



등록특허 10-2739664



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월05일

(11) 등록번호 10-2739664

(24) 등록일자 2024년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 47/68* (2017.01) *A61K 51/10* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*A61K 39/395* (2013.01)  
*A61K 47/6851* (2017.08)  
(21) 출원번호 10-2017-7033428  
(22) 출원일자(국제) 2016년04월20일  
심사청구일자 2021년04월14일  
(85) 번역문제출일자 2017년11월17일  
(65) 공개번호 10-2017-0138530  
(43) 공개일자 2017년12월15일  
(86) 국제출원번호 PCT/AU2016/000136  
(87) 국제공개번호 WO 2016/168885  
국제공개일자 2016년10월27일  
(30) 우선권주장  
2015901423 2015년04월20일 오스트레일리아(AU)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020090078360 A\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
미노믹 인터내셔널 리미티드  
오스트레일리아 뉴 싸우스 웨일즈 2113 맥쿼리 파크  
탈라베라 로드 75 그라운드 플로어 스위트 2  
(72) 발명자  
월시 브래들리  
오스트레일리아 뉴 싸우스 웨일즈 2074 터라머라  
머스그레이브 스트리트 5  
캠벨 더글라스  
오스트레일리아 뉴 싸우스 웨일즈 2060 노스 시드니  
키아라 클로즈 1 유닛 26  
위스필러 산드라  
오스트레일리아 뉴 싸우스 웨일즈 2567 커런스 힐  
커런스 힐 드라이브 56  
(74) 대리인  
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 14 항

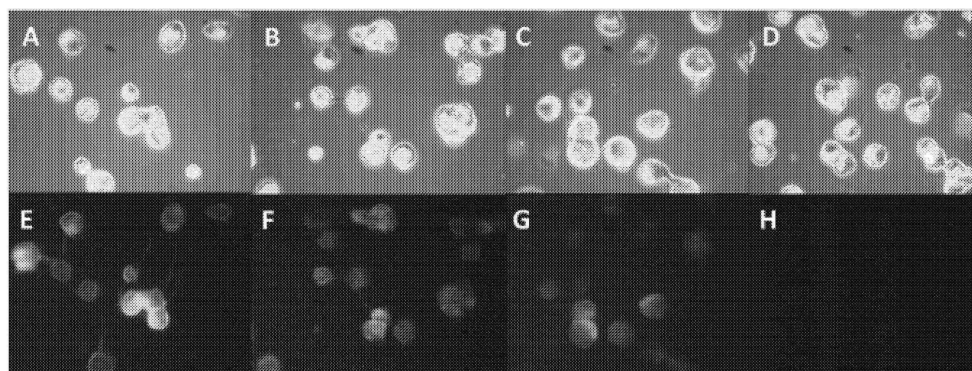
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 치료용 항체 및 이의 용도

### (57) 요약

본 발명은 암을 치료하기 위한 치료용 항체에 관한 것으로, 더욱 구체적으로, 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암을 치료하기 위한 치료용 항체에 관한 것이다.

### 대표도



33A

키메라

세특시맙

1° Ab없음

(52) CPC특허분류

*A61K 51/1045* (2020.05)  
*A61K 51/1057* (2020.05)  
*A61K 51/106* (2020.05)  
*A61K 51/1072* (2020.05)  
*A61K 51/1093* (2020.05)  
*C07K 16/30* (2013.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
*C07K 2317/622* (2013.01)  
*C07K 2317/73* (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02000023109 A1\*  
 Cancer Immunol. Immunother. 53(6):  
 533-542(2004.01.13.)\*  
 EJNMMI Res. 10: 46(2020.05.07. 공개)\*  
 W02005016285 A2  
 W02015106311 A1  
 KR1020150014521 A  
 US20030103980 A1  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

대상의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합(conjugate)된 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 대상에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암을 치료하기 위한 약학적 제제로서,

상기 항체 및/또는 항원-결합 단편이

(a) 서열번호 3의 50 내지 54 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 1 (CDR1);

서열번호 3의 69 내지 85 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 2 (CDR2);

서열번호 3의 118 내지 126 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region); 및

(b) 서열번호 4의 44 내지 54 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 1 (CDR1);

서열번호 4의 70 내지 76 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 2 (CDR2);

서열번호 4의 109 내지 117 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고,

상기 약학적 제제가

서열번호 11의 48 내지 58 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 1 (complementarity determining region, CDR1);

서열번호 11의 74 내지 80 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 2 (CDR2);

서열번호 11의 113 내지 121 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 3 (CDR3);

을 포함하는 경쇄 가변 영역(light chain variable region)을 가지는 항체를 포함하지 않는 것인, 약학적 제제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 항체는 Cellbank Australia에 수탁번호 CBA20140026로 기탁된 하이브리도마 세포 또는 이의 자손에 의해 생산된, 약학적 제제.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 항체는

- (i) 인간화된 항-GPC1 항체,
- (ii) 키메라 항-GPC1 항체,
- (iii) 인간 항-GPC1 항체,
- (iv) 단일클론 항-GPC1 항체,
- (v) 다합체(multimeric) 항-GPC1 항체,

(vi) 합성 항-GPC1 항체, 또는

(vii) 서열번호 7의 138 내지 467의 잔기에 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 불변 영역; 및 서열번호 8의 128 내지 234의 잔기에 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항체인,

약학적 제제.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 항체는

(i) 인간화된 항-GPC1 항체,

(ii) 키메라 항-GPC1 항체,

(iii) 인간 항-GPC1 항체,

(iv) 단일클론 항-GPC1 항체,

(v) 다합체(multimeric) 항-GPC1 항체,

(vi) 합성 항-GPC1 항체, 또는

(vii) 서열번호 7의 138 내지 467의 잔기에 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 불변 영역; 및 서열번호 8의 128 내지 234의 잔기에 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항체인,

약학적 제제.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(single chain variable fragment, scFv), 서열번호 9에 정의된 서열을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv), 가변 도메인(variable domain, Fv) 단편, 단편 항원 결합(fragment antigen binding, Fab) 단편, F(ab)2 단편, 펩타이드 또는 에피토프 결합 부위를 함유하는 단백질 가수 분해 단편인, 약학적 제제.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 제제는

(a) 부신피질 억제제(adrenocortical suppressant), 알킬화제(alkylating agent), 알킬 설포산염(alkyl sulfonate), 안트라사이클린(anthracycline), 항신생혈관계(anti-angiogenic agent), 항생제(antibiotic), 대사 길항 물질(antimetabolite), 유사분열저해제(antimitotic), 오리스타틴(auristatin), 칼리키아마이신(calicheamycin), 캄토테신(camptothecin), 콕스-2 억제제(COX-2 inhibitor), 효소 억제제(enzyme inhibitor), 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 에틸렌이민 유도체(ethylenimine derivative), 엽산 유사체(folic acid analog), HDAC 억제제, 열충격 단백질(heat shock protein) (HSP90) 억제제, 호르몬 길항제(hormone antagonist), 메이탄시노이드(maytansinoid), 메틸 하이드라진 유도체(methyl hydrazine derivative), mTOR 억제제, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아(nitrosourea), 백금 배위결합 복합체(platinum coordination complex), 프로-아폽토시스제(pro-apoptotic agent), 프로테오솜 억제제(proteasome inhibitor), 퓨린 유사체(purine analog), 피리미딘 유사체(pyrimidine analog), 방사성동위원소(radioisotope), 치환된 우레아(substituted urea), 탁산(taxane), 트리아젠(triazene), 튜불린 억제제(tubulin inhibitor), 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor) 및 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid);

(b) 아파티닙(afatinib), 아플리딘(aplidin), 아나스트로졸(anastrozole), 안트라사이클린(anthracyclines), AVL-101, AVL-291, 엑시티닙(axitinib), 아자리빈(azaribine), 벤다무스틴(bendamustine), 블레오마이신(bleomycin), 보테조밋(bortezomib), 보수티닙(bosutinib), 브리오스타틴-1(bryostatatin-1), 부슬판(busulfan), 캄토테신(camptothecins), 카르보플라틴(carboplatin), 칼리키아마이신(calicheamycin), 캄토테신(camptothecin), 카르보플라틴(carboplatin), 카무스틴(carmustine), 셀레코시브(celecoxib), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 클라드리빈(cladribine), COX-2 억제제, 크리조티닙(crizotinib),

시아노-몰폴리노 독소루비신(cyano-morpholino doxorubicin), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 시타라빈(cytarabine), 다카르바진(dacarbazine), 닥티노마이신(dactinomycin), 다사티닙(dasatinib), 다우노루비신(daunorubicin), 다이나시실립(dinaciclib), 3',5'-0-디올레오일(dioleoyl)-FudR (FudR-d0), DM1, DM3, DM4, 도세탁셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 독소루비신 글루쿠로나이드(doxorubicin glucuronide), 듀오카마이신(duocarmycin), 엔도스타틴(endostatin), 엔티노스테트(entinostat), 에피도필로톡신(epidophyllotoxin), 에피루비신 글루쿠로나이드(epirubicin glucuronide), 엘로티닙(erlotinib), 에스트라무스틴(estramustine), 에스트로겐 수용체 결합제(estrogen receptor binding agents), 에토포사이드 글루쿠로나이드(etoposide glucuronide), 에토포사이드 포스페이트(etoposide phosphate), 에토포사이드(etoposide) (VP16), 엑스메스탄(exemestane), 파네실-단백질 트랜스퍼라아제 억제제(farnesyl-protein transferase inhibitors), 핑고리모드(fingolimod), 플라보피리돌(flavopiridol), 플록스우리딘(floxuridine) (FudR), 플루다라빈(fludarabine), 5-플루오로우라실(fluorouracil), 플루타마이드(flutamide), 포스타마티닙(fostamatinib), 가네테스피브(ganetespib), GDC-0834, 제피티닙(gefitinib), 젬시타빈(gemcitabine), GS-1101, 10-하이드록시캄토테신(hydroxycamptothecin), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이브루티닙(ibrutinib), 아이다루비신(idarubicin), 이데랄리십(idelalisib), 아이포스파마이드(ifosfamide), 이마티닙(imatinib), 이리노테칸(irinotecan) (CPT-11), 라파티닙(lapatinib), 레노리다마이드(lenolidamide), 류코보린(leucovorin), LFM-A13, 로무스틴(lomustine), 메클로레타민(mechlorethamine), 멜팔란(melphalan), 머캅토피린(mercaptopurine), 6-머캅토피린(mercaptopurine), 메토티렉세이트(methotrexate), 미스라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 마이토테인(mitotane), 미토산트론(mitoxantrone), 모노메틸우레스타틴(monomethylauristatin) D (MMAD), 모노메틸우레스타틴 E (MMAE), 모노메틸우레스타틴 F (MMAF), 나벨빈(navelbine), 네라티닙(neratinib), 니로티닙(nilotinib), 니트로수우레아(nitrosurea), 올라파립(olaparib), 파클리탁셀(paclitaxel), PCI-32765, 펜토스타틴(pentostatin), 플리코마이신(plicomycin), 2-PDox 프로드러그(pro-drug) (pro-2-PDox), 프로카바진(procarbazine), PSI-341, 2-피롤리노독소루비신(pyrrolinodoxorubicine) (2-PDox), 라록시펜(raloxifene), 세무스틴(semustine), SN-38, 소라페닙(sorafenib), 스트렙토조신(streptozocin), SU1 1248, 수니티닙(sunitinib), 타목시펜(tamoxifen), 테마졸로마이드(temazolomide), 테니포사이드(teniposide), 탈리도마이드(thalidomide), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 토포테칸(topotecan), 트랜스플레티늄(transplatinum), 우라실 머스타드(uracil mustard), 바타라닙(vatalanib), 빈플라스틴(vinblastine), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 빈크리스틴(vincristine), 비노렐빈(vinorelbine) 및 ZD 1839로 이루어진 군으로부터 선택되는,

약학적 제제.

## 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 제제는

(a) 방사성동위원소;

(b)  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ , 및  $^{89}\text{Zr}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 방사성동위원소인,

약학적 제제.

## 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 대상은 포유동물 대상 또는 인간 대상인, 약학적 제제.

## 청구항 9

전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 나타내는 하나 이상의 세포독성 제제와 결합된 제 1 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체들 및/또는 이의 항원 결합 단편들을 포함하는 분리된 항체 집단으로서,

상기 제 1 항-GPC1 항체들은

(a) 서열번호 3의 50 내지 54 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 1 (CDR1);

서열번호 3의 69 내지 85 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 2 (CDR2);

서열번호 3의 118 내지 126 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열번호 4의 44 내지 54 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 1 (CDR1);

서열번호 4의 70 내지 76 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 2 (CDR2);

서열번호 4의 109 내지 117 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

상기 항체 집단은

서열번호 11의 48 내지 58 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 1 (CDR1);

서열번호 11의 74 내지 80 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 2 (CDR2);

서열번호 11의 113 내지 121 위치로 정의된 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 제 2 항체들을 함유하지 않는,

항체 집단.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 제 1 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체들 및/또는 이의 항원 결합 단편들은

(a) 서열번호 7의 138 내지 467의 잔기에 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 불변 영역; 및

(b) 서열번호 8의 128 내지 234의 잔기에 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 불변 영역;

을 포함하는 단일클론 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 다합체 항체, 합성 항체 및/또는 키메라 항체 중 어느 하나 이상인, 항체 집단.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, 항원 결합 단편들은 단쇄 가변 단편(scFv), 서열번호 9에 정의된 서열을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv), 가변 도메인(Fv) 단편, 단편 항원 결합(Fab) 단편, F(ab)<sub>2</sub> 단편, 펩타이드 또는 에피토프 결합 부위를 함유하는 단백질 가수 분해 단편 중 어느 하나 이상인, 항체 집단.

#### 청구항 12

제9항에 있어서, 제 1 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체들은 서열번호 3의 20 내지 461 위치로 정의된 중쇄 서열 및 서열번호 4의 21 내지 234 위치로 정의된 경쇄 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 항체 집단.

#### 청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 제제는

(a) 부신피질 억제제(adrenocortical suppressant), 알킬화제(alkylating agent), 알킬 설포산염(alkyl sulfonate), 안트라사이클린(anthracycline), 항신생혈관제(anti-angiogenic agent), 항생제(antibiotic), 대사 길항 물질(antimetabolite), 유사분열저해제(antimitotic), 오리스타틴(auristatin), 칼리키아마이신(calicheamycin), 캄토테신(camptothecin), 콕스-2 억제제(COX-2 inhibitor), 효소 억제제(enzyme inhibitor), 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 에틸렌이민 유도체(ethylenimine derivative), 엽산 유사체(folic acid analog), HDAC 억제제, 열충격 단백질(heat shock protein) (HSP90) 억제제, 호르몬 길항제(hormone antagonist), 메이탄시노이드(maytansinoid), 메틸 하이드라진 유도체(methyl hydrazine derivative), mTOR 억

제제, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아(nitrosourea), 백금 배위결합 복합체(platinum coordination complex), 프로-아폽토시스제(pro-apoptotic agent), 프로테오솜 억제제(proteasome inhibitor), 퓨린 유사체(purine analog), 피리미딘 유사체(pyrimidine analog), 방사성동위원소(radioisotope), 치환된 우레아(substituted urea), 택산(taxane), 트리아젠(triazene), 튜불린 억제제(tubulin inhibitor), 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor) 및 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid);

(b) 아파티닙(afatinib), 아플리딘(aplidin), 아나스트로졸(anastrozole), 안트라사이클린(anthracyclines), AVL-101, AVL-291, 엑시티닙(axitinib), 아자리빈(azaribine), 벤다무스틴(bendamustine), 블레오마이신(bleomycin), 보테조밋(bortezomib), 보수티닙(bosutinib), 브리오스타틴-1(bryostatatin-1), 부슬판(busulfan), 캄토테신(camptothecins), 카르보플라틴(carboplatin), 칼리키아마이신(calicheamycin), 캄토테신(camptothecin), 카르보플라틴(carboplatin), 카무스틴(carmustine), 세레코시브(celecoxib), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 클라드리빈(cladribine), COX-2 억제제, 크리조티닙(crizotinib), 시아노-몰폴리노 독소루비신(cyano-morpholino doxorubicin), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 시타라빈(cytarabine), 다카르바진(dacarbazine), 닥티노마이신(dactinomycin), 다사티닙(dasatinib), 다우노루비신(daunorubicin), 다이나시실립(dinaciclib), 3',5'-O-디올레오일(dioleoyl)-FudR (FudR-d0), DM1, DM3, DM4, 도세탁셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 독소루비신 글루쿠로나이드(doxorubicin glucuronide), 듀오카마이신(duocarmycin), 엔도스타틴(endostatin), 엔티노스테트(entinostat), 에피도필로톡신(epidophyllotoxin), 에피루비신 글루쿠로나이드(epirubicin glucuronide), 엘로티닙(erlotinib), 에스트라무스틴(estramustine), 에스트로젠 수용체 결합제(estrogen receptor binding agents), 에토포사이드 글루쿠로나이드(etoposide glucuronide), 에토포사이드 포스페이트(etoposide phosphate), 에토포사이드(etoposide) (VP16), 엑스메스탄(exemestane), 파네실-단백질 트랜스퍼라아제 억제제(farnesyl-protein transferase inhibitors), 핑고리모드(fingolimod), 플라보피리돌(flavopiridol), 플록스우리딘(floxuridine) (FUDr), 플루다라빈(fludarabine), 5-플루오로우라실(fluorouracil), 플루타마이드(flutamide), 포스타마티닙(fostamatinib), 가네테스피브(ganetespib), GDC-0834, 제피티닙(gefitinib), 젬시타빈(gemcitabine), GS-1101, 10-하이드록시캄토테신(hydroxycamptothecin), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이브루티닙(ibrutinib), 아이다루비신(idarubicin), 이데랄리시브(idelalisib), 아이포스파마이드(ifosfamide), 이마티닙(imatinib), 이리노테칸(irinotecan) (CPT-11), 라파티닙(lapatinib), 레노리다마이드(lenolidamide), 류코보린(leucovorin), LFM-A13, 로무스틴(lomustine), 메클로레타민(mechlorethamine), 멜팔란(melphalan), 머캅토피린(mercaptopurine), 6-머캅토피린(mercaptopurine), 메토크세이트(methotrexate), 미스라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 마이토테인(mitotane), 미토산트론(mitoxantrone), 모노메틸우레스타틴(monomethylauristatin) D (MMAD), 모노메틸우레스타틴 E (MMAE), 모노메틸우레스타틴 F (MMAF), 나벨빈(navelbine), 네라티닙(neratinib), 니로티닙(nilotinib), 니트로소우레아(nitrosourea), 올라파립(olaparib), 파클리탁셀(paclitaxel), PCI-32765, 펜토스타틴(pentostatin), 플리코마이신(plicomycin), 2-PDox 프로드러그(pro-drug) (pro-2-PDox), 프로카바진(procarbazine), PSI-341, 2-피롤리노독소루비신(pyrrolinodoxorubicine) (2-PDox), 라록시펜(raloxifene), 세무스틴(semustine), SN-38, 소라페닙(sorafenib), 스트렙토조신(streptozocin), SU1 1248, 수니티닙(sunitinib), 타목시펜(tamoxifen), 테마졸로마이드(temazolomide), 테니포사이드(teniposide), 탈리도마이드(thalidomide), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 토포테칸(topotecan), 트랜스플레티늄(transplatinum), 우라실 머스타드(uracil mustard), 바타라닙(vatalanib), 빈플라스틴(vinblastine), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 빈크리스틴(vincristine), 비노렐빈(vinorelbine) 및 ZD 1839로 이루어진 군으로부터 선택되는,

항체 집단.

#### 청구항 14

제9항 내지 제12항 중 어느 한 상에 있어서, 세포독성 제제는

(a) 방사성동위원소;

(b)  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ , 및  $^{89}\text{Zr}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 방사성동위원소인,

항체 집단.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제



## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 교차-참조에 의한 통합

[0002] 본 출원은 모든 내용이 교차-참조로서 본 발명에 포함되는, 2015년 4월 20일에 출원된 호주 가출원번호 2015901423에 기반하여 우선권을 주장한다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 전반적으로 전립선암, 췌장암 및/또는 방광암 분야에 대한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 전립선암, 췌장암 및/또는 방광암의 치료를 위한 항체의 용도에 대한 것이다.

### 배경 기술

[0005] 전립선암은 남성에게서 가장 흔히 발생하는 종양이며, 폐암에 이어 두 번째로 사망률이 높다. 전립선암이 조기에 진단되면, 수술 및/또는 방사선 치료를 통한 치료가 많은 환자들에게서 성공적이다. 그러나, 질병이 진행된 많은 환자들 및 전체 전립선암 환자들의 상당수가 국소적인 치료 후에 결국 전이성 질환으로 진행된다.

[0006] 방광암은 미국에서 매년 거의 77,000명의 성인에게 영향을 미치는 것으로 예상되며, 사망자는 16,000명으로 추정된다. 2016년에 미국의 비슷한 수의 환자가 췌장암으로 진단될 것으로 예상되며 (53,000), 매우 높은 사망률 (41,000)을 나타낼 것으로 예상된다. 상기 암들에 대한 일반적인 치료는 수술적 제거, 방사선 치료(radiation therapy) 및/또는 화학요법(chemotherapy)을 포함한다.

[0007] 효과적인 암 치료제로서의 가능성에도 불구하고 전립선암, 췌장암 또는 방광암의 치료를 위해 규제 승인된 치료용 항체는 없다. 미국 특허 5,622,836에서 워커 등 (Walker *et al.*)은 BLCA-38 (BLCA - "bladder cancer")로 명명한 항체에 대해 기재하였다. 이 문서에서는 BLCA-38이 방광암 세포에서 발현되는 미지의 항원에 특이적인 단일클론 항체임을 교시한다. 또한, BLCA-38은 인간의 난소암 및 결장암 세포주뿐만 아니라, 일부 흑색종 세포주에 대해서도 특이성을 나타내나, 림프성 (T 림프구 또는 B 림프구) 및 백혈병 세포주에서는 특이성을 나타내지 않는 것으로 나타났다.

[0008] 그 후, Russell 등 (2004) (Russell *et al.*, "Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: in vitro & in vivo studies". Cancer Immunol Immunother 2004; 53(5): 411-421)은 BLCA-38를 사용하여 세포 독성 펩타이드를 전립선 암으로 표적화하는데 사용한 연구를 발표했다. 저자들은 BLCA-38가 인간 방광암 세포주 UCRU-BL-17CL 에 대해 생성된 무린(murine) 단일클론 항체임을 제시하였다.

[0009] 2014년에 Russell 등에 의해 추가로 발표된 문헌 (Russell *et al.*, "Immunohistochemical characterization of the monoclonal antibody, BLCA38, for the detection of prostate cancer". Cancer Immunol Immunother 2004; 53(11) 995-1004)에서 또한 BLCA-38이 인간 방광암 세포주에 대해 생성된 무린 단일클론 항체이며, 방광암 세포, 전립선암 세포 및 외음부 표피 세포(vulval epidermoid cells)에 결합할 수 있지만, 유방암 세포에는 결합할 수 없음을 교시한다. 이 문헌은 BLCA-38이 약 30 kDa 크기의 특정하거나 동정하기 어려운 항원에 특이적이라는 것을 나타낸다.

[0010] Carter 등 (2004) (Carter *et al.*, "Biodistributions of intact monoclonal antibodies and fragments of BLCA38, a new prostate cancer directed antibody". Cancer Immunol Immunother 2004; 53(6) 533-542)은 BLCA-38을 사용하여 전립선암 세포주에 치료제를 표적화하기 위한 시기 및 투여량(dosage)을 분석하였고, 또한 세포 표면과 세포질에서 발현되는 약 30kDa의 항원을 표적으로하는 무린 단일클론 항체임을 나타냈다. 저자들은 항원의 성질을 밝히는 것이 어렵다고 명시하였고, 방광암 및 전립선암 세포에서 발현된다는 것을 밝혔다.

[0011] 2010년에 발표된 Khatri 등의 문헌 (Khatri *et al.*, "Promise of BLCA38 as a Targeting Antibody for Tissue-Specific Gene Delivery to prostate cancer". Austral-Asian J. Cancer 2010; 9(3): 195-203)에서 BLCA-38이 전립선암 세포에 특이적인 무린 단일클론 항체임을 재확인하였다. 저자들은 BLCA-38이 그의 항원과 결합할 때 내재화(internalised)되지는 않지만, 바이러스와의 접합(conjugate)은 항체의 내재화를 촉진하여 리포터 유전자의 발현을 증가시키는 것을 밝혔다.

[0012] 많은 암 치료가 암 및 건강한 세포 모두를 손상시킬 수 있는 것과 달리, 표적 암 치료는 치료받는 환자의 건강한 세포 및 조직은 피하면서 선택적으로 종양 세포를 공격하도록 설계되었다. 예를 들어, 표적 항체 약물 복합체 (antibody-drug conjugates, ADCs)는 암세포에 의해 특이적으로 생산된 마커에 특이적으로 결합함으로써 세포독성 제제(cytotoxic agent)를 암세포에 선택적으로 전달한다. 상기 약제들이 적재한 독소를 암세포에 전달하고 건강한 조직의 손상을 피하는 능력은 당연히 중요하다. 게다가, 암세포와 특이적으로 결합할 때의 ADC의 내재화는 ADC가 내재화되지 않을 때와는 대조적으로 그의 세포독성 효과를 향상시킬 수 있다. 내재화는 ADC가 세포 소포 (예, 엔도솜 및 리소솜)로 흡수될 때 그의 효과를 향상시킬 수 있도록 조절할 수 있다. 또한, 적어도 어느 정도는 다른 종류의 암세포들에서 엔도조말/리소조말(endosomal/lysosomal) 처리 경로의 차이에서 발생할 수 있다는 관찰인 효과적인 세포 사멸을 ADC의 내재화가 반드시 유도하지는 않는다는 것이 주목할만하다.

[0013] 치료용 항체는 임상적으로 유효한 투여량의 수배(multiple) 이상의 상당량의 생성물 (예, 용량 당 200-350 mg/m<sup>2</sup>)을 필요로 할 수 있다. ADC의 치료 용량(therapeutic dose)은 종종 네이키드(naked) 치료용 단일클론 항체 (TMAs)보다 미미하게 적을 수 있다 (예, 용량 당 160 mg). 그러나, ADC 구조는 생산 흐름을 복잡하게 하고 제조 비용을 크게 높일 수 있는 화학적 접합 단계와 같은 추가적인 기술들을 포함한다. 따라서, 가능하면 낮은 비용으로 치료적 용량의 ADC를 제공하는 것이 바람직하다.

[0014] 항체가 치료제로서 제공된다는 가능성에도 불구하고, 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암을 치료하기 위한 효과적인 치료용 항체가 지속적으로 요구되고 있다.

## 발명의 내용

[0015] 발명의 개요

[0016] 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 상기 선행기술에서 언급되고 사용된 BLCA-38 항체가 혼합 집단에서 구별되는 두 개의 단일클론항체의 조합임을 밝혔다. 이들 항체 종들(antibody species) 중 오직 한 종만이 전립선암 세포상에 존재하는 관련 표적 항원에 강력하게 결합할 수 있으나, 두 번째 종은 결합할 수 없는 것으로 밝혀졌다. 또한, 상기에서 언급된 선행 문헌에서 이와 반대로 나타난 것에도 불구하고, 예상과 달리 항체 종들이 전립선암 세포에 존재하는 관련 표적 항원에 결합할 수 있고, 그렇게 하면 내재화된다는 것이 발견되었다. 또한, 본 발명자들은 전립선암, 방광암 및 췌장암 세포들에서의 효과적인 내재화가 이들 암 세포 종류를 표적화 및 사멸시키는 수단을 제공한다는 것을 밝혔다.

[0017] 따라서, 제 1측면에서, 본 발명은 항-글리피칸-1(anti-glypican-1) (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기에서, 항체 및/또는 단편은 개체의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합(conjugate)된다.

[0018] 제 2 측면에서, 본 발명은 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포를 사멸하는 방법을 제공하며, 상기에서 항체 및/또는 단편은 항체 및/또는 단편은 개체의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된다.

[0019] 제 3 측면에서, 본 발명은 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 종양을 치료하는 방법을 제공하며, 상기에서 항체 및/또는 단편은 항체 및/또는 단편은 종양의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된다.

[0020] 제 4 측면에서, 본 발명은 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암을 개체에서 치료하기 위한 의약 제제(preparation of a medicament)로서의 용도를 제공하며, 상기 항체 및/또는 단편은 개체의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된다.

[0021] 제 5 측면에서, 본 발명은 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포를 개체에서 사멸시키기 위한 의약 제제로서의 용도를 제공하며, 상기 항체 및/또는 단편은 개체의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된다.

[0022] 제 6 측면에서, 본 발명은 발명은 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편의 전립선암, 방

광암 및/또는 췌장암 종양을 개체에서 치료하기 위한 의약 제제로서의 용도를 제공하며, 상기 항체 및/또는 단편은 개체의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된다.

[0023] 제 7 측면에서, 본 발명은 개체에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암을 치료하는데 사용하기 위한 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체 및/또는 단편은 개체의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된다.

[0024] 제 8 측면에서, 본 발명은 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포를 개체에서 사멸시키는데 사용하기 위한 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체 및/또는 단편은 개체의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된다.

[0025] 제 9 측면에서, 본 발명은 개체에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 종양을 치료하는데 사용하기 위한 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체 및/또는 단편은 개체의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된다.

[0026] 제 10 측면에서, 본 발명은:

[0027] 하나 이상의 방사성영상화제(radioimaging agent)와 접합된 항-글리피칸-1 (항-GPC1) 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하고,

[0028] 방사성영상화제에 의해 방출된 방사선을 검출하며, 및

[0029] 검출된 방사선을 전립선, 방광 및/또는 췌장의 방사성영상을 형성하는데 이용하는 것을 포함하는 개체에서의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암의 방사성영상화(radioimaging) 방법을 제공한다.

[0030] 제 10 측면의 일 구현예에서, 개체의 전립선은 전립선 비대증(benign prostatic hyperplasia, BPH)인 것을 특징으로 한다.

[0031] 제 10 측면의 일 구현예에서, 개체의 전립선, 방광 및/또는 췌장은 암성(cancerous)이다. 제 10 측면의 일 구현예에서, 개체는 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암으로 고통받는다.

[0032] 제 10 측면의 일 구현예에서, 방사성영상화제는  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{81}\text{mKr}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{99}\text{mTc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{32}\text{P}$  및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0033] 제 10 측면의 일 구현예에서, 방사성영상화는 단일광자방사형컴퓨터단층촬영(single-photon emission computed tomography) (SPECT)이고, 방사성영상화제는  $^{99}\text{mTc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{123}\text{I}$  및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0034] 제 10 측면의 일 구현예에서, 방사성영상화는 양전자방출단층촬영(positron emission tomography) (PET)이며, 방사성영상화제는  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0035] 상기 측면의 일 구현예에서, 약학적 조성물은 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지는 항체를 포함하지 않는다:

[0036] 서열번호 11의 48 내지 58 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 1 (CDR1);

[0037] 서열번호 11의 74 내지 80 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 2 (CDR2);

[0038] 서열번호 11의 113 내지 121 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 3 (CDR3).

[0039] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는 상기 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포의 엔도솜 또는 리소솜으로 흡수될 때 활성화되도록 설계된 프로드러그이다.

[0040] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 프로드러그는:

[0041] pH 7.2, pH 7.0, pH 6.5, pH 6.0, pH 5.5, pH 5.0, pH 4.5 또는 pH 4 미만의 pH에서 절단되기 쉬운 산 민감성-링커;

- [0042] 링커를 절단할 수 있는 효소가 엔도좀 또는 리소좀 내에 존재하는 효소-절단가능한 링커에 의해 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편에 접합된다.
- [0043] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편에 접합된 킬레이트제와 결합함으로써 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편과 연결된다.
- [0044] 상기 측면의 추가 구현예에서, 항체는:
- [0045] (a) **서열번호 3**의 50 내지 54 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 1 (CDR1);
- [0046] **서열번호 3**의 69 내지 85 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 2 (CDR2);
- [0047] **서열번호 3**의 118 내지 126 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 중쇄 가변영역(heavy chain variable region); 및
- [0048] (b) **서열번호 4**의 44 내지 54 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 1 (CDR1);
- [0049] **서열번호 4**의 70 내지 76 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 2 (CDR2);
- [0050] **서열번호 4**의 109 내지 117 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 경쇄 가변영역(light chain variable region)을 포함한다.
- [0051] 상기 측면의 한 구현예에서, 항체는 Cellbank Australia에 수탁번호(accession number) CBA20140026로 기탁된 하이브리도마 세포 또는 이의 자손에 의해 생산된다.
- [0052] 상기 측면의 추가 구현예에서, 항체는:
- [0053] (i) 인간화된 항-GPC1 항체,
- [0054] (ii) 키메라 항-GPC1 항체,
- [0055] (i) 인간 항-GPC1 항체,
- [0056] (ii) 단일클론 항-GPC1 항체,
- [0057] (iii) 다합체(multimeric) 항-GPC1 항체, 또는
- [0058] (iv) 합성 항-GPC1 항체인 방법.
- [0059] 상기 측면의 일 구현예에서, 항체는:
- [0060] (a) **서열번호 7**의 138 내지 467 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 중쇄 불변 영역 (heavy chain constant region); 및
- [0061] (b) **서열번호 8**의 128 내지 234 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 경쇄 불변 영역 (light chain constant region)을 포함하는 키메라 항체이다.
- [0062] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 항체의 항원-결합 단편은 단쇄 가변 단편(single chain variable fragment, scFv), 가변 도메인(variable domain, Fv) 단편, 단편 항원 접합(fragment antigen binding, Fab) 단편, F(ab)<sub>2</sub> 단편, 펩타이드 또는 에피토프 결합 부위를 함유하는 단백질 가수 분해 단편이다.
- [0063] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 항체의 항원-결합 단편은 **서열번호 9**로 정의된 서열을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv)이다.
- [0064] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는 부신피질 억제제(adrenocortical suppressant), 알킬화제(alkylating agent), 알킬 설포산염(alkyl sulfonate), 안트라사이클린(anthracycline), 항신생혈관제(anti-angiogenic agent), 항생제(antibiotic), 대사 길항 물질(antimetabolite), 유사분열저해제(antimitotic), 오리스타틴(auristatin), 칼리키아마이신(calicheamycin), 캄토테신(camptothecin), 콕스-2 억제제(COX-2 inhibitor), 효소 억제제(enzyme inhibitor), 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 에틸렌이민 유도체



(ethylenimine derivative), 엽산 유사체(folic acid analog), HDAC 억제제, 열충격 단백질(heat shock protein) (HSP90) 억제제, 호르몬 길항제(hormone antagonist), 메이탄시노이드(maytansinoid), 메틸 하이드라진 유도체(methyl hydrazine derivative), mTOR 억제제, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아(nitrosourea), 백금 배위결합 복합체(platinum coordination complex), 프로-아폽토시스제(pro-apoptotic agent), 프로테오솜 억제제(proteosome inhibitor), 퓨린 유사체(purine analog), 피리미딘 유사체(pyrimidine analog), 방사성동위원소(radioisotope), 치환된 우레아(substituted urea), 택산(taxane), 트리아젠(triazene), 튜불린 억제제(tubulin inhibitor), 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor) 및 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0065] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는 아파티닙(afatinib), 아플리딘(aplidin), 아나스트로졸(anastrozole), 안트라사이클린(anthracyclines), AVL-101, AVL-291, 엑시티닙(axitinib), 아자리빈(azaribine), 벤다무스틴(bendamustine), 블레오마이신(bleomycin), 보테조밋(bortezomib), 보수티닙(bosutinib), 브리오스타틴-1(bryostatatin-1), 부슬판(busulfan), 캄토테신(camptothecins), 카르보플라틴(carboplatin), 칼리키아마이신(calicheamycin), 캄토테신(camptothecin), 카르보플라틴(carboplatin), 카무스틴(carmustine), 쉐레콕시브(celecoxib), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 클라드리빈(cladribine), COX-2 억제제, 크리조티닙(crizotinib), 시아노-몰폴리노 독소루비신(cyano-morpholino doxorubicin), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 시타라빈(cytarabine), 다카르바진(dacarbazine), 닥티노마이신(dactinomycin), 다사티닙(dasatinib), 다우노루비신(daunorubicin), 다이나시실립(dinaciclib), 3',5'-O-디올레오일(dioleoyl)-FudR (FudR-dO), DM1, DM3, DM4, 도세탁셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 독소루비신 글루쿠로나이드(doxorubicin glucuronide), 듀오카마이신(duocarmycin), 엔도스타틴(endostatin), 엔티노스테트(entinostat), 에피도필로톡신(epidophyllotoxin), 에피루비신 글루쿠로나이드(epirubicin glucuronide), 엘로티닙(erlotinib), 에스트라무스틴(estramustine), 에스트로겐 수용체 결합제(estrogen receptor binding agents), 에토포사이드 글루쿠로나이드(etoposide glucuronide), 에토포사이드 포스페이트(etoposide phosphate), 에토포사이드(etoposide) (VP16), 엑스메스탄(exemestane), 파네실-단백질 트랜스퍼라아제 억제제(farnesyl-protein transferase inhibitors), 핑고리모드(fingolimod), 플라보피리돌(flavopiridol), 플록스우리딘(floxuridine) (FudR), 플루다라빈(fludarabine), 5-플루오로우라실(flourouracil), 플루타마이드(flutamide), 포스타마티닙(fostamatinib), 가네테스피브(ganetespib), GDC-0834, 게피티닙(gefitinib), 겐시타빈(gemcitabine), GS-1101, 10-하이드록시캄토테신(hydroxycamptothecin), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이브루티닙(ibrutinib), 아이다루비신(idarubicin), 이데탈리십(idelalisib), 아이포스파마이드(ifosfamide), 이마티닙(imatinib), 이리노테칸(irinotecan) (CPT-11), 라파티닙(lapatinib), 레노리다마이드(lenolidamide), 류코보린(leucovorin), LFM-A13, 로무스틴(lomustine), 메클로레타민(mechlorethamine), 멜팔란(melphalan), 머캅토피린(mercaptopyrine), 6-머캅토피린(mercaptopyrine), 메토티렉세이트(methotrexate), 미스라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 마이토테인(mitotane), 미토산트론(mitoxantrone), 모노메틸우레스타틴(monomethylauristatin) D (MMAD), 모노메틸우레스타틴 E (MMAE), 모노메틸우레스타틴 F (MMAF), 나벨빈(navelbine), 네라티닙(neratinib), 니로티닙(nilotinib), 니트로소우레아(nitrosourea), 올라파립(olaparib), 파클리탁셀(paclitaxel), PCI-32765, 펜토스타틴(pentostatin), 플리코마이신(plicomycin), 2-PDox 프로드러그(pro-drug) (pro-2-PDox), 프로카바진(procarbazine), PSI-341, 2-피롤리노독소루비신(pyrrolinodoxorubicine) (2-PDox), 라록시펜(raloxifene), 세무스틴(semustine), SN-38, 소라페닙(sorafenib), 스트렙토조신(streptozocin), SU1 1248, 수니티닙(sunitinib), 타목시펜(tamoxifen), 테마졸로마이드(temazolomide), 테니포사이드(teniposide), 탈리도마이드(thalidomide), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 토포테칸(topotecan), 트랜스플레티닙(transplatinum), 우라실 머스타드(uracil mustard), 바타라닙(vatalanib), 빈플라스틴(vinblastine), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 빈크리스틴(vincristine), 비노렐빈(vinorelbine) 및 ZD 1839로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0066] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는 <sup>90</sup>Y, <sup>188</sup>Re, <sup>166</sup>Ho, <sup>165</sup>Dy, <sup>109</sup>Pd, <sup>111</sup>Ag, <sup>186</sup>Re, <sup>198</sup>Au, <sup>153</sup>Sm, <sup>64</sup>Cu, <sup>177</sup>Lu, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>67</sup>Cu, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Dy, <sup>169</sup>Er, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Pb, <sup>66</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>86</sup>Y, <sup>94m</sup>Tc, 및 <sup>89</sup>Zr로 이루어진 군으로부터 선택되는 방사성동위원소이다.

