(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월23일
(11) 등록번호 10-2627947
(24) 등록일자 2024년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 47/6851 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2023-7028203(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년09월29일
심사청구일자 2023년09월15일
(85) 번역문제출일자 2023년08월18일
(65) 공개번호 10-2023-0128131
(43) 공개일자 2023년09월01일
(62) 원출원 특허 10-2023-7006492
원출원일자(국제) 2011년09월29일
심사청구일자 2023년03월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/054054
(87) 국제공개번호 WO 2012/047724
국제공개일자 2012년04월12일
(30) 우선권주장
61/387,933 2010년09월29일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Current Opinion in Chemical Biology. Vol. 13, No. 3, pp. 235-244 (2009)

(73) 특허권자
어젠시스 인코포레이티드
미국, 일리노이 60062, 노쓰브룩, 아스텔라스 웨이 1
씨젠 인크.
미국 98021 워싱턴주 보델 30번 드라이브 에스.이. 21823
(72) 발명자
사트페브, 다울렛
미국 캘리포니아 90404 산타 모니카 스튜어트 스트리트 1800
모리슨, 로버트, 켄달
미국 캘리포니아 90404 산타 모니카 스튜어트 스트리트 1800
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

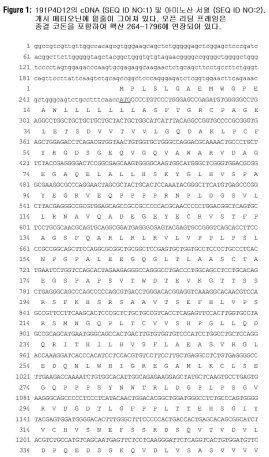
전체 청구항 수 : 총 40 항 심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 **191P4D12 단백질에 결합하는 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)**

(57) 요 약

191P4D12 단백질 및 그의 변이체에 결합하는 항체 약물 컨쥬게이트(ADC's)가 개시된다. 191P4D12는 정상적인 성인 조직에서 조직 특이적 발현을 나타내며 표 I에 수록된 암에서 비정상적으로 발현된다. 결론적으로, 본 발명의 ADC들은 암 치료를 위한 치료용 조성물을 제공해준다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
모리슨, 카렌 제인, 메이릭
미국 캘리포니아 90404 산타 모니카 스튜어트 스트리트 1800
구다스, 진
미국 캘리포니아 90404 산타 모니카 스튜어트 스트리트 1800
자코비츠, 아야
미국 캘리포니아 90404 산타 모니카 스튜어트 스트리트 1800
토르고프, 마이클
미국 캘리포니아 90404 산타 모니카 스튜어트 스트리트 1800
안, 질
미국 캘리포니아 90404 산타 모니카 스튜어트 스트리트 1800

명 세 서

청구범위

청구항 1

항-191P4D12 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 항체 약물 컨쥬게이트로서,

상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 표면 플라즈몬 공명법 (SPR)에 의해 측정된 1.6 x 10^{-8} M 이하의 KD로 191P4D12의 세포외 도메인에 결합하고, 및

상기 191P4D12의 세포외 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1-348을 포함하는, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 2의 적어도 A76 및 S91에 결합하는 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은,

SEQ ID NO: 7에 제시되는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

SEQ ID NO: 8에 제시되는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은,

SEQ ID NO: 7에 제시되는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열에 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 또는 90% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

SEQ ID NO: 8에 제시되는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열에 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 또는 90% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 Fab, $F(ab')_2$, Fv 또는 scFv 단편인 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체는 완전 인간 항체 (fully human antibody) 인 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 재조합적으로 생산된 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 링커를 통하여 MMAE에 컨쥬게이트된 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 링커는 발린-시트룰린을 포함하는 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 10

제8항에 있어서,

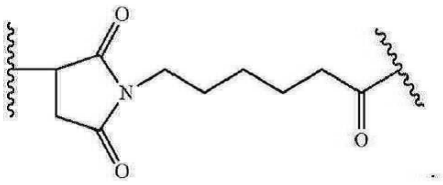
상기 링커는 효소-분해성 링커이고,

상기 링커의 유닛은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 황 원자와 결합을 형성하는 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

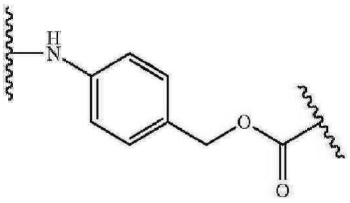
청구항 11

제8항에 있어서, 상기 링커의 유닛은 화학식: $-A_a-W_w-Y_y-$를 갖고;

여기서 -A-는 스트레쳐 유닛, a는 0 또는 1; -W-는 아미노산 유닛, w는 0 내지 12의 정수이며; -Y-는 스페이서 유닛, y는 0, 1, 또는 2이고; 상기 스트레쳐 유닛은 하기 화학식 (1)을 가지며; 상기 아미노산 유닛은 발린-시트룰린이고; 상기 스페이서 유닛은 하기 화학식 (2)의 구조를 갖는 PAB기이며;



화학식 (1)



화학식 (2);

여기서, 상기 스트레쳐 유닛은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 황 원자와 결합을 형성하고; 상기 스페이서 유닛은 카바메이트기를 통해 MMAE에 링크된 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편당 1 내지 10 유닛의 MMAE를 포함하는 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 13

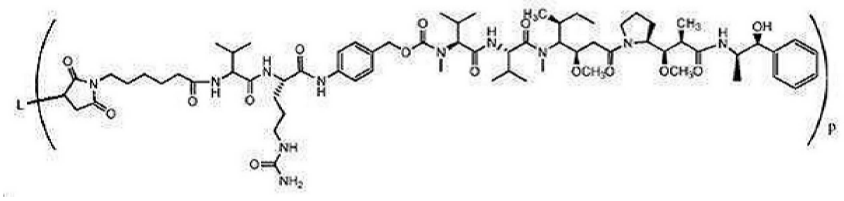
제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편당 2 내지 5 유닛의 MMAE를 포함하는 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편당 3 내지 5 유닛의 MMAE를 포함하는 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 항체 약물 컨쥬게이트는 다음 구조를 갖는 것인, 항체 약물 컨쥬게이트:



식 중, L- 은 항-191P4D2 항체 또는 항원 결합 단편을 나타내고, p는 1 내지 10을 나타낸다.

청구항 16

제15항에 있어서, p는 3 내지 5인 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 17

제15항에 있어서, p는 3.8인 것인, 항체 약물 컨쥬게이트.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 기재된 항체 약물 컨쥬게이트의 치료적 유효량 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것인 의약 조성물로서,

상기 의약 조성물은 대상자에서 암을 예방 또는 치료하기 위한 것인 의약 조성물.

청구항 19

제15항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 기재된 항체 약물 컨쥬게이트의 치료적 유효량 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것인 의약 조성물로서,

상기 의약 조성물은 대상자에서 암을 예방 또는 치료하기 위한 것이고, 및

상기 의약 조성물에서 상기 항체 약물 컨쥬게이트에 대한 평균 p 값은 3.8인 것인, 의약 조성물.

청구항 20

항-191P4D12 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

상기 항-191P4D12 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 표면 플라즈몬 공명법 (SPR)에 의해 측정된 1.6×10^{-8} M 이하의 KD로 191P4D12의 세포외 도메인에 결합하고, 및

상기 191P4D12의 세포외 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1-348을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 2의 적어도 A76 및 S91에 결합하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은,

SEQ ID NO: 7에 제시되는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

SEQ ID NO: 8에 제시되는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은,

SEQ ID NO: 7에 제시되는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열에 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 또는 90% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

SEQ ID NO: 8에 제시되는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열에 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 또는 90% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 Fab, $F(ab')_2$, Fv 또는 scFv 단편인 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 항체는 완전 인간 항체 (fully human antibody) 인 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 26

제20항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 재조합적으로 생산된 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 27

제20항에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료적 유효량 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것인 의약 조성물로서,

상기 의약 조성물은 대상자에서 암을 예방 또는 치료하기 위한 것인 의약 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 암은 191P4D12를 발현하는 종양 세포를 포함하는 것인 의약 조성물.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 대상자는 인간 대상자인 것인 의약 조성물.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 암은 결장암, 난소암, 식도암, 두경부암, 췌장암, 폐암, 방광암 또는 유방암인 것인 의약 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 암은 췌장암인 것인 의약 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 암은 폐암인 것인 의약 조성물.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 암은 방광암인 것인 의약 조성물.

청구항 34

제30항에 있어서, 상기 암은 유방암인 것인 의약 조성물.

청구항 35

제30항에 있어서, 상기 암은 결장암인 것인 의약 조성물.

청구항 36

제30항에 있어서, 상기 암은 난소암인 것인 의약 조성물.

청구항 37

제30항에 있어서, 상기 암은 식도암인 것인 의약 조성물.

청구항 38

제30항에 있어서, 상기 암은 두경부암인 것인 의약 조성물.

청구항 39

제33항에 있어서, 상기 방광암은 진행성 방광암인 것인 의약 조성물.

청구항 40

제33항에 있어서, 상기 방광암은 전이성 방광암인 것인 의약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원과의 상호참조

[0002] [0001] 이 출원은 2010년 9월 29일자로 출원된 미국 가특허출원 No. 61/387,933에 기초하여 우선권을 주장하는 정규 특허출원이다. 이 문단에 명시된 각 출원은 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합되었다.

[0003] EFS-WEB을 통하여 제출된 서열목록에 대한 참조

[0004] [0002] MPEP § 1730 II.B.2(a)(C) 하에 승인 및 규정된 바와 같이, USPTO EFS-WEB 서버를 통한 서열목록의 다음과 같은 전자제출 내용 전체는 실제로 이 건 출원에 그 전체가 참조 병합되었다. 서열목록은 다음과 같이 전자제출된 텍스트 파일로서 확인된다:

[0005]

파일명	생성일자	크기 (바이트)
5115820082505eqlist.txt	2011. 09. 27	41,949 바이트

[0007] 연방 후원하에 이루어진 연구에 따른 발명에 대한 권리 진술

[0008] [0003] 해당 없음

[0009] 기술분야

[0010] [0004] 본 발명은 191P4D12라 명명된 단백질에 결합하는 항체, 그의 결합 단편 및 항체 약물 컨쥬게이트(ADCs)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 191P4D12를 발현하는 암을 치료하는데 유용한 예후, 예방 및 치료방법과 치료용 조성물에 관한 것이다

배 경 기 술

[0011] [0005] 암은 관상 질환에 이어 두 번째로 흔한 인류의 사망 원인이다. 전세계적으로 매년 수백만 명이 암으로 사망한다. 미국 암협회의 보고에 의하면, 암으로 인한 사망자 수는 미국에서만 연간 50만 명이 넘으며 매년 120만 명이 넘는 사람들이 새롭게 암에 걸렸다는 진단을 받는다. 심장질환으로 이한 사망은 현저히 감소하는 추세에 있는 반면, 암으로 인한 사망은 대체로 증가 추세에 있다. 다음 세기 초에는 암이 가장 흔한 사망 원인이 될 것으로 예상된다.

[0012] [0006] 전 세계적으로 몇 가지 종류의 암이 특히 사망의 원인이 되고 있다. 특히, 폐, 전립선, 유방, 결정, 췌장, 난소 및 방광의 암종은 암으로 인한 사망의 주요 원인이다. 이들 그리고 실질적으로 기타 모든 암종은 공통적인 치명적 특징을 갖는다. 극히 적은 예외가 있기는 하지만, 암종으로 인한 전이성 질환은 대부분 치명적이다. 뿐만 아니라, 원발암에서 초기에 살아남은 암 환자들조차도, 인생이 극적으로 변화하는 경험을 치르게 된다. 많은 암 환자들은 암의 재발이나 치료의 실패 가능성으로 인해 강한 정신적 압박을 경험한다. 많은

암 환자들은 치료 후에 신체적으로 쇠약해진다. 나아가, 많은 암 환자들은 암의 재발도 경험한다.

[0013] [0007] 세계적으로, 전립선암은 남성에 있어서 네 번째로 흔한 암이다. 북미와 북유럽에서는, 남성에 있어서 이제까지 가장 빈번하게 발생하는 암이며 남성의 암으로 인한 사망의 두 번째 원인이 되고 있다. 미국에서만, 매년 30,000 명의 남성이 이 질환으로 사망하는데, 이는 폐암에 이어 두 번째이다. 이러한 어마어마한 수치에도 불구하고, 전이성 전립선암의 효과적인 치료법은 아직까지 없는 실적이다. 외과적인 전립선 절제술, 방사능 치료법, 호르몬 제거 치료법, 외과적 거세법 및 화학치료법이 주요한 치료 방식으로 이어져오고 있다. 불행히도, 이들 치료법은 다수의 환자에 대하여 효과가 없을 뿐만 아니라 종종 바람직하지 못한 결과를 초래하기도 한다.

[0014] [0008] 진단 분야에서, 조기 단계의 국소화된 종양을 정확하게 검출해 낼 수 있도록 해주는 전립선 종양 마커가 없다는 것은 이 질환의 진단 및 유지에 있어서 크나큰 걸림돌이 되고 있다. 비록 혈청 전립선 특이적 항원(PSA) 분석법이 매우 유용한 도구로서 사용되어 오고 있으나, 이 방법의 특이성과 일반적인 효용성은 몇가지 중요한 측면에서 여전히 미흡한 것으로 여겨지고 있다.

[0015] [0009] 마우스에 있어서 이 질환의 여러가지 상이한 단계를 반복할 수 있는 전립선 암 이종이식편의 제작에 의해, 전립선암의 부가적인 특이적 마커를 동정하는데 있어서 진전이 이루어졌다. LAPC(로스안젤레스 전립선암) 이종이식편은 중증혼합면역결핍증(SCID: severe combined immune devicient) 마우스에서 수세대에 걸쳐 생존하여 안드로겐 의존성으로부터 안드로겐 독립성으로의 전이를 모방하는 능력을 나타내는, 전립선암 이종이식편이다 (Klein 외, 1997, Nat. Med. 3:402). 최근에 동정된 전립선암 마커로는 PCTA-1 (Su 외, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), 전립선-특이적인 막항원 (PSMA) (Pinto 외, Clin Cancer Res 1996 Sep 2 (9): 1445-51), STEAP (Hubert, 외, Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7; 96(25): 14523-8) 및 전립선 줄기세포 항원(PSCA) (Reiter 외, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735)을 들 수 있다.

[0016] [0010] PSA와 같은 이전에 동정된 마커들을 이용하여 전립선암을 진단하고 치료하는데 드는 수고가 덜해진건 사실이지만, 진단 및 치료 효능을 더 개선시키기 위해서는 전립선암과 관련 암에 대한 부가적인 마커와 치료적 표적을 동정할 필요가 있다. 2000년도에 미국에서는 직장결장암 발생 건수가 130,200 건인 것으로 추산되는데, 이 중 93,800건은 결장암이고, 36,400건은 직장암이다.

[0017] [0011] 직장결장암은 남성과 여성에 있어서 세 번째로 흔한 암이다. 발병률은 1992-1996년도에 유의적으로 감소하였다 (연간 -2.1%). 연구 결과 이러한 감소는 스크리닝의 개선과 용종의 제거, 폴립이 침습성 암으로 진전하는 것을 방지한데 기인한 것으로 나타났다. 2000년도에 56,300 명이 사망하였는데(결장암으로 인한 사망자수는 47,700명이고 직장암으로 인한 사망자 수는 8.600명임), 이는 미국에서 암으로 인한 전체 사망자 수의 약 11%에 달하는 수치이다.

[0018] [0012] 현재로서는, 외과 수술이 결장 직장암을 치료하는데 있어서 가장 널리 사용되는 방법인데, 퍼지지 않은 암의 경우에는 잘 치유된다. 암이 내장벽 깊숙이 침투하거나 임파절에까지 퍼진 환자들의 경우 이들 환자의 대다수에 대해, 화학요법 또는 화학요법 플러스 방사선 요법이 수술 전 후에 행하여진다. 영구적인 결장조루술(colostomy:신체 폐기물을 제거하기 위한 개복)은 결장암을 치료하는데 빈번히 요구되는 반면, 직장암을 치료하는데는 그다지 많이 행해지지 않는다. 결장직장암을 효과적으로 진단 및 치료하는 새로운 양식이 요구되고 있다.

[0019] [0013] 미국에서 새로이 발생하는 모든 신생암 중, 방광암은 남성의 약 5 퍼센트(5 번째로 흔한 신생물임)와 여성의 3 퍼센트 (8 번째로 흔한 신생물임)를 차지한다. 이러한 비율은 서서히 증가하는 추세에 있으며 연령이 높아질 수록 발병률도 같이 높아진다. 1998년에 남성 39,500건과 여성 15,000건을 포함하여 54,500건이 발생한 것으로 평가되었다. 미국에서의 연령-조정 발생건수는 남성에 있어서 100,000명 당 32건, 여성의 경우 100,000명 당 8건이다. 남성/여성의 비율 3:1은 여성의 흡연 패턴과 관련하여 감소될 수 있을 것이다. 1998년 방광암으로 인한 사망자수는 11,000명에 이를 것으로 추산되었다 (남성 7,800명 및 여성 3,900명). 방광암 발생과 사망률은 연령이 높아질수록 현저히 증가하며 노령 인구가 많이짐에 따라 심각한 문제가 될 것으로 보인다.

[0020] [0014] 대부분의 방광암은 방광에서 재발한다. 방광암은 방광의 요도경유절제술(TUR) 및 방광내 화학요법 또는 면역요법의 조합으로 치료한다. 방광암의 이러한 다초점 및 재발 성향으로 인해 TUR에는 한계가 있다. 대부분의 근육-침습적 암은 TUR 단독으로는 치유되지 않는다. 근치방광절제술과 요로전환술은 이 암을 제거하는데 가장 효과적인 수단이긴 하지만 비뇨기능과 성기능에 분명히 영향을 미친다. 따라서 방광암 환자에 이로운 새로운 치료 양식의 개발 필요성이 절실하다.

[0021] [0015] 2000년도에 미국에서만 폐암과 기관지암이 164,100건 발생한 것으로 평가되었는데, 이는 미국에서 암으

로 진단된 전체 건수의 14%에 달하는 수치이다. 폐암과 기관지암은 남성에 있어서 1984년도에 100,000명당 86.5건으로 비교적 높았다가 1996년도에 70.0건으로 유의적으로 감소하였다. 1990년대에는, 여성에 있어서의 증가속도가 둔화되기 시작하였다. 1996년, 여성에 있어서 발생률은 100,000명당 42.3건이었다.

[0022] [0016] 폐암과 기관지암으로 인한 사망자 수는 2000년도에 156,900명으로 추산되는데, 이는 암으로 인한 모든 사망자의 28%에 상당하는 숫자이다. 1992년-1996년에 걸쳐, 폐암으로 인한 사망률은 남성에서는 유의적으로 감소한 반면 (연간 -1.7%) 여성에 있어서는 여전히 유의적으로 증가 추세에 있었다 (연간 0.9%). 1987년 이래, 유방암으로 인한 여성 사망자수보다 폐암으로 인한 여성 사망자 수가 더 많았는데, 이는 40여년 넘게, 여성의 암 사망의 주요 원인이 되었다. 폐암 발생률 및 사망률의 감소는 아마도 지난 30년간 감소된 흡연율에 기인하는 것으로 보인다; 그러나, 여성에 있어서의 흡연 양상의 감소는 남성에 있어서의 흡연율 감소에 미치지 못한다. 걱정스러운 것은, 성인 흡연율은 둔화되는 반면, 청소년층의 흡연율은 다시 증가하고 있다는 것이다.

[0023] [0017] 폐암 및 기관지암에 있어서의 치료법 선택은 암의 종류와 진행 단계에 의해 결정되며, 여기에는 외과수술법, 방사선요법 및 화학요법이 포함된다. 국소화된 많은 암에 있어서는, 치료방법으로 대개 외과수술이 이용된다. 이 질환은 일반적으로 발견될 무렵에는 이미 퍼져있기 때문에, 방사선 요법과 화학요법이 외과수술과 함께 복합적으로 필요하게 된다. 화학요법은 단독으로든 또는 방사선요법과 병용되던, 소세포폐암의 치료법으로 선택되는데; 이러한 치료법에서, 많은 환자들이 관해를 경험하게 되는데 몇몇 경우에는 장기간 지속될 수 있다. 그러나, 폐암과 기관지암에 대한 효과적인 치료 및 진단적 접근이 지속적으로 요망되고 있다.

[0024] [0018] 2000년도에 미국 여성 중 182,800명에서 새로운 침습성 유방암이 발명한 것으로 추산되었다. 이에 더해서, 약 1,400여건의 새로운 유방암 건수가 2000년도에 남성에서 진단된 것으로 예상되었다. 1980년대에 연간 약 4%씩 증가한 후, 여성에 있어서의 유방암 발병률은 1990년대에 들어 100,000명 당 약110.6건으로 그 수준이 낮아졌다.

[0025] [0019] 2000년도에 미국에서만, 유방암으로 인해 41,200명이 사망한 것으로 추산되었다 (여성 40,800명 및 남성 400명). 유방암은 여성에 있어서 두 번째로 높은 암 사망 원인이 된다. 최신 데이터에 의하면, 1992-1996년에 걸친 사망률은 유의적으로 감소하였으며 특히 백인과 흑인 양쪽 모두에서 젊은 여성의 경우 가장 크게 감소한 것으로 나타났다. 이러한 감소 추세는 아마도 조기 검진과 치료법의 개선에 기인한 것으로 여겨진다.

[0026] [0020] 의료 환경 및 환자의 선호도를 고려하여, 유방암의 치료는 종양절제술(종양의 국소 제거) 및 겨드랑이의 임파절 제거; 유방절제술 (유방의 수술적 제거) 및 겨드랑이의 임파절 제거; 방사선 치료법; 화학요법; 또는 호르몬 요법에 의해 이루어진다. 종종 두 가지 이상의 방법이 병용되기도 한다. 수많은 연구 결과, 조기 단계 질환의 경우, 종양절제술 플러스 방사선요법 후의 장기간 생존률은 변형된 방사선 유방절제술 후의 생존율과 유사한 것으로 나타났다. 재구성 기술의 유의적인 진보에 의하여 유방절제술 후 유방 재건을 위한 몇 가지 옵션이 제공되고 있다. 최근에, 이러한 재건술은 유방절제술과 동시에 행하여지고 있다.

[0027] [0021] 적당량의 주변의 정상적인 유방 조직과 함께 관상피내암종(DCIS)을 국소적으로 절제함으로써 DCIS의 국소적 재발을 방지할 수 있다. 유방 및/또는 타목시펜에 대한 방사선은 나머지 유방 조직에서 DCIS가 발생활 확률을 낮출 수 있다. 이것은 DCIS가 만일 치료되지 않은 채로 방치될 경우 침습성 유방암으로 발전할 위험이 있기 때문에 중요하다. 그럼에도 불구하고, 이들 치료법에는 심각한 부작용이나 후유증이 뒤따른다. 따라서, 효과적인 유방암 치료법이 요망되고 있는 실정이다.

[0028] [0022] 미국의 경우 2000년도에 23,100건의 난소암이 새로 발병한 것으로 추산되었다. 이는 여성암의 4%에 해당하며 부인과암 중 두 번째로 높은 비율이다. 1992-1996년 사이에, 난소암 발병률은 유의적으로 감소하였다. 난소암으로 인하여 2000년도에 14,000명이 사망한 것으로 추산되었다. 난소암은 여성 생식기와 관련한 다른 어떤 암보다도 사망률이 높다.

[0029] [0023] 난소암 치료에는 외과수술, 방사선요법 및 화학요법을 선택할 수 있다. 외과수술은 일반적으로 한쪽 또는 양쪽 난소를 모두 제거하거나, 나팔관(난관난소절제술), 및 자궁(자궁절제술)을 제거하는 것을 포함한다. 매우 조기의 종양에 있어서는, 특히 아이를 갖기를 바라는 젊은 여성의 경우에는 관련된 난소만을 제거한다. 병이 진행된 경우에는, 모든 장내 질환을 제거하여 화학요법의 효과를 증강시키기 위한 시도를 행한다. 난소암의 효과적인 대안적 치료법에 대한 요청이 지속적으로 있어왔다.

[0030] [0024] 미국의 경우 2000년도에 췌장암이 28,300건 발생한 것으로 평가되었다. 지난 20년간 남성의 췌장암 발병률은 감소하여왔다. 여성의 경우 발병률은 대략 일정하게 유지되고 있지만 최근 감소하고 있는 것으로 나타났다. 췌장암으로 인한 사망자 수는 미국에서 2000년도에 28,200명에 달하였다. 지난 20년간, 남성의 경우

사망률은 약간이지만 유의적으로 감소한데 반하여 (연간 약 -0.9%) 여성의 경우는 약간 증가하였다.

[0031] [0025] 외과수술, 방사선 요법 및 화학요법이 췌장암 치료에 사용되고 있는 처치법이다. 이러한 치료 방법들은 많은 환자들의 생존율을 높여주고/높여주거나 증상은 완화시키지만, 대부분 완치시키지는 못한다. 따라서 부가적인 치료법이나 암의 진단 선택법이 심각하게 요구되고 있다. 여기에는 치료방식으로서 항체, 백신 및 소형분자를 사용하는 것이 포함된다. 이에 더하여, 암치료 및 암 연구의 전분야에 걸친 종래 기술에 더해 이러한 치료 방법을 진단, 검출 및 관찰하는데 연구하는데 이용할 필요도 있다.

[0032] [0026] 모노클로날 항체(mAbs) (G. Kohler and C. Milstein, Nature 256:495-497 (1975))의 치료적 사용이 실현되고 있다. 모노클로날 항체는 이제 장기이식, 암, 감염성 질환, 심혈관계 질환 및 염증을 치료하는데 승인되었다. 이소형이 상이하면 이펙터 기능이 상이하다. 이러한 기능상의 차이점이 다양한 면역글로불린 이소형의 서로 다른 3차원 구조에 반영된다(P.M. Alzari *외*, Annual Rev. Immunol., 6:555-580 (1988)).

[0033] [0027] 마우스들은 면역화시키는데 간편하고 대부분의 인간 항원을 외래물질로서 인식하기 때문에, 치료 잠재능이 있는 인간 표적에 대한 mAbs는 일반적으로 쥐로부터 기원한 것이 많다. 그러나, 쥐의 mAbs(murine mAbs)는 사람을 치료하는데 근본적인 단점이 있다. 즉 이들 mAbs는 인간 항체에 비해 인간 체내에서 순환 반감기가 더 짧기 때문에 더 자주 투여하여야만 한다. 보다 중요한 것은, 쥐의 항체를 반복적으로 인간 면역계에 투여할 경우, 마우스 단백질을 외래물질로서 인식하여 인간 면역계가 응답하기 때문에 인간 항-마우스 항체(HAMA: human anti-mouse antibody) 반응이 일어나게 된다는 것이다. 이러한 HAMA 반응은 알레르기 반응을 일으켜서 시스템으로부터 마우스 항체가 급속히 제거됨에 따라 마우스 항체를 이용한 치료가 쓸모없게 될 수 있다. 이러한 부작용을 방지하기 위해서, 마우스 내에 인간 면역계를 구축하려는 시도가 행해져 왔다.

[0034] [0028] 최초의 시도는 인간 서열을 갖는 항체로 항원에 반응할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 만들고자 한 것이었지만(Bruggemann *외*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713 (1989) 참조), 이용가능한 클로닝 비시클에 의해 안정하게 유지될 수 있는 DNA의 양이 한정적이라는 제약이 있었다. 효모의 인공 염색체(YAC: yeast artificial chromosome) 클로닝 벡터를 사용함으로써 인간의 Ig 위치가 트랜스제닉 포유동물의 생식세포 단편으로 도입할 수 있었다. 인간의 게놈 및 인간 불변부에서 발견되는 것과 동일한 간격으로 배열된 인간의 V, D 및 J 대역의 대부분을 YAC를 이용하여 마우스에 도입하였다. 이러한 트랜스제닉 마우스 중 1종은 XenoMouse® 마우스로 알려져 있으며 암젠 프레몬트 인코포레이티드사(Amgen Fremont, Inc.:Fremont CA)로부터 구입할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0035] 발명의 개요

[0036] [0029] 본 발명은 191P4D12 단백질 및 191P4D12 단백질의 폴리펩타이드 단편에 결합하는 항체, 그의 결합 단편, 및 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)를 제공한다. 몇가지 실시상태에서, 본 발명은 치료약물과 컨쥬게이트된 완전한 인간 항체로 이루어져 있다. 특정 실시상태에서, Figure 3의 전체 핵산 서열이 코딩되지 않고/코딩되지 않거나 Figure 2의 아미노산 서열 전체가 제조되는 것은 아니다. 특정 실시상태에서, Figure 3의 핵산 서열 전체는 인코딩되고/인코딩되지 않으며 Figure 2의 아미노산 서열 전체가 제조되는데, 이들 중 하나는 대응하는 인간 유닛 도즈 형태이다.

[0037] [0030] 본 발명은 또한 표 I에 수록된 조직의 암과 같이, 191P4D12를 발현하는 암을 치료하기 위한, 항체 약물 컨쥬게이트와 같은 여러가지 다양한 면역원성 또는 치료용 조성물 및 전략을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0038] 발명의 상세한 설명

[0039] 섹션의 개요

[0040] I.) 정의

[0041] II.) 191P4D12 항체

[0042] III.) 항체 약물 컨쥬게이트 개괄

[0043] III(A). 메이탄시노이드(Maytansinoids)

[0044] III(B). 아우리스타틴(auristatins) 및 돌로스타틴(dolostatins)

[0045] III(C). 칼리케아미신(Calicheamicin)

[0046] III(D). 기타 세포독성 물질

[0048] IV.) 191P4D12에 결합하는 항체 약물 컨쥬게이트

[0049] V.) 링커 유닛

[0050] VI.) 스트레쳐 유닛(Stretcher Unit)

[0051] VII.) 아미노산 유닛

[0052] VIII.)스페이서 유닛

[0053] IX.) 약물 유닛

[0054] X.) 약물 로딩

[0055] XI.) ADC의 세포독성 효과의 측정법

[0056] XII.) 191P4D12를 발현하는 암(들)의 치료

[0057] XIII.)항체기반 치료법의 표적으로서의 191P4D12

[0058] XIV.) 191P4D12 ADC 칵테일

[0059] XV.) 복합 요법

[0060] XVI.) 키트/제품

[0062] I.) 정의:

[0063] [0057] 달리 언급하지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 용어, 설명, 및 과학적 용어들은 본 발명이 속한 기술 분야의 당업자들에게 널리 이해되는 의미로 사용된 것이다. 몇몇 경우에 있어서는, 흔히 이해되는 의미를 갖는 용어들을 명확성 및/또는 참조 용이성을 위해 정의하였으며 그렇다고, 이러한 본문의 정의가 이 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적으로 다른 의미를 갖는 것으로 파악되어야만 하는 것은 아니다. 본 명세서에서 설명된 많은 기술과 공정들은 당업자들에 의해 이용되는 통상적인 방법론을 이용하여 잘 이해되고 널리 사용되는 것들로서, 예를 들면, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.에 설명된 내용을 예로 들 수 있다. 적절한 경우, 시판되는 키트와 시약을 사용하는 공정들 역시 달리 언급하지 않는 한 제조자가 정의한 프로토콜 및/또는 파라미터에 따라 수행될 수 있다.

[0064] [0058] 상표명이 사용될 경우, 해당 상표명은 달리 언급하지 않는 한, 그 제품의 포뮬레이션, 제네릭 약물, 및 해당 상표명 제품의 약학적 활성성분(들)을 지칭하는 것일 수 있다.

[0065] [0059] "진행된 암", "국소적으로 진행된 암", "진행된 질병" 및 "국소적으로 진행된 질병"이라는 용어는 적절한 조직 캡슐을 통해 확산되는 암을 의미하며 미국 비뇨기협회(AUA) 시스템의 경우 C 단계 질환, 휘트모어-제윗 시스템의 C1-C2 단계 질환, 그리고 TNM (종양, 노드, 전이) 시스템의 T3 - T4 및 N+ 단계 질환을 포함하여 의미하는 것이다. 일반적으로, 국소적으로 질병이 진행된 환자에 있어서는 외과수술은 권장되지 않으며, 이 환자들은 임상적으로 국소화된(장기-국한된) 암에 걸린 환자에 비해 실제로 치료 결과가 좋지 못하다.

[0066] [0060] "AFP"라는 약어는 디메틸발린-발린-돌라이소류인-돌라프로인-페닐알라닌-p-페닐렌디아민을 가리킨다(하기 화학식 XVI 참조)

[0067] [0061] 약어 "MMAE"는 모노메틸 아우리스타틴 E를 가리킨다. (하기 화학식 XI 참조).

[0068] [0062] 약어 "AEB"는 아우리스타틴 E를 파라아세틸 벤조산과 반응시켜 생산하는 에스테르를 가리킨다. (하기 화학식 XX 참조).

[0069] [0063] 약어 "AEVB"는 아우리스타틴 E를 벤조일발레르산과 반응시켜 얻는 에스테르를 가리킨다 (하기 화학식

XXI 참조).

[0070] [0064] 약어 "MMAF"는 도발린-발린-돌라이소류인-돌라프로인-페닐알라닌을 가리킨다 (하기 화학식 XVIV 참조).

[0071] [0065] 달리 언급하지 않는 한, "알킬"이라는 용어는 약 1 내지 약 20개의 탄소 원자 (상기 수치 범위 사이에 드는 특정 수의 탄소원자의 조합 및 서브조합도 포함됨)를 갖는 포화된 선형 또는 분지상 탄화수소를 가리키며, 약 1 내지 약 8개의 탄소 원자를 갖는 것이 바람직하다. 알킬기의 예로는 메틸, 에틸, *n*-프로필, *이소*-프로필, *n*-부틸, *이소*-부틸, *sec*-부틸, *tert*-부틸, *n*-펜틸, 2-펜틸, 3-펜틸, 2-메틸-2-부틸, *n*-헥실, *n*-헵틸, *n*-옥틸, *n*-노닐, *n*-데실, 3-메틸-2-부틸, 3-메틸-1-부틸, 2-메틸-1-부틸, 1-헥실, 2-헥실, 3-헥실, 2-메틸-2-펜틸, 3-메틸-2-펜틸, 4-메틸-2-펜틸, 3-메틸-3-펜틸, 2-메틸-3-펜틸, 2,3-디메틸-2-부틸, 및 3,3-디메틸-2-부틸을 들 수 있다.

[0072] [0066] 알킬기는 단독으로든 또는 다른 기의 일부로서든, 다음의 비제한적인 기들 중 하나 이상의 기, 좋기로는 1 내지 3개의 기(및 할로겐으로부터 선택된 부가적인 치환기)에 의해 치환될 수 있다: -할로겐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, =O, -N_3 , -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ 및 -CN, [여기서 각각의 R'은 독립적으로 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되고, 상기 -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, 및 -C_2-C_8 알키닐기는 필요에 따라 다음의 기들 중 하나 이상의 기 (그러나 이들로 한정되는 것은 아님) , 즉 -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, -할로겐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH_2 , -C(O)NHR", -C(O)N(R")$_2$, -NHC(O)R". -SR", -SO_3R", -S(O)$_2$R", -S(O)R", -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R"), -N(R")$_2$ 및 -CN에 의해 치환될 수 있고, 여기서 각각의 R"은 독립적으로 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되는 것이다].

[0073] [0067] 달리 언급되지 않는 한, "알케닐" 및 "알키닐"이라는 용어는 약 2 내지 20개의 탄소 원자(상기 수치 범위 사이에 드는 특정 수의 탄소 원자의 조합 및 서브조합도 포함됨)를 갖는 직쇄 또는 분지상 탄소 사슬을 가리키며, 탄소 원자 수가 약 2 내지 약 8개인 것이 바람직하다. 알케닐 사슬은 사슬 내에 적어도 1개의 이중 결합을 가지며 알키닐 사슬은 사슬 내에 삼중 결합이 1개 이상 있다. 알케닐기의 예로는 에틸렌 또는 비닐, 알릴, -1-부테닐, -2-부테닐, -이소부틸레닐, -1-펜테닐, 2-펜테닐, 3-메틸-1-부테닐, 2-메틸-2-부테닐, 및 -2,3-디메틸-2- 부테닐을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 알키닐기의 예로는 아세틸레닉, 프로파르길, 아세틸레닐, 프로피닐, -1-부티닐, -2-부티닐, -1-펜티닐, -2-펜티닐 및 -3-메틸-1-부티닐을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0074] [0068] 알케닐기 및 알키닐기는 단독으로든, 또는 다른 기의 일부로든 필요에 따라 다음의 비제한적인 기들 중 하나 이상의 기, 좋기로는 1 내지 3개의 기(및 할로겐으로부터 선택된 부가적인 치환기)에 의해 치환될 수 있다: -할로겐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, =O, -N_3 , -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ 및 -CN, [여기서 각각의 R'은 독립적으로 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되고, 상기 -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, 및 -C_2-C_8 알키닐기는 필요에 따라 다음의 기들 중 하나 이상의 기 (그러나 이들로 한정되는 것은 아님) , 즉 -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, -할로겐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH_2 , -C(O)NHR", -C(O)N(R")$_2$, -NHC(O)R". -SR", -SO_3R", -S(O)$_2$R", -S(O)R", -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R"), -N(R")$_2$ 및 -CN에 의해 치환될 수 있고, 여기서 각각의 R"은 독립적으로 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되는 것이다].

