

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0072268

(43) 공개일자

2016년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/48569 (2013.01)

A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호

10-2016-7014660

(22) 출원일자(국제)

2014년10월28일

심사청구일자

없음

(85) 번역문제출일자

2016년06월01일

(86) 국제출원번호

PCT/US2014/062544

(87) 국제공개번호

WO 2015/065954

국제공개일자

2015년05월07일

(30) 우선권주장

61/899,800 2013년11월04일 미국(US)

(71) 출원인

화이자 인코포레이티드

미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트 235

스텝센트알엑스 인코포레이티드

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 이스트 자미 코트 450

(72) 발명자

다멜린, 마크 이삭

미국 07656 뉴저지주 파크 릿지 파인 드라이브 10

칸드케, 키란 마노하

미국 10954 뉴욕주 나뉴엣 이스트 엘리슨 애비뉴 120

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 **항-EFNA4 항체-약물 접합체**

### (57) 요약

본 발명은 EFNA4 항체-약물 접합체; 및 EFNA4 관련 장애의 검출, 예방 및 요법에 있어서의 그의 용도를 제공한다. 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 일반적으로 다음 식이다: Ab-(L-D) [여기서, Ab는 EFNA4, 또는 그의 EFNA4-결합성 단편과 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고; L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물, 바람직하게 칼리케아미신이다]. 상기 개시된 항체-약물 접합체의 Ab는 어떠한 EFNA4-결합성 항체일 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, Ab는 키메라, CDR-이식화, 인간화, 또는 재조합 인간 항체, 또는 그의 EFNA4-결합성 단편이다. 본 발명의 일부 측면에서, Ab는 내재화 항체 및/또는 중화 항체이다.

(52) CPC특허분류

**A61K 39/395** (2013.01)

**A61K 47/484** (2013.01)

**A61K 47/48561** (2013.01)

**C07K 16/30** (2013.01)

**A61K 2039/505** (2013.01)

**C07K 2317/34** (2013.01)

**C07K 2317/565** (2013.01)

**C07K 2317/76** (2013.01)

**C07K 2317/77** (2013.01)

(72) 발명자

**사프라, 푸자**

미국 07661 뉴저지주 리버 엡지 웨인 애비뉴 254

**반코비치, 알렉산더 존**

미국 94107 캘리포니아주 샌프란시스코 테네시 스트리트 635 넘버 204

---

**딜라, 스캇 제이.**

미국 94062 캘리포니아주 에메랄드 힐스 덴포드 코트 25

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 식의 항체-약물 접합체:

Ab-(L-D)

상기 식에서:

- (a) Ab는 EFNA4와 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고;
- (b) L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고, D는 칼리케아미신이다.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, Ab가 키메라, CDR-이식화, 인간화, 또는 재조합 인간 항체인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, Ab가 내재화 항체 및/또는 중화 항체인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

Ab가, 인간 EFNA4와의 결합에 대해

- (a) 서열 13으로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 27로서 제시된 경쇄 가변 영역; 또는
  - (b) 서열 39로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 53으로서 제시된 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 항체와 경쟁하고/하거나, 상기 항체와 동일한 에피토프와 결합되는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, Ab가 하나 이상의 중쇄 가변 영역과 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 하나 이상의 중쇄 가변 영역은 서열 15, 19, 및 23으로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 6

제4항에 있어서, Ab가 하나 이상의 중쇄 가변 영역과 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 하나 이상의 경쇄 가변 영역은 서열 29, 33, 및 35로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

Ab가

- (a) 서열 15, 19, 및 23으로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
  - (b) 서열 29, 33, 및 35로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 8

제4항에 있어서, Ab가 서열 13과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 27과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, Ab가 서열 13으로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 27로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, Ab가 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, Ab가 서열 25로서 제시된 중쇄를 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, Ab가 카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, Ab가 서열 37로서 제시된 경쇄를 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, Ab가 서열 25로서 제시된 중쇄와 서열 37로서 제시된 경쇄를 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 15

제4항에 있어서, Ab가 하나 이상의 중쇄 가변 영역과 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 하나 이상의 중쇄 가변 영역은 서열 41, 45, 및 49로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 16

제4항에 있어서, Ab가 하나 이상의 중쇄 가변 영역과 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 하나 이상의 경쇄 가변 영역은 서열 55, 59, 및 61로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 17

제4항에 있어서, Ab가

- (a) 서열 41, 45, 및 49로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 서열 55, 59, 및 61로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 18

제5항 또는 제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, Ab가 서열 39와 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 53과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, Ab가 서열 39로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 53으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, Ab가 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, Ab가 서열 51로서 제시된 중쇄를 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, Ab가 카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, Ab가 서열 63으로서 제시된 경쇄를 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 24

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, Ab가 서열 51로서 제시된 중쇄와 서열 63으로서 제시된 경쇄를 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 25

제4항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, Ab가 서열 13 또는 39로서 제시된 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 26

제4항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, Ab가 서열 27 또는 53으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 약물이 칼리케아미신의 N-아세틸 유도체인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 약물이 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 약물이 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라이드 (CM)인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)을 포함하는 것인 항체-약물 접합체.

#### 청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 1 내지 12의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체.

#### 청구항 32

하기 식의 항체-약물 접합체:

Ab-(L-D)

상기 식에서:

(a) Ab는 서열 25로서 제시된 중쇄와 서열 37로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고;

(b) L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고, D는 약물이며, 여기서 상기 링커는 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)이고, 상기 약물은 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라이드 (CM)이다.

#### 청구항 33

하기 식의 항체-약물 접합체:

Ab-(L-D)

상기 식에서:

(a) Ab는 서열 51로서 제시된 중쇄와 서열 63으로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고;

(b) L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고, D는 약물이며, 여기서 상기 링커는 4-(4'-아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)이고, 상기 약물은 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라이드 (CM)이다.

#### 청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 복수 개의 항체-약물 접합체; 및 임의로 제약 담체를 포함하며, 여기서 1 내지 12의 범위 내의 평균 DAR을 갖는 조성물.

#### 청구항 35

제34항에 있어서, 3 내지 5의 범위 내의 평균 DAR을 갖는 조성물.

#### 청구항 36

제35항에 있어서, 3 내지 4의 범위 내의 평균 DAR을 갖는 조성물.

#### 청구항 37

제36항에 있어서, 4 내지 5의 범위 내의 평균 DAR을 갖는 조성물.

#### 청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 약 4의 평균 DAR을 갖는 조성물.

#### 청구항 39

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 복수 개의 항체-약물 접합체; 및 임의로 제약 담체를 포함하며, 여기서 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 50% 이상 갖는 조성물.

#### 청구항 40

제39항에 있어서, 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 60% 이상 갖는 조성물.

#### 청구항 41

제40항에 있어서, 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 70% 이상 갖는 조성물.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 75% 이상 갖는 조성물.

#### 청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 약 70% 내지 80% 갖는 조성물.

#### 청구항 44

(a) 링커를 약물 모이어티에 연결하는 단계;

(b) 링커-약물 모이어티를 항체와 접합시키는 단계; 및

(c) 상기 항체-약물 접합체를 정제하는 단계

를 포함하는, 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체를 생성하는 방법.

#### 청구항 45

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

#### 청구항 46

EFNA 관련 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물의 치료상 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, EFNA 관련 장애의 치료 방법.

#### 청구항 47

제46항에 있어서, EFNA 관련 장애가 과증식성 장애인 방법.

#### 청구항 48

제47항에 있어서, 과증식성 장애가 신생물성 장애인 방법.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 신생물성 장애가 고형 종양을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 50

제49항에 있어서, 신생물성 장애가 유방암, 난소암, 결장직장암, 간암, 또는 폐암인 방법.

#### 청구항 51

제48항에 있어서, 신생물성 장애가 혈액 악성 종양을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 혈액 악성 종양이 백혈병인 방법.

#### 청구항 53

대상체에게서 EFNA 관련 장애의 치료를 위한 의약을 제조하는 데 있어서의, 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체의 용도.

#### 청구항 54

제53항에 있어서, EFNA 관련 장애가 과증식성 장애인 용도.

#### 청구항 55

제54항에 있어서, 과증식성 장애가 신생물성 장애인 용도.

#### 청구항 56

제55항에 있어서, 신생물성 장애가 고형 종양을 포함하는 것인 용도.

#### 청구항 57

제56항에 있어서, 신생물성 장애가 유방암, 난소암, 결장직장암, 간암, 또는 폐암인 용도.

#### 청구항 58

제55항에 있어서, 신생물성 장애가 혈액 악성 종양을 포함하는 것인 용도.

#### 청구항 59

제58항에 있어서, 혈액 악성 종양이 백혈병인 용도.

#### 청구항 60

특정 대상체에게서 EFNA 관련 장애를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 항체-약물 접합체.

#### 청구항 61

제60항에 있어서, EFNA 관련 장애가 과증식성 장애인, 사용하기 위한 항체-약물 접합체.

#### 청구항 62

제61항에 있어서, 과증식성 장애가 신생물성 장애인, 사용하기 위한 항체-약물 접합체.

#### 청구항 63

제62항에 있어서, 신생물성 장애가 고형 종양을 포함하는, 사용하기 위한 항체-약물 접합체.

#### 청구항 64

제63항에 있어서, 신생물성 장애가 유방암, 난소암, 결장직장암, 간암, 또는 폐암인, 사용하기 위한 항체-약물 접합체.

#### 청구항 65

제62항에 있어서, 신생물성 장애가 혈액 악성 종양을 포함하는 것인, 사용하기 위한 항체-약물 접합체.

#### 청구항 66

제65항에 있어서, 혈액 악성 종양이 백혈병인, 사용하기 위한 항체-약물 접합체.

#### 청구항 67

종양 세포 집단을 EFNA4 항체-약물 접합체와 접촉시킴으로써, 종양 세포 집단 내에서의 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 집단은 종양 개시 세포; 및 종양 개시 세포 이외의 종양 세포를 포함하는 것인 종양 세포 집단 내에서의 종양 개시 세포를 감소시키는 방법.

#### 청구항 68

제67항에 있어서, 접촉 단계가 생체 내에서 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 69

제67항에 있어서, 접촉 단계가 시험관 내에서 수행되는 것인 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

#### [0001] 관련 출원

[0002] 2013년 11월 4일에 출원된 미국 가출원 번호 61/899,800을 우선권 주장하며, 이 가출원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

#### [0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 EFS-웹을 통하여 전자적으로 출원되었고, .txt 포맷의 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함한다. 이러한 .txt 파일은 "PC72005\_Sequence\_Listing.txt"이란 명칭으로 2013년 11월 1일에 작성된, 56 KB의 크기를 갖는 서열 목록을 함유하고 있다. 이러한 .txt 파일 내에 함유된 서열 목록은 본 명세서의 일부이고 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 본 발명은 에프린-A4 리간드 (EFNA4) 항체 및 항체-약물 접합체에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 암을 치료하기 위하여 상기 항체 및 항체-약물 접합체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0006] 수용체 티로신 키나제의 가장 큰 계열인 에프린 수용체 (EPH)는 에프린 리간드 (EFN)와 결합하는 유형-I 막횡단 단백질이다. EPH 아계열 내의 수용체는 전형적으로, 단일 키나제 도메인; 및 Cys-풍부 도메인과 2개의 피브로



넥틴 유형 III 반복서열을 함유하는 세포외 영역을 갖는다. 서열 분석에 근거하여, 에프린 리간드는 다음 2개 군으로 나눌 수 있다: 에프린-A 리간드 (EFNA) 및 3개의 에프린-B 리간드 (EFNB). EFNA 리간드 (즉, EFNA1, EFNA2, EFNA3, EFNA4, EFNA5, EFNA6)는 전형적으로, 글리코실 포스포티딜이노시톨 (GPI) 연쇄를 통하여 세포 표면에 고정되긴 하지만, 일부 비-GPI-고정된 단백질은 에프린 mRNA, 예컨대 EFNA4의 코대 스플라이싱을 통하여 생성된다. EFNB 리간드 (즉, EFNB1, EFNB2, EFNB3)는 막횡단 도메인; 및 보존된 티로신 잔기와 PDZ-결합성 모티프를 수반한 짧은 세포질 영역을 함유한다. EFNA 리간드는 9개의 상이한 에프린 A 수용체 (EPHA) (즉, EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHA9) 중 어느 것과 우선적으로 결합되는 반면, EFNB 리간드는 6개의 상이한 에프린 B 수용체 (EPHB) (즉, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB5, EPHB6) 중 어느 것과 우선적으로 결합되지만, 일부 교차 상호작용이 보고되었다.

[0007] EFN-EPH 신호 전달은 쌍방향일 수 있고 (리간드 발현성 세포와 수용체 발현성 세포 둘 다에 영향을 미친다), 신경 발생, 세포 패턴화, 혈관형성, 및 세포 운동성 및 침습을 포함한, 광범위한 생물학적 활성을 조절할 수 있다. 암의 맥락에서, 각종 EPH 및 EFN의 발현이 관찰되었고, 각종 기능이 보고되었다 ([Hafner et al., Clinical Chemistry 50(3):490-499, 2004]; [Surawska et al., Cytokine & Growth Factor Reviews 15(6):419-433, 2004]; [Pasquale, E.B., Nature Reviews Cancer 10(3):165-180, 2010]). 리간드-수용체 결합 혼란 뿐만 아니라 기능적 중복으로 인해, 각각의 EFN 및 EPH의 역할을 정확하게 규정하는 것이 곤란하였다. 암을 치료하기 위하여 EPH 수용체를 치료적 표적화하는 것이 검토되긴 하였지만, EFN 리간드를 표적화하는 것은 크게 진행되지 못하였다 (Pasquale, E.B., Nature Reviews Cancer 10(3):165-180, 2010).

[0008] 암에 대한 부가의 치료 옵션에 대한 상당한 필요성이 여전히 존재한다. 이 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 EFNA4-양성 암을 표적으로 하는 신규 항체-약물 접합체를 제공한다.

### 발명의 내용

[0009] 본 발명은 EFNA4 항체-약물 접합체; 및 EFNA4 관련 장애의 검출, 예방 및 요법에 있어서의 그의 용도를 제공한다. 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 일반적으로 다음 식이다: Ab-(L-D) [여기서, Ab는 EFNA4, 또는 그의 EFNA4-결합성 단편과 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고; L-D는 링커-약물 모이어티(moiety)이며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이다]. 상기 개시된 항체-약물 접합체의 Ab는 어떠한 EFNA4-결합성 항체일 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, Ab는 키메라, CDR-이식화, 인간화, 또는 재조합 인간 항체, 또는 그의 EFNA4-결합성 단편이다. 본 발명의 일부 측면에서, Ab는 내재화 항체 및/또는 중화 항체이다.

[0010] 본 발명은 또한, 본 발명은 EFNA4 항체-약물 접합체; 및 EFNA4 관련 장애의 검출, 예방 및 요법에 있어서의 그의 용도를 제공한다. 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 일반적으로 다음 식이다: Ab-(L-D) [여기서, Ab는 EFNA4, 또는 그의 EFNA4-결합성 단편과 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고; L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고 D는 칼리케아미신(calicheamicin)이다].

[0011] 본 발명의 특별한 측면에서, Ab는 huE22 또는 huE47 항체; 또는 인간 EFNA4와의 결합에 대해 huE22 또는 huE47과 경쟁하는 항체; 및/또는 huE22 또는 huE47 항체와 동일한 에피토프와 결합하는 항체이다. 예를 들어, Ab는 인간 EFNA4와의 결합에 대해, (a) 서열 13으로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 27로서 제시된 경쇄 가변 영역; 또는 (b) 서열 39로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 53으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁할 수 있고/있거나 이러한 항체와 동일한 에피토프와 결합할 수 있다.

[0012] 인간 EFNA4와의 결합에 대해 huE22와 경쟁하고/하거나 huE22와 동일한 에피토프와 결합하는 Ab 중에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체를 제조하는 데 유용한 대표적인 Ab는 하나 이상의 중쇄 가변 영역과 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 하나 이상의 중쇄 가변 영역은 서열 15, 19, 및 23으로서 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 부가의 Ab는 하나 이상의 중쇄 가변 영역과 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 하나 이상의 경쇄 가변 영역은 서열 29, 33, 및 35로서 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 부가의 Ab는 (a) 서열 15, 19, 및 23으로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 29, 33, 및 35로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다.

[0013] 본 발명의 다른 EFNA4 항체-약물 접합체에서, Ab는 서열 13과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 27과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 예를 들어 서열 13으로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 27로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0014] 인간 EFNA4와의 결합에 대해 huE47과 경쟁하고/하거나 huE47과 동일한 에피토프와 결합하는 Ab 중에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체를 제조하는 데 유용한 대표적인 Ab는 하나 이상의 중쇄 가변 영역과 하나 이상의 경

쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 하나 이상의 중쇄 가변 영역은 서열 41, 45, 및 49로서 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 부가의 Ab는 하나 이상의 중쇄 가변 영역과 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 하나 이상의 경쇄 가변 영역은 서열 55, 59, 및 61로서 규정된 3개의 CDR을 포함한다. 부가의 Ab는 (a) 서열 41, 45, 및 49로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 55, 59, 및 61로서 제시된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다.

[0015] 본 발명의 다른 EFNA4 항체-약물 접합체에서, Ab는 서열 39와 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 53과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 예를 들어 서열 39로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 53으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0016] 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 IgG1 중쇄 불변 영역, 카파 경쇄 불변 영역, 또는 IgG1 중쇄 불변 영역과 카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 Ab를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체를 제조하는 데 유용한 Ab는 서열 25로서 제시된 중쇄, 서열 37로서 제시된 경쇄, 또는 서열 25로서 제시된 중쇄와 서열 37로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체를 포함한다. 부가의 예는 서열 51로서 제시된 중쇄, 서열 63으로서 제시된 경쇄, 또는 서열 51로서 제시된 중쇄와 서열 63으로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체를 포함한다.

[0017] 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 서열 13 또는 39로서 제시된 중쇄 가변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 서열 27 또는 53으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 포함한다.

[0018] 본 발명의 특별한 측면에서, Ab는 huE5 또는 huE15 항체; 또는 인간 EFNA4와의 결합에 대해 huE5 또는 huE15와 경쟁하는 항체; 및/또는 huE5 또는 huE15 항체와 동일한 에피토프와 결합하는 항체이다. 예를 들어, Ab는 인간 EFNA4와의 결합에 대해, (a) 서열 5로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 7로서 제시된 경쇄 가변 영역; 또는 (b) 서열 9로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 11로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁할 수 있고/있거나 이러한 항체와 동일한 에피토프와 결합할 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면에서, Ab는 인간화 항체, 예컨대 huE5, huE15, huE22 또는 huE47 항체이다.

[0020] 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체 중 어느 것은 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)을 포함하는 링커를 이용하여 제조될 수 있다.

[0021] 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체 중 어느 것은 칼리케아미신의 N-아세틸 유도체, 예컨대 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 및 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라지드 (CM)를 포함한, 칼리케아미신 약물을 이용하여 제조될 수 있다.

[0022] 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체 중 어느 것은 1 내지 12의 약물-대-항체 비 (DAR)를 가질 수 있다. 본 발명의 특별한 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) 서열 25로서 제시된 중쇄와 서열 37로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편인 Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티인 L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고, D는 약물이며, 여기서 상기 링커는 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)이고, 상기 약물은 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라지드 (CM)이다.

[0023] 본 발명의 또 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) 서열 51로서 제시된 중쇄와 서열 63으로서 제시된 경쇄를 포함하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편인 Ab; 및 (b) 링커-약물 모이어티인 L-D를 포함하며, 여기서 L은 링커이고, D는 약물이며, 여기서 상기 링커는 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)이고, 상기 약물은 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라지드 (CM)이다.

[0024] 본 발명은 본원에 개시된 복수 개의 항체-약물 접합체; 및 임의로 제약 담체를 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기서 이러한 조성물은 1 내지 12의 범위 내의 평균 DAR을 갖는다. 본 발명의 특별한 측면에서, 상기 조성물은 3 내지 5의 범위 내의 평균 DAR을 가질 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 3 내지 4의 범위 내의 평균 DAR을 가질 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 4 내지 5의 범위 내의 평균 DAR을 가질 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 약 4의 평균 DAR을 가질 수 있다.

[0025] 본 발명은 추가로, 본원에 개시된 복수 개의 항체-약물 접합체; 및 임의로 제약 담체를 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기서 이러한 조성물은 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 50% 이상 갖는다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 60% 이상 갖는다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 70% 이상 갖는다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 조성물은 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 75% 이상 갖는다. 본 발명의 또 다른 측

면에서, 상기 조성물은 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 약 70% 내지 80% 갖는다.

- [0026] 본 발명은 추가로, 일반적으로 식 Ab-(L-D)의 EFNA4 항체-약물 접합체를 제공하는데, 여기서 Ab는 EFNA4, 또는 그의 EFNA4-결합성 단편과 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고; L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 vc 또는 mc이고, D는 약물이다.
- [0027] 본 발명은 추가로, 일반적으로 식 Ab-(L-D)의 EFNA4 항체-약물 접합체를 제공하는데, 여기서 Ab는 EFNA4, 또는 그의 EFNA4-결합성 단편과 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고; L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고, D는 0101 또는 8261이다.
- [0028] 본 발명은 추가로, 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 항체-약물 접합체를 생성하는 방법은 (a) 링커를 약물 모이어티에 연결하는 단계; (b) 이러한 링커-약물 모이어티를 항체와 접합시키는 단계; 및 (c) 상기 항체-약물 접합체를 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 개시된 항체-약물 접합체의 생성 방법, 제조 방법, 합성 방법, 접합 방법, 및 정제 방법; 및 본원에 개시된 항체-약물 접합체의 제조, 합성 및 접합을 위한 중간체를 포함한다.
- [0030] 추가로, 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0031] 다른 측면에서, 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물의 치료상 유효량을 투여함으로써, EFNA 관련 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 대표적인 EFNA 관련 장애는 과증식성 장애, 예컨대 신생물성 장애, 예컨대 고형 종양 (예를 들어, 유방암, 난소암, 결장직장암, 간암, 폐암 등) 및 혈액 악성 종양 (예를 들어, 백혈병 등)을 포함한다. 또한, 특정 대상체에게서 EFNA 관련 장애를 치료하기 위한 의약을 제조하기 위한, 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체의 용도가 제공된다. 또한, EFNA 관련 장애의 치료에 사용하기 위한 EFNA4 항체-약물 접합체가 제공된다.
- [0032] 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체 및 화학요법제를 포함하는 조성물의 치료상 유효량을 투여함으로써, 특정 대상체에게서 EFNA 관련 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 개시된 항체-약물 접합체를 이용하여, 특정 환자에게서 EFNA4의 과발현을 특징으로 하는 장애를 치료하는 방법을 포함한다. 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항체-약물 접합체를 이용하여, 특정 환자에게서 EFNA4의 과발현을 특징으로 하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0034] 또한 다른 측면에서, 본 발명은 종양 세포 집단 내에서의 종양 개시 세포를 감소시키는 방법을 제공한다. 예를 들어, 이러한 방법은 종양 세포 집단 (여기서, 이러한 집단은 종양 개시 세포; 및 종양 개시 세포 이외의 종양 세포를 포함한다)을 EFNA4 항체-약물 접합체와 접촉시킴으로써, 종양 세포 집단 내에서의 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 접촉 단계는 시험관내 또는 생체 내에서 수행될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 개시된 화합물 및 조성물에 대한 진단 및 치료 용도를 포함한다.
- [0036] 본 발명의 다른 측면은 본원에 개시된 항체-약물 접합체, 용기, 및 처치를 표시하는 패키지 삽입물 또는 표지를 포함하는 제조품, 즉 키트를 포함한다.
- [0037] 본 발명의 이들 측면 및 다른 측면은 본 출원을 전체로서 고찰함으로써 인지될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 아미노산 차이를 보여주는 인간 EFNA4 a, b 및 c 이소형 서열의 정렬을 제공한다 (서열 2 내지 4).
- 도 2는 EFNA4 항체의 유전적 배열, 및 중쇄 및 경쇄 CDR 서열 (VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래됨)을 제공한다.
- 도 3A 및 3B는 EFNA4에 대한 결합 특이성을 예시하기 위한, huE22 및 huE47 항체 각각에 대한 결합 데이터를 제공한다.
- 도 4A 및 4B는 AcBut-CM, 및 항체 (X)와 접합된 AcBut-CM 각각의 구조를 제공한다.
- 도 5는 huE22-AcBut-CM의 소수성 상호 작용 크로마토그래피 (HIC) 분석을 제공한다.
- 도 6은 접합되지 않은 항체의 존재에 대한 TSK겔 부틸-NPR 상에서 정제된 huE22-AcBut-CM의 UPLC-HIC 분석을 제공한다.

- 도 7은 응집체 및 이량체의 존재에 대한 BEH200 SEC 상에서 정제된 huE22-AcBut-CM의 UPLC-SEC 분석을 제공한다.
- 도 8은 유리 약물의 존재에 대한 조르박스(Zorbax) 300SB-CN 상에서 정제된 huE22-AcBut-CM의 역상 분석을 제공한다.
- 도 9는 DAR 분포 프로파일에 대한 iCE280 상에서 정제된 huE22-AcBut-CM의 cIEF 분석을 제공한다.
- 도 10은 huE22-AcBut-CM의 안정성에 대한 다중 동결 해동의 효과를 제공한다.
- 도 11은 유방-5 (BR5) 삼중 음성 유방암 (TNBC) PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 도시한 것이다.
- 도 12는 유방-13 (BR13) TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 도시한 것이다.
- 도 13은 유방-22 (BR22) PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 도시한 것이다.
- 도 14는 유방-31 (BR31) TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 도시한 것이다.
- 도 15는 난소-45 (OV45) 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 도시한 것이다.
- 도 16은 난소-55 (OV55) 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 도시한 것이다.
- 도 17은 난소-44 (OV44) 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 도시한 것이다.
- 도 18은 난소-63 (OV63) 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 도시한 것이다.
- 도 19는 BR22 TNBC PDX에서 미세소관 억제제 (MTI) vc0101 및 mc8261과 접합된 huE15, huE22 및 huE47의 효능을 도시한 것이다.
- 도 20은 BR31 TNBC PDX에서 MTI vc0101과 접합된 huE15, huE22 및 huE47의 효능을 도시한 것이다.
- 도 21은 대조군-AcBut-CM ADC (대각선 빗금 원)와 비교한 EFNA4-발현성 293T 세포 (열린 다이아몬드)에서의 huE22-AcBut-CM의 시험관내 세포독성을 도시한 것이다.
- 도 22는 huE22-AcBut-CM에 노출된 BR5 TNBC PDX 종양의 항-hIgG1 항체 (대각선 빗금 원) 및 항- $\gamma$ -H2A.X 항체 (열린 다이아몬드)를 이용한 면역조직화학을 도시한 것이다.
- 도 23은 해리된 BR22 TNBC PDX 종양으로부터 단리된  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{+}$  세포 (대각선 빗금 원) 또는  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{-}$  세포 (열린 원)가 체내이식된 마우스에 대한 종양 성장 곡선을 도시한 것이다.
- 도 24는 해리된 BR31 TNBC PDX 종양으로부터 단리된  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{+}$  세포 (대각선 빗금 원) 또는  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{-}$  세포 (열린 원)가 체내이식된 마우스에 대한 종양 성장 곡선을 도시한 것이다.
- 도 25는 TCGA 데이터를 이용한 정상 인접 유방, TNBC, 비-TNBC 유방에서의 EFNA4 mRNA의 발현을 도시한 것이다.
- 도 26은 TCGA 및 METABRIC 데이터세트로부터 유방암 종양 샘플 중에서의 EFNA4 카피 수를 도시한 것이다.
- 도 27은 TCGA 및 METABRIC 데이터세트로부터 난소암 종양 샘플 중에서의 EFNA4 카피 수를 도시한 것이다.
- 도 28은 TCGA 및 METABRIC 데이터세트로부터 간세포 암종 (HCC) 종양 샘플 중에서의 EFNA4 카피 수를 도시한 것이다.
- 도 29는 4 m/m 및 6 m/m의 CM 대 huE22 Ab의 비로부터 생성된, 정제된 huE22-AcBut-CM ADC에 대한 분석적 HIC의 비교를 도시한 것이다.
- 도 30은 4 m/m 및 6 m/m의 CM 대 huE22 Ab의 비로부터 생성된, 정제된 huE22-AcBut-CM ADC에 대한 분석적 HIC의 추가 비교를 도시한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039]

본 발명은 에프린-A 리간드 (또는 EFNA), 예컨대 EFNA4와 결합하는 항체-약물 접합체를 제공한다. 본 발명은 또한, EFNA4 항체, 링커, 및 약물을 이용하여 상기 접합체를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 항체-약물 접합체는 EFNA4 발현을 특징으로 하는 과증식성 장애의 진단, 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있는 조성물, 예



컨대 의약의 제조 및 제작에 유용하다. 본 발명의 일부 측면에서, 상기 개시된 항체-약물 접합체는 종양 연속 세포 (TPC)와 고도의 증식성 종양 전구 세포 (TProg) 둘 다를 포괄하는 종양 개시 세포 (TIC)의 빈도를 감소시킬 수 있다.

[0040] I. EFNA 생리학

[0041] PCT 국제 공개 번호 W02012/118547에는 모든 세포 표면 수용체-리간드 상호 작용과 같이, 에프린 리간드 (EFN)에 의한 에프린 수용체 (EPH)의 개입으로 인해, 궁극적으로 세포내 신호 전달 캐스케이드가 활성화된다고 기재되어 있다. 수용체-리간드 상호 작용이 동일한 세포의 표면 상의 분자들 간에 일어날 수 있긴 하지만 (시스 상호 작용), 시스 상호 작용이 신호 전달 캐스케이드의 촉발을 유발시키지 않거나 또는 시스 상호 작용이 트랜스 상호 작용 (예를 들어, 별도의 세포 상에서 수용체와 리간드 간의 상호 작용)에 의해 개시된 신호 전달 캐스케이드를 실제로도 길항시킬 수 있는 것으로 일반적으로 여겨진다. EPH-EFN 트랜스 상호 작용의 한 측면은 수용체-리간드 개입시 2가지 신호 전달 캐스케이드, 즉 EPH를 발현하는 세포에서의 정배향 신호 전달 캐스케이드 및 EFN을 발현하는 세포에서의 역배향 신호 전달 캐스케이드를 촉발시킬 수 있는 능력이다. 2가지 별도의 신호 전달 캐스케이드의 활성화는, EPH 및 EFN을 동물 배아 발생에 협조하도록 진화시킨 세포 분류 및 세포 위치설정 과정을 반영할 수 있다.

[0042] EPH-EFN 신호 전달은 종종, 세포골격 역학을 조절하고 상이한 유형의 세포들 간의 부착성 및 반발성 상호 작용을 조정시켜 주는 세포-신호 전달 경로를 활성화시킨다. 일반적으로, EPH 및 EFN 단백질은 성체 조직에서 관찰된 것과 비교해서 배아형성 동안 훨씬 더 높은 수준으로 발견되긴 하지만, 성체에게서 지속되는 낮은 수준의 발현은 음와(crypt) 내의 조직 줄기 세포에서의 그들의 공급원으로부터 장 관강과 맞대고 있는 용모의 표면에서의 그들의 최종 위치까지 분화성 세포의 이동으로부터 비롯되는 명확히 규정된 구조를 갖는 조직, 예컨대 성체 소화관의 정상적인 기능에 있어서 이들 분자의 역할을 반영할 수 있다. EPH는 간세포 암종에서 처음으로 확인되었고 EPH 및 EFN 발현은 전형적으로, 성체에 제한되기 때문에, 인간 암에서의 EFN 및/또는 EPH의 발현을 재활성화시키는 것은 암 세포의 탈분화와 연관될 수 있고/있거나 이들 암 세포가 주변의 정상 조직에 침입하고 원발성 종양 부위에서 원격 위치로 이동할 수 있는 능력과 연관될 수 있다. 다른 연구는 EPH-EFN 상호 작용이 또한, 혈관신생에 있어서 일정 역할을 한다고 제안하였다.

[0043] 비-립프계 조직에서의 EPH-EFN 상호 작용이 인테그린(integrin)을 통한 세포들 간의 부착력 또는 반발력 및 세포골격 재배열을 생성시킴으로써 세포성 상호 작용을 조절한다는 발견 내용과 일치하여, 림프계 세포 상에서 발견된 EPH 및 EFN 분자는 세포의 매트릭스 성분에 대한 세포 부착, 화학주성 및 세포 이동을 매개하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 1차 CD4 및 CD8 T 세포 상에서의 EFNA1 (EPHA2 수용체와 결합하고, 예를 들어 유전자은행 수탁 번호 NM\_004428에서와 같은 아미노산 서열을 포함한다) 개입은 세포 이동을 자극하고 화학주성을 증강시키는 것으로 밝혀졌다. EFNA1과 마찬가지로, EFNA4는 1차 CD4 T 세포 상에서 발현되지만, EPH-EFN 상호 작용의 혼란으로 인해, EFNA4 개입이 이들 세포에 대하여 유사한 효과를 가지고 있는지는 명확하지 않다. 그러나, 성숙한 인간 B-림프구는 EFNA4를 발현하고 활성화시 이를 분비하는 것으로 입증되었다. 추가의 EFNA4는 다른 어떠한 EFN 또는 EPH 분자와 달리, 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 환자의 B 세포 상에서 또는 이러한 B 세포에 의해 지속적으로 발현되기도 한다. 흥미롭게도, Q-PCR에 의해 측정된 바와 같은 EFNA4 이소형의 발현은 상기 장애의 임상적 징후와 상관있을 수 있다. 또한, EFNA4의 발현이 증가된 것으로 공지된 CLL 환자로부터의 B 세포는 건강한 개개인으로부터의 B 세포와 비교해서 경내피 이동 전위에 있어서 손상을 나타내었다. 명백하게, EFNA4의 개입은 세포의 매트릭스 분자에 부착할 수 있는 CLL 세포의 능력을 저하시켰고, CCL1에 대한 그들의 화학주성 반응을 저하시켰다. 이들 보고 내용을 취합해 보면, 이는 B 및 T 세포 수송에 있어서의 EFNA4의 역할을 제안하고 있고, 상기 논의된 세포내 신호 전달 데이터와 조합하여 고려해 볼때, EFNA, 및 특히 EFNA4가 항암 치료제의 개발을 위한 매우 흥미로운 표적이 되도록 한다.

[0044] 또한, EFNA4의 발현은 각종 암 줄기 세포 집단에서 상승된다. 벌크 종양에서 몇 가지 EPHA 수용체가 동시에 상호 조절되는 것과 함께, 이는 EFNA4 매개된 리간드-수용체 상호 작용이 종양 증식, 혈관 신생 및/또는 종양 전이와 연계된 촉발성 세포 신호 전달 캐스케이드일 수 있다는 가능성을 제기하고 있다. 어떠한 특별한 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 본 발명의 EFNA4 항체 및 EFNA4 항체-약물 접합체는 적어도 부분적으로, 종양 개시 세포 (TIC) 빈도를 감소시키거나 또는 없앴으로써, 전통적인 표준 치료 (SOC)의 치료 요법 (예를 들어, 독소루비신 및 이리노테칸)과는 상이한 방식으로 종양 번식 또는 생존을 방해하거나, 또는 면역치료 신호 전달을 통하여 또는 EFNA4 발현성 세포를 사멸시킬 수 있는 페이로드(payload)를 전달함으로써 작용하는 것으로 여겨진다 (실시예 8 및 9 참조).

[0045] 대표적인 EFNA4 단백질 오르소로그(ortholog)는 인간 (NP\_005218, NP\_872631 또는 NP\_872632), 마우스 (NP\_031936), 침팬지 (XP\_001153095, XP\_001152971, XP\_524893, 및 XP\_001152916) 및 래트 (NP\_001101162)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 전사된 인간 EFNA4 유전자는 염색체 1로부터의 최소 5817 bp를 포함한다.

[0046] 3개의 인간 EFNA4 mRNA 전사물 변이체 및 코딩된 단백질이 표 1에 제시되어 있는데, 이들 각각은 전사된 RNA의 교대 스플라이싱으로부터 비롯된다: (1) 201개 아미노산 전구 단백질 (NP\_005218; EFNA4 이소형 a; 서열 2)을 코딩하는 1276개 염기 쌍 변이체 (NM\_005227; EFNA4 전사물 변이체 1; 서열 1); (2) 207개 아미노산 전구 단백질 (NP\_872631; EFNA4 이소형 b; 서열 3)을 코딩하는 1110개 염기 쌍 변이체 (NM\_182689; EFNA4 전사물 변이체 2); 및 (3) 193개 아미노산 전구 단백질 (NP\_872632; EFNA4 이소형 c; 서열 4)을 코딩하는 1111개 염기 쌍 변이체 (NM\_182690; EFNA4 전사물 변이체 3).

[0047] <표 1> 인간 EFNA4 mRNA 전사물 변이체 및 코딩된 단백질

서열 번호	서열
1	CTTCCCTCTTCACTTTGTACCTTTCTCTCCTCGACTGTGAAGCGGGCCGGGACCT GCCAGGCCAGACCAAACCGGACCTCGGGGGCGATGCGGCTGCTGCCCCCTGCTG CGGACTGTCTCTGGGCCGCGTTCCCTCGGCTCCCCTCTGCGCGGGGGCTCCAG CCTCCGCCACGTAGTCTACTGGAACCTCAGTAACCCCAAGTTGCTTCGAGGAGA CGCCGTGGTGGAGCTGGGCCTCAACGATTACCTAGACATTGTCTGCCCCACTA CGAAGGCCCAGGGCCCCCTGAGGGCCCCGAGACGTTTGTCTTGTACATGGTGG ACTGGCCAGGCTATGAGTCCTGCCAGGCAGAGGGCCCCCGGGCCTACAAGCGC TGGGTGTGCTCCCTGCCCTTTGGCCATGTTCAATTCTCAGAGAAGATTACGCGCT TCACACCCCTTCTCCCTCGGCTTTGAGTTCTTACCTGGAGAGACTTACTACTACATC TCGGTGCCCACTCCAGAGAGTTCTGGCCAGTGCTTGAGGCTCCAGGTGTCTGTC TGCTGCAAGAGAGGAAGTCTGAGTCAGCCCATCCTGTTGGGAGCCCTGGAGA GAGTGGCAGACAGGGTGGCGAGGGGGGACACTCCAGCCCCCTCTGTCTCT TGCTATTACTGCTGCTTCTGATTCTTCGTCTTCTGCGAATTCTGTGAGCCAAGCAG ACCTTCCCTCTCATCCCAAGGAGCCAGAGTCCTCCCAAGATCCCCTGGAGGAGG AGGGATCCCTGCTGCCTGCACTGGGGGTGCCAATTAGACCGACAAGATGGAG CATTGATGGGGGAGATCAGAGGGTCTGAGGTGACTCTTGACAGGAGCCTGTCCCC TCATCACAGGCTAAAGAAGAGCAGTAGACAGCCCTGGACACTCTGAAGCAGAGG CAAGACAAACACAGGCGCTTTGCAGGCTGCTCTGAGGGTCTCAGCCCATCCCC AGGAGGACTGGGATTTGGTATGATCAAATCCTCAAGCCAGCTGGGGGCCAGGC TGAAGACCTGGGGACAGGTCGATTGCTGGACCAGGGCAAAGAAGAAGCCCTGC CATCTGTGCCCTGTGGGCCTTTTCCCTGGGGCAGCACCTTGCCCTCCCAGGGG ATCACTCACTTGTCTTCTATGAAGACGGACTCTTCATGAGGTTGAATTTATGCCA GTTTGTATTTTATAAGTATCTAGACCAAACCTTCAATAAACCACTCATCTTTTGT TGCCCTCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2	MRLLPLLRTVLWAAFLGSPLRGGSSLRHVYWNSSNPRLLRGDAVVELGLNDYLDIV CPHYEGPGPPEGPETFALYMVDWPGYESCQAEGPRAYKRWVCSLPFGHVQFSEKI QRFTPFSLGFELPGETYYYISVPTPESSGQCLRLQVSVCKKERKSESAHPVGSPGE SGTSGWRGDDTPSPLCLLLLLLLLLILRLRL
3	MRLLPLLRTVLWAAFLGSPLRGGSSLRHVYWNSSNPRLLRGDAVVELGLNDYLDIV CPHYEGPGPPEGPETFALYMVDWPGYESCQAEGPRAYKRWVCSLPFGHVQFSEKI QRFTPFSLGFELPGETYYYISVPTPESSGQCLRLQVSVCKERRARVLRSPGGGG IPAACTGGANSRQDQDGMGEIRGSEVTLGACPLITG
4	MRLLPLLRTVLWAAFLGSPLRGGSSLRHVYWNSSNPRLLRGDAVVELGLNDYLDIV CPHYEGPGPPEGPETFALYMVDWPGYESCQAEGPRAYKRWVCSLPFGHVQFSEKI QRFTPFSLGFELPGETYYYISVPTPESSGQCLRLQVSVCKERNLPSHPKEPESSQ DPLEEEGSLPALGVPIQTDKMEH

[0048]

[0049] 각각의 인간 EFNA4 단백질은 성숙한 형태의 단백질 (즉, 168 내지 182 aa 길이)을 제공하도록 잘라낸 서열 2의 아미노산 1 내지 25를 포함하는 예측된 신호 또는 리더 서열을 포함하는 것으로 인지될 것이다. 이러한 신호 펩티드는 폴리펩티드가 세포 표면/분비 경로를 향하도록 한다. 신호 펩티드, 리더 펩티드로 불리우기도 하는 용어 "신호 서열"은 단백질이 분비될 수 있도록 하는 (세포 막을 관통함) 단백질의 N 말단에서의 약 15 내지 30 개 아미노산의 절편을 지칭한다. 신호 서열은 단백질이 분비됨에 따라 제거된다. 단백질 코딩 서열에 대하여 결과적으로 영향을 미치는 mRNA의 교대 스플라이싱으로 인해, 단백질 이소형은 세포에 의해 상이하게 처리된다. 이소형 a는 글리코실포스파티딜이노시톨 (GPI) 연쇄에 의해 세포 표면에 고정되고 막 국제되는 반면, 이소형 b

및 c에는 GPI-고정 신호 서열이 결여되므로, 세포에 의해 분비될 것으로 예상된다. 인간 EFNA4의 3개의 단백질 이소형에 관한 정렬이 도 1에 도시되어 있다. 앞서 표시된 바와 같이, 직접 참조 또는 문맥상의 필요성에 의해 달리 표시되지 않는 한, 용어 EFNA4는 인간 EFNA4의 이소형 a 및 면역반응성 증가물에 관한 것일 것이다. 상기 용어는 또한, 항체 또는 면역반응성 단편과 특이적으로 결합될 수 있는 에피토프를 함유하는 EFNA4의 천연 또는 변이체 형태의 유도체 또는 단편을 지칭할 수 있는 것으로 추가로 인지될 것이다.

[0050] II. EFNA4 항체-약물 접합체

[0051] 본 발명은 식 Ab-(L-D)의 항체-약물 접합체를 제공하는데, 여기서 (a) Ab는 EFNA4와 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고, (b) L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이다. Eph 수용체 신호 전달을 억제하기 위해 개발된 TKI와는 달리, 항체-약물 접합체 (ADC), 예컨대 항-EFNA4 ADC는 특이적 표면 분자, 및 그들의 신호 전달 기능에 상관없이 그들을 발현하는 세포를 표적으로 할 수 있는데, 단 상기 분자는 효율적으로 내재화되어야 한다. 또한, 상기 항체-약물 접합체의 제조 및 제작 방법, 및 임상 적용에 있어서의 그의 용도가 제공된다. "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"는 EFNA4와 결합하고 약물, 예컨대 다음에 추가로 기재되는 바와 같은, 세포독성제, 세포증식 억제제 및/또는 치료제와 결합되는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편 (항체 유도체 포함)을 지칭한다. 예를 들어, 세포독성제는 이러한 세포독성제를 종양 (예를 들어, EFNA4 발현성 종양)에 표적화 국소 전달하기 위하여 본원에 기재된 바와 같은 항-EFNA4 항체에 연결시키거나 또는 접합시킬 수 있다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "EFNA4"는 변이체, 이소형, 상동체, 오르소로그 및 파라로그(paralog)를 포함한다. EFNA4는 또한, 에프린-A4, 에프린-A4 리간드, EPH-관련 수용체 티로신 키나제 리간드 4, Eph-관련 키나제 4의 리간드, EFL4, EPLG4 및 LERK4로서 관련 기술분야에 공지되어 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 항체 및 항체-약물 접합체는 인간 이외의 종으로부터의 EFNA4, 예컨대 마우스, 래트, 또는 영장류의 EFNA4 뿐만 아니라 상이한 형태의 EFNA4 (예를 들어, 글리코실화 EFNA4)와 교차 반응한다. 다른 측면에서, 상기 항체 및 항체-약물 접합체는 인간 EFNA4에 대하여 완전히 특이적일 수 있고 종 또는 다른 유형의 교차 반응성을 나타내지 않을 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 EFNA4는 문맥상 달리 표시되지 않는 한 자연 발생적 인간 EFNA4를 지칭한다. 따라서, "EFNA4 항체", "항-EFNA4 항체", "에프린-A4 항체" 또는 "에프린-A4 리간드 항체" 또는 다른 유사한 명칭은 EFNA4 유형 리간드 또는 이소형, 또는 그의 단편 또는 유도체와 연합하거나, 결합하거나 또는 반응하는 모든 항체 (본원에 정의된 바와 같음)를 의미한다. 추가로, "EFNA4 항체-약물 접합체", "항-EFNA4 항체-약물 접합체", "에프린-A4 항체-약물 접합체" 또는 "에프린-A4 리간드 항체-약물 접합체"는 EFNA4 유형 리간드 또는 이소형, 또는 그의 단편 또는 유도체와 연합하거나, 결합하거나 또는 반응하는 모든 항체-약물 접합체 또는 ADC (본원에 정의된 바와 같음)를 의미한다.

[0053] "링커 (L)"는 약물에 대한 항체의 직접 또는 간접 연쇄를 기재한다. 항체에 대한 링커의 부착은 각종 방식, 예컨대 표면 리신을 통하여, 산화 탄수화물과의 환원적-커플링, 및 쇠간 디설피드 연쇄를 환원시킴으로써 방출된 시스테인 잔기를 통하여 수행될 수 있다. 히드라존-기반 연쇄, 디설피드-기반 연쇄 및 펩티드-기반 연쇄를 포함한, 각종 ADC 연쇄 시스템이 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0054] "약물 (D)"은 생물학적 또는 검출 가능한 활성을 갖는 모든 물질, 예를 들어 치료제, 검출 가능한 표지, 결합제 등, 및 생체 내에서 활성제로 대사되는 전구 약물이다. 용어 약물, 페이로드 및 화합물은 상호 교환적으로 사용된다.

[0055] "L-D"는 링커 (L)와 연결된 약물 (D)로부터 비롯되는 링커-약물 모이어티이다.

[0056] 본 발명과 연계해서 사용된 부가의 과학적 및 기술적 용어는 본원에서 달리 표시되지 않는 한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 추가로, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 것이고, 복수 용어는 단수를 포함할 것이다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련되어 사용되는 명명법 및 이의 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 흔히 사용되는 것이다.

[0057] 본 발명의 특별한 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) 서열 13으로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 27로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한 항체 (Ab), 또는 그의 항원-결합성 단편; 및 (b) 링커-약물 모이어티 (L-D) [여기서, L은 링커이고, D는 약물인데, 여기서 이러한 링커는 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)이며, 약물은 N-아세틸-γ-칼리케아미신 디메틸 히드라지드 (CM)이다]를 포함한다. 본 발명의 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) 서열 39로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 53으로서 제

시된 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 (Ab), 또는 그의 항원-결합성 단편; 및 (b) 링커-약물 모이어티 (L-D) [여기서, L은 링커이고, D는 약물인데, 여기서 이러한 링커는 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)이며, 약물은 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라이드 (CM)이다]를 포함한다.

[0058] 본 발명의 특별한 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) 서열 25로서 제시된 중쇄와 서열 37로서 제시된 경쇄를 포함한 항체 (Ab), 또는 그의 항원-결합성 단편; 및 (b) 링커-약물 모이어티 (L-D) [여기서, L은 링커이고, D는 약물인데, 여기서 이러한 링커는 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)이며, 약물은 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라이드 (CM)이다]를 포함한다. 본 발명의 다른 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) 서열 51로서 제시된 중쇄와 서열 63으로서 제시된 경쇄를 갖는 항체 (Ab), 또는 그의 항원-결합성 단편; 및 (b) 링커-약물 모이어티 (L-D) [여기서, L은 링커이고, D는 약물인데, 여기서 이러한 링커는 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)이며, 약물은 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라이드 (CM)이다]를 포함한다.

[0059] 본 발명은 추가로, 최적화된 평균 DAR 및 협소한 DAR 분포도를 갖는 항체-약물 접합체를 제공한다 (하기 섹션 IIC 약물에서의 추가의 설명 참조). 평균 DAR 및 DAR 분포도는 ADC의 임상 효능에 대한 효과를 가질 수 있는데, 특히 ADC의 효력과 잠재적 독성 둘 다에 대한 효과를 가질 수 있고, ADC의 특성, 예컨대 안정성 및 응집에 대하여 상당한 효과를 가질 수 있다.

[0060] 항체당 접합된 약물 분자의 수를 표시하는 DAR (약물-대-항체 비) 또는 약물 부하는 1 내지 12일 수 있다. 복수 개의 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 평균 DAR로써 명확하게 규정될 수 있다. DAR 및 평균 DAR은 각종의 통상적인 수단, 예컨대 UV 분광법, 질량 분광법, ELISA 검정, 방사성 측정 방법, 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 전기영동 및 HPLC에 의해 결정될 수 있다.

[0061] DAR 분포도는 ADC의 조성물, 배치 및/또는 제형에 존재할 수 있는, 각종 ADC 종의 % 또는 분획, 예를 들어 DAR 1 내지 12를 제공한다. ADC의 조성물, 배치 및/또는 제형의 DAR 분포도는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 모세관 등전점 전기영동법 (cIEF)에 의해 결정될 수 있다. ADC의 조성물, 배치 및/또는 제형의 DAR 분포도는, 일반적으로 DAR 1 내지 12를 갖는 광범위한 ADC 종을 함유하는, 넓은 DAR 분포도를 수반한 고도로 이질적인 혼합물로서 특징지을 수 있다. ADC의 조성물, 배치 및/또는 제형의 DAR 분포도는, 일반적으로 특별한 DAR, 예컨대 DAR 3 내지 5를 갖는 협소한 범위의 ADC 종을 함유하는, 협소한 DAR 분포도를 수반한 고도로 균질한 혼합물로서 특징지을 수 있다.

[0062] 본 발명의 특별한 측면에서, 본원에 개시된 개선된 접합 및 정제 조건은 약 3 내지 5의 범위, 바람직하게 약 4의 최적화 평균 DAR, 및 협소한 DAR 분포도, 예를 들어 덜한 이질성을 수반한 항-EFNA4 ADC를 제공하는데, 여기서 3 내지 5의 DAR (이것이 가장 바람직하다)을 수반한 종이 전체 항-EFNA4 ADC의 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 약 70% 내지 80%, 또는 바람직하게 약 75% 내지 80%를 차지한다 (도 9 참조).

[0063] 본 발명의 특별한 측면에서, 접합 및 정제 동안, 보다 높은 독성과 보다 낮은 치료 지수 (TI)에 기여할 수 있는, 더 소수성이고 더 신속한 청소율을 명확하게 보여주는 높은 DAR (DAR > 5)을 갖는 ADC는 제거하는 것이 유익하다. 본 발명의 다른 측면에서, 효능에는 거의 영향을 미치지 않지만, 표적 항원, 예컨대 EFNA4에 대해 ADC와 경쟁할 수 있고 더 낮은 TI를 초래할 수 있는 접합되지 않은 항체의 양을 증가시키는 낮은 DAR (DAR < 2)을 갖는 ADC는 제거하는 것이 유익하다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 높은 DAR (DAR > 5)을 갖는 ADC 및 낮은 DAR (DAR < 2)을 갖는 ADC는 제거하는 것이 유익하다.

[0064] 본 발명의 특별한 측면에서, 접합 반응 혼합물의 제조에 사용된 CM 대 huE22 비는, 최적화 DAR를 갖는 항-EFNA4 ADC를 생성시키고 보다 높은 DAR 종을 제거하기 위하여, 보다 높은 비와 비교해서 4 내지 5 대 1일 수 있다.

[0065] 본 발명의 다른 측면에서, 높은 진동과 강력한 혼합은, 예를 들어 링커-약물 모이어티 (AcBut-CM)를 혼합 와동의 중간 부분 내로 부가함으로써 부분적으로 달성되는 바와 같이, 상기 링커-약물 모이어티의 부가 동안 수행되는데, 이는 적은 양의 접합되지 않은 항체를 달성하는 데 도움이 되는, 선행 방법에 비해 개선된 것이다.

[0066] 본 발명의 다른 측면에서, 반응물의 인큐베이션 시간은 낮은 응집체를 제공하고 항-EFNA4 ADC의 안정성을 증가시키기 위하여, 60 내지 90분과 비교해서 2 내지 5분으로 단축될 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 반응 혼합물 내의 에탄올 (EtOH)의 양은 낮은 응집체를 제공하고 항-EFNA4 ADC의 안정성을 증가시키기 위하여, 9%와 비교해서 6 내지 8%로 감소될 수 있다.

[0067] 본 발명의 특별한 측면에서, 정제 동안, 항-EFNA4 ADC에 대한 협소한 DAR 분포도를 제공하기 위하여 용출 구배



를 최적화할 수 있다.

[0068] 본 발명의 특별한 측면에서, 정제된 항-EFNA4 ADC는 접합되지 않은 항체 (유리 항체)를 전혀 갖지 않을 수 있다 (도 6 참조). 본 발명의 다른 측면에서, 정제된 항-EFNA4 ADC는 단량체성 ADC일 수 있고, 응집체 및 이량체는 존재하지 않는다 (도 7 참조). 본 발명의 다른 측면에서, 정제된 항-EFNA4 ADC는 유리 약물을 전혀 갖지 않을 수 있다 (도 8 참조). 본 발명의 추가 측면에서, 정제된 항-EFNA4 ADC는 단량체성 ADC일 수 있고 유리 약물을 전혀 갖지 않는다.

[0069] IIA. EFNA4 항체

[0070] 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체를 제조하기 위하여, 상기 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편은 EFNA4와 특이적으로 결합하는 모든 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편일 수 있다. 본 발명의 항체는 PCT 국제 공개 번호 WO2012/118547 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 추가로 개시되고 명확하게 규명되어 있다. 상기 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편은 EFNA 항체-약물 접합체의 제조에 사용하기 위하여 단리되거나, 정제되거나 또는 유도체화될 수 있다.

[0071] "항체" 또는 "Ab"는 면역글로불린 분자의 가변 영역에 위치한, 하나 이상의 항원 인식 부위를 통하여 특이적 표적 또는 항원, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 폴리펩티드 등을 인식하고 이와 결합할 수 있는 면역글로불린 분자이다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "항체"는 모노클로날 항체; 폴리클로날 항체; 소정의 항체 (예를 들어, EFNA4)와 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있는 무손상 항체의 "항원-결합성 단편" (또는 부분), 예컨대 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, Fc 등; 단리된 상보성 결정 영역 (CDR); 이중특이적 항체; 이중 접합체 항체, 그의 돌연변이체; 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편 (예를 들어, 도메인 항체)을 갖는 융합 단백질; 단일 쇄 (ScFv) 및 단일 도메인 항체 [예를 들어, 상어 및 카멜리드(camelid) 항체]; 맥시보디(maxibody), 미니보디(minibody), 인트라보디(intrabody), 디아보디(diabody), 트리아보디(triabody), 테트라보디(tetrabody), v-NAR 및 비스-scFv (예를 들어, 문헌 [Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136] 참조); 인간화 항체; 키메라 항체; 및 요구되는 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 다른 모든 변형된 입체 배치 (항체의 글리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체 및 공유적으로 변형된 항체 포함)를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 어떠한 유형의 항체도 포괄할 수 있다. 항체는 무린, 래트, 인간, 또는 다른 모든 기원 (키메라 또는 인간화 항체 포함)일 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체의 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편은 키메라, 인간화, 또는 재조합 인간 항체, 또는 그의 EFNA4-결합성 단편이다.

[0072] 특정 표적 또는 항원 (예를 들어, EFNA4 단백질)과 "특이적으로 결합"하거나 또는 "우선적으로 결합"하는 (본원에서 상호 교환적으로 사용된다) 항체, 항체-약물 접합체, 또는 폴리펩티드는 관련 기술분야에서 널리 이해되는 용어이고, 이러한 특이적 결합 또는 우선적 결합을 결정하는 방법 또한, 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 특정 분자는 이것이 또 다른 세포 또는 물질과의 경우보다 더 자주, 더 신속하게, 더 큰 지속성으로 및/또는 더 큰 친화도로 특별한 세포 또는 물질과 반응하거나 연합되는 경우에 "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"을 나타내는 것으로 여겨진다. 특정 항체는 이것이 다른 물질과 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합 활성도로, 보다 신속하게 및/또는 더 큰 지속성으로 결합하는 경우에 특정 표적 또는 항원과 "특이적으로 결합"하거나 또는 "우선적으로 결합"한다. 예를 들어, EFNA4 에피토프와 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체는, 다른 EFNA4 에피토프 또는 비-EFNA4 에피토프와 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합 활성도로, 더 신속하게 및/또는 더 큰 지속성으로 EFNA4 에피토프와 결합하는 항체이다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "결합 친화도" 또는 " $K_D$ "는 특별한 항원-항체 상호 작용의 평형 해리 상수를 지칭하고자 한다.  $K_D$ 는 해리 속도 ("이탈 속도" 또는 " $k_d$ "로 불리우기도 함) 대 연합 속도, 또는 "작동 속도" 또는 " $k_a$ "의 비이다. 따라서,  $K_D$ 는  $k_d/k_a$ 이고, 이는 몰 농도 (M)로서 표현된다.  $K_D$ 가 더 작을수록, 결합 친화도는 더 강력해진다는 결론이 나온다. 따라서, 1  $\mu$ M의  $K_D$ 는 1 nM의  $K_D$ 와 비교해서 약한 결합 친화도를 표시한다. 항체에 대한  $K_D$  값은 관련 기술분야에 널리 확립된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 항체의  $K_D$ 를 결정하는 한 가지 방법은, 전형적으로 바이오센서 시스템, 예컨대 비아코어(Biacore®) 시스템을 사용하여, 표면 플라스몬 공명을 이용하는 것이다.

