다. 디에이알핀은 또한, 예를 들어, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)에 융합된 세포내 마커 단백질로서 세포내 분획에서 매우 활성적이라는 것이 증명되었다. 디에이알핀은 또한 pM 범위 내에 있는 IC50으로 바이러스 입장을 억제하는 데 사용되었다. 디에이알핀은 단백질-단백질 상호작용을 차단하는 데 이상적일 뿐 아니라, 효소를 억제하는 데에도 이상적이다. 프로테아제, 키나아제 및 운반자가 가장 일반적으로 알로스테릭 억제 방식으로 성공적으로 억제되었다. 종양 상에 매우 빠르고 특이적으로 농축되는 것과 매우 양호한 종양 대 혈액 비율로 인하여, 디에이알핀은 생체 내 진단 또는 치료적 접근에 매우 적절하다.

<413> 디에이알핀 및 다른 DRP 기술에 관한 추가의 정보는 미국 특허 출원 공개 번호 제2004/0132028호 및 국제 특허 출원 공개 번호 제WO 02/20565호에서 발견될 수 있고, 둘 다 본 명세서에 전체적으로 참조 문헌으로서 병합된다.

<414> 안티칼린은 추가적인 항체 의태 기술이나, 이 경우, 결합 특이성은 리포칼린, 즉 인간 조직 및 체액에서 자연적으로 그리고 풍부하게 발현되는 저분자량 단백질의 군으로부터 유도된다. 리포칼린은 생체 내에서 생리적 수송 및 화학적으로 민감하거나 불용성인 화합물의 저장과 관련된 일단의 기능들을 수행하기 위해 발달하였다. 리포칼린은 단백질의 하나의 말단에서 네 개 루프를 지지하는 고도로 보존된  $\beta$ -배럴을 포함하는 견고하고 고유한 구조를 가진다. 이러한 루프들은 결합 포켓의 입구를 형성하고, 분자의 이러한 부분에서의 형태적 차이는 개별 리포칼린 간의 결합 특이성에서의 다변화를 설명한다.

<415> 보존된  $\beta$ -시트 골격에 의해 지지되는 초가변성 루프의 전체 구조가 면역글로불린의 흔적이지만, 리포칼린은 크기에서 항체들과 상당히 상이하며, 단일 면역글로불린 도메인보다 약간 더 큰 160-180 아미노산들의 단일 폴리펩티드 사슬로 구성된다.

<416> 리포칼린을 클론화하고 이들의 루프를 조작하여 안티칼린을 생성한다. 구조적으로 다양한 안티칼린들의 라이브러리를 생성하였고 안티칼린 디스플레이는 결합 기능의 선택 및 스크리닝을 가능하게하며, 용해성 단백질을 발현하고 생성하여 원핵 또는 진핵 시스템에서 더 분석할 수 있다. 연구에 따르면, 실질적으로 임의의 인간 표적 단백질에 특이적인 안티칼린을 개발할 수 있고 분리할 수 있으며, 나노몰 또는 그 이상의 범위의 결합 친화도를 얻을 수 있다는 것이 성공적으로 밝혀졌다.

<417> 또한 안티칼린은 소위 듀오칼린으로 불리는, 이중 표적화 단백질로서 형성될 수 있다. 듀오칼린은, 그의 두개 결합 도메인의 구조적 방향과는 관계없이 표적 특이성 및 친화도를 유지하면서, 표준 제조방법으로 용이하게 제조되는 하나의 단량체성 단백질에서 두 개의 개별적인 치료적 표적을 결합한다.

<418> 단일 분자를 통하여 다중 표적들을 조정하는 것은 단일 원인 인자 이상을 포함하는 것으로 알려진 질병에 특히 유리하다. 더욱이, 듀오칼린과 같은 이중 또는 다중 결합 형식은 질병에서 세포 표면 분자를 표적화하는데 있어서, 신호 전달 경로 상에 작용 효과(agonistic effect)를 매개하는데 있어서, 또는 세포 표면 수용체들을 결합하고 클러스터링하는 것을 통해 향상된 내재화 효과를 유도하는 데 있어서 상당한 잠재능력을 가진다. 더구나, 듀오칼린의 높은 고유 안정성은 단량체성 안티칼린과 비견되며, 듀오칼린에게 유연한 배합 및 전달 능력을 제공한다.

<419> 안티칼린에 대한 추가 정보는 미국 특허 번호 제7,250,297호 및 국제 특허 출원 공개번호 제WO 99/16873호에서 발견되며, 이 둘은 본 명세서에서 참조 문헌으로서 병합된다.



- <420> 본 발명의 맥락에 유용한 또 다른 항체 의태 기술은 아비머이다. 아비머는 시험관내 엑손 셔플링(exon shuffling) 및 파지 디스플레이에 의해 인간 세포의 수용체 도메인의 거대 군으로부터 발달되고, 결합 및 억제 성질을 갖는 다중도메인 단백질을 생성한다. 다중 독립적 결합 도메인들을 연결하는 것은, 결합활성(avidity)을 생성하고 그 결과로 통상적인 단일-에피토프 결합 단백질에 비하여 친화도 및 특이성을 향상시킨다는 것을 보여 주었다. 다른 잠재적 장점은 대장균(*Escherichia coli*) 내에서 다중표적-특이적 분자를 간단하고 효율적으로 생산하고, 열안정성 및 프로테아제에 대한 내성을 향상시킨다는 것을 포함한다. 나노몰 이하의 친화도를 가지는 아비머를 다양한 표적에 대하여 얻었다.
- <421> 아비머에 대한 추가 정보는 미국 특허출원 공개번호 제2006/0286603호, 제2006/0234299호, 제2006/0223114호, 제2006/0177831호, 제2006/0008844호, 제2005/0221384호, 제2005/0164301호, 제2005/0089932호, 제2005/0053973호, 제2005/0048512호, 제2004/0175756호에서 발견되며, 이 모두는 전체적으로 본 명세서에 참조 문헌으로서 병합된다.
- <422> 베르사바디(Versabodies)는 본 발명에 사용될 수 있는 다른 항체 의태 기술이다. 베르사바디는 >15% 시스테인 함량을 갖는 3-5 kDa의 작은 단백질이고, 높은 이황화물 밀도 골격을 형성하여, 통상적인 단백질이 가지는 소수성 코어를 대체한다. 소수성 코어를 포함하는, 많은 수의 소수성 아미노산을 작은 수의 이황화물로 대체하면, 더 작고, 더 강한 친수성(덜 결합되고 비-특이적 결합)이고, 프로테아제와 열에 더 저항성이 있으며, 더 낮은 밀도의 T-세포 에피토프를 가지는 단백질을 생성하게 되는데, 이는 MHC 발현에 대부분 기여하는 잔기가 소수성 이기 때문이다. 이러한 네가지 성질 모두는 면역원성에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있고, 이들은 함께 면역원성을 크게 저하시킬 것으로 예상된다.
- <423> 베르사바디 대한 영감은 거머리, 뱀, 거미, 전갈, 달팽이, 및 말미잘에 의해 생산되는 천연적 주입성 생약학물로부터 나온 것인데, 이것은 예상외로 낮은 면역원성을 보이는 것으로 알려진다. 모양에 의해서 그리고 크기를 스크리닝함으로써, 선택된 천연 단백질 군으로 출발하여, 소수성, 단백질 가수분해성 항원 가공 및 에피토프 밀도를 천연적 주입성 단백질에 대하여 평균보다 훨씬 낮은 수준으로 최소화한다.
- <424> 베르사바디의 구조가 주어지면, 이러한 항체 의태체는 다-가(multi-valency), 다중 특이성, 다양한 반감기 메카니즘, 조직 표적화 모듈 및 항체 Fc 영역의 부재를 포함하는 다양한 형식을 제공한다. 더구나, 베르사바디는 *E. coli*에서 고효율로 제조되며, 그들의 친수성 및 작은 크기 때문에, 베르사바디는 고도로 용해성이고 고농도로 제형될 수 있다. 베르사바디는 뛰어나게 열에 안정성이고(그것들을 끓일 수도 있음) 보관 수명이 길다.
- <425> 베르사바디에 대한 추가 정보는 미국 특허출원 공개번호 제2007/0191272호에서 발견되며, 그 전체가 본 명세서에서 참조 문헌으로서 병합된다.
- <426> 상기에서 제공된 항체 단편 및 항체 의태 기술의 상세한 설명은 본 명세서의 맥락에서 사용될 수 있는 모든 기술의 포함 목록인 것으로 의도되지 않는다. 예를 들어, 비제한적 방식으로, 다양한 추가 기술이 본 발명의 맥락에서 사용할 수 있는 데, Qui 등, *Nature Biotechnology*, 25(8) 921-929 (2007)(이는 그 전체로서 본 명세서에 참조 문헌으로서 병합됨)에 개략적으로 기술된 상보적 결정 영역의 융합과 같은 대안적 폴리펩티드-기반 기술을 포함하며, 뿐만 아니라, 미국 특허번호 제5,789,157호, 제5,864,026호, 제5,712,375호, 제5,763,566호, 제6,013,443호, 제6,376,474호, 제6,613,526호, 제6,114,120호, 제6,261,774호, 및 제6,387,620호(이들 모두는 그 전체로서 본 명세서에 참조 문헌으로서 병합됨)에 서술된 RNA 앵타머 기술(RNA aptamer technologies)과 같은 핵산-기반 기술도 포함한다.
- <427> 항체 물리적 성질
- <428> 본 발명의 항체들은 항-CD19 항체의 다양한 물리적 성질에 의해 더 특성화될 수 있다. 다양한 분석 방법들을 사용하여 이러한 물리적 성질에 근거하여 항체들의 상이한 부류를 검출 및/또는 분화시킬 수 있다.
- <429> 어떤 구체예에서, 본 발명의 항체들은 경쇄 또는 중쇄 가변 영역에서 하나 이상의 글리코실화 자리를 가질 수 있다. 가변 영역에서 하나 이상의 글리코실화 자리가 존재하는 것은 변경된 항원 결합으로 인하여 항체의 면역원성을 높이거나 또는 항체의 pK를 변경하는 결과를 가져올 수 있다(Marshall 등 (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA 및 Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick 등 (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh 등 (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura 등 (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). 글리코실화는 N-X-S/T 서열을 포함하는 모티프(motifs)에서 발생한다고 알려져 있다. 가변 영역 글리코실화는 글라이코블랏(Glycoblots) 분석법을 사용하여 테스트할 수 있는데, 이는 항체를 절단하여 Fab를 생산한 후, 과요오드산 산화 및 슈프(Schiff) 염기 형성을 측정하는 분석법을 사용하여 글리코실화를 테

스트한다. 대안적으로, 가변 영역 글리코실화는 다이오넥스 광 크로마토그래피(Dionex-LC)를 사용하여 테스트할 수 있는데, 이는 Fab로부터 당류를 단당류로 절단하고 개별적인 당 함유량을 분석한다. 어떤 경우에, 가변 영역 글리코실화를 포함하지 않는 항-CD19 항체를 가지는 것이 바람직하다. 이것은 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여, 가변 영역에서 글리코실화 모티프를 포함하지 않는 항체들을 선택함으로써 또는 글리코실화 모티프 내에 잔기를 돌연변이시킴으로써 성취될 수 있다.

<430> 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체들은 아스파라긴 이성화 자리를 포함하지 않는다. 탈아미드화 또는 이소아스파르트 산 효과는 각각 N-G 또는 D-G 서열들에서 일어날 수 있다. 탈아미드화 또는 이소아스파르트 산 효과는 이소아스파르트 산의 생성을 야기하는데, 이것은 주 사슬보다는 측쇄 카르복시 말단의 얽힘 구조(kinked structure)를 생성함으로써 항체의 안정성을 저하시킨다. 이소아스파르트 산의 생성은 역-상 HPLC를 사용하여 이소아스파르트 산에 대하여 테스트하는 등량분석법(iso-quant assay)을 사용하여 측정될 수 있다.

<431> 각 항체는 고유의 등전위점(pI)을 가질 것이나, 일반적으로 항체들은 6 내지 9.5 사이의 pH 범위 안에 거한다. IgG1 항체에 대한 pI는 대표적으로 7-9.5의 pH 범위에 있고, IgG4 항체에 대한 pI는 대체로 6-8의 pH 범위에 거한다. 항체들은 이러한 범위 밖에 있는 pI를 가질 수 있다. 비록 상기 효과들이 일반적으로 알려져 있지 않더라도, 정상적인 범위 밖의 pI를 가진 항체들이 생체내 조건하에서 폴립(unfolding) 및 불안정성을 가질 수 있다고 생각된다. 상기 등전점을 모세관 등전위 초점 분석법(capillary isoelectric focusing assay)을 사용하여 테스트할 수 있는데, 이것은 pH 구배를 만들고 레이저 포커싱을 사용하여 정확성을 높일 수 있다(Janini 등 (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma 등 (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt 등 (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). 어떤 경우에, 정상 범위에 들어가는 pI 값을 포함하는 항-CD19 항체를 가지는 것이 바람직하다. 이것은 정상 범위 내의 pI를 갖는 항체를 선택함으로써, 또는 해당 분야에서 잘 알려진 표준 기술을 사용하여 하전된 표면 잔기를 돌연변이시킴으로써 이를 수 있다.

<432> 각 항체는 열 안정성을 나타내는 용융점을 가질 것이다(Krishnamurthy R 및 Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). 더 높은 열적 안정성은 생체내에서 더 큰 전체 항체 안정성을 나타낸다. 항체의 용융점은 차등 스캐닝 열량계와 같은 기술을 사용하여 측정될 수 있다(Chen 등 (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando 등 (1999) *Immunol Lett* 68:47-52).  $T_{m1}$ 은 항체의 초기 폴립의 온도를 나타낸다.  $T_{m2}$ 는 항체의 완전한 폴립의 온도를 나타낸다. 일반적으로, 본 발명의 항체의  $T_{m1}$ 은 60°C 이상, 바람직하게는 65°C 이상, 더욱 바람직하게는 70°C 이상이다. 대안적으로, 항체의 열적 안정성은 원편광 이색성 분석(circular dichroism)을 사용하여 측정될 수 있다(Murray 등 (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

<433> 바람직한 구체예에서, 빠르게 분해하지 않는 항체들을 선택한다. 항-CD19 항체의 단편화는, 당해 분야에 공지된, 모세관 전기영동(CE) 및 MALDI-MS를 이용하여 측정될 수 있다(Alexander AJ 및 Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

<434> 다른 바람직한 구체예에서, 최소 결집 효과를 갖는 항체들을 선택한다. 결집은 원치 않는 면역 반응 및/또는 변경되거나 바람직하지 않은 약물동력학(pharmacokinetic) 성질을 개시하게 할 수 있다. 일반적으로, 25% 이하, 바람직하게는 20% 이하, 더욱 바람직하게는 15% 이하, 더 더욱 바람직하게는 10% 이하, 그리고 더욱 더 바람직하게는 5% 이하로 결집하는 항체가 허용될 수 있다. 결집은, 크기 배제 컬럼(size-exclusion column, SEC) 고정능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 및 광 분산을 포함한, 당해 분야에 공지된 몇가지 기술을 사용하여 단량체, 이량체, 삼량체 또는 다량체를 확인하여 측정될 수 있다.

<435> 항체를 조작하는 방법

<436> 상기에 서술된 바와 같이, 본 명세서에서 공지된  $V_H$  및  $V_K$  서열들을 갖는 항-CD19 항체를 사용하여  $V_H$  및/또는  $V_K$  서열들 또는 이에 부착된 불변 영역(들)을 변형함으로써 새로운 항-CD19 항체들을 만들 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 관점에서, 본 발명의 항-CD19 항체, 예컨대 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 또는 46E8의 구조적 특징을 이용하여, 인간 CD19에 결합하는 것과 같은, 본 발명의 항체의 적어도 하나의 기능적 성질을 보유하는, 구조적으로 관련된 항-CD19 항체를 만들 수 있다. 예를 들어, 상기에 검토된 바와 같이, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 또는 46E8, 또는 이의 돌연변이들의 하나 이상의 CDR 영역을 공지된 골격 영역 및/또는 다른 CDR들과 재조합적으로 조합하여, 추가의 재조합적으로 조작된 본 발명의 항-CD19 항체를 만들 수 있다. 변형의 다른 유형은 앞 부분에서 설명되었던 것들을 포함한다. 이러한 조작 방법에 사용되는 개시 물질은 본 명세서에서 제공된 하나 이상의  $V_H$  및/또는  $V_K$  서열들 또는 이의 하나 이상의 CDR 영역이다. 조작된 항체를 만들기 위해, 본 명세서에서 제공된 하나 이상의  $V_H$  및/또는  $V_K$  서열들 또는 이의 하나 이상의 CDR 영역을 갖는

항체를 실제로 제조하는(즉, 단백질로서 발현시킴) 것은 필요치 않다. 그보다는, 그 서열(들)에 포함된 정보를 개시 물질로 사용하여 원래 서열(들)로부터 유래된 “2세대” 서열(들)을 생성시킨 후, 상기 “2세대” 서열(들)을 제조하고 단백질로서 발현시킨다.

- <437> 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 항-CD19 항체를 제조하는 방법을 제공한다:
- <438> (a) (i) 서열번호 16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR1 서열; 서열번호 23, 24, 25, 26, 27, 28 및 29로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR2 서열; 및/또는 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 35 및 36으로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 항체 서열; 및/또는 (ii) 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 42 및 43으로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR1 서열; 서열번호 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50으로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR2 서열; 및/또는 서열번호 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 및 58로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 항체 서열을 제공하고;
- <439> (b) 상기 중쇄 가변 영역 항체 서열 및/또는 상기 경쇄 가변 영역 항체 서열 내에서의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변경하여 적어도 하나의 변경된 항체 서열을 생성하고; 및
- <440> (c) 상기 변경된 항체 서열을 단백질로서 발현하는 것.
- <441> 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 상기 변경된 항체 서열을 제조하고 발현시킬 수 있다.
- <442> 바람직하게, 변경된 항체 서열(들)에 의하여 암호화된 항체는 본 명세서에서 기술된 항-CD19 항체의 기능적 성질들의 하나, 몇 개 또는 모두를 보유하는 항체이며, 상기 기능적 성질들은 다음을 포함하나, 이에 한정되지 않는다:
- <443> (a)  $1 \times 10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 인간 CD19에 결합하고;
- <444> (b) 라지 및 다우디 B-세포 종양 세포에 결합하며;
- <445> (c) CD19-발현 세포에 의하여 내재화되고;
- <446> (d) CD19 발현 세포에 대하여 항체 의존성 세포 독성(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 나타내며;
- <447> (e) 세포독소에 접합될 때 생체내에서 CD19-발현 세포의 성장을 억제한다.
- <448> 상기 변경된 항체들의 기능적 성질들은 실시예에서 설명된 바와 같이, 당해 분야에서 이용가능하고 및/또는 본 명세서에 서술된 표준 분석법(예, 유세포 분석법, 결합 분석법)을 이용하여 평가될 수 있다.
- <449> 본 발명의 항체를 조작하는 방법에 관한 소정의 구체예에서, 항-CD19 항체 암호화 서열의 전체 또는 일부를 따라서 돌연변이를 무작위적으로 또는 선택적으로 도입할 수 있으며, 그 결과의 변형된 항-CD19 항체들을, 본 명세서에 설명된 바와 같이, 결합 활성에 대하여 및/또는 다른 기능적 성질들에 대하여 스크리닝할 수 있다. 돌연변이 방법은 당해 분야에서 공지되어 있다. 예를 들면, Short의 PCT 공개번호 제WO 02/092780호는 포화 돌연변이 유발법, 합성 결합 조립법(synthetic ligation assembly) 또는 이의 조합을 사용하여 항체 돌연변이를 생성하고 스크리닝하는 방법을 기술한다. 대안적으로, Lazar 등의 PCT 공개번호 제WO 03/074679호는 컴퓨터화된 스크리닝 방법을 사용하여 항체들의 생리화학적 성질을 최적화시키는 방법들을 기술한다.
- <450> 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자
- <451> 본 발명의 다른 관점은 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 상기 핵산은 온전한 세포, 세포 용해물, 또는 부분적으로 정제되거나 실질적으로 순수한 형태 내에 존재할 수 있다. 핵산은, 알카라인/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 젤 전기영동 및 당해 업계에 공지된 다른 기술을 포함한 표준 기술을 사용하여, 다른 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제될 때, “분리”되거나 “실질적으로 순수하게 된” 것이다. F. Ausubel 등, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York을 참조. 본 발명의 핵산은, 예를 들어, DNA 또는 RNA일 수 있고 인트론성 서열들을 포함할 수도 안할 수도 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 핵산은 cDNA 분자이다.
- <452> 본 발명의 핵산을 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마(예, 후술하는 바와 같은 인간 면역글로불린 유전자를 지닌 트랜스유전자성(transgenic) 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현되는

항체의 경우, 하이브리도마에 의해 만들어진 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 얻을 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리로부터 얻은(예, 파지 디스플레이 기술을 사용함) 항체의 경우, 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 유전자 라이브러리로부터 회수할 수 있다.

<453> 본 발명의 바람직한 핵산 분자들은 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 또는 46E8 단일클론 항체들의  $V_H$  및  $V_L$  서열들을 암호화하는 것들이다. 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_H$  서열들을 암호화하는 DNA 서열들은 각각 서열번호 59, 60, 61, 62, 63, 64 및 65에 나타나 있다. 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의  $V_L$  서열들을 암호화하는 DNA 서열들은 각각 서열번호 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 및 73에 나타나 있다.

<454> 일단  $V_H$  및  $V_L$  분절을 암호화하는 DNA 단편들을 얻는다면, 이러한 DNA 단편들을 표준 재조합 DNA 기술에 의하여 더 조작하여, 예를 들어, 가변 영역 유전자를 전장 항체 사슬 유전자로, Fab 단편 유전자로 또는 scFv 유전자로 변환시킬 수 있다. 이러한 조작에서,  $V_L$ - 또는  $V_H$ -암호화 DNA 단편은 항체 불변 영역 또는 유연한 링커와 같은, 다른 단백질을 암호화하는 다른 DNA 단편과 작동적으로 연결되어 있다. 본 명세서의 맥락에서 사용되는, 용어 “작동적으로 연결된”은, 두 개 DNA 단편들이 연결되어서 그 두 개 DNA 단편들에 의해 암호화된 아미노산 서열들이 프레임 내에 남아있는 것을 의미하는 것으로 의도된다.

<455>  $V_H$ -암호화 DNA를 중쇄 불변 영역들(CH1, CH2, 및 CH3)을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결함으로써  $V_H$  영역을 암호화하는 분리된 DNA를 전장 중쇄 유전자로 변환시킬 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자들의 서열은 당해 분야에 공지되어 있고(예, Kabat, E. A. 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참조), 이러한 영역들을 포함하는 DNA 단편들을 표준 PCR 증폭에 의하여 얻을 수 있다. 상기 중쇄 불변 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있으나, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역이다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우,  $V_H$ -암호화 DNA를 중쇄 CH1 불변 영역만을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결할 수 있다.

<456>  $V_L$ -암호화 DNA를 경쇄 불변 영역, CL을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결함으로써,  $V_L$  영역을 암호화하는 분리된 DNA를 전장 경쇄 유전자(Fab 경쇄 유전자는 물론)로 변환시킬 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열들은 당해 분야에 공지되어 있고(예, Kabat, E. A. 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참조), 이러한 영역들을 포함하는 DNA 단편들은 표준 PCR 증폭에 의하여 얻을 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다.

<457> scFv 유전자를 만들기 위해,  $V_H$ - 및  $V_L$ -암호화 DNA 단편들을 유연한 링커를 암호화하는, 예를 들어, 아미노산 서열  $(Gly_4-Ser)_3$ 을 암호화하는 다른 단편에 작동적으로 연결시켜서,  $V_H$  및  $V_L$  서열들을 상기 유연한 링커로 연결된  $V_L$  및  $V_H$ 를 가지고, 연속적인 단일 사슬 단백질로서 발현하게 할 수 있다(예, Bird 등 (1988) *Science* 242:423-426; Huston 등 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty 등 (1990) *Nature* 348:552-554 참조).

<458> 본 발명의 단일클론 항체의 생산

<459> 본 발명의 단일클론 항체(mAbs)를 통상적인 단일클론 항체 방법, 예를 들어, Kohler 및 Milstein (1975) *Nature* 256:495 의 표준 체세포 하이브리드화 기술을 포함하는 다양한 기술로 생산할 수 있다. 비록 체세포 하이브리드화 과정이 바람직하다 하더라도, 원칙적으로, 단일클론 항체를 생산하는 다른 기술, 예를 들어, B 림프구의 바이러스성 또는 종양원성 형질전환을 사용할 수 있다.

<460> 하이브리도마를 제조하기 위한 바람직한 동물 시스템은 무린 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생산은 매우 잘 확립된 방법이다. 면역화 프로토콜 및 융합용 면역화된 비장세포의 분리 기술은 당해 분야에 공지되어 있다. 융합 파트너들(예를 들어, 무린 골수종 세포) 및 융합 공정 또한 공지되어 있다.

<461> 본 발명의 키메라 또는 인간화 항체들을 전술한 대로 제조된 비-인간 단일클론 항체의 서열에 근거하여 제조할 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린들을 암호화하는 DNA는 관심의 비-인간 하이브리도마로부터 얻을 수 있고, 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 비-무린(예, 인간) 면역글로불린 서열을 포함하도록 조작할 수 있다. 예를



들어, 키메릭 항체를 생성하기 위해, 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 유린 가변 영역을 인간 불변 영역에 연결시킬 수 있다(예, Cabilly 등의 미국 특허 제4,816,567호 참조). 인간화 항체를 만들기 위해, 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 유린 CDR 영역들을 인간 골격으로 삽입할 수 있다(예, Winter의 미국 특허번호 제 5,225,539호 및 Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호 및 제6,180,370호 참조).

<462> 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체들은 인간 단일클론 항체들이다. CD19에 대하여 지정된 그러한 인간 단일클론 항체들은 마우스 시스템보다는 인간 면역 시스템의 부분을 지닌 트랜스유전자성(transgenic) 또는 트랜스염색체성(transchromosomal) 마우스를 사용하여 생산할 수 있다. 이러한 트랜스유전자성 및 트랜스염색체성 마우스는 각각 본 명세서에서 HuMAb 마우스<sup>®</sup> 및 KM 마우스<sup>®</sup>로 지칭되는 마우스를 포함하고, 총칭하여 본원에서 “인간 Ig 마우스”라 지칭한다.

<463> HuMAb 마우스<sup>®</sup>(Medarex<sup>®</sup> 사)는 내인성  $\mu$  및  $\kappa$  사슬 좌위를 비활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께, 정렬되지 않은 인간 중쇄( $\mu$  및  $\gamma$ ) 및  $\kappa$  경쇄 면역글로불린 서열들을 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자 미니좌위(miniloci)를 포함한다(예, Lonberg, 등 (1994) *Nature* 368(6474):856-859 참조). 따라서, 상기 마우스는 마우스 IgM 또는  $\kappa$ 의 감소된 발현을 나타내고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스유전자들은 유형 전환(switching) 및 체세포 돌연변이를 겪게 되어 고친화도 인간 IgG $\kappa$  단일클론 항체를 생성한다(Lonberg, N. 등 (1994) 위 문헌; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. 및 Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, 및 Harding, F. 및 Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546에서 검토됨). HuMAb 마우스<sup>®</sup>의 제조와 사용, 및 상기 마우스에 의한 계능 변형은 Taylor, L. 등 (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. 등 (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon 등 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi 등 (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. 등 (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon 등 (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. 등 (1994) *International Immunology* 6: 579-591; 및 Fishwild, D. 등 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851에 더 설명되어 있는데, 이 모든 것들의 내용은 전체적으로 참조 문헌으로서 본 명세서에 특히 병합된다. Lonberg 및 Kay의 미국 특허번호 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,789,650호; 제5,877,397호; 제5,661,016호; 제5,814,318호; 제5,874,299호; 및 제5,770,429호; Surani 등의 미국 특허번호 제5,545,807호; Lonberg 및 Kay의 PCT 공개번호 제WO 92/03918호, 제WO 93/12227호, 제WO 94/25585호, 제WO 97/13852호, 제WO 98/24884호 및 제WO 99/45962호; 및 Korman 등의 PCT 공개번호 제WO 01/14424호를 더 참조. 인간 람다 경쇄 유전자를 지닌 트랜스유전자성 마우스 또한, Bruggemann의 PCT 공개번호 제 WO 00/26373호에 기술된 것들과 같이, 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 람다 경쇄 트랜스유전자를 지닌 마우스를 인간 중쇄 트랜스유전자를 지닌 마우스(예, HCo7)와, 또한 선택적으로 인간 카파 경쇄 트랜스유전자를 지닌 마우스(예, KCo5)와 교배시켜 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스유전자 둘다를 지닌 마우스를 만들어낼 수 있다(예로서 실시예 1을 참조).

<464> 다른 구체예에서, 본 발명의 인간 항체를, 인간 중쇄 트랜스유전자 및 인간 경쇄 트랜스염색체를 지닌 마우스와 같이, 트랜스유전자 및 트랜스염색체 상에 인간 면역글로불린 서열을 지닌 마우스를 사용하여 키울 수 있다. 이 마우스는 본 명세서에서 “KM 마우스<sup>®</sup>”로 지칭되며, Ishida 등의 PCT 공개번호 제WO 02/43478 호에 더 상세하게 설명되어 있다.

<465> 또한, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 트랜스유전자성 동물 시스템은 당해 분야에서 이용가능하며 본 발명의 항-CD19 항체를 키우는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제노마우스(Abgenix 사)로 지칭되는 대안적 트랜스유전자성 시스템을 사용할 수 있는데; 그러한 마우스는, 예를 들어, Kucherlapati 등의 미국 특허 제 5,939,598호; 제6,075,181호; 제6,114,598호; 제6,150,584호 및 제6,162,963호에 설명되어 있다.

<466> 더구나, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 트랜스염색체성 동물 시스템은 당해 분야에서 이용가능하고 본 발명의 항-CD19 항체를 키우는데 사용될 수 있다. 예를 들어, “TC 마우스”로 지칭되는, 인간 중쇄 트랜스염색체 및 인간 경쇄 트랜스염색체 둘 다를 지닌 마우스를 사용할 수 있는데; 그러한 마우스는 Tomizuka 등 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727에 설명되어 있다. 또한, 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스염색체를 지닌 소는 당해 분야에서 설명되어 있고(예, Kuroiwa 등 (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894 및 PCT 출원번호 제 WO 2002/092812호) 본 발명의 항-CD19 항체를 키우는데 사용될 수 있다.

<467> 본 발명의 인간 단일클론 항체들은 또한 인간 면역글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하는 파지 디스플레이 방법들을 사용하여 제조할 수 있다. 인간 항체들을 분리하는 그러한 파지 디스플레이 방법들은 당해 분야에

확립되어 있다. 예를 들어: Ladner 등의 미국 특허번호 제5,223,409호; 제5,403,484호; 및 제5,571,698호; Dower 등의 미국 특허번호 제5,427,908호 및 제5,580,717호; McCafferty 등의 미국 특허번호 제5,969,108호 및 제6,172,197호; 및 Griffiths 등의 미국 특허번호 제5,885,793호; 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제 6,582,913호, 제6,582,915호 및 제6,593,081호 참조.

<468> 본 발명의 인간 단일클론 항체들은 또한 인간 면역 세포가 재구성되어 인간 항체 반응이 면역화시 발생할 수 있는 SCID 마우스를 사용하여 제조할 수 있다. 그러한 마우스는, 예를 들어, Wilson 등의 미국 특허번호 제 5,476,996호 및 제5,698,767호에 설명되어 있다.

<469> 다른 구체예에서, Buechler 등의 미국 특허번호 제 6,794,132호에 기술된 바와 같이, 인간 항-CD19 항체를 인간 Ig 마우스 및 파지 디스플레이 기법의 조합을 이용하여 제조한다. 더구나 특히, 그 방법은 우선 인간 Ig 마우스 (상기한 HuMab 마우스 또는 KM 마우스와 같은)를 하나 이상의 CD19 항원으로 면역화시킴으로써 상기 마우스에 항-CD19 항체 반응을 키우고, 이어서 핵산 암호화 인간 항체 사슬을 마우스의 림프 세포로부터 분리하고 이러한 핵산을 디스플레이 벡터(예, 파지)에 도입하여 디스플레이 패키지의 라이브러리를 제공하는 것을 포함한다. 따라서, 각 라이브러리 멤버는 인간 항체 사슬을 암호화하는 핵산을 포함하고 각 항체 사슬은 디스플레이 패키지로부터 나타내어진다. 그 다음 라이브러리를 CD19 단백질로 스크리닝하여 CD19에 특이적으로 결합하는 라이브러리 멤버를 분리한다. 그 후 선택된 라이브러리 멤버의 핵산 삽입물(inserts)을 표준 방법에 의하여 분리하고 배열하여 선택된 CD19 바인더의 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 결정한다.  $V_H$  영역이  $C_H$  영역에 작동적으로 연결되고  $V_L$  영역이  $C_L$  영역에 작동적으로 연결될 수 있도록 가변 영역을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 지니는 발현 벡터로 클론화하는 것과 같은, 표준 제조법 DNA 기법에 의하여 가변 영역은 전장 항체 사슬로 전환될 수 있다.

<470> 인간 Ig 마우스의 면역화

<471> 인간 Ig 마우스를 사용하여 본 발명의 인간 항체를 키울 때, Lonberg, N. 등 (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. 등 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; 및 PCT 공개 번호 제WO 98/24884호 및 제WO 01/14424호에 의하여 설명된 바와 같이, 그러한 마우스를 CD19 항원 및/또는 제조법 CD19의 정제되거나 농축된 제조물, 또는 CD19 단백질을 발현하는 세포, 또는 CD19 융합 단백질로 면역화할 수 있다. 바람직하게는, 상기 마우스는 첫 주임시 6-16 주령일 것이다. 예를 들어, CD19 항원의 정제되거나 제조법 제조물(5-50  $\mu$ g)은 복강내로 및/또는 피하로 인간 Ig 마우스를 면역화시키는데 사용될 수 있다. 가장 바람직하게, 본 발명의 항체를 키우는데 사용되는 면역원은 그의 N-말단에서 비-CD19 폴리펩티드(예, His 태그)로 융합된, CD19 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 CD19 융합 단백질이다(실시예 1에서 더 설명함).

<472> 인간 CD19에 결합하는 완전한 인간 단일클론 항체를 생성하는 상세 과정이 하기 실시예 1에 기술되어 있다. 다양한 항원들과의 축적된 실험에 따르면, 트랜스유전자성 마우스는, 프로인트 완전 항원보조제(complete Freund's adjuvant) 내의 항원으로 복강내(IP)로 처음 면역화시킨 후, 프로인트 불완전 항원보조제(incomplete Freund's adjuvant) 내의 항원으로 2 주마다 (총 6 번까지) IP 면역화시킬 때, 반응하는 것으로 나타났다. 그러나, 프로인트 이외의 다른 항원보조제도 효과적이라는 것을 또한 발견하였다(예, 리비 보조제). 덧붙여, 보조제 부재시 완전 세포가 높은 항원성이라는 것도 발견하였다. 안화후방 혈액(retroorbital bleed)에 의하여 얻은 혈장 샘플을 이용한 면역화 프로토콜의 과정에 걸쳐서 면역반응을 모니터할 수 있다. 혈장을 ELISA에 의하여 스크리닝할 수 있고(하기 기술함), 항-CD19 인간 면역글로불린의 충분한 역가를 가진 마우스를 융합에 사용할 수 있다. 예를 들어 비장을 희생 및 제거하기 3일 전에 마우스를 항원으로 정맥내 증폭시킬 수 있다. 각 면역화에 대하여 2-3 개 융합이 수행되는 것이 필요한 것으로 예상된다. 일반적으로, 각 항원에 대하여 6 내지 24 마리 마우스를 면역화시킨다. 통상, HCo7 및 HCo12 세포주 둘 다 사용된다. 또한, HCo7 및 HCo12 트랜스유전자 둘 다를 두 개의 상이한 인간 중쇄 트랜스유전자(HCo7/HCo12)를 가진 단일 마우스 내로 함께 배양할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, KM 마우스<sup>®</sup> 주를 사용할 수 있다.

<473> 본 발명의 인간 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

<474> 본 발명의 인간 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 면역화된 마우스로부터 얻은 비장세포 및/또는 림프절 세포를 분리하고 적절한 무한증식 세포주, 예를 들어, 마우스 골수종 세포주에 융합시킬 수 있다. 결과로 생성된 하이브리도마를 항원-특이적 항체들의 생산을 위하여 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, 면역화된 마우스로부터 얻은 비장 림프구들의 단일 세포 현탁액을 50% PEG를 사용하여, P3X63-Ag8.653을 분비하지 않는 마우스 골수종 세포(ATCC, CRL 1580)의 수의 6분의 1에 융합시킬 수 있다. 대안적으로, 사이토펄스(CytoPulse) 대형 챔버 세포 융합 전기천공기(CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie, Maryland)를 사용하여,



전기장에 기초한 전기융합 방법을 사용함으로써 면역화된 마우스의 비장 림프구의 단일세포 현탁액을 융합시킬 수 있다. 세포를 평평한 바닥 마이크로타이터 플레이트에 약  $2 \times 10^5$ 으로 도달한 후, 20% 태아 클론 혈청, 18% "653" 조건 배양액, 5% 오리젠(IGEN), 4 mM L-글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트, 5mM HEPES, 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50 units/ml 페니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신, 50 mg/ml 겐타마이신 및 1X HAT(Sigma; HAT는 융합 후 24 시간에 첨가)를 함유하는 선택 배지에 2주일 배양한다. 약 2 주일 후에는, 세포를 HAT가 HT로 치환된 배지에서 배양할 수 있다. 그 다음, 개별 웰을 인간 단일클론 IgM 및 IgG 항체들에 대하여 ELISA에 의하여 스크리닝할 수 있다. 일단 광범위한 하이브리도마 성장이 일어나면, 통상 10-14 일후에 배지를 관찰할 수 있다. 하이브리도마를 분비하는 항체를 재도말하고, 다시 스크리닝하고 나서, 인간 IgG에 대하여 여전히 양성이면, 단일클론 항체들을 제한 희석법으로 적어도 두 번 서브클론화할 수 있다. 그 다음 안정된 서브클론들을 시험관 내에서 배양하여 특성화용 조직 배양 배지에서 소량의 항체를 생성할 수 있다.

<475> 인간 단일클론 항체들을 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마를 단일클론 항체 정제용 2-리터 스피너-플라스크에서 성장시킬 수 있다. 단백질 A-세파로즈(Pharmacia, Piscataway, N.J.)를 사용한 친화 크로마토그래피 전에 상청액을 여과하고 농축할 수 있다. 용출된 IgG를 젤 전기영동과 고성능 액체 크로마토그래피로 점검하여 순도를 확실하게 할 수 있다. 완충액을 PBS로 교환할 수 있고, 농도를 1.43 흡광 계수를 사용하여 OD280에 의하여 결정할 수 있다. 상기 단일클론 항체들을 분주하고 -80°C에 보관할 수 있다.

<476> 본 발명의 단일클론 항체를 생산하는 트랜스펙토마의 생성

<477> 또한 본 발명의 항체들을, 예를 들어, 당해 분야에 잘 알려진 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질감염 방법의 조합을 사용하여, 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산할 수 있다(예, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

<478> 예를 들어, 상기 항체 또는 이의 항체 단편을 발현하기 위해, 일부 또는 전장 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA들을, 표준 분자 생물학 기술(예, PCR 증폭 또는 관심의 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용하는 cDNA 클로닝)에 의하여, 얻을 수 있고 이러한 DNA들을 발현 벡터들에 삽입하여 그 유전자가 전사 및 번역 조절 서열에 작동적으로 연결할 수 있다. 이러한 맥락에서, 용어 "작동적으로 연결된"은 항체 유전자가 벡터 내로 결합되어 벡터 내의 전사 및 번역 조절 서열들이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 그들의 의도된 기능을 행하도록 하는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 발현 벡터 및 발현 조절 서열들은 사용되는 발현 숙주 세포에 사용할 수 있도록 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자를 별개의 벡터로 삽입할 수 있거나, 더욱 일반적으로는 두 유전자들을 동일한 발현 벡터로 삽입한다. 상기 항체 유전자들을 표준 방법(예, 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보 제한 자리의 결합, 또는 제한 자리가 없으면 블런트 말단 결합(blunt end ligation))에 의하여 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 본 명세서에서 설명된 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역들은, 그것들을 원하는 이소타입의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 이미 암호화하고 있는 발현 벡터 내로 삽입함으로써, 임의의 항체 이소타입의 전장 항체 유전자를 생성하는데 사용될 수 있는데, 상기 벡터 내에서  $V_H$  분절이  $C_H$  분절(들)과 작동적으로 연결되고 벡터내에서  $V_K$  분절이  $C_K$  분절과 작동적으로 연결된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 상기 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터 상기 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 상기 항체 사슬 유전자를 벡터로 클론화하여 신호 펩티드가 인-프레임(in-frame)으로 항체 사슬 유전자의 아미노산 말단에 연결되게 할 수 있다. 상기 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드(즉, 비-면역글로불린 단백질로부터 유도된 신호 펩티드)일 수 있다.

<479> 상기 항체 사슬 유전자에 더하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 사슬 유전자의 발현을 조절하는 조절 서열들을 지닌다. 용어 "조절 서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 조절하는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소(예, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 그러한 조절 서열들은, 예를 들어, Goeddel(Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))에 설명되어 있다. 조절 서열들의 선택을 포함하여, 발현 벡터의 구성은 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 요소에 달려있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 이해될 것이다. 포유동물 숙주 세포 발현에 대한 바람직한 조절 서열은 포유동물 세포에서 높은 수준의 단백질 발현을 계도하는 바이러스성 요소, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV), 시미언 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스 및 폴리오마 바이러스로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서(예, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(adenovirus major late promoter (AdMLP)))를 포함한다. 대안적으로, 비바이러스성 조절 서열들, 예를 들어, 유비퀴틴 프로모터 또는  $\beta$ -글로빈 프로모터를 사용할 수 있다. 또한, 조절 요소들은, SV40초기 프로모터로부터 유래된 서열들 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 타입 1의 긴 말단 반복체를 포함하는 SR $\alpha$  프로모터 시스템과 같이, 상이한 소스로부터 얻어진 서열들로 구성될 수 있다(Takebe, Y. 등 (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

- <480> 항체 사슬 유전자 및 조절 서열들에 더하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 추가 서열, 예를 들어, 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예, 복제 개시점) 및 선택 마커 유전자와 같은 서열들을 지닐 수 있다. 상기 선택 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다(예, Axcl 등의 미국 특허번호 제 4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호 참조). 예를 들어, 일반적으로, 선택 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포 상에, G418, 하이그로마이신 또는 메토폭렉세이트와 같은 약물에 대한 저항성을 부여한다. 바람직한 선택 마커 유전자는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자(메토폭렉세이트 선택/중폭으로 dhfr- 숙주 세포에서 사용) 및 네오(neo) 유전자(G418 선택용으로)를 포함한다.
- <481> 경쇄 및 중쇄를 발현하기 위해, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)를 표준 기술에 의하여 숙주 세포로 형질감염시킨다. 용어 “형질감염”의 다양한 유형은 외부 DNA를 원핵 또는 진핵 숙주 세포로 도입하는 데 공통적으로 사용되는 다양한 기술, 예를 들어, 전기천공, 칼슘-포스페이트 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등을 포함하는 것으로 의도된다. 비록 본 발명의 항체들을 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현하는 것이 이론적으로 가능하다고 할지라도, 진핵 세포, 및 가장 바람직하게는 포유동물 숙주 세포에서 항체를 발현시키는 것이 가장 바람직한데, 이는 그러한 진핵 세포, 및 특히 포유동물 세포가 원핵 세포보다, 적절히 접히고 면역적으로 활성인 항체를 더 잘 모으고 분비할 것 같기 때문이다. 항체 유전자의 원핵성 발현은 활성 항체를 높은 효율로 생산하는 것에 비효율적이라는 것이 보고되었다(Boss, M. A. 및 Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).
- <482> 본 발명의 재조합 항체들을 발현하기 위한 바람직한 포유동물 숙주 세포는 차이니스 햄스터 난소(CHO 세포)(R. J. Kaufman 및 P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621 에서 설명된 바와 같이, DHFR 선택 마커와 같이 사용되는, Urlaub 및 Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 에서 설명된 dhfr<sup>-</sup> CHO 세포를 포함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 특히, NSO 골수종 세포와 같이 사용하기 위해, 다른 바람직한 발현 시스템은 제WO 87/04462호(Wilson), 제WO 89/01036호(Bebbington) 및 EP 제338,841호(Bebbington)에 개시된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포로 도입될 때, 숙주 세포에서 항체가 발현하기에, 또는 더 바람직하게는 항체가 숙주세포가 성장되는 배양 배지로 분비되기에 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양함으로써, 상기 항체를 생산할 수 있다. 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 항체를 회수할 수 있다.
- <483> 항원에 대한 항체 결합의 특성화
- <484> 예를 들어, 표준 ELISA에 의하여, 인간 CD19에 결합하는 것에 대하여 본 발명의 항체들을 테스트할 수 있다. 간단히 말하면, 미세 역가 플레이트(microtiter plates)를 PBS 중의 0.25 µg/ml로 정제된 것으로 코팅하고 나서, PBS 중의 5% 소 혈청 알부민으로 블로킹시킨다. 항체의 희석물(예, CD19-면역화 마우스로부터의 혈청 희석액)을 각각의 웰에 첨가하고 37℃에서 1-2 시간 동안 배양한다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세척하고 나서, 알카라인 포스파타아제에 접합된 2차 시약(예, 인간 항체에 대하여, 염소-항-인간 IgG Fc-특이적 다중클론 시약)으로 37℃에서 1 시간동안 배양한다. 세척 후, 플레이트를 pNPP 기질(1 mg/ml)로 전개시킨 다음, 405-650의 OD로 분석한다. 바람직하게, 최고의 역가를 전개한 마우스가 융합에 사용될 것이다.
- <485> 또한 상술한 바와 같은 ELISA 분석법을 사용하여 CD19 면역원과의 양성 반응성을 보여주는 하이브리도마를 스크리닝할 수 있다. 높은 결합력 및/또는 친화도로 CD19 단백질에 결합하는 하이브리도마를 서브클론화하고 나아가 특성화한다. 부모 세포의 반응성을 보유하는(ELISA 분석법에 의함), 각 하이브리도마로부터의 하나의 클론을 선택하여 5-10 바이얼 세포 은행(vial cell bank)을 만들어 -140℃에서 저장하고 항체를 정제할 수 있다.
- <486> 항-CD19 항체를 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마를 단일클론 항체 정제용 2-리터 스피너-플라스크에서 성장시킬 수 있다. 단백질 A-세파로즈(Pharmacia, Piscataway, NJ)를 사용한 친화 크로마토그래피 전에 상청액을 여과하고 농축할 수 있다. 용출된 IgG를 젤 전기영동과 고성능 액체 크로마토그래피로 점검하여 순도를 확실하게 할 수 있다. 완충액을 PBS로 교환할 수 있고, 농도를 1.43 흡광계수를 사용하는 OD280으로 결정할 수 있다. 상기 단일클론 항체들을 분주하고 -80℃에 보관할 수 있다.
- <487> 선택된 항-CD19 단일클론 항체가 독특한 에피토프에 결합하고 있는지를 판단하기 위하여, 각 항체를 시판되는 시약(Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 비오틴화할 수 있다. 비표지된 단일클론 항체와 비오틴화된 단일클론 항체를 이용한 경쟁 연구를 상기에서 설명된 CD19 코팅-ELISA 플레이트를 이용하여 수행할 수 있다. 비오틴화된 mAb 결합을 스트렙-아비딘-알카라인 포스파타제 탐침자(strep-avidin-alkaline phosphatase probe)로 검출할 수 있다.
- <488> 정제된 항체들의 이소타입을 결정하기 위해, 특정 이소타입의 항체들에 특이적인 시약을 사용하여 이소타입

ELISA를 수행할 수 있다. 예를 들어, 인간 단일클론 항체의 이소타입을 결정하기 위해, 마이크로타이터 플레이트의 웰을 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 항-인간 면역글로불린으로 밤새 4°C에서 코팅할 수 있다. 1% BSA로 차단한 후, 주위 온도에서 1 내지 2 시간 동안 플레이트를 1  $\mu\text{g/ml}$  이하의 테스트 단일클론 항체들 또는 정제된 이소타입 대조군과 반응시킨다. 다음, 웰을 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이적 알카라인 포스파타제-접합 탐침자와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 전개시키고 전술한 바와 같이 분석한다.

<489> 웨스턴 블랏팅에 의하여, CD19 항원과의 반응성에 대하여 항-CD19 인간 IgG를 더 분석할 수 있다. 간단히 말하면, CD19를 준비하고, 여기에 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 실시한다. 전기영동 후, 분리된 항원들을 니트로셀룰로오스 막에 옮기고, 10% 태아 소혈청으로 차단하며, 테스트될 단일클론 항체들로 탐침한다. 인간 IgG 결합을 항-인간 IgG 알카라인 포스파타제를 사용하여 검출하고 BCIP/NBT 기질 타블렛으로 전개시킬 수 있다(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

<490> 또한 본 발명의 항체의 결합 특이성을, 예를 들어 유세포 분석법에 의하여, CD19 단백질을 발현하는 세포에 대한 항체의 결합을 모니터링함으로써 결정할 수 있다. CD19를 세포의 표면 상에서 발현시키기 위하여, OVCAR3, NCI-H226, CFPAC-1 또는 KB 세포(실시예 3에서 더 설명함)와 같은, CD19 단백질을 자연적으로 발현하는 세포 또는 세포주를 사용하거나 CHO 세포주와 같은, 세포주를 CD19를 암호화하는 발현 벡터로 감염시킬 수 있다. 감염된 단백질은, 태그에 대한 항체를 이용한 탐지용으로서, 바람직하게는 N-말단에서의, myc-태그 또는 his-태그와 같은, 태그를 포함할 수 있다. CD19 단백질에 대한 본 발명의 항체의 결합을 감염된 세포를 항체로 배양하고, 결합한 항체를 탐지함으로써 결정할 수 있다. 감염된 단백질 상에서 태그에 대한 항체의 결합을 양성 대조군으로서 이용할 수 있다.

<491> 이중특이적 분자

<492> 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 항-CD19 항체 또는 이의 단편을 포함하는 이중특이적 분자를 특징으로 한다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부는, 다른 기능성 분자, 예컨대, 다른 펩티드 또는 단백질(예, 다른 항체 또는 수용체에 대한 리간드)로 유도되거나 연결되어 적어도 두 개의 상이한 결합 자리 또는 표적 분자에 결합하는 이중특이적 분자를 생성할 수 있다. 본 발명의 항체는 사실상 하나 이상의 다른 기능성 분자로 유도되거나 연결되어 두 개 이상의 상이한 결합 자리 및/또는 표적 분자에 결합하는 다중특이적 분자를 생성하는데; 그러한 다중특이적 분자들은 또한, 본 명세서에서 사용되는, 용어 “이중특이적 분자”에 의하여 포함되는 것으로 의도된다. 본 발명의 이중특이적 분자를 만들기 위해, 본 발명의 항체를, 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 의태체와 같은, 하나 이상의 다른 결합 분자에 기능적으로 연결시켜(예를 들어, 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유적 결합 또는 기타), 이중특이적 분자를 만들어낸다.

<493> 따라서, 본 발명은 CD19에 대한 적어도 하나의 제 1 결합 특이체 및 제 2 표적 에피토프에 대한 제 2 결합 특이체를 포함하는 이중특이적 분자를 포함한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 상기 제 2 표적 에피토프는 Fc 수용체, 예를 들어, 인간 Fc $\gamma$ RI (CD64) 또는 인간 Fc $\alpha$  수용체 (CD89)이다. 따라서, 본 발명은 Fc $\gamma$ R 또는 Fc $\alpha$ R 발현 작동자 세포(예, 단핵구, 대식세포 또는 다형핵 세포(PMN)), 및 CD19를 발현하는 표적 세포 둘 다에 결합할 수 있는 이중특이적 분자를 포함한다. 이러한 이중특이적 분자들은 CD19 발현 세포를 작동자 세포에 표적화시키고 Fc 수용체-매개 작동자 세포 활성화, 예를 들어, CD19 발현 세포의 대식작용, 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 사이토카인 분비, 또는 슈퍼옥사이드 음이온의 발생을 개시한다.

<494> 이중특이적 분자가 다중특이성인 본 발명의 구체예에서, 상기 분자는 항-Fc 결합 특이체 및 항-CD19 결합 특이체에 더하여, 제 3 결합 특이체를 더 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 상기 제 3 결합 특이체는 항-증진 인자(anti-enhancement factor, EF) 부분, 예를 들어, 세포독성 활성화에 수반된 표면 단백질에 결합하여 표적 세포에 대하여 면역 반응을 증가시키는 분자이다. 상기 “항-증진 인자 부분”은 주어진 분자, 예를 들어 항원 또는 수용체에 결합하는 항체, 기능적 항체 단편 또는 리간드일 수 있고, 따라서 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 대한 결합 결정자의 작용을 향상시키는 결과를 낳는다. 상기 “항-증진 인자 부분”은 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원과 결합할 수 있다. 대안적으로, 상기 항-증진 인자 부분은 제1 및 제2 결합 특이체들이 결합하는 독립체와는 다른 개체에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-증진 인자 부분은 세포독성 T-세포를 결합할 수 있다(예, CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 또는 표적 세포에 대하여 면역 반응을 증진시키는 결과를 가져오는 다른 면역 세포를 통해서).

<495> 한 구체예에서, 본 발명의 이중특이적 분자는 결합 특이체로서 적어도 하나의 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하고, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, dAb 또는 단일 사슬 Fv를 포함한다. 상기 항체는 또한 경쇄 또는 중쇄 이량체, 또는 이의 임의의 최소 단편일 수 있고, 예를 들어 Fv 또는 단일 사슬 구성체일 수 있으며, 이



는 Ladner 등의 미국 특허번호 제 4,946,778 호에 기술되어 있고, 이의 내용은 참조문헌으로서 명백히 본 명세서에 병합된다.

<496> 한 구체예에서, Fc $\gamma$  수용체를 위한 결합 특이체가 단일클론 항체에 의해 제공되며, 이의 결합은 인간 면역글로불린 G(IgG)에 의해 차단되지 않는다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 “IgG 수용체”는 염색체 1 상에 위치한 8 개  $\gamma$ -사슬 유전자들 중의 임의의 것을 지칭한다. 이러한 유전자들은 총 12 개의 트랜스멤브레인 또는 용해성 수용체 이소형태를 암호화하고 이들은 세 가지 Fc $\gamma$  수용체 군으로 나뉜다: Fc $\gamma$ RI(CD64), Fc $\gamma$ RII(CD32), 및 Fc $\gamma$ RIII(CD16). 바람직한 한 구체예에서, Fc $\gamma$  수용체는 인간 고친화성 Fc $\gamma$ RI이다. 인간 Fc $\gamma$ RI은 72 kDa 분자이고, 단량체성 IgG에 대하여 높은 친화도( $10^8 - 10^9 M^{-1}$ )를 보여준다.

<497> 소정의 바람직한 항-Fc $\gamma$  단일클론 항체들의 생산 및 특성화는 Fanger 등의 PCT 공개번호 제WO 88/00052호 및 미국 특허번호 제4,954,617호에 기술되어 있고, 이의 교시는 본 명세서에 참조문헌으로서 완전히 병합된다. 이러한 항체들은 수용체의 Fc $\gamma$ 의 결합 자리와 구별되는 자리에서 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 또는 Fc $\gamma$ RIII의 에피토프에 결합하고, 따라서, 그들의 결합은 IgG의 생리적 수준에 의해서 실질적으로 차단되지 않는다. 본 발명에 유용한 특이성 항-Fc $\gamma$ RI 항체들은 mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 및 mAb 197이다. mAb 32 를 생산하는 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection), ATCC 등록번호 HB9469로부터 입수가능하다. 다른 구체예에서, 상기 항-Fc $\gamma$  수용체 항체는 단일클론 항체 22(H22)의 인간화 형태이다. H22 항체의 생산과 특성화는 Graziano, R. F. 등 (1995) *J. Immunol.* **155** (10):4996-5002 및 Tempest 등의 PCT 공개번호 제WO 94/10332호에 기술되어 있다. H22 항체 생산 세포주는 지정 HA022CL1 하에서 아메리칸 타입 컬렉션에 기탁되었고 및 등록번호 CRL 11177을 가진다.

<498> 다른 바람직한 구체예에서, Fc 수용체에 대한 결합특이성이 인간 IgA 수용체, 예를 들어, Fc $\alpha$ RI (CD89)에 결합하는 항체에 의해 제공되며, 이의 결합은 바람직하게는 인간 면역글로불린 A(IgA)에 의해 차단되지 않는다. 용어 “IgA 수용체”는 염색체 19 상에 위치한 하나의  $\alpha$ -유전자(Fc $\alpha$ RI)의 유전자 산물을 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 유전자는 55 내지 110 kDa의 수 개의 교호적으로 스플라이스된 트랜스멤브레인 이소형태를 암호화하는 것으로 알려져 있다. Fc $\alpha$ RI(CD89)은 단핵구/대식세포, 호산구 및 호중구 과립세포 상에 구조적으로 발현되나, 비-작동자(non-effector) 세포군 상에서는 아니다. Fc $\alpha$ RI은 IgA1 및 IgA2 둘 다에 대하여 중간 정도의 친화도( $\approx 5 \times 10^7 M^{-1}$ )를 가지며, 이는 G-CSF 또는 GM-CSF와 같은 사이토카인류에 노출시 증가된다(Morton, H. C. 등 (1996) *Critical Reviews in Immunology* **16**:423-440). A3, A59, A62 및 A77로서 동정된, IgA 리간드 결합 도메인 외부의 Fc $\alpha$ RI과 결합하는, 4 개 Fc $\alpha$ RI-특이성 단일클론 항체가 설명된다(Monteiro, R. C. 등 (1992) *J. Immunol.* **148**:1764).

<499> Fc $\alpha$ RI 및 Fc $\gamma$ RI은 본 발명의 이중특이적 분자에 사용하기에 바람직한 개시 수용체인데, 이는 그것들이 (1) 면역 작동자 세포, 예를 들어, 단핵구, PMN, 대식세포 및 수지상 세포 상에서 일차적으로 발현되고; (2) 높은 수준(예, 세포당 5,000-100,000)으로 발현되며; (3) 세포독성 활성의 매개자이고(예, ADCC, 대식작용); 및 (4) 그것들에 표적화된, 자체-항원을 포함한, 항원의 향상된 항원 제시를 매개하기 때문이다.

<500> 인간 단일클론 항체가 바람직하지만, 본 발명의 이중특이적 분자에 사용될 수 있는 다른 항체는 무린, 키메라 및 인간화 단일클론 항체이다.

<501> 본 발명의 이중특이적 분자는 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여, 구성적 결합 특이체, 예를 들어, 항-FcR 및 항-CD19 결합 특이체들을 접합함으로써 제조할 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 분자의 각 결합 특이체는 분리적으로 생성되고 이후에 서로 접합될 수 있다. 상기 결합 특이체들이 단백질 또는 펩티드인 경우, 다양한 커플링 또는 교차결합 제제가 공유결합성 접합에 사용될 수 있다. 교차결합 제제의 예는 단백질 A, 카보디이미드, N-석신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)(DTNB), o-페닐렌디말레이미드(oPDM), N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 및 설포석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트(sulfo-SMCC)를 포함한다(예, Karpovsky 등 (1984) *J. Exp. Med.* **160**:1686; Liu, MA 등 (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8648 참조). 다른 방법들은 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan 등 (1985) *Science* **229**:81-83, 및 Glennie 등 (1987) *J. Immunol.* **139**: 2367-2375에 설명된 것들을 포함한다. 바람직한 접합 제제는 SATA 및 sulfo-SMCC이고, 둘 다 Pierce Chemical Co.(Rockford, IL)에서 입수할 수 있다.

<502> 결합 특이체들이 항체인 경우, 이들을 두 개 중쇄의 C-말단 힌지 영역의 설피드릴 결합을 통해 접합시킬 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 접합 전에, 힌지 영역은 변형되어 홀수의 설피드릴 잔기, 바람직하게는 하나를

포함한다.