[0075] [0069] 달리 언급하지 않는 한, "알킬렌"이라는 용어는 약 1 내지 약 20개(상기 수치 범위 사이에 드는 특정 수의 탄소 원자의 조합 및 서브조합도 포함됨)의 탄소 원자를 갖는 포화된 분지쇄 또는 직쇄상 탄화수소 래디칼을 가리키며 탄소 원자 수가 약 1 내지 약 8개인 것이 바람직하고 모(母) 알칸의 같거나 다른 두 개의 탄소 원자들로부터 2 개의 수소 원자를 제거함으로써 유도된 2개의 일가 래디칼 중심을 갖는 것이 좋다. 전형적인 알킬렌의

예로는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌, 펜틸렌, 헥실렌, 헵틸렌, 옥틸렌, 노닐렌, 데칼렌, 1,4-시클로헥실렌, 등을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 알킬렌기는 단독으로든, 또는 다른 기의 일부로든 필요에 따라 다음의 비제한적인 기들 중 하나 이상의 기, 좋기로는 1 내지 3개의 기(및 할로겐으로부터 선택된 부가적인 치환기)에 의해 치환될 수 있다: -할로겐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, =O, -N_3 , -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ 및 -CN, [여기서 각각의 R'은 독립적으로 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되고, 상기 -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, 및 -C_2-C_8 알키닐기는 필요에 따라 다음의 기들 중 하나 이상의 기(그러나 이들로 한정되는 것은 아님) , 즉 -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, -할로겐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH_2 , -C(O)NHR", -C(O)N(R")$_2$, -NHC(O)R". -SR", -SO_3R", -S(O)$_2$R", -S(O)R", -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R"), -N(R")$_2$ 및 -CN에 의해 치환될 수 있고, 여기서 각각의 R"은 독립적으로 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되는 것이다].

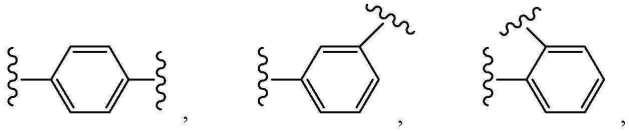
[0076] [0070] 달리 언급하지 않는 한, "알케닐렌"이라는 용어는 탄소-탄소 이중 결합을 1개 이상 함유하는, 치환되어도 좋은 알킬렌기를 가리킨다. 알케닐렌기의 예로는 에테닐렌(-CH=CH-) 및 프로페닐렌(-CH=CHCH$_2$-)을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0077] [0071] 달리 언급하지 않는 한, "알키닐렌"이라는 용어는 탄소-탄소 삼중 결합을 1개 이상 함유하는 치환되어도 좋은 알킬렌기를 가리킨다. 알키닐렌기의 예로는 아세틸렌(-C≡C-), 프로파르길(-CH$_2$C≡C-), 및 4-펜티닐(-CH$_2$CH$_2$CH$_2$C≡CH-)를 들 수 있다.

[0078] [0072] 달리 언급하지 않는 한, "아릴"이라는 용어는 모 방향족 고리계의 하나의 탄소 원자로부터 하나의 수소 원자를 제거함으로써 유도된 6 - 20 탄소 원자 (상기 수치 범위 사이에 드는 특정 수의 탄소 원자의 조합 및 서브조합도 포함됨)를 갖는 일가의 방향족 탄화수소 래디칼을 가리킨다. 몇몇 아릴기는 "Ar"로서 표시되기도 한다. 일반적인 아릴기는 벤젠, 치환된 벤젠, 페닐, 나프탈렌, 안트라센, 비페닐 등으로부터 유도된 래디칼을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0079] [0073] 아릴기는 단독으로든, 또는 다른 기의 일부로든 필요에 따라 다음의 비제한적인 기들 중 하나 이상의 기, 좋기로는 1 내지 5개의 기, 또는 심지어 1 내지 2개의 기에 의해 치환될 수 있다: -할로겐, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -NO_2, -N_3 , -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ 및 -CN [여기서 각각의 R'은 독립적으로 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되고, 상기 -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), 및 -아릴기는 -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, -할로겐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH_2 , -C(O)NHR", -C(O)N(R")$_2$, -NHC(O)R", -SR", -SO_3R", -S(O)$_2$R", -S(O)R", -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R"), -N(R")$_2$ 및 -CN으로부터 선택된 하나 이상의 치환기에 의해 임의로 더욱 치환될 수 있고, 여기서 각각의 R"은 독립적으로-H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되는 것이다].

[0080] [0074] 달리 언급하지 않는 한, "아릴렌"이라는 용어는 2가 (즉 모 방향족 고리계의 같거나 다른 두 개의 탄소 원자들로부터 두 개의 수소 원자를 제거함으로써 유도된다)이고 페닐기를 예로 든 하기 구조에서 나타나는 바와 같이 오르토, 메타 또는 파라 배열로 존재할 수 있는 임의 치환된 아릴기를 의미한다.

[0081] 

[0082] 일반적으로 "-(C_1-C_8 알킬렌)아릴", "-(C_2-C_8 알케닐렌)아릴" 및 " -(C_2-C_8 알키닐렌)아릴"기의 예로는 벤질, 2-페닐에탄-1-일, 2-페닐에텐-1-일, 나프틸메틸, 2-나프틸에탄-1-일, 2-나프틸에텐-1-일, 나프토벤질, 2-나프토페닐에탄-1-일 등을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0083] [0075] 달리 언급하지 않는 한, "헤테로사이클"이라는 용어는 3 내지 14개의 고리 원자(고리 멤버라고도 칭함)를 갖는 모노시클릭, 바이시클릭 또는 폴리시클릭 고리계를 가리키는 반면 적어도 하나의 고리 중 적어도 하나의 고리 원자는 N, O, P, 또는 S로부터 선택된 헤테로원자이다 (상기 수치 범위 사이에 드는 특정 수의 탄소 원자 및 헤테로 원자의 조합 및 서브조합도 포함됨). 헤테로사이클은 N, O, P, 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 고리 헤테로원자를 가질 수 있다. 헤테로사이클 중 1개 이상의 N, C, 또는 S 원자는 산화될 수 있다. 모노시클릭 헤테로사이클은 좋기로는 3 내지 7개의 고리 멤버(예컨대 2 내지 6개의 탄소 원자 및 N, O, P 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자)를 갖는 것이 좋고, 바이시클릭 헤테로사이클은 5 내지 10개의 고리 멤버 (예컨대 4 내지 9개의 탄소 원자 및 N, O, P, 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자)를 갖는 것이 좋다. 헤테로원자를 포함하는 고리는 방향족 또는 비방향족일 수 있다. 달리 언급하지 않는 한, 헤테로사이클은 안정한 구조를 결과시키는 임의의 헤테로원자 또는 탄소원자에서 그의 부속기에 부착되어 있다.

[0084] [0076] 헤테로사이클은 Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), 특히 1, 3, 4, 6, 7, 및 9장; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950년 부터 현재까지), 특히 제13, 14, 16, 19, 및 28권; 및 *J. Am. Chem. Soc.* 82:5566 (1960)에 설명되어 있는 것들이다.

[0085] [0077] "헤테로사이클"기의 비제한적인 예로는 피리딜, 디히드로피리딜, 테트라히드로피리딜(피페리딜), 티아졸릴, 피리미디닐, 퓨라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 테트라졸릴, 벤조퓨라닐, 티아나프탈레닐, 인돌릴, 인돌레닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 2-피롤리도닐, 피롤리닐, 테트라히드로퓨라닐, 비스-테트라히드로퓨라닐, 테트라히드로피라닐, 비스-테트라히드로피라닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 데카히드로퀴놀리닐, 옥타히드로이소퀴놀리닐, 아조시닐, 트리아지닐, 6H-1,2,5-티아디아지닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐, 티에닐, 티안트레닐, 피라닐, 이소벤조퓨라닐, 크로메닐, 잔테닐, 페녹사티닐, 2H-피롤릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 1H-인다졸릴, 퓨리닐, 4H-퀴놀리지닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 신놀리닐, 프테리디닐, 4H-카바졸릴, 카바졸릴, β-카보리닐, 페난트리디닐, 아크리디닐, 피리미디닐, 페난트롤리닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 퓨라자닐, 페녹사지닐, 이소크로마닐, 크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피페라지닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 퀴누클리디닐, 모르폴리닐, 옥사졸리디닐, 벤조트리아졸릴, 벤즈이속사졸릴, 옥신돌릴, 벤족사졸리닐, 및 이사티노일을 들 수 있다. 바람직한 "헤테로사이클"기의 예로는 벤조퓨라닐, 벤조티오페닐, 인돌릴, 벤조피라졸릴, 쿠마리닐, 이소퀴놀리닐, 피롤릴, 티오페닐, 퓨라닐, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 퀴놀리닐, 피리미디닐, 피리디닐, 피르리도닐, 피라지닐, 피리다지닐, 이소티아졸릴, 이속사졸릴 및 테트라졸릴을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0086] [0078] 헤테로사이클기는 단독으로는 또는 다른 기의 일부로든, 다음의 비제한적인 치환기, 즉, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, -할로겐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ 및 -CN [여기서 각각의 R'은 독립적으로 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되고, 상기 -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 및 -아릴기는 다음의 비제한적인 치환기들, 즉 -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, -할로겐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_2-C_8 알케닐), -O-(C_2-C_8 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH_2 , -C(O)NHR", -C(O)N(R")$_2$, -NHC(O)R", -SR", -SO_3R", -S(O)$_2$R", -S(O)R", -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R"), -N(R")$_2$ 및 -CN을 포함한 1개 이상의 치환기에 의해 더욱 치환될 수 있고 여기서 각각의 R"은 독립적으로 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 또는 아릴로부터 선택되는 것이다]로부터 선택된 1개 이상의 기, 좋기로는 1 내지 2개의 기에 의해 치환될 수 있다.

[0087] [0079] 비제한적인 예로서, 탄소-결합된 헤테로사이클은 다음 위치에서 결합될 수 있다: 피리딘의 2, 3, 4, 5,

또는 6위; 피리다진의 3, 4, 5, 또는 6위; 피리미딘의 2, 4, 5, 또는 6위; 피라진의 2, 3, 5, 또는 6위; 퓨란, 테트라히드로퓨란, 티오퓨란, 티오펜, 피롤 또는 테트라히드로피롤의 2, 3, 4, 또는 5위; 옥사졸, 이미다졸 또는 티아졸의 2, 4, 또는 5위; 이속사졸, 피라졸, 또는 이소티아졸의 3, 4, 또는 5위; 아지리딘의 2 또는 3위; 아제티딘의 2, 3, 또는 4위; 퀴놀린의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8위; 또는 이소퀴놀린의 1, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8위. 더욱 전형적으로, 탄소 결합된 헤테로사이클에는 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 5-피리딜, 6-피리딜, 3-피리다지닐, 4-피리다지닐, 5-피리다지닐, 6-피리다지닐, 2-피리미디닐, 4-피리미디닐, 5-피리미디닐, 6-피리미디닐, 2-피라지닐, 3-피라지닐, 5-피라지닐, 6-피라지닐, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 또는 5-티아졸릴이 포함된다.

[0088] [0080] 비제한적인 예로서, 질소 결합된 헤테로사이클은 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린 또는 1H-인다졸의 1위; 이소인돌 또는 이소인돌린의 2위; 모르폴린의 4위; 및 카바졸, 또는 β-카볼린의 9위에 결합될 수 있다. 더욱 전형적으로, 질소 결합된 헤테로사이클에는 1-아지리딜, 1-아제테딜, 1-피롤릴, 1-이미다졸릴, 1-피라졸릴 및 1-피페리디닐이 포함된다.

[0089] [0081] 달리 언급하지 않는 한, "카보사이클"이라는 용어는 3 내지 14개 (상기 수치 범위 사이에 드는 특정 수의 탄소 원자의 조합 및 서브조합도 포함됨)의 고리 원자를 갖는 포화 또는 불포화된 비방향족 모노시클릭, 바이시클릭, 또는 폴리시클릭 고리계를 가리키며 여기서 모든 고리 원자는 탄소 원자인 경우이다. 모노시클릭 카보사이클은 좋기로는 3 내지 6개의 고리 원자, 더욱 좋기로는 5 또는 6개의 고리 원자를 갖는다. 바이시클릭 카보사이클은 좋기로는 예컨대, 바이시클로 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6]계로서 배열되는 7 내지 12개의 고리 원자, 또는 바이시클로 [5,6] 또는 [6,6]계로서 배열되는 9 또는 10개의 고리 원자를 갖는 것이 좋다. "카보사이클"이라는 용어에는 예컨대 아릴기에 융합된 모노시클릭 카보사이클이 포함된다(예컨대, 벤젠 고리에 융합된 모노시클릭 카보사이클 고리). 카보사이클은 좋기로는 3 내지 8개의 탄소 고리 원자를 갖는 것이 바람직하다.

[0090] [0082] 카보사이클기는 단독으로든 다른 기의 일부로서든, 1개 이상의 치환기, 좋기로는 1 또는 2 개의 치환기 (및 할로겐으로부터 선택된 여하한 부가적인 치환기들)에 의해 치환될 수 있으며, 여기서 이들 치환기로는 -할로겐, $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐, $-C_2-C_8$ 알키닐, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), $-O-(C_2-C_8$ 알케닐), $-O-(C_2-C_8$ 알키닐), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', $-C(O)NH_2$, -C(O)NHR', $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, -SR', $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, -S(O)R', -OH, =O, $-N_3$, $-NH_2$, -NH(R'), $-N(R')_2$ 및 -CN을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다 [여기서 각각의 R'은 독립적으로 -H, $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐, $-C_2-C_8$ 알키닐, 또는 -아릴로부터 선택되고 상기 $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐, $-C_2-C_8$ 알키닐, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), $-O-(C_2-C_8$ 알케닐), $-O-(C_2-C_8$ 알키닐), 및 -아릴기는 다음 중 하나 이상의 치환기 (그러나 다음 치환기들로 한정되지 않음), 즉 $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐, $-C_2-C_8$ 알키닐, -할로겐, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), $-O-(C_2-C_8$ 알케닐), $-O-(C_2-C_8$ 알키닐), -아릴, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", $-C(O)NH_2$, -C(O)NHR", $-C(O)N(R")_2$, $-NHC(O)R"$, -SR", $-SO_3R"$, $-S(O)_2R"$, -S(O)R", -OH, $-N_3$, $-NH_2$, -NH(R"), $-N(R")_2$ 및 -CN으로부터 선택된 1개 이상의 치환기에 의해 치환될 수 있으며, 여기서 각각의 R"은 독립적으로 -H, $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_2-C_8$ 알케닐, $-C_2-C_8$ 알키닐, 또는 -아릴이다].

[0091] [0083] 모노시클릭 카보시클릭 치환기의 예로는 -시클로프로필, -시클로부틸, -시클로펜틸, -1-시클로펜트-1-에닐, -1-시클로펜트-2-에닐, -1-시클로펜트-3-에닐, 시클로헥실, -1-시클로헥스-1-에닐, -1-시클로헥스-2-에닐, -1-시클로헥스-3-에닐, -시클로헵틸, -시클로옥틸. -1,3-시클로헥사디에닐, -1,4-시클로헥사디에닐, -1,3-시클로헵타디에닐, -1,3,5-시클로헵타트리에닐, 및 -시클로옥타디에닐을 들 수 있다.

[0092] [0084] "카보시클로"는 단독으로 사용되든 또는 다른 기의 일부로서 사용되든 2가인 (즉 모 카보시클릭 고리계의 같거나 다른 두 개의 탄소 원자로부터 두 개의 수소 원자를 제거함으로써 유도됨) 임의 치환된 카보사이클기를 가리킨다.

[0093] [0085] 달리 언급하지 않는 한, 하이픈(-)은 부속 분자가 부착된 지점을 가리킨다. 따라서, "$-(C_1-C_8$ 알킬렌)아릴" 또는 "$-C_1-C_8$ 알킬렌(아릴)"이라는 용어는 상기 정의된 바와 같은 C_1-C_8 알킬렌 래디칼로서, 여기서 알킬렌 래디칼이 알킬렌 래디칼의 탄소 원자들 중 어느 하나의 부속 분자에 부착되어 있고 알킬렌 래디칼의 탄소 원자에 결합된 수소 원자들 중 하나는 상기 정의한 바와 같이 아릴 래디칼에 의해 대체되어 있는 그러한 C_1-C_8 알킬

렌 래디칼을 가리키는 것이다.

[0094] [0086] 특정 기가 "치환된" 경우, 그 기는 치환기 목록에서 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기, 좋기로는 1 내지 5개의 치환기, 더욱 좋기로는 1 내지 3개의 치환기, 가장 좋기로는 1 내지 2개의 치환기를 가질 수 있다. 그러나, 해당 기는 일반적으로 할로겐으로부터 선택된 치환기를 몇개인가 가질 수 있다. 치환된 기들 역시도 포함된다.

[0095] [0087] 어떤 분자 내의 특정 위치에서의 치환기 또는 배리어블의 정의는 그 분자의 다른 곳에서의 정의와 독립적인 의미를 가지며 반드시 일치할 필요는 없다. 본 발명의 화합물에 있어서의 치환기 또는 치환 패턴은 화학적으로 안정하며 본 발명에 제시된 방법 뿐만 아니라 본 발명이 속한 기술 분야에 알려진 기술에 의해 쉽게 합성 가능한 그러한 화합물을 제공할 수 있게끔 선택될 수 있다.

[0096] [0088] 본 발명에서 사용된 보호기는 다관능성 화합물 중 하나의 반응 위치를 선택적으로 임시적으로 또는 영구적으로 차폐시키는 기를 의미한다. 본 발명에서 사용하는데 적절한 히드록시-보호기는 약학적으로 허용가능하며 그 화합물이 활성적이 되도록 하기 위해 대상자 체내로 투여 후 모 화합물로부터 분리되어 나올 필요가 있을 수도, 그렇지 않을 수도 있다. 이러한 분리(cleavage)는 정상적인 체내 대사과정을 통하여 일어난다. 히드록시 보호기는 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예컨대, 본 발명에 그 내용 전부가 참조된 문헌, 즉, Protective Groups in Organic Synthesis by T. W. *Greene* 및 P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3rd Edition) 등을 통하여 잘 알려져 있으며, 예컨대, 에테르(예를 들어 알킬 에테르 및 실릴 에테르, 예를 들어, 디알킬실릴에테르, 트리알킬실릴에테르, 디알킬알콕시실릴에테르), 에스테르, 카보네이트, 카바메이트, 술포네이트, 및 포스페이트 보호기를 들 수 있다. 히드록시 보호기의 비제한적인 예로는 메틸 에테르; 메톡시메틸 에테르, 메틸티오메틸 에테르, (페닐디메틸실릴)메톡시메틸 에테르, 벤질옥시메틸 에테르, p-메톡시벤질옥시메틸 에테르, p-니트로벤질옥시메틸 에테르, o-니트로벤질옥시메틸 에테르, (4-메톡시페녹시)메틸 에테르, 구아이아콜메틸 에테르, t-부톡시메틸 에테르, 4-펜테닐옥시메틸 에테르, 실록시메틸 에테르, 2-메톡시에톡시메틸 에테르, 2,2,2-트리클로로에톡시메틸 에테르, 비스(2-클로로에톡시)메틸 에테르, 2-(트리메틸실릴)에톡시메틸 에테르, 메톡시메틸 에테르, 테트라히드로피라닐 에테르, 1-메톡시시클로헥실 에테르, 4-메톡시테트라히드로티오피라닐 에테르, 4-메톡시테트라히드로티오피라닐 에테르 S,S-디옥사이드, 1-[(2-클로로-4-메틸)페닐]-4-메톡시피페리딘-4-일 에테르, 1-(2-플루오로페닐)-4-메톡시피페리딘-4-일 에테르, 1,4-디옥산-2-일 에테르, 테트라히드로퓨라닐 에테르, 테트라히드로티오퓨라닐 에테르; 치환된 에틸 에테르, 예컨대 1-에톡시에틸 에테르, 1-(2-클로로에톡시)에틸 에테르, 1-[2-(트리메틸실릴)에톡시]에틸 에테르, 1-메틸-1-메톡시에틸 에테르, 1-메틸-1-벤질옥시에틸 에테르, 1-메틸-1-벤질옥시-2-플루오로에틸 에테르, 1-메틸-1페녹시에틸 에테르, 2-트리메틸실릴 에테르, t-부틸 에테르, 알릴 에테르, 프로파르길 에테르, p-클로로페닐 에테르, p-메톡시페닐 에테르, 벤질 에테르, p-메톡시벤질 에테르 3,4-디메톡시벤질 에테르, 트리메틸실릴 에테르, 트리에틸실릴 에테르, 트리프로필실릴에테르, 디메틸이소프로필실릴 에테르, 디에틸이소프로필실릴 에테르, 디메틸헥실실릴 에테르, t-부틸디메틸실릴 에테르, 디페닐메틸실릴 에테르, 벤조일포르메이트 에스테르, 아세테이트 에스테르, 클로로아세테이트 에스테르, 디클로로아세테이트 에스테르, 트리클로로아세테이트 에스테르, 트리플루오로아세테이트 에스테르, 메톡시아세테이트 에스테르, 트리페닐메톡시아세테이트 에스테르, 페닐아세테이트 에스테르, 벤조에이트 에스테르, 알킬 메틸 카보네이트, 알킬 9-플루오레닐메틸 카보네이트, 알킬 에틸 카보네이트, 알킬 2,2,2,-트리클로로에틸 카보네이트, 1,1,-디메틸-2,2,2-트리클로로에틸 카보네이트, 알킬술포네이트, 메탄술포네이트, 벤질술포네이트, 토실레이트, 메틸렌 아세탈, 에틸리덴 아세탈, 및 t-부틸메틸리덴 케탈을 들 수 있다. 바람직한 보호기는 화학식 $-R^a$, $-Si(R^a)(R^a)(R^a)$, $-C(O)R^a$, $-C(O)OR^a$, $-C(O)NH(R^a)$, $-S(O)_2R^a$, $-S(O)_2OH$, $P(O)(OH)_2$, 및 $-P(O)(OH)OR^a$로 나타낼 수 있으며, 여기서 R^a는 C_1-C_{20} 알킬, C_2-C_{20} 알케닐, C_2-C_{20} 알키닐, -C_1-C_{20} 알킬렌(카보사이클), -C_2-C_{20} 알케닐렌(카보사이클), -C_2-C_{20} 알키닐렌(카보사이클), -C_6-C_{10} 아릴, -C_1-C_{20} 알킬렌(아릴), -C_2-C_{20} 알케닐렌(아릴), -C_2-C_{20} 알키닐렌(아릴), -C_1-C_{20} 알킬렌(헤테로사이클), -C_2-C_{20} 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 -C_2-C_{20} 알키닐렌(헤테로사이클)을 나타내고, 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카보사이클, 및 헤테로사이클 래디칼은 단독으로든 또는 다른 기의 일부로서든 치환될 수 있다.

[0097] [0089] "천연 글리코실화 패턴을 변경"한다는 의미는 본 발명의 목적 상, 천연 191P4D12에서 발견되는 탄수화물 부분 1개 이상을 삭제하고 (기초 글리코실화 부위를 제거하거나 또는 화학적 및/또는 효소적 수단에 의해 글리코실화를 제거하는 것에 의함) 및/또는 천연 서열 191P4D12에 존재하지 않는 글리코실화 부위를 하나 이상 부가하는 것을 가리킨다. 또한, 상기 표현은 존재하는 다양한 탄수화물 부분의 특성과 비율의 변화를 비롯하여, 이

천연 단백질의 글리코실화에 질적인 변화를 가져오는 것도 포함한다.

[0098] [0090] "유사체(analog)"라는 용어는 다른 분자와 구조적으로 유사하거나 유사하거나 상응하는 부분을 공유하는 분자를 가리킨다(예컨대, 191P4D12-관련 단백질). 예컨대, 191P4D12 단백질의 유사체는 191P4D12에 특이적으로 결합하는 항체 또는 T 세포에 의해 특이적으로 결합될 수 있다.

[0099] [0091] "항체"라는 용어는 명백히 다른 의미를 가리키지 않는 한, 최광의로 사용된다. 따라서, "항체"는 자연발생적인 것일 수도 있고 또는 통상의 하이브리도마 기술에 의해 생산되는 모노클로날 항체와 같이 인공적인 것일 수도 있다. 191P4D12 항체는 모노클로날 및 폴리클로날 항체 뿐만 아니라 이들 항체의 항원결합 도메인 및/또는 1개 이상의 상보성 결정 대역을 함유하는 단편도 포괄한다. 본 발명에서, "항체"라는 용어는 191P4D12에 특이적으로 결합하고 및/또는 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 모든 형태의 항체나 그의 단편을 가리키며, 특히 191P4D12에 특이적으로 결합하고 및/또는 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 모노클로날 항체(전장 모노클로날 항체를 포함한다), 폴리클로날 항체, 멀티특이적 항체(예컨대 이중 특이적 항체) 및 항체 단편을 모두 포괄한다. 특이적인 여하한 모든 항체를 본 발명의 방법과 조성물에 사용할 수 있다. 따라서, 한가지 실시상태에서, "항체"라는 용어는 경쇄 면역글로불린 분자로부터의 1개 이상의 가변부와 중쇄 분자로부터의 1개 이상의 가변부를 포함하며 조합시 표적 항원에 대하여 특이적인 결합 자리를 형성하는 것인 분자를 포함한다. 한가지 실시상태에서, 항체는 IgG 항체이다. 예를 들어, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체이다. 본 발명의 방법과 조성물에서 유용한 항체는 세포 배양체, 파지, 또는 예컨대 소, 토끼, 염소, 마우스, 래트, 햄스터, 기니 피그, 양, 개, 고양이, 원숭이, 침팬지 및 유인원을 비롯한 여러가지 동물 (그러나 이에 한정되지 않음)에서 생산될 수 있다. 따라서, 한가지 실시상태에서, 본 발명의 항체는 포유동물의 항체이다. 파지 기술을 이용하여 초기 항체를 분리하거나 또는 변형된 특이성 또는 결합 특성을 갖는 변이체를 생산할 수 있다. 이러한 기술은 기술분야에 잘 알려져 있으며 널리 사용되고 있다. 한가지 실시상태에서, 항체는 기술 분야에 알려진 재조합 수단에 의해 생산된다. 예를 들어, 재조합 항체는 숙주 세포를, 그 항체를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 벡터로 형질감염시킴으로써 생산할 수 있다. 1가지 이상의 벡터를 사용하여 적어도 하나의 VL 및 적어도 하나의 VH 대역을 발현하는 DNA 서열을 숙주 세포내로 형질감염시킬 수 있다. 항체 생산 및 생성의 재조합 수단에 관한 설명은 Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephard, *외*, MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993); 및 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons, 최신판) 등에서 찾아볼 수 있다. 본 발명의 항체는 목적하는 기능을 매개하는데 있어서 항체의 효능을 증강시키기 위한 재조합 수단에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 재조합 수단을 이용하여 치환시킴으로써 항체를 변형시키는 것도 본 발명의 범위에 속한다. 일반적으로, 치환은 보존적 치환이다. 예를 들어, 항체의 불변부 중의 적어도 하나의 아미노산을 다른 잔기로 대체시킬 수 있다. 예컨대, 미국특허 5,624,821, 미국특허 6,194,551, 출원번호 WO 9958572; 및 Angal, *외*, Mol. Immunol. 30: 105-08 (1993) 참조. 아미노산의 변형에는 아미노산의 결실, 부가 및 치환이 있다. 몇몇 경우, 이러한 변화는 바람직하지 못한 활성, 예컨대 보체-의존성 세포독성을 감소시키기 위하여 만들어진다. 흔히, 검출가능한 신호를 제공하는 물질을 공유적으로 또는 비공유적으로 결합시킴으로써 항체를 표지시킬 수 있다. 광범위한 종류의 표지와 컨쥬게이션 기술이 알려져 있으며 이에 관한 연구 보고 내용은 과학 및 특허문헌 모두에서 풍부하게 찾아볼 수 있다. 이들 항체들은 정상적 또는 결함있는 191P4D12에 대한 결합 여부를 스크리닝하는데 이용가능하다. 예컨대, Antibody Engineering: A Practical Approach (Oxford University Press, 1996) 참조. 목적하는 생물학적 활성을 갖는 적합한 항체들을 비제한적인 예로서 다음의 시험관내 분석법: 증식, 이주, 부착, 소프트 한천 성장, 혈관생성, 세포-세포 커뮤니게이션, 세포자멸사, 트랜스포트, 신호 형질도입 및, 다음의 생체내 분석법, 예컨대 종양 성장 억제 등에 의해 동정해낼 수 있다. 본 발명에서 제공되는 항체들은 또한 진단 용도로도 유용할 수 있다. 포획 항원 또는 비무력화(non-neutralizing) 항체로서, 이들을 항원의 생물학적 활성 또는 수용체-결합을 억제함이 없이, 그 특이 항원에 결합하는 능력이 있는지에 대해 스크리닝할 수 있다. 무력화 항체로서, 항체는 경쟁적 결합 분석에서 유용할 수 있다. 이들은 또한 191P4D12 또는 그의 수용체를 정량화하는데 사용할 수도 있다.

[0100] [0092] 본 발명에서 항체의 "항원 결합부" 또는 "항체 단편" (또는 단순히 "항체 부분")이라는 용어는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 191P4D12 항체의 하나 이상의 단편을 가리킨다 (예컨대, 191P4D12 및 변이체; Figure 1). 항체의 항원-결합 기능은 전장 길이 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 어떤 항체의 "항원 결합부"라는 용어에 의해 포괄되는 결합 단편의 예로는 (i) Fab 단편, V_L, V_H, C_L 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 1가 단편; (ii) $F(ab')_2$ 단편, 힌지부에서 디술파이드 다리에 의해 링크된 2개의 Fab 단편들을 포함하는 2가 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 싱글 암(a single arm)의 V_L 및

V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (Ward 외, (1989) Nature 341:544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 대역 (CDR: complementarity determining region)을 들 수 있다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인인 V_L 및 V_H는 서로 다른 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 재조합 기술을 이용함으로써, V_L 및 V_H 대역이 1가 분자를 형성하도록 페어를 이루고 있는 단일 단백질 사슬이 되도록 해주는 합성 링커에 의해 이들을 서로 결합시킬 수 있다(단쇄 Fv (scFv)로 알려짐; 예컨대, Bird 외 (1988) Science 242:423-426; 및 Huston 외 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 참조). 이러한 단쇄 항체는 또한 항체의 "항원 결합부"라는 용어에도 포괄된다. 이들 항체 단편들은 당업자에게 잘 알려진 상법에 따라 얻을 수 있으며, 단편들에 대해서도 본래 항체와 마찬가지로 동일한 방식으로 그의 유용성 여부에 대해 스크리닝한다.

[0101] [0093] 본 발명에서, 어떤 형태의 "항원"이든지, 191P4D12에 특이적인 항체를 생성하는데 이용가능하다. 따라서, 유도 항원(eliciting antigen)은 단일 에피토프, 다중 에피토프, 전체 단백질 단독 또는 기술 분야에 알려져 있는 1종 이상의 면역원성 증강 물질과의 조합 형태일 수 있다. 유도 항원은 분리된 전장 단백질, 세포 표면 단백질 (예컨대, 항원의 적어도 일부분으로 세포를 형질감염시켜 면역화시킴), 또는 가용성 단백질 (예컨대, 단백질의 세포외 도메인 부분만으로 면역화시킴)일 수 있다. 항원은 유전적으로 변형된 세포에서 생산될 수 있다. 항원을 코딩하는 DNA는 게놈성 또는 비게놈성(예컨대, cDNA)일 수 있으며 세포외 도메인의 적어도 일부를 코딩한다. 본 발명에서, "부분/일부분(portion)"이라는 용어는 관심 대상 항원의 면역원성 에피토프를 구성하기 위한, 최소 갯수의 아미노산 또는 핵산을 의미한다. 관심 대상 세포의 형질전환에 적합한 모든 유전적 벡터를 사용할 수 있으며, 여기에는 아데노바이러스 벡터, 플라스미드, 비바이러스성 벡터, 예컨대 양이온성 지질이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 한가지 실시상태에서, 본 발명의 방법과 조성물의 항체는 관심 대상인 191P4D12의 세포외 도메인의 적어도 일부분에 특이적으로 결합하는 것이다.

[0102] [0094] 본 발명에서 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은 "생물활성물질"에 컨쥬게이트될 수 있다. 본 발명에서, "생물활성물질(bioactive agent)"라 함은 항원에 결합하고 및/또는 목적하는 생물학적 효과를 증강시키거나 매개하여 세포 사멸 독소를 증강시키는 합성 또는 천연 화합물을 모두 망라한다. 한가지 실시상태에서, 본 발명에서 유용한 결합 단편은 생물학적 활성 단편이다. 본 발명에서, "생물학적으로 활성인"이라는 표현은 목적하는 항원 에피토프에 결합하여 직접 또는 간접적으로 생물학적 효과를 발휘할 수 있는 항체 또는 항체 단편을 가리킨다. 직접 효과의 비제한적인 예로는 성장 신호의 변조, 자극, 및/또는 억제, 항세포자멸사 신호의 변조, 자극 및/또는 억제, 세포자멸사 신호 또는 세포괴사 신호의 변조, 자극 및/또는 억제, ADCC 캐스케이드의 변조, 자극 및/또는 억제, 및 CDC 캐스케이드의 변조, 자극 및/또는 억제를 들 수 있다.

[0103] [0095] "이중특이적(bispecific)" 항체 역시도 본 발명의 방법과 조성물에 유용하다. 본 발명에서 "이중특이적 항체"라는 용어는 항체, 일반적으로 적어도 2개의 상이한 항원 에피토프에 대하여 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체를 가리킨다. 한가지 실시상태에서, 에피토프는 동일 항원으로부터 유래한 것이다. 또 다른 실시상태에서, 에피토프는 서로 다른 두가지 항원으로부터 유래한다. 이중특이 항체의 제조 방법은 기술 분야에 알려져 있다. 예컨대, 2개의 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍을 공동발현시킴으로써 이중특이적 항체를 재조합적으로 생산할 수 있다. 예컨대, Milstein *외*, Nature 305:537-39 (1983) 참조. 별법으로, 이중특이적 항체는 화학적 결합을 이용하여 제조할 수도 있다. 예컨대, Brennan, *외*, Science 229:81 (1985) 참조. 이중특이적 항체에는 이중특이적 항체 단편이 포함된다. 예컨대, Hollinger, *외*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48 (1993), Gruber, *외*, J. Immunol. 152:5368 (1994) 참조.

[0104] [0096] 본 발명에서 모노클로날 항체는 특히 "키메라" 항체를 포함하는데 이 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하거나, 특징 종으로부터 유래되는 항체의 대응 서열과 동일 또는 상동적인 반면, 그 사슬(들)의 나머지는 표적 항원에 특이적으로 결합하고/결합하거나 소망되는 생물학적 활성을 나타내는 한, 다른 종 또는 다른 항체 클래스나 서브클래스 및 그러한 항체의 단편으로부터 유도된 항체 중의 대응 서열과 동일 또는 상동적인 것이다 (미국특허 No. 4,816,567; 및 Morrison *외*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

[0105] [0097] "화학요법 제제"라는 용어는 종양 성장을 억제하는데 효과가 있는 모든 화학적 화합물을 가리킨다. 화학요법 제제의 비제한적인 예로는 알킬화 제제; 예컨대, 질소 머스타드, 에틸렌이민 화합물 및 알킬 설포네이트; 항대사산물; 예컨대, 엽산, 퓨린 또는 피리미딘 길항제; 유사분열 억제제; 예컨대, 항튜불린 제제, 예컨대 빈카 알칼로이드, 아우리스타틴 및 포도필로톡신의 유도체; 세포독성 항체; DNA 발현 또는 복제를 손상 또는 간섭하는 화합물, 예컨대 DNA 마이너 그루브 바인더; 및 성장 인자 수용체 길항제를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 화학요법 제제에는 세포독성 제제 (본 명세서에서 정의되는 바와 같다), 항체, 생물학적 분자 및 소

분자가 포함된다.