[0074] 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체의 특이적 결합은 다중의 상이한 항원을 갖는 이질적 샘플 중의 인간 EFNA4 항원에 대한 항체의 우선적 결합을 지칭한다. 전형적으로, 결합 친화도가 적어도 약  $10^{-7}$  M 또는 그 초과, 예컨

대 적어도 약  $10^{-8}$  M 또는 그 초과 (적어도 약  $10^{-9}$  M 또는 그 초과, 적어도 약  $10^{-11}$  M 또는 그 초과, 또는 적어도 약  $10^{-12}$  M 또는 그 초과 포함)인 경우에, 특이적 결합이 발생한다. 예를 들어, 인간 EFNA4 항원에 대한 본 발명의 항체의 특이적 결합도는 적어도 약  $1 \times 10^{-7}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-12}$  M의 범위, 예컨대 약  $1 \times 10^{-8}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-12}$  M의 범위 이내, 또는 약  $1 \times 10^{-8}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-11}$  M의 범위 이내, 또는 약  $1 \times 10^{-8}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-10}$  M의 범위 이내, 또는 약  $1 \times 10^{-9}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-10}$  M의 범위 이내의 결합도를 포함한다. 특이적 결합은 또한, EFNA4 항체를 대상체에게 투여한 후, EFNA4-발현성 세포에 대한 상기 EFNA4 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편의 선택적 표적화를 지칭한다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같은, "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체와 특이적으로 결합할 수 있거나 또는 특정 분자와 달리 상호 작용할 수 있는 모든 단백질 결정기를 포함한다. 에피토프성 결정기는 일반적으로, 분자, 예컨대 아미노산 또는 탄수화물의 화학적으로 활성인 표면 집단, 또는 당 측쇄로 이루어지고, 일반적으로 특이적 3차원 구조적 특징 뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 갖는다. 에피토프는 '선형'이거나 또는 '입체 형태적'일 수 있다. 선형 에피토프에서는, 단백질과 상호 작용하는 분자 (예컨대, 항체) 간의 상호 작용 지점 모두가 이러한 단백질의 1차 아미노산 서열을 따라 선형으로 존재한다. 입체 형태적 에피토프에서는, 상호 작용 지점이 서로 분리되어 있는 단백질 상의 아미노산 잔기 전반에 걸쳐 존재한다. 일단 항원 상의 목적하는 에피토프가 결정되면, 예를 들어 본 발명에 기재된 기술을 이용하여 상기 에피토프에 대한 항체를 생성시키는 것이 가능하다. 또 다른 한편으로, 디스커버리 과정 동안, 항체의 생성 및 성상 확인으로 인해, 목적하는 에피토프에 관한 정보를 밝혀낼 수 있다. 이러한 정보로부터, 동일한 에피토프에의 결합에 대해 항체를 경쟁적으로 스크리닝하는 것이 가능하다. 이를 달성하기 위한 접근방식은 서로 경쟁적으로 결합하는 항체, 즉 항원과의 결합에 대해 경쟁하는 항체를 밝혀내기 위해 교차 경쟁 연구를 수행하는 것이다. 그들의 교차 경쟁에 근거한 '비닝 (binning)' 항체에 대한 고 처리량 과정이 PCT 국제 공개 번호 WO 03/48731에 기재되어 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 '비닝'은 항원 결합 특징 및 서로와의 경쟁에 근거하여 항체를 분류하는 방법을 지칭한다.

[0076] 그러나, EFNA4와 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원, 예컨대 다른 종으로부터의 EFNA4 분자 (즉, 오르소로그), 또는 EFNA4의 2개 이상의 이소형과의 교차 반응성을 가질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭한다 (예를 들어, EFNA4와 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 EFNA4 이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 더욱이, 단리된 항체는 기타 세포성 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 본 정의를 판독함으로써, 예를 들어 제1 표적과 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체 (또는 모이어티 또는 에피토프)는 제2 표적과 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있거나 또는 결합하지 않을 수 있는 것으로 또한 이해된다. 따라서, "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 독점적 결합을 (포함할 수 있긴 하지만) 반드시 요구하지는 않는다. 반드시 아니지만 일반적으로, 결합에 대한 언급은 우선적 결합을 의미한다.

[0077] 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 인간 EFNA4와의 결합에 대해, (a) 서열 13으로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 27로서 제시된 경쇄 가변 영역; 또는 (b) 서열 39로서 제시된 중쇄 가변 영역과 서열 53으로서 제시된 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편과 경쟁하고/하거나 이와 동일한 에피토프와 결합하는 항체를 포함한다.

[0078] 항체와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "경쟁하는"은 제1 항체 또는 그의 항원-결합성 단편이 제2 항체 또는 그의 항원-결합성 단편의 결합과 충분히 유사한 방식으로 에피토프와 결합하여, 제1 항체와 그의 동족 에피토프와의 결합에 따른 결과가 제2 항체의 부재 하에서의 제1 항체의 결합과 비교해서, 제2 항체의 존재 하에서 검출 가능한 수준으로 감소되는 것을 의미한다. 제2 항체와 그의 에피토프와의 결합이 또한, 제1 항체의 존재 하에서 검출 가능한 수준으로 감소되는 또 다른 방식도 이에 해당될 수 있지만, 반드시 그렇지는 않다. 즉, 제2 항체가 제1 항체와 그의 각각의 에피토프와의 결합을 억제하지 않으면서, 제1 항체가 이러한 제2 항체와 그의 에피토프와의 결합을 억제할 수 있다. 그러나, 각 항체가 다른 항체와 그의 동족 에피토프 또는 리간드와의 결합을 검출 가능한 수준으로 억제하는 경우, 억제 정도가 동일한지, 보다 큰지 아니면 보다 적은지 간에, 이러한 항체는 그들의 각각의 에피토프(들)와의 결합에 대해 서로 "교차 경쟁"하는 것으로 여겨진다. 경쟁적 항체와 교차 경쟁적 항체 둘 다가 본 발명에 포괄된다. 이러한 경쟁 또는 교차 경쟁이 일어나는 기전 (예를 들어, 입체 장애, 입체 형태적 변화, 또는 공통의 에피토프 또는 그의 일부와의 결합)에 상관없이, 통상의 기술자는 본원에 제공된 교시에 근거하여, 이러한 경쟁적 및/또는 교차 경쟁적 항체가 포괄되고 본원에 개시된 방법에 유용할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

- [0079] 천연 또는 자연 발생적 항체, 및 천연 면역글로불린은 전형적으로, 2개의 동일한 경쇄 (L)와 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이중-사량체성 당단백질이다. 각 경쇄는 1개의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄와 연결되지만, 디설피드 연쇄의 수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄들 간에 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 규칙적으로 이격된 쇠내 디설피드 브릿지를 또한 갖고 있다. 각 중쇄는 한 말단에 가변 도메인 (VH)에 이어 수많은 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 한 말단에 가변 도메인 (VL)을 갖고, 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는데; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특별한 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 간에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체들 간의 서열에 있어서 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다.
- [0080] 항체 및 상기 언급된 항체 도메인은 "폴리펩티드", "올리고펩티드", "펩티드" 및 "단백질", 즉 모든 길이, 바람직하게 비교적 짧은 (예를 들어, 10 내지 100개 아미노산) 아미노산의 쇠로서 기재될 수 있다. 이 쇠는 선형 또는 분지될 수 있고, 이는 변형된 아미노산을 포함할 수 있고/있거나 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 상기 용어는 또한, 자연적으로 또는 간섭에 의해, 예를 들어 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지화 성분과의 접합에 의해 변형시킨 아미노산 쇠를 포괄한다. 또한 상기 정의 내에는, 예를 들어 아미노산의 하나 이상의 유사체 (예를 들어, 비자연 아미노산 등 포함) 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 기타 변형물을 함유하는 폴리펩티드가 포함된다. 폴리펩티드는 단일 쇠로서 또는 연합 쇠로서 존재할 수 있는 것으로 이해된다. 아미노산은 통상적으로 공지된 그의 3-문자 부호로써 또는 IUPAC-IUB 바이오케미칼(Biochemical)에 의해 권장된 1-문자 부호로써 본원에 지칭될 수 있다.
- [0081] 항체의 "불변 영역"은 단독으로 또는 조합하여, 항체 경쇄의 불변 영역 또는 항체 중쇄의 불변 영역을 지칭한다. 키메라 및 인간화 EFNA4 항체의 불변 영역은 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, 그의 모든 이소형 (예를 들어, IgG의 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소형) 뿐만 아니라 그의 하위부류 및 돌연변이된 버전 중 어느 하나의 불변 영역으로부터 유래될 수 있다. 그의 중쇄의 불변 영역의 항체 아미노산 서열에 따라서, 면역글로불린은 상이한 부류로 배정될 수 있다. 5가지 주요 부류의 면역글로불린, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 있고, 이들 부류 중 몇 가지는 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가 분할될 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 영역은 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 각각 불리운다. 상이한 부류의 면역글로불린의 소단위 구조 및 3차원적 입체 배치는 널리 공지되어 있다.
- [0082] 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 관여하지 않지만, 각종 이펙터 기능, 예컨대 Fc 수용체 (FcR) 결합, 항체-의존성 세포성 독성에 있어서의 항체의 참여, 옵소닌화, 보체 의존성 세포독성의 개시, 및 비만 세포 탈과립화를 나타낸다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 이러한 "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 다양할 수도 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로, 위치 Cys226에서의 아미노산 잔기로부터 또는 Pro230으로부터 그의 카르복실-말단까지 연장되는 것으로 정의된다. Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트(Kabat)에서와 같은 EU 인덱스의 넘버링이다 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로, 2개의 불변 영역, 즉 CH2 및 CH3을 갖는다.
- [0083] 관련 기술분야에 사용된 바와 같이, "Fc 수용체" 및 "FcR"은 항체의 Fc 영역과 결합하는 수용체를 언급한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체와 결합하는 것이고 (감마 수용체), Fc  $\gamma$ RI, Fc  $\gamma$ RII, 및 Fc  $\gamma$ RIII 하위부류의 수용체를 포함하는데, 이는 이들 수용체의 대립 유전자성 변이체, 및 교대로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc  $\gamma$ RII 수용체는 Fc  $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc  $\gamma$ RIIB ("억제성 수용체")를 포함하는데, 이는 그의 세포질 도메인에 있어서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. FcR은 다음 문헌에서 고찰된다 ([Ravetch and Kinet, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92, 1991]; [Capel et al., Immunomethods, 4:25-34, 1994]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41, 1995]). "FcR"은 또한, 모계 IgG를 태아에게 전이시키는 데에 책임이 있는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다 ([Guyer et al., J. Immunol., 117:587-593 (1976)]; 및 [Kim et al., European J. Immunol., 24:2429-2434 (1994)]).
- [0084] 본 발명의 일부 측면에서, 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체의 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편은 IgG1 중쇄 불변 영역, 예를 들어 서열 25로서 제시된 huE22 중쇄 또는 서열 51로서 제시된 huE47 중쇄를 포함한다. 다른 측면에서, 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체의 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편은 카파 경쇄 불변 영역, 예를 들어 서열 37로서 제시된 huE22 경쇄 또는 서열 63으로서 제시된 huE47 경쇄를 포함한다. 본 발명의 특별한 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 IgG1 중쇄 불변 영역과 카파 경쇄 불변 영역, 예를 들어 서열

25로서 제시된 중쇄와 서열 37로서 제시된 경쇄, 또는 또 다른 예로서, 서열 51로서 제시된 중쇄와 서열 63으로서 제시된 경쇄를 포함할 수 있다.

[0085] 항체의 "가변 영역"은 단독으로 또는 조합하여, 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각, 초가변 영역으로서 공지되기도 한 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)에 의해 연결된 4개의 골격 영역 (FR)으로 이루어진다. 각 체 내의 CDR은 FR에 의해 아주 근접하여 결합되고, 다른 체로부터의 CDR과 함께, 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 적어도 2가지 기술이 있다: (1) 교차 중 서열 가변성에 근거한 접근 방식 (즉, 문헌 [Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)]); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 근거한 접근 방식 (Al-Lazikani et al., J. Molec. Biol. 273:927-948 (1997)). 본원에 사용된 바와 같은, CDR은 어느 한 가지 접근 방식 또는 양 접근 방식의 조합에 의해 규정된 CDR을 지칭할 수 있다.

[0086] 가변 도메인의 CDR은 카바트, 코티아(Chothia), 카바트와 코티아 둘 다의 누적, VBASE2, AbM, 접촉의 정의, 및/또는 입체 형태적 정의에 따라서 확인되거나 또는 관련 기술분야에 널리 공지된 모든 CDR 결정 방법에 따라서 확인되는 가변 영역 내의 아미노산 잔기이다. 항체 CDR은, 예를 들어 문헌 ([Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C] 참조)에 의해 최초로 정의된 초가변 영역으로서 확인될 수 있다. CDR의 위치는 또한, 예를 들어 문헌 ([Chothia et al., Nature 342:877-883, (1989)] 참조)에 최초로 기재된 구조적 루프 구조로서 확인될 수 있다. CDR 위치는 또한, VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Retter et al., Nucleic Acids Res. 33(데이터베이스 이슈):D671-D674, 2005] 및 <http://www.vbase2.org/> 참조).

[0087] CDR 정의에 대한 다른 접근 방식은 카바트와 코티아 간의 절충안이고 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어 [현재, 액셀리스(Accelrys®)]를 이용하여 유래되는 "AbM 정의", 또는 문헌 ([MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, (1996)])에 제시된, 관찰된 항원 접촉에 근거한 CDR의 "접촉 정의"를 포함한다. 본원에서 CDR의 "입체 형태적 정의"로서 지칭된 또 다른 접근 방식에서, 이러한 CDR의 위치는 항원 결합성에 엔탈피 기여를 하는 잔기로서 확인될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008] 참조). 또한 기타 CDR 경계 정의가 상기 접근 방식 중 하나를 엄격하게 따를 수는 없지만, 그럼에도 불구하고 카바트 CDR의 적어도 일부와 중복될 것이지만, 이들은 특별한 잔기 또는 잔기 군 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합성에 상당한 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험적 발견에 비추어 단축되거나 연장될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, CDR은 관련 기술분야에 공지된 어느 접근 방식 (접근 방식의 조합을 포함함)에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다. 본원에 사용된 방법은 이들 접근 방식 중 어느 것에 따라서 정의된 CDR을 활용할 수 있다. 본원에 기재된 EFNA4 항체-약물 접합체의 경우, CDR은 카바트, 코티아, 연장된, VBASE2, AbM, 접촉, 및/또는 입체 형태적 정의 중 어느 것에 따라서 정의될 수 있다.

[0088] 본 발명의 다른 측면에서, EFNA4 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편은 이러한 항체의 하나 이상의 CDR(들) (예컨대, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 모든 CDR)을 포함한다.

[0089] 본 발명의 경우, 다음 표 2에 제시된 CDR (서열 5 내지 64)은 카바트 및 코티아 접근 방식을 이용하여 유래되었고, 도 2에 제시된 CDR은 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래되었다. 따라서, 상기 모든 명칭으로써 정의된 CDR을 갖는 항체가 본 발명의 범위 내에 확실하게 포함된다. 더 광범위하게, 용어 "가변 영역 CDR 아미노산 잔기"는 상기 제시된 바와 같은 어느 서열 또는 구조 기반 방법을 이용하여 확인된 바와 같은 CDR 내의 아미노산을 포함한다.

[0090] 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 huE22 항체의 CDR을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함한다. 예를 들어, EFNA4 항체-약물 접합체는 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 포함한 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있는데, 여기서 하나 이상의 중쇄 가변 영역은 서열 15, 19, 및 23으로서 제시된 3개의 CDR을 갖는다. 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함하며, 여기서 하나 이상의 경쇄 가변 영역은 서열 29, 33, 및 35로서 제시된 3개의 CDR을 갖는다. 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 또한, (a) 서열 15, 19, 및 23으로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 29, 33, 및 35로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있다.



[0091] 본 발명의 또한 다른 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 코티아에 따라서 정의되거나 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 하나 이상의 huE22 CDR을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함한다. 예를 들어, EFNA4 항체-약물 접합체는 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있는데, 여기서 하나 이상의 중쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 huE22 CDR (표 2 참조) 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 huE22 CDR (도 2 참조)을 포함한다. 또 다른 예로서, EFNA4 항체-약물 접합체는 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있는데, 여기서 하나 이상의 경쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 huE22 CDR (표 2 참조) 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 huE22 CDR (도 2 참조)을 포함한다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) 코티아에 따라서 정의된 3개의 huE22 CDR (표 2 참조)을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 코티아에 따라서 정의된 3개의 huE22 CDR (표 2 참조)을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 huE22 CDR (도 2 참조)을 포함한 중쇄 가변 영역; 및 (b) VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 huE22 CDR (도 2 참조)을 포함한 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있다.

[0092] 본 발명의 다른 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 huE47 항체의 CDR을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함한다. 예를 들어, EFNA4 항체-약물 접합체는 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있는데, 여기서 하나 이상의 중쇄 가변 영역은 서열 41, 45, 및 49로서 제시된 3개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함하며, 여기서 하나 이상의 경쇄 가변 영역은 서열 55, 59, 및 61로서 제시된 3개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 또한, (a) 서열 41, 45, 및 49로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 55, 59, 및 61로서 제시된 3개의 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0093] 본 발명의 또한 다른 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 코티아에 따라서 정의되거나 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 하나 이상의 huE47 CDR을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함한다. 예를 들어, EFNA4 항체-약물 접합체는 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있는데, 여기서 하나 이상의 중쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 huE47 CDR (표 2 참조) 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 huE47 CDR (도 2 참조)을 포함한다. 또 다른 예로서, EFNA4 항체-약물 접합체는 하나 이상의 중쇄 가변 영역 및 하나 이상의 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있는데, 여기서 하나 이상의 경쇄 가변 영역은 코티아에 의해 정의된 3개의 huE47 CDR (표 2 참조) 또는 VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 huE47 CDR (도 2 참조)을 포함한다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) 코티아에 따라서 정의된 3개의 huE47 CDR (표 2 참조)을 포함한 중쇄 가변 영역; 및 (b) 코티아에 따라서 정의된 3개의 huE47 CDR (표 2 참조)을 포함한 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 (a) VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 huE47 CDR (도 2 참조)을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 (b) VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래된 3개의 huE47 CDR (도 2 참조)을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있다.

[0094] 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체를 제조하기 위해 사용되는 항체는 모노클로날 항체일 것이다. 용어 "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 실질적으로 동질적 항체 집단, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가, 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 집단으로부터 수득한 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다. 더욱이, 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대항하여 유도된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대항하여 유도된다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득되는 바와 같은 항체의 형질을 표시하고, 어느 특별한 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로 추론되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용하고자 하는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256:495-497, 1975]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 만들 수 있거나 또는 재조합 DNA 방법, 예컨대 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 방법에 의해 만들 수 있다. 모노클로날 항체는 또한, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990]에 기재된 기술을 이용하여

생성된 파지(phage) 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

- [0095] 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 항체-약물 접합체를 제조하기 위해 사용된 항체는 1가, 즉 분자 (예를 들어, IgG 또는 Fab) 당 하나의 항원 결합 부위를 가질 것이다. 일부 경우에, 1가 항체는 2개 이상의 항원 결합 부위를 가질 수 있지만, 이러한 결합 부위는 상이한 항원으로부터의 것이다. 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 항체-약물 접합체의 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편은 "2가 항체", 즉 분자 (예를 들어, IgG) 당 2개의 항원 결합 부위를 갖는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 2개의 결합 부위는 동일한 항원 특이성을 갖는다. 또 다른 한편으로, 2가 항체는 이중특이적일 수 있다. "이중특이적", "이중특이적" 또는 "이관능성" 항체는 2개의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 혼성체 항체이다. 이중특이적 항체의 2개의 항원 결합 부위는 동일하거나 상이한 단백질 표적 상에 상주할 수 있는 2개의 상이한 에피토프와 결합된다.
- [0096] 용어 "키메라 항체"는 가변 영역 서열의 일부 또는 전부가 한 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열이 또 다른 종으로부터 유래되는 항체, 예컨대 가변 영역 서열이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열이 인간 항체로부터 유래되는 항체를 지칭한다.
- [0097] 본원에 사용된 바와 같은 "인간화" 또는 "CDR 이식화" 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린쇄 또는 그의 단편 [예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 항체의 기타 항원 결합성 아서열]인 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 형태를 지칭한다. 바람직하게, 인간화 항체는 수용자의 하나 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비-인간 중, 예컨대 마우스, 래트 또는 토끼의 하나 이상의 CDR (공여자 항체)로부터의 잔기로써 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다.
- [0098] 몇몇 경우에는, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체시킨다. 더욱이, 인간화 항체는 수용자 항체에서 발견되지 않거나 또는 유입된 CDR 또는 골격 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있지만, 항체 성능을 추가로 정련하고 최적화하기 위해 포함된다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 것이다. 인간화 항체는 최적으로 또한, 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인 (Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역 또는 도메인의 적어도 일부를 포함할 것이다. 본 발명의 일부 측면에서 항체는 PCT 국제 공개 번호 WO 99/58572에 기재된 바와 같이 변형된 Fc 영역을 갖는다. 기타 형태의 인간화 항체는 본래의 항체를 기준으로 하여 변경될 수 있는 하나 이상의 CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, 또는 CDR H3)을 갖는데, 이는 또한, 본래의 항체로부터의 하나 이상의 CDR로부터 "유래된" 하나 이상의 CDR로 명명된다.
- [0099] 인간화는 필수적으로, 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 또는 돌연변이체 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 대체함으로써, 윈터(Winter)와 그 동료의 방법 (문헌 [Jones et al. Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al. Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeven et al. Science, 239:1534-1536 (1988)])에 따라서 수행될 수 있다 (또한, 미국 특허 번호 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205 참조; 그 전문이 본원에 참조로 포함된다). 몇몇 경우에는, 인간 면역글로불린의 하나 이상의 가변 영역의 골격 영역 내의 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체시킨다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 및 6,180,370 참조). 더욱이, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정련시키기 위해 (예를 들어, 목적하는 친화성을 수득하기 위해) 만들어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 영역은 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 골격 영역은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 임의로 또한, 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세 내역에 관해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 ([Jones et al. Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al. Nature 332:323-327(1988)]; 및 [Presta Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]; 그 전문이 본원에 참조로 포함된다). 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜한 무손상 인간 가변 도메인을 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 대체시킨 항체를 포함할 수 있다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로, 일부 CDR 잔기와 가능하게는 일부 골격 잔기를 설치류 항체 내의 유사한 부위로부터의 잔기로 대체시킨 인간 항체이다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205 참조). 또한, 미리 결정된 항원에 대한 개선된 친화성을 갖는 인간화 항체, 및 인간화 항체를 생성하기 위한 기술이 개시되어 있는 미국 특허 번호

6,180,370, 및 PCT 국제 공개 번호 WO 01/27160을 참조할 수 있다.

[0100] "재조합 인간 항체" 또는 "완전한 인간 항체"는 인간에 의해 생성되고/되거나 관련 기술분야의 숙련인에게 공지되어 있거나 본원에 개시된 인간 항체의 제조 기술 중 어느 것을 이용하여 만든 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 지칭한다. 이러한 인간 항체의 정의는 하나 이상의 인간 중쇄 폴리펩티드 또는 하나 이상의 인간 경쇄 폴리펩티드를 갖는 항체를 포함한다. 이러한 한 가지 예는 무인 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 갖는 항체이다. 인간 항체는 관련 기술분야에 공지된 각종 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선택되는데, 이러한 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다 ([Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 14:309-314, (1996)]; [Sheets et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:6157-6162, (1998)]; [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388, (1992)]; [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, (1991)]). 인간 항체는 내인성 유전자 자리 대신 인간 면역글로불린 유전자 자리를 형질전환적으로 도입시킨 동물, 예를 들어 내인성 면역글로불린 유전자를 부분적으로 또는 완전히 불활성화시킨 마우스를 면역시킴으로써 만들 수도 있다. 이러한 접근 방식은 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016에 기재되어 있다. 또 다른 한편으로, 인간 항체는 표적 항원에 대항하여 유도된 항체를 생산하는 인간 B 림프구를 불멸화시킴으로써 제조될 수 있다 (이러한 B 림프구는 개체로부터 또는 cDNA의 단일 세포 클로닝으로부터 회수할 수 있거나 또는 시험관 내에서 면역시킬 수 있었다) (예를 들어, 문헌 [Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, (1985)]; [Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95, (1991)]; 및 미국 특허 번호 5,750,373 참조).

[0101] 본 발명의 항체는 관련 기술분야에 널리 공지된 기술, 예를 들어 재조합 기술, 파지 디스플레이 기술, 합성 기술 또는 이러한 기술의 조합, 또는 관련 기술분야에 용이하게 공지된 기타 기술을 이용하여 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Jayasena, S.D., *Clin. Chem.*, 45: 1628-50 (1999)] 및 [Fellouse, F.A., et al., *J. Mol. Biol.*, 373(4):924-40 (2007)] 참조). 부가의 지침은 문헌 ([Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)]; [Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002)]; [Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998)]; 및 [Coligan et al., *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003)])에서 알아낼 수 있다. 대표적인 방법이 또한, 본원의 다음 실시예 1 내지 3에 기재되어 있다.

[0102] 일반적으로, 하이브리도마 세포주의 생성을 위한 숙주 동물의 면역 경로 및 스케줄은 일반적으로, 항체 자극과 생성을 위해 정립된 통상적인 기술에 따른다. 인간을 포함한 모든 포유류 대상체 또는 그로부터의 항체 생산 세포를, 포유류 (인간 포함) 및 하이브리도마 세포주의 생성을 위한 기준으로서 제공되도록 조작할 수 있는 것으로 고려된다. 전형적으로, 숙주 동물에게 본원에 기재된 바와 같은 것을 포함한 특정 양의 면역원을 복강내, 근육내, 경구, 피하, 발바닥내, 및/또는 피내 접종한다.

[0103] 하이브리도마는 문헌 (Kohler, B. and Milstein, C., *Nature* 256:495-497, 1975)의 일반적 체세포 혼성화 기술을 이용하거나 또는 문헌 (Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381, 1982)에 의해 변형된 바와 같이, 림프구 및 불멸화 골수종 세포로부터 제조할 수 있다. X63-Ag8.653 및 솔크 인스티튜트, 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute, Cell Distribution Center; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)로부터의 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 입수 가능한 골수종 세포주를 상기 혼성화에 사용할 수 있다. 일반적으로, 이러한 기술은 폴리에틸렌 글리콜과 같은 융합 유도제를 이용하거나 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 전기적 수단에 의해 골수종 세포와 림프계 세포를 융합시키는 것을 포함한다. 이러한 융합 후, 상기 세포를 융합 배지로부터 분리시키고, 선택적 성장 배지, 예컨대 히포크산틴-아미노프테린-티미딘 (HAT) 배지에서 성장시켜 혼성화되지 않은 부모 세포를 제거한다. 혈청으로 보충시켰거나 보충시키지 않은, 본원에 기재된 배지 중 어느 것도, 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 배양하기 위해 사용될 수 있다. 세포 융합 기술에 대한 또 다른 대안으로서, EBV 불멸화 B 세포를 사용하여 본 발명의 EFNA4 모노클로날 항체를 생성시킬 수 있다. 하이브리도마를 필요에 따라, 확장하고 서브클로닝하며, 상등액을 대상으로 하여 통상적인 면역검정 과정 (예를 들어, 방사성 면역검정, 효소 면역검정, 또는 형광 면역검정)에 의해 항-면역원 활성화에 관하여 검정한다. 항체의 공급원으로서 사용될 수 있는 하이브리도마는 모든 유도제, EFNA4에 대하여 특이적인 모노클로날 항체를 생산하는 부모 하이브리도마의 자손 세포, 또는 그의 일부를 포괄한다.

[0104] 이러한 항체를 생산하는 하이브리도마는 공지된 과정을 이용하여 시험관 내에서 또는 생체 내에서 성장시킬 수 있다. 모노클로날 항체는 필요에 따라, 통상적인 면역글로불린 정제 과정, 예컨대 황산암모늄 침전, 겔 전기영



동, 투석, 크로마토그래피, 및 한외여과에 의해 배양 배지 또는 체액으로부터 분리할 수 있다. 존재하는 경우, 원하지 않는 활성은, 예를 들어 고체 상에 부착된 면역원으로 제조된 흡착제 전반에 걸친 제조를 수행하고, 이러한 면역원으로부터 목적 항체를 용출 또는 방출시킴으로써 제거할 수 있다. 이관능성 또는 유도체화 작용제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 포함), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물,  $\text{SOCl}_2$ , 또는  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$  (여기서, R 및  $\text{R}^1$ 은 상이한 알킬 기이다)을 이용하여, 면역시키고자 하는 중에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키텔 림프 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 또는 대두 트립신 억제제와 접합된 표적 아미노산 서열을 함유하는 인간 EFNA4, 또는 그의 단편으로 숙주 동물을 면역시키면, 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체) 집단이 산출될 수 있다.

[0105] 필요에 따라, 관심 EFNA4 항체 (모노클로날 또는 폴리클로날)를 서열 분석할 수 있고, 그 다음 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현 또는 증식을 위해 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 관심 항체를 코딩하는 서열을 숙주 세포 내의 벡터에 유지시킨 다음, 이러한 숙주 세포를 나중의 사용을 위해 확장 및 동결시킬 수 있다. 세포 배양물 중에서 재조합 모노클로날 항체를 생성시키는 것은 관련 기술분야에 공지된 수단에 의해 B 세포로부터 항체 유전자를 클로닝함으로써 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Tiller et al., J. Immunol. Methods 329, 112-124, 2008]; 미국 특허 번호 7,314,622 참조).

[0106] "숙주 세포"는 폴리뉴클레오타이드 삽입물의 혼입을 위해 벡터(들)에 대한 수용체일 수 있거나 또는 이러한 수용체였던 개개의 세포 또는 세포 배양물을 포함한다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함하고, 이러한 자손은 자연적, 우발적 또는 고의적 돌연변이로 인해 본래의 부모 세포와 (형태학적 또는 게놈 DNA 보체 측면에서) 반드시 완벽하게 동일하지 않을 수 있다. 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(들)로 생체 내에서 형질감염된 세포를 포함한다.

[0107] 용어 "벡터"는 숙주 세포에 하나 이상의 관심 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달할 수 있고, 바람직하게는 이들을 발현할 수 있는 구축물을 의미한다. 벡터의 예는 바이러스 벡터, 있는 그대로의(naked) DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온성 축합제와 연합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜 내에 피막화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 특정의 진핵 세포, 예컨대 생산자 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0108] 용어 "발현 제어 서열"은 핵산의 전사를 지시하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 제어 서열은 프로모터, 예컨대 구성적 또는 유도성 프로모터, 또는 증강인자일 수 있다. 발현 제어 서열은 전사하고자 하는 핵산 서열과 작동적으로 연결된다.

[0109] 또 다른 한편으로, 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체를 "인간화"시키거나 또는 항체의 친화성 또는 기타 특징을 개선시키기 위한 유전자 조작을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 불변 영역은 항체가 인간에서의 임상 시험 및 치료에 사용되는 경우에, 면역 반응을 피하기 위해 인간 불변 영역과 더 거의 유사하도록 조작될 수 있다. EFNA4에 대한 보다 큰 친화성과 EFNA4를 억제하는 데 있어서 보다 큰 효능을 수득하도록 항체 서열을 유전적으로 조작하는 것이 바람직할 수 있다.

[0110] 모노클로날 항체를 인간화시키기 위해 사용될 수 있는 4가지 일반적인 단계가 있다: (1) 출발 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오타이드 및 예측된 아미노산 서열을 결정하는 단계; (2) 인간화 항체를 설계하는 단계, 즉 인간화 과정 동안 사용하기 위하여 어느 항체 골격 영역을 결정하는 단계; (3) 실제적 인간화 방법론/기술; 및 (4) 인간화 항체의 형질감염 및 발현 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; 및 6,180,370 참조).

[0111] 인간화 항체는 다음에 기재되는 바와 같은, 베니어링(veneering), 상보성 결정 영역 (CDR)의 이식화, 단축 CDR의 이식화, 특이성 결정 영역 (SDR)의 이식화, 및 프랑켄슈타인(Frankenstein) 어셈블리를 포함한 각종 방법 중 어느 한 가지를 이용하여 제조될 수 있다. 인간화 항체는 또한, 하나 이상의 변화를 CDR 내에 도입시킨 초인간화 항체를 포함한다. 예를 들어, CDR 내의 비-인간 잔기를 인간 잔기로 대체할 수 있다. 이들 일반적 접근 방식을 표준 돌연변이유발 및 합성 기술과 조합하여 목적하는 어떠한 서열의 항-EFNA4 항체도 생성시킬 수 있다.

[0112] 베니어링은 항체의 용매 접근 가능한 외부를 인간 아미노산 서열로 재포장함으로써 설치류 또는 기타 비-인간 항체 내의 잠재적으로 면역원성인 아미노산 서열을 감소시키는 개념에 근거한다. 따라서, 베니어링된 항체는 변형되지 않은 비-인간 항체보다 인간 세포에 대해 덜 외래인 것으로 보인다 (문헌 [Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-98] 참조). 비-인간 항체는, 인간 항체의 골격 영역 내의 동일한 위치에서의 것과 상이한, 비-인간 항체 내의 노출된 외부 골격 영역 잔기를 확인하고; 이와 같이 확인된 잔기를, 인간 항체 내의 상이 동일



한 위치를 전형적으로 점유하고 있는 아미노산으로 대체함으로써 베니어링된다.

- [0113] CDR의 이식화는 수용자 항체 (예를 들어, 목적하는 골격 잔기를 갖는 인간 항체 또는 기타 항체)의 하나 이상의 CDR을 공여자 항체 (예를 들어, 비-인간 항체)의 CDR로 대체함으로써 수행된다. 수용자 항체는 후보 수용자 항체와 공여자 항체 간의 골격 잔기의 유사성에 근거하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 프랑켄슈타인 접근 방식에 따라서, 인간 골격 영역은 관련 비-인간 항체의 각 골격 영역과 실질적인 서열 상동성을 갖는 것으로서 확인되고, 비-인간 항체의 CDR은 상이한 인간 골격 영역의 복합체 상으로 이식된다. 본 발명의 항체를 제조하는 데 또한 유용한 관련 방법이 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0040606에 기재되어 있다.
- [0114] 단축 CDR의 이식화가 관련 접근 방식이다. 단축 CDR은 특이성 결정 잔기 및 인접한 아미노산을 포함하는데, 이는 경쇄 내의 위치 27d-34, 50-55 및 89-96에서의 잔기, 및 중쇄 내의 위치 31-35b, 50-58 및 95-101에서의 잔기를 포함한다 [카바트 등의 넘버링 협정 (1987)] (문헌 [Padlan et al. (1995) *FASEB J.* 9:133-9] 참조). 특이성 결정 잔기 (SDR)의 이식화는 항체 결합 부위의 결합 특이성 및 친화성이 각각의 상보성 결정 영역 (CDR) 내의 가장 고도로 가변적인 잔기에 의해 결정된다는 이해에 전제를 둔 것이다. 항체-항원 복합체의 3차원적 구조의 분석을, 입수 가능한 아미노산 서열 데이터의 분석과 조합하여 사용하여, CDR 내의 각 위치에 존재하는 아미노산 잔기의 구조적 비유사성에 근거한 서열 가변성을 모델링할 수 있다. SDR은 접촉 잔기로 이루어진 최소한으로 면역원성인 폴리펩티드 서열로서 확인된다 (문헌 [Padlan et al. (1995) *FASEB J.* 9: 133-139] 참조).
- [0115] 일반적으로, 인간 수용자 골격은 이들이 공여자 항체의 골격 영역과 실질적으로 유사하거나 또는 가변 영역 아계열의 컨센서스 서열과 가장 유사하다는 사실을 기준으로 하여 선택된다. 이식화한 후, 공여자 및/또는 수용자 서열 내에서 부가의 변화를 만들어, 항체 결합성, 기능성, 코돈 사용빈도, 발현 수준 등을 최적화시킬 수 있는데, 이러한 변화는 비-인간 잔기를 골격 영역 내로 도입하는 것을 포함한다 (예를 들어, PCT 국제 공개 번호 WO 91/09967 참조).
- [0116] CDR을 중쇄 가변 골격 영역 상으로 이식화하는 경우, 유용한 골격 서열은 DP-21 (VH7), DP-54 (VH3-07), DP-47 (VH3-23), DP-53 (VH-74), DP-49 (VH3-30), DP-48 (VH3-13), DP-75, DP-8 (VH1-2), DP-25, VI-2b 및 VI-3 (VH1-03), DP-15 및 V1-8 (VH1-08), DP-14 및 V1-18 (VH1-18), DP-5 및 V1-24P (VH1-24), DP-4 (VH1-45), DP-7 (VH1-46), DP-10, DA-6 및 YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH1-e), DP-3 및 DA-8 (VH1-f)로부터 유래될 수 있다. CDR을 경쇄 가변 골격 영역 상으로 이식화하는 경우, 유용한 골격 서열은 DPK24 아군 IV 생식세포 계열 클론, 윌(Will) 아군 (DPK23, DPK22, DPK20, DPK21), 또는 VκI 아군 생식세포 계열 클론 (DPK9, DPK1, O2, DPK7)으로부터 유래될 수 있다.
- [0117] 항원-결합성 단편 또는 항체 단편은 항체의 단백질 분해적 또는 다른 분해에 의해, 상기 언급된 바와 같은 재조합 방법에 의해 (즉, 단일 또는 융합 폴리펩티드), 또는 화학적 합성에 의해 생성시킬 수 있다. 항체의 폴리펩티드, 특히 약 50개 이하의 아미노산의 보다 짧은 폴리펩티드는 화학적 합성에 의해 편리하게 제조한다. 화학적 합성 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고 시판되고 있다. 예를 들어, 항체 또는 항체 단편은 고체 상 방법을 이용하는 자동화 폴리펩티드 합성기에 의해 생성될 수 있었다 (또한, 미국 특허 번호 5,807,715; 4,816,567; 및 6,331,415 참조).
- [0118] 본 발명의 다른 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 huE5, huE15, huE22, 또는 huE47 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 갖거나 또는 huE5, huE15, huE22, 또는 huE47 중쇄 또는 경쇄 가변 영역과 실질적으로 유사한 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함한다.
- [0119] 폴리펩티드에 적용되는 바와 같은 용어 "실질적 동일성" 또는 "실질적 유사성"은 예컨대 프로그램에 공급된 바와 같은 디폴트 갭 중량을 이용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬된 경우에, 두 아미노산 서열이 70%, 75% 또는 80% 이상의 서열 동일성, 바람직하게 90% 또는 95% 이상의 서열 동일성, 및 보다 바람직하게 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 공유하는 것을 의미한다. 일부 실질적으로 유사한 아미노산 서열에서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 차이가 난다.
- [0120] 실질적으로 유사한 폴리펩티드는 또한, 하나 이상의 잔기를 기능적으로 유사한 잔기로 보존적으로 치환시킨, 보존적으로 치환된 변이체를 포함한다. 보존적 치환의 예는 하나의 비-극성 (소수성) 잔기, 예컨대 이소루이신, 발린, 루이신 또는 메티오닌을 또 다른 잔기로 치환하는 것; 하나의 극성 (친수성) 잔기를 또 다른 잔기로 치환하는 것, 예컨대 아르기닌과 리신 간의 치환, 글루타민과 아스파라긴 간의 치환, 글리신과 세린 간의 치환; 하나의 염기성 잔기, 예컨대 리신, 아르기닌 또는 히스티딘을 또 다른 잔기로 치환하는 것; 또는 하나의 산성 잔기, 예컨대 아스파르트산 또는 글루탐산을 또 다른 잔기로 치환하는 것을 포함한다.

[0121] 두 단백질이 실질적으로 동일하다는 추가의 표시는 이들이 전반적인 3차원 구조를 공유하고 있거나 또는 생물학상 기능적 등가물이라는 것이다.

[0122] 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4와 결합하는 항체-약물 접합체는 서열 5, 서열 9, 서열 13 및 서열 39 중 어느 하나로서 제시된 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 7, 서열 11, 서열 27 및 서열 53 중 어느 하나로서 제시된 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 서열 13과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 27과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편; 또는 서열 13으로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열 27로서 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 서열 39와 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 53과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편; 또는 서열 39로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열 53으로서 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편을 포함할 수 있다.

[0123] 본 발명의 EFNA4 항체를 발현하기 위하여, VH 및 VL 영역을 코딩하는 DNA 단편을 먼저, 상기 언급된 방법 중 어느 것을 이용하여 수득할 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, "폴리뉴클레오티드", "핵산/뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 모든 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태 (데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드), 그의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합체소에 의해 채워져 혼입될 수 있는 모든 기질을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 어떠한 3차원 구조도 가질 수 있고, 공지되거나 공지되지 않은 어떠한 기능도 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 비-제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편, 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전이 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, DNA, cDNA, 게놈 DNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 모든 서열의 단리된 DNA, 모든 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 자연 발생적, 합성, 재조합 또는 그의 모든 조합일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은쇄의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후에, 예컨대 표지화 성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 기타 유형의 변형물은, 예를 들어 "캡", 자연 발생적 뉴클레오티드 중 하나 이상을 유사체로 치환한 것, 뉴클레오티드간 변형물, 예컨대 전하를 띠지 않은 연쇄 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등)를 수반한 변형물 및 전하를 띤 연쇄 (예를 들어, 포스포포티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)를 수반한 변형물, 펜던트 모이어티, 예컨대 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 변형물, 삽입체 (예를 들어, 아크리딘, 프소랄렌 등)를 수반한 변형물, 킬레이트제 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화성 금속 등)를 함유하는 변형물, 알킬화제를 함유하는 변형물, 변형된 연쇄 (예를 들어, 알파 아노머성 핵산 등)를 수반한 변형물뿐만 아니라 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오티드(들)를 포함한다. 추가로, 당에 통상적으로 존재하는 어떠한 히드록실기도, 예를 들어 포스포네이트 기, 포스페이트 기에 의해 대체될 수 있거나, 표준 보호 기에 의해 보호될 수 있거나, 부가의 뉴클레오티드에 대한 부가의 연쇄를 제조하기 위해 활성화될 수 있거나, 또는 고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화될 수 있거나, 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑 기 모이어티 또는 아민으로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 또한 표준 보호 기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한, 관련 기술분야에 일반적으로 공지되어 있는 유사한 형태의 리보스 또는 데옥시리보스 당을 함유할 수 있는데, 이는 예를 들어, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, 알파- 또는 베타-아노머성 당, 에피머성 당, 예컨대 아라비노스, 크실로스 또는 릭소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스, 아시클릭 유사체 및 무염기성 뉴클레오티드 유사체, 예컨대 메틸 리보시드를 포함한다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연쇄를 또 다른 연결성 기로써 대체할 수 있다. 이들 또 다른 연결성 기는 포스페이트가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR<sub>2</sub> ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH<sub>2</sub> ("포름아세탈") (여기서, R 또는 R'는 각각 독립적으로, H이거나 또는 에테르 (-O-) 연쇄를 임의로 함유하는 치환되거나 치환되지 않은 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알킬이다)에 의해 대체되는 특색을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연쇄가 동일한 필요는 없다. 앞서의 설명은 본원에 지칭된 모든 폴리뉴클레오티드 (RNA 및 DNA 포함)에 적용된다.

[0124] 항-EFNA4 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 대표적인 DNA는 서열 6 (huE5 VH DNA), 8 (huE5 VL DNA), 10 (huE15 VH DNA), 12 (huE15 VL DNA), 14 (huE22 VH DNA), 28 (huE22 VL DNA), 40 (huE47 VH DNA), 및 54

(huE47 VL DNA)로서 제시된다. 항-EFNA 항체 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 대표적인 DNA는 서열 26 (huE22 HC), 서열 28 (huE22 LC), 서열 52 (huE47 HC), 및 서열 64 (huE47 LC)로서 제시된다 (하기 표 2 참조). huE5 및 huE15 항체의 CDR은 표 2에서 밑줄이 그어져 있다. huE22 및 huE47 항체의 CDR은 표 2 (카바트 또는 코티아에 의해 정의됨) 또는 도 2 (VBASE2 데이터베이스의 분석으로부터 유래됨)에서 별도의 서열 및 서열 식별자로서 제시된다.

- [0125] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 이용하여, 각종 변형, 예를 들어 돌연변이, 치환, 결실, 및/또는 부가를 huE5, huE15, huE22, 및 huE47 DNA 서열 내로 도입할 수도 있다. 예를 들어, 표준 방법, 예컨대 돌연변이된 뉴클레오타이드를 PCR 프라이머 내로 혼입하여, PCR 생성물이 목적하는 돌연변이 또는 부위 유도된 돌연변이유발을 함유하도록 하는 PCR-매개된 돌연변이유발을 이용하여 돌연변이유발을 수행할 수 있다.
- [0126] 따라서, 본 출원의 개시내용에 근거하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 huE5, huE15, huE22, 및 huE47 DNA와 실질적으로 유사한 DNA의 서열을 용이하게 인식할 것이다. 핵산 또는 그의 단편을 지칭하는 경우의 용어 "실질적 유사성" 또는 "실질적 서열 유사성"은 또 다른 핵산 (또는 그의 상보적 가닥)을 수반한 적당한 뉴클레오타이드 삽입물 또는 결실물과 최적으로 정렬되는 경우에는, 서열 동일성의 널리 공지된 어느 알고리즘, 예컨대 FASTA, BLAST 또는 Gap에 의해 측정된 바와 같이, 뉴클레오타이드 염기의 약 85% 이상, 바람직하게 약 90% 이상, 및 보다 바람직하게 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상에서 뉴클레오타이드 서열 동일성이 존재한다.
- [0127] 핵산 서열의 맥락에서 용어 "% 서열 동일성"은 최대 상응도를 위해 정렬된 경우에 동일한 두 서열 내의 잔기를 의미한다. 서열 동일성 비교의 길이는 약 9개 이상의 뉴클레오타이드, 통상적으로 약 18개 이상의 뉴클레오타이드, 보다 통상적으로 약 24개 이상의 뉴클레오타이드, 전형적으로 약 28개 이상의 뉴클레오타이드, 보다 전형적으로 약 32개 이상의 뉴클레오타이드, 및 바람직하게 적어도 약 36개, 48개 또는 그 초과 뉴클레오타이드의 연장물 전반에 걸쳐 수 있다. 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 수많은 상이한 알고리즘이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열은 위스콘신 패키지 버전 (Wisconsin Package Version) 10.0 [제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group (GCG); 미국 위스콘신주 매디슨)]의 프로그램인 FASTA, Gap 또는 Bestfit를 이용하여 비교할 수 있다. 예를 들어, 프로그램 FASTA2 및 FASTA3을 포함하는 FASTA는 질의 서열과 검색 서열 간의 가장 우수한 중복 영역의 정렬 및 % 서열 동일성을 제공한다 ([Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990)]; [Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000)]; [Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996)]; [Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998)]; 그 전문이 본원에 참조로 포함된다). 달리 명시되지 않는 한, 특별한 프로그램 또는 알고리즘에 대한 디폴트 파라미터가 사용된다. 예를 들어, 핵산 서열들 간의 % 서열 동일성은 그의 디폴트 파라미터 (6의 워드 크기 및 스코어링 매트릭스를 위한 NOPAM 인자)를 수반한 FASTA를 이용하거나 또는 GCG 버전 6.1 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 제공된 바와 같은 그의 디폴트 파라미터를 수반한 Gap를 이용하여 결정될 수 있다.
- [0128] 두 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 추가의 표시는 이러한 핵산에 의해 코딩된 단백질이 실질적으로 동일하거나, 전반적인 3차원 구조를 공유하고 있거나 또는 생물학적 기능적 등가물이라는 것이다. 이들 용어는 다음에 추가로 정의된다. 엄격한 조건 하에 서로 혼성화되지 않는 핵산 분자는, 상응하는 단백질이 실질적으로 동일한 경우에 여전히 실질적으로 동일하다. 이는, 예를 들어 두 뉴클레오타이드 서열이 유전 코드에 의해 허용되는 바와 같이, 보존적으로 치환된 변이체를 포함하는 경우에 일어날 수 있다.
- [0129] 보존적으로 치환된 변이체는 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치를 혼합-염기 및/또는 테옥시이노신 잔기로 치환시킨 변성 코돈 치환을 갖는 핵산 서열이다 (문헌 [Batzer et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:5081]; [Ohtsuka et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608]; 및 [Rossolini et al. (1994) Mol. Cell Probes 8:91-98] 참조).
- [0130] 예를 들어, 수행될 수 있는 한 가지 유형의 치환은 화학적으로 반응성일 수 있는 항체 내의 하나 이상의 시스템인을 또 다른 잔기, 예컨대 제한없이 알려진 또는 세린으로 변화시키는 것이다. 예를 들어, 비-표준 시스템인의 치환이 있을 수 있다. 이러한 치환은 항체의 가변 도메인의 CDR 또는 골격 영역 내에서 또는 불변 영역 내에서 수행될 수 있다. 또 다른 예로서, 시스템인이 표준일 수 있다.
- [0131] 항체를 또한, 예를 들어 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인 내에서 변형시켜, 예를 들어 항체의 결합 특성을 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 돌연변이를 하나 이상의 CDR 영역 내에서 수행하여, EFNA4에 대한 항체의  $K_D$ 를 증가 또는 감소시키거나,  $k_{off}$ 를 증가 또는 감소시키거나, 또는 항체의 결합 특이성을 변경시킬 수 있다. 부위 지

시된 돌연변이유발에 있어서의 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 상기 문헌 [Sambrook et al.] 및 [Ausubel et al.] 참조).

[0132] 변형 또는 돌연변이를 또한, 골격 영역 또는 불변 영역 내에서 수행하여, EFNA4 항체의 반감기를 증가시킬 수 있다 (예를 들어, PCT 국제 공개 번호 WO 00/09560 참조). 골격 영역 또는 불변 영역 내에서의 돌연변이를 또한 수행하여, 항체의 면역원성을 변경시키거나, 또 다른 분자와의 공유 또는 비-공유 결합을 위한 부위를 제공하거나, 또는 보체 고정화, FcR 결합성 및 항체-의존성 세포-매개된 세포독성과 같은 특성을 변경시킬 수 있다. 본 발명에 따라서, 단일 항체는 가변 도메인의 CDR 또는 골격 영역 중 어느 하나 이상 내에 또는 불변 영역 내에 돌연변이를 가질 수 있다.

[0133] "생식세포 계열화"로서 공지된 과정에서는, VH 및 VL 서열 내의 특정의 아미노산을, 생식세포 계열 VH 및 VL 서열에서 자연적으로 발견되는 것과 부합되도록 돌연변이시킬 수 있다. 특히, VH 및 VL 서열 내의 골격 영역의 아미노산 서열은 항체를 투여하는 경우에 면역원성의 위험을 저하시키기 위해 생식세포 계열 서열과 부합되도록 돌연변이시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "생식세포 계열"은 항체 유전자 및 유전자 절편의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열을 지칭하는데, 이는 이들이 생식 세포를 통하여 부모로부터 자손에게 전달되기 때문이다. 이러한 생식세포 계열 서열은 B 세포 성숙화의 과정 동안 재조합 및 초돌연변이 현상에 의해 변경되었던 성숙한 B 세포에서 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 구별된다. 특별한 생식세포 계열을 "활용"하는 항체는 그러한 생식세포 계열 뉴클레오타이드 서열과 가장 근접하게 정렬되거나 또는 이를 명시하는 아미노산 서열과 가장 근접하게 정렬되는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 갖는다. 이러한 항체는 종종, 생식세포 계열 서열과 비교해서 돌연변이된다. 인간 VH 및 VL 유전자에 대한 생식세포 계열 DNA 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, "Vbase" 인간 생식세포 계열 서열 데이터베이스 참조; 또한, 문헌 [Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 공개 번호 91-3242]; [Tomlinson et al., J. Mol. Biol. 227:776-798, 1992]; 및 [Cox et al., Eur. J. Immunol. 24:827-836, 1994] 참조).

[0134] 수행될 수 있는 또 다른 유형의 아미노산 치환은 항체 내의 잠재적 단백질 분해적 부위를 제거하는 것이다. 이러한 부위는 항체의 가변 도메인의 CDR 또는 골격 영역 내에 또는 불변 영역 내에 존재할 수 있다. 시스템인 잔기의 치환과 단백질 분해적 부위의 제거는 항체 생성물 내에서의 이질성의 위험을 감소시킬 수 있으므로, 그의 동질성을 증가시킬 수 있다. 또 다른 유형의 아미노산 치환은 아스파라긴과 글리신 잔기 중 하나 또는 둘 다를 변경시킴으로써, 잠재적 탈아미드화 부위를 형성하는 아스파라긴-글리신 쌍을 제거하는 것이다. 또 다른 예에서는, 본 발명의 EFNA4 항체의 중쇄의 C-말단 리신을 절단할 수 있다. 본 발명의 각종 측면에서, EFNA4 항체의 중쇄 및 경쇄는 임의로, 신호 서열을 포함할 수 있다.

[0135] 일단 본 발명의 VH 및 VL 절편을 코딩하는 DNA 단편을 수득하면, 이들 DNA 단편을 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작하여, 예를 들어 가변 영역 유전자를 완전한 길이의 항체쇄 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시킬 수 있다. 이들 조작에서는, VL-코딩 또는 VH-코딩 DNA 단편을 또 다른 단백질, 예컨대 항체 불변 영역 또는 가요성 링커를 코딩하는 또 다른 DNA 단편에 작동적으로 연결시킨다. 이러한 맥락에서 사용된 바와 같은 용어 "작동적으로 연결된"이란 상기 2개의 DNA 단편에 의해 코딩된 아미노산 서열이 동일 프레임 내에 남아 있도록 하기 위해 이들 2개의 DNA 단편을 연결시키는 것을 의미한다.

[0136] VH 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 VH-코딩 DNA를, 중쇄 불변 영역 (CH1, CH2 및 CH3)을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결시킴으로써 완전한 길이의 중쇄 유전자로 전환시킬 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고 (예를 들어, 문헌 [Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 공개 번호 91-3242] 참조), 이들 영역을 포괄하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 수득할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG2 불변 영역이다. 이러한 IgG 불변 영역 서열은 상이한 개체들 간에 존재하는 것으로 공지된 각종 대립 유전자 또는 동종이형, 예컨대 Gm(1), Gm(2), Gm(3), 및 Gm(17) 중 어느 것일 수 있다. 이들 동종이형은 IgG1 불변 영역 내의 자연 발생적 아미노산 치환물을 나타낸다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우, VH-코딩 DNA는 중쇄 CH1 불변 영역만을 코딩하는 또 다른 DNA 분자와 작동적으로 연결될 수 있다. 이러한 CH1 중쇄 불변 영역은 상기 중쇄 유전자 중 어느 것으로부터 유래될 수 있다.

[0137] VL 영역을 코딩하는 단리된 DNA는, 이러한 VL-코딩 DNA를 경쇄 불변 영역 CL을 코딩하는 또 다른 DNA 분자와 작동적으로 연결시킴으로써 완전한 길이의 경쇄 유전자 (뿐만 아니라 Fab 경쇄 유전자)로 전환시킬 수 있다. 인



간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고 (예를 들어, 문헌 [Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 공개 번호 91-3242] 참조), 이들 영역을 포괄하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 획득할 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다. 카파 불변 영역은 상이한 개체들 간에 발생하는 것으로 공지된 각종 대립 유전자, 예컨대 Inv(1), Inv(2), 및 Inv(3) 중 어느 것일 수 있다. 람다 불변 영역은 3가지 람다 유전자 중 어느 것으로부터 유래될 수 있다.

[0138] scFv 유전자를 창출하기 위하여, VH-코딩 DNA 단편과 VL-코딩 DNA 단편을, VH 서열과 VL 서열이 연속되는 단일쇄 단백질로서 발현될 수 있고 VL 영역과 VH 영역이 가요성 링커에 의해 연결되도록 이러한 가요성 링커를 코딩하는 또 다른 단편과 작동적으로 연결시킨다 (예컨대, [Bird et al., 1988, Science 242:423-426]; [Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883]; [McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554] 참조). 단일쇄 항체는 단지 단일 VH와 VL을 사용한 경우에는 1가일 수 있거나, 2개의 VH와 VL을 사용한 경우에는 2가일 수 있거나, 또는 2개 초과와 VH와 VL을 사용한 경우에는 다가일 수 있다. EFNA4 및 또 다른 분자와 특이적으로 결합하는 이중특이적 또는 다가 항체를 생성시킬 수 있다.

[0139] 본 발명의 또 다른 측면에서, 또 다른 폴리펩티드와 연결된 본 발명의 EFNA4 항체의 전부 또는 일부를 포함하는 융합 항체 또는 면역부착인자를 만들 수 있다. 또 다른 측면에서, EFNA4 항체의 가변 도메인만이 상기 폴리펩티드와 연결된다. 또 다른 측면에서, EFNA4 항체의 VH 도메인은 제1 폴리펩티드와 연결되는 반면, EFNA4 항체의 VL 도메인은 제2 폴리펩티드와 연결되는데, 이러한 폴리펩티드는 VH 도메인과 VL 도메인이 서로 상호 작용하여 항원 결합 부위를 형성할 수 있도록 하는 방식으로 제1 폴리펩티드와 연합된다. 또 다른 측면에서, VH 도메인은 링커에 의해 VL 도메인으로부터 분리되어, VH 도메인과 VL 도메인이 서로 상호 작용할 수 있도록 한다. 이어서, VH-링커-VL 항체가 관심 폴리펩티드와 연결된다. 또한, 2개 (또는 그 초과)의 단일쇄 항체가 서로 연결되는 융합 항체가 창출될 수 있다. 이는 단일 폴리펩티드쇄 상에 2가 또는 다가 항체를 창출시키고자 하는 경우, 또는 이중특이적 항체를 창출시키고자 하는 경우에 유용하다.