- <503> 대안적으로, 양 쪽 결합 특이체들은 동일 벡터에서 암호화되고, 동일한 숙주 세포에서 발현하고 결합될 수 있다. 이러한 방법은 상기 이중특이적 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> 또는 리간드 x Fab 융합 단백질인 경우 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이적 분자는 하나의 단일 사슬 항체와 결합 결정자를 포함하는 단일 사슬 분자, 또는 두 개 결합 결정자를 포함하는 단일 사슬 이중특이적 분자일 수 있다. 이중특이적 분자는 적어도 두 개 단일 사슬 분자를 포함할 수 있다. 이중특이적 분자를 제조하기 위한 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 제5,260,203호; 제5,455,030호; 제4,881,175호; 제5,132,405호; 제5,091,513호; 제5,476,786호; 제5,013,653호; 제5,258,498호; 및 제5,482,858호에 설명되어 있고, 이들 모두는 본 명세서에 참조문헌으로서 명백히 병합된다.
- <504> 이중특이적 분자가 그의 특이적 표적에 결합하는 것을, 예를 들어, 효소연관 면역흡착법(ELISA), 방사능면역분석(RIA), FACS 분석, 생체분석(예, 성장 억제), 또는 웨스턴 블랏 분석에 의하여 확인할 수 있다. 이러한 분석법의 각각은 일반적으로, 관심의 복합체에 특이적인 표지 시약(예, 항체)을 사용함으로써, 특정 관심의 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들어, FcR-항체 복합체는 예컨대 항체-FcR 복합체를 인식하고 특이적으로 결합하는 효소-연계 항체 또는 항체 단편을 사용하여 검출될 수 있다. 대안적으로, 상기 복합체는 다양한 다른 면역분석법 중 임의의 것을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 방사능으로 표지되고 방사능면역분석(radioimmunoassay, RIA)에서 사용될 수 있다(예를 들어, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986 참조, 이는 본 명세서에 참조 문헌으로 기재됨). 방사능 동위원소는  $\gamma$  계수기 또는 신틸레이션 계수기(scintillation counter)와 같은 수단을 사용하여 또는 자가방사기록법(autoradiography)으로 검출될 수 있다.
- <505> 링커(Linkers)
- <506> 본 발명은 화학적 링커를 통해 항체가 상기 파트너에 연결되는 항체-파트너를 제공한다. 어떤 구체예에서, 링커는 펩티딜 링커이고, 본 명세서에  $(L^4)_p-F-(L^1)_m$ 로 표시된다. 다른 링커는 하이드라진 및 디설파이드 링커들이고, 각각,  $(L^4)_p-H-(L^1)_m$  또는  $(L^4)_p-J-(L^1)_m$ 로 표시된다. 파트너에 부착된 링커에 부가하여, 본 발명은 또한 필수적인 임의의 분자 중에 부착하기에 적절한 분리가능한(cleavable) 링커 가치를 제공한다. 본 발명의 링커 가치의 양상은 치료 부분(moiety)에 대한 이들의 부착을 참고로 하여 본 명세서에 예시된다. 그러나, 링커는 진단용 제제, 분석용 제제, 생분자, 표적화 제제, 검출가능한 표지 등을 포함하나 이에 한정되지 않고, 다양한 중에 부착될 수 있다는 것이 당업자에게는 자명할 것이다.
- <507> 항체-파트너 접합체에서 펩티딜 및 다른 링커들의 용도는 미국 임시 특허출원 일련번호 제 60/295,196호; 제 60/295,259호; 제 60/295,342호; 제 60/304,908호; 제 60/572,667호; 제 60/661,174호; 제 60/669,871호; 제 60/720,499호; 제 60/730,804호; 및 제 60/735,657호; 그리고 미국 특허출원 일련번호 제 10/160,972호; 제 10/161,234호; 제 11/134,685호; 제 11/134,826호; 및 제 11/398,854호 및 미국 특허번호 제6,989,452호 및 PCT 특허출원 번호 제 PCT/US2006/37793호에 기술되어 있으며, 이들 모두는 참조 문헌으로서 본 명세서에 병합된다.
- <508> 추가 링커들은 미국 특허 번호 제 6,214,345 호(Bristol-Myers Squibb), 미국 특허출원 번호 제 2003/0096743 호 및 미국 특허출원 번호 제 2003/0130189 호(둘다 Seattle Genetics에 속함), de Groot 등, J. Med. Chem. 42, 5277 (1999); de Groot 등, J. Org. Chem. 43, 3093 (2000); de Groot 등, J. Med. Chem. 66, 8815, (2001); 제WO 02/083180호 (Syntarga); Carl 등, J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981); Dubowchik 등, Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998); 및 제 60/891,028호(2007년 2월 21일에 출원됨)에 기술되어 있다.
- <509> 한 관점에서, 본 발명은 치료제 및 마커에 표적화기(targeting groups)를 부착하는데 유용한 링커에 관한 것이다. 다른 관점에서, 본 발명은 화합물에 안정성을 부여하거나, 그들의 생체내 독성을 감소시키거나, 그렇지 않으면, 그들의 약물동력학, 생물학적 이용효능 및/또는 약물역학에 유리하게 영향을 미치는 링커를 제공한다. 그러한 구체예에서, 약물이 작용의 자리에 전달되면, 상기 링커는 분리되어 활성 약물을 방출하는 것이 일반적으로 바람직하다. 따라서, 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 링커는 흔적이 없어서, 일단 치료제 또는 마커로부터 제거되면(예를 들어 활성화 동안에), 링커의 존재 흔적은 남지 않는다.
- <510> 본 발명의 다른 구체예에서, 링커들은 치료 작용 또는 마커 활성의 자리에서와 같은 표적 세포의 자리에서 또는

근처에서 분리될 수 있는 그들의 능력에 의해 특징지워진다. 그러한 분리는 자연에서 효소적일 수 있다. 이 특징은 치료제 또는 마커의 전신 활성을 감소시키고 독성 및 전신 부작용을 감소시키는 것에 도움을 준다. 효소적 분리의 바람직한 분리가능한 기는 펩티드 결합, 에스테르 결합, 및 디설파이드 결합을 포함한다. 다른 구체예에서, 링커는 pH에 민감하고, pH의 변화를 통해 분리된다.

<511> 본 발명의 한 중요한 관점은 링커가 분리되는 속도를 조절하는 능력이다. 때때로 빨리 분리하는 링커가 바람직하다. 그러나 어떤 구체예에서, 더 느리게 분리하는 링커가 바람직할 수 있다. 예를 들면, 지속 방출 제형(sustained release formulation) 또는 빠른 방출 및 느린 방출 성분 둘다를 가진 제형(formulation)에서 더 느리게 분리하는 링커를 제공하는 것이 유용할 수 있다. 제WO 02/096910호는 하이드라진 링커를 갖는 여러 개의 특정 리간드-약물 복합체를 제공한다. 그러나, 요구되는 고리화(cyclization)의 속도에 따라 링커 조성물을 조절할 수 있는 방법은 없고 상술된 특정 화합물이 많은 약물-링커 접합체에 바람직한 것보다 더 느린 속도로 약물로부터 리간드를 분리한다. 이와 대조적으로, 본 발명의 하이드라진 링커는 매우 빠른 것에서 매우 느린 것까지의 고리화 속도 범위를 제공하고, 이에 의하여 바람직한 고리화 속도에 기초한 특정 하이드라진 링커의 선택이 가능하다.

<512> 예를 들어, 매우 빠른 고리화는 분리시 단일한 5-멤버 고리를 생산하는 하이드라진 링커로 성취될 수 있다. 세포에 세포독성제를 표적 전달하는 바람직한 고리화 속도는 분리시 제미널 위치(geminal position)에 2개의 메틸기를 갖는 링커로부터 얻어진 두 개의 5-멤버 고리 또는 단일 6-멤버 고리를 생산하는 하이드라진 링커를 사용하여 성취될 수 있다. 젼-디메틸 효과(gem-dimethyl effect)는 제미널 위치에 2개의 메틸기가 없는 단일 6-멤버 고리에 비해 고리화 반응 속도를 가속하는 것으로 보여졌다. 이는 스트레인(strain)이 고리에서 느슨해짐으로 인한 것이다. 그러나, 때때로 치환기들은 그것을 빠르게 하는 대신에 반응을 느리게 할 수 있다. 흔히 자연의 이유는 입체 장애일 수 있다. 예를 들어, 젼 디메틸 치환은 제미널 탄소(geminal carbon)가  $\text{CH}_2$ 일 때에 비해 훨씬 빠른 고리화 반응을 허용한다.

<513> 그러나, 어떤 구체예에서, 더 느리게 분리하는 링커가 바람직할 수 있다는 것을 주의하는 것이 중요하다. 예를 들면, 지속 방출 제형에서 또는 빠른 방출과 느린 방출 성분 둘 다를 갖는 제형에서, 더 느리게 분리하는 링커를 제공하는 것이 유용할 수 있다. 어떤 구체예에서, 느린 고리화 속도는, 분리시, 젼-디메틸 치환이 없이, 단일 6-멤버 고리 또는 단일 7-멤버 고리를 생산하는 하이드라진 링커를 사용하여 성취할 수 있다.

<514> 또한 링커는 순환 중에 분해에 대항하여 치료적 제제 또는 마커를 안정화시키는 작용을 한다. 그러한 안정화는 부착된 제제 또는 마커의 순환 반감기를 연장하기 때문에 이 특징은 유의한 이점을 제공한다. 또한 링커는 부착된 제제 또는 마커의 활성을 약화시켜서 접합체를 순환 중에 상대적으로 양성을 띠게하여(relatively benign), 원하는 작용 자리에서 활성화 후에, 원하는 효과, 예를 들면, 독성을 갖게 한다. 치료적 제제 접합체에 대해서, 링커의 이 특징이 제제의 치료 지표를 개선한다.

<515> 바람직하게 안정화기는 혈액 또는 비-표적 조직에 존재할 수 있는 효소에 의한 치료적 제제 또는 마커의 제거 및 대사를 제한하기 위해서 선택되며, 더 나아가 제제 또는 마커가 세포로 이동하는 것을 제한하기 위해 선택된다. 안정화기는 제제 또는 마커의 분해를 차단하는 작용을 하고, 또한 제제 또는 마커의 다른 물리학적 특성을 제공하는 작용도 할 수 있다. 안정화기는 또한 제형화된 또는 비-제형화된 형태로 저장되는 제제 또는 마커의 안정성을 개선할 수 있다.

<516> 이상적으로, 37°C에서 2시간 동안 인간 혈액내에 제제 또는 마커를 저장함으로써 테스트시 안정화기가 분해로부터 제제 또는 마커를 보호한다면, 안정화기는 치료적 제제 또는 마커를 안정화시키는데 유용하며 주어진 분석 조건하에서 인간 혈액내에 존재하는 효소에 의해 20% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 더욱 바람직하게는 5% 미만 및 더더욱 바람직하게는 2% 미만으로 제제 또는 마커를 분리하게 된다.

<517> 또한 본 발명은 이러한 링커들을 포함하는 접합체에 관한 것이다. 더욱 특별하게, 본 발명은 질병의 치료, 특히 암 화학요법에 사용될 수 있는 전구약물에 관한 것이다. 특히, 본 명세서에 기술된 링커들의 사용은 유사한 구조의 전구약물에 비해 혈액내에서 작용의 높은 특이성, 감소된 독성 및 개선된 안정성을 나타내는 전구약물을 제공한다.

<518> 본 명세서에 기술된 본 발명의 링커는 파트너 분자 내의 다양한 위치에 존재할 수 있다.

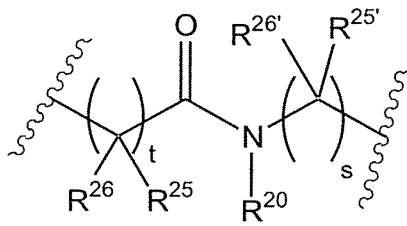
<519> 따라서, 그러한 기를 결합하는 구성체들의 속도에 비해 증진된 속도로, 생체내, 예컨대, 혈액류에서 분리될 그의 사슬의 부분으로서 임의의 다양한 기들을 포함하는 링커를 제공한다. 또한 치료적 제제 및 진단용 제제와 링커 가지의 접합체도 제공한다. 링커는 치료적 제제의 전구약물 유사체를 형성하고 치료적 제제 또는 진단용 제



제를 표적화 제제, 검출가능한 표지, 또는 고형 지지체에 가역적으로 연결하는데 유용하다. 링커를 세포독소를 포함하는 복합체에 함입할 수 있다.

- <520> 항체에 대한 전구약물의 부착은 종래의 세포독소적 약물의 항체 접합체에 비하여 추가적인 안전상 장점을 줄 수 있다. 전구약물의 활성화는, 종양 세포 내에서 및 혈장을 포함하는 몇 개의 정상 조직에서, 에스테라제에 의하여 성취될 수 있다. 인간 내에서의 관련 에스테라제 활성화의 수준은, 마우스에서 관찰되는 것보다 덜 하지만, 래트(rats) 및 비-인간 영장류에서 관찰되는 것과 매우 유사한 것으로 보여진다. 또한 전구약물의 활성화는 글루쿠로니다제에 의한 분리에 의하여 성취될 수 있다.
- <521> 분리가 가능한 펩티드, 하이드라진, 또는 디설파이드 기에 부가하여, 하나 이상의 자기-희생 링커기  $L^1$ 은 세포독소와 표적화 제제 사이에 임의로 도입된다. 또한 이러한 링커기는 스페이서기(spacer groups)로 기술될 수도 있으며, 적어도 2개의 반응성 기능기(functional groups)를 포함한다. 전형적으로, 스페이서기의 하나의 화학적 기능성기(functionality)는 치료 제제, 예를 들면, 세포독소의 화학적 기능성기에 결합되고, 반면에 상기 스페이서기의 다른 화학적 기능성기는 표적화 제제 또는 분리가 가능한 링커의 화학적 기능성기에 결합하는데 사용된다. 스페이서기의 화학적 기능성기의 예는 하이드록시, 메르캅토, 카르보닐, 카르복시, 아미노, 케톤, 및 메르캅토기들을 포함한다.
- <522>  $L^1$ 으로 표시되는, 자기-희생 링커는 일반적으로 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 또는 치환 또는 비치환 헤테로알킬 기이다. 한 구체예에서, 알킬 또는 아릴 기는 1개 및 20개 사이의 탄소 원자를 포함한다. 또한 그것들은 폴리에틸렌글리콜 부분도 포함할 수 있다.
- <523> 예시적 스페이서기는, 예를 들어, 6-아미노헥사놀, 6-메르캅토헥사놀, 10-하이드록시데칸산, 글리신 및 다른 아미노산, 1,6-헥산디올,  $\beta$ -알라닌, 2-아미노에탄올, 시스테아민(2-아미노에탄티올), 5-아미노펜탄산, 6-아미노헥산산, 3-말레이미도벤조산, 프탈리드,  $\alpha$ -치환 프탈리드, 카르보닐기, 아민성 에스테르, 헥산, 펩티드 등을 포함한다.
- <524> 스페이서는 부가적인 분자 부분 및 화학적 기능성기를 세포독소-표적화 제제 복합체 내로 도입하게 할 수 있다. 일반적으로, 부가적인 부분 및 기능성기는 상기 복합체의 혈장 반감기 및 다른 성질들에 영향을 줄 것이다. 따라서, 스페이서기의 신중한 선택을 통하여, 혈장 반감기 범위를 갖는 세포독소 복합체를 생산할 수 있다.
- <525> 약물 부분에 직접 인접하여 위치한 스페이서(들)는 또한  $(L^1)_m$ 으로 나타내며, 여기에서 m은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 및 6으로부터 선택된 정수이다. 다중  $L^1$  스페이서가 존재할 때, 동일한 또는 상이한 스페이서를 사용할 수 있다.  $L^1$ 은 임의의 자기-희생기일 수 있다.
- <526>  $L^4$ 는 상기 부분을 포함하는 링커를 사용하여 접합체에 증가된 용해성 또는 감소된 응집성을 바람직하게 부여하거나 상기 접합체의 가수분해 속도를 변경하는 링커 부분이다.  $L^4$  링커는 자기-희생이 될 필요가 없다. 한 구체예에서,  $L^4$  부분은 직쇄, 분지쇄, 또는 고리일 수 있는, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로알킬, 또는 비치환 헤테로알킬이다. 치환기는, 예를 들면, 저급( $C^1-C^6$ )알킬, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 또는 디알킬아미노일 수 있다. 어떤 구체예에서,  $L^4$ 는 비-고리형 부분을 포함한다. 다른 구체예에서,  $L^4$ 는 임의의 양 또는 음으로 하전된 아미노산 폴리머, 예를 들면, 폴리로신 또는 폴리아르게닌을 포함한다.  $L^4$ 는 폴리에틸렌 글리콜 부분과 같은 폴리머를 포함할 수 있다. 부가적으로,  $L^4$  링커는 예를 들면, 폴리머 성분 및 작은 화학적 부분 둘 다를 포함할 수 있다.
- <527> 바람직한 구체예에서,  $L^4$ 는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분을 포함한다.  $L^4$ 의 PEG 부분은 1-50개 단위의 길이일 수 있다. 바람직하게는, PEG는 1-12개의 반복 단위, 더욱 바람직하게는 3-12개의 반복 단위, 더욱 바람직하게는 2-6개의 반복 단위, 또는 심지어 더 바람직하게는 3-5개의 반복 단위 및 가장 바람직하게는 4개의 반복 단위를 가질 것이다.  $L^4$ 는 단지 PEG 부분만으로 구성되거나, 부가적인 치환 또는 비치환 알킬 또는 헤테로알킬을 또한 포함할 수 있다.  $L^4$  부분의 일부로서 PEG를 조합하여 복합체의 수용성을 향상시키는 것이 유용하다. 부가적으로, PEG 부분은 항체에 약물이 접합하는 동안 일어날 수 있는 응집의 정도를 감소시킨다.

<528> 어떤 구체예에서,  $L^4$  는  $(AA^1)_c$ 의 N-말단에 직접 부착되는



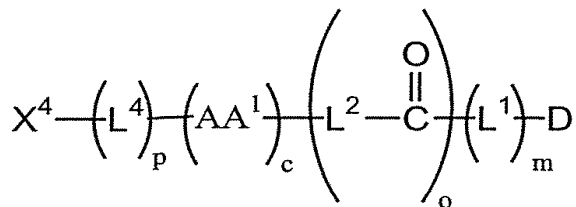
<529>

<530> 을 포함한다.  $R^{20}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택되는 멤버이다. 각  $R^{25}$ ,  $R^{25'}$ ,  $R^{26}$ , 및  $R^{26'}$ 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되고; s 및 t는 1 내지 6으로부터 독립적으로 선택되는 정수들이다. 바람직하게,  $R^{20}$ ,  $R^{25}$ ,  $R^{25'}$ ,  $R^{26}$  및  $R^{26'}$ 는 소수성이다. 어떤 구체예에서,  $R^{20}$ 은 H 또는 알킬(바람직하게, 비치환 저급 알킬)이다. 어떤 구체예에서,  $R^{25}$ ,  $R^{25'}$ ,  $R^{26}$  및  $R^{26'}$ 는 독립적으로 H 또는 알킬(바람직하게, 비치환  $C^1$  내지  $C^4$ 까지의 알킬)이다. 어떤 구체예에서,  $R^{25}$ ,  $R^{25'}$ ,  $R^{26}$  및  $R^{26'}$ 는 모두 H이다. 어떤 구체예에서, t는 1이고 s는 1 또는 2이다.

<531> **펩티드 링커 (F)**

<532> 상술한 바와 같이, 본 발명의 펩티드 링커는 다음의 일반식으로 표시될 수 있다:  $(L^4)_p-F-(L^1)_m$ , 여기에서 F는 펩티드 부분을 포함하는 링커 부분을 나타낸다. 한 구체예에서, F 부분은 임의의 부가적인 자기-희생 링커(들),  $L^2$ , 및 카르보닐기를 포함한다. 다른 구체예에서, F 부분은 아미노기 및 임의의 스페이서기(들),  $L^3$ 를 포함한다.

<533> 따라서, 한 구체예에서, 펩티드 링커를 포함하는 접합체는 다음 식 (a)의 구조를 포함한다:

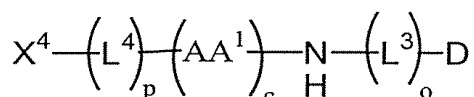


<534>

<535> 이 구체예에서,  $L^1$ 은 상술된 바와 같이, 자기-희생 링커이고,  $L^4$ 는 상술된 바와 같이, 증가된 용해성 또는 감소된 응집성을 부여하거나 가수분해율을 변경하는 부분이다.  $L^2$ 는 자기-희생 링커(들)를 나타낸다. 덧붙여, m은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이고; o 및 p는 독립적으로 0 또는 1이다.  $AA^1$ 은 하나 이상의 천연 아미노산, 및/또는 비천연  $\alpha$ -아미노산을 나타내고; c는 1 내지 20의 정수이다. 어떤 구체예에서, c는 2 내지 5의 범위에 있거나, 또는 c는 2 또는 3이다.

<536> 상기 식 (a)의 본 발명의 펩티드 링커에서,  $AA^1$ 은 그의 아미노 말단에서  $L^4$ 에 직접 연결되거나, 또는  $L^4$ 가 부재하는 경우,  $X^4$ 기(즉, 표적화 제제, 검출가능한 표지, 보호된 반응성 기능기 또는 비보호된 반응성 기능기)에 직접 연결된다. 어떤 구체예에서,  $L^4$ 가 존재하면,  $L^4$ 는  $(AA^1)_c$ 의 N-말단에 직접 부착된 카르복실 아실기를 포함하지 않는다. 따라서, 이들 구체예에서, 미국 특허 번호 제 6,214,345호의 펩티드 링커에서는 필요한, 카르복실 아실 단위가  $L^4$ 와  $X^4$  중의 하나와  $AA^1$  사이에 직접 있을 필요는 없다.

<537> 다른 구체예에서, 펩티드 링커를 포함하는 접합체는 다음 식 (b)의 구조를 포함한다:



<538>

<539>

이 구체예에서,  $L^4$ 는 상술된 바와 같이, 바람직하게 증가된 용해성 또는 감소된 응집성을 부여하거나 가수분해를 변경하는 부분이고;  $L^3$ 는 일차 또는 이차 아민 또는 카르복실 기능기를 포함하는 스페이서기이며,  $L^3$ 의 아민은 D의 매달린(pendant) 카르복실 기능기와 아마이드 결합을 형성하거나 또는  $L^3$ 의 카르복실은 D의 매달린 아민 기능기와 아마이드 결합을 형성하고; o 및 p는 독립적으로 0 또는 1이다.  $AA^1$ 는 하나 이상의 천연 아미노산, 및/또는 비천연  $\alpha$ -아미노산을 나타내고; c는 1 내지 20의 정수이다. 이 구체예에서,  $L^1$ 은 없다(즉, m은 일반식에서 0임).

<540>

상기 식 (b)의 본 발명의 펩티드 링커에서,  $AA^1$ 은 그의 아미노 말단에서  $L^4$ 에 직접 연결되거나, 또는  $L^4$ 가 부재하는 경우,  $X^4$ 기(즉, 표적화 제제, 검출가능한 표지, 보호된 반응성 기능기 또는 비보호된 반응성 기능기)에 직접 연결된다. 어떤 구체예에서,  $L^4$ 가 존재하면,  $L^4$ 는  $(AA^1)_c$ 의 N-말단에 직접 부착된 카르복실 아실기를 포함하지 않는다. 따라서, 이들 구체예에서, 미국 특허 번호 제 6,214,345호의 펩티드 링커에서는 필요한, 카르복실 아실 단위가  $L^4$ 와  $X^4$  중의 하나와  $AA^1$  사이에 직접 있을 필요는 없다.

<541>

자기-희생 링커  $L^2$

<542>

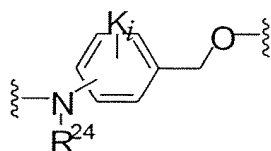
자기-희생 링커  $L^2$ 는 두 개의 간격이 있는 화학적 부분을 함께 공유적으로 연결시켜 정상적으로 안정한 세 부분으로 된 분자를 형성할 수 있는 2-기능성 화학적 성분으로, 효소적 분리 수단에 의해 상기 세 부분으로 된 분자로부터 상기의 간격이 있는 화학적 부분 중의 하나를 방출하고; 상기 효소적 분리 후에, 상기의 간격이 있는 화학적 부분 중 다른 하나를 상기 분자의 잔여 부분으로부터 자발적으로 분리하여 방출한다. 본 발명에 따라, 자기-희생 스페이서를 그의 한쪽 끝에서 펩티드 부분에 공유적으로 연결시키고, 그의 다른 쪽 끝에서 유도체화가 약리학적 활성을 억제하는 약물 부분의 화학적 반응성 자리에 공유적으로 연결시켜, 결과적으로 펩티드 부분과 약물 부분을 함께 구분하고 공유적으로 연결하여 세 부분으로 된 분자를 형성하는데, 이것은 표적 효소가 없을 때는 안정되고 약리학적으로 비활성이지만, 스페이서 부분과 펩티드 부분을 공유적으로 연결하는 결합부에서 표적 효소에 의해 효소적으로 분리되어 세 부분으로 된 분자로부터 펩티드 성분을 방출하는데 영향을 준다. 그러한 효소적 분리는, 다시, 스페이서 부분의 자기-희생적 특성을 활성화하고 약물 부분에 스페이서 부분을 공유적으로 연결하는 결합부의 자발적 분리를 개시하는데, 그렇게 함으로써 약물을 약리학적으로 활성인 형태로 방출하는데 영향을 준다.

<543>

자기-희생 링커  $L^2$ 는 임의의 자기-희생기일 수 있다. 바람직하게는  $L^2$ 는 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로사이클로알킬, 치환 헤테로사이클로알킬, 치환 및 비치환 아릴, 및 치환 및 비치환 헤테로아릴이다.

<544>

특히 바람직한 자기-희생 스페이서  $L^2$ 는 식 (c)에 의하여 나타낼 수 있다:



<545>

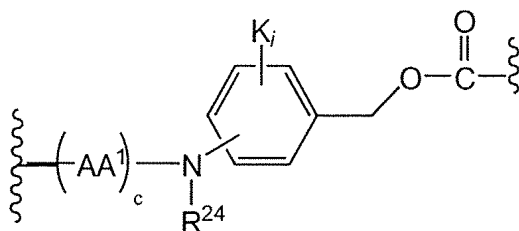
<546>

아미노벤질기의 방향족 고리는 하나 이상의 “K” 기로 치환될 수 있다. “K” 기는, 고리 구조의 일부인 4개의 비치환 탄소 중 하나에 부착된 수소를 대체한 방향족 고리 상의 치환기이다. “K” 기는 할로젠과 같은 단일 원자일 수 있고, 또는 알킬, 헤테로알킬, 아미노, 니트로, 하이드록시, 알콕시, 할로알킬, 및 시아노와 같은 다-원자기일 수 있다. 각 K는 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬, 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠,  $NO_2$ ,

$NR^{21}R^{22}$ ,  $NR^{21}COR^{22}$ ,  $OCONR^{21}R^{22}$ ,  $OCOR^{21}$ , 및  $OR^{21}$ 로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되는데, 여기에서  $R^{21}$  및  $R^{22}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬 및 비치환 헤테로사이클로알킬로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된다. 예시적인 K 치환기는 F, Cl, Br, I,  $NO_2$ , OH,  $OCH_3$ ,  $NHCOCH_3$ ,  $N(CH_3)_2$ ,  $NHCOCF_3$  및 메틸을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. “ $K_i$ ”에서,  $i$ 는 0, 1, 2, 3, 또는 4의 정수이다. 한 바람직한 구체예에서,  $i$ 는 0이다.

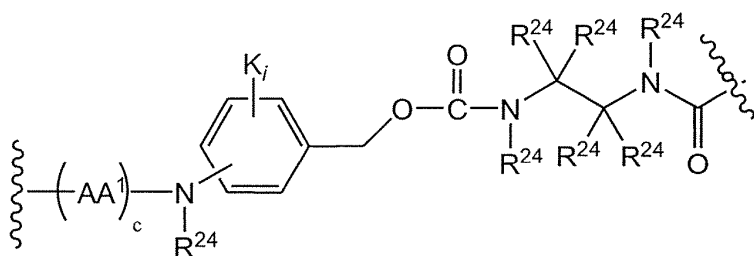
<547> 상기에서 보여진 구조의 에테르 산소 원자는 카르보닐기에 연결된다.  $NR^{24}$  기능성기로부터 방향족 고리로 난 선은, 아민 기능성기가 고리를 형성하면서  $-CH_2-O-$  기에 의해 치환되지 않는 5개의 탄소 중 임의의 것에 결합됨을 나타낸다. 바람직하게, X의  $NR^{24}$  기능성기는  $-CH_2-O-$  기에 대한 para 위치에서 방향족 고리에 공유적으로 결합되어 있다.  $R^{24}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 및 비치환 헤테로알킬로 구성된 군으로부터 선택되는 멤버이다. 특정 구체예에서,  $R^{24}$ 는 수소이다.

<548> 한 구체예에서, 본 발명은 상기 식 (a)의 펩티드 링커를 제공하는데, 여기에서, F는 다음 구조를 포함한다:



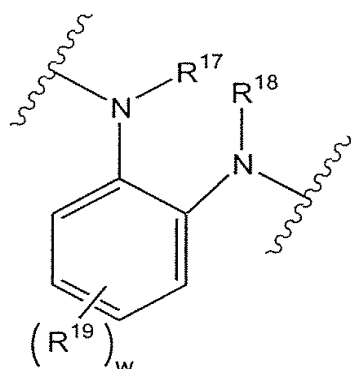
<549> 여기에서,  $R^{24}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 및 비치환 헤테로알킬로 구성된 군으로부터 선택된다. 각 K는 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬, 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠,  $NO_2$ ,  $NR^{21}R^{22}$ ,  $NR^{21}COR^{22}$ ,  $OCONR^{21}R^{22}$ ,  $OCOR^{21}$ , 및  $OR^{21}$ 로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되는 멤버인데, 여기에서  $R^{21}$  및  $R^{22}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬 및 비치환 헤테로사이클로알킬로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되며;  $i$ 는 0, 1, 2, 3, 또는 4의 정수이다.

<551> 다른 구체예에서, 상기 식 (a)의 펩티드 링커는 다음 구조를 포함하는  $-F-(L^1)_m-$ 를 포함한다:



<552> 여기에서 각  $R^{24}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 및 비치환 헤테로알킬로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되는 멤버이다.

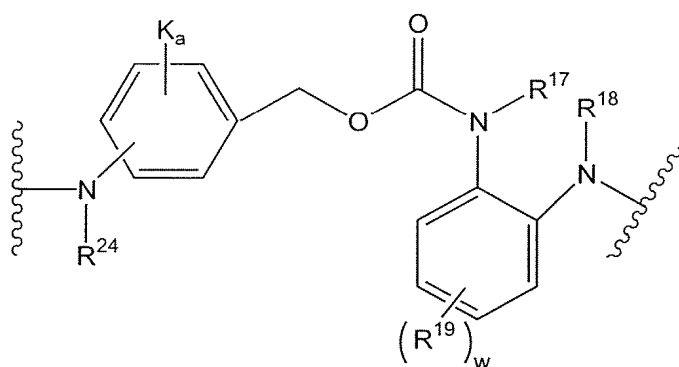
<554> 어떤 구체예에서, 자기-희생 스페이서  $L^1$  또는  $L^2$ 는 다음을 포함한다:



<555>

<556> 여기에서 각  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ , 및  $R^{19}$ 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 및 치환 또는 비치환 아릴로부터 독립적으로 선택되고, w는 0 내지 4의 정수이다. 어떤 구체예에서,  $R^{17}$  및  $R^{18}$ 은 독립적으로 H 또는 알킬(바람직하게, 비치환 C1-4 알킬)이다. 바람직하게,  $R^{17}$  및  $R^{18}$ 은 메틸 또는 에틸과 같은, C1-4 알킬이다. 어떤 구체예에서, w는 0이다. 특정 이론에 구속되는 것을 바라는 것은 아니지만, 이 특정한 자기-희생 스페이서는 상대적으로 빠르게 고리화한다는 것을 실험적으로 알아내었다.

<557> 어떤 구체예에서,  $L^1$  또는  $L^2$ 는 다음을 포함한다:

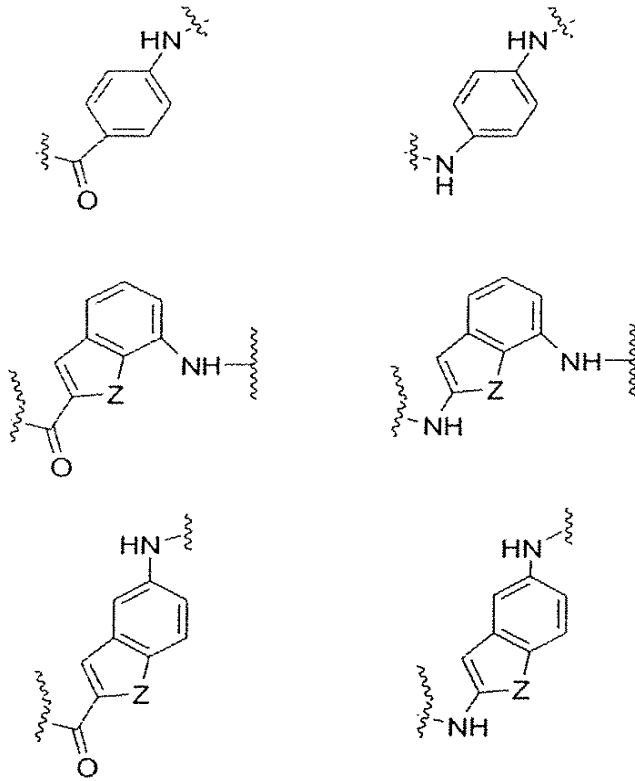


<558>

<559> 스페이서기  $L^3$

<560> 스페이서기  $L^3$ 은 일차 또는 이차 아민 또는 카르복실 기능을 포함하는 것으로 특징지워지며,  $L^3$ 기의 아민이 D의 매달린 카르복실 기능기와 아마이드 결합을 형성하거나 또는  $L^3$ 의 카르복실이 D의 매달린 아민 기능기와 아마이드 결합을 형성한다.  $L^3$ 은 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서,  $L^3$ 는 방향족기를 포함한다. 더욱 바람직하게,  $L^3$ 은 벤조산기, 아닐린기 또는 인돌기를 포함한다.  $-L^3-NH-$  스페이서로 작용할 수 있는 구조의 비-제한적인 예들은 다음의 구조를 포함한다:





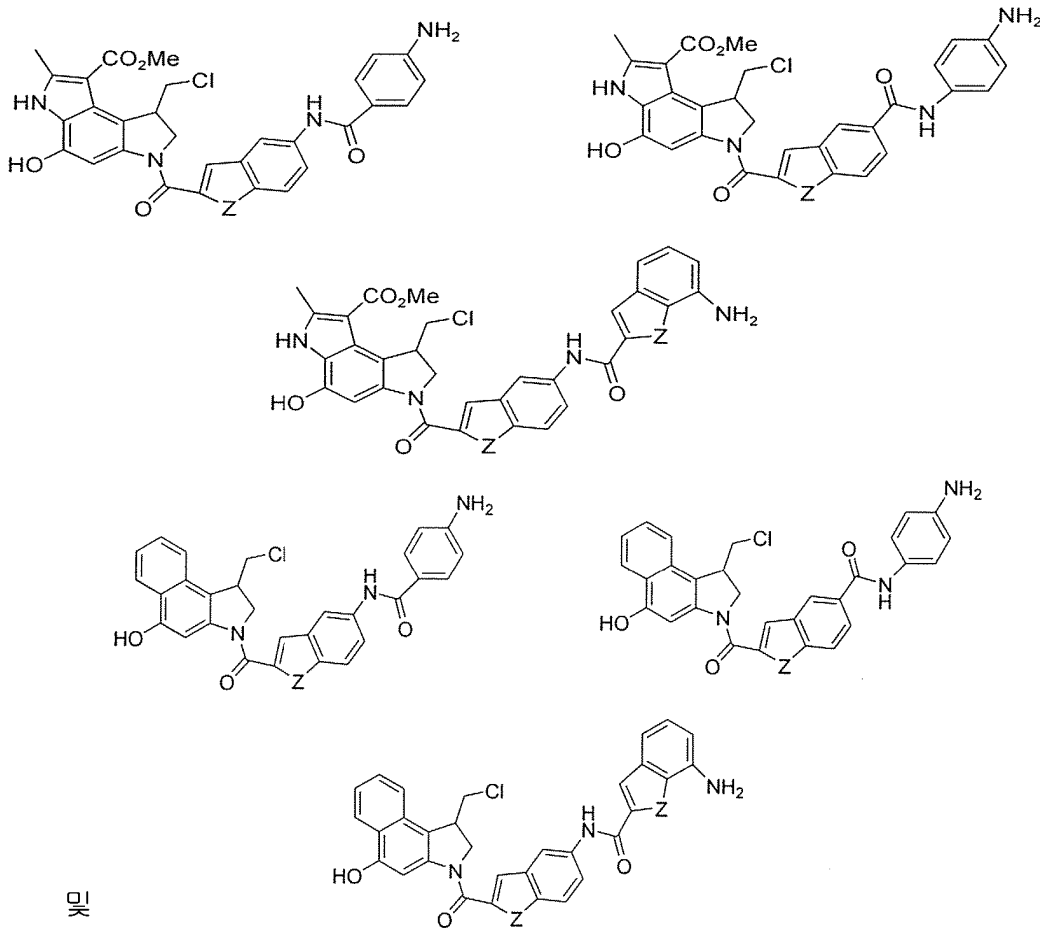
<561>

<562>

여기에서 Z는 O, S 및  $NR^{23}$  으로부터 선택되는 멤버이며,  $R^{23}$  은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택되는 멤버이다.

<563>

$L^3$  을 포함하는 본 발명의 링커의 분리시,  $L^3$  부분은 약물, D에 부착된 상태로 남는다. 따라서,  $L^3$  부분은 D에 부착된 그의 존재가 D의 활성을 유의하게 변경하지 않도록 선택된다. 다른 구체예에서, 약물 D의 일 부분은 그 자체가  $L^3$  스페이서로 기능한다. 예를 들면, 한 구체예에서, 약물, D는, 약물의 일 부분이  $L^3$  스페이서로서 기능하는 듀오카르마이신 유도체이다. 그러한 구체예의 비-제한적인 예는  $NH_2-(L^3)-D$  가 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 구조를 갖는 것들을 포함한다:



및

<564>

<565> 여기서  $Z$ 는 O, S 및  $\text{NR}^{23}$ 으로부터 선택된 멤버이고,  $R^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헥테로알킬, 및 아실로부터 선택되는 멤버이고; 각 구조상의  $\text{NH}_2$ 기는  $(\text{AA}^1)_c$ 와 반응하여  $-(\text{AA}^1)_c-\text{NH}-$ 를 형성한다.

<566>

펩티드 서열  $\text{AA}^1$

<567>

$\text{AA}^1$ 기는 단일 아미노산 또는 아미드 결합에 의해 함께 연결된 다수의 아미노산을 나타낸다. 아미노산은 천연 아미노산 및/또는 비천연  $\alpha$ -아미노산일 수 있다.

<568>

펩티드 서열  $(\text{AA}^1)_c$ 는 단일 아미노산( $c=1$ 일때) 또는 아미드 결합에 의해 함께 결합된 다수의 아미노산의 기능적 아미드화 잔기이다. 본 발명의 펩티드는 생물학 시스템에서 관심의 위치에서 효소에 의한 펩티드의 효소-촉매 분리를 위해 선택된다. 예를 들면, 표적화 제제를 사용하여 세포에 표적화되나, 그 세포에 의하여 내재화되지 않은 접합체에 대하여, 예컨대, 근처의 사멸하는 세포의 세포 내용물의 방출로 인하여 세포외 기질에 존재할 수 있는 하나 이상의 프로테아제에 의하여 분리되는 펩티드를 선택하여, 펩티드를 세포외적으로 분리한다. 펩티드 내의 아미노산의 수는 1부터 20까지의 범위에 있을 수 있으나; 더욱 바람직하게는  $(\text{AA}^1)_c$ 를 포함하여 1-8개의 아미노산, 1-6개의 아미노산 또는 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산일 것이다. 특정 효소 또는 효소류에 의해서 분리되기 쉬운 펩티드 서열은 당해 분야에 잘 알려져 있다.

<569>

혈청, 간, 장 등에서 효소에 의해 분리되는 많은 펩티드 서열은 당해 분야에 알려져 있다. 본 발명의 예시적인 펩티드 서열은 프로테아제에 의하여 분리되는 펩티드 서열을 포함한다. 프로테아제-민감성 서열의 사용에 대하여 나오는 논의의 초점은 설명을 명확하게 하기 위함이며 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

<570>

펩티드를 분리하는 효소가 프로테아제일 때, 링커는 일반적으로 프로테아제의 분리 인식 서열을 포함하는 펩티드를 포함한다. 프로테아제의 분리 인식 서열은 단백질분해 분리 동안에 프로테아제에 의하여 인식되는 특정 아미노산 서열이다. 많은 프로테아제 분리 자리는 당해 분야에 알려져 있고, 이들 및 다른 분리 자리들은 링커 부

분에 포함될 수 있다. 예컨대, Matayoshi 등, *Science* 247: 954 (1990); Dunn 등, *Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah 등, *Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber 등, *Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith 등, *Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); Bouvier 등, *Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995), Hardy 등, in *Amyloid Protein Precursor in Development, Aging, and Alzheimer's Disease*, ed. Masters *et al.* pp. 190-198 (1994) 참조.

- <571> 펩티드 서열 (AA<sup>1</sup>)<sub>c</sub>의 아미노산은 종양-관련 프로테아제와 같은 특정 분자에 의한 선택적인 효소적 분리에 대한 그들의 적합성을 근거로 선택된다. 사용된 아미노산은 천연 또는 비천연 아미노산일 수 있다. 그것들은 L 또는 D 배열될 수 있다. 한 구체예에서, 적어도 3개의 상이한 아미노산이 사용된다. 다른 구체예에서는, 단지 2개의 아미노산이 사용된다.
- <572> 바람직한 구체예에서, 펩티드 서열 (AA<sup>1</sup>)<sub>c</sub>은 리소솜 프로테아제에 의하여 분리되는 그의 능력을 근거로 선택되는데, 그의 비-제한적인 예는 카텡신 B, C, D, H, L 및 S를 포함한다. 바람직하게, 펩티드 서열 (AA<sup>1</sup>)<sub>c</sub>은 시험관 내에서 카텡신 B에 의하여 분리될 수 있는데, 이것을 당해 분야에 알려진 시험관내 프로테아제 분리 분석법을 사용하여 테스트할 수 있다.
- <573> 다른 구체예에서, 펩티드 서열 (AA<sup>1</sup>)<sub>c</sub>은 종양 세포의 부근에서 세포외적으로 발견되는 프로테아제와 같은, 종양-관련 프로테아제에 의하여 분리될 수 있는 그의 능력을 근거로 선택되는데, 그의 비-제한적인 예는 티메트 올리고펩티다아제(thimet oligopeptidase, TOP) 및 CD10을 포함한다. TOP 또는 CD10에 의해 분리되는 펩티드의 능력을 당해 분야에 알려진 실험실내 프로테아제 분리 분석법을 이용하여 테스트할 수 있다.
- <574> 본 발명의 접합체에 사용하기에 적절한 펩티드 서열의 적절하나 비-제한적인 예는 Val-Cit, Cit-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N<sup>9</sup>-토실-Arg, Phe-N<sup>9</sup>-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu(서열번호 88), β-Ala-Leu-Ala-Leu(서열번호 89), Gly-Phe-Leu-Gly(서열번호 90), Val-Ala, Leu-Leu-Gly-Leu(서열번호 101), Leu-Asn-Ala, 및 Lys-Leu-Val를 포함한다. 바람직한 펩티드 서열은 Val-Cit 및 Val-Lys이다.
- <575> 다른 구체예에서, 약물 부분에 가장 근접하게 위치한 아미노산은 다음으로부터 구성되는 군으로부터 선택된다: Ala, Asn, Asp, Cit, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 및 Val. 또한, 다른 구체예에서, 약물 부분에 가장 근접하게 위치한 아미노산은 다음으로부터 구성되는 군으로부터 선택된다: Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 및 Val.
- <576> 프로테아제는 암 전이에 관련되어 왔다. 프로테아제 우로키나아제의 합성의 증가는 많은 암에서 전이하는 능력의 증가와 관련되어 있다. 우로키나아제는 세포외 공간에 편재하여 위치하는, 플라스미노겐으로부터 플라스민을 활성화하고, 그의 활성화는, 전이하는 종양 세포가 침입하는 통로가 되는 세포외 기질에서 단백질의 분해를 일으킬 수 있다. 플라스민은 또한 콜라게나제를 활성화하여, 모세관 및 림프계를 둘러싸는 기저막에서 콜라겐의 분해를 증진시키고, 그 때문에 종양 세포가 표적 조직으로 침입하게 한다(Dano 등, *Adv. Cancer. Res.*, 44:139 (1985)). 따라서, 우로키나아제에 의해 분리되는 펩티드 서열을 링커로서 이용하는 것은 본 발명의 범위내에 있다.
- <577> 본 발명은 또한 트립타제에 의한 분리에 민감한 펩티드 서열의 이용을 제공한다. 인간 마스트 세포(mast cells)는, αβI, βII, 및 βIII로 지정된, 적어도 4개의 다른 트립타제를 발현한다. 이러한 효소들은 혈액 혈장 프로테아제 억제제에 의해서 조절되지 않으며, 단지 시험관내에서 약간의 생리학적 기질을 분리한다. 세린 프로테아제의 트립타제 군(family)은 마스트 세포를 수반하는 다양한 알러지 및 염증성 질병에 관련되어 있는데, 이는 이러한 질병을 갖는 환자의 생물학적 유체(biological fluids)에서 발견되는 높아진 트립타제 수준으로 인한 것이다. 그러나, 질병의 병리생리학에 있어서 트립타제의 정확한 역할은 서술될 것으로 남는다. 트립타제의 생물학적 기능 및 해당 생리학적 결과의 범위는 그들의 기질 특이성에 의하여 실질적으로 한정된다.
- <578> 트립타제는 종양 전이 및 침입과 관련된 프로테아제의 치모겐(zymogen) 형태인, 프로-우로키나아제 플라스미노겐 활성화제(uPA)의 우수한 활성화제이다. 세포의 유출 및 이동을 위한 세포외 기질의 파괴를 초래하는, 플라스미노겐 캐스케이드의 활성화는 Pro-Arg-Phe-Lys(서열번호 91)의 P4-P1 서열에서 프로-우로키나아제 플라스미노겐 활성화제의 트립타제 활성화의 작용일 수 있다(Stack 등, *Journal of Biological Chemistry* 269 (13): 9416-9419

(1994)). 관 투과성의 조절에 관련되어 있는 뉴로펩티드인, 혈관작용성 장 펩티드는, 또한 Thr-Arg-Leu-Arg(서열번호 92) 서열에서 일차적으로, 트립타제에 의하여 분리된다(Tam 등, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3: 27-32 (1990)). G-단백질과 짝지어진 수용체 PAR-2는 Ser-Lys-Gly-Arg(서열번호 93) 서열에서 트립타제에 의하여 분리되고 활성화되어 섬유아세포 증식을 이끌 수 있으며, 반면에 트롬빈 활성화 수용체 PAR-1은 Pro-Asn-Asp-Lys(서열번호 94) 서열에서 트립타제에 의하여 비활성화된다(Molino 등, *Journal of Biological Chemistry* 272(7): 4043-4049 (1997)). 취합하면, 이 증거는 질병의 결과로서 조직 리모델링에서의 트립타제의 주요한 역할을 암시한다. 이는 여러 마스트 세포-매개 질병에서 관찰되는 의미있는 변화와 일치한다. 만성 천식 및 다른 장-기성 호흡기 질병들의 한 증거는 그의 생리학적 표적의 트립타제 활성화의 결과일 수 있는 하부 조직의 섬유증 및 비대화이다. 유사하게, 일련의 보고서는 다양한 암에서 마스트 세포 밀도, 트립타제 활성화 및 나쁜 예후와 관련된 혈관생성(angiogenesis)을 보여준다(Coussens 등, *Genes and Development* 13(11): 1382-97 (1999)); Takanami 등, *Cancer* 88(12): 2686-92 (2000); Toth-Jakatics 등, *Human Pathology* 31(8): 955-960 (2000); Ribatti 등, *International Journal of Cancer* 85(2): 171-5 (2000)).

<579> 특정 프로테아제가 선택된 펩티드 서열을 분리하는지를 평가하는 방법은 당해 분야에 알려져 있다. 예를 들면, 7-아미노-4-메틸 코우마린(AMC) 형광성 펩티드 기질의 사용은 프로테아제 특이성을 결정하는 잘 확립된 방법이다(Zimmerman, M. 등 (1977) *Analytical Biochemistry* 78:47-51). 아닐리드 결합의 특이한 분리는 형광성 AMC 이탈기를 방출하여 개개의 기질의 분리 속도를 간단히 결정하게 한다. 더욱 최근에, AMC 펩티드 기질 라이브러리의 배열(Lee, D. 등 (1999) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9:1667-72) 및 위치-스캐닝 라이브러리(Rano, T.A. 등 (1997) *Chemistry and Biology* 4:149-55)를 사용하여 단일 실험에서 넓은 범위의 기질을 샘플링함으로써 프로테아제의 N-말단 특이성을 빠르게 개괄하였다. 따라서 당업자는 부적당한 실험에 의존하지 않고서 펩티드 서열의 배열을 쉽게 평가하여 본 발명에서 그들의 유용성을 결정할 수 있다.

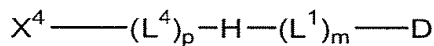
<580> 본 발명의 항체-파트너 접합체는 선택적으로 둘 이상의 링커를 포함할 수 있다. 이 링커들은 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 펩티드 링커는 약물을 리간드에 연결하는 데에 사용될 수 있고 제2 펩티드 링커는 진단용 제제를 복합체에 부착할 수 있다. 추가 링커들의 다른 이용은 분석용 제제, 생분자, 표적화 제제, 및 검출가능한 표지를 항체-파트너 복합체에 연결하는 것을 포함한다.

<581> 또한, 예를 들어, 본 발명의 화합물의 이량체, 삼량체, 사량체 및 고도의 동족체, 또는 이의 반응성 유사체와 같은, 종을 포함하는, 다중- 또는 다-가 중인 본 발명의 화합물은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 다중- 및 다-가 중은 본 발명의 단일 종 또는 하나 이상의 종으로부터 회합될 수 있다. 예를 들면, 이량체적 구성체는 “동중-이량체적” 또는 “이중 이량체적” 일 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물 또는 이의 반응성 유사체가 올리고머 또는 폴리머 골격(예, 폴리리신, 텍스트란, 하이드록시에틸 전분 등)에 부착되는 다중- 또는 다-가 구성체는 본 발명의 범위 내에 있다. 골격은 바람직하게 다중기능적이다(즉, 본 발명의 화합물을 부착하기 위한 반응 자리들의 배열을 가짐). 또한, 본 발명의 단일 종 또는 본 발명의 하나 이상의 종을 갖는 골격이 유도될 수 있다.

<582> 또한, 본 발명은, 유사하게 기능화되지 않은 유사 화합물에 비하여 향상된 수용성을 갖는 화합물을 제공하도록 기능화된 화합물을 포함한다. 따라서, 본 명세서에 설명된 임의의 치환기는 향상된 수용성을 갖는 유사 라디칼로 치환될 수 있다. 예를 들면, 하이드록실기를 디올로 대체하는 것, 또는 아민을 4급 아민, 하이드록시 아민 또는 유사한 보다 수용성인 부분으로 대체하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다. 바람직한 구체예에서, 부모 합성물의 수용성을 향상시킨 부분으로 본 명세서에 설명된 화합물의 이온 채널을 향하여 활성화 본질적이지 않은 자리에서의 치환에 의하여, 추가적인 수용성이 부여된다. 유기 화합물의 수용성을 향상시키는 방법은 당해 분야에 알려져 있다. 그러한 방법은, 예컨대 4급 암모늄과 같은 영구히 하전된 부분을 가지는 유기 핵, 또는 예컨대 카르복실산, 아민과 같은 생리학적으로 관련된 pH에서 하전된 기를 기능화하는 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 다른 방법은 유기 핵 하이드록실- 또는 아민-함유기, 예컨대, 알코올, 폴리올, 폴리에테르, 등에 부가하는 것을 포함한다. 대표적인 예는 폴리리신, 폴리에틸렌이민, 폴리(에틸렌글리콜) 및 폴리(프로필렌글리콜)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이러한 화합물을 위한 적절한 기능화 화학법 및 전략은 당해 분야에 알려져 있다. 예를 들어, Dunn, R.L. 등, Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991을 참조.

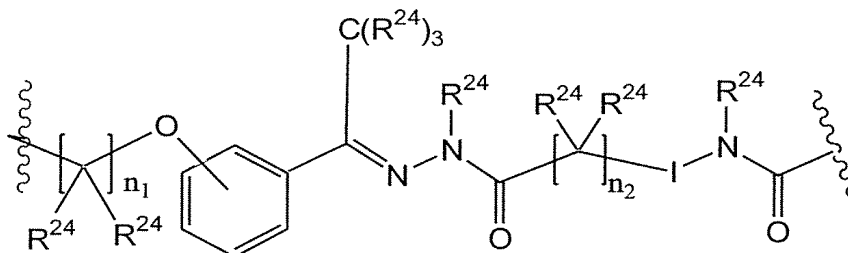
<583> 하이드라진 링커 (H)

<584> 두 번째 구체예에서, 본 발명의 접합체는 하이드라진 자기-희생 링커를 포함하는데, 상기 접합체는 다음의 구성을 가진다:



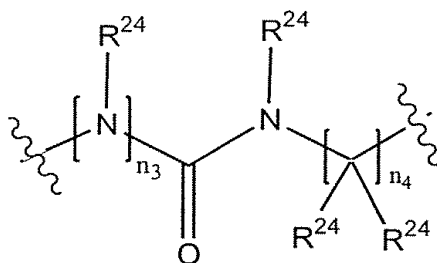
<585>

<586> 여기서, D,  $L^1$ ,  $L^4$ , 및  $X^4$ 는 상기에서 정의된 바와 같고 본 명세서에서 더 기술되며, H는 다음의 구조를 포함하는 링커이다:



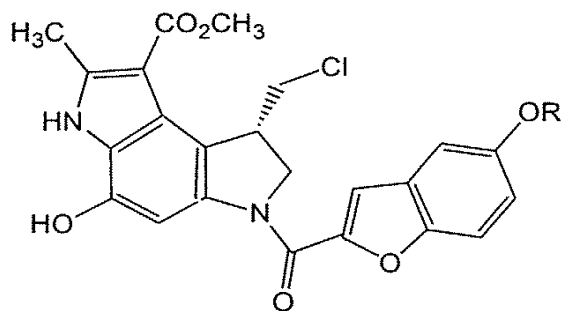
<587>

<588> 여기서,  $n_1$ 은 1 - 10의 정수이고;  $n_2$ 는 0, 1, 또는 2이고; 각  $R^{24}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로 알킬, 및 비치환 헤테로알킬로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되는 멤버이고; I는 결합(즉, 골격의 탄소와 인접한 질소 사이의 결합) 또는 다음의 구조이다:



<589>

<590> 여기서  $n_3$ 은 0 또는 1이며, 단  $n_3$ 이 0일 때,  $n_2$ 는 0이 아니고;  $n_4$ 는 1, 2, 또는 3이며, 여기서 I가 결합일 때,  $n_1$ 은 3이고  $n_2$ 는 1이며, D는 다음의 구조가 될 수 없다:



<591>

<592> 여기서 R은 Me 또는  $CH_2-CH_2-NMe_2$ 이다.

<593> 한 구체예에서, 페닐 고리 상에서의 치환은 파라 치환이다. 바람직한 구체예에서,  $n_1$ 은 2, 3, 또는 4이거나 또는  $n_1$ 은 3이다. 바람직한 구체예에서,  $n_2$ 는 1이다. 바람직한 구체예에서, I는 결합(즉, 골격의 탄소와 인접한 질소 사이의 결합)이다. 한 관점에서, 하이드라진 링커, H는 분리시, 예를 들면,  $n_3$ 이 0이고  $n_4$ 가 2일때, 6-멤버 자기-희생 링커를 형성할 수 있다. 다른 관점에서, 하이드라진 링커, H는 분리시 2개의 5-멤버 자기-희생 링커를 형성할 수 있다. 또 다른 관점에서, 분리시, H는 5멤버 자기-희생 링커를 형성하거나, H는 7-멤버 자기-희생 링커를 형성하거나, 또는 H는 5-멤버 자기-희생 링커 및 6-멤버 자기-희생 링커를 형성한다. 분리의 속도는 분리시 형성되는 고리의 크기에 의해 영향을 받는다. 따라서, 원하는 분리 속도에 따라, 분리시 형성될 적절한 크기의 고리를 선택할 수 있다.

<594>

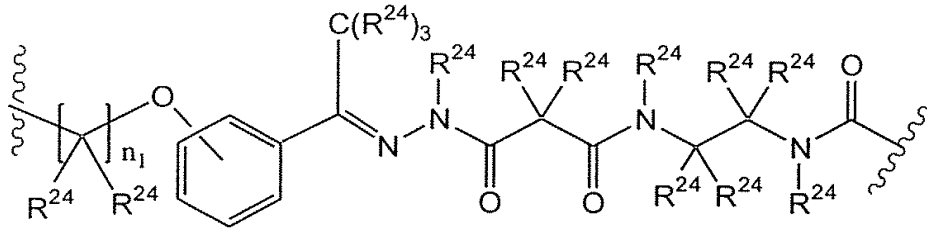
5 멤버 하이드라진 링커

<595>

한 구체예에서, 하이드라진 링커는 5-멤버 하이드라진 링커를 포함하는데, 여기서 H는 다음의 구조를 포함한



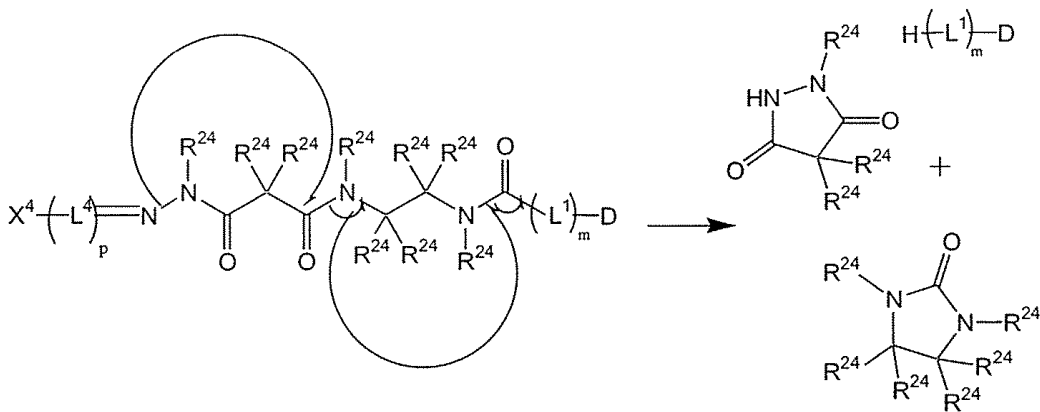
다:



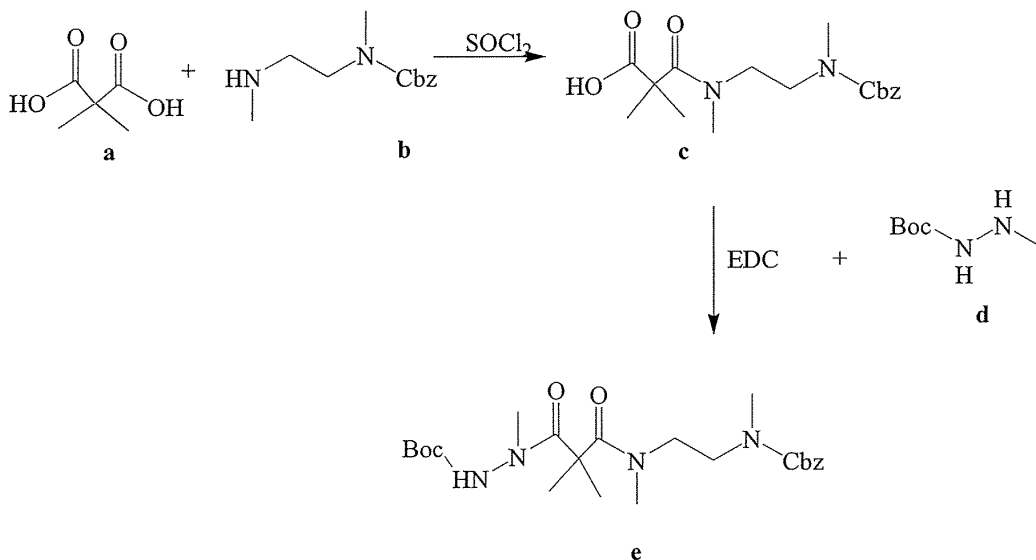
한 바람직한 구체예에서,  $n_1$ 은 2, 3, 또는 4이다. 다른 바람직한 구체예에서,  $n_1$ 은 3이다.

상기 구조에서, 각  $R^{24}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 및 비치환 헤테로알킬로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되는 멤버이다. 한 구체예에서, 각  $R^{24}$ 는 독립적으로 H 또는  $C_1 - C_6$  알킬이다. 다른 구체예에서, 각  $R^{24}$ 는 독립적으로 H 또는  $C_1 - C_3$  알킬, 더욱 바람직하게는 H 또는  $CH_3$ 이다. 다른 구체예에서, 적어도 하나의  $R^{24}$ 는 메틸기이다. 다른 구체예에서, 각  $R^{24}$ 는 H이다. 각  $R^{24}$ 는 화합물 입체 효과를 맞추고 용해성을 변경하기 위해서 선택된다.