[0106] [0098] "화합물"이라는 용어는 화학적 화합물 자체를 가리키거나 이를 포함하는 것은 물론, 명시적으로든 묵시적으로든, 해당 문장이 명백히 다음의 것들을 배제하고 있지 않는 한 다음의 것들을 포함한다: 화합물의 무정형 및 폴리모르픽 형태를 포함하여 결정형태, 여기서 이들은 혼합물 또는 분리물의 일부를 형성할 수 있다; 본 발명에 제공되는 구조에서 보여지는 일반적인 형태인, 화합물의 유리산 또는 유리 염기 형태; 광학이성질체 및 호변이성질체와 같은 화합물의 이성질체, 여기서 광학 이성질체는 거울상이성질체와 부분입체이성질체, 키랄 이성질체와 비-키랄 이성질체를 포함하며, 광학이성질체는 분리된 광학 이성질체 뿐만 아니라 라세미 혼합물과 비라세미 혼합물을 포함하는 광학 이성질체들의 혼합물도 포함한다; 여기서 이성질체는 1종 이상의 다른 이성질체와 혼합물 형태일수도 있고 분리된 형태일 수도 있다; 화합물의 동위원소, 예를 들어 이중수소- 및 삼중수소-함유 화합물과 방사능동위원소를 함유하는 화합물을 포함한다, 여기에는 치료효과 및 진단효과가 있는 방사능동위원소가 포함된다; 다이머, 트리머 등의 멀티머 형태의 화합물; 좋기로는 약학적으로 허용가능한 염과 같은 화합물의 염, 여기에는 산부가염과 염기 부가염이 포함되며 유기 카운터이온과 무기 카운터 이온을 갖는 염이 포함되고, 그 화합물이 2개 이상의 카운터이온과 연관이 있을 경우, 이들 두개 이상의 카운터이온이 같거나 다를 수 있는 것인 쯔비터이온 형태도 포함된다; 및 예컨대 반용매화물(hemisolvates) 일용매화물, 이용매화물 등과 같은, 화합물의 용매화물. 여기에는 유기 용매화물 및 무기 용매화물이 포함되고 상기 무기 용매화물에는 수화물이 포함된다; 화합물이 2개 이상의 용매 분자와 회합될 경우, 이들 2개 이상의 용매 분자는 같거나 다를 수 있다. 몇가지 경우에 있어서, 본 발명에서 말하는 화합물은 한기 혀태 중 하나 이상, 예컨대, 염 및/또는 용매화물을 명백히 의도할 수도 있다; 그러나, 이러한 지칭은 단지 강조를 위한 것이며, 상기 나열된 다른 형태가 배제되는 것은 아니다.

[0107] [0099] 본 발명에서 "보존적 치환"이라는 용어는 당업자에게 잘 알려진 아미노산 치환을 가리키며 결과적인 분자의 생물학적 활성이 일반적으로 변경되지 않는 치환을 가리킨다. 당업자라면, 일반적으로 폴리펩타이드의 비필수 대역에서의 단일 아미노산 치환은 생물학적 활성을 실질적으로 변경시키지 않는다는 것을 인식할 것이다 (예컨대, Watson, *외*, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4판 1987) 참조). 이러한 예시적인 치환은 표 II 및 표 III(a-b)에 제시된 바에 따라 만들어지는 것이 바람직하다. 예컨대, 이러한 변경에는 이소류신 (I), 발린 (V), 및 류신 (L)으로 다른 소수성 아미노산을 치환하는 것; 글루탐산 (E)를 아스파르트산(D)으로 치환하는 것 또는 그의 역; 아스파라긴(N)을 글루타민 (Q)로 치환하는 것 또는 그의 역; 쓰레오닌(T)를 세린(S)로 치환하는 것 또는 그의 역이 포함된다. 기타의 치환 역시 특정 아미노산 및 단백질의 3차원 구조에서의 그의 역할에 따라 보존적인 것으로 여겨질 수 있다. 예컨대, 글리신(G)과 알라닌(A)는 종종 호환가능하며 알라닌(A)와 발린(V)도 그러하다. 비교적 소수성인 메티오닌(M)은 종종 류신 및 이소류신과 호환될 수 있으며 때로는 발린과 호환되기도 한다. 라이신(K)과 아르기닌 (R)은 아미노산 잔기의 유의적 특성이 그의 전하에 기인하고 이들 두 아미노산 잔기의 pK'를 달리하는 것이 유의적이지 않은 부위에서 종종 상호교환가능하다. 다른 변경들도 특히 환경에서 "보존적"으로 고려될 수 있다 (예컨대, 본 발명의 표 III(a); "Biochemistry" 제2판 13-15 페이지, Lubert Stryer 편 (Stanford University); Henikoff 외, PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei 외, J Biol Chem 1995 May 19; 270(20):11882-6 참조). 다른 종류의 치환 역시 허용가능하며 실험적으로 결정되거나 또는 공지의 보존적 치환에 따라 결정될 수 있다.

[0108] [0100] "세포독성제"라는 용어는 세포의 발현 활성, 세포의 기능을 저해 또는 방지하고/방지하거나 세포의 파괴를 일으키는 물질을 가리킨다. 이 용어는 방사능 동위원소, 화학요법제, 및 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 소분자 독소와 같은 독소, 및 이들의 단편 및/또는 변이체를 포괄한다. 세포독성제의 예로는 아우리스타틴 (예컨대, 아우리스타틴 E, 아우리스타틴 F, MMAE 및 MMA), 아우로마이신, 메이탄시노이드, 리신, 리신 A-사슬, 콤브레스타틴, 듀오카마이신, 돌로스타틴, 독소루비신, 다우노루비신, 택솔, 시스플라틴, cc1065, 에티디움 브로마이드, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 디히드록시 안트라신 디온, 악티노마이신, 디프테리아 독소, 슈도모나스 엑소톡신 (PE) A, PE40, 아브린, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 큐리신, 크로틴, 칼리케아미신, 사포나리아 오피시날리스 (*Sapaonaria officinalis*) 저해제, 및 글루코코르티코이드 및 기타 화학요법제 뿐만 아니라, 방사능 동위원소, 예컨대 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212} 또는 ^{213}, P^{32} 및 Lu^{177}를 비롯한 Lu의 방사능 동위원소를 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 전구약물을 그의 활성형으로 전환시킬 수 있는 항암 전구약물 활성화 효소에 항체를 접합시킬 수도 있다.

[0109] [0101] 본 발명에서 "다이아바디(diabodies)"라는 용어는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 가리

키는 것으로서, 이들 단편들은 동일한 폴리펩타이드 사슬(V_H-V_L) 내에서 경쇄 가변부(V_L)에 연결된 중쇄 가변부(V_H)로 이루어진다. 동일 사슬 상에서 두개의 대역 사이에 쌍을 이루도록 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인들로 하여금 다른 사슬의 상보 대역과 쌍을 이루도록 하여 두개의 항원 결합 부위를 만든다. 다이아바디는 예컨대 EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger *외*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993)에 보다 상세히 설명되어 있다.

[0110] [0102] "고갈(deplete)"이라는 용어는 191P4D120발현 세포 상에서의 191P4D12 결합 물질의 효과와 관련하여, 191P4D12-발현 세포의 수가 감소되거나 이것이 제거되었음을 가리키는 것이다.

[0111] [0103] 본 발명에서 "유전자 산물"이라 함은 mRNA 또는 펩타이드/단백질을 가리킨다. 예컨대, "본 발명의 유전자 산물"은 때로 "암의 아미노산 서열", "암 단백질", " 표 I에 열거된 암 단백질", "암의 mRNA" " 표 I에 열거된 암의 mRNA" 등을 가리킨다. 한가지 실시상태에서, 암 단백질은 Figure 1의 핵산에 의해 코딩된다. 암 단백질은 단편이거나, 또는 Figure 1의 핵산에 의해 코딩된 전장 단백질일 수 있다. 한가지 실시상태에서, 암의 아미노산 서열은 서열 동일성 또는 유사성을 결정하는데 이용된다. 또 다른 실시상태에서, 이들 서열들은 Figure 1의 핵산에 의해 코딩된 단백질의 자연 발생적인 대립형질 변이체이다. 또 다른 실시상태에서, 이들 서열은 서열 변이체이며 이에 관해서는 이하에 상술한다.

[0112] [0104] "헤테로컨쥬게이트" 항체는 본 발명의 방법과 조성물에서 유용하다. 본 발명에서, "헤테로컨쥬게이트 항체"라 함은 2개의 공유적으로 결합된 항체들을 가리킨다. 이러한 항체들은 가교제를 사용하는 것을 포함하여, 합성 단백질 화학 분야의 공지 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 예컨대, 미국특허 No. 4,676,980 참조.

[0113] [0105] "상동체(homolog)"라는 용어는 다른 분자에게 상동성을 나타내는 분자, 예컨대, 대응하는 좌위에서 동일 또는 유사한 화학적 잔기의 서열을 갖는 분자를 가리킨다.

[0114] [0106] 한가지 실시상태에서, 본 발명에서 제공되는 항체는 "인간 항체"이다. 본 발명에서, "인간 항체"라 함은 경쇄 서열과 중쇄 사열의 전체 서열들이, 상보성 결정 대역 (CDRs)을 비롯하여, 모두 사람의 유전자로부터 기원한 것을 가리킨다. 한가지 실시상태에서, 인간의 모노클로날 항체는 트리오마 기술, 인간의 B 세포 기술 (예컨대, Kozbor, *외*, Immunol. Today 4: 72 (1983), EBV 형질전환 기술 (예컨대, Cole *외* Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy 77-96 (1985) 참조), 또는 파지 디스플레이 기술 (예컨대, Marks *외*, J. Mol. Biol. 222:581 (1991) 참조)를 이용하여 제조된다. 특정 실시상태에서, 인간 항체는 트랜스제닉 마우스에서 생성된다. 이러한 부분적 내지 완전한 인간 항체의 제조 기술은 기술 분야에 공지이며 이러한 기술 중 어느 것이든 이용가능하다. 특히 바람직한 실시상태에서는, 전적으로 인간 유래의 항체 서열을 인간의 중쇄 및 경쇄 항체 유전자를 발현하도록 조작된 트랜스제닉 마우스에서 만든다. 사람의 항체를 생산하는 트랜스제닉 마우스의 제조에 관한 예시적인 설명은 WO 02/43478 및 미국특허 6,657,103 (Abgenix) 및 그의 관련 출원에서 찾아볼 수 있다. 소망되는 항체를 생산하는 트랜스제닉 마우스로부터 얻은 B 세포를 융합시켜 항체의 연속 제조를 위한 하이브리도마 세포주를 만든다. 예컨대, 미국특허 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; 및 5,545,806; 및 Jakobovits, Adv. Drug Del. Rev. 31:33-42 (1998); Green, *외*, J. Exp. Med. 188:483-95 (1998).

[0115] [0107] 본 발명에서, "인간화된 항체(humanized antibody)"라 함은 인간 항체 뿐만 아니라 비인간 (예컨대, 마우스) 항체로부터의 서열도 함유하는 항체 형태를 가리킨다. 이러한 항체들은 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열 (minimal sequence)을 함유하는 키메라 항체들이다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 하나, 일반적으로 두개의 가변부를 함유하며, 여기서 초가변부(hypervariable) 루프의 모든 것 또는 실질적으로 모든 것은 비인간 면역글로불린의 그것에 대응하고, FR 대역의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 인간 면역글로불린 서열의 그것에 대응한다. 인간화된 항체는 또한 임의로 면역글로불린 불변부 (Fc), 일반적으로는 인간의 면역글로불린의 불변부를 적어도 일부분 함유한다. 예컨대, Cabilly U.S. Patent No. 4,816,567; Queen *외* (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033; 및 Antibody Engineering: A Practical Approach (Oxford University Press 1996) 참조.

[0116] [0108] 본 발명에서 "억제하다" 또는 "억제"라는 용어는 측정가능한 양으로 감소시키거나 또는 전적으로 방지하는 것을 의미한다.

[0117] [0109] "분리된" 또는 "생물학적으로 순수한"이라는 표현은 천연 상태라면 보통 그 물질과 함께 발견되는 성분들이 그 물질에 실질적으로 또는 기본적으로 없는 것을 가리킨다. 따라서, 본 발명에서 분리된 펩타이드는 바람직하게는 그의 *in situ* 환경에서 일반적으로 연관되는 물질을 함유하지 않는다. 예컨대, 어떤 폴리뉴클레오타이드가 191P4D12 유전자 이외의 유전자에 대응하거나 그에 상보적인 오염 폴리뉴클레오타이드를 실질적으로 함유

하지 않거나, 191P4D12 유전자 산물 또는 그의 단편 이외의 폴리펩타이드를 코딩하는 오염 폴리뉴클레오타이드를 실질적으로 함유하지 않을 때, 그 폴리뉴클레오타이드를 "분리되었다"고 칭한다. 당업자라면 분리된 191P4D12 폴리뉴클레오타이드를 얻기 위한 핵산 분리 공정을 쉽게 사용할 수 있을 것이다. 예컨대, 191P4D12 단백질을 그 단백질과 보통 연관된 세포 성분으로부터 제거하는데 물리적, 기계적, 화학적 방법이 사용된 경우 그 단백질은 '분리되었다'고 표현한다. 당업자라면 분리된 191P4D12 단백질을 얻는 표준 정제법을 쉽게 사용할 수 있을 것이다. 또한, 분리된 단백질은 화학적 수단에 의해 제조가능하다.

[0118] [0110] 적절한 "표지(label)"로는 라디오뉴클라이드, 효소, 기질, 코팩터, 억제제, 형광 부분, 화학발광 부분, 자기 입자 등을 들 수 있다. 이러한 표지의 사용 기술을 설명하는 특허로는 미국특허 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; 및 4,366,241을 들 수 있다. 또한, 본 발명에서 제공되는 항체들은 형광체의 항원 결합 성분으로서 사용될 수도 있다. 예컨대, Zeytun *외*, Nat. Biotechnol. 21:1473-79 (2003) 참조.

[0119] [0111] "포유동물"이라 함은 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 소, 말 및 사람을 포함하는 포유동물로 분류되는 모든 생물을 가리킨다. 본 발명의 일례에서, 포유동물은 마우스이다. 또 다른 예로서 포유동물은 사람이다.

[0120] [0112] "전이성 암" 및 "전이성 질환" 이라는 용어는 근위 임파절이나 원위부까지 확산된 암을 의미하며, AUA 시스템의 D 단계 질환 및 TNM 시스템의 TxNxM+ 단계를 포괄한다.

[0121] [0113] "조절자" 또는 "테스트 화합물" 또는 "약물 후보" 또는 본 발명에서 이들 용어의 문법상 등가물은 암 표현형, 암 서열, 예컨대 핵산 또는 단백질 서열, 또는 암 서열의 효과 (예컨대, 시그널링, 유전자 발현, 단백질 상호반응 등)을 직접 또는 간접적으로 변경시키는 능력에 대해 시험될, 예컨대 단백질, 올리고펩타이드, 소형 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 등을 가리킨다. 한가지 관점에서, 조절자는 본 발명의 암 단백질의 효능을 무력화시킬 것이다. "무력화"라 함은 어떤 단백질의 활성이 저해 또는 차단되면서 결과적으로 세포에 그러한 효과를 미침을 가리킨다. 또 다른 관점에서, 조절자는 상기 단백질의 수준을 정상화시킴으로써, 본 발명의, 유전자 및 그에 대응하는 단백질의 효과를 무력화시킬 것이다. 바람직한 실시상태에서, 조절자는 본 발명에 제공된 발현 프로파일, 또는 발현 프로파일 핵산 또는 단백질 또는 하류의 이펙터 경로를 변경시킨다. 일례에서, 조절자는 암의 표현형을, 예컨대, 정상적인 조직 핑거프린트로 억제한다. 또 다른 실시상태에서, 조절자는 암 표현형을 유도하였다. 일반적으로, 다수의 분석 혼합물을 시약의 농도를 달리하여 함께 병용함으로써 여러가지 농도에 대한 상이한 응답을 얻는다. 대개, 이러한 농도들 중 한가지는 제로 농도 또는 검출 수준 미만, 즉, 음성 대조군 역할을 한다.

[0122] [0114] 조절자, 약물 후보 또는 테스트 화합물은 일반적으로 유기 분자, 바람직하게는, 분자량이 100 달톤보다 크고 약 2,500 달톤 미만인 소형 유기 화합물인 경우가 많지만, 광범위한 화학물질을 포괄한다. 바람직한 소형 분자는 분자량이 2000 달톤 미만, 또는 1500 달톤 미만 또는 1000 달톤 미만 또는 500 달톤 미만이다. 후보 물질은 단백질과 구조적으로 상호반응하는데 필요한 관능기, 특히 수소 결합, 및 일반적으로 적어도 하나의 아민, 카르보닐, 히드록실 또는 카르복실기, 바람직하게는, 적어도 두개의 관능성 화학기를 포함하는 것이 좋다. 후보 물질은 종종 고리형 탄소 또는 헤테로시클릭 구조 및/또는 방향족 또는 폴리방향족 구조를 포함하여 이들은 하나 이상의 전술한 관능기로 치환된다. 조절자는 또한 펩타이드, 당류, 지방산, 스테로이드, 퓨린, 피리미딘, 이의 유도체, 구조적 유사체 또는 조합체와 같은 바이오분자도 포함한다. 특히 바람직한 것은 펩타이드이다. 조절자의 한 부류는 예컨대 약 5 내지 35개 아미노산, 바람직하게는 약 5 내지 약 20개 아미노산, 더욱 바람직하게는 약 7 내지 약 15 아미노산의 펩타이드이다. 바람직하게는, 암 조절 단백질이 가용성인 것이 좋고, 비트랜스막 대역을 가지며 및/또는, 가용성을 보조하기 위한 N-말단 Cys를 함유하는 것이 좋다. 일례에서, 그 단편의 C-말단은 유리산으로서 유지되고 N-말단은 예컨대 시스테인에 대한 커플링 보조를 위한 유리 아민이다. 일례에서, 본 발명의 암 단백질은 본 발명에서 논의된 면역원성 제제에 접합된다. 일례에서, 암 단백질은 BSA에 접합된다. 바람직한 길이의 본 발명의 펩타이드는 서로 링크되거나 다른 아미노산에 링크되어 보다 긴 펩타이드/단백질을 만들어낸다. 조절 펩타이드는 위에서 개략한 바와 같은 천연 단백질, 랜덤 펩타이드 또는 "편향된(biased)" 랜덤 펩타이드의 절편일 수 있다. 바람직한 실시상태에서, 펩타이드/단백질 기재 조절자는 상기 정의된 바와 같은 항체, 및 그의 단편이다.

[0123] [0115] 본 발명에서 "모노클로날 항체"라 함은 실제로 동질의 항체들의 집단, 즉, 그 집단을 이루는 항체들이, 소량으로 존재하는 자연발생적 돌연변이의 가능성을 제외하고 서로 동일한 항체들의 집단으로부터 얻어진 것을 가리킨다. 모노클로날 항체는 단일 항원 에피토프에 대해 고도로 특이적이면서 그것에 지향되어 있다. 이와 대조적으로, 통상적인 (폴리클로날) 항체 제제는 일반적으로 여러가지 상이한 에피토프에 지향된 (지향되거나 또

는 그에 특이적임) 항체를 복수개 포함한다. 일례에서, 폴리클로날 항체는 복수개의 항원 에피토프를 함유하는 단일 항원 내에서 상이한 에피토프 특이성, 친화성, 또는 결합활성을 갖는 모노클로날 항체들을 복수개 함유한다. 변형자 "모노클로날"은 그 항체의 특징이 항체의 실질적으로 균일한 집단으로부터 얻어졌음을 의미하며, 어떤 특정 방법에 의해 항체를 생산할 것이 요구되는 것은 아닌 것으로 이해되어야 한다. 예컨대, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 Kohler *외*, Nature 256: 495 (1975)에 의해 최초로 설명된 하이브리도마 방법에 의해 제조되거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예컨대, 미국특허 4,816,567)에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예컨대, Clackson *외*, Nature 352: 624-628 (1991) 및 Marks *외*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)에 설명된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리될 수도 있다. 이들 모노클로날 항체들은 대개 ELISA로 측정시 대개 적어도 약 1 μM의, 더욱 일반적으로는 적어도 약 300 nM, 일반적으로는 적어도 약 30 nM, 바람직하게는 적어도 약 10 nM, 더욱 바람직하게는 적어도 약 3 nM의 Kd와 결합한다.

[0124] [0116] "약학적 부형제"에는 애쥬번트, 담체, pH 조절제 및 완충제, 등장성 조절제, 보습제, 방부제 등과 같은 물질이 포함된다.

[0125] [0117] "약학적으로 허용가능한"이라 함은 비독성, 불활성 및/또는 사람이나 다른 포유동물과 생리적으로 혼용가능한 조성물을 지칭하는 것이다.

[0126] [0118] "폴리뉴클레오타이드"라는 표현은 길이가 적어도 10개의 염기 또는 염기쌍인 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오타이드 또는 이러한 뉴클레오타이드 중 어느 한 종류의 변형체인 뉴클레오타이드의 폴리머 형태로서, DNA 및/또는 RNA의 단일 및 이중가닥 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 기술 분야에서, 이 용어는 "올리고뉴클레오타이드"와 곧잘 혼용된다. 폴리뉴클레오타이드는 예컨대 Figure 1에 도시된 바와 같이, 티미딘 (T)이 우라실 (U)일 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고; 이러한 정의는 DNA와 RNA의 화학적 구조 간의 차이에 기인하는 것으로, 특히 RNA의 4개의 주요 염기 중 하나가 티미딘 (T) 대신 우라실 (U)인 경우 관찰된다.

[0127] [0119] "폴리펩타이드"라는 용어는 적어도 약 4, 5, 6, 7 또는 8개의 아미노산의 폴리머를 의미한다. 명세서 전체를 통해, 표준 세 개 또는 한개의 문자가 아미노산을 지시하기 위해 사용되었다. 당업계에서는 이 용어는 종종 "펩타이드" 또는 "단백질"과 상호교환적으로 사용된다.

[0128] [0120] "재조합" DNA 또는 RNA 분자는 *in vitro*에서 분자 조작된 DNA 또는 RNA 분자이다.

[0129] [0121] 여기서 사용된, "단일 쇄 Fv" 또는 "scFv" 또는 "단일 쇄" 항체라는 용어는 항체의 V_H 와 V_L 도메인을 포함하는 항체의 단편을 지칭하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 쇄로 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩타이드는 sFv가 항원 결합을 위해 바람직한 구조를 형성하도록 하는 V_H 와 V_L 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 더 포함한다. sFv에 대한 검토를 위해서는, Pluckthun, The Pharmacology Of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg 및 Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)를 참조할 것.

[0130] [0122] 여기서 사용된 "특정한", "특정하게 결합" 및 "결합이 특정하게" 의 용어는 표적 항원 에피토프에 대해 선택적으로 항체 결합하는 것을 지칭한다. 항체들의 결합 특이성은 주어진 조건 하에서 적절한 항원에 대한 결합과, 무관한 항원 또는 항원 혼합물에 대한 결합을 비교함으로써 시험될 수 있다. 항체가 무관한 항원 또는 항원 혼합물보다 적어도 2, 5, 7배, 바람직하게는 10배 더 많이 적절한 항원에 결합한다면, 특정한 것으로 간주된다. 일 실시상태에서, 특정한 항체는 191P4D12 항원에만 결합하고, 무관한 항원에는 결합하지 않는 것이다. 다른 실시상태에서, 특정 항체는 191P4D12 항원과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 아미노산 상동성으로 인간 191P4D12 항원에 결합하지만 비인간 191P4D12 항원에는 결합하지 않는다. 다른 실시상태에서, 특정 항체는 인간 191P4D12 항원에 결합하고, 쥐의 191P4D12 항원에 결합하지만, 인간 항원에 대한 결합도가 더 높다. 다른 실시상태에서 특정 항원은 인간 191P4D12 항원과 결합하고, 영장류 191P4D12 항원과 결합하지만, 인간 항원에 대한 결합도가 더 높다. 다른 실시상태에서, 특정 항원은 인간 191P4D12 항원에 결합하고, 비인간 191P4D12 항원에도 결합하지만, 인간 항원 또는 그 조합에 대한 결합도가 더 높다.

[0131] [0123] 여기서 사용되는 "처치되는" 또는 "치료적" 및 그와 문법적으로 관련된 용어들은 생존의 연장, 사망률의 저하와 같은 어떤 질병의 결과의 개선 및/또는 대체 치료 양상의 부산물인 부작용의 감소를 지칭하고; 당업계에서 이미 인정되는 바와 같이, 질병의 완전한 근절은 바람직하기는 하지만 치료 행위의 요건은 아니다.

[0132] [0124] "변종"이라는 용어는 특정하게 기술된 단백질 (예를 들면, Figure 1에 도시한 191P4D12 단백질)의 대응 위치에 하나 이상의 다른 아미노산을 갖는 단백질과 같이 기술된 타입 또는 표준에서 변형을 나타내는 것을 지

칭한다. 유사체는 변종 단백질의 일예이다. 스플라이스 이소폼과 단일 뉴클레오티드 폴리모피즘 (SNP)는 변종의 또 다른 예이다.

[0133] [0125] 본 발명의 "191P4D12 단백질" 및/또는 "191P4D12 관련 단백질"은 여기서 특정하게 정의된 것 (Figure 1 참조) 뿐 아니라, 여기서 개략적으로 설명되는 방법을 따라 과도한 실험 없이 또는 당업계에서 쉽게 이용할 수 있는 방법으로 분리/제조 및 특징지어질 수 있는 대립형질 변종, 보존적 치환 변종, 유사체와 상동체를 포함한다. 191P4D12 단백질의 융합 단백질과 이종 폴리펩타이드 뿐 아니라, 서로 다른 191P4D12 단백질 또는 그 단편의 부분을 결합한 융합 단백질도 또한 포함된다. 그와 같은 191P4D12 단백질은 총괄해서 191P4D12 관련 단백질, 본 발명의 단백직 또는 191P4D12 로 칭한다. "191P4D12-관련 단백질"이라는 용어는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 25개 이상의 아미노산 또는, 적어도 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 330, 335, 339 또는 그 이상의 아미노산의 폴리펩타이드 단편 또는 191P4D12의 단백질 서열을 지칭한다.

[0134] Ⅱ.) 191P4D12 항체

[0135] [0126] 본 발명의 또 다른 측면은 191P4D12 관련 단백질 (Figure 1 참조)에 결합하는 항체를 제공한다. 일 실시상태에서 191P4D12-관련 단백질에 결합하는 항체는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 191P4D12 단백질에 특이적으로 결합하는 항체이다. SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 191P4D12 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에는 다른 191P4D12-관련 단백질에 결합할 수 있는 항체가 포함된다. 예컨대, SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 191P4D12 단백질에 결합하는 항체들은 191P4D12 변이체 및 그의 상동체 또는 유사체와 같은 191P4D12-관련 단백질에 결합할 수 있다.

[0136] [0127] 본 발명의 191P4D12항체는 암 (예를 들면 표1을 참조)의 예후 진단, 화상화 및 치료 방법론에서 특히 유용하다. 마찬가지로, 그러한 항체는 결장 및 다른 암에서 191P4D12이 발현 또는 과발현되는 정도까지 다른 암의 치료 및/또는 예후에서 유용하다. 더욱이 세포 내에서 발현된 항체 (예를 들면 단일 쇄 항체)는 진행성 또는 전이성 결장암 또는 다른 진행성 또는 전이성 암과 같이 191P4D12의 발현이 관련된 암의 치료에 치료적으로 유용하다.

[0137] [0128] 항체, 특히 특정 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면 항체는 191P4D12 관련 단백질, 펩타이드 또는 단편을 이용하여 적절한 포유동물 숙주를 면역화함으로써 분리된 또는 면역 콘쥬게이트된 형태로 제조될 수 있다 (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow, 및 Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). 또한 191P4D12 GST 융합 단백질과 같은 191P4D12의 융합 단백질도 역시 사용될 수 있다. 특정 실시상태에서, Figure 1의 아미노산 서열의 모두 또는 대부분으로 이루어지는 GST 융합 단백질이 제조되어 적절한 항체를 생산하기 위한 면역원으로 사용된다. 또 다른 실시상태에서, 191P4D12관련 단백질이 합성되어 면역원으로 사용된다.

[0138] [0129] 또한, 당업계에 알려진 naked-DNA 면역화 기술이 인코딩된 면역원에 대한 면역을 만들기 위해 (정제 191P4D12 관련 단백질 또는 191P4D12 발현 세포를 사용하거나 사용하지 않고) 사용된다 (Donnelly *et al.*, 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648 참조).

[0139] [0130] Figure 1에 도시된 191P4D12 단백질의 아미노산 서열은 항체를 생산하기 위해 191P4D12 단백질의 특정 영역을 선택하기 위해 분석될 수 있다. 예를 들면 191P4D12 아미노산 서열의 소수성 및 친수성 분석이 191P4D12 구조에서 친수성 영역을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 다른 영역 및 도메인 뿐 아니라 면역 구조를 나타내는 191P4D12 단백질의 영역은 Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz 또는 Jameson-Wolf 분석 등의 당업계에 공지된 다양한 다른 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 친수성 프로파일은 Hopp, T.P. 및 Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828의 방법을 사용하여 만들어질 수 있다. 소수성 프로파일은 Kyte, J. 및 Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-132의 방법을 사용하여 만들어질 수 있다. 퍼센트(%) 어세서블 잔기 (Percent (%) Accessible Residues) 프로파일은 Janin J., 1979, Nature 277:491-492의 방법을 사용하여 만들 수 있다. 평균 유연성 프로파일은 Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255의 방법으로 만들 수 있다. 베타 턴 프로파일은 Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294.의 방법을 사용하여 만들 수 있다. 따라서, 이들 중 어떤 프로그램 또는 방법에 의해 동정된 각각의 영역도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 191P4D12 항체의 제조를 위한 바람직한 방법은 여기서 실시예에 의해 제시된다. 면역원으로서 사용하기 위한 단백질 또는 폴리펩타이드의 제조를 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. BSA, KLH 또는 다른 캐리어 단백질 등의 캐리어와

단백질의 면역성 컨쥬게이트를 만들기 위한 방법 역시 당업계에 잘 알려져 있다. 어떤 환경에서는 예를 들면 카보디이미드 시약을 사용하는 직접 콘쥬게이션이 효과적이고, 다른 경우에는 Pierce Chemical Co., Rockford, IL 사에 의해 공급되는 것과 같은 링킹 시약의 사용이 효과적이다. 191P4D12 면역원은 당업계에서 이해되는 바와 같이 적절한 시간 간격을 두고, 적절한 보조제와 함께 주사 투여된다. 면역화 스케쥴 동안, 항체 형성의 적절성을 결정하기 위해 항체의 역가가 취해질 수 있다.

[0140] [0131] 191P4D12 모노클로날 항체는 당업계에서 잘 알려진 바와 같이 다양한 수단에 의해 생산될 수 있다. 예를 들면 일반적으로 알려진 바와 같이, 원하는 모노클로날 항체를 분비하는 불멸화된 세포주는 Kohler와 Milstein의 표준 하이브리도마 기술 또는 항체 생성 B세포를 불멸화하는 변형에 의해 제조된다. 원하는 항체를 분비하는 불멸화된 세포주는 항원으로 191P4D12-관련 단백질을 사용하는 이뮤노어세이에 의해 스크리닝된다. 적절한 불멸화된 세포 배양이 동정되면, 그 세포는 확장될 수 있고, 항체는 *in vitro* 배양에서 또는 복수액으로부터 생성될 수 있다.

[0141] [0132] 본 발명의 항체 또는 단편은 또한 재조합 수단에 의해 제조될 수 있다. 191P4D12 단백질의 원하는 영역에 특이적으로 결합하는 영역은 또한 복수의 종 기원의 키메라 또는 상보 결정영역(CDR) 그래프트 항체의 맥락에서 만들어질 수 있다. 인간화된 또는 인간 191P4D12 항체는 치료적 맥락에서 제조되고 바람직하게 사용될 수 있다. 대응하는 인간 항체 서열에 대해 하나 이상의 비인간 항체 CDR을 치환함으로써 인간화된 쥐 및 다른 비인간 항체를 만드는 방법은 잘 알려져 있다(예를 들면 Jones *et al.*, 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239: 1534-1536 참조). 또한, Carter *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 및 Sims *et al.*, 1993, J. Immunol. 151: 2296 참조.

[0142] [0133] 바람직한 실시상태에서, 본 발명의 항체는 인간 191P4D12 항체 전부를 포함한다 (191P4D12 MAbs). 당업계의 다양한 방법이 인간 191P4D12 MAbs 전체를 제조하기 위해 제공된다. 예를 들면, 바람직한 실시상태에서는, 항체 생성을 위해 불활성화되고, 인간 중쇄 및 경쇄 좌위로 제노마우스(Xenomouse)라 불리는 트랜스제닉 마우스(Amgen Fremont, Inc.)를 이용한 기술이 제공된다. 인간 항체를 생성하기 위한 트랜스제닉 마우스를 제조하기 위한 예시적인 설명은 미국특허 6,657,103에서 찾아볼 수 있다. 또한 미국특허 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; 및 5,545,806; 및 Mendez, *et. al.* Nature Genetics, 15: 146-156 (1998); Kellerman, S.A. & Green, L.L., Curr. Opin. Biotechnol 13, 593-597 (2002)을 참조할 것.

[0143] [0134] 또한, 본 발명의 인간 항체는 재배열되지 않은 인간 중 (뮤 및 감마)와 카파 경쇄 면역 글로불린 서열을 인코딩하는 인간 면역 글로불린 유전자 미니 좌위를 갖는 HuMAb 마우스 (Medarex, Inc.)를, 내생 뮤 및 카파 쇄 좌위를 불활성화하는 표적화된 돌연변이와 함께 이용하여 제조될 수 있다 (예를 들면, Lonberg, 등 (1994) Nature 368(6474): 856-859 참조).

[0144] [0135] 다른 실시상태에서, 본 발명의 전 인간 항체는 인간 중쇄 이식유전자와 인간 경쇄 이식염색체를 운반하는 마우스와 같은, 인간 면역 글로불린 서열을 이식유전자와 이식염색체 상에 운반하는 마우스를 사용하여 만들어질 수 있다. 그와 같은 마우스는, 여기서 "KM 마우스"로 지칭되며, Tomizuka 등 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727 및 PCT Publication WO 02/43478 to Tomizuka, 등에 설명되어 있다.

[0145] [0136] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 인간 면역 글로불린 유전자의 스크리닝 라이브러리를 위한 파지 디스플레이법을 사용하여 제조될 수 있다. 인간 항체를 분리하기 위한 파지 디스플레이법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면 Ladner 등의 미국특허 5,223,409; 5,403,484; 및 5,571,698; Dower 등의 미국특허 427,908 및 5,580,717; McCafferty 등의 미국특허 5,969,108 및 6,172,197;과 Griffiths 등의 미국특허 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 및 6,593,081을 참조할 것.

[0146] [0137] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 인간 항체 응답이 면역화될 때 생성될 수 있도록 인간 면역 세포가 그 안으로 재구성되는 SCID 마우스를 이용하여 제조될 수 있다. 그와 같은 마우스는 예를 들면 Wilson 등의 미국특허 5,476,996와 5,698,767에서 설명된다.

[0147] [0138] 바람직한 실시상태에서 본 발명의 191P4D12 MAbs는 ATCC (American Type Culture Collection) 기탁번호 PTA-11267 (Figure 3 참조)로 기탁된 하이브리도마에 의해 제조되는 Ha22-2(2,4)6.1로 표시되는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변부, 또는 Ha22-2(2,4)6.1의 중쇄 및 경쇄 가변부의 아미노산 서열에 대한 상동체인 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 항체는 본 발명의 191P4D12 MAb의 바람직한 기능성을 유지한다. Ha22-2(2,4)6.1의 중쇄 가변부는 SEQ ID NO:7의 20번째 E 잔기에서 136번째 S 잔기까지의 아미노산 서열로 이루어지고; Ha22-2(2,4)6.1의 경쇄 가변부는 SEQ ID NO:8의 23번째 D 잔기에서 130번째 R 잔기까지의 아미노산 서열로 이루어진다. 본 발명의

항체의 불변부로서는, 불변부의 어떤 서브클래스도 선택될 수 있다. 일 실시상태에서 중쇄 불변부로서 인간 IgG1 불변부가, 경쇄 불변부로서 인간 Ig 카파(kappa) 불변부가 사용될 수 있다.

[0148] [0139] 예를 들면,본 발명은 중쇄 가변부와 경쇄 가변부를 포함하는, 분리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부분을 제공한다. 여기서:

[0149] (a) 중쇄 가변부는 Figure 3에 도시된 중쇄 가변부 아미노산 서열과 적어도 80% 상동인 아미노산 서열을 포함하고,

[0150] (b) 경쇄 가변부는 Figure 3에 도시된 경쇄 가변부 아미노산 서열과 적어도 80% 상동인 아미노산 서열을 포함한다.