[0140] 기타 변형된 항체는 EFNA4 항체를 코딩하는 핵산 분자를 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, "카파 보디" (문헌 [Ill et al., Protein Eng. 10:949-57, 1997]), "미니보디" (문헌 [Martin et al., EMBO J. 13:5303-9, 1994]), "디아보디" (문헌 [Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993]), 또는 "야누신(Janusin)" (문헌 [Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659, 1991] 및 [Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52, 1992])은 본 명세서의 교시에 따라서 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 제조할 수 있다.

[0141] 이중특이적 항체 또는 항원 결합성 단편은 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함한 각종 방법에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, 1990], [Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992] 참조). 또한, 이중특이적 항체는 "디아보디" 또는 "야누신"으로서 형성될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 이중특이적 항체는 EFNA4의 2개의 상이한 에피토프와 결합한다. 다른 측면에서, 상기 언급된 변형된 항체는 본원에 제공된 EFNA4 항체로부터의 가변 도메인 또는 CDR 영역 중 하나 이상을 이용하여 제조한다.

[0142] 항체-약물 접합체의 제조에 사용하기 위하여, 본원에 기재된 EFNA4 항체는 실질적으로 순수할 수 있는데, 즉 50% 이상 순수하고 (즉, 오염물질이 없다), 보다 바람직하게 90% 이상 순수하며, 보다 바람직하게 95% 이상 순수하고, 보다 더 바람직하게 98% 이상 순수하며, 가장 바람직하게 99% 이상 순수할 수 있다.

[0143] 표 2는 본 발명의 인간화 항-EFNA4 항체의 아미노산 (단백질) 서열 및 관련 핵산 (DNA) 서열을 제공한다. 카바트에 의해 정의된 바와 같이, huE5 VH, huE5 VL, huE15 VH, 및 huE15 VL의 CDR에 밑줄이 그어져 있다. 카바트 및 코티아에 의해 정의된 바와 같이, huE22 VH, huE22 VL, huE47 VH, 및 huE47 VL의 CDR은 별도의 서열로서 제시된다.

[0144] <표 2> 인간화 항-EFNA4 항체의 서열.

서열 번호	설명	서열
5	huE5 VH 단백질	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVTITYGVDWVRQAPGK GLEWLGVIWGGGSTNYSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCASP <u>WAYWGQGLTVTVSS</u>
6	huE5 VH DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCT GGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC GTCACTACTTATGGTGTGGACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGTTAGGTGTAATATGGGGTGGTGAAGC ACAAATTATAATAGCGCTTTGAAGAGCCGATTACCATCTCCAG AGACAACCTCAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGTGATTGG GCTTACTGGGGCCAAGGGA CTCTGGTCACTGTCTCTTC
7	huE5 VL 단백질	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQNVGTNVAFWQQKPGKAP KSLIHSA SYRYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQ QYK RYPYTFGGG TKLEIK
8	huE5 VL DNA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGAATG TGGGTACAAATGTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAG CCCCTAAGTCCCTGATCCATTCGGCATCCTACCGTTACAGTGG GGTCCCATCAAGGTTCAAGGCGAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACT TACTATTGTCAGCAATATAAGAGGTATCCGTACACGTTCCGAG GGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC
9	huE15 VH 단백질	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSSWVRQAPGK GLEWVATISSGGTYTYYPDSVKGRFKISRDN AKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCTRHD <u>PNDGYFLFAYW</u> GQGLTVTVSS
10	huE15 VH DNA	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAC CTTCAGTACCTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGCAACCATAGTAGTGGTGGTAC TTACACATACTACCCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCAAAATC TCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTACAAGAC ATGACCCCAATGATGGTTACTACTTCTGTTTGCTTACTGGGG CCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTC
11	huE15 VL 단백질	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCKASQSVGNVAVWYQQKPGQAP RLIIYYASNRYTGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQ HYSSPLTFGAGTKLEIK
12	huE15 VL DNA	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTG TTGGCAACAATGTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTACTATGCATCCAATAGGTATACAGG CATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAGTG TATTACTGTCAACAGCATTATAGCTCTCCGCTCACGTTCCGGTG CTGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC
13	huE22 VH 단백질	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYIHWVRQAPGQ GLEWMGWYIPGNFN TKYNERFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLR SDDTAVYYCAREDGSPYYAMDYWGQGTSTVTVSS
14	huE22 VH DNA	CAGGTTCAAGTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACC TTTACCGGCTATTACATCCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGATGGATCTACCCTGGCAATTTTA

[0145]

		ACACAAAATATAACGAGCGGTTCAAGGGCAGAGTCACCATGAC CACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAG CCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGA GGATGGTAGCCCCCTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
15	huE22 VH CDR1 단백질 - 카바트	GYIIH
16	huE22 VH CDR1 단백질 - 코티아	GYTFTGY
17	huE22 VH CDR1 DNA - 카바트	GGCTATTACATCCAC
18	huE22 VH CDR1 DNA - 코티아	GGTTACACCTTTACCGGCTAT
19	huE22 VH CDR2 단백질 - 카바트	WIYPGNFNTKYNERFKG
20	huE22 VH CDR2 단백질 - 코티아	YPGNFN
21	huE22 VH CDR2 DNA - 카바트	TGGATCTACCCTGGCAATTTTAACACAAAATATAACGAGCGGTT CAAGGGC
22	huE22 VH CDR2 DNA - 코티아	TACCCTGGCAATTTTAAC
23	huE22 VH CDR3 단백질 - 카바트 및 코티아	EDGSPYYAMDY
24	huE22 VH CDR3 DNA - 카바트 및 코티아	GAGGATGGTAGCCCCCTACTATGCTATGGACTAC
25	huE22 HC 단백질 - Hulg1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTGYIIHWVRQAPGQ GLEWMGWYYPGNFNTKYNERFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLR SDDTAVYYCAREDGSPYYAMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYT QKSLSLSPG
26	huE22 HC DNA	CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACC TTTACCGGCTATTACATCCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCTACCCTGGCAATTTTA ACACAAAATATAACGAGCGGTTCAAGGGCAGAGTCACCATGAC CACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAG CCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGA GGATGGTAGCCCCCTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCGCCCTCGAGCAAGAGCACCTCTGGGGG

[0146]

		CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA GCCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CAGCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGA CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACT ACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
27	huE22 VL 단백질	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFLYWYLQKP GQSPQLLIYRVSNRFSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQATHVPWTFGGGTKVEIK
28	huE22 VL DNA	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCGTACCCC CTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCCGGTCTAGTCAGAGCC TCGTGCATAGTAATGGAAACACCTTTTTGTATTGGTACCTGCAG AAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATCTATAGAGTTTCCA ACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTCAAGTGGCAGCGGGT CAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTG AGGATGTTGGGTTTATTACTGCTTTCAAGCTACACATGTTCC GTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAAGTGAAATCAAA
29	huE22 VL CDR1 단백질-카바트	RSSQSLVHSNGNTFLY
30	huE22 VL CDR1 단백질-코티아	QSLVHSNGNTF
31	huE22 VL CDR1 DNA- 카바트	CGGTCTAGTCAGAGCCTCGTGCATAGTAATGGAAACACCTTT TGAT
32	huE22 VL CDR1 DNA- 코티아	CAGAGCCTCGTGCATAGTAATGGAAACACCTTT
33	huE22 VL CDR2 단백질-카바트 및 코티아	RVSNRFS
34	huE22 VL CDR2 DNA- 카바트 및 코티아	AGAGTTTCCAACCGGTTCTCT
35	huE22 VL CDR3 단백질-카바트	FQATHVPWT

[0147]



	및 코티아	
36	huE22 VL CDR3 DNA- 카바트 및 코티아	CAAGCTACACATGTTCCGTGGACG
37	huE22 LC 단백질-카파	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFLYWYLQKP GQSPQLLIYRVSNRFSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQATHVPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	huE22 LC DNA	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCC CTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCCGGTCTAGTCAGAGCC TCGTGCATAGTAATGGAAACACCTTTTGTATTGGTACCTGCAG AAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATCTATAGAGTTTCCA ACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTCAAGTGGCAGCGGGT CAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTG AGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTTCAAGCTACACATGTTCC GTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAAGTGGAAATCAAACGGAC TGTGGCTGCACCAAGTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGT
39	huE47 VH 단백질	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYFYMNWVRQAPGQ GLEWVGQINPNNGGTAYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARWVGTHYFDYWGGQTTLTVSS
40	huE47 VH DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACACC TTCACTTACTTCTATATGAAGTGGGTGCGACAGGCCCTGGAC AAGGGCTTGAGTGGGTGGGACAAATCAACCCTAATAATGGTG GCACAGCCTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGA CCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCA GCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAT GGGTGCGGACTCACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCA CTCTCACAGTCTCCTCC
41	huE47 VH CDR1 단백질-카바트	YFYMN
42	huE47 VH CDR1 단백질-코티아	GYTFTYF
43	huE47 VH CDR1 DNA- 카바트	TACTTCTATATGAAC
44	huE47 VH CDR1 DNA- 코티아	GGATACACCTTCACTTACTTC
45	huE47 VH CDR2 단백질-카바트	QINPNNGGTAYAQKFQG
46	huE47 VH CDR2	NPNNGGT

[0148]

	단백질-코티아	
47	huE47 VH CDR2 DNA- 카바트	CAAATCAACCCTAATAATGGTGGCACAGCCTACGCACAGAAAGT TCCAGGGC
48	huE47 VH CDR2 DNA- 코티아	AACCCTAATAATGGTGGCACA
49	huE47 VH CDR3 단백질-카바트 및 코티아	WVGTHYFDY
50	huE47 VH CDR3 DNA- 카바트 및 코티아	TGGGTCGGGACTCACTACTTTGACTAC
51	huE47 HC 단백질 -인간 IgG1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYFYMNWVRQAPGQ GLEWVVGQINPNNGGTAYAQKFQGRVTMTSDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARWVGTHYFDYWGQGTTTLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
52	huE47 HC DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACACC TTCACTTACTTCTATATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGAC AAGGGCTTGAGTGGGTGGGACAAATCAACCCTAATAATGGTG GCACAGCCTACGCACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGA CCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCA GCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAT GGGTGGGACTCACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCA CTCTCACAGTCTCCTCCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCGCCCTCGAGCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCGG TGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGACAAAACCTCAC ACATGCCACCGTGCCGAGCACCTGAAGTCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCCCAGAAACCAAGGACACCCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT

[0149]

		GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
53	huE47 VL 단백질	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSSYTYIHWYQQKPG QAPRLINLFASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYY CQHSWEIPPTFGGGTKLEIK
54	huE47 VL DNA	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTG TTAGCAGCTCTAGCTATACTTACATTCACTGGTACCAACAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCAATTTTGCATCCAACT TGGAAAGTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGA TTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCTCCGA CGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
55	huE47 VL CDR1 단백질-카바트	RASQSVSSSSYTYIH
56	huE47 VL CDR1 단백질-코티아	SSSYTYIH
57	huE47 VL CDR1 DNA- 카바트	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTCTAGCTATACTTACATTC AC
58	huE47 VL CDR1 DNA- 코티아	AGCTCTAGCTATACTTACATTCAC
59	huE47 VL CDR2 단백질-카바트 및 코티아	FASNLES
60	huE47 VL CDR2 DNA- 카바트 및 코티아	TTTGCATCCAACTTGGAAAGT
61	huE47 VL CDR3 단백질-카바트 및 코티아	QHSWEIPPT
62	huE47 VL CDR3 DNA- 카바트 및 코티아	CAGCACAGTTGGGAGATTCTCCGACG
63	huE47 LC 단백질 -인간 카파	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSSYTYIHWYQQKPG QAPRLINLFASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYY CQHSWEIPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
64	huE47 LC DNA	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTG TTAGCAGCTCTAGCTATACTTACATTCACTGGTACCAACAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCAATTTTGCATCCAACT TGGAAAGTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGA TTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCTCCGA

[0150]

		CGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGACTGTGG CTGCACCAAGTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGT
--	--	---

[0151]

[0152]

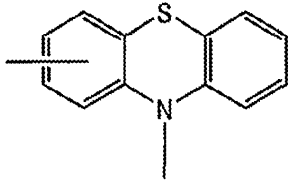
## II.B. 링커

[0153]

본 발명의 항-EFNA4 항체-약물 접합체는 약물을 항-EFNA4 항체와 연결 또는 접합시켜 주는 링커를 이용하여 제조될 수 있다. 본 발명의 특별한 측면에서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체의 링커는 4-(4'아세틸페녹시)부탄산 (AcBut)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0154] 링커 분자는 안정적이거나 (비-절단성) 또는 가수분해 가능하므로 (절단성), 이는 세포 유입 후에 방출된다. 약물이 항체로부터 절단되는 주요 기전은 리소솜의 산성 pH에서의 가수분해 (히드라존, 아세탈 및 시스-아코니테이트-유사 아마이드), 리소솜성 효소에 의한 펩티드 절단 (카텝신 및 기타 리소솜성 효소), 및 디설피드의 환원을 포함한다. 이들 다양한 절단 기전에 따른 결과로서, 약물을 항체와 연결시키는 기전 또한 광범위하게 다양하고, 적합한 어떠한 링커도 사용될 수 있다.
- [0155] 적합한 접합 과정의 한 예는 히드라지드 및 기타 친핵체가, 항체 상에 자연적으로 존재하는 탄수화물의 산화에 의해 생성된 알데히드와 접합되는 것에 좌우된다. 목적하는 약물 방출 특성을 제공해 주는 카르보닐 기가 도입된 히드라존-함유 접합체를 제조할 수 있다. 하나의 말단에 디설피드를 갖고, 중간에 알킬 쇄를 가지며, 다른 말단에 히드라진 유도체를 갖는 링커를 이용하여 접합체를 제조할 수도 있다. 안트라시클린은 이러한 기술을 이용하여 항체와 접합될 수 있는 세포독소의 한 예이다.
- [0156] 히드라존 이외의 작용기를 함유하는 링커는 리소솜의 산성 환경 하에 절단될 수 있는 잠재력을 지니고 있다. 예를 들어, 세포내적으로 절단 가능한 히드라존 이외의 부위를 함유하는 티올-반응성 링커, 예컨대 에스테르, 아마이드 및 아세탈/케탈로부터 접합체를 제조할 수 있다. 캄프토테신(Camptothecin)은 이들 링커를 이용하여 접합될 수 있는 하나의 세포독성제이다. 5 내지 7원 환 케톤으로부터 제조되고 세포독성제에 부착된 산소 중 하나를 갖고 항체 부착을 위하여 링커에 부착된 다른 것을 갖는 케탈을 사용할 수도 있다. 안트라시클린은 또한, 이들 링커와 함께 사용하는 데 적합한 세포독소의 한 예이다.
- [0157] 특정 부류의 pH 민감성 링커의 또 다른 예는 아마이드 결합과 병렬된 카르복실산을 갖는 시스-아코니테이트이다. 이러한 카르복실산은 산성 리소솜 내에서의 아마이드 가수분해를 가속화시킨다. 몇 가지 다른 유형의 구조를 이용하여 유사한 유형의 가수분해 속도 가속화를 달성하는 링커를 사용할 수도 있다. 마이탄시노이드가 C-9에 부착된 링커와 접합될 수 있는 세포독소의 한 예이다.
- [0158] 약물 접합체에 대해 또 다른 잠재적 방출 방법은 리소솜성 효소에 의한 펩티드의 효소적 가수분해이다. 한 예에서는, 펩티드를 아마이드 결합을 통하여 파라-아미노벤질 알콜에 부착시킨 다음, 이러한 벤질 알콜과 세포독성제 간에 카르바메이트 또는 카르보네이트를 만든다. 펩티드를 절단하면, 아미노벤질 카르바메이트 또는 카르보네이트의 붕괴 또는 자기 희생이 초래된다. 이러한 전략과 함께 예시된 세포독성제는 안트라시클린, 탁산, 미토마이신 C, 및 아우리스타틴을 포함한다. 한 예에서, 페놀이 카르바메이트 대신 링커의 붕괴에 의해 방출될 수도 있다. 또 다른 변이에서는, 디설피드 환원을 이용하여 파라-머캅토벤질 카르바메이트 또는 카르보네이트의 붕괴를 개시한다.
- [0159] 항체와 접합된 많은 세포독성제는 수중 용해도가 있다 하더라도 매우 낮으므로, 접합체의 응집으로 인해 이러한 접합체에 대한 약물 부하가 제한될 수 있다. 이를 극복하기 위한 한 가지 접근 방식은 가용화 기를 링커에 부가하는 것이다. PEG와 디펩티드로 이루어진 링커를 이용하여 제조된 접합체를 사용할 수 있는데, 이는 항체에 부착된 PEG 이산, 티올산, 또는 말레이미드산; 디펩티드 스페이서; 및 안트라시클린 또는 듀오카르마이신 유사체의 아민에 대한 아마이드 결합을 갖는 것을 포함한다. 또 다른 예는 항체와 결합된 아마이드 및 세포독성제와 결합된 PEG-함유 링커 디설피드를 이용하여 제조된 접합체이다. PEG 기를 혼입시키는 접근 방식이 약물 부하에 있어서의 제한과 응집을 극복하는 데 있어서 유리할 수 있다.
- [0160] 본 발명의 일부 측면에서, 본 발명의 항체-약물 접합체를 제조하기 위한 링커는 다음 식을 갖는 링커를 포함한다:
- [0161]  $(\text{CO-Alk}^1\text{-Sp}^1\text{-Ar-Sp}^2\text{-Alk}^2\text{-C(Z)}^1)=\text{Q-Sp}$
- [0162] 상기 식에서,
- [0163]  $\text{Alk}^1$  및  $\text{Alk}^2$ 는 독립적으로, 결합, 또는 분지되거나 또는 분지되지 않은 ( $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ ) 알킬렌 쇄이고;
- [0164]  $\text{Sp}^1$ 은 결합,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{CONH}-$ ,  $-\text{NHCO}-$ ,  $-\text{NR}'-$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}-$ , 또는  $-\text{X-Ar}'\text{-Y-(CH}_2)_n\text{-Z}$  [여기서, X, Y, 및 Z는 독립적으로, 결합,  $-\text{NR}'-$ ,  $-\text{S}-$ , 또는  $-\text{O}-$ 인데, 단  $n=0$ 인 경우, Y 및 Z 중 적어도 하나는 결합이어야만 하고,  $\text{Ar}'$ 는 ( $\text{C}_1\text{-C}_5$ ) 알킬, ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ) 알콕시, ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ) 티오알콕시, 할로젠, 니트로,  $-\text{COOR}'$ ,  $-\text{CONHR}'$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$ ,  $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$ , 또는  $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$  중 1개, 2개 또는 3개의 기로 임의로 치환된 1,2-, 1,3-, 또는 1,4-페닐렌이다]인데, 단  $\text{Alk}^1$ 이 결합인 경우,  $\text{Sp}^1$ 은 결합이며;

- [0165]  $n$ 은 0 내지 5의 정수이고;
- [0166]  $R'$ 는  $-OH$ ,  $(C_1-C_4)$  알콕시,  $(C_1-C_4)$  티오알콕시, 할로젠, 니트로,  $(C_1-C_3)$  디알킬아미노, 또는  $(C_1-C_3)$  트리알킬 암모늄- $A^-$  (여기서,  $A^-$ 는 염을 완료하는 제약상 허용되는 음이온이다) 중 1개 또는 2개의 기에 의해 임의로 치환된, 분지되거나 또는 분지되지 않은  $(C_1-C_5)$  쇠이며;
- [0167]  $Ar$ 은  $(C_1-C_6)$  알킬,  $(C_1-C_5)$  알콕시,  $(C_1-C_4)$  티오알콕시, 할로젠, 니트로,  $-COOR'$ ,  $-CONHR'$ ,  $-O(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-O(CH_2)_nCONHR'$ , 또는  $-S(CH_2)_nCONHR'$  (여기서,  $n$  및  $R'$ 는 상기 정의된 바와 같다) 중 1개, 2개 또는 3개의 기로 임의로 치환된 1,2-, 1,3-, 또는 1,4-페닐렌; 또는 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, 또는 2,7-나프틸리덴; 또는



- [0168]
- [0169] 인데, 각 나프틸리덴 또는 페노티아진은  $(C_1-C_6)$  알킬,  $(C_1-C_5)$  알콕시,  $(C_1-C_4)$  티오알콕시, 할로젠, 니트로,  $-COOR'$ ,  $-CONHR'$ ,  $-O(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ , 또는  $-S(CH_2)_nCONHR'$  (여기서,  $n$  및  $R'$ 는 상기 정의된 바와 같다) 중 1개, 2개, 3개 또는 4개의 기로 임의로 치환되는데, 단  $Ar$ 이 페노티아진인 경우,  $Sp^1$ 은 질소와만 연결된 결합이고;
- [0170]  $Sp^2$ 는 결합,  $-S-$ , 또는  $-O-$ 인데, 단  $Alk^2$ 가 결합인 경우,  $Sp^2$ 는 결합이며,
- [0171]  $Z^1$ 은  $H$ ;  $(C_1-C_5)$  알킬; 또는  $(C_1-C_5)$  알킬,  $(C_1-C_5)$  알콕시,  $(C_1-C_4)$  티오알콕시, 할로젠, 니트로,  $-COOR'$ ,  $-ONHR'$ ,  $-O(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-O(CH_2)_nCONHR'$ , 또는  $-S(CH_2)_nCONHR'$  (여기서,  $n$  및  $R'$ 는 상기 정의된 바와 같다) 중 1개, 2개 또는 3개의 기로 임의로 치환된 페닐이고;
- [0172]  $Sp$ 는 직쇄 또는 측쇄의 2가 또는 3가  $(C_1-C_{18})$  라디칼, 2가 또는 3가 아릴 또는 헤테로아릴 라디칼, 2가 또는 3가  $(C_3-C_{18})$  시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬 라디칼, 2가 또는 3가 아릴- 또는 헤테로아릴-아릴  $(C_1-C_{18})$  라디칼, 2가 또는 3가 시클로알킬- 또는 헤테로시클로알킬-알킬  $(C_1-C_{18})$  라디칼 또는 2가 또는 3가  $(C_2-C_{18})$  불포화 알킬 라디칼인데, 여기서 헤테로아릴은 바람직하게, 푸릴, 티에닐,  $N$ -메틸피롤릴, 피리디닐,  $N$ -메틸이미다졸릴, 옥사졸릴, 피리미디닐, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴,  $N$ -메틸카르바조일, 아미노코우르마리닐, 또는 페나지닐이며, 여기서  $Sp$ 가 3가 라디칼인 경우,  $Sp$ 는 저급  $(C_1-C_5)$  디알킬아미노, 저급  $(C_1-C_5)$  알콕시, 히드록시, 또는 저급  $(C_1-C_5)$  알킬티오 기에 의해 부가적으로 치환될 수 있고;
- [0173]  $Q$ 는  $=NHNCO-$ ,  $=NHNCS-$ ,  $=NHNCONH-$ ,  $=NHNCSNH-$ , 또는  $=NHO-$ 이다.
- [0174] 바람직하게,  $Alk^1$ 은 분지되거나 또는 분지되지 않은  $(C_1-C_{10})$  알킬렌 쇠이고;  $Sp^1$ 은 결합,  $-S-$ ,  $-O-$ ,  $-CONH-$ ,  $-NHCO-$ , 또는  $-NR'$  (여기서,  $R'$ 는 상기 정의된 바와 같다)인데, 단  $Alk^1$ 이 결합인 경우,  $Sp^1$ 은 결합이며;
- [0175]  $Ar$ 은  $(C_1-C_6)$  알킬,  $(C_1-C_5)$  알콕시,  $(C_1-C_4)$  티오알콕시, 할로젠, 니트로,  $-COOR'$ ,  $-CONHR'$ ,  $-O(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-O(CH_2)_nCONHR'$ , 또는  $-S(CH_2)_nCONHR'$  (여기서,  $n$  및  $R'$ 는 상기 정의된 바와 같다) 중 1개, 2개 또는 3개의 기로 임의로 치환된 1,2-, 1,3-, 또는 1,4-페닐렌이거나, 또는  $Ar$ 은  $(C_1-C_6)$  알킬,  $(C_1-C_5)$  알콕시,  $(C_1-C_4)$  티오알콕시, 할로젠, 니트로,  $-COOR'$ ,  $-CONHR'$ ,  $-O(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-O(CH_2)_nCONHR'$ , 또는  $-S(CH_2)_nCONHR'$  중 1개, 2개, 3개 또는 4개의 기로 각각 임의로 치환된 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, 또는 2,7-나프틸리덴이고;

[0176]  $Z^1$ 은  $(C_1-C_5)$  알킬; 또는  $(C_1-C_5)$  알킬,  $(C_1-C_4)$  알콕시,  $(C_1-C_4)$  티오알콕시, 할로젠, 니트로,  $-COOR'$ ,  $-CONHR'$ ,  $-O(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-S(CH_2)_nCOOR'$ ,  $-O(CH_2)_nCONHR'$ , 또는  $-S(CH_2)_nCONHR'$  중 1개, 2개 또는 3개의 기로 임의로 치환된 페닐이며;  $Alk^2$ 와  $Sp^2$ 는 함께, 결합이고;  $Sp$  및  $Q$ 는 바로 위에서 정의된 바와 같다.

[0177] 그 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,773,001에는 칼리케아미신으로부터 제조된 친핵성 약물, 특히 히드라지드 및 관련 친핵체와 함께 사용될 수 있는 링커가 개시되어 있다. 이들 링커는 약물과 링커 간에 형성된 연쇄가 가수분해 가능할 때 보다 우수한 활성이 획득되는 경우에 특히 유용하다. 이들 링커는 2개의 작용기를 함유하는데, 이는 (1) 항체와 반응하기 위한 기 (예를 들어, 카르복실산), 및 (2) 약물과 반응하기 위한 카르보닐 기 (예를 들어, 알데히드 또는 케톤)를 포함한다. 카르보닐 기는 약물 상의 히드라지드 기와 반응하여 히드라존 연쇄를 형성할 수 있다. 이러한 연쇄는 절단 가능하고 가수분해 가능하여, 표적 세포와의 결합 후 접합체로부터 치료제를 방출시켜 줄 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 사용된 가수분해 가능한 링커는 4-(4-아세틸페녹시) 부탄산 (AcBut)이다. 본 발명의 다른 측면에서, 항체-약물 접합체는 링커 분자로서 (3-아세틸페닐) 아세트산 (AcPac) 또는 4-머캅토-4-메틸-펜탄산 (아미드)를 이용하여 제조될 수 있다.

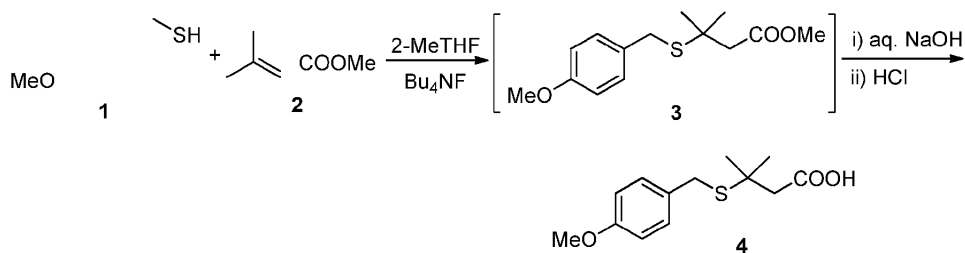
[0178] N-히드록시숙신이미드 (OSu) 에스테르 또는 기타 동등하게 활성화된 에스테르를 사용하여, 활성화된 가수분해 가능한 링커-약물 모이어티를 생성시킬 수 있다. 기타 적합한 활성화 에스테르의 예는 NHS (N-히드록시숙신이미드), 술폰-NHS (술폰화 NHS), PFP (펜타플루오로페닐), TFP (테트라플루오로페닐), 및 DNP (디니트로페닐)을 포함한다.

[0179] 본 발명의 일부 측면에서, 항체-약물 접합체는 칼리케아미신 또는 그의 유도체, AcBut 링커 및 본 발명의 항-EFNA4 항체를 반응시킴으로써 제조된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,773,001 참조). AcBut 링커는 순환시 실질적으로 안정적인 접합체를 생성시켜, 시험관내 인간 혈장에서 37°C 하에 검정되는 경우에 매일 대략 2%의 칼리케아미신이 방출된다. 이러한 접합체는 산성 리소솜 내에서 칼리케아미신을 방출시킨다.

[0180] 본 발명의 일부 측면에서, AcBut-CM 모이어티는 관련 기술분야, 예컨대 PCT 국제 공개 번호 WO 08/147765 및 미국 특허 번호 8,273,862 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 기재된 방법 및 공정을 이용하여 생성될 수 있다.

[0181] 본 발명의 일부 측면에서, AcBut-CM 모이어티는 미국 가출원 번호 61/899,682 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 기재된 바와 같은, 개선된 합성 공정을 이용하여 생성될 수 있다. 링커 중간체 (화합물 10)를 합성하는 방법이 다음과 같이 기재되어 있다:

[0182] 도식 1

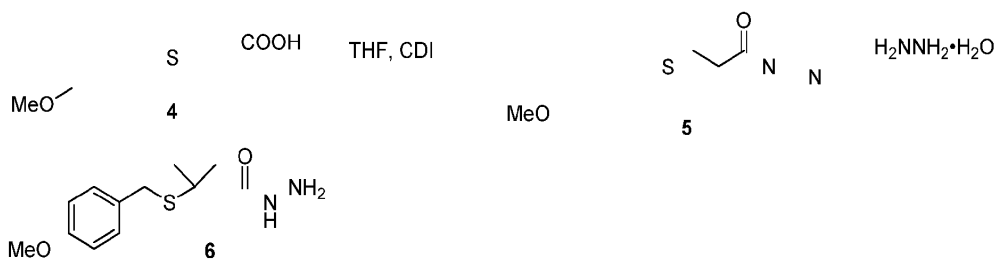


[0183]

[0184] 도식 1에서는, 화합물 1과 화합물 2를 2-메틸테트라히드로푸란 (2-MeTHF) 및 테트라부틸암모늄 플루오라이드 (Bu<sub>4</sub>NF)에서 반응시킨다. 수중 염화칼슘 이수화물 용액을 가하고, 하부 수성 상을 교반 후 제거하였다. 상부 유기 상에 수중 3 당량의 NaOH 및 메탄올을 가한다. 중간체 에스테르 3의 완전한 소모가 관찰될 때까지 상기 반응 혼합물을 교반시킨다. 이 반응물을 15°C로 냉각시키고, 2-메틸테트라히드로푸란을 가한 다음, 물을 가한다. 진한 HCl을 서서히 가하여, 반응물을 15 내지 30°C의 범위로 유지시킨다. 산 4를 유기 층으로부터 수득한다.



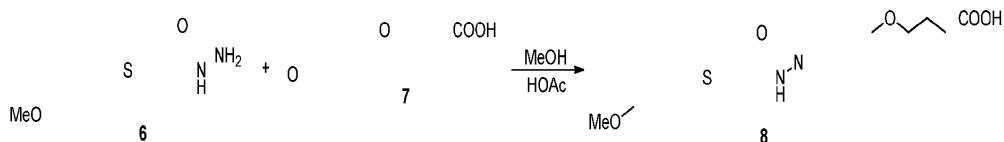
[0185] 도식 2



[0186]

[0187] 도식 2에서는, 화합물 4를 적합한 유기 용매, 예컨대 테트라히드로푸란 (THF) 및 아졸 활성화제, 예컨대 카르보닐 디이미다졸 (CDI)로 충전시켜, 중간체 5를 형성시킨다. 다른 아졸 활성화제, 예를 들어 티오펜 카르보닐 디이미다졸; 카르보닐 비스-피라졸 (여기서, 각 피라졸은 1개 내지 3개의 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 알킬 기로 임의로 치환된다); 카르보닐 비스-1,2,3-트리아졸; 카르보닐 비스-벤조트리아졸, 및 카르보닐 비스-1,2,4-트리아졸 (이로써, 화합물 5와 유사한 중간체 화합물이 형성되지만, 이미다졸릴 이외의 상이한 아졸 모이어티를 포함할 것이다)을 사용할 수 있다. 중간체 5를 히드라진, 바람직하게 히드라진의 수성 공급원, 예컨대 히드라진 일수화물과 반응시켜, 중간체 6을 산출시킨다. 중간체 6은 PCT 국제 공개 번호 WO 08/147765 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 기재되어 있다.

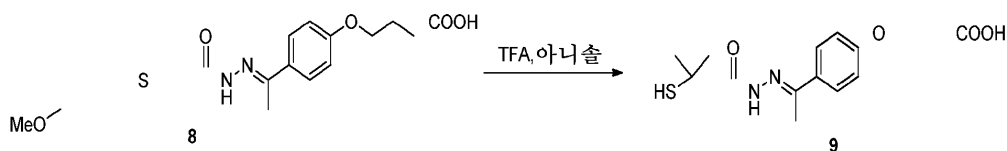
[0188] 도식 3



[0189]

[0190] 도식 3에서는, 중간체 6을 불활성 (비-반응성) 용매 (예컨대, 메탄올 (MeOH)) 중에서, 임의로 산성 촉매 (예컨대, 아세트산 (HOAc))와 함께, 중간체 7과 반응시켜 중간체 8을 산출시킨다.

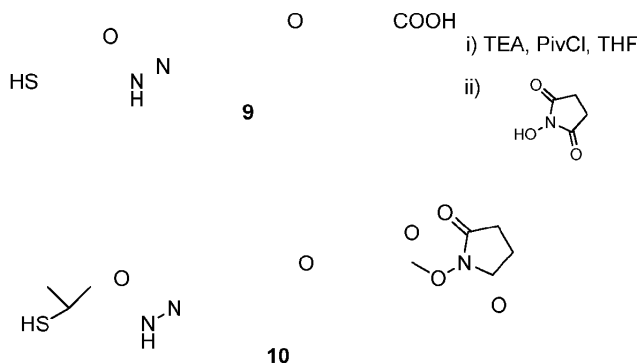
[0191] 도식 4



[0192]

[0193] 도식 4에서는, 임의로 가열 하에 강산을 이용하여, 예컨대 가열 하에 트리플루오로아세트산 (TFA)을 이용함으로써 중간체 8을 탈보호시켜 중간체 9를 형성한다. 트리플루오로아세트산 대신 다른 강산, 예를 들어 황산을 사용할 수 있다.

[0194] 도식 5



[0195]

[0196] 도식 5에서는, 중간체 9를 링커 중간체 10으로 전환시킨다. 중간체 9는 관련 기술분야, 예컨대 미국 특허 번호 8,273,862 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 기재된 바와 같이 링커 중간체 10으로 전환시킬 수 있다. 그러나 바람직하게, 도식 5에 묘사된 바와 같이, 중간체 9를 불활성 용매, 예컨대 테트라히드로푸란의 존재 하에 3급 아민 염기, 예컨대 트리에틸아민 (TEA) 및 트리메틸아세탈 클로라이드 (PivCl)와 반응시킨다. 연속해서, N-히드록시숙신이미드 (OSu)를 도입하여 링커 중간체 10을 제공한다.

[0197] 상기 본원에 기재된 링커 중간체 10을 합성하는 공정은 PCT 국제 공개 번호 WO 08/147765 및 미국 특허 번호 8,273,862에 기재된 공정에 비해 개선점을 제공하는데, 이는 상기 본원에 기재된 공정이 메틸렌 클로라이드의 사용을 피하게 해주고, 그의 사용에 따른 안전성 조치를 피하게 해주며, 링커 중간체 10을 보다 우수한 수율로 제공해주기 때문이다.

[0198] 링커 중간체 10의 합성에 이어, 링커 중간체 10을 선행 기술 분야, 예를 들어 미국 특허 번호 8,273,862에 기재되는 바와 같이 칼리케아미신 분자와 접합시킬 수 있다. 그러나 바람직하게, 링커 중간체 10을, 이로써 생성되는 칼리케아미신 유도체의 수율을 개선시켜 주는 카르보다이미드의 존재 하에 칼리케아미신과 조합한다. 사용될 수 있는 카르보다이미드의 예는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보다이미드 (EDC); N,N'-디시클로헥실 카르보다이미드 (DCC); N,N'-디이소프로필 카르보다이미드 (DIC); N-시클로헥실-N'-(2-모르폴리노에틸) 카르보다이미드; N-시클로헥실-N'-[2-(4-메틸모르폴린-4-이움-4-일)에틸] 카르보다이미드 토실레이트; N-시클로헥실-N'-[4-(디에틸메틸암모니오)시클로헥실] 카르보다이미드 토실레이트; N,N'-비스(2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-일)메틸]카르보다이미드; 및 N-벤질-N'-이소프로필카르보다이미드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0199] 링커 중간체 10과 칼리케아미신의 접합으로부터 생성되는 칼리케아미신 유도체는 모노클로날 항체 (예를 들어, 항-EFNA4 항체)와 반응시키기 앞서, 정제 및 단리할 수 있다. 정제 및 단리는 기존에 미국 특허 번호 8,273,862에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 또한, 정제는 역상 고 성능 액체 크로마토그래피 정제 프로토콜을 이용함으로써 수행될 수 있다. 10의 정제를 위한 역상 고 성능 액체 크로마토그래피 정제 프로토콜은 수성 및 유기 혼합물을 포함하는 상 (약 4 내지 약 6의 pH 범위의 상)으로 용출시키는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 55% 20 mM 소듐 아세테이트, pH 5 및 45% 아세트오니트릴로 이루어진 이동 상이 역상 고 성능 액체 크로마토그래피 정제를 위해 사용될 수 있는 수성/유기 이동 상이다. 역상 고 성능 액체 크로마토그래피 정제 프로토콜을 이용하여 정제한 다음, 고체 상 추출 프로토콜을 수행할 수 있다.

[0200] 본 발명의 다른 측면에서, 링커는 디펩티드 링커, 예컨대 발린-시트룰린 (val-cit), 페닐알라닌-리신 (phe-lys) 링커, 또는 말레이미도카프로산-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐 (vc) 링커일 수 있다. 또 다른 측면에서, 링커는 술포숙신이미드-4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트 (smcc)이다. 술포-smcc 접합은, 술포하이드릴 (티올, -SH)과 반응하는 말레이미드 기를 통하여 일어나는 반면, 그의 술포-NHS 에스테르는 1급 아민을 향하여 반응성이다 (리신 및 상기 단백질 또는 펩티드 N-말단에서 발견되는 바와 같다). 추가로, 링커는 말레이미도카프로일 (mc)일 수 있다.

[0201] 방사성 동위원소의 접합에 유용한 대표적인 링커는 디에틸렌트리아민 펜타아세테이트 (DTPA)-이소티오시아네이트, 숙신이미드 6-히드라지늄 니코티네이트 히드로클로라이드 (SHNH), 및 헥사메틸프로필렌 아민 옥심 (HMPAO)을 포함한다 ([Bakker et al. (1990) *J. Nucl. Med.* 31: 1501-1509], [Chattopadhyay et al. (2001) *Nucl. Med. Biol.* 28: 741-744], [Dewanjee et al. (1994) *J. Nucl. Med.* 35: 1054-63], [Krenning et al. (1989)



Lancet 1: 242-244], [Sagiuchi et al. (2001) *Ann. Nucl. Med.* 15: 267-270]; 미국 특허 번호6,024,938). 또 다른 한편으로, 표적화 분자를 유도체화하여, 방사성 동위원소가 그와 직접적으로 결합될 수 있도록 할 수 있다 (Yoo et al. (1997) *J. Nucl. Med.* 38: 294-300). 요오드화 방법이 또한 관련 기술분야에 공지되어 있고, 대표적인 프로토콜은, 예를 들어 문헌 ([Krenning et al. (1989) *Lancet* 1:242-244] 및 [Bakker et al. (1990) *J. Nucl. Med.* 31:1501-1509])에서 알아낼 수 있다.

[0202] II.C. 약물

[0203] 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체의 제조에 유용한 약물은 생물학적 또는 검출 가능한 활성을 갖는 모든 물질, 예를 들어 치료제, 검출 가능한 표지, 결합제 등, 및 생체 내에서 활성제로 대사되는 전구 약물을 포함한다. 약물은 또한, 약물 유도체일 수 있는데, 여기서는 약물이 본 발명의 항체와 접합될 수 있도록 기능성화되었다. 상기 개시된 방법에 따라서, 상기 약물을 이용하여 식 Ab-(L-D)의 항체-약물 접합체를 제조하는데, 여기서 (a) Ab는 EFNA4와 결합하는 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편이고, (b) L-D는 링커-약물 모이어티이며, 여기서 L은 링커이고 D는 약물이다. 항체당 접합된 약물 (D) 분자의 수를 표시하는 약물-대-항체 비 (DAR) 또는 약물 부하는 DAR 1 내지 12일 수 있다. 따라서, 본 발명의 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 1의 DAR, 2의 DAR, 3의 DAR, 4의 DAR, 5의 DAR, 6의 DAR, 7의 DAR, 8의 DAR, 9의 DAR, 10의 DAR, 11의 DAR 또는 12의 DAR을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명의 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 1개의 약물 분자, 또는 2개의 약물 분자, 또는 3개의 약물 분자, 또는 4개의 약물 분자, 또는 5개의 약물 분자, 또는 6개의 약물 분자, 또는 7개의 약물 분자, 또는 8개의 약물 분자, 또는 9개의 약물 분자, 또는 10개의 약물 분자, 또는 11개의 약물 분자, 또는 12개의 약물 분자를 포함할 수 있다. DAR은 각종의 통상적인 수단, 예컨대 UV 분광법, 질량 분광법, ELISA 검정, 방사성 측정 방법, 소수성 상호 작용 크로마토그래피 (HIC), 전기영동 및 HPLC에 의해 결정될 수 있다.

[0204] 식 Ab-(L-D)의 항체-약물 접합체 (ADC)의 조성물, 배치 및/또는 제형은 DAR 1 내지 12의, 다양한 수의 약물 분자와 접합된 복수 개의 항체를 포함할 수 있다.

[0205] 본 발명의 특별한 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 약 1 내지 약 12의 범위의 평균 DAR, 예를 들어 약 2 내지 약 4의 범위의 평균 DAR, 또는 약 3 내지 약 5의 범위의 평균 DAR, 또는 약 4 내지 약 6의 범위의 평균 DAR, 또는 약 5 내지 약 7의 범위의 평균 DAR, 또는 약 6 내지 약 8의 범위의 평균 DAR, 또는 약 7 내지 약 9의 범위의 평균 DAR, 또는 약 8 내지 약 10의 범위의 평균 DAR, 또는 약 9 내지 약 11의 범위의 평균 DAR로써 특징지을 수 있다. 일부 측면에서 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 약 1의 평균 DAR, 또는 약 2의 평균 DAR, 또는 약 3의 평균 DAR, 또는 약 4의 평균 DAR, 또는 약 5의 평균 DAR, 또는 약 6의 평균 DAR, 또는 약 7의 평균 DAR, 또는 약 8의 평균 DAR, 또는 약 9의 평균 DAR, 또는 약 10의 평균 DAR, 또는 약 11의 평균 DAR을 가질 수 있다. 전술된 평균 DAR의 범위에서 사용된 바와 같은 용어 "약"은  $\pm 0.5\%$ 를 의미한다.

[0206] 더욱이, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 평균 DAR의 바람직한 범위, 예를 들어 약 3 내지 약 5의 범위의 평균 DAR, 약 3 내지 약 4의 범위의 평균 DAR, 또는 약 4 내지 약 5의 범위의 평균 DAR로써 특징지을 수 있다. 추가로, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 평균 DAR의 바람직한 범위, 예를 들어 3 내지 5의 범위의 평균 DAR, 3 내지 4의 범위의 평균 DAR, 또는 4 내지 5의 범위의 평균 DAR로써 특징지을 수 있다.

[0207] 본 발명의 일부 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 약 3.0의 평균 DAR, 또는 3.0의 평균 DAR, 또는 3.1의 평균 DAR, 또는 3.2의 평균 DAR, 또는 3.3의 평균 DAR, 또는 3.4의 평균 DAR, 또는 3.5의 평균 DAR, 또는 3.6의 평균 DAR, 또는 3.7의 평균 DAR, 또는 3.8의 평균 DAR, 또는 3.9의 평균 DAR로써 특징지을 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 약 4.0의 평균 DAR, 또는 4.0의 평균 DAR, 또는 4.1의 평균 DAR, 또는 4.2의 평균 DAR, 또는 4.3의 평균 DAR, 또는 4.4의 평균 DAR, 또는 4.5의 평균 DAR, 또는 4.6의 평균 DAR, 또는 4.7의 평균 DAR, 또는 4.8의 평균 DAR, 또는 4.9의 평균 DAR, 또는 5.0의 평균 DAR로써 특징지을 수 있다.

[0208] 본 발명의 또 다른 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 12 이하의 평균 DAR, 11 이하의 평균 DAR, 10 이하의 평균 DAR, 9 이하의 평균 DAR, 8 이하의 평균 DAR, 7 이하의 평균 DAR, 6 이하의 평균 DAR, 5 이하의 평균 DAR, 4 이하의 평균 DAR, 3 이하의 평균 DAR, 2 이하의 평균 DAR, 또는 1 이하의 평균 DAR로써 특징지을 수 있다.

- [0209] 본 발명의 다른 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 11.5 이하의 평균 DAR, 10.5 이하의 평균 DAR, 9.5 이하의 평균 DAR, 8.5 이하의 평균 DAR, 7.5 이하의 평균 DAR, 6.5 이하의 평균 DAR, 5.5 이하의 평균 DAR, 4.5 이하의 평균 DAR, 3.5 이하의 평균 DAR, 2.5 이하의 평균 DAR, 또는 1.5 이하의 평균 DAR 로써 특징지을 수 있다.
- [0210] 식 Ab-(L-D)의 ADC의 조성물, 배치 및/또는 제형은 DAR 분포도로써 특징지을 수 있다. DAR 분포도는 ADC의 조성물, 배치 및/또는 제형에 존재할 수 있는, 각종 ADC 종의 % 또는 분획, 예를 들어 DAR 1 내지 12를 제공한다. ADC의 조성물, 배치 및/또는 제형의 DAR 분포도는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 모세관 등전점 전기영동법 (cIEF)에 의해 결정될 수 있다.
- [0211] 본 발명의 한 측면에서, 식 Ab-(L-D)의 ADC의 조성물, 배치 및/또는 제형의 DAR 분포도는, 일반적으로 DAR 1 내지 12를 갖는 광범위한 ADC 종을 함유하는, 넓은 DAR 분포도를 수반한 ADC의 고도로 이질적인 혼합물로서 특징지을 수 있다.
- [0212] 본 발명의 또 다른 측면에서, ADC의 조성물, 배치 및/또는 제형의 DAR 분포도는, 일반적으로 특별한 DAR, 예컨대 DAR 3 내지 5를 갖는 협소한 범위의 ADC 종을 함유하는, 협소한 DAR 분포도를 수반한 고도로 균질한 혼합물로서 특징지을 수 있다.
- [0213] 본 발명의 특별한 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 50% 이상 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 55% 이상 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 60% 이상 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 65% 이상 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 70% 이상 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 75% 이상 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 80% 이상 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 85% 이상 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 90% 이상 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 95% 이상 갖는 것으로써 특징지을 수 있다.
- [0214] 본 발명의 또 다른 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 50% 내지 60% 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 60% 내지 70% 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 70% 내지 80% 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 80% 내지 90% 갖거나, 또는 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 90% 내지 100% 갖는 것으로써 특징지을 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 3 내지 5의 DAR을 갖는 항체-약물 접합체를 약 50%, 또는 약 55%, 또는 약 60%, 또는 약 65%, 또는 약 70%, 또는 약 75%, 또는 약 80%, 또는 약 85%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 100% 갖는 것으로써 특징지을 수 있다.
- [0215] 예를 들어, 치료제는 암 세포 또는 활성화된 면역 세포에 대한 세포독성, 세포증식 억제제 및/또는 면역조절 효과를 발휘하는 작용제이다. 치료제의 예는 세포독성제, 화학요법제, 세포증식 억제제, 및 면역조절제를 포함한다. 화학요법제는 암을 치료하는 데 유용한 화학적 화합물이다.
- [0216] 치료제는 특정 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게서 이러한 장애를 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있는 조성물이다. 본 발명에 유용한 치료제는 항암제, 즉 EFNA4-발현성 세포, 예컨대 유방암, 예컨대 삼중 음성 유방암 (TNBC); 난소암; 결장직장암; 백혈병, 예컨대 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 간암, 예컨대 간세포 암종 (HCC); 및 폐암, 예컨대 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 소세포 폐암 (SCLC)으로부터의 암 세포에서 항암 활성을 갖는 작용제를 포함한다.
- [0217] 대표적인 치료제는 세포독소, 세포독성제, 및 세포증식 억제제를 포함한다. 세포독성 효과는 표적 세포(들)의 고갈, 제거 및/또는 사멸을 지칭한다. 세포독성제는 세포에 대하여 세포독성 및/또는 세포증식 억제 효과를 갖는 작용제를 지칭한다. 세포증식 억제 효과는 세포 증식의 억제를 지칭한다. 세포증식 억제제는 세포에 대하여 세포증식 억제 효과를 가짐으로써, 세포의 특이적 서브세트의 성장 및/또는 확장을 억제하는 작용제를 지칭한다.
- [0218] 부가의 대표적인 치료제는 방사성 동위원소, 화학요법제, 면역조절제, 항-혈관형성제, 항증식제, 아포토시스 유발제, 및 세포용해 효소 (예를 들어, RNAse)를 포함한다. 작용제는 또한, 치료용 핵산, 예컨대 면역조절제, 항-혈관형성제, 항증식제, 또는 아포토시스 유발제를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 이들 약물 기술어는 상호 독점적이지 않으므로, 치료제는 상기 언급된 용어들 중 하나 이상을 이용하여 기재될 수 있다. 예를 들어, 선택된 방사성 동위원소는 또한 세포독소이다. 치료제는 상기 중 어느 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체로서 제조될 수 있다. 일반적으로, 약물로서 방사성 동위원소를 갖는 접합체는 방사성 면역접합체로서 지칭

되고, 약물로서 화학요법제를 갖는 접합체는 화학면역접합체로서 지칭된다.

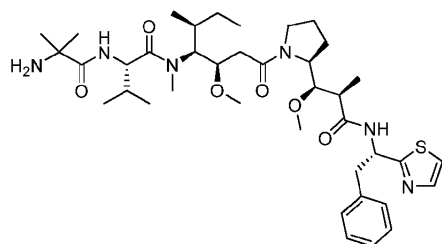
[0219] 세포독성제의 예는 안트라시클린, 아우리스타틴, CC-1065, 돌라스타틴, 두오카르마이신, 에네다인(enediynes), 젤다나마이신, 마이탄신, 푸로마이신, 탁산, 빈카 알칼로이드, SN-38, 투블리신, 헤미아스테를린, 및 그의 입체 이성체, 동배체, 유사체 또는 유도체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 식물 독소, 기타 생체 활성 단백질, 효소 (즉, ADEPT), 방사성 동위원소, 감광제 (즉, 광선 역학 요법용)를 사용할 수도 있다.

[0220] 안트라시클린은 박테리아 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)로부터 유래되고, 광범위한 암, 예컨대 백혈병, 림프종, 유방암, 자궁암, 난소암, 및 폐암을 치료하기 위해 사용되어 왔다. 예시되는 안트라시클린은 다우노루비신, 독소루비신 (즉, 아드리아마이신), 에피루비신, 이다루비신, 발루비신, 및 미톡산트론을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0221] 돌라스타틴 및 그의 펩티드성 유사체 및 유도체인 아우리스타틴은 항암 활성과 항진균 활성을 갖는 것으로 밝혀진 고도로 강력한 항유사분열제이다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,663,149 및 문헌 [Pettit et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965, (1998)] 참조). 예시되는 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 돌라스타틴 10, 아우리스타틴 E, 아우리스타틴 EB (AEB), 아우리스타틴 EFP (AEFP), MMAD (모노메틸 아우리스타틴 D 또는 모노메틸 돌라스타틴 10), MMAF (모노메틸 아우리스타틴 F 또는 N-메틸발린-발린-돌라이소루이신-돌라프로인-페닐알라닌), MMAE (모노메틸 아우리스타틴 E 또는 N-메틸발린-발린-돌라이소루이신-돌라프로인-노르에페드린), 5-벤조일발레르산-AE 에스테르 (AEVB) 및 기타 신규를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

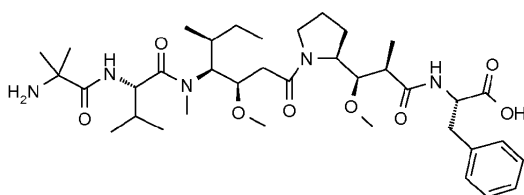
[0222] 본 발명의 일부 측면에서, PCT 국제 공개 번호 WO 2013/072813 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 기재된 아우리스타틴, 및 이들 아우리스타틴의 생성 방법이 본원에 사용된다.

[0223] 예를 들어, 다음 구조를 갖는 아우리스타틴 0101, 즉 (2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-3-메톡시-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-[(1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]아미노]프로필]피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4-yl]-N-메틸-L-발린아미드):



[0224]

[0225] 부가적으로, 다음 구조를 갖는 아우리스타틴 8261, 즉 2-메틸알라닐-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-카르복시-2-페닐에틸]아미노]-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필]피롤리딘-1-일]-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N-메틸-L-발린아미드:



[0226]

[0227] 두오카르마이신 및 CC-1065는 세포독성 효력을 지닌 DNA 알킬화제이다 (문헌 [Boger and Johnson, *PNAS* 92:3642-3649, 1995] 참조). 예시되는 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 (+)-두오카르마이신 A 및 (+)-두오카르마이신 SA, 및 (+)-CC-1065를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0228] 에네다인은 9원 또는 10원 환이거나 또는 접합된 삼중-이중-삼중 결합의 사이클릭 시스템의 존재를 특징으로 하는 특정 부류의 항-종양 박테리아 생성물이다. 예시되는 에네다인은 칼리케아미신, 에스페라미신, 및 디네미신을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 칼리케아미신은 토양 유기체 미크로모노스포라 에키노스포라 (*Micromonospora echinospora*) 아종 칼리켄시스(*calichensis*)로부터의 자연 생성물로서 최초로 단리되었던 에네다인 항생제이고 (문헌 [Zein et al. *Science* 27;240(4856):1198-1201, 1988]); 이는 이중 가닥 DNA 절단물을 생성시키고, 연속해서 표적 세포에서 아포토시스를 유도시킨다 ([Zein et al. *Science* 27;240(4856):1198-

1201, 1988]; [Nicolaou et al. Chem. Biol. Sep;1(1):57-66, 1994]; [Prokop et al. Oncogene 22:9107-9120, 2003]).