5-멤버 하이드라진 링커는 약물을 링커로부터 분리하는 하나 이상의 고리화 반응으로 처리될 수 있으며, 예를 들어, 다음에 의하여 기술될 수 있다:



본 발명의 5 멤버 링커를 제조하기 위한 예시적인 합성 경로는 다음과 같다:

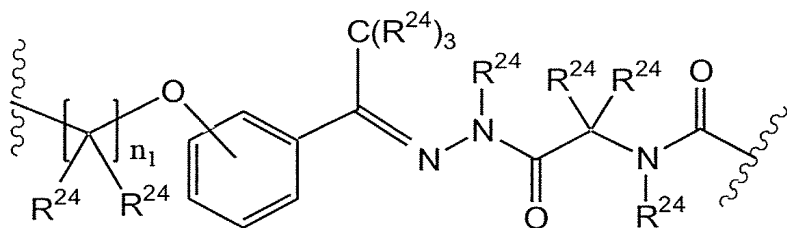


Cbz-보호 DMDA b는 티오닐 클로라이드를 갖는 용액에서 2,2-디메틸-말론산 a와 반응하여 Cbz-DMDA-2,2-디메틸말론산 c를 형성한다. 화합물 c는 EDC의 존재하에서 Boc-N-메틸 하이드라진 d와 반응하여 DMDA-2,2-디메틸말론산

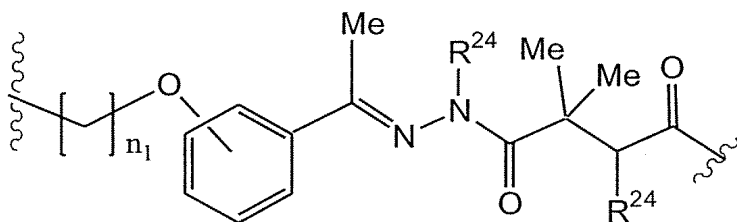
-Boc-N-메틸하이드라진 e를 형성한다.

## 6 멤버 하이드라진 링커

다른 구체예에서, 하이드라진 링커는 6-멤버 하이드라진 링커를 포함하는데, 여기에서 H는 하기 구조를 포함한다:

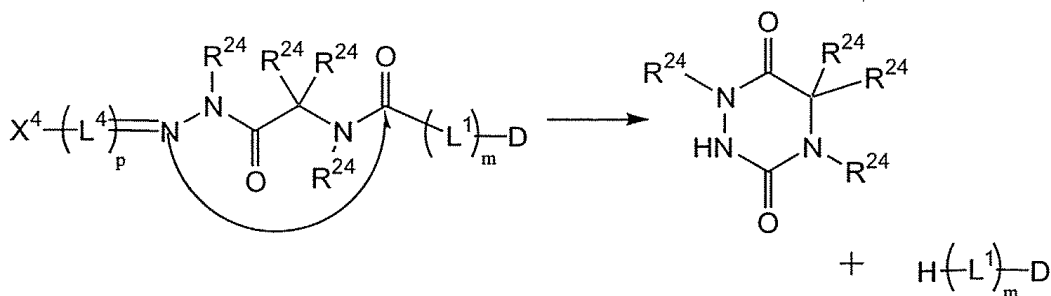


한 바람직한 구체예에서,  $n_1$ 은 3이다. 상기 구조에서, 각  $R^{24}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 및 비치환 헤테로알킬로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되는 멤버이다. 한 구체예에서, 각  $R^{24}$ 는 독립적으로 H 또는  $C_1-C_6$  알킬이다. 다른 구체예에서, 각각의  $R^{24}$ 는 독립적으로 H 또는  $C_1-C_3$  알킬, 더욱 바람직하게는 H 또는  $CH_3$ 이다. 다른 구체예에서, 적어도 하나의  $R^{24}$ 는 메틸기이다. 다른 구체예에서, 각  $R^{24}$ 는 H이다. 각  $R^{24}$ 는 화합물의 입체 효과를 맞추고 용해성을 변경하기 위해서 선택된다. 한 바람직한 구체예에서, H는 하기 구조를 포함한다:

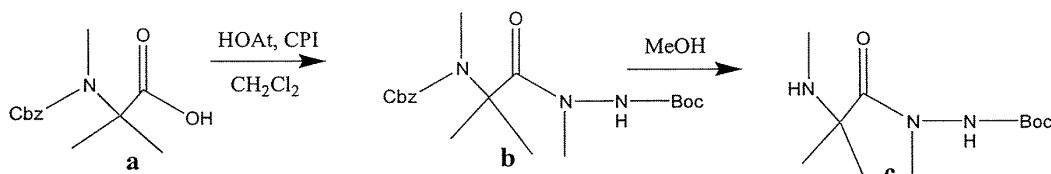


한 구체예에서, H는 제미널 디메틸 치환을 포함한다. 상기 구조의 한 구체예에서, 각 R<sup>24</sup>는 독립적으로 H 또는 치환 또는 비치환 알킬이다.

6-맴버 하이드라진 링커는 링커로부터 약물을 분리하는 고리화 반응으로 처리될 수 있으며, 다음과 같이 설명된다:



본 발명의 6 멤버 링커를 제조하기 위한 예시적인 합성 경로는 다음과 같다:



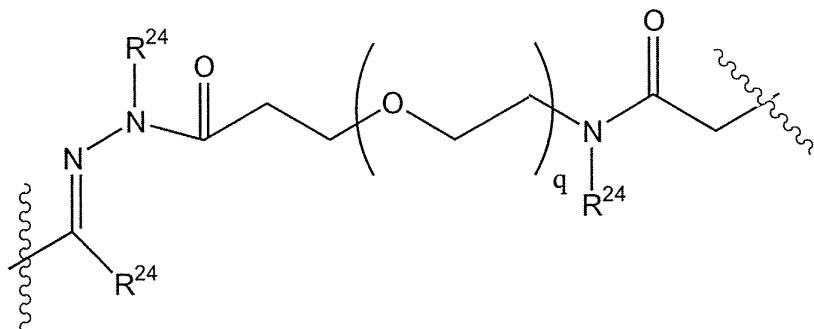
디클로로메탄을 갖는 용액의 Cbz-보호 디메틸 알라닌 a는 HOAt 및 CPI와 반응하여 Cbz-보호 디메틸알라닌 하이

드라진 b를 형성한다. 하이드라진 b는 메탄올의 작용에 의하여 탈보호되어 화합물 c를 형성한다.

<615> 기타 하이드라진 링커

<616> 본 발명은 7개의 멤버를 갖는 링커를 포함하는 것으로 고려된다. 이 링커는 5 또는 6 멤버 링커와 같이 빠르게 고리화하지 않을 것 같지만, 이것은 어떤 항체-파트너 접합체에 바람직하다. 유사하게, 상기 하이드라진 링커는 2개의 6 멤버 고리, 또는 하나의 6 및 하나의 5 멤버 고리화 생성물을 갖는 하나의 하이드라진 링커를 포함할 수 있다. 6 및 7 멤버 링커 뿐만 아니라 5 및 7 멤버 링커도 또한 고려된다.

<617> 다른 하이드라진 구조, H는 다음의 식을 가진다:



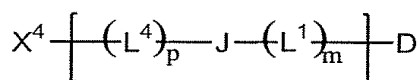
<618>

<619> 여기에서, q는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이고; 및

<620> 각  $R^{24}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 및 비치환 헤테로알킬로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되는 멤버이다. 이 하이드라진 구조는 또한 5-, 6-, 또는 7-멤버 고리를 형성할 수 있으며, 부가 성분을 더 하여 다중 고리를 형성할 수 있다.

<621> 디설파이드 링커 (J)

<622> 또 다른 구체예에서, 링커는 효소적으로 분리가능한 디설파이드기를 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명은 식 (d)에 의한 구조를 갖는 세포독성 항체-파트너 화합물을 제공한다:



<623>

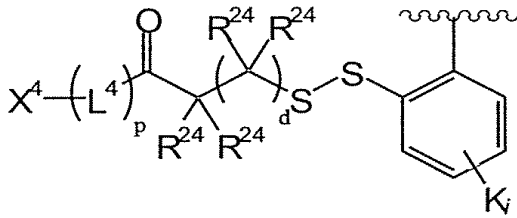
<624> 여기에서 D,  $L^1$ ,  $L^4$ , 및  $X^4$ 는 상기에서 정의되어 있고 본 명세서에 더 설명되어 있으며, J는 다음의 구조를 가지는 기를 포함하는 디설파이드 링커이다:

<625> 여기에서, 각  $R^{24}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 및 비치환 헤테로알킬로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되는 멤버이고; 각 K는 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬, 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠,  $NO_2$ ,  $NR^{21}R^{22}$ ,  $NR^{21}COR^{22}$ ,  $ONR^{21}R^{22}$ ,  $OCOR^{21}$ , 및  $OR^{21}$ 로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되는 멤버이고,

여기에서,  $R^{21}$  및  $R^{22}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬, 및 비치환 헤테로사이클로알킬로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택되고; i는 0, 1, 2, 3, 또는 4의 정수이고; d는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 정수이다.

<626> 디설파이드 링커의 방향족 고리는 하나 이상의 “K” 기로 치환될 수 있다. “K” 는, 고리 구조의 일부인 4개의 비치환 탄소 중 하나에 부착된 수소를 대체하는 방향족 고리 상의 치환기다. “K” 기는, 할로젠과 같은 단일 원자일 수 있고, 또는 알킬, 헤테로알킬, 아미노, 니트로, 하이드록시, 알콕시, 할로알킬, 및 시아노와 같은 다원자기일 수 있다. 예시적인 K 치환기는 독립적으로 F, Cl, Br, I,  $NO_2$ , OH,  $OCH_3$ ,  $NHCOCH_3$ ,  $N(CH_3)_2$ ,  $NHCOCF_3$  및 메틸을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. “ $K_i$ ” 에서, i는 0, 1, 2, 3, 또는 4의 정수이다. 한 특정 구체예에서, i는 0이다.

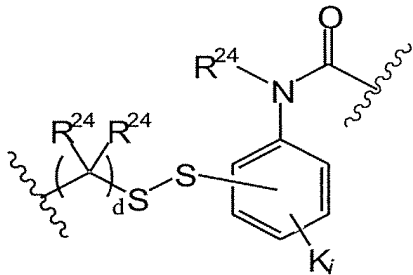
<627> 바람직한 구체예에서, 링커는 다음 식의 효소적으로 분리가능한 디설파이드기를 포함한다:



<628>

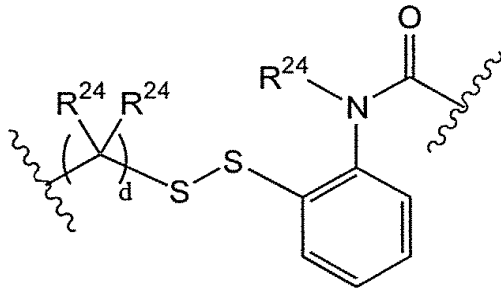
<629> 이 구체예에서,  $L^4$ ,  $X^4$ ,  $p$ , 및  $R^{24}$ 의 아이덴티티들(identities)은 상기에 서술된 바와 같고,  $d$ 는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이다. 특정 구체예에서,  $d$ 는 1 또는 2이다.

<630> 더욱 특정한 디설파이드 링커는 다음 식에서 보인다:



<631>

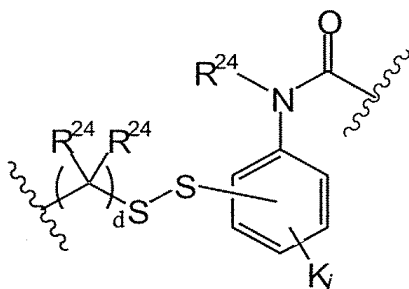
<632> 이 구체예의 특정한 예는 다음과 같다:



<633>

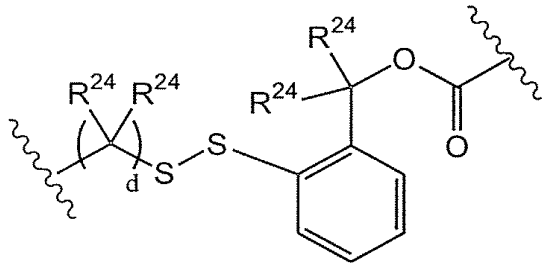
<634> 바람직하게,  $d$ 는 1 또는 2이다.

<635> 다른 디설파이드 링커는 하기 식에서 보인다:



<636>

<637> 이 구체예의 특정한 예는 다음과 같다:

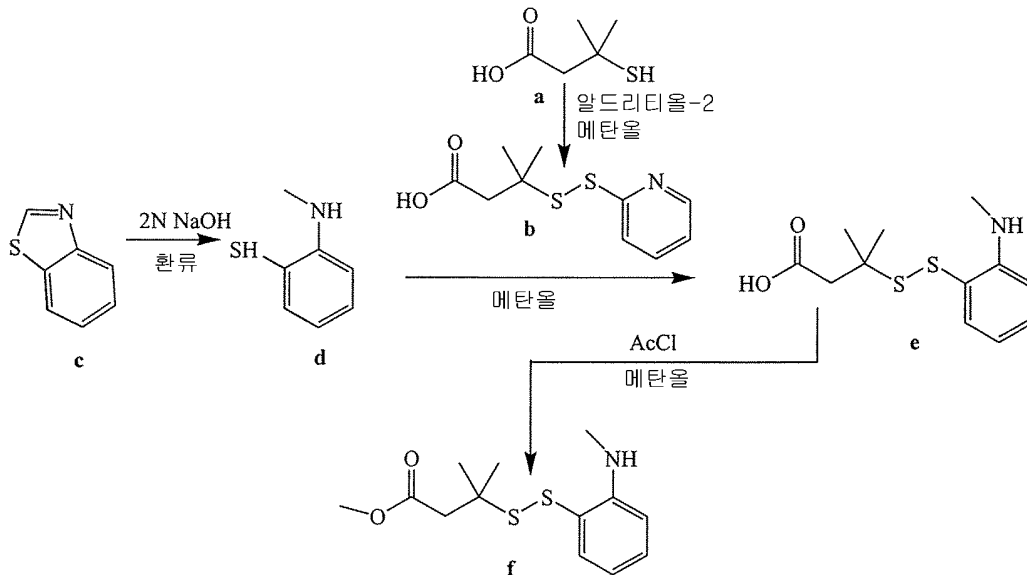


<638>

<639> 바람직하게, d는 1 또는 2이다.

<640> 다양한 구체예에서, 디설파이드기는 아민에 대하여 오르토(ortho)에 있다. 다른 특정 구체예에서, a는 0이다. 바람직한 구체예에서, R<sup>24</sup>는 H 및 CH<sub>3</sub>로부터 독립적으로 선택된다.

<641> 본 발명의 디설파이드 링커를 제조하기 위한 예시적인 합성 경로는 다음과 같다:



<642>

<643> 3-메르캅토프로피온산 a의 용액을 알드리티올-2와 반응시켜 3-메틸 벤조티아졸리움 아이오다이드 b를 형성한다. 3-메틸 벤조티아졸리움 아이오다이드 c를 수산화나트륨과 반응시켜 화합물 d를 형성한다. 화합물 d의 용액을 메탄올과 함께 화합물 b와 더 반응시켜 화합물 e를 형성한다. 화합물 e를 염화아세트 및 메탄올의 작용에 의하여 탈보호하여 화합물 f를 형성한다.

<644> 세포독소, 링커 및 항체에 치료적 제제를 접합하기 위한 다른 방법에 대해 더 많은 검토는, 또한, Gangwar 등의 PCT 공개번호 제 WO 2007/059404호, 및 Saito, G. 등 (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215의 “Cytotoxic Compounds And Conjugates”; Trail, P.A. 등 (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. 및 Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. 및 Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264를 참조, 이들 각각은 그 전체가 참조문헌으로서 본 명세서에서 병합되어 있다.

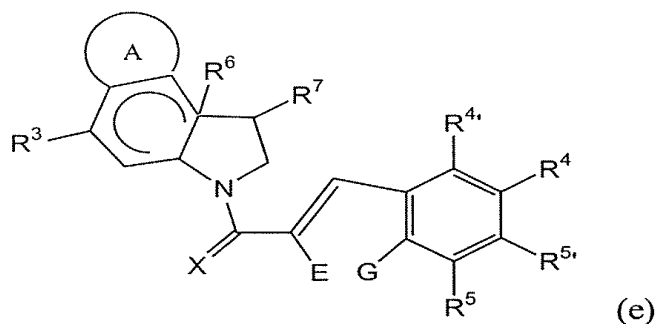
<645> 파트너 분자

<646> 한 관점에서, 본 발명은, 세포독소, 약물(예, 면역억제제) 또는 방사능독소와 같은, 파트너 분자에 접합하는 항체를 특징으로 한다. 그러한 접합체는 본 명세서에서 “면역접합체”로도 지칭된다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 “면역독소”로 지칭된다. 세포독소 또는 세포독성 제제는 세포에 해로운(예, 살해) 임의의 제제를 포함한다.



- <647> 본 발명의 파트너 분자의 예는 택솔, 사이토칼라신 B(cytochalasin B), 그라미시딘 D(gramicidin D), 에티듐 브로마이드(ethidium bromide), 에메틴(emetine), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 콜히친(colchicin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 디하이드록시 안트라신 디오네(dihydroxy anthracin dione), 미톡산트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 악티노마이신 D(actinomycin D), 1-디하이드로테스토스테론(1-dehydrotestosterone), 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 프로카인(procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로프라놀롤(propranolol), 및 퓨로마이신(puromycin) 및 이들의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 또한, 파트너 분자의 예는, 예를 들어, 항대사물질(예, 메토크세이트(methotrexate), 6-메르캅토피린(6-mercaptopurine), 6-티오구아닌(6-thioguanine), 사이타라빈(cytarabine), 5-플루오로우라실 데카르바진(5-fluorouracil decarbazine), 알킬화 제제(예, 메클로레타민(mechlorethamine), 티오에파 클로람부실(thioepa chlorambucil), 멜팔란(melphalan), 카르무스틴(carmustine)(BSNU) 및 로무스틴(lomustine)(CCNU), 사이클로토스포아미드(cyclophosphamide), 부숴판(busulfan), 디브로모만니톨(dibromomannitol), 스트렙토조토신(streptozotocin), 미토마이신C(mitomycin C), 및 cis-디클로로디아민 플라티늄(II)(cis-dichlorodiamine platinum, DDP) 시스플라틴(cisplatin), 안트라사이클린(anthracyclines)(예, 다우노루비신(daunorubicin)(이전에는 다우노마이신(daunomycin)) 및 독소루비신(doxorubicin)), 항생제(예, 닥티노마이신(dactinomycin)(이전에는 악티노마이신(actinomycin)), 블레오마이신(bleomycin), 미트라마이신(mithramycin), 및 안트라마이신(anthracycline, AMC)), 및 항-유사분열 제제(예, 빈크리스틴(vincristine) 및 빈블라스틴(vinblastine))을 포함한다.
- <648> 본 발명의 항체에 접합할 수 있는 파트너 분자의 다른 바람직한 예는 듀오카르마이신(duocarmycins), 칼리체아미신(calicheamicins), 메이탄신(maytansins) 및 아우리스타틴(auristatins), 및 이들의 유도체를 포함한다. 칼리체아미신 항체 접합체의 예는 상업적으로 입수가 가능하다(MyloTarg®; American Home Products).
- <649> 파트너 분자의 바람직한 예는 CC-1065 및 상기 듀오카르마이신이다. CC-1065는 Upjohn사에 의해 1981년에 스트렙토마이세스 젤렌시스(*Streptomyces zelensis*)로부터 처음 분리되었고(Hanka 등, J. Antibiot. 31: 1211 (1978); Martin 등, J. Antibiot. 33: 902 (1980); Martin 등, J. Antibiot. 34: 1119 (1981)), 시험관 내에서 그리고 실험용 동물에서도 우수한 항종양 및 항균 활성을 가지고 있는 것이 발견되었다(Li 등, Cancer Res. 42: 999 (1982)). CC-1065는 5'-d(A/GNTTA)-3' 및 5'-d(AAAAA)-3'의 서열 선택과 함께 마이너 그루브(minor groove) 내에서 이중-가닥 B-DNA에 결합하고(Swenson 등, Cancer Res. 42: 2821 (1982)), 분자에 존재하는 그의 CPI 좌-수 유닛(left-hand unit)에 의하여 3'-아데닌의 N3 위치를 알킬화한다(Hurley 등, Science 226: 843 (1984)). 강하고 넓은 항종양 활성에도 불구하고, CC-1065는 실험용 동물에서 죽음을 지연시키기 때문에 인간에 이용될 수 없다.
- <650> CC-1065 및 듀오카르마이신의 많은 유사체 및 유도체는 당해 분야에서 알려져 있다. 많은 화합물의 구조, 합성 및 성질에 대한 연구가 검토되었다. 예를 들어, Boger 등, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 1438 (1996); 및 Boger 등, Chem. Rev. 97: 787 (1997) 참조.
- <651> Kyowa Hakko Kogyo 사에서의 하나의 기(group)는 많은 CC-1065 유도체를 제조하였다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제 5,101,038호; 제 5,641,780호; 제 5,187,186호; 제 5,070,092호; 제 5,703,080호; 제 5,070,092호; 제 5,641,780호; 제 5,101,038호; 및 제 5,084,468호; 공개된 PCT 출원번호 제 WO 96/10405 호 및 공개된 유럽 특허출원 번호 제 0 537 575 A1호를 참조.
- <652> 또한 Upjohn 사(Pharmacia Upjohn)가 CC-1065의 유도체를 제조하는데 활발하다. 예를 들어, 미국 특허번호 제 5,739,350호, 제 4,978,757호, 제 5,332,837호 및 제 4,912,227호를 참조.

<653> 본 발명의 특히 바람직한 관점은 다음 식 (e)에 따른 구조를 갖는 세포독성 화합물을 제공한다:



<654>

<655> 여기에서, 고리계 A는 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 기들로부터 선택되는 멤버이다. 예시적인 고리계는 페닐 및 피롤을 포함한다.

<656> 기호 E 및 G는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 헤테로원자, 단일결합으로부터 독립적으로 선택되거나, E 및 G는 임의로 결합되어 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 선택된 고리계를 형성한다.

<657> 기호 X는 O, S 및  $\text{NR}^{23}$ 으로부터 선택된 멤버를 나타낸다.  $\text{R}^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬로, 및 아실로부터 선택된 멤버이다.

<658> 기호  $\text{R}^3$ 는 (=O),  $\text{SR}^{11}$ ,  $\text{NHR}^{11}$  및  $\text{OR}^{11}$ 로부터 선택된 멤버를 나타내는데, 여기에서  $\text{R}^{11}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 설포네이트, 아실,  $\text{C(O)R}^{12,13}$ ,  $\text{C(O)OR}^{12}$ ,  $\text{C(O)NR}^{12,13}$ ,  $\text{P(O)(OR}^{12})_2$ ,  $\text{C(O)CHR}^{12,13}$ ,  $\text{SR}^{12}$  또는  $\text{SiR}^{12,13,14}$ 이다. 기호  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$ , 및  $\text{R}^{14}$ 는 독립적으로 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 및 치환 또는 비치환 아릴을 나타내며, 여기에서,  $\text{R}^{12}$  및  $\text{R}^{13}$ 은 이들이 부착된 질소 또는 탄소 원자와 함께 임의로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는 4부터 6까지의 멤버를 갖고 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성한다. 하나 이상의  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$ , 또는  $\text{R}^{14}$ 는 그의 구조 안에 분리가능한 기를 포함할 수 있다.

<659>  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^5$  및  $\text{R}^{5'}$ 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NR}^{15,16}$ ,  $\text{NC(O)R}^{15}$ ,  $\text{OC(O)NR}^{15,16}$ ,  $\text{OC(O)OR}^{15}$ ,  $\text{C(O)R}^{15}$ ,  $\text{SR}^{15}$ ,  $\text{OR}^{15}$ ,  $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ , 및  $\text{O(CH}_2)_n\text{N(CH}_3)_2$ 로부터 독립적으로 선택되는 멤버들인데, 여기에서 n은 1부터 20까지의 정수이며, 또는  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^5$  및  $\text{R}^{5'}$ 의 임의의 이웃한 쌍은, 그들이 부착된 탄소 원자와 함께, 결합되어 4부터 6까지의 멤버를 갖는 치환 또는 비치환 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성한다.  $\text{R}^{15}$  및  $\text{R}^{16}$ 은 독립적으로 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 및 치환 또는 비치환 펩티딜을 나타내는데, 여기에서  $\text{R}^{15}$  및  $\text{R}^{16}$ 은 그들이 부착되는 질소 원자와 함께, 임의로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는 4부터 6까지의 멤버를 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성한다. 하나의 예시적인 구조는 아닐린이다.

<660>  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^{5'}$ ,  $\text{R}^{11}$ ,  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{15}$  및  $\text{R}^{16}$ 은 분리가능한 링커 또는 분리가능한 기질과 같이, 그들의 구조 안에 하나 이상의 분리가능한 기를 임의로 포함한다. 예시적인 분리가능한 기는 펩티드, 아미노산, 하이드라진, 디설파이드, 및 세팔로스포린 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

<661> 어떤 구체예에서,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^{5'}$ ,  $\text{R}^{11}$ ,  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{15}$  및  $\text{R}^{16}$  중 적어도 하나는, 본 명세서에 기술된 바와 같이, 약물을 본 발명의 링커 또는 효소 분리가능한 기질에, 예를 들면 존재한다면  $\text{L}^1$ 에, 또는 F, H, J, 또는  $\text{X}^2$ 에, 또는 J에 결합하는데 사용된다.

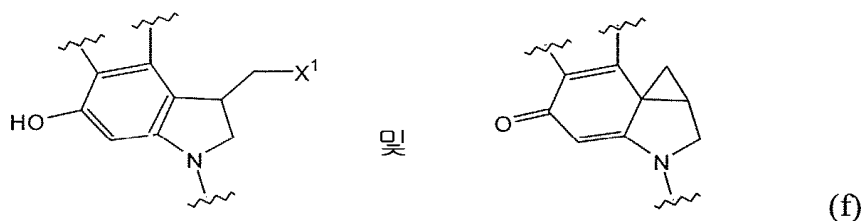
<662> 또 다른 예시적인 구체예에서,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^{5'}$ ,  $\text{R}^{11}$ ,  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{15}$  및  $\text{R}^{16}$  중 적어도 하나는 화합물을 접합하기에

적절한 반응기를 가진다. 다른 예시적인 구체예에서,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5'}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 독립적으로 H, 치환 알킬 및 치환 헤테로알킬로부터 선택되며, 알킬 또는 헤테로알킬 부분의 자유말단에서 반응성 기능기를 가진다.  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5'}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{15}$  및  $R^{16}$  중 하나 이상은 다른 중, 예를 들어, 표적 제제, 검출가능한 표지, 고형 지지체, 등등에 접합될 수 있다.

<663>  $R^6$ 은 존재하거나 부재하는 단일 결합이다.  $R^6$ 이 존재하면,  $R^6$  및  $R^7$ 은 결합되어 사이클로프로필 고리를 형성한다.  $R^7$ 은  $\text{CH}_2\text{-X}^1$  또는  $-\text{CH}_2-$ 이다.  $R^7$ 이  $-\text{CH}_2-$ 이면, 그것은 사이클로프로판 고리의 성분이다. 기호  $\text{X}^1$ 은 할로젠, 예를 들어 Cl, Br 또는 F와 같은 이탈기를 나타낸다.  $R^6$  및  $R^7$ 의 조합은 화학 원자가의 규칙을 어기지 않는 방식으로 해석된다.

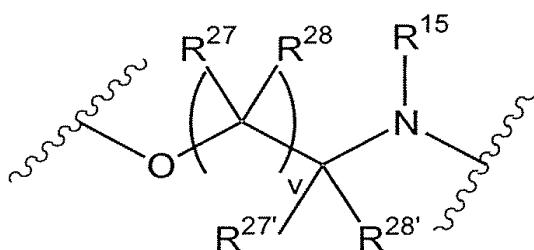
<664>  $\text{X}^1$ 은 임의의 이탈기일 수 있다. 유용한 이탈기는 할로젠, 아지드, 설포닉 에스테르(예, 알킬설포닐, 아릴설포닐), 옥소늄 이온, 알킬 퍼클로레이트, 암모니오알칸설포네이트 에스테르, 알킬플루오로설포네이트 및 플루오르화 화합물(예, 트리플레이트, 노나플레이트, 트레실레이트) 및 기타 유사한 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이탈기로서 유용한 특정 할로젠은 F, Cl 및 Br이다. 이들 및 특정의 반응 조건에 적절한 다른 이탈기를 선택하는 것은 당해 분야의 숙련자의 능력 범위안에 있다(예를 들어, March J, Advanced Organic Chemistry, 제2판, John Wiley and Sons, 1992; Sandler SR, Karo W, Organic Functional Group Preparations, 제2판, Academic Press, Inc., 1983; 및 Wade LG, Compendium of Organic Synthetic Methods, John Wiley and Sons, 1980).

<665> 6-멤버 고리내의 곡선은 고리가 하나 이상의 불포화도를 가질 수 있으며, 방향족일 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 아래에 설명된 것들과 같은 고리 구조 및 관련 구조는 식 (f)의 범위 내에 있다:



<666>

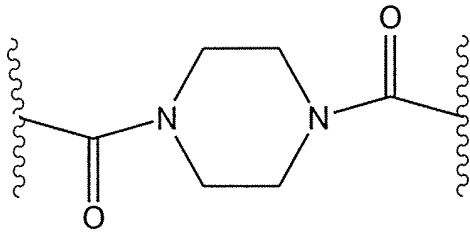
<667> 어떤 구체예에서,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ , 및  $R^{5'}$  중 적어도 하나는 상기 약물을 존재한다면  $L^1$ 에, 또는 F, H, J, 또는  $\text{X}^2$ 에 결합시키고, 다음을 포함한다:



<668>

<669> 여기에서  $v$ 는 1부터 6까지의 정수이고; 각  $R^{27}$ ,  $R^{27'}$ ,  $R^{28}$ , 및  $R^{28'}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택된다. 어떤 구체예에서,  $R^{27}$ ,  $R^{27'}$ ,  $R^{28}$ , 및  $R^{28'}$ 은 모두 H이다. 어떤 구체예에서,  $v$ 는 1부터 3까지의 정수이다(바람직하게, 1). 이 유닛은 약물로부터 아릴 치환기를 분리하는데 사용될 수 있으며, 그렇게하여 다중-약물 저항에 대한 기질인 화합물을 생성하는 것을 저지하거나 피한다.

<670> 한 구체예에서,  $R^{11}$ 은 자기-고리화하지 않으며 약물을 존재한다면  $L^1$ 에, 또는 F, H, J, 또는  $\text{X}^2$ 에 연결하는 부분,  $\text{X}^5$ 를 포함한다. 부분,  $\text{X}^5$ 는, 바람직하게 효소를 사용하여 분리가능하며, 분리될 때, 활성 약물을 제공한다. 예로써,  $R^{11}$ 은 다음 구조(약물의 잔여 부분에 결합하는 우측을 가짐)를 가진다:



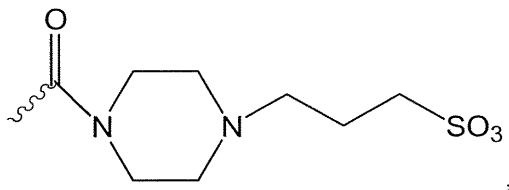
<671>

<672>

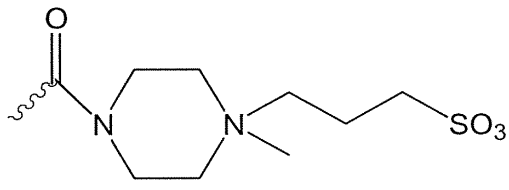
예시적 구체예에서, 식 (e)의 고리계 A는 치환 또는 비치환 페닐 고리이다. 고리계 A는 본 명세서에 정의 부분에서 설명된 바와 같은 하나 이상의 아릴기 치환기로 치환될 수 있다. 어떤 구체예에서, 페닐기는 CN 또는 메톡시 부분으로 치환된다.

<673>

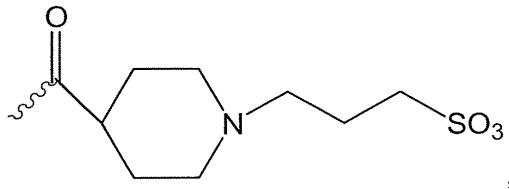
어떤 구체예에서,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ , 및  $R^{5'}$  중 적어도 하나는 약물을 존재한다면  $L^1$ 에, 또는 F, H, J, 또는  $X^2$ 에 연결하며,  $R^3$ 은  $SR^{11}$ ,  $NHR^{11}$  및  $OR^{11}$ 로부터 선택된다.  $R^{11}$ 은  $-SO(OH)_2$ ,  $-PO(OH)_2$ ,  $-AA_n$ ,  $-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ,  $-C(O)OPhNH(AA)_m$ ,



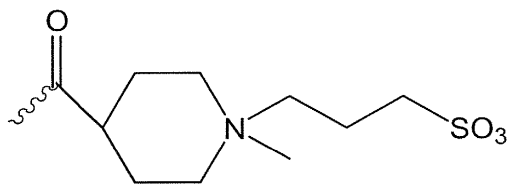
,



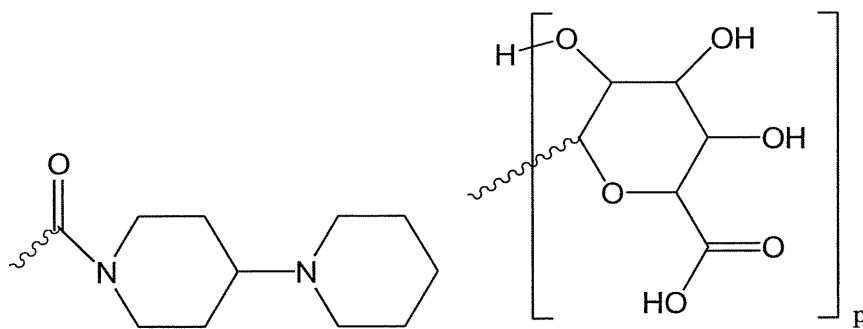
,



,



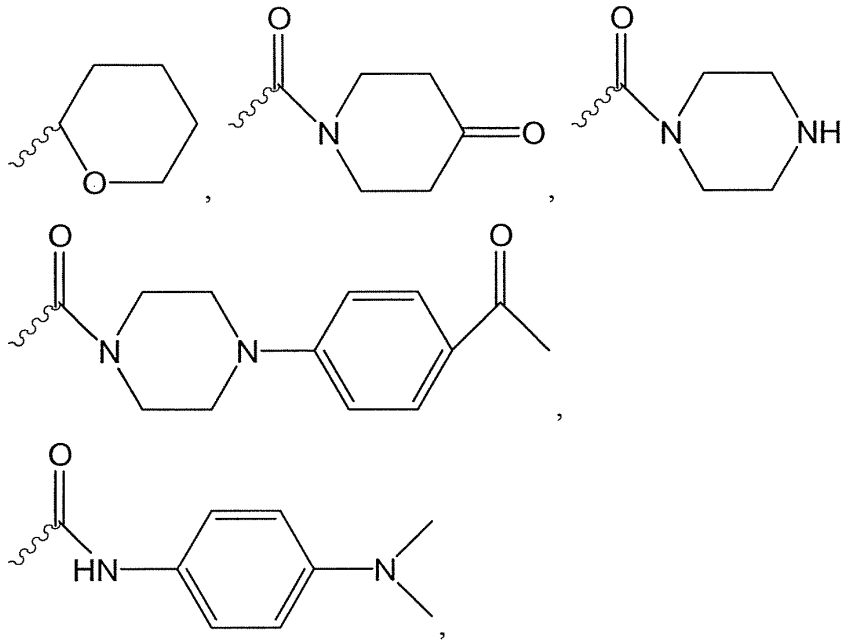
,



또는 임의의 다른 당류 또는 당

<674>

류의 조합,



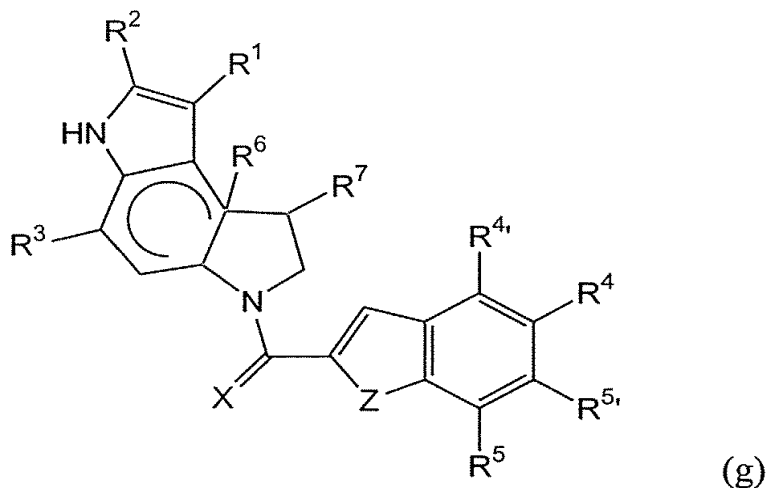
<675>

<676>

및 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로부터 선택되는데, 여기에서  $n$ 은 1 내지 10의 범위 내에 있는 정수이고,  $m$ 은 1 내지 4의 범위 내에 있는 정수이며,  $p$ 는 1 내지 6의 범위 내에 있는 정수이고, AA는 천연 또는 비-천연 아미노산이다. 어떤 구체예에서, AA<sub>n</sub> 또는 AA<sub>m</sub>는 펩티드 링커 (F)에 대하여 상기에 설명된 동일한 아미노산 서열로부터 선택되고,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ , 또는  $R^{5'}$ 의 링커 부분에 사용되는 아미노산 서열과 임의로 동일하다. 적어도 어떤 구체예에서,  $R^3$ 은 생체내에서 분리가능하여 활성 약물 화합물을 제공한다. 적어도 어떤 구체예에서,  $R^3$ 은 화합물의 생체내 용해성을 증가시킨다. 어떤 구체예에서, 활성 약물을 제공하기 위하여 혈액에서 활성 약물의 농도의 감소 속도가  $R^3$ 의 분리 속도보다 실질적으로 빠르다. 이것은 활성 약물의 독성이 전구약물 형태의 것보다 실질적으로 높은 곳에서 특히 유용하다. 다른 구체예에서, 혈액에서, 활성 약물을 제공하기 위한  $R^3$ 의 분리 속도는 활성 약물의 농도의 감소 속도보다 빠르다.

<677>

다른 예시적 구체예에서, 본 발명은 식 (g)에 따른 구조를 갖는 화합물을 제공한다:



<678>

<679>

이 구체예에서, 치환기  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5'}$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  및 X의 아이덴티티들(identities)은 실질적으로 식 (a)에서 상술한 바와 같으며, 뿐만 아니라 특정 구체예에서도 같다. 기호 Z는 O, S 및 NR<sup>23</sup>으로부터 독립적으로 선택된 멤버이다. 기호 R<sup>23</sup>은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택된 멤버를 나타낸다. 각 R<sup>23</sup>은 독립적으로 선택된다. 기호 R<sup>1</sup>은 H, 치환 또는 비치환 저급 알킬, 또는 C(O)R<sup>8</sup> 또는 CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>



을 나타낸다.  $R^8$ 은 치환 알킬, 비치환 알킬,  $NR^9R^{10}$ ,  $NR^9NHR^{10}$  및  $OR^9$ 로부터 선택된 멤버이다.  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬로부터 독립적으로 선택된다.  $R^2$ 는 H, 또는 치환 또는 비치환 저급 알킬이다.  $R^2$ 가 치환 알킬일 때, 그것은 퍼플루오로알킬, 예를 들어,  $CF_3$ 이외의 것이 일반적으로 바람직하다. 한 구체예에서,  $R^2$ 는 치환 알킬인데, 여기에서 치환기는 할로젠이 아니다. 다른 구체예에서,  $R^2$ 는 비치환 알킬이다.

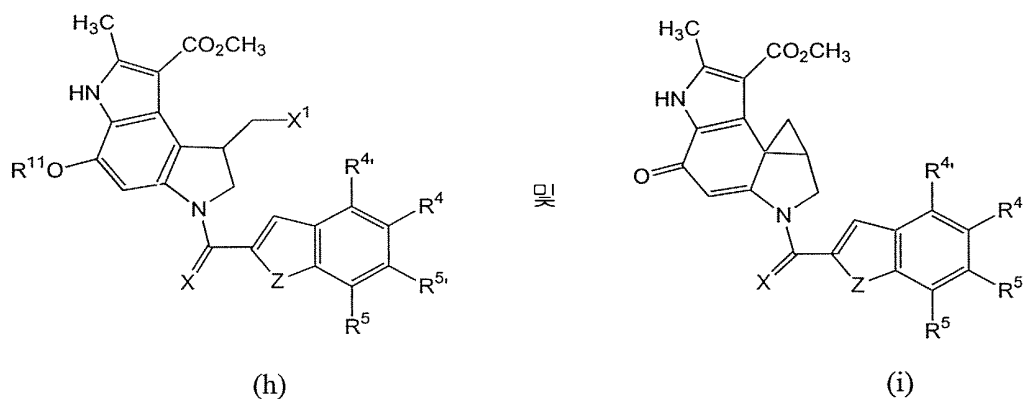
<680> 어떤 구체예에서,  $R^1$ 은  $CO_2CH_3$ 와 같은, 에스테르 부분이다. 어떤 구체예에서,  $R^2$ 은 저급 알킬기인데, 치환되거나 비치환될 수 있다. 현재 바람직한 저급 알킬기는  $CH_3$ 이다. 어떤 바람직한 구체예에서,  $R^1$ 은  $CO_2CH_3$ 이고  $R^2$ 는  $CH_3$ 이다.

<681> 어떤 구체예에서,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ , 및  $R^{5'}$ 는 H, 할로젠,  $NH_2$ , OMe,  $O(CH_2)_2N(R^{29})_2$  및  $NO_2$ 로부터 독립적으로 선택된 멤버들이다. 각  $R^{29}$ 는 독립적으로 H 또는 저급 알킬(예, 메틸)이다.

<682> 어떤 구체예에서, 이탈기  $X^1$ 이 할로젠, 일킬설포닐, 아릴설포닐, 및 아지드로 구성되는 군으로부터 선택되는 멤버이도록 약물을 선택한다. 어떤 구체예에서,  $X^1$ 는 F, Cl, 또는 Br이다.

<683> 어떤 구체예에서, Z는 O 또는 NH이다. 어떤 구체예에서, X는 O이다.

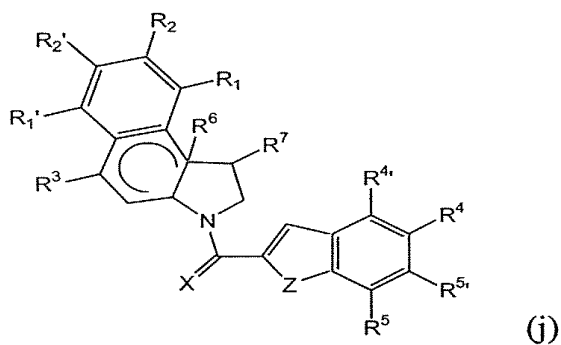
<684> 또 다른 예시적 구체예에서, 본 발명은 식 (h) 또는 (i)에 따른 구조를 갖는 화합물을 제공한다:



<685>

<686> 식 (e)의 듀오카르마이신 유사체의 다른 바람직한 구조는 고리계 A가 비치환 또는 치환 페닐 고리인 구조이다. 고리계 A가 피롤일 때의 식 7의 구조에 대해 상술된 약물 분자 상의 바람직한 치환기는 또한 고리계 A가 비치환 또는 치환 페닐 고리일 때의 바람직한 치환기이다.

<687> 예를 들면, 바람직한 구체예에서, 약물 (D)는 구조 (j)를 포함한다:



<688>

<689> 이 구조에서,  $R^3$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ , X는 식 (e)에 대하여 상술된 바와 같다. 더욱이, Z는 O, S 및  $NR^{23}$ 으로부터 선택된 멤버이고, 여기에서,  $R^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택된 요소

이며;

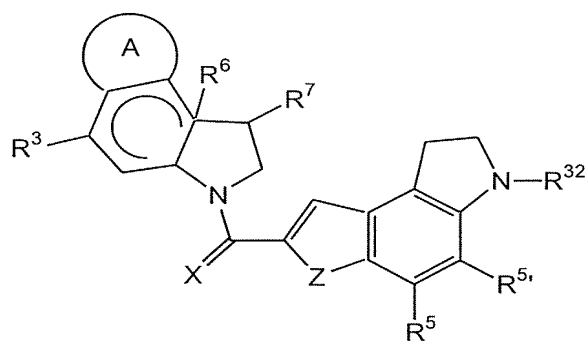
<690>  $R^1$ 은 H, 치환 또는 비치환 저급 알킬,  $C(O)R^8$ , 또는  $CO_2R^8$ 이고, 여기에서  $R^8$ 은  $NR^9R^{10}$  및  $OR^9$ 로부터 선택된 멤버이며, 여기에서  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬로부터 독립적으로 선택되는 멤버이고;

<691>  $R^{1'}$ 은 H, 치환 또는 비치환 저급 알킬, 또는  $C(O)R^8$ 이고, 여기에서,  $R^8$ 은  $NR^9R^{10}$  및  $OR^9$ 로부터 선택된 멤버이며, 여기에서  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬로부터 독립적으로 선택되는 멤버이고;

<692>  $R^2$ 는 H, 또는 치환 또는 비치환 저급 알킬, 또는 비치환 헤테로알킬, 또는 시아노, 또는 알콕시이고;  $R^{2'}$ 는 H, 또는 치환 또는 비치환 저급 알킬, 또는 비치환 헤테로알킬이다.

<693>  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5'}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{15}$  또는  $R^{16}$  중 적어도 하나는 약물을 존재한다면  $L^1$ 에, 또는 F, H, J, 또는  $X^2$ 에 연결한다.

<694> 약물 (D)의 다른 구체예는 구조 (k)를 포함하는데, 여기에서  $R^4$  및  $R^{4'}$ 는 결합되어 헤테로사이클로알킬을 형성한다:



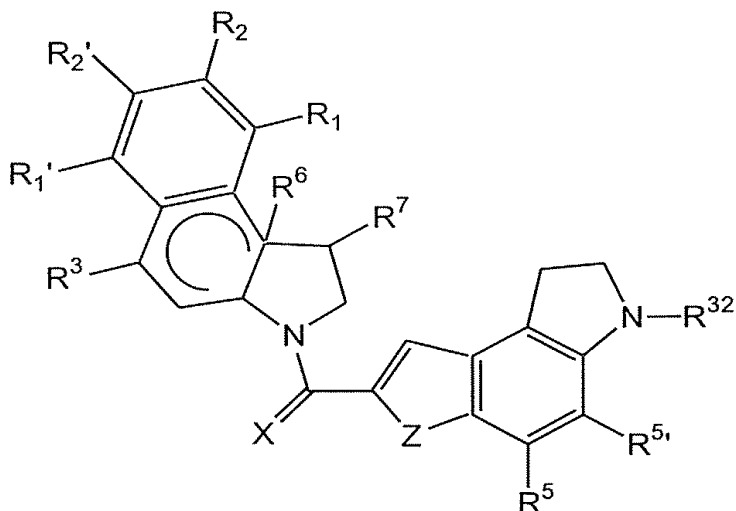
<695>

<696> 이 구조에서,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^{5'}$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ , X는 식 (e)에 대해 상술된 바와 같다. 더욱이, Z는 O, S 및  $NR^{23}$ 으로부터 선택된 멤버이고, 여기에서,  $R^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택된 요소이고;

<697>  $R^{32}$ 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠,  $NO_2$ ,  $NR^{15}R^{16}$ ,  $NC(O)R^{15}$ ,  $OC(O)NR^{15}R^{16}$ ,  $OC(O)OR^{15}$ ,  $C(O)R^{15}$ ,  $SR^{15}$ ,  $OR^{15}$ ,  $CR^{15}=NR^{16}$ , 및  $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$ 로부터 선택되는데, 여기에서 n은 1 내지 20의 정수이다.  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 독립적으로 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 및 치환 또는 비치환 펩티딜을 나타내는데, 여기에서  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 그들이 부착되는 질소 원자와 함께, 임의로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는 4내지 6의 멤버를 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성한다.  $R^{32}$ 는, 분리가 가능한 링커 또는 분리가 가능한 기질과 같이, 그의 구조 안에 하나 이상의 분리가 가능한 기를 임의로 포함한다. 예시적인 분리가 가능한 기는 펩티드, 아미노산, 하이드라진, 디설파이드, 및 세팔로스포린 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5'}$ ,  $R^{15}$ , 및  $R^{16}$ 에 대하여 본 명세서에 서술된 치환기의 임의의 선택은  $R^{32}$ 에도 적용가능하다.

<698>  $R^5$ ,  $R^{5'}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ , 또는  $R^{32}$ 의 적어도 하나는 약물을 존재한다면  $L^1$ 에, 또는 F, H, J, 또는  $X^2$ 에 연결한다. 적어도 어떤 구체예에서,  $R^{32}$ 는 약물을 존재한다면  $L^1$ 에, 또는 F, H, J, 또는  $X^2$ 에 결합한다.

<699> 이 화합물의 바람직한 구체에는 다음 구조를 가진다:



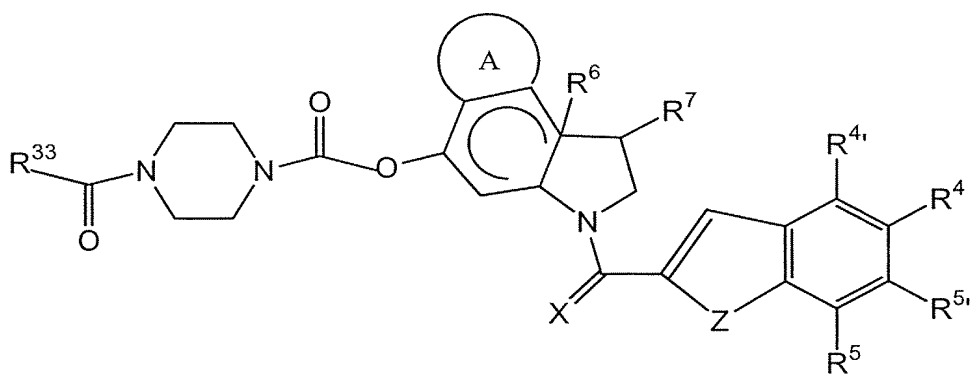
<700>

<701>  $R^1$ 은 H, 치환 또는 비치환 저급 알킬,  $C(O)R^8$ , 또는  $CO_2R^8$ 이고, 여기에서  $R^8$ 은  $NR^9R^{10}$  및  $OR^9$ 로부터 선택된 멤버이고, 여기에서  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬로부터 독립적으로 선택되는 멤버이고;

<702>  $R^{1'}$ 은 H, 치환 또는 비치환 저급 알킬, 또는  $C(O)R^8$ 이고, 여기에서,  $R^8$ 은  $NR^9R^{10}$  및  $OR^9$ 로부터 선택된 멤버이며, 여기에서  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로알킬로부터 독립적으로 선택되는 멤버이고;

<703>  $R^2$ 은 H, 또는 치환 또는 비치환 저급 알킬, 또는 비치환 헤테로알킬, 또는 시아노, 또는 알콕시이고;  $R^{2'}$ 은 H, 또는 치환 또는 비치환 저급 알킬, 또는 비치환 헤테로알킬이다.

<704> 다른 구체에는 다음 식을 가진다:



<705>

<706> 이 구조에서, A,  $R^6$ ,  $R^7$ , X,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ , 및  $R^{5'}$ 는 식 (e)에 대해 상술된 바와 같다. 더욱이, Z는 O, S 및  $NR^{23}$ 으로부터 선택된 멤버이고, 여기에서,  $R^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택된 멤버이고;

<707>  $R^{33}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠,  $NO_2$ ,  $NR^{15}R^{16}$ ,  $NC(O)R^{15}$ ,  $OC(O)NR^{15}R^{16}$ ,  $OC(O)OR^{15}$ ,  $C(O)R^{15}$ ,  $SR^{15}$ ,  $OR^{15}$ ,  $CR^{15}=NR^{16}$ , 및  $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$ 로부터 선택되는데, 여기에서 n은 1 내지 20의 정수이다.  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 독립적으로 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 및 치환 또는 비치환 펩티딜을 나타내는데, 여기에서  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 그들이 부착되는 질

소 원자와 함께, 임의로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는, 4내지 6의 멤버를 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성한다.  $R^{33}$ 은 약물을 존재한다면  $L^1$ 에, 또는 F, H, J, 또는  $X^2$ 에 연결한다.

<708> 바람직하게, A는 치환 또는 비치환 페닐, 또는 치환 또는 비치환 피롤이다. 또한,  $R^{11}$ 에 대하여 본 명세서에 서술된 치환기의 임의의 선택은  $R^{33}$ 에도 적용가능하다.

<709> 리간드

<710>  $X^4$ 는 보호된 반응성 기능기, 비보호된 반응성 기능기, 검출가능한 표지, 및 표적화 제제로 구성된 군으로부터 선택된 리간드를 나타낸다. 바람직한 리간드는 항체 및 이의 단편과 같은, 표적화 제제다.

<711> 어떤 구체예에서,  $X^4$ 기는  $R^{29}$ ,  $COOR^{29}$ ,  $C(O)NR^{29}$ , 및  $C(O)NNR^{29}$ 로부터 선택되는 멤버로 기술될 수 있으며, 여기에서  $R^{29}$ 는 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 및 치환 또는 비치환 헤테로아릴로부터 선택된 멤버이다. 또 다른 예시적인 구체예에서,  $R^{29}$ 는 티올 반응성 멤버이다. 더 예시적인 구체예에서,  $R^{29}$ 는 할로아세틸 및 알킬 할라이드 유도체, 말레이미드, 아지리딘, 및 아크릴로일 유도체로부터 선택된 티올 반응성 멤버이다. 상기 티올 반응성 멤버는, 예를 들어, 항체와 같은 표적화 제제의 아미노산의 측쇄와 반응하여 표적화 제제를 링커-약물 부분에 결합시킬 수 있는 반응성 보호기로서 작용할 수 있다.

<712> 검출가능한 표지

<713> 본 발명의 화합물 및 방법과 연관되어 사용된 특정 표지 또는 검출가능한 기는 일반적으로 그것이 본 발명의 화합물의 활성 또는 유용성에 유의하게 간섭하지 않는 한, 본 발명의 중요한 관점이 아니다. 검출가능한 기는 검출가능한 물리적 또는 화학적 성질을 갖는 임의의 물질일 수 있다. 그러한 검출가능한 표지는 면역분석 분야에서 잘 발달되어 왔으며, 일반적으로, 그러한 방법에 유용한 대부분의 임의의 표지는 본 발명에 적용될 수 있다. 따라서, 표지는 분광기의, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단에 의해 검출가능한 임의의 조성물이다. 본 발명에 유용한 표지는 자성 구슬(예, DYNABEADS<sup>TM</sup>), 형광 색소(예, 형광물질 이소티오시아네이트, 텍사스 레드(Texas red), 로다민(rhodamine), 등), 방사능표지(예,  $^3H$ ,  $^{125}I$ ,  $^{35}S$ ,  $^{14}C$ , 또는  $^{32}P$ ), 효소(예, 호스 라디시 퍼옥시다제(horse radish peroxidase), 알칼리 포스파타제, 및 ELISA에 일반적으로 사용되는 다른 것들), 및 콜로이드성 금 또는 착색된 유리 또는 플라스틱 구슬(예, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스, 등)과 같은 비색 표지를 포함한다.

<714> 당해 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 표지를 본 발명의 화합물에 직접적으로 또는 간접적으로 결합시킬 수 있다. 상술한 바와 같이, 요구되는 민감도, 화합물과의 접합의 용이성, 안정성 요구, 사용가능한 설비 및 처리 규정에 따라 표지를 선택함으로써 매우 다양한 표지를 사용할 수 있다.

<715> 본 발명의 화합물이 검출가능한 표지에 접합될 때, 상기 표지는 바람직하게는 방사성 동위원소, 형광성 제제, 형광성 제제 전구체, 발색단(chromophores), 효소 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 멤버이다. 항체에 여러 기들을 접합시키는 방법은 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, 항체에 빈번히 접합되는 검출가능한 표지는 호스라디시 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제,  $\beta$ -갈락토시다제, 및 글루코스 옥시다제와 같은 효소이다.

<716> 비-방사성 표지는 흔히 간접적인 수단에 의해서 부착된다. 일반적으로, 리간드 분자(예, 비오틴)는 접합체의 성분에 공유적으로 결합된다. 다음에 상기 리간드는 고유하게 검출가능하거나, 검출가능한 효소, 형광성 화합물, 화학발광성 화합물과 같은, 신호 시스템에 공유적으로 결합되는 다른 분자(예, 스트렙타비딘)에 결합된다.

<717> 또한 본 발명의 접합체의 성분은, 예를 들면, 효소 또는 형광단과의 접합에 의하여, 신호 생성 화합물에 직접적으로 접합될 수 있다. 표지로서 관심의 효소는 우선적으로 하이드롤라제, 특히 포스파타제, 에스테라제 및 글리코시다제, 또는 옥시다제, 특히 퍼옥시다제일 것이다. 형광성 화합물은 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움벨리페론, 등등을 포함한다. 화학발광성 화합물은 루시페린, 및 2,3-디하이드로프탈라진디온, 예를 들면, 루미놀을 포함한다. 사용될 수 있는 여러 표지화 또는 신호 생성 시스템의 검토를 위하여, 미국 특허번호 제 4,391,904호를 참조.

<718> 표지를 검출하는 수단은 당업자에 잘 알려져 있다. 따라서, 예를 들면, 표지가 방사성 표지일 때, 검출 수단은

자가방사기록법(autoradiography)에서와 같은 신틸레이션 계수기 또는 사진 필름을 포함한다. 표지가 형광성 표지일 때, 적절한 파장의 빛을 갖는 형광색소를 여기시키고(exciting) 그 결과의 형광을 검출함으로써 표지를 검출할 수 있다. 사진 필름 수단에 의하여, 전하결합소자(charge coupled devices, CCDs) 또는 광증폭기 등과 같은 전자 검출기를 사용함으로써, 상기 형광을 육안으로 검출할 수 있다. 유사하게, 효소에 적절한 기질을 제공하고 그 결과의 반응 생성물을 검출함으로써, 효소 표지를 검출할 수 있다. 마지막으로, 단순한 비색 표지는 표지와 관련된 색깔을 관찰함으로써 간단히 검출할 수 있다. 따라서, 여러 딥스틱(dipstick) 분석법에서, 접합된 금은 흔히 분홍색으로 나타나고, 반면에 다양한 접합된 구슬은 구슬의 색으로 나타낸다.

<719> 형광성 표지는 취급시 주의를 거의 요구하지 않는다는 장점을 가지며, 고-처리량 가시화 기술(컴퓨터를 포함하는 통합된 시스템에서 분석용 이미지의 디지털화를 포함하는 광학적 분석)에 사용할 수 있어서 현재 바람직하다. 바람직한 표지는 다음 중 하나 이상에 의하여 전형적으로 특징지어질 수 있다: 표지화하는데 있어서 높은 감응성, 높은 안정성, 낮은 백그라운드(background), 낮은 환경 감응성 및 높은 특이성. 많은 형광성 표지는 SIGMA chemical company(Saint Louis, MO), Molecular Probes(Eugene, OR), R&D systems(Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology(Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories Inc.(Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company(Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc.(Gaithersburg, MD), Fluka Chemica- Biochemika Analytika(Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), 및 Applied Biosystems(Foster City, CA), 뿐만 아니라 당업자에게 알려진 많은 다른 상업적 소스(sources)로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 더욱이, 당업자들은 특정 용도에 적절한 형광단을 선택하는 방법을 알 것이며, 상업적으로 용이하게 입수할 수 없다면, 필요한 형광단을 새로 합성하거나 상업적으로 입수할 수 있는 형광성 화합물을 합성적으로 변형하여 원하는 형광성 표지에 도달할 수 있을 것이다.

<720> 작은 분자 형광단에 덧붙여, 자연적으로 발생하는 형광성 단백질 및 그러한 단백질의 조작된 유사체가 본 발명에서 유용하다. 그러한 단백질은, 예를 들면, 자포동물의 녹색 형광성 단백질(Ward 등, *Photochem. Photobiol.* 35:803-808 (1982); Levine 등, *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B:77-85 (1982)), 비브리오 피셰리(*Vibrio fischeri*) 균주로부터의 황색 형광성 단백질(Baldwin 등, *Biochemistry* 29:5509-15 (1990)), 와편모충 심비오 디니움(dinoflagellate Symbiodinium) sp 종으로부터의 페리딘-클로로필(Peridinin-chlorophyll)(Morris 등, *Plant Molecular Biology* 24:673:77 (1994)), 시네코코커스(*Synechococcus*), 예를 들면, 피코에리트린(phycoerythrin) 및 피코시아닌(phycocyanin)과 같은 해양 시아노박테리아로부터의 피코빌리단백질(phycobiliproteins)(Wilbanks 등, *J. Biol. Chem.* 268:1226-35 (1993)), 등을 포함한다.

<721> 일반적으로, 세포독소와 표적화 제제(또는 다른 시약), 및 선택적으로는 스페이서기의 사이에 결합을 형성하기 전에, 적어도 하나의 화학적 기능성기가 활성화될 것이다. 당업자는 하이드록시, 아미노, 및 카르복시기를 포함한, 다양한 화학적 기능성기가 다양한 표준 방법 및 조건을 사용하여 활성화될 수 있다는 것을 알 것이다. 예를 들면, 세포독소 또는 표적화 제제의 하이드록실기를 포스겐 처리를 통해 활성화시켜 해당 클로로포르메이트, 또는 p-니트로페닐클로로포르메이트를 형성하고 해당 카르보네이트를 형성할 수 있다.