[0151] [0140] 다른 실시상태에서, V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열은 Figure 3에 도시된 V_H 및 V_L 서열과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동일 수 있다.

[0152] [0141] 다른 실시상태에서, 본 발명은 인간화된 중쇄 가변부와 인간화된 경쇄 가변부를 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합부를 제공한다. 여기서:

[0153] (a) 중쇄 가변부는 Figure 3에 도시된 중쇄 가변부 CDR의 아미노산 서열을 갖는 상보결정부(CDR)을 포함하고,

[0154] (b) 경쇄 가변부는 Figure 3에 도시된 경쇄 가변부 CDR의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함한다.

[0155] [0142] 본 발명의 조작 항체는 V_H 및/또는 V_L 내에서 프레임워크 잔기에 대해 변형이 이루어진 항체를 포함한다 (예를 들면, 항체의 특성을 개선하기 위해). 전형적으로 그와 같은 프레임워크 변형은 항체의 면역원성을 감소하기 위해 행해진다. 예들 들면, 그에 대한 하나의 접근은, 하나 이상의 프레임워크 잔기를 해당 생식세포주 서열로 "복귀 돌연변이" (backmutate) 하는 것이다. 보다 상세하게는, 체세포 돌연변이된 항체는, 항체가 유래된 생식세포주 서열과는 다른 프레임워크 잔기를 함유할 수 있다. 그와 같은 잔기는 항체 프레임워크 서열을 항체가 유래한 생식세포주 서열과 비교함으로써 동정될 수 있다. 프레임워크 잔기 서열을 그들의 생식세포주 배열로 되돌리기 위해서, 체세포 돌연변이는 예를 들면, 위치 지정 돌연변이 생성 또는 PCR 매개 돌연변이 생성에 의해 생식세포주 서열로 복귀 돌연변이 될 수 있다 (예를 들면, 류신에서 메티오닌으로 복귀 돌연변이). 이와 같은 복귀 돌연변이된 항체는 또한 본 발명에 포함되도록 의도된다.

[0156] [0143] 프레임워크 변형의 또 다른 형태는 프레임워크 영역 내에서 또는 하나 이상의 CDR 영역 내에서 하나 이상의 잔기를 돌연변이시켜 T-세포 에피토프를 제거함으로써 항체의 잠재적 면역원성을 감소시키는 것과 관련된다. 이 접근은 또한 "면역제거"라고 지칭되며, Carr et al.에 의한 미국특허 공개 2003/0153043에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0157] [0144] 프레임워크 또는 CDR 영역 내에서 행해지는 변형에 대해 추가로 또는 선택적으로, 본 발명의 항체는 전형적으로 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원 의존성 세포 독성 등의 항체의 하나 이상의 기능특성을 변형시키기 위해 Fc 영역 내에서의 변형을 포함하도록 조작될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 191P4D12 MAb는 화학적으로 변형되거나 그 글리코실화 또는 MAb의 하나 이상의 기능 특성을 변경시키기 위해 변형될 수 있다 (예를 들면, 하나 이상의 화학부분이 항체에 결합될 수 있다). 이들 실시상태의 각각은 이하에서 보다 더 상세하게 설명된다.

[0158] [0145] 하나의 실시상태에서, CH1의 힌지 영역은 힌지 영역의 시스테인 잔기의 수가 변경, 즉 증가 또는 감소되도록 변형된다.이 접근은 Bodmer et al. 등에 의한 미국특허 5,677,425에서 더 상세하게 설명된다. CH1의 힌지 영역에서 시스테인 잔기의 수는 예를 들면 경쇄 또는 중쇄의 어셈블리를 용이하게 하거나 191P4D12 MAb의 안정성을 증가 또는 감소시키기 위해 변경된다.

[0159] [0146] 다른 실시상태에서, 항체의 Fc 힌지 영역은 191P4D12 MAb의 생물학적 반감기를 감소시키기 위해 돌연변이된다. 보다 상세하게는, 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 Fc -힌지 단편의 CH2-CH3 도메인 인터페이스 영역으로 도입되어 항체는 천연 Fc-힌지 도메인 SpA 결합에 대해 결합하는 손상된 스타필로코실 단백질 A (Staphylococcyl protein A) (SpA)를 갖는다. 이 접근은 Ward et al.에 의한 미국특허 6,165,745에 더 상세하게 설명된다.

[0160] [0147] 다른 실시상태에서, 191P4D12 MAb는 생물학적 반감기가 증가하도록 변형된다. 이에 대해 다양한 접근이 가능하다. 예를 들면, 돌연변이는 Ward의 미국특허 6,277,375 에서 설명된 바와 같이 도입될 수 있다. 또는, 반감기를 증가시키기 위해, Presta et al. 에 의한 미국특허 5,869,046 및 6,121,022에 설명된 바와 같이 IgG의

Fc 영역의 CH2 도메인의 두 개의 루프에서 취해진 에피토프와 결합하는 샐비지 수용체를 함유하도록 항체는 CH1 또는 CL 영역 내에서 변경될 수 있다.

[0161] [0148] 또 다른 실시상태에서, Fc 영역은 191P4D12 MAb의 이펙터 기능을 변경시키도록 적어도 하나의 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 대체함으로써 변경된다. 예를 들면, 아미노산 특정 잔기로부터 선택된 하나 이상의 아미노산은, 항체가 이펙터 리간드에 대한 변경된 친화성을 갖지만 모항체의 항원 결합 능력은 유지하도록 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 친화성이 변경될 수 있는 이펙터 리간드는, 예를 들면, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분이 될 수 있다. 이 접근은 Winter et al.에 의한 미국특허5,624,821 및 5,648,260에 더 상세하게 설명된다.

[0162] [0149] 191P4D12 관련 단백질에 대한 191P4D12 항체의 반응성은 적절한 191P4D12-관련 단백질, 191P4D12 발현 세포 또는 그 추출물을 이용한 웨스턴 블랏, 면역침강, ELISA 및 FACS 분석을 포함하는 공지의 다수의 방법에 의해 확립될 수 있다. 191P4D12 항체 또는 그 단편은 검출가능한 마커로 표지되거나 두번째 분자와 컨쥬게이트될 수 있다. 적절한 검출가능한 마커는 방사성 동위원소, 형광 화합물, 생물발광 화합물, 화학발광 화합물 또는 금속 킬레이터 또는 효소를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 또한, 두 개 이상의 191P4D12 에피토프에 대해 특이적인 이중 특이성 항체는 당 업계에 일반적으로 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 호모다이머 항체 역시 업계에 알려진 가교 기술에 의해 제조될 수 있다 (예를 들면, Wolff *et al.*, Cancer Res. 53: 2560-2565).

[0163] [0150] 또 다른 바람직한 실시상태에서, 본 발명의 191P4D12 MAb는 Ha22-2(2,4)6.1로 표시되는 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체이다. Ha22-2(2,4)6.1의 중쇄는 SEQ ID NO: 7의 20번째 E 잔기에서 466번째 K잔기까지의 아미노산 서열로 이루어지고, Ha22-2(2,4)6.1의 경쇄는 SEQ ID NO: 8 서열의 23번째 D잔기에서 236번째 C잔기까지의 아미노산 서열로 이루어진다. 상기 서열은 Figure 2 및 Figure 3에 도시되어 있다. 바람직한 실시상태에서, Ha22-2(2,4)6.1은 세포독성제와 컨쥬게이트된다.

[0164] [0151] Ha22-2(2,4)6.1로 지정된 항체를 생성하는 하이브리도마를 2010년 8월 18일에 VA 20108 머내서스, P.O. Box 1549의 ATCC (American Type Culture Collection)로 발송되어 (Federal Express를 통해), 기탁번호 PTA-11267를 부여받았다.

[0165] Ⅲ.) 일반적인 항체-약물 컨쥬게이트

[0166] [0152] 다른 관점에서, 본 발명은 화학치료제, 약물, 성장억제제, 독소 (예를들면 박테리아, 균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성화된 독소 또는 그 단편) 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 컨쥬게이트)와 같은 독소제와 컨쥬게이트된 항체를 포함하는 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)를 제공한다. 다른 관점에서, 본 발명은 또한 ADC의 사용방법을 제공한다. 하나의 관점에서, ADC는 독소제 또는 검출가능제에 공유적으로 결합된 상기 191P4D12 MAb 중 어떤 것도 포함한다.

[0167] [0153] 세포독소제 또는 세포분열 억제제, 즉 암의 치료에서 종양세포를 죽이거나 저해하는 약물 (Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz 및 Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; 미국특허 4,975,278)의 국소 전달을 위한 항체 약물 컨쥬게이트의 사용은, 약물 부분의 종양에 대한 타켓화된 전달과 세포 내 축적을 가능하게 하여, 이들 비컨쥬게이트 약제의 시스템 투여로 인해 제거해야 할 종양 세포 뿐 아니라 정상 세포에 대해서도 수용불가능한 독성 수준을 초래할 수 있다(Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) Monoclonal Antibodies '84 에서 "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," : Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). 따라서 최소 독성을 갖는 최대 효과가 추구된다. 폴리크로날 항체와 모노클로날 항체는 모두 이들 전략에서 유리한 것으로 보고되고 있다. (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). 이들 방법에 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트와 빈데신 (Rowland et al., (1986) supra)을 포함한다. 항체-독소 컨쥬게이트에 사용되는 독소는 디프테리아 독소 등의 박테리아 독소, 리신과 같은 식물 독소, 겔다나마이신 (Mandler et al (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), 메이탄시노이드 (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)와 칼리아미신 (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342)과 같은 소분자 독소를 포함한다. 상기 독소는 튜불린 결합, DNA 결합 또는 토포이소머라제 저해를 포함하는 매커니즘에 의해 그들의 세포독성 및 세포 분열 억제 효과를 나타낼 수 있다. 어떤 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드와 컨쥬게이트될 때 비활성화되거나 활성이 작아지는 경향을

보인다.

[0168] [0154] 항체 약물 컨쥬게이트의 예는 정상 및 악성 B 림프구 표면에서 발견되는 CD20 항원을 지향하는 뮤린 IgG1 카파 모노클로날 항체와, 티오요소 링커-킬레이터에 의해 결합된 ^{111}In 또는 ^{90}Y 방사성 동위원소 (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)로 구성되는 항체-방사성 동위원소 컨쥬게이트인 ZEVALIN® (이브리투모맙 튜세탄, Biogen/Idec)이다.

[0169] [0155] 또한, 칼리케아미신에 링크된 hu CD33 항체로 구성된 항체 약물 컨쥬게이트인 MYLOTARG™ (겜투주맙-오조가마이신, Wyeth Pharmaceuticals)은 급성 골수성 백혈병 주사 치료용으로 2000년에 승인되었다 (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 미국특허 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001).

[0170] [0156] 또한, 다이설파이드 링커 SPP를 통해 메이탄시노이드 약물 부분, DM1에 링크된 huC242 항체 약물 컨쥬게이트인, 칸투주맙 메탄신 (Cantuzumab mertansine, Immunogen, Inc.)은 CanAg을 발현하는, 결장, 췌장, 위장 및 기타 암의 치료에 대한 2상 시험에 진입하였다.

[0171] [0157] 또한, MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)은 메이탄시노이드 약물 부분, DM1에 링크된 항전립성 특정 멤브레인 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 구성된 항체 약물 컨쥬게이트로서, 전립선암의 잠재적 치료를 위해 개발 중이다.

[0172] [0158] 마지막으로, 아우리스타틴 펩타이드, 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE), 도라스탄틴의 합성 유사체는 (암종에서 루이스 Y에 특정한) 키메라 모노클로날 항체 cBR96 와 (혈액 종양에서 CD30에 특정한) cAC10 에 컨쥬게이트되며, 치료적 개발이 진행 중이다. (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784).

[0173] [0159] 또한, ADC의 제조에 유용한 화학치료제가 여기서 설명된다. 이용가능한 효소적으로 활성인 독소와 그 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (녹농균에서 유래), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 유동 (Aleurites fordii)단백질, 디안신 (dianthin) 단백질, 피토라카 아메리카나 (Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 여주 (momordica charantia) 저해제, 쿠르신 (curcin), 크로틴 (crotin), 솝워트 (sapaonaria officinalis) 저해제, 게로닌 (gelonin), 미토겔린 (mitogellin), 레스트릭토신 (restrictocin), 페노마이신 (phenomycin), 에노마이신 (enomycin) 및 트리코테센 (tricothecenes)을 포함한다. 예를 들면 1993년 10월 28일 발행된 WO 93/21232를 참조할 것. 방사성 컨쥬게이트된 항체의 제조를 위해 다양한 방사성 핵종이 이용가능하다. 실시예는 ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y 및 ^{186}Re를 포함한다. 항체와 세포 독성제의 컨쥬게이트는 N-숙신이미딜-3-(2- 피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이기능성 유도체 (디메틸 아디피미데이트 HCl 등), 활성 에스테르 (디숙신이미딜 수베레이트 등), 알데히드 (글루타르알데히드 등), 비스-아지도 화합물 (비스(p-아지도벤조일)헥산디아민 등), 비스-디아조늄 유도체(비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민 등), 디이소시아네이트 (톨루엔 2,6-디이소시아네이트 등) 및 비스-활성 불소 화합물 (1,5-디플루오-2,4-디니트로벤젠 등)과 같은 다양한 이기능성 단백질 결합제를 이용하여 만들어진다. 예를 들면, 리신 이뮤노톡신은 Vitetta et al (1987) Science, 238:1098에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14- 표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성 핵종과 항체의 컨쥬게이션용 킬레이트제의 일예이다(WO94/11026).

[0174] [0160] 항체와 1종 이상의 소분자 독소, 예컨대 칼리케아미신, 마이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우리스타틴, 트리코테킨 및 CC1065 및 독소 활성을 가지는 이들 독소의 유도체들의 컨쥬게이트들도 역시 본 명세서에 고려된다.

[0175] III(A). 마이탄시노이드 (Maytansinoides)

[0176] [0161] 마이탄시노이드 약물 모이어티로 사용하기에 적합한 마이탄신 화합물이 이 기술 분야에 공지되어 있고, 공지의 방법에 따라 천연 자원으로부터 분리되고, 유전자 공학 기법을 이용하여 제조될 수 있으며 (Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973 참고), 또는 공지의 방법에 따라 마이탄시놀 및 마이탄시놀 유사체가 합성 제조될 수 있다.

[0177] [0162] 예시적 마이탄시노이드 약물 모이어티는 변형된 방향족 고리, 예컨대 C-19-데클로로 (US 4256746) (안사미톡신 P2의 리튬 알루미늄 하이드라이드 환원에 의하여 제조); C-20-하이드록시 (또는 C-20-데메틸) +/-C-

19-데클로로 (미국특허 제4361650호 및 제4307016호) (스트렙토마이세스 또는 악티노마이세스를 이용하여 탈메틸화에 의하여 제조 또는 LAH를 이용하여 탈클로로화에 의하여 제조); 및 C-20-데메톡시, C-20-아실록시 (-OCOR), +/-데클로로 (U.S. 특허 제4,294,757호) (아실 클로라이드를 이용하여 아실화에 의하여 제조)를 가지는 것들 및 기타 위치가 변형된 것들을 포함한다.

[0178] [0163] 예시적 마이탄시노이드 약물 모이어티는 변형된 것들, 예컨대 C-9-SH (미국특허 제4424219호) (H_2S 또는 P_2S_5과 마이탄시놀의 반응에 의하여 제조); C-14-알콕시메틸(데메톡시/CH_2 OR)(미국특허 제4331598호); C-14-하이드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH_2OH 또는 CH_2OAc) (미국특허 제4450254호) (노카르디아로부터 제조); C-15-하이드록시/아실옥시 (미국특허 제4364866호) (스트렙토마이세스에 의한 마이탄시놀의 변환에 의하여 제조); C-15-메톡시 (미국특허 제4313946호 및 제4315929호) (트레위아 누들플로라로부터 단리); C-18-N-데메틸 (미국특허 제4362663호 및 제4322348호) (스트렙토마이세스에 의한 마이탄시놀의 탈메틸화에 의하여 제조); 및 4,5-데옥시 (미국특허 제4371533호) (마이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드/LAH 환원에 의하여 제조)도 역시 포함한다.

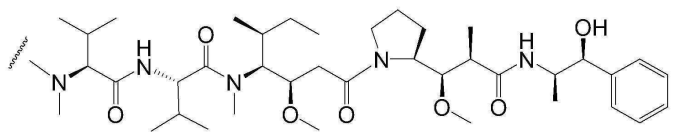
[0179] [0164] 마이탄시노이드를 함유하는 ADC, 이를 제조하는 방법 및 그들의 치료적 용도가 예컨대, 미국특허 제5,208,020호; 제5,416,064호; 제6,441163호 및 유럽 특허 EP 제0 425 235호 B1에 개시되어 있고, 이들 개시 사항이 본 명세서에 참조로 명확히 포함된다. 문헌 [Liu 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]은 인간의 대장암에 대한 모노클로날 항체 C242와 관련된 마이탄시노이드 지정된 DM1을 포함하는 ADC를 개시하고 있다. 상기 컨쥬게이트는 배양된 대장암 세포에 대하여 크게 세포 독성이 있는 것으로 밝혀졌고 생체 내 종양 생장 실험에 있어서도 항암 활성을 나타내었다. 문헌 [Chari 외, Cancer Research 52:127-131 (1992)]는 마이탄시노이드가 인간의 대장암 세포주의 항원에 결합하는 쥐 항체 A7 또는 HER-2/neu 옹코진에 결합하는 쥐의 또 다른 모노클로날 항체 TA.1에 이황화기 링커를 통하여 컨쥬게이트된 ADC를 개시하고 있다. TA.1-마이탄시노이드 컨쥬게이트의 세포 독성을, 각 세포가 3 x 10^5의 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에서 실험실내 (in vitro) 시험하였다. 약물 컨쥬게이트는 자유 마이탄시노이드 약물과 유사한 정도의 세포 독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자당 마이탄시노이드 분자의 수를 증가시킴으로써 증가시킬 수 있었다. A7-마이탄시노이드 컨쥬게이트는 생쥐에서 낮은 수준의 전신 세포 독성을 나타내었다.

[0180] III(B). 아우리스타틴 및 돌라스타틴

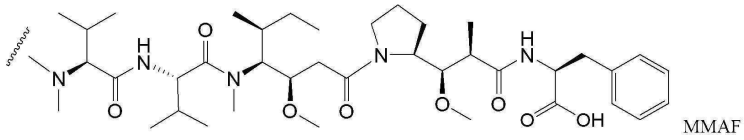
[0181] [0165] 몇 가지 실시상태에 있어서, ADC는 돌로스타틴 또는 돌로스타틴의 펩타이드 유사체 및 유도체인 아우리스타틴과 컨쥬게이트된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국특허 제5635483호; 제5780588호). 돌로스타틴 및 아우리스타틴은 미소세관 역학, GTP 가수분해 및 핵과 세포의 분열을 방해하는 것으로 알려져 있고 (Woyke 외 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584), 항암 활성 (미국특허 제5663149호) 및 항진균 활성 (Pettit 외 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)을 갖는 것으로 알려져 있다. 돌로스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩타이드 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통하여 항체에 부착될 수 있다 (WO 제02/088172호).

[0182] [0166] 예시적 아우리스타틴의 실시상태는 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 들 수 있고, 문헌 "Senter 외, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004" 및 미국 공개 특허 제2005/0238648호에 개시되어 있고, 이들 기재는 전체가 참조로서 본 명세서에 포함된다.

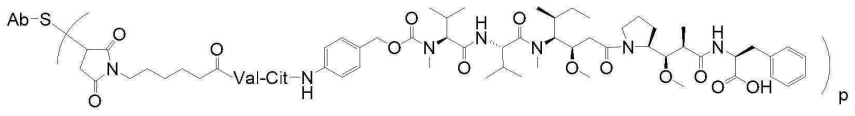
[0183] [0167] 아우리스타틴 실시상태로 예시적인 한 가지는 MMAE이다 (여기서 물결선은 항체 약물 컨쥬게이트의 링커 (L)에 대한 공유 결합을 나타낸다).

[0184] 
MMAE

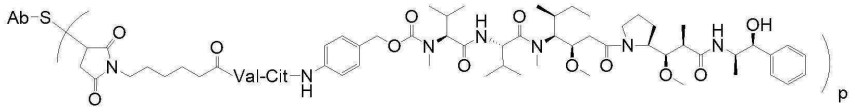
[0185] [0168] 아우리스타틴 실시상태로 예시적인 또 한 가지는 MMAF이고, 여기서 물결선은 항체 약물 컨쥬게이트의 링커 (L)에 대한 공유 결합을 나타낸다 (미국특허 제2005/0238649호):

[0186] 
MMAF

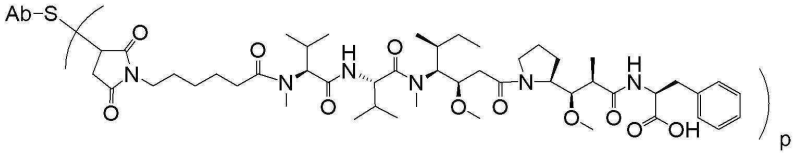
[0187] [0169] MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 요소들 (본 명세서에서 기재)을 포함하는 추가의 예시적 실시상태는 이하의 구조 및 약어를 포함한다 (여기서 Ab는 항체를 의미하고, S는 항체의 황이며, p는 1 내지 약 8이다):



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



[0188] Ab-MC-MMAF

[0189] [0170] 통상적으로, 펩타이드계 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩타이드 단편간의 펩타이드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 이러한 펩타이드 결합은, 예컨대 펩타이드 화학 분야에 공지된 액체 상 합성법 (E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides" volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press)에 따라 이루어질 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 미국특허 제5635483호; 미국특허 제5780588호; [Pettit 외 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465]; [Pettit 외 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277]; [Pettit, G.R., 외 Synthesis, 1996, 719-725]; [Pettit 외 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863]; 및 [Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784]의 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0190] III(C). 칼리케아미신 (Calicheamicin)

[0191] [0171] 또 다른 실시상태에 있어서, ADC는 1개 이상의 칼리케아미신 분자와 컨쥬게이트된 본 발명의 항체를 포함한다. 항생제 중 칼리케아미신 패밀리는 피코몰 농도 아래에서도 DNA 이중 가닥을 파괴할 수 있다. 칼리케아미신 패밀리의 컨쥬게이트를 제조하기 위하여는, U.S. 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호, 제5,877,296호 (모두 아메리칸 사이아나미드 컴퍼니의 특허)를 참고한다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체들로는 γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-아세틸-γ_1^I, PSAG 및 θ^I_1 (Hinman 외, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode 외, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) 및 전술한 아메리칸 사이아나미드의 U.S. 특허)를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 항체가 컨쥬게이트될 수 있는 또 다른 항암 약물은 항엽산제인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA 양자 모두는 세포 내 작용 지점에서 작용하며 쉽게 원형질막을 통과하지 못한다. 그러므로, 이들 제제의 항체 매개 인입을 통한 세포로의 흡수는 이들의 세포 독성 효과를 크게 증진시킨다.

[0192] III(D). 기타 세포독성제

[0193] [0172] 항체와 컨쥬게이트될 수 있는 본 발명의 기타 항암 제제로는 BCNU, 스트렙토조이신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, U.S. 특허 제5,053,394호, 제5,770,710호에 개시되어 총괄적으로 LL-E33288 복합체로 알려진 제제들의 패밀리 및 에스페라마이신 (U.S. 특허 제5,877,296호)를 들 수 있다.

[0194] [0173] 사용될 수 있는 효소적으로 활성인 독소 및 그들의 단편으로는 디프테리아 A 체인, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 체인 (수도모나스 아에루기노사로부터 획득), 리신 A 체인, 아브린 A 체인, 모데신

A 체인, 알파-사르신, 알레우리츠 포르디이 단백질들, 디아틴 단백질들, 피토라카 아메리카나 단백질들 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 차란티아 저해제, 큐르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 저해제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테킨을 들 수 있다. 예컨대, 1993년 10월 28일자 공개된 WO 제93/21232호를 참고한다.

[0195] [0174] 본 발명은 항체와 핵산 분해 활성을 가지는 화합물 (예컨대, 리보뉴클리에이즈 또는 디옥시리보뉴클리에이즈; DNase 등의 DNA 엔도뉴클리에이즈) 간에 형성된 ADC도 역시 고려한다.

[0196] [0175] 종양의 선택적인 제거를 위하여, 항체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소를 방사능 컨쥬게이트된 항체를 형성하기 위하여 사용될 수 있다. 예로는 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위원소를 들 수 있다. 컨쥬게이트를 검출용으로 사용한다면, 신티그래프 검사용 방사성 원자를 포함할 수 있으며, 예컨대 tc^{99m} 또는 I^{123}, 또는 핵자기공명 (NMR) 이미징 (자기공명 이미징으로도 알려져 있다, MRI)용 스핀 표지, 예컨대 이요딘-123, 이요딘-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 갈돌리늄, 망간 또는 철 등이다.

[0197] [0176] 공지의 방법으로 방사성 또는 기타 표지가 컨쥬게이트에 포함될 수 있다. 예컨대, 적절한 아미노산 전구체를 포함하여 사용하는, 예컨대 수소 대신 불소-19를 사용하는 화학적 아미노산 합성에 의하여 펩타이드를 생합성하거나 합성할 수 있다. tc^{99m} 또는 I^{123}, Re^{186}, Re^{188} 및 In^{111} 등의 표지가 시스테인 잔기를 통하여 펩타이드에 부착될 수 있다. 이트리움-90은 리신 잔기를 통하여 부착될 수 있다. IODOGEN 법 [Fraker 외 (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57]이 이요딘-123을 포함시키는 데 사용될 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal,CRC Press 1989)]에 다른 방법들이 자세히 개시되어 있다.

[0198] <u>IV.) 191P4D12에 결합하는 항체-약물 컨쥬게이트 화합물</u>

[0199] [0177] 본 발명은 특히 약물의 표적 전달을 위한 항체-약물 컨쥬게이트를 제공한다. 본 발명의 발명자들은 항체-약물 컨쥬게이트가 191P4D12를 발현하는 세포에 대하여 강력한 세포 독성 및/또는 세포 증식 억제 활성을 가진다는 것을 발견하였다. 상기 항체-약물 컨쥬게이트 화합물들은 하나 이상의 약물 유닛과 공유 결합으로 연결된 항체 유닛을 포함한다. 약물 유닛은 직접적으로 또는 링커 유닛 (-LU-)를 통하여 공유적으로 연결된다.

[0200] [0178] 몇 가지 실시상태에 있어서, 상기 항체 약물 컨쥬게이트 화합물은 다음의 화학식을 가진다.

[0201] $L-(LU-D)_p$ (I)

[0202] 또는 이들의 약학적 허용염 또는 용매화물;

[0203] 여기서 L은 항체 유닛, 예컨대 본 발명의 191P4D12 MAb이고, (LU-D)는 링커 유닛-약물 유닛 모이어티이고,

[0204] 여기서 LU-는 링커 유닛이고, -D는 표적 세포에 대하여 세포 증식 억제 활성 또는 세포 독성 활성을 가지는 약물 유닛이고,

[0205] p는 정수 1 내지 20이다.

[0206] [0179] 몇 가지 실시상태에 있어서, p는 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 또는 1 내지 2의 범위이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, p는 2 내지 10, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4 또는 2 내지 3의 범위이다. 다른 실시상태에 있어서, p는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, p는 2 또는 4이다.

[0207] [0180] 몇 가지 실시상태에 있어서, 항체 약물 컨쥬게이트 화합물은 다음의 화학식을 가진다.

[0208] $L-(A_a-W_w-Y_y-D)_p$ (II)

[0209] 또는 이들의 약학적 허용염 또는 용매화물; 여기서

[0210] L은 항체 유닛, 예컨대 본 발명의 191P4D12 MAb이고;

[0211] $-A_a-W_w-Y_y-$는 링커 유닛 (LU)이고, 여기서

[0212] -A-는 스트레쳐 유닛 (Stretcher unit)이고,

[0213] a는 0 또는 1,

[0214] 각각의 -W-는 독립적으로 아미노산 유닛이고,

[0215] w는 0 내지 12 범위의 정수이고,

[0216] -Y-는 자기 희생적(self-immolative) 스페이서 유닛이고,

[0217] y는 0, 1 또는 2이며;

[0218] -D는 표적 세포에 대하여 세포 증식 억제 활성 또는 세포 독성 활성을 가지는 약물 유닛이고,

[0219] p는 정수 1 내지 20이다.

[0220] [0181] 몇 가지 실시상태에 있어서, a는 0 또는 1, w는 0 또는 1, 및 y는 0, 1 또는 2이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, a는 0 또는 1, w는 0 또는 1, 및 y는 0 또는 1이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, p는 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 또는 1 내지 2의 범위이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, p는 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4 또는 2 내지 3의 범위이다. 다른 실시상태에 있어서, p는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, p는 2 또는 4이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, w가 0이 아닌 경우, y는 1 또는 2이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, w가 1 내지 12인 경우, y는 1 또는 2이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, w는 2 내지 12이고 y는 1 또는 2이다. 몇 가지 실시상태에 있어서, a는 1이고 w 및 y는 0이다.

[0221] [0182] 다수의 항체들을 포함하는 조성물용으로, 약물량 (drug loading)은 p, 항체당 평균 약물 분자수로 나타낸다. 약물량은 항체당 1 내지 20 약물 (drugs, (D))의 범위이다. 컨쥬게이션 반응의 제조에 있어서 항체당 평균 약물 수는 질량 분광법, ELISA 시험 및 HPLC 등의 종래 수단에 의하여 파악될 수 있다. p에 관하여도 항체-약물 컨쥬게이트의 정량적 분포를 역시 결정할 수 있다. 몇 가지 예로서, 다른 약물량을 가지는 항체-약물 컨쥬게이트로부터 특정 p값을 가지는 균질 항체-약물 컨쥬게이트를 단리, 정제 및 특징화하는 것은 역상 HPLC 또는 전기 영동 방법으로 이루어질 수 있다. 예시적인 실시상태에 있어서, p는 2 내지 8이다.

[0222] [0183] 항체-약물 컨쥬게이트 화합물의 생성은 숙련된 기술자에게 알려진 임의의 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 간단히, 항체-약물 컨쥬게이트 화합물은 항체 유닛으로서 191P4D12 MAb, 약물 및 필요에 따라 약물과 결합제를 연결하는 링커를 포함한다. 양호한 실시상태에 있어서, 항체는 전술된 항체 지정 Ha22-2(2,4)6.1의 헤비 체인 및 라이트 체인 변이 부분을 포함하는 191P4D12 MAb이다. 더욱 양호한 실시상태에 있어서, 전술된 항체 지정 Ha22-2(2,4)6.1의 헤비 체인 및 라이트 체인을 포함하는 191P4D12 MAb이다. 다양한 많은 반응을, 약물 및/또는 링커와 결합제의 공유적 결합에 이용할 수 있다. 이것은 종종 결합제의 아미노산 잔기의 반응에 의하여 이루어질 수 있으며, 예컨대 항체 분자, 예컨대 리신의 아민기, 글루타민산 및 아스파르트산의 자유 카르복실산기, 시스테인의 술프하이드릴기 및 방향족 아미노산의 다양한 모이어티 등이다. 공유 결합에 가장 흔하게 사용되는 불특정 방법 중 하나는 화합물의 카르복시기 (또는 아미노기)를 항체의 아미노기 (또는 카르복시기)와 연결시키는 카르보디이미드 반응이다. 더욱이, 두 가지 기능성 제제들, 예컨대 디알데히드 또는 이미도에스테르는 화합물의 아미노기와 항체 분자의 아미노기를 연결시키는 데 사용된다. 쉬프 (Schiff) 염기 반응도 역시 약물과 결합제의 부착에 이용된다. 이 방법은 글리콜 또는 하이드록시기를 함유하는 약물의 과요오드산염 산화를 수반하고, 그러므로 알데히드를 형성하여 결합제와 뒤이어 반응하게 된다. 결합은 결합제의 아미노기를 가지는 쉬프 베이스의 형성을 통하여 일어난다. 이소티아사이아네이트도 역시 약물과 결합제의 공유적 결합을 위한 커플링제로 사용될 수 있다. 기타의 방법들이 본 발명의 범위 내에서 숙련된 기술자에게 알려져 있다.

[0223] [0184] 특정한 실시상태에 있어서, 링커의 전구체인 매개자는 적절한 조건 하에서 약물과 반응한다. 특정한 실시상태에 있어서, 반응기는 약물상에서 및/또는 매개자에서 사용된다. 그 후 약물과 매개자 간의 반응 산물, 또는 유도된 약물은 적절한 조건 하에서 191P4D12 MAb와 반응한다.

[0224] [0185] 항체-약물 컨쥬게이트 화합물의 특정 유닛 각각은 본 명세서에서 더욱 자세히 기술하고 있다. 예시적인 링커 유닛, 스트레쳐 유닛, 아미노산 유닛, 자기 희생적 스페이서 유닛 및 약물 유닛의 합성 및 구조도 역시 U.S. 공개 특허출원 제2003-0083263호, 제2005-0238649호 및 제2005-0009751호에 기재되어 있고, 모든 목적을 위하여 본 명세서에 참조로 그 전체가 포함된다.

[0225] V.) 링커 유닛

[0226] [0186] 통상적으로, 항체-약물 컨쥬게이트 화합물은 약물 유닛과 항체 유닛 간에 링커 유닛을 포함한다. 몇 가

지 실시상태에 있어서, 링커는 세포 내 조건 하에서는 분리될 수 있어서, 링커의 분리에 의하여 세포 내 환경에서 항체로부터 약물 유닛을 방출한다. 또 다른 실시상태에 있어서, 링커 유닛은 분리될 수 없고 약물은, 예컨대 항체 분해에 의하여 방출된다.

[0227] [0187] 몇 가지 실시 상태에 있어서, 링커는 세포 내 환경 (예컨대, 리소좀 또는 엔도좀 또는 포낭)에 존재하는 분리제에 의하여 분리될 수 있다. 링커는, 예컨대 세포 내 펩타이드분해효소 또는 단백질 분해 효소에 의하여 분해되는 펩타이드 링커는 리소좀의 또는 엔도좀의 단백질 분해 효소를 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 몇 가지 실시 상태에 있어서, 펩타이드 링커는 2 이상의 아미노산 길이 또는 3 이상의 아미노산 길이이다. 분리제는 카텝신 B 및 D 및 플라즈민을 포함할 수 있고, 이들 모두는 디펩타이드 약물 유도체들을 가수분해하는 것으로 알려져 있어 표적 세포 안으로 활성 약물을 방출하는 결과를 나타낸다 (예컨대, Dubowchik 및 Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123 참고). 191P4D12를 발현하는 세포에 존재하는 효소에 의하여 분해되는 펩타이드 링커가 가장 일반적이다. 예컨대, 암 조직에서 다량 발현되는 티올 의존성 단백질 분해 효소 카텝신-B에 의하여 분해될 수 있는 펩타이드 링커가 사용될 수 있다 (예컨대, Phe-Leu 또는 Gly-Phe-Leu-Gly 링커 (SEQ ID NO: 9)). 이러한 링커들의 다른 예가, 예컨대 U.S. 특허 제6,214,345호에 개시되어 있고, 모든 목적을 위하여 전체가 본 명세서에 포함된다. 특정 실시 상태에 있어서, 세포 내 단백질 분해 효소에 의하여 분해될 수 있는 펩타이드 링커는 Val-Cit 링커 또는 Phe-Lys 링커 (예컨대, U.S. 특허 제6,214,345호, 여기에는 Val-Cit 링커를 포함하는 독소루비신의 합성이 개시되어 있다)이다. 치료제가 세포 내의 단백질 분해에 의하여 방출되는 경우의 한 가지 장점은 컨쥬게이트시 일반적으로 약독성이고 통상 컨쥬게이트의 혈청 안정성이 높다는 점이다.

[0228] [0188] 다른 실시상태에서, 절단성 링커는 pH 민감성, 즉, 어떤 pH 값에서 가수분해에 민감하다. 전형적으로, pH 민감성 링커는 산성 조건 하에서 가수분해가능하다. 예를 들면, 리소좀에서 가수분해될 수 있는 산-불안정 링커 (예를 들면, 히드라존, 세미카바존, 티오세미카바존, 시스-아코니트 아미드, 오르토에스테르, 아세탈, 케탈 등)이 사용될 수 있다 (예를 들면, 미국특허 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661.를 참조) 그러한 링커들은 혈액과 같은 중성 pH 조건 하에서 상대적으로 안정하지만, 리소좀의 근사 pH인 pH 5.5 미만 또는 5.0에서는 불안정하다. 어떤 실시상태에서는, 가수분해가능한 링커는 티오에테르 링커 (예를 들면, 아실히드라존 결합을 통해 치료제에 결합된 티오에테르)이다 (미국특허 5,622,929를 참조할 것).