- [0229] 본 발명의 일부 측면에서, 세포독성제는 항생제, 예컨대 칼리케아미신 (LL-E33288 복합체로 불리우기도 함), 예를 들어  $\beta$ -칼리케아미신,  $\gamma$ -칼리케아미신 또는 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 (감마-칼리케아미신 ( $\gamma_1$ ))이다. 본 발명에 사용하기 적합한 칼리케아미신의 예는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,671,958 4,970,198, 5,053,394, 5,037,651, 5,079,233 및 5,108,912 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 개시되어 있다. 이들 화합물은 칼리케아미신을 항- $\text{EFNA4}$  항체와 접합시키는 데 유용한 작용기, 예컨대 히드라지드 또는 기타 작용기를 도입함과 동시에, 디설피드를 형성하기 위해 적당한 티올과 반응할 수 있는 메틸트리설피드를 함유한다. 칼리케아미신의 디설피드 유사체, 예를 들어 미국 특허 번호 5,606,040 및 5,770,710 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 기재된 유사체를 사용할 수도 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 이러한 디설피드 유사체는 N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라지드 ("CM"으로 후술됨)이다.
- [0230] 젤다나마이신은 Hsp90 (열 쇼크 단백질 90)과 결합하고 항종양 약물로 사용되어 온 벤조퀴논 안사마이신 항생제이다. 예시되는 젤다나마이신은 17-AAG (17-N-알릴아미노-17-데메톡시젤다나마이신) 및 17-DMAG (17-디메틸아미노에틸아미노-17-데메톡시젤다나마이신)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0231] 마이탄신 또는 그의 유도체 마이탄시노이드는 투블린의 중합 억제를 통하여 유사분열 동안 미세소관 형성을 억제함으로써 세포 증식을 억제한다 ([Remillard et al., Science 189:1002-1005, 1975] 참조). 예시되는 마이탄신 및 마이탄시노이드는 메르탄신 (DM1) 및 그의 유도체 뿐만 아니라 안사미토신을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0232] 탁산은 항투블린제 또는 유사분열 억제제로서 작용하는 디테르펜이다. 예시되는 탁산은 파클리탁셀 (예를 들어, TAXOL®) 및 도세탁셀 (TAXOTERE®)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0233] 빈카 알칼로이드가 또한 항투블린제이다. 예시되는 빈카 알칼로이드는 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 및 비노렐빈을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0234] 본 발명의 일부 측면에서, 작용제는 면역조정제이다. 면역조정제의 예는 간시클로비에르, 에타네르셉트, 타크롤리무스, 시클리무스, 보클로스포린, 시클로스포린, 라파마이신, 시클로포스파미드, 아자티오프린, 미코페놀게이트 모페틸, 메토크렉트레이트, 글루코코르티코이드 및 그의 유사체, 시토카인, 크산틴, 줄기 세포 성장 인자, 림프톡신, 종양 괴사 인자 (TNF), 조혈 인자, 인터루킨 (예를 들어, 인터루킨-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, 및 IL-21), 집락 자극 인자 (예를 들어, 과립구-집락 자극 인자 (G-CSF) 및 과립구 대식세포-집락 자극 인자 (GM-CSF)), 인터페론 (예를 들어, 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$  및 - $\gamma$ ), "S 1 인자"로 명명된 줄기 세포 성장 인자, 에리트로포이에틴 및 트롬보포이에틴, 또는 그의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0235] 본 발명에 유용한 면역조정제는 또한, 종양에 대한 호르몬 작용을 차단시키는 항호르몬제, 및 시토카인 생성을 억제하거나, 자기 항원 발현을 하향 조절하거나 또는 MHC 항원을 차폐시키는 면역억제제를 포함한다. 대표적인 항호르몬제는 항에스트로겐제, 예를 들어 타목시펜, 팔록시펜, 아로마타제 억제제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나폰스톤, 및 토레미펜; 및 항안드로겐제, 예컨대 플루타미드, nil루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 항부신제를 포함한다. 대표적인 면역억제제는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘, 아자티오프린, 시클로포스파미드, 브로모크립틴, 다나졸, 답손, 글루타르알데히드, MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-개체특이형(idiotypic) 항체, 시클로스포린 A, 스테로이드, 예컨대 글루코코르티코스테로이드, 시토카인 또는 시토카인 수용체 길항제 (예를 들어, 항-인터페론 항체, 항-IL10 항체, 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL2 항체), 스트렙토키나제, TGF  $\beta$ , 라파마이신, T-세포 수용체, T-세포 수용체 단편, 및 T 세포 수용체 항체를 포함한다.
- [0236] 본 발명의 일부 측면에서, 약물은 독소, 호르몬, 효소, 및 성장 인자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 치료용 단백질이다.
- [0237] 독소 단백질 (또는 폴리펩티드)의 예는 디프테리아 (예를 들어, 디프테리아 A 쇄), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 외독소 및 내독소, 리신 (예를 들어, 리신 A 쇄), 아브린 (예를 들어, 아브린 A 쇄), 모데신 (예를 들어, 모데신 A 쇄), 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 리보뉴클레아제 (RNase), DNase I, 스태필로코쿠스성 (*Staphylococcal*) 장독소-A, 역새폴 항바이러스 단백질, 겔로닌, 디프테린 독소, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아



(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*sapaonaria officinalis*) 억제제, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 트리코테센, 억제제 시스템 크롭(knot) (ICK) 펩티드 (예를 들어, 세라토독신), 및 코노톡신 (예를 들어, KIIIA 또는 SmIIa)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0238] 호르몬의 예는 에스트로겐, 안드로겐, 프로게스틴 및 코르티코스테로이드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0239] 본 발명의 일부 측면에서, 세포독성제는 리포솜 또는 생체적합성 중합체를 이용하여 만들 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 항-EFNA4 항체는 생체적합성 중합체와 접합하여, 혈청 반감기 및 생체 활성을 증가시킬 수 있고 /있거나 생체내 반감기를 연장시킬 수 있다. 생체적합성 중합체의 예는 수용성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 그의 유도체, 및 양성이온(zwitterion)-함유 생체적합성 중합체 (예를 들어, 포스포릴콜린 함유 중합체)를 포함한다.

[0240] 본 발명의 일부 측면에서, 약물은 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

[0241] 본 발명에 유용한 부가의 약물은 혈관 형성을 억제하는 항-혈관형성제, 예를 들어 파르네실트랜스페라제 억제제, COX-2 억제제, VEGF 억제제, bFGF 억제제, 스테로이드 술파타제 억제제 (예를 들어, 2-메톡시에스트라디올 비스-술파메이트 (2-MeOE2bisMATE)), 인터루킨-24, 트롬보스폰딘, 메탈로스폰딘 단백질, 부류 I 인터페론, 인터루킨 12, 프로타민, 안지오스타틴, 라미닌, 엔도스타틴, 및 프로락틴 단백을 포함한다.

[0242] 항증식제 및 아폽토시스 유발제는 PPAR-감마의 활성화제 (예를 들어, 시클로펜테논 프로스타글란딘 (cyPG)), 레티노이드, 트리테르페노이드 (예를 들어, 시클로아르탄, 루판, 우르산, 올레아난, 프리에텔란, 담마란, 쿠쿠르비타신, 및 리모노이드 트리테르페노이드), EGF 수용체의 억제제 (예를 들어, HER4), 램파마이신, CALCITRIOL® (1,25-디히드록시콜레칼시페롤 (비타민 D)), 아로마타제 억제제 (FEMARA® (레토로존)), 텔로메라제 억제제, 칠킬레이트제 (예를 들어, 3-아미노피리딘-2-카르복살데히드 티오세미카르바존 (트리아핀)), 아폽틴 (치킨 빈혈 바이러스로부터의 바이러스 단백질 3 - VP3), Bcl-2 및 Bcl-X(L)의 억제제, TNF-알파, FAS 리간드, TNF-관련 아폽토시스-유도성 리간드 (TRAIL/Apo2L), TNF-알파/FAS 리간드/TNF-관련 아폽토시스-유도성 리간드 (TRAIL/Apo2L) 신호 전달의 활성화제, 및 PI3K-Akt 생존 경로 신호 전달의 억제제 (예를 들어, UCN-01 및 젤다나마이신)를 포함한다.

[0243] 대표적인 화학요법제는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술포, 임프로술포 및 피포술포; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, 독소루비신, 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사제, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데놈테린, 메토트렉세이트, 프테로테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2''-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈테신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 (Ara-C); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 [TAXOL®; 브리스톨-마이어 스킵 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology; 미국 뉴저지주 프린스턴)] 및 독세탁셀 [TAXOTERE®; 론-포울렌 로러 (Rhone-Poulenc Rorer;



프랑스 안토니)); 클로람부실; 젠시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미놉테린; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소메라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 및 카페시타빈을 포함한다.

[0244] 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 부가의 치료제는 광선 역학 요법을 위한 감광제 [예컨대, 미국 공개 번호 20020197262 및 미국 특허 번호 5,952,329 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)]; 화학요법을 위한 자기 입자 [예컨대, 미국 공개 번호 20030032995 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)]; 결합제, 예컨대 펩티드, 리간드, 세포 부착 리간드 등, 및 전구 약물, 예컨대 보다 활성인 세포독성 유리 약물로 전환될 수 있는, 포스페이트 함유 전구 약물, 티오포스페이트 함유 전구 약물, 술페이트 함유 전구 약물, 펩티드 함유 전구 약물,  $\beta$ -락탐 함유 전구 약물, 치환된 페녹시아세트아미드 함유 전구 약물 또는 치환된 페닐아세트아미드 함유 전구 약물, 5-플루오로시토신 및 기타 5-플루오로우리딘 전구 약물을 포함한다.

[0245] 항-EFNA4 항체를 이용하는 진단 방법의 경우, 약물은 시험관내 또는 생체 내에서 EFNA4-발현성 세포의 존재를 검출하기 위해 사용되는 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 생체 내에서 검출 가능한 방사성 동위원소, 예컨대 섬광조영술, 자기 공명 영상화, 또는 초음파를 이용하여 검출 가능한 표지를 임상 진단 적용에 사용할 수 있다. 유용한 섬광조영술 표지는 양전자 방출핵 및  $\gamma$ -방출핵을 포함한다. 자기 원시 영상화를 위한 대표적인 조영제는 상자성 또는 초상자성 이온 (예를 들어, 철, 구리, 망간, 크롬, 에르븀, 에우로퓸, 디스프로슘, 홀름 및 가돌리늄), 산화철 입자, 및 수용성 조영제이다. 초음파 검출하는 경우에는, 기체 또는 액체를 다공성 무기 입자 내에 봉입시킬 수 있는데, 이는 미세거품 조영제로서 방출된다. 시험관내 검출하는 경우, 유용한 검출 가능한 표지는 형광단, 검출 가능한 에피토프 또는 결합제, 및 방사성 표지를 포함한다.

[0246] 따라서, 본 발명의 일부 측면에서, 약물은 조영제 [예를 들어, 형광단 또는 PET (양전자 방출 단층촬영술) 표지, SPECT (단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영술) 표지], 또는 MRI (자기 공명 영상화) 표지이다.

[0247] 본원에서 사용된 경우의 용어 "표지"는 "표지된" 항체를 생성하도록 항체와 직접 또는 간접적으로 접합되는 검출 가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 그 자체가 검출 가능할 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광성 표지), 또는 효소 표지의 경우에는, 검출 가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다. 검출 가능한 표지로서 제공될 수 있는 방사성핵종은, 예를 들어 I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, 및 Pd-109를 포함한다. 표지는 또한, 검출 가능하지 않은 실체, 예컨대 독소일 수도 있다.

[0248] 형광단의 예는 플루오레스세인 이소티오시아네이트 (FITC) (예를 들어, 5-FITC), 플루오레스세인 아미다이트 (FAM) (예를 들어, 5-FAM), 에오신, 카르복시플루오레스세인, 에리트로신, 알렉사 플루오르® (Alexa Fluor®) (예를 들어, 알렉사 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700, 또는 750), 카르복시테트라메틸로다민 (TAMRA) (예를 들어, 5-TAMRA), 테트라메틸로다민 (TMR), 및 술포로다민 (SR) (예를 들어, SR101)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0249] 치료 또는 진단용 방사성 동위원소 또는 기타 표지 (예를 들어, PET 또는 SPECT 표지)를 본원에 기재된 바와 같은 항-EFNA4 항체와 접합하기 위한 작용제에 혼입시킬 수 있다. 동위원소는, 예를 들어 항체에 존재하는 시스테인 잔기에서 항체와 직접적으로 결합될 수 있거나, 또는 킬레이트제를 이용하여 항체와 방사성 동위원소의 결합을 매개할 수 있다. 방사선 요법에 적합한 방사성 동위원소는  $\alpha$ -방출핵,  $\beta$ -방출핵, 및 오제(auger) 전자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 진단 적용하는 경우, 유용한 방사성 동위원소는 양전자 방출핵 및  $\gamma$ -방출핵을 포함한다. 본 발명의 항-EFNA4 항체는, 예를 들어 항체의 티로신 잔기 상에서 추가로 요오드화되어, 이러한 항체의 검출 또는 치료 효과를 촉진시킬 수 있다.

[0250] 방사성 동위원소 또는 기타 표지의 예는  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{95}\text{Ru}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{103}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{105}\text{Ru}$ ,  $^{107}\text{Hg}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{121}\text{Te}$ ,  $^{122}\text{Te}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{125}\text{Te}$ ,  $^{126}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{133}\text{I}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{153}\text{Pb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{165}\text{Tm}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{H}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{168}\text{Tm}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{189}\text{Re}$ ,  $^{197}\text{Pt}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{203}\text{Hg}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ac}$ , 및  $^{225}\text{Ac}$ 을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0251] II.D. EFNA4 항체-약물 접합체의 제조 방법
- [0252] 또한, 본 발명의 항체-약물 접합체의 제조 방법이 제공된다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 EFNA4 항체-약물 접합체의 생성 방법은 (a) 링커를 약물 모이어티와 연결하는 단계; (b) 이러한 링커-약물 모이어티를 항체와 접합시키는 단계; 및 (c) 항체-약물 접합체를 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0253] 한 예에서, 식 Ab(L-D)의 항체-약물 접합체는 (a) 링커-약물 모이어티 (예를 들어, AcBut-CM)를 항-EFNA4 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편에 부가하는 단계 (여기서, 항체의 농도는 1 내지 25 mg/ml의 범위일 수 있고, 링커-약물 모이어티는 항-EFNA4 항체 1에 대하여 약 1 내지 15 범위의 몰비로 존재한다); (b) 상기 링커-약물 모이어티와 항-EFNA4 항체를, 약 7 내지 9의 범위의 pH를 갖는 비-친핵성의 단백질-화합성 완충 용액에서 인큐베이션하여 단량체성 항체-약물 접합체를 생성시키는 단계 (여기서, 상기 용액은 (i) 적합한 유기 조용매, 및 (ii) 하나 이상의 C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> 카르복실산 또는 그의 염을 갖는 부가제를 추가로 포함하고, 인큐베이션은 약 1분 내지 약 24시간의 범위의 기간 동안 약 0℃ 내지 약 45℃의 범위의 온도 하에 수행된다); 및 (c) 단계 (b)에서 생성된 접합체를 대상으로 하여 크로마토그래피 분리 공정을 수행하여, 1 내지 12의 DAR을 갖고; 접합되지 않은 항-EFNA4 항체, 링커-약물 모이어티, 및 응집된 접합체로부터 10% 미만의 낮은 접합 분획 (LCF)을 제공하는 항체-약물 접합체를 분리시키는 단계에 의해 제조될 수 있다.
- [0254] 본 발명의 일부 측면에서, 링커-약물 모이어티를 항-EFNA4 항체에 부가하는데, 여기서 이러한 항체는 약 .01 내지 약 1 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 1 내지 약 2 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 2 내지 약 3 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 3 내지 약 4 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 4 내지 약 5 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 5 내지 약 6 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 6 내지 약 7 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 7 내지 약 8 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 8 내지 약 9 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 9 내지 약 10 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 10 내지 약 11 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 11 내지 약 12 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 12 내지 약 13 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 13 내지 약 14 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 14 내지 약 15 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 15 내지 약 16 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 16 내지 약 17 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 17 내지 약 18 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 18 내지 약 19 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 19 내지 약 20 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 20 내지 약 21 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 21 내지 약 22 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 22 내지 약 23 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 23 내지 약 24 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 24 내지 약 25 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 10 mg/ml의 농도를 갖거나, 또는 상기 항체는 약 10 mg/ml 미만의 농도를 갖는다. 항체의 전술된 범위에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 +/- 0.5 mg/ml를 의미한다.
- [0255] 본 발명의 일부 측면에서, 링커-약물 모이어티를 항-EFNA4 항체에 부가하는데, 여기서 링커-약물 모이어티 대 항-EFNA4 항체는 2 내지 3 대 1의 몰 비, 또는 3 내지 4 대 1의 몰 비, 또는 4 내지 5 대 1의 몰 비, 또는 5 내지 6 대 1의 몰 비, 또는 6 내지 7 대 1의 몰 비, 또는 7 내지 8 대 1의 몰 비, 또는 8 내지 9 대 1의 몰 비, 또는 9 내지 10 대 1의 몰 비, 또는 10 내지 11 대 1의 몰 비, 또는 11 내지 12 대 1의 몰 비, 또는 12 내지 13 대 1의 몰 비, 또는 13 내지 14 대 1의 몰 비, 또는 14 내지 15 대 1의 몰 비이다. 본 발명의 일부 측면에서, 링커-약물 모이어티는 약 4 내지 4.5 대 1의 몰 비로 항-EFNA4 항체에 부가함으로써, 바람직하지 못한 보다 높은 DAR 항체-약물 접합체를 감소시킨다. 예를 들어, 링커-약물 모이어티는 4 내지 4.5 대 1의 몰비로 항-EFNA4 항체에 부가한다. 링커-약물 모이어티 대 항체의 기타 범위를 또한 이용하여, 접합되지 않은 항체, 낮은 DAR 및 높은 DAR 항체-약물 접합체를 감소시킬 수 있다.
- [0256] 본 발명의 일부 측면에서, 링커-약물 모이어티를 항-EFNA4 항체에 부가하는데, 여기서 약물은 항-EFNA4 항체의 약 2 중량% 내지 약 3 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 약 3 중량% 내지 약 4 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 약 4 중량% 내지 약 5 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 약 5 중량% 내지 약 6 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 약 6 중량% 내지 약 7 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 약 7 중량% 내지 약 8 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 약 8 중량% 내지 약 9 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 약 9 중량% 내지 약 10 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 약 10 중량% 내지 약 11 중량%이다. 링커-약물 모이어티 대 항체의 전술된 범위 (5 중량 기준)에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 +/- 0.5%를 의미한다.

- [0257] 본 발명의 일부 측면에서, 링커-약물 모이어티를 항-EFNA4 항체에 부가하는데, 여기서 약물은 항-EFNA4 항체의 2 중량% 내지 3 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 3 중량% 내지 4 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 4 중량% 내지 5 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 5 중량% 내지 6 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 6 중량% 내지 7 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 7 중량% 내지 8 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 8 중량% 내지 9 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 9 중량% 내지 10 중량%이거나, 또는 약물은 항-EFNA4 항체의 10 중량% 내지 11 중량%이다.
- [0258] 본 발명의 일부 측면에서, 상기 단계 (b)(ii)에 기재된 인큐베이션은 약 0℃ 내지 약 5℃ 범위의 온도, 또는 약 0℃ 내지 약 4℃ 범위의 온도, 또는 약 5℃ 내지 약 10℃ 범위의 온도, 또는 약 10℃ 내지 약 15℃ 범위의 온도, 또는 약 15℃ 내지 약 20℃ 범위의 온도, 또는 약 20℃ 내지 약 25℃ 범위의 온도, 또는 약 25℃ 내지 약 30℃ 범위의 온도, 또는 약 30℃ 내지 약 35℃ 범위의 온도, 또는 약 35℃ 내지 약 40℃ 범위의 온도, 또는 약 40℃ 내지 약 45℃ 범위의 온도에서 수행된다. 전술된 온도 범위에 사용된 바와 같은 용어 "약"은  $\pm 1^\circ\text{C}$ 를 의미한다.
- [0259] 본 발명의 일부 측면에서, 상기 단계 (b)(ii)에 기재된 인큐베이션은 접합 반응을 약 50% 이상 완료, 예를 들어 약 60% 이상 완료, 약 70% 이상 완료, 약 80% 이상 완료, 약 90% 이상 완료, 약 95% 이상 완료, 또는 약 99% 이상 완료하는 데 충분한 시간 동안 진행될 수 있다. 따라서, 상기 반응은 적어도 약 1분 내지 약 5분 동안 진행될 수 있다. 접합체의 응집이 허용되는 수준으로 유지되는 한은 보다 긴 시간에 또한 허용될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 상기 반응은 대개 약 1분 정도로서 완료되는데, 짧은 기간이 선행 방법에 비해 개선점이다.
- [0260] 본 발명의 일부 측면에서, 상기 단계 (c)에서, 상기 단계 (b)의 항체-약물 접합체를 대상으로 하여 크로마토그래피 분리 공정을 수행하여, 약 1 내지 약 12의 범위의 평균 DAR, 예를 들어 약 2 내지 약 4의 범위의 평균 DAR, 또는 약 3 내지 약 5의 범위의 평균 DAR, 또는 약 4 내지 약 6의 범위의 평균 DAR, 또는 약 5 내지 약 7의 범위의 평균 DAR, 또는 약 6 내지 약 8의 범위의 평균 DAR, 또는 약 7 내지 약 9의 범위의 평균 DAR, 또는 약 8 내지 약 10의 범위의 평균 DAR, 또는 약 9 내지 약 11의 범위의 평균 DAR을 갖는 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형을 선택한다. 일부 측면에서 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 약 1의 평균 DAR, 또는 약 2의 평균 DAR, 또는 약 3의 평균 DAR, 또는 약 4의 평균 DAR, 또는 약 5의 평균 DAR, 또는 약 6의 평균 DAR, 또는 약 7의 평균 DAR, 또는 약 8의 평균 DAR, 또는 약 9의 평균 DAR, 또는 약 10의 평균 DAR, 또는 약 11의 평균 DAR을 가질 수 있다. 평균 DAR의 전술된 범위에 사용된 바와 같은 용어 "약"은  $\pm 0.5\%$ 를 의미한다.
- [0261] 일부 측면에서 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 약 3 내지 약 5의 범위의 평균 DAR, 약 3 내지 약 4의 범위의 평균 DAR, 또는 약 4 내지 약 5의 범위의 평균 DAR을 가질 수 있다.
- [0262] 일부 측면에서 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 3 내지 5의 범위의 평균 DAR, 또는 3 내지 4의 범위의 평균 DAR, 또는 4 내지 5의 범위의 평균 DAR을 가질 수 있다.
- [0263] 일부 측면에서, 항체-약물 접합체는 약 3.0의 평균 DAR, 또는 3.0의 평균 DAR, 또는 3.1의 평균 DAR, 또는 3.2의 평균 DAR, 또는 3.3의 평균 DAR, 또는 3.4의 평균 DAR, 또는 3.5의 평균 DAR, 또는 3.6의 평균 DAR, 또는 3.7의 평균 DAR, 또는 3.8의 평균 DAR, 또는 3.9의 평균 DAR을 갖는다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 약 4.0의 평균 DAR, 또는 4.0의 평균 DAR, 또는 4의 평균 DAR, 또는 4.1의 평균 DAR, 또는 4.2의 평균 DAR, 또는 4.3의 평균 DAR, 또는 4.4의 평균 DAR, 또는 4.5의 평균 DAR, 또는 4.6의 평균 DAR, 또는 4.7의 평균 DAR, 또는 4.8의 평균 DAR, 또는 4.9의 평균 DAR, 또는 5.0의 평균 DAR로써 특징지을 수 있다.
- [0264] 본 발명의 또 다른 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 12 이하의 평균 DAR, 11 이하의 평균 DAR, 10 이하의 평균 DAR, 9 이하의 평균 DAR, 8 이하의 평균 DAR, 7 이하의 평균 DAR, 6 이하의 평균 DAR, 5 이하의 평균 DAR, 4 이하의 평균 DAR, 3 이하의 평균 DAR, 2 이하의 평균 DAR, 또는 1 이하의 평균 DAR로써 특징지을 수 있다.
- [0265] 본 발명의 다른 측면에서, 항체-약물 접합체의 조성물, 배치 및/또는 제형은 11.5 이하의 평균 DAR, 10.5 이하의 평균 DAR, 9.5 이하의 평균 DAR, 8.5 이하의 평균 DAR, 7.5 이하의 평균 DAR, 6.5 이하의 평균 DAR, 5.5 이하의 평균 DAR, 4.5 이하의 평균 DAR, 3.5 이하의 평균 DAR, 2.5 이하의 평균 DAR, 또는 1.5 이하의 평균 DAR로써 특징지을 수 있다.

- [0266] 본 발명의 일부 측면에서, 상기 단계 (c)에서, 상기 단계 (b)의 항체-약물 접합체를 대상으로 하여 크로마토그래피 분리 공정을 수행하여, 약 2 중량% 내지 약 10 중량%의 범위의 약물이 부하된, 예를 들어 약 2 중량% 내지 약 4 중량%의 범위의 약물이 부하되거나, 또는 약 3 중량% 내지 약 5 중량%의 범위의 약물이 부하되거나, 또는 약 4 중량% 내지 약 6 중량%의 범위의 약물이 부하되거나, 또는 약 5 중량% 내지 약 7 중량%의 범위의 약물이 부하되거나, 또는 약 6 중량% 내지 약 8 중량%의 범위의 약물이 부하되거나, 또는 약 7 중량% 내지 약 9 중량%의 범위의 약물이 부하되거나, 또는 약 8 중량% 내지 약 10 중량%의 범위의 약물이 부하된 항체-약물 접합체를 선택한다. 약물 부하의 전술된 범위에 사용된 바와 같은 용어 "약"은  $\pm 0.5\%$ 를 의미한다.
- [0267] 본 발명의 일부 측면에서, 상기 단계 (c)에서, 상기 단계 (b)의 항체-약물 접합체를 대상으로 하여 크로마토그래피 분리 공정을 수행하여, 약 10% 미만, 예를 들어 10% 미만, 또는 약 9% 미만, 또는 9% 미만, 또는 약 8% 미만, 또는 8% 미만, 또는 약 7% 미만, 또는 7% 미만, 또는 약 6% 미만, 또는 6% 미만, 또는 약 5% 미만, 또는 5% 미만, 또는 약 4% 미만, 또는 4% 미만, 또는 약 3% 미만, 또는 3% 미만, 또는 약 2% 미만, 또는 2% 미만, 또는 약 1% 미만, 또는 1% 미만, 또는 0%의 낮은 접합 분획 (LCF)을 갖는 항체-약물 접합체를 선택한다. 본 발명의 일부 측면에서, 0% 이상이지만, 10% 미만인 LCF가 바람직한 것으로 고려된다. LCF의 전술된 설명에서, 용어 "약"은 표시된 비율 (%)의  $\pm 0.5\%$ 를 의미한다. 본 발명의 일부 측면에서, 높은 진동과 강력한 혼합은, 예를 들어 링커-약물 모이어티를 혼합 와동의 중간 부분 내로 부가함으로써 부분적으로 달성되는 바와 같이, 상기 링커-약물 모이어티의 부가 동안 수행되는데, 이는 낮은 비접합 분획을 달성하는 데 도움이 되는, 선행 방법에 비해 개선된 것이다.
- [0268] 본 발명의 맥락에서, 단량체성 항체-약물 접합체는 항체를 상당히 응집시키지 않고서도 어떠한 수의 약물 분자와도 연결되거나 또는 접합되는 단일 항체를 지칭한다. 접합되지 않거나 또는 상당히 하향 접합된 항체를 갖는 소정의 집단 내에서의 항체의 비율 (%)이 낮은 접합 분획 (LCF)으로서 지칭된다. 접합체의 단량체성 형태는 응집된 형태와 달리, 상당한 치료적 가치를 지니고 있고; LCF를 최소화하고 응집을 실질적으로 저하시키면, 이러한 LCF가 보다 고도로 접합된 분획 (HCF)과 경쟁하지 못하게 함으로써 항체 출발 물질을 치료상 의미있는 방식으로 활용할 수 있다.
- [0269] 칼리케아미신을 포함한 많은 약물의 소수성 성질로 인해, 항체-약물 접합체의 응집이 초래될 수 있다. 보다 높은 약물 접합 (저하된 LCF)과 감소된 응집을 수반하는 단량체성 항체-약물 접합체를 생성하기 위하여, 접합 반응을 (i) 조용매로서의 에탄올 및 (ii) 하나 이상의  $C_6-C_{18}$  카르복실산 또는 그의 염을 갖는 부가제를 함유하는 비-친핵성의 단백질-화합성 완충 용액에서 수행할 수 있다. 기타 단백질-화합성 유기 조용매, 예컨대 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, DMF 및 DMSO를 사용할 수도 있다. 유기 조용매 중 일부 또는 전부를 이용하여, 약물을 접합 혼합물 내로 전이시킨다. 유용한  $C_6-C_{18}$  카르복실산은 테칸산, 옥탄산 또는 카프릴산, 또는 그의 염을 포함한다. 본 발명의 한 측면에서, 카르복실산은 테칸산, 또는 상응하는 염, 예컨대 소듐 데카노에이트이다. 하나 이상의  $C_6-C_{18}$  카르복실산 또는 그의 염을 갖는 부가제의 대표적인 양은 20 mM 내지 100 mM, 예컨대 30 mM 내지 90 mM, 또는 약 40 mM 내지 80 mM, 또는 약 40 mM 내지 50 mM의 범위이다.  $C_6-C_{18}$  카르복실산 또는 그의 염의 농도는 150 내지 300 mM로 증가시킬 수 있고 조용매는 1% 내지 10%로 떨어뜨렸다. N-히드록시숙신이미드 (OSu) 에스테르 또는 기타 동등하게 활성화된 에스테르를 이용하여 항체-약물 접합체를 제조하는 데 유용한 완충제는 인산염 완충 식염수 (PBS) 및 N-2-히드록시에틸 피페라진-N'-2-에탄술포산 (HEPES 완충제)을 포함한다. 접합 반응에 사용된 완충 용액은 유리 아민 및 친핵체가 실질적으로 결여되어야 한다. 또 다른 접근 방식으로서, 접합 반응은 부가의 부가제를 수반하지 않고 t-부탄올을 함유하는 비-친핵성의 단백질-화합성 완충 용액에서 수행될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,712,374 및 5,714,586 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다) 참조). 접합을 위한 부가의 방법, 및 칼리케아미신-함유 접합체는 미국 특허 번호 5,739,116 및 5,877,296 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 기재되어 있다.
- [0270] 접합체를 형성하기 위한 최적의 반응 조건은 반응 변수, 예컨대 온도, pH, 링커-칼리케아미신 모이어티 유입량, 및 부가제 농도를 변화시킴으로써 실험적으로 결정할 수 있다. 다른 약물을 접합하는 데 적합한 조건은 과도한 실험없이도 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정할 수 있다.
- [0271] 항체-약물 접합체를 제조하는 다른 방법이 각종 공보에 보고되었다. 예를 들어, 접합 반응이 발생하도록 쇠간 디설피드 결합을 환원시킴으로써 활성화된 시스테인 술프히드릴 기를 통하여 또는 리신 측쇄 아민을 통하여 항체에서 화학적 변형이 이루어질 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Tanaka et al., FEBS Letters 579:2092-2096, 2005] 및 [Gentle et al., Bioconjugate Chem. 15:658-663, 2004] 참조). 한정된 화학량론을 이용한 특이적



약물 접합을 위하여 항체의 특이적 부위에서 조작된 반응성 시스템 잔기가 또한 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Junutula et al., Nature Biotechnology, 26:925-932, 2008] 참조). 트랜스글루타미나제 및 아민 (예를 들어, 반응성 아민을 갖거나 또는 이에 부착된 세포독성제)의 존재 하에 폴리펩티드 조작함으로써 반응성으로 만든 (즉, 아실 공여자로서 공유 결합을 형성할 수 있는 능력) 아실 공여자 글루타민 함유 태그 또는 내인성 글루타민을 이용한 접합이 또한, PCT 국제 공개 번호 WO 2012/059882에 기재되어 있다.

[0272] 항체-약물 접합체당 약물 분자의 수를 추가로 증가시키기 위하여, 약물을 직쇄 또는 분지된 폴리에틸렌 글리콜 중합체 및 단량체를 포함한 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 접합시킬 수 있다. PEG 단량체는 다음 식이다:  $-(CH_2CH_2O)-$ . 약물 및/또는 펩티드 유사체를 직접 또는 간접적으로, 즉 적당한 스페이서 기, 예컨대 당을 통하여 PEG와 결합시킬 수 있다. PEG-항체-약물 조성물은 또한, 약물 안정성을 촉진시켜 주고 생체내 표적 부위로 전달해주는 부가의 친지성 및/또는 친수성 모이어티를 포함할 수 있다. PEG 함유 조성물을 제조하기 위한 대표적인 방법은 특허, 미국 특허 번호 6,461,603; 6,309,633; 및 5,648,095에서 알아낼 수 있다.

[0273] 예를 들어, 항체-칼리케아미신 접합체 내에서의 칼리케아미신의 양을 증가시키기 위하여, 항체를 칼리케아미신과 접합시키기 이전에, 예를 들어 PEG-SPA, PEG-SBA, 또는 PEG-비스-말레이미드를 이용하여 PEG와 접합시킨다. PEG를 이용하여 제조된 항체-약물 접합체는 표적 항원에 대하여 저하된 결합 친화성을 나타낼 수 있지만, 증가된 약물 부하에 따른 결과로서 여전히 효과적이다.

[0274] 접합, 상기 단계 (c)의 크로마토그래피 분리 후, 접합체를 통상적인 방법에 의해 접합되지 않은 반응물 및/또는 응집된 형태의 접합체로부터 분리시킬 수 있다. 이는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 한외여과/정용여과, 이온 교환 크로마토그래피 (IEC), 크로마토분획 (CF) HPLC, FPLC, 또는 세파크릴 S-200 크로마토그래피와 같은 과정을 포함할 수 있다. 크로마토그래피 분리는 또한, (1) LCF 함량 뿐만 아니라 응집체를 효율적으로 감소시킬 수 있는 능력; (2) 큰 반응 용적의 수용; 및 (3) 생성물의 최소 회색을 포함한, SEC에 비해 일부 이점을 제공하는 소수성 상호 작용 크로마토그래피 (HIC)에 의해 달성될 수 있다. 적합한 HIC 매질은 페닐 세파로스 6 신속 유동 크로마토그래피 매질, 부틸 세파로스 4 신속 유동 크로마토그래피 매질, 옥틸 세파로스 4 신속 유동 크로마토그래피 매질, 도요퍼얼(Toyopearl) 에테르-650M 크로마토그래피 매질, 매크로-프렘(Macro-Prep) 메틸 HIC 매질 또는 매크로-프렘 t-부틸 HIC 매질을 포함한다.

[0275] 본 발명의 일부 측면에서, 크로마토그래피 분리는 부틸 세파로스 4 신속 유동 크로마토그래피 매질을 이용하여 수행된다. 실시예 6에 기재된 바와 같은 맞춤형 구배를 이용하는 경우에는, 칼럼과 여전히 결합되어 있는 보다 높은 DAR 종을 제거하는데, 이것이 선행 방법에 비해 개선된 것이다.

[0276] 일부 측면에서 정제 공정은 원심분리기 세포 제거 단계, 임의로 단백질 A 친화 포획 단계에 이은 하나 또는 둘의 직교 크로마토그래피 연마 단계, 바이러스 여과 단계, 및 접선 유동 여과 단계 (농축 및 제제화하기 위함)를 포함할 수 있다.

[0277] 전형적인 항-EFNA4-ActBut-CM 항체-약물 접합체 제제는 항체 1 몰당 CM 3 내지 5몰, 예를 들어 항체 1 몰당 CM 3 내지 4몰, 또는 항체 1 몰당 CM 4 내지 5몰을 함유하는, 대부분 (약 95%) 접합된 항체를 함유한다. 생체내 연구에서, 이러한 약물 부하에 대한 몰 범위를 이용하여 제조된 EFNA4 항체-약물 접합체는 최소 독성을 나타내면서 고도로 효능이 있다.

[0278] EFNA4-ActBut-CM 항체-약물 접합체는 실험실 규모로 재현 가능하게 제조되었다 (10 내지 200 mg). pg CM/mg 모노클로날 항체로서 표현되는 DAR 또는 약물 부하는 CM 농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )를 항체 농도 (mg/mL)로 나눔으로써 결정된다. 이들 값은 280 nm (항체) 및 310 nm (칼리케아미신)에서의 접합체 용액의 UV 흡광도를 측정함으로써 결정된다. 이것이 평균 약물 부하이고 실제적인 약물 부하는 평균 약물 부하 값에 집중된 준-가우시안(quasi-gaussian) 분포도라는 사실, 즉 항체 중 일부가 평균 보다 더 높게 부하되고 항체 중 일부가 평균 보다 더 낮게 부하된다는 사실에 주목하는 것이 중요하다. 공지된 항체-칼리케아미신 접합체 (예를 들어, CMC-676 및 CMC-544)와 비교되는 바와 같이, 상기 DAR 분포도는 매우 협소하고, 3 내지 5 DAR 중 (이것이 가장 바람직하다)은 전체 종의 약 75%를 차지한다. 접합되지 않은 항체 (낮은 접합 분획 또는 LCF)는 분석적 HIC-HPLC (소수성 상호 작용 고 성능 액체 크로마토그래피)를 이용하여 측정될 수 있다. 이러한 값은 항체 상에서의 CM 분포도의 측정치이고, 일반적으로 투여된 CM의 양에 영향을 미치지 않는다. ELISA를 이용하여 측정될 수 있는 접합되지 않은 CM은 항체와 접합되지 않고 총 CM의 %로 표현되는 CM의 양을 지칭한다. 약물-부하 검정은 접합되지 않은 CM과 접합된 CM 간을 차별하지 않는다. 접합되지 않은 CM의 양은 약물-부하 검정을 이용하는 경우에 검출 가능하지 않거나 또는 무시할만한 수준이므로, 이들 검정은 접합된 CM의 양을 효과적으로 측정한다.



- [0279] 분석적 방법을 이용하여 인간화 EFNA4-AcBut-CM 항체-약물 접합체의 방출 및 안정성 시험에 관하여 검정할 수 있다. 상기 접합체를 대상으로 하여, 실체 (IEF), 세기 (총 단백질 및 총 CM 부하), 순도 (접합되지 않은 CM, 낮은 접합 항체, 응집체 함량 및 환원된 SDS-PAGE), 및 면역친화성 (항원 결합성 ELISA)에 관하여 평가할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 부가의 검정을 이용할 수 있다. 이들 검정을 이용하여, 상업적 제작에 있어서 배치 대 배치 일관성을 유지할 수 있다.
- [0280] III. EFNA 항체-약물 접합체의 성상 확인을 위한 기능적 검정
- [0281] 본 발명은 추가로, EFNA 결합 활성, 세포 표면 상에 존재하는 EFNA4 항원과의 결합 후 세포 내재화, 및 특정 대상체에게서 EFNA4-발현성 세포에 대한 표적화를 포함한, EFNA4 항체-약물 접합체의 활성을 명확히 규명하기 위한 시험관내 및 생체내 검정을 개시한다. 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 상기 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편의 중화 또는 고갈 측면을 특징으로 한다. 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 대체 약물의 효능이 결여되는 것과 비교해서 특별한 약물의 예상치 못한 효능을 특징으로 한다. 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체-약물 접합체는 상기 약물과 동일한 작용 방식을 갖는 표준 치료 치료제를 증가하는 것으로서 특징짓는다.
- [0282] EFNA4 항원, 또는 기타 EFNA 항원에 대한 EFNA4 항체-약물 접합체의 결합을 검출하는 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있는데, 이는 예를 들어, BIACORE® 검정을 포함한다. 부가의 대표적인 기술은 원심분리, 친화 크로마토그래피 및 기타 면역화학 방법을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Manson (1992) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa, N.J., United States of America]; [Ishikawa (1999) Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Elsevier, Amsterdam/New York] 참조). 단리된 EFNA4 항원 또는 EFNA4-발현성 세포를 이용하여 항원결합 검정을 수행할 수 있다.
- [0283] EFNA4 항체-약물 접합체의 결합 특이성은 결합성 에피토프의 정의, 즉 항원 결합에 참여하는 비인접 잔기를 포함한 잔기의 확인, 및/또는 항원 결합에 영향을 미치는 잔기의 정의로써 추가로 설명될 수 있다.
- [0284] EFNA-발현성 세포에 의한 EFNA4 항체-약물 접합체의 내재화는 시간 경과에 따른 EFNA-발현성 세포의 표면과 결합된 항체 또는 접합체의 양을 관찰함으로써 검정할 수 있다. 선택된 EFNA 리간드 또는 그의 이소형은 가용성 형태로 존재할 수 있고, 적어도 일부 EFNA4는 세포 표면과 여전히 연합되는 것으로 예상되므로, 본원에 개시된 항체의 내재화가 허용된다. 따라서, 본 발명의 항-EFNA4 항체-약물 접합체는 EFNA4를 발현하는 세포에 의해 내재화될 수 있다. 예를 들어, 종양 개시 세포의 표면 상의 EFNA4와 결합하는 항-EFNA4 항체-약물 접합체는 이러한 종양 개시 세포에 의해 내재화될 수 있다.
- [0285] EFNA4 항체의 내재화는 세포를 사포린 독소와 접합되는 2차 항체 Fab 단편 및 EFNA4 항체와 함께 인큐베이션하는 기능적 검정을 이용하여 평가할 수 있다. 이어서, 적합한 어떠한 방법에 의해서도 세포 생육성을 측정하는데, 세포성 세포독성이 항체 내재화를 암시한다 (실시예 5 참조).
- [0286] 본 발명의 일부 측면에서, 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체의 항체, 또는 그의 항원-결합성 단편은 가장 광범위한 의미로 사용된 바와 같은 "길항제", 즉 본원에 개시된 천연 표적의 생물학적 활성, 또는 그의 전사 또는 해독을 부분적으로 또는 완전히 차단, 억제 또는 중화시키는 모든 분자이다. 본 발명의 항체의 생체 활성과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "억제" 또는 "중화"하는 것은 특정 생물학적 활성을 포함하지만 이에 제한되지 않는 활성을 실질적으로 길항시키거나, 금지하거나, 방지하거나, 제어하거나, 느리게 하거나, 붕괴하거나, 제거하거나, 중지하거나, 저하시키거나 또는 역전시킬 수 있는 항체의 능력, 예를 들어 그의 진행 또는 중증도가 억제되는 것을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 일부 측면에서, 항-EFNA4 항체-약물 접합체는 이러한 항체-약물 접합체의 내재화시 세포 사멸을 촉진시킨다.
- [0287] 보다 특히, 용어 중화 항체 또는 중화 길항제는 EFNA 리간드와 결합하거나 또는 이와 상호 작용하며, 상기 리간드가 그의 결합 파트너 (예를 들어, EPHA 수용체)와 결합하거나 또는 연합하는 것을 방지함으로써, 분자의 상호 작용으로부터 달리 비롯될 것인 생물학적 반응을 중단시키는 항체 또는 길항제를 지칭한다. EFNA4의 경우, 중화 항체 또는 길항제는 바람직하게, EPHA4와 결합할 수 있는 EFNA4의 능력을 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 초과하여 저하시킬 것이다. 이와 같이 저하된 활성은 관련 기술분야에서 승인된 기술을 이용하여 직접적으로 측정될 수 있거나 또는 상기 저하가 EPHA4 수용체 활성에 대해 미치게 될 영향력에 의해 측정될 수 있다는 것을 인지해야 할 것이다.
- [0288] 본 발명의 다른 측면에서 본 발명의 항-EFNA4 항체-약물 접합체는 고갈 항체일 수 있다. 용어 고갈 항체는 세포 표면 상에서 또는 세포 표면 근처에서 EFNA4와 결합되거나 또는 이와 연합되고, 세포의 사멸 또는 제거를

(예를 들어, 보체-의존성 세포독성 또는 항체-의존성 세포성 세포독성에 의해) 유도하거나, 증진시키거나 또는 유발시키는 항체를 지칭한다. 바람직하게 고갈 항체는 규정된 세포 집단에서 종양 영속 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99%를 제거하거나, 없애거나 또는 사멸시킬 수 있을 것이다.

[0289] 기능적 검정은 또한, 항체-약물 접합체의 항암 활성, 예를 들어 기존의 암 세포를 파괴하거나 또는 암 세포의 성장을 지연 또는 방지시킬 수 있는 능력을 평가하는 방법을 포함한다. 본 발명의 항체-약물 접합체에 의해 표적화된 암은 원발성 종양과 전이된 종양 둘 다, 및 대상체 내의 어떠한 조직의 암종도 포함하는데, 이는 암종 및 조혈 악성 종양, 예컨대 백혈병 및 림프종을 포함한다.

[0290] 성장 억제 활성을 갖는 EFNA4 항체-약물 접합체는 EFNA-발현성 세포를 제거할 수 있거나 또는 EFNA-발현성 암 세포의 증식을 방지 또는 저하시킬 수 있다. 세포 성장 억제의 신속한 시험관내 평가를 위한 대표적인 방법이 문헌 ([Jones et al. (2001) J. Immunol. Methods 254:85-98])에 기재되어 있다.

[0291] EFNA4 항체-약물 접합체는 또한, 세포 사멸, 예를 들어 핵 DNA 분해, 핵 변성 및 응축, 막 완전성의 상실, 및 포식작용을 특징으로 하는 프로그램된 세포 사멸을 유도시킬 수 있는 능력을 포함할 수 있다. 세포를 평가하는 대표적인 검정이 문헌 ([Hoves et al. (2003) Methods 31:127-34]; [Peng et al. (2002) Chin. Med. Sci. J. 17:17-21]; [Yasuhara et al. (2003) J. Histochem. Cytochem. 51:873-885])에 기재되어 있다.

[0292] 예를 들어, 시험관 내에서 EFNA4 항체-약물 접합체의 세포독성을 평가하기 위하여, EFNA4-발현성 암 세포와 대조군 세포를 EFNA4 항체-약물 접합체의 존재 하에 배양하고 유리 약물과는 별도로 배양한다. 각 작용제의 세포 독성이 ED50 (ng/ml)으로서 보고되는데, 이는 처리되지 않은 대조군과 비교해서 세포 배양물의 50% 감소를 유발시키는, 접합체로서 또는 유리 약물로서 제공된 약물의 양이다. 배양물 내의 세포 수는 약물 노출 후 생체 염색 색소 (MTS)를 이용하여 결정된다.

[0293] 생체 내에서 EFNA4 항체-약물 접합체의 세포독성을 평가하기 위하여, 각종 암 세포를 피하 주사함으로써 NOD/SCID 마우스에서 종양을 제조한다. EFNA4 항체-약물 접합체 및 대조군 화합물을, 예를 들어 2주 동안 1주에 2회 (q4dx4) 복강내 주사함으로써 종양-보유 마우스에 투여할 수 있다. 측정 가능한 치료 성과는 종양 세포 성장의 억제를 포함한다 (실시예 8 참조).

[0294] 추가로, 본 발명은, 예를 들어 항-EFNA4 항체, 또는 전달 투여량 및 방법에 따라서 특이적 세포를 제거하거나 또는 선택된 경로를 효능작용시키거나 또는 길항시키는 것을 포함한 각종 기전을 통하여, 종양 개시 세포 (TIC)를 포함한 종양 세포, 및/또는 이와 관련된 종양의 성장, 번식 또는 생존을 고갈, 침묵, 중화, 제거 또는 억제할 수 있는 EFNA4 항체-약물 접합체를 제공한다 (실시예 9 참조).

[0295] 본원에 사용된 바와 같은 용어 종양 개시 세포 (TIC)는 종양 영속 세포 (TPC; 즉, 암 줄기 세포 또는 CSC)와 고도의 증식성 종양 전구 세포 (TProg) 둘 다를 포괄하는데, 이는 함께 일반적으로, 벌크 종양 또는 덩어리의 독특한 하위집단 (즉, 0.1 내지 40%)을 포함한다. 본 개시내용의 목적상, 용어 종양 영속 세포 및 암 줄기 세포는 등가이고, 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 역으로, TPC는 이것이 종양 내에 존재하는 종양 세포의 조성을 완벽하게 반복발생시킬 수 있고 적은 수의 단리된 세포의 일련의 이식 (마우스를 통한 2회 이상의 세대)에 의해 입증된 바와 같이 무제한 자기 재생 능력을 지니고 있다는 점에서 TProg와 상이하다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "종양 개시 세포"는 또한, 종양 그 자체를 특징으로 하지 않는, 각종 혈액 악성 종양의 암 줄기 세포를 지칭한다.

[0296] 본 발명은 종양 개시 세포 (TIC), 및 특히 종양 영속 세포 (TPC)를 표적으로 함으로써, 신생물성 장애 및 과증식성 장애의 치료, 관리 및 예방을 촉진시켜 주는 EFNA4 항체-약물 접합체를 제공한다. 보다 구체적으로, 특이적 종양 세포 하위집단은 EFNA4를 발현하고, 암 줄기 세포 자기 재생과 세포 생존에 중요한 모르포겐 (morphogen) 신호 전달의 국한성 협조를 변형시키는 것으로 예상된다. 따라서, EFNA4 항체-약물 접합체를 이용하여, 대상체로의 투여시 TIC의 빈도를 감소시킬 수 있다. 종양 개시 세포 빈도에서의 감소는 a) 종양 개시 세포의 제거, 고갈, 감작화, 침묵 또는 억제; b) 종양 개시 세포의 성장, 확장 또는 재발의 제어; c) 종양 개시 세포의 개시, 번식, 유지 또는 증식의 중단; 또는 d) 종양형성성 세포의 생존, 재생 및/또는 전이의 방해에 따른 결과로서 일어날 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 종양 개시 세포 빈도에서의 감소는 하나 이상의 생리학적 경로 상의 변화에 따른 결과로서 일어난다. 이러한 경로 상의 변화는 이것이 종양 개시 세포의 감소 또는 제거에 의해서든지 아니면 그의 잠재력의 변형 [예를 들어, 분화 유도, 니치(niche) 붕괴] 또는 종양 환경이나 다른 세포에 대하여 효과를 발휘할 수 있는 그의 능력의 방해에 의해서든지 간에, 궁극적으로 종양형성, 종양

유지 및/또는 전이 및 재발을 억제함으로써 EFNA4-관련 장애를 보다 효과적으로 치료할 수 있게 해준다.

[0297] 이러한 종양 개시 세포의 빈도에서의 감소를 평가하기 위해 사용될 수 있는 방법 중에서, 시험관내 또는 생체 내에서 제한 희석 분석한 다음, 바람직하게 프와송(Poisson) 분포 통계를 이용하거나 또는 미리 규정된 확정 현상의 빈도, 예컨대 생체 내에서 종양을 생성시킬 수 있거나 그렇지 않은 능력을 평가함으로써 계산하는 방법이 있다. 널리 공지된 유동 세포계수 또는 면역조직화학적 수단을 통하여 빈도 값 감소를 결정하는 것이 또한 가능하다. 전술된 방법 모두에 관해서는, 예를 들어 문헌 ([Dylla et al., PLoS ONE 3(6):e2428, 20082 & Hoey et al, Cell Stem Cell 5:168-177, 2009 (각각의 전문이 본원에 참조로 포함된다)])을 참조할 수 있다. 종양 개시 세포 빈도를 계산하기 위해 사용될 수 있는, 본 발명과 화합성인 기타 방법은 정량화 가능한 유동 세포계수 기술 및 면역조직화학적 염색 과정을 포함한다. 대표적인 방법이 실시예 9에 기재되어 있다.

[0298] 상기 언급된 방법 중 어느 것을 이용하여, 본원의 교시에 따라서 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체에 의해 제공된 TIC (또는 그 안의 TPC)의 빈도에서의 감소를 정량화하는 것이 가능하다. 일부 경우에, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 TIC의 빈도를 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 또는 심지어 35% 정도 감소시킬 수 있다 (제거, 분화 유도, 니치 붕괴, 침묵 등을 포함한, 상기 언급된 각종 기전에 의함). 본 발명의 다른 측면에서, TIC의 빈도에서의 감소는 대략 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 또는 65%일 수 있다. 본 발명의 특정 측면에서, 상기 개시된 화합물은 TIC의 빈도를 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 심지어 95% 정도 감소시킬 수 있다. TIC의 빈도의 어떠한 감소에 의해서도, 종양의 종양원성, 영속성, 재발 및 침습성에 있어서의 상응하는 감소가 초래되는 것으로 예상된다는 것을 인지해야 할 것이다.

[0299] 수집된 증거는 종양 성장, 요법에 대한 저항성, 및 장애 재발이 TPC에 의해 제어된다는 가설을 뒷받침해준다. TPC의 빈도는 종양 유형마다 다양할 수 있거나 또는 동일한 종양 유형을 갖는 환자들 간에도 장애 병기 및/또는 종양 내의 분화 정도에 따라서 다양할 수 있다. TPC는 특정 유형의 암 환자들 간에 그들의 발현에 있어서 종종 중복되는 세포 표면 마커 패넬을 이용하여 확인하고 강화할 수 있다. TPC는 일련의 이식시 종양을 개시할 수 있는 그들의 기능적 능력으로써 가장 잘 규정되는 반면, 비-종양형성성 (NTG) 세포는 이러한 능력이 없다. 그들의 독특한 종양 개시 능력이 보장된 고품 종양 세포는 유방암에서 최초로 확인되었지만, 유방암은 특정 스펙트럼의 악성 종양을 포함하고 있다. 지금까지, 과학계는 특이적 TPC 실체를 특별한 장애 하위유형과 연관시키지 못하였는데, 이는 집단 전반에 걸쳐 그리고 집단 내에서 모순된 결과의 기저를 이룰 수 있고 또한 병원으로 이동되지 못할 가능성을 증가시킬 수 있다.

[0300] 본 발명은 TPC의 강화를 개선시켜 주는 새로운 세포 표면 마커의 조합물을 제공한다. 특별한 측면에서, 본 발명은 삼중 음성 유방암 (TNBC) TPC의 강화를 촉진시켜 주는 새로운 세포 표면 마커의 조합물을 제공한다. 본 발명은 추가로, TNBC에서 신규 TPC-관련 치료 표적으로서의 EFNA4의 확인을 제공하는데; 그의 발현 수준은 다른 유방암 하위유형 및 정상 조직에서 보다 상당히 더 높다.

[0301] EFNA4 항체-약물 접합체의 약동학은 각종 동물에서 평가하고, 이를 접합되지 않은 칼리케아미신의 약동학과 비교할 수 있다. 예를 들어, 이는 암컷 NOD/SCID 마우스, 수컷 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 래트, 및 암컷 시노몰구스(cynomolgus) 원숭이에서 단일 정맥내 볼루스 주사한 후에 수행될 수 있다. EFNA4 항체-약물 접합체의 약동학은 일반적으로, 각종 종에서의 낮은 청소율, 낮은 분포 용적, 및 긴 걸보기 말단 반감기를 특징으로 한다. 접합되지 않은 칼리케아미신 유도체의 혈청 농도는 정량화 한계치 아래인 것으로 예상된다. 단일 용량 독성 범위 연구에서 이들 접합체에 대한 독성 프로파일은 동등한 용량에서 다른 항체-칼리케아미신 접합에 대하여 수득된 것과 유사한 것으로 예상된다.

[0302] "아포토시스를 유도시키는" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 내형질 세망의 팽창, 세포 단편화, 및/또는 막 소포 (아포토시스 체로 불리움)의 형성에 의해 결정된 바와 같은 프로그램된 세포 사멸을 유도시키는 것이다. 세포는 종양 세포, 예를 들어, 유방, 난소, 결장직장, 간 및 폐이다. 아포토시스와 연관된 세포성 현상을 평가하기 위한 각종 방법이 이용 가능하다. 예를 들어, 포스파티딜 세린 (PS) 전위는 아넥신 결합에 의해 측정될 수 있고; DNA 단편화는 DNA 래더링을 통하여 평가될 수 있으며; 핵/염색질 응축은 DNA 단편화와 함께, 저이배체 세포에서의 어떠한 증가에 의해서도 평가될 수 있다.

[0303] 본원에 사용된 바와 같은 "항체-의존성 세포 매개된 세포독성" 또는 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 [예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 호중구, 및 대식 세포]가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식한 다음, 연속해서 이러한 표적 세포의 용해를 유발시키는 세포 매개된 반응을 지칭한다. 관심 분자의 ADCC 활성은 시험관내 ADCC 검정, 예컨대 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 검정을 이용하여 평가할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 NK 세포를 포함한다. 또



다른 한편으로, 또는 부가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 ([Clynes et al., PNAS (USA), 95:652-656 (1998)])에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다.

[0304] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서 표적을 용해시키는 것을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을, 동족 항원과 복합체를 형성한 분자 (예를 들어, 항체)와 결합시킴으로써 개시시킨다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 ([Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163-171 (1997)])에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0305] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 상기 세포는 Fc $\gamma$ RIII를 발현하고 항원-의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC) 이펙터 기능을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단구, 대식세포, 호산구 및 호중구를 포함하지만 이에 제한되지 않는데, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. ADCC 활성을 갖는 항체는 전형적으로, IgG1 또는 IgG3 이소형이다. 이러한 ADCC-매개성 항체는 또한, 비-ADCC 항체로부터의 가변 영역 또는 가변 영역 단편 내지 IgG1 또는 IgG3 이소형 불변 영역을 조작함으로써 만들 수 있다.

[0306] IV. EFNA 항체-약물 접합체의 용도

[0307] 본 발명의 항체 및 항체 약물-접합체는 치료적 처치 방법 및 진단적 처치 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 각종 적용에 유용하다.

[0308] IV.A. 시험관내 적용

[0309] 본 발명은 EFNA4 항체-약물 접합체를 이용하는 시험관내 방법을 제공한다. 예를 들어, 상기 개시된 항체는 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 EFNA-양성 암 세포와 특이적으로 결합하여 이러한 세포가 세포 샘플로부터 고갈 되도록 하는 세포독성제 또는 기타 약물과 조합하여 사용될 수 있다. EFNA-발현성 세포를 EFNA4 항체-약물 접합체와 접촉시키는 것을 통하여, 아포토시스를 유도시키고/시키거나 세포 증식을 억제하는 방법이 또한 제공된다. 대표적인 시험관내 방법이 "EFNA4 항체-약물 접합체의 성상 확인을 위한 기능적 검정"이란 표제 하에 상기 기재되어 있다.

[0310] 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 또한, EFNA4 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 그의 능력에 근거하여 시험관 내에서 EFNA-양성 세포를 검출하는 데 유용하다. EFNA-발현성 세포를 검출하는 방법은 (a) 세포를 갖는 생물학적 샘플을 제조하는 단계; (b) EFNA4 항체-약물 접합체를 시험관 내에서 상기 생물학적 샘플과 접촉시키는 단계 (여기서, 약물은 검출 가능한 표지이다); 및 (c) EFNA4 항체-약물 접합체가 결합하는 것을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0311] 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체는 또한, 종양 샘플 중에서의 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는 데 유용하다. 예를 들어, 상기 방법은 시험관 내에서 종양 세포 집단 (여기서, 이러한 집단은 종양 개시 세포, 및 종양 개시 세포 이외의 종양 세포를 포함한다)을 EFNA4 항체-약물 접합체와 접촉시킴으로써, 세포 집단 내의 종양 개시 세포의 비율 (%)을 감소시키는 단계를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "종양 개시 세포"는 또한, 종양 그 자체를 특징으로 하지 않는 각종 혈액 악성 종양의 암 줄기 세포를 지칭한다. 대표적인 종양 샘플은 종양 세포를 함유하는 모든 생물학적 또는 임상 샘플, 예를 들어 조직 샘플, 생검, 혈액 샘플, 혈장, 타액, 뇨, 정액 등을 포함한다. 대표적인 방법이 실시예 9에 기재되어 있다.

[0312] IV.B. 치료 적용

[0313] EFNA4 관련 장애는 유방암, 예컨대 삼중 음성 유방암 (TNBC); 난소암; 결장직장암; 백혈병, 예컨대 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 간암, 예컨대 간세포 암종 (HCC); 및 폐암, 예컨대 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 소세포 폐암 (SCLC)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0314] 본원에 사용된 바와 같은 "유효량" 또는 "유효 투여량"은 어느 한 가지 이상의 유리하거나 목적하는 치료 결과를 달성하는 데 필요한 약물, 화합물 또는 제약 조성물의 양을 지칭한다. 예방적으로 사용하는 경우, 유리하거나 목적하는 결과는 장애의 생화학적, 조직학적 및/또는 행위적 증상, 그의 합병증 및 장애의 발생 동안 제시되는 중간 병리학적 표현형을 포함한, 장애의 위험을 제거 또는 저하시키거나, 장애의 중증도를 약화시키거나 또는 장애의 발단을 지연시키는 것을 포함한다. 치료적으로 사용되는 경우, 유리하거나 목적하는 결과는 임상 결과, 예컨대 각종 EFNA4 관련 장애의 한 가지 이상의 증상의 발생률을 저하시키거나 또는 이러한 증상을 완화시키고/시키거나, 장애를 치료하는 데 요구되는 다른 의약의 용량을 감소시키고/시키거나, 또 다른 의약의 효과를 증강시키고/시키거나 환자의 EFNA4 관련 장애의 진행을 지연시키는 것을 포함한다.