<722> 한 예시적인 구체예에서, 본 발명은 카르복실 기능성기를 포함하는 표적화 제제를 이용한다. 예를 들면, 카르복실기를 해당 아실 할라이드 또는 활성 에스테르로의 전환에 의하여 활성화시킬 수 있다. 이 반응을 상기 March, pp. 388-89에 기술된 바와 같이 다양한 조건하에서 실시할 수 있다. 한 예시적인 구체예에서, 아실 할라이드를 카르복실-함유기와 옥살일 클로라이드의 반응을 통하여 제조한다. 활성화된 제제를 세포독소 또는 세포독소-링커 가지 조합과 반응시켜 본 발명의 접합체를 형성한다. 카르복실-함유 표적화 제제의 사용은 단순히 예시적이고, 많은 다른 기능성 기들을 갖는 제제를 본 발명의 링커에 접합할 수 있다는 것을 당업자는 알 것이다.

<723> 반응성 기능기

<724> 기술되는 바를 명확히 하기 위하여, 계속되는 논의는 표적화 제제에 세포독소를 접합시키는 것에 초점을 맞춘다. 이 초점은 본 발명의 한 구체예를 예시하고, 다른 것들은 당업자에 의해서 쉽게 추론될 수 있다. 한 구체예의 논의에 초점을 맞춘 것으로 본 발명이 한정되지 않는다.

<725> 본 발명의 예시적 화합물은 치환 또는 비치환 알킬 또는 헤테로알킬 사슬에 일반적으로 위치하며, 다른 종에 그것들의 용이한 부착을 허용하는, 반응성 기능기를 포함한다. 상기 반응성기의 편리한 위치는 사슬의 말단 위치이다.

<726> 본 발명을 실시하는 데 유용한 반응들의 반응성기 및 반응부류는 일반적으로 생접합 화학의 분야에 잘 알려진 것들이다. 반응성 기능기를 보호하거나 보호하지 않을 수 있으며, 상기 기의 보호된 성질을 유기 합성의 분야에



알려진 방법에 의해 변하게 할 수 있다. 반응성 세포독소 유사체에 유용한 반응들의 바람직한 부류는 비교적 온화한 조건하에서 진행되는 것들이다. 이것들은 친핵성 치환(nucleophilic substitutions)(예, 아실 할라이드, 할성 에스테르를 갖는 아민 및 알코올의 반응), 친전자성 치환(예, 엔아민 반응) 및 탄소-탄소 및 탄소-헥테로 원자 다중 결합에 첨가(예, 마이클 반응(Michael reaction), 디엘스-알더 첨가(Diels-Alder addition))를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이들 및 다른 유용한 반응들은 예를 들면, March, *Advanced Organic Chemistry*, 제3판, John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; 및 Feeney 등, *Modification of Proteins: Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982에서 논의된다.

<727>

예시적인 반응 유형은 N-하이드록시숙신이미드 에스테르, N-하이드록시벤조트리아졸 에스테르, 산 할라이드, 아실 이미다졸, 티오에스테르, p-니트로페닐 에스테르, 알킬, 알케닐, 알키닐 및 방향족 에스테르를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 카르복실기 및 이의 다양한 유도체들의 반응을 포함한다. 하이드록실기는 에스테르, 에테르, 알데히드, 등등으로 전환될 수 있다. 할로알킬기는, 예를 들면, 아민, 카르복실레이트 음이온, 티올 음이온, 카르바니온 또는 알콕시드 이온과의 반응에 의하여 새로운 종류로 전환될 수 있다. 디에노필(예, 말레이미드)기는 디엘스-알더 반응에 참여한다. 알데히드 또는 케톤 기는 이민, 하이드라존, 세미카르바존 또는 옥시모, 또는 그리그나드(Grignard) 첨가 또는 알킬리튬 첨가와 같은 메커니즘을 통하여, 전환될 수 있다. 설폰일 할라이드는 아민과 쉽게 반응하여, 예를 들면, 설포아미드를 형성한다. 아민 또는 설포하이드릴 기는 예를 들면, 아실화, 알킬화 또는 산화될 수 있다. 알켄은, 사이클로첨가, 아실화, 마이클 첨가, 등등을 이용하여 새로운 종류의 배열로 전환될 수 있다. 에폭시드는 아민 및 하이드록실 화합물과 쉽게 반응한다.

<728>

통상의 기술자는 많은 이러한 연결들을 다양한 방법으로 다양한 조건을 이용하여 생성할 수 있음을 알 것이다. 에스테르의 제조에 대해서, 예를 들면, 상기 March, 1157 참조; 티오에스테르에 대해서, 상기 March, 362-363, 491, 720-722, 829, 941, 및 1172 참조; 카르보네이트에 대해서, 상기 March, 346-347 참조; 카르바메이트에 대해서, 상기 March, 1156-57 참조; 아미드에 대해서, 상기 March 1152 참조; 우레아 및 티오우레아에 대해서, 상기 March 1174 참조; 아세탈 및 케탈에 대해서, 상기 Greene 등 178-210 및 상기 March 1146 참조; 아실옥시 알킬 유도체에 대해서, *Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery*, K. B. Sloan, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1992 참조; 에놀 에스테르에 대해서, 상기 March 1160 참조; N-설포닐이미데이트에 대해서, Bundgaard 등, *J. Med. Chem.*, 31:2066 (1988) 참조; 안하이드라이드에 대해서, 상기 March 355-56, 636-37, 990-91, 및 1154 참조; N-아실아미드에 대해서, 상기 March 379 참조; N-마니쉬 염기에 대해서, 상기 March 800-02 및 828 참조; 하이드록시메틸 케톤 에스테르에 대해서, Petracek 등, *Annals NY Acad. Sci.*, 507:353-54 (1987) 참조; 디설피드에 대해서, 상기 March 1160 참조; 그리고 및 포스포네이트 에스테르 및 포스포아미데이트에 참조.

<729>

반응성 기능기들은 반응에 참여하지 않거나 반응을 간섭하지 않도록 비보호되거나 선택될 수 있다. 대안적으로, 보호기의 존재에 의하여 반응성 기능기가 반응에 참여하는 것을 막을 수 있다. 당업자는 특정 기능기가 반응 조건의 선택을 간섭하는 것을 막는 방법을 알 것이다. 유용한 보호기의 예에 대해서, Greene 등, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991 참조.

<730>

전형적으로, 표적화 제제는 표준 화학 기술을 사용하여 그들 각각의 화학적 기능성기들을 통해 세포독소에 공유적으로 연결된다. 임의적으로, 링커 또는 제제는 하나 이상의 스페이서기를 통하여 제제에 결합된다. 스페이서기는 조합으로 사용될 때 등가이거나 다를 수 있다.

<731>

일반적으로, 세포독소와 반응성 기능기 사이의 연결이 형성되기 전에, 그리고 임의로, 스페이서기는, 적어도 하나의 화학적 기능성기가 활성화될 것이다. 당업자는 하이드록시, 아미노 및 카르복시 기들을 포함하는, 다양한 화학적 기능성기들이 다양한 표준 방법들 및 조건들을 이용하여 활성화될 수 있다는 것을 알 것이다. 한 예시적인 구체예에서, 본 발명은 반응성 기능기로서 카르복실 기능성기를 포함한다. 카르복실기는 상기에서 기술된 바와 같이 활성화될 수 있다.

<732>

#### 분리가능한 기질

<733>

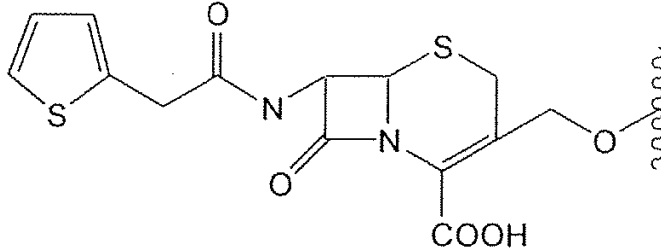
본 발명의 분리가능한 기질은 " $X^2$ " 로 나타낸다. 바람직하게, 분리가능한 기질은 효소에 의하여 분리될 수 있는 분리가능한 효소 기질이다. 바람직하게, 효소는, 직접적으로 또는 간접적으로, 치료될 종양 또는 다른 표적 세포와 우선적으로 관련이 있다. 효소는 치료될 종양 또는 다른 표적 세포에 의하여 생성될 수 있다. 예를 들면, 분리가능한 기질은 종양 또는 다른 표적 세포의 주위에 또는 안에서 발견되는 효소에 의하여 우선적으로 분리될 수 있는 펩티드일 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 효소는, 종양 항원에 특이적인 항체와 같은, 종양 세

포에 특이적으로 결합하는 표적화 제제에 부착될 수 있다.

- <734> 상기에 기술된 약물에 결합하기 적당한 효소 분리성 기질의 예로서, PCT 특허출원 공개번호 제 WO 00/33888호, 제 WO 01/95943호, 제 WO 01/95945호, 제 WO 02/00263호, 및 제 WO 02/100353호는 약물에 분리가능한 펩티드의 부착을 공지하며, 이들 모두는 참조 문헌으로서 본 명세서에 병합된다. 펩티드는, 종양과 관련있는, 트로우아제(trouase)(티메트 올리고펩티다아제(thimet oligopeptidase)와 같은), CD10(네프릴리신), 기질 메탈로프로테아제(MMP2 또는 MMP9와 같은), 유형 II 트랜스멤브레인 세린 프로테아제(헵신, 테스티신, TMPRSS4, 또는 매트립타제/MT-SP1과 같은), 또는 카텡신과 같은, 효소에 의하여 분리될 수 있다. 이 구체예에서, 전구약물은 상술한 바와 같은 약물, 펩티드, 안정화기, 및 선택적으로 약물과 펩티드 사이의 연결기를 포함한다. 안정화기는 펩티드의 말단에 부착되어 전구약물이 종양 또는 다른 표적 세포에 도달하기 전에 분해되는 것을 막는다. 적절한 안정화기의 예들은, 숙신산, 디글리콜산, 말레산, 폴리에틸렌 글리콜, 피로글루탐산, 아세트산, 나프틸카복실산, 테레프탈산, 및 글루타르산 유도체들과 같은, 비-아미노산; 뿐만 아니라, 비-유전자로 암호화된 아미노산, 또는 아스파르트산의  $\beta$ -카복시기 또는 글루탐산의  $\gamma$ -카복실기에서 펩티드의 N-말단에 부착되는 아스파르트산 또는 글루탐산을 포함한다.
- <735> 펩티드는 전형적으로 3-12(또는 그 이상) 아미노산을 포함한다. 특정 아미노산의 선택은, 적어도 부분적으로, 펩티드를 분리하는데 사용될 효소, 뿐만 아니라, 생체내 펩티드의 안정성에 의존할 것이다. 적절한 분리가능한 펩티드의 일 예는  $\beta$ -AlaLeuAlaLeu(서열번호 102)이다. 이것은 안정화기와 조합하여 숙시닐- $\beta$ -AlaLeuAlaLeu(서열번호 102)를 형성한다. 적절한 분리가능한 펩티드의 다른 예가 상기에 언급된 참조문헌에 제공되어 있다.
- <736> 예증적 예로써, 네프릴리신(neprilysin), 중성 엔도펩티다아제(neutral endopeptidase, NEP), 및 공통 급성 림프구성 백혈병 항원(common acute lymphoblastic leukemia antigen, CALLA)으로도 알려진, CD10은 유형 II 세포-표면 아연-의존성 메탈로프로테아제이다. CD10과 함께 사용되는데 적절한 분리가능한 기질은 LeuAlaLeu 및 IleAlaLeu을 포함한다. 기질이 커짐에 따라 촉매 효율성이 종종 감소된다 할지라도, CD10에 대한 다른 알려진 기질은 50개까지의 아미노산 길이를 갖는 펩티드를 포함한다.
- <737> 다른 예증적 예는 기질 메탈로프로테아제(matrix metalloproteases, MMP)에 기초한다. 아마도 종양과 관계된 가장 특성화된 단백질 분해적 효소에서, 종양 미세환경 내에서 MMP의 활성화의 명확한 상관관계가 있다. 특히, 용해성 기질 효소 MMP2(젤라티나제 A) 및 MMP9(젤라티나제 B)는 집중적으로 연구되었고, 종양 성장을 포함하는 조직 리모델링 동안에 선택적으로 활성화되는 것으로 보여진다. MMP2 및 MMP9에 의하여 분리되도록 설계된 펩티드 서열은 텍스트란 및 메토티렉세이트의 접합체(Chau 등, *Bioconjugate Chem.* 15:931-941 (2004)); PEG (polyethylene glycol)와 독소루비신의 접합체(Bae 등, *Drugs Exp. Clin. Res.* 29:15-23 (2004)); 및 알부민과 독소루비신의 접합체(Kratz 등, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:2001-2006 (2001))에 대하여 설계되고 테스트된다. MMP와 함께 사용할 적절한 서열의 예는 ProValGlyLeuIleGly(서열번호 95), GlyProLeuGlyVal(서열번호 96), GlyProLeuGlyIleAlaGlyGln(서열번호 97), ProLeuGlyLeu(서열번호 98), GlyProLeuGlyMetLeuSerGln(서열번호 99), 및 GlyProLeuGlyLeuTrpAlaGln(서열번호 100)을 포함하나 이에 한정되지 않는다(예를 들어, Kline 등, *Mol. Pharmaceut.* 1:9-22 (2004) 및 Liu 등, *Cancer Res.* 60:6061-6067 (2000)뿐만 아니라 이전에 언급된 참조문헌을 참조). 다른 분리가능한 기질도 사용될 수 있다.
- <738> 또한 다른 예는 유형 II 트랜스멤브레인 세린 프로테아제이다. 효소의 이러한 기는, 예를 들어, 헵신, 테스티신, 및 TMPRSS4를 포함한다. GlnAlaArg는 매트립타제/MT-SP1(유방 및 난소 암들에서 과대-발현됨)과 함께 유용한 하나의 기질 서열이고, LeuSerArg는 헵신(전립선 및 다른 부분의 종양 유형에서 과대-발현됨)과 함께 유용하다(예, Lee 등, *J. Biol. Chem.* 275:36720-36725 및 Kurachi와 Yamamoto, *Handbook of Proeolytic Enzymes* 제2권, 제2판 (Barrett AJ, Rawlings ND & Woessner JF, eds) pp. 1699-1702 (2004) 참조). 다른 분리가능한 기질도 사용될 수 있다.
- <739> 분리가능한 기질 정렬의 다른 유형은 종양 또는 세포와 관련되는 분리가능한 기질을 분리할 수 있는 별개의 효소를 준비하는 것을 포함한다. 예를 들어, 효소는 종양-특이적 항체(또는 종양 또는 수용체 리간드와 같은 다른 표적 세포에 우선적으로 부착되는 다른 개체)에 결합될 수 있으며, 그리고 나서 효소-항체 접합체는 환자에게 제공될 수 있다. 효소-항체 접합체는 종양과 관련된 항원을 향하고 이 항원에 결합된다. 이어서, 약물-분리가능한 기질 접합체가 전구약물로서 환자에 제공된다. 약물-분리가능한 기질 접합체가 종양과 관련되는 효소와 반응할 때 상기 약물은 종양 근처에서 방출되지만 하여, 분리가능한 기질은 분리되고 약물은 유리된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제 4,975,278호; 제 5,587,161호; 제 5,660,829호; 제 5,773,435호; 및 제 6,132,722호는 그러한 정렬을 공지하는데, 이 모든 것들은 본 명세서에 참조 문헌으로서 병합된다. 적절한 효소 및 기질의 예는  $\beta$

-락타마제 및 세팔로스포린 유도체, 카르복시펩티다아제 G2 및 글루타믹 및 아스파르틱 염산 유도체들을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<740> 한 구체예에서, 효소-항체 접합체는 관심의, 표적 세포 상에서 또는 표적 자리에서 발현되는 항원에 대한 특이성에 기초하여 선택된, 항체, 또는 항체 단편을 포함한다. 항체에 대한 논의는 본 명세서에서 상기에 주어졌다. 적절한 세팔로스포린-분리가능성 기질의 예는 다음과 같다:



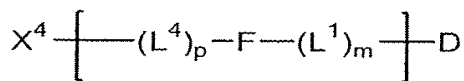
<741>

<742> 접합체의 예

<743> 본 발명의 링커 및 분리가능한 기질은 다양한 파트너 분자를 포함하는 접합체에 사용될 수 있다. 본 발명의 접합체의 예는 하기에 더 자세히 기술된다. 다른 지시가 없으며, 치환기들은 세포독소, 링커, 및 분리가능한 기질에 관한 부분에서 상기에 설명된 바와 같이 정의된다.

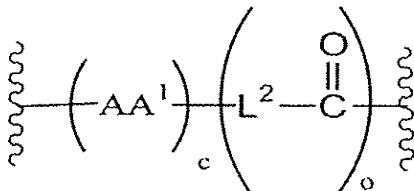
<744> A. 링커 접합체

<745> 적절한 접합체의 한 예는 다음 식의 화합물이다:



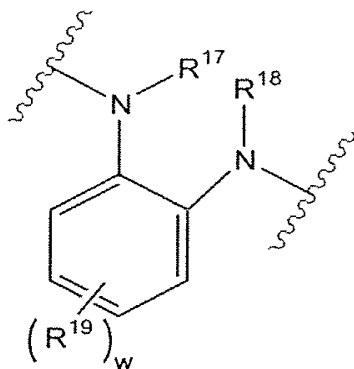
<746>

<747> 여기에서  $L^1$ 은 자기-희생 링커이고; m은 정수 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이며; F는 다음 구조를 포함하는 링커이다:



<748>

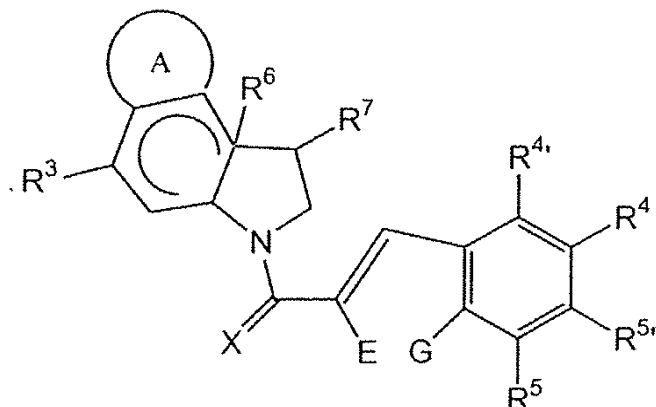
<749> 여기에서  $AA^1$ 은 천연 아미노산 및 비천연  $\alpha$ -아미노산으로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 멤버이고; c는 1 내지 20의 정수이며;  $L^2$ 는 자기-희생 링커이고 다음을 포함한다:



<750>

<751> 여기에서 각  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ , 및  $R^{19}$ 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬 및 치환 또는 비치환

아릴로부터 독립적으로 선택되고, w는 0 내지 4에서의 정수이며; o는 1이고; L<sup>4</sup>는 링커 멤버이며; p는 0 또는 1 이고; X<sup>4</sup>는 보호된 반응성 기능기, 비보호된 반응성 기능기, 검출가능한 표지, 및 표적화 제제로 구성된 군으로부터 선택된 멤버이며; D는 다음의 구조를 포함한다:



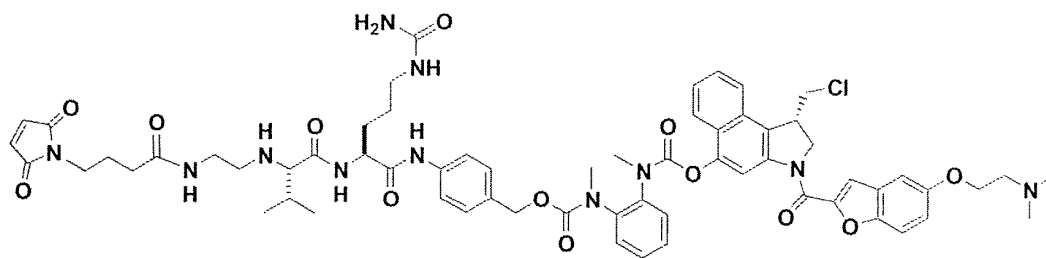
<752>

<753>

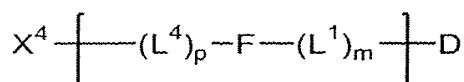
여기에서 고리계 A는 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 기들로부터 선택된 멤버이고; E 및 G는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 헤테로원자, 단일 결합으로부터 독립적으로 선택된 멤버이거나, E 및 G는 결합되어 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 선택된 고리계를 형성하며; X는 O, S 및 NR<sup>23</sup>으로부터 선택된 멤버이고; R<sup>23</sup>은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택된 멤버이며; R<sup>3</sup>은 OR<sup>11</sup>인데, R<sup>11</sup>은 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 설포네이트, 아실, C(O)R<sup>12,13</sup>, C(O)OR<sup>12</sup>, C(O)NR<sup>12,13</sup>, P(O)(OR<sup>12</sup>)<sub>2</sub>, C(O)CHR<sup>12,13</sup>, SR<sup>12</sup> 및 SiR<sup>12,13,14</sup>로 구성되는 군으로부터 선택된 멤버이고, R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup> 및 R<sup>5'</sup>는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬, 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠, NO<sub>2</sub>, NR<sup>15,16</sup>, NC(O)R<sup>15</sup>, OC(O)NR<sup>15,16</sup>, OC(O)OR<sup>15</sup>, C(O)R<sup>15</sup>, SR<sup>15</sup>, OR<sup>15</sup>, CR<sup>15</sup>=NR<sup>16</sup>, 및 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된 멤버들이거나, R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup> 및 R<sup>5'</sup>의 임의의 인접쌍은, 그것들이 부착되는 탄소 원자와 함께, 결합되어 4 내지 6의 멤버들을 갖는 치환 또는 비치환 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하며; 여기에서 n은 1 내지 20까지의 정수이고; R<sup>15</sup> 및 R<sup>16</sup>은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬, 및 치환 또는 비치환 펩티딜로부터 독립적으로 선택되고, 여기에서 R<sup>15</sup> 및 R<sup>16</sup>은 그것들이 부착되는 질소 원자와 함께, 임의로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는 4 내지 6의 멤버들을 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하며; R<sup>6</sup>은 존재하거나 부재하는 단일 결합이고, 존재할 때 R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>은 결합되어 사이클로프로필 고리를 형성하며; 및 R<sup>7</sup>은 상기 사이클로프로필 고리에서 R<sup>6</sup>과 결합된 CH<sub>2</sub>-X<sup>1</sup> 또는 -CH<sub>2</sub>- 이고, 여기에서 X<sup>1</sup>은 이탈기인데, 여기에서 R<sup>11</sup>은 상기 약물을 존재한다면 L<sup>1</sup>에, 또는 F에 연결시킨다.

<754>

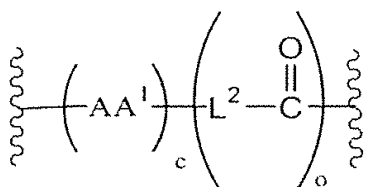
어떤 구체예에서, 약물은 상기 구조 (c) 또는 (f)를 가진다. 접합체로서 사용되기에 적당한 화합물의 특정한 예는 다음과 같다:



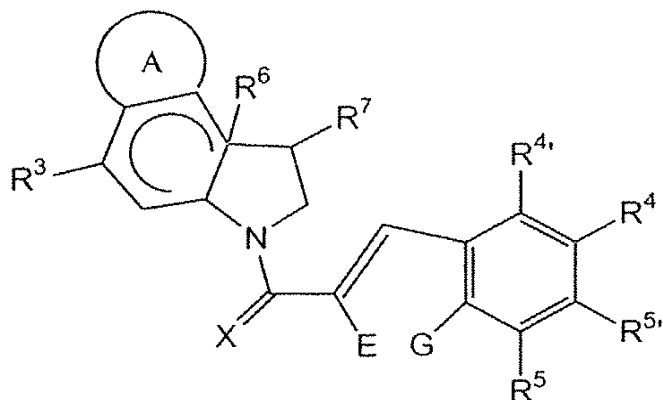
접합체 유형의 다른 예는 다음 식의 화합물이다:



여기에서  $L^1$ 은 자기-희생 링커이며;  $m$ 은 정수 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이고;  $F$ 는 다음 구조를 포함하는 링커이다:



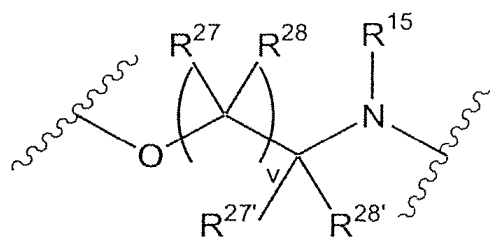
여기에서  $AA^1$ 은 천연 아미노산 및 비천연  $\alpha$ -아미노산으로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 멤버이며;  $c$ 는 1 내지 20의 정수이고;  $L^2$ 는 자기-희생 링커이며;  $o$ 는 0 이거나 1이고;  $L^4$ 는 링커 멤버이며;  $p$ 는 0 또는 1이고;  $X^4$ 는 보호된 반응성 기능기, 비보호된 반응성 기능기, 검출가능한 표지, 표적화 제제로 구성되는 군으로부터 선택된 멤버이며; 그리고  $D$ 는 다음 구조를 포함한다:



여기에서 고리계 A는 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 기들로부터 선택된 멤버이고; E 및 G는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 헤테로원자, 단일 결합으로부터 독립적으로 선택된 멤버이거나, E 및 G는 결합되어 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 선택된 고리계를 형성하며; X는 O, S 및  $\text{NR}^{23}$ 으로부터 선택된 멤버이고;  $\text{R}^{23}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택된 멤버이며;  $\text{R}^3$ 은 (=O),  $\text{SR}^{11}$ ,  $\text{NHR}^{11}$  및  $\text{OR}^{11}$ 로 구성되는 군으로부터 선택된 멤버인데,  $\text{R}^{11}$ 은 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 설포네이트, 아실,  $\text{C}(\text{O})\text{R}^{12,13}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{12}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{12,13}$ ,  $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{12})_2$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{CHR}^{12,13}$ ,  $\text{SR}^{12}$  및  $\text{SiR}^{12,13,14}$ 로 구성되는 군으로부터 선택된 멤버이고, 여기에서  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$ , 및  $\text{R}^{14}$ 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및



치환 또는 비치환 아릴로부터 독립적으로 선택된 멤버인데,  $R^{12}$  및  $R^{13}$ 은 그것들이 부착된 질소 또는 탄소 원자와 함께 임의적으로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는, 4 내지 6 멤버를 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하며;  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬, 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠,  $NO_2$ ,  $NR^{15}R^{16}$ ,  $NC(O)R^{15}$ ,  $OC(O)NR^{15}R^{16}$ ,  $OC(O)OR^{15}$ ,  $C(O)R^{15}$ ,  $SR^{15}$ ,  $OR^{15}$ ,  $CR^{15}=NR^{16}$ , 및  $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$ 로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 멤버들이거나,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$ 의 임의의 인접쌍은, 그것들이 부착되는 탄소 원자와 함께, 결합되어 4 내지 6의 멤버들을 갖는 치환 또는 비치환 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하는데, 여기에서 n은 1 내지 20까지의 정수이고;  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬, 및 치환 또는 비치환 펩티딜로부터 독립적으로 선택되는데, 여기에서  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 그것들이 부착되는 질소 원자와 함께, 임의로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는, 4 내지 6의 멤버들을 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하며; 여기에서  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$  중 적어도 하나는 약물을 존재한다면  $L^1$ 에, 또는 F에 연결하고, 다음을 포함한다:



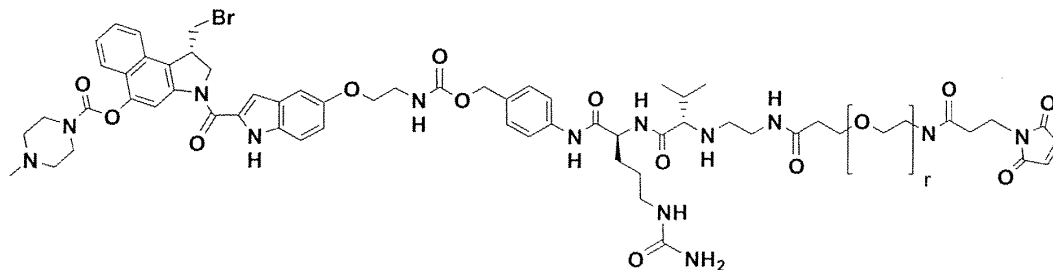
<763>

<764>

여기에서 v는 1 내지 6까지의 정수이고; 각  $R^{27}$ ,  $R^{27'}$ ,  $R^{28}$ , 및  $R^{28'}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며;  $R^6$ 은 존재하거나 부재하는 단일 결합이고 존재할 때  $R^6$  및  $R^7$ 은 결합되어 사이클로프로필 고리를 형성하며; 그리고  $R^7$ 은 상기 사이클로프로필 고리에서  $R^6$ 과 함께 결합되는  $CH_2-X^1$  또는  $-CH_2-$ 인데, 여기에서  $X^1$ 는 이탈기이다.

<765>

어떤 구체예에서, 약물은 상기 구조 (c) 또는 (f)를 가진다. 접합체로서 사용되기에 적당한 화합물의 특정한 예는 다음과 같다:



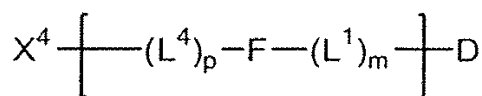
<766>

<767>

여기에서 r은 0 내지 24 범위 내에서의 정수이다.

<768>

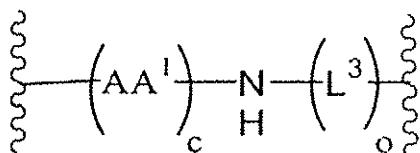
적절한 접합체의 다른 예는 다음 식의 화합물이다:



<769>

<770>

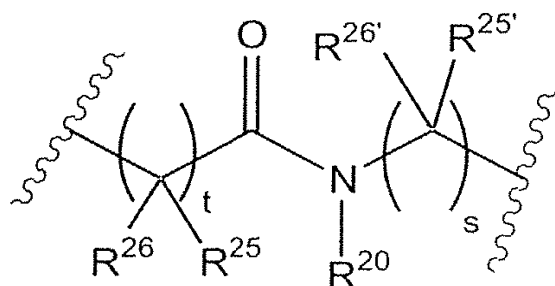
여기에서  $L^1$ 은 자기-희생 링커이고; m은 정수 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이며; F는 다음 구조를 포함하는 링커이다:



<771>

<772>

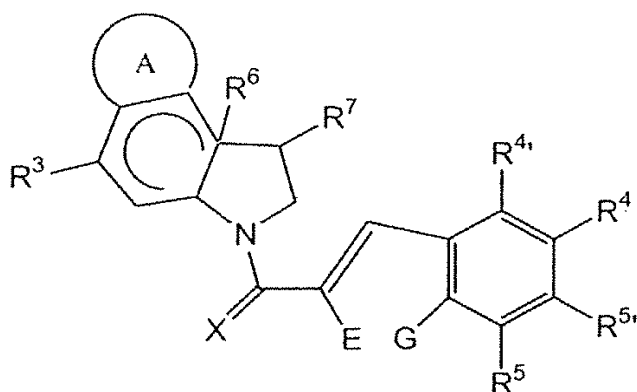
여기에서  $AA^1$ 은 천연 아미노산 및 비천연  $\alpha$ -아미노산으로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 멤버이며;  $c$ 는 1 내지 20의 정수이고;  $L^3$ 은 1차 또는 2차 아민 또는 카르복실 기능기를 포함하는 스페이서기이며; 여기에서  $L^3$ 이 존재하면,  $m$ 은 0이고,  $L^3$ 의 아민이 D의 매달린 카르복실 기능기와 아마이드 결합을 형성하거나  $L^3$ 의 카르복실이 D의 매달린 아민 기능기와 아마이드 결합을 형성하거나 둘 중의 하나이고;  $o$ 는 0 또는 1이고;  $L^4$ 는 링커 멤버인데, 여기에서  $L^4$ 는  $(AA^1)_c$ 의 N-말단에 직접 부착되는.



<773>

<774>

을 포함하는데, 여기에서  $R^{20}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택되는 멤버이며, 각  $R^{25}$ ,  $R^{25'}$ ,  $R^{26}$ , 및  $R^{26'}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되고; s 및 t는 1 내지 6로부터 독립적으로 선택되는 정수들이며; p는 1이고;  $X^4$ 는 보호된 반응성 기능기, 비보호된 반응성 기능기, 검출가능한 표지, 및 표적화 제제로 구성되는 군으로부터 선택된 멤버이며; 그리고 D는 다음 구조를 포함한다:



<775>

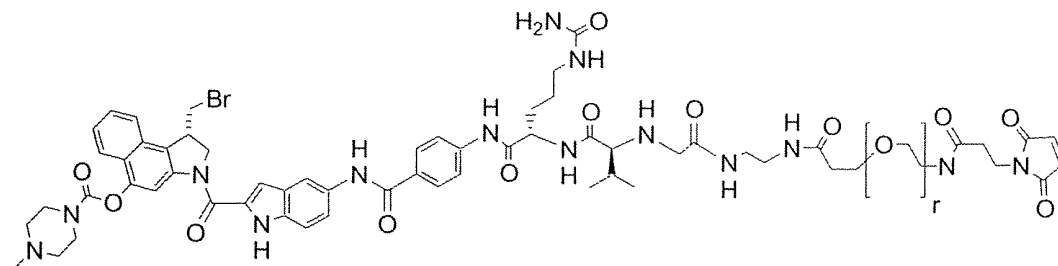
<776>

여기에서 고리계 A는 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 기들로부터 선택된 멤버이고; E 및 G는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 헤테로원자, 단일 결합으로부터 독립적으로 선택된 멤버이거나, E 및 G는 결합되어 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 선택된 고리계를 형성하며; X는 O, S 및  $\text{NR}^{23}$  으로부터 선택된 멤버이고;  $\text{R}^{23}$  은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택된 멤버이며;  $\text{R}^3$  은 (=O),  $\text{SR}^{11}$ ,  $\text{NHR}^{11}$  및  $\text{OR}^{11}$  로 구성되는 군으로부터 선택된 멤버인데,  $\text{R}^{11}$  은 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 실로네이트, 아실,  $\text{C(O)R}^{12, 13}$ ,  $\text{C(O)OR}^{12}$ ,  $\text{C(O)NR}^{12, 13}$ ,  $\text{P(O)(OR}^{12})_2$ ,  $\text{C(O)CHR}^{12, 13}$ ,  $\text{SR}^{12}$  및  $\text{SiR}^{12, 13, 14}$  로 구성되는 군으로부터

터 선택된 멤버이고, 여기에서  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ , 및  $R^{14}$ 는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 치환 또는 비치환 아릴로부터 독립적으로 선택된 멤버인데,  $R^{12}$  및  $R^{13}$ 은 그것들이 부착된 질소 또는 탄소 원자와 함께 임의적으로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는, 4 내지 6 멤버를 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하며;  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$ 는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬, 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$ ,  $\text{NC(O)}\text{R}^{15}$ ,  $\text{OC(O)}\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$ ,  $\text{OC(O)}\text{OR}^{15}$ ,  $\text{C(O)}\text{R}^{15}$ ,  $\text{SR}^{15}$ ,  $\text{OR}^{15}$ ,  $\text{CR}^{15}=\text{NR}^{16}$ , 및  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된 멤버들이거나,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$  및  $R^{5'}$ 의 임의의 인접쌍은, 그것들이 부착되는 탄소 원자와 함께, 결합되어 4 내지 6의 멤버들을 갖는 치환 또는 비치환 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하는데, 여기에서 n은 1 내지 20까지의 정수이고;  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬, 및 치환 또는 비치환 펩티딜로부터 독립적으로 선택되는데, 여기에서  $R^{15}$  및  $R^{16}$ 은 그것들이 부착되는 질소 원자와 함께, 임의로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는, 4 내지 6의 멤버들을 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하며;  $R^6$ 은 존재하거나 부재하는 단일 결합이고 존재할 때  $R^6$  및  $R^7$ 은 결합되어 사이클로프로필 고리를 형성하며; 그리고  $R^7$ 은 상기 사이클로프로필 고리에서  $R^6$ 과 함께 결합되는  $\text{CH}_2\text{-X}^1$  또는  $\text{-CH}_2\text{-}$ 인데, 여기에서  $\text{X}^1$ 은 이탈기이고,  $R^4$ ,  $R^{4'}$ ,  $R^5$ ,  $R^{5'}$ ,  $R^{15}$  또는  $R^{16}$  중 적어도 하나는 약물을 존재한다면  $\text{L}^1$ 에, 또는 F에 연결한다.

<777>

어떤 구체예에서, 약물은 상기 구조 (c) 또는 (f)를 가진다. 접합체로서 사용하기에 적절한 화합물의 한 특정 예는 다음을 포함한다:



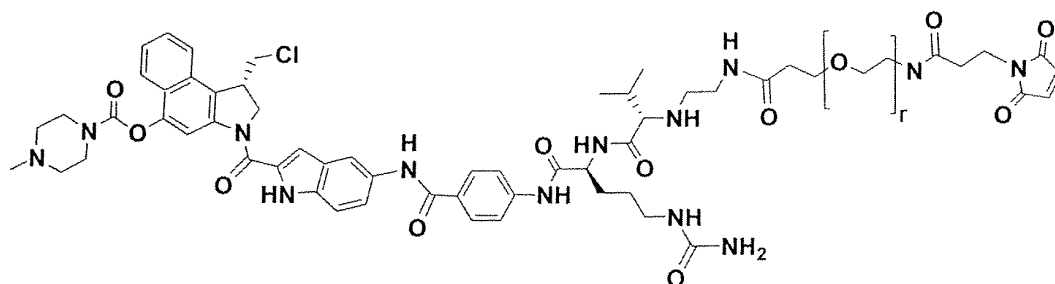
<778>

<779>

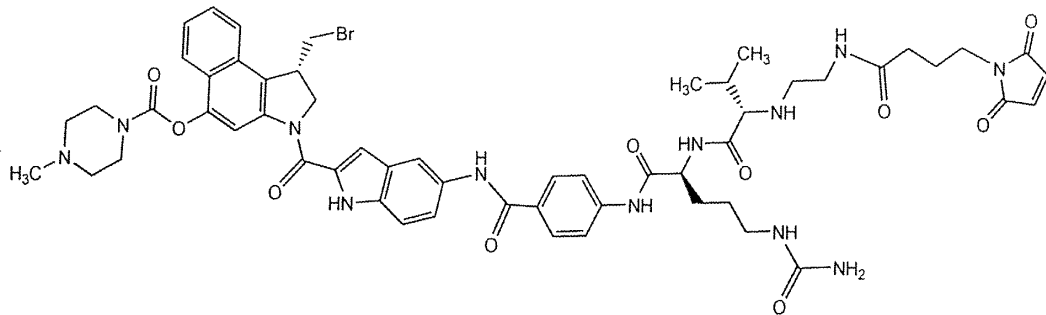
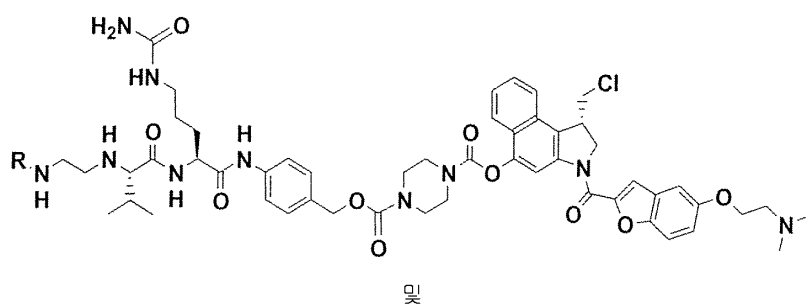
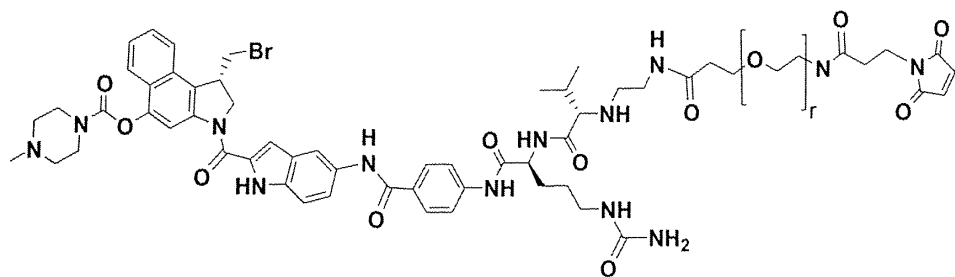
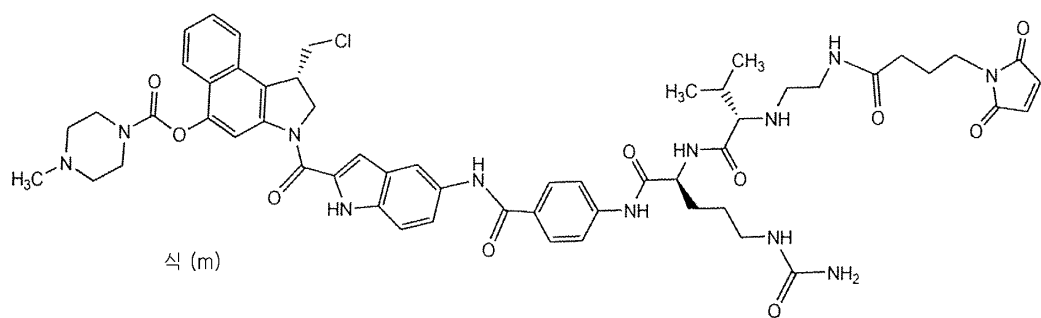
여기에서 r은 0 내지 24의 범위 내의 정수이다.

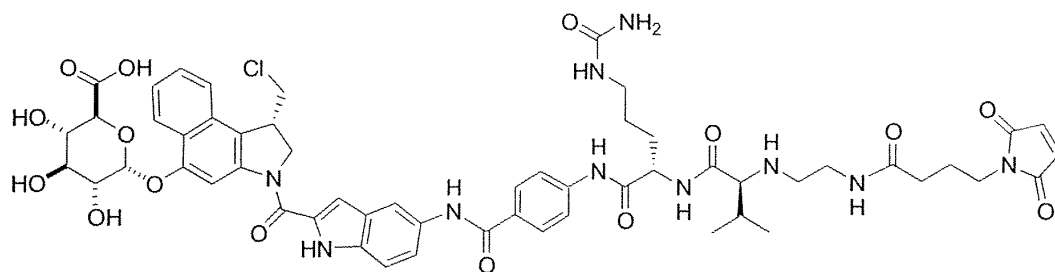
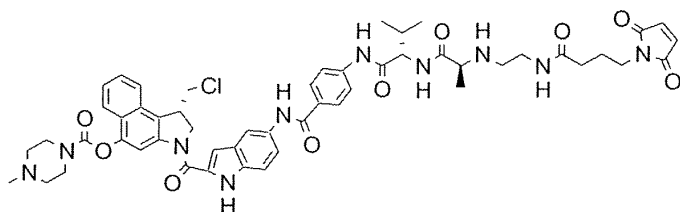
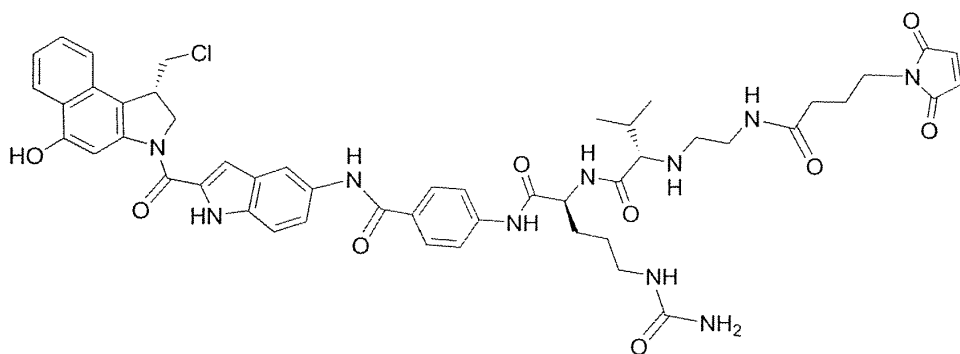
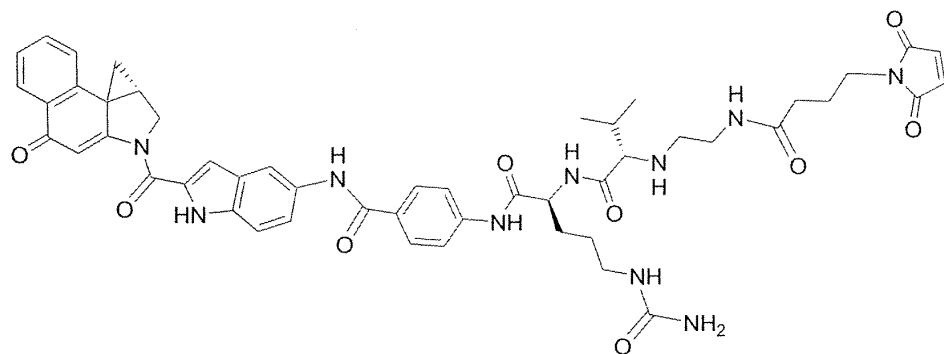
<780>

접합체로서 사용하기에 적절한 화합물의 다른 예는 다음을 포함한다:



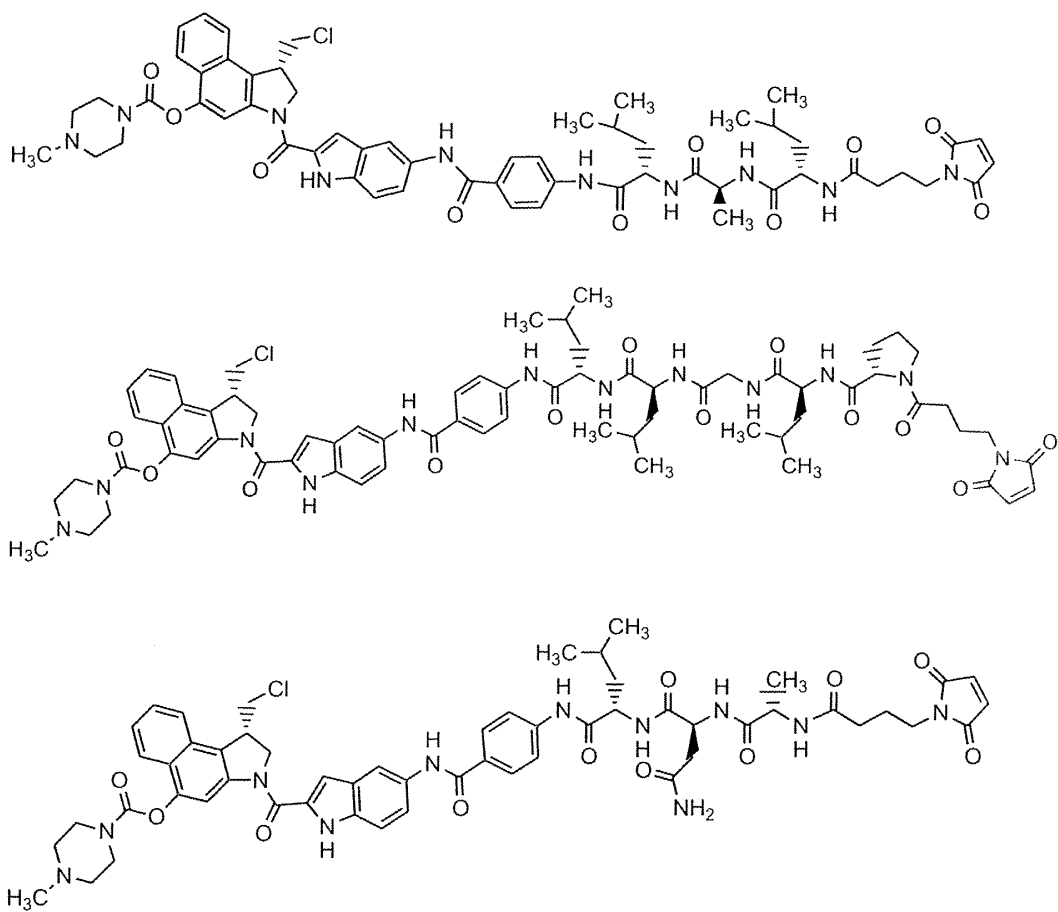
<781>



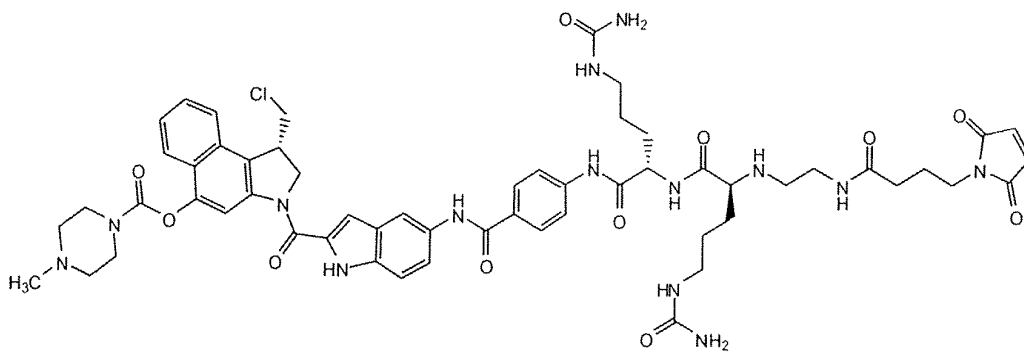
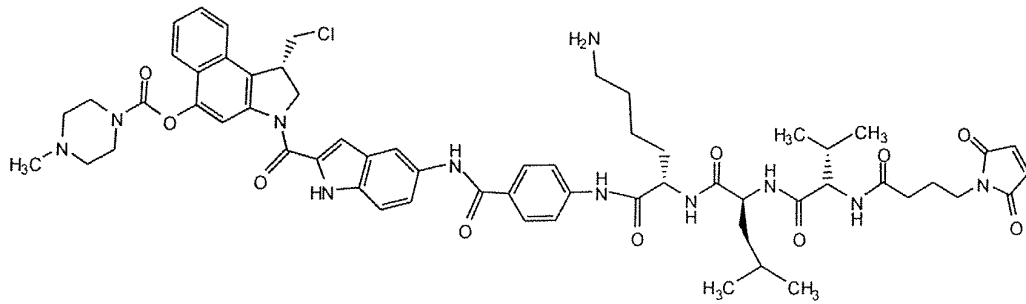
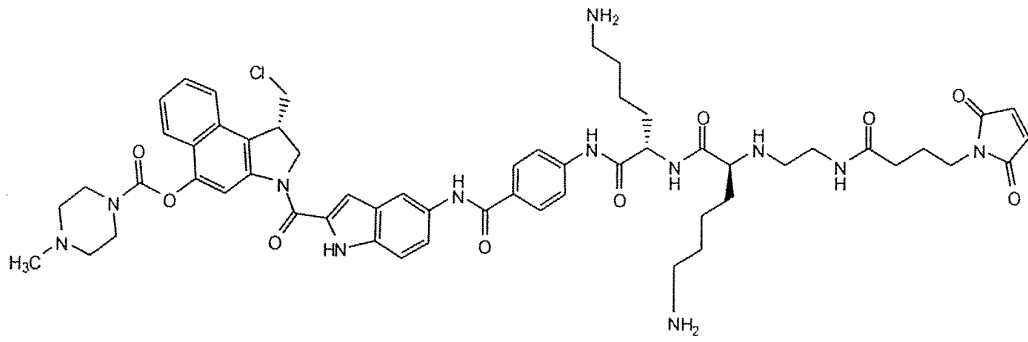


<783>

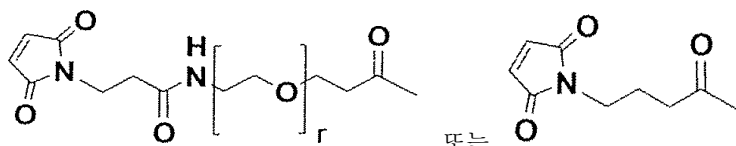




<784>



<785>



<786>

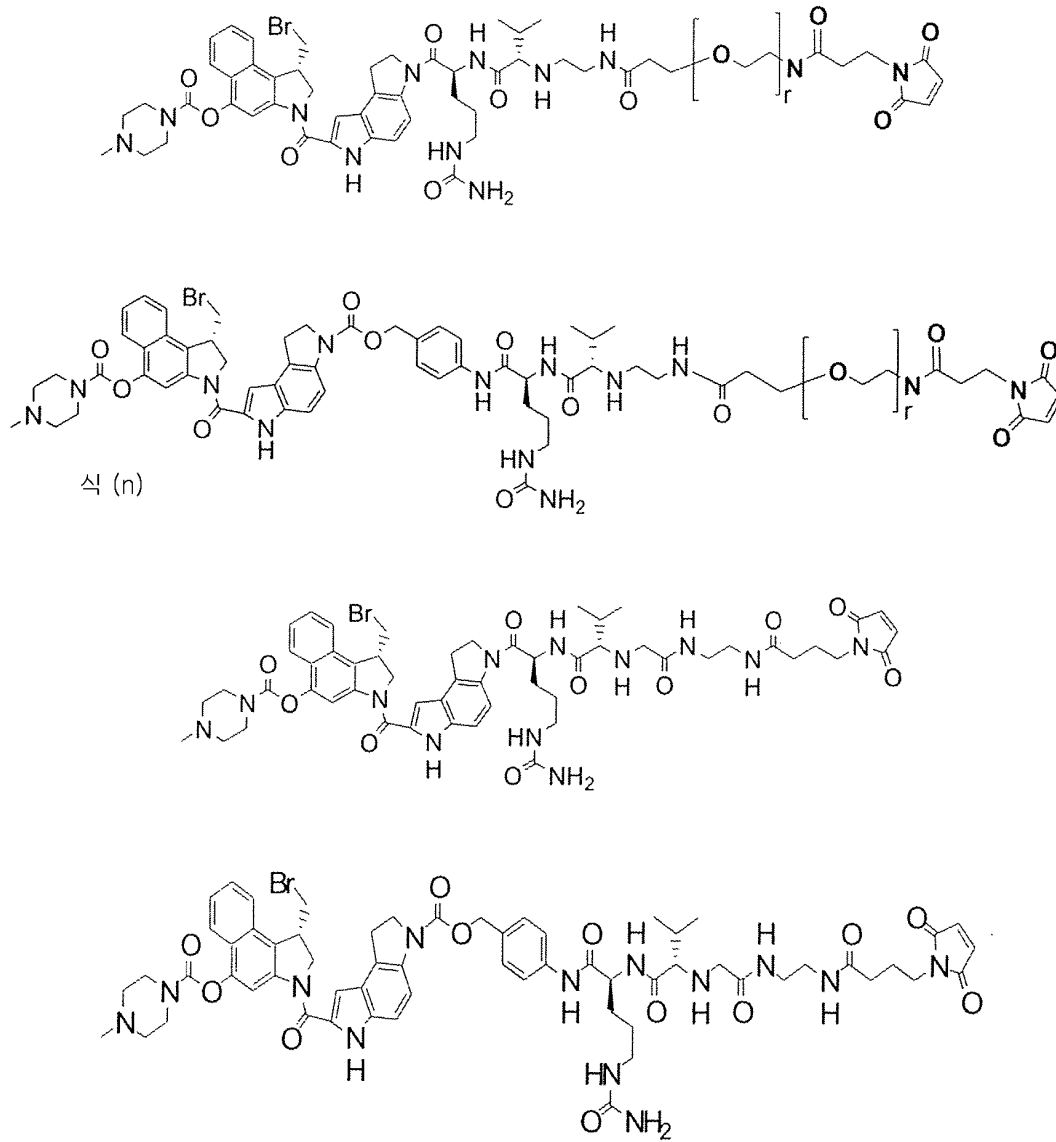
여기에서 R은  
의 정수이다.

또는

이고 r은 0 내지 24 범위에서

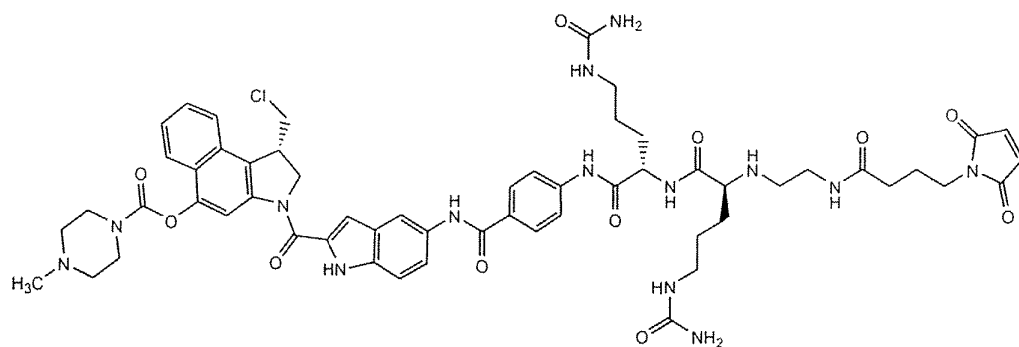
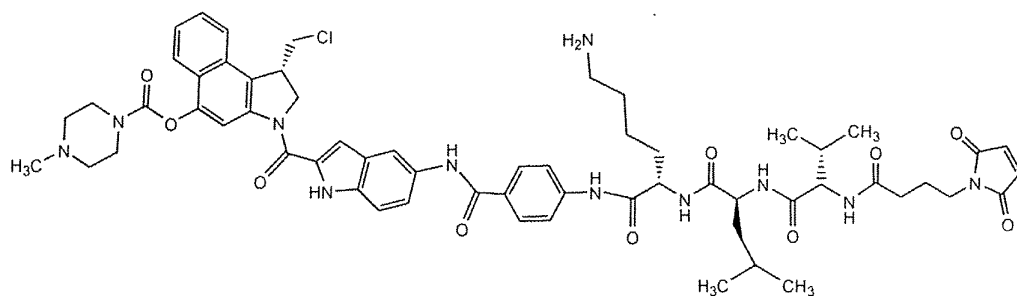
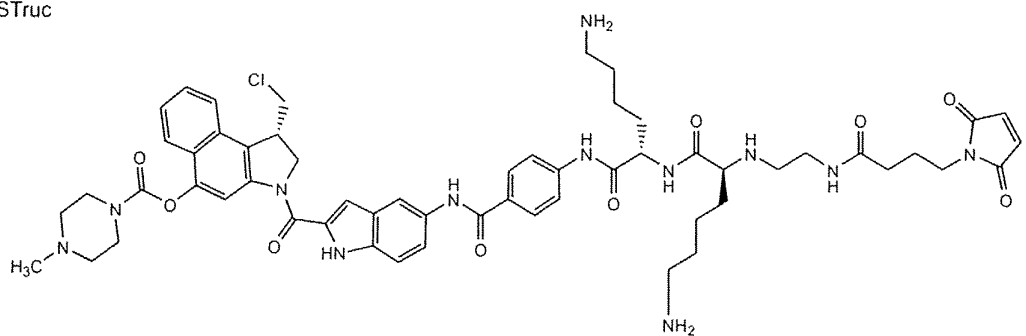
<787>

또한 접합체는, 다음 화합물과 같이, 구조 (g)를 갖는 약물을 사용하여 형성될 수 있다:



<788>

STruc

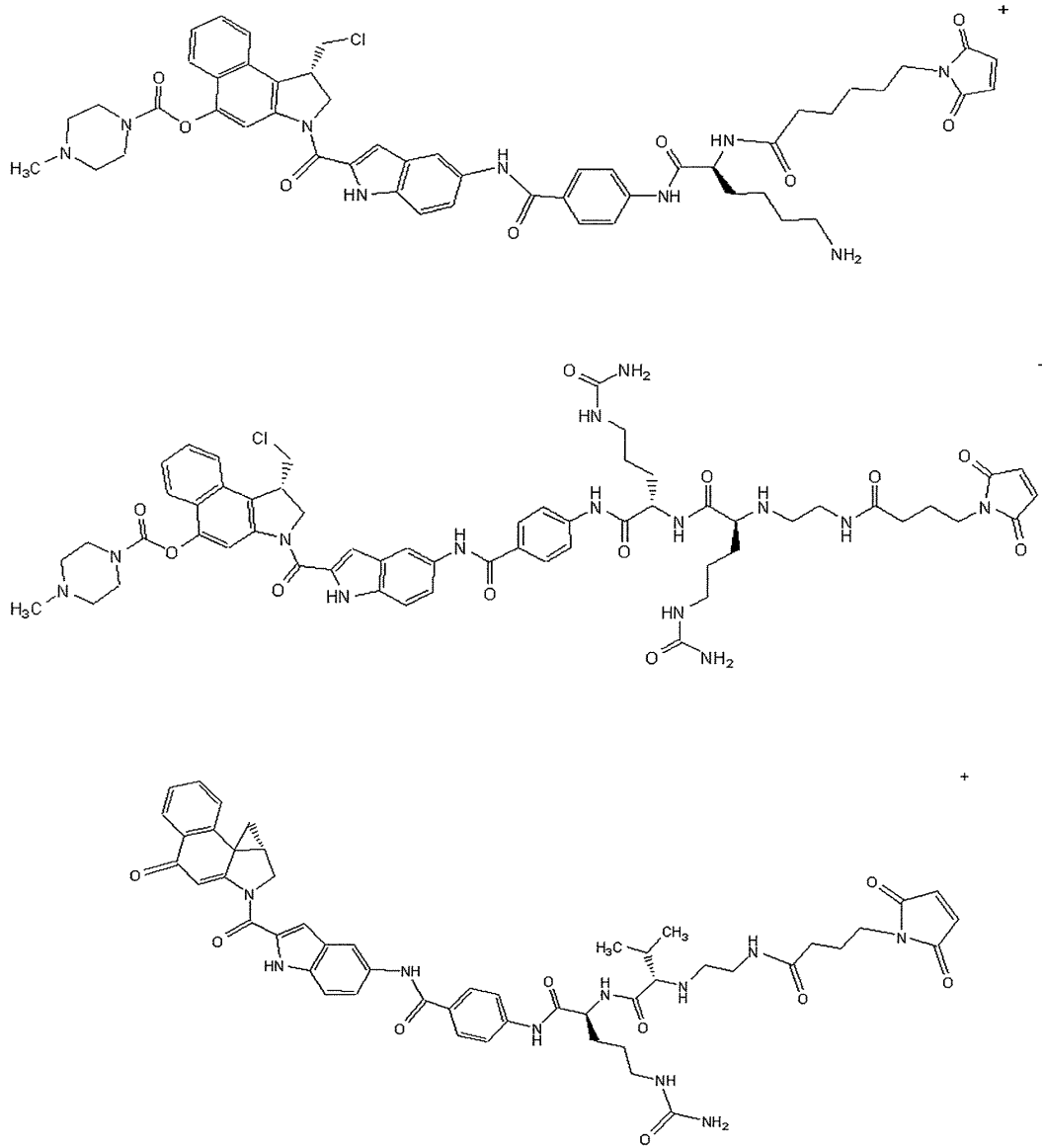


<789>

<790>

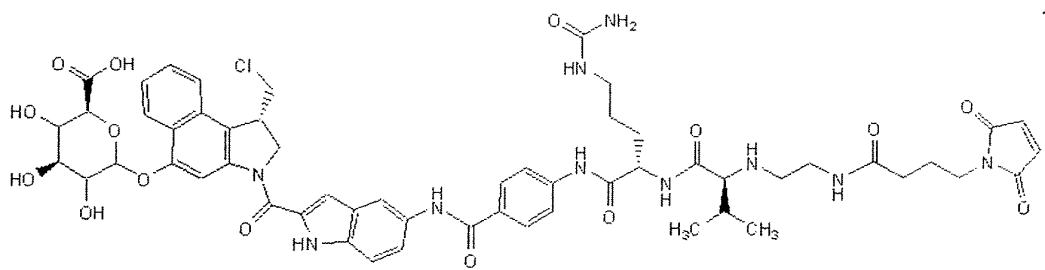
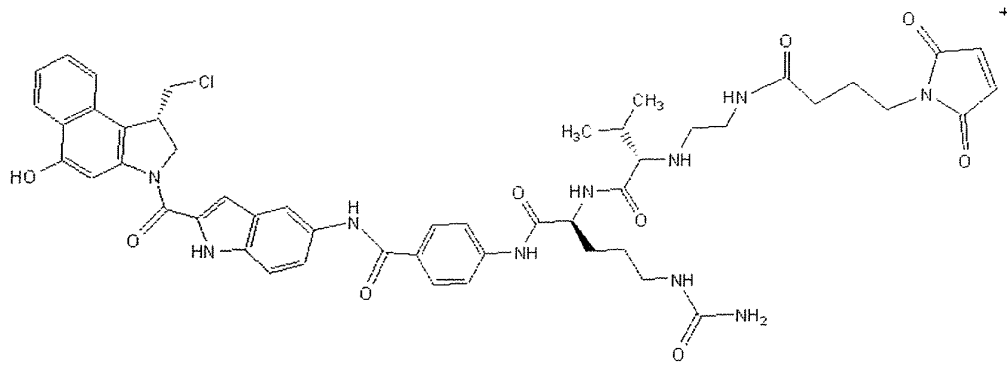
여기에서 r은 0 내지 24의 범위 내의 정수이다.