[0229] [0189] 또 다른 실시상태에서, 상기 링커는 환원 조건 하에서 절단가능하다 (즉, 디설파이드 링커). SATA (N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트), SPDP (N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트), SPDB (N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)부티레이트) 및 SMPT (N-숙신이미딜-옥시카보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)톨루엔), SPDB 및 SMPT를 이용하여 형성될 수 있는 것을 포함하는 다양한 디설파이드 링커가 업계에 알려져 있다 (예를 들면, Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. 미국특허 4,880,935.를 참조)

[0230] [0190] 또 다른 특정 실시상태에서, 상기 링커는 말로네이트 링커 (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), 말레이미도벤조일 링커 (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304) 또는 3'N-아미드 유사체 (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12)이다.

[0231] [0191] 또 다른 실시상태에서, 상기 링커 유닛은 절단가능하지 않고, 약물은 항체 붕괴에 의해 방출된다 (그 전체가 여기에 참고로서 포함되는 미국 공개 2005/0238649를 참조할 것).

[0232] [0192] 전형적으로, 링커는 실질적으로 세포외 환경에 민감하지 않다. 여기서 사용되는 바와 같이, 링커의 맥락에서 "세포외 환경에 실질적으로 민감하지 않다"는 것은 항체-약물 컨쥬게이트 화합물이 세포외 환경 (예를 들면 혈장)에 존재할 때, 샘플 항체-약물 컨쥬게이트 화합물에서 20% 이하, 전형적으로 15% 이하, 더욱 전형적으로는 10% 이하, 더욱 더 전형적으로는 5% 이하, 3% 이하 또는 1% 이하의 링커가 절단된다는 의미이다. 링커가 세포외 환경에 민감한지 여부는 예를 들면, 소정 시간 간격으로 (예를 들면 2, 4, 8, 16 또는 24시간) 항체-약물 컨쥬게이트 화합물을 혈장과 함께 배양하여 혈장 내에 존재하는 자유 약물의 양을 정량함으로써 결정될 수 있다.

[0233] [0193] 다른, 상호 비배타적인 실시상태에서, 링커는 세포 내재화를 증진한다. 어떤 실시상태에서는, 링커는 치료제와 컨쥬게이트될 때 (즉, 여기서 설명된 바와 같이 항체-약물 컨쥬게이트 화합물의 링커-치료제 부분의 환경에서), 세포 내재화를 촉진한다. 또 다른 실시상태에서, 링커는 아우리스타틴 화합물과 191P4D12 MAb 양자에

컨쥬게이트될 때 세포 내재화를 촉진한다.

[0234] [0194] 본 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있는 다양한 예시적인 링커들이 WO 2004-010957, 미국특허 공개 2006/0074008, 2005/0238649, 및 2006/0024317에 설명된다(이들 각각은 그 전체가 여기에 참고로서 포함된다).

[0235] [0195] "링커 유닛" (LU)은 약물 유닛과 항체 유닛을 링크하여 항체-약물 컨쥬게이트 화합물을 형성하는데 사용될 수 있는 이기능성 화합물이다. 몇몇 실시상태에서, 링커 유닛은 하기의 화학식을 갖는다.

[0236] $-A_a-W_w-Y_y-$

[0237] 여기서, -A-는 스트레처 유닛이고,

[0238] a는 0 또는 1,

[0239] 각각의 -W- 는 독립적으로 아미노산 유닛이고,

[0240] w는 0~12의 정수이고,

[0241] -Y-는 자가희생적 스페이서 유닛이고,

[0242] y는 0, 1 또는 2이다.

[0243] [0196] 몇가지 실시상태에서, a는 0 또는 1, w는 0 또는 1이고, y는 0, 1 또는 2이다. 몇가지 실시상태서, a는 0 또는 1, w는 0 또는 1이고 y는 0 또는 1이다. 몇가지 실시상태서, w가 1 내지 12이면, y는 1 또는 2이다. 몇가지 실시상태에서, w는 2 내지 12이고 y는 1 또는 2이다. 몇가지 실시상태서, a는 1이고 w 및 y는 0이다.

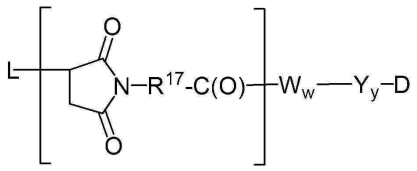
[0244] VI.) 스트렛쳐 유닛

[0245] [0197] 스트렛쳐 유닛(A)는 존재할 경우, 항체 유닛을 아미노산 유닛(-W-)(존재할 경우)에, 스페이서 유닛(-Y-)(존재할 경우)에, 결합시킬 수 있으며; 또는 약물 유닛(-D)에 결합시킬 수 있다. 191P4D12 MAb에 존재할 수 있는 유용한 관능기 (예컨대 Ha22-2(2,4)6.1)의 비제한적인 예로는 천연의 것이거나 또는 화학 합성된 것이거나, 술프히드릴, 아미노, 히드록실, 탄수화물의 아노머형 히드록실기 및 카르복실을 들 수 있다. 적절한 관능기는 술프히드릴과 아미노이다. 일례에서, 술프히드릴기는 191P4D12 MAb의 분자내 디술파이드 결합을 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 또 다른 실시상태에서, 술프히드릴기는 191P4D12 MAb의 라이신 부분의 아미노기를 2-이미노티올란(Traut 시약) 또는 다른 술프히드릴 발생 시약과 반응시킴으로써 만들 수 있다. 특정 실시상태에서, 191P4D12 MAb는 재조합 항체이며 하나 이상의 라이신을 보유하기 위해 조작될 수 있다. 또 다른 특정 실시상태에서, 재조합 191P4D12 MAb는 부가적인 술프히드릴기를 보유하기 위해, (예컨대 부가적인 시스테인) 조작될 수 있다.

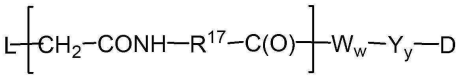
[0246] [0198] 한가지 실시상태에서, 스트렛쳐 유닛은 항체 유닛의 황 원자와 결합을 형성한다. 황 원자는 항체의 술프히드릴기로부터 유래할 수 있다. 이러한 실시상태의 대표적인 스트렛쳐 유닛은 화학식 IIIa 및 IIIb의 네모난 괄호(대괄호) 안에 그려진 것으로서, 여기서, L-, -W-, -Y-, -D, w 및 y는 상기 정의된 바와 같고, R^{17}은 $-C_1-C_{10}$ 알킬렌-, $-C_1-C_{10}$ 알케닐렌-, $-C_1-C_{10}$ 알키닐렌-, 카보시클로-, $-O-(C_1-C_8$ 알킬렌)-, $O-(C_1-C_8$ 알케닐렌)-, $-O-(C_1-C_8$ 알키닐렌)-, -아릴렌-, $-C_1-C_{10}$ 알킬렌-아릴렌-, $-C_2-C_{10}$ 알케닐렌-아릴렌, $-C_2-C_{10}$ 알키닐렌-아릴렌, -아릴렌-C_1-C_{10} 알킬렌-, -아릴렌-C_2-C_{10} 알케닐렌-, -아릴렌-C_2-C_{10} 알키닐렌-, $-C_1-C_{10}$ 알킬렌-(카보시클로)-, $-C_2-C_{10}$ 알케닐렌-(카보시클로)-, $-C_2-C_{10}$ 알키닐렌-(카보시클로)-, -(카보시클로)-C_1-C_{10} 알킬렌-, -(카보시클로)-C_2-C_{10} 알케닐렌-, -(카보시클로)-C_2-C_{10} 알키닐렌, -헤테로시클로-, $-C_1-C_{10}$ 알킬렌-(헤테로시클로)-, $-C_2-C_{10}$ 알케닐렌-(헤테로시클로)-, $-C_2-C_{10}$ 알키닐렌-(헤테로시클로)-, -(헤테로시클로)-C_1-C_{10} 알킬렌-, -(헤테로시클로)-C_2-C_{10} 알케닐렌-, -(헤테로시클로)-C_1-C_{10} 알키닐렌-, $-(CH_2CH_2O)_r-$, 또는 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$로부터 선택되며, r은 1-10의 정수이고, 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카보사이클, 카보시클로, 헤테로시클로, 및 아릴렌 래디칼은 단독으로든 또는 다른 기의 일부의 형태이든, 치환될 수 있다. 몇몇 실시상태에서, 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌,알키닐렌, 아릴, 카보사이클, 카보시클로, 헤테로시클로, 및 아릴렌 래디칼은, 단독으로든 다른 기의 일부의 형태이든, 치환되지 않는다. 몇몇 실시상태에서, R^{17}은 $-C_1-C_{10}$ 알킬렌-, - 카보시클로-, $-O-(C_1-C_8$ 알킬렌)-, -아릴렌-, $-C_1-C_{10}$ 알킬렌-아릴렌-, -아릴렌-C_1-C_{10} 알킬렌-,

$-C_1-C_{10}$ 알킬렌-(카보시클로)-, -(카보시클로)-C_1-C_{10} 알킬렌-, $-C_3-C_8$ 헤테로시클로-, $-C_1-C_{10}$ 알킬렌-(헤테로시클로)-, -(헤테로시클로)-C_1-C_{10} 알킬렌-, $-(CH_2CH_2O)_r-$, 및 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$로부터 선택되고; r은 1-10의 정수이며, 여기서 상기 알킬렌기는 치환되지 않으며, 나머지 기들은 치환되어도 좋다.

[0247] [0199] 모든 예시적인 실시상태 전반에 걸쳐서, 굳이 명시되지 않은 경우에도, 항체 하나에 1 내지 20개의 약물 부분(drug moieties)이 결합될 수 있는 것으로 이해되어야 한다 (p=1-20).

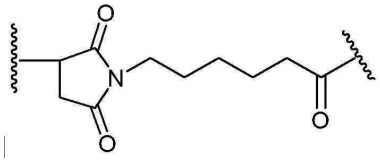
[0248] 

IIIa

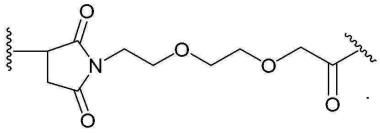
[0249] 

IIIb

[0250] [0200] 스트렛쳐 유닛의 한가지 예는 R^{17}은 $-(CH_2)_5-$인 화학식 IIIa이다.

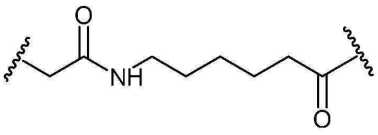
[0251] 

[0252] [0201] 스트렛쳐 유닛의 또 다른 예는 R^{17}이 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$이고; r은 2인 화학식 IIIa이다:

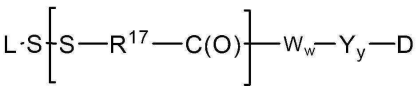
[0253] 

[0254] [0202] 스트렛쳐 유닛의 한가지 예는R^{17}이 -아릴렌- 또는 아릴렌-C_1-C_{10} 알킬렌-인 화학식 IIIa이다. 몇가지 실시상태에서, 아릴기는 비치환 페닐기이다.

[0255] [0203] 또 다른 스트렛쳐 유닛의 예는 R^{17}이 $-(CH_2)_5-$인 화학식 IIIb이다:

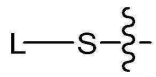
[0256] 

[0257] [0204] 특정 실시상태에서, 스트렛쳐 유닛은 항체 유닛의 황 원자와 스트렛쳐 유닛의 황 원자 사이의 디술파이드 결합을 통해 항체 유닛에 결합된다. 이 실시상태의 대표적인 스트렛쳐 유닛은 화학식 IV의 대괄호 안에 그려져 있으며, 여기서, R^{17}, L-, -W-, -Y-, -D, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다.

[0258] 

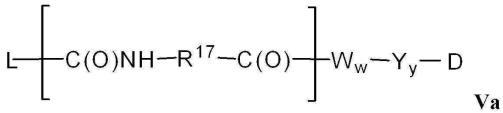
IV

[0259] [0205] 본 발명 전반에 걸쳐, 하기 화학식의 S 부분은 달리 언급하지 않는 한, 항체 유닛의 황 원자를 가리키는 것으로 이해되어야 한다.

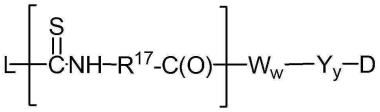


[0260]

[0261] [0206] 또 다른 실시상태에서, 스트렛쳐 유닛은 항체의 일차 또는 이차 아미노기와 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위를 함유한다. 이러한 반응성 부위의 비제한적인 예로는 활성화된 에스테르, 예컨대 숙신이미드 에스테르, 4-니트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 무수물, 산 클로라이드, 술포닐 클로라이드, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 들 수 있다. 이 실시상태의 대표적인 스트렛쳐 유닛은 화학식 Va와 Vb에서 대괄호 안에 표시된 것이며, 여기서 $-R^{17}-$, L-, -W-, -Y-, -D, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다;

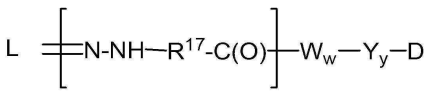


[0262] **Va**

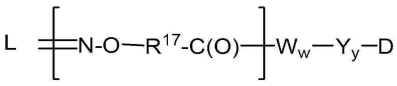


[0263] **Vb**

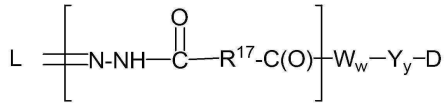
[0264] [0207] 몇가지 실시상태에서, 스트렛쳐 유닛은 항체에 존재할 수 있는 변형된 탄수화물의 (-CHO)기와 반응하는 반응성 부위를 함유한다. 예컨대, 탄수화물은 소듐 페리오데이트와 같은 시약을 이용하여 온화하게 산화시킨 다음 이 산화된 탄수화물의 결과적인 (-CHO) 유닛을 관능기, 예컨대 히드라지드, 옥심, 일차 또는 이차 아민, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카복실레이트 및 예컨대 Kaneko *외*, 1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41에 설명된 바와 같은 아릴히드라지드를 함유하는 스트렛쳐 유닛과 축합시킬 수 있다. 이러한 실시상태의 대표적인 스트렛쳐 유닛은 화학식 VIa, VIb, VIc의 대괄호 내에 도시되어 잇으며, 여기서 $-R^{17}-$, L-, -W-, -Y-, -D, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다.



[0265] **VIa**



[0266] **VIb**

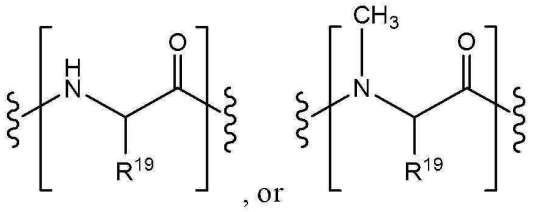


[0267] **VIc**

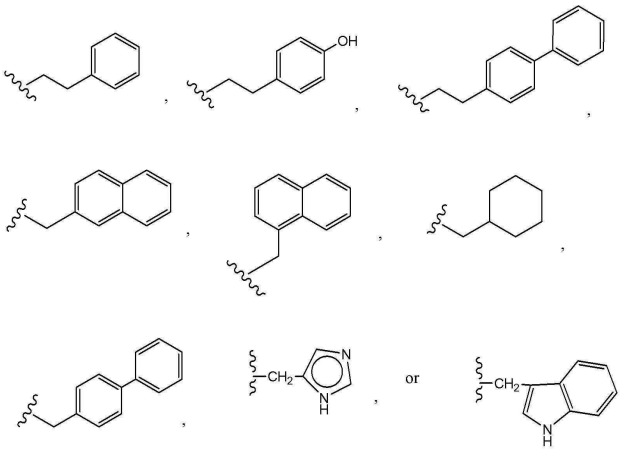
[0268] VII.) 아미노산 유닛

[0269] [0208] 아미노산 유닛(-W-)은 존재할 경우, 스트렛쳐 유닛을 스페이서 유닛(스페이서 유닛이 존재하는 경우)에 결합시키고, 스트렛쳐 유닛을 약물 유닛에 결합시키며 (스페이서 유닛이 부재하는 경우), 항체 유닛을 약물 유닛에 결합시킨다(스트렛쳐 유닛과 스페이서 유닛이 부재할 경우).

[0270] [0209] W_w- 는 예컨대, 모노펩타이드, 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드, 펜타펩타이드, 헥사펩타이드, 헵타펩타이드, 옥타펩타이드, 노나펩타이드, 데카펩타이드, 운데카펩타이드 또는 도데카펩타이드 유닛일 수 있다. 각각의 -W- 유닛은 독립적으로 아래 화학을 가지며, w는 0 내지 12의 정수이다.

[0271] 

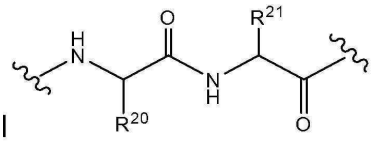
[0272] 식 중, R^{19}는 수소, 메틸, 이소프로필, 이소부틸, *sec*-부틸, 벤질, *p*-히드록시벤질, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-피리딜메틸-, 3-피리딜메틸-, 4-피리딜메틸-, 페닐, 시클로헥실,

[0273] 

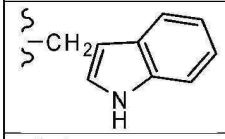
[0274] 이다.

[0275] [0210] 몇가지 실시상태에서, 아미노산 유닛은 암 또는 종양 관련 프로테아제를 비롯한 1종 이상의 효소에 의해 효소적으로 절단되어 약물 유닛 (-D)를 방출하며 이 약물 유닛은 일 실시상태에서 방출시 생체내에서 양성자화되어 약물 (D)를 제공하게 된다.

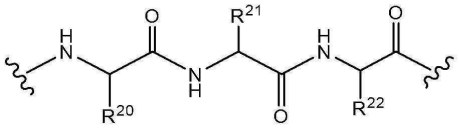
[0276] [0211] 몇가지 실시상태에서, 아미노산 유닛은 천연 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또 다른 실시상태에서, 아미노산 유닛은 비천연 아미노산으로 이루어질 수 있다. 예시적인 Ww 유닛은 화학식 (VII)-(IX)로 표시된다:

[0277]  **(VII)**

[0278] 식 중 중 R^{20} 및 R^{21}는 다음과 같다:

R^{20}	R^{21}
벤질	$(CH_2)_4NH_2$;
메틸	$(CH_2)_4NH_2$;
이소프로필	$(CH_2)_4NH_2$;
이소프로필	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
벤질	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
이소부틸	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
sec-부틸	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
벤질	메틸;
벤질	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

[0279]



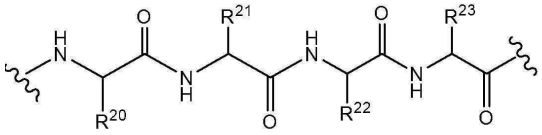
(VIII)

[0280]

[0281] 식 중, R^{20}, R^{21} 및 R^{22} 는 다음과 같다:

R^{20}	R^{21}	R^{22}
벤질	벤질	$(CH_2)_4NH_2$;
이소프로필	벤질	$(CH_2)_4NH_2$; 및
H	벤질	$(CH_2)_4NH_2$;

[0282]



(IX)

[0283]

[0284] 식 중, R^{20}, R^{21}, R^{22} 및 R^{23} 는 다음과 같다:

R^{20}	R^{21}	R^{22}	R^{23}
H	벤질	이소부틸	H; 및
메틸	이소부틸	메틸	이소부틸.

[0285]

[0286] [0212] 아미노산 유닛의 비제한적인 예로는 화학식 VII의 유닛을 들 수 있고, 여기서: R^{20}은 벤질이고 R^{21}은 $-(CH_2)_4NH_2$이며; R^{20}은 이소프로필이고 R^{21}은 $-(CH_2)_4NH_2$이며; 또는 R^{20}은 이소프로필이고 R^{21}은 $-(CH_2)_3NHCONH_2$이다. 또 다른 예시적인 아미노산 유닛은 화학식 VIII의 유닛인데, 여기서 R^{20}은 벤질, R^{21}은 벤질이고 R^{22}은 $-(CH_2)_4NH_2$이다.

[0287] [0213] 유용한 $-W_w-$ 유닛을 고안하여 특정 효소, 예컨대 종양관련 프로테아제에 의한 효소적 절단에 의한 이들의 선별능에 알맞게 최적화시킬 수 있다. 한가지 실시상태에서, $-W_w-$ 유닛은 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의해 그의 분해가 촉매되는 것이다.

[0288] [0214] 한가지 실시상태에서, $-W_w-$는 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드 또는 펜타펩타이드이다. R^{19},

R^{20}, R^{21}, R^{22} 또는 R^{23}이 수소가 아닐 경우, R^{19}, R^{20}, R^{21}, R^{22} 또는 R^{23}가 붙어있는 탄소 원자는 키랄 탄소이다.

[0289] [0215] R^{19}, R^{20}, R^{21}, R^{22} 또는 R^{23}이 붙어있는 탄소 원자 각각은 독립적으로(S) 또는 (R) 배열이다.

[0290] [0216] 아미노산 유닛의 한가지 구체예에서, 아미노산 유닛은 발린-시트룰린(vc 또는 val-cit)이다. 또 다른 구체예에서, 아미노산 유닛은 페닐알라닌-라이신 (즉, fk)이다. 아미노산 유닛의 또 다른 구체예에서, 아미노산 유닛은 N-메틸발린-시트룰린이다. 또 다른 구체예에서, 아미노산 유닛은 5-아미노발레르산, 호모페닐알라닌 라이신, 테트라이소퀴놀린카르복실레이트 라이신, 시클로헥실알라닌 라이신, 이소네페코트산(isonepecotic acid) 라이신, 베타-알라닌 라이신, 글라이신 세린 발린 글루타민 및 이소네페코트산이다.

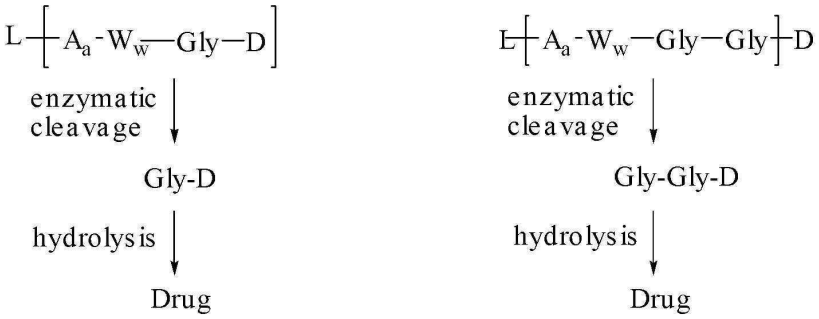
[0291] VIII.) 스페이서 유닛

[0292] [0217] 스페이서 유닛 (-Y-)은 존재할 경우, 아미노산 유닛을 약물 유닛에 결합시킨다(아미노산 유닛이 존재할 경우). 또는 스페이서 유닛은 스트렛쳐 유닛을 약물 유닛에 결합시킨다(아미노산 유닛이 부재할 경우). 스페이서 유닛은 또한 약물 유닛을 항체 유닛에 결합시키기도 한다(아미노산 유닛과 스트렛쳐 유닛이 부재할 경우).

[0293] [0218] 스페이서 유닛에는 일반적으로 2가지 종류가 있는데: 비자기 희생적(non self-immolative) 또는 자기 희생적(self-immolative)가 그것이다. 비자기 희생적 스페이서 유닛은, 스페이서 유닛의 전부 또는 일부가 항체-약물 컨쥬게이트로부터의 아미노산 유닛의 분해, 특히 효소적 분해 후에도 약물 부분에 결합된 채로 남아있는 것이다. 비자기 희생적 스페이서 유닛의 예로는 (글라이신-글라이신) 스페이서 유닛 및 글라이신 스페이서 유닛 (두 가지 모두 반응식 1에 도시함)(후술됨)을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 글라이신-글라이신 스페이서 유닛 또는 글라이신 스페이서 유닛을 함유하는 컨쥬게이트가 효소(예컨대, 종양-세포 관련-프로테아제, 암-세포-관련 프로테아제 또는 임파구-관련 프로테아제)를 통하여 효소적으로 분해되는 경우, 글라이신-글라이신-약물 부분 또는 글라이신-약물 부분이 L-Aa-Ww-로부터 떨어져 나간다. 한가지 구체예에서, 표적 세포 내에서 독립적인 가수분해 반응이 일어나서, 글라이신-약물 부분 결합을 절단하여 약물로부터 방출시킨다.

[0294] [0219] 반응식 1

[0295]



[0296] [0220] 몇가지 실시상태에서, 비자기 희생적 스페이서 유닛 (-Y-)은 -Gly-이다. 몇가지 실시상태에서, 비자기 희생적 스페이서 유닛 (-Y-)은 -Gly-Gly-이다.

[0297] [0221] 한가지 실시상태에서, 스페이서 유닛이 없는 (y=0) 약물-링커 컨쥬게이트, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화합물이 제공된다.

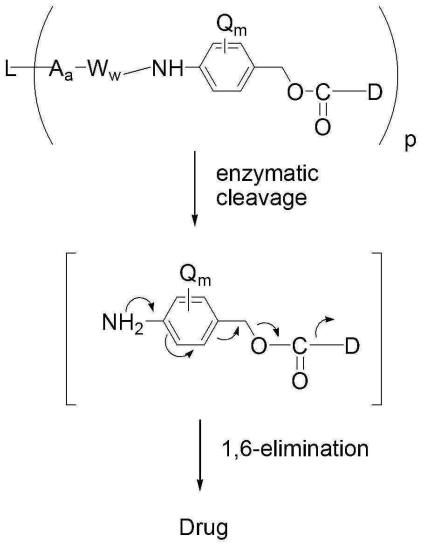
[0298] [0222] 다른 한편으로, 자기 희생적 스페이서 유닛을 함유하는 컨쥬게이트는 -D를 방출할 수 있다. 본 발명에서 "자기 희생적 스페이서"라는 용어는 2개의 이격된 화학 부분들을 함께 공유적으로 결합시켜 안정한 3부분 (tripartite) 분자를 형성시킬 수 있는 이기능성 화학 부분을 가리킨다. 이것은 제1 부분에 대한 그의 결합이 절단될 경우, 제2의 화학 부분으로부터 자연적으로 분리될 것이다.

[0299] [0223] 또 다른 실시상태에서, $-Y_y-$는 p-아미노벤질 알코올(PAB) 유닛 (반응식 2 및 3 참조)으로서, 여기서 페닐렌 부분은 Q_m으로 치환되어 있고, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-C_1-C_8$ 알케닐, $-C_1-C_8$ 알키닐, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), $-O-(C_1-C_8$ 알케닐), $-O-(C_1-C_8$ 알키닐), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이며; m은 0 내지 4의 정수이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 단독으로든 또는 다른 기의 일부분으로서건 필요하다면 치환되어도 좋다.

[0300] [0224] 몇가지 실시상태에서, -Y-는 PAB기의 아미노 질소 원자를 통하여 $-W_w-$에 결합되고, 카보네이트, 카바메이트 또는 에테르기를 통하여 -D에 직접 연결된 PAB 기이다. 특정 이론이나 메카니즘에 구애됨이 없이, 반응식

2에는 Toki 외, 2002, *J. Org. Chem.* 67:1866-1872에 설명된 바와 같이 카바메이트 또는 카보네이트기를 통하여 -D에 직접 결합된 PAB기의 약물 방출의 가능한 메카니즘이 도시되어 있다.

[0301] 반응식 2

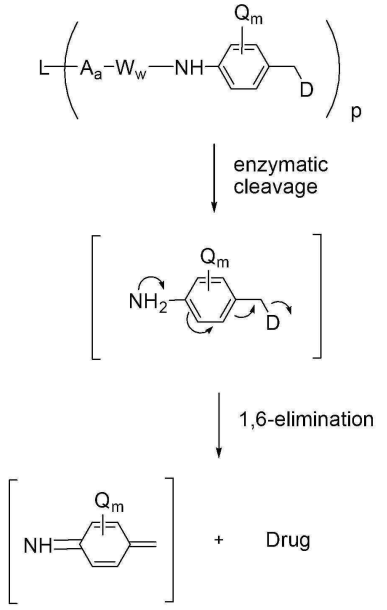


[0302]

[0303] [0225] 반응식 2에서, Q는 -C_1-C_8 알킬, -C_1-C_8 알케닐, -C_1-C_8 알키닐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_1-C_8 알케닐), -O-(C_1-C_8 알키닐), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0 내지 4의 정수이며; p는 1 내지 약 20이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 단독으로든 또는 다른 기의 일부로서든 필요하면 치환될 수 있다.

[0304] [0226] 특정 이론이나 메카니즘에 구애됨이 없이, 반응식 3에는 에테르 또는 아민 결합을 경유하여 -D에 직접 부착된 PAB기의 가능한 약물 방출 메카니즘이 도시되어 있는데, 여기서 D는 약물 유닛의 일부인 산소 또는 질소기를 포함하는 것이다.

[0305] 반응식 3



[0306]

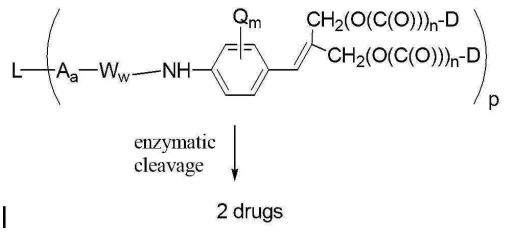
[0307] [0227] 반응식 3에서 Q는 -C_1-C_8 알킬, -C_1-C_8 알케닐, -C_1-C_8 알키닐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_1-C_8 알케닐), -O-(C_1-C_8 알키닐), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0 내지 4의 정수이며; p는 1 내지 약 20의 정수이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 단독으로든 다른 기의 일부로서든, 필요하다면 치환될 수도 있다.

[0308] [0228] 자기 희생적 스페이서의 비제한적인 또 다른 예로는 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체(Hay 외, 1999,

Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) 및 오르토 또는 파라-아미노벤질아세탈처럼, PAB기와 전자적으로 유사한 방향족 화합물을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 스페이서는 치환 및 비치환 4-아미노부티르산 아미드(Rodrigues *외*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223), 적절히 치환된 바이시클로[2.2.1] 및 바이시클로[2.2.2] 고리계(Storm *외*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) 및 2-아미노페닐프로피온산 아미드 (Amsberry *외*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867)와 같이 아미드 결합 가수분해에 의해 고리화를 수행하는데 이용될 수 있다. 글라이신의 α-위치에서 치환된 아민-함유 약물의 제거(Kingsbury *외*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447) 역시도 자기 희생적 스페이서의 예가 된다.

[0309] [0229] 한가지 실시상태에서, 스페이서 유닛은 반응식 4에 도시된 바와 같은 분지상 비스(히드록시메틸)-스티렌(BHMS) 유닛으로서, 이것은 복수개의 약물을 병합 및 방출하는데 이용될 수 있다.

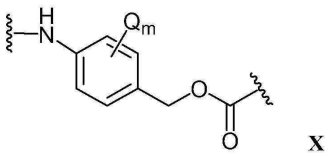
[0310] 반응식 4

[0311] 

[0312] [0230] 반응식 4에서, Q는 -C_1-C_8 알킬, -C_1-C_8 알케닐, -C_1-C_8 알키닐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_1-C_8 알케닐), -O-(C_1-C_8 알키닐), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이며; n은 0 또는 1이고; p는 1 내지 약 20의 정수이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐은 단독으로든 또는 다른기의 일부로서든지 필요하다면 치환될 수 있다.

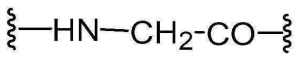
[0313] [0231] 몇 가지 실시상태에서, -D 부분은 동일하다. 또 다른 구체예에서, -D 부분은 서로 다르다.

[0314] [0232] 한 가지 구체예에서, 스페이서 유닛 (-Y_y-)는 화학식 (X)-(XII)로 표시된다:

[0315] 

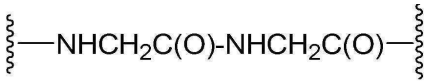
X

[0316] 식 중, Q는 -C_1-C_8 알킬, -C_1-C_8 알케닐, -C_1-C_8 알키닐, -O-(C_1-C_8 알킬), -O-(C_1-C_8 알케닐), -O-(C_1-C_8 알키닐), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0 내지 4의 정수이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐기는 단독으로든 다른 기의 일부로서든 필요하면 치환될 수 있다.

[0317] 

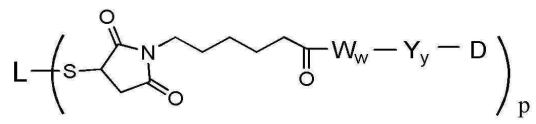
XI

[0318] 및

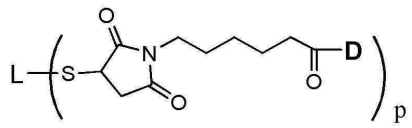
[0319] 

XII.

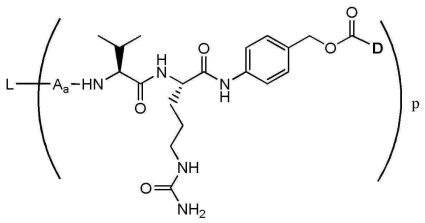
[0320] [0233] 항체-약물 컨쥬게이트 화합물을 함유하는 화학식 I 및 II의 구체예는 다음을 포함할 수 있다:

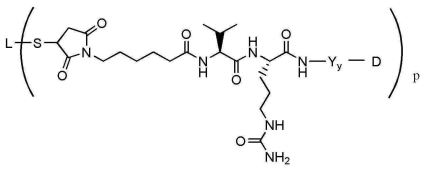
[0321] 

[0322] 식 중 w 및 y는 각각 0, 1 또는 2이고,

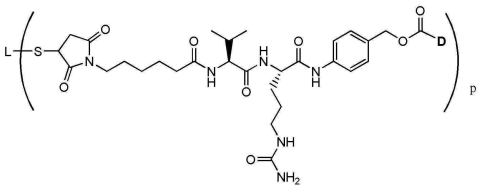
[0323] 

[0324] 식 중 w 및 y는 각각 0,

[0325] 

[0326] 

및

[0327] 

이다.

[0328] IX.) 약물 유닛

[0329] [0234] 약물 부분 (D)는 세포독성제, 세포증식억제제 또는 면역조절제(예컨대 면역억제제) 또는 약물일 수 있다. D는 스페이서 유닛, 아미노산 유닛, 스트렛쳐 유닛 또는 항체 유닛과 결합을 형성할 수 있는 원자를 갖는 약물 유닛(부분:moiety)이다. 몇가지 구체예에서, 약물 유닛 D는 스페이서 유닛과 결합을 형성할 수 있는 질소 원자이다. 본 발명에서 "약물 유닛"과 "약물 부분"이라는 용어는 동의어이며 호환적으로 사용된다.

[0330] [0235] 세포독성제, 세포증식억제제 또는 면역조절제의 유용한 부류의 예로는 항튜뷸린제, DNA 마이너 그루브 바인더, DNA 복제 억제제 및 알킬화제를 들 수 있다.

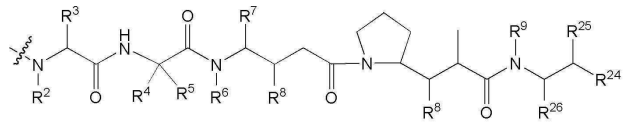
[0331] [0236] 몇가지 구체예에서, 약물은 아우리스타틴 E와 같은 아우리스타틴(기술 분야에서는 돌라스타틴-10의 유도체라고도 알려져 있다) 또는 그의 유도체이다. 아우리스타틴은 예컨대 아우리스타틴 E와 케토산 사이에 형성된 에스테르일 수 있다. 예를 들어, 아우리스타틴 E을 파라아세틸 벤조산 또는 벤조일발레르산과 반응시켜서 각각 AEB와 AEBV를 생산한다. 다른 전형적인 아우리스타틴에는 AFP, MMAF, 및 MMAE가 포함된다. 예시적인 아우리스타틴의 합성방법과 구조가 미국특허출원공개 Nos. 2003-0083263; 국제특허공개 No. WO 04/010957, 국제특허공개 No. WO 02/088172, 및 미국특허 7,498,298, 6,884,869, 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; 및 4,486,414에 설명되어 있으며 이들 문헌은 그 내용 전체가 본 발명에 참조되었다.

[0332] [0237] 아우리스타틴은 미세관(microtubule) 동력학과 핵 및 세포 분할을 간섭하며 항암 활성을 갖는 것으로 나타나다. 아우리스타틴은 튜불린에 결합하여 191P4D12-발현 세포에 대하여 세포독성 또는 세포증식억제 효과를 나타낸다. 아우리스타틴 또는 결과적인 항체-약물 컨쥬게이트가 목적하는 세포주에 대해 세포증식 억제효과 또는 세포독성 효과를 갖는지를 측정하는데 사용가능한 방법이 기술 분야에 여러가지 알려져 있다.