- [0315] 한 측면에서, 본 발명은 특정 대상체에게서 EFNA4 발현과 연관된 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 특정 대상체에게서 EFNA4 발현과 연관된 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체, 또는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 추가로, 특정 대상체에게서 EFNA4 발현과 연관된 장애를 치료하기 위한 의약을 제조하는 데 있어서의, 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체, 또는 제약 조성물의 용도를 제공한다.
- [0316] 본 발명의 일부 측면에서, 특정 대상체에게서 EFNA4 발현과 연관된 장애를 치료하는 방법은 상기 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 EFNA4 항체-약물 접합체를 갖는 조성물 (예를 들어, 제약 조성물)의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. EFNA4 발현과 연관된 장애는 비정상적인 EFNA4 발현, 변경되거나 또는 이상한 EFNA4 발현, EFNA4 과발현, 및 증식성 장애 (예를 들어, 암)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0317] 본 발명의 한 측면에서, 상기 장애는 중피종, 간담즙 (간 및 담관) 암, 간세포 암종, 원발성 또는 이차 CNS 종양, 원발성 또는 이차 뇌 종양, 폐암 (NSCLC 및 SCLC), 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 결장암, 직장암, 항문부 암, 위암, 위장 (위, 결장직장, 및 십이지장) 암, 유방암, 자궁암, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경관 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병(Hodgkin's Disease), 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연질 조직 암종, 요도암, 남근암, 전립선암, 고환암, 만성 또는 급성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 림프구성 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신세포 암종, 신우 암종, 중추신경계 (CNS)의 종양, 원발성 CNS 림프종, 비호지킨 림프종, 척추 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 부신피질 암, 담낭암, 다발성 골수종, 담관암종, 섬유육종, 신경모세포종, 망막모세포종, 또는 본원에 개시된 하나 이상의 암의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 암이다.
- [0318] 본 발명의 특별한 측면에서, 항-EFNA4 항체-약물 접합체를 이용하여 표적화하는 데 적합한 암은 EFNA4-발현성 원발성 및 전이성 암, 예컨대 유방암 [삼중 음성 유방암 (TNBC) 포함]; 난소암; 결장직장암; 백혈병, 예컨대 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 간암, 예컨대 간세포 암종 (HCC); 및 폐암, 예컨대 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 소세포 폐암 (SCLC)을 포함한다. 본 발명의 일부 측면에서, 종양 성장 또는 진행의 억제를 필요로 하는 대상체에게, 본원에 기재된 바와 같은 EFNA4 항체-약물 접합체를 갖는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, EFNA4 발현성 종양을 갖는 대상체에게서 종양 성장 또는 진행을 억제하는 방법이 제공된다. 본 발명의 다른 측면에서, EFNA4 발현성 암 세포의 전이를 억제시킬 필요가 있는 대상체에게, 본원에 기재된 바와 같은 EFNA4 항체-약물 접합체를 갖는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에게서 EFNA4 발현성 암 세포의 전이를 억제하는 방법이 제공된다. 본 발명의 다른 측면에서, EFNA4 발현성 종양의 퇴행을 유도시킬 필요가 있는 대상체에게, 본원에 기재된 바와 같은 EFNA4 항체-약물 접합체를 갖는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에게서 EFNA4 발현성 종양의 퇴행을 유도하는 방법이 제공된다. 다른 측면에서, 본 발명은 상기 언급된 바와 같은 방법에 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체, 또는 제약 조성물을 제공한다. 다른 측면에서 본 발명은 상기 언급된 방법에 사용하기 위한 의약을 제조하는 데 있어서의, 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체, 또는 제약 조성물의 용도를 제공한다.
- [0319] 따라서, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체를 이용하여 치료하고자 하는 환자는 종양 기원 또는 조직학 보다는 오히려 강화된 표적 발현에 대하여 선별된 환자 집단을 초래하는 EFNA4 항원의 상승된 발현 및 벌크 종양 샘플의 mRNA (qPCR)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 바이오마커 발현에 근거하여 선별될 수 있다. 표적 발현은 세포 염색의 세기와 조합된 세포 염색의 수의 함수로서 측정될 수 있다. 예를 들어, EFNA4의 고 발현의 분류는 3+의 수준 (1부터 4의 척도로)에서 EFNA4에 대해 양성인 것으로 면역조직화학적 염색에 의해 시험된 세포를 30% 초과 (즉, 40%, 50% 또는 60%)하여 갖는 환자를 포함하는 반면, EFNA4의 중간 수준의 발현은 1+ 내지 2+로 세포 염색되는 세포를 20% 초과하여 갖는 환자를 포함할 수 있다. 표적 발현은 또한, 본원에 기재된 바와 같은 종양 개시 세포 (TIC) 상에서의 EFNA 발현을 검출함으로써 측정할 수 있다.
- [0320] TNBC에서의 EFNA4의 발현은 특이적인데, 이는 다른 유방암 하위유형 및 정상 조직에서보다 더 높기 때문이다. 일반적으로, EFNA4의 발현 수준이 더 낮은 종양이 클라우딘 로우(Claudin-low) TNBC 분자 시그니처를 나타냈는데, 이는 환자 선별 전략에 대한 상기 분류의 잠재적 해석상 관련성을 제안한다. 본 발명은 EFNA4의 증가된 발현을 갖는 환자를 선별하고, 이러한 환자를 본원에 개시된 EFNA4 ADC로 치료하는 것을 제공한다. 추가로, 유방암, 난소암 및 간세포 암종에서 EFNA4 및 mRNA 수준의 카피 수 증가는 EFNA4의 과발현에 대한 유전적 기준을 결정하는 것과 관련될 수 있고, 이를 환자 선별 전략에 사용할 수 있다. 본 발명은 추가로, EFNA4의 카피 수가 증가된 환자를 선별하고, 이러한 환자를 본원에 개시된 EFNA4 ADC로 치료하는 것을 제공한다. 본 발명은 추가로, EFNA4의 mRNA 수준이 증가된 환자를 선별하고, 이러한 환자를 본원에 개시된 EFNA4 ADC로 치료하는 것을 제



공한다.

- [0321] EFNA4의 발현 이외의 바이오마커를 또한, 환자 선별에 사용할 수 있는데, 이는 예를 들어, 다중 약물 내성(MDR)을 근거로 한 종양의 성상 확인을 포함한다. 인간 암의 거의 50%가 화학요법에 대해 완전히 내성이 있거나, 또는 일시적으로만 반응하는데, 그 후에는 이들 암이 흔히 사용되는 항암 약물에 의해 더 이상 영향을 받지 않는다. 이러한 현상이 MDR로서 지칭되는데, 일부 종양 유형에 의해서는 선천적으로 나타나는 반면, 다른 종양 유형의 경우에는 화학요법 치료에 노출된 후에 MDR이 후천적으로 나타난다. 약물 유출 펌프 P-당단백질은 세포 독성 화학요법제와 연관된 대다수의 MDR을 매개한다. 특이적 MDR 기전(들)을 특이적 종양 유형에 있어서의 화학요법에 대한 내성과 관련시키기 위해, 암 환자 종양 표본에 존재하는 MDR 기전의 표현형별 및 기능적 분석을 수행할 수 있다.
- [0322] 본 발명은 TNBC TPC가  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{+}$  세포들 중에서는 상당히 강화되지만,  $CD324^{-}$  대응물에서는 그렇지 않다는 것을 제공한다. 본 발명은 추가로, 환자를 선별하고 이러한 환자를 본원에 개시된 EFNA4 ADC로 치료하기 위한 마커로서의 ESA 및/또는 CD46 및/또는 CD324의 용도를 제공한다. 본 발명은 추가로, TNBC 환자를 선별하고 이러한 환자를 본원에 개시된 EFNA4 ADC로 치료하기 위한 마커로서의 ESA 및/또는 CD46 및/또는 CD324의 용도를 제공한다.
- [0323] 암 성장 또는 비정상적인 증식은 세포 내에서 보다 발달된 암 형태 또는 장애 상태로 변화된 것을 제안하는 수 많은 지표 중 어느 하나를 지칭한다. 암 세포 또는 비-종양 증식성 장애의 세포의 성장 억제, 예컨대 종양 성장 지연 및 전이 억제는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 검정할 수 있다. 암 성장 억제를 측정하는 다른 지표는 암 세포 생존에 있어서의 감소, 종양 용적 또는 형태 상의 감소 (예를 들어, 컴퓨터 단층촬영술 (CT), 초음파 검사 또는 다른 영상화 방법을 이용하여 결정된 바와 같음), 종양 혈관계의 파괴, 지연형 과민증 피부 시험에 있어서의 개선된 성능, 세포용해성 T 림프구의 활성 상의 증가, 및 종양 특이적 항원의 수준 감소를 포함한다.
- [0324] 상기 개시된 치료 방법의 목적하는 성과는 일반적으로, 대조군 또는 기준선 측정과 비교해서 정량화 가능한 측정기준이다. 본원에 사용된 바와 같은, 상대적 용어, 예컨대 "개선"시키거나, "증가"시키거나 또는 "감소"시키는 것은 대조군 값, 예컨대 본원에 기재된 처치를 개시하기 이전에 동일한 개체에서의 측정치, 또는 본원에 기재된 처치의 부재 하에 특정 대조군 개체 (또는 다수의 대조군 개체)에게서의 측정치에 대해 상대적인 값을 표시한다. 대표적인 대조군 개체는 (처치된 개체와 대조군 개체에 있어서의 장애의 병기가 동등하다는 것을 보장하기 위하여) 처치되는 개체와 대략 동일한 연령이고, 처치되는 개체와 동일한 형태의 과증식성 장애를 앓고 있는 개체이다.
- [0325] 요법에 반응하여 변화되거나 또는 개선되는 것은 일반적으로, 통계상 유의적이다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유의성" 또는 "유의적"은 2가지 이상의 실체 간의 비-무작위적인 연관성이 있다는 확률의 통계적 분석에 관한 것이다. 특정 관계가 "유의적"이거나 또는 "유의성"을 갖는지 아닌지를 결정하기 위하여, 데이터를 통계적으로 조작한 것이 "p-값"일 수 있다. 사용자 정의 컷-오프(cut-off) 지점 아래에 속하는 p-값은 유의적인 것으로 간주된다. 0.1 이하, 0.05 미만, 0.01 미만, 0.005 미만, 또는 0.001 미만의 p-값이 유의적인 것으로 간주될 수 있다.
- [0326] "III. EFNA 항체-약물 접합체의 성상 확인을 위한 기능적 검정"이란 표제 하에 상기 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 또한, 종양 개시 세포를 표적화하는 방법을 제공한다. 보다 특히, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 종양 개시 세포를 포함한 종양 세포의 성장, 번식 또는 생존을 고갈, 침묵, 중화, 제거 또는 억제시킬 수 있다.
- [0327] 따라서, 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체는 또한, 종양 샘플 내의 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는 데 유용하다. 예를 들어, 상기 방법은 종양 세포 집단 (여기서, 이러한 집단은 종양 개시 세포, 및 종양 개시 세포 이외의 종양 세포를 포함한다)을 EFNA4 항체-약물 접합체와 접촉시킴으로써, 상기 세포 집단 내의 종양 개시 세포의 비율 (%)을 감소시키는 단계를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "종양 개시 세포"는 또한, 종양 그 자체를 특징으로 하지 않는 각종 혈액 악성 종양의 암 줄기 세포를 지칭한다. 상기 접촉 단계는 시험관 내에서 수행될 수 있는데, 여기서 종양 세포 집단은 상기 본원에 기재된 바와 같이, 생물학적 샘플 내에 함유되어 있다. 또 다른 한편으로, 상기 접촉 단계는 EFNA4 항체-약물 접합체를 대상체에게 투여한 후에 일어나는 바와 같이 생체 내에서 수행될 수 있다.
- [0328] IV.C. 생체내 검출 및 진단

- [0329] 또 다른 측면에서, EFNA4 발현과 연관된 장애를 검출, 진단 및/또는 모니터링하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 EFNA4 항체는 검출 가능한 모이어티, 예컨대 조영제 및 효소-기질 표지로 표시될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 항체는 또한, 생체내 진단 검정, 예컨대 생체내 영상화 (예를 들어, PET 또는 SPECT), 또는 염색 시약에 사용될 수 있다.
- [0330] EFNA4 항체-약물 접합체 (여기서, 약물은 검출 가능한 표지이다)를 대상체에게 투여한 후, 및 결합에 충분한 시간 후, 상기 항체에 의해 결합된 EFNA4-발현성 세포의 생체내 분포를 가시화할 수 있다. 상기 개시된 진단 방법은 치료 방법과 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 검출과 요법의 이중 목적을 위해 투여할 수 있다.
- [0331] 대표적인 비-침습성 검출 방법은 심광 조영술 [예를 들어, SPECT (단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영술), PET (양전자 방출 단층촬영술), 감마 카메라 영상화, 및 직선 주사], 자기 공명 영상화 [예를 들어, 통상적인 자기 공명 영상화, 자화 이동 영상화 (MTI), 양성자 자기 공명 분광법 (MRS), 확산 가중 영상화 (DWI) 및 기능성 MR 영상화 (fMRI)], 및 초음파를 포함한다.
- [0332] IV.D. 제형
- [0333] 본 발명은 추가로, 본원에 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체 중 어느 것과 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 추가로, 이러한 조성물은 2개 이상의 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체 (예를 들어, EFNA4의 상이한 에피토프를 인식하는 EFNA4 항체의 혼합물)를 포함할 수 있다. 기타 예시되는 조성물은 동일한 에피토프(들)를 인식하는 2개 이상의 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체, 또는 EFNA4 (예를 들어, 인간 EFNA4)의 상이한 에피토프와 결합하는 상이한 종의 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체를 포함한다.
- [0334] 본 발명에 사용된 조성물은 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington: The Science and practice of Pharmacy 21st Ed., 2005, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover])를 추가로 포함하여, 동결건조된 제형 또는 수성 용제의 형태일 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 완충제, 예컨대 인산염, 시트레이트, 및 기타 유기 산; 항산화제 (아스코르브산 포함) 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물 (글루코스, 만노스, 또는 덱스트란 포함); 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "제약상 허용되는 염"은 분자 또는 거대분자의 제약상 허용되는 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 제약상 허용되는 부형제는 본원에 추가로 기재되어 있다.
- [0335] EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체의 각종 제형이 투여에 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 이러한 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체는 순수하게 투여될 수 있다. EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체, 및 제약상 허용되는 부형제는 각종 제형 내에 존재할 수 있다. 제약상 허용되는 부형제는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 약리학상 유효한 물질의 투여를 촉진시켜 주는 비교적 불활성 물질이다. 예를 들어, 부형제는 형태 또는 점도도를 제공할 수 있거나 또는 희석체로서 작용할 수 있다. 적합한 부형제는 안정화제, 습윤제 및 유화제, 다양한 삼투압을 위한 염, 피막화제, 완충제, 및 피부 침투 증강제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 부형제 뿐만 아니라 비경구 및 경구 약물 전달을 위한 제형이 문헌 ([Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000])에 제시되어 있다.
- [0336] 본 발명의 일부 측면에서, 이들 작용제는 주사에 의한 투여 (예를 들어, 복강내, 정맥내, 피하, 근육내 등)용으로 제제화된다. 따라서, 이들 작용제는 제약상 허용되는 비히클, 예컨대 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액 등과 조합될 수 있다. 특별한 투여량 요법, 즉 용량, 시기 및 반복은 특별한 개체, 및 그러한 개체의 병력에 좌우될 것이다.
- [0337] 본 발명에 따라서 사용되는 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체의 치료 제형은 목적하는 순도를 지닌 항체를 임의로 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005])와 혼합하여, 동결건조된 제형 또는 수성 용제의 형태로 저장하기

위해 제조한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 이는 완충제, 예컨대 인산염, 시트레이트, 및 기타 유기 산; 염, 예컨대 염화나트륨; 항산화제 (아스코르브산 포함) 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물 (글루코스, 만노스, 또는 덱스트린 포함); 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다.

[0338] EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체를 함유하는 리포솜은 관련 기술분야에 공지된, 예컨대 문헌 ([Eppstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985]; [Hwang, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980]); 및 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545에 기재된 방법에 의해 제조된다. 순환 시간이 증강된 리포솜은 미국 특허 번호 5,013,556에 개시되어 있다. 특히 유용한 리포솜은 포스포티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스포티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함한 지질 조성물을 이용하는 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 규정된 공극 크기의 필터를 통하여 압출시켜, 목적하는 직경을 갖는 리포솜을 산출시킨다.

[0339] 활성 성분은 또한, 예를 들어 액적형성(coacervation) 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 미소캡슐, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴 미소캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미소캡슐; 콜로이드상 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀션, 나노-입자 및 나노-캡슐); 또는 매크로에멀션 내에 포착시킬 수 있다. 이러한 기술은 문헌 ([Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005])에 개시되어 있다.

[0340] 지속 방출 제제를 제조할 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예는 상기 항체를 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하는데, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 미소캡슐의 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 [예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)], 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산과 7-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사용 미소구), 슈크로스 아세테이트 이소부티레이트, 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0341] 생체내 투여에 사용하고자 하는 제형은 멸균성이어야만 한다. 이는 예를 들어, 멸균성 여과 막을 통하여 여과 시킴으로써 용이하게 달성된다. 치료 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체 조성물은 일반적으로, 멸균성 유입 포트를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용제 봉지 또는 바이알 내에 놓아둔다.

[0342] 본 발명에 따르는 조성물은 단위 투여 형태, 예컨대 경구, 비경구 또는 직장 투여용, 또는 흡입 또는 취입에 의한 투여용의, 정제, 환제, 캡셀제, 산제, 과립제, 용제 또는 현탁제, 또는 좌제일 수 있다.

[0343] 고형 조성물, 예컨대 정제를 제조하기 위하여, 주요 활성 성분을 제약 담체, 예를 들어 통상적인 정제화 성분, 예컨대 옥수수 전분, 락토스, 슈크로스, 소르비톨, 탈크, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 인산이칼슘 또는 겔, 및 기타 제약 희석제, 예를 들어 물과 혼합하여, 본 발명의 화합물 또는 그의 비독성의 제약상 허용되는 염의 균질한 혼합물을 함유하는 고형 예비제형 조성물을 형성시킨다. 이들 예비제형 조성물을 균질한 것으로서 지칭하는 경우, 이는 활성 성분이 조성물 전반에 걸쳐 균일하게 분포되어 이러한 조성물이 동등하게 유효한 단위 투여 형태, 예컨대 정제, 환제 및 캡셀제로 용이하게 세분될 수 있다는 것을 의미한다. 이어서, 이러한 고형 예비제형 조성물을, 본 발명의 활성 성분을 0.1 내지 약 500 mg 함유하는 상기 언급된 유형의 단위 투여 형태로 세분한다. 신규 조성물의 정제 또는 환제를 코팅하거나 또는 달리 화합시켜, 장시간 작용의 이점을 제공할 수 있는 투여 형태를 제공할 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 환제는 내부 투여 성분과 외부 투여 성분을 포함할 수 있는데, 후자는 전자 위를 덮는 외피의 형태이다. 두 성분은 위(stomach)에서의 붕괴를 견디게 해주는 작용을 하고 내부 성분이 무손상 상태로 십이지장 내로 통과되게 해주거나 또는 방출 지연될 수 있도록 해주는 장내 층에 의해 분리될 수 있다. 이러한 장내 층 또는 코팅에 각종 물질을 사용할 수 있는데, 이러한 물질은 수많은 중합체성 산, 및 중합체성 산과 셸락(shellac), 세틸 알콜 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 물질의 혼합

물을 포함한다.

- [0344] 적합한 표면 활성제는 특히, 비이온성 작용제, 예컨대 폴리옥시에틸렌소르비탄 (예를 들어, Tween™ 20, 40, 60, 80 또는 85) 및 기타 소르비탄 (예를 들어 Span™ 20, 40, 60, 80 또는 85)을 포함한다. 표면 활성제를 수반한 조성물은 편리하게, 0.05 내지 5%의 표면 활성제를 포함할 것이고, 0.1 내지 2.5%일 수 있다. 다른 성분, 예를 들어 필요에 따라, 만니톨 또는 기타 제약상 허용되는 비히클을 부가할 수 있다는 것을 인지해야 할 것이다.
- [0345] 적합한 에멀션은 시판용 지방 에멀션, 예컨대 인트라리피드(Intralipid™), 리포신(Liposyn™), 인포뉴트롤(Infonutrol™), 리포펀딘(Lipofundin™) 및 리피피산(Lipiphysan™)을 이용하여 제조할 수 있다. 활성 성분을 미리 혼합된 에멀션 조성물에 용해시킬 수 있거나 또는 또 다른 한편으로, 이를 오일 (예를 들어, 대두유, 홍화유, 면실유, 참깨유, 옥수수유 또는 아몬드유)에 용해시킬 수 있고, 인지질 (예를 들어, 계란 인지질, 대두 인지질 또는 대두 레시틴) 및 물과의 혼합시 에멀션이 형성된다. 다른 성분, 예를 들어 글리세롤 또는 글루코스를 부가하여, 에멀션의 긴장성을 조정할 수 있다는 것을 인지해야 할 것이다. 적합한 에멀션은 전형적으로, 20% 이하의 오일, 예를 들어 5 내지 20%의 오일을 함유할 것이다. 지방 에멀션은 0.1 내지 1.0  $\mu\text{m}$ , 특히 0.1 내지 0.5  $\mu\text{m}$ 의 지방 비말을 포함할 수 있고, 5.5 내지 8.0의 범위의 pH를 가질 수 있다.
- [0346] 에멀션 조성물은 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체를 INTRALIPID™ 또는 그의 성분 (대두유, 계란 인지질, 글리세롤 및 물)과 혼합함으로써 제조될 수 있다.
- [0347] 흡입 또는 취입용 조성물은 제약상 허용되는 수성 또는 유기 용매, 또는 그의 혼합물 중의 용제 및 현탁제, 및 산제를 포함한다. 액상 또는 고형 조성물은 상기 제시된 바와 같은 적합한 제약상 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 조성물은 국소 또는 전신 효과를 위한 경구 또는 비내 호흡 경로에 의해 투여된다. 바람직하게 멸균성의 제약상 허용되는 용매 중의 조성물은 기체의 사용에 의해 분무될 수 있다. 분무되는 용액은 분무 장치로부터 직접적으로 호흡될 수 있거나, 또는 이러한 분무 장치를 안면 마스크, 텐트 또는 간헐적 양압 호흡 기계에 부착시킬 수 있다. 용제, 현탁제 또는 산제 조성물은 제형을 적당한 방식으로 전달시켜 주는 장치로부터, 바람직하게 경구 또는 비내 투여될 수 있다.
- [0348] 본 발명은 또한, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 본원에 기재된 바와 같은 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체를 포함한 하나 이상의 용기, 및 본원에 기재된 본 발명의 방법 중 어느 것에 따르는 사용 설명서를 포함한다. 일반적으로, 이러한 사용 설명서는 상기 언급된 치료적 처치를 위하여 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체를 투여하는 것에 관한 설명을 포함한다.
- [0349] 본원에 기재된 바와 같은 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체의 사용과 관련한 설명서는 일반적으로, 의도한 처치를 위한 투여량, 투여 스케줄 및 투여 경로에 관한 정보를 포함한다. 상기 용기는 단위 용량, 벌크 패키지 (예를 들어, 다중-용량 패키지) 또는 소단위 용량일 수 있다. 본 발명의 키트에 공급된 설명서는 전형적으로, 표지 또는 패키지 삽입물 (예를 들어, 키트에 포함된 종이 시트) 상에 작성된 설명서이지만, 기계-판독 가능한 설명서 (예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크 상에 수반된 설명서) 또한 허용된다.
- [0350] 본 발명의 키트는 적합하게 패키징되어 있다. 적합한 패키징은 바이알, 병, 자르(jar), 유연 패키징 [예를 들어, 밀폐 마일라(Mylar) 또는 비닐 봉지] 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특이적 장치, 예컨대 흡입기, 비내 투여용 장치 (예를 들어, 분무기) 또는 주입 장치, 예컨대 미니펌프와 조합하여 사용하기 위한 패키지가 또한 고려된다. 키트는 멸균성 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용제 봉지 또는 바이알일 수 있다). 용기는 또한, 멸균성 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용제 봉지 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 한 가지 활성제는 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체이다. 용기는 제2의 제약상 활성제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0351] 키트는 임의로, 부가 성분, 예컨대 완충제 및 해석 정보를 제공할 수 있다. 정상적으로, 키트는 특정 용기와, 이러한 용기 상에 있거나 이와 연합된 표지 또는 패키지 삽입물(들)을 포함한다.
- [0352] IV.E. 용량 및 투여
- [0353] 시험관내 및 생체내 적용하기 위하여, EFNA4 항체-약물 접합체는 유효 투여량으로 제공되거나 또는 투여된다. 임상 환경에서는, 약물, 화합물, 또는 제약 조성물의 유효 투여량이 직접 또는 간접적으로 예방적 또는 치료적 처치를 달성하는 데 충분한 양이다. 유효 투여량은 1회 이상 투여로 투여될 수 있다. 약물, 화합물, 또는 제약 조성물의 유효 투여량은 또 다른 약물, 화합물, 또는 제약 조성물과 연계해서 달성될 수 있거나 그렇지 않을



수 있다. 따라서, "유효 투여량"은 한 가지 이상의 치료제를 투여하는 맥락에서 고려될 수 있고, 단일 작용제는 이것이 한 가지 이상의 다른 작용제와 연계해서 목적하는 결과를 달성할 수 있거나 또는 달성되는 경우에, 유효량으로 제공되는 것으로 간주될 수 있다. 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체를 이용하여 EFNA-양성 세포를 검출하기 위하여, 본 발명의 조성물의 검출 가능한 양을 대상체에게 투여하는데, 즉 상기 접합체의 존재가 시험관내 또는 생체내에서 결정될 수 있도록 해주는 접합체의 용량을 투여한다.

[0354] 예를 들어, 암 보유 대상체에게 투여되는 경우, 유효량은 암 세포 세포용해, 암 세포 증식의 억제, 암 세포 아포토시스의 유도, 암 세포 항원의 감소, 종양 성장 지연, 및/또는 전이의 억제를 포함한 항암 활성을 유도시키기 위해 충분한 양을 포함한다. 종양 수축이 효능에 대한 임상 대리 마커로서 널리 허용된다. 효능에 대하여 널리 허용된 또 다른 마커는 질병 진행이 없는 생존율이다. EFNA4 항체-약물 접합체는 일반적으로, 주요 효능 파라미터에 있어서 적어도 25%의 개선, 예컨대 평균 생존율, 종양 진행되기까지의 시간, 및 전반적인 반응률 상의 개선을 명확히 보여준다.

[0355] EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체는 적합한 어떠한 경로를 통해서도 특정 개체에게 투여될 수 있다. 본원에 기재된 예는 이용 가능한 기술을 제한하는 것이 아니라 이의 예시라는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해해야 할 것이다. 따라서, 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체는 공지된 방법에 따라서, 예컨대 정맥내 투여, 예를 들어 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸쳐 연속적으로 주입하거나, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 두개내, 경피, 피하, 관절내, 설하, 활막내, 취입을 통하여, 척추강내, 경구, 흡입 또는 국소 경로에 의해 개체에게 투여한다. 투여는 전신, 예를 들어 정맥내 투여이거나 또는 국소성일 수 있다. 액상 제형을 위한 시판용 분무기 (제트 분무기 및 초음파 분무기 포함)가 투여에 유용하다. 액상 제형은 직접 분무할 수 있고, 동결건조된 분말은 재구성한 후에 분무할 수 있다. 또 다른 한편으로, EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체는 플루오로카본 제형 및 계측된 용량 흡입기를 이용하여 에어로솔화할 수 있거나, 또는 동결건조되고 분쇄된 분말로서 흡입될 수 있다.

[0356] 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체는 부위 특이적 또는 표적화 국소 전달 기술을 통하여 투여한다. 부위 특이적 또는 표적화 국소 전달 기술의 예는 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체의 각종 이식형 데포 공급원, 또는 국소 전달 카테터, 예컨대 주입 카테터, 유치(indwelling) 카테터, 또는 바늘 카테터, 합성 이식편, 외막 랩, 셉트(shunt) 및 스텐트(stent), 또는 기타 이식형 장치, 부위 특이적 캐리어, 직접 주사 또는 직접 적용을 포함한다 (예를 들어, PCT 국제 공개 번호 WO 2000/53211 및 미국 특허 번호 5,981,568 참조).

[0357] 본원에 기재된 바와 같은 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체는 주사 (예를 들어, 복강내, 정맥내, 피하, 근육내 등)에 의한 것을 포함한, 적합한 모든 방법을 이용하여 투여할 수 있다. EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체는 또한, 본원에 기재된 바와 같은 흡입을 통하여 투여할 수 있다. 일반적으로, EFNA4 항체 및 EFNA4 항체-약물 접합체를 투여하는 경우, 초기 후보 투여량은 약 2 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 목적상, 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 요인들에 따라서, 약 3 µg/kg 내지 30 µg/kg 내지 300 µg/kg 내지 3 mg/kg, 내지 30 mg/kg, 내지 100 mg/kg 또는 그 초과 범위일 것이다. 예를 들어, 약 1 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 및 약 25 mg/kg의 투여량을 사용할 수 있다. 장애에 따라서 수일에 걸쳐 또는 그 보다 더 길게 반복해서 투여하는 경우에는, 증상의 목적하는 역제가 일어나거나 또는 충분한 치료 수준이 달성될 때까지 치료를 지속하여, 예를 들어 종양 성장/진행 또는 암 세포의 전이를 억제 또는 지연시킨다. 예시되는 투여 요법은 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체의 약 2 mg/kg의 초기 용량을 투여한 다음, 매주 약 1 mg/kg의 유지 용량을 투여하거나 또는 격주마다 약 1 mg/kg의 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 기타 예시되는 투여 요법은 용량을 증가시키면서 투여하는 것을 포함한다 (예를 들어, 1 mg/kg의 초기 용량을 투여하고, 매주 또는 그 보다 더 긴 기간 동안 1회 이상의 더 높은 용량으로 점차적으로 증가시켜 투여한다). 실행자가 달성하기를 원하는 약동학적 붐과 패턴에 따라서 기타 투여량 요법이 유용할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 일부 측면에서, 1주에 1회 내지 4회 투여하는 것이 고려된다. 다른 측면에서, 1개월에 1회, 또는 격월로 1회, 또는 3개월 마다 1회 투여하는 것 뿐만 아니라 매주, 격주 및 3주마다 투여하는 것이 고려된다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링할 수 있다. 투여 요법 (사용된 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체 포함)은 시간이 경과함에 따라 다양할 수 있다.

[0358] 본 발명의 목적상, EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체의 적당한 투여량은 이용된 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체 (또는 그의 조성물), 치료하고자 하는 증상의 유형 및 중증도, 작용제가 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 기존의 요법, 환자의 병력 및 상기 작용제에 대한 반응, 투여된 작용제에 대한 환자의 청소율, 및 담당의의 재량에 좌우될 것이다. 임상적 목적하는 결과 및 그 이상의 것을 달성시켜 주는 투여량에 도달



할 때까지 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체를 투여할 수 있다. 용량 및/또는 횟수는 시간 과정에 따라 다양할 수 있지만, 일정하게 유지될 수도 있다. 실험적 고려 사항, 예컨대 반감기가 일반적으로, 투여량을 결정하는 데 기여할 것이다. 예를 들어, 인간 면역 시스템과 화합성인 항체, 예컨대 인간화 항체 또는 완전한 인간 항체를 이용하여, 이러한 항체의 반감기를 연장시키고 항체가 숙주의 면역 시스템에 의해 공격받는 것을 방지할 수 있다. 투여 횟수는 요법의 과정에 따라 결정할 수 있고 조정할 수 있으며, 반드시 아니지만 일반적으로, 증상의 치료 및/또는 억제 및/또는 완화 및/또는 지연, 예를 들어 종양 성장 억제 또는 지연 등에 근거한다. 또 다른 한편으로, EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체의 지속적인 연속적 방출 제형이 적당할 수 있다. 지속적인 방출을 달성하기 위한 각종 제형 및 장치는 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0359] 본 발명의 일부 측면에서, EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체에 대한 투여량은 이러한 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체를 1회 이상 투여한 개체에게서 실험적으로 결정될 수 있다. EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체의 증분 투여량이 개체에게 제공된다. 효능을 평가하기 위하여, 장애의 지표를 추적할 수 있다.

[0360] 본 발명의 방법에 따라서 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체를 투여하는 것은, 예를 들어 수용자의 생리학적 장애, 투여 목적이 치료적인지 아니면 예방적인지의 여부, 및 통상의 실행자에게 공지된 기타 요인들에 따라서 연속적이거나 또는 간헐적일 수 있다. EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체의 투여는 본질적으로, 미리 선택된 기간에 걸쳐 연속적일 수 있거나 또는 일련의 간격을 둔 용량일 수 있다.

[0361] IV.F. 조합 요법

[0362] 본 발명의 일부 측면에서, 본원에 기재된 방법은 대상체를 부가 형태의 요법으로 치료하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 부가 형태의 요법은 화학요법, 방사선, 수술, 호르몬 요법, 및/또는 부가의 면역요법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 부가의 항암 요법이다.

[0363] 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체는 초기 치료로서 투여될 수 있거나, 또는 통상적인 요법에 반응이 없는 장애를 치료하기 위하여 투여될 수 있다. 또한, EFNA4 항체-약물 접합체는 다른 요법 (예를 들어, 외과적 절제, 방사선, 부가의 항암 약물 등)과 조합하여 사용됨으로써, 부가적 또는 증강된 치료 효과를 유발시킬 수 있고/있거나 일부 항암제의 간세포독성을 저하시킬 수 있다. 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 부가의 작용제와 공동 투여되거나 또는 공동 제제화될 수 있거나, 또는 부가의 작용제와 어떠한 방식으로든 연속적으로 투여하기 위하여 제제화될 수 있다.

[0364] 조합 요법에 유용한 대표적인 작용제는 "약물"이란 부제 하에 EFNA4 항체-약물 접합체의 제조에 유용한 것으로서 상기 본원에 기재된 약물 중 어느 것을 포함한다. 본 발명의 EFNA4 항체-약물 접합체는 또한, 다른 치료 항체 및 항체-약물 접합체와 조합하여 사용될 수 있는데, 이는 상기 개시된 항-EFNA 항체 이외의 항-EFNA 항체 뿐만 아니라 상이한 항원을 표적화하는 항체 및 접합체를 포함한다. 단독으로 사용될 수 있거나 또는 항체-약물 접합체로서 사용될 수 있는 대표적인 항체는 항-5T4 항체 (예를 들어, A1, A2, 및 A3), 항-CD19 항체, 항-CD20 항체 (예를 들어, RITUXAN®, ZEVALIN®, BEXXAR®), 항-CD22 항체, 항-CD33 항체 (예를 들어, MYLOTARG®), 항-CD33 항체-약물 접합체, 항-루이스(Lewis) Y 항체 (예를 들어, Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), 항-HER-2 항체 [예를 들어, HERCEPTIN® (트라스투주맙(trastuzumab)), MDX-210, OMNITARG.RTM. (페르투주맙(pertuzumab), rhuMab 2C4)], 항-CD52 항체 (예를 들어, CAMPATH®), 항-EGFR 항체 [예를 들어, ERBITUX® (세특시맙(cetuximab)), ABX-EGF (판티투무맙(panitumumab))], 항-VEGF 항체 [예를 들어, AVASTIN® (베바시주맙(bevacizumab))], 항-DNA/히스톤 복합 항체 (예를 들어, ch-TNT-1/b), 항-CEA 항체 (예를 들어, CEA-Cide, YMB-1003) hLM609, 항-CD47 항체 (예를 들어, 6H9), 항-VEGFR2 (또는 키나제 삽입 도메인-함유 수용체, KDR) 항체 (예를 들어, IMC-1C11), 항-Ep-CAM 항체 (예를 들어, ING-1), 항-FAP 항체 [예를 들어, 시브로투주맙(sibrotuzumab)], 항-DR4 항체 (예를 들어, TRAIL-R), 항-프로게스테론 수용체 항체 (예를 들어, 2C5), 항-CA19.9 항체 (예를 들어, GIVAREX®) 및 항-피브린 항체 (예를 들어, MH-1)를 포함한다.

[0365] 상기 개시된 EFNA4 항체-약물 접합체는 또한, 치료 요법의 일부로서 세포독성제의 한 가지 이상의 조합물과 함께 투여할 수 있다. 이러한 목적에 유용한 세포독성 제제는 CHOPP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 및 프레드니손); COP (시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손); CAP-BOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 프로카르바진, 블레오마이신, 빈크리스틴 및 프레드니손); m-BACOD (메토트렉세이트, 블레오마이신, 독소루비신, 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 텍사메타손, 및 류코보린); ProMACE-MOPP (프레드니손, 메토트렉세이트, 독소루비신, 시클로포스파미드, 에토포시드, 류코보린, 메클로에타민, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); ProMACE-CytaBOM (프레드니손, 메토트렉세이트, 독소루비신, 시클로포스파미드, 에토포시드, 류코보린, 시타라빈, 블레오마이신

및 빈크리스틴); MACOP-B (메토티렉세이트, 독소루비신, 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손, 블레오마이신 및 류코보린); MOPP (메클로에타민, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); ABVD (아드리아마이신/독소루비신, 블레오마이신, 빈블라스틴 및 다카르바진); ABV (아드리아마이신/독소루비신, 블레오마이신, 빈블라스틴)와 교대하는 MOPP (메클로에타민, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); ABVD (아드리아마이신/독소루비신, 블레오마이신, 빈블라스틴 및 다카르바진)와 교대하는 MOPP (메클로에타민, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진); ChIVPP (클로람부실, 빈블라스틴, 프로카르바진, 프레드니손); IMVP-16 (이포스파미드, 메토티렉세이트, 에토포시드); MIME (메틸-개그, 이포스파미드, 메토티렉세이트, 에토포시드); DHAP (텍사메타손, 고용량 시타라빈 및 시스플라틴); ESHAP (에토포시드, 메틸프레디솔론, HD 시타라빈, 및 시스플라틴); CEPP(B) (시클로포스파미드, 에토포시드, 프로카르바진, 프레드니손 및 블레오마이신); CAMP (로무스틴, 미토산트론, 시타라빈 및 프레드니손); 및 CVP-1 (시클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손); DHAP (시스플라틴, 고용량 시타라빈 및 텍사메타손); CAP (시클로포스파미드, 독소루비신, 시스플라틴); PV (시스플라틴, 빈블라스틴 또는 빈데신); CE (카르보플라틴, 에토포시드); EP (에토포시드, 시스플라틴); MVP (미토마이신, 빈블라스틴 또는 빈데신, 시스플라틴); PFL (시스플라틴, 5-플루오로우라실, 류코보린); IM (이포스파미드, 미토마이신); IE (이포스파미드, 에토포시드); IP (이포스파미드, 시스플라틴); MIP (미토마이신, 이포스파미드, 시스플라틴); ICE (이포스파미드, 카르보플라틴, 에토포시드); PIE (시스플라틴, 이포스파미드, 에토포시드); 비오렐빈 및 시스플라틴; 카르보플라틴 및 파클리탁셀; CAV (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴); CAE (시클로포스파미드, 독소루비신, 에토포시드); CAVE (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 에토포시드); EP (에토포시드, 시스플라틴); 및 CMCcV (시클로포스파미드, 메토티렉세이트, 로무스틴, 빈크리스틴)를 포함한다.

[0366] EFNA4 항체-약물 접합체는 전신 항암 약물, 예컨대 에피틸론 (BMS-247550, Epo-906), 탁산의 제제형 [아브락산 (Abraxane), 크소탁스(Xyotax)], 마이크로튜불린(microtubulin) 억제제(MST-997, TTI-237)와 조합하여 사용되거나, 또는 표적화 세포독소, 예컨대 CMD-193 및 SGN-15와 조합하여 사용될 수 있다. 부가의 유용한 항암제는 TAXOTERE®, TARCEVA®, GEMZAR® (젠티타빈), 5-FU, AVASTIN®, ERBITUX®, TROVAX®, 아나투모맙, 마페나톡스, 레트라졸, 도세탁셀, 및 안트라시클린을 포함한다.

[0367] 조합 요법의 경우, EFNA4 항체-약물 접합체 및/또는 한 가지 이상의 부가의 치료제 또는 진단제는 의도한 요법 또는 진단의 성능에 적합한 어느 기간 내에 투여한다. 따라서, 단일 작용제는 실질적으로 동시에 (즉, 단일 제형으로서 또는 수 분 또는 수 시간 내에) 투여될 수 있거나 또는 어떠한 순서로든 연속적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 단일 작용제 치료는 서로 약 1년 이내, 예컨대 약 10, 8, 6, 4, 또는 2개월 이내, 또는 4, 3, 2 또는 1주 이내, 또는 약 5, 4, 3, 2 또는 1일 이내에 투여할 수 있다. EFNA4 항체-약물 접합체를 제2의 치료제와 조합하여 투여하면 바람직하게, 어느 한 가지를 단독으로 투여한 경우 보다 더 큰 효과가 유발된다.

[0368] 본 발명의 일부 측면에서, 부가 형태의 요법은 본원에 기재된 바와 같은 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체 이외에 한 가지 이상의 치료제를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 치료제는 제2의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 항-HER2 항체, 항-CD25 항체, 및/또는 항-CD20 항체), 혈관형성 억제제, 세포독성제, 소염제 (예를 들어, 파클리탁셀, 도세탁셀, 시스플라틴, 독소루비신, 프레드니손, 미토마이신, 프로게스테론, 타목시펜, 또는 플루오로우라실)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0369] 본 발명의 일부 측면에서, 2개 이상의 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체가 존재할 수 있다. 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상의 상이한 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체가 존재할 수 있다. 일반적으로, 이들 EFNA4 항체 또는 EFNA4 항체-약물 접합체는 서로에 대해 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, 다음 EFNA4 항체 중 하나 이상을 사용할 수 있다: EFNA4 상의 하나의 에피토프에 대해 유도된 제1 EFNA4 항체, 및 EFNA4 상의 상이한 에피토프에 대해 유도된 제2 EFNA4 항체.

[0370] 개시된 조합 요법은 상승적 치료 효과, 즉 그들 개개의 효과 또는 치료 성과의 합 보다 더 큰 효과를 유발시킬 수 있다. 측정 가능한 치료 성과는 본원에 기재되어 있다. 예를 들어, 상승적 치료 효과는 단일 작용제에 의해 유발된 치료 효과 또는 소정의 조합물의 단일 작용제에 의해 유발된 치료 효과의 합 보다 적어도 약 2배 더 크거나, 또는 적어도 약 5배 더 크거나, 또는 적어도 약 10배 더 크거나, 또는 적어도 약 20배 더 크거나, 또는 적어도 약 50배 더 크거나, 또는 적어도 약 100배 더 큰 효과일 수 있다. 상승적 치료 효과는 또한, 단일 작용제에 의해 유발된 치료 효과 또는 소정의 조합물의 단일 작용제에 의해 유발된 치료 효과의 합과 비교해서 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 40% 이상, 또는 50% 이상, 또는 60% 이상, 또는 70% 이상, 또는 80% 이상, 또는 90% 이상, 또는 100% 이상 치료 효과가 증가된 것으로서 관찰될 수 있다. 상승적 효과는 또한, 이들을 조합하여 사용하는 경우에, 치료제의 투여량을 감소시켜 줄 수 있는 효과이다.

- [0371] 상세한 설명 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 용어 "약"은 달리 표시되지 않는 한, 용어 "약" 다음의 값의 +/- 1% 값을 의미한다.
- [0372] **실시예**
- [0373] 다음 실시예는 단지 예시 목적으로 제공되고, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 실제로, 본원에 제시되고 기재된 것 이외에 본 발명의 각종 변형이 전술된 설명으로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 이는 첨부된 청구범위의 범위 내에 속한다.
- [0374] **실시예 1**
- [0375] **항-EFNA4 항체의 생성**
- [0376] 국제 공개 번호 W02012/118547에 기재된 바와 같이, hEFNA4-ECD-Fc, hEFNA4-ECD-His, EFNA4를 과발현하는 완전 세포 BALB/c 3T3 세포, 또는 본원에 제시된 바와 같은 혈장 프랩 (ECD - 세포외 도메인)을 접종함으로써 EFNA4 무린 항체를 생성하였다. 시판용 출발 물질 (예를 들어, 재조합 인간 에프린-A4 Fc 키메라, CF R&D 시스템즈 #369-EA-200) 및/또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 기술을 이용하여 면역원을 모두 제조하였다.
- [0377] 암컷 마우스 (Balb/c, CD-I, FVB)를 EFNA4 항원의 각종 제제로 면역시킴으로써 EFNA4 무린 항체를 생성하였다. 면역원은 Fc 구축물 또는 His 태그부착된 인간 EFNA4,  $10^7$ 개의 과발현성 EFNA4 293 세포로부터 추출된 막 분획, 또는 표면 상의 인간 EFNA4를 과발현하는 완전 3T3 세포를 포함하였다. 모든 주사제에 대해 발바닥 경로를 통하여 마우스를 면역시켰다. 등 용적의 TITERMAX 또는 백반 아주반트로 유화시킨  $10 \mu\text{g}$ 의 EFNA4 면역원 또는  $1 \times 10^6$ 개 세포 또는 세포 등가물을 면역에 사용하였다. 면역시킨 후, 마우스를 안락사시키고, 배액 림프절 (확대된 경우, 오금 및 사타구니)을 절제 제거하며, 이를 항체 생산 세포를 위한 공급원으로서 사용하였다. 조직 분쇄기를 이용하여 림프절을 기계적으로 붕괴시킴으로써 림프구를 방출시켰다.
- [0378] 2가지 융합 프로토콜 중 한 가지를 사용하였다. 첫 번째로는 제네트로닉(Genetronic) 장치를 이용한 전기세포 융합을 수행한 다음, 폴리클로날 하이브리도마를 도말하고 후속 서브클로닝을 이용하여 스크리닝하여 모노클로날 하이브리도마를 생성하였다. 두 번째로는 BTX 기기를 이용한 전기세포융합을 수행한 다음, 대량으로 하이브리도마 라이브러리의 성장 및 클론의 후속 스크린을 이용한 하이브리도마의 단일 세포 침착이 후속하였다.
- [0379] 제네트로닉 장치 융합 프로토콜: B 세포의 단일 세포 현탁액을, ATCC CRL-1580으로부터 구입한 비-분비성 P3x63Ag8.653 골수종 세포 (문헌 [Kearney et al., J. Immunol. 123: 1548-1550 (1979)])과 1:1의 비로 혼합함으로써 융합을 수행하였다. 이러한 세포 혼합물을 800 g로 원심분리함으로써 온화하게 펠릿화하였다. 상등액을 완전히 제거한 후, 세포를 2 내지 4 mL의 프로나제 용액으로 2분 이하 동안 처리하였다. 융합 발생기 모델 ECM2001 [제네트로닉, 인크. (Genetronic, Inc.)]을 이용하여 전기세포융합을 수행하였다. 세포를 평저 미세역가 판에서  $2 \times 10^4$ 개/웰로 도말한 다음, 선택적 HAT 배지 [시그마(Sigma), CRL P-7185]에서 2주 인큐베이션하였다. 이어서, 개개의 웰을 대상으로 하여, ELISA 및 FACS에 의해 항-인간 EFNA4 모노클로날 IgG 항체에 대해 스크리닝하였다.
- [0380] ELISA 미세역가 판을, 카르보네이트 완충제 중에서  $100 \text{ ng/}$ 웰로 형질감염된 293 세포로부터 정제된 재조합 EFNA4 His 융합 단백질로 코팅하였다. 판을  $4^\circ\text{C}$  하에 밤새 인큐베이션한 다음, PBS/트윈(Tween) (0.05%) 중의 3% BSA의  $200 \mu\text{l/}$ 웰로 차단하였다. 하이브리도마 판으로부터의 상등액을 각 웰에 가하고, 주위 온도 하에 1 내지 2시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 판을 PBS/트윈으로 세척한 다음, 실온 하에 1시간 동안 서양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP) [잭슨 면역노리서치(Jackson ImmunoResearch)]와 접합된 Fc 단편 특이적인 염소 항 마우스 IgG와 함께 인큐베이션하였다. 세척한 후, 상기 판을 TMB 기질 [더모 사이언티픽(Thermo Scientific) 34028]로 현상하였고, OD 450에서 분광광도계로 분석하였다.
- [0381] 양성 웰로부터 EFNA4 분비된 하이브리도마를 제한 희석 또는 단일 세포 FACS 분류에 의해 재스크리닝 및 서브클로닝하였다. 제한 희석 도말을 이용하여 선택된 항원-양성 웰 상에서 서브클로닝을 수행하였다. 판을, 단일 집락 성장의 존재에 대해 가시적으로 검사한 다음, 단일 집락 웰로부터의 상등액을 상기 언급된 항원-특이적 ELISA 및 다음에 기재되는 바와 같은 FACS 확증에 의해 스크리닝하였다. 이로써 생성된 클로날 집단을 확장시키고, 냉동 배지 (90% FBS, 10% DMSO)에서 냉동보존하며, 액체 질소에서 저장하였다. EFNA4로 면역시킨 마우스로부터의 상기 융합으로 인해, 상기 언급된 ELISA 프로토콜을 이용하여 EFNA4에 대하여 반응성인 무린 모노클로

날 항체가 산출되었다.

[0382] BTX 기기 융합 프로토콜: B 세포의 단일 세포 현탁물을 전기세포융합에 의해 1:1의 비로 비-분비성 P3x63Ag8.653 골수종 세포와 융합하였다. 하이브리드 시스템(Hybrimune System), 모델 47-0300 [BTX 하바드 장치 (Harvard Apparatus)]를 이용하여 전기세포융합을 수행하였다. 융합된 세포를, 아자세린 (시그마 #A9666)으로 보충시킨 하이브리도마 선별 배지 [15% 태아 클론 I 혈청 (하이클론(Hyclone)), 10% BM 컨다임드 (Condimed) (로슈 어플라이드 사이언스(Roche Applied Sciences)), 1 mM 소듐 피루베이트, 4 mM L-글루타민, 100 IU 페니실린-스트렙토마이신, 50  $\mu$ M 2-머캅토에탄올, 및 100  $\mu$ M 히포크산틴을 함유하는 DMEM (셀그로 (Cellgro) cat#15-017-CM) 배지]에 재현탁시킨 다음, 플라스크당 90 ml 선별 배지로 4개의 T225 플라스크에 도말하였다. 이어서, 상기 플라스크를, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기를 함유하는 가습 37°C 인큐베이터에 6 내지 7일 동안 놓아둔다.

[0383] 성장 6 내지 7일째에, 라이브러리를 아리아(Aria) I 세포 분류기를 이용하여 48 팔콘(Falcon) 96 웰 U-바닥 판에서 웰당 1개 세포로 도말하였다. 간략하게 언급하면, 15% 태아 클론 I 혈청 (하이클론), 10% BM 컨다임드 (로슈 어플라이드 사이언스), 1 mM 소듐 피루베이트, 4 mM L-글루타민, 100 IU 페니실린-스트렙토마이신, 50  $\mu$ M 2-머캅토에탄올, 및 100  $\mu$ M 히포크산틴을 함유하는 배양 배지를 48 팔콘 96 웰 U-바닥 판에서 웰당 200  $\mu$ l로 도말하였다. 살아있는 하이브리도마를 아리아 I 세포 분류기를 이용하여 웰당 1개 세포로 놓아두고, 10 내지 11일 동안 배양하며, 상등액을 EFNA4에 대하여 반응성인 항체에 관하여 FACS 또는 ELISA에 의해 검정하였다.

[0384] 마우스 면역글로불린을 분비하는 성장 양성 하이브리도마 웰을 대상으로 하여, 상기 언급된 바와 유사한 ELISA 검정을 이용하여 뮤린 EFNA4 특이성에 관하여 스크리닝하였다. 간략하게 언급하면, 96 웰 판 (VWR, 610744)을 4°C 하에 밤새 탄산나트륨 완충제 중의 1  $\mu$ g/mL 뮤린 EFNA4-His로 코팅하였다. 상기 판을 세척하고, 37°C 하에 1시간 동안 2% FCS-PBS로 차단시키며, 즉시 사용하거나 4°C 하에 유지시켰다. 희석되지 않은 하이브리도마 상등액을 상기 판 상에서 RT 하에 1시간 동안 인큐베이션하였다. 판을 세척하고, RT 하에 1시간 동안 1% BSA-PBS 중에서 1:10,000로 희석된 HRP 표지된 염소 항-마우스 IgG로 프로빙하였다. 이어서, 상기 판을 상기 언급된 바와 같은 기질 용액과 함께 인큐베이션하고 OD 450 하에 판독하였다. 인간 EFNA4와 고 친화도로 결합되는 것으로 예시되는 뮤린 항체 E2, E5, E8, E15, E22, E31, E47, E60, E73, E76, E91 및 E105의 아미노산 서열 및 관련 핵산 서열 (CDR에 밑줄이 그어져 있다)이 국제 공개 번호 W02012/118547에 제공된다.

[0385] 본 발명의 각종 뮤린 항-EFNA4 항체의 결합 특징이 표 3에 제시되어 있다. 이러한 항체는 나노몰 범위의 비교적 높은 친화도를 나타내었고, EFNA4 단백질 상의 에피토프 또는 적어도 3개의 상이한 빈(bin)과 결합한다. 대부분의 항-EFNA4 항체는 항원하고만 반응한 반면 (여기서, 디설피드 결합은 무손상 (NR)된다), E22 및 E91은 비 환원된 항원과 환원된 항원 (NR/R) 둘 다와 반응하였다. E22 및 E91은 서열 QRFTPFSLGFE (서열 137) 및 RLLRGDAVVE (서열 138)를 각각 인식하였다. 추가로, E5, E15, E91 및 E105는 마우스 EFNA4와 교차 반응성이고, 모든 항체는 고도로 유사한 시노몰구스 EFNA4와 교차 반응하였다. 세포를 중화시킬 수 (즉, 수용체 리간드 상호 작용, 특이적으로 EFNA4-EphA2를 차단할 수) 있고/있거나 내재화할 수 있는 항체의 능력이, 세포를 사멸시킬 수 있는 능력과 함께 또한 제공된다.

[0386] <표 3>

클론	빈	친화도 (nM)	웨스턴 반응성	마우스 XR	시노 XR	중화	내재화	사멸
E2	A	20 <sup>F</sup>	NR	없음	ND	없음	있음	있음
E5	B	0.3 <sup>B</sup>	NR	있음	있음	없음	있음	있음
E15	B	4.8 <sup>B</sup>	NR	있음	있음	ND	있음	있음
E22	A	3.1 <sup>B</sup>	NR/R	없음	있음	없음	있음	있음
E31	A	11 <sup>B</sup>	NR	ND	ND	있음	있음	있음
E47	C	<0.1 <sup>B</sup>	NR	없음	있음	있음	있음	있음
E76	A	0.4 <sup>F</sup>	NR	ND	ND	없음	있음	ND
E91	B	0.2 <sup>B</sup>	NR/R	있음	있음	없음	있음	있음
E105	B	16 <sup>F</sup>	ND	있음	있음	ND	있음	있음

[0387]

[0388] <sup>B</sup> 비아코어 친화도; <sup>F</sup> 포르테(Forte)BIO 사내 비교; ND: 결정되지 않음



[0389] 실시예 2

[0390] 항-EFNA4 항체의 인간화

[0391] 국제 공개 번호 W02012/118547에 추가로 기재된 바와 같이, 실시예 1로부터의 무린 항체 중 4개를, 상보성 결정 영역 (CDR) 이식화를 이용하여 인간화시켰다. 기능적 인간 생식세포 계열 유전자에 대하여 서열 및 구조 유사성에 근거하여, 중쇄 및 경쇄에 대한 인간 골격을 선별하였다. 문헌 ([Chothia et al.] 상기 참조)에 기재된 바와 같이, 마우스 표준 CDR 구조를 동일한 표준 구조를 갖는 인간 후보와 비교함으로써 구조적 유사성을 평가하였다.

[0392] 보다 특히, 무린 항체 E5, E15, E22 및 E47을, 컴퓨터 이용 CDR-이식화 방법 [아비시스(Abysis) 데이터베이스, UCL 비즈니스 Pic.] 및 표준 분자 공학 기술을 이용하여 인간화시켜, 인간화 항체 E5, E15, E22 및 E47 (각각 huE5, huE15, huE22 및 huE47로 후술됨)을 생성하였다. 마우스 골격 서열 및 그의 표준 구조와 가장 높은 서열 상동성에 근거하여 가변 영역의 인간 골격 영역을 선별하였다. 분석할 목적으로, CDR 도메인 각각에 대하여 아미노산을 할당하는 것은 카바트 등의 넘버링에 따른다. 최적의 인간화 항체를 생성시키기 위하여 몇 가지 인간화 항체 변이체를 만들었는데, 상기 인간화 항체는 일반적으로, 인간 골격 영역과 연합하여 마우스 하이브리도마로부터의 항원 결합성 상보성 결정 영역 (CDR)을 보유하고 있다. 비아코어 시스템을 이용하여 측정된 바와 같이, HuE15, huE22 및 huE47 mAb는 그들의 무린 대응물과 유사한 친화도로 EFNA4 항원과 결합되었고, huE5는 약간 더 낮은 친화도로 결합되었다.