<791> 접합체는 다음 구조를 갖는 약물을 사용하여 또한 형성될 수 있다:

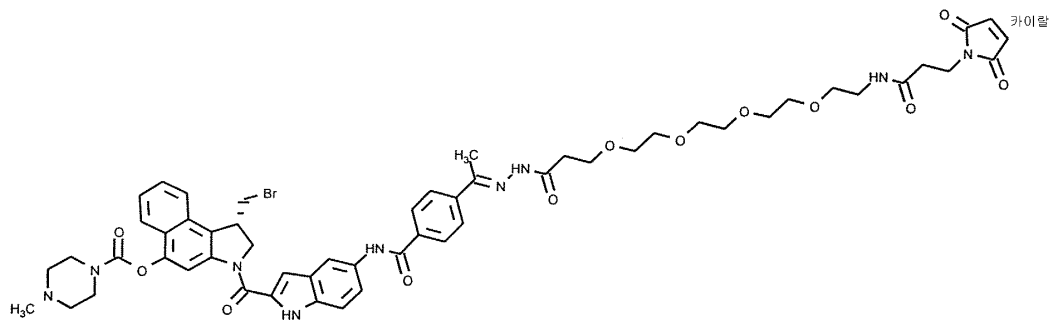
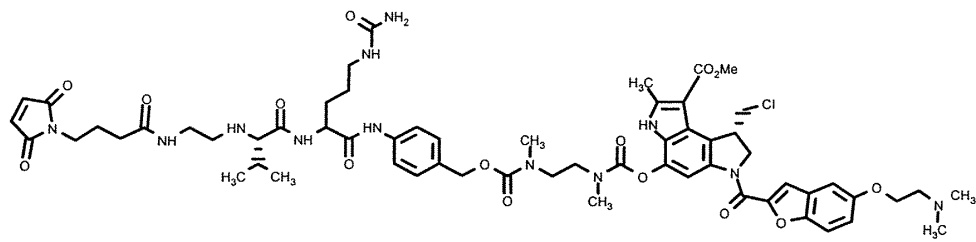


<792>



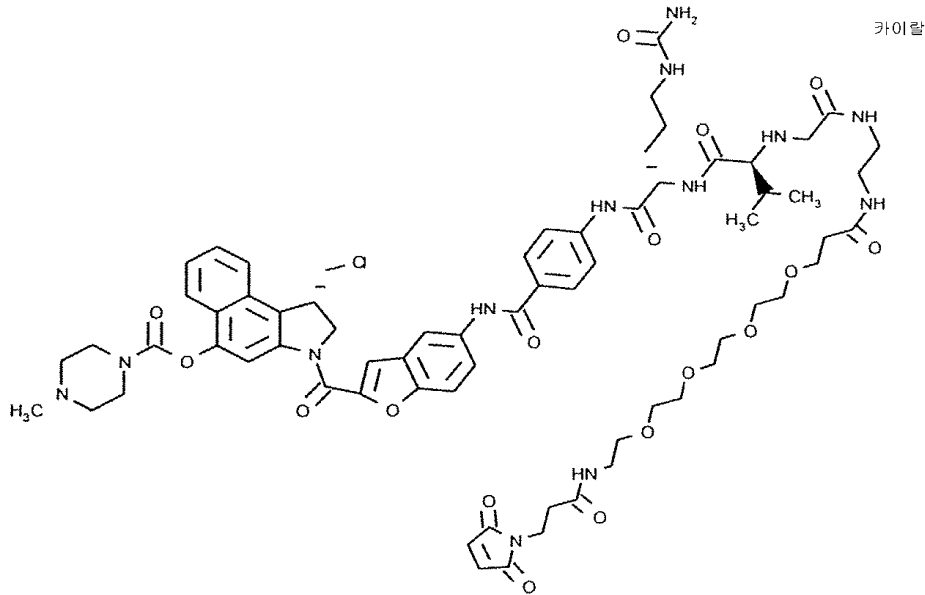


<793>



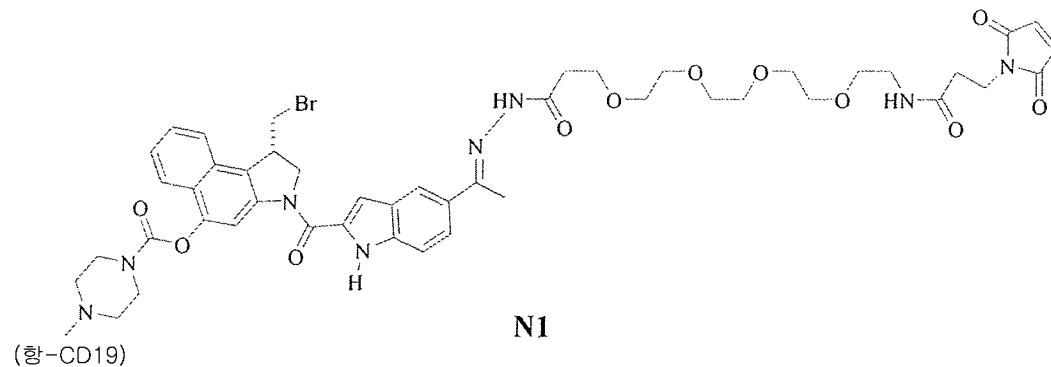
<794>

및

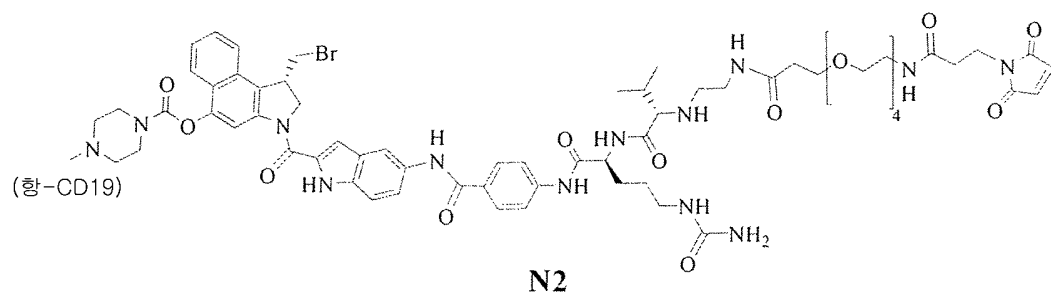


그러한 세포독소들의 합성, 뿐만 아니라 항체에 대한 그것들의 연결에 관한 설명은, 2007년 11월 30일에 출원된 미국 특허 출원 일련번호 제 60/991,300호에 공지되어 있다.

소정의 구체예에서, 항-CD19는 구조 N1의 링커 및 치료적 제제에 접합된다:



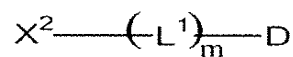
소정 구체예에서, 항-CD19는 구조 N2의 링커 및 치료적 제제에 접합된다:



<801>

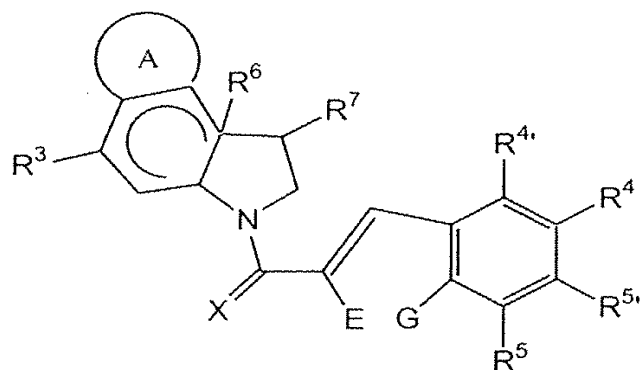
B. 분리가능한 링커 접합체

적절한 접합체의 예는 다음 구조를 갖는 화합물이다:



<804>

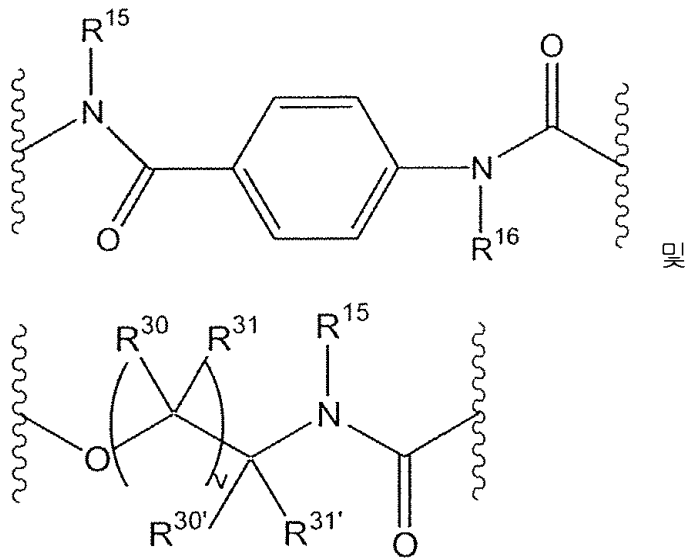
여기에서  $L^1$ 은 자기-희생 스페이서이며;  $m$ 은 정수 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이고;  $X^2$ 는 분리가능한 기질이며; 그리고 D는 다음 구조를 포함한다:



<806>

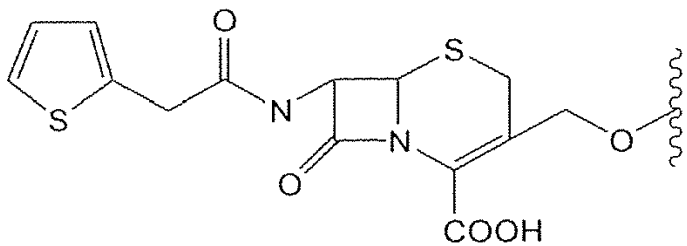
<807>

여기에서 고리계 A는 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 기들로부터 선택된 멤버이고; E 및 G는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 헤테로원자, 단일 결합으로부터 독립적으로 선택된 멤버이거나, E 및 G는 결합되어 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 선택된 고리계를 형성하며; X는 O, S 및 NR<sup>23</sup>으로부터 선택된 멤버이고; R<sup>23</sup>은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 아실로부터 선택된 멤버이며; R<sup>3</sup>은 (=O), SR<sup>11</sup>, NHR<sup>11</sup> 및 OR<sup>11</sup>로 구성되는 군으로부터 선택된 멤버인데, R<sup>11</sup>은 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 헤테로알킬, 비치환 헤테로알킬, 디포스페이트, 트리포스페이트, 아실, C(O)R<sup>12,13</sup>, C(O)OR<sup>12</sup>, C(O)NR<sup>12,13</sup>, P(O)(OR<sup>12</sup>)<sub>2</sub>, C(O)CHR<sup>12,13</sup>, SR<sup>12</sup> 및 SiR<sup>12,13,14</sup>로 구성되는 군으로부터 선택된 멤버이고, 여기에서 R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup>, 및 R<sup>14</sup>는 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 및 치환 또는 비치환 아릴로부터 독립적으로 선택된 멤버인데, R<sup>12</sup> 및 R<sup>13</sup>은 그것들이 부착된 질소 또는 탄소 원자와 함께 임의적으로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는, 4 내지 6 멤버를 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하며; R<sup>6</sup>은 존재하거나 부재하는 단일 결합이고 존재할 때 R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>은 결합되어 사이클로프로필 고리를 형성하고; R<sup>7</sup>은 상기 사이클로프로필 고리에서 R<sup>6</sup>과 함께 결합되는 CH<sub>2</sub>-X<sup>1</sup> 또는 -CH<sub>2</sub>-인데, 여기에서 X<sup>1</sup>은 이탈기이며, R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup> 및 R<sup>5'</sup>는 H, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 헤테로아릴, 비치환 헤테로아릴, 치환 헤테로사이클로알킬, 비치환 헤테로사이클로알킬, 할로젠, NO<sub>2</sub>, NR<sup>15,16</sup>, NC(O)R<sup>15</sup>, OC(O)NR<sup>15,16</sup>, OC(O)OR<sup>15</sup>, C(O)R<sup>15</sup>, SR<sup>15</sup>, OR<sup>15</sup>, CR<sup>15</sup>=NR<sup>16</sup>, 및 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된 멤버들이거나, R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup> 및 R<sup>5'</sup>의 임의의 인접쌍은, 그것들이 부착되는 탄소 원자와 함께, 결합되어 4 내지 6의 멤버들을 갖는 치환 또는 비치환 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하는데, 여기에서 n은 1 내지 20까지의 정수이며; R<sup>15</sup> 및 R<sup>16</sup>은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬, 및 치환 또는 비치환 펩티딜로부터 독립적으로 선택되는데, 여기에서 R<sup>15</sup> 및 R<sup>16</sup>은 그것들이 부착되는 질소 원자와 함께, 임의로 결합되어, 선택적으로 둘 이상의 헤테로원자를 포함하는, 4 내지 6의 멤버들을 갖는 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬 고리계를 형성하며; 여기에서 R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup>, 및 R<sup>5'</sup> 중 적어도 하나는 약물을 존재한다면 L<sup>1</sup>에, 또는 X<sup>2</sup>에 연결하며, 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된다:



여기에서  $R^{30}$ ,  $R^{30'}$ ,  $R^{31}$ , 및  $R^{31'}$  은 H, 치환 또는 비치환 알킬, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 치환 또는 비치환 헤테로아릴, 및 치환 또는 비치환 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되고;  $v$ 는 1 내지 6의 정수이다.

적절한 분리가능한 링커의 예는  $\beta$ -AlaLeuAlaLeu(서열번호 102) 및 다음을 포함한다:



#### 약제학적 조성물

다른 관점에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어, 본 발명의, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합부(들) 중 하나 또는 조합물을 포함하고, 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화된 약제학적 조성물을 제공한다. 그러한 조성물들은 본 발명의 (예를 들어, 두 개 이상의 상이한) 항체, 또는 면역접합체 또는 이중특이적 분자의 하나 또는 조합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물은 표적 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 또는 상보적 활성을 가지는 항체(또는 면역접합체 또는 이중특이체)의 조합을 포함할 수 있다.

또한 본 발명의 약제학적 조성물은 조합 요법, 즉 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 적어도 하나의 다른 항-암성 제제와 조합된 본 발명의 항-CD19 항체를 포함할 수 있다. 조합 요법에 사용될 수 있는 치료적 제제의 예들은 본 발명의 항체의 용도에 대한 부분에서 더 자세히 후술한다.

본 명세서에서 사용되는, “약제학적으로 허용가능한 담체”는 생리학적으로 양립할 수 있는, 임의의 및 모든 용매, 분산매, 코팅물, 항박테리아성 및 항균성 제제, 등장액 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구적, 척추 또는 표피 투여(예, 주사 또는 주입으로)에 적합하다. 투여 경로에 의존하여, 활성 화합물, 즉, 항체, 면역접합체, 또는 이중특이적 분자는 산의 작용 및 화합물을 비활성화시키는 다른 자연적 조건으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅할 수 있다.

본 발명의 약제학적 화합물은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. “약제학적으로 허용가능한 염”은 부모 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 유지하고 임의의 원하지 않는 독소학적 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다(예, Berge, S. M. 등 (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19 참조). 그러한 염의 예는 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 산 부가 염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등과 같은 비독성 무기산으로부터 유래된 것은 물론, 지방족 모노- 및 디카르복실 산, 페닐-치환된 알카노 산, 하이드록시 알카노 산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰 산 등과 같은 비독성 유기산으로부터 유래된 것을 포

함한다. 염기 부가 염은, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼리 토금속으로부터 유래된 것은 물론 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등과 같은 비독성 유기 아민류로부터 유래된 것을 포함한다.

<817> 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 약제학적 허용가능 항산화제를 포함할 수 있다. 약제학적 허용가능 항산화제의 예는: (1) 아스코르브 산, 시스테인 염산염, 소듐 비설페이트, 소듐 메타비설페이트, 소듐 설페이트 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코빌 팔미테이트, 부틸레이티드 하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸레이티드 하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 지용성 항산화제; 및 (3) 시트르 산, 에틸렌디아민 테트라아세트 산(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 소르비톨, 타르타르 산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트화제를 포함한다.

<818> 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올류(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은) 및 이들의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르류를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

<819> 이러한 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 포함할 수 있다. 미생물 존재의 예방은 전술한 살균 공정 및, 예를 들어, 과라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브 산 등과 같은 다양한 항박테리아 및 항진균성 제제 주입으로 확립할 수 있다. 당, 염화나트륨 등과 같은 등장제제(isotonic agents)를 조성물에 포함하는 것이 또한 바람직하다. 이에 더하여, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 포함하여 주사가능한 약제학 제형의 흡수를 연장할 수 있다.

<820> 약제학적으로 허용가능한 담체는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사용액이나 분산액의 임시 제조물용 멸균 분말을 포함한다. 약제학적 활성 물질용으로 그러한 배치 및 제제를 사용하는 것은 당해 분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 배치 또는 제제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고는, 본 발명의 약제학적 조성물에 이를 사용하는 것이 포함된다. 보조적인 활성 화합물 또한 조성물에 포함될 수 있다.

<821> 치료적 조성물은 일반적으로 제조 및 보관 환경하에서 반드시 멸균적이고 안정적이어야 한다. 상기 조성물은 용액, 미소유화액, 리포솜, 또는 고 약물 농도에 적합한 다른 주문된 구조로서 제형될 수 있다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적절한 혼합물을 포함하는 용매나 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 많은 경우에 있어서, 등장제제, 예를 들어, 당, 폴리알코올류, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 조성물에 포함하는 것이 바람직하다. 예를 들어 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 조성물에 포함시킴으로써 주사가능한 조성물의 흡수를 연장할 수 있다.

<822> 멸균된 주사가능한 용액은, 활성 화합물을 적절한 용매에 요구되는 양으로, 필요한 경우, 상기 설명된 성분 중 하나 또는 조합물과 같이 배합하고, 멸균 마이크로정제하여 제조될 수 있다. 일반적으로 분산액은 상기 활성 화합물을, 염기성 분산매 및 상기 설명된 것의 필요한 다른 성분을 포함하는 멸균 비이클(vehicle)에 배합하여 제조된다. 멸균된 주사용 용액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조(lyophilization)이고 이는 활성 성분에 더하여 이의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 산출한다.

<823> 담체 물질과 조합하여 단일 투약 형태를 생성하는 활성 성분의 양은 처리될 대상체 및 투여의 특정 방식에 따라 변할 것이다. 단일 투약 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합할 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 나타내는 조성물의 양이다. 일반적으로, 100 퍼센트 중에, 이러한 양은 활성 성분의 약 0.01 % 내지 약 99%, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 활성 성분의 약 1% 내지 약 30%가 약제학적으로 허용가능한 담체와 조합되어 있다.

<824> 투약 섭생은 최적의 원하는 반응(예, 치료 반응)을 제공하도록 조절된다. 예를 들어, 단일 볼러스(bolus)가 투여될 수 있고, 수 개 분리된 투약물이 여러 번 투여될 수 있고 또는 투여량은 치료 상태의 긴급성에 의해 지시되는 바와 같이, 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 투여의 용이함 및 투여의 일관성을 위해 비경구 조성물을 투약 단위 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본 명세서에서 사용되는 투약 단위 형태는, 치료될 대상체에 단일성 투약물로서 적절한 물리적으로 분리된 단위체를 지칭하고, 각 단위체는 요구되는 약제학적 담체



와 결합하여 요구되는 치료 효과를 생성하는 데 계산된 활성 화합물의 소정의 양을 포함한다. 본 발명의 투약 단위 형태에 대한 명세는 (a) 활성 화합물의 고유의 특성 및 이루어지는 특정 치료효과, 및 (b) 개인에게서 민감성의 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 조제하는 당해 분야에 고유한 제한에 의해 지시되고 및 직접적으로 의존한다.

<825> 항체의 투여의 경우, 투여량은 숙주 체중의, 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 더 통상적으로는 0.01 내지 5 mg/kg의 범위이다. 예를 들어, 투여량은 0.3 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중이거나 1-10 mg/kg의 범위에 있다. 예시적인 치료 섭생은 일 주에 한번, 이 주에 한번, 삼 주에 한번, 사 주에 한번, 한 달에 한 번, 세 달에 한번, 또는 삼 내지 육 개월에 한 번 투여될 수 있다. 본 발명의 항-CD19 항체에 대한 바람직한 투여 섭생은 1 mg/kg 체중 또는 3 mg/kg 체중 정맥 내 투여를 포함하고, 상기 항체는 하기 투여 스케줄 중 하나를 이용한다: (i) 4 주마다 6 번 투여 후, 3 달 마다 투여; (ii) 3 주 마다; (iii) 3 mg/kg 체중 한 번 투여 후, 매 3 주 마다 1 mg/kg 체중 투여.

<826> 어떤 방법에서, 상이한 결합 특이성을 가지는 두 개 이상의 단일클론 항체를 동시에 투여하며, 이 경우, 투여되는 각 항체의 투여량은 지시된 범위에 속한다. 항체는 통상적으로 여러 번 투여된다. 단일 투여 간의 간격은, 예를 들어, 주간, 월간, 삼개월 또는 연간일 수 있다. 간격은 또한, 환자에서 표적 항원에 대한 항체의 혈중 농도를 측정하여 지시되는 바에 따라, 불규칙할 수 있다. 어떤 방법에서, 투여량은 약 1-1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 혈장 항체 농도, 및 특정의 방법에서는 약 25-300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 얻도록 조절한다.

<827> 대안적으로, 항체는 지속 방출(sustained release) 제형으로서 투여될 수 있고, 이 경우, 투여 횟수가 줄어든다. 투여량 및 횟수는 환자에서 항체의 반감기에 의존하여 변한다. 일반적으로, 인간 항체들은 가장 긴 반감기를 보이며, 인간화 항체들, 키메라 항체들, 및 비인간 항체들이 그 뒤를 따른다. 투여량 및 투여 횟수는 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 변할 수 있다. 예방적 적용에서는, 상대적으로 적은 투여량이 긴 시간에 걸쳐서 상대적으로 적은 횟수로 투여된다. 특정 환자는 그들 수명의 남은 기간 동안 치료를 계속 받는다. 치료적 적용에서, 질병의 진행이 감소되거나 종결될 때까지 및 바람직하게, 환자가 질병의 증상의 부분적으로 또는 완전한 개선을 보일 때까지 상대적으로 낮은 횟수로 상대적으로 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그 후, 환자는 예방적 섭생 방식으로 투여될 수 있다.

<828> 프로피락시스(prophylaxis)에서의 사용 및/또는 비정상 세포 증식과 관련된 질병의 치료에서, 약 0.001  $\mu\text{M}$  내지 20  $\mu\text{M}$ 의 화합물의 농도를 순회하여 투여하는 것이 바람직한데, 약 0.01  $\mu\text{M}$  내지 5  $\mu\text{M}$ 이 바람직하다.

<829> 본 명세서에 설명된 화합물의 구강 투여에 관한 환자 투여량은, 전형적으로 약 1 mg/일 내지 약 10,000 mg/일, 더 전형적으로 약 10 mg/일 내지 약 1,000 mg/일, 그리고 가장 전형적으로 약 50 mg/일 내지 약 500 mg/일의 범위를 가진다. 환자 체중의 견지에서 언급했듯이, 전형적인 투여량은 약 0.01 내지 약 150 mg/kg/일, 더욱 전형적으로 약 0.1 내지 약 15 mg/kg/일, 가장 전형적으로 약 1 내지 약 10 mg/kg/일의 범위를 가지며, 예를 들면 5 mg/kg/일 또는 3 mg/kg/일이다.

<830> 적어도 어떤 구체예에서, 종양 성장을 저지하거나 억제하는 환자 투여량은 1  $\mu\text{mol/kg/일}$  이하일 수 있다. 예를 들면, 환자 투여량은 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.45, 0.3, 0.2, 0.15, 0.1, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 또는 0.005  $\mu\text{mol/kg}$  이하일 수 있다(약물의 몰(mole)을 지칭). 바람직하게, 항체-약물 접합체는 적어도 5일의 기간 이상 일일 투여량으로 투여될 때 종양의 성장을 저지한다. 적어도 어떤 구체예에서, 종양은 SCID 마우스에서 인간-유형 종양이다. 예로써, SCID 마우스는 CB17.SCID 마우스(Taconic, Germantown, NY로부터 입수가가능)일 수 있다.

<831> 본 발명의 약제학적 조성물에서 활성 성분의 실제 투약 수준은 환자에 유독하지 않고서, 특정 환자, 조성물, 및 투여의 방식에 대하여 원하는 치료학적 반응을 성취하는데 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위하여 다양화할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물, 또는 이들의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여의 경로, 투여의 시간, 사용된 특정 화합물의 배출율, 치료의 기간, 다른 약물, 사용된 특정 조성물과 조합하여 이용된 화합물 및/또는 물질, 치료될 환자의 나이, 성별, 무게, 조건, 일상 건강 상태 및 이전의 병력, 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사한 요소들을 포함하는, 다양한 약물동력학적 요소들에 달려있다.

<832> 본 발명의 항-CD19 항체의 “치료적으로 유효한 투여량”은 바람직하게는 질병 증상의 중증도를 감소시키고, 무증상질병 기간의 빈도 및 기간을 증가시키고, 또는 질병 고통으로 인한 장애나 불능을 방지하는 결과를 가져온다. 예를 들어, CD19<sup>+</sup> 종양의 치료의 경우, “치료적으로 유효한 투여량”은, 미치료 대상체에 비하여, 세포 성장 또는 종양 성장을 바람직하게는 적어도 약 20%, 더 바람직하게는 적어도 약 40%, 더욱 바람직하게는 적어도

약 60%, 및 더더욱 바람직하게는 적어도 약 80%로 억제한다. 종양 성장을 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서 효능을 예시하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 이러한 조성물의 성질은 세포 성장을 억제하는 화합물의 능력을 조사함으로써 평가될 수 있고, 그러한 억제는, 숙련된 실험자에게 알려진 분석 방법으로 시험관 내에서 측정될 수 있다. 치료 화합물의 치료적 유효량은 대상체에서 종양 크기를 감소시키거나, 그렇지 않다면 증상을 개선시킨다. 당업자는 대상체의 크기, 대상체 증상의 중증도, 및 선택된 투여의 특정 조성물이나 경로와 같은 요인에 근거하여 그러한 양을 결정할 수 있을 것이다.

<833> 본 발명의 조성물을 당해 분야에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여할 수 있다. 숙련자에 의해 이해될 바와 같이, 투여의 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 의존하여 변할 것이다. 본 발명의 항체에 대한 바람직한 투여 경로는, 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 피하, 척추 또는 다른 비경구 투여 경로, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 투여를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는, 어구 “비경구 투여”는, 장 및 국소 투여 외의 투여 방식, 통상적으로는 주사에 의한 방식을 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수막강내, 관절낭내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내, 피부내, 복강내, 경기관(transtracheal), 피하, 표피하(subcuticular), 관절내, 피막하(subcapsular), 지주막하(subarachnoid), 척수내, 경막외(epidural) 및 흉골내(intrasternal) 주사 및 주입을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<834> 대안적으로, 본 발명의 항체는 국소, 표피 또는 점막 투여 경로와 같은, 비경구가 아닌 경로, 예를 들어, 비강내, 경구적으로, 질내로, 직장내로, 설하내로 또는 국소적으로 투여될 수 있다.

<835> 활성 화합물은, 조절된 분비 제형과 같이, 이식물, 경피 패치, 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는, 빠른 분비에 대하여 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산과 같은, 생체분해성, 생체양립성 중합체를 사용할 수 있다. 그러한 제형을 제조하기 위한 많은 방법은 특허되어 있거나 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참조.

<836> 치료 조성물은 당해 분야에 공지된 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 구체예에서, 본 발명의 치료 조성물은 미국 특허 번호 제5,399,163호; 제5,383,851호; 제5,312,335호; 제5,064,413호; 제4,941,880호; 제4,790,824호; 또는 제4,596,556호에 공지된 장치와 같이, 바늘없는 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에 유효한 공지된 이식물 및 모듈의 예는 다음을 포함한다: 미국 특허 번호 제4,487,603호, 조절된 속도로 약물을 분배하는, 이식될 수 있는 마이크로-주입 펌프를 보여줌; 미국 특허 번호 제4,486,194호, 피부를 통해 약물을 투여하는 치료 장치를 보여줌; 미국 특허 번호 제4,447,233호, 정밀한 주입 속도로 약물을 전달하는 약물 주입 펌프를 보여줌; 미국 특허 번호 제4,447,224호, 연속적인 약물 전달용, 가변성 흐름 이식성 주입 장치를 보여줌; 미국 특허 번호 제4,439,196호, 다중-챔버 구획을 가지는 삼투압성 약물 전달 시스템을 보여줌; 및 미국 특허 번호 제4,475,196호, 삼투압성 약물 전달 시스템을 보여줌. 이러한 특허들은 본 명세서에서 참조문헌으로서 병합된다. 많은 다른 그러한 이식물, 전달 시스템, 및 모듈은 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

<837> 어떤 구체예에서, 본 발명의 인간 단일클론 항체들을 제형화하여 생체 내에서 적절히 분포하게 할 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB)은 많은 고도의 친수성 화합물을 배제시킨다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 가로지르는 것을 확실하게 하기 위해(필요시), 상기 화합물은, 예를 들어, 리포솜 내에 제형화될 수 있다. 리포솜 제조 방법에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조. 리포솜은 선택적으로 특정 세포 또는 기관으로 운반되는 하나 이상의 부분(moieties)을 포함하며, 따라서 표적화 약물 전달을 향상시킬 수 있다(예, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685 참조). 예시적 표적화 부분들은 플레이트 또는 비오틴(예컨대, Low 등의 미국 특허 번호 제 5,416,016호 참조); 만노시드(Umezawa 등 (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); 항체(P.G. Bloeman 등 (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais 등 (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); 계면활성제 단백질 A 수용체(Briscoe 등 (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier 등 (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); 또한 K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273 참조)을 포함한다.

<838> 본 발명의 용도 및 방법

<839> 본 발명의 항체, 특히 인간 항체, 항체 조성물, 항체-파트너 분자 접합체 조성물 및 방법은 CD19 매개 질병의 진단 및 치료를 포함한 수 많은 시험관내 및 생체내 진단 유용성 및 치료 유용성을 가진다. 예를 들어, 시험관내 또는 생체외, 또는 인간 대상체, 예컨대 생체내로, 이러한 분자들을 배양중인 세포로 투여하여, 다양한 질환

을 치료, 예방 및 진단할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 “대상체”는 인간 및 비-인간 동물을 포함하는 것으로 의도된다. 비-인간 동물은 모든 척추동물들, 예를 들어, 포유동물, 및 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류, 및 파충류와 같은 비포유동물을 포함한다. 바람직한 대상체는 CD19 활성화에 의해 매개되는 장애를 갖는 인간 환자를 포함한다. 본 방법은 변종적 CD19 발현과 관련된 장애를 갖는 인간 환자를 치료하는데 특히 적합하다. CD19에 대한 항체-파트너 분자 접합체를 다른 제제와 함께 투여하면, 그 둘은 순차적으로 또는 동시에 투여할 수 있다.

<840> 본 발명의 항체가 CD19에 대하여 특이적으로 결합하는 경우, 본 발명의 항체를 사용하여 세포 표면 상에서 CD19 발현을 특이적으로 검출할 수 있고, 또한, 면역친화성 정제를 통해 CD19를 정제할 수 있다.

<841> 또한, 다양한 종양 세포 상에서 CD19가 발현하면, 본 발명의 인간 항체-파트너 분자 접합체 조성물 및 방법을 이용하여 종양형성 장애(tumorigenic disorder), 예를 들어 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma, NHL), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia, ALL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 부르키트 림프종(Burkitt's lymphoma), 역형성 거대세포 림프종(anaplastic large-cell lymphomas, ALCL), 다발성 골수종(multiple myeloma), 피부 T-세포 림프종(cutaneous T-cell lymphomas), 결절성 소분할-세포 림프종(nodular small cleaved-cell lymphomas), 림프구성 림프종(lymphocytic lymphomas), 말초 T-세포 림프종(peripheral T-cell lymphomas), 레너트 림프종(Lennert's lymphomas), 면역모세포성 림프종(immunoblastic lymphomas), T-세포 백혈병/림프종(T-cell leukemia/lymphomas, ATLL), 성인 T-세포 백혈병(adult T-cell leukemia, T-ALL), 중심모세포성/중심세포성 여포 림프종 암(centroblastic/centrocytic(cb/cc) follicular lymphomas cancers), B형의 미만성 거대세포 림프종(diffuse large cell lymphomas of B lineage), 혈관면역모세포성 림프절병증(angioimmunoblastic lymphadenopathy, AILD)-유사 T 세포 림프종, HIV 관련 신체체강 기반 림프종(HIV associated body cavity based lymphomas), 배아 암종(Embryonal Carcinomas), 비인강의 미분화 암종(undifferentiated carcinomas of the rhino-pharynx)(예, 슈민케 종양(Schmincke's tumor)), 캐슬만 질환(Castleman's disease), 카포시 육종(Kaposi's Sarcoma), 다발성 골수종(Multiple Myeloma), 왈덴스트롬 매크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia) 및 다른 B-세포 림프종을 포함하는, 예컨대 CD19를 발현하는 종양 세포의 존재에 의하여 특징지어지는 장애를 갖는 환자를 치료할 수 있다.

<842> 추가적으로, CD19의 과발현(overexpression)은 B-세포 내성의 손실 및 자가면역 장애의 생성을 가져올 수 있다(Tedder 등(2005) *Curr Dir Autoimmun* 8:55). 이 자가면역 효과를 류마티스 관절염 환자의 염증성 관절에서 CD19+ B-세포의 축적에 의하여 볼 수 있다(He 등(2001) *J Rheumatol* 28:2168). 그와 같이, 본 발명의 인간 항체, 항체 조성물 및 방법을 사용하여 자가면역 장애, 예를 들어, 류마티스 관절염을 포함하는, CD19를 발현하는 B-세포의 존재에 의하여 특징지어진 장애를 갖는 대상체를 치료할 수 있다.

<843> 한 구체예에서, 본 발명의 항체(예컨대, 인간 단일클론 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 조성물)를 이용하여 CD19의 수준, 즉 막 표면 상에서 CD19를 포함하는 세포들의 수준을 검출할 수 있는데, 그 때 상기 수준은 소정의 질환 증상과 관련될 수 있다. 대안적으로, 항체를 사용하여, 소정 질환의 증상을 막거나 개선하는 것과 관련이 있을 수 있는, CD19 기능을 억제하거나 막을 수 있는데, 그렇게 함으로써 질환의 매개자로서 CD19와 관련이 있다. 이것은 항체와 CD19 사이에 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 치료 및 대조군 치료를 항-CD19 항체에 접촉시킴으로써 성취할 수 있다. 항체 및 CD19 사이에 형성된 임의의 복합체를 치료 및 대조군에서 검출하거나 비교한다.

<844> 다른 구체예에서, 본 발명의 항체(예, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 조성물)를 시험관 내에서 치료적 또는 진단적 사용과 관련된 결합 활성화에 대하여 처음에 테스트할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 하기 실시예에서 기술된 유세포 분석법을 이용하여 테스트할 수 있다.

<845> 본 발명의 항체(예, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자, 면역접합체 및 조성물)는 CD19-관련 질환의 치료 및 진단에 있어서 추가적인 유용성을 가진다. 예를 들어, 인간 단일클론 항체, 다중특이적 또는 이중특이적 분자 및 면역접합체를 이용하여 다음의 생물학적 활성들 중 하나 이상을 생체내에서 또는 시험관내에서 유도할 수 있다: CD19를 발현하는 세포의 성장을 억제 및/또는 그 세포를 살해하는 것; 인간 작동자 세포의 존재하에서 CD19를 발현하는 세포의 식세포작용 또는 ADCC를 매개하는 것, 또는 CD19에 대한 CD19 리간드 결합을 막는 것.

<846> 특정 구체예에서, 항체(예, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 조성물)를 사용하여 생체내에서 다양한 CD19-관련 질환을 치료, 예방 또는 진단한다. CD19-관련 질환의 예들은, 그 중에서도, 자가면역 질환, 류마티스 관절염, 암, 비-호지킨 림프종, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 부르키트 림프종, 역형성 거대세포 림프종(ALCL), 다발성 골수종, 피부 T-세포 림프종, 결절성 소분할-세포 림프종, 림프



구성 림프종, 말초 T-세포 림프종, 레너트 림프종, 면역모세포성 림프종(immunoblastic lymphomas), T-세포 백혈병/림프종(ATLL), 성인 T-세포 백혈병(T-ALL), 중심모세포성/세포중심성 여포 림프종 암(centroblastic/centrocytic(cb/cc) follicular lymphomas cancers), B형의 미만성 거대세포 림프종, 혈관면역모세포성 림프절병증(angioimmunoblastic lymphadenopathy, AILD)-유사 T 세포 림프종, HIV 관련 신체 체강 기반 림프종, 배아 암종, 비인강의 미분화 암종(예, 슈민케 종양), 캐슬먼 질환, 카포시 육종, 다발성 골수종, 왈든스트롬 매크로글로불린혈증 및 다른 B-세포 림프종을 포함한다.

<847> 본 발명의 항체 조성물(예, 인간 단일클론 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 면역접합체)의 적절한 생체 내 및 시험관 내 투여 경로는 당해 분야에 공지되어 있고, 당업자에 의하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체 조성물을 주사(예, 정맥내 또는 피하내)로 투여할 수 있다. 상기 사용되는 분자의 적절한 투여량은 대상체의 나이와 체중, 및 항체 조성물의 농도 및/또는 제형에 따라 다르다.

<848> 전술한 바와 같이, 본 발명의 인간 항-CD19 항체는 하나 이상의 다른 치료적 제제, 예를 들어, 세포독성 제제, 방사성독성 제제 또는 면역억제제와 공동 투여될 수 있다. 상기 항체는 상기 제제에 연결되거나(면역복합체로서) 또는 상기 제제와 별도로 투여될 수 있다. 후자의 경우(별도 투여), 상기 항체는 상기 제제 투여 전, 후 또는 동시에 투여할 수 있거나, 다른 공지된 요법, 예를 들어, 항암 요법, 예를 들어 방사능 요법과 공동투여될 수 있다. 그러한 치료적 제제들은, 특히, 항-신생물 제제, 예를 들어, 독소루비신(아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 설페이트, 카르무스틴, 클로람부실 및 사이클로포스파미드 하이드록시우레아를 포함하며, 이들은 그 자체로, 환자에 독성이거나 약독성(subtoxic)인 수준에서만 효과적이다. 시스플라틴은 4주에 한번씩 100 mg/ 투여량으로 정맥내 투여되며 아드리아마이신은 21일 마다 한번씩 60-75 mg/ml의 투여량으로 정맥내 투여된다. 본 발명의 인간 항-CD19 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 화학요법제와 함께 공동 투여하면, 인간 종양 세포에 세포독성 효과를 내는 상이한 메커니즘을 통해 작동하는 두 개의 항암제를 제공하게 된다. 그러한 공동 투여는, 약물에 대한 저항성의 발달로 인한 문제점 또는 종양 세포가 상기 항체에 비반응적이 되도록 하는, 종양 세포의 항원성에서의 변화로 인한 문제점을 해결할 수 있다.

<849> 또한, 표적-특이적 작동자 세포(effector cell), 예를 들어, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자)에 연결된 작동자 세포는 치료적 제제로서 사용될 수 있다. 표적화용 작동자 세포는 대식세포, 호중구 또는 단핵구와 같은 인간 백혈구일 수 있다. 다른 세포들은 호산구, 중성 살해 세포 및 다른 IgG- 또는 IgA-수용체 함유 세포를 포함한다. 필요시, 작동자 세포는 처리될 대상체로부터 얻을 수 있다. 표적-특이적 작동자 세포는 생리적으로 허용가능한 용액에서 세포 현탁액으로서 투여될 수 있다. 투여되는 세포의 수는 약  $10^8$ - $10^9$  이나, 치료 목적에 따라 다르다. 일반적으로, 그 양은 표적 세포, 예를 들어, CD19를 발현하는 종양 세포에서 국소화되고 그리고 예를 들어, 대식 작용에 의해 세포 살해를 수행하기에 충분할 정도이어야 할 것이다. 또한 투여 경로도 다양화할 수 있다.

<850> 표적-특이적 작동자 세포를 이용한 요법은 표적화된 세포를 제거하는 다른 기술과 결합하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자)을 사용한 항-종양 요법 및/또는 이러한 조성물로 무장한 작동자 세포를 화학요법과 결합하여 사용할 수 있다. 추가적으로, 조합 면역요법을 사용하여 두 개의 구별되는 세포독성 작동자 군이 종양 세포를 격퇴하게 할 수 있다. 예를 들어, 항-Fc-감마 RI 또는 항-CD3에 연결된 항-CD19 항체를 IgG- 또는 IgA-수용체 특이적 결합 제제와 결합하여 사용할 수 있다.

<851> 또한, 본 발명의 이중특이적 및 다중특이적 분자를 사용하여, 예를 들어, 세포 표면 상에 있는 수용체를 캡핑하거나 제거함으로써, 작동자 세포 상의 Fc  $\gamma$ R 또는 Fc  $\gamma$ R 수준을 조절할 수 있다. 또한 항-Fc 수용체들의 혼합물을 이 목적에 사용할 수 있다.

<852> 보체와 결합하는 IgG1, IgG2, 또는 IgG3, 또는 IgM의 부분과 같이, 보체 결합 자리를 가지는, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 면역접합체)을 또한 보체 존재 하에서 사용할 수 있다. 한 구체예에서, 표적 세포를 포함하는 일 군의 세포를 본 발명의 결합제 및 적절한 작동자 세포를 사용하여 생체의 처리하는 것은, 보체 또는 보체 함유 혈청을 첨가함으로써 보충될 수 있다. 본 발명의 결합제로 코팅된 표적 세포의 대식 작용은 보체 단백질의 결합으로 향상될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자)로 코팅된 표적 세포는 또한 보체에 의해 용해될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 보체를 활성화시키지 않는다.

<853> 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자 및 면역접합체)은 또한 보체와 함께 투여될 수 있다. 소정 구체예에서, 본 발명은 인간 항체, 다중특이적 또는 이중특이적 분자 및 혈청이나 보체를 포함하

는 조성물들을 제공한다. 이러한 조성물들은 보체가 인간 항체, 다중특이적 또는 이중특이적 분자들 바로 가까이 위치할 때 유리할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 인간 항체, 다중특이적 또는 이중특이적 분자 및 보체나 혈청은 따로 투여될 수 있다.

<854> 또한 본 발명의 항체 조성물(예, 인간 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 분자, 또는 면역접합체)을 포함하는 키트, 및 이의 사용에 대한 설명서가 본 발명의 범위에 속한다. 상기 키트는 하나 이상의 추가적인 시약, 예를 들어, 면역억제제, 세포독성제 또는 방사능독성제, 또는 본 발명의 하나 이상의 추가적인 인간 항체(예, 상기 제 1 인간 항체와는 구별되는, CD19 항원의 에피토프에 결합하는 상보성 활성을 가지는 인간 항체)를 더 포함할 수 있다.

<855> 따라서, 본 발명의 항체 조성물로 치료된 환자에 다른 치료적 제제, 예를 들어, 세포독성 또는 방사능독성 제제를 추가로(본 발명의 인간 항체 투여 전에, 동시에, 또는 그 후에) 투여하여, 상기 인간 항체들의 치료 효과를 향상시키거나 증폭할 수 있다.

<856> 다른 구체예에서, 상기 대상체를  $Fc\gamma$  또는  $Fc\gamma$  수용체의 발현 또는 활성을 변경하는, 예를 들어, 향상시키거나 억제하는 제제로, 예를 들어, 사이토카인으로 대상체를 처리함으로써 추가로 치료할 수 있다. 다중특이적 분자로 치료 중 투여될 수 있는 바람직한 사이토카인은 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), 및 종양괴사인자(TNF)를 포함한다.

<857> 또한 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자)은  $Fc\gamma R$  또는 CD19를 발현하는 세포를 표적화하는데, 예를 들어, 그러한 세포를 표지하는데 사용될 수 있다. 그러한 용도를 위하여, 검출될 수 있는 분자와 상기 결합체를 연결할 수 있다. 따라서, 본 발명은  $Fc\gamma R$ 과 같은  $Fc$  수용체, 또는 CD19를 발현하는 세포를 생체 외에서 또는 시험관 내에서 국소화 시키는 방법을 제공한다. 검출가능한 표지는, 예를 들어, 방사능 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자(co-factor)일 수 있다.

<858> 특정 구체예에서, 본 발명은 시료 내에서 CD19 항원의 존재를 검출하는, 또는 CD19 항원의 양을 측정하는 방법을 제공하는데, 이는 상기 항체 또는 이의 결합부와 CD19 사이에 복합체를 형성하도록 허용하는 조건 하에서, 시료, 및 대조군 시료를, CD19에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부에, 접촉시키는 것을 포함한다. 그 다음, 복합체의 형성을 검출하는데, 여기에서, 시료와 대조군 시료 사이의 복합체 형성 차이는 시료에서의 CD19 항원 존재를 나타낸다.

<859> 다른 구체예에서, 본 발명은, 대상체에 상기에서 기술된 인간 항체를 투여함으로써, 대상체 내의 CD19 매개 장애, 예컨대, 자가면역 질환, 류마티스 관절염, 암, 비-호지킨 림프종, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 부르기트 림프종, 역형성 거대세포 림프종(ALCL), 피부 T-세포 림프종, 결절성 소분할-세포 림프종, 림프구성 림프종, 말초 T-세포 림프종, 레너트 림프종, 면역모세포성 림프종(immunoblastic lymphomas), T-세포 백혈병/림프종(ATLL), 성인 T-세포 백혈병(T-ALL), 중심모세포성/세포중심성 여포 림프종 암(centroblastic/centrocytic(cb/cc) follicular lymphomas cancers), B형의 미만성 거대세포 림프종, 혈관면역모세포성 림프절병증(angioimmunoblastic lymphadenopathy, AILD)-유사 T 세포 림프종, HIV 관련 신체 체강 기반 림프종, 배아 암종, 비인강의 미분화 암종(예, 슈민케 종양), 캐슬먼 질환, 카포시 육종, 다발성 골수종, 왈든스트롬 매크로글로불린혈증 및 다른 B-세포 림프종을 치료하는 방법을 제공한다. 그러한 항체 및 이의 유도체를 사용하여 CD19가 유도하는 소정의 장애와 관련된 활성, 예를 들어 증식 및 분화를 억제할 수 있다. 상기 항체를 CD19(예, 대상체에 항체를 투여함으로써)에 접촉시킴으로써, 그러한 활성을 유도하는 CD19의 능력을 억제하며, 따라서, 관련 장애를 치료한다. 항체 조성물을 단독으로, 또는 항체 조성물과 접합하여 또는 상승작용으로 작용하는 세포독소적 또는 방사능독소적 제제와 같은, 다른 치료적 제제와 함께 투여하여 CD19 매개 장애를 치료하거나 예방할 수 있다.

<860> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 면역접합체를 사용하여 화합물(예, 치료적 제제, 표지, 세포독소, 방사능독소, 면역억제제, 등)을 상기 항체에 연결시킴으로써, CD19 세포 표면 수용체를 가지는 세포로 상기 화합물을 표적화할 수 있다. 예를 들면, 항-CD19 항체를 미국 특허 번호 제 6,281,354호 및 제 6,548,530호, 미국 특허공개 번호 제 20030050331호, 제 20030064984호, 제 20030073852호, 및 제 20040087497호에 기술된 또는 제 WO 03/022806호로 공개된 임의의 독소 화합물에 접합시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 CD19를 발현하는 세포를 생체외에서 또는 생체내에서 국소화 시키는 방법을 제공한다(예를 들어, 방사능 동위원소, 형광 화합물, 효소, 또는 효소 보조인자와 같은, 검출가능한 표지를 사용하여). 대안적으로, 상기 면역접합체를 사용하여, 세포독소 또는 방사능독소를 CD19에 표적화함으로써 CD19 세포 표면 수용체를 갖는 세포를 살해할 수 있다.

## 실시예

### <917> 실시예 1 : CD 19에 대항하여 인간 단일클론 항체의 생성

#### <918> 항원

<919> B 세포 종양 세포주 라지(Raji; ATCC 등록번호 CCL-86) 및 다우디(Daudi; ATCC 등록번호 CCL-213)를 면역화를 위한 항원으로 사용하였다.

#### <920> 트랜스유전자성 트랜스염색체성(transgenic transchromosomal) KM-MOUSE<sup>®</sup>

<921> CD19에 대한 완전 인간 단일클론 항체를 인간 항체 유전자를 발현하는 트랜스유전자성 트랜스염색체성 마우스의 KM 종(strain)을 사용하여 제조하였다. 이 마우스 종에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자를 Chen 등 (1993) EMBO J. 12:811-820에 기술된 바와 같이 동형접합적으로(homozygously) 분쇄시켰으며, 내인성 마우스 중쇄 유전자를 HuMab 마우스에 대한 PCT 공개 제 WO 01/09187호의 실시예 1에 기술된 바와 같이 동형접합적으로 분쇄시켰다. 마우스는, Fishwild 등 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851에 기술된 바와 같이, 인간 카파 경쇄 트랜스유전자 KCo5를 지닌다. 또한 마우스는, PCT 공개 제 WO 02/43478호에 기술된 바와 같이, 인간 중쇄 트랜스염색체 SC20을 지닌다.

#### <922> KM-MOUSE<sup>®</sup> 면역화:

<923> CD19에 대한 완전 인간 단일클론 항체를 생성하기 위하여, KM-MOUSE<sup>®</sup>의 코호트(cohort)를 라지 또는 다우디 B 세포 종양 세포주로 면역화시켰다. 일반적인 면역화 체계는 Lonberg, N. 등 (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. 등 (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 및 PCT 공개 제 WO 98/24884호에 기술되어 있다. 마우스는 항원의 첫 주입시 6-16 주령이었다. 세포 제조물(cell preparation)을 사용하여 복강내(IP)로 마우스(KM-MOUSE<sup>®</sup>)를 면역화시켰다.

<924> 트랜스유전자성 마우스를 완전 프로인트 보조제(Freund's adjuvant) 또는 리비 보조제(Ribi adjuvant) 내의 항원으로 2 회 IP 면역화시켰고, 이어서 불완전 프로인트 보조제 또는 리비 보조제 중의 항원으로 3-21일 IP 면역화시켰다(총 11 회까지의 면역화). 면역 반응을 안와후 출혈(retroorbital bleeds)에 의하여 모니터하였다. 혈장을 ELISA(하기에서 기술됨)로 스크리닝하였으며, 충분한 역가의 항-CD19 인간 면역글로불린을 갖는 마우스를 융합을 위하여 사용하였다. 마우스를 희생시켜 비장을 제거하기 3일 전에 항원으로 정맥내로 부스팅하였다(boosted).

#### <925> 항-CD19 항체를 생산하는 KM-MOUSE<sup>®</sup>의 선택

<926> CD19에 결합하는 항체를 생산하는 KM-MOUSE<sup>®</sup>를 선택하기 위하여, 면역화된 마우스로부터의 혈청을 상기 Fishwild, D. 등 (1996)에 의하여 최초로 기술된 바와 같이 변형된 ELISA에 의해서 테스트하였다. 간략하면, 미세역가 플레이트를 PBS 중 1-2  $\mu\text{g/ml}$ 의 정제된 재조합 CD19 융합 단백질로 코팅하고, 50  $\mu\text{l}$ /웰을 4°C에서 밤새 배양한 다음에, PBS 중 5% BSA의 200  $\mu\text{l}$ /웰로 차단하였다. CD19-면역화된 마우스로부터의 혈장의 희석액을 각각의 웰에 첨가하고, 주위 온도에서 1-2 시간 동안 배양하였다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세척한 다음에, 알칼리 포스파타제와 접합된 염소-항-인간 카파 경쇄 다중클론 항체와 함께 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 세척한 후에, 플레이트를 pNPP 기질로 전개시키고, OD 415-650에서 분광광도계로 분석하였다. 최고 역가의 항-CD19 항체를 전개했던 마우스를 융합을 위해서 사용하였다. 융합을 하기 기술하는 바와 같이 실시하였으며 하이브리도마 상청액을 ELISA로 항-CD19 활성화에 대하여 테스트하였다.

#### <927> CD19에 대한 인간 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

<928> KM-MOUSE<sup>®</sup>로부터 분리된 마우스 비장세포를, 표준 프로토콜에 기반하는 PEG 또는 사이토피스(Cyto Pulse) 거대 챔버 세포 융합 전기천공기(Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD)를 사용하는 전기장 기반 전기융합을 사용하여, PEG와 함께 마우스 골수종 세포주에 융합시켰다. 그리고나서 그 결과의 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산을 위하여 스크리닝하였다. 면역화된 마우스로부터의 비장 림프구의 단일 세포 현탁액을 50% PEG(Sigma)와 함께 SP2/0 비분비성 마우스 골수종 세포(ATCC, CRL 1581)의 수의 1/4에 융합시켰다. 세포를 편평바닥 미세역가 플레이트(flat bottom microtiter plate)에서 약  $1 \times 10^5$ /웰로 도말하고, 이어서 10% 소 태아 혈



청, 10% P388D1(ATCC, CRL TIB-63) 조건배지, DMEM(Mediatech, CRL 10013, 고농도 글루코스, L-글루타민 및 소듐 피루베이트 함유) 중의 3-5% 오리젠(IGEN)에 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50 mg/ml 겐타마이신 및 1x HAT(Sigma, CRL P-7185)를 더한 것을 함유한 선택 배지에서 약 2 주일 배양하였다. 1-2 주일 후에, 세포를 HAT를 HT로 대체한 배지 내에서 배양하였다. 그 후, 각각의 웰을 인간 항-CD19 단일클론 IgG 항체를 위하여 ELISA(상기에서 기술됨)로 스크리닝하였다. 광범위한 하이브리도마 성장이 일어나면, 배지를 통상적으로는 10-14일 후에 모니터링하였다. 항체를 분비하는 하이브리도마를 재도말하고, 다시 스크리닝하고, 인간 IgG에 대해서 여전히 양성이라면 항-CD19 단일클론 항체를 제한 희석에 의하여 적어도 2 번 서브클로닝하였다. 그리고나서, 안정한 서브클론을 시험관내에서 배양하여 추가의 특정화를 위하여 조직 배양 배지 내에서 소량의 항체를 생성하였다.

<929> 하이브리도마 클론 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8을 추가 분석을 위하여 선택하였다.

<930> **실시예 2: 인간 단일클론 항체 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8의 구조적 특성화**

<931> 21D4 및 21D4a 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA 서열을 표준 PCR 기술을 이용하여 21D4 하이브리도마로부터 획득하였으며 표준 DNA 서열화 기술을 이용하여 서열화하였다. 21D4 하이브리도마는 두 개의 경쇄(서열번호 8 및 9) 중의 하나와 쌍을 이루는 중쇄를 갖는 항체를 생산하는 것으로 나타난다. 두 항체(즉, 서열번호 1 및 8의  $V_H$  및  $V_L$  서열을 각각 갖는 21D4, 및 서열번호 1 및 9의  $V_H$  및  $V_L$  서열을 각각 갖는 21D4a)는 모두 CD19에 결합한다. 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA 서열을 표준 PCR 기술을 이용하여, 각각 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 및 46E8 하이브리도마로부터 획득하였으며, 표준 DNA 서열화 기술을 이용하여 서열화하였다.

<932> 21D4의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열들이 도 1A 및 서열번호 59 및 1에 각각 나타나 있다.

<933> 21D4의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열들이 도 1B 및 서열번호 66 및 8에 각각 나타나 있다.

<934> 21D4 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 21D4 중쇄가 인간 생식계열  $V_H$  5-51로부터의  $V_H$  절편, 인간 생식계열 3-10으로부터의 D 절편, 및 인간 생식계열 JH 4b로부터의  $J_H$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_H$  5-51 서열에 대한 21D4  $V_H$  서열의 정렬이 도 8에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 21D4  $V_H$  서열을 추가 분석하여 도 1A 및 8, 및 서열번호 16, 23 및 30에서 각각 나타낸 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 묘사하였다.

<935> 21D4 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 21D4 경쇄가 인간 생식계열  $V_K$  L18로부터의  $V_L$  절편 및 인간 생식계열 JK 2로부터의  $J_K$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_K$  L18 서열에 대한 21D4  $V_L$  서열의 정렬이 도 15에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 21D4  $V_L$  서열을 추가 분석하여 도 1B 및 15, 및 서열번호 37, 44 및 51에서 각각 나타낸 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 묘사하였다.

<936> 21D4a의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열들이 도 1A 및 서열번호 59 및 1에 각각 나타나 있다.

<937> 21D4a의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열들이 도 1C 및 서열번호 67 및 9에 각각 나타나 있다.

<938> 21D4a 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 21D4a 중쇄가 인간 생식계열  $V_H$  5-51로부터의  $V_H$  절편, 인간 생식계열 3-10으로부터의 D 절편, 및 인간 생식계열 JH 4b로부터의  $J_H$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_H$  5-51 서열에 대한 21D4a  $V_H$  서열의 정렬이 도 8에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 21D4a  $V_H$  서열을 추가 분석하여 도 1A 및 8, 및 서열번호 16, 23 및 30에서 각각 나타낸 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 묘사하였다.