[0067] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 DOTA, DTPA, NOTA, NODAGA, MeCOSAR, TETA, TRAP, TE2A, CBTE2A로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제와 접합된다.

[0068] 상기 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제 및 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 DOTA, DTPA, NOTA,

NODAGA, MeCOSAR, TETA, TRAP, TE2A, CBTE2A로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제와 접합된다.

- [0069] 상기 측면의 추가 구현예에서, 개체는 포유동물 또는 인간이다.
- [0070] 제 11 측면에서, 본 발명은 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 나타내는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된 제 1 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 분리된 항체 집단을 제공하며, 상기 제 1 항체는:
- [0071] (a) **서열번호 3**의 50 내지 54 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 1 (CDR1);
- [0072] **서열번호 3**의 69 내지 85 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 2 (CDR2);
- [0073] **서열번호 3**의 118 내지 126 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0074] (b) **서열번호 4**의 44 내지 54 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 1 (CDR1);
- [0075] **서열번호 4**의 70 내지 76 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 2 (CDR2);
- [0076] **서열번호 4**의 109 내지 117 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0077] 상기 항체 집단은:
- [0078] **서열번호 11**의 48 내지 58 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 1 (CDR1);
- [0079] **서열번호 11**의 74 내지 80 위치로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 2 (CDR2);
- [0080] **서열번호 11**의 113 내지 121 위치로 정의된 아미노산을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 제 2 항체를 함유하지 않는다.
- [0081] 제 11 측면의 일 구현예에서, 제 1 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 단일클론 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 다항체 항체 및/또는 합성 항체이다.
- [0082] 제 11 측면의 또 다른 구현예에서, 항원 결합 단편은 하나 이상의 단쇄 가변 단편(single chain variable fragment, scFv), 가변 도메인(variable domain, Fv) 단편, 단편 항원 접합(fragment antigen binding, Fab) 단편, F(ab)2 단편, 펩타이드 또는 에피토프 결합 부위를 함유하는 단백질 가수 분해 단편이다.
- [0083] 제 11 측면의 추가적인 구현예에서, 제 1 항체는 **서열번호 3**의 20 내지 461 위치로 정의된 중쇄 서열 및 **서열번호 4**의 21 내지 234 위치로 정의된 경쇄 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0084] 제 11 측면의 추가 구현예에서, 제 1 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편은 키메라(chimeric)이다.
- [0085] 제 11 측면의 추가 구현예에서, 제 1 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0086] (a) **서열번호 7**의 138 내지 467 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 중쇄 불변 영역; 및
- [0087] (b) **서열번호 8**의 128 내지 234의 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 경쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항체이다.
- [0088] 제 11 측면의 또 다른 구현예에서, 항원 결합 단편은 **서열번호 9**로 정의된 서열을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv)이다.
- [0089] 제 11 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는 부신피질 억제제(adrenocortical suppressant), 알킬화제(alkylating agent), 알킬 설포산염(alkyl sulfonate), 안트라사이클린(anthracycline), 항신생혈관제(anti-angiogenic agent), 항생제(antibiotic), 대사 길항 물질(antimetabolite), 유사분열저해제(antimitotic), 오



리스타틴(auristatin), 칼리키아마이신(calicheamycin), 캄토테신(camptothecin), 콕스-2 억제제(COX-2 inhibitor), 효소 억제제(enzyme inhibitor), 에피도포필로톡신(epipodophyllotoxin), 에틸렌이민 유도체(ethylenimine derivative), 엽산 유사체(folic acid analog), HDAC 억제제, 열충격 단백질(heat shock protein) (HSP90) 억제제, 호르몬 길항제(hormone antagonist), 메이탄시노이드(maytansinoid), 메틸 하이드라진 유도체(methyl hydrazine derivative), mTOR 억제제, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 니트로소우레아(nitrosourea), 백금 배위결합 복합체(platinum coordination complex), 프로-아포토시스제(pro-apoptotic agent), 프로테오솜 억제제(proteosome inhibitor), 퓨린 유사체(purine analog), 피리미딘 유사체(pyrimidine analog), 방사성동위원소(radioisotope), 치환된 우레아(substituted urea), 택산(taxane), 트리아젠(triazene), 튜불린 억제제(tubulin inhibitor), 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor) 및 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0090] 제 11 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는 아파티닙(afatinib), 아플리딘(aplidin), 아나스트로졸(anastrozole), 안트라사이클린(anthracyclines), AVL-101, AVL-291, 액시티닙(axitinib), 아자리빈(azaribine), 벤다무스틴(bendamustine), 블레오마이신(bleomycin), 보테조밋(bortezomib), 보수티닙(bosutinib), 브리오스타틴-1(bryostatatin-1), 부슬판(busulfan), 캄토테신(camptothecins), 카르보플라틴(carboplatin), 칼리키아마이신(calicheamycin), 캄토테신(camptothecin), 카르보플라틴(carboplatin), 카무스틴(carmustine), 세레콕시브(celecoxib), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 클라드리빈(cladribine), COX-2 억제제, 크리조티닙(crizotinib), 시아노-몰폴리노 독소루비신(cyano-morpholino doxorubicin), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 시타라빈(cytarabine), 다카르바진(dacarbazine), 닥티노마이신(dactinomycin), 다사티닙(dasatinib), 다우노루비신(daunorubicin), 다이나시실립(dinaciclib), 3',5'-O-디올레오일(dioleoyl)-FudR (FudR-dO), DM1, DM3, DM4, 도세탁셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 독소루비신 글루쿠로나이드(doxorubicin glucuronide), 듀오카마이신(duocarmycin), 엔도스타틴(endostatin), 엔티노스테트(entinostat), 에피도포필로톡신(epidophyllotoxin), 에피루비신 글루쿠로나이드(epirubicin glucuronide), 엘로티닙(erlotinib), 에스트라무스틴(estrामustine), 에스트로겐 수용체 결합제(estrogen receptor binding agents), 에토포사이드 글루쿠로나이드(etoposide glucuronide), 에토포사이드 포스페이트(etoposide phosphate), 에토포사이드(etoposide) (VP16), 엑스메스탄(exemestane), 파네실-단백질 트랜스퍼라아제 억제제(farnesyl-protein transferase inhibitors), 핑고리모드(fingolimod), 플라보피리돌(flavopiridol), 플록스우리딘(floxuridine) (FudR), 플루다라빈(fludarabine), 5-플루오로우라실(fluorouracil), 플루타마이드(flutamide), 포스타마티닙(fostamatinib), 가네테스피브(ganetespib), GDC-0834, 제피티닙(gefitinib), 젬시타빈(gemcitabine), GS-1101, 10-하이드록시캄토테신(hydroxycamptothecin), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이브루티닙(ibrutinib), 아이다루비신(idarubicin), 이데탈리십(idelalisib), 아이포스파마이드(ifosfamide), 이마티닙(imatinib), 이리노테칸(irinotecan) (CPT-11), 라파티닙(lapatinib), 레놀리다마이드(lenolidamide), 류코보린(leucovorin), LFM-A13, 로무스틴(lomustine), 메클로레타민(mechlorethamine), 멜팔란(melphalan), 머캅토피린(mercaptopurine), 6-머캅토피린(mercaptopurine), 메토티렉세이트(methotrexate), 미스라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 마이토테인(mitotane), 미토산트론(mitoxantrone), 모노메틸우레스타틴(monomethylauristatin) D (MMAD), 모노메틸우레스타틴 E (MMAE), 모노메틸우레스타틴 F (MMAF), 나벨빈(navelbine), 네라티닙(neratinib), 니로티닙(nilotinib), 니트로소우레아(nitrosourea), 올라파립(olaparib), 파크리탁셀(paclitaxel), PCI-32765, 펜토스타틴(pentostatin), 플리코마이신(plicomycin), 2-PDox 프로드러그(pro-drug) (pro-2-PDox), 프로카바진(procarbazine), PSI-341, 2-피롤리노독소루비신(pyrrolinodoxorubicine) (2-PDox), 라록시펜(raloxifene), 세무스틴(semustine), SN-38, 소라페닙(sorafenib), 스트렙토조신(streptozocin), SU1 1248, 수니티닙(sunitinib), 타목시펜(tamoxifen), 테마졸로마이드(temazolomide), 테니포사이드(teniposide), 탈리도마이드(thalidomide), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 토포테칸(topotecan), 트랜스플레티닙(transplatinum), 우라실 머스타드(uracil mustard), 바타라닙(vatalanib), 빈플라스틴(vinblastine), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 빈크리스틴(vincristine), 비노렐빈(vinorelbine) 및 ZD 1839로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0091] 제 11 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포의 엔도솜 또는 리소솜으로 흡수될 때 활성화되도록 설계된 프로드러그이다.

[0092] 제 11 측면의 한 구현예에서, 프로드러그는:

[0093] pH 7.2, pH 7.0, pH 6.5, pH 6.0, pH 5.5, pH 5.0, pH 4.5 또는 pH 4 미만의 pH에서 절단되기 쉬운 산 민감성-링커; 또는

- [0094] 링커를 절단할 수 있는 효소가 엔도솜 또는 리소솜 내에 존재하는 효소-절단가능한 링커에 의해 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편과 접합된다.
- [0095] 제 11 측면의 한 구현예에서, 세포독성 제제는 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편과 접합된 킬레이트제와 결합함으로써 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편과 연결된다.
- [0096] 제 11 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제 및 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 DOTA, DTPA, NOTA, NODAGA, MeCOSAR, TETA, TRAP, TE2A, CBTE2A로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제와 접합된다.
- [0097] 제 11 측면의 또 다른 구현예에서, 세포독성 제제는  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ , 및  $^{89}\text{Zr}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 방사성동위원소이다.
- [0098] 제 11 측면의 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 DOTA, DTPA, NOTA, NODAGA, MeCOSAR, TETA, TRAP, TE2A 및 CBTE2A로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제와 접합된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0099] 본 발명의 바람직한 구현예는 여기에 첨부된 도면을 참조하여 실시예로서만 기술될 것이다:
- 도 1**은 DU-145 세포에서 키메라 MIL-38 항체 및 대조군을 이용한 면역 형광 분석 이미지를 도시한다. **도 1A** 내지 **D**는 염색된 세포들의 명시야상 및 DAPI상을 결합한 이미지를 도시한다. **도 1E** 내지 **H**는 33A 제조 MIL-38 (**1E**, 양성 대조군), 키메라 MIL-38 (**1F**), 세툽시맙(Cetuximab) (**1G**, 인간 IgG1k에 대한 양성 대조군) 및 음성 대조군 (**1H**, 1차 항체 없음)과 DU-145 세포와의 결합을 도시한다;
- 도 2**는 키메라 MIL-38 항체의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. **도 2A**는 DU-145 MPEK 추출물, C3 MPEK 추출물 및 NS0-생산 재조합 GPC-1 항원과 뮤린 MIL-38의 반응성(reactivity)을 도시한다. **도 2B**는 DU-145 MPEK 추출물, C3 MPEK 추출물 및 NS0-생산 재조합 GPC-1 항원과 키메라 MIL-38과의 반응성을 도시한다. **도 2C**는 **도 2B**와 동일한 조건하에서의 DU-145 MPEK 추출물, C3 MPEK 추출물 및 NS0-생산 재조합 GPC-1 항원과 뮤린 MIL-38과의 반응성을 도시한다;
- 도 3**은 DU-145 세포에 결합하는 형광-표지된 MIL-38 및 scFv MIL-38 항체의 유세포분석(Flow cytometry)을 도시한다. **도 3A**는 음성 대조군 (세포 단독 및 음성 대조군 항체)을 도시한다. **도 3B**는 세포가 표지되지 않은 MIL-38 항체와 전처리되었을 때 DU-145 세포와 뮤린 MIL-38의 반응성 및 FLOW 신호 감소를 도시한다. **도 3C**는 표지된 MIL-38 및 표지된 MIL-38 scFv의 DU-145 세포와의 상대적 결합(comparative binding)을 도시한다. MIL-38 scFv는 DU-145 세포에 대한 결합을 유지하지만, 뮤린 MIL-38보다 약간 낮은 수준이다;
- 도 4**는 MIL-38 항체의 MDA-MB-231 유방암 세포, T-24 방광암 세포, PANC-1 췌장암 세포 및 DU-145 전립선암 세포와의 결합을 도시한다. **도 4A**는 뮤린 MIL-38 항체의 MDA-MB-231 세포와의 결합을 도시한다. MIL-38의 결합은 아이소타입(isotype) 또는 대조군인 이차 항체보다 상당히 높으며, 이는 MDA-MB-231 세포가 MIL-38 항원 GPC-1에 대해 양성임을 도시한다. **도 4B**는 MDA-MB-231, T-24 또는 DU-145 세포와 MIL-38의 결합에 대해 오버레이된 유세포 분석 히스토그램을 도시한다. **도 4C**는 PANC-1 세포와 MIL-38, 항-CD9 및 항-CD81 항체의 결합에 대해 오버레이된 유세포 분석 히스토그램을 도시한다.
- 도 5**는 MIL-38 항체의 MDA-MB-231, T-24 및 DU-145 세포에 의한 내재화(internalisation)를 도시한다. **도 5A**는 DU-145 세포와의 결합 30분 후의 1F5 뮤린 MIL-38 모 항체(parent antibody)의 내재화를 도시한다. **도 5B**는 DU-145 세포와의 결합 30분 후의 키메라 MIL-38 항체의 내재화를 도시한다. **도 5C**는 키메라 MIL-38 항체를 MDA-MB-231 세포에 30분 노출한 후 검출 가능한 항체 결합 또는 내재화가 없음을 도시한다. **도 5D**는 키메라 MIL-38 항체가 T-24 세포와 결합 후 즉시 내재화되는 것을 도시한다; **도 5E**는 60분의 타임코스(timecourse)의 15분 후에, 키메라 MIL-38 항체 (녹색)의 PANC-1 세포에서의 위치를 도시한다. **도 5F**는 60분 타임코스를 완료한 후에, PANC-1 세포에서 Alexa-Fluor 488로 표지된 항-인간 항체의 내재화를 도시한다.
- 도 6**은 CY5-표지된 1F5 뮤린 MIL-38 또는 CY5-표지된 키메라 MIL-38의 피하에 DU-145가 이종이식된 종양으로의 표적화를 도시한다. **도 6A**는 1F5 뮤린 MIL-38의 표적화를 나타내고, **도 6B**는 키메라 MIL-38의 표적화를 도시한다. 종양들은 마우스의 등에 위치하고 화살표로 표시되었다. 또한, 귀 천자창(puncture)의 위치로 정위되었다 (다이하몬드로 표시).

**도 7**은 다양한 표적화 항체들을 이용한 DU-145 및 MDA-MB-231 유방암 세포주에서의 세포 성장 저해 분석을 도시한다. 간단하게, 세포들은 세포독성 제제 DM1, MMAE, MMAF 및 듀오카마이신(Duocarmycin)으로 미리 표지된 키메라 MIL-38 및 단백질 G 존재하에 3일 동안 성장되었고, 그 후에 세포 생존율(cell viability)을 평가하였다. EC50s가 측정되었으며 각각의 도의 오른쪽에 나타났다. 사용된 항체들은 키메라 MIL-38 (**도 7A**), BLCA-38 (AM3 및 AM4 집단을 포함하는 이중-클론 집단(bi-clonal population), **도 7B**), AM3 (최소한의 GPC-1-결합을 가지는, BLCA-38 유래 단일클론 집단, **도 7C**), 1F5 MIL-38 (높은 GPC-1 결합을 가지는, BLCA-38 집단 유래 AM4-유사 단일클론 집단, **도 7D**) 및 얼비투스(Erbtux) (일반명 세툽시맙, 양성 대조군으로서 사용된 키메라 항-EGFR 단일클론, **도 7E**). **도 7F**는 단백질 G-듀오카마이신의 DU-145 세포에서의 적정 (위쪽 패널) 및 DU-145 세포에서 최적화된 단백질 G-듀오카마이신 농도를 이용한 세포 성장 억제 분석을 도시한다;

**도 8**은 스테이블 세포(stable cell) 풀을 이용한 파일럿 배치(pilot batch) 생산의 세포 성장 및 키메라 항체 발현 특성을 도시한다. 대용량 GMP 생산에 적합한 방법론을 이용한 한 확장가능한(scalable) 키메라 항체 발현을 증명하는, 세포 생존 밀도 (**도 8A**), 세포 생존율 (**도 8B**) 및 항체 생산 (**도 8C**)을 도시한다;

**도 9**는 MIL-38의 DOTA 접합(conjugation) 및  $^{177}\text{Lu}$  표지를 도시한다. **도 9A**는 HPLC로 분석된 젤 여과 표준 마커를 도시한다. **도 9B**는 HPLC로 분석된 비접합된(unconjugated) MIL-38를 도시한다. **도 9C**는 PD-10 컬럼 정제(purification) 후 HPLC로 분석한 접합된 MIL-38을 도시한다. **도 9D**는  $^{177}\text{Lu}$ 로 표지된 MIL-38의 방사능(radioactivity)을 HPLC로 분석한 것을 도시한다. **도 9E**는 HPLC로 분석한 표지된 MIL-38에 해당하는 A280 궤적(trace)을 도시한다;

**도 10**은 DU-145 세포와 결합하는 키메라 MIL-38, MIL-38 DOTA 및 모의 방사성-표지된 MIL-38 DOTA의 유세포 분석을 도시한다. 본질적으로 DOTA 접합(conjugation)이 DU-145 세포에 결합하는 MIL-38를 감소시키지 않았다는 것을 나타내는 결합 등곡선(equivalent binding curves)을 얻었다. 유사하게, 모의 방사성표지 과정을 거친 MIL-38 DOTA는 표지되지 않은 접합체와 동등한 세포 결합을 가지며, 이는 세포 결합 활성(cell binding activity)의 유지를 나타낸다;

**도 11**은 DOTA-접합된 MIL-38의  $^{67}\text{Ga}$  표지를 도시한다. **도 11A**는  $^{67}\text{Ga}$ 로 표지된 MIL-38의 방사능의 사이즈 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography) HPLC 크로마토그램을 도시한다. 별표는 반응 혼합물에 남은 유리(free)  $^{67}\text{Ga}$ 를 표시한다. **도 11B**는  $^{67}\text{Ga}$ -표지된 MIL-38 DOTA의 안정성 연구를 도시한다.  $^{67}\text{Ga}$ 로 표지된 MIL-38의 방사능의 사이즈 배제 크로마토그래피 HPLC 크로마토그램을 해당 UV 궤적과 함께 나타냈다.  $^{67}\text{Ga}$ -MIL-38 제제에서 유리  $^{67}\text{Ga}$ 가 제거되었고, SEC HPLC 크로마토그래프를 수행하기에 앞서 상온에서 2주 동안 방치되었다.

**도 12**는 직접 항원 결합 ELISA(direct antigen binding ELISA)와 유세포 분석을 이용하여, 키메라 MIL-38, 다른 DOTA 접합 비율을 사용하여 제조된 MIL-38 DOTA 및 모의 방사성-표지된(mock radio-labelled) MIL-38의 DU-145 및 T-24 세포에 대한 결합을 도시한다. **도 12A**는 비-표지된 키메라 MIL-38 또는 5, 10 또는 20배 몰(molar) 과량의 DOTA를 이용하여 DOTA와 접합된(conjugated) 키메라 MIL-38의 결합을 도시한다. 본질적으로 DOTA 접합(conjugation)이 DU-145 세포에 결합하는 MIL-38를 감소시키지 않았다는 것을 나타내는 결합 등곡선(equivalent binding curves)을 얻었다. **도 12B**는 모의-표지되는(mock-labelling) 반응을 거친 chMIL-38 DOTA (20배 과량)을 세 개로 나눈 배치와 T-24 세포의 결합에 대한 유세포 분석을 도시한다. 본질적으로 동일한 결합 곡선(identical binding curves)이 관찰되어 우수한 배치간 재현성을 나타냈다. **도 12C**는 모의-표지 반응을 거친 하나의 배치로부터 모두 제조된 chMIL-38 DOTA (20배 과량)의 세 개의 분리된 유동 반응(FLOW reactions)의 T-24 세포와의 결합에 대한 유세포 분석을 도시한다. 본질적으로 동일한 결합 곡선(identical binding curves)이 관찰되어 우수한 배치 내 재현성을 나타내었다. **도 12D**는 이차 항체 단독 (빨간색 궤적), chMIL-38 DOTA (녹색 궤적), 배치 간 재현성 중 한 시료 (Batch 1, 파란색 궤적) 및 배치 내 재현성 중 한 시료 (Intra 1, 오렌지색 궤적)와 T-24 세포의 결합에 대해 오버레이된 유세포 분석 프로파일을 도시한다. 본질적으로 동일한 결합 곡선이 관찰되어, 모의-표지 과정이 chMIL-38 DOTA 대조군 대비 세포와의 결합에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. **도 12E**는 직접 결합 ELISA에서의 chMIL-38 및, 5, 10 또는 20배 몰 과량의 DOTA를 사용하여 DOTA와 접합된(conjugated) chMIL-38과 재조합 GPC-1의 결합을 도시한다. **도 12F**는 chMIL-38 DOTA, 배치 간 비교를 위해 제조된 세 가지 모의-표지된 chMIL-38 DOTA 및 배치 내 제제 유래 세 가지 반응으로 제조된 세 가지 모의-표지된 chMIL-38 DOTA와 재조합 GPC-1의 직접 결합을 도시한다.

**도 13**은 키메라 MIL-38 항체 주사 후 Balb/c 누드 마우스의 등에 DU-145가 이종이식된 종양을 관찰한 형광 영상

(A); 및 144시간 후 (A)의 대표 마우스의 다중-모드 동물 회전 시스템 (MARS) 영상 (B)을 도시한다.

도 14는  $^{177}\text{Lu}$ -표지된 MIL-38 DOTA를 정상 래트에 투여했을 때의 타임코스에서 따른 생체 분포를 도시한다. 그래프는 혈액(blood), 위(stomach), 소장(small intestine), 대장(large intestine), 정소(testes), 근육(muscle), 뼈(bone) 갑상선(thyroid), 심장(heart), 폐(lung), 간(liver), 신장(kidneys) 및 방광(bladder)에 대한 그래프당 % 주사 투여량을 도시한다. 투여 후 6시간, 1일, 2일, 1주 및 2주의 시점(Timepoint)을 도시한다.

도 15는  $^{177}\text{Lu}$ -표지된 MIL-38 DOTA를 정상 래트에 투여했을 때의 생체 분포의 타임코스를 도시한다. 그래프는 혈액, 간 및 신장에 대한 그래프당 % 주사 투여량을 도시한다. 투여 후 6시간, 1일, 2일, 1주 및 2주의 시점을 도시한다.

도 16은 이중이식 종양을 가진 Balb/c 누드 마우스에 주사 48시간 후에 찍은  $^{64}\text{Cu}$ -표지된 MIL-38 NOTA의 PET-CT 영상이다. 화살표는 DU-145 이중이식 종양의 위치를 나타낸다.

도 17은 이중이식 종양을 가진 Balb/c 누드 마우스에서의 DOTA- 및 NOTA-표지된 MIL-38 항체의 생체 외(ex vivo) 생체 분포를 나타내는 그래프이다.

도 18은 염소 항-GPC-1 항체에 대해 등에서 관찰된 형광 영상 (A); 주사 120시간 후에 염소 항-GPC-1에 대해 관찰된 장기의 생체 외 형광 영상 (B)을 도시한다. 종양은 빨간색 화살표와 120시간 켜의 MARS 영상 (C)으로 표시하였다.

도 19는 포획 항체로서 다른 MIL-38 항체 제제를 이용하여 수행된 비교 샌드위치 ELISA(comparative sandwich ELISAs)를 도시한다. 도 19A는 AM3 및 AM4를 포획 항체로서 이용한 비교 샌드위치 ELISA를 도시한다. 도 19B는 혼합된 제제 (34A) 또는 클론 집단 (AM4 1F5)을 포획 항체로서 이용한 비교 샌드위치 ELISA를 도시한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 정의

본 출원에 사용된 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수형의 대상을 포함한다. 예를 들어, 구(phrase) "an 항체"는 다수의 항체 또한 포함한다.

본 발명에서 사용된, 용어 "포함하는(comprising)"은 "포함한다(including)"를 의미한다. "포함하다(comprise)" 및 "포함하다(comprises)"와 같은 "포함하는(comprising)"의 변형은 그에 상응하는 다양한 의미를 가진다. 따라서, 예를 들어, 항체 A를 "포함하는(comprising)" 시료는 항체 A만으로 이루어질 수 있거나 하나 이상의 추가적인 구성 요소(component) (예를 들어, 항체 B)를 포함할 수 있다.

본 발명에서 사용된, 용어 "다수(multiple)"는 하나 이상을 의미한다. 특정 구체적인 측면 또는 구현예에서, 다수는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 또는 그 이상, 및 거기서 유추 가능한 임의의 정수, 및 거기서 유추 가능한 임의의 범위를 의미할 수 있다.

본 발명에서 사용된, 용어 "항체(antibody)" 및 "항체들(antibodies)"은 IgG (IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 포함), IgA (IgA1 및 IgA2 포함), IgD, IgE, IgM 및 IgY, 단-쇄 전체 항체(single-chain whole antibodies)를 포함하는 전체 항체, 및 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 항원-결합 항체 단편은 Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>, 단쇄 Fvs (scFv), 단쇄 항체(single-chain antibodies), 이황화결합-가교된 (disulfide-linked) Fvs (sdFv), 및 VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 항체는 임의의 동물 기원(origin) 또는 적절한 생산 숙주에서 유래될 수 있다. 단쇄 항체를 포함하는 항원-결합 단편은 가변 영역/들을 단독으로 포함하거나 경첩 영역, CH1, CH2 및 CH3 도메인의 전체 또는 일부를 조합하여 포함할 수 있다. 또한 가변 영역/들 및 경첩영역, CH1, CH2, 및 CH3 도메인의 임의의 조합이 포함된다. 항체는 생물학적 분자에 특이적으로 결합하는 단일클론, 다클론(polyclonal), 키메라, 다중(multispecific), 인간화, 및 인간 단일클론 및 다클론 항체일 수 있다. 항체는 이중-특이적 항체, 디아바디(diabody), 트리바디(tribody), 테트라바디(tetrabody), 나노바디(nanobody), 단일 도메인 항체(single domain antibody), VHH 도메인, 인간 항체, 완전 인간화 항체, 부분 인간화 항체, 안티칼린(anticalin), 어드넥틴(adnectin) 또는 에피바디(affibody) 일 수 있다.

본 발명에서 사용된 용어 "단일클론 항체(monoclonal antibody)"는 단일 항원성 에피톱(single antigenic epitope)을 인식하며, 같은 항원성 에피톱에 특이적으로 결합하고 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생적 돌연변



이가 잠재적으로 제외된 것과 동일한 실질적으로 균일한(homogeneous) 항체 집단으로부터 얻어지는 항체를 의미한다.

[0106] 본 발명에서 사용된, 용어 "인간화 항체(humanised antibody)"는 비-인간 항체 (예를 들어, 무린 항체)뿐만 아니라 인간 항체 유래 서열도 포함하는 항체의 형태를 의미한다.

[0107] 예를 들어, 인간화 항체는 실질적으로 모든 적어도 하나 및 일반적으로 두개의 가변 도메인을 포함할 수 있으며, 모든/실질적으로 모든 비-인간 면역글로불린에 상응하는 초가변(hypervariable) 루프(loop) 및 모든/실질적으로 모든 FR 영역이 인간 면역글로불린(immunoglobulin) 서열로부터 유래한다. 인간화 항체는 선택적으로 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분 또한 포함하며, 일반적으로 인간 면역글로불린의 것일 수 있다.

[0108] 본 발명에서 사용된, 용어 "키메라 항체(chimeric antibody)"는 원하는 생물학적 활성을 나타내고, 경쇄 및/또는 중쇄의 일부가 주어진/특정 종(species)으로부터 유래된 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동하면서(homologous) 남은 체(chain)/들이 또 다른 종으로부터 유래한 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동한 항체를 의미한다. 예를 들어, 키메라 항체는 첫 번째 종으로부터 유래된 가변 영역과 두 번째 종으로부터 유래된 불변 영역을 포함할 수 있다. 키메라 항체는 예를 들어 다른 종에 속하는 면역글로불린 유전자 분절(segment)을 유전자 조작함으로써 제조될 수 있다.

[0109] 본 발명에서 사용된, 용어 "하이브리도마(hybridoma)"는 불멸 세포(immortal cell) (예를 들어, 다발성 골수종 세포)와 항체-생산 세포 (예를 들어, B 림프구(lymphocyte))의 융합에 의해 생산된 세포를 의미하며, 이는 단일 결합 특이성의 단일클론 항체를 생산할 수 있다.

[0110] 본 발명에서 항체, 항체 변이체(variant), 항체 유도체(derivative), 항원 결합 단편 등과 관련하여 사용된 용어 "특이적으로 결합(binding specifically)" 및 "특이적인 결합(specifically binding)"는 비-표적 분자보다 우선적으로 주어진 표적 분자에 결합하는 능력을 의미한다. 예를 들어, 항체, 항체 변이체, 항체 유도체 또는 항원 결합 단편 ("분자 A")가 주어진 표적 분자 ("분자 B")에 "특이적으로 결합" 또는 "특이적인 결합"이 가능하다면, 분자 A는 분자 B와 잠재적으로 선택 가능한 다른 많은 결합 파트너들을 구별(discriminate)할 수 있다. 따라서, 수 많은 잠재적인 결합 파트너로서 동일하게 접근 가능한 다른 분자들에 노출되었을 때, 분자 A는 분자 B에 선택적으로 결합하고, 잠재적으로 선택 가능한 다른 결합 파트너들은 분자 A에 실질적으로 결합되지 않고 남을 것이다. 통상적으로, 분자 A는 다른 잠재적 결합 파트너들보다 적어도 10-배, 바람직하게는 50-배, 더욱 바람직하게는 100-배, 및 가장 바람직하게는 100-배 이상의 빈도로 분자 B에 우선적으로 결합할 것이다. 분자 A는 분자 B가 아닌 분자에 약하지만 검출가능한 수준으로 결합할 수 있다. 이 것은 일반적으로 배경 결합(background binding)으로 알려져 있으며, 이는, 예를 들어, 적절한 대조군을 사용함으로써, 분자 B-특이적 결합과 손쉽게 식별될 수 있다.

[0111] 본 발명에서 사용된, 용어 "세포독성 제제"는 임의의 화합물일 수 있고, 예를 들어 세포 기능 저해하는 것과 같은, 세포 (예를 들어, 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포)에 유독하고, 직접적 및/또는 간접적 세포 사멸을 야기하는 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0112] 본 발명에 기재된 바와 같이 "세포독성 제제", 및 본 발명에 기재된 항체, 항체 유도체 또는 항체의 항원 결합 단편의 맥락에서 본 발명에서 사용된, 용어 "접합하다(conjugate)", "접합된(conjugated)" 및 "접합(conjugation)"은 세포독성 제제가 항체, 항체 유도체 또는 항원 결합 단편에 연결(link)되는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 연결이 세포독성 제제와 항체 사이에 직접 일어날 수 있거나, 선택적으로 세포독성 제제와 항체 사이의 연결이 하나 이상의 중개(intervening) 분자 (예를 들어, 단백질-G)를 통해 간접적으로 일어날 수 있다.

[0113] 본 발명에서 사용된, 용어 "개체(subject)"는 소(bovine), 말(equine), 양(ovine), 영장류(primate), 조류(avian) 및 설치류(rodent) 종을 포함하는 경제적, 사회적 또는 연구 중요성이 있는 임의의 동물을 포함한다. 따라서, "개체"는 예를 들어, 인간과 같은 포유동물 또는 비-인간 포유동물일 수 있다.

[0114] 본 발명의 선행 문헌 또는 상기 문서들에서 파생되거나 이에 기초한 본 발명의 명세서의 기재는 문서 또는 파생된 명세서가 관련 기술에 대한 일반적인 지식의 일부임을 인정하는 것이 아니다. 설명을 목적으로 본 발명에서 언급된 모든 문헌들은 달리 언급되지 않는 한 그 전체가 본 발명에 참조 문헌으로서 포함된다.

[0115] **상세한 설명**

[0116] 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암을 치료할 더 효과적인 방법 및 약제의 필요성이 지속적으로 존재해왔다. 항체

는 암의 진단 및 치료에 유용한 약제이며, 혈액 악성 종양(haematological malignancies) 및 고형암을 가진 환자를 진단하고 치료하기 위한 성공적이고 중요한 수단이 되어왔다. 암-특이적 항원을 표적화하는 새로운 관련 항체의 동정은 암 환자에 대한 진단 및/또는 치료 결과를 향상시킬 수 있는 하나의 잠재적 수단을 제공한다. 상기 결과를 향상시킬 수 있는 또 다른 수단은 기존의 항체-기반 진단 및/또는 치료를 향상시키는 것이다.

[0117] 본 발명자들은 예상 밖으로 선행 기술에서 언급되고 사용된 BLCA-38 항체가 기재된 바와 같은 별개의 단일클론 항체가 아니라, 혼합된 집단에서 별개의 두 단일클론 항체의 조합이라는 것을 밝혔다. 본 발명자들은 대표 샘플이 American Tissue Type Culture Collection에 수탁번호 HB11785로 기탁된, BLCA-38 항체를 생성하는데 사용된 하이브리도마가 두 개 이상의 별개의 항체 종을 생산하는 하이브리도마 세포들의 혼합 집단을 밝혔다. 이들 항체 종들 중 오직 한 종만이 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 존재하는 관련 표적 항원에 강력하게 결합할 수 있고, 두 번째 종은 결합할 수 없다.

[0118] 선행 기술에서 언급된 BLCA-38가 혼합된 하이브리도마/항체 집단을 나타낸다는 예상치 못한 발견은 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포의 표적 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 단일클론 항체의 단일 집단의 생성이 가능한 단일클론 하이브리도마의 생산을 촉진시켰다. 이는 효과가 없는 치료용 항체의 불필요한 생산 및 적용을 회피한다. 또한 특히 방사성-면역 요법을 위한 ADC 생산 또는 킬레이트제의 접합과 같이 생산 후 변형(post-production modifications)이 필요할 때 치료용 항체 생산의 비용이 높은 것이 자명하다. 표적 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포 항원과 결합하지 않는 항체로부터 ADC 또는 킬레이트된 단일클론 항체를 제조하는 것을 피하는 것은 확실히 유익하다. 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 항원에 결합하지 않는 BLCA-38 혼합 집단의 항체 종의 실제 표적은 비-표적 세포에 대한 잠재적 결합으로 인한 원하지 않는 부작용(side-effects)의 위험을 높이는 것으로 알려져 있지 않다.

[0119] 또한 본 발명자들은 예상 밖으로 선행 기술이 BLCA-38 항체 집단이 암세포와 결합할 때 내재화되지 않는다고 교시한 것과 반대인 것을 발견했고, 본 발명자들은 단일클론 항체 종의 항체가 사실은 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 존재하는 관련 표적에 결합시 내재화된다는 것을 밝혔다

[0120] 따라서, 본 발명의 특정 구현에는 항체 집단의 각 구성원이 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 존재하는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는, 클론 하이브리도마 세포(clonal hybridoma cells)로부터 유래한 단일클론 항체 집단의 제공에 관한 것이다. 또한 본 발명은 동일한 결합 특이성을 유지하는 항체의 유도체 및 변이체뿐만 아니라, 상기 항체들의 항원 결합 단편도 제공한다. 항체 및 단편은 하나 이상의 개체의 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 독성을 가지는 세포독성 제제와 접합된다.

[0121] 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포를 특이적으로 표적화할 수 있는 항체 접합체를 제공하는 관점에서, 본 발명의 다른 구현예들은 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암으로 고통받는 개체에서 치료하는 방법 및 전립선, 방광 및/또는 췌장 세포 및 종양을 사멸하는 방법에 관한 것이다.

[0122] 본 발명의 추가적인 측면은 접합된 항체 및/또는 단편을 포함하는 의약 및 약학적 조성물 및 이들의 제조 방법에 관한 것이다.

#### [0123] 항체 및 항원-결합 단편

[0124] 본 발명은 각각 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된, 항체, 상기 항체의 유도체, 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0125] 변경된 구현예에서, 항체, 상기 항체의 유도체, 및 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 세포독성 제제와의 접합 없이 제공된다 (즉, '네이키드 (naked)').

[0126] 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 글리피칸-1 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan) (GPC-1)에 존재하는 항원 에피토프(antigenic epitope)에 특이적으로 결합할 수 있다. GPC-1 단백질은 인간 글리피칸-1 단백질일 수 있다 (예를 들어, NCBI reference sequence accession no. NP\_002072.2, GenBank accession no. AAH51279.1, GenBank accession no. AAA98132.1, GenBank accession no. EAW71184.1 또는 UniProtKB/Swiss-Prot accession no. P35052.2 중 어느 하나에 기재된 서열로 정의된 바와 같이). 일부 구현예에서 GPC-1 단백질은 신호 펩타이드 및/또는 프로펩타이드(propeptide)를 포함하지 않을 수 있다. 추가적 또는 대안적으로, 단일클론 항체, 유도체, 항원 결합 단편은 GPC-1 변이체 (예를 들어, GPC-1 아이소폼(isoform), 스플라이스 변이체(splice variant) 또는 동종이인자형(allotype))에 존재하는 항원 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.



[0127] 비 제한적 실시예로서, 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 중쇄 및/또는 경쇄, 이의 조합, 또는 이의 구성 요소/들을 포함할 수 있다.

[0128] 적합한 항-GPC1 항체의 비 제한적 실시예는 하기 표 1에 기재된 것들을 포함한다.

표 1

회사	Cat#	반응성	용도	숙주	M/P	결합 특이성	면역원(Immunogen)
R&D	BAF4519	인간	WB, FC	염소	poly	aa24-530	마우스 골수종(myeloma) 세포주 NS0-유래 재조합인간 글리피칸-1, Asp24-Ser530 (Accession# P35052)
Bioss	bs-2426R-Biotin	인간, 마우스, 래트, 개, 소, 말	WB, ELISA, IHC-P&F	토끼	poly		미지의 면역원. 비오틴(Biotin) 결합
Bioss	bs-2426-HRP	인간, 마우스, 래트, 개, 소, 말	WB, ELISA, IHC-P&F	토끼	poly		미지의 면역원. HRP 결합
antibodies-online	ABIN740102	인간, 마우스, 래트, 개, 소, 말	WB, ELISA, IHC-P&F	토끼	poly	C-term	인간 글리피칸 1 C-말단 유래 합성 펩타이드. 비오틴 결합.
antibodies-online	ABIN1174125	인간	IHC, WB, ELISA	토끼	poly		미지의 면역원. 비오틴 결합
antibodies-online	ABIN740109	인간, 마우스, 래트, 개, 소, 말	WB, ELISA, IHC-P&F	토끼	poly	C-term	인간 글리피칸 1 C-말단 유래 합성 펩타이드. 서열 정보 문의(Enquire about sequence info). HRP 결합
antibodies-online	ABIN653109	인간	WB, IHC, FACS, ELISA	토끼	poly	N-term	인간 글리피칸-1의 N-말단으로부터 12-41aa 사이에 KLH 접합된 합성 펩타이드
antibodies-online	ABIN952553	인간	ELISA, IHC-p, WB, FACS	토끼	poly	N-term	인간 글리피칸-1의 N-말단으로부터 12-41aa 사이에 KLH 접합된 합성 펩타이드
antibodies-online	ABIN797896	인간	IHC, WB	토끼	poly	N-term	인간 GPC1의 N-말단 도메인 유래 합성 펩타이드
antibodies-online	ABIN347483	마우스, 래트, 인간	IHC, WB	토끼	poly	N-term	인간 GPC1의 N-말단 도메인 유래 합성 펩타이드
antibodies-online	ABIN347484	인간	IHC, WB, ICC, ELISA	토끼	poly	N-term	인간 GPC1의 N-말단 도메인 유래 합성 펩타이드
antibodies-online	ABIN740100	인간, 마우스, 래트, 개, 소, 말	WB, ELISA, IHC-P&F, IF	토끼	poly	C-term	인간 글리피칸 1 C-말단 유래 합성 펩타이드. 서열 정보 문의.
antibodies-online	ABIN207433	인간	WB, ELISA	토끼	poly	C-term	인간 GPC1 전구체(precursor)의 C-말단 잔기에 상응하는 합성 펩타이드
antibodies-online	ABIN964659	인간, 마우스, 래트	WB, ELISA	토끼	poly	internal region	인간 GPC-1의 내부 영역에 상응하는 합성 펩타이드
antibodies-online	ABIN349638	인간	WB, ELISA	토끼	poly	internal region	인간 GPC1에 상응하는 합성 펩타이드
antibodies-online	ABIN1101824	인간	WB, ELISA	토끼	poly	internal region	인간 GPC-1의 내부 영역에 상응하는 합성 펩타이드

antibodies-online	ABIN595376	인간	WB, ELISA	토끼	poly	internal region	인간 GPC-1의 내부 영역에 상응하는 합성 펩타이드
antibodies-online	ABIN330371	인간	WB, ELISA	염소	poly	aa24-530	NS0-유래 rhGlypican 1 aa24-530
antibodies-online	ABIN1479675	인간	FACS, IHC, WB, ELISA	토끼	poly	aa12-41	KLH 접합된 인간 GPC1의 N-말단 영역 유래 합성 펩타이드

**표 1: 항-GPC1 항체의 비-제한적 실시예**

중쇄 또는 이의 구성 요소/들은 기술분야에서 중쇄 초가변 (HV) 영역(heavy chain hypervariable regions)으로도 알려진, 1, 2 또는 3개의 상보성 결정영역 (CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 중쇄 CDR1은 **서열번호 3**의 50 내지 54 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 중쇄 CDR2는 **서열번호 3**의 69 내지 85 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 중쇄 CDR3는 **서열번호 3**의 118 내지 126 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

추가적 또는 대안적으로, 중쇄 가변 영역은 1, 2, 3 또는 4개의 프레임워크 영역 (FR1, FR2, FR3, 및/또는 FR4)을 포함할 수 있다. 중쇄 FR1은 **서열번호 3**의 20 내지 49 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 중쇄 FR2는 **서열번호 3**의 55 내지 68 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 중쇄 FR3는 **서열번호 3**의 86 내지 117 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 중쇄 FR4는 **서열번호 3**의 127 내지 137 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

추가적 또는 대안적으로, 중쇄 가변 영역은 선도 서열을 포함할 수 있다. 중쇄 선도 서열은 **서열번호 3**의 1 내지 19 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 통상의 기술자는 선도서열이 새로이 합성된 중쇄를 소포체(endoplasmic reticulum)로 운반하는 것을 가능하게 하는 신호 서열임을 알 수 있으며, 이는 단일클론 항체의 최종 조립된 형태의 중쇄에는 일반적으로 존재하지 않는다.