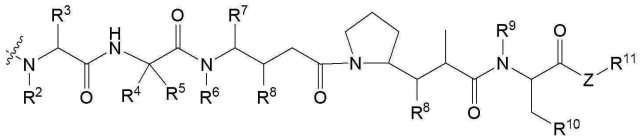
[0333] [0238] 화합물이 튜불린에 결합하는지를 알아내는 방법이 기술 분야에 알려져 있다. 예를 들어, Muller 외, *Anal. Chem* 2006, 78, 4390-4397; Hamel 외, *Molecular Pharmacology*, 1995 47: 965-976; 및 Hamel 외, *The Journal of Biological Chemistry*, 1990 265:28, 17141-17149 참조. 본 발명의 목적상, 튜불린에 대한 화합물의 상대적 친화성을 측정할 수 있다. 본 발명의 몇가지 바람직한 아우리스타틴은 튜불린에 결합하는데 그 결합

친화도는 MMAAE의 튜불린에 대한 결합 친화도의 10분의 1(즉 약한 친화도) 내지, MMAE의 튜불린에 대한 친화도의 10배, 20배 또는 심지어 100배에 달하는 친화도(높은 친화도)에 이르기까지 다양하다.

[0334] [0239] 몇가지 구체예에서, -D는 화학식 $\mathbf{D_E}$ 또는 $\mathbf{D_F}$를 갖는 아우리스타틴:



$\mathbf{D_E}$



$\mathbf{D_F}$

[0335]

[0336] 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화합물이다;

[0337] 식 중, 각각의 위치에서 독립적으로:

[0338] 파선은 결합을 나타내고;

[0339] R^2는 -C_1-C_{20} 알킬, -C_2-C_{20} 알케닐, 또는 -C_2-C_{20} 알키닐이고;

[0340] R^3는 -H, -C_1-C_{20} 알킬, -C_2-C_{20} 알케닐, -C_2-C_{20} 알키닐, -카보사이클, -C_1-C_{20} 알킬렌 (카보사이클), -C_2-C_{20} 알케닐렌(카보사이클), -C_2-C_{20} 알키닐렌(카보사이클), -아릴, -C_1-C_{20} 알킬렌(아릴), -C_2-C_{20} 알케닐렌(아릴), -C_2-C_{20} 알키닐렌(아릴), 헤테로사이클, -C_1-C_{20} 알킬렌(헤테로사이클), -C_2-C_{20} 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 -C_2-C_{20} 알키닐렌(헤테로사이클)이며;

[0341] R^4는 -H, -C_1-C_{20} 알킬, -C_2-C_{20} 알케닐, -C_2-C_{20} 알키닐, 카보사이클, -C_1-C_{20} 알킬렌 (카보사이클), -C_2-C_{20} 알케닐렌(카보사이클), -C_2-C_{20} 알키닐렌(카보사이클), 아릴, -C_1-C_{20} 알킬렌(아릴), -C_2-C_{20} 알케닐렌(아릴), -C_2-C_{20} 알키닐렌(아릴), -헤테로사이클, -C_1-C_{20} 알킬렌(헤테로사이클), -C_2-C_{20} 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 -C_2-C_{20} 알키닐렌(헤테로사이클)이고;

[0342] R^5는 -H 또는 -C_1-C_8 알킬;이며

[0343] 또는 R^4 및 R^5는 함께 카보시클릭 고리를 형성하여 화학식-$(CR^aR^b)_s$- 을 갖는데, 여기서 R^a 및 R^b는 독립적으로 -H, -C_1-C_{20} 알킬, -C_2-C_{20} 알케닐, -C_2-C_{20} 알키닐, 또는 -카보사이클이고 s는 2, 3, 4, 5 또는 6이며,

[0344] R^6는 -H, -C_1-C_{20} 알킬, -C_2-C_{20} 알케닐, 또는 -C_2-C_{20} 알키닐이고;

[0345] R^7은 -H, -C_1-C_{20} 알킬, -C_2-C_{20} 알케닐, -C_2-C_{20} 알키닐, 카보사이클, -C_1-C_{20} 알킬렌 (카보사이클), -C_2-C_{20} 알케닐렌(카보사이클), -C_2-C_{20} 알키닐렌(카보사이클), -아릴, -C_1-C_{20} 알킬렌(아릴), -C_2-C_{20} 알케닐렌(아릴), -C_2-C_{20} 알키닐렌(아릴), 헤테로사이클, -C_1-C_{20} 알킬렌(헤테로사이클), -C_2-C_{20} 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 -C_2-C_{20} 알키닐렌(헤테로사이클)이고;

[0346] 각각의 R^8은 독립적으로 -H, -OH, -C_1-C_{20} 알킬, -C_2-C_{20} 알케닐, -C_2-C_{20} 알키닐, -O-(C_1-C_{20} 알킬), -O-(C_2-C_{20} 알케닐), -O-(C_1-C_{20} 알키닐), 또는 -카보사이클을 나타내고;

[0347] R^9은 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고;

[0348] R^{24}는 -아릴, -헤테로사이클, 또는 -카보사이클이며;

[0349] R^{25}는 -H, C_1-C_{20} 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, -카보사이클, $-O-(C_1-C_{20}$ 알킬), $-O-(C_2-C_{20}$ 알케닐), $-O-(C_2-C_{20}$ 알키닐)이거나, 또는 OR^{18} (여기서 R^{18}은 -H, 히드록실 보호기이거나 또는 OR^{18}이 =O인 경우 직접 결합이며;

[0350] R^{26}은 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐, -아릴, -헤테로사이클, 또는 -카보사이클이고;

[0351] R^{10}은 -아릴 또는 -헤테로사이클이며;

[0352] Z는 -O, -S, -NH, 또는 $-NR^{12}$이고, 여기서 R^{12}는 $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고;

[0353] R^{11}은 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $--C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, -아릴, -헤테로사이클, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$이고;

[0354] m은 1 내지 1000의 정수 또는 m=0-1000이며;

[0355] R^{13}은 $-C_2-C_{20}$ 알킬렌, $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌이고;

[0356] R^{14}은 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이며;

[0357] R^{15}는 각각 독립적으로 -H, -COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 알킬, $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 알키닐을 나타내고;

[0358] R^{16}은 각각 독립적으로 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐 또는 $-(CH_2)_n-COOH$이며; 및

[0359] n은 0 내지 6의 정수이고;

[0360] 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카보사이클 및 헤테로사이클 래디칼은 단독으로든 또는 다른 기의 일부이든 필요한 경우 치환되어도 좋다.

[0361] [0240] 화학식 D_E의 아우리스타틴은 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카보사이클 및 헤테로사이클 래디칼이 치환되지 않은 경우를 포함한다.

[0362] [0241] 화학식 D_E의 아우리스타틴은 R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, 및 R^9기가 치환되지 않고 R^{19}, R^{20} 및 R^{21} 기는 필요에 따라 상기와 같이 치환된 것인 경우를 포함한다.

[0363] [0242] 화학식 D_E의 아우리스타틴은 다음의 정의를 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화합물을 포함한다, 즉 ,식 중:

[0364] R^2는 C_1-C_8 알킬;

[0365] R^3, R^4 및 R^7은 독립적으로 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, 모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클), C_6-C_{10} 아릴, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(C_6-C_{10} 아릴), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(C_6-C_{10} 아릴), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(C_6-C_{10} 아릴), 헤테로사이클, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(헤테로사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 $-C_2-$

C_{20} 알키닐렌(헤테로사이클); 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 카보사이클, 아릴 및 헤테로사이클 래디칼은 치환되어도 좋다;

[0366] R^5는 -H;

[0367] R^6는 -C_1-C_8 알킬;

[0368] R^8은 각각 독립적으로 -OH, -O-(C_1-C_{20} 알킬), -O-(C_2-C_{20} 알케닐), 또는

[0369] -O-(C_2-C_{20} 알키닐)이고 여기서 상기 알킬, 알케닐, 및 알키닐 래디칼은 치환되어도 좋은 것이고;

[0370] R^9는 -H 또는 -C_1-C_8 알킬;

[0371] R^{24}는 치환되어도 좋은 -페닐;

[0372] R^{25}는 -OR^{18}이고; 여기서 R^{18}은 H, 히드록실 보호기, 또는 직접 결합이고 여기서 OR^{18}은 =O를 나타내며;

[0373] R^{26}은 -H, -C_1-C_{20} 알킬, -C_2-C_{20} 알케닐, -C_2-C_{20} 알키닐, 또는 -카보사이클로부터 선택되고; 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐 및 카보사이클 래디칼은 치환되어도 좋은 것이다.

[0374] [0243] 화학식 D_E의 아우리스타틴은 다음의 정의를 갖는 것 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함한다, 식 중:

[0375] R^2는 메틸;

[0376] R^3는 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, 또는 C_2-C_8 알키닐이고, 여기서 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 래디칼은 치환되어도 좋고;

[0377] R^4는 -H, -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐, -C_2-C_8 알키닐, 모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클, -C_6-C_{10} 아릴, -C_1-C_8 알킬렌(C_6-C_{10} 아릴), -C_2-C_8 알케닐렌(C_6-C_{10} 아릴), -C_2-C_8 알키닐렌(C_6-C_{10} 아릴), -C_1-C_8 알킬렌 (모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클), -C_2-C_8 알케닐렌 (모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클), -C_2-C_8 알키닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클)이며; 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴 및 카보사이클 래디칼은 단독으로든 다른 기의 일부로서든 필요에 따라 치환될 수 있고;

[0378] R^5는 -H;

[0379] R^6는 메틸;

[0380] R^7은 -C_1-C_8 알킬, -C_2-C_8 알케닐 또는 -C_2-C_8 알키닐;

[0381] 각각의 R^8은 메톡시;

[0382] R^9은 -H 또는 -C_1-C_8 알킬;

[0383] R^{24}는 -페닐;

[0384] R^{25} 는 -OR^{18}이고; 여기서 R^{18}은 H, 히드록실 보호기, 또는 직접 결합이며 여기서 OR^{18}은 =O을 나타내고;

[0385] R^{26}은 메틸이다.

[0386] [0244] 화학식 D_E의 아우리스타틴에는 다음의 정의를 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화합물 형태가 포함된다. 식 중:

[0387] R^2는 메틸; R^3는 -H 또는 $-C_1-C_3$ 알킬; R^4는 $-C_1-C_5$ 알킬; R^5는 -H; R^6는 메틸; R^7은 이소프로필 또는 sec-부틸; R^8은 메톡시; R^9은 -H 또는 $-C_1-C_8$ 알킬; R^{24}는 페닐; R^{25} 는 $-OR^{18}$이고; 여기서 R^{18}은 -H, 히드록실 보호기, 또는 직접 결합이고 여기서 OR^{18}은 =O를 나타내며; 및 R^{26}은 메틸이다.

[0388] [0245] 화학식 D_E의 아우리스타틴에는 다음 정의를 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염 형태가 포함된다. 식 중:

[0389] R^2는 메틸 또는 C_1-C_3 알킬,

[0390] R^3는 -H 또는 $-C_1-C_3$ 알킬;

[0391] R^4는 $-C_1-C_5$ 알킬;

[0392] R^5는 H;

[0393] R^6는 C1-C3 알킬;

[0394] R^7은 $-C_1-C_5$ 알킬;

[0395] R^8은 $-C_1-C_3$ 알콕시;

[0396] R^9은 -H 또는 $-C_1-C_8$ 알킬;

[0397] R^{24}는 페닐;

[0398] R^{25}는 $-OR^{18}$; 여기서 R^{18}은 -H, 히드록실 보호기 또는 직접 결합이고 여기서 OR^{18}은 =O을 나타내고;

[0399] R^{26}은 $-C_1-C_3$ 알킬이다.

[0400] [0246] 화학식 D_F의 아우리스타틴은 다음 정의를 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염을 포함한다. 식 중:

[0401] R^2는 메틸;

[0402] R^3, R^4, 및 R^7은 독립적으로 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, 모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(모노시클릭 C_3-C_6 카보사이클), $-C_6-C_{10}$ 아릴, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(C_6-C_{10} 아릴), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(C_6-C_{10} 아릴), $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(C_6-C_{10} 아릴), 헤테로사이클, $-C_1-C_{20}$ 알킬렌(헤테로사이클), $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌(헤테로사이클), 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌(헤테로사이클)로부터 선택되고; 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 카보사이클, 아릴 및 헤테로사이클 래디칼은 단독으로든 다른 기의 일부로서든 필요에 따라 치환될 수 있고;

[0403] R^5는 -H;

[0404] R^6는 메틸;

[0405] 각각의 R^8은 메톡시;

[0406] R^9은 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이고; 여기서 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 래디칼은

치환되어도 좋은 것이며;

[0407] R^{10}은 치환되어도 좋은 아릴 또는 치환되어도 좋은 헤테로사이클이고;

[0408] Z는 -O-, -S-, -NH-, 또는 $-NR^{12}$이고 여기서 R^{12}는 $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐이며 이들 각각은 필요에 따라 치환되어도 좋은 것이며;

[0409] R^{11}은 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐, -아릴, -헤테로사이클, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$인데, 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴 및 헤테로사이클 래디칼은 치환되어도 좋은 것이고;

[0410] m은 1-1000의 정수이거나 또는 m = 0이고;

[0411] R^{13}은 $-C_2-C_{20}$ 알킬렌, $-C_2-C_{20}$ 알케닐렌, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐렌이고 이들 각각은 치환되어도 좋은 것이고;

[0412] R^{14}는 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-C_2-C_{20}$ 알키닐인데 여기서 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 래디칼은 치환되어도 좋고;

[0413] 각각의 R^{15}는 독립적으로 -H, -COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 알킬, $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 알케닐, 또는 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 알키닐인데 여기서 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 래디칼은 치환되어도 좋은 것이며;

[0414] 각각의 R^{16}은 독립적으로 -H, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_2-C_{20}$ 알케닐, $-C_2-C_{20}$ 알키닐 또는 $-(CH_2)_n-COOH$인데 여기서 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐 래디칼은 치환되어도 좋고;

[0415] n은 0 내지 6의 정수이다.

[0416] [0247] 이들 특정 구체예에서, R^{10}은 치환되어도 좋은 페닐이다.

[0417] [0248] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, 및 R^9기들은 치환되지 않고 R^{10} 및 R^{11}기들은 전술한 바와 같은 것인 화합물이 포함된다.

[0418] [0249] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴, 카보사이클, 및 헤테로사이클 래디칼이 치환되지 않은 화합물들이 포함된다.

[0419] [0250] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 다음 정의를 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염이 포함된다. 식 중:

[0420] R^2는 $-C_1-C_3$ 알킬; R^3는 -H 또는 $-C_1-C_3$ 알킬; R^4는 $-C_1-C_5$ 알킬; R^5는 -H; R^6는 $-C_1-C_3$ 알킬; R^7은 $-C_1-C_5$ 알킬; R^8은 $-C_1-C_3$ 알콕시; R^9은 -H 또는 $-C_1-C_8$ 알킬; R^{10}은 치환되어도 좋은 페닐; Z는 -O-, -S-, 또는 -NH-; R^{11}은 상기 정의한 바와 같다.

[0421] [0251] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 다음 정의를 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염이 포함된다:

[0422] R^2는 메틸; R^3는 -H 또는 $-C_1-C_3$ 알킬; R^4는 $-C_1-C_5$ 알킬; R^5는 -H; R^6는 메틸; R^7은 이소프로필 또는 sec-부틸; R^8은 메톡시; R^9은 -H 또는 $-C_1-C_8$ 알킬; R^{10}은 치환되어도 좋은 페닐; Z은 -O-, -S-, 또는 -NH-이고; R^{11}은 상기 정의한 바와 같다.

[0423] [0252] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 다음 정의를 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염이 포함된다:

[0424] R^2는 메틸; R^3는 -H 또는 $-C_1-C_3$ 알킬; R^4는 $-C_1-C_5$ 알킬; R^5는 -H; R^6는 메틸; R^7는 이소프로필 또는 sec-부틸;

R^8은 메톡시; R^9은 -H 또는 C_1-C_8 알킬; R^{10}은 페닐; 및 Z은 -O- 또는 -NH- 및 R^{11}은 상기 정의한 바와 같고 바람직하게는 수소이다.

[0425] [0253] 화학식 D_F 의 아우리스타틴에는 다음 정의를 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염이 포함된다:

[0426] R^2는 -C_1-C_3 알킬; R^3는 -H 또는 -C_1-C_3 알킬; R^4는 -C_1-C_5 알킬; R^5는 -H; R^6 는 -C_1-C_3 알킬; R^7은 -C_1-C_5 알킬; R^8은 -C_1-C_3 알콕시; R^9은 -H 또는 -C_1-C_8 알킬; R^{10}은 페닐; 및 Z는 -O- 또는 -NH- 및 R^{11}은 상기 정의한 바와 같고 좋기로는 수소이다.

[0427] [0254] 화학식 D_E 또는 D_F의 아우리스타틴으로는 R^3, R^4 및 R^7은 독립적으로 이소프로필 또는 sec-부틸이고 R^5는 -H인 화합물들을 들 수 있다. 예시적인 구체예에서, R^3 및 R^4는 각각 이소프로필, R^5는 H이고 R^7은 sec-부틸이다. 나머지 치환기들은 상기 정의한 바와 같다.

[0428] [0255] 화학식 D_E 또는 D_F의 아우리스타틴에는 R^2 및 R^6가 각각 메틸이고, R^9은 H인 화합물이 포함된다. 나머지 치환기들은 상기 정의한 바와 같다.

[0429] [0256] 화학식 D_E 또는 D_F의 아우리스타틴에는 각각의 R^8이 -OCH_3인 화합물이 포함된다. 나머지 치환기는 상기 정의한 바와 같다.

[0430] [0257] 화학식 D_E 또는 D_F의 아우리스타틴에는 R^3 및 R^4 각각은 이소프로필이고, R^2 및 R^6는 각각 메틸, R^5는 H, R^7은 sec-부틸, 각각의 R^8은 -OCH_3이고 및 R^9은 H인 화합물이 포함된다. 나머지 치환기들은 상기 정의한 바와 같다.

[0431] [0258] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 Z가 -O- 또는 -NH-인 화합물이 포함된다. 나머지 치환기들은 상기 정의한 바와 같다.

[0432] [0259] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 R^{10}이 아릴인 화합물들이 포함된다.. 나머지 치환기들은 상기 정의한 바와 같다.

[0433] [0260] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 R^{10}이 -페닐인 화합물들이 포함된다. 나머지 치환기들은 상기 정의한 바와 같다.

[0434] [0261] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 Z가 -O-이고 R^{11}은 H, 메틸 또는 t-부틸인 화합물들이 포함된다. 나머지 치환기들은 상기 정의한 바와 같다.

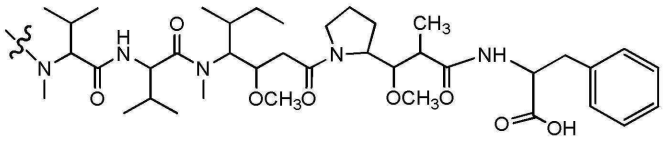
[0435] [0262] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 Z가 -NH-일 때, R^{11}이 -$(R^{13}O)_m$-$CH(R^{15})_2$인 화합물이 포함되며, 여기서 R^{15}은 -$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$이고 R^{16}은 -C_1-C_8 알킬 또는 -$(CH_2)_n$-COOH이다. 나머지 치환기들은 상기 정의한 바와 같다.

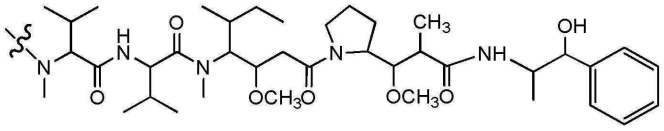
[0436] [0263] 화학식 D_F의 아우리스타틴에는 Z가 -NH-, R^{11}은 -$(R^{13}O)_m$-$CH(R^{15})_2$이고, 여기서 R^{15}는 -$(CH_2)_n$-SO_3H인 화합물들이 포함된다. 나머지 치환기들은 상기 정의한 바와 같다.

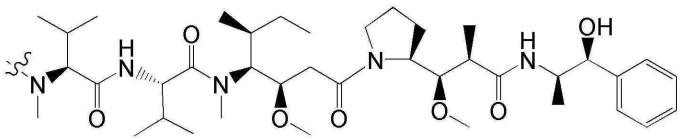
[0437] [0264] 바람직한 구체예에서, D가 화학식 D_E의 아우리스타틴이면, w는 1 내지 12의 정수, 좋기로는 2 내지 12의 정수이고, y는 1 또는 2이며 a는 좋기로는 1이다.

[0438] [0265] 몇가지 구체예에서, D가 화학식 D_F의 아우리스타틴이면 a는 1이고 w 및 y는 0이다.

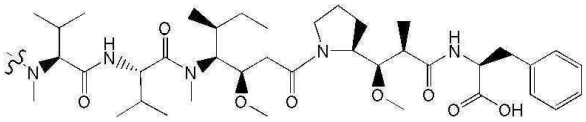
[0439] [0266] 예시적인 약물 유닛 (-D)에는 다음 구조를 갖는 약물 유닛 또는 약학적으로 허용되는 그의 염 또는 용매화합물이 포함된다:

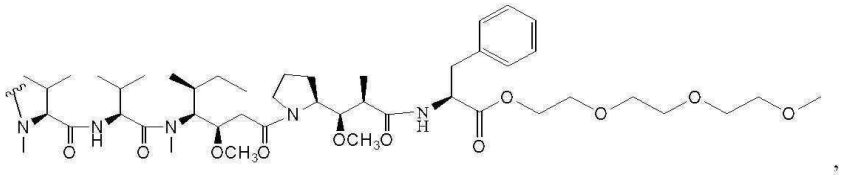


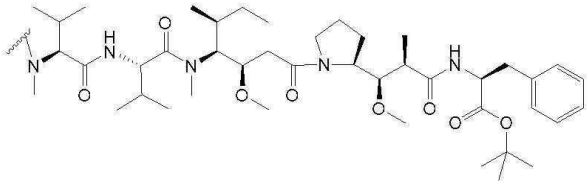


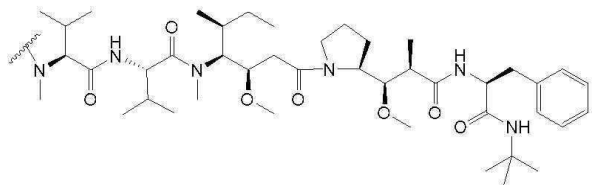


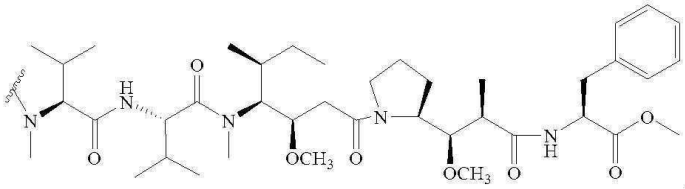
[0440]

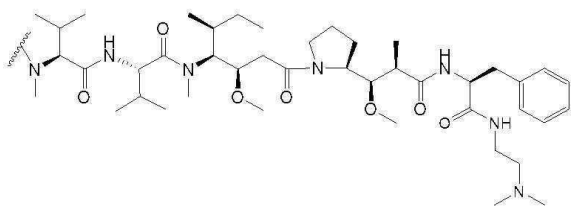




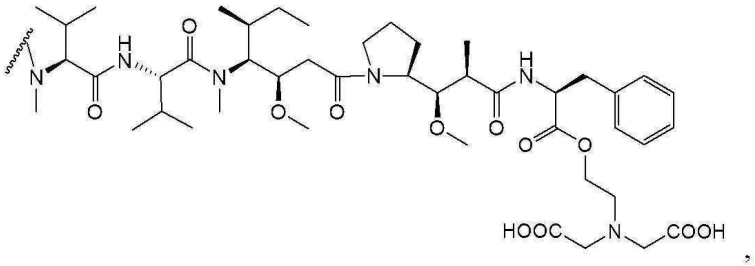




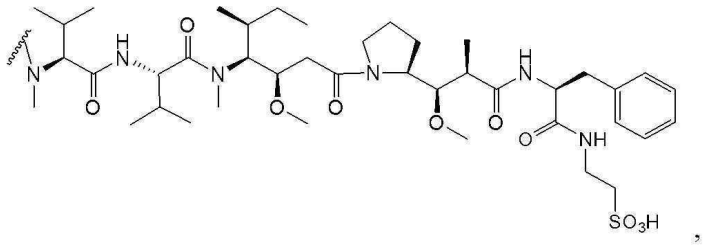




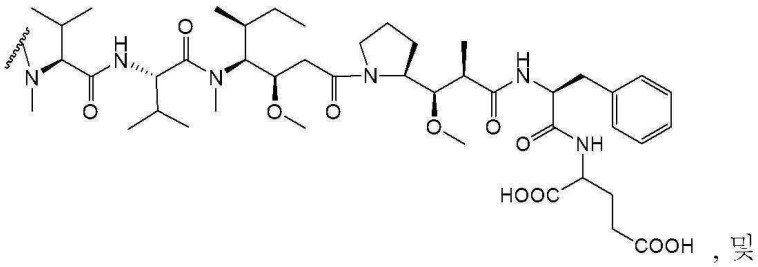
[0441]



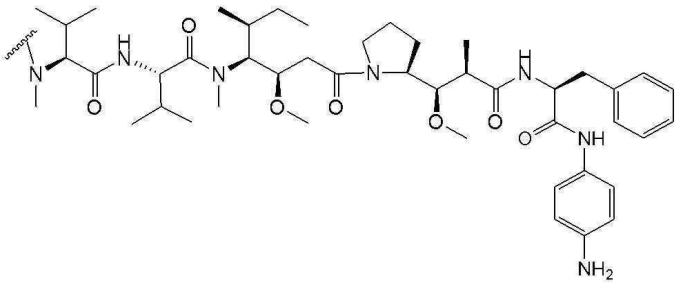
,



,



, 및

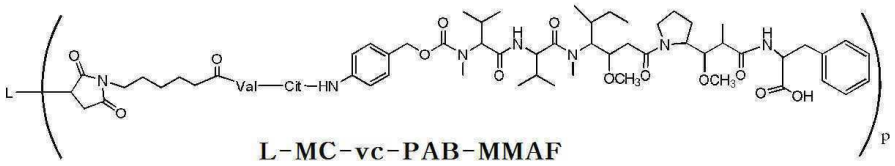


[0442]

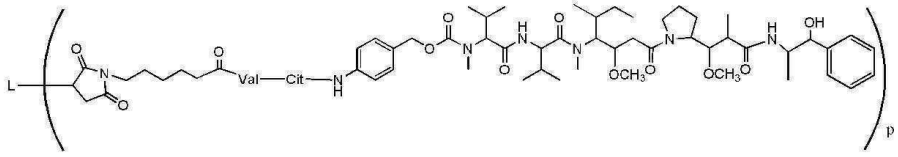
[0443] [0267] 한가지 구체예에서, 친수성기, 예컨대 트리에틸렌 글리콜 에스테르(TEG) (그러나 이에 한정되지 않음)는 R^{11}에서 약물 유닛에 부착될 수 있다. 특정 이론에 구애됨이 없이, 친수성기는 약물 유닛의 내면화 (internalization) 및 비응집화에 기여한다.

[0444] [0268] 몇가지 실시상태에서, 약물 유닛은 TZT-1027이 아니다. 몇가지 실시상태에서, 약물 유닛은 아우리스타틴 E, 돌라스타틴 10, 또는 아우리스타틴 PE가 아니다.

[0445] [0269] 항체-약물 컨쥬게이트 화합물의 예로는 다음의 구조를 갖는 것들 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 들 수 있으며, 하기 식에서 "L" 또는 "mAb-s-"는 하기와 같은 191P4D12 MAb 표시된 Ha22-2(2,4)6.1을 나타낸다:

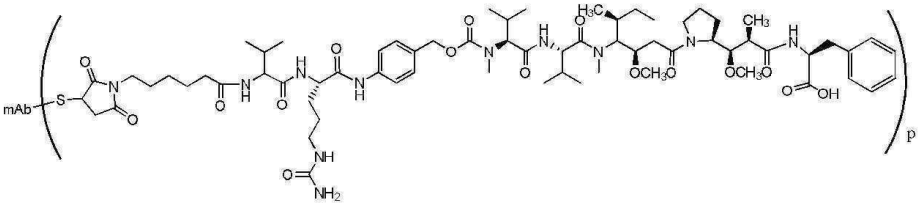


L-MC-vc-PAB-MMAF



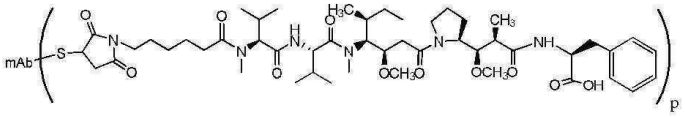
L-MC-vc-PAB-MMAE

또는



L-MC-vc-PAB-MMAF

또는



L-MC-MMAF

[0446]

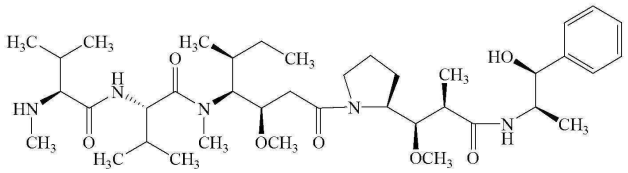
[0447] [0270] 몇 가지 실시상태에서, 약물 유닛은 칼리케아미신, 캄토테신, 메이탄시노이드 또는 안트라사이클린이다. 몇가지 구체예에서 약물은 탁산, 호변이성질체 억제제, 빈카 알칼로이드 등이다.

[0448] [0271] 몇가지 전형적인 실시상태에서, 적절한 세포독성제의 예로는 DNA 마이너 그루브 바인더 (예컨대, 엔디인 및 렉시트롭신, CBI 화합물; 미국특허 6,130,237 참조), 듀오카르마이신, 탁산 (예컨대, 파크리탁셀 및 도세탁셀)), 퓨로마이신 및 빈카 알칼로이드를 들 수 있다. 기타 세포독성제의 예로는, CC-1065, SN-38, 토포테칸, 모폴리노-독소루비신, 리족신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 에치노마이신, 콤브레스타틴, 네트롭신, 에포틸론 A 및 B, 에스트라무스틴, 크립토피진, 세마도틴, 메이탄시노이드, 디스코데르몰리드, 엘레우테로빈 및 미토잔트론을 들 수 있다.

[0449] [0272] 몇가지 실시상태에서, 약물은 항-튜불린 제제이다. 항-튜불린 제제의 예로는 아우리스타틴, 탁산(예컨대, Taxol®(파클리탁셀), Taxotere®(도세탁셀)), T67 (Tularik) 및 빈카 알킬로이드(예컨대 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신 및 비노렐빈)를 들 수 있다. 기타 항튜불린제의 예로는 바카틴 유도체, 탁산 유사체 (예컨대, 에포틸론 A 및 B), 노코다졸, 콜히친 및 콜시미드, 에스트라무스틴, 크립토피신, 세마도틴, 메이탄시노이드, 콤브레스타틴, 디스코데몰리드 및 엘로이트로빈을 들 수 있다.

[0450] [0273] 특정 실시상태에서, 세포독성제는 메이탄시노이드, 기타 그룹의 항-튜불린제이다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 메이탄시노이드는 메이탄신 또는 DM-1 (ImmunoGen, Inc.; Chari *외*, 1992, Cancer Res. 52:127-131 참조)이다.

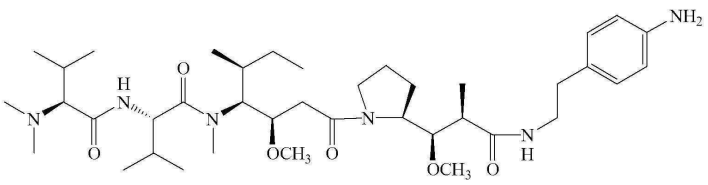
[0451] [0274] 특정 실시상태에서, 세포독성제 또는 세포증식억제제는 돌라스타틴이다. 특정 실시상태에서, 세포독성제 또는 세포증식억제제는 아우리스타틴 부류의 것이다. 따라서, 특정 실시상태에서, 세포독성제 또는 세포증식억제제는 MMAE (화학식 XI)이다. 또 다른 특정 실시상태에서, 세포독성제 또는 세포증식억제제는 AFP (화학식 XVI)이다.



(XI)

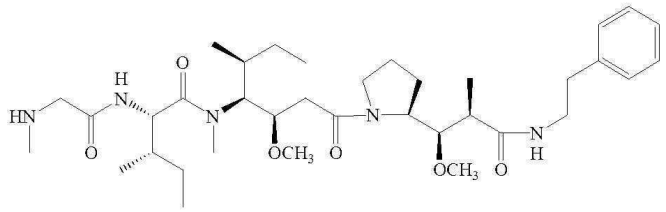
[0452]

[0453] 특정 실시상태에서, 세포독성제 또는 세포증식억제제는 화학식 XII-XXI 의 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염이다.

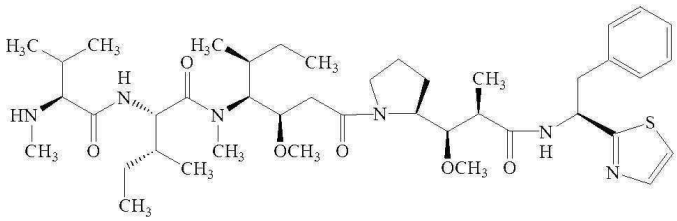


(XII)

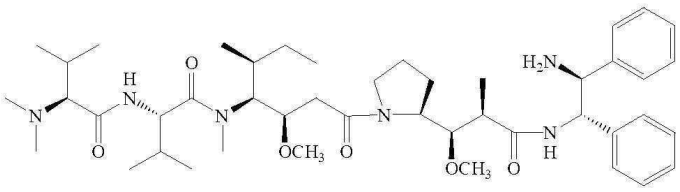
[0454]



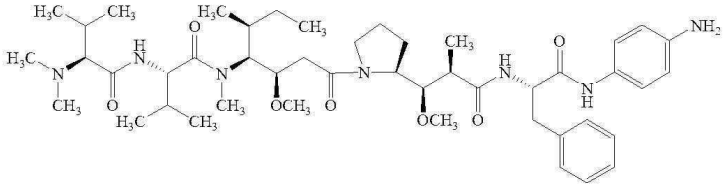
(XIII)



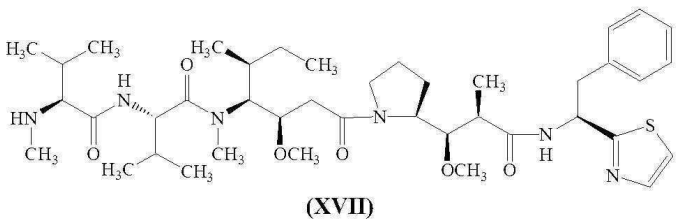
(XIV)



(XV)

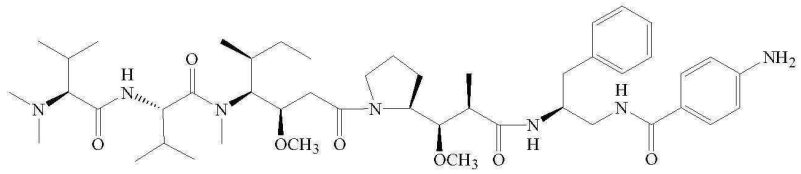


(XVI)

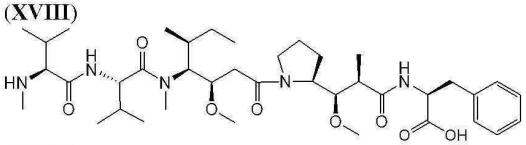


(XVII)

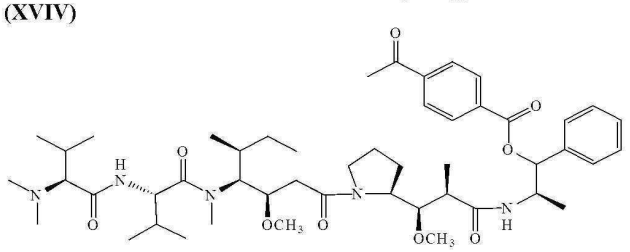
[0455]



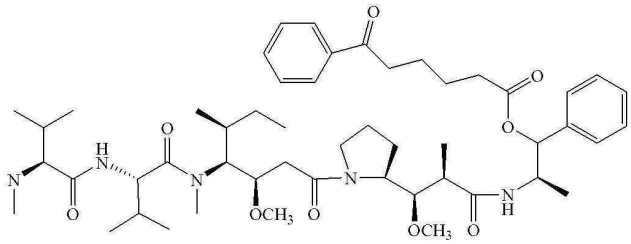
(XVIII)



(XVIV)



(XX)



(XXI)

[0456]

[0457] X.) 약물 로딩

[0458] [0275] 약물 로딩은 p로 나타내어지는데, 이는 분자 중 항체 당 약물 모이어티의 평균 개수이다. 약물 로딩은 항체 당 1 내지 20 약물 모이어티 (D) 범위일 수 있다. 본 발명의 ADC는 1 내지 20의 약물 모이어티 범위와 컨쥬게이트된 항체의 컬렉션을 포함한다. 컨쥬게이션 반응으로부터의 ADC 제조에 있어서, 항체 당 약물 모이어티의 평균 개수는 질량 분광 및 ELISA 분석과 같은 전통적 수단에 의해 특성화될 수 있다. p 의 관점에서 ADC의 정량적 분배 또한 결정될 수 있다. 몇몇 예에서, 다른 약물이 로딩된 ADC로부터 p가 일정 값인 균일성 ADC의 분리, 정제 및 특성화는 전기 영동과 같은 수단에 의하여 달성될 수 있다.