<939> 21D4a 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 21D4a 경쇄가 인간 생식계열  $V_K$  L18로부터의  $V_L$  절편 및 인간 생식계열 JK 3으로부터의  $J_K$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_K$  L18 서열에 대한 21D4a  $V_L$  서열의 정렬이 도 16에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 21D4a  $V_L$  서열을 추가 분석하여 도 1C 및 16, 및 서열번호 37, 44 및 52에서 각각 나타낸 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 묘사하였다.

- <940> 47G4의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 2A 및 서열번호 60 및 2에 각각 나타나 있다.
- <941> 47G4의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 2B 및 서열번호 68 및 10에 각각 나타나 있다.
- <942> 47G4 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 47G4 중쇄가 인간 생식계열  $V_H$  1-69로부터의  $V_H$  절편, 인간 생식계열 6-19로부터의 D 절편, 및 인간 생식계열 JH 5b로부터의  $J_H$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_H$  1-69 서열에 대한 47G4  $V_H$  서열의 정렬이 도 9에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 47G4  $V_H$  서열을 추가 분석하여 도 2A 및 9, 및 서열번호 17, 24 및 31에서 각각 나타낸 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.
- <943> 47G4 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 47G4 경쇄가 인간 생식계열  $V_K$  A27로부터의  $V_L$  절편 및 인간 생식계열 JK 3으로부터의 JK 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_K$  A27 서열에 대한 47G4  $V_L$  서열의 정렬이 도 17에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 47G4  $V_L$  서열을 추가 분석하여 도 2B 및 17, 및 서열번호 38, 45 및 53에서 각각 나타낸 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.
- <944> 27F3의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 3A 및 서열번호 61 및 3에 각각 나타나 있다.
- <945> 27F3의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 3B 및 서열번호 69 및 11에 각각 나타나 있다.
- <946> 27F3 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 27F3 중쇄가 인간 생식계열  $V_H$  5-51로부터의  $V_H$  절편, 인간 생식계열 6-19로부터의 D 절편, 및 인간 생식계열 JH 6b로부터의  $J_H$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_H$  5-51 서열에 대한 27F3  $V_H$  서열의 정렬이 도 10에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 27F3  $V_H$  서열을 추가 분석하여 도 3A 및 10, 및 서열번호 18, 25 및 32에서 각각 나타낸 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.
- <947> 27F3 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 27F3 경쇄가 인간 생식계열  $V_K$  L18로부터의  $V_L$  절편 및 인간 생식계열 JK 2로부터의  $J_K$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_K$  L18 서열에 대한 27F3  $V_L$  서열의 정렬이 도 18에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 27F3  $V_L$  서열을 추가 분석하여 도 3B 및 18, 및 서열번호 39, 46 및 54에서 각각 나타낸 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.
- <948> 3C10의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 4A 및 서열번호 62 및 4에 각각 나타나 있다.
- <949> 3C10의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 4B 및 서열번호 70 및 12에 각각 나타나 있다.
- <950> 3C10 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 3C10 중쇄가 인간 생식계열  $V_H$  1-69로부터의  $V_H$  절편, 인간 생식계열 1-26으로부터의 D 절편, 및 인간 생식계열 JH 6b로부터의  $J_H$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_H$  1-69 서열에 대한 3C10  $V_H$  서열의 정렬이 도 11에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 3C10  $V_H$  서열을 추가 분석하여 도 4A 및 11, 및 서열번호 19, 26 및 33에서 각각 나타낸 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.
- <951> 3C10 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 3C10 경쇄가 인간 생식계열  $V_K$  L15로부터의  $V_L$  절편 및 인간 생식계열 JK 2로부터의 JK 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_K$  L15 서열에 대한 3C10  $V_L$  서열의 정렬이 도 19에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 3C10  $V_L$  서열을 추가 분석하여 도 4B 및 19, 및 서열번호 40, 47 및 55에서 각각 나타낸 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.
- <952> 5G7의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 5A 및 서열번호 63 및 5에 각각 나타나 있다.
- <953> 5G7의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 5B 및 서열번호 71 및 13에 각각 나타나 있다.
- <954> 5G7 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 5G7 중쇄가 인간 생식계열  $V_H$  5-51로부터의  $V_H$  절편, 인간 생식계열 3-10으로부터의 D 절편, 및 인간 생식계열 JH 6b로부터의  $J_H$  절편

을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_H$  5-51 서열에 대한 5G7  $V_H$  서열의 정렬이 도 12에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 5G7  $V_H$  서열을 추가 분석하여 도 5A 및 12, 및 서열번호 20, 27 및 34에서 각각 나타낸 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.

<955> 5G7 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 5G7 경쇄가 인간 생식계열  $V_K$  L18로부터의  $V_L$  절편 및 인간 생식계열 JK 1로부터의  $J_K$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_K$  L18 서열에 대한 5G7  $V_L$  서열의 정렬이 도 20에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 5G7  $V_L$  서열을 추가 분석하여 도 5B 및 20, 및 서열번호 41, 48 및 56에서 각각 나타낸 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.

<956> 13F1의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 6A 및 서열번호 64 및 6에 각각 나타나 있다.

<957> 13F1의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 6B 및 서열번호 72 및 14에 각각 나타나 있다.

<958> 13F1 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 13F1 중쇄가 인간 생식계열  $V_H$  5-51로부터의  $V_H$  절편, 인간 생식계열 6-19로부터의 D 절편, 및 인간 생식계열 JH 6b로부터의  $J_H$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_H$  5-51 서열에 대한 13F1  $V_H$  서열의 정렬이 도 13에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 13F1  $V_H$  서열을 추가 분석하여 도 6A 및 13, 및 서열번호 21, 28 및 35에서 각각 나타낸 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.

<959> 13F1 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 13F1 경쇄가 인간 생식계열  $V_K$  L18로부터의  $V_L$  절편 및 인간 생식계열 JK 2로부터의  $J_K$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_K$  L18 서열에 대한 13F1  $V_L$  서열의 정렬이 도 21에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 13F1  $V_L$  서열을 추가 분석하여 도 6B 및 21, 및 서열번호 42, 49 및 57에서 각각 나타낸 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.

<960> 46E8의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 7A 및 서열번호 65 및 7에 각각 나타나 있다.

<961> 46E8의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 7B 및 서열번호 73 및 15에 각각 나타나 있다.

<962> 46E8 중쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 46E8 중쇄가 인간 생식계열  $V_H$  5-51로부터의  $V_H$  절편, 인간 생식계열 6-19로부터의 D 절편, 및 인간 생식계열 JH 6b로부터의  $J_H$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_H$  5-51 서열에 대한 46E8  $V_H$  서열의 정렬이 도 14에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 46E8  $V_H$  서열을 추가 분석하여 도 7A 및 14, 및 서열번호 22, 29 및 36에서 각각 나타낸 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.

<963> 46E8 경쇄 면역글로불린 서열을 공지의 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 46E8 경쇄가 인간 생식계열  $V_K$  L18로부터의  $V_L$  절편 및 인간 생식계열 JK 2로부터의  $J_K$  절편을 이용한다는 것을 입증하였다. 생식계열  $V_K$  L18 서열에 대한 46E8  $V_L$  서열의 정렬이 도 22에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밧 시스템을 이용하여 46E8  $V_L$  서열을 추가 분석하여 도 7B 및 22, 및 서열번호 43, 50 및 58에서 각각 나타낸 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들을 묘사하였다.

### <964> **실시예 3: 항-CD19 인간 단일클론 항체의 결합 특이성 및 결합 동력학의 특성화**

<965> 이 실시예에서는 항-CD19 항체 21D4 및 47G4의 결합 친화성을 ELISA 분석에 의하여 검사하였다.

#### <966> ELISA에 의한 결합 특이성

<967> 미세 역가 플레이트를 PBS 중 1.0  $\mu\text{g/ml}$  로 정제된 전장 CD19-Fc 융합 단백질 50  $\mu\text{l}$ 로 코팅한 다음에, PBS 중 1% 소 혈청 알부민 150  $\mu\text{l}$ 로 차단하였다. 플레이트를 30 분 내지 1 시간 동안 배양하고, 세번 세척하였다. HuMAb 항-CD19 항체 47G4의 희석액을 각각의 웰에 첨가하고, 37°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 공지의 무린 항-CD19 항체를 양성 대조군으로 사용하였다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세척하고 나서 호스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다제에 접합된 염소 항-인간 IgG 카파-특이적 제 2 시약과 함께 37°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 세척 후에, 플레이트를 ABTS 기질(1.46 mMol/L)로 전개시키고, 490 nm의 OD에서 분석하였다. 결과를 도 23에 도시하

였다. CD19 HuMAb 47G4는 인간 CD19 펩티드에 특이적으로 결합하였다.

<968> 항-CD19 항체의 에피토프 맵핑(mapping)

<969> 유세포분석법을 이용하여 항-CD19 HuMAbs의 에피토프 그루핑(epitope grouping)을 결정하였다. 항-CD19 인간 단일클론 항체 21D4, 21D4a, 3C10, 5G7, 5G7-N19K, 5G7-N19Q 및 13F1의 에피토프 결합을 라지 B 종양 세포를 0.3  $\mu\text{g/ml}$ 의 비오틴화된 21D4 또는 21D4a 항-CD19 인간 단일클론 항체와 함께 배양하고, 세척하고, 이어서 냉 항-CD19 인간 단일클론 항체를 첨가함으로써 평가하였다. 이소타입 대조군 항체를 음성 대조군으로 사용하였다. 결합을 FITC-표지된 항-인간 IgG Ab로 검출하였다. 유세포분석법을 FACScan 유세포분석(Becton Dickinson, San Jose, CA)을 사용하여 실시하였다. 결과가 도 24A 및 도 24B에서 보인다. 데이터 분석시, 항-CD19 항체 21D4, 21D4a, 3C10, 5G7 및 13F1은 동일한 에피토프 영역에 대하여 경쟁한다.

<970> 실시예 4: B 세포-유도성 종양 세포주에 대한 CD19 항체의 결합

<971> B 세포 종양주(tumor line) 라지 및 다우디에 대한, 또는 CHO-CD19로 형질감염시킨 세포주에 대한 CD19 HuMAbs의 결합을 유세포분석법에 의하여 평가하였다. CHO 세포를 CD19의 트랜스멤브레인 형태(transmembrane form)를 암호화한 전장 cDNA를 함유하는 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 라지, 다우디 및 CD19-CHO 세포주를 다음의 CD19 HuMAbs 중의 하나와 함께 배양하였다: 21D4, 21D4a, 47G4, 5G7, 5G7-N19K, 5G7-N19Q, 3C10 또는 13F1. 공지의 뮤린 항-CD19 항체를 양성 대조군으로 사용하였다. 세포를 세척하고, 피코에리트린-표지된(phycoerythrin-labeled) 항-인간 또는 항-마우스 제 2 항체에 의하여 검출하고, 유세포분석법에 의하여 분석하였다. CHO-CD19 세포주, 다우디 B 세포주, 라지 B 세포주에 대한 결합 및 라지 B 세포주에 대한 확장된 결합 세트에 대한 결합에 관한 결과가 각각 도 25A, 25B, 25C 및 25D에 보인다. 인간 항-CD19 단일클론 항체, 21D4 및 47G4는, CHO-CD19 세포주에 결합하였다. 인간 항-CD19 단일클론 항체, 21D4, 21D4a, 47G4, 5G7, 5G7-N19K, 5G7-N19Q, 3C10 및 13F1은, 라지 B 세포주에 결합하였다. 항-CD19 HuMAb 항체 21D4, 21D4a, 3C10, 5G7, 5G7-N19K, 5G7-N19Q, 및 13F1은, 각각 0.1413, 0.1293, 0.2399, 0.1878, 0.2240, 0.2167 및 0.2659의 계산된  $\text{EC}_{50}$ 값을 가졌다. 47G4는 또한 다우디 B 종양 세포주를 결합시키는 것으로 나타났다. 모든 결과는 염색(staining)의 기하 평균 형광세기(geometric mean fluorescent intensity, GMFI)에 의하여 측정된 것으로 나타난다. 이들 데이터는 CD19 단백질이 B 세포 기원의 종양 세포주의 표면 상에서 발현되며, 항-CD19 HuMAb 항체 21D4, 21D4a, 47G4, 5G7, 5G7-N19K, 5G7-N19Q, 3C10 및 13F1가 상기 세포 표면 상에서 발현된 CD19에 결합한다는 것을 보여준다.

<972> 실시예 5: 라지 B 종양 세포에 대한 항-CD19 인간 항체 21D4 및 47G4의 스캐차드(scatchard) 결합 분석

<973> 라지 세포를 ATCC(등록 번호 CCL-86)로부터 수득하였고, 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함유한 RPMI 내에서 성장시켰다. 세포를 4°C에서 10% FBS를 함유한 RPMI로 두 번 세척하였으며 세포를 10% 소 태아 혈청을 함유한 RPMI 배지(24 mM Tris pH 7.2, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM 글루코스, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% BSA를 함유한 결합 버퍼) 내에서  $4 \times 10^7$  세포/ml로 조정하였다. 밀리포어 플레이트(Millipore plate)(MAFB NOB)를 물 중 1% 탈지 분유로 코팅하고, 4°C에서 밤새 저장하였다. 상기 플레이트를 결합 버퍼로 세척하고, 결합 버퍼 중 25  $\mu\text{l}$ 의 비표지된 항체(1000-배 과량)를 밀리포어 96 웰 유리 섬유 필터 플레이트 내의 대조군 웰(비-특이적 결합)(non-specific binding, NSB)에 첨가하였다. 25  $\mu\text{l}$ 의 버퍼를 단독으로 최대 결합 대조군 웰(total binding)에 첨가하였다. 결합 버퍼 중 25  $\mu\text{l}$ 의 다양한 농도의  $^{125}\text{I}$ -항-CD19 항체 21D4 또는 47G4와 25  $\mu\text{l}$ 의 라지 세포( $4 \times 10^7$  세포/ml)를 첨가하였다. 플레이트를 4°C 진탕기 상에서 2 시간 동안 200 RPM에서 배양하였다. 배양의 완료 시에 밀리포어 플레이트를 0.2 ml의 냉 세척 버퍼(24mM Tris pH 7.2, 500mM NaCl, 2.7mM KCl, 2mM 글루코스, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% BSA)로 세번 세척하였다. 필터를 제거하고 감마 계수기로 계수하였다. 평형 결합(equilibrium binding)의 평가를 프리즘 소프트웨어(Prism software)(San Diego, CA)로 단일 부위 결합 파라미터를 사용하여 실시하였다. 상기의 스캐차드 결합 분석(scatchard binding assay)을 이용하여, 라지 세포에 대한 항체의  $K_D$ 는 대략 21D4의 경우에는 2.14 nM이고, 47G4의 경우에는 12.02 nM이었다.

<974> 실시예 6: 항-CD19 단일클론 항체의 내재화

<975> Hum-Zap 내재화 분석법을 이용하여, CD19-발현 라지 B 종양 세포 또는 CD19로 형질감염된 인간 CHO 세포 내로 내재화하는 능력에 대하여 항-CD19 HuMAbs를 테스트하였다. Hum-Zap 은 독소 사포린에 접합된 인간 IgG에 대한 친화성을 갖는 제 2 항체의 결합을 통하여 제 1 인간 항체의 내재화에 대하여 테스트한다.



<976> CHO-CD19 또는 라지 B 종양 세포주를 밤새 또는 다음날 (2 시간의 기간 동안) 100  $\mu$ l 웰 내에  $1.0 \times 10^4$  세포/웰로 접종하였다. 항-CD19 항체 21D4 또는 47G4를 30 nM의 출발 농도로 웰에 첨가하였고, 1:3 계열 희석으로 하향적정하였다. CD19에 비특이적인 인간 이소타입 대조군 항체를 음성 대조군으로 사용하였다. Hum-Zap()을 11 nM의 농도로 첨가하고, 플레이트를 48 시간 동안 배양하였다. 이 후, 플레이트를 1.0  $\mu$ Ci의  $^3$ H-티미딘으로 18-24 시간 동안 펄스하고(pulse), 수확하여 탑 카운트 신틸레이션 계수기(Top Count Scintillation Counter)(Packard Instruments)에서 판독하였다. CHO-CD19 및 B 종양세포 상에서의 내재화에 대한 결과가 각각 도 26A 및 26B에 보인다. HuMAb 47G4만을 CHO-CD19 세포 상에서 테스트하였다. 항-CD19 항체 47G4는 CHO-CD19 세포 상에서  $^3$ H-티미딘 혼입의 항체 농도 의존적 감소를 보여주었다. 두 21D4 및 47G4 HuMAb들은 라지 B 종양 세포 상에서  $^3$ H-티미딘 혼입의 항체 농도 의존적 감소를 보여주었다. 이 데이터는 항-CD19 항체 21D4 및 47G4가 CD19를 발현하는 CHO-CD19 형질감염자(transfectant) 세포 및 B 종양 세포 내로 내재화한다는 것을 입증한다.

<977> **실시예 7: 세포독소-접합성 항-CD19 항체의 세포 살해의 평가**

<978> 이 실시예에서, 티미딘 혼입 분석(thymidine incorporation assay)으로 CD19+ 세포주를 살해하는 능력에 대하여 독소에 접합된 항-CD19 단일클론 항체를 테스트하였다. 세포독소 N1을 이 실험에서 사용하였다.

<979> 항-CD19 단일클론 항체를, 캡티딜, 하이드라존 또는 디설파이드 링커와 같은, 링커를 통해서 세포독소에 접합시켰다. CD19+를 발현하는 라지 세포주를 3 시간 동안  $2.5 \times 10^4$  세포/웰로 접종하였다. 항-CD19 항체-세포독소 접합체를 30 nM의 출발 농도로 웰에 첨가하였고, 1:3 계열 희석으로 하향적정하였다. CD19에 비특이적인 이소타입 대조군 항체를 음성 대조군으로 사용하였다. 10-배 과량의 냉 항체인, 21D4a 또는 이소타입 대조군 항체를 사용하여 결합을 경쟁시켰다. 플레이트를 69 시간 동안 배양하였다. 그리고나서 플레이트를 1.0  $\mu$ Ci의  $^3$ H-티미딘으로 24 시간 동안 펄스하고, 수확하여 탑 카운트 신틸레이션 계수기(Top Count Scintillation Counter)(Packard Instruments, Meriden, CT)에서 판독하였다. 결과가 EC50 값과 함께 도 27A 및 27B에 보인다. 이 데이터는 항-CD19 항체 21D4가 라지 B-세포 종양 세포를 살해한다는 것을 입증한다.

<980> **실시예 8: 항-CD19 항체를 이용한 생체내 B 세포 종양의 치료**

<981> 이 실시예에서, 암성 B 세포 종양으로 이식된 SCID 마우스를 네이키드(naked) 항-CD19 21D4 항체 또는 세포독소-접합성 항-CD19 21D4 항체로 생체내에서 치료하여 종양 성장에 대한 항체의 생체내 효과를 검사하였다. 세포독소 N1을 이 실험에서 사용하였다.

<982> 세포독소-접합성 항-CD19 항체를 상술한 바와 같이 제조하였다. 기능적 B 및 T 림프구를 결여한, 중증 복합 면역 결핍증(Severe combined immune deficient, SCID) 마우스를 사용하여 B-세포 악성종양을 연구하였다. 라모스 B 종양 세포주로부터의 세포를 정맥내로 주사하였다. 마우스를 19.6 mg/kg의 세포독소-접합체 항-CD19 항체 또는 30 mg/kg의 네이키드 항-CD19 항체로 치료하였다. 이소타입 대조군 항체 또는 제형 버퍼를 음성 대조군으로 사용하였다. 이소타입 대조군을 N1 내 링커의 분리에 의하여 방출된 자유 독소(free toxin)에 접합시켰다. 동물에게 항체 또는 비이클(vehicle)을 함유한 약 200  $\mu$ l의 PBS를 복강내 주사에 의하여 투여하였다. 항체-세포독소 접합체를 제7일에 단일 용량으로 주사하였으며, 반면에 네이키드 항체를 제1일에 단일 용량 예방적 모델로서 주사하거나, 제7, 14 및 21일에 치료 모델로서 주사하였다. 마우스를 약 6 주일 동안 뒷다리 마비에 대해서 매일 모니터링하였다. 전자 캘리퍼(caliper)를 사용하여, 종양을 삼차원적으로 (높이×폭×길이) 측정하였고, 종양 부피를 계산하였다. 뒷다리 마비가 있는 경우 마우스를 안락사시켰다.

<983> 카플란-메이어 분석(Kaplan-Meier analysis)(도 28)에 의하여 증명된 바와 같이, 세포독소-접합성 항-CD19 항체, 예방적으로 투여된 네이키드 항-CD19 항체 또는 치료 요법으로서 투여된 항-CD19 항체에 의한 치료 시에 평균 생존 시간의 증가가 있었다. 평균 생존시간의 최대 증가는 네이키드 항-CD19 항체를 사용한 예방적 치료에 의해서 나타났다.

<984> 또한 체중의 변화도 측정하였으며 체중의 % 변화율로 계산하였다. 데이터는 도 29A 및 29B에 보인다. 30일의 기간 넘게, 하나의 세포독소-접합체 항체로 인하여 체중의 순 증가 변화가 있었으며, 항체 및 세포독소(접합체 아님)로 인하여 체중의 순 감소 변화가 있었다. 예방적인 네이키드 항-CD19 항체 또는 항-CD19 항체 치료 요법으로 인하여 체중의 순 증가 변화가 있었다.

<985> **실시예 9: 네이키드 항-CD19 항체를 이용한 생체내 종양 이종이식 모델(Xenograft Model)의 치료**

- <986> 림프종 종양으로 이식된 마우스를 네이키드 항-CD19 항체로 생체내에서 치료하여 종양 성장에 대한 항체의 생체 내 효과를 검사하였다.
- <987> ARH-77(인간 B 림프모세포성 백혈병; ATCC 등록번호 CRL-1621) 및 라지(인간 B 림프구 브루키트 림프종; ATCC 등록번호 CCL-86) 세포를 표준 실험실 공정을 이용하여 시험관내에서 확장시켰다. 6-8 주령의 수컷 CB17.SCID 마우스(Taconic, Hudson, NY)에 마우스당 0.2 ml의 PBS/마트리젤(Matrigel) (1:1) 중  $5 \times 10^6$  ARH-77 또는 라지 세포를 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 마우스의 체중을 재고, 이식 후에 매주 2 회 전자 캘리퍼를 이용하여 삼차원적으로 종양에 대해서 측정하였다. 종양 부피를 높이×폭×길이/2로 계산하였다. 평균  $80 \text{ mm}^3$ 의 ARH-77 종양 또는 평균  $170 \text{ mm}^3$ 의 라지 종양을 갖는 마우스를 치료 그룹으로 무작위 분류하였다. 마우스에게 제0일에 PBS 비이클, 이소타입 대조군 항체 또는 네이키드 항-CD19 HuMAb 2H5를 복강내로 투여하였다. 종양이 종양 종말 점( $2000 \text{ mm}^3$ )에 이를 때 마우스를 안락사시켰다. 결과가 도 30A(ARH-77 종양) 및 30B(라지 종양)에 보인다. 네이키드 항-CD19 항체 21D4는 종양 종말점 부피( $2000 \text{ mm}^3$ )에 도달하는 평균 시간을 연장시켰으며, 종양 성장 진행을 늦추었다. 따라서, 항-CD19 항체만을 단독으로 치료하는 것은 종양 성장에 대한 직접적인 생체내 억제 효과를 가진다.
- <988> **실시예 10: 비푸코실화 HuMAb의 생산**
- <989> 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 항체는 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 증명되었다. 이 실시예에서, 푸코실 잔기가 결여된 항-CD19 HuMAb 21D4를 생산하였다.
- <990> 푸코실트랜스퍼라제 유전자인 FUT 8을 결여한, CHO 세포주 Ms704-PF(Biowa, Inc., Princeton, NJ)를 항체 21D4의 중쇄 및 경쇄를 발현하는 벡터로 전기천공시켰다. 약물-저항성 클론을 6 mM L-글루타민 및 500  $\mu\text{g/ml}$  G418(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 갖는 세포외(Ex-Cell) 325-PF CHO 배지(JRH Biosciences, Lenexa, KS) 내에서 성장시킴으로써 선택하였다. 클론을 표준 ELISA 분석법에 의하여 IgG 발현을 위하여 스크리닝하였다.
- <991> CE-LIF에 의한 MAb의 올리고당 특성화
- <992> CHO 푸코실화 세포주로부터의 항-CD19 항체 및 Ms704-PF가 유도하는 항-CD19 단일클론 항체 샘플로부터 유도된 N-연결성 올리고당(N-linked oligosaccharides)의 비교 분석을 모세관 전기영동 레이저 유도성 형광(capillary electrophoresis laser induced fluorescence, cLIF)에 의하여 실시하였다(Chen and Evangelista (1998) Electrophoresis 15:1892). 정제된 항체의 N-결합성 올리고당을 IgG 샘플( $100 \mu\text{g}$ )로부터 방출시켰는데, 이는 상기 샘플을  $40^\circ\text{C}$ 에서 12.5 mU PNGaseF(Prozyme)와 함께 밤새 배양함으로써 이루어졌다. 사용된 조건 하에서는, CHO 푸코실화 및 비-푸코실화 세포에서 발현된 HuMAb 21D4의 Fc 부분으로부터 N-연결성 글리칸(N-linked glycans)을 방출시켰다. 에탄올 침전으로 MAb 단백질을 제거한 후에, 글리칸을 함유한 상청액을 진공 원심분리에 의하여 건조시켰고, 탈시알릴화 및 푸코즈 잔기의 상실의 최소화(THF 중 15% 아세트산 및 1 M 쇼돔 시아노보로하이드라이드(Sigma)) 약한 환원적 아미노화 조건 하에서 19 mM 8-아미노피렌-1,3,6-트리스ัล포네이트(8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate, APTS)(Beckman)에서 재현탁시켰다. 글리칸 표지 반응을  $40^\circ\text{C}$ 에서 밤새 지속하였고, 이어서 물 중에서 샘플을 25배 희석시켰다. APTS-표지된 글리칸을, 50 cm의 유효 길이를 갖는  $50 \mu\text{m}$ 의 내부 직경의 N-CHO로 코팅된 모세관(Beckman)을 사용하여, 역극성을 갖는 P/ACE MDQ CE 시스템(Beckman) 상에서 레이저 유도성 형광에 의한 모세관 전기영동에 적용하였다. 샘플을 가압(8 sec.) 주입하였고, 분리를 25 kV에서 탄수화물 분리 겔 버퍼(Carbohydrate Separation Gel Buffer)(Beckman)를 사용하여  $20^\circ\text{C}$ 에서 20분간 실시하였다. 3 mW 아르곤 이온 레이저 및 488 nm의 여기 파장 및 520 nm의 방출 파장을 갖는 레이저-유도성 형광 검출시스템(Beckman)을 사용하여 분리를 모니터링하였다(Ma and Nashabeh (1999) Anal. Chem. 71:5185). 올리고당 프로파일에서의 차이를 Ms704-PF 세포주와 비교할 때 푸코실화 세포주로부터 수득된 항체 중에서 관찰하였는데, 이것은 Ms704-PF가 유도하는 항-CD19 항체에서 푸코즈 잔기의 부재에 부합된다.
- <993> HPAE-PAD를 갖는 HPLC에 의한 당당류 분석
- <994> IgG 샘플( $200 \mu\text{g}$ )을  $100^\circ\text{C}$ 에서 4 시간 동안 2 N TFA(중성 당을 예측하기 위함) 또는 6 N HCl(아미노 당을 예측하기 위함)을 이용하여 산 가수분해로 처리하였다. 샘플을 주위 온도에서 진공 원심분리에 의하여 건조시켰고, 200  $\mu\text{l}$  물에서 재구성시킨 후에 HPAE-PAD(Dionex)에 의하여 분석하였다. 당당류를 프리-칼럼 아미노 트랩(pre-column Amino Trap) 및 보레이트 트랩(Borate Trap)(Dionex)을 갖는 카보팩(CarboPac) PA10 4 x 250 mm 칼럼을 사용하여 분리하였다. 과정은 디오넥스 테크니컬 노트(Dionex Technical Note) 53을 따랐다. 당당류 피크 동일



성 및 상대적 풍부성(relative abundance)을 단당류 표준물(Dionex)을 이용하여 결정하였다.

<995> 또한 비푸코실화 항-CD19 21D4 항체를 표준 모세관 등전성 집중화 키트 분석기(standard capillary isoelectric focusing kit assay)(Beckman Coulter)를 이용하여 테스트하였다. 상기 분석은 푸코실화 21D4의 경우 pH 8.45, 푸코실화 21D4a의 경우 8.44 및 8.21, 및 비푸코실화 21D4 항체의 경우 8.52 및 8.30의 관찰된 pI 값을 나타내었다.

<996> **실시예 11: 항-CD19 항체의 ADCC 활성의 평가**

<997> 이 실시예에서, 푸코실화 및 비푸코실화 항-CD19 단일클론 항체를 형광 세포독성 분석에서 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 통하여 작동자 세포(effector cells)의 존재하에서 CD19+ 세포를 살해하는 능력에 대해서 테스트하였다.

<998> 비코실화 인간 항-CD19 단일클론 항체 21D4를 상술한 바와 같이 제조하였다. 인간 작동자 세포를 다음과 같이 전혈로부터 제조하였다. 인간 말초 혈액 단핵 세포를 헤파린처리된 전혈로부터 표준 피콜-파크(Ficoll-paque) 분리에 의하여 정제하였다. 세포를 10% FBS(배양 배지) 및 200 U/ml의 인간 IL-2를 함유하는 RPMI1640 배지 내에 재현탁하였고, 37°C에서 밤새 배양하였다. 다음날, 세포를 수거하여 배양 배지 내에서 한번 세척하였고,  $2 \times 10^7$  세포/ml로 재현탁하였다. 표적 CD19+ 세포를 2.5 mM 프로베네시드(probenecid)(분석 매질)로 보충된 배양 배지 내에서  $1 \times 10^6$  표적세포/mL 당  $2.5 \mu\text{l}$ 의 BATDA로 BATDA 시약(Perkin Elmer, Wellesley, MA)과 함께 37°C에서 20 분 동안 배양하였다. 표적 세포를 PBS 중에서 20 mM HEPES 및 2.5 mM 프로베네시드로 4 회 세척하고, 스핀 다운시키고, 분석 매질 내에서  $1 \times 10^5$  세포/ml 의 최종 부피로 조정하였다.

<999> CD19+ 세포주 ARH-77(인간 B 림프세포성 백혈병; ATCC 등록번호 CRL-1621)을 다음과 같이 델피아(Delfia) 형광 방출 분석을 사용하여 푸코실화 및 비-푸코실화 인간 항-CD19 단일클론 항체 21D4에 대한 항체 특이적 ADCC에 대해서 테스트하였다. 표적 세포주 ARH77(100  $\mu\text{l}$ 의 표지된 표적 세포)을 작동자 세포 50  $\mu\text{l}$  및 21D4 또는 비푸코실화 21D4 항체 50  $\mu\text{l}$ 와 함께 배양하였다. 1:50의 표적 대 작동자 비를 실험 전체에 걸쳐서 사용하였다. 인간 IgG1 이소타입 대조군을 음성 대조군으로 사용하였다. 2100 rpm 펄스 스핀 및 37°C에서의 1 시간 배양 후에, 상청액을 수집하고, 다시 빠르게 회전시키고, 20  $\mu\text{l}$ 의 의 상청액을 편평 바닥 플레이트로 옮기고, 여기에 180  $\mu\text{l}$ 의 Eu 용액(Perkin Elmer, Wellesley, MA)을 첨가하고 용합 알파 TRF 플레이트 판독기(Perkin Elmer)에서 판독하였다. % 용해율을 다음과 같이 계산하였다: (샘플 방출 - 자발적 방출\*100)/(최대 방출 - 자발적 방출), 여기에서 자발적 방출은 표적 세포만을 함유한 웰로부터의 형광성이고, 최대 방출은 표적 세포를 함유한 웰로부터의 형광성이며, 3% 라이졸(Lysol)로 처리하였다. ARH-77 세포주에 대한 세포의 세포독성 %특이적 용해가 도 31에 보인다. CD19+를 발현하는 세포주 ARH-77은 HuMAb 항-CD19 항체 21D4에 의한 항체 매개성 세포독성 및 항-CD19 항체 21D4의 비푸코실화 형태와 연관된 특이적 용해의 증가된 백분율을 보여주었다. 이 데이터는 비 푸코실화 HuMAb 항-CD19 항체가 CD19+를 발현하는 세포에 대하여 특이적 세포독성을 증가시킨다는 것을 입증한다.

<1000> **실시예 12: 시차 주사 열량측정(Differential Scanning Calorimetry)에 의한 항-CD19 단일클론 항체의 열안정성**

<1001> 항-CD19 단일클론 항체들의 열적 안정성을 그들의 용점의 열량측정 분석을 이용하여 비교하였다.

<1002> 용점의 열량 측정은 자동샘플러(MicroCal LLC, Northampton, MA, USA)와 조합된 VP-모세관 DCS 시차주사 미세 열량기 플랫폼(VP-Capillary DSC differential scanning microcalorimeter platform)상에서 실시하였다. 샘플 세포 부피는 0.144 mL이다. 항체의 글리코실화 및 탈글리코실화 형태에 대한 변성 데이터를, 샘플을 2.3  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 1°C/분의 속도로 30°C에서 95°C로 가열함으로써, 얻었다. 단백질 샘플은 pH 7.4의 포스페이트-버퍼성 식염수(phosphate-buffered saline, PBS) 내에 존재하였다. 동일한 버퍼를 참조 세포에 사용하여 비교에 의한 몰 열용량(molar heat capacity)을 얻었다. 관찰된 온도기록도는 기준선이 보정되었으며, 소프트웨어 오리진(Origin) v7.0을 이용하여, 표준화된 데이터를 2-상 모델을 기초로 분석하였다. 데이터는 표 2에 보인다.

## 표 2

<1003> 항-CD19 항체의 열적 안정성 측정

클론	열 안정성 T <sub>m</sub> 1 (°C)
21D4	68.7
21D4a	69.7
5G7	68.5
5G7 IgG4	67.4
13F1 IgG4	68.4
46E8	66.4
47G4	67.2

<1004> 실시예 13: 글리코실화 자리의 평가

<1005> HuMAb 항-CD19 항체 5G7는 서열 분석에 의하여 가변 영역에 N-X-S/T 글리코실화 모티프(motif)를 가지는 것으로 밝혀졌다. N-결합성 서열 자리(N-X-S/T)의 존재는 MAb에 탄수화물을 첨가하는데 필요하지만 충분하지는 않다. 즉, 단백질 접힘 및 용매 접근성으로 인하여 탄수화물을 실제로 첨가하지 않은 N-X-S/T 서열을 가지는 것이 가능하다. 5G7의 가변 영역에서 글리코실화 자리의 확인을 LC-MS 및 웨스턴 분석 둘 다에 의하여 검사하였다.

<1006> 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)은 항체와 같은, 단백질의 질량을 결정하기 위한 표준 도구이다. 분석 전에, 항-CD19 HuMAbs 5G7 및 13F1의 N-연결성 올리고당을 IgG 샘플(100 µg)로부터 방출시켰는데, 이를 위하여 상기 샘플을 12.5 mU PNGaseF(Prozyme)과 함께 40°C에서 밤새 배양하였다. 사용된 조건 하에서, HuMAbs의 Fc 부분으로부터 N-연결성 글리칸을 방출시켰다. 클론 5G7의 경우, 우리는 다량으로 두 개의 질량을 관찰하였는데; 하나(49,855 Da)는 보존된 N-연결성 자리(N297)에서 불변 영역 내의 당을 제거하기 위한 PNGaseF 분해 후에 예상된 질량에 대응되고, 두번째 질량(52,093 Da)은 두 번째 자리에서의 탄수화물의 첨가에 부합된다. 우리는 Fab-영역 글리칸을 PNGaseF 분해에 의하여 제거하지 못함을 알아냈으며; 따라서 이 데이터는 클론 5G7의 가변 영역에 탄수화물이 존재한다는 것을 확인해준다. 클론 13F1의 경우, 관찰된 질량은 부착된 탄수화물이 없는 단백질 서열의 예상된 질량에 일치하였다.

<1007> 상기의 결과를 확인하기 위하여, 우리는 탄수화물-특이적 염색 방법으로, 클론 5G7 및 13F1의 Fab 단편에 대하여 웨스턴 블랏 분석(Western Blot assay)을 완료하였다. 1.25 µg의 활성화된 파파인(papain)을 1 mM 시스테인을 함유한 25 µg의 IgG 샘플에 첨가함으로써, Fab 및 Fc 단편을 생산하였다. 샘플을 40°C에서 4 시간 동안 배양하고, 반응을 30 mM 요오도아세트아미드(iodoacetamide)로 정지시켰다. 샘플을 4-20% 트리스-글리신 SDS-PAGE에 의하여 분석하고 이어서 PVDF 막 상으로 전기-블랏팅(electro-blotting)을 실시하였다. 블랏(blot)의 탄수화물 특이적 염색을 제조자가 제안한 프로토콜에 따라 겔 코드 글리코프로테인 염색 키트(Gel Code Glycoprotein Staining Kit)(Pierce)를 사용하여 실시하였다. 결과는 5G7 항체에서 Fab 글리코실화를 검출하였지만, 13F1 항체에서는 검출하지 못했다. 이들 결과는 5G7 항체가 Fab 영역에서 글리코실화되는 것을 보여주었다.

<1008> 상술한 바와 같이, 항-CD19 단일클론 항체 5G7은 글리코실화 자리를 갖는 가변 영역을 포함한다. 가변 영역에서의 글리코실화 자리는 변경된 항원 결합성으로 인하여 항체의 면역원성을 증가시키거나 pK 값을 변경시킬 수 있기 때문에, 가변 영역 N-X-S/T 글리코실화 모티프 서열을 돌연변이시켜 글리코실화를 감소시키는 것이 유리할 수 있다. 표준 분자 생물학 기술을 이용하여, 5G7 항체 서열을 변형시켜 위치 19에서 시작하는 N-I-S 서열을 K-I-S(5G7-N19K) 또는 Q-I-S(5G7-N19Q)로 변화시켰다.

<1009> 실시예 14: 형광 분광분석에 의한 항-CD19 단일클론 항체의 안정성

<1010> 형광 분광분석에 의하여 화학적 변성의 중간점을 측정함으로써 항-CD19 단일클론 항체들의 안정성을 비교하였다.

<1011> 화학적 변성의 형광 측정을 마이크로맥스 플레이트 판독기(Micromax plate reader)(SPEX, Edison, NJ)로 SPEX 플루오로로그(Fluorolog) 3.22 상에서 실시하였다. 측정을 PBS 버퍼 내에서 16 가지의 상이한 농도의 구아니딘염 하이드로클로라이드에서 평형화하도록 24 시간 동안 유지시킨 항체 샘플에 대해서 실시하였다. 측정을 흑색, 저 부피, 비-결합성 표면 384-웰 플레이트(Corning, Acton, MA)에서 실시하였으며, 12 µL의 웰 부피에서 2 µM의 항체를 필요로 하였다. 형광을 280 nm에서 여기시켰으며, 방출 스펙트럼을 300 내지 400 nm에서 측정하였다. 주사 속도는 nm당 1초였으며, 슬릿을 5 nm 밴드패스(bandpass)로 설정하였다. 버퍼 블랭크(blank)를 PBS를 사용하여 실시하였으며, 데이터로부터 자동적으로 차감하였다. 데이터는 표 3에 보인다.

**표 3**

항-CD19 항체의 형광 안정성

클론	플림 중간점 (M)	결집 피크(M)
21D4	3.01	
21D4a	2.97	
5G7	2.91	
5G7 IgG4	2.63	
27F3	2.77	
13F1 IgG4	2.58	2.29
46E8	2.43	2.16
47G4	1.68	

**실시예 15: 항-CD19 항체를 이용한 생체내 B 세포 라지 종양의 치료**

이 실시예에서, 암성 B 세포 종양으로 이식된 SCID 마우스를 네이키드 항-CD19 항체 또는 세포독소-접합성 항-CD19 항체로 생체내에서 치료하여 종양 성장에 대한 항체의 생체내 효과를 검사하였다.

세포독소-접합성 항-CD19 항체 21D4를 상술한 바와 같이 제조하였다. 항-CD19-N1 접합체 및 항-CD19-N2 접합체 둘 다를 이 실시예에서 테스트하였다. 기능적 B 및 T 림프구를 결여한, 중증 복합 면역 결핍증(SCID) 마우스를 사용하여 B-세포 악성종양을 연구하였다. 라지 B 종양 세포주로부터의 세포를 피하로 주사하였다. 마우스를 30 mg/kg의 항체 또는 0.3  $\mu$ mole/kg(세포독소)의 항체-세포독소 접합체로 치료하였다. 이소타입 대조군 항체 또는 제형 버퍼를 음성 대조군으로 사용하였다. 상기 동물에게 항체 또는 비이클(vehicle)을 함유한 약 200  $\mu$ l의 PBS를 복강내 주사에 의하여 투여하였다. 항체를 제0일에 단일 용량(single dose, SD)으로 주사하거나, 제0, 7 및 14일에 반복 용량(repeat dose, RD)으로 주사하였다. 전자 캘리퍼를 사용하여 종양 성장에 대하여 마우스를 매일 모니터링하였으며; 종양을 삼차원적으로 (높이×폭×길이) 측정하였고, 종양 부피를 계산하였다. 종양이 종양 종말점(2000 mm<sup>3</sup>)에 이르거나 20% 이상의 무게 손실을 보여줄 때 마우스를 안락사시켰다. 결과는 도 32에 보인다. 각각의 경우에, 항-CD19 항체는 음성 대조군에 비하여 더 작은 종양 부피를 나타냈으며, 세포독소-접합성 항체는 네이키드 항체에 의한 치료에서보다 더 작은 종양 부피를 나타내었다.

또한 체중의 변화를 측정하였으며 체중의 % 변화율로 계산하였다. 그 결과가 도 33에 보인다. 결과는 그 세포독소-접합성 항체에 의한 체중의 순 감소 변화 및 비이클 또는 네이키드 항체에 의한 체중의 순 증가를 보여주었다.

**실시예 16: 시노몰구스 원숭이(Cynomolgus Monkeys)에서의 B 세포 연구**

이 실시예에서, 시노몰구스 원숭이에게 부모 항-CD19 항체 21D4 또는 비푸코실화(nonfucosylated, nf) 항-CD19 항체 21D4를 정맥내 주사하였다. 투약 후에 절대 백혈구 수 및 백혈구 서브셋을 결정하였으며, 투약-전 값과 비교하였다.

시노몰구스 원숭이로부터 취한 혈액 샘플을 부모 CD19 항체 또는 nf 항-CD19 항체로 염색하고, 표준 방법을 이용하여 FACS에 의하여 분석하였다. 연구에 포함된 모든 원숭이로부터의 B-세포를 부모 및 nf 항-CD19 항체 둘 다에 의하여 양성으로 염색하였다. 두 마리의 수컷 및 두 마리의 암컷 원숭이들을 각 그룹에 포함시켰다. 혈액 샘플을 -7일 및 투약-전에 채취하였다. 복재 정맥(saphenous vein) 내에서 느린 볼루스 정맥내 주사를 실시하였으며 상기 동물에게 1 mg/kg 의 부모 또는 nf 항-CD19 항체를 투여하였다. 혈액 샘플을 투약 후 24 시간, 48 시간, 72시간, 및 제 7, 14, 21 및 28일에 채취하였다. 혈액 샘플을 PK 결정, 혈액학 및 유세포분석을 위하여 채취하였다. 각 시점에서, 다음의 세포 표면 항원을 혈액으로부터 모니터링하였다; CD2+/CD20+ (모든 림프구), CD20+(B-림프구), CD3+(T-림프구), CD3+/CD4+(T-헬퍼 림프구), CD3+/CD8+(T-세포독성 림프구), CD3-/CD16+(NK세포), CD3-/CD14+(단핵세포).

도 34는 평균 제-7일 및 투약-전 값과 비교할 때 CD20 양성 세포의 수에서의 변화를 나타낸 것이다. 부모 항-CD19 항체는 24 시간 후 CD20 양성 B-세포의 수에서 55% 감소를 유도한 반면에, 비푸코실화 항체는 약 90%까지의 B-세포 수를 저하시키는 더 큰 억제를 유도하였다. nf 항-CD19 군에서, B-세포 수는 치료 후 제2, 3 및 7일에 이 수준으로 유지되었고, 반면에 부모 항체는 기준선으로 다시 복귀하기 시작하는 것으로 나타났다. 도 35는

개별적인 원숭이 각각에 대해 CD20 양성 세포에 대한 기준선으로부터의 % 변화율을 나타낸 것이다. nf 항-CD19 항체로 치료된 4 마리의 원숭이 모두는 부모 항-CD19 항체와 비교할 때 CD20 양성 세포의 %에서 더 유의적인 저하를 나타내었다. 이들 데이터는 nf 항-CD19 항체가 부모 항체와 비교할 때 순환성 B-세포(circulating B-cells)를 격감시키는데 더 효과적임을 의미한다.

**실시예 17: 항-CD19 항체의 면역조직화학적 연구**

HuMAb 항-CD19의 조직 결합 프로파일을 평가하기 위하여, FITC 접합된 21D4(21D4-FITC, F:P=4) 및 비푸코실화 21D4(nf21D4)(nf21D4-FITC, F:P=3)를 비장, 편도선, 소장, 소뇌, 대뇌, 심장, 간, 폐 및 신장(1-2 샘플/각각)을 포함하는, 정상(비-신생물성) 인간 조직을, 뿐만 아니라 만성 림프구성 백혈병, 여포 림프종, 주변 영역 림프종, 맨틀(mantle) 세포 림프종, 및 미만성 거대 B 세포 림프종(1-2 샘플/각각)을 포함하는 B 세포 신생물의 패널에서 검사하였다. 비푸코실화 21D4 항체를 상술한 바와 같이 제조하였다. FITC 접합된 Hu-IgG<sub>1</sub>(Hu-IgG<sub>1</sub>-FITC)를 이소타입 대조군 항체로 사용하였다.

순간 동결시키고(snap frozen) OCT 포매된(OCT embedded) 정상 및 림프종 조직을 Cooperative Human Tissue Network(Philadelphia, PA) 또는 National Disease Research Institute(Philadelphia, PA)로부터 구입하였다. 5  $\mu$ m의 동결 절편(cryostat sections)을 실온에서 10 분 동안 아세톤으로 고정시키고, 사용할 때까지 -80°C에서 저장하였다. EnVision+System(Dako, Carpinteria, CA)을 이용하여 간접 퍼옥시다제 면역염색을 우리의 일반적인 프로토콜에 따라서 실시하였다. 간략하게, 슬라이드를 PBS(Sigma, St. Louis, MO)로 2 회 세척하였고, 그리고 나서 Dako EnVision+System에서 공급된 퍼옥시다제 블럭과 함께 10 분 동안 배양하였다. PBS로 2 회 세척한 후에, 슬라이드를 1% 인간 감마 글로불린 및 1 mg/ml의 열 결집성 인간 IgG로 보충된 Dako 단백질 블럭과 함께 20 분 동안 배양하여 비특이적 결합부위를 차단하였다. 계속하여, 제 1 항체(0.4 또는 2  $\mu$ g/ml의 21D4-FITC 및 nf 21D4-FITC) 또는 이소타입 대조군(0.4 또는 2  $\mu$ g/ml의 Hu-IgG<sub>1</sub>-FITC)을 절편 상으로 적용하고, 1 시간 동안 배양하였다. PBS로 3 회 세척한 후, 슬라이드를 마우스 항-FITC 항체(20  $\mu$ g/ml)와 함께 30 분 동안 배양하였다. PBS로 3 회 더 세척한 후, 슬라이드를 Dako EnVision+System 에서 공급된 퍼옥시다제-접합성 항-마우스 IgG 폴리머와 함께 30 분 동안 배양하였다. 마지막으로, 슬라이드를 상기한 바와 같이 세척하고, Dako EnVision+System 에서 공급된 DAB 기질-크로모젠 용액과 6 분 동안 반응시켰다. 그리고 나서 일반적인 조직학적 과정에 따라서 슬라이드를 탈이온수로 세척하고, 메이어 헤마톡실린(Mayer's hematoxylin)(Dako)으로 대비염색 하며, 탈수하고, 세정하며, Permount(Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ)로 커버슬립하였다.

두 21D4-FITC 및 nf 21D4-FITC에 의한 특이적 염색을 림프성 또는 림프구-풍부 조직(비장, 편도선 및 소장) 및 림프종 조직에서 관찰하였다. 비장 및 편도선에서, 강력한 특이적 염색이 주로 B 세포 영역, 즉 비장의 림프소 절, 맨틀 존(mantle zone) 및 편도선의 배아 중심에 분포되었다. 소장에서, 강한 특이적 면역반응성은 주로 페이어서 패취(Peyer's Patch) 또는 림프구 응집체에 국부화되어 있으며, 뿐만 아니라 약한 내지 강한 염색은 점막의 고유판(lamina propria) 내의 미만성 림프구에서 국부화되어 있다. 또한 강한 염색은 여포 림프종 및 주변 영역 림프종의 종양세포에서 나타났으며, 뿐만 아니라 중간 내지 강한 염색은 만성 림프구성 백혈병, 미만성 거대 B 세포 림프종 및 맨틀 세포 림프종에서 나타났다.

정상 소뇌, 대뇌, 심장, 간, 폐 및 신장 조직에서, 폐 및 신장 조직에서의 병소 림프구 세포 또는 응집체에서의 약간의 염색을 제외하고 21D4-FITC 또는 nf21D4-FITC로 염색한 경우에 의미있는 염색은 관찰되지 않았다. 덧붙여, 이들 조직을 10  $\mu$ g/ml까지의 더 높은 농도에서 염색하였다. 유사하게, 이소타입 대조군 항체와 비교하여 특이적 염색은 관찰되지 않았다.

21D4-FITC 및 nf21D4-FITC의 비교는 모든 조직에서 유사한 염색 패턴을 나타내었다. 특이적 염색은 0.4  $\mu$ g/ml에서 포화되거나, 거의 포화되었다. 그러나, 21D4-FITC에 의한 염색 세기는 nf21D4-FITC에 의한 것보다 약 0.5-1 등급 더 강하다. 아마도 이것은 부분적으로 21D4-FITC의 더 큰 F:P 비(4 대 3)에 기인할 것이다.

**실시예 18: 항-CD19 항체의 세포 살해의 평가**

이 실시예에서, 항-CD19 단일클론 항체를 단독으로 또는 세포 독소에 접합하여, 티미딘 혼입 분석에서 CD19+ 세포주를 살해하는 능력에 대하여 테스트하였다.

항-CD19 단일클론 항체를 펩티딜, 하이드라존 또는 디설파이드 링커와 같은, 링커를 통해서 세포독소 (N1)에 접합시켰다. CD19+를 발현하는 라지 또는 SU-DHL-6 세포주를  $1 \times 10^4$  세포/웰로 접종하였다. 항-CD19 항체 단독으로 또는 항-CD19 항체-세포독소 접합체를 30 nM의 출발 농도로 웰에 첨가하였으며, 8 회의 희석을 위해서 1:3 계열



희석으로 하향 적정하였다. CD19에 대해 비특이적인 이소타입 대조군 항체를 음성 대조군으로 사용하였다. 플레이트를 69 시간 동안 배양하였다. 그리고나서, 플레이트를 0.5  $\mu\text{Ci}$ 의  $^3\text{H}$ -티미딘으로 24 시간 동안 펄스하고, 수확하여 탑 카운트 신틸레이션 카운터(Packard Instruments, Meriden, CT)에서 판독하였다. 결과가 EC50 값과 함께 도 36에 보인다. 도 36A는 라지 세포 상의 네이키드 항체를 보여준다. 도 36B는 SU-DHL-6 세포 상의 네이키드 항체를 보여준다. 도 36C는 SU-DHL-6 세포 상의 세포독소-접합성 항-CD19 항체를 보여준다. 이들 데이터는 항-CD19 항체 21D4가 라지 B-세포 종양세포에 결합하고 그것을 살해하며, SU-DHL-6 세포 상에서 예기치 않게 높은 수준의 세포 살해를 가진다는 것을 입증한다.

#### <1030> 실시예 19: B-세포 격감 연구

<1031> 항-CD19 항체가 B-세포를 격감시킬 수 있는지를 판단하기 위하여, 전혈 B-세포 격감 분석법을 수립하였다.

<1032> 인간 전혈을 AllCells 사(Berkeley, CA)로부터 구입하였으며, 같은 날에 실온에서 송달받았다. 2 ml의 전혈을 1-30mg/ml의 지정된 항체, 또는 비처리군으로서 PBS의 부재 또는 존재하에서 배양하였다. 혈액-항체 혼합물을 5% CO<sub>2</sub>와 함께 37°C에서 밤새 배양하였다. 실험일에, 혈액을 RBC 용해 버퍼를 사용하여 1:10 비율로 10분 동안의 배양에 의하여 2회 용해하였고 이어서 원심분리시켰다. 두번째 스핀 후에, 세포 펠렛을 FACS 버퍼(2% FBS 및 20% 베르젠(versene)과 함께 PBS에 칼슘 및 마그네슘을 더함)로 한번 세척하고, 이어서 표준 유세포분석 프로토콜을 이용하여 T-세포 마커로서 항-CD3 항체(Becton Dickinson) 및 B-세포 마커로서 항-CD22 항체(Becton Dickinson)로 FACS-염색을 실시하였다. 세포를 얼음 상에서 20 분 동안 배양한 후에 최종적으로 세척하고, FACS 버퍼 중 5 mg/ml 프로피듐 요오다이드 용액(Sigma)에 재현탁시켰다. 데이터를 FASCalibur 시스템 및 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)의 셀퀘스트(CellQuest) 소프트웨어를 이용하여 유세포분석에 의하여 수집하였고, 림프구 크기 게이팅(gating)을 이용하여 플로우조(FlowJo) 소프트웨어로 분석하였다. 백분율 변화율을, 비-처리된 그룹에서의 % 양성 B 세포에서 항체 처리 그룹에서의 % 양성 B-세포를 뺀 다음에 비처리군에서의 % 양성 B-세포로 나누고 100을 곱하여 결정함으로써 계산하였다. 결과가 표 4에 보인다. 건강한 혈액 공여자로부터, 8.7%의 B-세포가 밤새 배양 후에 혈액 내에 유지되었다(항체 없음). 전혈을 30 mg/ml의 양성 대조군 리툭산(Rituxan)과 함께 배양하여 비처리된, 무-항체 그룹과 비교할 때 B-세포의 수에서 46% 격감을 유도하였다. 비-푸코실화(nf) 항-CD19 항체 21D4로 치료된 그룹은 B-세포를 ~40% 만큼 억제하여 B-세포 격감에 뛰어난 효과를 가졌다. 부모 항체 21D4는 B-세포 수에 대하여 적절한 효과를 가졌다.

#### 표 4

<1033> 전혈로부터의 B-세포 격감

샘플	% 양성 (CD22)	% 변화
항체 없음	8.7	--
이소타입 대조군	7.5	14.2
리툭산®	4.7	46.3
부모 항-CD19 mAb	7.0	20.0
Nf 항-CD19 mAb	5.2	40.5

#### <1034> 실시예 20: 피하 이종이식(Xenograft) 모델에서 항-CD19 면역접합체의 생체내 효능

<1035> 항-CD19 면역접합체가 생체내에서 종양 성장을 억제하거나 감소시킬 수 있는지를 판단하기 위하여, SCID 마우스에서 피하 이종이식 모델을 테스트하였다. SCID 마우스에 마우스 당 0.1 ml PBS 및 0.1 ml 매트릭젤(matrigel)에서  $1 \times 10^7$  라지 세포를 피하 주사하였다. 평균 종양 부피가 약 50 mm<sup>3</sup>로 측정(정밀한 캘리퍼를 이용)될 때까지 종양 형성을 모니터링하였다. 여덟 마리의 종양-보유 마우스의 그룹들을 다음 중 하나의 단일 용량으로 치료하였다: (a) 비이클 대조군, (b) 이소타입 대조군, (c) 항-CD19 항체 21D4, 또는 (d) 항체 21D4를 이용하는, 면역접합체 항-CD19-N2. 면역접합체 CD19-N2 및 이소타입 대조군- N2(IgG-N2)를 N2 당량의 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ 의 용량으로 마우스에 복강내(i.p.)로 투여하였다. 항-CD19 항체를 25.7 mg/kg(즉, 면역접합체 CD19-N2에 사용된 N2 당량에 대한 등가 단백질 용량)으로 투여하였다. 실험의 과정을 통하여 정밀한 캘리퍼를 이용하여 측정함으로써 종양 성장을 모니터링하였다. 도 37에 분명히 나타난 바와 같이, 면역접합체 CD19-N2에 의한 단일 용량 치료는, 대조군 또는 항-CD19 항체 단독으로 치료될 때 크기에 있어서 종양 성장을 갖는 마우스와 비교하여 10일 안으로는 종양이 없는 마우스(그리고 60일까지는 종양이 없는 채로 남아있었음)를 가지게 되었다.



**실시예 21: 부루키트 림프종 모델에서 항-CD19 면역접합체의 생체내 효능**

항-CD19 면역접합체가 용량-의존적 방식으로 생체내에서 종양 성장을 억제하거나 감소시킬 수 있는지를 판단하기 위하여, 피하 브루키트 림프종 SCID 마우스 모델을 테스트하였다. SCID 마우스에 마우스 당 0.1 ml PBS 및 0.1 ml 매트릭셀(matrigel)에서  $1 \times 10^7$  라지 세포를 피하 주사하였다. 평균 종양 부피가 약  $70 \text{ mm}^3$ 로 측정(정밀한 캘리퍼를 사용)될 때까지 종양 형성을 모니터링하였다. 여덟 마리의 종양-보유 마우스의 그룹들을 다음 중 하나로 치료하였다: (a) 비이클 대조군, (b) 항-CD19 항체 21D4, 또는 (c) 항체 21D4를 이용하는, 면역접합체 항-CD19-N2. 2회 용량의 면역접합체 CD19-N2를 일주일 간격으로 마우스의 각 그룹에 복강내로, 다음 용량들 중의 하나로, 투여하였다: N2 당량의 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ , 0.1  $\mu\text{mol/kg}$ , 0.03  $\mu\text{mol/kg}$  및 0.01  $\mu\text{mol/kg}$ . 항-CD19 항체를 25 mg/kg(즉, 면역접합체 CD19-N2에 사용된 N2 당량에 대한 등가 단백질 용량)으로 투여하였다. 실험의 과정을 통하여 정밀한 캘리퍼를 이용하여 측정함으로써 종양 성장을 모니터링하였다. 도 38에 분명히 나타난 바와 같이, 종양 부피는 용량-의존적 방식으로 감소되는데, 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ 의 면역접합체 CD19-N2는 20-30일내에 종양이 없는 마우스를 가지게 되었고 이에 비하여 더 낮은 용량에서는 종양의 부피가 증가하였다.

**실시예 22: 전신성 모델에서 항-CD19 면역접합체의 생체내 효과**

항-CD19 면역접합체가 용량-의존적 방식으로 생체내에서 종양 성장을 억제하거나 감소시킬 수 있는지를 판단하기 위하여, 피하 브루키트 림프종 SCID 마우스 모델을 테스트하였다.

SCID 마우스에 마우스 당 0.1 ml PBS에서  $1 \times 10^6$  라지 세포를 테일 베일(tail veil)을 통하여 정맥내로 주사하였다. 주사 후 일주일, 여섯 마리의 마우스의 그룹들을 다음 중의 하나의 단일 용량으로 치료하였다: (a) 비이클 대조군, (b) 항-CD19 항체 21D4, 또는 (c) 항체 21D4를 사용하는, 면역접합체 항-CD19-N2. 면역접합체 CD19-N2를 각 마우스의 그룹에 복강내로 다음 용량 중의 하나로 투여하였다: N2 당량의 0.3  $\mu\text{mol/kg}$  또는 0.1  $\mu\text{mol/kg}$ . 항-CD19 항체를 30 mg/kg(즉, 면역접합체 CD19-N2에 사용된 N2 당량에 대한 등가 단백질 용량)으로 투여하였다. 라지세포의 종양 신경계로의 침투의 결과로서 뒷-다리 마비의 발달을 측정함으로써, 종양 성장을 실험의 과정을 통하여 모니터링하였다. 도 39에 분명히 나타난 바와 같이, 어떠한 마우스도 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ 의 면역접합체 CD19-N2로 치료될 때 뒷 다리 마비를 발달시키지 않았으나, 반면에 15%의 마우스는 0.1  $\mu\text{mol/kg}$ 의 면역접합체 CD19-N2로 치료될 때 뒷 다리 마비를 발달시키지 않았다. 대조적으로, 항-CD19 단독으로 치료된 모든 마우스는 주사 50일 내에 뒷 다리 마비를 발달시켰다.