추가적 또는 대안적으로, 경쇄 또는 이의 구성 요소/들은 기술분야에서 경쇄 초가변 (HV) 영역(light chain hypervariable regions)으로도 알려진, 1, 2 또는 3개의 상보성 결정영역 (CDR1, CDR2, CDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 경쇄 CDR1은 **서열번호 4**의 44 내지 54 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 경쇄 CDR2는 **서열번호 4**의 70 내지 76 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 경쇄 CDR3는 **서열번호 4**의 109 내지 117 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

추가적 또는 대안적으로, 경쇄 가변 영역은 1, 2, 3 또는 4개의 프레임워크 영역 (FR1, FR2, FR3, FR4)을 포함할 수 있다. 경쇄 FR1은 **서열번호 4**의 21 내지 43 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 경쇄 FR2는 **서열번호 4**의 55 내지 69 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 경쇄 FR3는 **서열번호 4**의 77 내지 108 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 경쇄 FR4는 **서열번호 4**의 118 내지 127 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

추가적 또는 대안적으로, 경쇄 가변 영역은 선도 서열을 포함할 수 있다. 경쇄 선도 서열은 **서열번호 4**의 1 내지 20 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 통상의 기술자는 선도서열이 새로이 합성된 경쇄를 소포체(endoplasmic reticulum)로 운반하는 것을 가능하게 하는 신호 서열임을 알 수 있으며, 이는 단일클론 항체의 최종 조립된 형태의 경쇄에는 일반적으로 존재하지 않는다.

추가적 또는 대안적으로, 중쇄는 1, 2 또는 3개의 중쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 **서열번호 3**의 138 내지 461 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

추가적 또는 대안적으로, 경쇄는 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 경쇄 불변 영역은 **서열번호 4**의 128 내지 234 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

일부 구현예에서, 본 발명에 따른 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 **서열번호 3**의 20 내지 137 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 단일클론 항

체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 1 또는 2개의 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

- [0140] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 **서열번호 4**의 21 내지 127 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 1 또는 2개의 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0141] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 **서열번호 3**의 20 내지 137 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 영역, 및 **서열번호 4**의 21 내지 127 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 2개의 중쇄 가변 영역 및 2개의 경쇄 가변 영역의 조합을 포함할 수 있다.
- [0142] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 **서열번호 3**의 20 내지 461 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄를 포함할 수 있다. 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 중쇄를 포함할 수 있다.
- [0143] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 **서열번호 4**의 21 내지 234 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄를 포함할 수 있다. 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 1 또는 2개의 경쇄를 포함할 수 있다.
- [0144] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 **서열번호 3**의 20 내지 461 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄, 및 **서열번호 4**의 21 내지 234 잔기로 정의된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄를 포함할 수 있다. 단일클론 항체, 변이체, 유도체 및 항원 결합 단편은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄의 조합을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.
- [0145] 본 발명에 따른 단일클론 항체, 상기 항체의 변이체 및 유도체, 및 이들의 항원 결합 단편은 임의의 특정 아이소타입에 제한되지 않으며, 따라서, IgA (IgA1 또는 IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 또는 IgM 아이소타입일 수 있다. 일부 구현예에서, IgG1 아이소타입이다.
- [0146] 본 발명의 범위 내에 포함되는 것은 부다페스트 조약에 의해 웨스트메드 호주의 NSW 2145, 혹스베리가 214에 위치한 Cellbank Australia에 2014년 8월 22일에 수탁번호 CBA20140026로 제출된 하이브리도마 세포에 의해 생산된 단일클론 항체이다. 하이브리도마는 글리피칸-1 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 (GPC-1)에 존재하는 에피톱에 대해 결합 특이성을 가지는 단일 항체 종을 생산하는 클론 집단(clonal population)이다.
- [0147] 본 발명의 범위 내에 포함되는 것은 본 발명에 기재된 항체의 "단편"이다. 통상적으로, 단편은 이들이 파생되거나 기반을 둔 모 항체와 같은 항원/에피톱 (예를 들어, GPC-1)에 특이적으로 결합이 가능하다는 의미에서 "항원 결합 단편"이다. 일반적으로, 항원 결합 단편은 모 항체의 항원/에피톱 결합능(binding capacity)의 10% 이상을 보유하거나, 또는, 모 항체의 항원/에피톱 결합능의 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100% (또는 그 이상) 이상을 보유한다. 본 발명에 기재된 항체의 항원 결합 단편이 그의 항원/에피톱 결합 특이성/결합능을 실질적으로 변화시키지 않는 (예를 들어, 그의 항원/에피톱 결합 특이성/결합능의 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100% (또는 그 이상) 이상이 유지될 수 있다) 보존적(conservative) 아미노산 치환(substitutions)을 포함할 수 있는 것 또한 고려된다.
- [0148] 항원 결합 단편의 비-제한적 실시예는 예를 들어, Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>3</sub>, Fv, 단쇄 Fv (scFv), dsFv, Fd 단편, dAB 단편 Fse, VH, VL, VhH, 및 V-NAR 도메인, 파라토프(paratopes), CDR 영역, 단쇄 항체 분자 (예를 들어, sc-Fv), 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 카파바디, 선형(linear) 항체, 다가 특이성(multispecific) 항체, 항체 단편으로부터 형성된 도메인 항체, 항체 단편으로부터 형성된 다가 특이성 항체 단편, 및 관련 항원/에피톱 (예를 들어, GPC-1)에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 임의의 일부 또는 펩타이드 서열을 포함하는, 전장의 항체, 펩타이드 및 그의 유도체의 일부를 포함한다.
- [0149] 또한, 본 발명의 범위 내에 포함되는 것은 본 발명에 기재된 항체의 "유도체"이다. 본 발명의 항체의 "유도체(derivative)"는 본 발명에 기재된 항체가 여전히 그가 유래된 모 항체와 같이 동일하게 항원/에피톱 (예를 들어, GPC-1)에 특이적 결합할 수 있으면서, 추가적인 구성 요소를 포함하도록 변형되거나 변형된 기존의 구성 요소/들을 가지는 것을 의미한다. 일반적으로, 본 발명에서 고려되는 바와 같이 항체 유도체는 모 항체의 항원/에피톱 결합 특이성의 10% 이상을, 또는 모 항체의 항원/에피톱 결합 특이성의 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100% (또는 그 이상) 이상을 보유한다.
- [0150] 항체 유도체를 형성하기에 적합한 변형의 비-제한적 실시예는 아미노화(amidation), 글리코실화

(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 폐길화(pegylation), 세포 리간드 또는 다른 단백질과의 연결(linkage), 알려진 보호기/차단기에 의한 유도체화, 아세틸화(acetylation) 등을 포함한다. 추가적 또는 대안적으로, 유도체는 하나 이상의 비-전형적(non-classical) 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 변형은 DOTA, DTPA, NOTA, NODAGA, MeCOSAR, TETA, TRAP, TE2A 및 CBTE2A와 같은 킬레이트제와의 접합을 포함할 수 있다.

[0151] 항체 유도체는 예를 들어, 방사성 요오드(iodine), 인듐(indium), 황(sulphur), 탄소(carbon), 트리튬(tritium) 등으로 표지된 단일클론 항체; 아비딘 또는 비오틴과 접합된 단일클론 항체, 효소와 접합된 단일클론 항체 (예를 들어, 호스래디쉬(horseradish), 글루코즈 6-인산탈수소효소(glucose 6-phosphate dehydrogenase), 글루코즈 산화효소(glucose oxidase), 베타-D-갈락토시다아제(galactosidase), 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 아세틸콜린 에스테라아제(acetylcholine esterase), 카복실산 탈수효소(carboxylic acid anhydrase), 말산 탈수소효소(malate dehydrogenase), 리소자임(lysozyme) 또는 퍼옥시다아제(oxidase)), 및 화학발광제(chemoluminescent agent) (예를 들어, 아크리딘 에스테르(acridine esters)), 생물발광제(bioluminescent agents) (예를 들어, 루시페라아제(luciferase)), 또는 형광제(fluorescent agents) (예를 들어, 피코빌리단백질(phycobiliproteins))와 접합된 단일클론 항체와 같은 표지된 항체를 포함할 수 있다. 항체 유도체의 추가 실시예는 두개의 다른 항원기(antigenic groups)를 인식하는 별개의 두 항체의 부분을 조합해서 생성된 (예를 들어, 재조합 기술 또는 가교(crosslinking)에 의해) 이중특이성(bispecific) 항체와 같은 이관능성(bifunctional) 항체를 포함한다.

[0152] 항체 유도체는 본 발명에서 기재된 항체의 공유 변형(covalent modification), 예를 들어, 항체의 표적 아미노산 잔기를 선택된 측쇄(side chains) 또는 말단 잔기(terminal residues)와 반응시킬 수 있는 시약과의 반응에 의해 형성될 수 있다. 예를 들어, 이관능제(bifunctional agent)로 유도체화(derivatisation)하는 것은 항체 또는 이의 단편을 불수용성 지지 매트리스(water-insoluble support matrices)와 같은 고분자(macromolecular) 담체와 가교하기 유용한 수단이다. 본 발명에서 고려되는 바와 같이, 항체 유도체는 기본 항체 또는 이의 단편에 부착된, 생체 내에서 반감기를 증가시킬 수 있는 약제 (예를 들어, 혈류에서 제거되기 전까지의 시간을 연장시키는)를 가질 수 있다. 그런 기술의 비-제한적인 실시예는 PEG 모이어티의 부가를 포함한다.

[0153] 특정 구현예에서, 항체 유도체는 하나 이상의 모노머를 포함하는, 예를 들어, 이합체와 같은 다합체일 수 있으며, 각각의 모노머는 (i) 본 발명에 기재된 바와 같이 항-GPC-1 항체의 항원-결합 영역 또는 이로부터 유래한 폴리펩타이드 영역 (예를 들어, 하나 이상의 아미노산/들의 보존적 치환에 의해서와 같은), 및 (ii) 다합체화(multimerising) 폴리펩타이드 영역 (예를 들어, 이합체화)를 포함하며, 그래서 항체 유도체가 GPC-1에 특이적으로 결합하는 다합체 (예를 들어, 동종이합체(homodimers))를 형성한다. 예를 들어, 본 발명에서 기재한 바와 같이 항-GPC-1 항체의 항원 결합 영역, 또는 이로부터 유래한 폴리펩타이드 영역은 이종(heterologous) 단백질과 재조합적 또는 키메라적으로 융합될 수 있으며, 상기 이종 단백질은 이합체화(dimerisation) 또는 다합체화(multimerisation) 도메인을 포함한다. 유도체는 동종이합체 또는 이종이합체를 형성하게 하는 조건에 처할 수 있다. 이종이합체는 동일한 이합체화 도메인이지만 항-GPC-1 항원-결합 영역이 다른, 동일한 항-GPC-1 항원-결합 영역이지만 이합체화 도메인이 다른, 또는 다른 항-GPC-1 항원-결합 영역 및 다른 이합체화 도메인을 포함할 수 있다. 적합한 이합체화 도메인은 전사 인자 (예를 들어, 기초 영역 류신 지퍼(basic region leucine zipper)), 기초-영역 헬릭스-루프-헬릭스 단백질(basic-region helix-loop-helix protein), 및 면역글로불린 불변 영역 (예를 들어, 중쇄 불변 영역, 또는 CH1 도메인, CH2 도메인 또는 CH3 도메인과 같은 이의 도메인)에서 유래한 도메인을 포함한다.

[0154] 다른 구현예에서, 항체 유도체는 본 발명에서 기재된 바와 같이 제 2 항체가 접합된 ("항체 이중접합(antibody heteroconjugate)") 항-GPC-1 항체일 수 있다.

[0155] 또한 본 발명에서 기재된 항체의 인간화된 유도체가 고려된다. 본 발명에서 고려된 바와 같이, "인간화된" 항체는 비-인간 면역글로불린에서 유래된 최소한의 서열을 포함하는 인간/비-인간 키메라 항체이다. 예를 들어, 인간화된 항체는 수용 항체의 CDR 영역/들 유래 잔기가 비-인간 종 (공여 항체) (예를 들어, GPC-1 항원/에피토프에 대해 원하는 특이성 및 친화도를 가지는 마우스, 래트, 토끼, 또는 비-인간 유인원)의 CDR 영역 유래 잔기로 교체된 인간 면역글로불린 (수용 항체(recipient antibody))일 수 있다. 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기 또한 상응하는 비-인간 잔기로 (선택적으로) 교체될 수 있고, 일부 경우 인간화된 항체는 항체 성능을 향상시키기 위해 수용 항체 또는 공여 항체에 존재하지 않는 잔기를 포함할 수 있다.

[0156] 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종에서 유래했거나, 특정 항체 클래스(class) 또는 서브클래스에 속하는 본 발명에 기재된 항체의 상응하는 서열에 동일하거나 상동하고, 나머지 쇠/들은 또 다른 다른 종에서 유래하거나



또 다른 다른 항체 클래스 또는 서브클래스(subclass)에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동한 "키메라" 항체 유도체가 고려된다. 예를 들어, 본 발명에서 고려된 바와 같이 키메라 항체는 본 발명에 기재된 바와 같이 항-GPC-1 단일클론 항체로부터 유래된 가변 영역, 및 두 번째 종으로부터 유래한 불변 영역을 포함할 수 있다. 키메라 항체는, 예를 들어, 다른 종에 속하는 면역글로불린 유전자 분절의 유전자 조작으로 생성될 수 있다. 키메라 항체 및 이의 항원-결합 단편은 본 발명에 기재된 바와 같이 세포독성 제제와 접합되거나 접합되지 않을 수 있다.

[0157] 오직 비-한정적인 실시예로서, 본 발명에 따른 키메라 항체는 키메라 마우스 인간 CH1-CH3쇄 서열 마우스 VH-인간 CH1-CH3쇄 (중쇄) 및/또는 마우스 인간 카파(Kappa)쇄 서열 마우스 VK-인간 CK 서열 MIL-38 마우스 VK (경쇄)를 포함할 수 있다. 키메라 항체의 중쇄는 **서열번호 7**의 20 내지 467 잔기로 기재되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 키메라 항체의 경쇄는 **서열번호 8**의 21 내지 234 잔기로 기재되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 중쇄 가변 영역은 **서열번호 7**의 50 내지 54 위치로 정의되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 1 (CDR1); 및/또는 **서열번호 7**의 69 내지 85 위치로 정의되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 2 (CDR2); 및/또는 **서열번호 7**의 118 내지 126 위치로 정의되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함할 수 있다. 추가적 또는 대안적으로, 경쇄 가변 영역은 **서열번호 8**의 44 내지 54 위치로 정의되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 1 (CDR1); 및/또는 **서열번호 8**의 70 내지 76 위치로 정의되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 2 (CDR2); 및/또는 **서열번호 8**의 109 내지 117 위치로 정의되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 상보성 결정 영역 3 (CDR3)을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 키메라 항체는 상기 키메라 항체의 "변이체"일 수 있다.

[0158] 본 발명의 범위 내에 포함되는 것은 본 발명에 기재된 항체의 "변이체"이다. "변이체" 항체는 모 항체 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기/들의 삽입, 결실 및/또는 치환에 의해 "모(parent)" 항-GPC-1 항체 아미노산 서열과 아미노산 서열이 상이한 항체를 의미한다. 예를 들어, 항체 변이체(variant antibody)는 모 항체의 하나 이상의 CDR 및/또는 프레임워크 영역/들에 하나 이상의 아미노산 치환/들 (예를 들어, 모 항체의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR 및/또는 프레임워크 영역에 1 내지 10, 2 내지 5, 또는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환)을 포함할 수 있다. 항체 변이체는 중쇄 가변 도메인 서열 및/또는 경쇄 가변 도메인 서열 아미노산 서열은 모 항체의 상응하는 가변 도메인과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 98% 이상의 아미노산 서열 상동성 (즉, 동일한 서열)을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0159] 본 발명에서 두 서열간의 서열 상동성 또는 동일성(identity)은, 필요할 경우 최대 퍼센트의 서열 동일성을 달성하기 위해, 서열 정렬(aligning) 및 갭(gaps) 도입 후에, 모 항체 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율(percentage)로 정의된다. 서로 비교할 두 서열의 길이가 서로 다른 경우, 서열 동일성은 더 긴 서열의 아미노산 서열 잔기와 동일한 더 짧은 서열의 아미노산 잔기의 백분율에 관한 것이다. 서열 동일성은 통상적으로 Bestfit 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711) 및/또는 프로그램 "fasta20u66" (version 2.0u66, September 1998 by William R. Pearson and the University of Virginia; 또한 W. R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98 참조)과 같은 컴퓨터 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다.

[0160] 일부 구현예에서, 본 발명에서 기재된 바와 같이 항체 변이체(variant antibody)는 가변 항체(variable antibody)의 서열 내에서의 보존적 아미노산 변이를 통해 모 항체와 상이할 수 있다. "보존적 변이 (conservative change)"는 실질적으로 모 항체와 비교해, 항체 변이체(variant antibody)의 3차 구조에서 최소한의 변이를 발생시키거나, 항체 변이체(variant antibody)의 항원 결정기(antigenic determinants)에서의 최소한의 변이를 발생시키는, 항원적으로(antigenically) 또는 입체적으로(conformationally) 중성이고, 모 항체 처럼 GPC-1 내의 동일한 에피토프에 결합할 수 없는 변이체를 만들지 않는 변화(alteration)를 의미한다. 보존적 아미노산 변이의 비-제한적 실시예는 소수성 아미노산의 치환 및 물리화학적으로 유사한 아미노산의 치환을 포함한다. 기술분야에 속하는 통상의 기술자는 일상적으로 그리고 어려움 없이 구조적으로 그리고 항원 중립성을 유지하면서 주어진 아미노산 치환이 이루어지는지 평가할 수 있다 (예를 들어, Berzofsky, (1985) Science 229:932-940; Bowie *et al.* (1990) Science 247:1306-1310 참조). 단백질 구조에서의 변화가 마이크로컴플리멘트 고정 방법(microcomplement fixation methods) (Wasserman *et al.* (1961) J. Immunol. 87:290-295; Levine *et al.* (1967) Meth. Enzymol. 11:928-936 참조)를 포함한 공지된 분석을 이용해서, 그리고 구조-의존적 (conformation-dependent) 단일클론 항체를 이용한 결합 분석 (Lewis *et al.* (1983) Biochem. 22:948-954

참조)을 통해 달성될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 보존적 아미노산 변이/들은 모 항체의 하나 이상의 CDR 및/또는 프레임워크 영역/들에서 일어날 수 있다 (예를 들어, 모 항체의 하나 이상의 CDR 및/또는 프레임워크 영역 내에서 1 내지 10, 2 내지 5, 또는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 보존적 치환).

[0161] 통상적으로, 본 발명에서 고려된 바와 같이 인간화된 항체, 키메라 항체, 항체 유도체, 항체 단편 및 항체 변이체는 여전히, 이들이 파생된 또는 이들이 이의 구성 요소/들을 포함하는 모 항체처럼 동일한 항원/에피토프 (예를 들어, GPC-1)에 특이적으로 결합할 수 있다. 일반적으로, 이들은 모 항체의 항원/에피토프 결합 능력의 10% 이상, 또는, 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100% (또는 그 이상) 이상을 보유할 수 있다. 예를 들어, 이들은 모 항체에 비해 더 강한 결합 친화도 및/또는 결합 특이성을 가질 수 있다.

[0162] 항체 단편, 유도체 또는 변이체의 모 항체에 의해 표적화되는 항원/에피토프 (즉, GPC-1 항원/에피토프)에 대한 특이적 결합능은 예를 들어, 웨스턴 블롯(Western blots), 방사성면역분석법(radioimmunoassays), 효소면역분석법(enzyme linked immunosorbent assay) (ELISA), 면역침전법(immunoprecipitation assays), "샌드위치(sandwich)" 면역분석법(immunoassays), 면역확산 분석법(immunodiffusion assays), 침전 반응(precipitin reactions), 단백질 A 면역분석법, 형광 면역분석법(fluorescent immunoassays), 젤확산침전반응(gel diffusion precipitin reactions), 보체-고정 분석법(complement-fixation assays), 면역방사측정법(immunoradiometric assays), 응집 분석법(agglutination assays) 등 같은 기술을 이용한 경쟁적 및 비-경쟁적 분석 시스템을 포함하는 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 테스트될 수 있다 (예를 들어, Ausubel *et al.*, eds., *Short Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., New York, 4th ed. 1999); Harlow & Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999) 참조).

[0163] 본 발명의 범위 내에 특별히 포함되는 것은 본 발명에서 기재된 본 발명에서 특정 서열로 정의된 항체 (키메라 항체 포함) 및 항원 결합 단편을 포함하는 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 변이체, 및 부다페스트 조약에 의해 웨스트메드 호주의 NSW 2145, 혹스베리가 214에 위치한 Cellbank Australia에 2014년 8월 22일에 수탁번호 CBA20140026로 제출된 하이브리도마를 포함하는 본 발명에서 기재한 하이브리도마에 의해 생산된 항체이다.

#### [0164] 세포독성 제제

[0165] 본 발명에 따른 항체 및 이의 항체-결합(antibody-binding) 단편은 하나 이상의 세포독성 제제와 접합될 수 있다. 세포독성 제제는 임의의 화합물일 수 있고, 예를 들어 세포 기능 저해하는 것과 같은, 세포 (예를 들어, 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포)에 유독하고, 직접적 및/또는 간접적 세포 사멸을 야기하는 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0166] 세포독성 제제는 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포에 직접적으로 독성을 유발하거나 세포사멸을 유발할 수 있다. 또한, 방사성 표지의 경우, 방사능이 DNA 손상을 유발하여 세포 성장 정지, 세포사멸(apoptosis) 유발 또는 세포사의 결과를 야기할 수 있다.

[0167] 향상된 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암의 사멸은 사멸된 또는 사멸되고 있는 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 세포 유래 단백질의 면역적 인지(immune recognition)가 원인이고, 이로 인해 "면역화(immunisation)" 효과를 야기한다.

[0168] 적합한 세포독성 제제의 비-제한적인 실시예는 아파티닙(afatinib), 아플리딘(aplidin), 아나스트로졸(anastrozole), 안트라사이클린(anthracyclines), AVL-101, AVL-291, 엑시티닙(axitinib), 아자리빈(azaribine), 벤다무스틴(bendamustine), 블레오마이신(bleomycin), 보테조밍(bortezomib), 보수티닙(bosutinib), 브리오스타틴-1(bryostatatin-1), 부숄판(busulfan), 캄토테신(camptothecins), 카르보플라틴(carboplatin), 칼리키아마이신(calicheamycin), 캄토테신(camptothecin), 카르보플라틴(carboplatin), 카무스틴(carmustine), 셀레코시브(celecoxib), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatinum), 클라드리빈(cladribine), COX-2 억제제, 크리조티닙(crizotinib), 시아노-몰폴리노 독소루비신(cyano-morpholino doxorubicin), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 시타라빈(cytarabine), 다카르바진(dacarbazine), 닥티노마이신(dactinomycin), 다사티닙(dasatinib), 다우노루비신(daunorubicin), 다이나시실립(dinaciclib), 3',5'-O-디올레오일(dioleoyl)-FudR (FudR-dO), DM1, DM3, DM4, 도세탁셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 독소루비신 글루쿠로나이드(doxorubicin glucuronide), 듀오카마이신(duocarmycin), 엔도스타틴(endostatin), 엔티노스테트(entinostat), 에피도필로톡신(epidophyllotoxin), 에피루비신 글루쿠로나이드



(epirubicin glucuronide), 엘로티닙(erlotinib), 에스트라무스틴(estramustine), 에스트로겐 수용체 결합제 (estrogen receptor binding agents), 에토포사이드 글루쿠로나이드(etoposide glucuronide), 에토포사이드 포스페이트(etoposide phosphate), 에토포사이드(etoposide) (VP16), 엑스메스탄(exemestane), 파네실-단백질 트랜스퍼라아제 억제제(farnesyl-protein transferase inhibitors), 팅고리모드(fingolimod), 플라보피리돌(flavopiridol), 플록스우리딘(floxuridine) (FUDR), 플루다라빈(fludarabine), 5-플루오로우라실(flourouracil), 플루타마이드(flutamide), 포스타마티닙(fostamatinib), 가네테스피브(ganetespib), GDC-0834, 제피티닙(gefitinib), 젬시타빈(gemcitabine), GS-1101, 10-하이드록시캠토테신(hydroxycamptothecin), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이브루티닙(ibritinib), 아이다루비신(idarubicin), 이데탈리십(idelalisib), 아이포스파마이드(ifosfamide), 이마티닙(imatinib), 이리노테칸(irinotecan) (CPT-11), 라파티닙(lapatinib), 레노리다마이드(lenolidamide), 류코보린(leucovorin), LFM-A13, 로무스틴(lomustine), 메클로레타민(mechlorethamine), 멜팔란(melphalan), 머캅토피린(mercaptapurine), 6-머캅토피린(mercaptapurine), 메토티렉세이트(methotrexate), 미스라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 마이토테인(mitotane), 미토산트론(mitoxantrone), 모노메틸우레스타틴(monomethylauristatin) D (MMAD), 모노메틸우레스타틴 E (MMAE), 모노메틸우레스타틴 F (MMAF), 나벨빈(navelbine), 네라티닙(neratinib), 니로티닙(nilotinib), 니트로수우레아(nitrosurea), 올라파립(olaparib), 파클리탁셀(paclitaxel), PCI-32765, 펜토스타틴(pentostatin), 플리코마이신(plicomycin), 2-PDox 프로드러그(pro-drug) (pro-2-PDox), 프로카바진(procarbazine), PSI-341, 2-피롤리노독소루비신(pyrrolinodoxorubicine) (2-PDox), 라록시펜(raloxifene), 세무스틴(semustine), SN-38, 소라페닙(sorafenib), 스트렙토조신(streptozocin), SU1 1248, 수니티닙(sunitinib), 타목시펜(tamoxifen), 테마졸로마이드(temazolomide), 테니포사이드(teniposide), 탈리도마이드(thalidomide), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 토포테칸(topotecan), 트랜스플레티늄(transplatinum), 우라실 머스타드(uracil mustard), 바타라닙(vatalanib), 빈플라스틴(vinblastine), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 빈크리스틴(vincristine), 비노렐빈(vinorelbine) 및 ZD 1839를 포함한다.

[0169] 추가적 또는 대안적으로, 세포독성 제제는 방사성동위원소일 수 있다. 적합한 방사성동위원소의 비-제한적 실시예는 <sup>90</sup>Y, <sup>188</sup>Re, <sup>166</sup>Ho, <sup>165</sup>Dy, <sup>109</sup>Pd, <sup>111</sup>Ag, <sup>186</sup>Re, <sup>198</sup>Au, <sup>153</sup>Sm, <sup>64</sup>Cu, <sup>177</sup>Lu, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>67</sup>Cu, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Dy, <sup>169</sup>Er, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Pb, <sup>66</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>86</sup>Y, <sup>94m</sup>Tc 및 <sup>89</sup>Zr를 포함한다.

[0170] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 세포독성 제제 또는 약제(들)와 직접적으로 접합된다.

[0171] 다른 구현예에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 세포독성 제제 또는 약제(들)와 직접적으로 접합된다 (예를 들어, DOTA, DTPA, NOTA, NODAGA, MeCOSAR, TETA, TRAP, TE2A, CBTE2A 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 킬레이트제를 통해).

# [0172] **접합된 항체 생산(production)**

[0173] 단일클론 항체, 이의 유도체 및 변이체, 및 이의 항원 결합 단편의 제조 방법은 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 입수할 수 있고 어렵지 않게 수행할 수 있다.

[0174] Kohler 등 (1975)의 하이브리도마 방법의 일부 및 상기 "하이브리도마" 제목 섹션에서 기재한 것과 별개로, 이 용될 수 있는 또 다른 비-제한적 방법은 재조합 DNA 기술이다 (예를 들어, US Patent No. 4816567 참조). 예를 들어, 단일클론 항체, 이의 유도체 및 변이체, 및 이의 항원 결합 단편은 바칼로바이러스(baculovirus), 효모(yeast) (예를 들어, *Pichia* sp., *Saccharomyces* sp.), *E. coli*, 포유동물 세포(mammalian cells), 식물(plants) 또는 형질전환 동물(transgenic animals)을 포함하는 잘-수립된 임의의 발현 시스템 (Breitling and Dubel, 1999, Recombinant Antibodies, John Wiley & Sons, Inc., NY, pp. 119-132) 참조)에서 재조합적으로 생산될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0175] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 단일클론 항체, 이의 유도체 및 변이체, 및 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산 서열은 재조합 DNA 기술에 기초한 생산 공정에 이용될 수 있다. 비-제한적 실시예는 **서열번호 1**로 정의된 중쇄 폴리뉴클레오티드(polynucleotide) 서열 또는 이의 변이체 또는 단편, 및/또는 **서열번호 2**로 정의된 경쇄 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함한다.

[0176] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 "변이체"는 모 서열 또는 참조(reference) 폴리뉴클레오티드 서열과 다른 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 폴리뉴클레오티드 서열 차이(divergence)는 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 치환 또는 삽입과 같은 돌연변이적 변이에 의한 것일 것이다. 이러한 각각의 변이는 단독으로 또는 조합되어 주어진 서열에서 한 번 이상 일어날 수 있다. 폴리뉴클레오티드 "변이체"는 모 폴리뉴클레오티드 또는 참조 폴리뉴클레오티드

드와 실질적으로 유사한 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 통상적으로, 두 서열이 동일한 특정 핵분율의 뉴클레오티드 (서열 "상동성" 또는 서열 "동일성"의 핵분율)를 가지면 두 서열이 "실질적으로 유사(substantially similar)"하다. 본 발명에서 두 폴리뉴클레오티드 서열 간의 서열 상동성 또는 동일성은, 필요할 경우 최대 퍼센트의 서열 동일성을 달성하기 위해, 서열 정렬(aligning) 및 갭(gaps) 도입 후에, 모/참조 폴리뉴클레오티드 서열의 핵분율과 동일한 후보 ("변이체") 뉴클레오티드 서열의 핵분율로 정의된다. 서로 비교할 두 서열의 길이가 서로 다른 경우, 서열 동일성은 더 긴 서열의 뉴클레오티드와 동일한 더 짧은 서열의 뉴클레오티드의 핵분율에 관한 것이다. 서열 동일성은 통상적으로 Bestfit 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711) 및/또는 프로그램 "fasta20u66" (version 2.0u66, September 1998 by William R. Pearson and the University of Virginia; 또한 W. R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98 참조)과 같은 컴퓨터 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 변이체 및 참조/모 폴리뉴클레오티드 사이의 서열 상동성/동일성의 정도는, 예를 들어, 75%, 80%, 83%, 85%, 88%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 수 있다.

[0177] 폴리뉴클레오티드 "단편"은 큰 모/참조 폴리뉴클레오티드의 구성 요소(constituent)를 암호화하는 또는 이의 구성 요소인 폴리뉴클레오티드 분자이다. 통상적으로, 단편은 본 발명의 항체의 단편을 암호화할 것이며, 단편은 GPC-1에 특이적으로 결합이 가능하다.

[0178] 본 발명에 따라 생산된 단일클론 항체, 이의 유도체 및 변이체, 및 이의 항원 결합 단편은 면역글로불린-결합 분자(immunoglobulin-binding molecules) (예를 들어, 단백질 A, L, G 또는 H), 항체 또는 항체 단편과 작동 가능하게 연결된 태그(tags) (예를 들어, His-태그, c-myc 태그), 친화 크로마토그래피(affinity chromatography) 등을 포함하는 적합한 방법을 이용하여 다양한 출처(source)로부터 분리될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0179] 본 발명에서 기재한 바와 같이 단일클론 항체, 이의 유도체 및 변이체, 및 이의 항원 결합 단편은 예를 들어, 상기 "하이브리도마" 제목의 섹션에서 기재한 것과 같은 단일 또는 혼합된 집단의 하이브리도마를 포함하는 하이브리도마 및/또는 세포 배양 후, 공지된 기술을 이용하여 분리함으로써 생산될 수 있다. 일부 구현예에서, 단일클론 항체는 부다페스트 조약에 의해 수탁번호 CBA20140026로 Cellbank Australia 에 기탁된 단일 (단일클론의) 종의 하이브리도마 세포를 배양하고, 배양액으로부터 분리함으로써 생산될 수 있다.

[0180] 하이브리도마 세포주의 제조 및 배양, 및 생산된 항체의 분리 공정은 기술분야의 통상의 기술자에게 자명하며 표준 공정이다.

[0181] 본 발명에 따른 항체 및 이의 항체-결합(antibody-binding) 단편은 하나 이상의 세포독성 제제와 접합될 수 있다. 세포독성 제제를 항체 및 이의 항원 결합 단편에 접합하는 방법은 기술분야의 통상의 기술자에게 자명하다 (예를 들어, Zhang *et al.* PLOS One December 2011, Volume 6 Issue 12 참조).

## [0182] **의약 및 약학적 조성물**

[0183] 본 발명에 따른 의약 및 약학적 조성물은 항체 및 이의 항체-결합(antibody-binding) 단편을 포함하며, 본 발명에 기재한 바와 같이 하나 이상의 세포독성 제제와 접합될 수 있거나, 또는 이와 달리 이러한 약제 없이 (즉, 네이키드) 제공될 수 있다. 의약 및 약학적 조성물은 방법을 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 방법의 비-제한적인 실시예가 Gennaro *et al.* (Eds), (1990), "*Remington's Pharmaceutical Sciences*", Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, USA에 기재되었다.

[0184] 의약 및 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 희석제 및/또는 보조제를 포함할 수 있다. 본 발명에서 고려하는 바와 같이 "약학적으로 허용 가능한(Pharmaceutically acceptable)" 담체, 의약 및 약학적 조성물, 희석제 및/또는 보조제는 인간 또는 비-인간 동물과 같은 특정 수용자에게 투여했을 때 부작용(들)이 발생하지 않는 물질이다. 약학적으로 허용 가능한 담체, 의약 및 약학적 조성물, 희석제 및 보조제는 일반적으로 의약 및 약학적 조성물의 다른 성분들과 양립할 수 있다. 적합한 의약 및 약학적 조성물, 희석제 및 담체의 비-제한적 실시예는 "*Handbook of Pharmaceutical Excipients*" 4th Edition, (2003) Rowe *et al.* (Eds), The Pharmaceutical Press, London, American Pharmaceutical Association, Washington에서 찾아볼 수 있다.

[0185] 약학적으로 적합한 담체, 의약 및 약학적 조성물 또는 희석제의 비-제한적인 실시예는 탈염수(demineralised water) 또는 증류수(distilled water); 생리식염수(saline solution); 땅콩 오일(peanut oil), 홍화 오일(safflower oil), 올리브유(olive oil), 면실유(cottonseed oil), 옥수수유(maize oil), 참깨 오일(sesame oils), 아라키스 오일(arachis oil) 또는 코코넛 오일(coconut oil)과 같은 식물성 오일; 메틸 폴리실록산

(methyl polysiloxane), 페닐 폴리실록산(phenyl polysiloxane) 및 메틸페닐 폴리실록산(methylphenyl polysiloxane)과 같은 폴리실록산(polysiloxanes)을 포함하는 실리콘 오일(silicone oils); 휘발성 실리콘(volatile silicones); 액체 파라핀, 연질 파라핀(soft paraffin) 또는 스쿠알렌(squalene)과 같은 미네랄 오일; 메틸 셀룰로오스(methyl cellulose), 에틸 셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose), 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스(sodium carboxymethylcellulose) 또는 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(hydroxypropylmethylcellulose)와 같은 셀룰로오스 유도체; 저급 알칸올, 예를 들어, 에탄올 또는 이소프로판올; 저급 아랄카놀(aralkanol); 저급 폴리알킬렌 글리콜(polyalkylene glycols) 또는 저급 알킬렌글리콜(alkylene glycols), 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol), 에틸렌 글리콜(ethylene glycol), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 1,3-부틸렌 글리콜(1,3-butylene glycol) 또는 글리세린(glycerine); 이소프로필 팔미테이트(isopropyl palmitate), 이소프로필 미리스테이트(isopropyl myristate) 또는 에틸 올레이트(ethyl oleate)와 같은 지방산 에스테르(fatty acid esters); 폴리바이닐피리돈(polyvinylpyrrolidone); 아가(agar); 카라기난(carrageenan); 검 트라가칸트(gum tragacanth) 또는 검 아카시아(gum acacia) 및 펠트룰럼 젤리(petroleum jelly)를 포함한다. 일반적으로, 담체 또는 담체들은 조성물 중량의 10% 내지 99.9%를 형성할 것이다.

[0186] 본 발명의 의약 및 약학적 조성물은 주사에 의한 투여에 적합한 형태, 경구 투여에 적합한 제형의 형태 (예를 들어, 캡슐, 정제, 당의정, 엘릭서와 같은), 연고의 형태, 국소 투여에 적합한 크림 또는 로션, 눈에 점적하여 전달하기 적합한 형태, 비강 흡입 또는 경구 흡입과 같은 흡입 투여에 적합한 에어로졸 형태, 또는 비경구 투여, 즉, 피내(intradermal), 피하(subcutaneous), 근육내(intramuscular) 또는 정맥내(intravenous) 주사에 적합한 형태 일 수 있다.