[0393] 관련 기술분야에서 승인된 기술을 이용하여 분자 공학 과정을 수행하였다. 제조업자의 프로토콜 [트리졸 (Trizol®) 플러스 RNA 정제 시스템, 라이프 테크놀로지(Life Technologies)]에 따라서 하이브리도마로부터 전체 mRNA를 추출하였다. 완전한 마우스 레퍼토리를 표적으로 하도록 설계된, 32개의 마우스 특이적 5' 리더 서열 프라이머를 포함한 프라이머 혼합물을 3' 마우스 C $\gamma$ 1 프라이머와 조합하여 사용하여, 항체 중쇄의 가변 영역을 증폭시키고 서열 분석하였다. 유사하게, 마우스 카파 불변 영역에 대해 특이적인 단일 역배향 프라이머와 조합된 V $\kappa$  마우스 계열 각각을 증폭시키도록 설계된 32개의 5' V $\kappa$  리더 서열 프라이머 혼합물을 사용하여, 카파 경쇄를 증폭시키고 서열 분석하였다. 역전사효소 중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)을 이용하여 100 ng 전체 RNA로부터 V $H$  및 V $L$  전사물을 증폭시켰다.

[0394] 총 8개의 RT-PCR 반응을 각 하이브리도마에 대하여 수행하였는데: V 카파 경쇄에 대해 4개의 반응을 수행하였고 V 감마 중쇄 ( $\gamma$ 1)에 대해 4개의 반응을 수행하였다. 퀴아젠(QIAGEN) 1 단계 RT-PCR 키트를 증폭에 사용하였다 [퀴아젠, 인크.(Qiagen, Inc.)]. 특이적 V 영역 프라이머를 이용하여, 상기 추출된 PCR 생성물을 직접적으로 서열 분석하였다. IMGT를 이용하여 뉴클레오타이드 서열을 분석하여, 가장 높은 서열 상동성을 나타내는 생식세포 계열 V, D 및 J 유전자 구성원을 확인하였다. 이와 같이 유래된 서열을, VBASE2 데이터베이스의 분석 (상기 문헌 [Retter et al.] 참조)으로부터 유래된 Ig V- 및 J-영역의 공지된 생식세포 계열 DNA 서열과 비교하였고, V $H$  및 V $L$  유전자를 마우스 생식세포 계열 데이터베이스에 대하여 정렬시킴으로써 비교하였다.

[0395] 뉴클레오타이드 서열 정보로부터, E5, E15, E22 및 E47의 중쇄 및 경쇄의 V, D 및 J 유전자 절편에 관한 데이터를 획득하였다. 이러한 서열 데이터에 근거하여, 재조합 모노클로날 항체를 클로닝하기 위한, 항체의 Ig V $H$  및 V $\kappa$  쇄의 리더 서열에 대해 특이적인 새로운 프라이머 세트를 설계하였다. 연속해서, V-(D)-J 서열을 마우스 Ig 생식세포 계열 서열과 정렬하였다.

[0396] E5, E15, E22 및 E47의 중쇄 및 경쇄 유전자를 확인하였는데, 그 결과가 다음 표 4에 요약되어 있다.

[0397] <표 4>

클론	마우스 이소형	VH	DH	JH	VL	JL
E5	IgG1/K	IGHV2-6	없음	JH3	IGKV6-15	JK2
E15	IgG1/K	IGHV5-6	DSP2.9	JH3	IGKV6-b	JK5
E22	IgG2b/K	VhJ558	DFL16.1e	JH4	IGKV1-110	JK1
E47	IgG1/K	IGHV1-26	P1inv	JH2	IGKV21-7	JK1

[0398]

[0399] 4개 클론 모두로부터 획득된 중쇄 및 경쇄 서열을 기능적 인간 가변 영역 서열과 정렬하고 상동성 및 표준 구조에 관하여 고찰하였다. 중쇄 및 경쇄 분석 결과가 다음 표 5 및 6에 각각 제시되어 있다.



<표 5>

클론	인간 VH	인간 DH	인간 JH	인간 생식세포 계열 서열에 대한 상동성 %	마우스 서열에 대한 상동성 %
E5	VH3-66	IGHD2	JH4	82	75
E15	VH3-21	IGHD5-5	JH4	88	88
E22	VH1-18	IGHD5-24	JH6	87	83
E47	VH1-46	IGHD3-10	JH4	91	76

<표 6>

클론	인간 VK	인간 JK	인간 생식세포 계열 서열에 대한 상동성 %	마우스 서열에 대한 상동성 %
E5	L1	JK2	86	79
E15	A27	JK4	89	76
E22	A18b	JK1	89	91
E47	L6	JK4	87	84

생식세포 계열 선별과 CDR 이식화 과정은 일반적으로 그의 결합 특징을 보유하고 있는 항체를 제공하는 것으로 나타났고, 대부분의 구축물에서는 유리 잔기를 삽입할 필요가 거의 없었다. 그러나, huE15에서는 중쇄 잔기 68 이 Thr (T)에서 Lys (K)로 복귀 돌연변이되어 항체 특징을 개선시켰다.

huE5, huE15, huE22 및 huE47의 아미노산 서열 및 관련 핵산 서열이 상기 표 2에 제시되어 있다. huE5, huE15, huE22 및 huE47에 대한 VH 영역의 아미노산 서열이 서열 5, 서열 9, 서열 13 및 서열 39에 각각 제시되어 있고, 상응하는 핵산 서열은 서열 6, 서열 10, 서열 14 및 서열 40에 제시되어 있다. huE5, huE15, huE22 및 huE47의 카파 VL 영역의 아미노산 서열이 서열 7, 서열 11, 서열 27 및 서열 53에 각각 제시되어 있고, 상응하는 핵산 서열은 서열 8, 서열 10, 서열 28 및 서열 54에 제시되어 있다.

### 실시예 3

#### 인간화 항-*EFNA4* 항체의 발현

관련 기술분야에서 승인되고 국제 공개 번호 W02012/118547에 기재된 기술을 이용하여, 항-*EFNA4* 항체 huE5, huE15, huE22 및 huE47을 발현 및 단리하였다. 그 목적을 달성하기 위하여, 양 중쇄의 합성 인간화 가변 DNA 단편 [인티그레이티드 DNA 테크놀로지(Integrated DNA Technologies)]을 인간 IgG1 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 가변 경쇄 단편을 인간 C-카파 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 중쇄와 경쇄를 CHO 세포 내로 공동-형질감염시킴으로써 항체를 발현하였다.

보다 특히, 항체 생성을 위하여, 유리 및 인간화 가변 유전자 PCR 생성물을 인간 면역글로불린 발현 벡터 내로 지향적 클로닝하였다. Ig 유전자 특이적 PCR에 사용된 모든 프라이머는 인간 IgG1 및 IGH 불변 영역을 각각 함유하는 발현 벡터 내로의 클로닝을 지시할 수 있는 제한 부위 (IGH의 경우에는 AgeI 및 XhoI이고, IGK의 경우에는 XmaI 및 DraIII이다)를 포함하였다. 간략하게 언급하면, 퀴아퀵(Qiaquick) PCR 정제 키트 (퀴아젠, 인크.)를 이용하여 PCR 생성물을 정제한 다음, AgeI 및 XhoI (IGH), XmaI 및 DraIII (IGK)로 각각 분해하였다. 분해된 PCR 생성물을 발현 벡터 내로 결찰시키기에 앞서 정제하였다. 결찰 반응은 200U T4-DNA 리가제 [뉴 잉글랜드 바이오랩(New England Biolabs)], 7.5  $\mu$ L의 분해된 및 정제된 유전자 특이적 PCR 생성물 및 25 ng 선형화 벡터 DNA를 이용하여 총 용적 10  $\mu$ L으로 수행하였다. 적절한 이. 콜라이 (*E. coli*) DH10B 박테리아 (라이프 테크놀로지)를 42°C에서 열 쇼크 하에 3  $\mu$ L 결찰 생성물로 형질전환시키고, 앰피실린 판 (100  $\mu$ g/mL) 상으로 도말하였다. 이어서, V<sub>H</sub> 영역의 AgeI-EcoRI 단편을 pEE6.4HuIgG1 발현 벡터의 동일한 부위 내로 삽입한 반면, 합성 XmaI-DraIII V<sub>K</sub> 삽입물은 각각의 pEE12.4Hu-카파 발현 벡터의 XmaI-DraIII 부위 내로 클로닝하였다.

293 펩틴을 이용하여 HEK 293 세포를 적당한 플라스미드로 형질감염시킴으로써, 인간화 항체를 생산하는 세포를 생성시켰다. 플라스미드 DNA를 QIA프랩 스핀 칼럼 (퀴아젠)으로 정제하였다. 인간 배아 신장 (HEK) 293T (ATCC 번호 CRL-1 1268) 세포를, 10% 열 불활성화 FCS, 100  $\mu$ g/mL 스트렙토마이신, 100  $\mu$ g/mL 페니실린 G (모두 라이프 테크놀로지로부터 입수함)로 보충시킨 돌베크(Dulbecco) 변형 이글 배지 (DMEM)에서 표준 조건 하에 150 mm 판 [팔콘, 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)]에서 배양하였다.

[0411] 일시적인 형질감염을 위해, 세포를 80% 전면생장물로 성장시켰다. 등량의 IgH와 상응하는 IgL 쇠 벡터 DNA (각 벡터 DNA 12.5  $\mu$ g)를, 1.5 mL 옵티-MEM 중의 50  $\mu$ L HEK 293 형질감염 시약과 혼합된 1.5 mL 옵티-MEM에 가하였다. 이 혼합물을 실온 하에 30분 동안 인큐베이션하고, 배양 판에 균등하게 분포시켰다. 형질감염시킨지 3일 후에 상등액을 수거하고, 10% FBS로 보충시킨 20 mL의 신선한 DMEM으로써 대체한 다음, 형질감염 후 6일째에 다시 수거하였다. 10분 동안 800 xg으로 원심분리함으로써 배양 상등액에서 세포 부스러기를 제거하고, 4℃ 하에 저장하였다. 재조합 키메라 및 인간화 항체를 단백질 G 비드 [GE 헬스케어(Healthcare)]로 정제하였다.

#### [0412] 실시예 4

#### [0413] 항-EFNA4 항체의 결합 특성

[0414] 국제 공개 번호 W02012/118547에 기재된 바와 같이, 본 발명의 E15, E22 및 E47 항체의 결합 특징이 표 7에 제시되어 있다.

[0415] <표 7>

클론	빈	mAb 이소형	마우스 Ag 친화도	시노 Ag 결합성	Hu Ag 친화도 (뮤린 mAb)	Hu Ag 친화도 (인간화 mAb)
E15	B	chimHulgG1	3.4 nM	+	2.7 nM	4.8 nM
E22	A	mslgG2b	>100nM	+	3.1 nM	3.8 nM
E47	C	mslgG1	>100nM	+	<0.1 nM	<0.1 nM

[0416]

[0417] ELISA를 이용하여 추가의 특성을 결정하여, 상동 계열 구성원 에프린-A1 (EFNA1) 및 에프린-A3 (EFNA3)과 함께 에프린-A4 (EFNA4)에 대한 항-EFNA4 항체 huE22 및 huE47의 결합 특이성을 분석하였다. 4℃ 하에 밤새 PBS 중의 바이오원 마이크로론(BioOne Microlon) [그라이너(Greiner)] 판 상에 코팅된 에프린-A1-His, 에프린-A3-huFc, 에프린-A4-huFc 및 에프린-A5-huFc (모두 R&D로부터 입수함)를 이용하여 직접 ELISA함으로써 항체 결합성을 결정하였다. 바이오틴-표지된 huE22 및 huE47을 실온 하에 2.5시간 동안 상기 판 상에서 인큐베이션하고 스트렙타비딘 HRP를 이용하여, 간접 인간 IgG 신호의 부재 하에 바이오틴 표지된 항체로부터 신호를 발생시켰다. 도 3A에 제시된 데이터는 huE22가 EFNA4와는 결합하지만, EFNA1, EFNA3 또는 EFNA5와는 그렇지 않다는 것을 입증해준다. 도 3B에 제시된 데이터는 huE47이 EFNA4와는 결합하지만, EFNA1 또는 EFNA3과는 그렇지 않다는 것을 입증해준다.

[0418] 인간화 항-EFNA4 항체 huE22 및 huE47의 결합성을 유동 세포계수법에 의해 EFNA4 발현성 세포 상에서 평가하였다. TrpLE 익스프레스(Express) (GIBCO cat #12604-021)를 이용하여 부착성 세포를 해리시키고, 세포 배양 배지로 중화시킨 다음 계수하였다. 세포를,  $5 \times 10^5$  개 세포/100  $\mu$ L 배지/웰을 수반한 U-바닥 96-웰 판 (BD 팔콘 cat #353077) 내로 도말하였다. 이러한 판을 4℃ 하에 5분 동안 300 xg로 원심분리하여 세포를 펠릿화하고 상등액을 경사 제거하였다. 모든 시약을 다음 단계를 위해 얼음 상에 유지시켰다. 각 펠릿을 PBS 중의 3% BSA에서 10  $\mu$ g/mL로 음성 대조군 항체, 또는 100  $\mu$ L 1차 인간화 항-EFNA4 항체 (huE22 또는 huE47)에 재현탁시켰다. 상기 판을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 판을 원심분리시키고, 세포 펠릿을 PBS 중의 200  $\mu$ L 3% BSA에서 세척하였다. 각 세포 펠릿을, PBS 중의 3% BSA에서 1:50으로 희석시킨, 100  $\mu$ L의 R-피코에리트린 (PE)-접합된 염소 항-인간 IgG Fc 단편 (잭슨 임뮤노리서치 cat #109-115-098)에 재현탁시켰다. 상기 판을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 판을 원심분리시키고, 세포 펠릿을 PBS 중의 200  $\mu$ L 3% BSA에서 세척하였다. 각 펠릿을 PBS 중의 100  $\mu$ L 3% BSA에 재현탁시키고, 이를 PBS 중의 250  $\mu$ L 3% BSA를 함유하는 5 mL 폴리카르보네이트 튜브 (BD 팔콘 cat #352054)에 옮겼다. 생육성 균주로서 샘플당 5  $\mu$ L 7AAD [B-D 파르민젠(Pharmingen) cat #51-68981E]를 이용하여 유동 세포계수함으로써 샘플을 분석하였다.

[0419] 인간 EFNA4의 고 발현을 가능하게 해주는 벡터를 이용하여 HEK293T의 안정적 형질감염체인 HEK293T-EFNA4 세포, 및 극히 낮은 수준의 EFNA4를 발현하는 HEK293T 부모 세포에 대해 상기 언급된 방식으로 항체 결합성을 측정하였다. 표 8은 EFNA4 발현성 세포주와 결합하는 항체의 평균 채널 형광 (MCF)을 나타낸다. huE22 및 huE47 항체는 HEK293T-EFNA4 과발현성 세포와는 강력하게 결합하지만, 부모 HEK293T 세포와는 그렇지 않음으로써 EFNA4 표적에 대한 특이성을 명확히 보여준다.

<표 8>

세포주	발현 수준	평균 채널 형광(MCF) 10 µg/ml 항체		
		huE22	huE47	비-결합성 대조군 IgG
HEK293T 부모	EFNA4 의 저 발현	7.2	데이터 없음	6.9
HEK293T-EFNA4	EFNA4 의 고 발현	1521	576	3.3

내인성 EFNA4 발현성 암 세포주를 분석하였다: 유방 세포주 BT-483, HCC202 및 MX-1, 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 세포주 MEC1 및 외투 세포 림프종 (MCL) 세포주 Z138. 표 9에 제시된 MCF 값은 항원의 내인성 발현을 나타내는 각종 암 세포주와 결합할 수 있는 항-EFNA4 항체, huE22 및 huE47의 능력을 입증해 준다.

<표 9>

세포주	종양 유형	평균 채널 형광(MCF) 10 µg/ml 항체		
		huE22	huE47	비-결합성 대조군 IgG
BT-483	유방	17.7	24	3.1
HCC202	유방	13.2	21.9	15.6
MX-1	유방	12.8	21.1	3.6
MEC1	B-만성 림프구성 백혈병 (B-CLL)	24	33	7.2
Z138	외투 세포 림프종 (MCL)	44	44	7.4

## 실시예 5

### 항-EFNA4 항체의 내재화 및 시험관내 세포독성

세포를 사포린 독소와 접합되는 1차 항체 및 2차 항체 (항원-결합성 단편, Fab)와 함께 인큐베이션하는 기능적 검정에서 huE22의 내재화를 평가하였다. 세포를 96-웰 판에 시딩하고, 밤새 인큐베이션한 다음, 각각 2차:1차 항체의 1.5:1의 물 비 하에 사포린-접합된 항-인간 Fab 단편 [어드밴스드 타겟팅 시스템즈(Advanced Targeting Systems) 카탈로그 번호 IT-51]을 수반한 huE22 또는 인간 IgG1 대조군 항체의 용량 반응에 4일 동안 노출시켰다. 이어서, MTS 검정 [프로메가(Promega) 카탈로그 번호 G5430]을 이용하여 세포 생육성을 측정하였고, 처리되지 않은 세포와 비교해서 세포 생육성을 50% 억제하는 1차 항체 농도 (IC<sub>50</sub>)를, 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어 상에서 로지스틱 비-선형 회귀에 의해 계산하였다.

1차 항체, 예컨대 huE22가 표적 세포 내로 내재화되고 사포린-접합된 Fab 단편을 상기 세포 내로 운반하는 경우에, 세포독성이 달성된다. 표 10에 제시된 바와 같이, huE22는 HEK293T 부모 세포에 비해 약 60배 특이성으로 HEK293T-EFNA4 세포에 사포린 매개된 세포독성을 부여한 반면, 대조군 1차 항체는 어느 하나의 세포주에 실제적 세포독성을 부여하지 못하였다. HEK293T-부모 세포에서 발현된 낮은 수준의 EFNA4는 대조군 항체 보다 더 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 생성시키는 huE22를 초래할 수도 있었다. 이들 결과는 huE22 항체가 표적-의존적 방식으로 상기 세포 내로 내재화되었다는 것을 입증해준다.

<표 10>

### 사포린-매개된 세포독성

세포주	IC <sub>50</sub> 값 (ng/mL)	
	huE22	대조군 IgG
HEK293T 부모	174	375
HEK293T-EFNA4	3	360

## 실시예 6

[0433] **항-EFNA4-AcBut-CM 항체-약물 접합체의 접합 및 정제**

[0434] **A. 접합**

[0435] 본 발명에서, 항-EFNA4 항체 huE22 및 huE47을 도 4A에 도시된 바와 같이, AcBut-N-아세틸- $\gamma$ -칼리케아미신 디메틸 히드라이드 (AcBut-CM) OSu 에스테르와 접합시켜, 도 4B에 도시된 바와 같이 huE22-AcBut-CM ADC 및 huE47-AcBut-CM ADC를 생성시켰다 (여기서, X는 어느 항체, 예컨대 huE22 및 huE47일 수 있다). AcBut-CM을 리신 잔기를 통하여 항-EFNA4 항체와 접합시켜, 약물-대-항체 비 (DAR)의 협소한 분포도를 갖는 항-EFNA4-AcBut-CM ADC를 생성시켰는데, 여기서 ADC의 약 70% 내지 80%가 3 내지 5의 DAR, 및 약 3 내지 5의 범위의 평균 DAR을 갖는다.

[0436] huE22-AcBut-CM을 생성시키기 위한 접합 반응 혼합물은 4 내지 4.5 대 1의 물 비 하의 정제된 huE22 항체 및 AcBut-CM OSu 에스테르 10 mg/ml 이하를 포함하였다. AcBut-CM을 혼합 와동에 부가하는 동안에 고 진탕을 수행하였다. 반응물 pH는 8.3이었고, 다른 반응 성분의 농도는 다음과 같다: 180 mM HEPES 완충제, 41 mM 소듐 데카노에이트, 및 8% (v/v) 에탄올. 반응을 33°C 하에 5분 동안 수행하였다. 접합 반응을 완료한 후, 반응 혼합물을, 혼합하면서 pH 8.5로 조정된 1.3 용적의 1M  $K_2HPO_4$ 로 서서히 희석시켰다. huE47-AcBut-CM ADC를 생성하기 위하여 유사한 반응 혼합물을 사용하였다.

[0437] **B. 정제**

[0438] 정제하기 위하여, 상기 희석된 반응 혼합물을, 도 5에 도시된 바와 같이 5 칼럼 용적 (cv)의 0.52 M 인산칼륨 완충제, pH 8.5에서 미리 평형화시킨 (상부 라인 280 nm 및 하부 라인 310 nm) 부틸 세파로스-4 신속 유동 HIC 칼럼 (GE 헬스케어) 상의 2개의 배치에 부하하였다. 상기 칼럼 상에 부하된 단백질은 배드 용적 1 ml당 3.5 mg이었다. 유속은 샘플 부하를 통하여 15 ml/분이었고, 크로마토그래피의 세척 및 용출 상 전반에 걸쳐 22 ml/분이었다. 이러한 개선된 구배는 상기 칼럼과 결합되었던 보다 높은 DAR ADC를 제거시켜 준다.

[0439] 부하 동안 결합되지 않은 분획은 주로 반응 시약이었고, 접합되지 않은 항체 대부분은 폐기되었다. 이어서, 상기 칼럼을 0.3 cv의 0.52 M 인산칼륨 완충제, pH 8.5로 세척하여, 남아있는 어떠한 시약도 제거하였다. 그 다음, 1 cv의 0.52 M에서 0.4 M까지의 인산칼륨 완충제, pH 8.5로의 단계 구배를 이용하여, 느슨하게 결합된 접합되지 않은 모든 항체를, 존재하는 경우 적게 부하된 항-EFNA4-AcBut-CM과 함께 용출시켰다. 이어서, 1 cv의 0.4 M에서 5 mM까지의 인산칼륨 완충제, pH 8.5의 단계 구배를 이용하여 주요 분획을 용출시켜, 3 내지 5의 DAR을 갖는 huE22-AcBut-CM을 구배의 말단 쪽으로 제공하였다. 보다 높은 DAR을 갖는 huE22-AcBut-CM 접합체가 존재하는 경우에는, 2 cv의 5 mM 인산칼륨 완충제, pH 8.5의 구배를 이용하여 상기 분획을 용출시킨 다음, 순수 탈이온수를 용출시켰다. 탈이온수 용출 후에도 여전히 결합된 채로 있는, 보다 높은 DAR을 갖는 어떠한 huE22-AcBut-CM 접합체도, 20% 에탄올을 함유하는 2 cv의 10 mM 수산화나트륨을 이용하여 용출시켰다.

[0440] 모세관 등전점 전기영동 [cIEF; iCE280, 프로테인심플(ProteinSimple)]을 이용하여, huE22-AcBut-CM ADC의 정제된 배치는 협소한 DAR 분포도를 갖는데, 여기서 상기 ADC의 약 70% 내지 80%, 바람직하게 약 75% 내지 80%는 3 내지 5의 DAR을 갖는다. 예를 들어, 도 9는 huE22-AcBut-CM ADC의 정제된 배치가 협소한 DAR 분포도를 갖는다는 것을 보여주는데, 여기서 ADC의 약 78%가 3 내지 5의 DAR을 갖는다. DAR은 280 nm 및 310 nm 하에서의 흡광도를 측정하는 UV 분광법에 의해 결정된다.

[0441] 추가로, huE22-AcBut-CM ADC의 정제된 배치는 약 3 내지 약 5의 범위의 평균 DAR을 갖는다. 예를 들어, huE22-AcBut-CM ADC의 정제된 배치는 약 4의 평균 DAR을 가지고, 보다 특히 평균 DAR은 약 4.6이다.

[0442] 이러한 개선된 접합 및 정제 과정으로 인해, 6 미만인 DAR, 및 일부 측면에서 3 내지 5의 범위의 DAR을 갖는 ADC가 생성되었다. 추가로, 상기 과정으로 인해, 보다 협소한 부하 분포도가 발생되었는데, 예를 들어 생성물 내에서 덜 이질적이었다. 접합 및 정제 과정에 대한 개선은 추가로 다음을 포함하였다: 1) AcBut-CM 대 huE22 비를 4 내지 4.5 대 1로 감소시켜, 보다 낮은 DAR을 갖는 ADC를 생성하였고, 2) AcBut-CM을 huE22에 부가하는 동안 고 진탕을 수행하여, 적은 양의 접합되지 않은 항체 (유리 항체)를 수반한 ADC를 생성하였으며, 3) 인큐베이션 시간을 60 내지 90분과 비교해서 2 내지 5분으로 단축시켜, 낮은 응집체를 제공하고, 4) 에탄올 양을 6 내지 8%로 감소시켜 낮은 응집체를 제공한다.

[0443] 양 배치로부터의 정제되고 풀링된 피크를 배합 완충제에 대항하여 2회 투석하여, 동결된 상태에서의 저장을 촉진시켰다. 이러한 배합 완충제 조성은 20 mM 트리스(Tris), 7.5% 슈크로스, 0.01% 폴리소르베이트 80, 10 mM NaCl, pH 8.0였다. 정제된 huE22-AcBut-CM ADC는 다음을 이용하여 명확히 규명하였다:

- [0444] - 도 6에 도시된 바와 같이, 접합되지 않은 항체의 존재에 대한 소수성 상호 작용 크로마토그래피 [HIC; TSK겔 부틸-NPR, 도쇼 바이오사이언스, 엘엘씨(Tosoh Bioscience, LLC)] (정제된 huE22-AcBut-CM에서는 유리 항체가 전혀 검출되지 않았다);
- [0445] - 도 7에 도시된 바와 같이, 응집체 및 이량체의 존재에 대한 크기 배제 크로마토그래피 [SEC; 아퀴티(Acquity) UPLC BEH200 SEC, 워터스(Waters)] (100% 단량체가 존재하였고, 응집체 또는 이량체는 검출되지 않았다);
- [0446] - 도 8에 도시된 바와 같이, 유리 약물의 존재를 알아보기 위한 역상 고 성능 액체 크로마토그래피 [HPLC-RP; 조르박스(Zorbax) 300SB-CN, 아질런트(Agilent)] (정제된 huE22-AcBut-CM에서는 유리 약물이 전혀 검출되지 않았다); 및
- [0447] - 도 9에 도시된 바와 같이, 약물 분포 프로파일에 대한 모세관 등전점 전기영동 (cIEF; iCE280, 프로테인심플) (3 내지 5의 목적하는 협소한 DAR 분포도는 약 78%였고, DAR 7 이상의 종은 극소량으로만 존재하였으며, DAR 1 및 접합되지 않은 (DAR 0) 종은 검출되지 않았다).
- [0448] 유사한 정제 과정을 huE47-AcBut-CM ADC의 생성에 사용하였다. 도 10 및 하기 표 11은 정제된 huE22-AcBut-CM 항체-약물 접합체의 안정성에 대한 동결 해동 주기의 효과를 나타낸다. 다중의 동결 해동에 대해서 유의적 변화는 관찰되지 않았다.
- [0449] <표 11>

huE22-AcBut-CM 항체-약물 접합체			
조건	% 유리 항체	% 단량체	유리 약물
T=0 (동결되지 않음)	0.2	100	n/a
동결 해동 (-70°C) #1	0.1	100	검출되지 않음
동결 해동 (-70°C) #3	0.1	100	검출되지 않음
동결 해동 (-70°C) #6	0.1	100	검출되지 않음

- [0450]
- [0451] 도 29는 4 m/m 및 6 m/m의 CM 대 huE22 Ab의 비로부터 생성된 정제된 ADC (2 mg)에 대한 분석적 HIC의 비교를 도시한 것이다 ((상부 라인 280 nm 및 하부 라인 310 nm). 4 m/m의 CM 대 huE22 Ab 비는 4.3의 평균 DAR을 갖는 ADC를 생성시켰고 (상부 패널), 6 m/m의 CM 대 huE22 Ab 비는 5.2의 평균 DAR을 갖는 ADC를 생성시켰다 (하부 패널). 4 m/m를 이용하여 생성된 ADC는 목적하는 ADC (낮은 소수성 단량체로서 명확히 규명된다)의 보다 높은 수율과 원하지 않는 ADC (높은 소수성 응집체로서 명확히 규명된다)의 보다 낮은 수율을 갖는다. 도 30은 4 m/m (상부 라인) 및 6 m/m (하부 라인)의 CM 대 huE22 Ab의 비로부터 생성된 정제된 ADC에 대한 추가의 분석적 HIC를 도시한 것이다. 특히, 6 m/m (5.2 DAR 제제)를 이용하여 생성된 ADC는 고도로 소수성인 종의 존재와 응집이 증가하였는데, 4 m/m (4.3 DAR 제제)를 이용하여 생성된 ADC에서는 더 낮았다.

- [0452] 실시예 7
- [0453] 항-EFNA4-AcBut-CM ADC의 시험관내 결합성 및 세포독성

[0454] A. 결합 검정

- [0455] 인간 및 시노물구스 원숭이 EFNA4 단백질에 대한 huE22의 결합 상수는 정제를 촉진시키기 위해 히스티딘 태그와 융합시켰던 재조합 EFNA4 세포외 도메인을 이용하는 BIA코어 2000 (GE 헬스케어)을 사용하여 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 결정하였다. 이 결과는 인간과 시노물구스 원숭이 EFNA4 둘 다에 대한 huE22의 고 친화성을 표시하였다 (표 12 참조). 시노물구스 원숭이 EFNA4 단백질 서열은 인간 EFNA4 단백질 서열과 고도로 상동성인데, 전반적으로는 98% 동일하고 세포외 도메인에서는 98% 동일하다. 이와는 달리, 래트 항원과 결합하는 huE22는 전혀 검출되지 않았고, 별도의 연구에서 마우스 항원과의 결합도 검출되지 않았다. 래트 또는 마우스 EFNA4와의 huE22 결합이 없다는 것은 아마도, 규정된 huE22 에피토프 내에서 래트 및 마우스 EFNA4 서열 내의 비-보존 잔기로써 설명된다.

- [0456] 인간 및 시노물구스 원숭이 EFNA4에 대한 huE22-AcBut-CM ADC의 결합 상수는 huE22와 동일한 결합 연구에서 결정하였다. 표 12에 제시된 바와 같이, ADC 및 접합되지 않은 mAb (huE22)는 인간과 시노물구스 원숭이 항원 둘 다에 대하여 거의 동등한 결합 상수를 갖고 있었다.

- [0457] <표 12>



[0458] huE22 mAb 및 huE22-AcBut-CM ADC의 결합 상수

	항원 종	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_d (nM)$
huE22 mAb	인간	$1.9 \times 10^6$	$3.3 \times 10^{-3}$	1.7
	시노볼구스 원숭이	$3.8 \times 10^6$	$7.8 \times 10^{-3}$	2.1
	랫	400 nM 항원에서 결합이 전혀 검출되지 않음		
huE22-AcBut-CM ADC	인간	$2.6 \times 10^6$	$6.1 \times 10^{-3}$	2.3
	시노볼구스 원숭이	$4.2 \times 10^6$	$1.1 \times 10^{-2}$	2.7
	랫	400 nM 항원에서 결합이 전혀 검출되지 않음		

[0459]

[0460] huE22 및 huE22-AcBut-CM ADC의 세포 결합성 및 내재화를 분석하였다. 부모 HEK293T 세포 (EFNA4 음성) 및 HEK293T-EFNA4 (고 수준의 인간 EFNA4를 발현하도록 조작됨)를 사용하였다. huE22 및 huE22-AcBut-CM ADC는 EFNA4 항원을 발현한 세포에 대한 특이적 결합성을 명확히 보여주었다. 추가로, 접합되지 않은 huE22 및 huE22-AcBut-CM ADC는 HEK293T-EFNA4 세포와 거의 동등한 결합성을 나타내었고, 부모 HEK293T 세포와 결합된 항체는 전혀 없었다 (표 13 참조). 표 12 (상기)에서의 SPR 결과를 취합해 보면, 이들 데이터는 바이오접합 과정이 huE22의 결합 특징을 변경시키지 않았다는 것을 나타낸다.

[0461] <표 13>

[0462] huE22 및 huE22-AcBut-CM ADC의 세포 결합성

세포주	시험 제품	농도			
		0.3 $\mu g/mL$	1.0 $\mu g/mL$	3.0 $\mu g/mL$	10.0 $\mu g/mL$
HEK293T 부모	huE22-AcBut-CM ADC	6.8	6.1	8.2	13.4
	huE22 mAb	8.3	6.8	6.1	14.5
HEK293T-EFNA4	huE22-AcBut-CM ADC	446	621	728	863
	huE22 mAb	446	606	739	856

[0463]

[0464] B. 세포독성 검정

[0465] 일단 huE22-AcBut-CM ADC가 세포 내로 내재화되면, 칼리케아미신의 방출이 세포독성을 유발시킨다. 내재화 항체는 전형적으로, 분해를 위하여 리소솜 구획으로 트래픽킹한다. 직접적인 세포독성 검정을 이용하여 huE22-AcBut-CM의 세포독성 반응을 분석하였다. HEK293T-EFNA4 과발현성 세포 및 HEK293T 부모 (EFNA4 음성) 세포를 웰당 180  $\mu L$ 의 세포 배양 배지당 500개 세포로, 청정한 평저 조직 배양 판 (BD 팔콘 cat # 353072) 내로 도말하였다. 상기 세포를 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 37°C 하에 밤새 인큐베이션하였다. 그 다음날, huE22-AcBut-CM 및 음성 비-결합성 대조군 hIgG1-AcBut-CM ADC를 세포 배양 배지에서 세 번 되풀이하여 반-로그 희석하면서 1  $\mu g/mL$ 로 출발하는 10 포인트 농도 곡선으로서 상기 세포에 부가하였다. 상기 판을 96시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 이어서, 제조업자의 지시에 따라서 MTS 검정 [프로메가 셀티터(Promega CellTiter) 96 수성 비-방사성 세포 증식 검정 cat #G5430]을 이용하여 세포 생육성을 측정하였다. 40  $\mu L$ 의 합한 MTS 시약을 각 웰에 가하였다. 상기 판을 1.5시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 표 14에 제시된 바와 같이, 처리되지 않은 세포와 비교해서 세포 생육성을 50% 억제한 농도 (IC<sub>50</sub>)를 그래프패드 프리즘 소프트웨어 상에서 로지스틱 비-선형 회귀에 의해 계산하였다. 도 21은 각종 농도의 huE22-AcBut-CM (열린 다이아몬드) 또는 hIgG-AcBut 대조군 ADC (대각선 빗금 원)에 노출된 HEK293T-EFNA4 세포를 도시한 것이고; 세포 생육성을 측정하며, 이를 처리되지 않은 세포의 생육성에 대하여 표준화시켰다.

[0466] 표 14 및 도 21에 제시된 바와 같이, huE22-AcBut-CM은 EFNA4 표적-발현성 세포에 대항하여 시험관 내에서 용량-의존적 세포독성 반응을 유발시켰고, 표적-의존적 및 용량-의존적 방식으로 세포 성장을 억제하였다. HEK293T-EFNA4 세포를 huE22-AcBut-CM에 노출시킨 경우, 1 ng/mL 농도의 ADC는 세포 성장을 50% 억제하였고 (IC<sub>50</sub>), 이와는 달리 대조군 ADC는 >150배 더 활성이었다. 데이터는 huE22-AcBut-CM의 강력하고도 특이적인 세포독성 활성을 입증해준다. 대조군 ADC 및 huE22-AcBut-CM ADC는 EFNA4 발현이 결여된 HEK293T 부모 세포에 대항하여 세포독성을 유발하지 못하였는데, 이는 특이성과 항원 의존성을 입증해준다.

[0467] <표 14>

[0468] 항-EFNA4-AcBut-CM 세포독성

세포주	IC <sub>50</sub> 값 (ng/mL)	
	huE22-AcBut-CM	대조군-AcBut-CM
HEK293T 부모	650	100
HEK293T-EFNA4	1	157

[0469]

[0470] 실시예 8

[0471] 항-EFNA4 항체-약물 접합체의 생체내 효능

[0472] 인간 종양 환자-유래 이종이식편 (PDX)의 생체내 성장에 대한, 실시예 6에 기재된 접합 및 정제 과정에 따라서 제조된 항-EFNA4 huE22-AcBut-CM 및 huE47-AcBut-CM의 효과를 추가로 평가하였다. 원발성 종양 절제 샘플은 HIPAA 규제에 따라서 및 인간 대상체 보호 승인을 위한 윤리 심의 위원회에 따르는 임상 사이트로부터 입수하였다.

[0473] 각 모델에서 표적 EFNA4의 발현은 2가지 방식으로 측정하였다: mRNA 추출물을 이용하는 역전사효소 증합효소 연쇄 반응 (RT-PCR) 및 단백질을 추출물을 이용하는 ELISA. 표 15는 종양 모델의 패널에서 EFNA4의 표준화된 mRNA 및 단백질 수준을 나타낸다. EFNA4가 시험된 모든 모델에서 검출되었는데, 달리 말하면 양 측정이 종양 모델 MDA-MB-231로부터의 것을 초과하였다.

[0474] <표 15>

종양 유형	종양 모델	EFNA4 RT-PCR (표준화된 신호)	EFNA4 ELISA (ng EFNA4 / mg 단백질)
유방암 (TNBC)	BR5	1.58	1.80
	BR13	0.45	1.00
	BR22	1.01	1.91
	BR31	0.48	1.02
	144580A1	3.86	1.74
	MDA-MB-231	0.19	0.25
난소암	OV44	2.10	1.39
	OV45	3.39	3.64
	OV55	1.45	0.42
	OV63	2.40	0.49
	LU86	0.85	0.45
폐	LU80	ND	ND
	CR5	ND	ND

[0475]

[0476] ND=결정되지 않음.

[0477] 종양 단편을 저장하고 얼음 상의 히포터마솔(Hypothermasol) [바이오라이프 솔루션즈(Biolife Solutions)]에 시핑하며, 성장 인자의 등록 혼합물을 함유하는 매트릭셀(Matrigel) (BD)에 매립시키고, 절제 24시간 이내에 암컷 NOD/SCID 마우스의 유선 지방체 내로 피하 이식하였다. 마우스를 대상으로 하여, 매일 건강 상태에 관하여 모니터링하고, 초기에는 매주 2회씩 가시적으로 검사함으로써 종양 성장에 관하여 모니터링하였다. 일단 종양이 손으로 만질 수 있게 되면, 종양 용적을 측정하기 시작하여 종양 성장을 추적하고 세포 배가 시간을 추정하였다. 방정식  $V = (A \cdot B^2) / 2$  (여기서, A는 장축이고 B는 단축이다)을 이용하여 종양 용적을 추정하였다. 종양이 500 mm<sup>3</sup> 내지 1,500 mm<sup>3</sup>의 용적에 도달하는 경우에는, 연구 및 재이식을 위하여 이들을 수거하였다. 계통에 따라서, 기계적 및/또는 화학적 해리를 이용하여, 계대하기 위해 개별 세포를 분리할 수 있다. 살아있는 세포를 동물 1마리당 10,000개 내지 50,000개 세포로 타고난 본래의 동물 내로 접종하였다.

[0478] 효능 연구를 위하여, 종양을 계대 연구로부터 수거하였고, 세포를 단일 세포 현탁물 내로 해리하였다. 체제를 대상으로 하여, 트립린 블루 배제를 이용하여 살아있는 세포에 대하여 계수하였고, 마우스 1마리당 10,000개 내지 50,000개 세포를 매트릭셀에 접종하였다. PDX의 차별적 성장물을 고려하기 위하여, 무작위 배정시 최소 종양 용적 분산을 허용하도록 적어도 25% 이상의 동물을 출발시켰다. 일단 종양 용적이 약 30 mm<sup>3</sup>에 도달하게 되면 초기에는 종양 성장을 측정하기 시작한 다음, 손으로 만질 수 있었다. 연구는 종양 보유 마우스의 코호트(cohort)가 140 내지 180 mm<sup>3</sup>에 도달하게 되면 종양 크기에 근거하여 무작위적으로 수행하였는데, 한 무리당 6

내지 10마리 마우스가 배정되었다. 동물에게 ADC를 각종 용량 수준으로 2주 동안 매주 2회씩 (Q4dx4) 복강내 주사하였는데, 2주 동안 매주 1회씩 (Q7dx2) 독소루비신을 1.5 mg/kg (최대 내성 용량)으로 투여하였거나 또는 2주 동안 매주 1회씩 시스플라틴을 5 mg/kg으로 투여하였다. IACUC 프로토콜에 따라서 희생이 권고된 경우에 개별 마우스 또는 전체 군 종양 측정치가 1200 mm<sup>3</sup>에 도달할 때까지 연구 군을 추적하였다. 선별된 투여 연구를 위해, 약동학적 하악선 출혈을 2 또는 6시간, 36시간 및 72시간째에 수행하였다. 혈액 10 µL 용량을 90 µL의 HBS-P (GE 헬스케어) 내로 즉시 피펫팅하였다. 분석하기에 앞서 샘플을 -80℃ 하에 저장하였다. 각 종양 측정을 위해, 종양 용적 ± 평균의 표준 오차 (SEM)가 제공된다. GT = 종양 크기가 크기 때문에 종결된 군. ND = SEM을 이용하여 유의적 측정을 수행하기에는 남아있는 동물이 충분하지 못함. 모든 연구는 PBS 비히클을 포함하였고; 동일한 링커-페이로드와 접합된 비-결합성 hIgG1 항체를 갖는 대조군 항체-약물 접합체가 분석되었고 이는 거의 동등한 수준의 약물-대-항체 비 (DAR) 및 DAR 분포도를 수반하였다.

[0479] **A. 유방암**

[0480] 표 16 내지 20 및 도 11 내지 14는 각종 삼중 음성 유방암 (TNBC) PDX 종양 모델에서 huE22-AcBut-CM 및 huE47-AcBut-CM의 효능을 입증해주는 데이터를 제공한다. 수득된 결과는 예상치 못한 것이었는데, 이는 huE22-AcBut-CM이, 칼리케아미신 (DNA 손상제)과 유사한 작용 기전을 갖는 독소루비신 표준 치료 (SOC)를 이용한 처리와 비교해서 모든 TNBC PDX 모델에서 탁월한 효능을 명확히 보여주었기 때문이다.

[0481] 표 16 및 도 11은 유방-5 (BR5) 삼중 음성 유방암 (TNBC) PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 보여준다. 0.27 mg/kg huE22-AcBut-CM을 이용하여 80일 초과하여 지속적인 퇴행을 달성시켰고, 0.036 mg/kg 정도로 낮은 용량 수준도 항종양 활성을 유발시켰다. 이와는 달리, 대조군 ADC 뿐만 아니라 독소루비신 표준 치료 (SOC) 어느 것도 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다.

[0482] <표 16>

[0483] BR5 TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	비히클	독소루비신	0.1 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM
0	178 ± 18	166 ± 18	191 ± 41	173 ± 24	161 ± 21	174 ± 23
7	468 ± 87	494 ± 70	472 ± 31	461 ± 36	441 ± 57	428 ± 46
11	1138 ± 41	752 ± 92	1176 ± 9	467 ± 75	209 ± 42	290 ± 42
18	GT	966 ± 32	GT	239 ± 40	83 ± 25	69 ± 7
25	GT	GT	GT	137 ± 27	30 ± 8	34 ± 6
32	GT	GT	GT	254 ± 53	15 ± 10	3 ± 3
39	GT	GT	GT	485 ± 73	14 ± 9	0 ± 0
47	GT	GT	GT	903 ± 145	32 ± 25	0 ± 0
53	GT	GT	GT	GT	82 ± 66	0 ± 0
60	GT	GT	GT	GT	159 ± 118	0 ± 0
67	GT	GT	GT	GT	318 ± 209	0 ± 0
74	GT	GT	GT	GT	452 ± 234	0 ± 0
81	GT	GT	GT	GT	811 ± 362	0 ± 0
89	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
95	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
102	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
109	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
116	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
123	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
130	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
137	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
144	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
152	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
155	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
168	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
172	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0

[0484]

[0485] 표 17 및 도 12는 유방-13 (BR13) TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM 및 huE47-AcBut-CM의 효능을 보여준다. huE22-AcBut-CM의 경우에는, 0.27 mg/kg 용량 수준이 90일 동안 퇴행을 가져다 주었는데, 그 후에는 종양이 재성장하였다. 추가로, 0.09 mg/kg 용량 수준은 종양 성장을 약 40일 동안 지연시켰다. 이와는 달리, 대조군

ADC 뿐만 아니라 독소루비신 SOC 어느 것도 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다.

<표 17>

BR13 TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM 및 huE47-AcBut-CM의 효능

일	비히클	독소루비신	0.3 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.1 mg/kg huE47- AcBut-CM	0.3 mg/kg huE47- AcBut-CM
0	161 ± 15	167 ± 13	154 ± 11	156 ± 13	156 ± 10	155 ± 14	19 ± 25	172 ± 26
7	180 ± 15	178 ± 20	171 ± 20	176 ± 20	145 ± 14	144 ± 15	251 ± 42	242 ± 37
14	239 ± 27	227 ± 25	183 ± 12	184 ± 24	156 ± 21	91 ± 14	261 ± 42	238 ± 38
22	382 ± 52	322 ± 38	237 ± 24	232 ± 32	112 ± 20	35 ± 5	264 ± 47	92 ± 18
28	484 ± 72	326 ± 34	287 ± 28	279 ± 47	98 ± 23	17 ± 4	439 ± 86	34 ± 7
36	600 ± 98	GT	315 ± 30	341 ± 42	116 ± 32	4 ± 1	509 ± 105	41 ± 21
42	735 ± 106	GT	402 ± 19	471 ± 68	138 ± 34	3 ± 1	546 ± 121	46 ± 15
49	841 ± 106	GT	493 ± 38	516 ± 91	188 ± 46	1 ± 1	698 ± 144	79 ± 27
56	GT	GT	659 ± 41	738 ± 109	274 ± 75	6 ± 2	713 ± 132	155 ± 57
63	GT	GT	779 ± 33	814 ± 110	328 ± 86	7 ± 3	960 ± 192	135 ± 51
70	GT	GT	991 ± 71	959 ± 103	425 ± 93	13 ± 4	GT	167 ± 56
77	GT	GT	GT	GT	531 ± 116	13 ± 7	GT	132 ± 46
84	GT	GT	GT	GT	667 ± 133	30 ± 13	GT	151 ± 50
91	GT	GT	GT	GT	830 ± 146	40 ± 15	GT	198 ± 62
98	GT	GT	GT	GT	GT	79 ± 33	GT	559 ± 186
105	GT	GT	GT	GT	GT	99 ± 36	GT	788 ± 257
112	GT	GT	GT	GT	GT	147 ± 53	GT	744 ± 217
119	GT	GT	GT	GT	GT	198 ± 65	GT	1030 ± 349
126	GT	GT	GT	GT	GT	290 ± 97	GT	GT
133	GT	GT	GT	GT	GT	332 ± 113	GT	GT
140	GT	GT	GT	GT	GT	522 ± 156	GT	GT
144	GT	GT	GT	GT	GT	573 ± 144	GT	GT
150	GT	GT	GT	GT	GT	709 ± 248	GT	GT

표 18 및 도 13은 유방-22 (BR22) PDX (TNBC의 덜 감수성인 종양 모델이다)에서의 huE22-AcBut-CM 및 huE47-AcBut-CM의 효능을 보여준다. huE22-AcBut-CM의 경우에는, 0.27 mg/kg 용량 수준이 종양 성장을 약 40일 동안 지연시켰지만, 완전한 퇴행을 가져다 주지는 못하였다. 추가로, 0.27 mg/kg 미만의 용량 수준은 최소한의 효과를 나타내었다. 대조군 ADC 뿐만 아니라 독소루비신 SOC 어느 것도 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다.

<표 18>

BR22 TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM 및 huE47-AcBut-CM의 효능

일	비히클	독소루비신	0.1 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.3 mg/kg huE47- AcBut-CM
0	195 ± 17	244 ± 17	208 ± 23	207 ± 17	217 ± 17	202 ± 16	194 ± 17
7	376 ± 43	416 ± 61	354 ± 35	358 ± 41	324 ± 52	292 ± 32	438 ± 36
9	401 ± 42	-	376 ± 23	366 ± 37	319 ± 63	281 ± 28	522 ± 48
14	564 ± 54	553 ± 39	494 ± 24	511 ± 60	364 ± 45	248 ± 31	468 ± 58
21	819 ± 97	729 ± 91	677 ± 52	649 ± 83	368 ± 58	92 ± 15	557 ± 80
28	GT	GT	1054 ± 122	891 ± 106	535 ± 70	77 ± 21	855 ± 112
35	GT	GT	GT	GT	715 ± 90	81 ± 24	1145 ± 165
43	GT	GT	GT	GT	1007 ± 115	140 ± 41	GT
49	GT	GT	GT	GT	GT	199 ± 53	GT
56	GT	GT	GT	GT	GT	274 ± 78	GT
63	GT	GT	GT	GT	GT	370 ± 73	GT
70	GT	GT	GT	GT	GT	605 ± 120	GT
77	GT	GT	GT	GT	GT	711 ± 110	GT
84	GT	GT	GT	GT	GT	981 ± 135	GT

도 19는 BR22 PDX에서 각종 미세소관 억제제 (MTI), 예컨대 vc0101 및 mc8261과 결합된 huE15, huE22 및 huE47의 효능을 보여준다. 그 데이터는 MTI ADC가 종양 성장에 상당한 영향을 미치지 못하였다는 것을 입증해준다. 따라서, huE22-AcBut-CM 및 huE47-AcBut-CM이 동일한 BR22 PDX 모델에서 증가된 효능을 명확히 보여주었다는 것은 예상치 못한 일이었다.

[0494] 표 19 및 도 14는 유방-31 (BR31) TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 보여준다. 0.27 mg/kg 용량 수준은 약 120일 동안 퇴행을 가져다 주었고, 그 후에는 종양이 일부 동물에게서 재성장하였다. 0.09 mg/kg 용량 수준이 약 50일 동안 종양을 퇴행시켰는데, 그 후에는 종양이 재성장하였다. 이와는 달리, 대조군 ADC 뿐만 아니라 독소루비신 SOC 어느 것도 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다.

[0495] <표 19>

[0496] BR31 TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	비히클	독소루비신	0.3 mg/kg 대조군- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.1 mg/kg huE47- AcBut-CM	0.3 mg/kg huE47- AcBut-CM
0	159 ± 10	160 ± 11	163 ± 23	165 ± 6	149 ± 13	163 ± 6	147 ± 15
7	269 ± 17	304 ± 20	305 ± 42	277 ± 18	137 ± 11	283 ± 26	239 ± 27
14	425 ± 32	458 ± 24	307 ± 53	201 ± 11	59 ± 8	269 ± 29	141 ± 17
21	668 ± 50	592 ± 56	377 ± 58	103 ± 12	30 ± 9	127 ± 11	44 ± 11
28	1088 ± 93	759 ± 111	356 ± 52	64 ± 4	11 ± 7	126 ± 16	22 ± 8
36	GT	GT	405 ± 52	60 ± 11	17 ± 9	179 ± 20	4 ± 4
44	GT	GT	569 ± 64	57 ± 15	0 ± 0	213 ± 33	6 ± 6
49	GT	GT	557 ± 73	82 ± 19	0 ± 0	373 ± 39	11 ± 7
56	GT	GT	795 ± 88	132 ± 32	0 ± 0	750 ± 76	5 ± 5
63	GT	GT	1160 ± 142	206 ± 44	0 ± 0	GT	9 ± 9
71	GT	GT	GT	338 ± 73	0 ± 0	GT	27 ± 27
78	GT	GT	GT	414 ± 74	0 ± 0	GT	75 ± 64
85	GT	GT	GT	589 ± 121	12 ± 8	GT	63 ± 56
91	GT	GT	GT	741 ± 157	20 ± 13	GT	117 ± 107
98	GT	GT	GT	1178 ± 271	26 ± 17	GT	154 ± 137
105	GT	GT	GT	GT	32 ± 21	GT	165 ± 147
112	GT	GT	GT	GT	29 ± 20	GT	205 ± 181
119	GT	GT	GT	GT	58 ± 39	GT	210 ± 180
126	GT	GT	GT	GT	88 ± 58	GT	267 ± 209
133	GT	GT	GT	GT	159 ± 103	GT	286 ± 211
141	GT	GT	GT	GT	181 ± 118	GT	286 ± 211
147	GT	GT	GT	GT	219 ± 142	GT	286 ± 211
154	GT	GT	GT	GT	279 ± 176	GT	428 ± 302
161	GT	GT	GT	GT	293 ± 172	GT	571 ± 376
168	GT	GT	GT	GT	293 ± 172	GT	571 ± 376
175	GT	GT	GT	GT	306 ± 170	GT	GT
182	GT	GT	GT	GT	308 ± 169	GT	GT
189	GT	GT	GT	GT	317 ± 168	GT	GT
197	GT	GT	GT	GT	429 ± 192	GT	GT
204	GT	GT	GT	GT	445 ± 200	GT	GT

[0497]

[0498] 도 20은 BR31 PDX에서 MTI vc0101과 접합된 huE15, huE22 및 huE47의 효능을 보여준다. 그 데이터는 MTI ADC가 종양 성장에 상당한 영향을 미치지 못하였다는 것을 입증해준다. 따라서, huE22-AcBut-CM 및 huE47-AcBut-CM이 동일한 BR31 PDX 모델에서 증가된 효능을 명확히 보여주었다는 것은 예상치 못한 일이었다.

[0499] 표 20은 유방-56 (BR56) TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 보여준다. 이와는 달리, 대조군 ADC 뿐만 아니라 독소루비신 SOC 어느 것도 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다.

[0500] <표 20>



[0501] BR56 TNBC PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	비히콜	독소루비신	0.1 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM
0	144 ± 9	141 ± 13	140 ± 11	143 ± 13	148 ± 14	141 ± 12
4	179 ± 15	182 ± 11	181 ± 12	154 ± 13	150 ± 10	151 ± 14
11	271 ± 33	267 ± 31	270 ± 26	268 ± 42	268 ± 32	170 ± 21
18	373 ± 33	318 ± 32	408 ± 34	298 ± 55	251 ± 25	90 ± 10
25	727 ± 86	374 ± 50	644 ± 49	424 ± 89	286 ± 39	42 ± 13
33	1010 ± 88	GT	913 ± 84	431 ± 98	291 ± 45	14 ± 4
40	GT	GT	GT	591 ± 120	341 ± 47	0 ± 0
47	GT	GT	GT	635 ± 116	442 ± 66	0 ± 0
54	GT	GT	GT	780 ± 125	635 ± 94	11 ± 8
60	GT	GT	GT	896 ± 132	816 ± 64	48 ± 17
67	GT	GT	GT	GT	GT	75 ± 29
74	GT	GT	GT	GT	GT	155 ± 51
81	GT	GT	GT	GT	GT	207 ± 56
88	GT	GT	GT	GT	GT	270 ± 78
95	GT	GT	GT	GT	GT	363 ± 100
102	GT	GT	GT	GT	GT	530 ± 143
109	GT	GT	GT	GT	GT	714 ± 198

[0502]

[0503] B. 난소암

[0504] 표 21 및 도 15는 난소-45 (OV45) 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 보여준다. 0.27 mg/kg을 이용하여 75일 초과하여 지속적인 퇴행을 달성하였다. 퇴행은 또한, 0.09 mg/kg 용량 수준에서도 달성되었는데, 일부 동물에게서는 50일 후에 종양이 재성장하였다. 0.036 용량 수준은 종양 성장을 약 25일 동안 지연시켰다. 이와는 달리, 대조군 ADC는 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다.

[0505] <표 21>

[0506] OV45 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	10 mg/kg 마우스 IgG1	0.1 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM
0	157 ± 16	142 ± 14	141 ± 14	145 ± 15	153 ± 20
3	-	239 ± 35	178 ± 5	240 ± 41	177 ± 39
8	329 ± 32	470 ± 77	198 ± 17	147 ± 23	35 ± 5
14	516 ± 57	590 ± 101	206 ± 34	60 ± 16	4 ± 2
21	843 ± 151	906 ± 194	251 ± 53	15 ± 1	0 ± 0
33	GT	GT	429 ± 79	0 ± 0	0 ± 0
39	GT	GT	733 ± 111	0 ± 0	0 ± 0
46	GT	GT	1140 ± 92	0 ± 0	0 ± 0
53	GT	GT	GT	30 ± 30	0 ± 0
60	GT	GT	GT	118 ± 99	0 ± 0
67	GT	GT	GT	256 ± 165	0 ± 0
74	GT	GT	GT	423 ± 257	0 ± 0
81	GT	GT	GT	443 ± 252	0 ± 0
88	GT	GT	GT	743 ± 256	0 ± 0
96	GT	GT	GT	1576 ± 208	0 ± 0
102	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
109	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
116	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
123	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
131	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
137	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
141	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
158	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
166	GT	GT	GT	GT	0 ± 0

[0507]

[0508] 표 22 및 도 16은 난소-55 (OV55) 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 보여준다. 0.27 및 0.09 mg/kg 용량 수준에서 종양 퇴행이 달성되었는데, 0.036 용량 수준은 종양 성장에 있어서의 일부 지연을 가져다 주었다. 대조군 ADC는 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다.

[0509] <표 22>

[0510] OV55 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	비히클	0.1 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM
0	206 ± 41	216 ± 31	211 ± 28	208 ± 24	204 ± 28
6	317 ± 42	325 ± 57	262 ± 36	198 ± 33	152 ± 18
13	508 ± 45	412 ± 92	250 ± 46	109 ± 27	66 ± 13
20	717 ± 102	595 ± 111	232 ± 29	63 ± 14	35 ± 9
27	1064 ± 144	799 ± 173	355 ± 55	30 ± 9	5 ± 4
34	GT	1097 ± 123	630 ± 93	37 ± 13	0 ± 0
42	GT	GT	863 ± 41	94 ± 37	0 ± 0
48	GT	GT	GT	171 ± 62	0 ± 0
55	GT	GT	GT	382 ± 142	0 ± 0
62	GT	GT	GT	579 ± 209	4 ± 4
69	GT	GT	GT	980 ± 405	7 ± 7
76	GT	GT	GT	GT	11 ± 11
83	GT	GT	GT	GT	24 ± 24
90	GT	GT	GT	GT	35 ± 35
97	GT	GT	GT	GT	78 ± 78
105	GT	GT	GT	GT	107 ± 107
108	GT	GT	GT	GT	99 ± 99
121	GT	GT	GT	GT	157 ± 157
125	GT	GT	GT	GT	253 ± 253
132	GT	GT	GT	GT	253 ± 253

[0511]

[0512] 표 23 및 도 17은 난소-44 (OV44) 난소암 PDX (난소암의 털 감수성인 종양 모델이다)에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 보여준다. 0.27 mg/kg 용량 수준은 종양 성장을 약 50일 동안 지연시켰지만, 종양을 퇴행시키지는 못하였다. 0.27 mg/kg 미만의 용량 수준은 최소한의 효과를 나타내었다. 대조군 ADC는 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다.