**실시예 23: 시노물구스 원숭이에서의 단일 용량 약리학**

항-CD19 항체 21D4의 약리학을 평가하기 위하여, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 mg/kg의 비푸코실화(NF) 항체를 단일 정맥 주사로 시노물구스 원숭이에게 투여하였다. CD20<sup>+</sup> B 세포를 FACS에 의하여 평가하였다. 각 혈액 샘플의 100- $\mu\text{L}$  분액(aliquot)을 깨끗하고, 표지된 튜브 내에 위치시키고, 상업적으로 입수가능한 형광색소가 표지된 항-CD20 항체를 적절한 양으로 첨가하였다. 분액을 실온에서 약 30분 동안 배양하였고, 빛으로부터 차단시켰다. 표지 후에, 상업적으로 입수가능한 용해 용액을 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 남아있는 손상되지 않은 세포(약 1 내지  $2 \times 10^6$  세포/mL)를 즉시 분석하거나 분석할 때까지 약 4°C에서 보관하였다(혈액 수거후 120 시간 내로). 분석 전에 즉시 현탁액을 천천히 실온까지 데운다.

B 세포(CD20<sup>+</sup>)는 최소한의 21D4의 투여 후에는 용량-의존적 방식으로 감소되었으나(도 40A) 0.01 mg/kg에서는 격감이 없었다. B 세포는 0.1 mg/kg의 투여 후에 기준선의 16% 내지 32%로 감소되었다. B 세포의 회복이 투여 후 56일에 보였다. 이 연구에서, B-세포 격감의 크기 및 길이는 0.1 mg/kg의 리툭시맵(rituximab)의 주사 후의 그것과 유사하다(도 40B).

최저점에서의 B 세포는 1 mg/kg의 21D4의 투여 후에 기준선의 3% 내지 9%이었다. 4 마리 동물 중 2마리에서, B 세포는 투여 후 제36일에 회복되기 시작하였고 투여 후 7개월 내에 완전히 회복되었다. 다른 2마리 동물에서, B-세포 회복은 투여 후 6 내지 11 주에 시작하였고 투여 후 7 개월에 기준선의 56% 및 58% 이었다.

10 mg/kg의 21D4의 투여 후 B 세포의 감소는 1 mg/kg의 투여 후의 그것과 유사하다(3% 내지 11% 대 3% 내지 9%). 이 연구에서, 투여 후 제15일에 4마리 동물에 대해 검사를 실시하였다. 테스트품 관련 결과는 4 마리 동물 중 2마리에서의 경증 비장 림프구성 여포 위축(mild splenic lymphoid follicular atrophy)에 한정된다. 이것은 인식가능한 배아 중심(germinal centers)의 부재 및 림프구성 여포의 크기의 감소, 비장 내에서 B 세포의 주요한 위치에 의하여 특징지어진다. 다른 조직(하악 및 장간막 림프절(mandibular and mesenteric lymph nodes))

및 장-관련 림프구성 조직)에서의 림프구성 여포는 유사하게 영향을 받지 않았다. 두마리의 추가 동물은 회복 기간 동안 유지되었고 B 세포는 투여 후 20 주 이내에 기준선의 > 75% 로 회복하였다. 제184일에 이 동물들에 대해 검사를 실시하였는데 미시적 병리학적 평가시 보인 비장 또는 림프절에서 약리학적 효과가 없었다. 따라서, NF 21D4를 시노물구스 원숭이에 투여하는 것은 잘 받아들여졌고 CD19+ B 세포의 격감에서 예상된 약리학적 효과를 나타내었다.

**실시예 24: 시노물구스 원숭이에서의 다중 용량 약리학**

10 mg/kg (x3)의 비-푸코실화(NF) 21D4의 매월 투여(monthly administration)는 6 마리의 동물 중 4마리에서 85일을 통하여 기준선의 < 5%의 B-세포 수를 가져왔다. 다른 2 동물에서, B 세포는 첫 용량 투여 후에 기준선의 < 10% 이었다. 이 동물 중 1에서, B 세포는 제 29일에 기준선의 17%로 증가하였고, 그리고 나서, 제 85일을 통하여 안정적으로 유지되었다. 다른 동물에서, B-세포 수는 제 71일에 기준선의 69%까지 증가하였다. IgG 및 IgM 수준을 연구 전체에 걸쳐 측정하였으며 NF 21D4의 투여에 의하여 영향을 받지 않았다. 제 92일에 6 마리의 동물 중 4에 검사를 실시하였다. 조직학적 결과는 비장(4 마리 동물 중 2 마리) 및 장간막 림프절(4마리 동물 중 1마리)에서 경증 내지 중간 등급(moderate) 림프구성 여포 위축증으로 구성되었다. 이것은 인식가능한 배아 중심(germinal centers)의 부재 및 림프구성 여포의 크기의 감소, 비장 내에서 B 세포의 주요한 위치에 의하여 특징지어진다. 나머지 2마리 동물은 회복 기간 동안 유지되었다. B-세포 수는 제 169일에 증가하기 시작하였고 제 225일에 기준선의 31% 및 38%이었다. 이러한 동물들을 B-세포 수가 기준선의 > 75% 일때까지 모니터링 할 것이다.

또한 1, 10 또는 50 mg/kg의 매주 투여는 B 세포 수가 유의하게 감소하였다; 최저점에서 기준선의 < 16%. 제 30일에 각 그룹의 6마리에 검사를 실시하였고 조직학적 발견물은 18마리 동물 중 10에서의 비장에서 최소 내지 중간 등급의 림프구성 여포의 미만성 위축증(diffuse atrophy)을 포함하였다. 또한 비장, 림프절 및 골수에서의 CD20+ 림프구의 감소가 대부분의 동물에서 보였다.

**실시예 25: 항-CD19-세포독소 A에 의한 생체내에서의 종양 성장 억제**

이 실시예는 세 개의 인간 림프종 모델(SCID 마우스에서의 라지 및 다우디와 Es1<sup>6</sup> 누드 마우스에서의 라모스)을 이용하여 림프종에 대항하는 표적화된 치료적 제제로서의 항-CD19-세포독소 A 접합체의 유용성을 입증한다. 세포독소 A의 구조가 도 46에 보인다.

이러한 동물 모델을 사용하여 생체내에서 항-CD19-세포독소 A 접합체의 효능을 테스트하였다. CD19 항체 21D4의 세포독소 접합체는 본 명세서에서 CD19-세포독소 A로 지칭되는데, 이것은 세포독소 A에 연결된 CD19 항체 21D4로 구성된다. 세포독소 A 및 이의 제조물은, 2006년 12월 28일에 출원된 미국 출원 일련번호 제 60/882,461호 및 2007년 11월 30일에 출원된 미국 출원 일련번호 제 60/991,300호에 더 기술되어 있으며, 이것들의 전체 내용은 참고로서 본 명세서에 특히 병합된다. 세포독소 A는 전구약물 형태이며, 활성을 위하여 항체로부터의 방출뿐만 아니라 활성 부분을 방출하기 위하여 4' 카바메이트(carbamate)기의 분리를 요구한다.

라지 림프종 모델에서 항-CD19-세포독소 A의 활성을 입증하기 위하여, 요법 연구(therapy study)를 피하 라지 이종이식물을 지닌 SCID 마우스에서 실시하였다. 라지 세포(0.1 ml의 PBS 및 0.1 ml의 Matrigel<sup>TM</sup>에서의 10000000/마우스)를 SCID 마우스에 피하 주사하였고, 종양이 평균 크기 190 mm<sup>3</sup>에 도달할 때 8 마리의 그룹에 단일 용량의 항-CD19-세포독소 A를 0.03, 0.1 또는 0.3 μmol/kg체중으로 복강내 주사하여 치료하였다. 덧붙여, 대조군 그룹에 비이클 단독으로, 또는 이소타입 대조군 항체 세포독소 A 접합체를 0.1 또는 0.3 μmol/kg체중을 주사하였다. 마우스의 종양 부피(LWH/2) 및 체중을 연구의 과정에 걸쳐서 기록하였는데, 이것을 주입 후 63일 동안 계속하였다. 결과들이 도 41 및 42에 보인다. 도 41은 단일 그래프에서의 결과를 나타낸 것이고 도 42는 이소타입 대조군을 포함하는 결과를 나타낸 것이다. 결과들은 항-CD19-세포독소 A 접합체가 림프종의 치료에서 효능이 있다는 것과 요법이 용량-의존적이라는 것을 입증한다.

제2 림프종 모델을 라모스 이종이식을 이용하여 실시하였다.

라모스 세포(0.1 ml의 PBS 및 0.1 ml의 Matrigel<sup>TM</sup>에서의 10000000/마우스)를 Es1<sup>6</sup>누드 마우스(Jackson Laboratory)로 피하 주사하였고, 종양이 평균 크기 110 mm<sup>3</sup>에 도달할 때 10 마리의 그룹에 단일 용량(제 0일) 또는 반복 용량(제 0, 11, 및 25일)의 항-CD19-세포독소 A를 0.3 μmol/kg체중으로 복강내 주사하여 치료하였다. 덧붙여, 대조군 그룹에 비이클 단독으로, 항-CD19 항체 단독으로, 또는 이소타입 대조군 항체 세포독소 A 접합체를 0.3 μmol/kg체중으로 주사하였다. 마우스의 종양 부피(LWH/2) 및 체중을 연구의 과정에 걸쳐서 기록하였

는데, 이것을 주입 후 60일 동안 계속하였다. 결과들이 도 43에 보인다. 결과들은 또한 이 동물 모델에서도 림프종의 치료에 항-CD19-세포독소 A 접합체가 효능이 있다라는 것을 입증한다.

<1055> 제 3 림프종 모델을 다우디 이종이식을 이용하여 실시하였다. 다우디 세포(0.1 ml의 PBS 및 0.1 ml의 Matrigel™에서의 10000000/마우스)를 SCID 마우스로 피하 주사하였고, 종양이 평균 크기 70 mm<sup>3</sup>에 도달할 때 8 마리의 그룹에 단일 용량의 항-CD19-세포독소 A를 0.1 또는 0.3 μmol/kg체중으로 복강내 주사하여 치료하였다. 덧붙여, 대조군 그룹에 비이클 단독으로, 0.3 μmol/kg의 항-CD19-접합체 A 용량에 부합되는 항-CD19 항체 단독으로, 또는 0.1 또는 0.3 μmol/kg체중의 이소타입 대조군 세포독소 A 접합체를 주사하였다. 마우스의 종양 부피(LWH/2) 및 체중을 연구의 과정에 걸쳐서 기록하였는데, 이것을 주입 후 58일 동안 계속하였다. 결과들이 도 44에 보인다. 결과들은 항-CD19-세포독소 A 접합체가 이 동물 모델에서도 림프종의 치료에 효능이 있다라는 것을 입증한다.

<1056> **실시예 26: 항-CD19-N2에 의한 생체내에서 종양 성장 억제**

<1057> 이 실시예는 SU-DHL-6 림프종 모델에서의 항-CD19-N2의 효능을 입증한다. CD19 항체 21D4의 세포독소 접합체는 본 명세서에서 CD19-N2로 지칭되는데, 이것은 N2에 연결된 CD19 항체 21D4로 구성된다.

<1058> 요법 연구를 피하 SU-DHL-6 이종이식물을 지닌 SCID 마우스에서 실시하였다. SU-DHL-6 세포(0.1 ml의 PBS 및 0.1 ml의 Matrigel™에서의 10000000/마우스)를 SCID 마우스에 피하 주사하였고, 종양이 평균 크기 140 mm<sup>3</sup>에 도달할 때 10 마리의 그룹에 단일 용량의 항-CD19-N2를 0.1 또는 0.3 μmol/kg체중으로 복강내 주사하여 치료하였다. 덧붙여, 대조군 그룹에 비이클 단독으로, 또는 이소타입 대조군 항체 N2 접합체를 0.1 또는 0.3 μmol/kg 체중을 주사하였다. 마우스의 종양 부피(LWH/2) 및 체중을 연구의 과정에 걸쳐서 기록하였는데, 이것을 주입 후 64일 동안 계속하였다. 결과들이 도 45에 보인다. 결과들은 항-CD19-N2 접합체가 림프종의 치료에서 효능적이며 선택적이라는 것과 요법이 용량-의존적이라는 것을 입증한다.

<1059> 서열 목록의 요약

<1060>

서열번호	서열	서열번호	서열
1	V <sub>H</sub> a.a. 21D4 & 21D4a	41	V <sub>K</sub> CDR1 a.a. 5G7
2	V <sub>H</sub> a.a. 47G4	42	V <sub>K</sub> CDR1 a.a. 13F1
3	V <sub>H</sub> a.a. 27F3	43	V <sub>K</sub> CDR1 a.a. 46E8
4	V <sub>H</sub> a.a. 3C10	44	V <sub>K</sub> CDR2 a.a. 21D4 & 21D4a
5	V <sub>H</sub> a.a. 5G7	45	V <sub>K</sub> CDR2 a.a. 47G4
6	V <sub>H</sub> a.a. 13F1	46	V <sub>K</sub> CDR2 a.a. 27F3
7	V <sub>H</sub> a.a. 46E8	47	V <sub>K</sub> CDR2 a.a. 3C10
8	V <sub>K</sub> a.a. 21D4	48	V <sub>K</sub> CDR2 a.a. 5G7
9	V <sub>K</sub> a.a. 21D4a	49	V <sub>K</sub> CDR2 a.a. 13F1
10	V <sub>K</sub> a.a. 47G4	50	V <sub>K</sub> CDR2 a.a. 46E8
11	V <sub>K</sub> a.a. 27F3	51	V <sub>K</sub> CDR3 a.a. 21D4
12	V <sub>K</sub> a.a. 3C10	52	V <sub>K</sub> CDR3 a.a. 21D4a
13	V <sub>K</sub> a.a. 5G7	53	V <sub>K</sub> CDR3 a.a. 47G4
14	V <sub>K</sub> a.a. 13F1	54	V <sub>K</sub> CDR3 a.a. 27F3
15	V <sub>K</sub> a.a. 46E8	55	V <sub>K</sub> CDR3 a.a. 3C10
16	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 21D4 & 21D4a	56	V <sub>K</sub> CDR3 a.a. 5G7
17	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 47G4	57	V <sub>K</sub> CDR3 a.a. 13F1
18	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 27F3	58	V <sub>K</sub> CDR3 a.a. 46E8
19	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 3C10	59	V <sub>H</sub> n.t. 21D4 & 21D4a
20	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 5G7	60	V <sub>H</sub> n.t. 47G4
21	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 13F1	61	V <sub>H</sub> n.t. 27F3

22	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 46E8	62	V <sub>H</sub> n.t. 3C10
23	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 21D4 & 21D4a	63	V <sub>H</sub> n.t. 5G7
24	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 47G4	64	V <sub>H</sub> n.t. 13F1
25	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 27F3	65	V <sub>H</sub> n.t. 46E8
26	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 3C10	66	V <sub>K</sub> n.t. 21D4
27	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 5G7	67	V <sub>K</sub> n.t. 21D4a
28	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 13F1	68	V <sub>K</sub> n.t. 47G4
29	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 46E8	69	V <sub>K</sub> n.t. 27F3
30	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 21D4 & 21D4a	70	V <sub>K</sub> n.t. 3C10
31	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 47G4	71	V <sub>K</sub> n.t. 5G7
32	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 27F3	72	V <sub>K</sub> n.t. 13F1
33	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 3C10	73	V <sub>K</sub> n.t. 46E8
34	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 5G7	74	VH 5-51 생식계열 a.a.
35	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 13F1	75	VH 1-69 생식계열 a.a.
36	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 46E8	76	VK L18 생식계열 a.a.
37	V <sub>K</sub> CDR1 a.a. 21D4 & 21D4a	77	VK A27 생식계열 a.a.
38	V <sub>K</sub> CDR1 a.a. 47G4	78	VK L15 생식계열 a.a.
39	V <sub>K</sub> CDR1 a.a. 27F3	79	CD19 a.a.
40	V <sub>K</sub> CDR1 a.a. 3C10	80	JH4b 생식계열

<1061>

서열번호	서열	서열번호	서열
		81	JH5b 생식계열
		82	JH6b 생식계열
		83	JH6b 생식계열
		84	JK2 생식계열
		85	JK3 생식계열
		86	JK1 생식계열
		87	JK2 생식계열
		88	펩티드 링커
		89	펩티드 링커
		90	펩티드 링커
		91	펩티드 링커
		92	펩티드 링커
		93	펩티드 링커
		94	펩티드 링커
		95	펩티드 링커
		96	펩티드 링커
		97	펩티드 링커
		98	펩티드 링커
		99	펩티드 링커
		100	펩티드 링커
		101	펩티드 링커

### 도면의 간단한 설명

<861>

도 1A는 21D4 및 21D4a 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 59) 및 아미노산 서열(서열번호 1)을 보여준다. CDR1(서열번호 16), CDR2(서열번호 23) 및 CDR3(서열번호 30) 영역들이 묘사되어 있고 V, D 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.

- <862> 도 1B는 21D4 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 66) 및 아미노산 서열(서열번호 8)을 보여준다. CDR1(서열번호 37), CDR2(서열번호 44) 및 CDR3(서열번호 51) 영역들이 묘사되어 있고 V 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <863> 도 1C는 21D4a 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 67) 및 아미노산 서열(서열번호 9)을 보여준다. CDR1(서열번호 37), CDR2(서열번호 44) 및 CDR3(서열번호 52) 영역들이 묘사되어 있고 V 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <864> 도 2A는 47G4 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 60) 및 아미노산 서열(서열번호 2)을 보여준다. CDR1(서열번호 17), CDR2(서열번호 24) 및 CDR3(서열번호 31) 영역들이 묘사되어 있고 V, D 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다..
- <865> 도 2B는 47G4 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 68) 및 아미노산 서열(서열번호 10)을 보여준다. CDR1(서열번호 38), CDR2(서열번호 45) 및 CDR3(서열번호 53) 영역들이 묘사되어 있고 V 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <866> 도 3A는 27F3 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 61) 및 아미노산 서열(서열번호 3)을 보여준다. CDR1(서열번호 18), CDR2(서열번호 25) 및 CDR3(서열번호 32) 영역들이 묘사되어 있고 V, D 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <867> 도 3B는 27F3 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 69) 및 아미노산 서열(서열번호 11)을 보여준다. CDR1(서열번호 39), CDR2(서열번호 46) 및 CDR3(서열번호 54) 영역들이 묘사되어 있고 V 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <868> 도 4A는 3C10 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 62) 및 아미노산 서열(서열번호 4)을 보여준다. CDR1(서열번호 19), CDR2(서열번호 26) 및 CDR3(서열번호 33) 영역들이 묘사되어 있고 V, D 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <869> 도 4B는 3C10 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 70) 및 아미노산 서열(서열번호 12)을 보여준다. CDR1(서열번호 40), CDR2(서열번호 47) 및 CDR3(서열번호 55) 영역들이 묘사되어 있고 V 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <870> 도 5A는 5G7 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 63) 및 아미노산 서열(서열번호 5)을 보여준다. CDR1(서열번호 20), CDR2(서열번호 27) 및 CDR3(서열번호 34) 영역들이 묘사되어 있고 V, D 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <871> 도 5B는 5G7 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 71) 및 아미노산 서열(서열번호 13)을 보여준다. CDR1(서열번호 41), CDR2(서열번호 48) 및 CDR3(서열번호 56) 영역들이 묘사되어 있고 V 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <872> 도 6A는 13F1 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 64) 및 아미노산 서열(서열번호 6)을 보여준다. CDR1(서열번호 21), CDR2(서열번호 28) 및 CDR3(서열번호 35) 영역들이 묘사되어 있고 V, D 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <873> 도 6B는 13F1 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 72) 및 아미노산 서열(서열번호 14)을 보여준다. CDR1(서열번호 42), CDR2(서열번호 49) 및 CDR3(서열번호 57) 영역들이 묘사되어 있고 V 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <874> 도 7A는 46E8 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 65) 및 아미노산 서열(서열번호 7)을 보여준다. CDR1(서열번호 22), CDR2(서열번호 29) 및 CDR3(서열번호 36) 영역들이 묘사되어 있고 V, D 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <875> 도 7B는 46E8 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 73) 및 아미노산 서열(서열번호 15)을 보여준다. CDR1(서열번호 43), CDR2(서열번호 50) 및 CDR3(서열번호 58) 영역들이 묘사되어 있고 V 및 J 생식계열 유도체가 나타나 있다.
- <876> 도 8은 21D4 (서열번호 1) 및 21D4a(서열번호 1)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열 V<sub>H</sub> 5-51 아미노산 서열(서열번호 74)과 정렬시킨 것을 보여준다. JH4b 생식계열은 서열번호 80에 공지되어 있다.



- <877> 도 9는 47G4(서열번호 2)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_H$  1-69 아미노산 서열(서열번호 75)과 정렬시킨 것을 보여준다. JH5b 생식계열은 서열번호 81에 공지되어 있다.
- <878> 도 10은 27F3(서열번호 3)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_H$  5-51 아미노산 서열(서열번호 74)과 정렬시킨 것을 보여준다. JH6b 생식계열은 서열번호 82에 공지되어 있다.
- <879> 도 11은 3C10(서열번호 4)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_H$  1-69 아미노산 서열(서열번호 75)과 정렬시킨 것을 보여준다. JH6b 생식계열은 서열번호 82에 공지되어 있다.
- <880> 도 12는 5G7(서열번호 5)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_H$  5-51 아미노산 서열(서열번호 74)과 정렬시킨 것을 보여준다. JH6b 생식계열은 서열번호 83에 공지되어 있다.
- <881> 도 13은 13F1(서열번호 6)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_H$  5-51 아미노산 서열(서열번호 74)과 정렬시킨 것을 보여준다. JH6b 생식계열은 서열번호 82에 공지되어 있다.
- <882> 도 14는 46E8(서열번호 7)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_H$  5-51 아미노산 서열(서열번호 74)과 정렬시킨 것을 보여준다. JH6b 생식계열은 서열번호 82에 공지되어 있다.
- <883> 도 15는 21D4(서열번호 8)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_k$  L18 아미노산 서열(서열번호 76)과 정렬시킨 것을 보여준다. JK2 생식계열은 서열번호 84에 공지되어 있다.
- <884> 도 16은 21D4a(서열번호 9)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_k$  L18 아미노산 서열(서열번호 76)과 정렬시킨 것을 보여준다. JK3 생식계열은 서열번호 85에 공지되어 있다.
- <885> 도 17은 47G4(서열번호 10)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_k$  A27 아미노산 서열(서열번호 77)과 정렬시킨 것을 보여준다. JK3 생식계열은 서열번호 85에 공지되어 있다.
- <886> 도 18은 27F3(서열번호 11)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_k$  L18 아미노산 서열(서열번호 76)과 정렬시킨 것을 보여준다. JK2 생식계열은 서열번호 84에 공지되어 있다.
- <887> 도 19는 3C10(서열번호 12)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_k$  L15 아미노산 서열(서열번호 78)과 정렬시킨 것을 보여준다. JK2 생식계열은 서열번호 84에 공지되어 있다.
- <888> 도 20은 5G7(서열번호 13)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_k$  L18 아미노산 서열(서열번호 76)과 정렬시킨 것을 보여준다. JK1 생식계열은 서열번호 86에 공지되어 있다.
- <889> 도 21은 13F1(서열번호 14)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_k$  L18 아미노산 서열(서열번호 76)과 정렬시킨 것을 보여준다. JK2 생식계열은 서열번호 87에 공지되어 있다.
- <890> 도 22는 46E8(서열번호 15)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을, 인간 생식계열  $V_k$  L18 아미노산 서열(서열번호 76)과 정렬시킨 것을 보여준다. JK2 생식계열은 서열번호 87에 공지되어 있다.
- <891> 도 23은 인간 CD19에 대항한 인간 단일클론 항체 47G4가, 특이적으로 인간 CD19에 결합하는 것은 입증한 실험의 결과를 보여주는 그래프이다.
- <892> 도 24A 및 도 24B는 CD19에 대항한 인간 단일클론 항체들이 라지 세포 상에서 결합을 경쟁하는 것을 입증하는 실험의 결과들을 보여주는 그래프들이다.
- <893> 도 25A 부터 도 25D는 인간 CD19에 대항한 인간 단일클론 항체 21D4, 21D4a, 47G4, 3C10, 5G7 및 13F1가 B-세포 종양 세포주의 세포 표면 상에 결합한다는 것을 입증하는 유세포 분석 실험들의 결과를 보여준다. (A) 인간 CD19로 형질감염된 CHO 세포 상에서의 HuMAb들 21D4 및 47G4의 유세포 분석. (B) 다우디 B 종양 세포 상에서의 HuMAb 47G4의 유세포 분석. (C) 라지 B 종양 세포 상에서의 HuMAb들 21D4 및 47G4의 유세포 분석. (D) 라지 B 종양 세포 상에서의 HuMAb들 21D4, 21D4a, 3C10, 5G7 및 13F1의 유세포 분석.
- <894> 도 26A 부터 도 26B는 인간 CD19에 대항한 인간 단일클론 항체 21D4 및 47G4가 3H-티미딘 방출 분석에 의하여 CHO-CD19 및 CD19-발현 라지 B 종양 세포에 들어간다는 것을 입증하는 내재화 실험의 결과를 보여준다. (A)

CHO-CD19 세포로의 HuMAb 47G4 내재화. (B) 라지 B 종양 세포로의 HuMAb들 21D4 및 47G4 내재화.

- <895> 도 27A 및 도 27B는 인간 CD19에 대항한 인간 단일클론 항체가 라지 B 세포 종양 세포를 살해한다는 것을 입증하는 티미딘 혼입 분석의 결과를 보여준다.
- <896> 도 28은 라모스 전신성 모델에서 마우스 생존의 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 플롯을 보여준다.
- <897> 도 29A 내지 도 29B는 라모스 전신성 모델에서 마우스의 체중 변화를 보여준다.
- <898> 도 30A 내지 도 30B는 네이키드 항-CD19 항체 21D4에 의한 치료는 생체내에서 림프종 종양에 대하여 직접적인 억제 효과를 가진다는 것을 입증하는 생체내 마우스 종양 모델 연구의 결과를 보여준다. (A) ARH-77 종양 (B) 라지 종양.
- <899> 도 31은 비푸코실화 인간 단일클론 항-CD19 항체가 ADCC 의존적 방식으로 인간 백혈병 세포에 증가된 세포성 세포독성을 가지는 것을 입증하는 항체 의존적 세포 독성(ADCC)의 결과를 보여준다.
- <900> 도 32는 세포독소-접합성 항-CD19 항체가 종양 부피를 줄인다는 것을 입증하는 생체내 마우스 종양 모델 연구의 결과를 보여준다. 독소 1은 세포독소 N1이고 독소 2는 세포독소 N2이다.
- <901> 도 33은 라지 종양 모델 연구에서 마우스의 체중 변화를 보여준다. 독소 1은 세포독소 N1이고 독소 2는 세포독소 N2이다.
- <902> 도 34는 푸코실화 또는 비푸코실화 항-CD19 HuMAb를 이용한 치료 뒤에 감소된 개체수의 CD20+를 보여주는 시노물구스 원숭이 연구의 결과를 보여준다.
- <903> 도 35는 푸코실화 또는 비푸코실화 항-CD19 HuMAb를 이용한 치료 뒤에 개별 시노물구스 원숭이의 결과를 보여준다.
- <904> 도 36A 내지 도 36C는 인간 CD19 단독 또는 세포독소에 접합한 인간 CD19에 대항한 인간 단일클론 항체가 라지 및 SU-DHL-6 B 세포 종양 세포를 살해한다는 것을 입증하는 티미딘 혼입 분석의 결과를 보여준다.
- <905> 도 37은 피하 이종이식 SCID 마우스 모델에서 종양 형성에 대항하는 면역접합체 항-CD19-N2의 생체내 효능을 보여준다.
- <906> 도 38은 피하 부르키트 림프종 SCID 마우스 모델에서 종양 형성에 대항하는 면역접합체 항-CD19-N2의 생체내 효능을 보여준다.
- <907> 도 39는 전신성 SCID 마우스 모델에서 종양 형성에 대항하는 면역접합체 항-CD19-N2의 생체내 효능을 보여준다.
- <908> 도 40A 는 B 세포(CD20<sup>+</sup>)가 최소의 21D4의 투여 후 용량-의존적 방식으로 감소하거나 0.01 mg/kg에서 격감이 없다는 것을 보여준다. B 세포는 0.1 mg/kg의 투여 후 기준선의 16% 내지 32%로 감소하였다.
- <909> 도 40B는 21D4의 투여 후 B-세포 격감의 크기 및 길이가 0.1 mg/kg의 리툭시맙의 주사의 것과 유사하였다는 것을 설명한다.
- <910> 도 41은 라지 이종이식 SCID 마우스 모델에서 종양 형성에 대항하는 단일 용량의 항-CD19-세포독소 A의 생체내 효능을 보여준다.
- <911> 도 42는 이소타입 대조군을 포함하는, 라지 이종이식 SCID 마우스 모델에서 종양 형성에 대항하는 단일 용량의 항-CD19-세포독소 A의 생체내 효능을 보여준다.
- <912> 도 43은 라모스 이종이식 Es1<sup>c</sup> 누드 마우스 모델에서 종양 형성에 대항하는 단일 용량 및 반복 용량의 항-CD19-세포독소 A의 생체내 효능을 보여준다.
- <913> 도 44는 다우디 이종이식 SCID 마우스 모델에서 종양 형성에 대항하는 단일 용량의 항-CD19-세포독소 A의 생체내 효능을 보여준다.
- <914> 도 45는 SU-DHL6 이종이식 SCID 마우스 모델에서 종양 형성에 대항하는 단일 용량의 항-CD19-N2의 생체내 효능을 보여준다. N2=세포독소 B.
- <915> 도 46은 세포독소 A의 구조이다.
- <916> 본 발명은 다음의 실시예들에 의해 더 자세히 설명될 것이고, 이는 본 발명을 더 제한하는 것으로 해석되어서는

안된다. 본 명세서 전체에서 인용된 모든 도면 및 모든 참조물, 진뱅크 서열, 특허, 및 공개된 특허 출원서는 참조문헌으로서 본 명세서에 명백히 병합된다.

## 도면

### 도면1A

#### 항-CD19 21D4 및 21D4a VH

V 분절: 5-51  
D 분절: 3-10  
J 분절: JH4b

```

1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                         CDR1
                                         ~~~~~~
55     K I S C K G S G Y S F S S S W I G W
      AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT AGC AGC AGC TGG ATC GGC TGG

                                         CDR2
                                         ~~~~~~
109    V R Q M P G K G L E W M G I I Y P D
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GAT

                                         CDR2
                                         ~~~~~~
163    D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGT CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

                                         CDR3
                                         ~~~~~~
217    D K S I R T A Y L Q W S S L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AGG ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                         CDR3
                                         ~~~~~~
271    T A M Y Y C A R H V T M I W G V I I
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAT GTT ACT ATG AIT TGG GGA GTT ATT ATT

                                         CDR3
                                         ~~~~~~
325    D F W G Q G T L V T V S S
      GAC TTC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

도면1B

항-CD19 21D4 VK

V 분절: L18

J 분절: JK2

```

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

                                CDR1
                                ~~~~~
55      V  T  I  T  C  R  A  S  Q  G  I  S  S  A  L  A  W  Y
      GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109     Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  A  S  S  L
      CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
163     E  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T
      GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217     L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
271     F  N  S  Y  P  Y  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K
      TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

도면1C

항-CD19 21D4a VK

V 분절: L18

J 분절: JK3

```

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

                                CDR1
                                ~~~~~
55     V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
      CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
163    E S G V P S R F S G S G S G T D F T
      GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
271    F N S Y P F T F G P G T K V D I K
      TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
  
```



도면2A

항-CD19 47G4 VH

V 분절: 1-69  
D 분절: 6-19  
J 분절: JH5b

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     K V S C K D S G G T F S S Y A I S W
      AAG GTC TCC TGC AAG GAC TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGA CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
                                ~~~~~
163    F G T T N Y A Q Q F Q G R V T I T A
      TTT GGT ACA ACA AAC TAC GCA CAG CAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217    D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGT CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A V Y Y C A R E A V A A D W L D P
      ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA GCA GTA GCT GCG GAC TGG TTA GAC CCC

325    W G Q G T L V T V S S
      TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

도면2B

항-CD19 47G4 VK

V 분절: A27

J 분절: JK3

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

CDR1

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

CDR2

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

CDR2

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

CDR3

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

CDR3

271 Q Y G S S R F T F G P G T K V D I K  
CAG TAT GGT AGC TCA CGA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

도면3A

항-CD19 27F3 VH

V 분절: 5-51  
D 분절: 6-19  
J 분절: JH6b

```

1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55      K I S C K G S G Y S F T S Y W I A W
      AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109     V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
163     D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217     D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271     T A M Y Y C A R Q G Y S S G W D S Y
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAG GGG TAT AGC AGT GGC TGG GAC TCC TAC

                                CDR3
                                ~~~~~
325     Y G M G V W G Q G T T V T V S S
      TAC GGT ATG GGC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면3B

항-CD19 27F3 VK

V 분절: L18  
J 분절: JK2

```

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

                                CDR1
                                ~~~~~
55     V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

                                CDR2
                                ~~~~~
163    E S G V P S R F S G S G S G T D F T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

                                CDR3
                                ~~~~~
271    F N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```

도면4A

항-CD19 3C10 VH

V 분절: 1-69

D 분절: 1-26

J 분절: JH6b

```

1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55      K  V  S  C  K  A  S  G  G  T  F  S  S  Y  T  I  N  W
      AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT ACT ATC AAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109     V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  G  I  I  P  I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATT CCT ATC

                                CDR2
                                ~~~~~
163     F  G  I  P  N  Y  A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  A
      TTT GGT ATA CCI AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGT AGA GTT ACG ATT ACC GCG

217     D  E  S  T  N  T  A  Y  M  E  L  S  S  L  R  A  E  D
      GAC GAA TCC ACG AAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271     T  A  V  Y  Y  C  A  R  A  S  G  G  S  A  D  Y  S  Y
      ACG GCC GTT TAT TAC TGT GCG AGA GCC AGT GGT GGG AGC GCG GAC TAT TCC TAC

                                CDR3
                                ~~~~~
325     G  M  D  V  W  G  Q  G  T  A  V  T  V  S  S
      GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC GCG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```



도면4B

항-CD19 3C10 VK

V 분절: L15

J 분절: JK2

```

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

                                CDR1
                                ~~~~~
55     V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
      CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
163    Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
      CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
271    Y K R Y P Y T F G Q G T K L E I K
      TAT AAG AGA TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

도면5A

항-CD19 5G7 VH

V 분절: 5-51  
D 분절: 3-10  
J 분절: JH6b

```

1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55      N I S C K G S G Y S F T S Y W I G W
      AAC ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109     V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
163     D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

                                CDR2
                                ~~~~~
217     D K S I N T A Y L Q W S S L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AAC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271     T A M Y Y C A R G V S M I W G V I M
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GTT TCT ATG ATT TGG GGA GTT ATT ATG

                                CDR3
                                ~~~~~
325     D V W G Q G T T V I V S S
      GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

도면5B

항-CD19 5G7 VK

V 분절: L18

J 분절: JK1

```

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

                                CDR1
                                ~~~~~
55     V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
      CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
163    E S G V P S R F S G S G S G T D F T
      GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
271    F N S Y P W T F G Q G T K V E I K
      TTT AAT AGT TAC CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

도면6A

항-CD19 13F1 VH

V 분절: 5-51  
D 분절: 6-19  
J 분절: JH6b

```

1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     Q I S C K G S G Y T F T N Y W I A W
      CAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ACC TTT ACC AAC TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
163    D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

                                CDR2
                                ~~~~~
217    D K S I S T A Y L Q W S G L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTA CAG TGG AGC GGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A M Y Y C A R Q G Y S S G W R S Y
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAG GGA TAT AGC AGT GGC TGG CGC TCC TAC

                                CDR3
                                ~~~~~
325    Y G M G V W G Q G T I V I V S S
      TAC GGT ATG GGC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

도면6B

항-CD19 13F1 VK

V 분절: L18  
J 분절: JK2

```

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

                                CDR1
                                ~~~~~
55     V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

                                CDR2
                                ~~~~~
163    E S G V P S R F S G S G S G T D F T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

                                CDR3
                                ~~~~~
271    F N S Y P H T F G Q G T K L E I K
TTT AAT AGT TAC CCT CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```



도면7A

항-CD19 46E8 VH

V 분절: 5-51  
D 분절: 6-19  
J 분절: JH6b

```

1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     Q I S C K G S G Y T F T N Y W I A W
      CAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ACC TTT ACC AAC TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
163    D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

                                CDR2
                                ~~~~~
217    D K S I S T A Y L Q W S G L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTA CAG TGG AGC GGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A M Y Y C A R Q G Y S S G W R S Y
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAG GGA TAT AGC AGT GGC TGG CGC TCC TAC

                                CDR3
                                ~~~~~
325    Y G M G V W G Q G T T V T V S S
      TAC GGT ATG GGC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

도면7B

항-CD19 46E8 VK

V 분절: L18

J 분절: JK2

```

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

                                CDR1
                                ~~~~~
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   A   L   A   W   Y
55  GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
      Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   D   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
      E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
      F   N   S   Y   P   H   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I   K
271 TTT AAT AGT TAC CCT CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

도면8

항-CD19 21D4, 21D4a VH 영역

5-51 생식계열	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	G	W
21D4 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21D4a VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

5-51 생식계열	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	I	I	Y	P	G	D	S	D	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	V	T	I	S	A
21D4 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21D4a VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5-51 생식계열	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R									
21D4 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21D4a VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

JH4b 생식계열	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
21D4 VH	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JH4b)
21D4a VH	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JH4b)

도면9

항-CD19 47G4 VH 영역

1-69 생식계열 47G4 VH	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W - - - - - D - - - - -	CDR1
1-69 생식계열 47G4 VH	V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A - - - - - T - - - - - Q - - - - -	CDR2
1-69 생식계열 JH5b 생식계열 47G4 VH	D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y C A R - - - - - - - - - - E A V A A D - L - -	CDR3
JH5b 생식계열 47G4 VH	W G Q G T L V T V S S - - - - - (JH5b)	

도면10

항-CD19 27F3 VH 영역

5-51 생식계열  
27F3 VH

EVQLVQSGAEVKKPKGESLKISCKGSGYSFTSYWIGW  
- - - - - CDR1 - - - - - A -

5-51 생식계열  
27F3 VH

VRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTTRYSPSFQGVTTISA  
- - - - - CDR2 - - - - -

5-51 생식계열  
JH6b 생식계열  
27F3 VH

DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAR  
- - - - - CDR3 - - - - - QGYSSGWDSS -  
YY

JH6b 생식계열  
27F3 VH

YGMDVWGQGTFTVSS  
- - - - - (JH6b)



도면11

## 항-CD19 3C10 VH 영역

1-69 생식계열	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W	CDR1	- T - N -
3C10 VH	- - - - -		
1-69 생식계열	V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A	CDR2	- - - - -
3C10 VH	- - - - -		- I P - - - - -
1-69 생식계열	D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R	CDR3	- - - - -
JH6b 생식계열	- - - - -		Y Y Y
3C10 VH	- - - - -		- A S G G S A D - S -
JH6b 생식계열	G M D V W G Q G T T V T V S S		
3C10 VH	- - - - -		- A - - - - - (JH6b)

도면12

형-CD19 5G7 VH 영역

5-51 생식계열 5G7 VH	E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G W - - - - - N - - - - - CDR1 - - - - -
5-51 생식계열 5G7 VH	V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A - - - - - CDR2 - - - - -
5-51 생식계열 JH6b 생식계열 5G7 VH	D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R - - - - - N - - - - - CDR3 - - - - - M - - - - - G V S M I W G V I -
JH6b 생식계열 5G7 VH	D V W Q G T T V T V S S - - - - - (JH6b) - - - - -

도면13

항-CD19 13F1 VH 영역

5-51 생식계열 13F1 VH	E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G W - - - - - Q - - - - - T - - - - - A - CDR1
5-51 생식계열 13F1 VH	V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A CDR2
5-51 생식계열 JH6b 생식계열 13F1 VH	D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R Y Y - - - - - G - - - - - Q G Y S S G W R S - CDR3
JH6b 생식계열 13F1 VH	Y G M D V W G Q G T T V T V S S - - - - - G - - - - - (JH6b)

도면14

항-CD19 46E8 VH 영역

5-51 생식계열 46E8 VH	E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G W - - - - - Q - - - - - T - - - - - A - CDR1
5-51 생식계열 46E8 VH	V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A - - - - - CDR2
5-51 생식계열 JH6b 생식계열 46E8 VH	D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R - - - - - G - - - - - Q G Y S S G W R S - CDR3
JH6b 생식계열 46E8 VH	Y G M D V W G Q G T T V T V S S - - - G - - - - - (JH6b) CDR3

도면15

항-CD19 21D4 VK 영역

L18 생식계열  
21D4 VK  
A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S  
CDR1

L18 생식계열  
21D4 VK  
A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F  
CDR2

L18 생식계열  
21D4 VK  
S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y C Q Q F N S  
CDR3

L18 생식계열  
JK2 생식계열  
21D4 VK  
Y P  
Y T F G Q G T K L E I K  
(JK2)

도면16

항-CD19 21D4a VK 영역

L18 생식계열 21D4a VK	A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S	CDR1
L18 생식계열 21D4a VK	A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F	CDR2
L18 생식계열 21D4a VK	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S	CDR3
L18 생식계열 JK3 생식계열 21D4a VK	Y P F T F G P G T K V D I K	(JK3)





도면18

항-CD19 27F3 VK 영역

L18 생식계열  
27F3 VK

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

CDR1

L18 생식계열  
27F3 VK

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

CDR2

L18 생식계열  
27F3 VK

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

CDR3

L18 생식계열  
JK2 생식계열  
27F3 VK

Y P

Y T F G Q G T K L E I K

(JK2)

도면19

항-CD19 3C10 VK 영역

L15 생식계열 3C10 VK	D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S	CDR1
L15 생식계열 3C10 VK	W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F	CDR2
L15 생식계열 3C10 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S	CDR3
L15 생식계열 JK2 생식계열 3C10 VK	Y P Y T F G Q G T K L E I K	(JK2)

도면20

항-CD19 5G7 VK 영역

L18 생식계열 5G7 VK	A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S - - - - - CDR1
L18 생식계열 5G7 VK	A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F - - - - - CDR2
L18 생식계열 5G7 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N N - - - - - CDR3
L18 생식계열 JK1 생식계열 5G7 VK	Y P W T F G Q G T K V E I K - - - - - (JK1)

도면21

항-CD19 13F1 VK 영역

L18 생식계열  
13F1 VK

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

CDR1

L18 생식계열  
13F1 VK

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

CDR2

L18 생식계열  
13F1 VK

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

CDR3

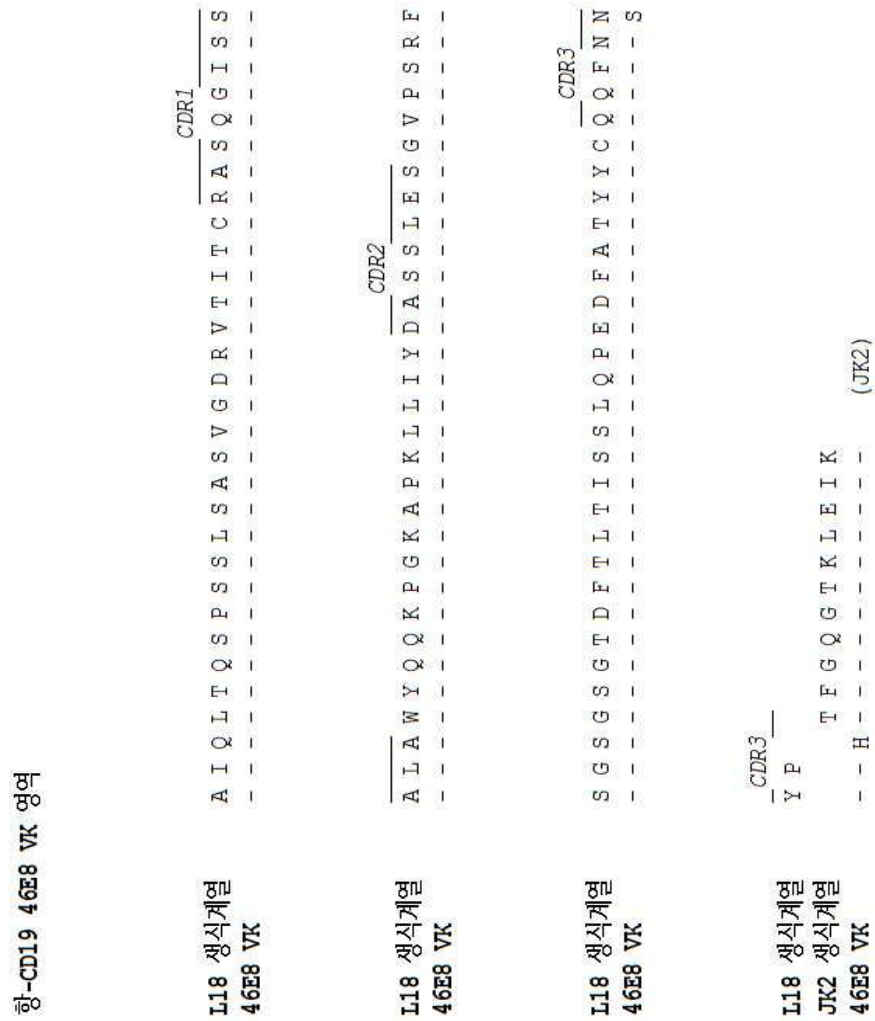
L18 생식계열  
JK2 생식계열  
13F1 VK

Y P

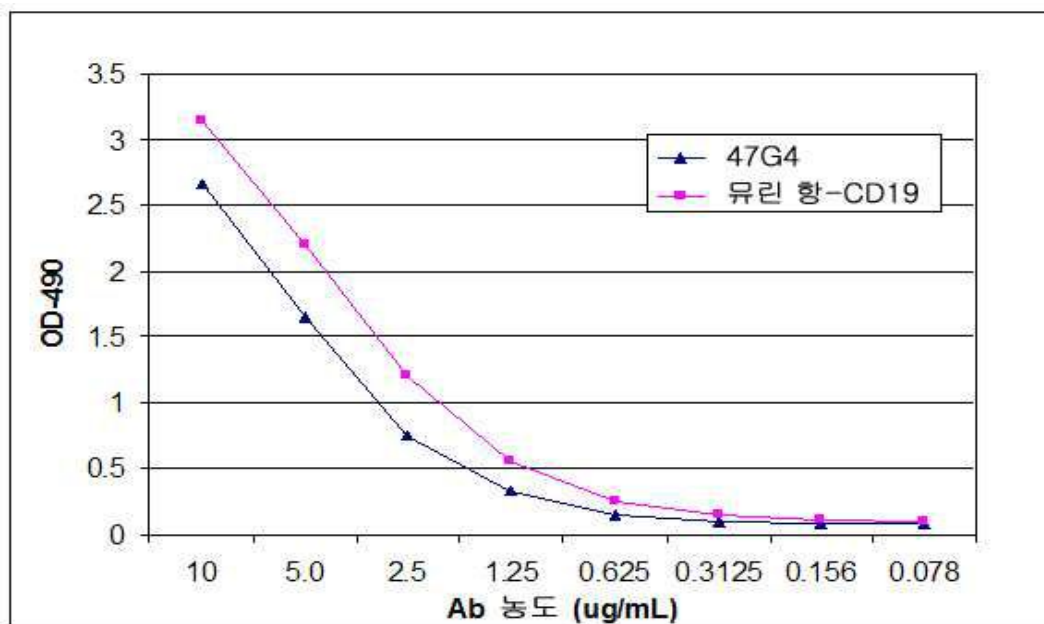
T F G Q G T K L E I K

(JK2)