[0187] 경구 투여를 위한 의약 및 약학적 조성물의 고체 형태는 인간 및 동물용 의약품 통례(pharmaceutical practice)에서 허용가능한 결합제(binders), 감미제(sweeteners), 붕해제(disintegrating agents), 희석제(diluents), 향료(flavourings), 코팅제(coating agents), 방부제(preservatives), 윤활제(lubricants) 및/또는 시간 지연제(time delay agents)를 포함할 수 있다. 적합한 결합제는 검 아카시아, 젤라틴(gelatine), 옥수수 전분(corn starch), 검 트라가칸트, 알긴산나트륨(sodium alginate), 카르복시메틸셀룰로오스 또는 폴리에틸렌글리콜을 포함한다. 적합한 감미제는 수크로즈(sucrose), 락토오즈(lactose), 글루코즈(glucose), 아스파탐(aspartame) 또는 사카린(saccharine)을 포함한다. 적합한 붕해제는 옥수수 전분, 메틸셀룰로오스, 폴리바이닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 구아검(guar gum), 잔탄검(xanthan gum), 벤토나이트(bentonite), 알긴산(alginic acid) 또는 아가(agar)를 포함한다. 적합한 희석제는 락토오즈, 솔비톨(sorbitol), 만니톨(mannitol), 덱스트로즈(dextrose), 카올린(kaolin), 셀룰로오스, 탄산 칼슘(calcium carbonate), 칼슘 실리케이트(calcium silicate) 또는 인산2칼슘(dicalcium phosphate)을 포함한다. 적합한 향료는 페퍼민트 오일(peppermint oil), 윈터그린 오일(oil of wintergreen), 체리, 오렌지 또는 라즈베리 향료(flavouring)를 포함한다. 적합한 코팅제는 아크릴산 및/또는 메타크릴산(methacrylic acid)의 중합체(polymer) 또는 공중합체(copolymer) 및/또는 이들의 에스테르(esters), 왁스(waxes), 지방알코올(fatty alcohols), 제인(zein), 셀락(shellac) 또는 글루텐(gluten)을 포함한다. 적합한 방부제는 나트륨 벤조에이트(sodium benzoate), 비타민 E, 알파-토코페롤(tocopherol), 아스코르브산(ascorbic acid), 메틸 파라벤(methyl paraben), 프로필 파라벤(propyl paraben) 또는 아황산 수소 나트륨(sodium bisulphite)을 포함한다. 적합한 윤활제는 스테아르산 마그네슘(magnesium stearate), 스테아르산(stearic acid), 올레산 나트륨(sodium oleate), 염화나트륨(sodium chloride) 또는 탈크(talc)를 포함한다. 적합한 시간 지연제는 글리세릴 모노스테아레이트(glyceryl monostearate) 또는 글리세릴 디스테아레이트(glyceryl distearate)를 포함한다.

[0188] 경구 투여를 위한 의약 및 약학적 조성물의 액체 형태는 상기 약제에 추가로 액체 담체를 함유할 수 있다. 적합한 액체 담체는 물, 땅콩 오일, 참깨 오일, 해바라기유, 홍화 오일, 아라키스 오일, 코코넛 오일, 올리브유와 같은 오일, 액체 파라핀, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 글리세롤, 지방산 알코올, 트리글리세라이드(triglycerides) 또는 이의 혼합물을 포함한다.

[0189] 경구 투여를 위한 현탁액은 분산제(dispersing agents) 및/또는 현탁제(suspending agents)를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 현탁제는 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스(hydroxypropylmethyl-cellulose), 폴리-바이닐-피롤리돈(poly-vinyl-pyrrolidone), 알긴산 나트륨 또는 아테실 알코올을 포함한다. 적합한 분산제는 레시틴(lecithin), 스테아르산, 폴리옥시에틸렌 솔비톨 모노- 또는 디-올레이트, -스테아레이트(stearate) 또는 -라우레이트(laurate), 폴리옥시에틸렌 솔비탄(polyoxyethylene sorbitan) 모노- 또는 디-올레이트, -스테아레이트 또는 -라우레이트와 같은 지방산의 폴리옥시에틸렌 에스테르

(polyoxyethylene esters) 등을 포함한다.

- [0190] 의약 및 약학적 조성물을 주사 가능한 용액 또는 현탁액으로서 제조하기 위해, 링거 용액(Ringer's solution), 등장식염수(isotonic saline), 인산완충식염수(phosphate buffered saline), 에탄올 및 1,2 프로필렌 글리콜과 같은 비경구적으로 허용 가능한 비-독성 희석제 또는 담체가 사용될 수 있다.
- [0191] 경구 투여를 위한 에멀전(Emulsions)은 유화제(emulsifying agents)를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 유화제는 상기 예시된 바와 같은 분산제 또는 구아검, 검 아카시아 또는 검 트라가칸트와 같은 천연 고무(gum)를 포함한다.
- [0192] 국소 제제(Topical formulations)는 유효 성분(active ingredient)(들) (예를 들어, 즉, 본 발명의 항체 및/또는 이의 항원-결합 단편)과 함께 선택적으로 다른 치료 성분들(therapeutic ingredients)을 포함한다. 국소 투여에 적합한 제제는 치료가 요구되는 위치의 피부를 통한 침투에 적합한, 연고제(liniments), 로션(lotions), 크림(creams), 연고(ointments) 또는 페이스트(pastes), 및 눈, 귀 또는 코로 투여하기에 적합한 점적액(drops)과 같은 액체 또는 반-액체 제제를 포함한다.
- [0193] 점적액으로 제제화되었을 경우, 의약 및 약학적 조성물은 멸균 수성 또는 유성 용액 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 이들은 유효 성분을 살균(bactericidal)제 및/또는 항진균제(fungicidal agent) 및/또는 임의의 다른 적합한 방부제, 및 선택적으로 계면활성제(surface active agent)를 포함하는 수성 용액에 용해시켜 제조될 수 있다. 그 후 생성된 용액은 여과에 의해 정제되어 적합한 용기에 옮겨지고 멸균될 수 있다. 예를 들어, 멸균(sterilisation)은 여과 후 무균 기술에 의해 용기에 옮겨짐으로써 달성될 수 있다. 점적액에 포함되기에 적합한 살균제 및 진균제의 실시예는 페닐머큐릭(phenylmercuric) 나이트레이트(nitrate) 또는 아세테이트(0.002%), 벤잘코늄클로라이드(benzalkonium chloride) (0.01%) 및 클로로헥시딘 아세테이트(chlorhexidine acetate) (0.01%)이다. 유성 용액의 제조에 적합한 용매는 글리세롤, 희석된 알코올 및 프로필렌 글리콜을 포함한다.
- [0194] 크림, 연고 또는 페이스트로 제제화되는 경우, 의약 및 약학적 조성물은 외부 적용을 위한 유효 성분의 반-고체 제형일 수 있다. 이들은 미분(finely-divided) 또는 분말(powdered) 형태의 유효 성분을 단독으로 또는 수용성 또는 비수성 유체의 용액 또는 현탁액에 녹여서 지성(greasy) 또는 비-지성(non-greasy) 베이스(basis)와 혼합함으로써 만들어질 수 있다. 베이스는 프로필렌 글리콜 또는 마크로폴(macrogols)과 같은 알코올과 함께 경질, 연질 또는 액체 파라핀, 글리세롤, 비즈왁스(beeswax), 금속 비누(metallic soap)와 같은 하이드로카본(hydrocarbons); 점액(mucilage); 아몬드 오일, 옥수수 오일, 아라키스 오일, 피마자(castor) 오일 또는 올리브 오일과 같은 천연 유래 오일; 양모지(wool fat) 또는 이의 유도체, 또는 스테아릭산 또는 올레익산과 같은 지방산을 포함한다.
- [0195] 의약 및 약학적 조성물은 솔비탄 에스테르 또는 이의 폴리옥시에틸렌 유도체와 같은, 음이온성, 양이온성 또는 비-이온성 계면활성제와 같은 적합한 계면활성제(surfactant)를 포함할 수 있다. 천연 고무, 셀룰로오스 유도체 또는 규산질 실리카(siliceous silicas)와 같은 무기재료, 및 라놀린(lanolin)과 같은 다른 성분과 같은 현탁제 또한 포함될 수 있다.
- [0196] **전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 치료 방법**
- [0197] 본 발명에 따르면, 네이키드 또는 하나 이상의 세포독성 제제와 접합된 항체 및 이의 항체-결합(antibody-binding) 단편은 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암의 치료에 적합하다. 항체 및/또는 이의 단편은 본 발명에 기재된 바와 같이 약학적 조성물 또는 의약의 구성 요소로서 투여될 수 있다.
- [0198] 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암을 가진 또는 이로 발달될 위험을 가진 개체를 판별하는 것은 기술분야의 통상의 기술자에게 자명하다. 예를 들어, 전립선암에 적합한 방법론(methodolog)의 경우, 디지털 직장 검사(digital rectal exam), PSA-기반 분석 및 전립선 생검을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0199] 양성 전립선 종양 (암성이 아닌) 및 악성 전립선 종양 (암성(cancerous)) 사이의 구별 인자 중 하나는 전이(metastasis) 가능한 암의 형태이다. 전이는 암세포가 신체의 다른 부위로 확산되는 (전이) 능력이다. 환자의 전립선암은 원발 종양의 크기 및 정도 (T), 주변 림프절로의 암의 확산 (N), 및 원발 종양의 신체의 다른 부분으로의 전이에 의한 이차 종양 형성 (M)에 따라 암을 분류한 **TNM Classification of Malignant Tumours (TNM)** (미국 암 학회(American Cancer Society))에 따라 단계(Stage)로 분류된다. 표 2는 각각의 암 단계에 대한 정의 예시를 나타낸다.



표 2

단계(Stage)	정의(Definition)
단계 0	동소발생암(Carcinoma in situ)
단계 I, 단계 II 및 단계 III	숫자가 높아질수록 더욱 광범위한 질병을 나타냄: 더 큰 종양 크기 및/또는 인근 림프절 및/또는 원발암의 위치에 인접한 조직 또는 기관으로 처음 발달되는, 기관을 넘어선 암의 확장
단계 IV	암이 멀리 떨어진 조직 또는 기관으로의 확장됨

표 2. 미국 암 학회에 의해 채용된 TNM 시스템의 암 단계에 대한 정의.

상기 방법이 개체에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암의 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명으로 치료될 수 있는 전립선암의 비-제한적인 실시예는 전립선상피내종양(prostatic intraepithelial neoplasia), 선암(adenocarcinoma), 평활근육종(leiomyosarcoma) 및 횡문근육종(rhabdomyosarcoma)을 포함한다. 본 발명으로 치료될 수 있는 방광암 및/또는 췌장암의 비-제한적인 실시예는 미국암연합위원회(American Joint Committee on Cancer) (AJCC) 'TNM system'에 기재된 바와 같이, T 카테고리, N 카테고리 및 M 카테고리의 방광암, 근침윤성 방광암(muscle invasive bladder cancer) 및 비-근육침윤성 방광암을 포함한다.

본 발명에 기재된 방법의 맥락에서 "치료"는 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암과 관련된 증상을 전부 또는 일부 경감시키거나, 이들의 증상이 더 이상 진행 또는 악화되는 것을 지연, 억제 또는 정지시키는 것, 또는 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암의 예방(prevention)을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암의 치료는 예를 들어, 암 전이의 억제 또는 예방, 전이 속도 및/또는 수의 감소, 전이된 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암의 종양 부피 감소, 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암의 완전한 또는 부분적인 완화, 또는 다른 치료 효과(들)을 포함할 수 있다.

항체 및/또는 이의 항체-결합(antibody-binding) 단편의 투여에 의해 이익을 얻을 수 있는 개체는 임의의 동물일 수 있다. 일부 구현예에서, 개체는 포유동물이다, 예를 들어, 인간, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 유인원 또는 설치류 (예를 들어, 래트 또는 마우스)

방법은 "치료적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"의 본 발명에 따른 항체 및 이의 항체-결합(antibody-binding) 단편의 투여를 수반할 수 있다. "치료적으로 유효한 양"은 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암과 관련된 증상을 전부 또는 일부 경감시키거나, 이들의 증상이 더 이상 진행 또는 악화되는 것을 지연, 억제 또는 정지시키거나, 또는 전립선암이 발달될 위험이 있는 개체에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암을 방지하거나 예방을 제공하는, 항체 및/또는 단편의 양을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

치료적으로 유효한 양은 투여 경로 및 투여 형태에 따라 달라질 수 있다. 본 발명에 따른 접합된 항체 및/또는 이의 단편의 유효량은 일반적으로 약 0.001내지 100 mg/kg/day의 범위, 예를 들어, 약 0.05 내지 10 mg/kg/day의 범위에 속한다. 일반적으로 항체 및/또는 단편은 높은 치료 지수를 나타내는 제제를 제공하도록 선택된다. 치료 지수는 독성과 치료 효과 사이의 용량 비율(dose ratio)이며 LD<sub>50</sub>과 ED<sub>50</sub> 사이의 비율로 표현될 수 있다. LD<sub>50</sub>는 집단의 50%가 치사하는 용량이고 ED<sub>50</sub>는 집단의 50%에서 치료적으로 유효한 용량이다. LD<sub>50</sub> 및 ED<sub>50</sub>는 동물 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약학적 절차에 의해 결정된다.

통상적으로, 본 발명에 따른 접합된 항체 및/또는 이의 단편의 유효 투여량(effective dosage)은 24시간 당 체중 kg당 유효 성분(active component) (즉, 본 발명에 따른 접합된 항체 및/또는 이의 단편)이 약 0.0001mg 내지 1000mg의 범위; 일반적으로, 24시간 당 체중 kg당 약 0.001mg 내지 약 750mg; 24시간 당 체중 kg당 약 0.01mg 내지 약 500mg; 24시간 당 체중 kg당 약 0.1mg 내지 약 500mg; 24시간 당 체중 kg당 약 0.1mg 내지 약 250mg; 24시간 당 체중 kg당 약 1.0mg 내지 약 250mg인 것으로 예상된다. 더 일반적으로, 유효 용량(effective dose) 범위는 24시간 당 체중 kg당 약 1.0mg 내지 약 200mg; 24시간 당 체중 kg당 약 1.0mg 내지 약 100mg; 24시간 당 체중 kg당 약 1.0mg 내지 약 50mg; 24시간 당 체중 kg당 약 1.0mg 내지 약 25mg; 24시간 당 체중 kg당 약 5.0mg 내지 약 50mg; 24시간 당 체중 kg당 약 5.0mg 내지 약 20mg; 24시간 당 체중 kg당 약 5.0mg 내지 약 15mg인 것으로 예상된다.

또한, 유효 투여량(effective dosage)은 약 500mg/m<sup>2</sup>까지의 유효 성분(active component) (본 발명에 따른 접합된 항체 및/또는 이의 단편)일 수 있다. 통상적으로, 유효 투여량은 약 25 내지 약 500mg/m<sup>2</sup>, 바람직하게는 약

25 내지 약 350mg/m<sup>2</sup>, 더욱 바람직하게는 약 25 내지 약 300mg/m<sup>2</sup>, 더욱 바람직하게는 약 25 내지 약 250mg/m<sup>2</sup>, 더욱 바람직하게는 약 50 내지 약 250mg/m<sup>2</sup>, 및 가장 바람직하게는 약 75 내지 약 150mg/m<sup>2</sup>의 범위인 것으로 예상된다.

[0209] 일반적으로, 치료적 적용에서, 치료는 개체에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암 질병의 지속 기간 동안 이루어질 것이다. 또한, 개별 투여량의 최적 양 및 간격이 치료될 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암의 특성 및 정도, 투여의 형태, 경로 및 위치 및 치료되는 특정 개인의 특성에 따라 결정되는 것이 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 또한, 이런 최적 조건은 종래 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0210] 많은 경우에, 본 발명에 따른 접합된 항체 및/또는 이의 단편의 수회 또는 다중 투여가 이루어지는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 주어진 투여량은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 또는 그 이상 투여될 수 있다. 투여는 약 1주 내지 약 12주 간격으로 투여될 수 있으며, 특정 구현예에서 약 1주 내지 약 4주 간격으로 투여된다. 대상 개체에서 전립선암, 방광암 및/또는 췌장암이 재발의 경우 또는 위험이 있을 때 주기적인 재-투여가 바람직할 수 있다.

[0211] 또한, 통상적인 치료 결정 테스트 경로(course)를 이용하여 최적 치료 경로를 확인될 수 있음이 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백하다.

[0212] 본 발명에 따른 접합된 항체 및/또는 이의 단편은 예를 들어, 경구, 비경구 (예를 들어, 피내, 정맥내, 척수내, 복강내, 피하 또는 근육내), 비강, 직장, 국소 또는 이식된 병원소(reservoir)를 통한 다양한 투여 경로에 대해 제제화될 수 있다. 전신 투여 또는 비경구 투여는 복강내, 근육내, 피하 및 정맥내 주사를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 이들은 점막 경로에 의해 투여된다. 점막내 투여 경로의 허용 가능한 비-제한적 실시예는 비강내(intranasal), 눈(ocular), 구강(buccal), 생식관(genital tract), 직장(rectal), 기관내(intratracheal), 피부 및 위장관(gastrointestinal tract)을 포함한다.

[0213] 일부 구현예에서, 본 발명에 기재된 치료 방법은 항체 및/또는 이의 단편이 다른 약제 또는 요법(therapies)과 조합되어 투여될 수 있다. 항체 및/또는 이의 단편은 본 발명에 기재된 약학적 조성물 또는 의학의 구성 요소일 수 있다. 추가적인 약제 또는 요법의 비-제한적 실시예는 호르몬 제제(hormonal agents), LHRH 작용제(agonists) 및 길항제(antagonists), CYP17 억제제(inhibitors), 타산 요법(taxane therapy), 방사성동위원소 치료(radioisotope treatment), 면역 조절 요법(immunomodulatory therapy)을 포함한다. 실시예는 도세탁셀(docetaxel), 미톡산트론(mitoxantrone), 아비라테론 아세테이트(abiraterone acetate), 엔잘루타마이드(enzalutamide), 케토코나졸(ketoconazole), 코르티코스테로이드(corticosteroids), 시푸류셀-T(Sipuleucel-T), 카바지탁셀(cabazitaxel), <sup>223</sup>라듐(<sup>223</sup>radium), 젬시타빈(gemcitabine) 및 Bacille Calmette Guérin (BCG) 면역요법을 포함한다. 또한 사용되는 추가적인 방사선 요법은 외부 방사선조사요법(external beam radiation) 및 근접치료(brachytherapy)를 포함한다. 항체 및/또는 이의 단편은 추가적인 약제 또는 요법과 동시에 개체에 투여될 수 있다. 추가적 또는 대안적으로, 항체 및/또는 단편은 추가적인 약제 또는 요법이 투여되기 전 또는 후에 개체에 투여될 수 있다.

[0214] **실시예**

[0215] 본 발명은 특정 실시예를 참조하여 설명될 것이나, 이는 어떤 형식으로도 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0216] **실시예 1: MIL-38 하이브리도마 집단 유래 항체의 분석**

[0217] **1.1 재료 및 방법**

[0218] - MIL-38 항체 제조(preparation)

[0219] 하기 출처(source)부터 MIL-38 항체 하이브리도마 제제를 얻었다:

[0220] (i) 내부의(in house) BLCA-38 하이브리도마 세포 스타키 33A로 명명된 MIL-38 항체 제제 생성에 사용되었다.

[0221] (ii) 최초 기탁된(original deposit) BLCA-38 하이브리도마 (HB11785) 유래 세포의 초기 계대(early passage) (<6) 세포가 단일 세포 클로닝을 수행하고 특성화 할 다수의 클론을 제공하기 위해 사용되었다. MIL-38 1F5 클론은 선택되어 CellBank Australia에 기탁번호(deposit number) CBA20140026으로 기탁되었다.

- [0222] (iii) 상기 (i) 및 (ii)에 기재된 제제를 생성하기 위한 기반으로 사용된 하이브리도마 스타크는 모든 내용이 교차-참조로 본 발명에 포함된 미국 특허 제 5,622,836호 내지 Walker 외에 기재된 바와 같이 제조되었다.
- [0223] MIL-38 항체의 정제를 위해, 동결된 세포 스타크를 신속히 녹인 뒤, RPMI 1640 배지에 재부유시켜 37℃에서 5% CO<sub>2</sub>로 24시간 동안 성장시켰다. 세포들은 순차적으로 확장(expand), 분주 및 스케일업(scaled up)되었다. 매 단계에서, 세포들은 새 배지에서 재부유되고 37℃에서 5% CO<sub>2</sub>로 배양되었다. 스케일 업(scale up) 후에, 세포들은 살균된 무혈청 배지로 옮겨졌고 사멸기(death phase)가 시작될 때까지 성장되었다. MIL-38 항체를 수집 및 멸균 여과하기 위해 상등액은 수거되었다. 항체 상등액은 필요시까지 -80℃에서 보관되었다. 항체는 Pierce protein G를 이용하여 제조사의 지시에 따라 정제되었다.
- [0224] - 웨스턴 블롯(Western blot) 및 사이프로 젤 분석(Sypro gel analysis)
- [0225] 단백질 추출: DU-145 (MIL-38 항원 양성) 또는 C3 (MIL-38 항원 음성) 세포들을 표준 조직 배양 기술에 따라 배양하였다. 세포막 단백질들은 Merck Millipore ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit (MPEK)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 농축되었다.
- [0226] - 트랜스퍼(Transfer)
- [0227] 젤들은 Transblot Turbo system (Biorad)를 이용하여 2.5 A 및 최대 25V에서 10분 동안 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 트랜스퍼되었다.
- [0228] - 웨스턴 블롯
- [0229] 간략하게, 트랜스퍼 멤브레인을 5% 탈지유가 포함된 PBS-Tween (0.1%)로 상온에서 2h 동안 블록킹하였다. 일차 항체 (5% 탈지유가 포함된 PBS-Tween (0.1%)에 1μg/ml)를 적용하고 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 세척 (PBS-Tween (0.1%)로 10분씩 3회)한 후 멤브레인을 이차 항체 (5% 탈지유가 포함된 PBS-Tween (0.1%)에 1:2000로 희석한 양(sheep)-항-마우스-HRP-표지된 항체)와 인큐베이션하였다. 세척 (PBS-Tween (0.1%)로 10분씩 3회)한 후 ECL detection kit (Biorad)를 이용하여 항원을 검출하고 LAS4000 mini (GE Life Science)로 영상화하였다.
- [0230] - 사이프로 젤
- [0231] 젤들은 Sypro®Ruby Protein Stain로 트랜스퍼 되기 전에 고정 용액 (10% 에탄올, 7% 아세트산)으로 2h 동안 고정되었고 상온의 암조건에서 하룻밤 동안 인큐베이션 되었다. 젤들을 영상화하기 전에 탈염색 용액 (10% 에탄올, 7% 아세트산)으로 최소 2h 동안 행귀지고 세척되었다. 영상화는 Pharos X Scanner로 수행되었다.
- [0232] - 면역 형광 분석(Immunofluorescence assay, IFA)
- [0233] IFA: 세포 밀집도가(confluency) 75%가 될 때까지 커버슬립에서 배양하고 6 웰 플레이트에 위치시켰다. 세포들은 PBS로 세척된 뒤 아세톤으로 고정되었다. 세포들을 PBS로 또 다시 세척하고 TBS로 인큐베이션한 뒤 5% 탈지유가 함유된 PBS로 블록킹되었다. 그 후, 세포들을 MIL-38, chimeric MIL-38 또는 세툽시맙(Cetuximab)으로 암조건에서 인큐베이션시킨 뒤, FITC 또는 Alexa488로 표지된 염소(goat) 항-마우스 또는 염소 항-인간 항체로 인큐베이션하였다. 두 항체들은 1% 탈지유가 함유된 PBS에 제조되었다. 일차 항체 인큐베이션과 이차 항체 인큐베이션 사이에 PBS로 세척되었다. 이차 인큐베이션 후에, 세포들은 DAPI를 함유한 PBS로 세척되고 녹색 형광 (MIL-38 양성)으로 시각화되었다.
- [0234] - SDS-PAGE 전기영동(electrophoresis)
- [0235] SDS-PAGE: 시료들은 비-환원 SDS 함유 시료 버퍼와 혼합되고 프리캐스트(precast) 4-15% 폴리아크릴아마이드 젤 (Criterion TGX; Biorad)에 로딩되었다. 젤은 Tris-Glycine 러닝 버퍼에서 80V에서 10분 동안, 200V에서 추가 50분 동안 전기영동되었다.
- [0236] - 시퀀싱(Sequencing) (DNA)
- [0237] 이전의 결과들은 ATCC 수탁 번호 HB11785 BLCA-38 세포가 두 세포 집단을 포함한다는 것을 나타낸다. 서브 클로닝(Subcloning)으로 두 종류의 클론: AM3/Alfio II 타입 (GPC-1에 결합하지 않음) 또는 AM4/Alfio 1 (GPC-1에 강력하게 결합)을 확인했다. 두 집단은 ATCC에서 얻은 낮은 계대의 스타크들 ("1-0 또는 초기(original)"로 언급됨)과 함께 시퀀싱되었다.

[0238] 224945 (1-0) 및 449295-1 (Alfio I)의 서열 분석을 위해, 총 RNA가 동결된 하이브리도마 세포로부터 추출되었고, RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 그 후 항체의 가변 영역 (중쇄 및 경쇄) 및 불변 영역을 증폭하기 위해 PCR을 수행하였으며, 이를 각각 표준 클로닝 벡터에 클로닝하고 시퀀싱하였다. 총 RNA는 TRIzol® Plus RNA Purification System의 기술적 매뉴얼에 따라 하이브리도마 세포로부터 분리되었다. 총 RNA는 아가로스 젤 전기영동을 통해 분석되었다. 동형-특이적(isotype-specific) 안티-센스 프라이머 및 범용 프라이머를 이용하여 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System의 기술적 매뉴얼에 따라 총 RNA를 cDNA로 역전사하였다. VH, VL, CH 및 CL의 항체 단편은 GenScript의 RACE 표준 작업 방법(standard operating procedure of RACE)에 따라 증폭되었다. 증폭된 항체 단편은 표준 분자 클로닝 방법(standard molecular cloning procedures)을 이용하여 각각 표준 클로닝 벡터에 클로닝되었다. 정확한 크기의 인서트(inserts)를 가지는 클론을 식별하기 위해 콜로니 PCR 스크리닝이 수행되었다. 정확한 크기의 인서트를 가진 5개 이상의 단일 콜로니들을 각 항체 단편에 대해 시퀀싱되었다. VH 및 VL 플라스미드는 항체의 전장의(full-length) 가변 영역, 및 CH1 및 CL의 일부를 암호화하였다. CH 플라스미드는 CH1의 일부, 및 전장의 CH2 및 CH3를 암호화하였다. CL 플라스미드는 CL의 일부를 암호화하였다. 전장의 불변 영역 또는 중쇄/경쇄를 얻기 위해, VH 및 VL 플라스미드에 의해 암호화되는 불변 영역의 일부, 및 CH 및 CL 플라스미드에 의해 암호화되는 불변 영역의 일부는 각각 PCR에 의해 증폭되었으며, 전장의 DNA를 얻기 위해 오버랩 연장 PCR(overlap extension PCR)을 수행하였다. 정확한 VH, VL, CH 및 CL 인서트 사이스를 가지는 5개의 단일 콜로니가 시퀀싱에 보내졌다. 시료의 분리된 총 RNA는 DNA 마커 (Marker III - TIANGEN, Cat. No. : MD103)와 나란히 1.5% 아가로스/GelRed™ 젤에 전기영동되었다. 각각의 시료의 PCR 산물 4마이크로리터를 DNA 마커와 나란히 5% 아가로스/GelRed™ 젤에 전기영동하였다. PCR 산물은 정제되어 후에 이용되기 전까지 -20℃에서 보관되었다.

[0239] 5가지 다른 클론의  $V_H$ ,  $V_L$ ,  $C_H$  및  $C_L$  유전자들은 거의 동일하였다. 하기에 기재된 공통서열은 단일클론 하이브리도마 집단에 의해 생산된 항체 (AM-4)의 서열로서 결정되었다.

[0240] MIL-38 마우스 IgG<sub>1</sub> 중쇄 DNA 공통 서열 (서열번호: 1)

```

ATGGCTTGGGTGTGGAACTTGTCTATTCTCTGATGGCTGCTGCCCAAAGTATCCAAAGCAAGATCCAGTTGGTGCA
GTCTGGAACCTGAGCTGAAGAAGCCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCTGCAAGGCTTCTGGTTATGCCCTTACAG
ACTATTCAATGAAGTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAGGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACT
GGTGAGCCCAACATATACAGATGACTTCAAGGGAACGGTTTGCTTCTCTTTGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTT
TTTGAGATCAACAACCTCAGAAATGAAGACACGGCTACATATTTCTGTGCTAGACACTATGATTACGGGGGT
TTCCTTACTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAAGCCAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTG
GCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACTCCATGGTGAACCTGGGATGCTGGTCAAGGGCTATTTCCTGAGCC
AGTGACAGTGAACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTGTGACC
TCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACTGCAAGGTTGCC
CACCCGGCCAGCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAATTGTGCCAGGGATTGTGTTGTAAGCCTTGCAATGTAC
AGTCCAGAGTATCATCTGTCTTCTATCTTCCCCCAAGGCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTA
AGGTACGCTGTGTGTGTGTAGACATCAGCAAGGATGATCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTG
GAGGTGCACACAGCTCAGACGCAAGCCCGGAGGAGCAGTTCACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCC
CATCATGCACAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCGCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCCGAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCAAGGAG
CAGATGGCCAAAGGATAAAGTCAGTCTGAOCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTG
GCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCATCATGGACACAGATGCTCTTACTTCG
TCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAG
GGCCTGCACAAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA

```

[0241] GGCCTGCACAAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA

[0242] 서열을 암호화한 마우스 중쇄의 개별 영역은 음영/비음영으로 번갈아 표시되는 텍스트로 강조되었다.

[0243] 위치: 1-57 = 선도서열(leader sequence); 58-147 = 프레임워크 영역(framework region) (HFR1); 148-162 = 상보성 결정 영역(HCDR1); 163-204 = HFR2; 205-255 = HCDR2; 256-351 = HFR3; 352-378 = HCDR3; 379-411 = HFR4; 412-1383 = 불변 영역(CH1-CH3); 703-741 = 경첩 영역(underlined); 1384-1386 = 정지 코돈(stop codon).



[0244] MIL-38 마우스 카파(카파(Kappa)) 경쇄 DNA 공통 서열 (서열번호: 2)

ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGCGTTGCTGCTGTGGCTTACAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGAC  
TCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTGGAGCAAGTGGGAATGTTG  
ACAATTATTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCTCAACTCTGGTCTATACTGCAAAAACCTTA  
GCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAATAGCCTGCA  
GCCTGAAGATTTTGGGACTTATTACTGTCAACATTTTGGAGTAATCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGC  
TGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA  
GGTGCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGGAAGATTGATGGCAG  
TGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCA  
CCTCAGCTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACT  
TCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAG

[0245]

[0246] 서열을 암호화한 마우스 중쇄의 개별 영역은 음영/비음영으로 번갈아 표시되는 텍스트로 강조되었다.

[0247] 위치: 1-60 = 선도 서열; 61-129 = 프레임워크 영역 (LFR1); 130-162 = 상보성 결정 영역 (LCDR1); 163-207 = LFR2; 208-228 = LCDR2; 229-324 = LFR3; 325-351 = LCDR3; 352-381 LFR4; 382-702 = 불변 영역 (CK); 703-705 = 정지 코돈.

[0248] 상기 AM-4 MIL-38 중쇄 및 경쇄 DNA 공통 서열은 하기 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열로 번역된다:

[0249] AM-4 MIL-38 마우스 IgG1 중쇄 아미노산 공통 서열 (서열번호: 3)

MAVWVTLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYAFTDYSMNWVKQAPGKGLRWMGNINTET  
GEPTYTDDFKGRFAFSLETSASTAFILQINNLRNEDTATYFCARHYDYGGFFYWGQGLVTVSAAKTPPSVYPL  
APGSAAQINSMVILGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPVPSSTWPSETVTCNVA  
HPASSTKVKDKIVPRDGGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTQVVDISKDDPEVQFSNFWDDV  
EVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKE  
QMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNIFTCSVLHE  
GLNHHTEKSLSHSPGK\*

[0250]

[0251] 마우스 IgG1 중쇄 서열의 개별 영역은 상기 아미노산 서열로 표시되었다. 위치 1-19 = 선도 서열; 20-49 = 프레임워크 영역 (HFR1); 50-54 = 상보성 결정 영역 1 (HCDR1); 55-68 = HFR2; 69-85 = HCDR2; 86-117 = HFR3; 118-126 = HCDR3; 127-137 = HFR4 (결합 영역(joining region) 또는 J-영역이라고도 함); 138-461 = IgG1 쇠(chain) 불변 영역 (CH1 - CH3) & 정지 코돈 (\*). 경첩 영역(hinge region)은 상기 서열에서 밑줄 표시됨.

[0252] AM-4 공통(consensus) MIL-38 경쇄 아미노산 공통 서열 (서열번호: 4)

MSVLTQVIALLLLWLITGARGDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNVHNYLAWYQQKQGKSPQLLVYTAKTL  
ADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLOPEDFGTYQCWFNSNPWTFGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG  
GASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSRQNGVINSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKST  
SPIVKSFNRENC\*

[0253]

[0254] 경쇄 아미노산 서열의 개별 영역이 표지된대로 표시되었다: 위치1-20 = 선도 서열; 21-43 = 프레임워크 영역 (LFR1); 44-54 = 상보성 결정 영역 1 (LCDR1); 55-69 = LFR2; 70-76 = LCDR2; 77-108 = LFR3; 109-117 = LCDR3; 118-127 = LFR4; 128-234 = 카파 불변 영역 (CK) & 정지 코돈(\*)

[0255] 실시예 2: 키메라 MIL-38 항체의 제조 및 테스트

[0256] 2.1 재료 및 방법

[0257] - 키메라 항체의 제조

[0258] 클로닝 목적으로 최적화된 두 cDNA 서열이 개발되었다. 이들은 상기 실시예 1에서 동정된 AM-4 중쇄 및 경쇄 공통서열에 기반한다.

[0259] 먼저 최적화된 cDNA 서열이 마우스-인간 키메라 중쇄 서열 생성에 사용되었다:

[0260] CHO 코돈 최적화된(codon Optimized) cDNA 서열 #1 - 마우스-인간 키메라 중쇄 1404 bp (서열번호: 5)

ATGGCTTGGGTGTGGACACTGCTGTTCCTGATGGCTGCTGCCAGAGTATTAGGCTCAGATTGAGCTGGTCCA  
GAGCGGTCCCGAGCTGAAGAAGCCAGGCGAGACCGTGAAGATCTCCTGCAAGGCCAGCGGTACGCTTTCACAG  
ACTATTCTATGAAGTGGTGAAGCAGGCCAGGCAAGGCCCTGAGGTGGATGGGCTGGATCAATACGAGACA  
GGCGAGGCCACCTACACAGACGATTTCAGGGCCGGTTCGCTTTTCCCTGGAGACCTCTGCTCCACAGCTTT  
TCTGCAGATCAACAATCTGAGAAACGAGGACACCGCCACATACTTCTGCGCTAGGCACTACGATTATGGCGGCT  
TTCCTTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCCAGCGCTCTACCAAGGGCCCATCGTGTTCCTACTG  
GCTCCCTCTTCCAGAGCACTCTGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCAGAGCC  
CGTGACAGTGTCTTGGAACTCCGGCGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACATTTCCCGCTGTCTGCAGAGCTCTG  
GCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTG  
AATCAACAAGCCATCCAAATCAAAAGGTGACAAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCATACATGCC  
CCTTGTCTGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGAOCTAGCGTGTTCCTGTTTCCACCAAGCCTAAGGACACCCCTGA  
TGATCTCTAGGACCCCGAGGTGACATCGGTGGTGGTGAAGTGTCCCAAGAGGATCTGAGGTGAAGTTCAAC  
TGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTACAACAGCAOCTATCG  
GGTGGTGTCTGTCTGACAGTGTCTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGAGCAATA  
AGGCCTGCCCGCTCCATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCACAGGTGTACACA  
CTGCCCTCCAGCAGAGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCTTC  
TGATATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCATAGGCCAGOCAGAGAACAATTACAGACCACACCCOCTGTGCTGGACA  
GCGATGGCTCTTTCTTCTGTATTCAGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAAGCTGTCTCC  
TGTAGCGTGATGCACGAGGCACTGCACAACCACTACACTCAGAAATCCCTGTCCCTGTACCTGGCAATGA

[0261]

[0262] 서열 암호화된 마우스-인간 키메라 중쇄 개별 영역은 음영/비음영으로 번갈아 표시되는 텍스트로 강조되었다.  
위치: 1-57 = 선도 서열; 58-147 = 프레임워크 영역 (FR1); 148-162 = 상보성 결정 영역 (CDR1); 163-204 = FR2; 205-255 = CDR2; 256-351 = FR3; 352-378 = CDR3; 379-411 = FR4; 412-1401 = 인간 불변 영역 (CH1-CH3); 706-750 = 경첩 영역 (밀줄); 1402-1405 = 정지 코돈.

[0263] 생성된 두 번째로 최적화된 cDNA 서열이 마우스-인간 키메라 경쇄 서열의 생성에 이용되었다:

[0264] CHO 코돈 최적화된 cDNA 서열 #2 - 마우스-인간 키메라 경쇄 705 bp (서열번호: 6)

ATGAGCGTGCTGAOCCAGGTGCTGGCCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGGAGCCCGTTGGACATCCAGATGAC  
CCAGTCCOCTGCCCTCTCTGTCCGCCAGCGTGGGCGAGACCGTGACAATCACCTGCAGAGCCTCTGGCAACGTGC  
ACAATTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCAGGGCAAGTCCCCACAGCTGCTGGTGTACACAGCCAAGACCOCTG  
GCTGAGGGCGGTGCCAGCAGGTCTCTGGCTCCGGCAGCGGCACACAGTATAGCCTGAAGATCAACTCTCTGCA  
GCTGAGGATTTTGGCACCTACTATTGCGAGCATTTCTGGTCTAATCCATGGACATTTGGCGGCGGCACCAAGC  
TGGAGATCAAGAGGACAGTGGCCGCTCCCTCGTGTTCATCTTTCCOCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGC  
AOCGCTTCGGTGGTGTGCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGATAACGC  
TCTGCAGTCTGGCAATTCCAGGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCTAAGGATCCACCTATAGCCTGTCCAGCA  
CACTGACCOCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAGGTGTATGCTTGTGAGGTCACTCAOCCAGGGGTGTCA  
AGTCCAGTCACAAAGTCTTCAATAGGGGGGAATGCTGA

[0265]

[0266] 서열 암호화된 마우스-인간 키메라 경쇄 개별 영역은 음영/비음영으로 번갈아 표시되는 텍스트로 강조되었다.  
위치: 1-60 = 선도 서열; 61-129 = 프레임워크 영역 (LFR1); 130-162 = 상보성 결정 영역 (LCDR1); 163-207 = LFR2; 208-228 = LCDR2; 229-324 = LFR3; 325-351 = LCDR3; 352-381 = LFR4; 382-702 = 인간 불변 영역 (CK); 703-705 = 정지 코돈.