[0513] <표 23>

[0514] OV44 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	비히클	0.1 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM
0	141 ± 14	138 ± 18	140 ± 9	148 ± 16	152 ± 17
5	286 ± 58	215 ± 30	269 ± 33	236 ± 20	249 ± 35
11	442 ± 27	347 ± 59	331 ± 45	328 ± 39	250 ± 30
18	555 ± 14	417 ± 72	328 ± 53	299 ± 29	162 ± 24
25	747 ± 35	621 ± 94	397 ± 59	313 ± 39	142 ± 21
32	1010 ± 120	760 ± 104	478 ± 69	414 ± 50	137 ± 33
39	GT	851 ± 68	567 ± 79	497 ± 44	114 ± 43
46	GT	GT	708 ± 61	610 ± 28	140 ± 59
53	GT	GT	1060 ± 182	957 ± 99	249 ± 152
61	GT	GT	GT	GT	242 ± 102
67	GT	GT	GT	GT	367 ± 143
74	GT	GT	GT	GT	452 ± 140
81	GT	GT	GT	GT	521 ± 130
88	GT	GT	GT	GT	619 ± 120
95	GT	GT	GT	GT	686 ± 111
102	GT	GT	GT	GT	830 ± 82

[0515]

[0516] 표 24 및 도 18은 난소-63 (OV63) 난소암 PDX (난소암의 털 감수성 모델이다)에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 보여준다. 0.27 mg/kg에서는 일시적인 종양 퇴행이 달성되었고, 0.036 및 0.09 mg/kg에서는 종양 성장에 있어서의 지연이 달성되었다.

[0517] <표 24>

[0518] OV63 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	비히클	5.0 mg/kg 시스플라틴	0.1 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM
0	160 ± 22	153 ± 22	155 ± 18	153 ± 21	156 ± 16	165 ± 16
5	152 ± 10	146 ± 27	212 ± 30	197 ± 25	176 ± 30	158 ± 15
11	171 ± 23	-	178 ± 23	160 ± 16	180 ± 38	112 ± 19
18	207 ± 16	198 ± 29	221 ± 40	209 ± 33	152 ± 36	86 ± 15
25	218 ± 37	205 ± 36	277 ± 36	178 ± 17	112 ± 17	67 ± 18
32	207 ± 17	238 ± 49	316 ± 32	219 ± 37	132 ± 29	83 ± 22
39	216 ± 10	221 ± 40	381 ± 21	264 ± 72	184 ± 24	106 ± 44
47	249 ± 29	243 ± 42	533 ± 80	271 ± 73	186 ± 16	104 ± 40
53	317 ± 59	265 ± 63	504 ± 79	322 ± 108	188 ± 31	78 ± 30
60	317 ± 63	296 ± 80	643 ± 116	326 ± 110	179 ± 28	60 ± 43
67	446 ± 123	265 ± 82	805 ± 165	417 ± 141	184 ± 27	69 ± 38
74	ND	ND	840 ± 187	456 ± 190	209 ± 46	73 ± 45
81	ND	ND	GT	498 ± 188	241 ± 66	65 ± 39
88	ND	ND	GT	530 ± 191	251 ± 3	64 ± 26

[0519]

[0520] 표 25는 난소-39 (OV39) 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능을 보여준다.

[0521] <표 25>

[0522] OV39 난소암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	비히클	독소루비신	0.1 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM
0	177 ± 32	186 ± 33	163 ± 23	165 ± 29	173 ± 18	169 ± 21
7	413 ± 103	282 ± 50	413 ± 74	448 ± 78	355 ± 48	378 ± 56
14	806 ± 333	171 ± 32	650 ± 118	814 ± 112	554 ± 80	320 ± 73
17	1101 ± 502	122 ± 24	822 ± 153	1050 ± 159	609 ± 94	252 ± 62
21	1305 ± 453	106 ± 19	891 ± 143	1265 ± 146	628 ± 97	147 ± 28
24	1436 ± 427	83 ± 11	1096 ± 170	1356 ± 185	614 ± 95	118 ± 28
28	GT	118 ± 17	1245 ± 154	GT	779 ± 123	98 ± 25
35	GT	361 ± 40	GT	GT	934 ± 99	67 ± 18
42	GT	712 ± 97	GT	GT	GT	72 ± 23
49	GT	966 ± 85	GT	GT	GT	170 ± 96
56	GT	GT	GT	GT	GT	446 ± 337
63	GT	GT	GT	GT	GT	940 ± 675
70	GT	GT	GT	GT	GT	1194 ± 422

[0523]

[0524] C. 소세포 폐암 (SCLC) 및 결장직장암

[0525] 몇 가지 부가의 효능 연구를 소세포 폐암 (SCLC)의 모델인 LU80 및 LU86 PDX, 및 결장직장암 (CRC)의 모델인 CR5 PDX에서 수행하였는데, 그 데이터가 표 26 내지 28에 제시되어 있다. 수득된 결과는 예상치 못한 것이었는데, 이는 huE22-ActBut-CM이, 칼리케아미신 (DNA 손상제)과 유사한 작용 기전을 갖는 독소루비신 표준 치료 (SOC)를 이용한 처리와 비교해서 SCLC 및 CRC PDX 모델에서 탁월한 효능을 명확히 보여주었기 때문이다.

[0526] <표 26>

[0527] LU80 SCLC PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	비히클	5.0 mg/kg 시스플라틴+ 24mg/kg 에토포시드	0.1 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.018 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM
0	165 ± 27	190 ± 8	188 ± 19	158 ± 29	177 ± 19	161 ± 18	158 ± 20
7	500 ± 64	89 ± 11	312 ± 17	511 ± 37	527 ± 64	384 ± 40	208 ± 36
14	824 ± 137	163 ± 31	754 ± 41	630 ± 79	452 ± 75	217 ± 31	80 ± 10
21	985 ± 116	325 ± 68	1026 ± 61	638 ± 58	464 ± 67	134 ± 20	49 ± 8
28	GT	616 ± 67	GT	647 ± 96	439 ± 75	83 ± 24	7 ± 5
35	GT	979 ± 135	GT	1324 ± 208	883 ± 174	112 ± 31	0 ± 0
42	GT	GT	GT	GT	GT	126 ± 38	0 ± 0
49	GT	GT	GT	GT	GT	330 ± 120	0 ± 0
56	GT	GT	GT	GT	GT	686 ± 249	46 ± 31
63	GT	GT	GT	GT	GT	979 ± 216	105 ± 52
70	GT	GT	GT	GT	GT	GT	227 ± 89
77	GT	GT	GT	GT	GT	GT	376 ± 145
84	GT	GT	GT	GT	GT	GT	621 ± 209
91	GT	GT	GT	GT	GT	GT	703 ± 225

[0528]

[0529] <표 27>

[0530] LU86 SCLC PDX에서의 huE22-AcBut-CM 및 huE47-AcBut-CM의 효능

일	비히클	5.0 mg/kg 시스플라틴+ 24mg/kg 에토포시드	0.3 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.036 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.1 mg/kg huE47- AcBut-CM	0.3 mg/kg huE47- AcBut-CM
0	147 ± 11	149 ± 13	205 ± 19	139 ± 9	143 ± 10	138 ± 9	161 ± 16	195 ± 17
7	317 ± 33	250 ± 24	282 ± 24	239 ± 25	215 ± 19	105 ± 12	234 ± 24	372 ± 60
14	672 ± 62	468 ± 47	458 ± 62	296 ± 33	66 ± 9	0 ± 0	231 ± 34	260 ± 65
21	1233 ± 83	946 ± 77	637 ± 90	423 ± 50	0 ± 0	0 ± 0	355 ± 58	212 ± 84
28	GT	GT	964 ± 130	557 ± 66	0 ± 0	0 ± 0	458 ± 79	304 ± 111
35	GT	GT	GT	808 ± 69	0 ± 0	0 ± 0	598 ± 94	433 ± 162
42	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0	808 ± 113	585 ± 198
49	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0	1015 ± 139	778 ± 258
56	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0	1262 ± 198	1031 ± 304
63	GT	GT	GT	GT	28 ± 22	0 ± 0	1770 ± 293	GT
70	GT	GT	GT	GT	52 ± 34	0 ± 0	GT	GT
77	GT	GT	GT	GT	93 ± 60	0 ± 0	GT	GT
84	GT	GT	GT	GT	117 ± 75	0 ± 0	GT	GT
92	GT	GT	GT	GT	237 ± 124	6 ± 6	GT	GT
98	GT	GT	GT	GT	304 ± 154	34 ± 24	GT	GT
105	GT	GT	GT	GT	385 ± 179	56 ± 32	GT	GT
112	GT	GT	GT	GT	420 ± 171	99 ± 56	GT	GT
119	GT	GT	GT	GT	491 ± 163	171 ± 109	GT	GT
126	GT	GT	GT	GT	602 ± 165	239 ± 139	GT	GT
133	GT	GT	GT	GT	828 ± 213	370 ± 201	GT	GT
140	GT	GT	GT	GT	GT	429 ± 210	GT	GT
147	GT	GT	GT	GT	GT	469 ± 222	GT	GT
154	GT	GT	GT	GT	GT	599 ± 286	GT	GT

[0531]

[0532] <표 28>

[0533] CR5 결장직장암 PDX에서의 huE22-AcBut-CM의 효능

일	10 mg/kg MsigG1	35 mg/kg 이리노테칸	0.3 mg/kg 대조군 - AcBut-CM	0.1 mg/kg 대조군 hlgG1- AcBut-CM	0.09 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.27 mg/kg huE22- AcBut-CM	0.3 mg/kg huE47- AcBut-CM
0	249 ± 17	252 ± 15	141 ± 14	165 ± 10	168 ± 9	141 ± 9	141 ± 7
3	397 ± 35	395 ± 29	234 ± 22	246 ± 23	255 ± 15	210 ± 11	223 ± 10
7	344 ± 32	237 ± 23	357 ± 30	166 ± 23	154 ± 11	299 ± 18	361 ± 20
10	829 ± 64	446 ± 35	524 ± 49	502 ± 59	429 ± 37	286 ± 15	498 ± 25
14	1250 ± 107	448 ± 38	376 ± 41	831 ± 88	531 ± 35	93 ± 5	329 ± 17
21	GT	396 ± 52	1150 ± 75	1406 ± 123	763 ± 64	161 ± 10	885 ± 51
28	GT	629 ± 116	GT	2372 ± 165	1457 ± 90	149 ± 17	1273 ± 81
35	GT	1097 ± 142	GT	GT	GT	397 ± 90	1724 ± 103
42	GT	GT	GT	GT	GT	889 ± 171	GT

[0534]

[0535] huE22-AcBut-CM을 이용한 모든 생체내 효능 연구의 결과가 표 29 및 30에 요약되어 있다. 요약하면, huE22-AcBut-CM이 TNBC (비-클라우딘 로우), 난소암, SCLC 및 결장직장암의 모델에서 종양 성장을 강력하게 억제하였다. huE22-AcBut-CM은 시험된 모든 사례 (TNBC 및 SCLC)에서 표준 치료 화학요법 (SOC)을 능가하였다. 종양 퇴행은 첫 번째 용량에서의 크기와 비교해서 평균 종양 용적에서의 감소로서 정의되었다.

[0536] 유방 및 난소 모델에서는, 종양 퇴행이 투여 후 평균 종양 용적에서의 감소로서 정의되었다. TGI = 종양 성장 억제. % TGI = [1 - (처리군의 평균 종양 용적) / (비히클의 평균 종양 용적)]. 종양이 퇴행된 사례에서는, 병세 진행까지의 시간 (TTP)이 첫 번째 용량 투여 시간과, 평균 종양 용적이 퇴행 후 상당히 증가한 (재성장한) 시간 사이의 일수인 것으로 결정되었다. 종양이 실험 과정 동안 재성장하지 않았을 경우에는, TTP가 첫 번째 용량 투여 시간과 실험이 종결되는 시간 사이의 일수이다. 상기 언급된 바와 같이, 모든 동물에게 huE22-AcBut-CM ADC를 4주기 동안 매주 2회 투여하거나, 독소루비신을 1.5 mg/kg으로 2주기 동안 매주 1회 투여하거나, 또는 시스플라틴을 5 mg/kg으로 2주기 동안 매주 1회 투여하였다. ADC 용량 수준은 항체 함량에 따라서 mg/kg으로 열거된다. 정맥내 투여한 144580을 제외한 모든 연구에서는 동물에게 복강내 투여하였다.

[0537] <표 29>

[0538] huE22-AcBut-CM 유방암 생체내 효능 연구의 요약

유방암 하위유형	종양 모델	1.5 mpk 독소루비신	EFNA4 단백질 (ng/mg)	huE22-AcBut-CM	
		퇴행 (TTP, 일) 또는 % TGI		용량 수준 (mg/kg)	퇴행 (TTP, 일) 또는 % TGI
TNBC: 기저	BR5 PDX	44% TGI	1.8	0.036	퇴행 (32)
				0.09	퇴행 (53)
				0.27	퇴행 (200)
	BR22 PDX	27% TGI	1.91	0.018	활성 없음
				0.036	21% TGI
				0.09	55% TGI
	BR31 PDX	30% TGI	1.02	0.27	퇴행 (43)
				0.09	퇴행 (56)
	BR56 PDX	49% TGI	1.01	0.27	퇴행 (91)
				0.018	활성 없음
				0.036	34% TGI
				0.09	56% TGI
TNBC: NL	BR13	16% TGI	1.00	0.27	퇴행 (60)
				0.018	활성 없음
				0.036	36% TGI
				0.09	퇴행 (42)
TNBC: 미지	144580	ND	1.74	0.27	퇴행 (84)
				0.03	11% TGI
				0.1	55% TGI
TNBC: CL	BR25	활성 없음	0.47	0.3	퇴행 (53)
	BR64	활성 없음	0.66	0.27	27% TGI
HER2+	BR17	66% TGI	ND	0.27	활성 없음

[0539]



[0540] NL= 정상-유사. CL = 클라우딘-로우. ND = 결정되지 않음.

[0541] <표 30>

[0542] huE22-AcBut-CM 난소암 생체내 효능 연구의 요약

난소암 하위유형	종양 모델	5 mpk 시스플라틴	EFNA4 단백질 (ng/mg)	huE22-AcBut-CM	
		퇴행 (TTP, 일) 또는 % TGI		용량 수준 (mg/kg)	퇴행 (TTP, 일) 또는 % TGI
고 악성도 장액성	OV39	퇴행 (28)	ND	0.036	활성 없음
				0.09	45% TGI
				0.27	퇴행 (49)
	OV44 PDX	퇴행 (60)	1.39	0.036	53% TGI
				0.09	59% TGI
				0.27	퇴행 (53)
	OV63 PDX	35% TGI	0.49	0.036	활성 없음
				0.09	59% TGI
				0.27	퇴행 (88)
MMMT	OV45 PDX	NA	3.64	0.018	활성 없음
				0.036	70% TGI
				0.09	퇴행 (60)
				0.27	퇴행 (200)
	OV55 PDX	NA	0.42	0.018	활성 없음
				0.036	67% TGI
				0.09	퇴행 (42)
				0.27	퇴행 (76)
	OV124	NA	ND	0.27	퇴행 (152)

[0543]

[0544] MMT = 악성 혼합 밀러 종양; ND= 결정되지 않음; NA = 적용 가능하지 않음.

[0545] 실시예 9

[0546] 종양-개시 세포 (TIC)의 감소

[0547] 항-EFNA4 항체-약물 접합체 처리가 종양 내에서의 종양-개시 세포 (TIC) 빈도를 감소시켰는지를 결정하기 위하여, 종양을 항-EFNA4 항체-약물 접합체, huE22-AcBut-CM, 또는 대조군 hIgG 항체-약물 접합체, 대조군-AcBut-CM으로 전처리한 다음, 전처리된 해리된 종양으로부터의 살아있는 인간 종양 세포를 제한 희석 분석에서 사용되지 않은 동물 내로 이식하였다. huE22-AcBut-CM 또는 대조군-AcBut-CM 처리된 종양-보유 마우스로부터 종양을 초기 처리 후 12일째 (BR22의 경우) 및 21일째 (BR13의 경우)에 수거하였다. 수거 당일, huE22-AcBut-CM 노출 후 종양이 퇴행되기 시작한 시기를 근거로 하여 일련의 이식을 선택하였다. 종양을 해리시키고 이를 항-인간 ESA, 항-마우스 CD45, 및 항-마우스 H2Kd 항체로 염색하였다. 처리군당 3개의 종양을 풀링하고, 살아있는 인간 종양 세포 (ESA+)를 유동 세포계수법에 의해 분류하였다.

[0548] BR22의 경우에는, 8마리 마우스 군에게 대조군-AcBut-CM 처리된 종양으로부터 분류된 400, 100, 50, 또는 20개 종양 세포를 주사하였고, 8마리 마우스 군에게 huE22-AcBut-CM 처리된 종양으로부터 분류된 390, 90, 40, 또는 18개 종양 세포를 주사하였다. BR13의 경우에는, 10마리 마우스 군에게 대조군-AcBut-CM 처리된 종양으로부터 분류된 400, 100, 60, 또는 20개 종양 세포를 주사하였고, 10마리 마우스 군에게 huE22-AcBut-CM 처리된 종양으로부터 분류된 380, 160, 50, 또는 25개 종양 세포를 주사하였다.

[0549] 수용자 마우스 내의 종양을 매주, 및 주사 후 21주째에 측정하였고, 수용자 마우스 내에서  $200 \text{ mm}^3$ 을 초과한 종양은 양성으로서 스코어링되었다. L-Calc 소프트웨어 [스템셀 테크놀로지 (Stemcell Technologies; 캐나다 브리티시 컬럼비아주 밴쿠버)]를 통한 프와송 분포 통계학을 이용하여, 이식 후 21주째에 종양을 수반한 수용자 및 수반하지 않은 수용자의 주사된 세포 용량을 이용하여, 각 집단 내에서의 TIC의 빈도를 계산하였다. BR22와 BR13 PDX 둘 다의 경우, 그 데이터는 TIC 빈도의 이차 종말점 (이는 표준 종양 용적 측정치와 독립적이다)을 이용하여 항종양 효능을 입증해준다. 상기 데이터는 추가로, huE22-AcBut-CM이 더 침습성이 강한/종양원성 TIC (또는 CSC)를 표적으로 한다는 것을 입증해준다.

[0550] BR22 처리된 종양에서의 TIC의 수는 표 31에 제시된 바와 같이, 대조군-AcBut-CM 처리된 55개 세포 중 1개의

TIC로부터, huE22-AcBut-CM 처리된 147개 세포 중 1개의 TIC로 약 3배 정도 감소되었다 (양측 시험에서  $p = 0.019$ ).

<표 31>

BR22 종양 모델에서의 종양-개시 세포 빈도

군	전처리	동물 1 마리당 체내이식된 세포 #	종양을 갖는 동물 #	군 내의 동물 #	TIC 빈도	p-값
A1	대조군-AcBut-CM	400	8	8	55 개 중 1 개	0.019
A2	대조군-AcBut-CM	100	6	8		
A3	대조군-AcBut-CM	50	3	8		
A4	대조군-AcBut-CM	20	6	8		
B1	huE22-AcBut-CM	390	7	8	147 개 중 1 개	
B2	huE22-AcBut-CM	90	6	8		
B3	huE22-AcBut-CM	40	1	8		
B4	huE22-AcBut-CM	18	0	7		

유사하게, BR13 처리된 종양에서의 TIC의 수는 표 32에 제시된 바와 같이, 대조군-AcBut-CM 처리된 75개 세포 중 1개의 TIC로부터, huE22-AcBut-CM 처리된 270개 세포 중 1개의 TIC로 약 2.6배 정도 감소되었다 ( $p = 0.0007$ ). 요약하면, huE22-AcBut-CM 처리된 종양 세포가 주사된 마우스는 유사한 수의 대조군-AcBut-CM 처리된 종양 세포가 주사된 마우스보다 적은 수의 종양을 일관되게 생성시켰는데, 이는 huE22-AcBut-CM 처리가 종양-개시 세포 (TIC)를 감소시켰다는 것을 나타낸다.

<표 32>

BR13 종양 모델에서의 종양-개시 세포 빈도.

군	전처리	동물 1 마리당 체내 이식된 세포 #	종양을 갖는 동물 #	군 내의 동물 #	TIC 빈도	p-값
A1	대조군-AcBut-CM	400	10	10	75 개 중 1 개	0.0007
A2	대조군-AcBut-CM	100	7	10		
A3	대조군-AcBut-CM	60	6	10		
A4	대조군-AcBut-CM	20	2	10		
B1	huE22-AcBut-CM	380	7	10	270 개 중 1 개	
B2	huE22-AcBut-CM	160	4	10		
B3	huE22-AcBut-CM	50	3	10		
B4	huE22-AcBut-CM	25	1	9		

## 실시예 10

### 혈장에서 전체 huE22-AcBut-CM의 시험관내 안정성

ADC가 투여된 마우스에서 약동학적 연구로부터의 혈장 샘플 내에서, 전체 ADC 및 전체 항체의 정량화는 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA) 방법을 이용하여 결정하였다. ELISA 및 액체 크로마토그래피 텐덤 질량 분광측정 (LC-MS/MS) 방법을 또한 사용하여, 래트 및 원숭이에서 탐구적 독성 연구로부터 및 ADC를 이용한 시험관내 혈장 안정성 연구에서 전체 ADC, 전체 항체 및 접합되지 않은 페이로드를 정량화하였다.

실시예 6에 기재된 접합 및 정제 과정에 따라서 제조된 huE22-AcBut-CM의 시험관내 안정성은 스프라그 돌리 래트 및 시노몰구스 원숭이 혈장에서 ELISA함으로써 전체 ADC 및 전체 항체를 측정함으로써 결정하였다. huE22-AcBut-CM을 마우스, 래트, 원숭이, 및 인간 혈장에서 168시간 이하 동안 37°C 하에 1 및 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 인큐베이션하였고, ELISA를 이용하여 전체 ADC 및 전체 항체 (인간 혈장의 경우는 제외됨)를 결정하였다 (표 33 및 34 참조).

래트, 마우스, 및 원숭이 혈장에서 37°C 하에 168시간 동안 huE22-AcBut-CM을 인큐베이션한 후 남아있는 전체 항체의 평균 ( $n = 3$ ) 양은 인큐베이션 농도 둘 다에서 완충제 대조군과 유사하였고 종 전반에 걸쳐 유사하였다.

37℃ 하에 168시간 동안 1% 소 혈청 알부민 (BSA)을 수반한 인산염 완충 식염수 (PBS)에서 huE22-AcBut-CM을 인큐베이션한 후 남아있는 평균 (n = 3) 전체 ADC 및 전체 항체 양은 1 µg/mL 인큐베이션의 경우에는 각각 94.5% 및 90.5%였고, 50 µg/mL 인큐베이션의 경우에는 각각 88.3% 및 98.6%였는데, 이는 생물학적 온도 하에서 혈장 내의 전체 ADC의 최소 열 분해가 존재하였다는 것을 나타낸다.

[0563] 전체 항체 농도는 인간 혈장 내에서 전체 ADC 인큐베이션에 대하여 측정할 수 없었는데, 이는 인간 IgG를 함유하는 인간 혈장에서 인간 IgG에 대한 ELISA 검출 제한 때문이다. 래트, 마우스, 원숭이, 및 인간 혈장에서 37℃ 하에 168시간 동안 huE22-AcBut-CM을 인큐베이션한 후 남아있는 전체 ADC의 평균 양은 인큐베이션 농도 둘다에서 완충제 대조군과 유사하였고 중 전반에 걸쳐 유사하였다. NC = 계산되지 않음; SD = 표준 편차.

[0564] <표 33>

[0565] 마우스, 래트 및 원숭이 혈장에 남아있는 전체 huE22 Ab %.

매트릭스	농도 (ug/mL)		시간 (시)					
			0	8	24	48	72	168
마우스	50	평균 SD	100 NC	111 25.4	117 16.3	97.1 18.1	96.7 20.8	89.9 24.0
	1	평균 SD	100 NC	105 8.0	126 16.7	109 13.2	101 9.9	102 17.7
래트	50	평균 SD	100 NC	98.1 8.0	115 21.0	111 21.0	87.1 3.7	83.3 13.3
	1	평균 SD	100 NC	76.8 6.6	89.0 7.5	81.4 3.2	79.4 5.6	64.6 10.5
원숭이	50	평균 SD	100 NC	106 6.6	109 1.3	106 15.6	103 1.8	94.3 11.7
	1	평균 SD	100 NC	107 8.9	111 2.0	107 15.9	106 5.7	95.0 12.0
완충제	50	평균 SD	100 NC	99.5 8.7	113 5.2	111 11.2	92.9 10.4	98.6 13.5
	1	평균 SD	100 NC	86.1 16.6	87.5 6.6	91.9 17.6	92.1 17.7	90.5 1.7

[0566]

[0567] <표 34>

[0568] 마우스, 래트, 원숭이 및 인간 혈장에 남아있는 huE22-AcBut-CM %

매트릭스	농도 (ug/mL)		시간 (시)					
			0	8	24	48	72	168
마우스	50	평균 SD	100 NC	100 13.7	104.2 11.7	95.2 11.3	84.0 10.0	83.0 3.6
	1	평균 SD	100 NC	96.7 5.1	101 11.8	102 23.7	87.5 12.8	79.1 9.5
래트	50	평균 SD	100 NC	94.7 1.6	97.3 6.7	107.6 21.7	96.9 7.9	70.1 10.6
	1	평균 SD	100 NC	95.2 4.3	93.0 8.6	86.2 9.1	81.0 4.2	69.0 7.3
원숭이	50	평균 SD	100 NC	100 8.6	103 7.0	87.9 5.1	81.9 2.6	71.6 5.8
	1	평균 SD	100 NC	98.3 8.7	99.8 13.1	91.0 6.5	90.8 5.3	75.1 2.5
인간	50	평균 SD	100 NC	101 15.1	105 12.0	93.4 13.8	83.5 11.5	82.9 3.4
	1	평균 SD	100 NC	102 10.1	93.2 7.1	98.4 11.5	89.3 8.3	82.5 5.1
완충제	50	평균 SD	100 NC	90.6 5.2	104 9.5	99.7 10.6	93.4 13.7	88.3 4.4
	1	평균 SD	100 NC	90.6 7.5	101 17.4	97.5 4.5	94.9 3.0	94.5 2.8

[0569]

[0570] 실시예 11

[0571] 작용 기전

[0572] huE22-AcBut-CM의 작용 기전을 분석하여, 이것이 칼리케아미신의 작용 기전과 일치하였다는 사실을 입증하였다. 인산화 히스톤 변이체 H2A.X (YH2A.X)는 DNA 손상의 확립된 바이오마커이다. 검정을 검증하기 위하여, 암 세포주를 접합되지 않은 AcBut-CM으로 처리하였고, YH2A.X 마커는 별개의 병소 내의 세포 핵에서 명백하였는데, 이는 특유의 염색 패턴이다. huE22-AcBut-CM으로 처리하면, 시험관내와 생체내 둘 다의 표적 세포에서 DNA 이중 가닥 절단물이 생성되었는데, 이는 칼리케아미신 ADC의 예상된 작용 기전과 일치한다.

[0573] HEK293T-EFNA4 또는 부모 HEK293T 세포를 4시간 동안 0.3 µg/mL huE22-AcBut-CM, 대조군 ADC 또는 접합되지 않은 huE22와 함께 노출시켰다. 세포를 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 고정시키며, 1% 트리톤(Triton)-X100으로 투과화시켰고, 1시간 동안 항-히스톤 YH2A.X [밀리포어(Millipore) #05-636]와 함께 인큐베이션하며, 세척하고, 30분 동안 알렉사플루오르(AlexaFluor)488-접합된 2차 항체 및 DAPI 핵산 스타인과 함께 인큐베이션한 다음, 세척하며 봉입제 및 커버슬립으로 보호하였다. 세포를 자이츠(Zeiss) LSM510 공초점 현미경으로 가시화하고, DNA 손상 및 DNA 함량의 YH2A.X 바이오마커에 관하여 분석하였다.

[0574] huE22-AcBut-CM에 노출시킨 후, HEK293T-EFNA4 세포는 DNA 손상을 표시하는 별개의 YH2A.X 병소를 나타냈는데, 이와는 달리 대조군 ADC 또는 접합되지 않은 huE22로 처리한 후에는 어떠한 병소도 관찰되지 않았다 (영상은 제시되지 않음). 더욱이, huE22-AcBut-CM은 표적-음성 HEK293T 세포에서 병소를 유도시키지 않았다. 따라서, huE22-AcBut-CM은 표적-의존적 및 칼리케아미신-의존적 방식으로 DNA 손상을 발생시켰는데, 이는 ADC의 예상된 작용 기전과 일치한다.

[0575] 생체내 약력학 연구에서 유사한 결과를 수득하였다. EFNA4-발현성 BR5 TNBC PDX 종양이 정착된 마우스에게 1 mg/kg huE22-AcBut-CM의 1회 용량을 투여하였고, 24, 48 및 96시간 후에 종양을 수거하였다. 종양을 포르말린에 고정시키고 파라핀에 매립시켰다 (FFPE). 박편을 2.4 µg/mL 항-huIgG [셀 시그널링(Cell Signaling) #3443-1] 및 1.8 mg/mL 항-γ-H2A.X (셀 시그널링 2577S)로 염색하고, 슬라이드를 아페리오(Aperio) AT2 상에서 스캔하였다. 디지털 영상 분석을 위하여, 건강하게 생존 가능한 조직의 영역을 분류하였지만, 괴사 영역 및 무관한 조직은 제거하였다. 이러한 생존 가능한 영역 내의 개개의 세포를, 사용자 정의 파라미터 (예를 들어, 막 hIgG 염색 또는 세포내 YH2A.X 염색)에 근거하여 스코어링하였고, 생존 가능한 영역 내에서의 마커-양성 세

포의 비율 (%)이 보고되었다.

[0576] 도 22에 도시된 바와 같이, 항-hIgG1 항체 (대각선 빗금 원)를 이용한 면역조직화학은 투여 후 24시간째에 거의 모든 종양 세포의 혈장 막에서, 그리고 96시간째에는 종양 세포의 약 절반의 혈장 막에서 염색을 명확히 보여주었다. 도 22에 추가로 도시된 바와 같이, 항- $\gamma$ -H2A.X 항체 (열린 다이아몬드)를 이용한 면역조직화학은 종양 세포에서의 핵 염색을 보여주었는데; 예상된 바와 같이, 피크 항- $\gamma$ -H2A.X 염색 시간은 피크 세포 결합 시간보다 뒤떨어졌는데, 이는 칼리케아미신이 DNA 손상을 발생시키기 전에 ADC 내재화 및 페이로드 방출이 일어나기 때문이다. 대시는 군당 중앙 값을 표시한다. 취합해 보면, 시험관내 및 생체내 연구는 항-EFNA4-AcBut-CM ADC에 대한 예상된 작용 기전을 명확히 보여주었다.

[0577] 칼리케아미신-발생된 DNA 손상은 아포토시스를 유도시키고, 이는 궁극적으로 세포 사멸을 유발시킨다 (Zein et al., 1988; Nicolaou et al., 1994; Prokop et al., 2003). huE22-AcBut-CM으로 처리한 후의 아포토시스는 세포 표면 상의 포스포티딜세린과의 결합에 의해 아포토시스성 세포를 표시하는 아넥신 V로의 염색에 의해 평가하였다 (Koopman et al., 1994). HEK293T-EFNA4 또는 부모 HEK293T를 huE22-AcBut-CM, 대조군 ADC 또는 huE22 mAb로 처리한 다음, 아넥신 V 및 생육성 군주 7AAD로 염색하였다. HEK293T-EFNA4 세포를 huE22-AcBut-CM으로 처리하면, 실질적으로 더 높은 수준의 아포토시스성 세포가 생성된 반면, 부모 HEK293T 세포를 처리하면 그렇지 않았다 (표 35 참조). 대조군 ADC 뿐만 아니라 huE22 mAb는 아포토시스를 상당한 정도로 유도시키지 못하였다. 따라서, huE22-AcBut-CM은 표적-의존적 및 칼리케아미신-의존적 방식으로 표적 세포 내에서 아포토시스를 유도시켰다.

[0578] <표 35>

[0579] 표적 세포 내에서의 아포토시스

화합물	농도 (ng/mL)	HEK293T-EFNA4			HEK293T 부모		
		% 초기 아포토시스	% 후기 아포토시스	% 총 아포토시스	% 초기 아포토시스	% 후기 아포토시스	% 총 아포토시스
없음 (비히클)	NA	4.9	1.7	6.6	1.6	0.7	2.3
huE22- AcBut- CM	1	22.4	7.8	30.2	6.0	1.6	7.6
	100	19.0	10.2	29.2	4.0	1.6	5.6
	1000	17.9	8.6	26.5	6.0	3.4	9.4
대조군 ADC	1	5.5	4.0	9.5	3.3	1.4	4.7
	100	4.5	2.1	6.6	3.7	0.9	4.6
	1000	12.0	5.6	17.6	7.6	3.9	11.5
huE22 mAb	1	4.7	3.1	7.8	2.7	1.3	4.0
	100	6.4	2.1	8.5	2.8	1.1	3.9
	1000	8.3	2.3	10.6	1.8	0.8	2.6

[0580]

[0581] 실시예 12

[0582] TNBC TPC의 강화

[0583] 19개의 유방 PDX 종양을 함유하는 PDX 종양 은행을 확립하였다. PAM-50(+) 패널을 이용한 마이크로어레이 서브클러스터링, 환자 병리학 보고서 및 종양 조직 병리학에 근거하여, 이들 PDX 종양 모델 중 13개가 TNBC 환자로부터 유래되는 것으로 확증되었고; 이들 중 3개가 클라우딘-로우 (CL) 하위유형인 것으로 명확히 규명되었다. 유방 PDX 종양을 수거하고, 단일 세포 현탁물로 해리시키며, 엄격한 이중선 판별 통문을 이용하여 유동 세포계수함으로써 분석하였다. 추가로, 인간 ESA+ 종양 세포를 대상으로 하여, CD46, CD324, CD24 및 CD34 발현에 관하여 각각 분석하였다.

[0584] 유방암 CD24에서 종양 영속 세포 (즉, 암 줄기 세포)의 경계를 표시하는 것으로 여겨지는 대단히 중요한 세포 표면 마커에 대하여 조심스럽게 표현형별 프로파일링하면, TNBC 환자로부터 유래되는 PDX 종양 내의 모든 세포는 상기 항원을 균일하게 발현하므로, 상기 하위유형의 유방암에서 TPC를 확인하기 위한 유용성을 거의 가지고 있지 않다는 사실이 명백해졌다. 유동 세포계수법에 의해 수백 개의 세포 표면 항원을 표현형별 프로파일링하여, BR22 및 BR31 PDX 종양에서 이질적으로 발현된 수많은 항원 (CD46 및 CD324 포함)을 확인하였다.

[0585] 기대되는 TPC (즉,  $ESA^+CD46^+CD324^+$  세포)를 FACS에 의해 BR22 PDX 종양으로부터 분리하였고, 체내이식에 앞서 유동 세포계수법에 의해 재분석하였다. 딸 종양(들)을 유사하게 해리시키고 분석하여, 부모 종양을 반영하는 세포 이질성을 확증하였다. 도 23 및 24에 각각 도시된 바와 같이, 해리된 BR22 및 BR31 유방 PDX 종양으로부터



터 분리된 50개의  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{+}$  세포 (대각선 빗금 원) 또는  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{-}$  세포 (열린 원)가 체내이식된 개개의 마우스에 대한 종양 성장 곡선. CD46 및/또는 CD324의 발현을 수반하지 않거나 수반한 단일 세포를 분리하고 이를 면역기능저하 마우스 내로 이식하는 것을 촉진시키기 위해 상기 마커를 활용한 결과,  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{+}$  세포만이 이들 부모 종양의 표현형 이질성을 복제하는 종양을 효율적으로 영속시킬 수 있었지만, 상기 세포의 CD324<sup>-</sup> 대응물은 그렇지 못하였다는 것이 입증되었다.

[0586] 완전히 이질적인 종양은 50개 정도로 적은 수의 체내이식된 세포로 효율적으로 개시된 반면, CD324<sup>-</sup> 하위집단 내에서의 TPC 빈도는 BD FACS아리아 상에 분리된 세포의 1% 세포 불순물 프로파일로부터 비롯되는 예상된 거짓 양성 예측의 오차 이내였다 (표 36 참조).

[0587] <표 36>

		ESA+ CD46+			
PDX	# 세포	CD324+		CD324-	
BR13	50	10/20	50%	2/20	10%
BR22	50	53/78	68%	2/41	5%
BR31	50	13/30	43%	0/15	0%
BR56	50	9/16	56%	2/13	15%
BR86	100	11/20	55%	0/11	0%
	200	8/12	67%	0/3	0%
TG+ 마우스		104		6	
이식된 마우스		176		103	
		59%		6%	
기능적 TPC 빈도		1:71 세포		1:1,000 세포	
TPC 강화 배수		>14 배			

[0588]

[0589] CD324<sup>+</sup> 세포 하위집단 중에서 1:71로 입증된 TPC 빈도는 100개의 CD324<sup>+</sup> 세포가 이식된 마우스당 평균 1.4개의 기능적 TPC를 산출시키는 것인 반면, 1% 분류 오차율은 분리된 CD324<sup>-</sup> 세포 중에서 평균 0.014% CD324<sup>+</sup> 세포 오염 빈도를 산출할 것인데, 이는 1.4% (0.2 내지 2.7% 범위)의 거짓 양성 빈도로 해석된다.

[0590] 추가로, 클라우딘 로우 및 비-클라우딘 로우 TNBC, 및 유방암의 루미날(Luminal) B 하위유형을 포함한, 각종 하위유형의 수많은 유방 PDX 종양 모델로부터 분리된  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{+}$  TPC 및  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{-}$  NTG 세포를 각각 사용하여, 일루미나(Illumina) HiSeq 2000 플랫폼 (100 x 100 bp 쌍형성된 말단 서열 분석)을 이용하여 완전한 전사체 서열 분석을 수행하였다. 정상 조직, 예컨대 심장, 간, 신장, 폐, 결장, 피부, 채장 및 난소로부터 수득된 mRNA를 이용하여 완전한 전사체 서열 분석을 또한 수행하였다. 이로써 생성된, 모든 샘플에 대한 fpkm (백만개당 킬로염기당 단편) 값을, 표준 기술을 이용하여 표준화한 다음 필터링하여, 세포 표면 상에 있는 것으로 주석이 달린 단백질을 코딩하는 유전자에 초점을 맞추었다. 입력으로서 설정된, 상기과 같이 필터링된 데이터를 이용하여, 바이오컨덕터(Bioconductor) 내의 DESeq2 패키지를 이용하여, NTG 세포와 정상 조직 둘 다와 비교해서 TPC에서 시차적으로 발현된 유전자를, 그들의 조정된 p-값과 함께 확인하였다. 특히, EFNA4는 거짓 발현에 대한 p-값을 조정된 후에도, NTG 세포 및 정상 조직과 비교해서 TPC에서 상당히 상승되었다.

[0591] 실시예 13

[0592] EFNA4 발현은 TNBC TPC에서 상승된다

[0593] TNBC TPC의 강화를 추가로 입증하기 위하여, 클라우딘 로우 및 비-클라우딘 로우 TNBC, 및 유방암의 루미날 B 하위유형을 포함한, 각종 하위유형의 수많은 유방 PDX 종양 모델로부터 분리된  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{+}$  TPC 및  $ESA^{+}CD46^{+}CD324^{-}$  NTG 세포를 사용하여, 일루미나 HiSeq 2000 플랫폼 (100 x 100 bp 쌍형성된 말단 서열 분석)을 이용하여 완전한 전사체 서열 분석을 수행하였다.

[0594] 정상 조직의 패널, 예컨대 심장, 간, 신장, 폐, 결장, 피부, 채장 및 난소로부터 수득된 mRNA를 이용하여 완전

한 전사체 서열 분석을 또한 수행하였다. 이로써 생성된, 모든 샘플에 대한 FPKM (백만개당 킬로염기당 단편) 값을, 표준 기술을 이용하여 표준화한 다음 필터링하여, 세포 표면 상에 있는 것으로 주석이 달린 단백질을 코딩하는 유전자에 초점을 맞추었다. 입력 설정된 상기와 같이 필터링된 데이터를 이용하여, 바이오컨덕터 내의 DESeq2 패키지를 이용하여, NTG 세포와 정상 조직 둘 다와 비교해서 TPC에서 시차적으로 발현된 유전자를, 그들의 조정된 p-값과 함께 확인하였다. 특히, EFNA4는 거짓 발현율에 대해 p-값을 조정한 후에도, NTG 세포 및 정상 조직과 비교해서 TPC에서 상당히 상승되었다.

[0595] 또한, 각종 하위유형을 포괄하는 19개의 유방 PDX 종양 중에서 (실시예 12에 기재됨), 마이크로어레이에 의해 벌크 유방 PDX 종양 또는 생명유지에 필요한 정상 기관에서 EFNA4 mRNA 발현을 평가하였다. EFNA4 mRNA 발현은 평가된 정상 유방 또는 다른 정상 조직보다 평균 2.6배 초과하여 더 높게 상승하였다.

[0596] 추가로, 입수 가능한 더 암 게놈 아틀라스 (The Cancer Genome Atlas; TCGA) 리서치 네트워크 (문헌 [Weinstein JN et al. Nature Genetics 45:1113-1120, 2013]) 데이터를 이용하여, 정상 인접 유방, TNBC, 및 비-TNBC 유방 종양에서의 EFNA4 mRNA의 발현을 평가하였다. EFNA4 발현은 일반적으로, 다른 유방암 하위유형과 비교해서 TNBC의 비-클라우딘 로우 하위유형에서 더 높았다. PAM(50)+ 유전자 시그니처를 292명의 환자로부터의 원발성 종양 표본으로부터 생성된 TCGA 데이터에 적용하면, 도 25에 도시된 바와 같이, 정상 인접 유방 (n = 108), 및 비-TNBC 하위유형의 유방 종양 (n = 197)과 비교해서, TNBC 종양 (n = 95)에서의 EFNA4의 발현 상승이 여전히 명백하였다. 수평선은 중앙 값을 표시한다.

[0597] 유방암 및 난소암에서의 EFNA4의 과발현의 유전적 기준을 분석하였다. 도 26은 TCGA 및 METABRIC (문헌 [Curtis, C et al. Nature Apr. 18; 486(7403):346-352, 2012]) 데이터세트로부터 유방 종양 샘플 중에서의 EFNA4 카피 수를 도시한 것이고 도 27은 난소 종양 샘플 중에서의 EFNA4 카피 수를 도시한 것이다. 백색 박스는 25번째 내지 75번째 백분위를 나타내고, 오차 막대는 10번째 내지 90번째 백분위의 경계를 표시하며, 각각의 점은 10번째 백분위 아래 또는 90번째 백분위 위에 속한다. 정상 카피 수 (n=2)가 파선으로써 제시된다.

[0598] 일부 유방 종양에서, EFNA4의 과발현은 카피 수 증가에 따른 결과일 수 있다 (도 26 참조). TCGA 유방암 데이터세트에서, 종양 샘플의 25.5%는 EFNA4의 주목할만한 카피 수 증가 ( $n \geq 2.5$ )를 나타낸 반면, 실질적인 카피 수 손실을 나타낸 것은 전혀 없었다. TNBC 샘플의 서브세트는 EFNA4 카피 수 증가에 비례하는 발생률을 갖고 있었다. 동일한 경향이 METABRIC 유방암 데이터세트에서 관찰되었는데, 종양 샘플의 14.3%에서  $n \geq 2.5$ 였다. 더욱이, EFNA4 mRNA 수준과 DNA 카피 수 간에는 강력한 상관관계가 있다 ( $r = 0.48$ ;  $p < 0.0001$ ). 그 데이터는 유방암, 및 특히 TNBC에서의 EFNA4의 과발현에 대한 잠재적인 유전적 기준을 제안하고 있다.

[0599] 상승된 EFNA4 유전자 발현이 단백질 상의 증가로 해석되었는지 아닌지를 결정하기 위하여, 전통적인 면역 및 하이브리도마 접근 방식에 의해 모노클로날 항체의 패널을 생성시켰고, 샌드위치 ELISA 쌍을 확인하였다. 17개의 정상 기관, 49개의 원발성 유방 종양 표본, 및 9개의 TNBC PDX 종양 모델로부터의 조직 단백질 용해물을 분석하여, EFNA4 단백질 수준이 정상 조직 및 다른 하위유형의 유방암과 비교해서 TNBC에서 상승되었을 뿐만 아니라 발현이 클라우딘-로우 서브세트와 비교해서 TNBC의 비-클라우딘-로우 하위부류에서 더 높은 것으로 관찰되었다. 이들 결과는 심지어 벌크 종양 수준에서도, 상승된 EFNA4 유전자 발현이 EFNA4 단백질에 있어서의 의미있는 증가로 해석된다는 사실을 확증시켜 준다.

[0600] 난소암에서는, TCGA 샘플의 실질적 분획 (22.2%)에서 EFNA4 카피 수 증가 ( $n \geq 2.5$ )가 관찰된 반면, 상당한 카피 수 손실의 사례는 전혀 없었다 (도 27 참조). EFNA4 mRNA 수준과 DNA 카피 수 간에는 강력한 상관 관계가 있었는데 ( $r = 0.32$ ;  $p < 0.0001$ ), 이는 유방암에서의 관찰 결과와 유사하였다. 유방암에서의 데이터와 취합해 보면, 이러한 관찰 결과는 종양에서의 EFNA4 과발현에 대한 잠재적인 유전적 기준을 제안하고 있다.

[0601] 유방 및 난소암 이외에도, 간암은 EFNA4 카피 수 증가의 높은 빈도를 나타내었다. 도 28은 다음 3가지 데이터세트로부터의 간세포 암종 (HCC) 종양 샘플 중에서의 EFNA4 카피 수를 도시한 것이다: 화이자(Pfizer)-ACRG (n = 310), 화이자-삼성(Samsung) (n = 272) 및 TCGA (n = 212). 모든 샘플은 삼각형으로써 나타내고, 수평선은 중앙 값을 표시한다. 정상 카피 수 (n=2)가 파선으로써 제시된다. 3가지 데이터세트 전반에 걸쳐 일관되게, 빈번한 EFNA4 카피 수 증가는 있었지만, 상당한 카피 수 손실은 없었는데; 샘플의 68.4%, 37.5% 및 29.7%가 ACRG, 삼성 및 TCGA 데이터세트에서 각각  $n \geq 2.5$ 를 나타내었다. 간암에서는, 3가지 독립적인 데이터세트에서 EFNA4 mRNA 수준과 DNA 카피 수 간에 강력한 상관관계가 있었다: TCGA 상관 계수 = 0.50 (p 약 0); ACRG 계수 = 0.56 (p 약 0) 및 삼성 계수 = 0.38 ( $p = 3E-09$ ). HCC에서의 EFNA4 증가는 국소성이 아니었고, 대신 염색체 영역 Chr1q21-1q22 (이는 또한, ELK4, MDM4 및 PARP1을 포함한다)의 증폭의 맥락에서 발생되었다. 특히, EFNA4 mRNA 발현 수준은 HCC 데이터세트에서 카피 수와 강력하게 상관관계가 있었는데, 이는 EFNA4 증가를 수반

한 종양이 항-EFNA4 ADC를 이용한 치료에 더 반응성일 수 있다는 것을 제안하였다.

[0602] 실시예 14

[0603] 에프린-A4의 결합 특성

[0604] Eph 수용체와 결합하는 에프린-A4의 특성을 추가로 분석하였다. 항-EFNA4 항체가 에프린-A4와 결합하고, 한편 이 리간드가 그의 Eph 수용체와 맞물리기 때문에, 이들 두 거대분자 간의 친화도를 결정하였다. 시판용 Eph 수용체와 에프린-A4의 친화도는 BIA코어 2000 (GE 헬스케어)을 이용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 직접적으로 비교하여, 가장 관련있는 수용체를 결정하였다. 항-인간 항체 포획 키트를 이용하여, CM5 바이오센서 칩 상에 재조합 Eph 수용체를 고정화하였다. 각 항원 주사 주기에 앞서, 2분의 접촉 시간 및 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속을 이용하여 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 Eph 수용체를 상기 표면 상에서 포획하였다. 이와 같이 포획된, 기준선으로부터의 항체 로딩은 150 내지 260 반응 단위로 일정하였다. 수용체 포획 및 1분 기준선 후, 단량체성 인간 에프린-A4를, 2분 회합기에 이어 2분 해리기 동안 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속으로 400, 241, 145, 87, 53, 32, 19 및 12 nM 농도로 상기 표면 위에 유동시켰다. 각 주기 후, 3 M  $\text{MgCl}_2$ 의 30초 접촉 시간을 이용하여 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ 으로 항-인간 포획 표면을 재생시켰다.

[0605] 비아코어 데이터는 평형시 반응 ( $R_{eq}$ )의 평균을 먼저 계산함으로써 처리하였다. 이어서, 이러한  $R_{eq}$ 를 농도 (M)에 대하여 플롯하였고, 정지 상태 친화도 피트를 이용하여 친화도 및 이론적  $R_{max}$ 를 계산하였다. 모든 경우에, 적어도 5개의 상이한 분석물 농도를 이용하여 상기 계산을 수행하였다. 모든 데이터 분석 단계를 비아이벨류에이션(BiaEvaluation) 소프트웨어 3.1 (GE 헬스케어)에서 완료하였다.

[0606] Eph 수용체와 결합하는 에프린-A4로부터의 미가공 데이터 및  $R_{eq}$  대 농도 곡선 (제시되지 않음)은 가장 높은 친화도를 갖는 수용체가 EphA2였고 가장 낮은 친화도를 갖는 수용체가 EphA10이었다는 것을 결정하였다. 표 37은 에프린-A4와의 결합에 대해 시험된 9개의 Eph 수용체를 친화도가 감소하는 순서로 보여준다. 이 데이터는 에프린-A4에 대한 Eph 수용체의 친화도가 모두, 본원에 개시된 항-EFNA4 항체보다는 낮다는 것을 입증하고 있다.