도면22

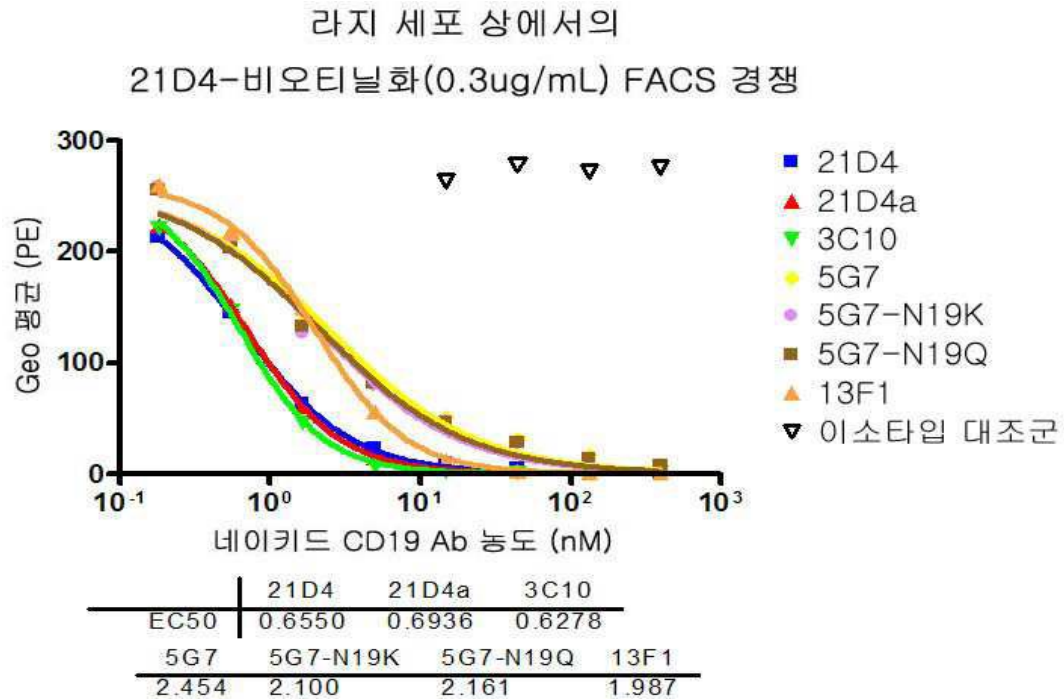


도면23

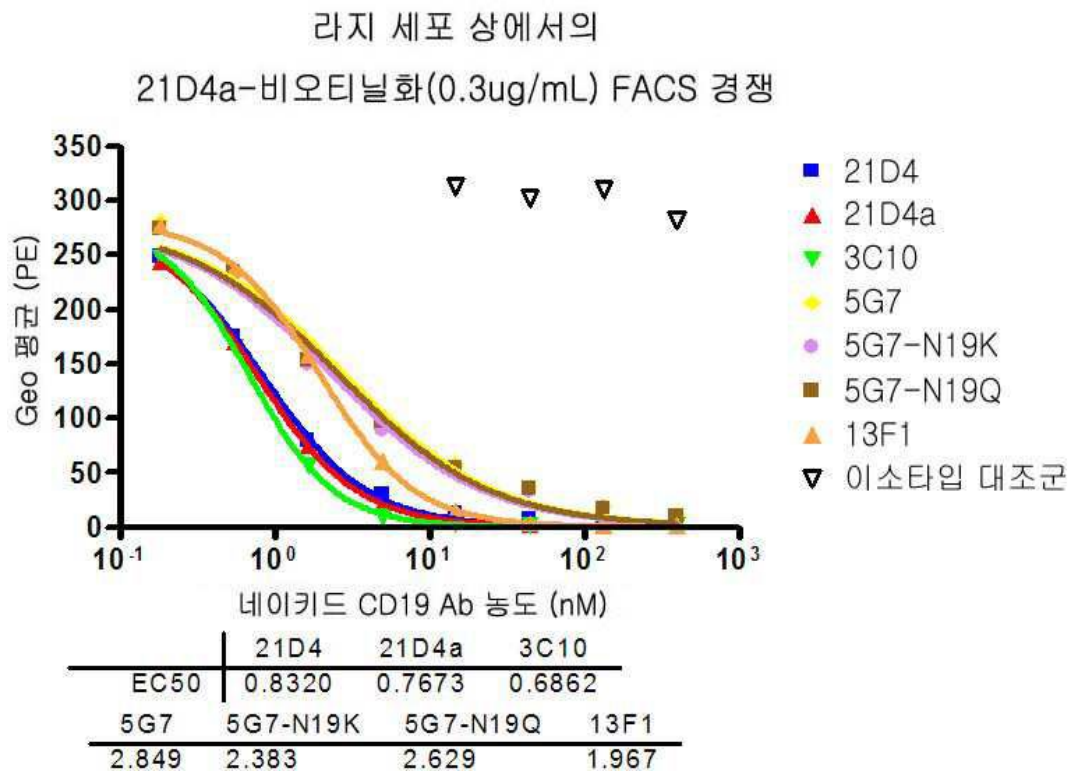




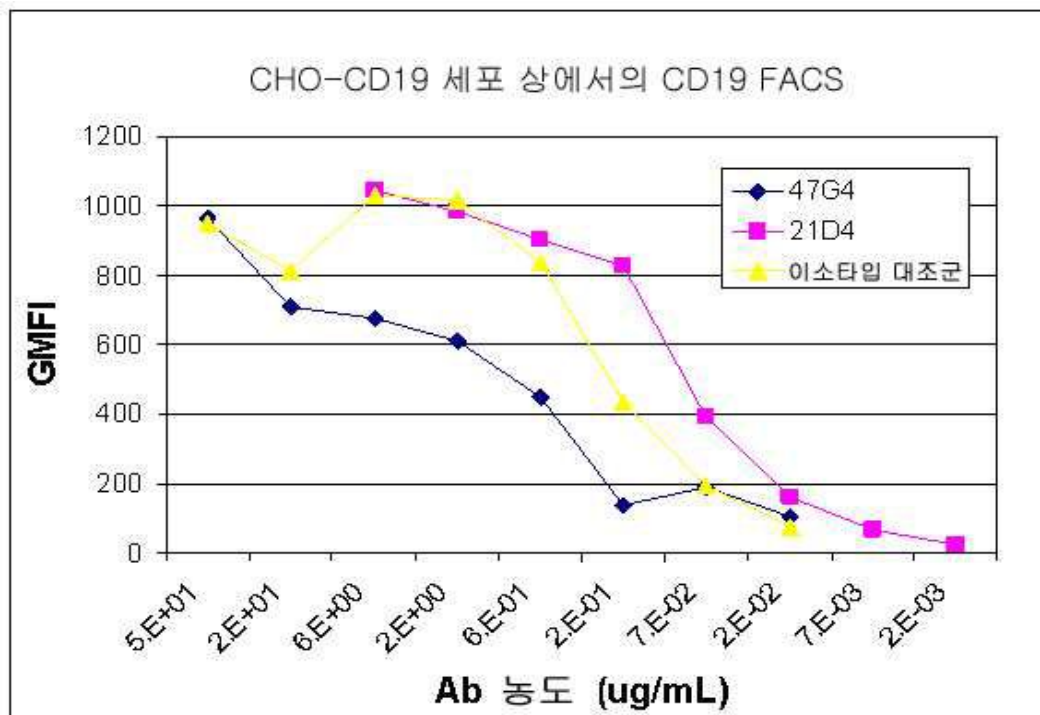
도면24A



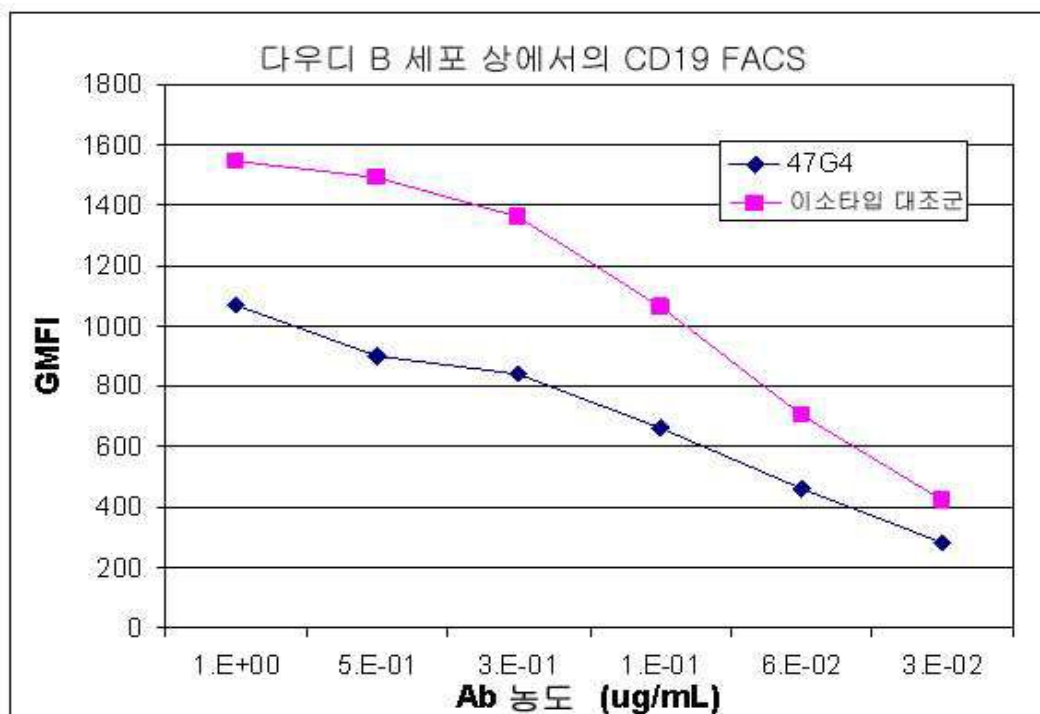
도면24B



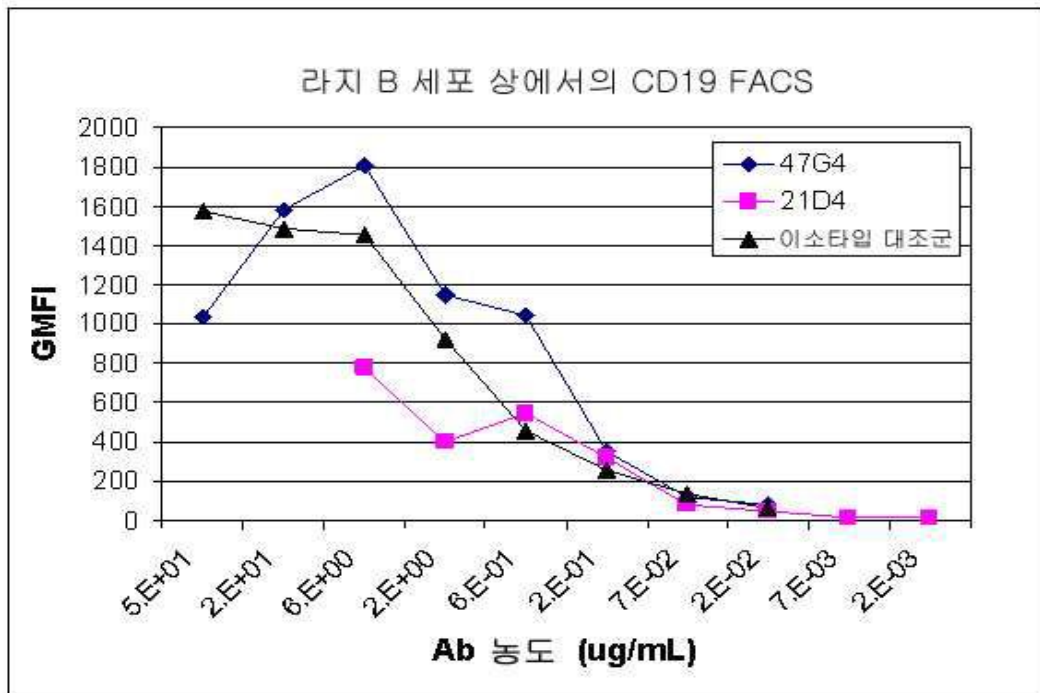
도면25A



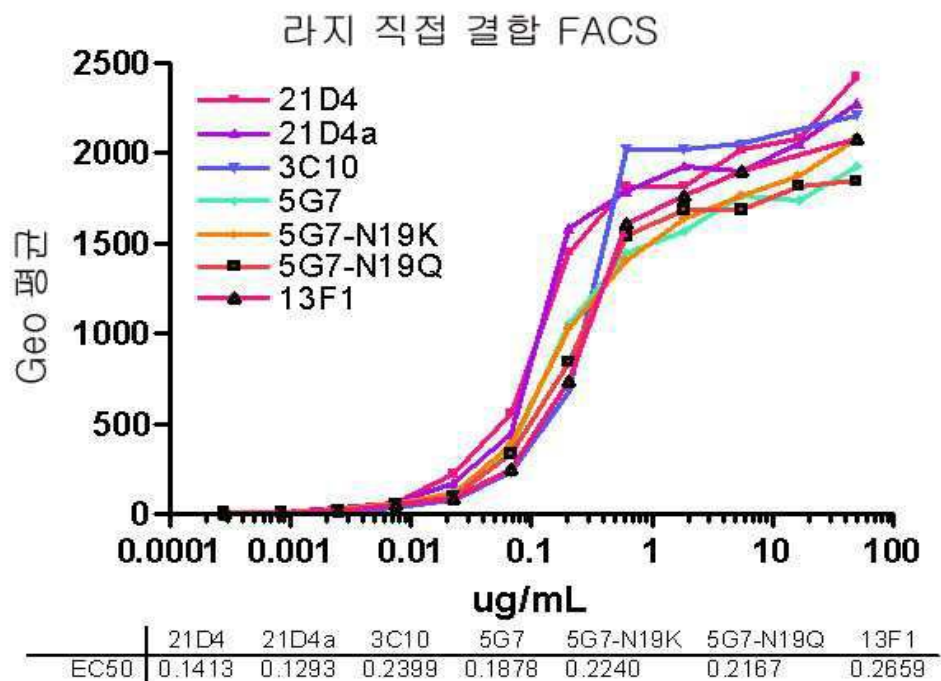
도면25B



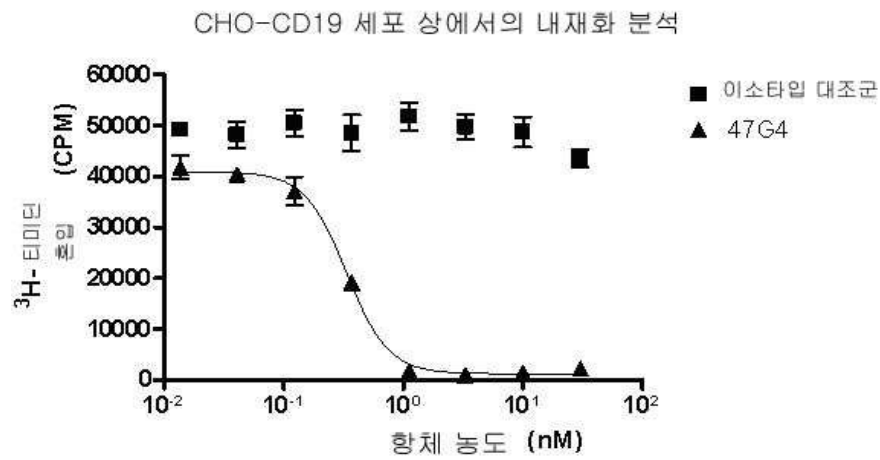
도면25C



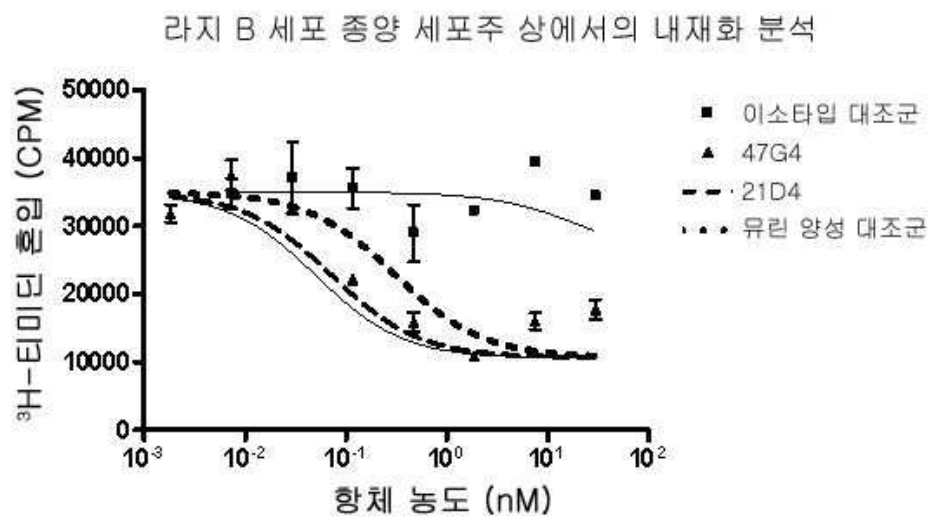
도면25D



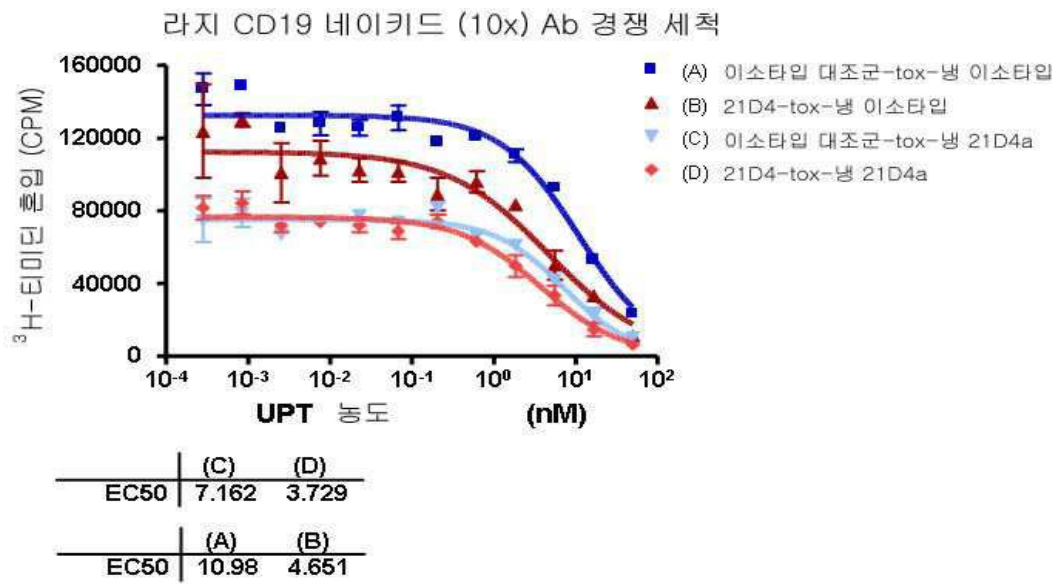
도면26A



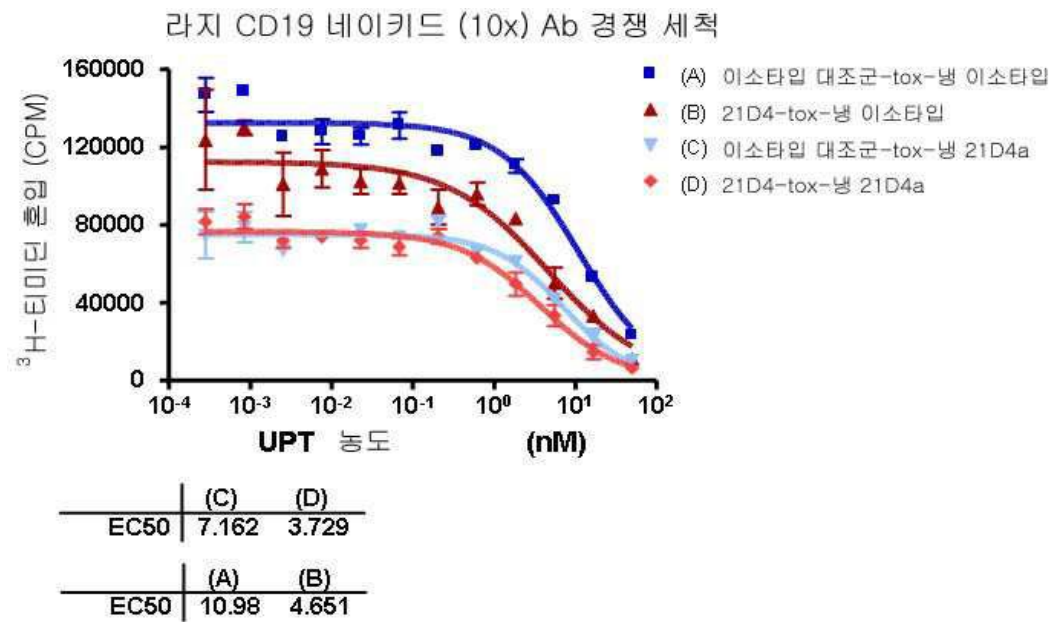
도면26B



도면27A

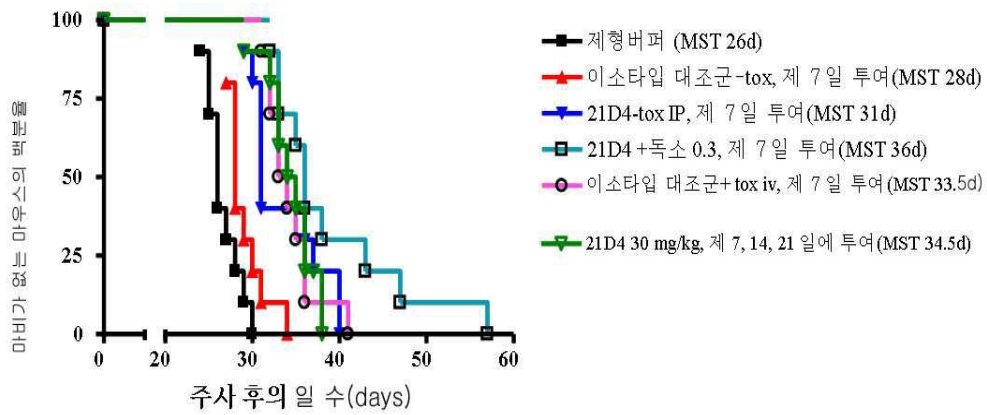


도면27B



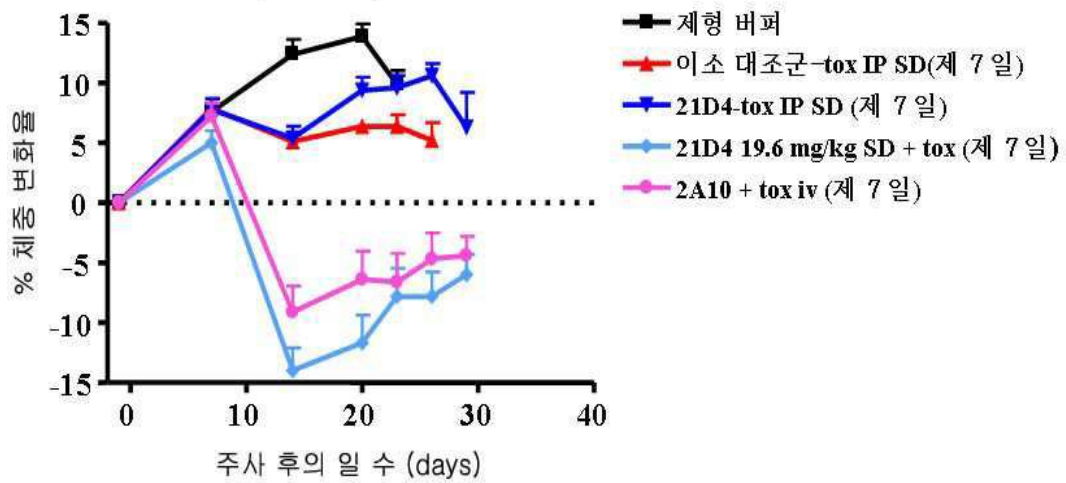
도면28

라모스 전신성 모델 생존 곡선(종말점: 뒷다리 마비)



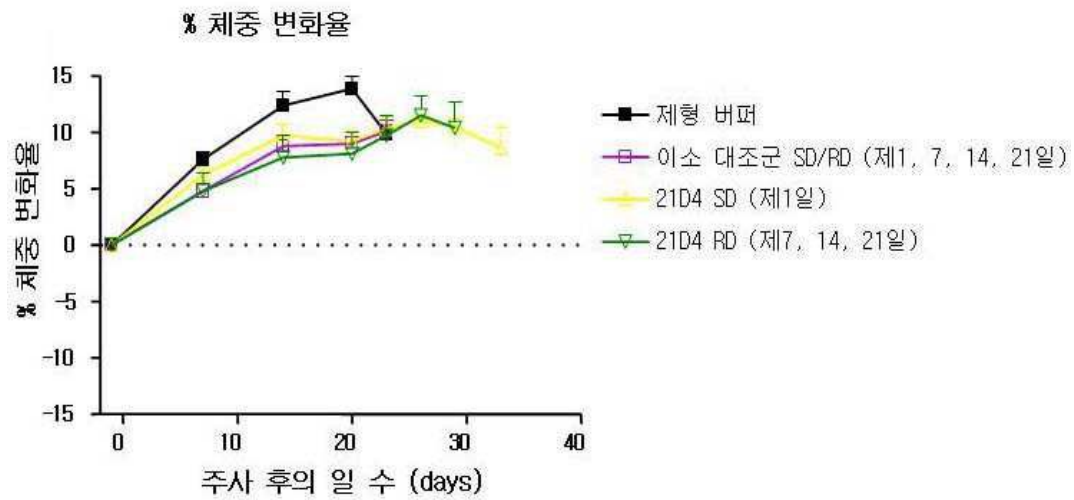
도면29A

% 체중 변화율

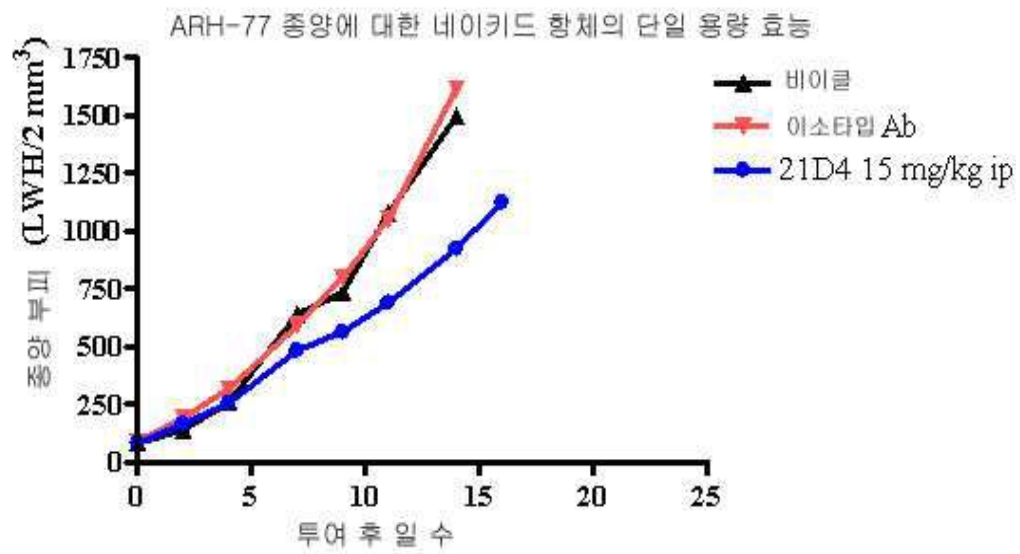




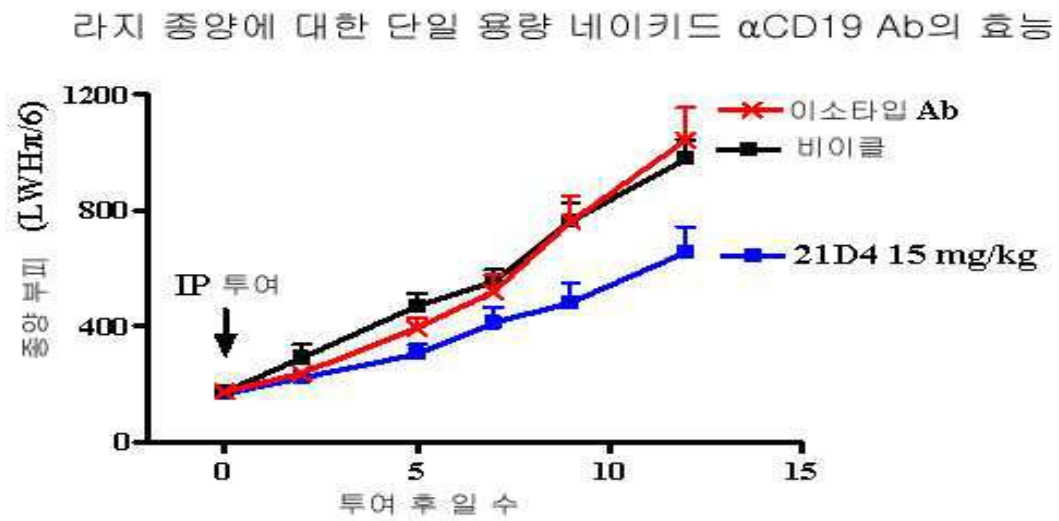
도면29B



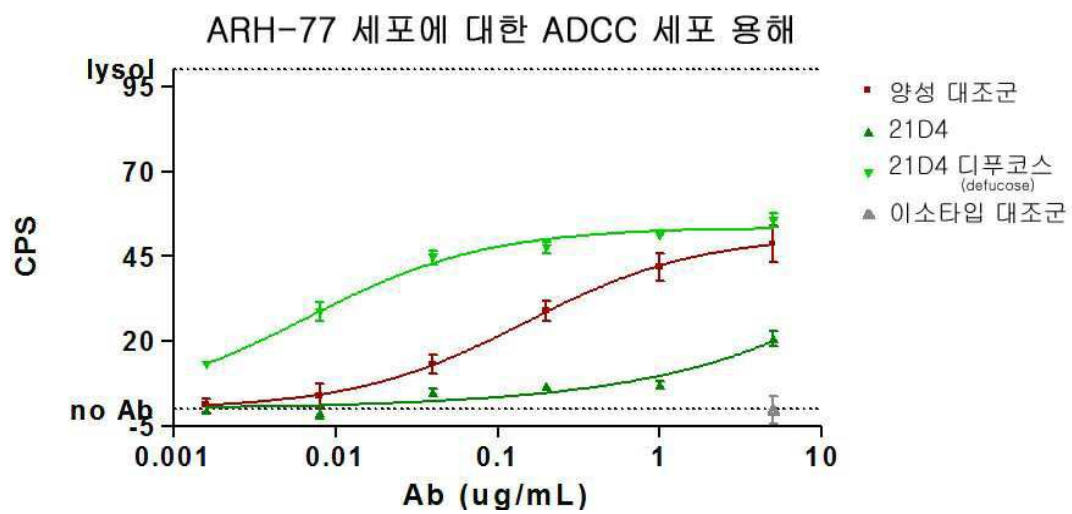
도면30A



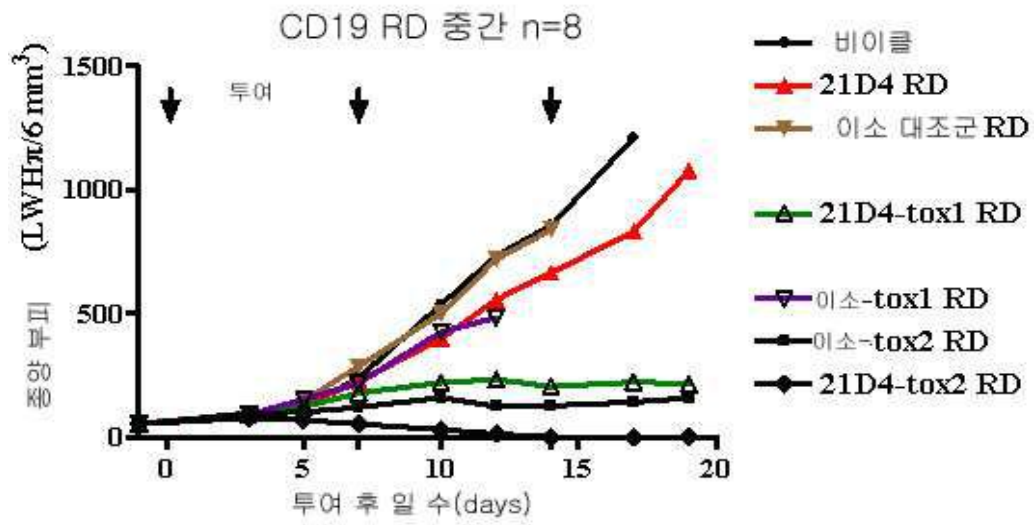
도면30B



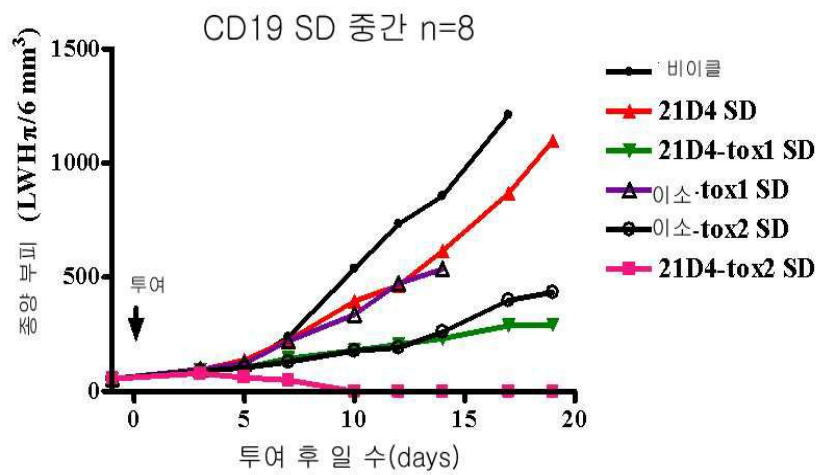
도면31



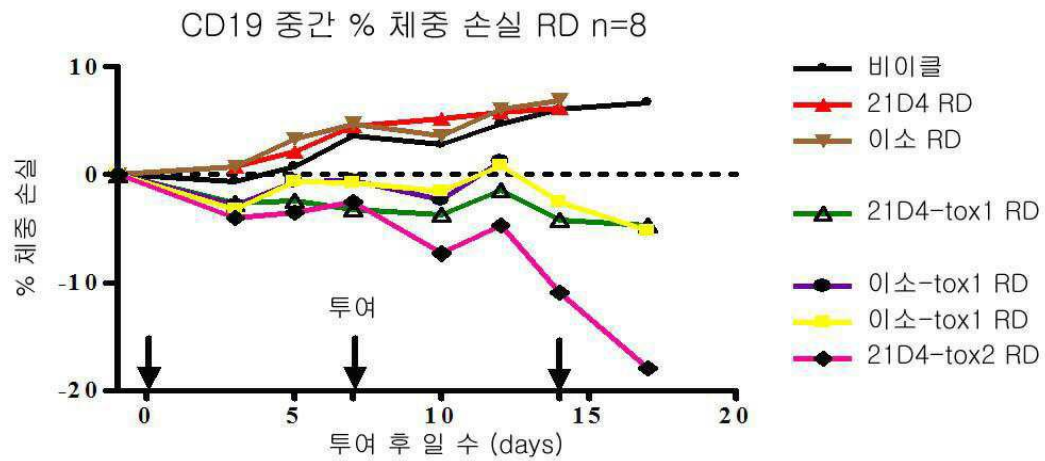
도면32A



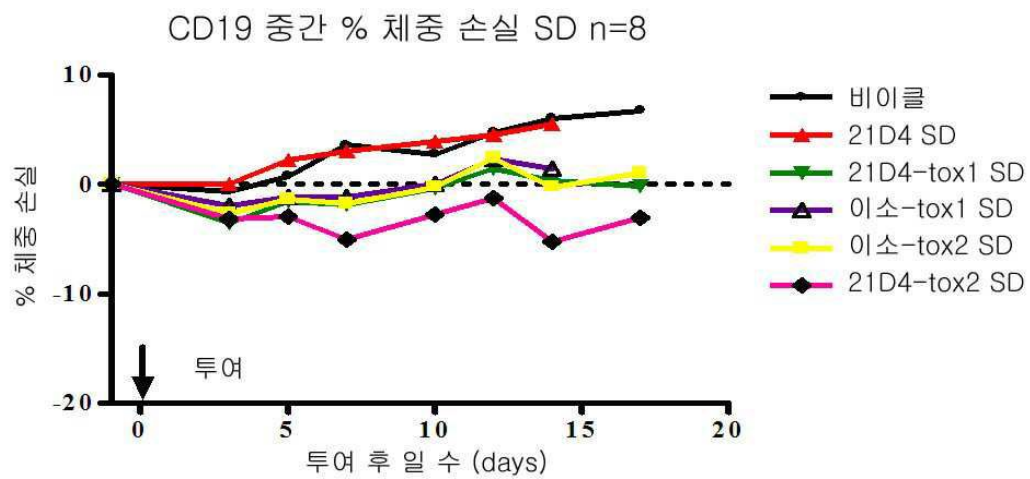
도면32B



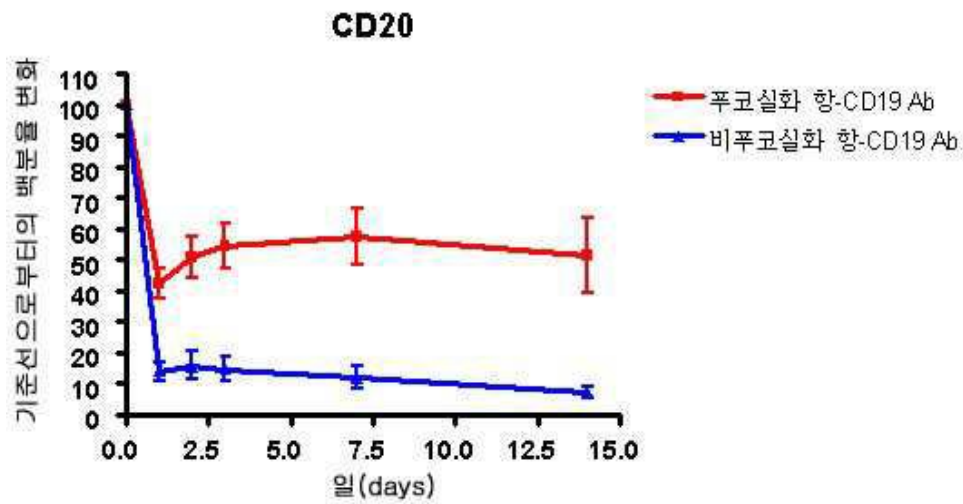
도면33A



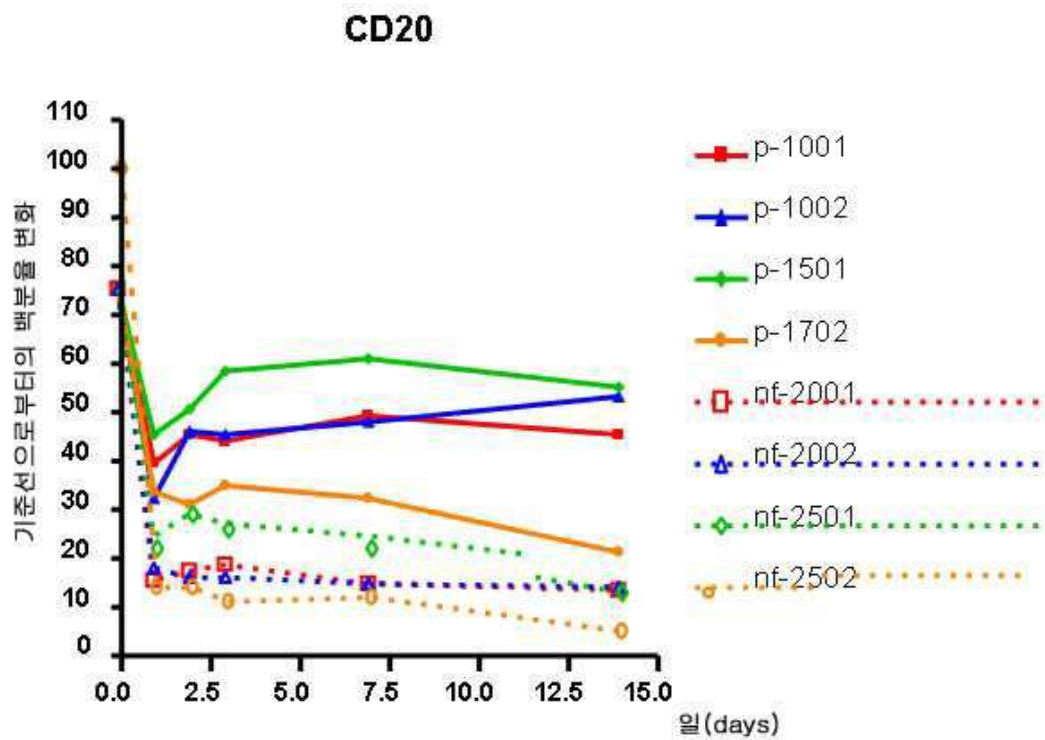
도면33B



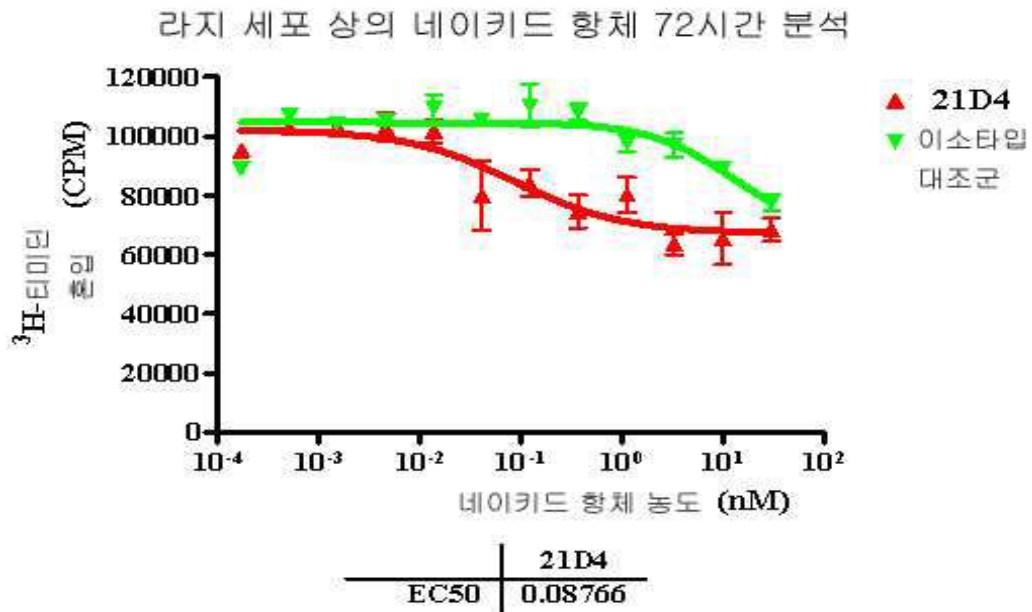
도면34



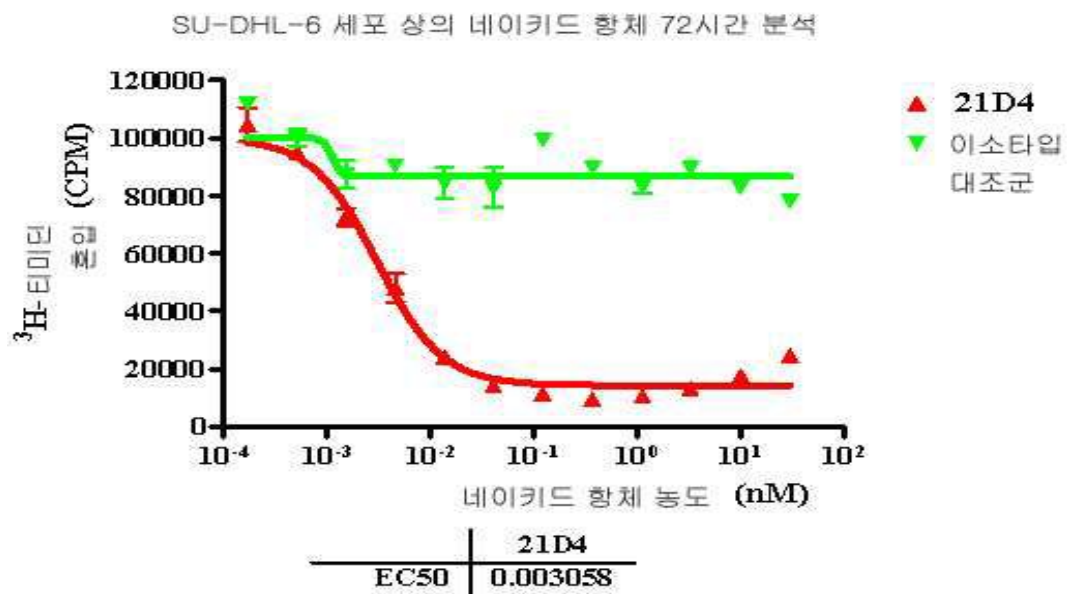
도면35



도면36A

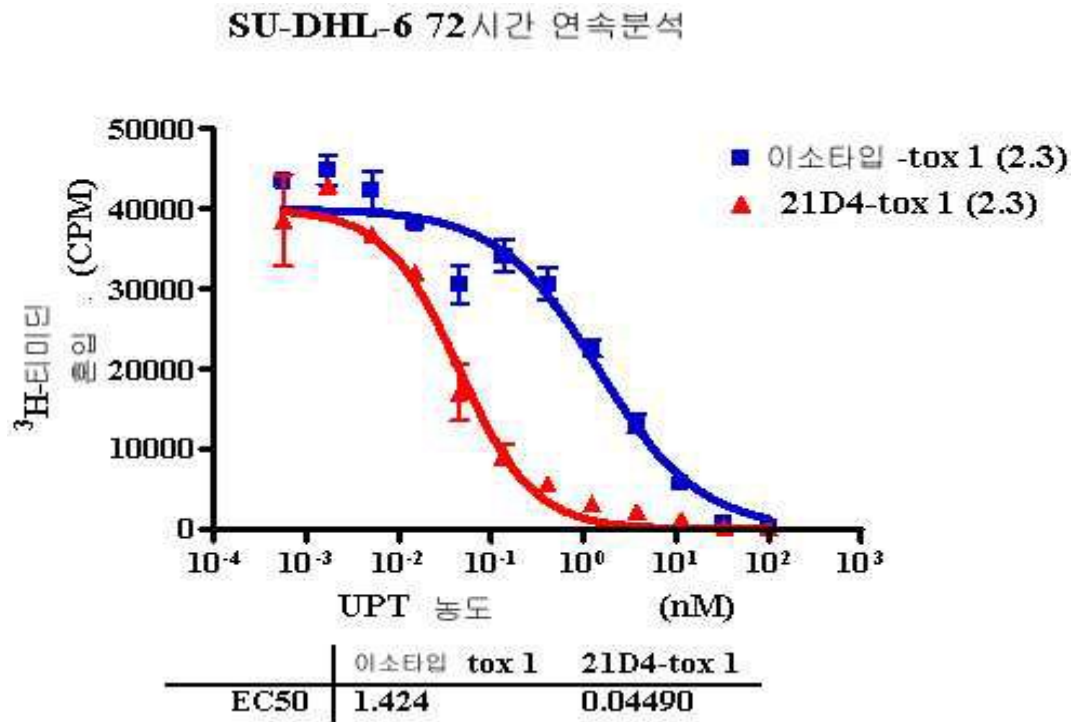


도면36B

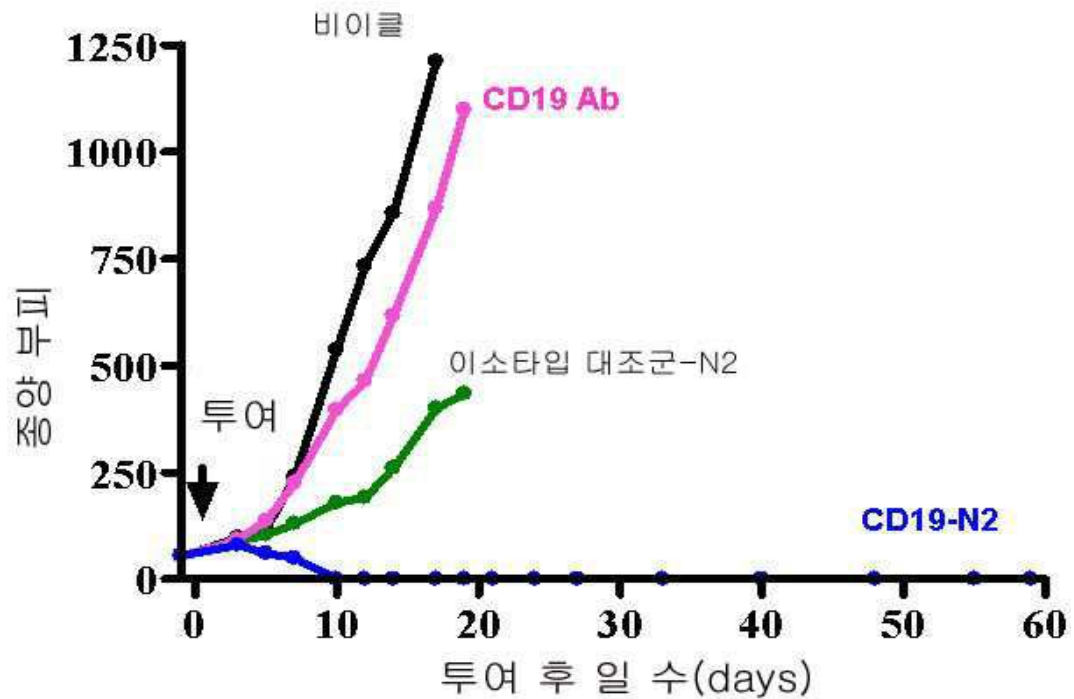




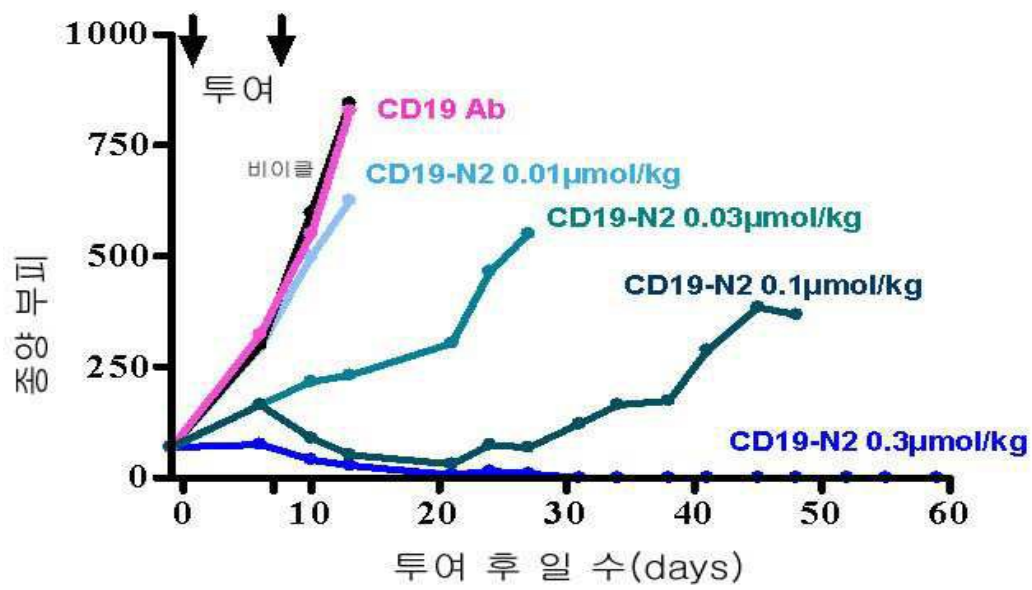
도면36C



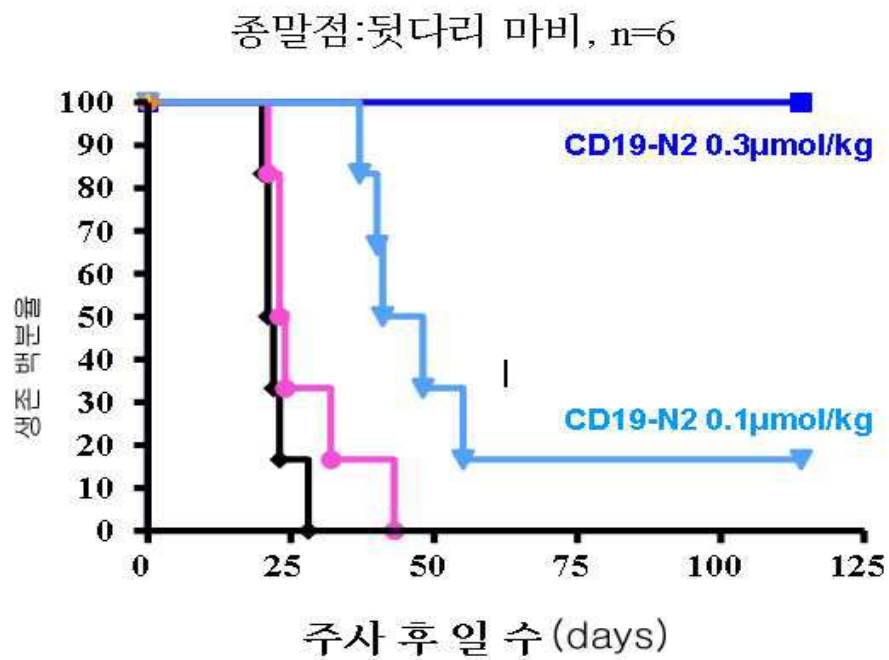
도면37



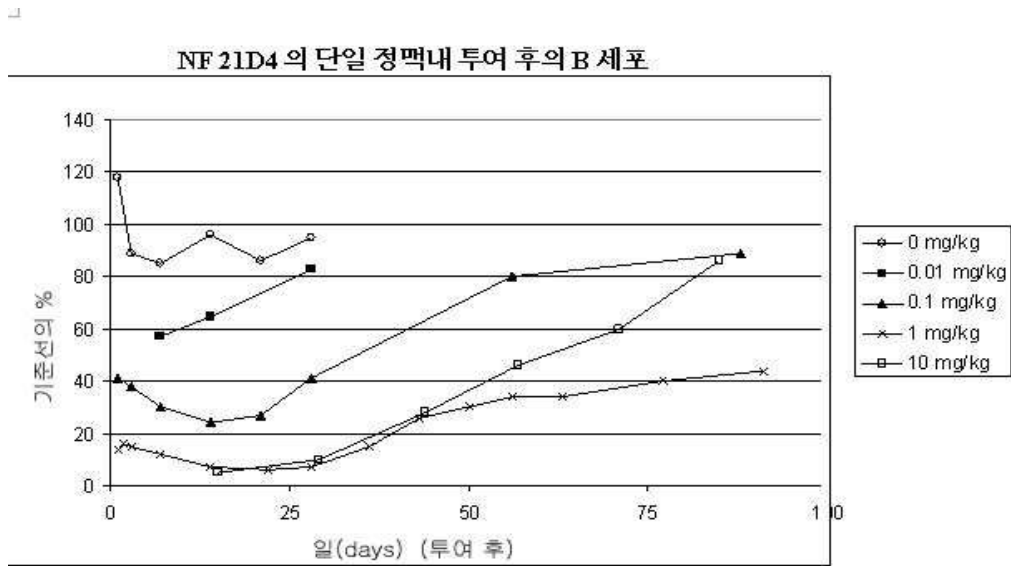
도면38



도면39

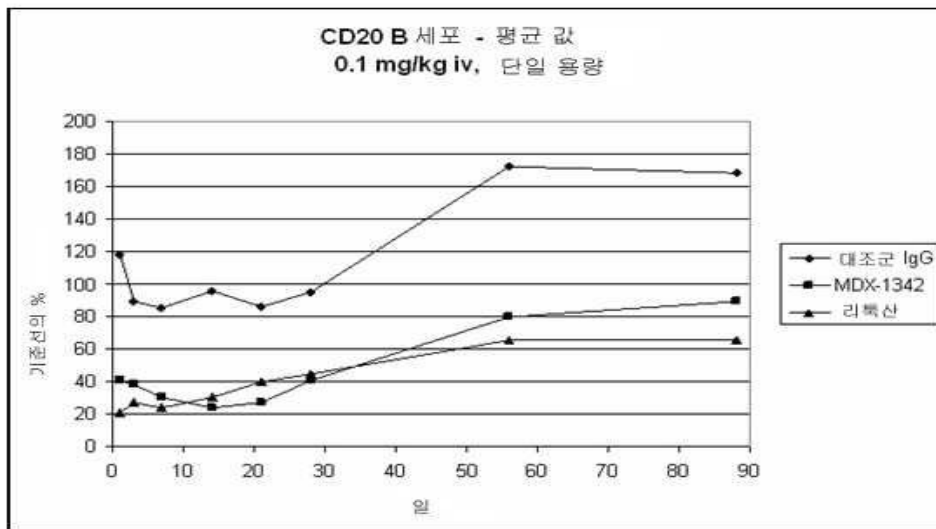


도면40A



도면40B

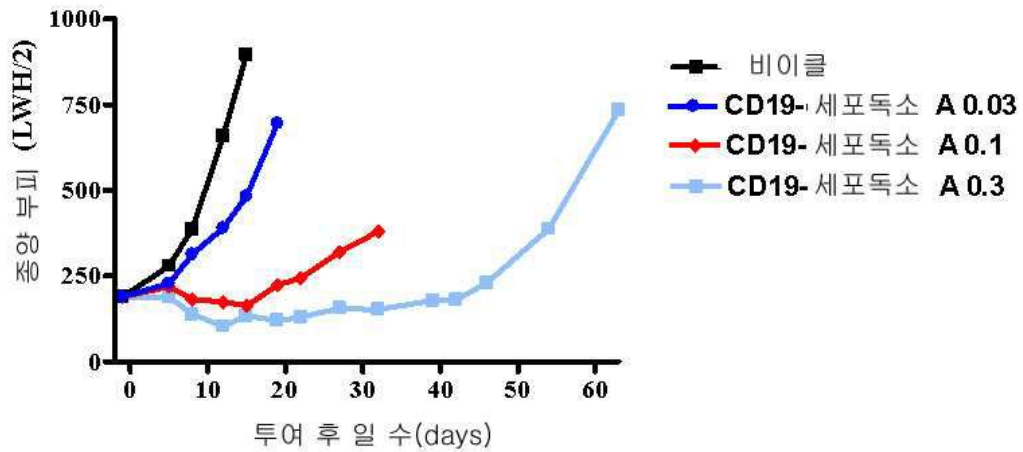
NF 21D4(MDX-1342) 또는 리툭시맙(Rituximab)의 0.1 mg/kg 의 단일 정맥내 투여 후의 B 세포



도면41

SCID 내에 성장된 라지 이중이식물 상의 1416-001 CD19 접합체

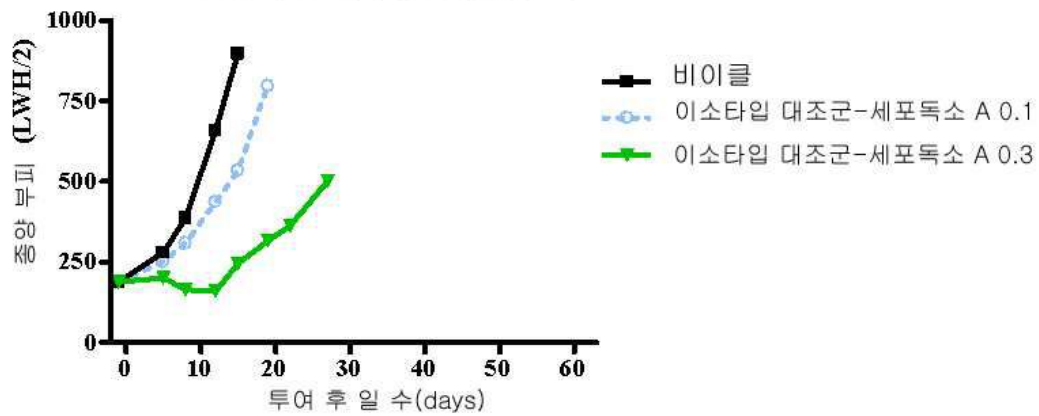
라지 중간 종양 부피



도면42

SCID 내에 성장된 라지 이중이식물 상의 1416-001 CD19 접합체

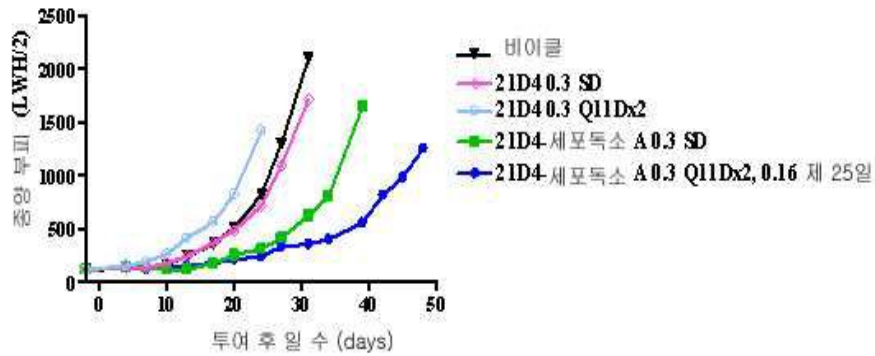
1416-001 라지 중간 종양 부피



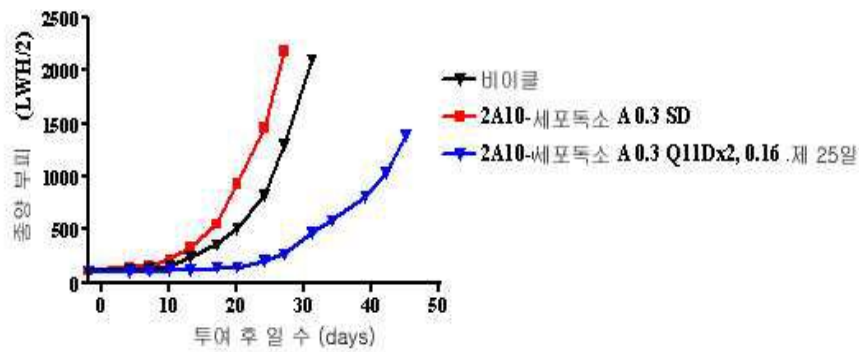
도면43

*Esl<sup>fl</sup>* 누드 마우스 내에 성장된 라모스 이종이식물 상의 1342-036 CD19 접합체  
중간 종양 성장 곡선

1342-036 라모스 *Esl<sup>fl</sup>* 누드 중간 종양 부피



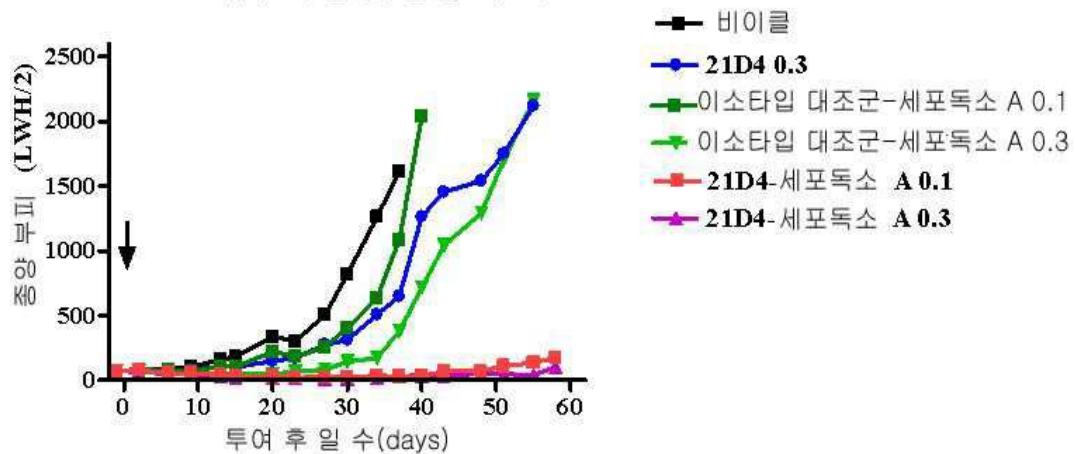
1342-036 라모스 *Esl<sup>fl</sup>* 누드 중간 종양 부피



도면44

1335-005다우디 SC 모델

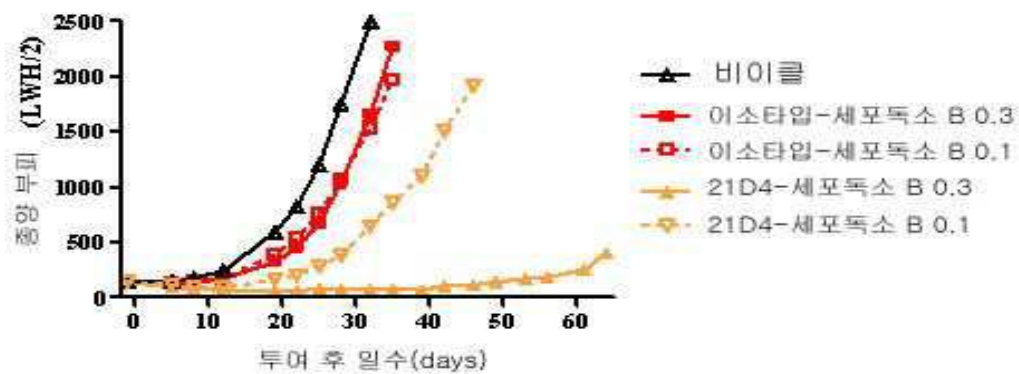
1335-005 다우디 중간 종양 부피



도면45

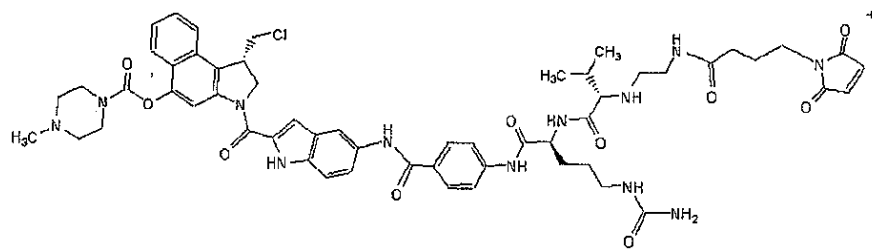
SCID 내에서 성장된 SU-DHL6 이종이식물 상의  
1335-004 CD19-세포독소 B (N2) 접합체

1335-004 DHL-6 중간 종양 성장 곡선



도면46

## 세포독소 A



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

- <110> Medarex Inc.  
King, David J.  
Rao-Naik, Chetana  
Pan, Chin  
Cardarelli, Josephine  
Blanset, Diann
- <120> HUMAN ANTIBODIES THAT BIND CD19 AND USES THEREOF



<130> 077375.0540

<150> US 60/869,904

<151> 2006-12-13

<150> US 60/991,700

<151> 2007-11-30

<160> 102

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Val Thr Met Ile Trp Gly Val Ile Ile Asp Phe Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 2  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Gln Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 3

<211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 4  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

1                      5                      10                      15

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50                      55                      60

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

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

Ala Arg Ala Ser Gly Gly Ser Ala Asp Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Val  
100                      105                      110

Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser  
115                      120

<210> 5  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

35

40

45

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

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

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

Ala Arg Gly Val Ser Met Ile Trp Gly Val Ile Met Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 6  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Arg Ser Tyr Tyr Gly Met Gly  
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 7  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Arg Ser Tyr Tyr Gly Met Gly



100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

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

<210> 9  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

<210> 11  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

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

<210> 12  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Arg Tyr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 13  
<211> 107

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

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

<210> 14  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His  
85 90 95

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

<210> 15  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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



65                      70                      75                      80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His  
                              85                      90                      95

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

<210>	16
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 16

Ser Ser Trp Ile Gly  
1 5

<210>	17
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 17

Ser Tyr Ala Ile Ser  
1 5

<210>	18
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 18

Ser Tyr Trp Ile Ala  
1 5

$\langle 210 \rangle$	19
$\langle 211 \rangle$	5

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Tyr Thr Ile Asn  
1 5

<210> 20  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Tyr Trp Ile Gly  
1 5

<210> 21  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21

Asn Tyr Trp Ile Ala  
1 5

<210> 22  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22

Asn Tyr Trp Ile Ala  
1 5

<210> 23  
<211> 17  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ile	Ile	Tyr	Pro	Asp	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

Gly

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

Gly

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

Gly

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

Gly

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

Gly

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Gly

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

His	Val	Thr	Met	Ile	Trp	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Phe
1				5				10			

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Asp	Trp	Leu	Asp	Pro
1			5				10		

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gln	Gly	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Met	Gly	Val
1				5				10					15	

<210> 33  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Ser Gly Gly Ser Ala Asp Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Val Ser Met Ile Trp Gly Val Ile Met Asp Val  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Arg Ser Tyr Tyr Gly Met Gly Val  
 1 5 10 15

<210> 36  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Arg Ser Tyr Tyr Gly Met Gly Val  
 1 5 10 15

<210> 37  
 <211> 11



<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 37

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 38  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 38

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10		

<210> 39  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 40  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 41  
<211> 11  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr  
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr  
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Gln Tyr Lys Arg Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His Thr  
1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His Thr  
1 5

<210> 59

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60

tcctgtaagg gtcttgata cagcttttagc agcagctgga tcggctgggt gcgccagatg 120

cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg atgactctga taccagatac 180

agtccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag gaccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctggac accgccatgt attactgtgc gagacatgtt 300

actatgatatt ggggagttat tattgacttc tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 360

tca 363

<210> 60

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens



<400> 60  
caggtccagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60  
  
tcctgcaagg actctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120  
  
cctggacaag gacttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac aacaaactac 180  
  
gcacagcagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240  
  
atggagctga gcagtctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaagca 300  
  
gtagctgcgg actggttaga cccctggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 61  
<211> 372  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 61  
gaggtgcagc tggatgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60  
  
tcctgtaagg gtcttgata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120  
  
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180  
  
agcccgctct tccaaggcca ggatccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240  
  
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagacagggg 300  
  
tatagcagtg gctgggactc ctactacggt atgggcgtct ggggccaagg gaccacggtc 360  
  
accgtctct ca 372

<210> 62  
<211> 369  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 62

caggtccagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctcttgagg caccttcagc agctatacta tcaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggagg atcattccta tctttgtat acctaactac 180

gcacagaagt tccagggtag agttacgatt accgcggacg aatccacgaa cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag agctgaggac acggccgttt attactgtgc gagagccagt 300

ggtgggagcg cggactatc ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cgcggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 63  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 63

gaggtgcagc tggatgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaacatc 60

tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120

ccccggaaag gcctggagt gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180

agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcaa caccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgcatgt attactgtgc gagagggtt 300

tctatgattt ggggagttat tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 64  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 64

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgcagatc 60

tcctgtaagg gttctggata cacctttacc aactactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120

cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180

agccccgtcct tccaaggcca ggteaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctacagtgga gcggcctgaa ggcctcggac accgcatgt attactgtgc gagacaggga 300

tatagcagtg gctggcgctc ctactacggt atgggcgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 65  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 65

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgcagatc 60

tcctgtaagg gttctggata cacctttacc aactactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120

cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180

agccccgtcct tccaaggcca ggteaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctacagtgga gcggcctgaa ggcctcggac accgcatgt attactgtgc gagacaggga 300

tatagcagtg gctggcgctc ctactacggt atgggcgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 66  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 66

gccatccagt tgacceagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgcttttag cctggatatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgtacac ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 67  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 67

gccatccagt tgacceagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgcttttag cctggatatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccattcac tttcggccct 300

gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 68  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 68

gaaatttgtg tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggtg ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacgatt cactttcggc 300

cctgggacca aagtggatat caaa 324

<210> 69  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 69  
 gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgcttttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagtcctt gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgtacac ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 70  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 70  
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggttag cctggtatca gcagaaacca 120

gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttacta ctgccaacag tataagagat acccgtacac ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 71  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 71  
 gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtc gggcattagc agtgccttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagtc ctaagtcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgtggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 72  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 72  
 gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtc gggcattagc agtgccttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagtc ctaagtcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcacac ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 73  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 73  
gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtc gggcattagc agtgcttttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcacac ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 74  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74

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

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

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

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



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

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

Ala Arg

<210> 75  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 76  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 76

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

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

<210> 77  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 77

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

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

20 25 30

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

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

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

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

<210> 78  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 78

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

85

90

95

<210> 79  
 <211> 556  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 79

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met  
 1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp  
 20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln  
 35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu  
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile  
 65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu  
 85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr  
 100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp  
 115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro  
 130 135 140

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

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

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala  
355 360 365

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp  
370 375 380

Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly  
385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu  
405 410 415

Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu  
420 425 430

Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly  
435 440 445

Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu  
450 455 460

Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser  
465 470 475 480

Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly  
485 490 495

Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln  
500 505 510

Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala  
515 520 525

Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp  
530 535 540

Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg  
545 550 555

<210> 80  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 80

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 81  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 81

Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10 15

<210> 82  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 82

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 83  
<211> 14  
<212> PRT



<213> Homo sapiens

<400> 83

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
1 5 10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
1                      5                      10

<210> 88

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide linker

<400> 88

Ala Leu Ala Leu  
1

<210> 89

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide linker

<400> 89

Ala Leu Ala Leu  
1

<210> 90

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide linker

<400> 90

Gly Phe Leu Gly  
1

<210> 91  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Peptide linker

<400> 91

Pro Arg Phe Lys  
1

<210> 92  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Peptide linker

<400> 92

Thr Arg Leu Arg  
1

<210> 93  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Peptide linker

<400> 93

Ser Lys Gly Arg

1

<210> 94  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Peptide linker

<400> 94

Pro Asn Asp Lys  
 1

<210> 95  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Peptide linker

<400> 95

Pro Val Gly Leu Ile Gly  
 1 5

<210> 96  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Peptide linker

<400> 96

Gly Pro Leu Gly Val  
 1 5

<210> 97  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Peptide linker

<400> 97

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln  
 1 5

<210> 98  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Peptide linker

<400> 98

Pro Leu Gly Leu  
 1

<210> 99  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Peptide linker

<400> 99

Gly Pro Leu Gly Met Leu Ser Gln  
 1 5

<210> 100  
 <211> 8  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide linker

<400> 100

Gly Pro Leu Gly Leu Trp Ala Gln  
1 5

<210> 101

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide linker

<400> 101

Leu Leu Gly Leu  
1  
35

<210> 102

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide linker

<400> 102

Ala Leu Ala Leu  
1