- [0267] 마우스 인간 C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>3 체(chins) 키메라 MIL-38은 무혈청 배지를 이용한 CHO-3E7 세포 현탁액에서 일시적으로 발현된 뒤, 1 단계 정제(one-step purification)되었다.
- [0268] CHO-3E7 세포들은 무혈청 FreeStyle<sup>TM</sup> CHO Expression Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에서 배양되었다. 세포들은 Erlenmeyer Flasks (Corning Inc., Acton, MA)안에서 37°C로 5% CO<sub>2</sub>의 orbital shaker (VWR Scientific, Chester, PA)에서 유지되었다. 트랜스펙션(transfection) 당일, DNA 및 PEI (Polysciences, Eppelheim, Germany)를 최적 비로 혼합한 뒤 트랜스펙션을 위해 준비된 세포가 들어있는 플라스크에 첨가하였다. 6일째 날에 수득된 상등액이 추가 정제를 위해 사용되었다.
- [0269] 세포 배양 배지는 원심분리되고 여과되었다. 여과된 상등액을 3.0 ml/min로 5 ml Protein A CIP column (GenScript, Cat.No.L00433)에 로딩하였다. 적절한 버퍼로 세척 및 용출(elution)한 뒤, 분획이 수득하고 pH 9.0의 1M Tris-HCl로 중화하였다. 분자량, 수율 및 순도 측정을 위해 정제된 단백질을 표준 프로토콜을 사용하여 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯으로 분석하였다.
- [0270] - 키메라 MIL-38 항체 분석 (슬라이드 면역형광법(Slide Immunofluorescence))
- [0271] 키메라 MIL-38 항체가 DU-145 세포 면역형광 분석에 사용되었다. 33A 제조 뮤린 MIL-38 가 GPC-1 항원 염색의 양성 대조군으로 사용되었고, 세특시맵 (EGFR을 표적화하는 키메라 항체)이 인간 IgG 불변 영역 염색 양성 대조군으로 사용되었다. 일차 항체가 없는 슬라이드를 음성 대조군으로 사용하였다. 염색은 이차 항체가 Alexafluor 488로 표지되고 항-인간 항체가 키메라 및 세특시맵 시료를 염색하는데 사용된 것을 제외하고 기본적으로 섹션 1.1에 기재된 바와 같이 수행되었다.
- [0272] - 키메라 MIL-38 웨스턴 블롯
- [0273] 재조합 NSO-생성 GPC-1 항원뿐만 아니라 DU-145 및 C3 MPEK 추출물에 대한 키메라 MIL-38 및 뮤린 MIL-38의 반응성이 웨스턴 블롯으로 테스트되었다. 웨스턴 블롯은 뮤린 MIL-38 또는 키메라 MIL-38에 의해 탐침되었다 (probed). 키메라 MIL-38는 염소 항-인간 이차 항체에 이어 양-항-염소 HRP 항체에 의해 검출되었다. 대조군으로, 뮤린 MIL-38가 염소 항- 마우스 이차 항체에 이어 양(sheep)-항-염소 HRP 항체에 의해 검출되었다. 동일 조건하에서 검출되었을 때 키메라 MIL-38 및 뮤린 MIL-38에 대해 동등한 반응성이 관찰되었다.
- [0274] **2.2 결과**
- [0275] - 키메라 항체 서열의 발현
- [0276] 마우스 인간 CH1-CH3 체 키메라 MIL-38의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 재조합 플라스미드가 CHO-3E7 세포 배양 현탁액에 일시적으로 트랜스펙션되었다. 표적 단백질은 Protein A CIP 5 ml column에 이은 버퍼 교체에 의해 세포 배양 현탁액으로부터 포획되었다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 분석되었다.
- [0277] - 키메라 항체 서열
- [0278] 최적화된 cDNA 서열 #1 (서열번호: 5)이 하기의 아미노산 서열을 가진 키메라 MIL-38 항체 중쇄 생성에 사용되었다:
- [0279] 마우스 인간 CH1-CH3 체 키메라 MIL-38 서열 마우스 VH-인간 CH1-CH3 체 (중쇄) (서열번호: 7)
- ```

MAVWVTLFLMAAQSIQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYAFTDYSMNWVKQAPGKGLRWMGNINTET
GEPTYTDDFKGRFAFSLETSASTAFLQINNLRNEDTATYFCARHYDYGGFYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
    
```
- [0280]
- [0281] 마우스-인간 키메라 중쇄 서열의 개별 영역은 상기 아미노산 서열로 표시되었다: 위치Positions 1-19 = 선도 서열; 20-49 = 프레임워크 영역 (HFR1); 50-54 = 상보성 결정 영역 1 (HCDR1); 55-68 =HFR2; 69-85 = HCDR2; 86-



117 = HFR3; 118-126 = HCDR3; 127-137 = HFR4 (결합 영역 또는 J-영역이라고도 함); 138-467 = IgG1 chain 불변 영역 (CH1-CH3), & 정지 코돈 (\*). 경첩 영역-인간 IgG1 중쇄 경첩 영역은 상기에 밑줄 표시됨.

[0282] 최적화된 cDNA 서열 #2 (서열번호: 6)가 하기의 아미노산 서열을 가지는 키메라 MIL-38 항체 경쇄 생성에 사용되었다:

[0283] 키메라 MIL-38 마우스-인간 카파 경쇄 서열: 마우스 VK-인간 CK 서열 (서열번호: 8)

```
MSVLTVLALLLLWLITGARGDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNVHNYLAWYQQKQKGKSPQLLVYTAKTL
ADGVPSRFSFGSGSGTQYSLKINSLPEDFGTYTCQHFWSNFWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SFVTKSFNRGEC*
```

[0284]

[0285] 마우스-인간 키메라 경쇄 아미노산 서열의 개별 영역은 표지된대로 표시되었다: 위치 1-20 = 선도 서열; 21-43 = 프레임워크 영역 (LFR1); 44-54 = 상보성 결정 영역 1 (LCDR1); 55-69 = LFR2; 70-76 = LCDR2; 77-108 = LFR3; 109-117 = LCDR3; 118-127 = LFR4; 128-234 = 카파 불변 영역 (CK) & 정지 코돈(\*)

[0286] - 키메라 MIL-38 항체 분석 (슬라이드 면역형광법)

[0287] 도 1A 내지 D는 세포의 명시야상을 도시한다. 도 1E는 33A 양성 대조군의 염색을 나타낸다. 도 1F는 키메라 MIL-38 항체의 염색을 도시한다. 도 1G는 상용 키메라 (마우스/인간) 단일클론 항체 (세톡시맵)를 이용한 양성 대조군 염색을 도시하고, 도 1H는 일차 항체가 없는 음성 대조군 염색을 도시한다. 도 1E, F 및 G에서 강한 염색 결과가 관찰되었으며, 도 1H에서는 염색이 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과는 IFA에서 키메라 MIL-38 항체가 DU-145 세포에 성공적으로 결합하여 묶인 MIL-38 항체 (parental murine MIL-38 antibody)의 결합 특이성 (binding specificity)이 유지되었음을 나타낸다.

[0288] - 키메라 MIL-38 항체 분석 (웨스턴 블롯)

[0289] 도 2A는 묶인 MIL-38 에 이어 항-마우스 HRP 이차 항체로 탐침된 웨스턴 블롯이 도시되었다. 도 2A에 도시된 웨스턴 블롯의 노출 시간은 30초였다. 도 2B는 키메라 MIL-38에 이어 염소 항-인간 이차 항체로 탐침된 웨스턴 블롯을 도시한다. 복합체는 양-항-염소 HRP 항체를 이용해 검출되었다. 도 2B에 도시된 웨스턴 블롯의 노출 시간은 30분이었다. 도 2C는 마우스 MIL-38에 이어 염소 항-마우스 항체로 탐침된 웨스턴 블롯을 도시한다. 복합체는 양-항-염소 HRP 항체를 이용하여 검출되었다. 도 2C에 도시된 웨스턴 블롯의 노출 시간은 30분이었다.

[0290] 묶인 MIL-38 항-마우스는 DU-145 파쇄물(lysates) 및 재조합 GPC-1 NS0에 존재하는 항원을 인식한다. 예상대로 C3 파쇄물에서 반응성이 관찰되지 않았다 (도 2A).

[0291] DU-145 및 C3 추출물뿐만 아니라 NS0 GPC-1과 키메라 MIL-38의 반응성을 테스트하기 위해 3 항체 검출 방법이 필요했다 (도 2B). 3 항체 검출 방법(three antibody detection method)을 이용한 대조군 웨스턴 블롯 또한 묶인 MIL-38로 수행되었다 (도 2C). 3 항체 검출 방법이 사용되었을 때, 일반적인 2 항체 방법(two antibody method)을 이용했을 때보다 검출이 훨씬 덜 민감했다 (도 2A 및 C에 도시된 웨스턴 블롯에 대해, 도 2A의 노출 시간은 30초였지만, 도 2C의 노출 시간은 30분이었다). 도 2B에 도시된 바와 같이, 키메라 MIL-38는 재조합 GPC-1 NS0 항원을 인식하고 본 방법을 이용하여 검출했을 때 묶인 MIL-38에 대해 동등한 반응성(comparable reactivity)을 나타낸다 (도 2B 및 C 비교).

[0292] 2.3 논의

[0293] 키메라 MIL-38 항체는 CHO-3E7 세포 현탁액에서 성공적으로 발현되고 정제되었다. 표적 항체의 H 및 L 쇠가 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석에 기반하여 추정 분자량 ~55 kDa (Cal.M.W. ~52 kDa) 및 28 kDa (Cal.M.W. ~26 kDa) 으로 검출되었다.

[0294] 키메라 MIL-38 항체 및 묶인 모 항체 사이에 동등한 반응성이 IFA 및 웨스턴 블롯에서 관찰되었으며, 이는 키메라 항체의 컨스트럭션(construction)에서 결합 특이성이 유지된 것을 나타낸다.

[0295] 실시예 3: 제조 및 MIL-38 항체 단쇄 가변 단편 (scFv)

[0296] 3.1 재료 및 방법

[0297] - scFv 항체의 제조

[0298] 클로닝 목적을 위해 최적화된 cDNA 서열을 개발하였다. 이는 상기 실시예 1에 밝힌 AM-4 중쇄 및 경쇄 공통서열에 기반한다. 중쇄 가변 영역은 N-말단에 위치하였고 세린/글라이신에 가요성(flexible)을 가지는 링커를 이용하여 경쇄 가변 영역에 연결되었다. scFv 단백질은 재조합 단백질의 정제를 용이하게 하기 위해 6개의 히스티딘(hexa his)으로 이루어지는 C-말단 태그에 포함되고, Cys-기반 표지를 용이하게 하기 위해 C-말단의 시스테인 잔기에 포함된다.

[0299] 최적화된 cDNA 서열이 마우스-인간 키메라 중쇄 아미노산 서열을 생성하기 위해 사용되었다:

[0300] scFv MIL-38 아미노산 서열 (서열번호: 9)

```

MGWSCIIILFLVATATGVHSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYAFTDYSMNVKQAPGKGLRWMGWINTET
GEPTYTDDFKGRFAFSLETSASTAFLQINNLRNEDTATYFCARHYDYGGFPYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGG
GGGSDIQMTQSPASLSASVGETVTIITCRASGNVHNYLAWYQQKQKSPQLLVITAKTLADGVPSRFSGSGSGTQ
YSLKINSIQPEDFGTYTCQHFWSNPWFIFGGGKLEIKHHHHHC*
    
```

[0301]

[0302] 마우스-인간 키메라 중쇄 서열의 개별 영역은 아미노산 서열에 표시하였다. 상기 서열: 위치 1-19 = 선도 서열; 20-49 = 프레임워크 영역 (HFR1); 50-54 = 상보성 결정 영역 1 (HCDR1); 55-68 = HFR2; 69-85 = HCDR2; 86-117 = HFR3; 118-126 = HCDR3; 127-137 = HFR4 (결합 영역 또는 J-영역이라고도 함); 138-152 = gly/ser 가요성 링커 서열, 153-175 = 프레임워크 영역 (LFR1); 176-186 = 상보성 결정 영역 1 (LCDR1); 187-201 = LFR2; 202-208 = LCDR2; 209-240 = LFR3; 241-249 = LCDR3; 250-259 = LFR4; 260-265 = Hexa His tag & 정지 코돈 (\*). 링커 서열 - Gly/ser 링커 서열은 상기에 밑줄 표시됨.

[0303] ScFv MIL-38는 CHO 세포에서 일시적으로 발현되고 hexa-히스티딘 태그 및 니켈 친화 컬럼(nickel affinity column)을 이용하여 1 단계 정제되었다.

[0304] - 유세포분석

[0305] 무린 1F5 MIL-38 항체 또는 scFv 1F5 MIL-38 컨스트럭트(construct)는 표준 방법을 이용하여 CY5 형광단(fluorophor)으로 표시되었다. 그 후 상기 항체들은 DU-145 전립선암 세포들을 염색하기 위해 사용되었다.

[0306] 간략하게, DU-145 세포들을 PBS/2mM EDTA를 이용하여 분리(detached)하였다. 원심분리 후, 세포들은 항체 또는 대조군 용액이 포함된 FACS 워시 용액(wash solution) (PBS/5% fetal calf serum))과 함께 아이스 위에서 45분 동안 인큐베이션 되었다. FACS 워시 용액으로 세척된 후, 세포들은 PBS에서 재부유되고 유세포분석기로 세포 결합에 대해 측정되었다.

[0307] 결합의 특이성(specificity of binding)을 확인하기 위해, DU-145 세포들을 CY5-표지된 MIL-38과 인큐베이션하기 전에 표지되지 않은 무린 MIL-38 항체와 전-처리(pre-incubated)하였다.

[0308] 도 3A는 DU-145 세포 단독 또는 CY5-표지된 아이소타입 대조군으로 처리된 세포의 플로우 히스토그램(FLOW histograms)을 도시한다. 도 3B는 미처리(untreated) 또는 CY5-표지된 MIL-38로 처리된 DU-145 세포, 또는 CY5-표지된 MIL-38과 인큐베이션하기 전에 표지되지 않은 MIL-38로 전처리한 세포의 플로우 히스토그램을 도시한다. 결합의 특이성은 CY5-표지된 MIL-38로 전처리된 세포에서 관찰된 낮은 형광 강도에 의해 표시된다. 도 3C는 CY5-표지된 MIL-38로 처리 또는 미처리되거나, 또는 CY5-표지된 scFv MIL-38로 처리된 DU-145 세포의 플로우 히스토그램을 도시한다.

[0309] 3.3 논의

[0310] MIL-38 항체는 scFv 형식(format)으로 성공적으로 변환되었다. DU-145 세포에 대한 결합은 MIL-38 무린 모 항체(parent MIL-38 murine antibody)에 비해 낮았다.

[0311] 실시예 4: 전립선암 세포 DU-145에서의 무린 1F5 MIL-38 및 키메라 MIL-38 항체의 내재화

[0312] 4.1 재료 및 방법

[0313] - MDA-MB-231, T-24, PANC-1 또는 DU-145 세포의 유세포 분석

[0314] 세포들을 PBS-EDTA로 분리한 뒤 아이스 위에서 45분 동안 MIL-38 일차 항체가 포함된 FACS 워시 버퍼 (PBS +5%

FCS)와 45분 동안 인큐베이션되었다. 세포들을 FACS 워시 버퍼로 3회 세척한 뒤 AlexaFluor 488 이차 항체와 30분 동안 암조건의 아이스 위에서 인큐베이션 되었다. FACS 워시 버퍼로 3회 세척한 뒤, 세포들을 FACS 튜브로 옮기고 유세포 분석기로 분석하였다.

[0315] - 항체 내재화 분석

[0316] MDA-MB-231 또는 DU-145 세포를 8-웰 챔버 슬라이드 (5)에 분주하고 10% FCS가 함유된 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 세포들을 36시간 동안 무혈청 배지에 옮겼다. 슬라이드를 아이스에 놓고, 배지를 제거한 후 10 $\mu$ g/ml의 차가운 항체 용액이 포함된 무혈청 배지 200  $\mu$ L를 각 웰에 첨가하였다. 아이스에서 세포들을 30분 동안 인큐베이션한 뒤, 차가운 무혈청 배지로 세척하고, 각 웰에 200  $\mu$ L의 무혈청 배지를 첨가하였으며, 세포들을 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C에서 0, 15 및 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후 배지를 제거하고 세포들은 3%PFA가 함유된 PBS로 15분 동안 상온에서 고정하였다. 고정 후에, 세포들을 PBS로 세척하고 차가운 Triton X-100 0.1%이 함유된 PBS로 5분 동안 투과하였다(permeabilised). 남은 계면활성제(detergent)를 제거하기 위해 세포들을 PBS로 세척한 후, 5% 탈지유가 포함된 Tris Buffered Saline (TBS, pH 7.5)으로 30분 동안 블로킹하였다. 상응하는 이차 항체 (염소 항-마우스-Alexa488 및 염소 항-인간-Alexa488)를 PBS에 희석 (각각 4 $\mu$ g/mL 및 2  $\mu$ g/mL)하였다. 이차 항체 용액을 200 $\mu$ L/웰로 웰당 첨가하였고, 상온의 암조건에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 세포들을 PBS로 세척하고, 웰 200  $\mu$ L 당 1 $\mu$ g/mL Hoechst (핵 대조염색(counterstaining))와 5분 동안 인큐베이션하였으며, 그 후 PBS로 2회 세척하였다. 챔버를 제거하고, 70% 글리세롤이 포함된 물을 마운팅 용액으로 이용하여 슬라이드들을 마운팅하였다.

[0317] T-24 세포들에 대해, 세포들을 8-웰 챔버 슬라이드에 분주하고 세포 밀집도가 약 50%에 도달할 때까지 3일 동안 배양하였다. 세포들을 무혈청 배지에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 슬라이드들을 상기에서 MDA-MB-231 및 DU-145 세포에 대해 기재한 바와 같이 처리하였다.

[0318] PANC-1 타임코스(timecourse)에 대해, 세포들을 상기에서 DU-145 세포에 대해 기재한 바와 같이 처리하였다. 중복(Duplicate) 슬라이드들을 만들었고, 37 $^{\circ}$ C에서 15분 또는 60분 후에 세포들을 고정하였다.

[0319] 4.2 결과

[0320] 도 4A는 MDA-MB-231 및 대조군 (일차 항체 없이 또는 아이소타입 단독)에 대한 유세포 분석 히스토그램을 도시하고, 도 4B는 1F5 MIL-38 무린 항체의 MDA-MB-231, T-24 또는 DU-145 세포에 대한 상대 반응성을 도시한다. 도 4C는 1F5 MIL-38 무린 항체의 PANC-1 세포에 대한 반응성을 도시한다.

[0321] 도 5A는 DU-145 세포와 30분 동안 인큐베이션한 뒤의 무린 MIL-38 항체 (녹색)의 정위(localization)를 도시한다. 세포핵은 파란색으로 도시하였다. 도 5B는 DU-145 세포와 30분 동안 인큐베이션한 뒤의 키메라 MIL-38 항체 (녹색)의 위치를 도시한다. 세포핵은 파란색으로 도시하였다. 도 5C는 MDA-MB-231 세포와 30분 동안 인큐베이션한 뒤 키메라 MIL-38의 결합 또는 내재화가 없음을 도시한다. 도 5D는 T-24 세포와 인큐베이션한 직후의 키메라 MIL-38 항체 (녹색)의 위치를 도시한다. 세포핵은 파란색으로 도시하였다. 도 5E는 60분의 타임코스 중 15분 후 PANC-1 세포에서의 키메라 MIL-38 항체(녹색)의 위치를 도시한다. 도 5F는 60분의 타임코스 완료 후 PANC-1에서 Alexa-Fluor 488로 표지된 항-인간 항체의 내재화를 도시한다.

[0322] 4.3 논의

[0323] MIL-38 항체는 GPC-1 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan) 항원에 결합한다 (도 1 및 2). GPC-1은 전립선암 세포의 표면에 발현되며 (도 1), 난소암 및 방광암 (Walker et al 1989, Russell et al 2004) 및 유방암 (Matsuda et al 2001)을 포함하는 다른 다양한 암세포주에서도 발현된다고 보고되었다. 또한, GPC-1은 T-24 방광암 세포에서 포낭(caveolae) 및 엔도솜(endosomal) 수송 trafficking)을 통해 세포 표면에 내재화 및 재순환(recycle)된다고 보고되었다.

[0324] 따라서, 상기 수송 메커니즘을 통해 GPC-1은 결합된 MIL-38 항체를 세포로 운반할 수 있으며 약물(drug) 또는 방사성핵종(radionuclides)과 같은 독성 모이어티(toxic moieties)의 전달이 가능하다. BLCA-38 항체의 표적이 GPC-1으로 최근 밝혀졌다 (PCT application no: PCT/AU2015/000018). 그러나, BLCA-38 항체 (1F5 무린 MIL-38 항체에 대해 모세포주)가 내재화를 겪지 않는 것으로 보고되었다 (Khatri 2010). 최근 BLCA-38 세포들은 GPC-1을 인식하는 단 하나의 세포 집단만이 이중-클론성(bi-clonal)인 것으로 나타났다 (PCT/AU2014/000999). 1F5 무린 MIL-38 서브클론 및 키메라 MIL-38 항체 모두 GPC-1을 인식하나, 지금까지 이들의 내재화는 다양한 세포 종류에서 조사되지 않았다.



- [0325] DU-145 전립선암 세포는 MDA-MBA-231 유방암 세포 또는 T-24 방광암 세포보다 더 높은 항체 결합을 나타냈고, 또한 chMIL-38 은 PANC-1 세포에 결합할 수 있다 (도 4). 두 무린 MIL-38 단일클론 항체 및 키메라 MIL-38 항체는 DU-145 세포로 내재화될 수 있고 30분에 가장 강한 내재화를 가진다 (도 5A 및 B). T-24 세포 또한 키메라 MIL-38의 내재화를 입증하였으나, MDA-MB-231 세포는 MIL-38 항원을 발현함에도 불구하고 (도 4) 상기 조건에서 MIL-38의 검출 가능한 결합 또는 내재화를 나타내지 않았다 (도 5C). PANC-1 세포는 인큐베이션 15분 후에 MIL-38가 세포막과 결합하고, 인큐베이션 60분 후 항체가 거의 완전히 내재화되는 것을 나타낸다 (도 5E 및 F).
- [0326] 따라서 MIL-38 항체의 GPC-1-매개 내재화는 MIL-38 항원의 발현보다는 발현 수준 또는 세포 종류에 달려있을 수 있다. 세포 종류의 역할은 전립선암에서의 엔도솜 기능 변화를 정상 전립선과 비교한 내용을 기재한 최근 보고에 의해 뒷받침된다 (Johnson et al 2014 *Mol Cancer Res.* 2014 Dec;12(12):1851-62).
- [0327] 키메라 MIL-38 항체는 전립선 암, 방광암 또는 췌장암 세포주의 세포 표면 위의 GPC-1과 결합한 후에 내재화된다. chMIL-38의 강력한 내재화는 이의 항체 약물 복합체(antibody drug conjugate, ADC)로서의 적합성(suitability)을 나타낸다.
- [0328] **실시예 5: DU-145 이종이식편(xenograft)에 대한 MIL-38 항체의 표적화**
- [0329] **5.1 재료 및 방법**
- [0330] - 이종이식 모델
- [0331] 누드 마우스의 좌측 옆구리(f flank)에  $1 \times 10^6$  DU-145 세포를 피하주사하였다. 세포들을 약 4주 동안 성장시키고,  $5 \mu\text{M}$  Cy-5-표지된 항체가 포함된 PBS 100  $\mu\text{l}$ 를 꼬리 정맥으로 정맥내 주사하였다. Bruker MS-FX Pro 스캐너를 이용하여 주사 24시간 후 광학 이미지를 얻었다. 상기 마우스들은 Cy-5 표지된 1F5 무린 MIL-38을 주사하였고 세 마리의 마우스는 Cy-5 표지된 키메라 MIL-38을 주사하였다.
- [0332] **5.2 결과**
- [0333] 1F5 MIL-38 (도 6A) 및 키메라 MIL-38 (도 6B)는 테스트된 그룹당 세 마리 무린 각각에서 DU-145 이종이식편에 대한 강한 표적화와 부정확한 결합의 최소화를 입증했다. 일부 소수의 축적이 귀 천자창 마크에 나타났고, 이는 천자창 상처 때문에 발생한 염증때문이었을 수 있다 (천자창이 없는 귀에는 나타나지 않음).
- [0334] **5.3 논의**
- [0335] 방사성-접합된 BLCA-38을 이용한 앞서의 데이터는 전립선암 이종이식편으로의 표적화를 나타내나 (Carter et al 1994), BLCA-38 항체의 이중클론 특성으로 인해 1F5 클론이 유사한 표적화를 나타내는지 또는 AM3-유사 클론이 종양 정위(localization)를 일으키는지는 불분명하다.
- [0336] 도 6A 및 6B에 도시한 결과는 MIL-38의 1F5 및 키메라 형식(format) 모두가 DU-145 종양 이종이식편에 위치하는 것을 나타내고, 이는 혼합 집단 BLCA-38로부터 분리된 1F5 항체 클론이 종양 표적화의 원인이며, BLCA-38 스타에 존재하는 이차 유형의 항체는 종양 정위에 필요하지 않음을 시사한다.
- [0337] 1F5 및 키메라 MIL-38 항체의 종양-특이적 정위는 이들이 항체 약물 복합체 또는 방사성-면역 요법과 같은 항-전립선암 치료를 시행하기에 좋은 우수한 약제가 될 것이라고 제안한다.
- [0338] **실시예 6: 세포 성장 억제 분석(Cell growth inhibition assays)**
- [0339] **6.1 재료 및 방법**
- [0340] - 세포 성장 억제 분석
- [0341] 본 분석은 독소(toxin)를 세포로 내재화 및 전달하여 세포 성장 억제 및/또는 세포 사멸을 초래할 수 있는 항체를 스크리닝하기 위해 설계되었다. 세포 성장 억제를 유발하는 항체는 확인된 독소를 적재한 항체 약물 복합체(ADC) 형식으로 변환할 후보 물질이다.
- [0342] 분석은 우선 테스트 항체 및 표적 세포를 ADC 기술에 이용하기 적합한 다른 독소와 연결된 단백질 G(Protein G)의 존재하에 인큐베이션하는 것을 포함한다. 항체 용량 반응 곡선(antibody dose response curve)은 고정된 단백질 G-독소의 최종 농도로 확립된다.
- [0343] 하기의 단백질 G 조합이 선택된다:

표 3

| 사전 적재된 단백질 G      | 링커(Linker)            | 작용 농도(Working Concentration) |
|-------------------|-----------------------|------------------------------|
| PSGD (DM1 사전 적재)  | 비-절단가능(Non-cleavable) | 10 nM                        |
| PSGE (MMAE 사전 적재) | 절단가능                  | 50 nM                        |
| PSGF (MMAF 사전 적재) | 비-절단가능                | 100 nM                       |
| PSGDuc (듀오카마이신)   | 절단가능                  | 50 nM                        |

표 3: 단백질 G 조합

분석 형식은 하기와 같이 수행되었다:

세포들을 100  $\mu$ l의 배양액에서 20 내지 30%의 밀집도로 96웰 플레이트에 플리이팅하고 하룻밤 동안 인큐베이션 하였다. 항체들을 19:60 비율로 그래프에 표시한 농도에서 시작하여 연속 희석하고, 세포를 포함하는 96웰 플레이트에 첨가하였다.

사전 적재된 단백질 G-약물 복합체를 처리된 웰에 상기 표시된 농도로 첨가하였다. 그 후 세포들을 3일 동안 인큐베이션한 뒤, CelltiterGlo 를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

하기의 항체들이 테스트되었다:

- 키메라 MIL-38 (인간 IgG1)
- 뮤린 1F5 MIL-38 (뮤린 IgG1, BLCA-38의 GPC-1 고결합 서브클론)
- 뮤린 BLCA-38 (뮤린 IgG1, 1F5-타입 및 AM3 타입 항체로 이루어진 혼합 집단)
- 뮤린 AM3 (뮤린 IgG, BLCA-38의 GPC-1 저결합 서브클론)
- 엘비투스(Erbtux) (인간 IgG1 키메라 항-EGFR 항체 대조군)

## 6.2 결과

분석에 포함시키기 위해 두개의 세포주 DU-145 및 MDA-MB-231가 선택되었다. 둘 다 GPC-1 양성이나, 다른 수준의 MIL-38 반응성 및 내재화를 나타낸다. 선택된 항체들은 다양한 종류의 특성을 나타낸다:

표 4

| 항체      | DU-145 |                         | MDA-MB-231 |          | 아이소타입(Isotype) |
|---------|--------|-------------------------|------------|----------|----------------|
|         | 결합     | 내재화                     | 결합         | 내재화      |                |
| 키메라     | ++++   | ++++                    | 테스트되지 않음   | -        | 인간 IgG1        |
| BLCA-38 | ++++   | 음성*                     | ++         | 테스트되지 않음 | 뮤린 IgG1        |
| AM3     | -/+    | 테스트되지 않음(Not tested)    | 테스트되지 않음   | 테스트되지 않음 | 뮤린 IgG1        |
| 1F5     | ++++   | ++++                    | ++         | 테스트되지 않음 | 뮤린 IgG1        |
| 엘비투스    | 양성 대조군 | 양성 추정(Assumed positive) | 양성 대조군     | 양성 추정    | 인간 IgG1        |

\*BLCA-38는 내재화되지 않는 것으로 보고됨 (Khatri et al 2010).

표 4: 사용된 항체들

항-EGFR/독소 복합체는 MDA-MB-231의 성장을 억제할 수 있었던 반면 (도 7E), MDA-MB-231 세포들은 모든 항-GPC-1 항체/독소 복합체에 민감하지 않았다 (도 7A 내지 7D). MDA-MB-231 세포는 엘비투스 단독으로는 성장 억제가 부족한 것에 의해 입증된 바와 같이 성장 억제를 위해 독소의 내재화가 요구되었다 (도 7E). MDA-MB-231의 항-GPC-1 항체에 대한 무감응(insensitivity)이 GPC-1의 발현 수준 때문인지, GPV-1/항-GPC-1/단백질 G 독소

복합체의 내재화 능력 때문인지 또는 항-GPC-1 대 항-EGFR 복합체에 대한 공정 차이(differential processing) 때문인지 불분명하다.

[0361] DU-145 세포는 얼비투스의 표적이 될 때 본 분석에 사용된 모든 독소에 민감했으나, 얼비투스 단독으로는 억제 가 나타나지 않았다 (도 7E). 키메라 MIL-38은 MMAE 및 MMAF 독소가 사전 적재된 PSG와 함께 DU-145 세포에서 성장 억제를 유발할 수 있었으나 듀오카마이신 또는 DM1이 사전 적재된 PSG와는 성장 억제를 유발할 수 없었고, 이는 관련된 특정 독소도 효과를 가진다는 것을 입증하였다 (도 7A). 반대로, 1F5 MIL-38, BLCA-38 및 AM3는 본 분석에서 세포 성장 저해를 유발할 수 없었다.

[0362] 도 7A 내지 7E에 도시된 실험에 사용된 단백질 G-듀오카마이신의 농도는 항체가 없더라도 DU-145 세포에 독성을 가지는 것으로 판명되었으며, 따라서, DU-145 세포에 적절한 저농도를 결정하기 위해 적정을 수행하였다 (도 7F 패널 1). 얼비투스는 상기 조건에서 농도-의존적으로 세포 성장 저해를 유발할 수 있었으나, MIL-38 항체들 중 어느것도 상기 조건에서 성장 저해를 야기할 수 없었다.

[0363] 항체의 단독 내재화는 성장 저해를 예측하지 못한다: 키메라 MIL-38 및 1F5 무린 MIL-38은 동등한 수준으로 내재화된다 (도 5A 및 B). 성장 억제는 키메라 MIL-38에 대해 관찰되지만 (도 7A), 1F5 무린 항체에서는 성장 저해가 관찰되지 않는다 (도 7D).

### [0364] 6.3 논의

[0365] 여러 주요 질문이 본 분석에서 평가되었다:

[0366] 1. 세포주가 GPC-1 항원을 발현한다면 (발현 수준과 상관없이) 항-GPC-1 항체에 민감할 것인가

[0367] 2. 항체가 내재화되면 GPC-1/항-GPC-1 항체/단백질 G 독소 복합체의 내재화를 통해 성장 억제를 야기할 수 있는가?

[0368] 3. 동등한 수준의 항체 내재화는 동등한 성장 저해를 야기할 것이다.

[0369] 4. 세포주/항체/독소 복합체의 상대적 민감도(Relative sensitivity).

[0370] MIL-38-유래 항체들은 본 분석에서 양성 대조군 (얼비투스)에 비해 뚜렷한 활성 프로파일을 나타낸다. 첫째, 유방암 세포주인 MDA-MBA-231에 GPC-1이 발현함에도 불구하고 테스트된 독소와 복합체를 이룬 키메라 MIL-38은 이 세포주에 대해 활성을 나타내지 않았다. 반대로 얼비투스는 테스트된 모든 독소와 함께 MDA-MB-231 세포에 대해 활성을 가진다.

[0371] 둘째, 무린 1F5, AM3 또는 BLCA-38는 활성을 나타내지 않은 반면, 키메라 MIL-38은 MMAE 및 MMAF 독소와 함께 DU-145 세포에 대해 성장 저해를 나타낸다. 동등한 내재화가 입증된 1F5의 경우가 특히 예상외이며 (도 5A 및 5B), 이는 관찰된 활성 차이가 키메라 프레임워크(chimeric framework) 때문인 것을 시사한다.

[0372] 상기 결과로부터 항원 단독 또는 항체의 내재화가 주어진 항체/항원 복합체의 잠재적 활성을 예견할 수 없고, 주어진 분자의 잠재적 유용성을 결정하기 위해 실험적 데이터를 반드시 얻어야하는 것이 명백하다.

[0373] 가장 낮은 수준으로 GPC-1 항원을 발현하는 MDA-MB-231세포가 GPC-1 항원을 발현함에도 불구하고 키메라 MIL-38에 의한 세포 성장 억제를 나타내지 않는다는 관찰은 키메라 MIL-38의 ADC 버전이 낮은 GPC-1 항원 발현을 나타내는 다른 조직은 표적화하지 않고 전립선암 세포를 특이적으로 표적화할 수 있음을 시사한다. 1F5가 아니라 키메라 MIL-38에 의한 성장 억제를 확인함으로써 키메라 형식(format)이 ADC-기반 전략의 전개에 예상치 못한 이점을 제공하는 것을 시사한다.

### [0374] 실시예 7: 확장(scalable) 키메라 발현 시스템의 개발

#### [0375] 7.1 재료 및 방법

##### [0376] - 세포주 개발

[0377] 임상 실험 및 궁극적으로 상업적 공급을 위한 충분한 키메라 항체의 생산을 위해 항체 고발현 및 정제 후 우수한 회수가 가능한 생산 시스템이 필요하다. 실시예 1에 기재된 키메라 항체의 생산은 일시적인 발현을 이용하여 수행되었으며, 대규모 GMP 생산에는 부적합한 기술이다. 따라서, 하기의 특성을 가지는 적합한 발현/정제 시스템이 개발되었다:

[0378] 1. 수립된 유전자 형질도입(transduction) 기술의 이용.

- [0379] 2. 임상 등급(clinical grade) 생산에 적합한 충분한 품질 및 계통(lineage)의 세포주의 이용
- [0380] 3. 최종 산물의 확장 가능한 GMP 생산에 적합한 세포 성장 배지, 생물 반응 장치(bioreactors) 및 정제 기술의 이용
- [0381] 카탈렌트(Catalent)는 그들의 항체의 GMP 생산에 대한 광범위한 경험과 그들의 GPEX 레트로 벡터(retrovector) 발현 특허 기술 때문에 제조사로서 선택되었다.
- [0382] 스테이블 세포 풀은 Catalent의 GPEX 발현 레트로 벡터에 삽입된 서열을 암호화하는 키메라 MIL-38 중쇄 및 경쇄를 이용하여 개발되었다.
- [0383] 선택 후, 스테이블 풀이 수립되어 키메라 MIL-38의 25L 스케일 업 생산에 사용되었다. 세포 상등액은 확장 생산에 적합한 과정을 이용하여 정제되었다.
- [0384] **7.2 결과**
- [0385] 스테이블 풀이 수립되었고 초기 단계의 생산 시행(production run)에 이용되었다. 25L 생산 시행이 스테이블 세포 풀을 이용한 18-일 유가배양(fed-batch)으로 수행되었다. 세포 생존 밀도(Viable cell density) (도 8A), 세포 생존율 (도 8B) 및 항체 생산 (도 8C)는 개발의 초기 단계에 얻은 0.8 g/L의 발현 수준과 우수한 성능을 나타냈다.
- [0386] 유가배양으로부터 수득한 상등액을 정제(clarified)한 뒤, 항체 정제, 숙주 세포 단백질 및 바이러스 퇴화(virus reduction)에 이용되는 확장가능한 기술을 이용하여 정제하였다(purified) (도 5). 비-최적화된 정제를 이용하여 약 50%의 수율을 얻었으며, 이는 확장 가능한 공정이 개발되었음을 나타낸다.

**표 5**

[0387]

| 단계                  | 부피 (L) | 농도(Conc.) (mg/mL) | Total (g) | 단계 수율 (%) | 총 수율 (%) |
|---------------------|--------|-------------------|-----------|-----------|----------|
| 수득(Harvest)         | 25.0   | 0.81              | 20.3      | 100       | 100      |
| 정제(Clarification)   | 24.7   | 0.77              | 18.9      | 93        | 93       |
| 단백질 A / Low pH Hold | 2.4*   | 6.6               | 15.9      | 84        | 78       |
| Q Flow through      | 2.22   | 5.2               | 11.5      | 94        | 73       |
| CEX 결합 및 용출(Elute)  | 0.50   | 16.1              | 8.0       | 75**      | 55       |
| Viral Filtration    | 0.77   | 9.2               | 7.1       | 89        | 49       |
| 제제(Formulation)     | 0.78   | 9.3               | 7.3       | 103       | 50       |

[0388] **표 5: 키메라 MIL-38의 정제 동안의 수율 및 회수율.**

- [0389] **7.3 결과**
- [0390] 키메라 MIL-38을 발현하는 스테이블 CHO 세포 풀이 GPEX 기술을 이용하여 수립되었으며, 생산 시행의 초기 단계에 이용하였다. 초기 유가배양 생산 시행 동안 우수한 발현이 관찰되었으며 GMP 생산에 적합한 것으로 알려진 표준 정제 공정을 이용하여 우수한 회수(recovery)가 달성되었다.
- [0391] 스테이블 풀은 클론 분리 및 마스터 및 작업 세포(working cell) बैंक 구성을 포함한 미래의 세포주 개발을 위한 기반을 형성할 것이다. 사용된 정제 공정은 수율을 높이기 위해 추가로 최적화될 수 있다.
- [0392] 잘 수립된 세포주, 발현 벡터, 세포 성장 시스템 및 정제 기술의 이용은 25L 파일럿 배치로부터 얻은 최종 항체 산물이 최종 생산 공정에서 생산된 것과 매우 유사한 특성을 가져야 하는 것을 의미한다. 현재까지 얻은 수율은 산물이 다른 시판중인 항체 제품과 동일한 가격에 생산될 수 있음을 나타낸다.

[0393] **실시예 8: 영상화 및 방사선치료(radiotherapy)를 위한 키메라 MIL-38 DOTA 접합체(conjugate)의 개발**

[0394] **8.1 재료 및 방법**

[0395] - <sup>177</sup>Lu 표지를 위한 MIL-38과 DOTA의 접합(Conjugation)

[0396] DOTA는 다음과 같이 키메라 MIL-38과 10:1의 비율로 접합되었다. p-SCN-Bn-DOTA는 0.1M PBS (pH 8.5) 버퍼에 준비되었고, 키메라 MIL-38 (cMIL-38)이 혼합물에 첨가되었다. 혼합물은 20시간 동안 상온의 암조건에서 반응되

었다.