[0459] [0276] 몇몇 항체-약물 컨쥬게이트에 있어서, p는 항체 위의 부착 부위의 개수에 의해 제한될 수 있다. 예컨대, 상기 예시적 실시상태들에서와 같이, 그 부착이 시스테인 티올인 경우, 항체는 단 하나 또는 수개의 시스테인 티올 그룹을 가질 수 있으며, 또는 링커가 부착될 수 있는 충분히 반응성인 단 하나 또는 수개의 티올 그룹을 가질 수도 있다. 특정 실시상태에서, 높은 약물 로딩, 즉 p >5는 뭉침, 비 용해성, 독성 또는 특정 항체-약물 컨쥬게이트의 세포 내 투과성의 상실을 야기할 수 있다. 특정 실시상태에서 본 발명의 ADC에 대한 약물 로딩은 1 내지 약 8; 약 2 내지 약 6; 약 3 내지 약 5; 약 3 내지 약 4; 약 3.1 내지 약 3.9; 약 3.2 내지 약 3.8;약 3.2 내지 약 3.7;약 3.2 내지 약 3.6;약 3.3 내지 약 3.8; 또는 약 3.3 내지 약 3.7의 범위이다. 실제로, 특정 ADC에 대하여 항체 당 적정 약물 모이어티 비율은 8 미만일 수 있다고, 그리고 약 2 내지 약 5일 수 있다고 나타났다. US 특허 7,498,298(전체가 참고로서 본 명세서에 포함됨)를 참조할 것.

[0460] [0277] 특정 실시상태에서, 컨쥬게이션 반응 동안에 이론적 최대치보다 적은 약물 모이어티가 항체에 컨쥬게이트 되었다. 항체는 아래에서 논의할 바와 같이 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하지 않는, 예컨대 라이신 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로 항체들은 약물 모이어티와 결합할 수 있는 다수의 자유롭고 반응성인 시스테인 티올 그룹을 포함하지 않는다; 실제로 항체 내 대부분의 시스테인 티올 잔기는 이황화 결합으로서 존재한다. 특정 실시상태에서 반응성인 시스테인 티올 그룹을 발생시키기 위하여, 부분적 또는 전체적 환원 조건하에서 DTT(dithiothreitol) 또는 TCEP(tricarbonylethylphosphine)와 같은 환원제로 항체를 환원시킬 수 있다. 특정 실시상태에서, 라이신 또는 시스테인 같은 반응성인 친핵성(nucleophilic) 그룹을 노출시키기 위하여 항체를 변성 조건하에 둔다.

[0461] [0278] ADC의 로딩(약물/항체 비율)은 여러 방식으로 조절될 수 있는데, 예컨대, (i) 항체와 비교하여 약물-링

커 중간체 또는 링커 시약의 몰적 과잉을 제한, (ii) 컨쥬게이션 반응 시간 또는 온도를 제한, (iii) 시스테인 티올 변형을 위한 환원 조건을 일부 또는 제한, (iv) 재조합 기술에 의해 항체의 아미노산 서열을 엔지니어링하여, 링커-약물 부착의 개수 및/또는 위치 조절을 위하여, 시스테인 잔기의 개수 및 위치가 변형되도록 함(WO2006/034488(전체가 참고로서 본 명세서에 포함됨) 및 본 명세서에 기술된 바에 따라 제조된 thioMab 또는 thioFab과 같이)에 의하여 조절될 수 있다.

[0462] [0279] 일 이상의 친핵성 그룹이 약물 모이어티 시약이 따라오는 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하는 곳에서 생성된 산물은 항체에 부착된 일 이상의 약물 모이어티 분포를 갖는 ADC 화합물의 혼합물인 것으로 이해된다. 항체 당 평균 약물 수는 이중 ELISA 항체 분석법에 의하여 혼합물로부터 계산될 수 있는데, 이는 항체에 대하여 특이적이고 약물에 대하여 특이적이다. 개개의 ADC 분자는 질량 분석법에 의하여 혼합물 중에서 동정될 수 있으며, HPLC, 예컨대 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의하여 분리될 수 있다(참고로 예컨대, Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). 특정 실시상태에서 단일 로딩 값을 갖는 균일한 ADC는 전기영동 또는 크로마토그래피에 의하여 컨쥬게이션 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0463] XI.) ADC의 세포독성 효과 판단 방법

[0464] [0280] 약물 또는 항체-약물 컨쥬게이트가 세포에 세포증식억제 및/또는 세포독성 효능을 행사하는지 여부를 결정하는 방법은 알려져 있다. 일반적으로 항체 약물 컨쥬게이트의 세포독성 또는 세포증식억제 활성은 항체 약물 컨쥬게이트의 표적 단백질을 발현하는 포유류 세포를 세포 배양 배지에 노출시키고; 약 6시간으로부터 약 5일까지의 기간 동안 세포를 배양하고: 그리고 세포 생존능력을 측정함에 의하여 측정될 수 있다. 생존능력(증식), 세포독성, 및 항체 약물 컨쥬게이트의 세포자멸사 유도(카스파제 활성화)를 측정하기 위하여 세포-기반 인 비트로 분석법이 사용될 수 있다.

[0465] [0281] 항체 약물 컨쥬게이트가 세포증식억제 효능을 행사하는지 여부를 결정하기 위하여 티미딘 혼입 분석법이 사용될 수 있다. 예컨대, 표적 항원을 96 웰 플레이트의 5,000 셀/웰의 밀도로 발현하는 암세포를 72시간의 기간 동안 배양하고 72시간의 기간 중 마지막 8시간 동안 0.5 μCi의 ^{3}H-티미딘에 노출시킬 수 있다. 배양 세포 속으로의 ^{3}H-티미딘의 혼입은 항체 약물 컨쥬게이트의 존재 또는 부존재 중에서 측정된다.

[0466] [0282] 세포 독성 측정을 위하여, 네크로시스 또는 세포자멸사(프로그램된 세포 사멸)을 측정할 수 있다. 네크로시스는 전형적으로 세포막의 증가된 투과성, 세포의 팽창 및 세포막의 파열을 수반한다. 세포자멸사는 전형적으로 막 수포화, 세포질의 응축 및 내인성 엔도뉴클레아제의 활성화에 의해 특징지어진다. 암세포에 대한 이러한 영향 중 어느 하나의 확정은 항체 약물 컨쥬게이트가 암 치료에 유용하다는 것을 나타낸다.

[0467] [0283] 세포 생존능력은 중성 레드, 트리판 블루 또는 ALAMAR™ 블루(참고, 예컨대 Page *et al.*, 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476)와 같은 염료의 세포 내 섭취를 결정하여 측정될 수 있다. 그러한 분석에 있어서, 세포를 염료를 포함한 배지에서 배양하고, 세포를 세척하고, 그리고 염료의 세포적 섭취를 반영하는 남아있는 염료를 분광학적으로 측정한다. 단백질-결합 염료 설포호다민 B(SRB) 또한 세포독성을 측정하기 위하여 사용될 수 있다(Skehan *et al.*, 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

[0468] [0284] 별법으로, 죽은 세포가 아닌 살아있는 세포의 측정에 의한 포유류 세포의 생존 및 증식에 대한 정량적 색도 분석법에서, MTT와 같은 테트라졸리움 염이 사용될 수 있다(참고로 예컨대, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

[0469] [0285] 세포자멸사(apoptosis)는 예컨대, DNA 파쇄를 측정하여 정량화될 수 있다. DNA 파쇄를 정량적으로 인 비트로 측정하기 위한 상업적인 광도 측정법이 이용가능하다. TUNEL (파쇄된 DNA 중의 표지된 뉴클레오티드의 혼입을 측정) 및 ELISA-기반 분석법을 포함하는 이와 같은 분석법의 예시가 *Biochemica*, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals)에 기술되어 있다.

[0470] [0286] 세포자멸사는 또한 세포 중의 형태학상의 변화를 측정하여 결정되어 질 수 있다. 예를 들어, 네크로시스와 같이, 세포막의 완결성의 상실은 특정 염료(예컨대, 아크릴 오렌지 또는 에티디움 브로마이드와 같은 형광

염료)의 섭취를 측정하여 결정될 수 있다. 세포자멸사 세포 개수의 측정 방법은 듀크 및 코헨의 Current Protocols in Immunology (Coligan *et al.* eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16)에 기술되었다. 세포는 또한 DNA 염료(예로 아크리딘 오렌지, 에티디움 브로마이드 또는 프로피디움 요오드)로 표지될 수 있고, 크로마틴 응축 및 핵막 내부를 따라 생기는 가장자리화에 대해 관찰된다. 세포자멸사를 결정하기 위하여 측정되는 다른 형태적 변화는 예컨대, 세포질 응축, 증가된 막 수포화 및 세포 수축을 포함한다.

[0471] [0287] 세포자멸성 세포의 존재는 배양물의 부착된 구획 및 "부유하는" 구획 둘 모두에서 측정될 수 있다. 예를 들어 두 구획은 상등액 제거, 부착된 세포의 트립신처리, 표본의 조합 및 뒤이은 원심 분리 세척 단계(예로 2000 rpm에서 10분) 및세포자멸사 탐지(예로, DNA 단편을 측정함에 의하여)에 의하여 수집될 수 있다(참고로 예컨대, Piazza *et al.*, 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

[0472] [0288] 191P4D12 치료용 조성물의 영향은 적당한 동물 모델에서 인 비보(*in vivo*) 평가될 수 있다. 예를 들어 이종 개체 암 모델을 사용할 수 있는데, 여기에서 암 이식체 또는 계대 이종이식편 조직은 누드 또는 SCID 마우스와 같이 면역을 저하시킨 동물 안으로 도입된다(Klein *et al.*, 1997, Nature Medicine 3: 402-408). 예를 들어 PCT 특허출원 WO98/16628 및 미국특허 제6,107,540호는 일차 종양의 발전, 미소전이 및 후기 단계 질병의 특징인 조골세포 전이 형성을 재현할

[0473] 수 있는 능력이 있는 다양한 인간 전립선 암 이종이식편 모델을 기술한다. 종양 형성의 억제, 종양의 퇴행 또는 전이 등을 측정하는 분석법을 사용하여 효능을 예측할 수 있다.

[0474] [0289] 세포자멸사 촉진을 평가하는 인 비보 분석법은 치료용 조성물을 평가하는데에 있어 유용하다. 일 실시상태에서 치료용 조성물로 처리된 종양 포함 마우스로부터 유래한 이종이식편체는 세포자멸사성 병소의 존재를 위해 시험되고, 처리되지 않은 대조군 이종이식-포함 마우스와 비교될 수 있다. 처리된 마우스의 종양 내 세포자멸사성 병소가 발견되는 범위는 조성물의 치료적 효능에 대한 지시를 제공한다.

[0475] [0290] 상기 방법의 실행에 사용된 치료적 조성물은 목적하는 전달 방법을 위해 적합한 담체를 포함하는 약제학적 조성물로 조제될 수 있다. 적합한 담체는 치료적 조성물과 조합되었을 때 치료적 조성물의 항-종양 기능을 보유하고, 환자의 면역 시스템에 일반적으로 비 반응성인 임의의 물질을 포함한다. 예를 들면, 살균 포스페이트 완충된 염수 용액, 제균수 등과 같은 수많은 표준 약제학적 담체 중 어느 하나를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다(참고, 일반적으로, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

[0476] [0291] 치료적 제형은 용해되고, 종양 부위로 치료적 조성물을 운반할 수 있는 그 어떠한 경로를 통해서라도 투여될 수 있다. 잠재적으로 효과적인 투여 경로는 정맥 내, 비경구적, 복막 내, 근육 내, 종양 내, 피부 내, 기관 내, 오르토토픽(orthotopic) 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 정맥 내 주입을 위한 바람직한 제형은 보존된 제균수, 살균 비보존수 중의 치료적 조성물, 및/또는 0.9%의 주입용 살균 염화나트륨 USP를 포함하는 염화폴리비닐 또는 폴리에틸렌 백 중에 희석된 치료적 조성물을 포함한다. 치료적 단백질 조제물은 냉동 건조되어 멸균 파우더로서 바람직하게는 진공하에서 보관될 수 있고, 그 다음 주입에 앞서 제균수(예컨대, 벤질 알코올 보존제를 포함하는) 또는 살균수 중으로 재 용해시킬 수 있다.

[0477] [0292] 상기 방법을 이용한 암 치료용 투약 및 투여 프로토콜은 방법 및 표적 암과 함께 변동될 것이고, 당업계에서 고려되는 수 개의 다른 인자에 일반적으로 의존적일 것이다.

[0478] XII.) 191P4D12를 발현하는 암의 치료

[0479] [0293] 제한된 조직 세트 중에서 정상적으로 발현되지만, 또한 표 I에 열거한 것과 같은 암 세포 중에서도 발현하는 단백질로서 191P4D12를 동정함은, 그와 같은 암의 치료에 대한 수개의 치료적 접근법을 열었다.

[0480] [0294] 그 중에서도 특기할 만한 것은 표적화된 항종양 요법인데, 이 방법은표적 단백질이 정상 조직에서, 심지어는 핵심적 정상 기관 조직에서 발현하는 경우에도 효과적이었다. 핵심적 기관은 심장 또는 대장과 같이 생명 유지에 필수적인 것이다. 비 핵심적 기관은 제거되어도 개인이 여전히 생존할 수 있는 것이다. 비 핵심적 기관의 예로 난소, 유방 및 전립선이 있다.

[0481] [0295] 정상 조직 중, 심지어 핵심 정상 조직 중에서의 표적 단백질의 발현은, 그 단백질이 또한 과발현되는 특정 종양에 대한 치료법으로서 그 단백질에 대한 표적 작용제의 유용성을 좌절시키지 않는다. 예를 들어 핵심 기관 중의 발현은 그 자체로 불이익이지 않다. 또한 전립선 및 난소와 같이 제거가능한 것으로 여겨지는 기관은 죽음에 영향을 미치지 않고 제거될 수 있다. 마지막으로, 몇몇 핵심 기관들은 면역 특권 (immunoprivilege) 때문에 정상 기관 발현에 의하여 영향받지 않는다. 면역 특권화된 기관이란 혈액-기관 장벽에 의하여 혈액으로부

터 보호되어 면역 치료법에 접근할 수 없는 기관이다. 면역 특권화된 기관의 예로는 뇌 및 고환이 있다.

[0482] [0296] 따라서, 191P4D12 단백질의 활성을 억제하는 치료적 접근법은 191P4D12를 발현하는 암으로 고통받는 환자에게 유용하다. 이러한 치료적 접근법은 일반적으로 3개의 군으로 분류된다. 첫 번째 군은 종양 세포 성장의 억제 또는 지연 또는 그것의 사멸을 이끌면서 종양 세포 성장과 관련되어, 191P4D12의 기능을 조절한다. 두 번째 군은 191P4D12 단백질의 그 결합 파트너 또는 다른 단백질과의 결합 또는 연합 억제를 위한 다양한 방법을 포함한다. 세 번째 군은 191P4D12 유전자의 전사 또는 191P4D12 mRNA 번역 억제를 위한 다양한 방법을 포함한다.

[0483] [0297] 따라서, 암 환자는 바람직하게는 암조직의 면역조직화학 분석법, 정량적인 191P4D12 이미지화, 또는 191P4D12 발현의 존재 또는 정도를 신뢰할 수 있게 지시하는 다른 기술을 사용하여, 191P4D12 발현의 존재 또는 레벨을 평가받을 수 있다. 종양 생검 또는 수술적 표본에 대한 면역조직화학적 분석법이 이 목적을 위하여 바람직하다. 종양 조직에 대한 면역조직화학적 분석법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0484] XIII.) 항체-기반 요법에서 표적으로서의 191P4D12

[0485] [0298] 191P4D12는 항체-기반 치료적 전략을 위한 매력적인 표적이다. 수개의 항체 전략이 세포 외 및 세포 내 분자 모두의 표적화에 대하여 당업계에 알려져 있다(참고로, 예컨대 인트라바디의 사용뿐만 아니라, 보체 및 ADCC 매개성 사멸). 191P4D12가 대응 정상 세포와 관련 있는 다양한 계통의 암세포에 의해 발현되기 때문에, 191P4D12-면역활성 조성물의 전신 투여가 준비되고, 비-표적 기관 및 조직에 면역활성 조성물이 결합함에 의해 야기되는 독성, 비-특이적 및/또는 비-표적적인 효과 없이 우수한 민감성을 나타내었다. 191P4D12의 도메인과 특이적으로 반응하는 항체들은 191P4D12-발현 암을 전신 치료하는데에 유용한데, 바람직하게는 컨쥬게이트가 폭신 또는 치료제와 함께인 것인 항체 약물 컨쥬게이트(즉, ADC)로서 유용하다.

[0486] [0299] 당업계의 숙련된 자들은, Figure 1에서 보여지는 것과 같은 191P4D12 서열의 면역원성 영역과 같은 면역원성 분자를 특이적으로 표적화 및 결합하는데에 항체가 사용될 수 있다는 것을 이해한다. 또한, 숙련된 기술자들은 항체를 세포독성 약제에 컨쥬게이트 시키는 것이 흔하다는 것을 이해한다(참고로, 예컨대 Slevers *et al.* Blood 93:11 3678-3684 (June 1, 1999)). 세포독성 및/또는 치료적 약제가, 세포가 발현하는 분자(예컨대, 191P4D12)에 특이적인 항체와 그들을 컨쥬게이트 시킴에 의한 것과 같이, 세포에 직접적으로 전달될 때, 세포독성 약제는 그것의 알려진 생물학적 효능(즉, 세포독성)을 그 세포에 발휘할 것이다.

[0487] [0300] 세포를 사멸시키기 위하여 항체-세포독성 약제 컨쥬게이트를 사용하는 방법 및 다양한 종류의 조성물이 당업계에 알려져 있다. 암의 맥락에 있어서, 전형적인 방법은 세포 표면 상에서 발현되거나, 결합에 접근성이 있거나, 또는 지역화된 항원(예컨대, 191P4D12)에 결합하는 표적화된 제제(예컨대,191P4D12 MAb, 바람직하게는 Ha22-2(2,4)6.1)와 연결된 선택된 세포독성 및/또는 치료적 약제를 포함하는 컨쥬게이트의 생물학적 유효량을 종양을 가진 포유류에게 투여하는 것을 수반한다. 전형적인 실시상태는 세포독성 및/또는 치료적 약제를 191P4D12를 발현하는 세포에 전달하는 방법인데, 이는 세포독성 약제를 면역특이적으로 191P4D12 에피토프에 결합하는 항체에 컨쥬게이트 시키는 것, 및 세포를 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)에 노출시키는 것을 포함한다. 또 다른 설명적 실시상태는 전이된 암으로부터 고통받는 것으로 의심되는 개인을 치료하는 방법인데, 이는 세포독성 및/또는 치료적 약제에 컨쥬게이트된 항체의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 상기 개인에게 비경구적으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0488] [0301] 대장암(Arlen *et al.*, 1998, Crit. Rev. Immunol. 18:133-138), 복합 골수종(Ozaki *et al.*, 1997, Blood 90:3179-3186, Tsunenari *et al.*, 1997, Blood 90:2437-2444), 위암(Kasprzyk *et al.*, 1992, Cancer Res. 52:2771-2776), B-세포 림프종(Funakoshi *et al.*, 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:93-101), 백혈병(Zhong *et al.*, 1996, Leuk. Res. 20:581-589), 결장직장암(Moun *et al.*, 1994, Cancer Res. 54:6160-6166; Velders *et al.*, 1995, Cancer Res. 55:4398-4403) 및 유방암(Shepard *et al.*, 1991, J. Clin. Immunol. 11:117-127)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다른 종류의 암 치료에 성공적으로 적용되어 온 다양한 접근법에 따라서, 191P4D12 항체를 이용한 암 면역요법을 행할 수 있다. 몇몇 치료학적 접근은 Y^{91} 또는 I^{131}를 항-CD20 항체(예컨대, ZevalinTM, IDEC Pharmaceuticals Corp. or Bexxar™, Coulter Pharmaceuticals)에 각각 컨쥬게이션하는 것과 같은, 네이키드 항체를 폭신 또는 방사능 동위원소에 컨쥬게이션 시키는 것과 관련되는 반면에, 다른 접근법들은 파클리탁셀(Genentech, Inc.)과 함께 헤르셉틴™(trastuzu MAb)과 같은 다른 치료적 약제와 항체를 공동-투여하는 것과 관련된다. 바람직한 실시상태에서, 항체는 세포독성 약제, 상기 바람직하게는 MMAE(Seattle Genetics)로 지명된 아우라스타틴(aurastatin) 유도체에 컨쥬게이트될

것이다.

[0489] [0302] 비록 191P4D12 항체 치료법이 모든 단계의 암에 유용하다고 하더라도, 항체 치료법은 발전된 암 또는 전이성 암에 특히 적합할 수 있다. 본 발명의 항체 치료법에 의한 치료는 화학적 치료를 한 차례 이상 받아온 환자에게 지정된다. 또는, 본 발명의 항체 치료법은 화학치료적 치료법을 받아오지 않은 환자를 위하여 화학치료적 또는 방사능 처방과 함께 조합된다. 또한, 항체 치료법은 특히 화학치료적 약제의 독성에 매우 잘 순응하지 못하는 환자에 대하여, 부수하는 화학요법의 감소된 투여량의 사용을 가능하게 할 수 있다. 팬(Fan *et al.*, Cancer Res. 53:4637-4642, 1993), 프레웨트(Prewett *et al.*, International J. of Onco. 9:217-224, 1996) 및 한콕(Hancock *et al.*, Cancer Res. 51:4575-4580, 1991)은 다양한 항체를 화학치료적 약제들과 함께 사용하는 것을 기술한다.

[0490] [0303] 표 I에 기재된 암들을 치료하는 191P4D12 모노클로날 항체에는 종양에 대해 강한 면역 반응을 개시하는 것 및 직접적으로 세포독성인 것들이 포함된다. 이와 관련하여, 191P4D12 모노클로날 항체(MAb)는 보체-매개된 메카니즘 또는 항체-의존적 세포 독성(ADCC) 메카니즘에 의하여 종양 세포 용해를 유도할 수 있는데, 두 메카니즘 모두 보체 단백질의 효과기 세포 Fc 수용체 부위와의 상호작용을 위하여 면역 글로불린 분자의 완전한 Fc 부분을 필요로 한다. 또한, 종양 성장에 대한 직접적인 생물학적 효과를 행사하는 191P4D12 MAb는 191P4D12를 발현하는 암을 치료하는데 유용하다. 세포 독성 MAb가 직접적으로 작용하는 메카니즘은 세포 성장의 억제, 세포 분화의 조절, 종양 신생 인자 동태의 조절 및 아폽토시스 유도를 포함한다. 개개의 191P4D12 MAb가 항-종양 효과를 행사하는 메카니즘은, 당업계에 일반적으로 알려진 바와 같이, ADCC 및 보체-매개된 세포 용해 등과 같은 세포 사멸을 평가할 수 있는 수개의 인 비트로 분석법을 사용하여 평가된다.

[0491] [0304] 따라서, 본 발명의 치료적 방법에 사용되는 바람직한 모노클로날 항체는 완전히 인간이고 높은 친화력으로 191P4D12 항원 표적에 특이적으로 결합하는 것이다.

[0492] XIV.) 191P4D12 ADC 칵테일

[0493] [0305] 본 발명의 치료적 방법은 다른 MAb(즉, 191P4D12 MAb 또는 다른 단백질에 결합하는 Mab)의 조합 또는 칵테일뿐만 아니라, 단일 191P4D12 ADC의 투여를 의도한다. 이와 같은 MAb 칵테일은 다른 에피토프를 표적화하거나, 다른 효과기 메카니즘을 개척하거나 또는 세포독성 MAb를 면역 효과기 기능성에 의존하는 MAb와 직접적으로 결합시키는 MAb들을 포함하는 만큼 특정한 이점을 가질 수 있다. 이와 같은 조합된 MAb들은 상승 효과적인 치료 효능을 나타낼 수 있다. 또한 191P4D12 MAb는 다양한 화학치료적 또는 생물학적 약제, 안드로겐-차단제, 면역조절제(예컨대, IL-2, GM-CSF), 수술 또는 방사능을 포함하며 이에 제한되지 않는 다른 치료적 형태와 함께 부수적으로 투여될 수 있다. 바람직한 실시상태에서, 191P4D12 MAb는 컨쥬게이트된 형태로 투여된다.

[0494] [0306] 191P4D12 ADC 제제는 항체를 종양 세포에 전달할 수 있는 그 어떠한 경로를 통해서라도 투여된다. 투여의 경로는 정맥 내, 복막 내, 근육 내, 종양 내, 피부 내 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 치료는 일반적으로 정맥 내 주입(IV)과 같이 수용가능한 투여 경로를 경유하여, 전형적으로 0.1, .2, .3, .4, .5, .6, .7, .8, .9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25 mg/kg(체중)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 투여량으로 191P4D12 ADC 조제물을 반복적으로 투여하는 것과 관련된다. 일반적으로 주당 10-1000 mg MAb 범위의 투여량이 효과적이고 잘 수용된다.

[0495] [0307] 전이성 유방암 치료에서 헤르셉틴®(Trastuzumab)을 이용한 임상적 경험에 근거한, MAb 조제물의 초기 투여량 약 4 mg/kg(환자 체중 IV)와 이를 따르는 주당 투여량 약 2 mg/kg IV 은 수용가능한 투여 계획을 나타낸다. 바람직하게는, 초기 투여량은 90분 또는 더 긴 주입으로 투여된다. 주기적인 유지 투여량은 초기 투여량이 잘 수용되는 것을 조건으로, 30분 또는 더 긴 주입으로 투여된다. 당업계의 숙련된 자들에 의해 고려되듯이, 다양한 인자가 특정 경우에 있어 이상적인 투여 계획에 영향을 미칠 수 있다. 이와 같은 인자는 특정 환자의 건강 상태뿐만 아니라, 예를 들면 사용된 MAb의 결합 친화력 및 반감기, 환자 중의 191P4D12 발현 정도, 순환하는 쉐드 191P4D12 항원의 정도, 목적하는 정상 상태 항체 농도 레벨, 처리의 빈도 및 본 발명의 치료 방법과 조합하여 사용되는 화학적 치료 또는 다른 약제의 영향을 포함한다.

[0496] [0308] 임의적으로, 가장 효과적인 투여 계획 등의 결정을 돕기 위하여, 환자는 주어진 시료 내 191P4D12의 레벨(예컨대, 순환하는 191P4D12 항원 및/또는 191P4D12 발현 세포의 레벨)을 평가받아야 한다. 이와 같은 평가는 치료 전체를 통해 모니터링 목적으로 또한 사용되며, 다른 파라미터(예를 들면, 방광암 치료에 있어 소변 세포학 및/또는 면역Cyt 레벨, 또는 유사하게, 전립선 암 치료에 있어서 혈청 PSA 레벨)의 평가와 결합하여 치료적 성공을 평가하는데에 유용하다.

[0497] [0309] 본 발명의 목적은 191P4D12 ADC을 제공하는데 있는데, 이는 191P4D12 발현 종양 세포의 성장을 억제 또는 지연시킨다. 본 발명의 다른 목적은 상기 191P4D12 ADC을 사용하여, 특히 다른 약제 또는 면역학적으로 활성인 치료법과 조합한 상기 191P4D12 ADC을 사용하여, 혈관신생 및 다른 생물학적 기능을 억제한 결과 포유류, 바람직하게는 인간 내의 종양 성장을 감소시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0498] XV.) 조합 치료법 (Combination Therapy)

[0499] [0310] 일 실시상태에서, 인간 종양을 포함하는 종양을 화학치료적 약제 또는 방사능 또는 이들의 조합과 결합시킨 191P4D12 ADC으로 처리하는 경우 상승 효과가 있다. 다시 말해, 191P4D12 ADC에 의한 종양 성장의 억제는 화학치료적 약제 또는 방사능 또는 이들의 조합과 결합시키는 경우 기대보다 더 많이 향상된다. 상승효과는 예를 들어, 오직 191P4D12 ADC만의 처리로부터 기대되는 것 또는 191P4D12 ADC 및 화학치료적 약제 또는 방사능을 이용한 치료의 합산 효과로부터 기대되는 것보다, 조합된 치료에 의한 종양 성장의 더 큰 억제에 의하여 나타날 수 있다. 바람직하게는, 상승효과는 암의 감쇠에 의하여 나타내어지는데, 여기에서 상기 감쇠는 191P4D12 ADC로부터, 또는 191P4D12 ADC 및 화학치료적 약제 또는 방사능의 추가적 조합을 사용한 치료로부터는 기대할 수 없는 것이다.

[0500] [0311] 191P4D12 ADC 및 화학치료 또는 방사능 또는 양자의 조합을 사용하여 종양 세포 성장을 억제하는 방법은, 화학치료 또는 방사능 치료를 시작하기 전, 중간 또는 이후 또는 이들의 그 어떠한 조합(즉, 화학치료 및/또는 방사능 치료를 시작하기 전 및 중간, 전 및 이후, 중간 및 이후, 또는 전, 중간 및 이후)에 191P4D12 ADC를 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 191P4D12 ADC 전형적으로 1 및 60일 사이에, 바람직하게는 3 및 40일 사이에, 보다 바람직하게는, 5 및 12일 사이에, 방사능 치료 및/또는 화학적 치료를 시작하기에 앞서 투여된다. 그러나, 치료 프로토콜 및 특정 환자의 요구에 따라, 상기 방법은 가장 효과적인 치료를 제공하고, 환자의 수명을 최대로 연장할 수 있는 방법으로 수행된다.

[0501] [0312] 화학치료적 약제의 투여는 비경구 및 경장 경로에 의한 전신 투여를 포함하는 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 일 실시상태에서, 191P4D12 ADC 및 화학치료적 약제는 분리된 분자로서 투여된다. 화학치료적 약제 또는 화학치료법의 특정한 예로는 시스플라틴(cisplatin), 다카바진(dacarbazine, DTIC), 닥티노마이신(dactinomycin), 메클로레타민(mechlorethamine, nitrogen mustard), 스트렙토조신(streptozocin), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 카무스틴(carmustine, BCNU), 로무스틴(lomustine, CCNU), 독소루비신(doxorubicin, adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 프로카바진(procarbazine), 미토마이신(mitomycin), 시타라빈(cytarabine), 에토포사이드(etoposide), 메토트렉세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 블레오마이신(bleomycin), 파클리탁셀(paclitaxel, taxol), 도세탁셀(docetaxel, taxotere), 알데스루킨(aldesleukin), 아스파라기나세(asparaginase), 부설판(busulfan), 카보플라틴(carboplatin), 클라드리빈(cladribine), 다카바진(dacarbazine), 플록수리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이포스파미드(ifosfamide), 인터페론 알파(interferon alpha), 루프로리드(leuprolide), 메게스트롤(megestrol), 멜팔란(melphalan), 메르캅토퓨린(mercaptopurine), 플리카마이신(plicamycin), 미토탄(mitotane), 페가스파가세(pegaspargase), 펜토스타틴(pentostatin), 피포브로만(pipobroman), 플리카마이신(plicamycin), 스트렙토조신(streptozocin), 타목시펜(tamoxifen), 테니포시드(teniposide), 테스토락톤(testolactone), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 우라실 머스타드(uracil mustard), 비노렐빈(vinorelbine), 겜시타빈(gemcitabine), 클로람부실(chlorambucil), 탁솔(taxol) 및 이들의 조합을 포함한다.

[0502] [0313] 191P4D12 ADC와 조합으로 사용되는 방사능의 원천은 치료되어지는 환자의 외부 또는 내부일 수 있다. 원천이 환자의 외부인 경우, 치료법은 외부 빔 방사 요법(EBRT)으로 알려져있다. 방사능의 원천이 환자 내부인 경우, 그 치료법은 근접 방사선 치료법(brachytherapy, BT)이라고 불리운다.

[0503] [0314] 상기 기술된 치료적 계획은 추가적인 암 치료 약제 및/또는 요법과 추가적으로 결합될 수 있는데, 예를 들면 추가적인 화학치료법, 암 백신, 신호 전달 억제제, 비정상적 세포 성장 또는 암 치료에 유용한 약제, 항체(예컨대, WO/2005/092380에 기술되어 있는 Anti-CTLA-4 항체(Pfizer)) 또는 IGF-1R 및 사이토카인에의 결합에 의하여 암 성장을 억제하는 다른 리간드가 있다.

[0504] [0315] 포유류가 추가적인 화학치료법을 받는 경우, 상기에서 기술한 화학적치료 약제들이 사용될 수 있다. 추가적으로, 성장 인자 억제제, 생물학적 반응 변형제, 항-호르몬 요법, 선택적 에스트로겐 수용체 조절자(SERMs), 혈관신생 억제제 및 항-안드로겐이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-호르몬, 예컨대 놀바덱스(Nolvadex, tamoxifen)과 같은 항-에스트로겐 또는 카소덱스(Casodex, 4'-시아노-3-(4-플루오로페닐설포닐)-2-

하이드록시-2-메틸-3-'-(트리플루오로메틸)프로피온아닐리드)와 같은 항-안드로겐이 사용될 수 있다.

[0505] [0316] 상기 치료적 접근법들은 다양한 범위의 수술적, 화학치료, 또는 방사능 치료 요법 중의 어느 하나와 결합될 수 있다. 본 발명의 치료적 접근법은 화학치료법(또는 다른 치료법)의 감소된 투여량의 사용 및/또는 덜 빈번한 투여를 가능하게 하는데, 이는 모든 환자, 특히 화학치료적 약제의 독성에 잘 순응하지 않는자들에게 이점이다.

[0506] XVI.) 제조 키트/품목

[0507] [0317] 본 명세서에 기술된 실험실적, 예후적, 예방적, 진단적 및 치료적 응용에 사용되기 위하여, 키트는 본 발명의 범위에 속한다. 이와 같은 키트는 바이알 및 튜브 등과 같은 일 이상의 컨테이너를 수용하기 위하여 구획된 캐리어, 패키지 또는 컨테이너를 포함하는데, 각각의 컨테이너는 본 명세에 기술된 사용과 같은 사용을 위한 지시를 포함하는 라벨 또는 삽입물과 함께, 본 방법에 사용되기 위한 분리된 요소 중 하나를 포함한다. 예를 들어, 컨테이너는 탐지가능하게 표지된 또는 표지될 수 있는 항체를 포함할 수 있다. 키트는 약물 유니트를 포함하는 컨테이너를 포함할 수 있다. 상기 키트는 Figure 2 또는 Figure 3의 아미노산 서열 또는 그의 유사체, 또는 그와 같은 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0508] [0318] 본 발명의 키트는 전형적으로 상기에서 기술된 컨테이너와, 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지, 캐리어, 패키지, 콘테이너, 내용물 및/또는 사용을 위한 지시를 나열하는 바이알 및/또는 튜브 라벨, 및 사용을 위한 지시를 갖는 패키지 삽입물을 포함하는, 상업적 및 사용자의 관점에서 바람직한 물질을 포함하는, 그와 결합할 수 있는 일 이상의 다른 컨테이너를 포함할 것이다.

[0509] [0319] 라벨은, 조성물이 특정 치료 또는 예후적, 예방적, 진단적 또는 실험실적 응용과 같은 비치료적 응용에 사용됨을 나타내기 위하여 컨테이너 상에 또는 그와 함께 존재할 수 있으며, 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 인 비보 또는 인 비트로 사용을 위한 지시를 표시할 수 있다. 지시 및 또는 다른 정보 또한 키트 상에 또는 그와 함께 포함되는 삽입물 또는 라벨 상에 포함될 수 있다. 상기 라벨은 컨테이너 상에 또는 그와 결합되어 있을 수 있다. 라벨은 라벨을 형성하는 문자, 숫자 또는 다른 글자가 컨테이너 자체로 몰딩되거나 또는 새겨진 경우 컨테이너 상에 있을 수 있다; 라벨은 그것이 예컨대 패키지 삽입물과 같은, 컨테이너를 또한 보유할 수 있는 저장소 또는 캐리어 내부에 존재하는 경우에, 컨테이너와 결합될 수 있다. 라벨은 조성물이 표 I에 나타난 조직의 암과 같은 상태의 진단, 치료, 예방 및 예상을 위하여 사용된다는 것을 지시할 수 있다.