[0607] <표 37>

수용체	Kd (nM)
EphA2	31
EphA3	77
EphA6	82
EphA7	86
EphB3	108
EphA4	122
EphB2	135
EphA1	414
EphA10	431

[0608]

도면

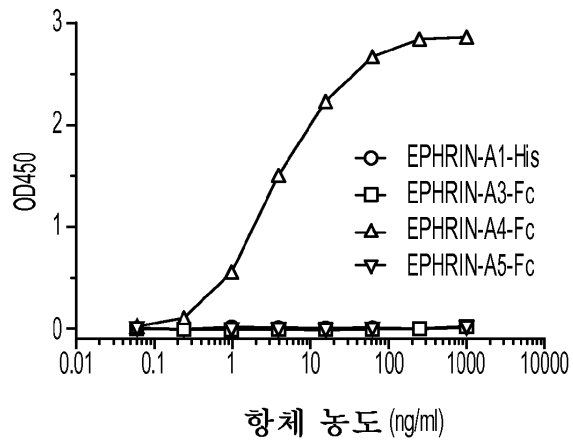
도면1

huEFNA4 이소 b NP\_872631.1 MRLPLLRRTVLWAAFLGSPLRGGSSLRHVYWNSSNPRLLRGDAVVELGL  
huEFNA4 이소 c NP\_872632.2 MRLPLLRRTVLWAAFLGSPLRGGSSLRHVYWNSSNPRLLRGDAVVELGL  
huEFNA4 이소 a NP\_005218.1 MRLPLLRRTVLWAAFLGSPLRGGSSLRHVYWNSSNPRLLRGDAVVELGL  
huEFNA4 이소 b NP\_872631.1 NDYLDIVCPHYEGPGPEGPETFALYMVDWPGYESQAECPRAYKRWVCS  
huEFNA4 이소 c NP\_872632.2 NDYLDIVCPHYEGPGPEGPETFALYMVDWPGYESQAECPRAYKRWVCS  
huEFNA4 이소 a NP\_005218.1 NDYLDIVCPHYEGPGPEGPETFALYMVDWPGYESQAECPRAYKRWVCS  
huEFNA4 이소 b NP\_872631.1 LPFGHVQFSEKIQRFTPFSLGFEFLPGETYYYYISVPTPESSGQCLRLQVS  
huEFNA4 이소 c NP\_872632.2 LPFGHVQFSEKIQRFTPFSLGFEFLPGETYYYYISVPTPESSGQCLRLQVS  
huEFNA4 이소 a NP\_005218.1 LPFGHVQFSEKIQRFTPFSLGFEFLPGETYYYYISVPTPESSGQCLRLQVS  
huEFNA4 이소 b NP\_872631.1 VCCKERR-ARVLPSPGGGIPAACTGGANSRQDQDGMGEIRGSEVTLA  
huEFNA4 이소 c NP\_872632.2 VCCKERN-LPSHPKEP-- -E-----SSQDPLEEGSLLPALGVPIQTDK  
huEFNA4 이소 a NP\_005218.1 VCCKERKSESAHPVGSPPGESG----TSGWRGGDTPSPICLLLLLLLLILR  
huEFNA4 이소 b NP\_872631.1 GACPLITG (서열 3)  
huEFNA4 이소 c NP\_872632.2 MEH----- (서열 4)  
huEFNA4 이소 a NP\_005218.1 LLRIL--- (서열 2)

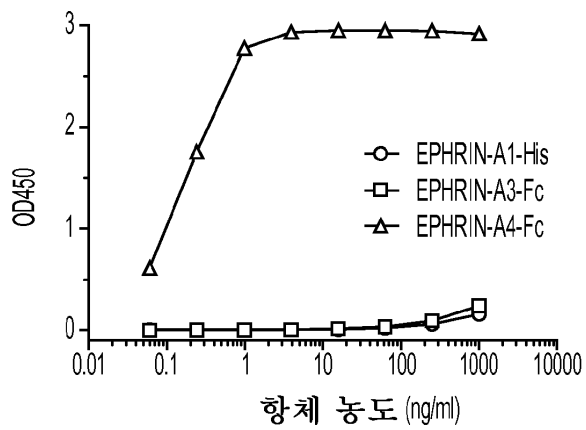
클론	이소형	VH	DH	JH	CDRH1 서열 65-76	CDRH2 서열 77-88	CDRH3 서열 89-100	VL	JL	CDRL1 서열 101-112	CDRL2 서열 113-124	CDRL3 서열 125-136
E2	IgG1/K	VHJ558	P1	JH3	GVTFTDYE	FDPETGNT	ARGYPAMFGY	IGKV1-110	JK1	QSLAHNNGNTY	KVSNMRFES	SQDTHVPPT
E5	IgG1/K	IGHV2-6	NONE	JH3	GSLLTTYG	IMGGSST	ASDWAY	IGKV6-15	JK2	QNVGTN	SASYRYS	QQYKRYPYT
E8	수행되지 않음	VHJ558	IGHD6-1	JH4	GVTFTNYW	IDPSDSYI	ARERLSHAMDY	IGVK9-128	JK2	QDIKSY	YATSLAD	LQHGESPYT
E15	IgG1/K	IGHV5-6	DSP2.9	JH3	GTFESTYG	ISSGGTYT	TRHDPNDGYTFEAY	IGKV6-b	JK5	QSVGNV	YASNRYT	QQHYSSPLT
E22	IgG2a/K	VHJ558	DFL16.1e	JH4	GVTFTGY	YPGNFNT	AREDGSPYYAMDY	IGKV1-110	JK1	QSLVHSGNTF	RVSNRFS	FQATHVPWT
E31	IgG1/K	VHJ558	DFL16.1	JH4	GVTFTRDW	IHPVDESET	VTFIKTMMDTYYYAMDY	IGKV1-135	JK1	QSLHSDGKTY	LVSNLDS	WQGTHFPQT
E47	IgG1/K	IGHV1-26	P1inv	JH2	GVTFTYFY	INPNNGGT	ARWVGTHYFDY	IGKV21-7	JK1	QSVSSSYTY	FASNLES	QHSWEIPPT
E60	IgG2a/K	IGHV1-39	DQ52a.2	JH4	GVSFTVYN	INPYGGT	ARGGKTGTYYYAMDY	IGKV12-44	JK5	ENIDSY	AATLLAD	QHYYSTLT
E73	IgG1/K	IGHV3-6	DSP2.13	JH2	GVSITSGY	ISYDGRN	AREGYGDYPPDY	IGKV21-7	JK1	QSVSSSSYSY	YASNLES	QHSWEIPRT
E76	IgG2a/K	J558.87.183	DFL16.1e	JH4	GVTFTGY	YPGNFNT	AREDGSPYYAMDY	IGKV1-110	JK1	QSLVHSGNTF	RVSNRFS	FQATHVPWT
E91	IgG2a/K	IGHV1-64	P8inv	JH4	GVTFTSYW	IHPNSDTI	ATPERRRAMDY	IGKV4-74	JK4	SSLSSSY	STFLAS	QQYDSSPPT
E105	IgG1/K	VH3660	DSP2.2	JH3	GASITSGY	INYSGNT	ARSTMITTGAMFAY	IGKV6-32	JK5	QSVSKD	YASNRYT	QQDYSSPLT



도면3

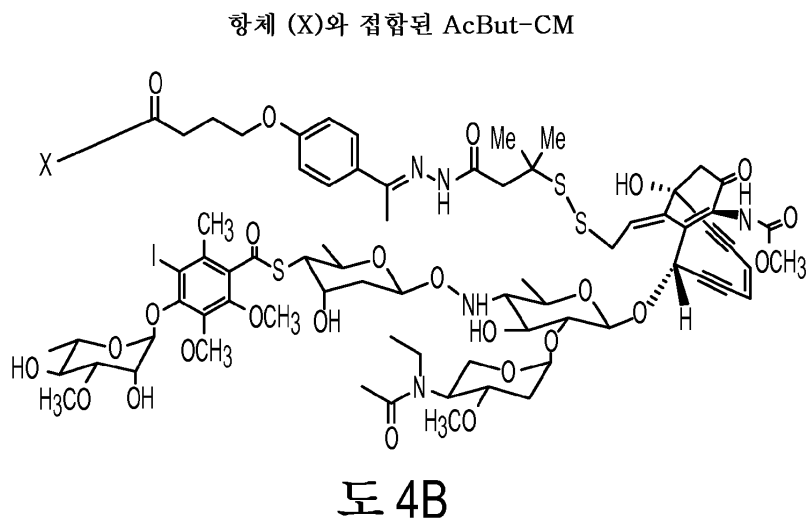
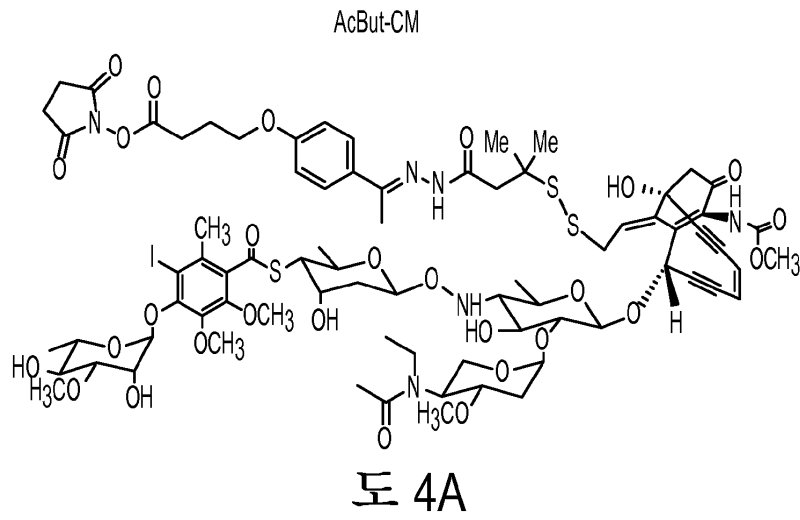


도 3A

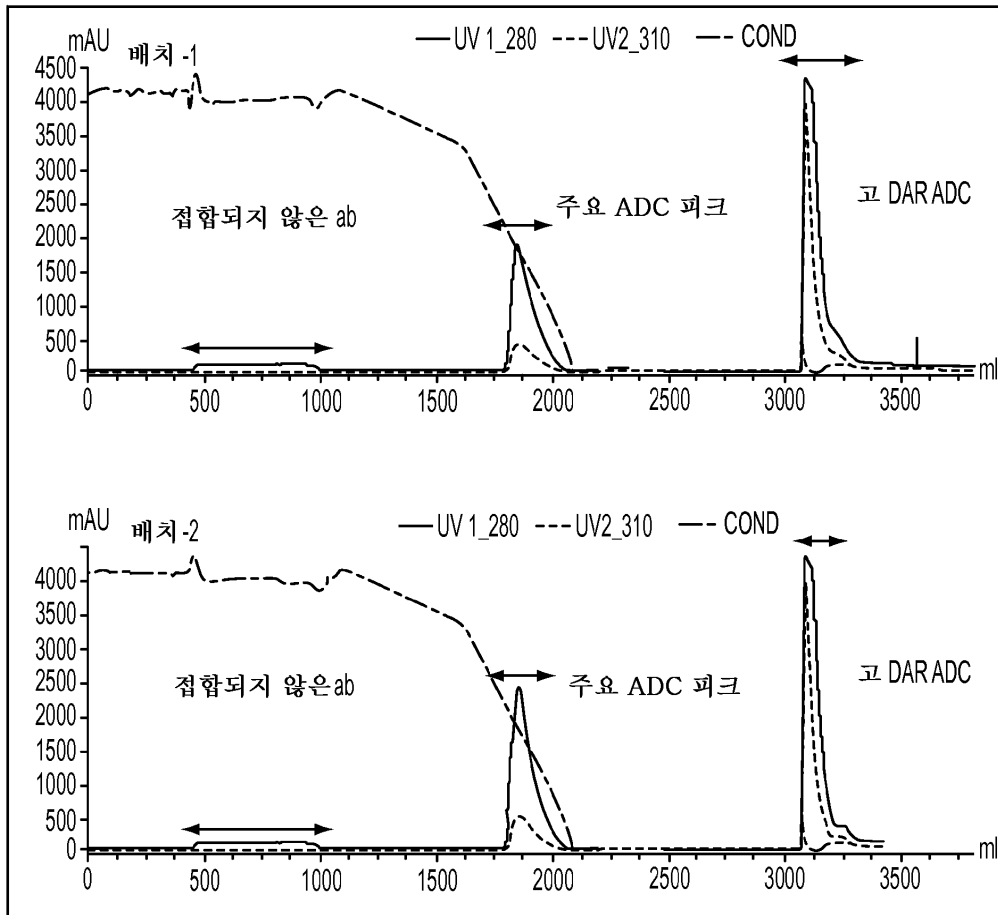


도 3B

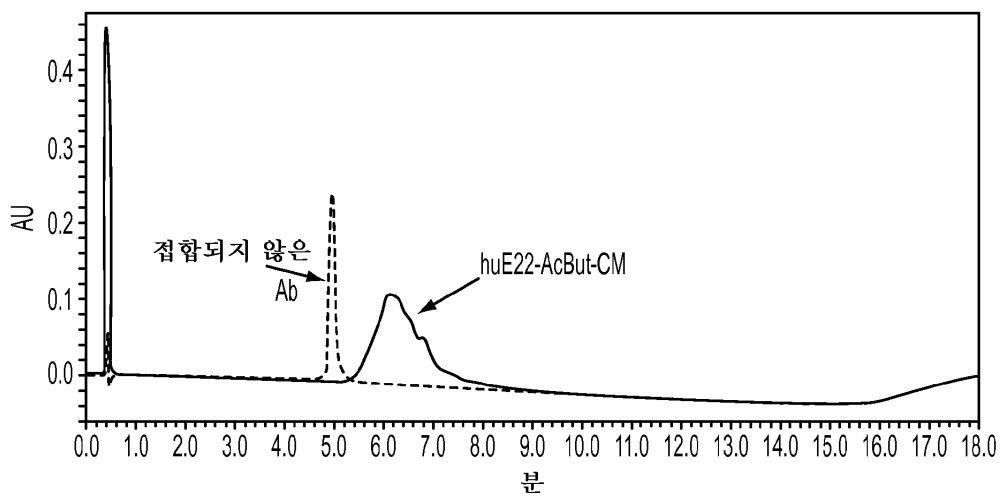
도면4



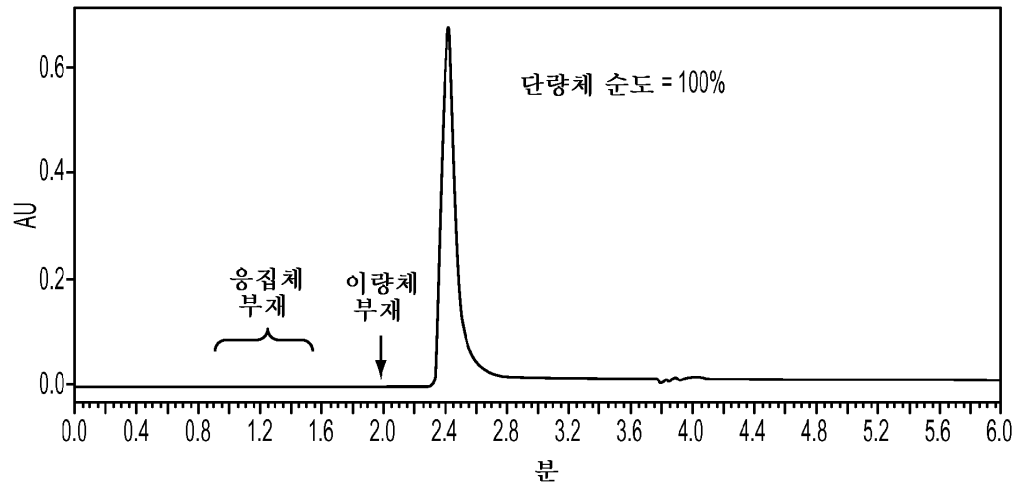
도면5



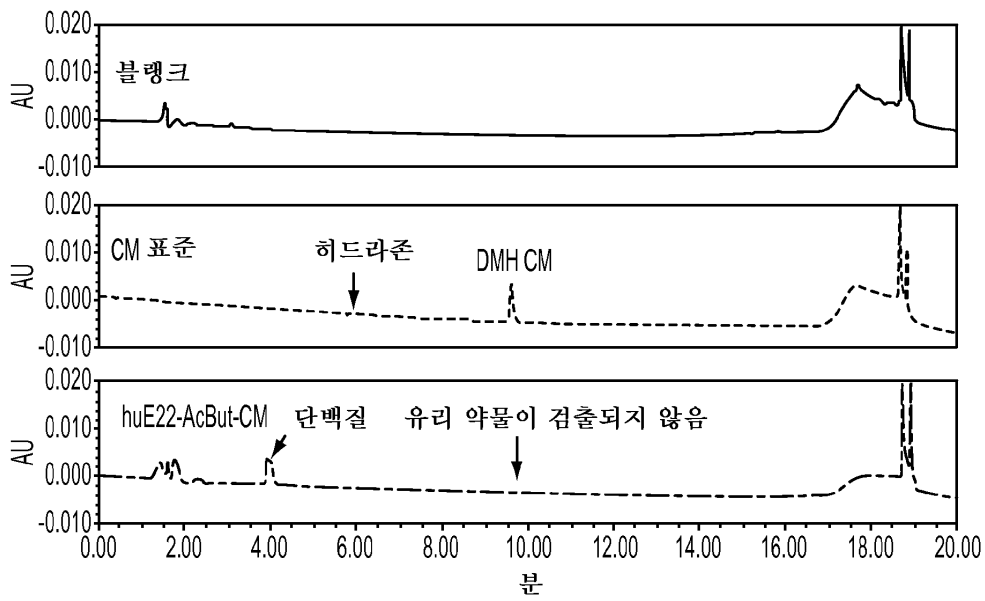
도면6



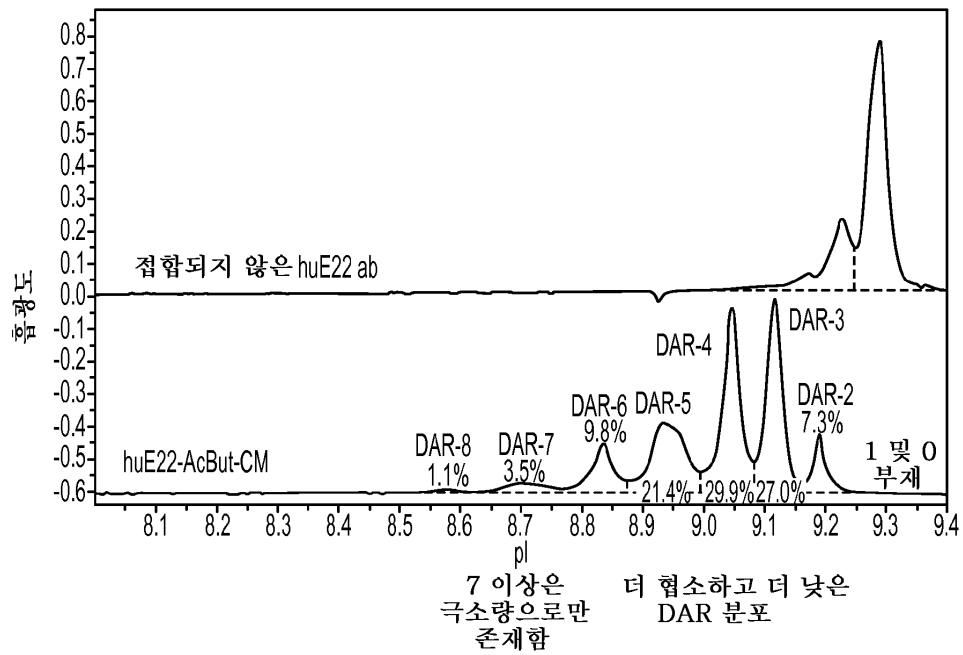
도면7



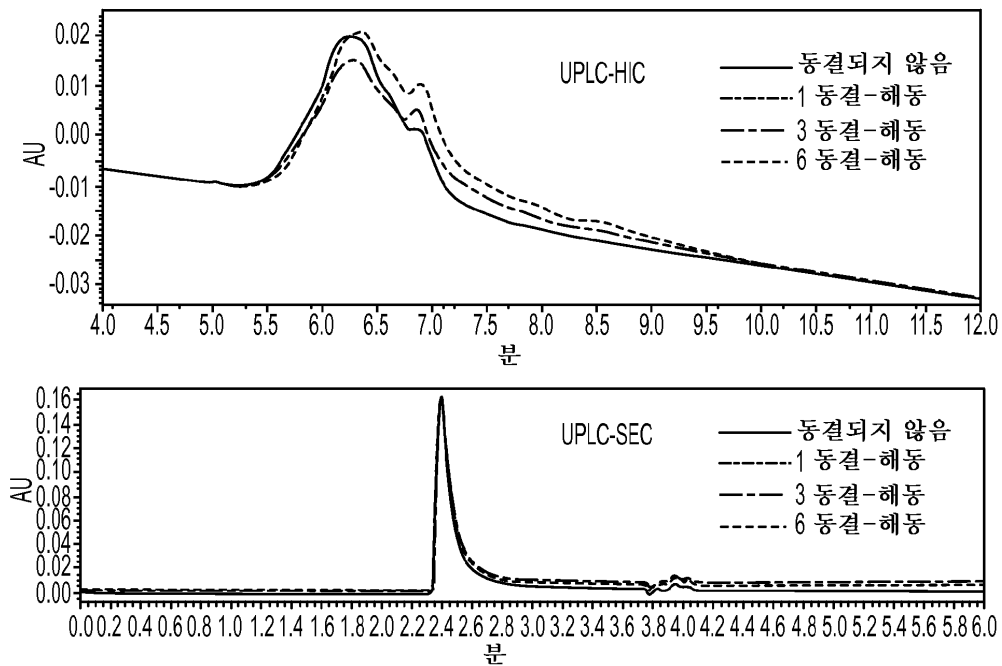
도면8



도면9

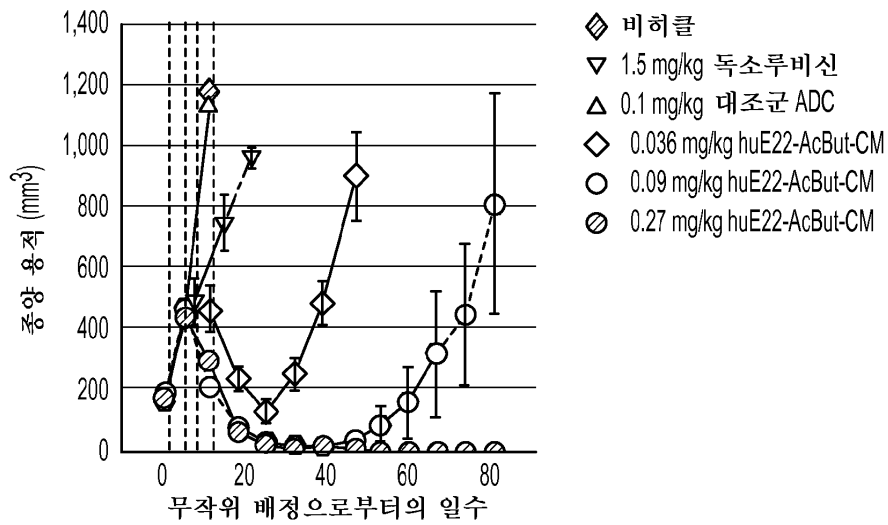


도면10

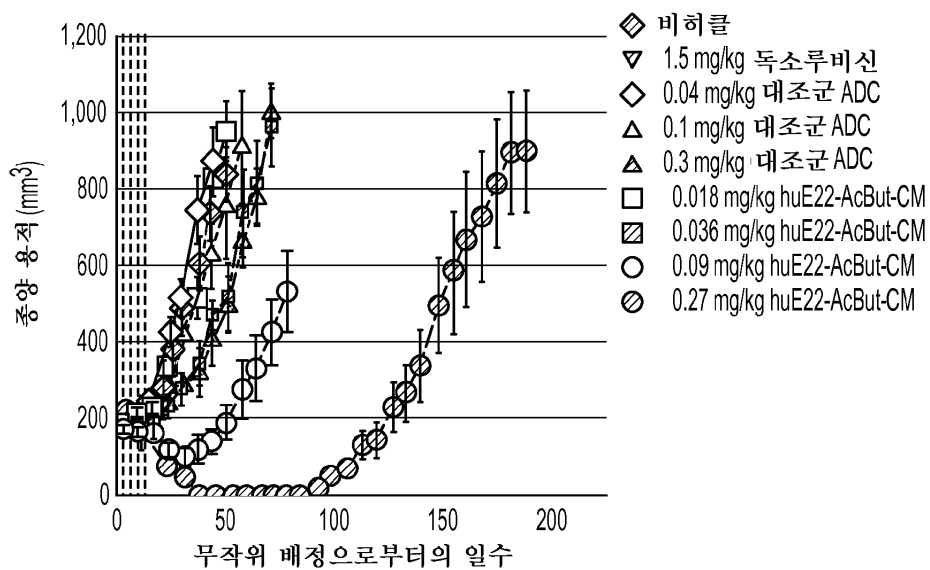




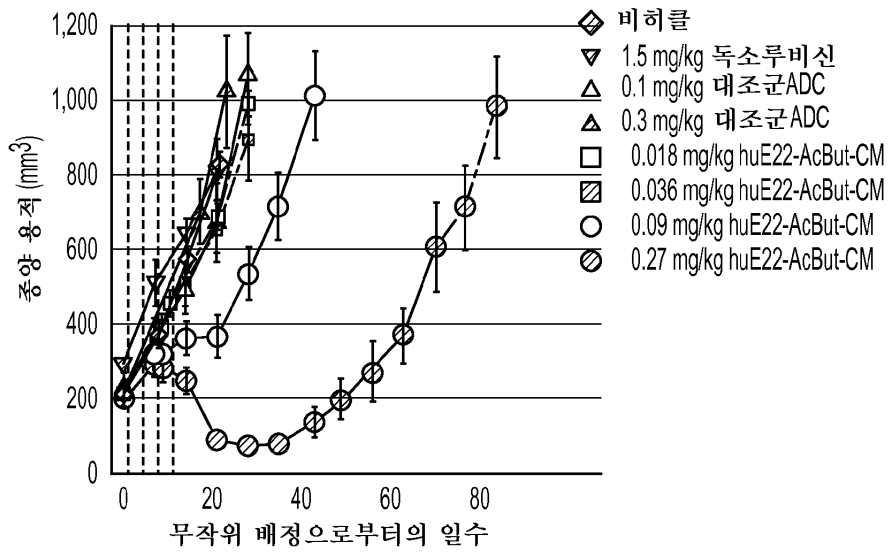
도면11



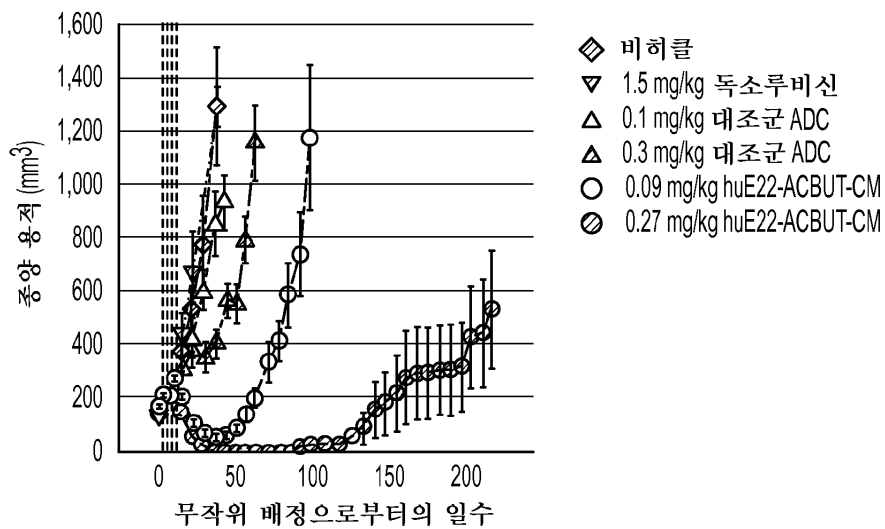
도면12



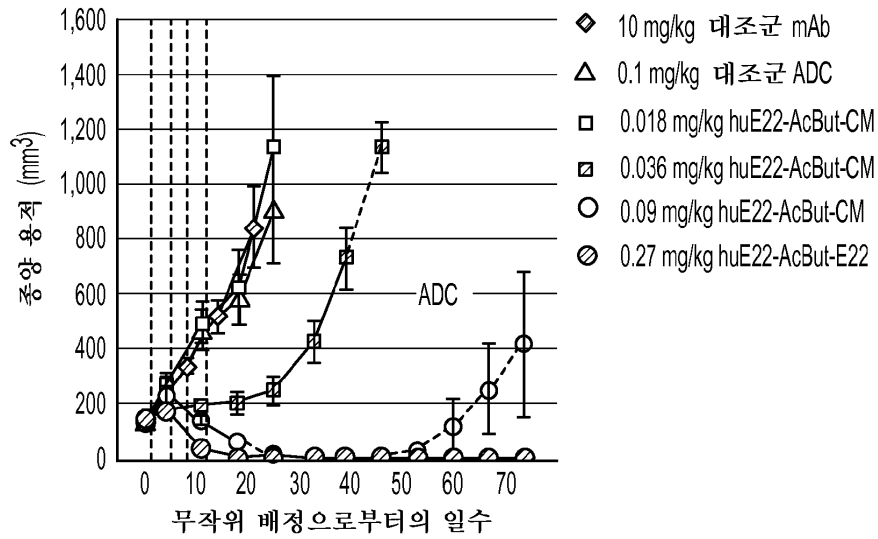
도면13



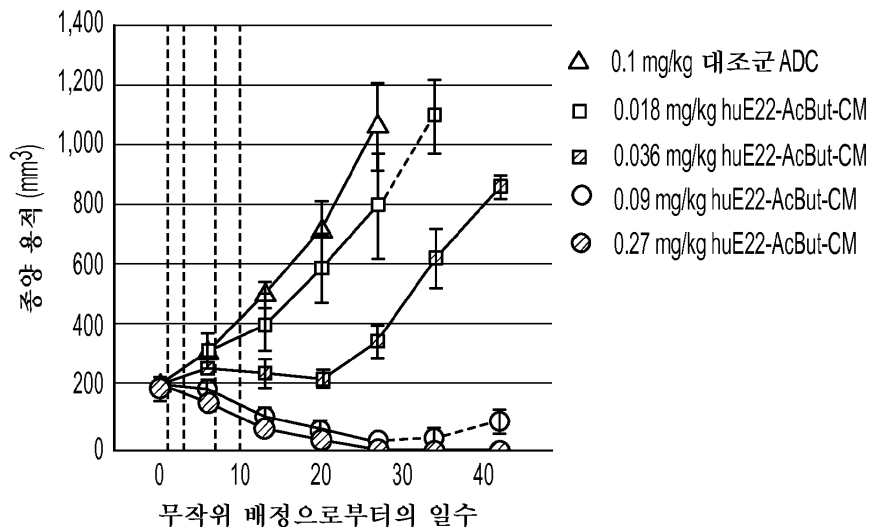
도면14



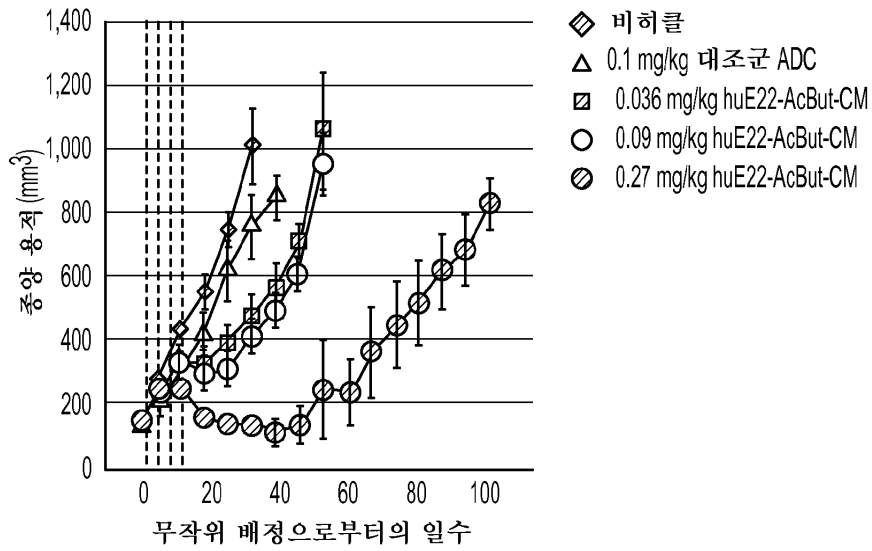
도면15



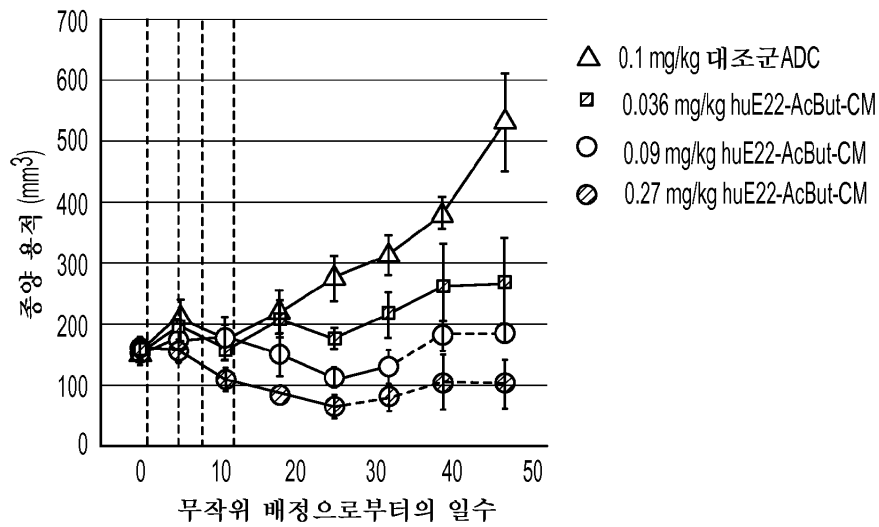
도면16



도면17



도면18



도면19

BR22 TNBC PDX에서의 각종 항-EGFNA4-MTI의 효능

인	비하클	3 mg/kg huE15- vc0101	10 mg/kg huE15- mc8261	3 mg/kg huE22- vc0101	10 mg/kg huE22- mc8261	3 mg/kg huE47- vc0101	10 mg/kg huE47- mc8261
0	195 ± 17	198 ± 16	198 ± 22	184 ± 24	184 ± 24	172 ± 17	184 ± 15
7	376 ± 43	313 ± 17	329 ± 52	317 ± 37	339 ± 36	259 ± 33	288 ± 21
14	564 ± 54	354 ± 39	664 ± 65	558 ± 83	781 ± 98	547 ± 56	735 ± 101
21	819 ± 97	299 ± 59	1061 ± 69	901 ± 175	1377 ± 125	839 ± 110	1270 ± 125
28	GT	478 ± 113	1739 ± 110	1537 ± 321	2257 ± 173	1618 ± 221	2442 ± 344
35	GT	1032 ± 216	2935 ± 341	2617 ± 414	3284 ± 261	2468 ± 271	3190 ± 265

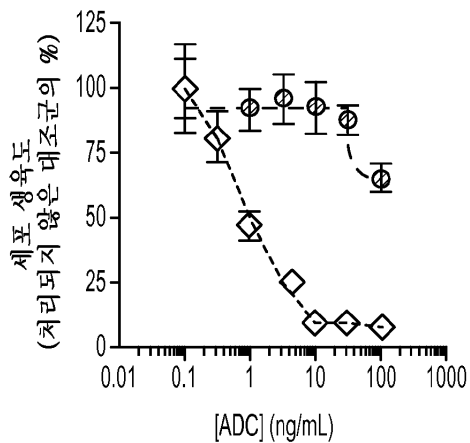


도면20

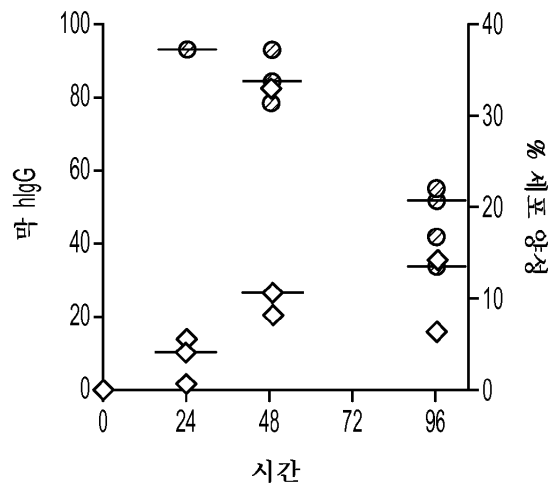
BR31 TNBC PDX에서의 각종 항-EFNA4-MTI의 효능

일	비히클	3 mg/kg 대조군-AcBut-CM	3 mg/kg huE22-vc0101	3 mg/kg huE47-vc0101	3 mg/kg huE15-vc0101
0	159 ± 10	148 ± 12	151 ± 13	142 ± 11	167 ± 17
7	269 ± 17	227 ± 23	188 ± 17	176 ± 18	174 ± 18
14	425 ± 32	133 ± 10	80 ± 8	84 ± 8	99 ± 10
21	668 ± 50	101 ± 21	67 ± 6	58 ± 10	44 ± 11
28	1088 ± 93	70 ± 17	44 ± 10	60 ± 13	33 ± 10
36	GT	105 ± 28	57 ± 13	79 ± 17	41 ± 13
44	GT	214 ± 76	87 ± 28	146 ± 32	91 ± 30
49	GT	234 ± 83	111 ± 37	205 ± 43	119 ± 36
56	GT	393 ± 103	151 ± 55	285 ± 57	169 ± 44
63	GT	680 ± 181	454 ± 138	637 ± 140	376 ± 98
71	GT	1169 ± 300	680 ± 206	857 ± 176	641 ± 178
78	GT	1300 ± 331	949 ± 215	1005 ± 256	837 ± 271
85	GT	GT	1005 ± 201	GT	1129 ± 374

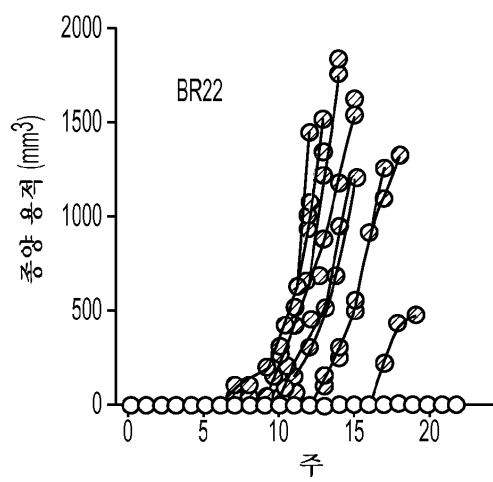
도면21



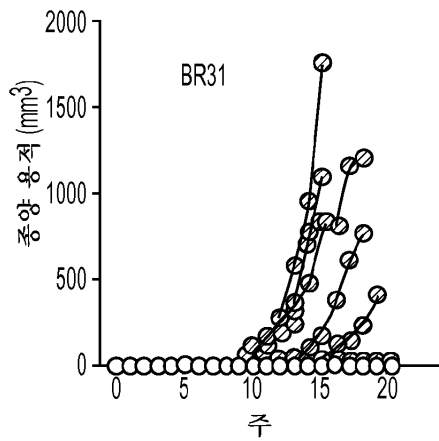
도면22



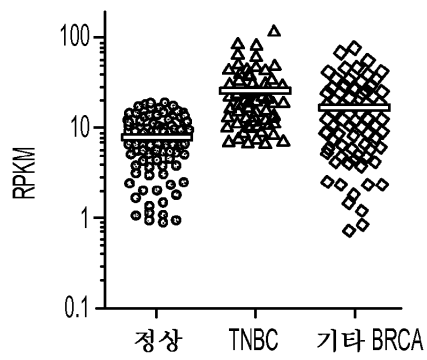
도면23



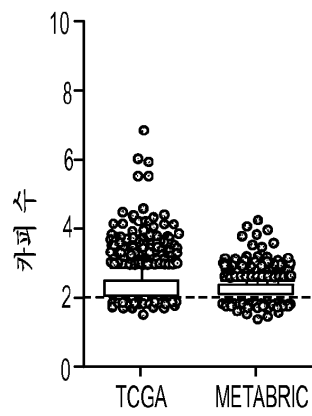
도면24



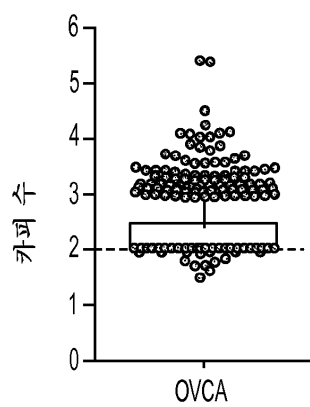
도면25



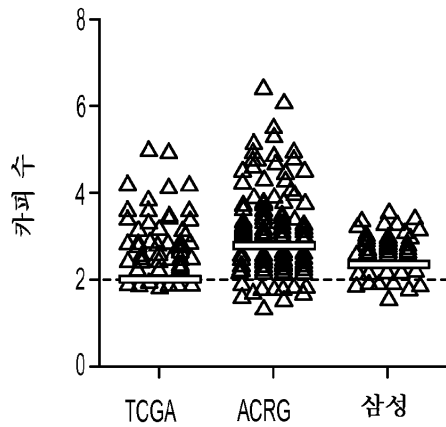
도면26



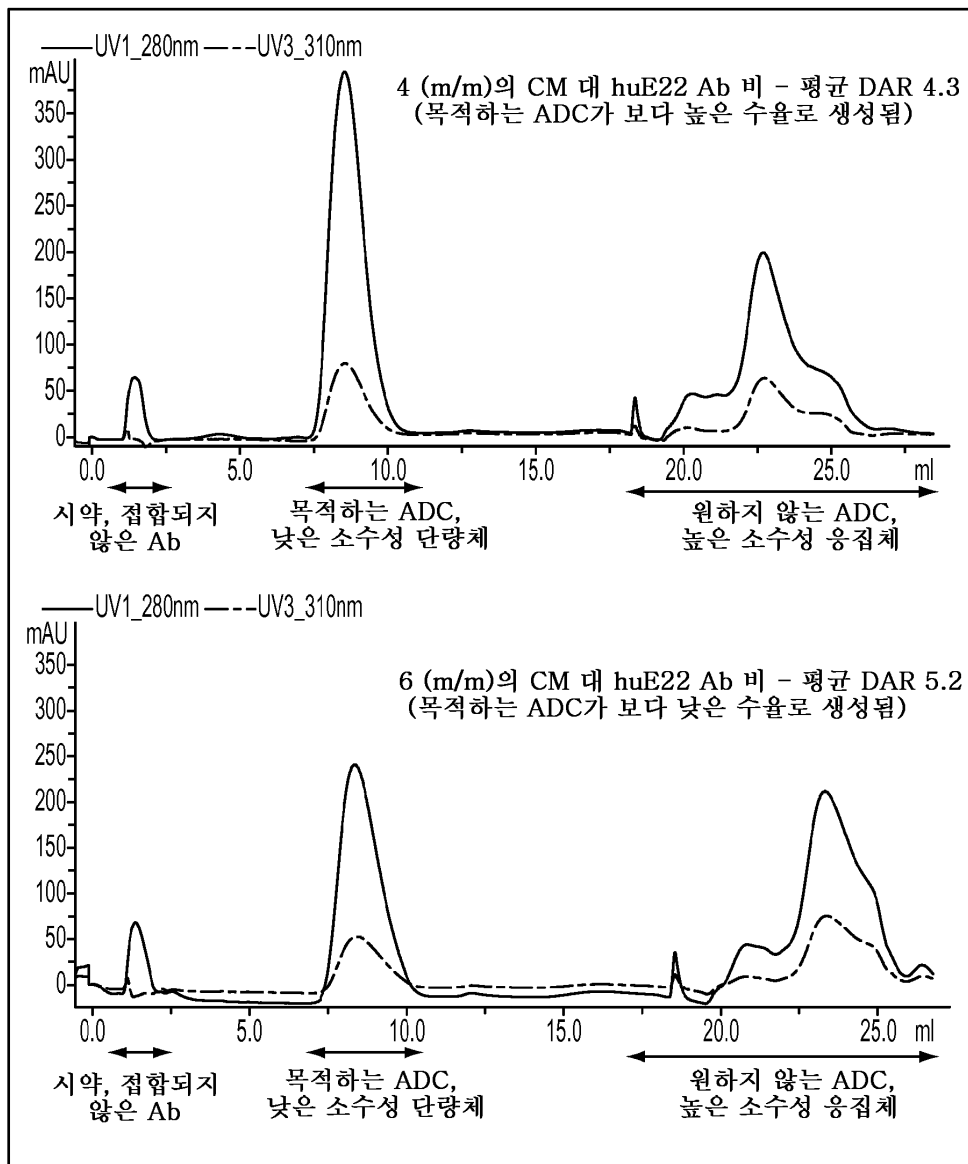
도면27



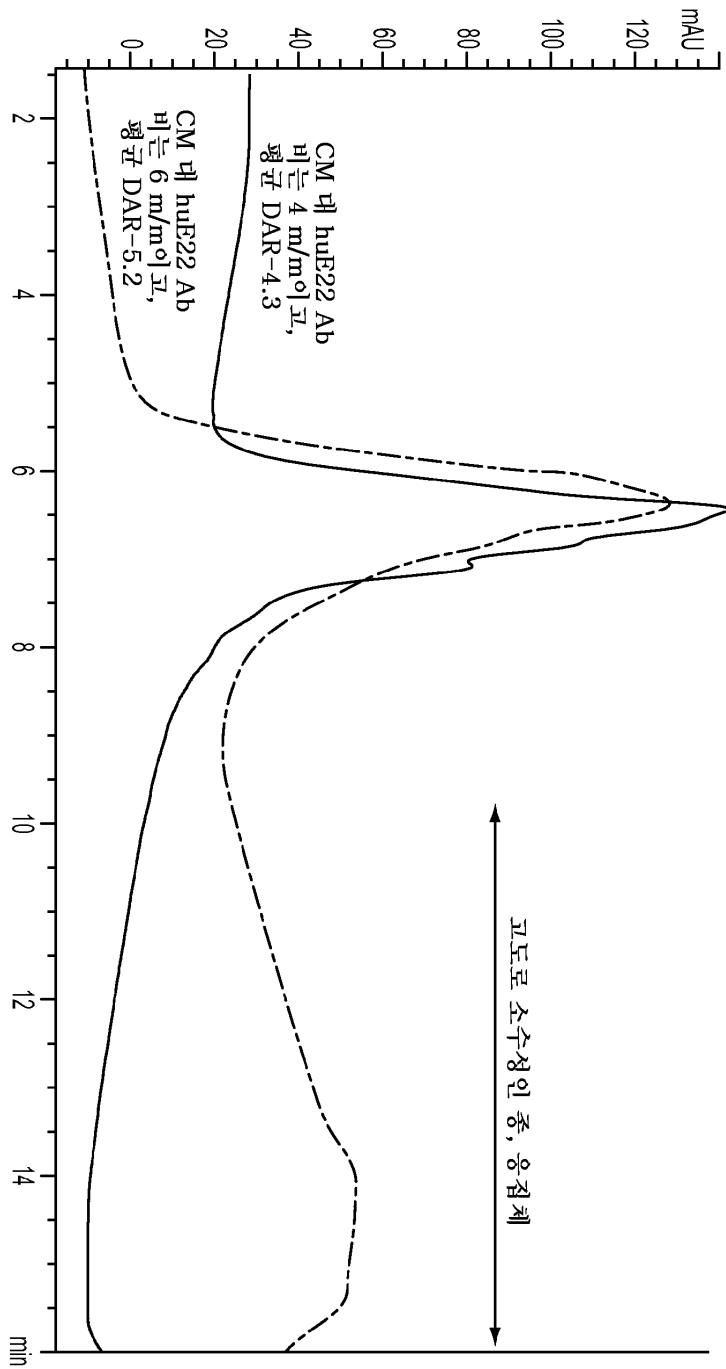
도면28



도면29



도면30



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc.

Damelin, Marc

<120> ANTI-EFNA4 ANTIBODIES AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

<130> PC72005



<160> 138

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1276

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cttcctctt cactttgtac ttttctctcc tcgactgtga agcgggccgg gacctgccag      60
gccagaccaa accggacctc gggggcgatg cggtctgtgc cctgtctgcg gactgtcctc    120
tgggccgcgt tctcggctc ccctctgcgc gggggctcca gcctccgcca cgtagtctac    180

tggaactcca gtaacccag gttgtcttga ggagacgccg tggaggagct gggcctcaac     240
gattacctag acattgtctg cccctactac gaaggcccag ggccccctga gggccccgag     300
acgtttgtct tgtacatggt ggactggcca ggctatgagt cctgccagcg agaggggccc     360
cgggcctaca agcgtgggt gtgtcccttg ccttttgccc atgttcaatt ctcagagaag     420
attcagcgct tcacaccctt ctccctcggc tttagattct tacctggaga gacttactac     480
tacatctcgg tgccactcc agagagttct ggccagtgtc tgaggctcca ggtgtctgtc     540
tgctgcaagg agaggaagtc tgagtcagcc catcctgttg ggagccctgg agagagtggc     600

acatcagggt ggcgaggggg ggacactccc agccccctct gtctcttgct attactgtg      660
cttctgattc ttcgtcttct gcgaattctg tgagccaagc agaccttccc tctcatccca     720
aggagccaga gtctcccaa gatccctgg aggaggaggg atccctgtct cctgcactgg     780
gggtgccaat tcagaccgac aagatggagc attgatgggg gagatcagag ggtctgaggt     840
gactcttgca ggagcctgtc ccctcatcac aggctaaaga agagcagtag acagccctgg     900
acactctgaa gcagaggcaa gacaacaca ggcgctttgc aggctgtctc gagggtctca     960
gcccattccc caggaggact gggatttggc atgatcaaat cctcaagcca gctggggggc    1020

caggctgaag acctggggac aggtcgattg ctggaccagg gcaaagaaga agccctgccca    1080
tctgtgccct gtgggccttt tccctggggc agcaccttgc cctccccagg ggatcactca    1140
cttgtcttct atgaagacgg actcttcatg aggttgaatt tcatgccagt ttgtattttt    1200
ataagtatct agaccaaac ttcaataaac cactcatctt tttgttgccc tccccaaaaa    1260
aaaaaaaaaa aaaaaa                                     1276

```

<210> 2

<211> 201

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Arg Thr Val Leu Trp Ala Ala Phe Leu

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

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

130 135 140  
Leu Arg Leu Gln Val Ser Val Cys Cys Lys Glu Arg Lys Ser Glu Ser  
145 150 155 160  
Ala His Pro Val Gly Ser Pro Gly Glu Ser Gly Thr Ser Gly Trp Arg  
165 170 175  
Gly Gly Asp Thr Pro Ser Pro Leu Cys Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
180 185 190  
Leu Ile Leu Arg Leu Leu Arg Ile Leu  
195 200

<210> 3

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Arg Thr Val Leu Trp Ala Ala Phe Leu

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Arg Gly Gly Ser Ser Leu Arg His Val Val Tyr Trp

20 25 30

Asn Ser Ser Asn Pro Arg Leu Leu Arg Gly Asp Ala Val Val Glu Leu

35 40 45

Gly Leu Asn Asp Tyr Leu Asp Ile Val Cys Pro His Tyr Glu Gly Pro

50 55 60

Gly Pro Pro Glu Gly Pro Glu Thr Phe Ala Leu Tyr Met Val Asp Trp

65 70 75 80

Pro Gly Tyr Glu Ser Cys Gln Ala Glu Gly Pro Arg Ala Tyr Lys Arg

85 90 95

Trp Val Cys Ser Leu Pro Phe Gly His Val Gln Phe Ser Glu Lys Ile

100 105 110

Gln Arg Phe Thr Pro Phe Ser Leu Gly Phe Glu Phe Leu Pro Gly Glu

115 120 125

Thr Tyr Tyr Tyr Ile Ser Val Pro Thr Pro Glu Ser Ser Gly Gln Cys

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Arg Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ile Pro Ala Ala Cys Thr Gly

165 170 175

Gly Ala Asn Ser Asp Arg Gln Asp Gly Ala Leu Met Gly Glu Ile Arg

180 185 190

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

195 200 205

<210> 4

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Arg Thr Val Leu Trp Ala Ala Phe Leu

1 5 10 15

Gly Ser Pro Leu Arg Gly Gly Ser Ser Leu Arg His Val Val Tyr Trp

20 25 30

Asn Ser Ser Asn Pro Arg Leu Leu Arg Gly Asp Ala Val Val Glu Leu

35 40 45

Gly Leu Asn Asp Tyr Leu Asp Ile Val Cys Pro His Tyr Glu Gly Pro

50 55 60

Gly Pro Pro Glu Gly Pro Glu Thr Phe Ala Leu Tyr Met Val Asp Trp

65 70 75 80

Pro Gly Tyr Glu Ser Cys Gln Ala Glu Gly Pro Arg Ala Tyr Lys Arg

85 90 95

Trp Val Cys Ser Leu Pro Phe Gly His Val Gln Phe Ser Glu Lys Ile

100 105 110

Gln Arg Phe Thr Pro Phe Ser Leu Gly Phe Glu Phe Leu Pro Gly Glu

115 120 125

Thr Tyr Tyr Tyr Ile Ser Val Pro Thr Pro Glu Ser Ser Gly Gln Cys

130 135 140

Leu Arg Leu Gln Val Ser Val Cys Cys Lys Glu Arg Asn Leu Pro Ser

145 150 155 160

His Pro Lys Glu Pro Glu Ser Ser Gln Asp Pro Leu Glu Glu Glu Gly

165 170 175

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

180 185 190

His

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 5

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95  
Ser Asp Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

<210> 6

<211> 335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 6

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag ccctctggatt caccgtcact acttatggtg tggactgggt ccgccaagct 120

ccagggaagg ggctggagtg gttaggtgta atatggggtg gtggaagcac aaattataat 180  
agcgctttga agagccgatt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtatctg 240  
caaatgaaca gtctgagagc cgaggacacg gccgtgtatt actgtgccag tgattgggct 300  
tactggggcc aagggaactct ggctactgtc tcttc 335

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence



<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

His Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Arg Tyr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 8

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 8

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgtc gggcgagtc gaatgtgggt acaaatgtag cctggtttca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagtcctt gatccattcg gcatcctacc gttacagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gaagattttg caacttacta ttgtcagcaa tataagaggt atccgtacac gttcggaggg 300  
gggaccaagc tggaaataaa ac 322

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg His Asp Pro Asn Asp Gly Tyr Tyr Phe Leu Phe Ala Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 10

<211> 365

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 10

gaggtgcaac tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatggca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtactta cacatactac 180

ccagactcag tgaagggccg attcaaaatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac aagacatgac 300

cccaatgatg gttactactt cctgtttgct tactggggcc aggggactct ggtcactgtc 360

tcttc 365

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 11

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

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

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

<210> 12

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 12

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca aggccagtca gagtgttggc aacaatgtag cttggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctactat gcatccaata ggtatacagg catcccagac	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct	240
gaagattttg cagtgtatta ctgtcaacag cattatagct ctccgctcac gttcggtgct	300
gggaccaagc tggagatcaa ac	322

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Phe Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Asp Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 14

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 14

caggttcagc tggatgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctctcgggta cacctttacc ggctattaca tccactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atctaccctg gcaattttaa cacaaaatat 180

aacgagcggg tcaagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggat 300

ggtagccct actatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 15

Gly Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

1 5

<210> 17

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 17

ggctattaca tccac

15

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400>

> 18

ggttacacct ttaccggcta t

21

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 19

Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Phe Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 20

Tyr Pro Gly Asn Phe Asn

1 5

<210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 21

tggatctacc ctggcaattt taacacaaaa tataacgagc ggttcaaggg c 51

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 22

taccctggca attttaac 18

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence



<400> 23

Glu Asp Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 24

gaggatggta gccctacta tgctatggac tac

33

<210> 25

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Phe Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Asp Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

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

370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 Gly

<210> 26

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 26

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc ggctattaca tccactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atctaccctg gcaattttaa cacaaaatat 180  
 aacgagcggg tcaagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240  
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggat 300  
 ggtagccctt actatgctat ggactactgg gtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct cgagcaagag cacctctggg 420  
 ggacacagcg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagccggt gacggtgtcg 480  
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 540  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660  
 aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccc cgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720  
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 780  
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagtacaac 900  
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020  
 aaagccaaag ggagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 1200  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 1347

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 27

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 28

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 28

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
atctcctgcc ggtctagtc gagcctcgtg catagtaatg gaaacacctt ttgtattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctaatct atagagtctt caaccggttc	180
tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agccgggtgg aggctgagga tgttgggtt tattactgct ttcaagctac acatgttccg	300
tggacgttcg gtggaggcac caaagtggaa atcaaa	336

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 29

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

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

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 30

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe

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

<210> 31

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 31

cggctctagtc agacctcgt gcatagtaat ggaaacacct tttgtat	48
---	----

<210> 32

<211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence  
 <400> 32  
 cagagcctcg tgcataagtaa tggaaacacc ttt 33  
 <210> 33

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide sequence  
 <400> 33  
 Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence  
 <400> 34  
 agagtttcca accggttctc t 21  
 <210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide sequence  
 <400> 35  
 Phe Gln Ala Thr His Val Pro Trp Thr

1 5  
 <210> 36  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence



<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 36

caagctacac atgttccgtg gacg

24

<210> 37

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 37

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190  
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205  
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 38

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 38

gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60  
atctcctgcc ggtctagtca gaggcctctg catagtaatg gaaacacctt ttgtattgg 120  
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctaatct atagagtctt caaccggttc 180  
tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcagga cagatttcac actgaaaatc 240  
agccgggtgg aggtctagga tgttgggtt tattactgct ttcaagctac acatgttccg 300  
tggacgttcg gtggaggcac caaagtggaa atcaaacgga ctgtggctgc accaagtgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420  
ctgaataact tctatccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa 480  
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540  
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600  
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 39

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 39

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

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

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

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

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

65 70 75 80

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 40

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 40

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg catctggata caccttcact tactttctata tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg ggtgggacaa atcaacccta ataatggtgg cacagcctac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagatgggtc 300

gggactcact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctcc 354

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 41

Tyr Phe Tyr Met Asn

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 42

Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Phe

1 5

<210> 43

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 43

tacttctata tgaac

15

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400>

> 44

ggatacacct tcacttactt c

21

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 45

Gln Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 46

Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 47

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 47

caaatcaacc ctaataatgg tggcacagcc tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 48

aaccctaata atggtggcac a 21

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 49

Trp Val Gly Thr His Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 50

tgggtcggga ctcactactt tgactac

27

<210> 51

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gln Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190



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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
260 265 270

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

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
370 375 380

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

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
420 425 430

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

435	440	445
<210> 52		
<211> 1341		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Synthetic nucleotide sequence		
<400> 52		
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60	
tcctgcaagg catctggata caccttcact tactttctata tgaactgggt gcgacaggcc	120	
cctggacaag ggcttgagtg ggtgggacaa atcaacccta ataatggtgg cacagcctac	180	
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac	240	
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagatgggtc	300	
gggactcact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctccgcctcc	360	
accaagggcc catcggtctt cccctggcg ccctcgagca agagcacctc tgggggcaca	420	
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc cggtgacggt gtcgtggaac	480	
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc	540	
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacca gacctacatc	600	
tgcaactga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gccc aaatct	660	
tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	720	
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	780	
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	840	
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	900	
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	960	
aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	1020	
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc	1080	
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1140	
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200	
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag	1260	
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag	1320	
agcctctccc tgtctecggg t	1341	
<210> 53		

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Tyr Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Asn Phe Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp

85 90 95

Glu Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 54

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 54

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctctagct atacttacat tcttggtac 120

caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcataaatt ttgcatcaa ctgggaaagt 180

ggcatcccag ccagggttcag tggcagtggtg tctgggacag acttactct caccatcagc 240

agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc acagttggga gattcctccg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 55

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide sequence  
 <400> 55  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Tyr Ile His  
 1 5 10 15

<210> 56  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic peptide sequence  
 <400> 56

Ser Ser Ser Tyr Thr Tyr Ile His  
 1 5

<210> 57  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence  
 <400> 57

agggccagtc agagtgttag cagctctagc tatacttaca ttcac 45

<210> 58  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence  
 <400> 58

agctctagct atacttacat tcac 24

<210> 59  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 59

Phe Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 60

tttgcaccca acttggaag t 21

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 61

Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Pro Thr

1 5

<210>

62

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 62

cagcacagtt gggagattcc tccgacg 27

<210> 63

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Tyr Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Asn Phe Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 64

<211> 654

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 64

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctctagct atacttacat tcaactgtac	120
caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcataaatt ttgcatccaa ctgggaaagt	180
ggcatcccag ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag attcactct caccatcagc	240
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc acagttggga gattcctcgc	300
acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacggactg tggctgcacc aagtgtcttc	360

atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgtg	420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggagg tggataacgc cctccaatcg	480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	540
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt	654

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu

1	5
---	---

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 66

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly

1	5
---	---

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 67

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

1	5
---	---



<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly

1 5

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 69

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 70

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asp Trp

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 71

Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Phe Tyr

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 72

Gly Tyr Ser Phe Thr Val Tyr Asn

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 73

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 74

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 75

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 76

Gly Ala Ser Ile Thr Ser Gly Tyr

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 77

Phe Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 78

Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 79

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Ile

1 5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 80

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr

1 5

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 81

Ile Tyr Pro Gly Asn Phe Asn Thr

1 5

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 82

Ile His Pro Tyr Asp Ser Glu Thr

1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 83

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 84

Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr

1 5

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 85

Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn

1 5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 86

Ile Tyr Pro Gly Asn Phe Asn Thr

1 5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 87

Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Ile

1 5

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 88

Ile Asn Tyr Ser Gly Asn Thr

1 5

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 89

Ala Arg Gly Tyr Pro Ala Trp Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 90

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 90

Ala Ser Asp Trp Ala Tyr

1 5

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 91

Ala Arg Glu Arg Leu Ser His Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213>

Mus spretus

<400> 92

Thr Arg His Asp Pro Asn Asp Gly Tyr Tyr Phe Leu Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 93

Ala Arg Glu Asp Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 94

Val Thr Phe Ile Lys Thr Met Val Asp Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 95

Ala Arg Trp Val Gly Thr His Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 96

Ala Arg Gly Gly Lys Thr Gly Thr Tyr Tyr Tyr Val Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 97

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 97

Ala Arg Glu Gly Tyr Gly Asp Tyr Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 98

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 98

Ala Arg Glu Asp Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 99

Ala Thr Pro Glu Arg Arg Arg Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 100

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 100

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

1 5 10

<210> 101

<211> 11



<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 101

Gln Ser Leu Ala His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 102

Gln Asn Val Gly Thr Asn

1 5

<210> 103

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 103

Gln Asp Ile Lys Ser Tyr

1 5

<210> 104

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 104

Gln Ser Val Gly Asn Asn

1 5

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 105

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe

1 5 10

<210> 106

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus spretus  
 <400> 106  
 Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr  
 1 5 10  
 <210> 107  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus spretus  
 <400> 107  
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Tyr  
 1 5 10  
 <210> 108  
 <211> 6  
 <212>  
 > PRT  
 <213> Mus spretus  
 <400> 108  
 Glu Asn Ile Asp Ser Tyr  
 1 5  
 <210> 109  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus spretus  
 <400> 109  
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Tyr  
 1 5 10  
 <210> 110  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus spretus  
 <400> 110  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe  
 1 5 10

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 111

Ser Ser Leu Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 112

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 112

Gln Ser Val Ser Lys Asp

1 5

<210> 113

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 113

Lys Val Ser Asn Met Arg Phe Ser

1 5

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 114

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 115

Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp

1 5

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 116

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 117

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 118

Leu Val Ser Asn Leu Asp Ser

1 5

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 119

Phe Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 120

Ala Ala Thr Leu Leu Ala Asp

1 5

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 121

Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 122

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 123

Ser Thr Ser Phe Leu Ala Ser

1 5

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 124

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 125

Ser Gln Asp Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 126

Gln Gln Tyr Lys Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 127

Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 128

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 129

Phe Gln Ala Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 130

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr

1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 131

Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Pro Thr

1 5

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 132

Gln His Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr

1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 133

Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Arg Thr

1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 134

Phe Gln Ala Thr His Val Pro Trp Thr



1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 135

Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Phe Thr

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus spretus

<400> 136

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 137

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Gln Arg Phe Thr Pro Phe Ser Leu Gly Phe Glu

1 5 10

<210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Arg Leu Leu Arg Gly Asp Ala Val Val Glu

1 5 10