- [0397] 전처리된(pre-conditioned) 미니 PD-10 젤 컬럼을 이용하여 접합된 mAb 혼합물이 정제되었다. 분획물은 HPLC에 의한 활성 스크린 분획(screen fractions)이었다.
- [0398] - MIL-38의  $^{177}\text{Lu}$  표지
- [0399] 0.472.1 mCi의  $^{177}\text{Lu}$ 가 포함된 0.05N HCl 10mL를 DOTA- cMIL-38 0.2mg에 첨가하고, pH를 pH 7.5로 맞췄다. 혼합물은 50℃의 암조건(dark)에서 60분 동안 인큐베이션한 뒤, 상온으로 식히고 20분 동안 방치하였다.
- [0400] 방사성표지된 MIL-38 DOTA는 전처리된 미니 PD-10 젤 컬럼을 이용하여 정제되었다. 컬럼은 1x PBS 2mL로 전처리되고 용출물을 버렸다. 이 과정은 총 4회 반복되었으며, 그 후 방사성 용액이 컬럼의 중앙에 첨가되었다. PBS 0.2 ml을 첨가하고 분획을 저결합 에펜도르프 튜브(low binding Eppendorf tube)에 수득하였다. 이 과정은 19번 더 반복되었고, 그 후 각 분획의 활성을 검량기(dose calibrator)를 이용하여 측정하였다. 분석의 확인을 위해 방사성 mAb 시료가 방사성(radio)-HPLC를 이용하여 분석되었다.
- [0401] - MIL-38 DOTA의 모의 표지(Mock labelling) 및 유세포 분석
- [0402] 키메라 MIL-38의 DU-145 세포에 대한 결합이 DOTA와의 접합 후 및 방사성-표지 과정 후에 유지되는지를 확인하기 위하여, MIL-38 DOTA를 상기 기재된 방사성-표지 과정 동안 사용된 동일한 버퍼와 인큐베이션하고 동일한 온도에 노출한 "모의" 방사성표지 과정을 겪게하였다. PD-10 컬럼 정제 단계가 생략되었다.
- [0403] 그 후 키메라 MIL-38, MIL-38 DOTA 및 모의-표지된 MIL-38 DOTA 각각이 유세포 분석에서 일차 항체로 사용되었다.
- [0404] - 스케일업 제조를 위한 chMIL-38과 DOTA의 접합 및  $^{67}\text{Ga}$  표지
- [0405] chMIL-38과 p-SCN-Bn-DOTA (DOTA)의 접합은 Forrer et al.의 "in vitro characterization of  $^{177}\text{Lu}$ -radiolabelled chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and a preliminary dosimetry study"에 의해 개설했던 방법에 따라 시행되었다. 세 조건이 사용되었다: 5, 10 및 20배 과량의 DOTA. 간략하게, 세 바이알의 chMIL-38 (9.3mg/ml)를 합하고 버퍼를 0.01M PBS에서 0.2Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH9.5로 교체하였다. 그 후 chMIL-38 용액을 최종 부피 433  $\mu\text{l}$ 로 농축하여 64.4 mg/ml의 유효 농도(effective concentration)를 얻었다. 물질을 세 144  $\mu\text{l}$  분액(aliquot)으로 나눈 뒤 DOTA (5, 10 또는 20 등가물(equivalents))와 반응시켰다. 각각의 반응 혼합물을 37℃ 또는 1시간 동안 유지하였다. 그 후 시료들을 pH 9.5의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 ml로 세척하고 버퍼를 pH7의 0.25M 암모늄 아세테이트(ammonium acetate)로 교체하였다.
- [0406] 부착된 DOTA의 수를 나타내는 질량 스펙트럼 분석(Mass spectral analysis)은 4.3 DOTA: MAb (5배 과량 반응), 4.6 DOTA: MAb (10배 과량 반응) 및 7.5 DOTA: MAb (20배 과량 반응)였다.
- [0407] - chMIL-38 DOTA의  $^{67}\text{Ga}$  표지
- [0408] 7.5 DOTA:MAb 비율을 포함하는 20배 과량 반응으로부터 생산된 산물을 이용하여 chMIL-38 DOTA의  $^{67}\text{Ga}$ -표지를 수행하였다. 반응 조건: 0.02M HCl에 함유된 50  $\mu\text{l}$   $^{67}\text{GaCl}_3$ , pH 5.0의 0.1M NaOAc 버퍼 100  $\mu\text{l}$ , chMIL-38 DOTA: 5 내지 25  $\mu\text{l}$ 의 항체 (46-230  $\mu\text{g}$ )이 사용되었다. 혼합물은 40℃에서 1 또는 16 시간 동안 인큐베이션되었다. 표지수율(radiochemical yield) 및 유도 비활성(specific activity)이 계산되었다.
- [0409] - 유세포 분석 및 직접 결합 ELISA를 이용한, MIL-항원 결합에 대한 DOTA 접합 및 표지 조건의 평가
- [0410] DOTA를 chMIL-38에 접합시키는데 사용된 반응 조건이 chMIL-38 DOTA와 GPC-1의 결합을 유의미하게 변화시키지 않는 것을 확인하기 위하여 두 분석이 사용되었다: 유세포 분석 및 직접 결합 ELISA(direct binding ELISA). 유세포 분석은 하기와 같이 수행되었다. DU-145 또는 T-24 세포를 2mM EDTA (37℃에서 10분)를 이용해 분리하였다. 세포들을 펠릿화한 뒤, 튜브당  $2 \times 10^5$ 의 세포로 준비하였다. 세포들을 일차 항체 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{l}$ )와 아이스에서 45분 동안 인큐베이션시킨 후, FACS 워시 버퍼로 3회 세척하였다 (1 x PBS 용액). 그 후 이차 항체 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AlexaFluor 488 염소 항- 인간 (H+L)) 50  $\mu\text{l}$ 와 45분 동안 인큐베이션시켰다. 세포들을 FACS 워시 버퍼로 3회 세척한 뒤 software BD FACSDIVA<sup>TM</sup>를 이용하는 BD LSRFortessa<sup>TM</sup> - Cell analyser로



작동시켰다.

[0411] GPC-1 직접 결합 ELISA는 하기와 같이 수행되었다. 96웰 플레이트를 pH 9의 10mM 카보네이트(Carbonate) 버퍼로 15분 동안 코팅하였다. 카보네이트 버퍼를 제거하고 1.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 재조합 인간 GPC-1 (R&D systems)이 함유된 pH 9의 10mM 카보네이트 버퍼로 상온에서 하룻밤 동안 코팅하였다. 다음날 웰들을 pH 9의 5mM 카보네이트 버퍼로 세척한 뒤, 10% 카제인이 함유된 PBS로 1시간 동안 블로킹하였다. 일차 항체는 25 ng/mL에서 시작하여 0.39 ng/mL까지 연속 희석한 뒤 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 플레이트 PBS-Tween 20 (0.1%)로 4회 세척하였다. Thermofisher 토끼(rabbit) 항-인간 이차 항체를 PBS-Tween, 10% 카제인으로 1:8000으로 희석한 뒤 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-Tween으로 4회 세척하고 100  $\mu\text{l}$  TMB를 첨가하였다. 플레이트를 2분 동안 전개하고(developed) 1450 nm에서 판독하였다.

## [0412] 8.2 결과

[0413] 도 9A는 HPLC 보정에 사용된 젤 여과 표준의 A280 흡광도 궤적(absorbance trace)을 도시한다. 도 9B는 비-접합된(un-conjugated) 키메라 MIL-38의 A280 흡광도 궤적을 도시한다. 도 9C는 DOTA 접합 및 PD-10 컬럼 정화(clean up) 후 키메라 MIL-38의 A280 흡광도 궤적을 도시한다. 도 9D는 MIL-38 DOTA의 표지 및 PD-10 컬럼 정화 후  $^{177}\text{Lu}$  활성의 방사성-HPLC 궤적을 도시한다. 도 9E는 도 9D에 해당하는 A280 흡광도 궤적을 도시한다.

[0414] 상기 기재된 접합(conjugation), 표지 및 정제 과정을 이용하여,  $^{177}\text{Lu}$  방사성 표지된 키메라 MIL-38 DOTA의 단일 피크(peak)를 얻었다.

[0415] 도 10은 키메라 MIL-38, 키메라 MIL-38 DOTA 및 모의-표지된 키메라 MIL-38 DOTA에 대한 FLOW 히스토그램을 도시한다. DOTA 접합은 키메라 MIL-38가 처리되지 않은 것에 비해 관찰된 형광 신호를 경미하게 감소시켰다. 모의 표지는 MIL-38 DOTA와 비교했을 때 검출된 형광에는 영향을 미치지 않았다.

[0416] ChMIL-38 DOTA의 스케일 업 생산 및  $^{67}\text{Ga}$  표지를 위해 대체 접합 조건이 사용되었다.  $^{67}\text{Ga}$ 는 3.3일의 반감기를 가지므로  $^{68}\text{Ga}$ 와 같은 동위원소 (반감기 ~68분)보다 chMIL-38 DOTA-표지된 chMIL-38의 *in-vivo* 생체 분포(biodistribution)를 예측하기에 더 좋은 동위원소(isotope)이다.

[0417] 도 11은 DOTA-접합된 MIL-38의  $^{67}\text{Ga}$  표지화를 도시한다. 도 11A는  $^{67}\text{Ga}$ 로 표지된 MIL-38의 방사능의 사이즈 배제 크로마토그래피 HPLC 크로마토그램을 도시한다. 별표는 반응 혼합물에 남은 유리(free)  $^{67}\text{Ga}$ 를 표시한다. 도 11은  $^{67}\text{Ga}$ -표지된 MIL-38 DOTA의 안정성 연구를 도시한다. 는  $^{67}\text{Ga}$ 로 표지된 MIL-38의 방사능의 사이즈 배제 크로마토그래피 HPLC 크로마토그램은 해당하는 UV 궤적과 함께 도시했다.  $^{67}\text{Ga}$ -MIL-38 제제에서 유리  $^{67}\text{Ga}$ 가 제거되었고, SEC HPLC 크로마토그래프를 수행하기에 앞서 상온에서 2주 동안 방치되었다. chMIL-38 DOTA로부터  $^{67}\text{Ga}$ 가 일부 분리되었지만 (용출 시간 ~10분에 두 번째 피크로 표시), 항체 및 방사능의 대부분이 상기 조건에서 그대로 유지되어 우수한 안정성을 나타냈다.

[0418]  $^{67}\text{Ga}$ -표지된 chMIL-38 DOTA의 비활성을 최대화하기 위해, chMIL-38 DOTA와  $^{67}\text{GaCl}_3$ 의 비율 및 인큐베이션 시간(1시간 vs 16시간)의 영향이 조사되었다. 표 6에 나타낸 바와 같이, 반응 혼합물 중 항체의 양이 표지수율(radiochemical yield, RC) 및 유도(derived) 비활성(specific activity, SA)을 결정하는데 가장 중요한 변수였다.

표 6

| Reaction ID | Reaction Time (h) | <sup>67</sup> Ga Activity (MBq) | Mass of Antibody (ug) | RC Yield (%) | Derived SA MBq/mg |
|-------------|-------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------|-------------------|
| NGL07104-1  | 1                 | 40.4                            | 230                   | 98           | 170               |
| NGL07104-2  | 1                 | 39.5                            | 92                    | 79           | 340               |
| NGL07104-3  | 1                 | 37.4                            | 46                    | 72           | 585               |
| NGL07104-4  | 16                | 37.8                            | 230                   | 97           | 136*              |
| NGL07104-5  | 16                | 38.1                            | 92                    | 83           | 293*              |
| NGL07104-6  | 16                | 38.1                            | 46                    | 84           | 594*              |

\* Decay corrected value (18h decay, x0.853)

표 6. 항체 질량 및 인큐베이션 시간의 <sup>67</sup>Ga로 표지된 chMIL-38의 표지수율 및 유도 비활성에 대한 영향

DOTA와 chMIL-38의 접합 및 <sup>67</sup>Ga 표지화에 사용된 조건이 결합 활성에 영향을 미칠 수 있으므로 상기 과정이 chMIL-38 및 GPC-1 항원의 결합에 미치는 영향을 조사하기 위해 일련의 실험을 두 가지 별개의 분석법으로 설계하였다: 유세포 분석법 (세포-접합(cell-bound) 항원을 표적으로 함) 및 직접 결합 ELISA (표면 결합된 재조합 형태의 GPC-1을 표적으로 함)

표지화 조건의 영향을 앞서 기재한 바와 같이 "모의-표지"로 확인하였다. 또한, 상기 분석의 내부- 및 외부-분석 재현성을 평가하였다.

도 12는 키메라 MIL-38, 다른 DOTA 접합 비율을 사용하여 제조된 MIL-38 DOTA 및 모의 방사성-표지된 MIL-38의 DU-145 또는 T-24 세포와의 결합을 유세포 분석뿐만 아니라 직접 항원 결합 ELISA를 이용하여 도시한다. 도 12A는 비-표지된 키메라 MIL-38 또는 5, 10 또는 20배 몰(molar) 과량의 DOTA를 이용하여 DOTA와 접합된 키메라 MIL-38의 결합을 도시한다. 본질적으로 DOTA 접합(conjugation)이 DU-145 세포에 결합하는 MIL-38를 감소시키지 않았다는 것을 나타내는 결합 등곡선(equivalent binding curves)을 얻었다. 도 12B는 모의-표지 반응을 거친 chMIL-38 DOTA (20배 과량)을 세 개로 나눈 배치와 T-24 세포의 결합에 대한 유세포 분석을 도시한다. 본질적으로 동일한 결합 곡선(identical binding curves)이 관찰되어 우수한 배치간 재현성을 나타냈다. 도 12C는 모의-표지 반응을 거친 하나의 배치로부터 모두 제조되고, 세 개로 분리된 유동 반응(FLOW reactions)의 chMIL-38 DOTA (20배 과량)과 T-24 세포의 결합에 대한 유세포 분석을 도시한다. 본질적으로 동일한 결합 곡선(identical binding curves)이 관찰되어 우수한 배치 내(intra-batch) 재현성을 나타내었다. 도 12D는 이차 항체 단독 (빨간색 궤적), chMIL-38 DOTA (녹색 궤적), 배치 간 재현성 중 한 시료 (Batch 1, 파란색 궤적) 및 배치 내 재현성 중 한 시료 (Intra 1, 오렌지색 궤적)과 T-24 세포의 결합에 대한 오버레이된 유세포 분석 프로파일을 도시한다. 본질적으로 동일한 결합 곡선이 관찰되어, 모의-표지 과정이 chMIL-38 DOTA 대조군에 비해 세포와의 결합에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 도 12E는 직접 결합 ELISA에서의 chMIL-38 및, 5, 10 또는 20배 몰 과량의 DOTA를 사용하여 DOTA와 접합된 chMIL-38과 재조합 GPC-1의 결합을 도시한다. 도 12F는 chMIL-38 DOTA, 배치 간 비교를 위해 제조된 세 가지 모의-표지된 chMIL-38 DOTA 및 배치 내 체제 유래 세 가지 반응으로 제조된 세 가지 모의-표지된 chMIL-38 DOTA와 재조합 GPC-1의 직접 결합을 도시한다.

직접 분석에서 DOTA와 chMIL-38의 접합이 비-접합된 chMIL-38에 비해 GPC-1에 대한 결합을 감소시켰지만, 이 효과는 오직 낮은 항체 농도에서만 관찰되었고, 실험에 사용된 DOTA 비율 또는 부착된 DOTA 분자 수에 의존적이지 않았다 (도 12E). 테스트된 모의-방사성표지된 조건은 모의 표지되지 않은 chMIL-38 DOTA와 비교해 chMIL-38 DOTA의 결합에 영향을 미치지 않았으며 분석결과는 우수한 배치 내 및 배치 간 재현성을 나타냈다 (도 12F).

### 8.3 논의

키메라 MIL-38과 DOTA 킬레이트 분자를 접합시키기 위한 방법이 성공적으로 개발되었다. 키메라 MIL-38 DOTA 항체는 영상화를 위한 <sup>67</sup>Ga와 같은 약제(agent), 또는 영상화 및 방사성 면역 요법 치료를 위한 <sup>177</sup>Lu 로 표지될 수

있다. 가돌리늄(Gadolinium) 또는  $^{90}\text{Y}$ trium과 같은 다른 약제 또한 DOTA 킬레이터로 킬레이트화될 수 있다.

[0427] 유세포 분석 및 직접 결합 데이터는 접합(conjugation) 및 표지 과정이 키메라 MIL-38의 DU-145 세포와의 결합 능력에 최소한의 영향만 미치는 것을 나타낸다.

[0428] **실시예 9: 마우스 이중이식 모델에서의 키메라 MIL-38의 정위**

[0429] **9.1 재료 및 방법**

[0430] - 항체 표지 및 내재화

[0431] 키메라 MIL-38는 시각화를 위해 Cy5 형광단으로 표지되었다. DU-145 세포를 이용한 유세포 분석으로 표지 후 결합 활성의 유지를 확인하였다. ChMIL-38 Cy5는 DU-145 세포로의 명확한 내재화를 입증하였다.

[0432] - 이중이식 및 항체 주입(infusions)

[0433] 8주령 수컷 Balb/c 누드 마우스 세마리에  $5 \times 10^6$ 의 DU-145 세포가 포함된 무혈청 배지(RPMI) 100  $\mu\text{L}$ 를 각 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하주사하였다. 26일째에 모든 마우스는 촉진 가능한(palpable) 종양을 가졌다 (가로 약 4mm). 항체 용액 (약  $150 \mu\text{g}/\text{injection}$ )을 꼬리 정맥을 통해 주사한 뒤 0, 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 및 144시간째에 Bruker In-Vivo Xtreme Optical Scanner를 이용하여 영상화하였다.

[0434] **9.2 결과**

[0435] 종양 정위는 4시간째에 세마리의 마우스 중 두마리의 마우스에서 나타났고 테스트된 세마리의 마우스 모두에서 주입 24시간 후에 명확하게 나타났다 (도 13A). 종양 정위는 48 및 72시간에 유지되었으나 비-종양 신호는 감소하였다. 배경 대비 종양의 최적 신호가 배경 신호(background signal)가 사라지는 144 시간째에 관찰되었다. chMIL-38 Cy5 주입은 내약성이 좋았다 (well tolerated). 도 13B는 도 13A에서 144h 후의 대표 마우스에 대한 다중 모드 동물 회전 시스템(Multi-modal Animal Rotation System) (MARS) 영상을 도시한다.

[0436] **실시예 10:  $^{177}\text{Lu}$  DOTA MIL-38의 생체 분포 연구**

[0437] **10.1 재료 및 방법**

[0438] - 생체 분포 연구

[0439] 주요 장기 방사능 축적의 해부 및 측정을 위해 계획된 5개의 채혈 시점의  $T_0$ 에 수컷 Wistar 래트(rat) 15마리가 주사되었다. 계획된 시점은 6시간, 24시간, 48시간, 7일 및 14일이었다.

[0440] Singapore Radiopharmaceuticals에서 제공된 DOTA 접합된 MIL-38 항체를  $^{177}\text{Lu}$ 로 방사성표지하였고 벤치탑 품질 보증 테스트(bench top quality assurance testing)를 통과하였다.

[0441] **10.2 결과**

[0442] 시점(timepoints)에 따른 기관의 그램당 주사 활성(injected activity) %에 대해 표준화된 도표(standardised plot) (도 14)는 분석된 조직 및 기관에 독소 축적이 된다는 증거가 없는 안전한 방사성 면역 요법 (radioimmunotherapy) 프로파일을 나타낸다. 흥미롭게, 주요 배설 기관 (간, 신장)은 독성 방사성 축적의 증거가 나타나지 않는다 (도 15).

[0443] 시험 동물에서 부작용은 나타나지 않았다.

[0444] **10.3 논의**

[0445]  $^{177}\text{Lu}$ -표지된 키메라 MIL-38 DOTA는 조직 또는 기관, 특히 배설 기관(excretory organs)에서의 독소 축적의 증거 없이 우수한 내약성(good tolerability)을 나타냈다. 약제는 알려진 부작용없이 내약성이 좋았다.

[0446] 표적화된 종양이 결합된(combined) 정상 래트에서 형광 표지된 키메라 MIL-38로 나타난 상기 결과 (도 6 및 도 13)는 MIL-38 DOTA 접합체가 전립선암의 영상화 및 방사성-면역 요법 모두에 적용 가능성을 가질 것임을 시사한다.

[0447] **실시예 11: 이중이식편에서의  $^{64}\text{Cu}$  chMIL-38 DOTA 및 NOTA의 PET 영상화 연구**

[0448] **11.1 재료 및 방법**

[0449] 본 연구의 목적은 방사성-표지된 chMIL-38의 DU-145 이중이식편에 대한 생체 내(*in vivo*) 표적을 PET-CT 및 생체 외(*ex vivo*) 기관 분석을 이용하여 조사하는 것이다.  $^{67}\text{Ga}$ 도  $^{177}\text{Lu}$ 도 PET-CT 영상화에 사용될 수 없으므로  $^{64}\text{Cu}$ 가 방사성표지로 사용되었다. NOTA는  $^{64}\text{Cu}$ 에 대한 킬레이터로 선호되므로, 이런 이유로 키메라 MIL-38이 NOTA 킬레이터(chelator)와 접합되었고  $^{64}\text{Cu}$ 가 영상화 동위원소로 사용되었다. 영상화는 Siemens Inveon PET-CT 스캐너를 사용하여 수행되었다.  $^{64}\text{Cu}$  chMIL-38 NOTA 및  $^{64}\text{Cu}$  chMIL-38 DOTA 모두 영상화 및 생체 분포(biodistribution) 목적으로 사용되었다.

[0450] 8주령 수컷 Balb/c 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에  $5 \times 10^6$  DU-145 세포가 포함된 무혈청 배지(RPMI) 100  $\mu\text{L}$ 를 피하 주사하였다. 투여 시점에 궤양의 증거는 없었으며, 동물들을 면밀히 관찰하고 종양과 별개로 양호한 상태를 유지하였다. 33일째에 모든 마우스들은 촉진 가능한 종양(가로 약 4mm)을 가졌다. 접종(*inoculation*) 후 54일째에 항체 용액을 꼬리 정맥을 통해 주사하였고 Siemens Inveon PET-CT 기기를 이용하여 영상화하였다. 두 마리의 마우스는  $^{64}\text{Cu}$  chMIL-38-DOTA를 세 마리의 마우스는  $^{64}\text{Cu}$  chMIL-38-NOTA를 주입하였다. 각 마우스는 약 100  $\mu\text{g}$ 의 3.1-3.4MBq의 활성을 가진 chMIL-38 (chMIL-38 DOTA) 또는 4-4.8MBq의 활성을 가진 chMIL-38 (chMIL-38 NOTA)가 주입되었다.

[0451] PET 영상은 ordered-subset expectation maximization (OSEM2D) 알고리즘을 이용하여 재구성되고 Inveon Research Workplace 소프트웨어(IRW 4.1)(Siemens)를 이용하여 분석되어 CT 및 PET 영상의 융합 및 관심 영역(regions of interest)(ROIs)의 정의를 가능하게 하였다. 관심 기관의 오버랩을 확실하게 하기 위해 개별 동물 각각의 CT 및 PET 데이터 세트(dataset)가 IRW 소프트웨어(Siemens)를 이용하여 정렬되었다.

[0452] 마우스는 24시간 및 48시간 후에 촬영되었으며, 그 후에 마우스로부터 주요 기관을 제거하였고  $\gamma$ -분석(*analysis*)에 의해 존재하는 항체의 양이 측정되었다.

[0453] **11.2 결과**

[0454] Cy5-표지된 chMIL-38에 대해 관찰된 바와 같이 chMIL-38 NOTA 항체에 대한 생체 내(*In vivo*) 영상화는 우수한 종양 축적 및 장기(2일 이상) 정위(localisation)를 나타냈다(도 16). DOTA-표지된 항체에 비해 NOTA-표지된 항체가 종양에서 더 높은 결합력 및 축적을 나타냈다(도 17). 이는 생체 외 킬레이터(DOTA의 경우)의 불안정성(*instability*), 다른 기관의 킬레이터-유발 비-특이적 흡수(*uptake*), 또는 낮은 결합 효율(*binding efficiency*)에 따른 DOTA의  $^{64}\text{Cu}$  손실 때문일 것이다. NOTA-표지된 항체는 다른 항체 시스템에서 관찰된 것과 거의 동일하게 종양에서 높은 축적을 나타냈다.

[0455] 생체 외 분석은 두 가지 다른 접근 방법을 이용해서 표지된 chMIL38 항체에 대해 48시간에 생체 분포(biodistribution)를 나타냈다(도 17). chMIL-38 NOTA에 대해 간에서 효과적인 표적화를 나타내는 종양과 거의 동일한 신호가 나타났다. 더 긴 시점으로 영상화하면 거의 전적으로 종양 묘사가 나타날 것으로 기대되었다.

[0456] **실시예 12: 이중이식편에서의 염소 항-GPC-1의 표적화 및 내성 연구**

[0457] **12.1 재료 및 방법**

[0458] MIL-38가 마우스 GPC-1을 인식하지 못하기 때문에, chMIL-38의 종양-특이적 정위 및 다른 연구에서 나타난 우수한 내약성이 chMIL-38가 이중이식 종양에서 오직 인간 GPC-1만을 표적화하고 류린 또는 래트의 내재성(endogenous) GPC-1는 표적화하지 않기 때문일 가능성이 있다.

[0459] 염소 항-GPC-1 항체가 웨스턴 블롯에서 마우스 재조합 GPC-1을 인식하고 마우스 재조합 GPC-1을 면역침강(*immunoprecipitate*)시킬 수 있음이 밝혀졌으며 이는 염소 항-GPC-1 항체가 마우스 GPC-1의 원래(*native*) 형태(세포 표면)를 인식한다는 것을 시사한다. 따라서 염소 항-GPC-1 항체는 chMIL-38에 대해 나타난 안전성 및 내약성 결과가 마우스 GPC-1을 인식하는 항체에서도 나타나는지 확인하기 위해 사용된다.

[0460] 연구용 신약(Investigational New Drugs) 탐사에 대한 FDA 지침은 <30nmol의 단백질에 대한 최대 미세용량(*microdose*)을 제안한다. 전장 단일클론 항체는 의 단백질이다. 마우스에서 ~0.3mg의 항체가 22의 안전계수(*safety factor*)를 가지는 항체 4.5 mg 또는 안전계수 100을 가지는 항체 1mg의 인간 등가 용량(*Human Equivalent Dose*)(HED)과 동등하다(표 7 참조). 염소 항-GPC-1 300  $\mu\text{g}$ 를 주입 당 최대 용량으로 사용하였다.



[0461] DU-145가 이중이식된 6마리의 BalbC 마우스에 Cy5로 표지한 염소 항-GPC-1를 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 세 마리는 항체 150 µg을 투여하였고 세 마리는 항체 300 µg을 투여하였다.

표 7

| Human Equivalent Dose (HED) calculations |      |      |
|------------------------------------------|------|------|
| Proposed human total dose (mg)           | 1    | 4.5  |
| Safety factor                            | 100  | 22.2 |
| Equivalent total dose (mg)               | 100  | 100  |
| Av pt weight (kg)                        | 75   | 75   |
| Dose (mg/kg)                             | 1.33 | 1.33 |
| Conversion factor**                      | 12.3 | 12.3 |
| Animal dose (mg/kg)                      | 16.4 | 16.4 |
| Weight of mouse (g)                      | 20   | 20   |
| Dose per mouse (µg)                      | 328  | 328  |

\*recommended margin for safety factor is 100 - see  
Guidance for Industry on Estimating the Maximum  
Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for  
Therapeutics in Adult Health Volunteers

\*\*for human: mouse refer pg 7 Guidance for Industry  
Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for  
Therapeutics in Adult Healthy Volunteers

Chimeric MIL-38 does not bind recombinant mouse GPC-1  
Goat anti-GPC-1 binds both recombinant human and mouse GPC-1  
Goat anti-GPC-1 can act as a surrogate in a mouse tolerability study

[0462]

[0463] 표 7. 내약성 연구를 위한 염소 항-GPC-1 용량 계산.

[0464] 12.2 결과

[0465] - 표적화

[0466] 염소 항-GPC 항체에 대한 생체 내(In vivo) 영상화는 종양 축적 및 장기 (5일 이상) 정위를 나타냈다. 이 것은 특히 마우스 2.2 및 2.3 영상 (도 18A 및 18B) 및 MARS 영상 (도 18C)에서 뚜렷하다.

[0467] 생체 외 분석 (도 18B)는 염소 항-GPC 항체가 종양에서 강한 신호를 나타내는 것을 도시하였다. 모든 동물의 내 장에서의 일부 잔류 신호는 항체가 필시 담도계(biliary system)를 통해 제거되었음을 암시한다.

[0468] - 안전성(Safety) 및 내약성(tolerability)

[0469] 마우스는 외관, 임상 증상(clinical signs), 이유없는 행동 및 외부 자극에 대한 반응에 따라 연구 동안 평가되었다 (표 8). 체중 또한 모니터링되었다.

[0470] 본 연구에서 사용된 점수표에 근거하여 어떠한 쥐도 사용된 항체에 의해 유의적인 건강 영향이 나타내지 않았다. 한 마우스 (마우스 2.3)가 주사후에 경미한 경직(sluggishness)을 보였으나, 이는 주사 중에 발생한 경 미한 꼬리 화상에 의한 것이었다. 상기 마우스는 이 후 연구 과정 중에 회복되었다.

[0471] 연구 과정 동안 각각의 마우스에 대해 최소한의 체중변화가 관찰되었다.



표 8

| Indicators                               | Score of each animal in group |  |  |  |  |  | Scoring of independent variables:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------|-------------------------------|--|--|--|--|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Date                                     |                               |  |  |  |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Appearance:                              |                               |  |  |  |  |  | 0. Normal coat is smooth, lies flat and often has a sheen, eyes are clear and bright.<br>1. Slightly ruffled coat but no other marked changes<br>2. Moderate ruffled coat, eyes and nose may have discharges<br>3. Very ruffled coat, external orifices ungroomed, abnormal posture, may look hunched up, eyes look pale and pupils enlarged                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Clinical Signs                           |                               |  |  |  |  |  | 0. Respiration appears normal, body temperature feels normal on handling, no twitching behaviour, normal bowel movements<br>1. Small changes in above parameters<br>2. Body temperature appears above normal, respiration rapid and shallow breathing, twitching behaviour, altered bowel movement (change in consistency or amount)<br>3. Marked increasing in body temperature, respiration noisy, comatose.                                                                                                                                                                                                      |
| Unprovoked behaviour                     |                               |  |  |  |  |  | This behaviour is best observed from a distance and before any handling is attempted.<br>0. Normal behaviour pattern<br>1. Minor changes<br>2. Abnormal behaviour, less mobile and less alert than normal, inactive when hyperactivity would be expected.<br>3. Unsolicited vocalisation, self-mutilation, expiratory grunts, very restless or does not move at all                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Behavioral responses to external stimuli |                               |  |  |  |  |  | Often mice will show inquisitiveness with whisker twitching and sniffing, or attempts to escape if frightened. Mice can have good body tone and paw grip on handling. If the abdominal area of the body is painful then gently pressure and observation is a useful measure to pain.<br>0. Behavioural responses normal for the expected conditions<br>1. Shows some minor depression or minor exaggeration of responses.<br>2. Shows moderate signs of abnormal responses, there may be a change of behaviour.<br>3. Reacts violently to stimuli or muscular responses may be very weak as in a pre-comatose state |

[0472]

[0473]

총점:

[0474]

0-4 - 정상, 조치 필요 없음

[0475]

5-10 - 신중하게 모니터링, 고통의 근거

[0476]

10 이상 - 심각한 통증의 충분한 근거, 동물 안락사

[0477]

한 기준(criteria)에서 3점-즉시 안락사(euthanase).

[0478]

- 논의

[0479]

염소 항-GPC-1은 특히 120시간 시점에 도 13B에서 나타난 chMIL-38 결과와 거의 동일한 표적화를 나타냈다. 이는 다른 기관에 제한적인 결합이 있는 것을 시사하고, GPC-1이 어떤 특정 기관에서 높게 발현되지 않고 세포-표면에 발현되지 않거나 세포 표면에서 낮은 수준으로 발현되는 것을 암시한다.

[0480]

염소 항-GPC-1 항체는 두 용량에서 내약성이 좋았다.

[0481]

실시예 13: AM4 MIL-38 항체를 이용한 글리피칸-1 항원의 검출

[0482]

본 발명자들에 의해 수행된 실험은 최초 기탁된 후 "BLCA-38 하이브리도마"라고 언급되는 MIL-38 항체에 대한 하이브리도마 (ATCC 수탁번호 HB11785: 뮤린 하이브리도마 BLCA-38)는 본 발명에서 "AM3" 및 "AM4"라고 언급하는 두 가지 항체 집단을 생산하는 하이브리도마 세포들이 혼합된 집단이다. 각각 다른 항체 집단을 생산하는 하이브리도마 세포들이 분리되었고, "AM4" 하이브리도마 세포가 2014년 8월 22일에 수탁번호 CBA20140026로 CellBank Australia (CBA)에 기탁되었다.

[0483]

96웰 플레이트는 AM3 또는 AM4로 제조한 MIL-38 (1 µg/well)가 포함된 pH 9.5의 카보네이트 버퍼로 하룻밤 동안 코팅하였다. 플레이트를 5% 탈지유를 함유한 PBS-Tween (0.1%)로 37°C에서 블로킹하고 세척하였다. 항원 (GPC-1 NS0)에 150mM NaCl를 첨가하여 버퍼 II (20mM HEPES pH 7.5, 0.5mM EDTA, 0.5% Triton X-100)로 희석하였고 37°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 비오틴화된 AM4 항체로 검출을 수행한 후, 아비딘(avidin) HRP (1µg/mL)로 검출하였다. TMB (Sigma cat no T0440)를 첨가하고 TMB 정지 용액 (Sigma S5814)으로 반응을 정지시켰다. 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 도 19A에 도시하였다.

[0484]

두 번째 실험에서, 96웰 플레이트를 34A (AM3 및 AM4 항체들의 혼합) 또는 AM4로 제조한 MIL-38 (2.5 µg/well)가 포함된 pH 7.2의 PBS로 상온에서 1시간 동안 코팅하였다. 플레이트는 Blocker Casein (Thermo)을 포

함한 PBS-Tween (0.05%)로 37℃에서 1시간 동안 블록킹되었다. 세척 후에, 항원 (GPC-1 NSO)가 50mM Tricine 및 150 mM NaCl를 함유하는 pH 7.2의 TBS에 희석되었고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션되었다. 비오틴화된 AM4 클론 1F5으로 검출이 수행된 뒤 아비딘 HRP (1 µg/mL)로 검출되었다. TMB (Sigma cat no T0440)가 첨가되었고 TMB 정지 용액 (Sigma S5814)으로 반응이 정지되었다. 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 **도 19B**에 도시하였다.

[0485] 상기에 기재된 첫 번째 ELISA는 NSO가 생산한 GPC-1 (즉, MIL-38 항원)을 포획(capture)하기 위해 MIL-38을 이용하여 분석하였다. 상기 실험은 단일클론 AM3 MIL-38 및 단일클론 AM4 MIL-38의 포획과 비교되었다. AM4는 포획제로서 기능하는 것으로 나타난 반면, AM3는 샌드위치 ELISA 분석에서 포획제(capture agent)로서 기능하지 않았다 (**도 19A**).

[0486] 혼합 집단 MIL-38일 때 (AM3 및 AM4) 얻은 ELISA 신호가 비교된 상기에 기재된 두 번째 ELISA를 단일클론 AM4 1F5 클론으로부터 얻은 신호와 비교하였다. AM4 1F5를 포획제로 사용하는 것은 혼합된 항체 집단 34A를 사용한 것보다 더 높은 ELISA 신호를 제공했다 (**도 19B**).

[0487] 샌드위치 ELISA 결과는 단일클론 MIL-38 항체의 오직 AM4-유사 형태만이 글리피칸-1 항원을 포획제로서 검출하는데 유용하며, 단일클론 집단을 함유하는 포획제는 혼합 집단으로 이루어진 것에 비해 우수한 ELISA 신호를 제공한다는 것을 밝혔다.

[0488] **실시예 14: AM4 및 AM4 MIL-38 항체 집단의 서열 분석**

[0489] **재료 및 방법**

[0490] - 중쇄 및 경쇄 시퀀싱 (DNA)

[0491] 분리된 세 가지 시퀀싱이 수행되었다. 첫 번째로 1-0으로 명명된, 혼합된 이중-클론 하이브리도마 세포 (AM4 및 AM3) 제제를 이용하여 수행되었다 (coded 224945). 두 번째로 AM4를 생성하는데 사용된 하이브리도마 스타크 Alfio I 유래 세포를 이용하여 수행되었다 (coded 449295-1). 세 번째로 AM3를 생성하는데 사용된 하이브리도마 스타크인 Alfio II 유래 세포를 이용하여 수행되었다 (coded 449295-5).

[0492] 224945 (1-0) 및 449295-1 (Alfio I)의 시퀀싱을 위해, 총 RNA가 동결된 하이브리도마 세포로부터 추출되었고 cDNA가 RNA로부터 합성되었다. 그 후 항체의 가변 영역 (중쇄 및 경쇄) 및 불변 영역을 증폭하기 위해 RT-PCR를 수행한 뒤, 표준 클로닝 벡터로 각각 클로닝되고 시퀀싱되었다.

[0493] 총 RNA는 TRIzol® Plus RNA Purification System의 기술적 매뉴얼에 따라 하이브리도마 세포로부터 분리되었다. 총 RNA는 아가로스 젤 전기영동에 의해 분석되었다. 총 RNA는 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System의 기술적 매뉴얼에 따라 동형-특이적 안티 센스 프라이머 또는 범용 프라이머를 이용하여 cDNA로 역전사되었다. VH, VL, CH 및 CL 의 항체 단편은 GenScript의 RACE 표준 작업 방법(standard operating procedure of RACE)에 따라 증폭되었다.

[0494] 증폭된 항체 단편은 표준 분자 클로닝 방법(standard molecular cloning procedures)을 이용하여 각각 표준 클로닝 벡터에 클로닝되었다.

[0495] 정확한 크기의 인서트(inserts)를 가지는 클론을 식별하기 위해 콜로니 PCR 스크리닝이 수행되었다. 정확한 크기의 인서트를 가진 5개 이상의 단일 콜로니들을 각 항체 단편에 대해 시퀀싱되었다.

[0496] V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 플라스미드는 항체의 전장의(full-length) 가변 영역, 및 C<sub>H</sub>1 및 C<sub>L</sub>의 일부를 암호화하였다. C<sub>H</sub> 플라스미드는 C<sub>H</sub>1의 일부, 및 전장의 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3를 암호화하였다. C<sub>L</sub> 플라스미드는 C<sub>L</sub>의 일부를 암호화하였다. 전장의 불변 영역 또는 중쇄/경쇄를 얻기 위해, V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 플라스미드에 의해 암호화되는 불변 영역의 일부, 및 C<sub>H</sub> 및 C<sub>L</sub> 플라스미드에 의해 암호화되는 불변 영역의 일부는 각각 PCR에 의해 증폭되었으며, 전장의 DNA를 얻기 위해 오버랩 연장 PCR(overlap extension PCR)을 수행하였다. 정확한 VH, VL, CH 및 CL 인서트 사이스를 가지는 5개의 단일 콜로니가 시퀀싱에 보내졌다.

[0497] 449295-5 (Alfio II) 시퀀싱은 예상된 IgG1 중쇄 서열에 해당하는 서열을 얻는데 어려움을 겪었다. 두 RNA 제조(preparations)가 수행되었다. 세포의 첫 번째 배치(batch)에 대해, 역전사 (RT)를 위해 올리고-dT 프라이머 및 CDS III 프라이머가 사용되었다. IgG1 및 Ig 특이적 프라이머를 이용한 PCR에 의해 VH/CH 및 V/C가 증폭되었고, 마우스 β-actin 유전자의 일부가 양성 대조군으로서 증폭되었다. 정상적인 경쇄 밴드를 수월하게 얻었고 젤에

서 오직 약한 VH만이 관찰되었다. 정확한 V 및 C 인서트 사이즈를 가지는 5개의 개별 콜로니가 시퀀싱에 보내졌다. 5개의 다른 클론들의 V 및 C 유전자는 거의 동일한 것으로 판명되었다. Alfio II 하이브리도마의 경쇄 공통 서열은 하기에 열거하였다. 하기에 나타난 바와 같이, 1개의 비생산적(unproductive) 중쇄 서열을 8개의 랜덤 시퀀싱된 VH 양성 클론으로부터 얻었다. 세 종류의 중쇄 불변 영역 서열을 10개의 랜덤 시퀀싱된 CH 양성 클론 (IgG<sub>1</sub>CH 1개, IgG<sub>2a</sub>CH 1개 및 IgG<sub>2b</sub>CH 8개)으로부터 얻었다. 잠재적인 종류 변환(class switching)의 영향을 피하기 위해, IgM 특이적 프라이머를 이용한 C<sub>H</sub>의 증폭이 수행되었으나, 표적 PCR 산물은 수득되지 않았다. 또한, 중쇄 FR1 변성(degenerate) 프라이머를 이용하여 전장의 중쇄 (V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>)가 증폭된 경우, 표적 PCR 산물이 존재하지 않았다

[0498] 여러 번의 시도 후에도 생산적 중쇄가 수득되지 않았으므로, Alfio II 세포의 두 번째 바이알(vial)에서 중쇄 서열을 분리하여 시도하였다. 세포의 두 번째 바이알에 대해, 역전사 초기에 oligo- dT 프라이머가 사용되었다. V<sub>H</sub>는 IgG1, IgG2b, IgM, IgA 특이적 프라이머 및 IgG 변성 프라이머 각각을 이용하여 증폭되었고, V는 Ig 특이적 프라이머를 이용하여 증폭되었다. 이전 결과와 동일했던 생산적 경쇄 및 비생산적 중쇄를 얻었다. 랜덤 6머(mer) 프라이머를 이용한 역전사 또한 시도되었으나 성공하지 못했다.

[0499] 요약하면, 경쇄 및 중쇄 서열을 분리하려는 여러 시도가 이루어졌다. 1개의 재배열된(rearranged) 경쇄 서열은 세포의 두 배치에 대한 다른 시도 후에 일관되게 얻어졌다. 그러나, 약한 VH 표적 PCR 산물만이 관찰되었으며 중쇄 서열 시퀀싱 결과가 일관되게 나타나지 않았다.

## [0500] **결과**

[0501] - 시퀀싱 (DNA)

[0502] 시료로부터 분리된 총 RNA가 1.5% 아가로스/ GelRed<sup>TM</sup> 젤에서 DNA 마커 (Marker III - TIANGEN, Cat. No. : MD103)와 나란히 전기영동되었다.

[0503] PCR 산물 4 마이크로리터(microliter)를 DNA 마커 (Marker III)와 나란히 1.5% agarose/GelRed<sup>TM</sup> 젤에 전기영동하였다. PCR 산물은 정제되었고 이후에 사용하기 전까지 -20℃에서 보관되었다.

[0504] 5개의 다른 클론의 V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, C<sub>H</sub> 및 C<sub>L</sub> 유전자는 거의 동일하였다. 공통서열 (**서열번호: 1** - AM4 MIL-38 마우스 IgG<sub>1</sub> 중쇄 DNA 공통 서열; **서열번호: 2** - AM4 MIL-38 마우스 카파(Kappa) 경쇄 DNA 공통 서열)이 단일클론 하이브리도마 집단 (AM-4)에 의해 생산되는 항체의 서열로 밝혀졌다.

[0505] 상기 AM4 MIL-38 중쇄 및 경쇄 공통 DNA 서열은 AM4 중쇄 아미노산 서열 (**서열번호: 3** - AM4 MIL-38 마우스 IgG1 중쇄 아미노산 공통 서열) 및 AM4 경쇄 아미노산 서열 (**서열번호: 4** - AM4 공통 MIL-38 경쇄 아미노산 공통 서열)로 번역된다.

## [0506] **AM3 공통 서열**

[0507] AM3-유사 Alfio II 세포로부터 일관적으로 얻어지지 않았다. 시퀀싱 449295-5 (Alfio II)로부터 얻은 경쇄 서열이 일관되게 얻어졌으며, 다른 두 시퀀싱에 대한 서열과 비교해 프레임워크 영역 및 상보성-결정 영역 둘 다에서 명확한 차이를 나타냈다.

[0508] AM3 MIL-38 카파(Kappa) 경쇄 DNA 공통 서열 (서열번호: 10)

ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTTGTATACATGTTGCTGTGGTTGTCTGGTGTGATGGAGA  
CATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAGTTTCATGTCCACATCAATAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAGGCCA  
GTCAGAAATGTGGGTTCTCATGTAGCCTGTTTTCAGCAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTACTCG  
GCATCCTACCGGTACAGCGGAGTCACTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCACCAT  
CAACAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTAGCAATATAACAGTTTTCCATTACGTTTCGGTT  
CGGGGACAAAGTTGGAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAG  
TTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTCTTCTTGAACAACCTTCTACCCAAAAGACATCAATGTCAAGTGGAA  
GATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAAGACAGCACCTACA  
GCATGAGCAGCACCTCAGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCAC  
AAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAG

[0509]

[0510] \* 경쇄를 암호화하는 서열의 개별 영역은 음영/비음영으로 번갈아 표시되는 텍스트로 강조되었다. 위치: 1-72 = 선도 서열; 73-141= 프레임워크 영역 (LFR1); 142-174= 상보성 결정 영역 (LCDR1); 175-219= LFR2; 220-240 = LCDR2; 241-336 = LFR3; 337-363 = LCDR3; 364-393 = LFR4; 394-714 = 불변 영역 (CK); 715-717 = 정지 코돈

[0511] AM3 MIL-38 Light Chain Amino Acid 공통 서열 (서열번호: 11)

MGIKMESQTQVFVYMLLWLSGVGDIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCKASQNVGSHVAFQKPGQSPKALIYS  
ASYRYSQVTDRTGSGSGTDFTLTINNVQSEDLAEYFCQQYNSFPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ  
LTSGGASVVCFLNFFPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTQDQSKDSTYSMSSTLTCLKDEYERHNSYTCETH  
KTSTSPIVKSFNRENC\*

[0512]

[0513] 경쇄 아미노산 서열의 개별 영역은 표지된대로 표시되었다: 위치 1-24 = 선도 서열; 25-47 = 프레임워크 영역 (LFR1); 48-58 = 상보성 결정 영역 1 (LCDR1); 59-73 = LFR2; 74-80 = LCDR2; 81-112 = LFR3; 113-121 = LCDR3; 122-131 = LFR4; 132-238 = 카파(Kappa) 불변 영역 (CK) & 정지 코돈(\*)

[0514] 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에 기재된 것들과 유사하거나 동일한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있으나, 더욱 바람직한 방법 및 재료가 본 발명에 기재된다. 인용된 모든 발행물(publication), 특허, 및 특허 공보는 그 전체가 모든 목적을 위해 본 발명에 참조 문헌으로서 포함된다.

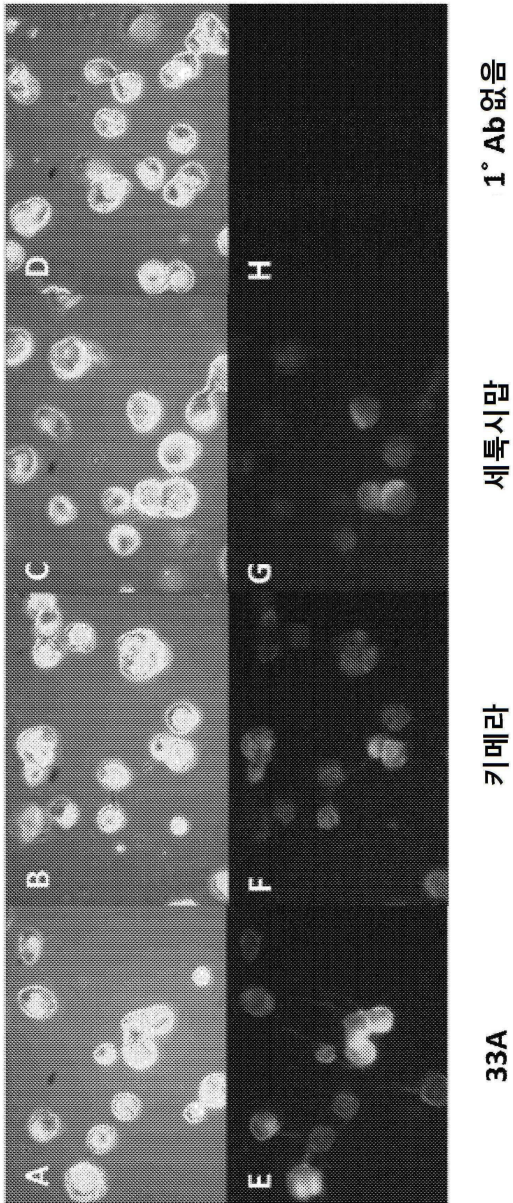
[0515] 본 발명에서 논의된 발행물들은 본 출원의 출원일 이전에 그들을 개시하기 위해서만 제공된다. 본 발명의 어떤 것도 본 발명이 선행 발명에 의해 그런 발행물들을 선행할 권리가 없다고 인정하는 것으로 해석되어선 안된다.

[0516] 본 발명이 이의 특정 실시예와 관련하여 기재되었지만, 추가 변형이 가능한 것으로 이해될 것이며, 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리를 따르는 본 발명의 임의의 변형, 사용, 또는 적용을 포함하고, 본 발명이 적용되는 기술분야 내에 공지된 또는 통상적인 관례 범위 내에서 본 발명의 기재로부터의 이탈을 포함하며, 첨부된 청구 범위 안에서 전술한 필수적인 특성에 적용될 수 있다.



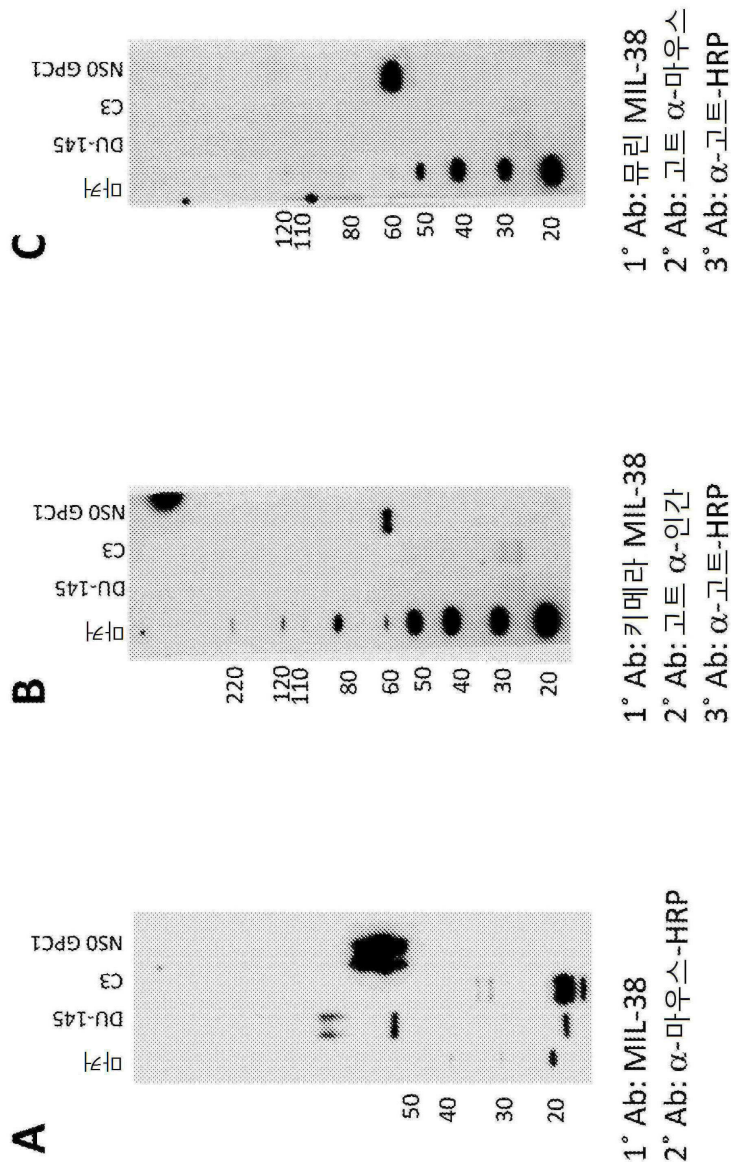
도면

도면1

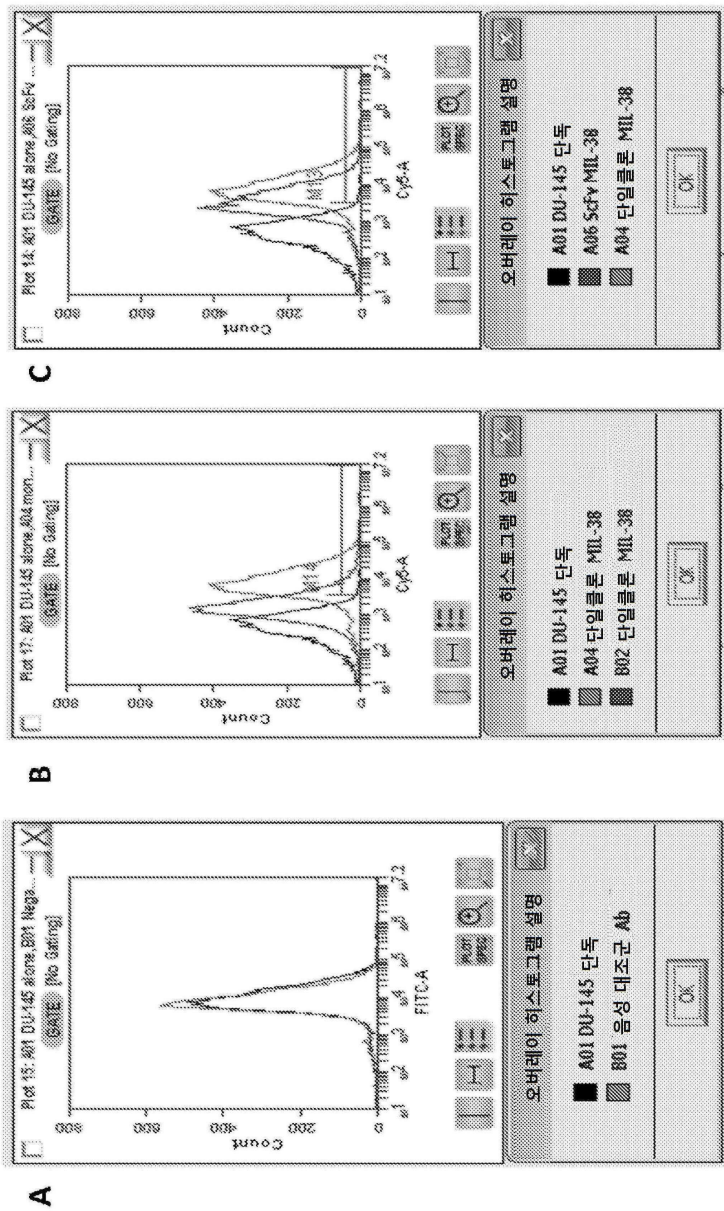




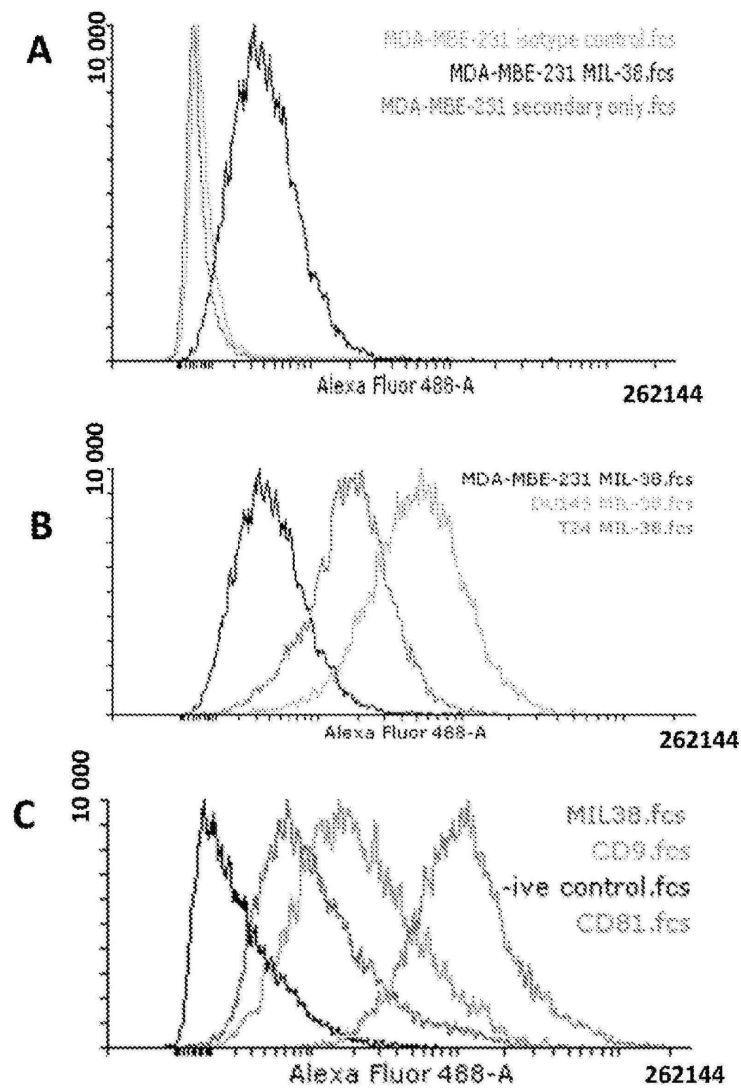
도면2



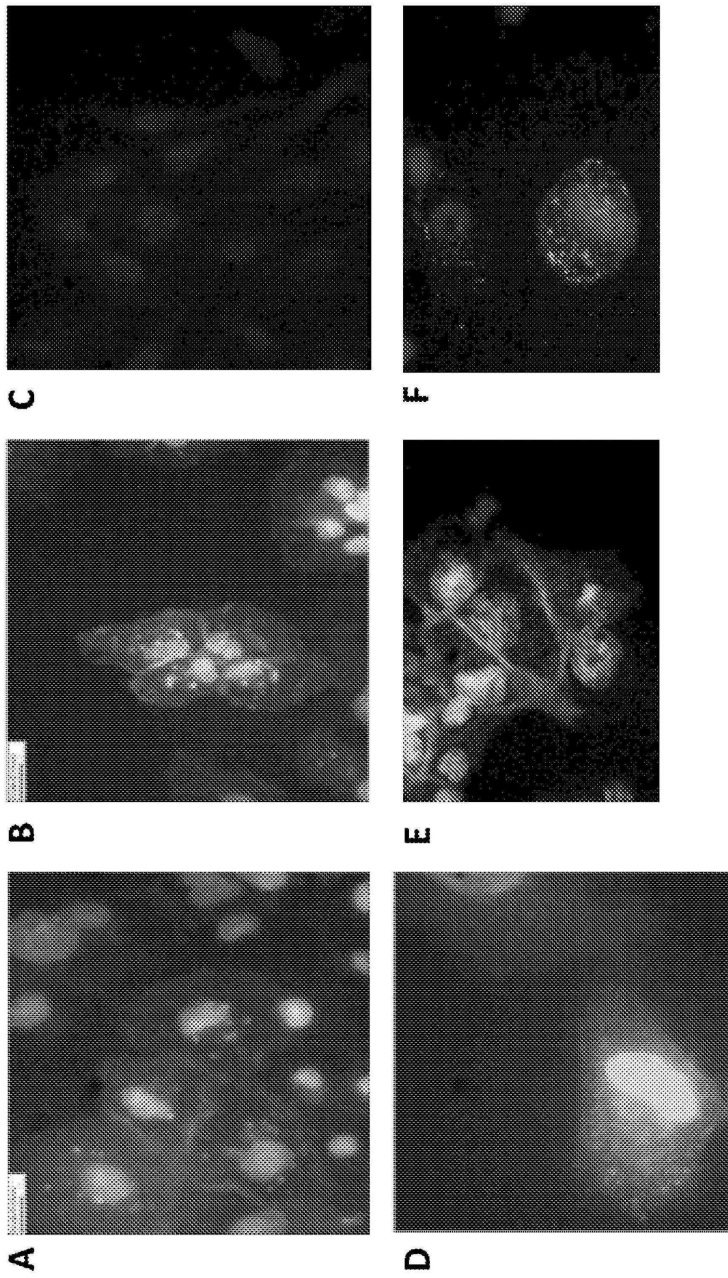
도면3



도면4

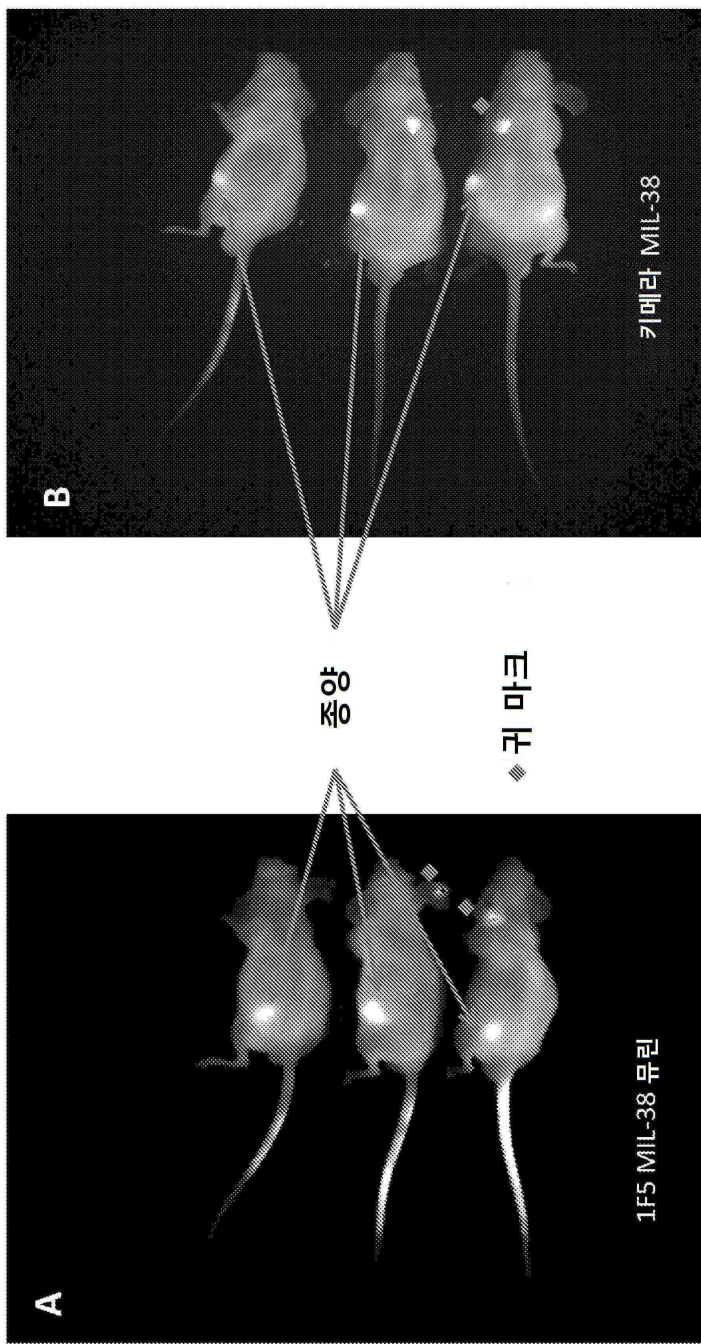


도면5



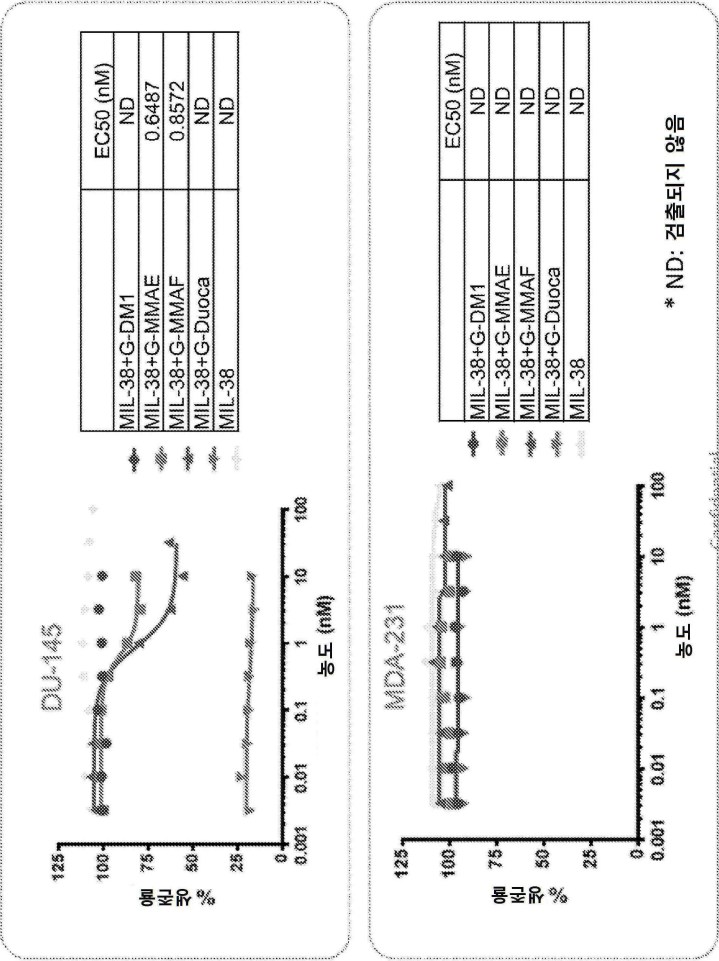


도면6



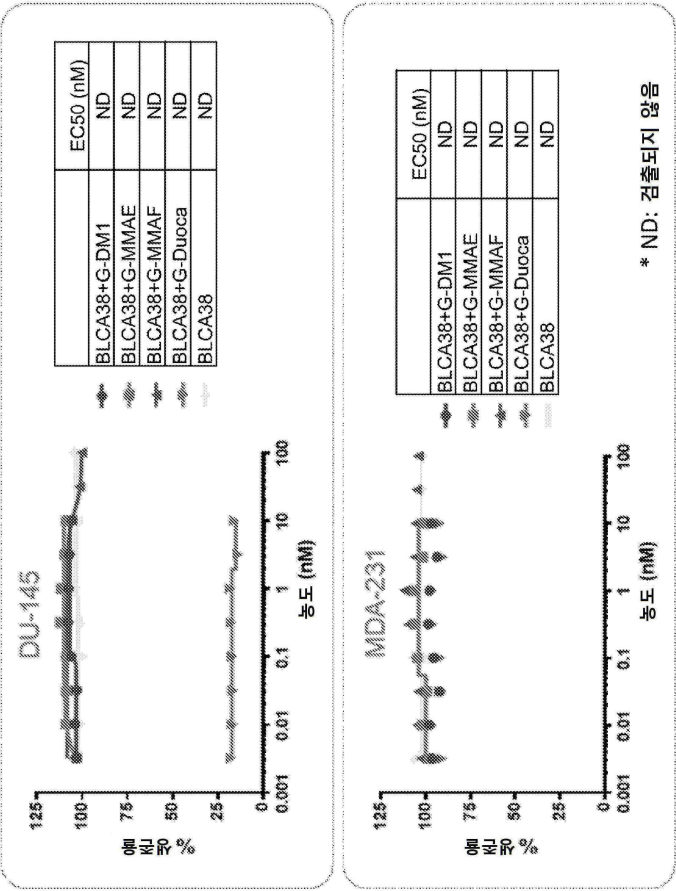
도면7a

A



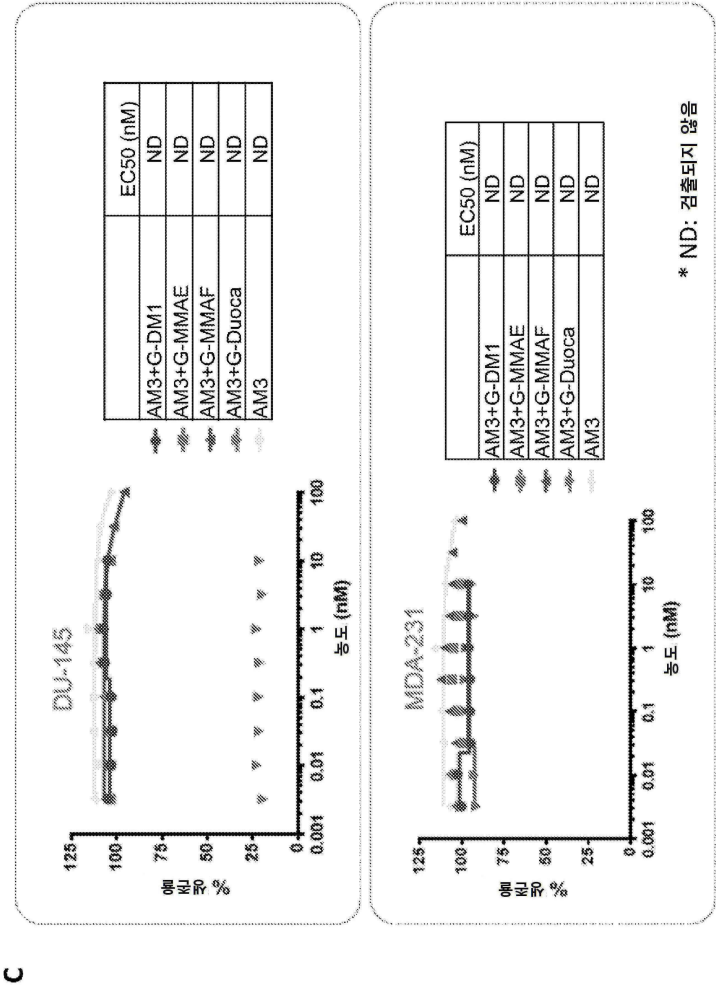
도면7b

B



Confidential

도면7c

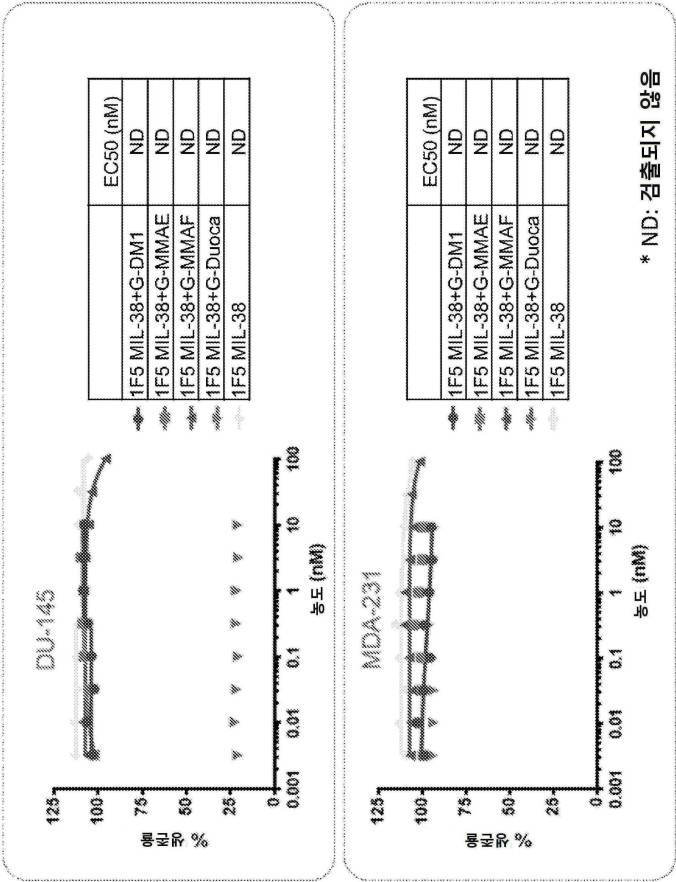


Confidential



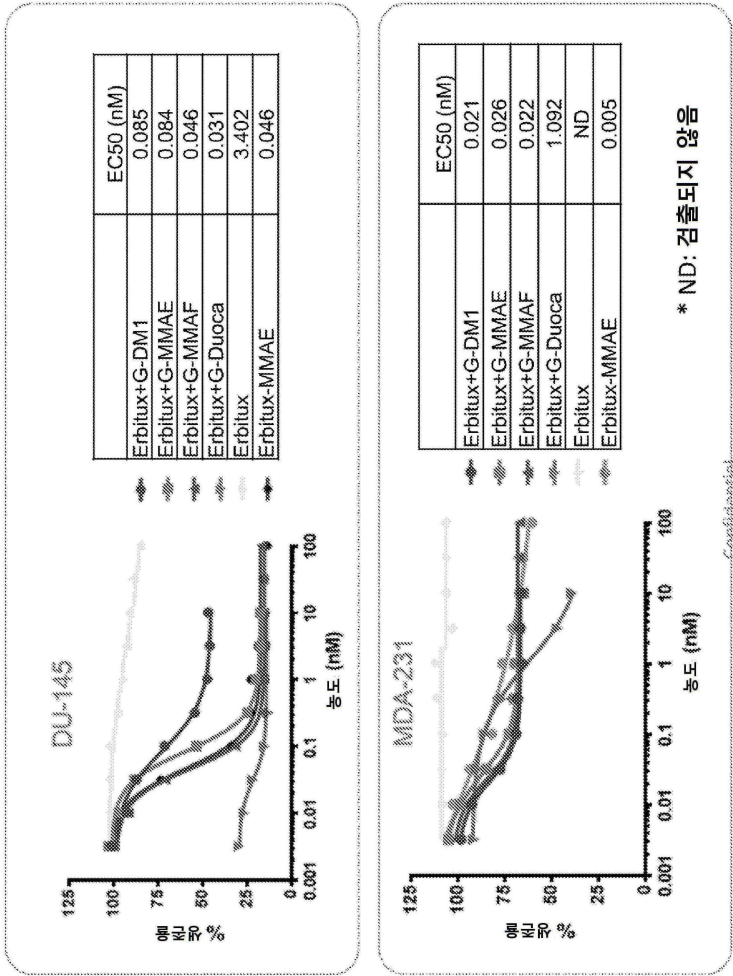
도면7d

D



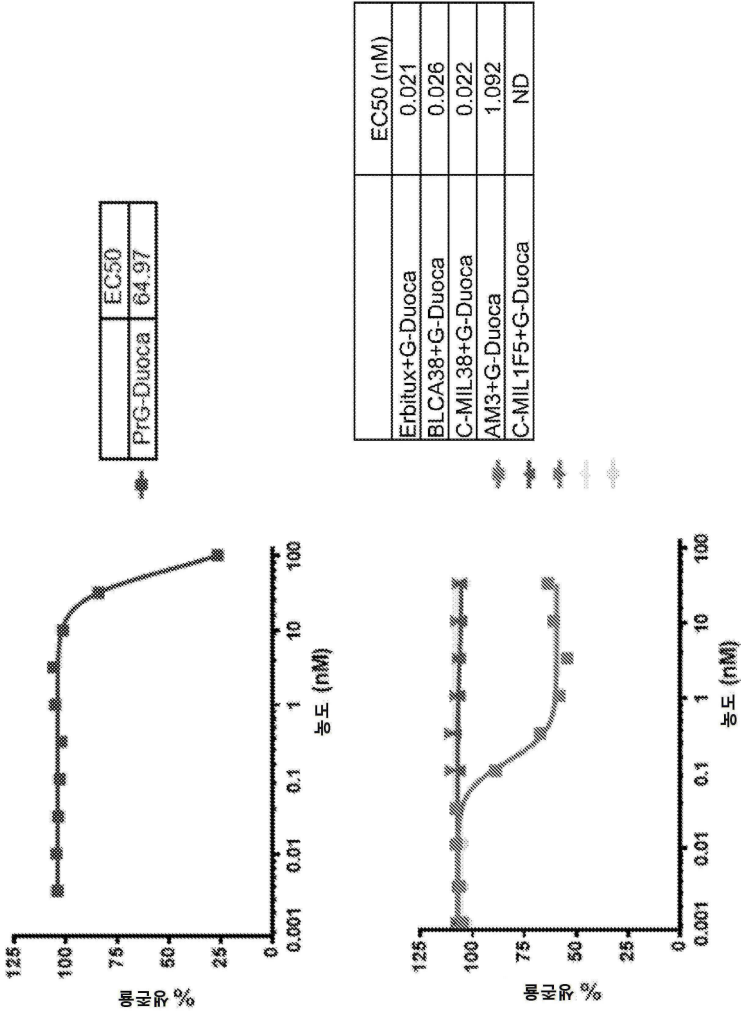
Confidential

도면7e

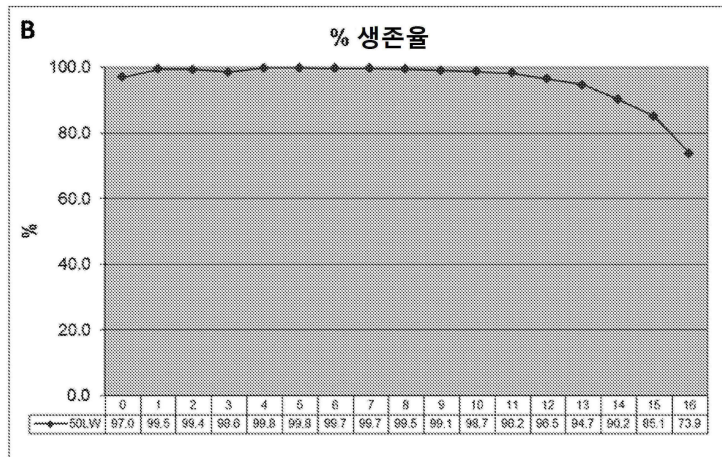
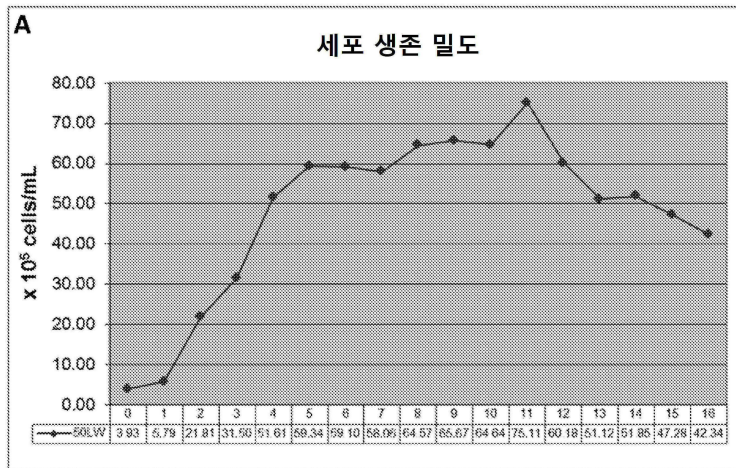


E

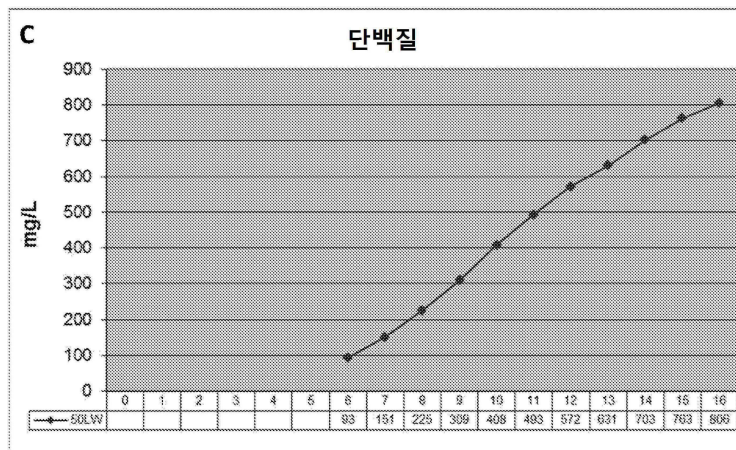
도면7f



도면8a

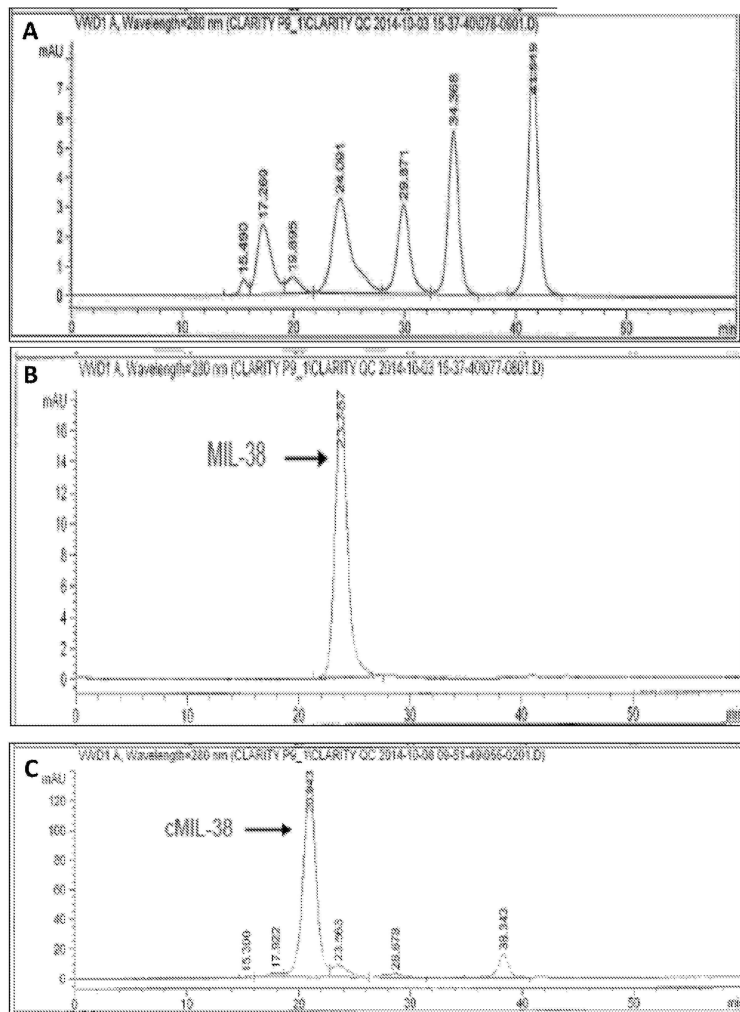


도면8b

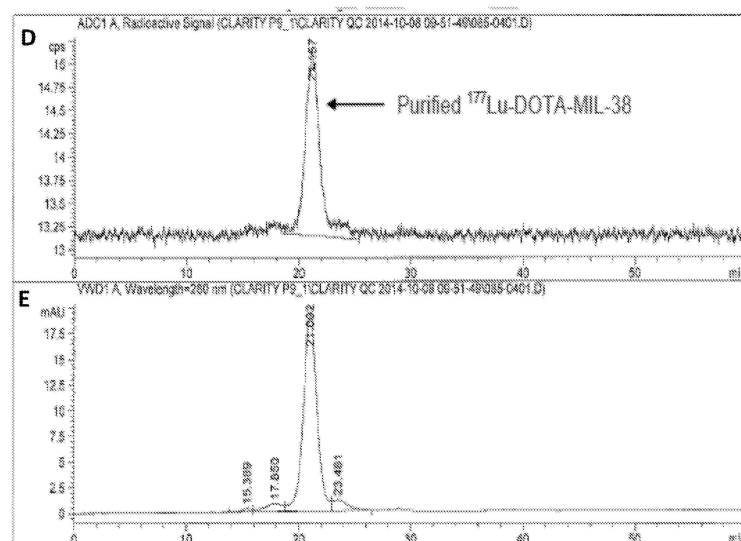




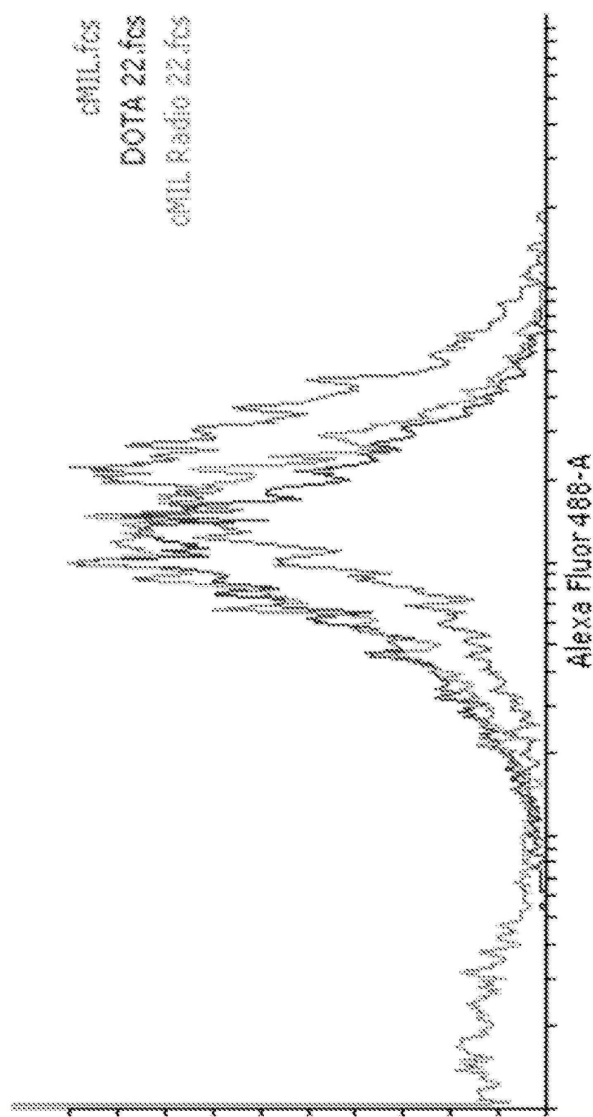
도면9a



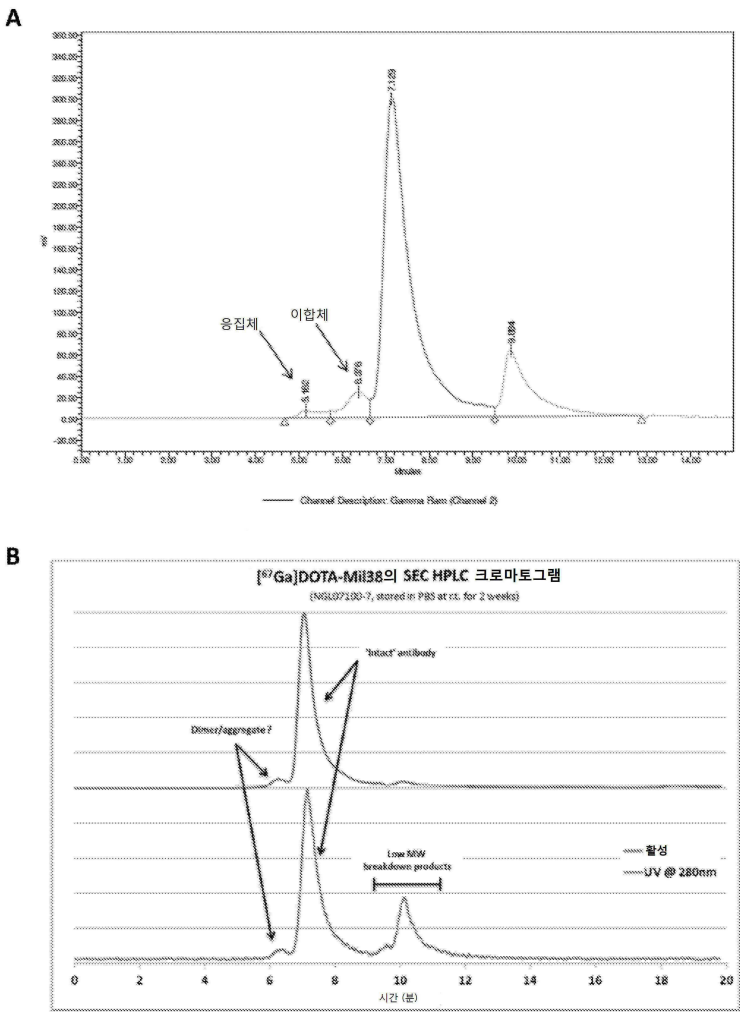
도면9b



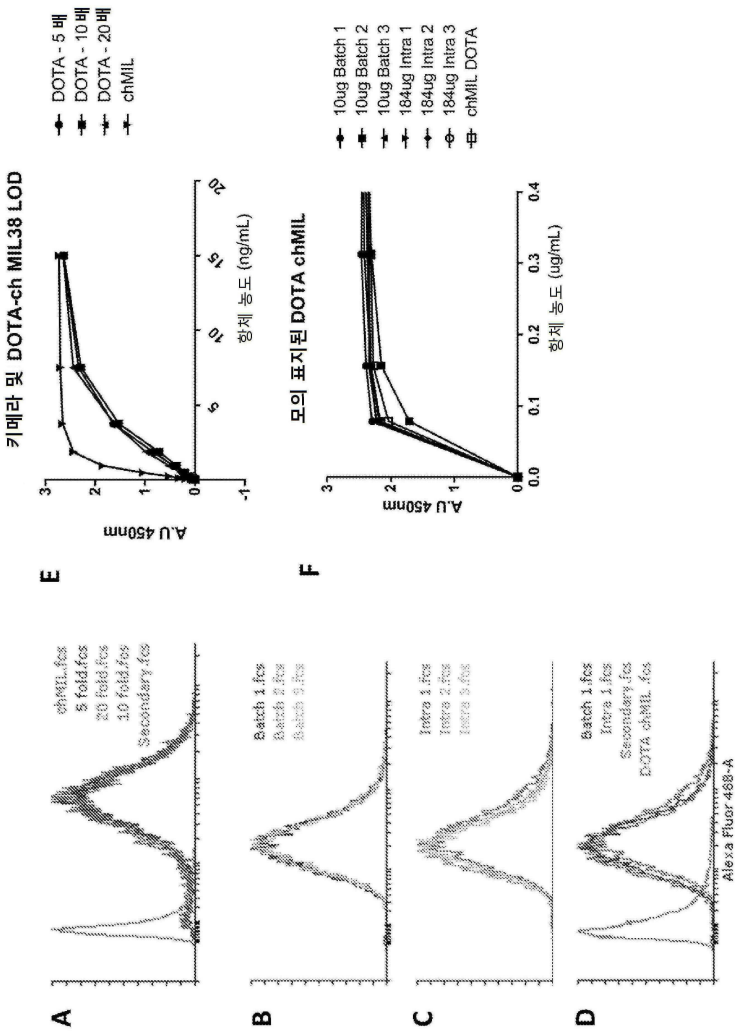
도면10



도면11

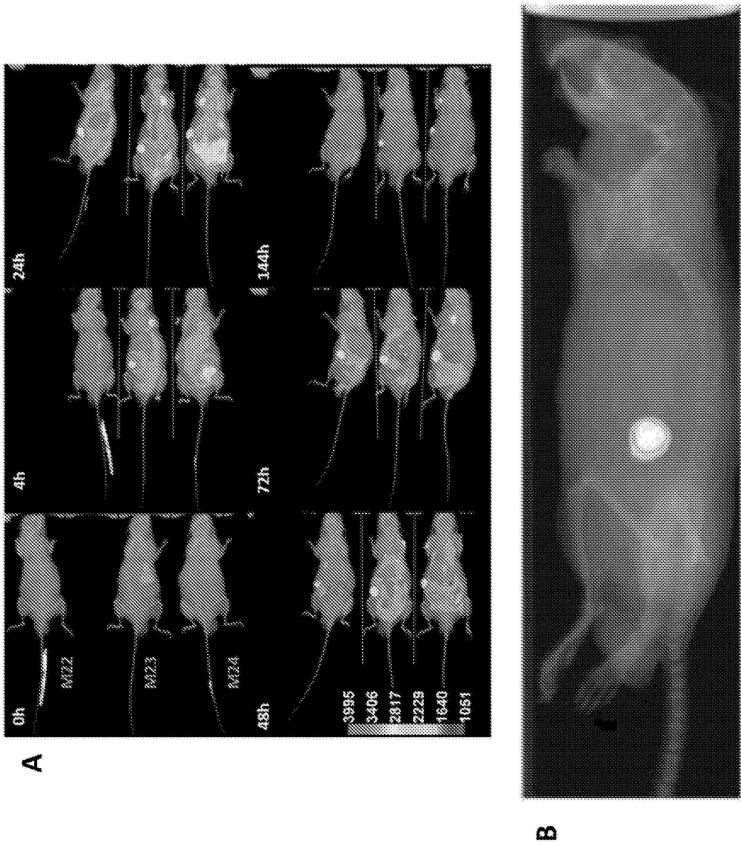


도면12

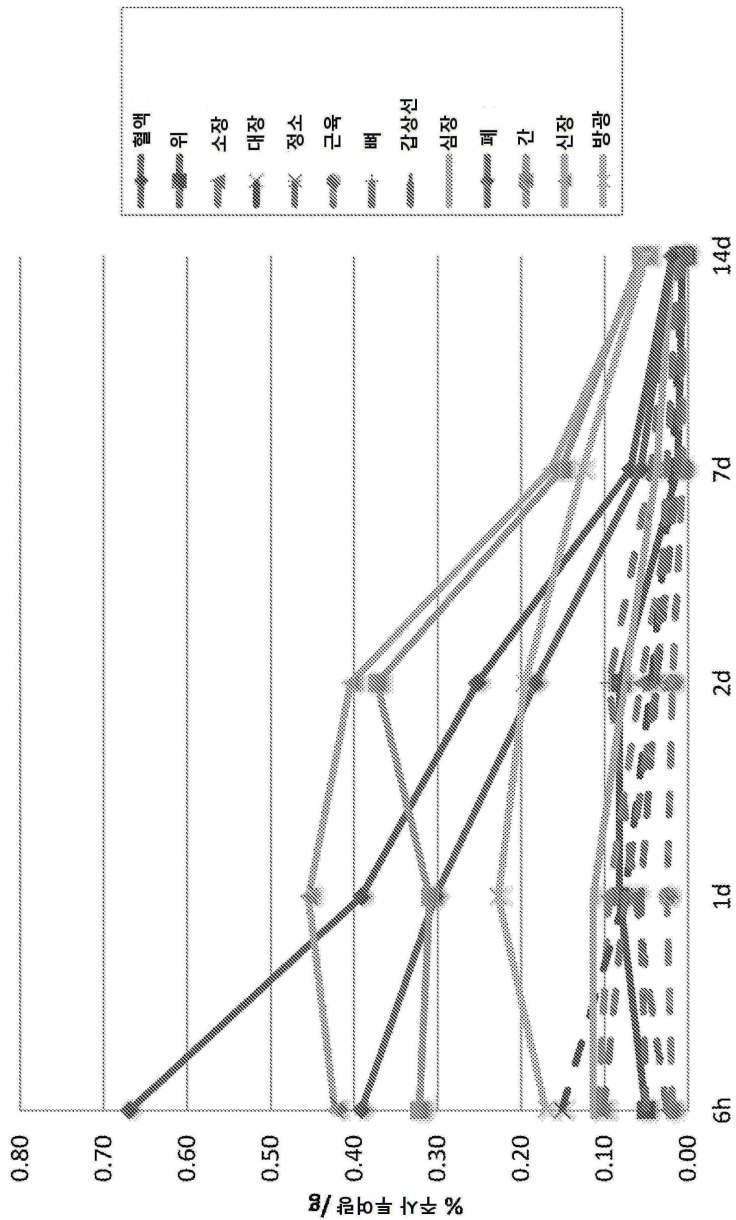




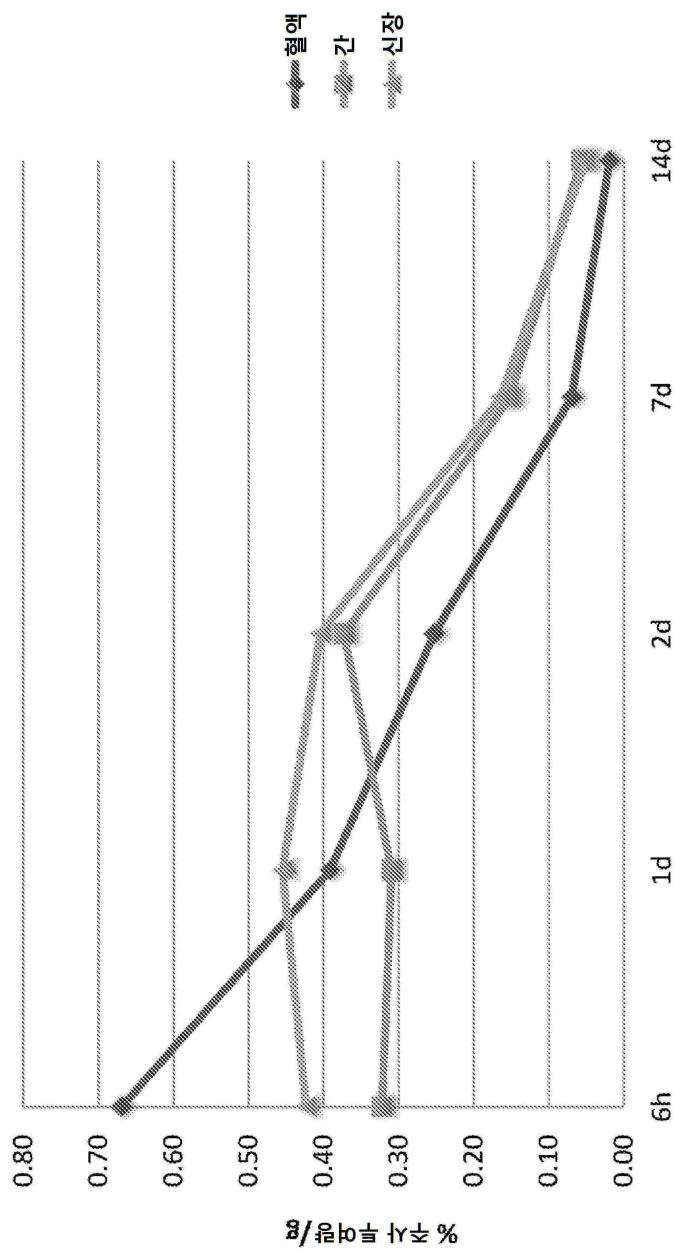
도면13



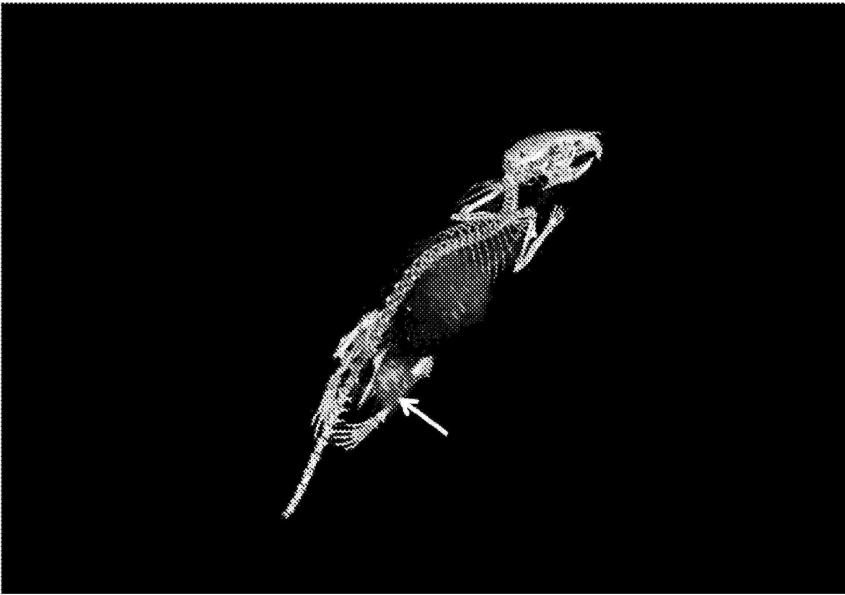
도면14



도면15

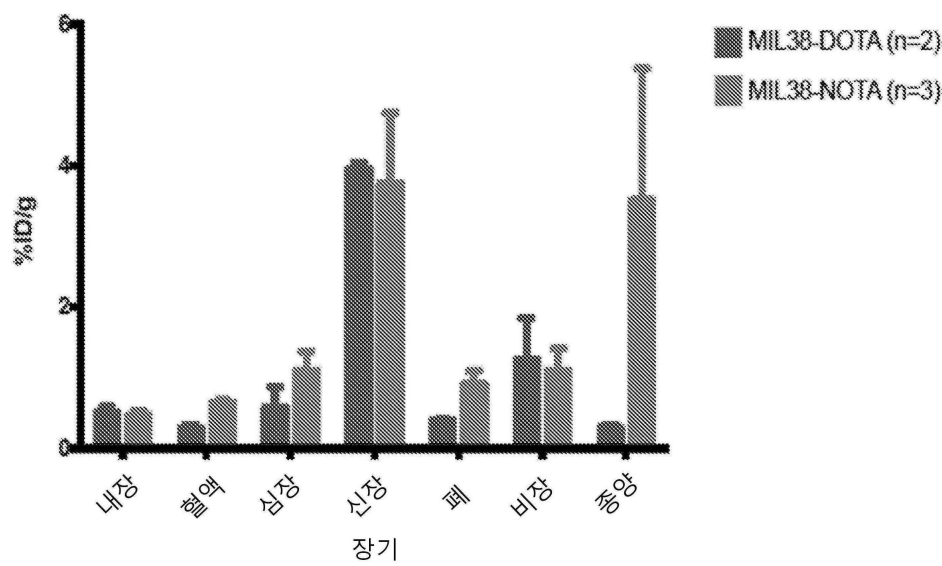


도면16



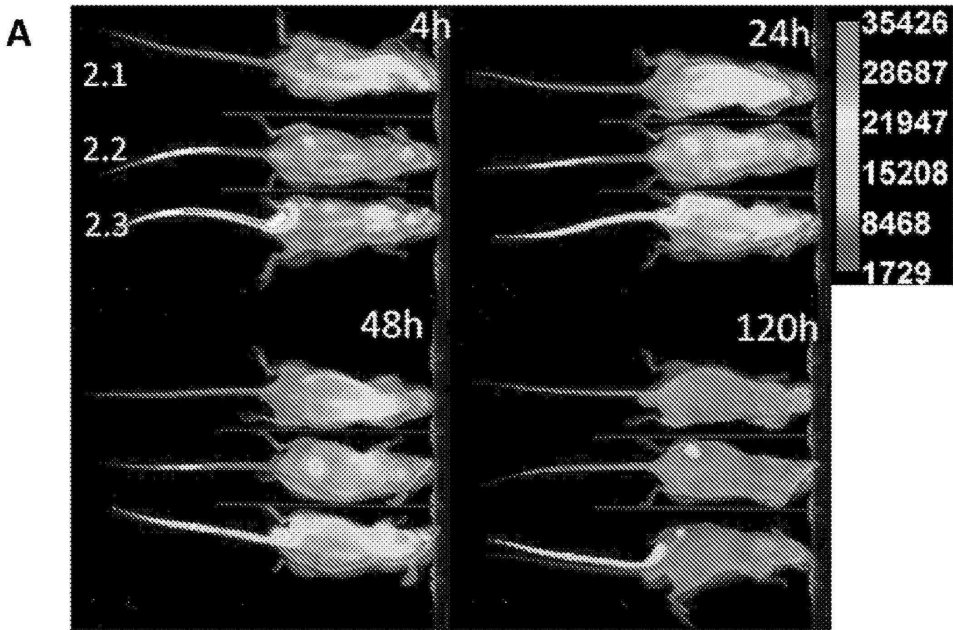
도면17

DOTA & NOTA에 대한 탈체(Ex Vivo) 생체 내 분포  
표지된 MIL-38

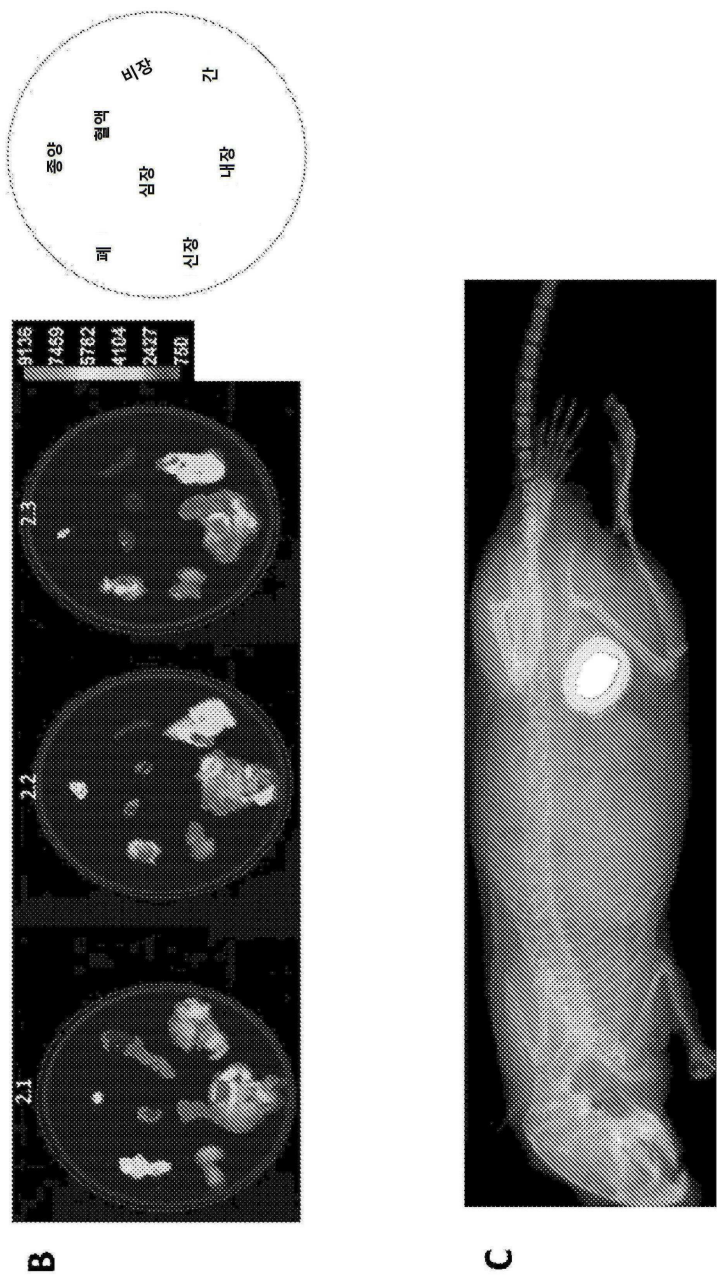




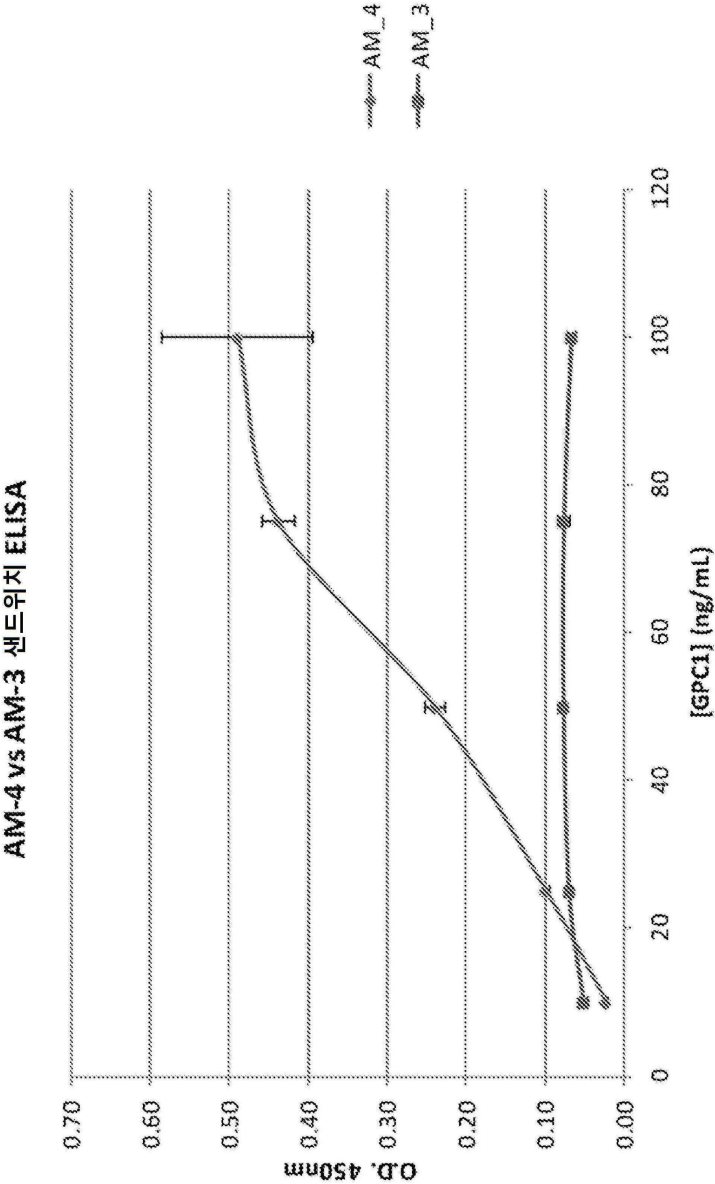
도면18a



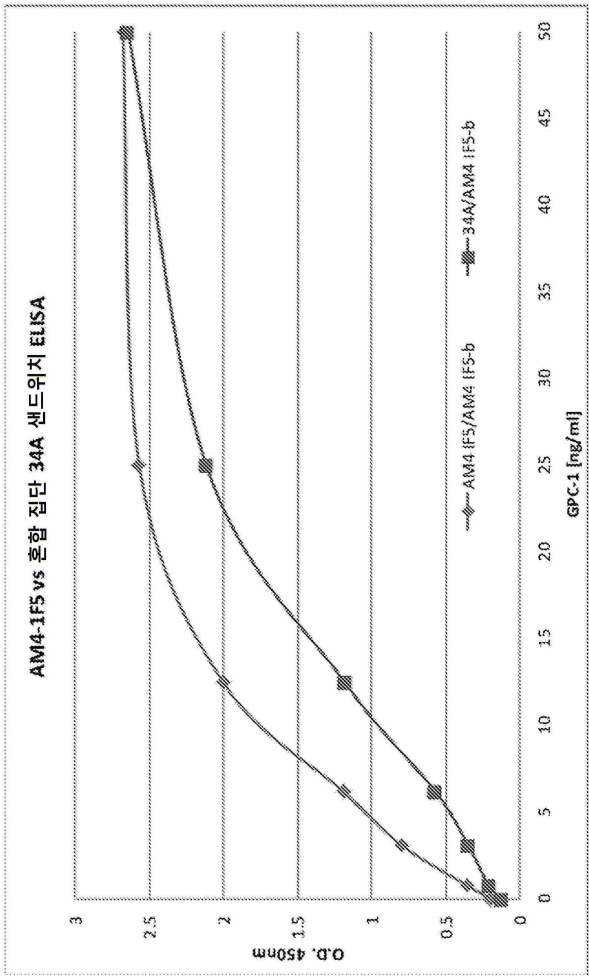
도면18b



도면19a



도면19b



B

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Minomic International Ltd
- <120> Therapeutic Antibodies and Uses Thereof
- <130> P142353C
- <160> 11
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1386
- <212> DNA
- <213> Mus musculus
- <400> 1



atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggctgctg cccaaagtat ccaagcacag 60

atccagttag tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120

tgcaaggctt ctggttatgc cttcacagac tattcaatga actgggtgaa gcaggctcca 180

ggaaagggtt taaggtggat gggctggata aacactgaga ctggtgagcc aacatatata 240

gatgacttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctttttg 300

cagatcaaca acctcagaaa tgaagacacg gctacatatt tctgtgctag acactatgat 360

tacggggggt ttccttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc agccaaaacg 420

acacccccat ctgtctatcc actggccctt ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg 480

accctgggat gcctggtcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgc ctggaactct 540

ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact 600

ctgagcagct cagtgaactg cccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac 660

gttgcacc cggccagcag caccaagggt gacaagaaaa ttgtgccag ggattgtggt 720

tgtaagcctt gcatatgtac agtccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag 780

ccaaggatg tgctcacat tactctgact cctaagggtca cgtgtgtgtt ggtagacatc 840

agcaaggatg atcccaggt ccagttcagc tggttttag atgatgtgga ggtgcacaca 900

gctcagacgc aaccccgga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt 960

cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagtca aatgcagggt caacagtgc 1020

gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca 1080

caggtgtaca ccattccacc tccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc 1140

tgcatgataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag 1200

ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc 1260

tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct 1320

gtgttacatg agggcctgca caaccacat actgagaaga gcctctccca ctctcctggt 1380

aatga 1386

<210> 2

<211> 705

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcgttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120

atcacatgtc gagcaagtgg gaatgttcac aattatttag catggtatca gcagaaacag 180  
 ggaaaatctc ctcaactcct ggtctatact gcaaaaacct tagcagatgg tgtgccatca 240  
 aggttcagtg gcagtggatc aggaacacaa tattctctca agatcaatag cctgcagcct 300  
 gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttggagta atccgtggac gttcggtgga 360  
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420

tccagtgage agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480  
 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540  
 aacagttgga ctgatacaga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600  
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgagggcac tcacaagaca 660  
 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 705

<210> 3

<211> 461

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

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

20 25 30  
 Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe

35 40 45  
 Thr Asp Tyr Ser Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60  
 Arg Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr

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

85 90 95  
 Thr Ala Phe Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Asn Glu Asp Thr Ala Thr

100 105 110  
 Tyr Phe Cys Ala Arg His Tyr Asp Tyr Gly Gly Phe Pro Tyr Trp Gly

115 120 125

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

130

135

140

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro

195

200

205

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro

210

215

220

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

225

230

235

240

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile

245

250

255

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

260

265

270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln

275

280

285

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln

290

295

300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu

305

310

315

320

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

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

370 375 380  
Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln

385 390 395 400  
Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly

405 410 415  
Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu

420 425 430  
Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn

435 440 445  
His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

450 455 460  
<210> 4

<211> 234

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Val His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp

100 105 110

Ser Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115                      120                      125  
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln  
 130                      135                      140  
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145                      150                      155                      160  
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln  
 165                      170                      175  
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180                      185                      190  
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg  
 195                      200                      205  
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro  
 210                      215                      220  
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

225

230

<210> 5

<211> 1404

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mus musculus/Homo-sapiens chimeric sequence

<400> 5

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggcttggg tgtggacact gctgttcttg atggctgctg cccagagtat tcaggctcag  | 60  |
| attcagctgg tccagagcgg tcccagactg aagaagccag gcgagaccgt gaagatctcc  | 120 |
| tgcaaggcca gcggctacgc ttccacagac tattctatga actgggtgaa gcaggcccca  | 180 |
| ggcaagggcc tgaggtggat gggctggatc aataccgaga caggcgagcc cacctacaca  | 240 |
| gacgatttca agggccgggtt cgctttttcc ctggagacct ctgcctccac agcttttctg | 300 |
| cagatcaaca atctgagaaa cgaggacacc gccacatact tctgcgctag gcactacgat  | 360 |
|                                                                    |     |
| tatggcggct ttcttatttg gggccagggc accctggtga cagtgtccag cgcctctacc  | 420 |
| aagggcccat ccgtgtttcc actggctccc tcttccaaga gcacctctgg cggcacagcc  | 480 |
| gctctgggct gtctggtgaa ggattacttc ccagagcccg tgacagtgtc ttggaactcc  | 540 |
| ggcgccctga cctccggagt gcatacatit cccgctgtgc tgcagagctc tggcctgtac  | 600 |
| agcctgtcca gcgtggtgac cgtgccttct tccagcctgg gcaccagac atatatctgc   | 660 |



aacgtgaatc acaagccatc caatacaaaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgt 720  
 gataagacc cccattgtcct gctccagagc tgctgggagg acctagcgtg 780  
  
 ttctctgttc caccgaagcc taaggacacc ctgatgatct ctaggacccc cgaggtgaca 840  
 tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacaggat cctgaggatga agttcaactg gtacgtggat 900  
 ggctgtggagg tgataaatgc taagaccaag cctaggaggagg agcagtacaa cagcacctat 960  
 cgggtggtgt ctgtgtgtac agtgtgtcac caggactggc tgaacggcaa ggagtataag 1020  
 tgcaaggatga gcaataagcc cctgcccgtc cctatcgaga agaccatctc taaggccaag 1080  
 ggccagcctc gggagccaca ggtgtacaca ctgcctccaa gcagagacga gctgaccaag 1140  
 aaccagggtgt ctctgacatg tctggtgaag ggcttctatc cttctgatat cgctgtggag 1200  
  
 tgggagtcca atggccagcc agagaacaat tacaagacca caccctctgt gctggacagc 1260  
 gatggtctct tctttctgta ttccaagctg accgtggata agagcagggtg gcagcagggc 1320  
 aacgtgttct cctgtagcgt gatgcacgag gcactgcaca accactacac tcagaaatcc 1380  
 ctgtccctgt cacctggcaa atga 1404  
  
 <210> 6  
 <211> 705  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Mus musculus/Homo sapiens chimeric sequence  
 <400> 6  
  
 atgagcgtgc tgaccaggt gctggccctg ctgctgctgt ggctgaccgg agcccgttgc 60  
  
 gacatccaga tgaccagtc cctgcctct ctgtccgcca gcgtgggcca gaccgtgaca 120  
 atcacctgca gagcctctgg caacgtgcac aattacctgg cttggtatca gcagaagcag 180  
 ggcaagtccc cacagctgct ggtgtacaca gccaagacc tggtgtgacgg cgtgcccagc 240  
 aggttctctg gctccggcag cggcacacag tatagcctga agatcaactc tctgcagcct 300  
 gaggatcttg gcacctacta ttgccagcat ttctggtcta atccatggac atttgccggc 360  
 ggcaccaagc tggagatcaa gaggacagtg gccgtccct ccgtgttcat ctttccccct 420  
 agcgacgagc agctgaagtc tggcaccgct tccgtggtgt gcctgctgaa caatttctac 480  
  
 cctcgggagg ccaagggtga gtggaagggt gataacgctc tgcagtctgg caattcccag 540  
 gagagcgtga cagagcagga ctctaaggat tccacctata gcctgtccag cactgtgacc 600  
 ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtatgctt gtgaggtcac tcaccagggg 660  
 ctgtcaagtc cagtcacaaa gtccttcaat aggggggaat gctga 705

<210> 7

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mus musculus/Homon sapiens chimeric sequence

<400> 7

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser  
1 5 10 15

Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys  
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe  
35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Arg Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr  
65 70 75 80

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

Thr Ala Phe Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Asn Glu Asp Thr Ala Thr  
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg His Tyr Asp Tyr Gly Gly Phe Pro Tyr Trp Gly  
115 120 125

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

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
180 185 190

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| 240                                                             |     |     |
| Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| 320                                                             |     |     |
| Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| 400                                                             |     |     |
| Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 8

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mus musculus/Homon sapiens chimeric sequence

<400> 8

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Val His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp

100 105 110

Ser Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 9

<211> 266

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mus musculus/Homo sapiens chimeric sequence

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Arg Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ala Phe Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Asn Glu Asp Thr Ala Thr

100 105 110

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

115 120 125



Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
130 135 140  
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro  
145 150 155 160  
Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg  
165 170 175  
Ala Ser Gly Asn Val His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln  
180 185 190  
Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Thr Ala Lys Thr Leu Ala Asp  
195 200 205  
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser  
210 215 220  
Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys  
225 230 235 240  
Gln His Phe Trp Ser Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

245 250 255  
Glu Ile Lys His His His His His His Cys  
260 265

<210> 10

<211> 717

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| atgggcacatca agatggagtc acagactcag gtctttgtat acatgttgct gtggttgtct | 60  |
| ggtgttgatg gagacattgt gatgaccag tctcaaaagt tcatgtccac atcaatagga    | 120 |
| gacagggtca gcgtcacctg caaggccagt cagaatgtgg gttctcatgt agcctggttt   | 180 |
| cagcagaaac cagggaac tcctaaagca ctgatttact cggcacccta ccggtacagc     | 240 |
|                                                                     |     |
| ggagtcactg atcgcttcac aggagtgga tctgggacag atttactct caccatcaac     | 300 |
| aatgtgcagt ctgaagactt ggcagagtat tctgtcagc aatataacag tttccattc     | 360 |
| acgttcggtt cggggacaaa gttggaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc    | 420 |
| atcttccac catccagtga gcagtaaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg    | 480 |
| aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa   | 540 |

aatggcgctcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600  
agcacctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660

actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717

<210> 11

<211> 238

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys

35 40 45

Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser His Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Val Thr Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

130 135 140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu

145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly

165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|     |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |  |  |  |  |
| Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Met | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Thr | Lys | Asp |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu | Tyr | Glu | Arg | His | Asn | Ser | Tyr | Thr | Cys | Glu | Ala | Thr | His | Lys | Thr |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser | Thr | Ser | Pro | Ile | Val | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Asn | Glu | Cys |     |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |  |  |  |  |