[0510] [0320] 용어 "키트" 및 "제조 물품"은 동의어로 사용될 수 있다.

[0511] [0321] 본 발명의 또 다른 실시상태에서, 항체 또는 항체 약물 컨쥬게이트(ADCs) 와 같은 조성물, 예컨대, 표 I에 나타난 것과 같은 조직의 암의 진단, 예상, 예방 및/또는 치료에 유용한 물질을 포함하는 제조 물품이 제공된다. 상기 제조 물품은 전형적으로 적어도 한개의 컨테이너 및 적어도 하나의 라벨을 포함한다. 적절한 컨테이너는 예컨대, 병, 바이알, 시린지 및 시험관을 포함한다. 컨테이너는 유리, 금속 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 컨테이너는 아미노산 서열, 소분자, 핵산 서열, 세포 개체 및/또는 항체를 보유할 수 있다. 또 다른 실시상태에서, 컨테이너는 세포 및 조직 중의 191P4D12 단백질 발현을 평가하는데 사용하기 위한, 또는 관련된 실험실적, 예후적, 진단적, 예방적 및 치료적 목적을 위한 항체, 그의 결합 단편 또는 특이적인 결합 단백질을 포함한다: 시약 및 다른 조성물 또는 이러한 목적을 위한 도구가 포함될 수 있는 것처럼, 그와 같은 사용을 위한 지시 및/또는 지침서가 상기 컨테이너 상에 또는 그와 함께 포함될 수 있다.

[0512] [0322] 선택적으로, 컨테이너는 상태의 치료, 진단, 예상 및 예방에 효과적인 조성물을 보유할 수 있으며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어 컨테이너는 피하 주사 바늘에 의하여 관통될 수 있는 마개를 가지는 정맥 용액 자루 또는 바이알일 수 있다). 조성물의 활성 성분은 191P4D12에 특이적으로 결합할 능력이 있는 항체 또는 191P4D12에 특이적으로 결합하는 항체 약물 컨쥬게이트일 수 있다.

[0513] [0323] 제조 물품은 포스페이트-완충 염수, 링거 용액 및/또는 덱스트로스 용액과 같이 약제학적으로 허용되는 완충액을 포함하는 2차 콘테이너를 추가로 포함할 수 있다. 그것은 다른 완충제, 희석제, 필터, 교반기, 바늘, 시린지, 및/또는 사용을 위한 지시 및/또는 지침서가 있는 패키지 삽입물을 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 추가적으로 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0514] [0031] **Figure 1.** Figure 1에 191P4D12의 cDNA 및 아미노산 서열을 도시하였다. 개시 메티오닌에 밑줄을 그어 표시하였다. 오픈 리딩 프레임은 종결 코돈을 포함하여 핵산 264-1796에 연장되어 있다.

[0032] **Figures 2A-B.** 191P4D12 항체의 핵산 및 아미노산 서열. **Figure 2A.** Ha22-2(2,4)6.1 중쇄의 cDNA 및 아미노산 서열. 이중 밑줄은 리더 서열, 밑줄은 중쇄 가변부, 그리고 점선으로 된 밑줄은 인간 IgG1 불변부이다. **Figure 2B.** Ha22-2(2,4)6.1 경쇄의 cDNA 및 아미노산 서열 이중 밑줄은 리더 서열, 밑줄은 경쇄 가변부, 그리고 점선으로 된 밑줄은 인간 카파 불변부이다.

[0033] **Figures 3A-B**. 191P4D12 항체의 아미노산 서열. **Figure 3A.** Ha22-2(2,4)6.1 중쇄의 아미노산 서열. 이중 밑줄은 리더 서열, 밑줄은 중쇄 가변부, 그리고 점선으로 된 밑줄은 인간 IgG 불변부이다. **Figure 3B.** Ha22-2(2,4)6.1 경쇄의 아미노산 서열. 이중 밑줄은 리더 서열, 밑줄은 경쇄 가변부, 그리고 점선으로 된 밑줄은 인간 카파 불변부이다.

[0034] **Figures 4A-B**. 인간 Ig 생식세포에 대한 Ha22-2(2,4)6.1 항체의 정렬도. **Figure 4A.** 인간 Ig 생식세포에 대한 Ha22-2(2,4)6.1 중쇄의 정렬도. **Figure 4A.** 인간 Ig 생식세포에 대한 Ha22-2(2,4)6.1 경쇄의 정렬도.

[0035] **Figures 5A-B**. Ha22-2(2,4)6.1 MAb 결합 분석. **Figure 5A:** RAT-대조군 및 RAT-191P4D12 세포를 하이브리도마 또는 CHO 세포로부터의 Ha22-2(2,4)6.1 MAb로 염색하였다. 유세포 분석기에 의해 결합을 검사하였다. 그 결과 CHO 세포에서 재조합적으로 발현된 Ha22-2(2,4)6.1 MAb가 분비되어 세포-표면 191P4D12에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다. **Figure 5B:** 하이브리도마 또는 CHO 세포로부터의 Ha22-2(2,4)6.1 MAb를 ELISA를 이용하여 재조합 191P4D12 정제된 세포외 단백질에 대한 결합에 관하여 검사하였다. 그 결과 CHO 및 하이브리도마로부터 유래된 Ha22-2(2,4)6.1에 대한 191P4D12 단백질의 결합은 동일한 것으로 나타났다.

[0036] **Figures 6**. PC3-인간-191P4D12 세포를 이용하여 FACS에 의한 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 친화도 측정. 친화도는 0.69 Kd이다.

[0037] **Figure 7**. PC3-시노몰구스-191P4D12 세포를 이용한 FACS에 의한 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 친화도 측정. 친화도는 0.34 Kd이다.

[0038] **Figure 8**. PC3-래트-191P4D12 세포를 이용한 FACS에 의한 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 친화도 측정. 친화도는 1.6 Kd이다.

[0039] **Figures 9A-D**. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE에 의해 매개된 세포독성. **Figure 9A:** PC3-인간-191P4D12 세포를 이용한 세포독성 분석. **Figure 9B:** PC3-시노몰구스-191P4D12 세포를 이용한 세포독성 분석. **Figure 9C:** PC3-래트-191P4D12 세포를 이용한 세포독성 분석. **Figure 9D:** PC3-Neo 세포를 이용한 세포독성 분석.

[0040] **Figure 10**. FACS에 의한 Ha22-(2,4)6.1 MAb의 도메인 매핑.

[0041] **Figure 11**. 웨스턴 블롯 분석에 의한 Ha22-2(2,4)6.1 MAb 도메인 매핑.

[0042] **Figure 12**. SCID 마우스에 있어서 인간 폐암 이종이식편 AG-L4의 피하 종양 형성 모델에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 평가. 평가 결과 191P4D12 MAbs는 SCDI 마우스에 있어서 인간 폐암 이종이식편 AG-L4의 종양 성장을 유의적으로 억제하지 않은 것으로 나타났다.

[0043] **Figure 13**. SCID 마우스에 있어서 인간 췌장암 이종이식편 HPAC의 피하 종양 형성 모델에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 평가. 평가 결과 191P4D12 MAbs는 대조군 항체와 비교할 때 SCID 마우스에 있어서 인간 췌장암 이종이식편의 종양 성장을 억제하지 않은 것으로 나타났다.

[0044] **Figure 14**. SCID 마우스에 있어서 인간 췌장암 이종이식편 AG-Panc3의 피하 종양 형성 모델에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 평가. 평가 결과 191P4D12 MAbs는 대조군 항체와 비교할 때 SCID 마우스에 있어서 인간 췌장암 이종이식편의 종양 성장을 억제하지 않은 것으로 나타났다.

[0045] **Figure 15**. SCID 마우스에 있어서 피하 수립된 인간 폐암 이종이식편 AG-L4에서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능. 시험 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE를 이용한 처리는 처리군 및 무처리 대조군 양자 모두와 비교할 때 누드 마우스에 피하 이식된 AG-L4 폐암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다.

[0046] **Figure 16**. SCID 마우스에 있어서 피하 수립된 인간 유방암 이종이식편 BT-483에서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능. 시험 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE를 이용한 처리는 처리군 및 무처리 대조군 ADCs와 비교할 때 SCID 마우스에 피하 이식된 BT-483 유방암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다.

[0047] **Figure 17**. SCID 마우스에 있어서 피하 수립된 인간 방광암 이종이식편 AG-B1에서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능. 시험 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE를 이용한 처리는 대조군 ADCs와 비교할 때 AG-B1 방광암 이

종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다.

[0048] **Figure 18**. SCID 마우스에 있어서 피하 수립된 인간 췌장암 이종이식편 AG-Panc2에서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능. 시험 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE를 이용한 처리는 대조군 ADCs와 비교할 때 AG-Panc2 췌장암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다.

[0049] **Figure 19**. SCID 마우스에 있어서 피하 수립된 인간 폐암 이종이식편 AG-Panc4에서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능. 시험 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE를 이용한 처리는 대조군 ADCs와 비교할 때 AG-Panc4 췌장암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다.

[0050] **Figure 20**. SCID 마우스에 있어서 피하 수립된 인간 방광암 이종이식편 AG-B8에서의 비교 투여량에 있어서 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능. 시험 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE를 10mg/kg의 양으로 이용한 처리는 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE를 5 mg/kg의 양으로 이용한 경우에 비하여 AG-B8 방광암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다.

[0051] **Figures 21A-N**. IHC에 의한 암환자 피검물 내에서의 191P4D12 단백질의 검출. **Figures 21A-B**는 방광암 피검물을 나타낸다. **Figures 21C-D**는 유방암 피검물을 나타낸다. **Figures 21E-F**는 췌장암 피검물을 나타낸다. **Figures 21G-H**는 폐암 피검물을 나타낸다. **Figures 21I-J**는 난소암 피검물을 나타낸다. **Figures 21K-L**는 식도암 피검물을 나타낸다. **Figures 21M-N**은 식도암 피검물을 나타낸다.

[0052] **Figures 22A-B**. 정제된 재조합 191P4D12 (ECD 아미노산 1-348)에 대한 Ha22-2(2,4)6.1 Mab 및 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 친화도를 측정하는데 사용된 결합 곡선을 도시한 도면.

[0053] **Figures 23A-D**. 191P4D12 **(Figure 23A)** 및 시노몰구스 원숭이로부터의 오솔로그(ortholog)**(Figure 23B)**, 래트로부터의 오솔로그 **(Figure 23C)** 및 마우스로부터의 오솔로그 **(Figure 23D)**를 발현하는 PC3 세포에 대한 Ha22-2(2,4)6.1의 결합을 도시한 도면.

[0054] **Figures 24A-D**. 이중 돌연변이 A76I, S91N에 대한 Ha22-2(2,4)6.1의 결합은 쥐의 오솔로그 결합에 대한 것과 유사함을 보여준다.

[0055] **Figure 25**. PyMOL을 이용하여 Ig-도메인 함유 단백질과 191P4D12의 패밀리 멤버에 대한 공개된 결정구조 데이터에 기반한 191P4D12의 V-도메인의 모델을 나타낸 도면이다. Ala-76 (점묘처리 부분) 및 Ser-91 (교차빗금처리 부분)이 도시되어 있다.

[0056] **Figures 26A-C**는 Ha22-2(2,4)6.1이 V-도메인 발현 세포 **(Figure 26A)** 뿐만 아니라 야생형 191P4D12 **(Figure 26B)**에 대하여도 결합하나, 먼저 생산된 C1C2 도메인 발현 세포에 대하여는 결합하지 않음을 보여준다. **(Figure 26C)**.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0515] 실시예

[0516] [0324] 본 발명의 다양한 관점은 하기에 기술될 수개의 실시예의 방법에 의해 추가적으로 설명되고 묘사되는데, 이들은 본 발명의 범위를 제한하기 위한 의도가 아니다.

[0517] 실시예 1

[0518] 191P4D12 항원

[0519] [0325] 공지기술인 억제차감 혼성화 (Suppression Subtractive Hybridization: SSH) 방법에 의하여 191P4D12 유전자 서열이 밝혀졌다. 표준 방법을 이용하여 아홉 (9)개의 정상 조직 풀로부터 유래된 방광종양 마이너스 cDNAs로부터 223 bp의 191P4D12 SSH 서열을이 동정되었다. 191P4D12의 전장 cDNA 클론을 방광암 cDNA 라이브러리로부터 단리하였다. 이 cDNA는 길이가 3464 bp이고 510 아미노산 ORF (Figure 1 참조)를 코딩한다. 191P4D12 유전자는 Nectin-4 유전자에 대해 상동성을 나타낸다. 이와 관련하여, US2004/0083497 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA) 및 PCT 공개 WO2004/016799 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA)를 추가로 참조할 수 있다. 예컨대, 191P4D12 항원에 대하여는 Figure 1을 참조할 수 있다.

[0520] 실시예 2

[0521] 191P4D12 모노클로날 항체(MAbs)의 생성

[0522] [0326] 일 실시상태에서, 191P4D12 및 191P4D12 변이체에 대한 치료적 모노클로날 항체("MAbs")는 각각의 단백질에 특이적이거나 또는 변이체 간에 공통되는 서열에 특이적인 에피토프와 반응하는 것, 191P4D12 또는 191P4D12 변이체의 생물학적 기능에 결합, 내재화, 방해 또는 조절하는 것, 예를 들면 리간드, 기질 및 결합 파트너와의 결합을 방해하는 것을 포함한다. 이와 같은 MAb의 발생을 위한 면역원은 세포외 도메인 또는 191P4D12 단백질 서열 전체, 기능적 모티프를 포함하는 것으로 예측되는 부분 및 아미노산 서열의 컴퓨터 분석으로부터 항원성인 것으로 예측된 191P4D12 단백질 변이체의 영역을 인코딩하거나 또는 포함하도록 설계된 것들을 포함한다. 면역원은 tag5-191P4D12, His 태그된 단백질로부터 유래한 정제된 포유류 세포와 같은 펩타이드 및 재조합 단백질을 포함한다. 또한, RAT1-191P4D12 또는 300.19-191P4D12와 같이, 높은 레벨의 191P4D12을 발현하도록 엔지니어링된 세포가 마우스를 면역화하기 위해 사용된다.

[0523] [0327] 191P4D12에 대한 MAb는 마우스 중쇄 및 kappa 경쇄 자리가 불활성화되어 있고, 인간 중쇄 및 kappa 경쇄 면역 글로불린 자리의 대다수가 삽입되어 있는 XenoMouse technology®(Amgen Fremont)을 사용하여 생성시켰다. Ha22-2(2,4)6.1로 명명된 MAb는 pTag5/mychis-191P4D12 (아미노산 23-351)를 갖는 인간 γ1 생성 제노마우스를 면역화하여 발생시켰다.

[0524] [0328] 191P4D12 MAb Ha22-2(2,4)6.1은 ELISA에 의하여 pTag5/mychis-191P4D12 단백질에 특이적으로 결합하며 191P4D12 발현 재조합 세포 (PC3-191P4D12) 및 191P4D12을 발현하는 다수의 암세포주에 특이적으로 결합한다.

[0525] [0329] Ha22-2(2,4)6.1이라고 명명된 항체를 생산하는 하이브리도마를 ATCC(American Type Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108)로 2010년 8월 18일에 보내어(연방 익스프레스를 경유) 수탁번호 PTA-11267을 할당받았다.

[0526] [0330] 191P4D12 MAb Ha22-2(2,4)6.1에 대한 DNA 코딩 서열은 트리졸 시약(Life Technologies, Gibco BRL)을 사용하여 각각의 하이드로마 세포로부터 mRNA를 분리한 후에 결정하였다.

[0527] [0331] 항-191P4D12 Ha22-2(2,4)6.1 중쇄 및 경쇄 가변 핵산 서열은 다음의 프로토콜을 사용하여 하이드로마 세포로부터 시퀀싱하였다. Ha22-2(2,4)6.1 분비 하이드로마 세포를 트리졸 시약(Life Technologies, Gibco BRL)으로 용해하였다. 총 RNA를 정제하고 정량화하였다. Gibco-BRL Superscript Preamplification 시스템을 사용한 올리고 (dT)12-18 프라이밍으로 총 RNA로부터 cDNA의 첫번째 가닥을 생성시켰다. 첫번째 cDNA 가닥을 인간 면역 글로불린 가변 중쇄 프라이머 및 인간 면역 글로불린 가변 경쇄 프리아머를 사용하여 증폭시켰다. PCR 산물을 시퀀싱하고, 가변 경쇄 및 중쇄 영역을 결정하였다.

[0528] [0332] 가변 중쇄 및 경쇄 영역의 핵산 및 아미노산 서열을 Figure 2 및 Figure 3에 나열하였다. 인간 Ig 생식세포(germline)에 대한 Ha22-2(2,4)6.1의 정렬도를 Figure 4A-4B에 나타내었다.

[0529] 실시예 3

[0530] 재조합 DNA 기법을 사용한 Ha22-2(2,4)6.1의 발현

[0531] [0333] 형질감염된(transfected) 세포 중에 Ha22-2(2,4)6.1 MAb을 재조합적으로 발현시키기 위하여, Ha22-2(2,4)6.1 MAb 가변 중쇄 및 경쇄 서열을 인간 중쇄 IgG1 및 인간 경쇄 Igκ불변 영역의 업스트림에 각각 클로닝하였다. 완전한 Ha22-2(2,4)6.1 MAb 인간 중쇄 및 경쇄 카세트를 클로닝 벡터 중의 CMV 프로모터/인핸서의 다운스트림에 클로닝하였다. 폴리아데닐화 영역을 MAb 코딩 서열의 다운스트림에 포함시켰다. 재조합 Ha22-2(2,4)6.1 MAb 발현 구조물(construct)을 CHO 세포 내로 형질감염시켰다. 유세포 분석기를 이용하여 재조합 세포로부터 분비되는 Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 세포 표면 191P4D12에의 결합을 평가하였다(Figure 5A). Ha22-2(2,4)6.1 중쇄 및 경쇄 벡터 구조물로 형질감염시킨 하이드로마 또는 CHO 세포로부터 유래한 Ha22-2(2,4)6.1 Mab로 래트-대조군 및 래트-191P4D12 세포를 염색하였다. 유세포 분석기로 결합을 측정하였다.

[0532] [0334] 그 결과, CHO 세포 내에서 발현된 재조합적으로 발현되는 Ha22-2(2,4)6.1이, 하이드로마로부터 정제된 Ha22-2(2,4)6.1과 유사하게 191P4D12에 결합하는 것으로 나타났다. 재조합 세포로부터 분비된 Ha22-2(2,4)6.1 Mab에 대하여도 ELISA를 이용하여 191P4D12 재조합 단백질에 대한 결합에 대해 평가하였다. Figure 5B에 도시된 바와 같이, 191P4D12 단백질에 대한 Ha22-2(2,4)6.1의 결합은 CHO로부터 유래된 MAb 물질과 하이브리도마 세포로부터 유래된 MAb 물질 사이에 동일하였다.

[0533] 실시예 4

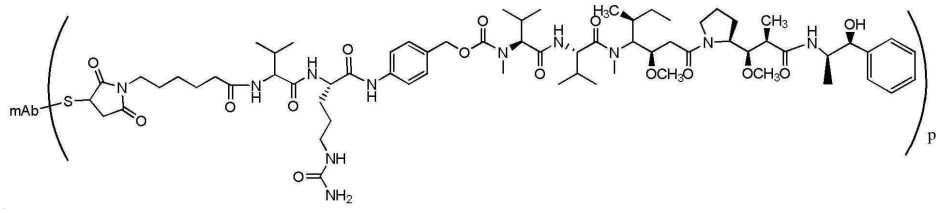
[0534] Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 항체 약물 컨쥬게이션

[0535] [0335] 하기 프로토콜에 따라 본 명세서에 기술된 vc (Val-Cit) 링커를 사용하여 MMAE라고 명명된 아우리스타틴 (auristatin) 유도체(Formula XI)에 Ha22-2(2,4)6.1 Mab(Figure 2)를 컨쥬게이션시켜, Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE라고 명명된 본 발명의 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)를 만들었다. 표 IV에 나타난 일반적인 방법을 사용하여 (Val-Cit) 링커의 MMAE (Seattle Genetics, Seattle, WA)에 대한 컨쥬게이션을 완결하여 세포독성 vcMMAE를 만들어 냈다(참조, US 특허 7,659,241).

[0536] [0336] 이어서, Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE라고 명명된 본 발명의 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)를 다음의 프로토콜에 따라 만들었다.

[0537] [0337] 간단히, pH 5.0의 10 mM 아세테이트, 1% 소르비톨, 3% L-아르기닌 중 Ha22-2(2,4)6.1MAb의 15 mg/mL 용액에 pH 8.4의 0.1 M TrisCl 20 부피%, 25mM EDTA 및 750 mM NaCl을 첨가하여 용액의 pH를 7.5로 조정하고, 5mM EDTA 및 150 mM의 염화나트륨으로 한다. 이어서 2.3 몰 당량 (molar equivalents)의 TCEP (MAb에 대한 mole)를 첨가함으로써 MAb를 부분적으로 환원시킨 다음 37℃에서 2 시간 동안 교반한다. 이어서, 부분 환원된 MAb 용액을 5℃로 냉각하고 4.4 몰 당량의 vcMMAE (항체에 대한 mole)를 6% (v/v) DMSO 용액으로서 첨가한다. 이 혼합물을 5℃에서 60분간 교반한 다음, vcMMAE에 상대적으로 N-아세틸시스테인 1 몰 당량을 첨가한 후 15분간 더 교반한다. 과량의 급냉된 vcMMAE 및 기타 반응 성분들을 pH 6.0의 20 mM 히스티딘 10배 부피를 이용하여 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)의 한외여과/디아필트레이션에 의해 제거한다.

[0538] 결과적인 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)는 다음 화학식을 가지며, Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE라 명명하였다:

[0539] 

[0540] 식 중, MAb는 Ha22-2(2,4)6.1 (Figure 2 및 Figure 3)이고 p는 1 내지 8이다. 이 실시예에서 설정된 항체 약물 컨쥬게이트의 p 값은 약 3.8이었다.

[0541] 실시예 5

[0542] Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 특징화

[0543] [0339] 191P4D12에 결합하는 항체 약물 컨쥬게이트들을 "Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 항체 약물 컨쥬게이션"이라는 제목의 실시예에 설명된 방법을 이용하여 생성시키고, 이들을 스크리닝하여 동정한 다음 공지기술의 분석법을 조합하여 특징화하였다.

[0544] A. FACS에 의한 친화도 측정

[0545] [0340] 각각 PC3-인간-191P4D12, PC3-시노몰구스-191P4D12, 및 PC3-래트-191P4D12 세포의 표면상에 발현된 191P4D12에 대한 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 친화도를 검사하였다. 간단히, Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 열한가지 (11) 희석물을 160 nM 내지 0.011 nM의 최종 농도의 각각의 세포 종류 (웰 당 50,000개의 세포)와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 말기에, 세포들을 세척하고 4℃에서 45분간 항-hIgG-PE 검출 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 미결합 검출 항체를 씻어낸 후, 세포들을 FACS에 의해 분석하였다. 평균 형광 강도 (MFI) 값이 Figure(s) 6-8에 나타낸 바와 얻어졌다. MFI 값을 Graphpad Prisim 소프트웨어에 입력하고 단일지점 결합 (쌍곡선) 방정식 Y=Bmax*X/(Kd+X)을 이용하여 분석하여, Figure(s) 6-8에 각각 도시된 바와 같은 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 포화 곡선을 얻었다. Bmax는 191P4D12에 대한 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 최대 결합시의 MFI 값이고; Kd는 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 결합 친화도로서, 하프 최대(half-maximal) 결합을 달성하는데 요구되는 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 농도이다.

[0546] [0341] PC3-인간-191P4D12, PC3-시노몰구스-191P4D12, 및 PC3-래트-191P4D12 세포의 표면에 각각 발현된 191P4D12에 대한 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 계산된 친화도 (Kd)는 각각 0.69 nM (Figure 6), 0.34 nM (Figure 7), 및 1.6 nM (Figure 8)이다.

[0547] B. SPR에 의한 친화도 측정

[0548] [0342] Ha22-2(2,4)6.1 MAb 및 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 정제된 재조합 191P4D12 (ECD 아미노산 1-348)에 대한

친화도를 표면 플라즈몬 공명법 (Surface Plasmon Resonance: SPR) (BIAcore)에 의해 측정하였다. 간략히 설명하면, 염소-항-인간 Fc_{γ} 폴리클로날 Abs (Jackson Immuno Research Labs, Inc.)를 CM5 센서 칩(Biacore) 상에 공유적으로 고정시켰다. 이어서, 정제된 Ha22-2(2,4)6.1 MAb 또는 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE를 상기 칩의 표면 상에 포착시켰다. 매 사이클마다 평균, 약 300 RUs의 테스트 Ha22-2(2,4)6.1 MAb 또는 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE가 포착되었다. 이어서, 재조합 191P4D12 (ECD 아미노산 1-348)의 1 nM 내지 100 nM 범위의 5 내지 6 계대 희석물을 이러한 표면에 주사하여 결합 곡선 (센소그램)을 얻고 BIAevaluation 3.2 및 CLAMP 소프트웨어 (Myszka and Morton, 1998) 를 이용하여 1:1 상호반응 모델에 대체로 맞게끔 프로세싱하였다 (Figure 22). 표 V에 재조합 191P4D12 (ECD 아미노산 1-348)에 대한 Ha22-2(2,4)6.1 MAb 및 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 친환도 뿐만 아니라 결합 및 해리 속도 상수도 요약하였다.

[0549] C. Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 도메인 매핑

[0550] [0343] 191P4D12 단백질의 특정 도메인에 대한 Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 결합 부위를 매핑하기 위하여, 이러한 도메인 (또는 도메인의 조합)을 발현하는 몇몇 Rat1(E) 재조합 세포주들을 생성시켰다 (표 VI). Ha22-2(2,4)6.1의 세포 표면에 대한 결합을 표준 프로토콜을 이용하여 FACS에 의해 평가하였다. Figure 10에 도시된 바와 같이, Ha22-2(2,4)6.1 MAb는 VC1 도메인 발현 세포 뿐만 아니라 야생형 191P4D12에도 결합하지만, C1C2 도메인 발현 세포에는 결합하지 않는다. 이에 더해서, Ha22-8e6.1이라 명명된 또 다른 191P4D12 MAb는 세포 표면 상의 191P4D12의 C1C2 도메인은 인식하지만, VC1 도메인은 인식하지 않는다. 이것은 Ha22-2(2,4)6.1 MAb에 대한 결합 부위가 191P4D12의 1-147 아미노산 도메인 내에 위치하지만, 191P4D12에 결합하는 MAb 모두가 이 도메인을 인식하는 것은 아님을 시사하는 것이다.

[0551] [0344] Figure 10에 제시된 결과를 보다 확실히 하기 위해서, 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다. 간략히 설명하면, 191P4D12의 세포외 전체부 (전장)과 표 VI에 제시된 특이적 도메인들을 293T 세포에서 쥐의 Fc 융합 단백질로서 발현시켜 정제하였다. 염소 항-마우스-HPR를 대조군으로서 사용하였다. Figure 11에 도시된 바와 같이, SDS-PAGE (환원되지 않음) 상에서 분해되어(resolved) Ha22-2(2,4)6.1-바이오틴으로 프로브된 다음 스트렙트아비딘-HRP에 의해 프로브된 경우, 전장 191P4D12 (레인 1), V (레인 2) 및 VC1 (레인 3) 융합 구조물에 대응하는 밴드들이 인식되었으나, C1C2 융합 구조물 (레인 4)는 인식되지 않았다. 이것은, Ha22-2(2,4)6.1 MAb에 대한 결합 에피토프가 191P4D12의 1-147 aa 도메인 내에 위치함을 더욱 시사하는 것이다.

[0552] 실시예 6

[0553] Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE에 의해 매개된 세포독성

[0554] [0345] 191P4D12-의존성 세포독성을 매개하는 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 능력을, 인간 191P4D12, 시노몰구스 191P4D12 및 래트 191P4D12를 발현하도록 엔지니어링된 PC3 세포들에서 평가하였다. 간단히 설명하면, PC3-네오, PC3-인간-191P4D12 세포, PC3-시노몰구스-191P4D12 또는 PC3-래트-191P4D12 세포들 (1500 세포/웰)을 제1일에 96웰 플레이트에 접종하였다. 다음날, 표시 농도의 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 또는 vcMMAE가 컨쥬게이트된 대조군 MAb (즉, 대조군-vcMMAE)을 함유하는 동 부피의 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 세포들을 37℃에서 4일간 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 기간 말기에, 각각의 웰에 알라마 블루(Alamar Blue)를 첨가하고 4시간 더 계속 인큐베이션시켰다. 여기 파장 620 nM 및 방출 파장 540 nM를 이용하여 Biotek 플레이트 판독기를 이용함으로써, 결과적인 형광을 검출하였다.

[0555] [0346] Figure 9A-9D의 결과는 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE가 PC3-인간-191P4D12 (Figure 9A), PC3-시노몰구스-191P4D12 (Figure 9B), 및 PC3-래트-191P4D12 세포(Figure 9C)에 있어서 세포독성을 매개하는 반면, vcMMAE와 컨쥬게이트된 인간 IgG 대조군은 아무 효과가 없었음을 보여준다. 191P4D12를 발현하지 않는 PC3-Neo 세포에 대한 독성 결여는 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 특이성을 더욱 입증하는 것이다 (Figure 9D). 따라서, 이러한 결과들은 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE가 191P4D12를 발현하는 세포에 약물을 선택적으로 전달하여 이들 세포를 사멸시킬 수 있음을 가리키는 것이다.

[0556] 실시예 7

[0557] Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE는 종양의 성장을 인 비보 억제한다

[0558] [0347] 종양 조직의 세포 표면 상에서 191P4D12의 현저한 발현은 정상 조직 중에서 그의 제한된 발현과 결합하여, 191P4D12를 항체 치료법 및 이와 유사하게 ADC를 통한 치료법의 좋은 표적으로 만든다. 따라서 인간 방광암, 폐암, 유방암 및 췌장암 이종이식편 마우스 모델에서의 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE의 치료적 효과를 평가한

다.

[0559] [0348] 종양 성장 및 전이 형성에 대한 항체 약물 컨쥬게이트의 효과를 마우스 암 이종이식편 모델에서 연구하였다(예컨대, 피하(subcutaneous) 및 동소(orthotopically)).

[0560] [0349] 마트리겔(Collaborative Research)과 1:1의 희석 비율로 혼합된 5 x 10^4- 10^6의 암세포를 웅성 SCID 마우스의 오른쪽 옆구리에 주입하여 피하(s.c.) 종양을 발생시킨다. 종양 형성에 대한 ADC 효과를 시험하기 위하여, ADC를 종양 세포 주입과 동일한 날에 주입하기 시작한다. 대조군으로서, 정제된 인간 IgG 또는 PBS; 또는 인간 세포 중에서 발현되지 않는 관계없는 항원을 인식하는 정제된 MAb를 마우스에 주입한다. 예비 연구에서 대조군 IgG 또는 PBS의 종양 성장에 대한 차이가 발견되지 않았다. 종양의 크기는 캘리퍼 측정으로 구하고, 종양의 부피는 폭^2 x 길이/2로서 계산하되, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기를 칭한다. 직경 1.5 cm보다 더 큰 피하 종양을 갖는 마우스를 희생시킨다.

[0561] [00350] 난소암은 종종 전이하여 복막 공동 내에서 성장한다. 따라서, 2 밀리온의 세포를 자성 마우스의 복강 속으로 직접 주입함에 의하여, 마우스 중 난소암의 복막 공동 내 성장을 수행한다. 마우스의 일반적인 건강, 신체적 활동성 및 외관을 사멸 직전까지 관찰한다. 희생시키는 때에, 종양의 적하를 측정을 위하여 복막 공동을 관찰할 수 있고 , 먼 부분까지의 전이를 평가하기 위하여 폐를 적출할 수 있다. 또는 사멸을 종말점으로 사용할 수 있다. 그 다음 복강내로 주입되는 191P4D12 또는 MAb와 함께 적절한 치료를 위하여 마우스를그룹으로 분리한다.

[0562] [0351] 이종이식편 암 모델의 한가지 장점은 신생혈관화 및 혈관신생을 연구할 수 있다는 것이다. 종양의 성장은 부분적으로는 신생혈관 발달에 의존한다. 모세관계 및 발달 중의 혈관 네트워크가 숙주 고유의 것이기는 하지만 신생혈관계의 시작 및 축조는 이종이식편 종양에 의해 조절된다(Davidoff *et al.*, Clin Cancer Res. (2001) 7:2870; Solesvik *et al.*, Eur J Cancer Clin Oncol. (1984) 20:1295). 신생혈관화에 미치는 항체 및 소분자의 영향은 종양 조직 및 그들 주변 미세 환경의 IHC 분석과 같은, 당업계에서 알려진 절차에 따라 연구된다.

[0563] [0352] Ha22-2(2,4)6.1ADC는 폐암, 방광암, 유방암 및 췌장암 이종이식편 형성을 억제한다. 이러한 결과는 암, 좋기로는 표 I에 제시된 암들의 국소적 및 진전된 단계의 암을 치료하는데 있어서 Ha22-2(2,4)6.1ADC가 유용함을 가리키는 것이다.

[0564] 191P4D12 ADCs:

[0565] [0353] "191P4D12 모노클로날 항체 (MAbs)의 생성"이라는 제하의 실시예에 기술된 바에 따라 191P4D12에 대한 모노클로날 항체를 만들었다. 또한, 이들 MAb들을 "Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 항체 약물 컨쥬게이션"이라는 제목의 실시예에 설명된 바와 같이, 독소에 컨쥬게이션시켜 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE을 형성한다. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE를 FACS 및 기타 공지기술에 의해 특징화시켜 191P4D12에 결합하는 그의 능력을 측정하였다.

[0566] 세포주 및 이종이식편:

[0567] [0354] BT-483 및 HPAC 세포들을 공지기술에 따라, L-글루타민 및 10% FBS가 보강된 DMEM에서 유지시킨다. AG-B8, AG-Panc4, AG-Panc2, AG-B1, AG-L4, 및 AG-Panc3 이종이식편들을 SCID 마우스에서 계대증식에 의해 유지시킨다.

[0568] SCID 마우스 내 인간 폐암 이종이식편 AG-L4의 피하 종양형성 모델에

[0569] 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE MAb의 평가

[0570] [0355] 이 실험에서, 환자-유래의 폐암 이종이식편 AG-L4를 SCID 마우스에서 계대시킴으로써 유지하였다. 스톡(stock) 종양을 멸균 수확후 효소 분해시켜 단일 세포 현탁액으로 만들었다. 각각의 SCID 마우스의 옆구리에 2백만개의 세포들을 이식시켰다. 이어서 동물들을 7개의 그룹, 즉: 6개의 191P4D12 항체 처리군 및 대조군 항체 H3-1.10.1.2 군 (n=10)으로 무작위적으로 배당하였다. 모든 항체들을 연구 종료시까지 1주일에 2회씩 동물 1마리 당 750 μg의 양으로 복강 투여하였다. 종양 성장을 3 내지 4일마다 캘리퍼로 측정하여 모니터링하였다. 종양 크기는 폭^2 x 길이/2로서 계산하였고, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기값이다.

[0571] [0356] 시험 결과 191P4D12 MAb는 SCDI 마우스 내의 인간 폐 이종이식편 AG-L4에서 종양 성장을 유의적으로 억제하지 않은 것으로 나타났다. 또한, 다른 191P4D12 MAbs도 이 연구에 이용되었다. 결과를 나타내지는 않았

다.(Figure 12).

[0572] SCID 마우스 내의 인간 췌장암 이종이식편 HPAC의 피하 종양형성 모델에

[0573] 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1 vc MAb의 평가

[0574] [0357] 또 다른 실험에서, 인간 췌장암 HPLC 세포 (2,000,000/마우스)를 각 SCID 마우스의 옆구리에 주사하였다. 이어서 동물들을 무작위적으로 8개의 그룹, 즉: 7개의 191P4D12 항체 처리군 및 1개의 대조군 항체 H3-1.4.1.2 군 (n=10)으로 나누었다. 모든 항체들을 이 연구 종료시까지 1주일에 2회씩 동물 1 마리당 500 μg의 양으로 투여하였다. 종양 성장을 3 내지 4일마다 캘리퍼로 측정하여 모니터링하였다. 종양 크기는 폭^2 x 길이/2로서 계산하였고, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기값이다.

[0575] [0358] 평가 결과 191P4D12 MAb는 대조군 항체와 비교할 때, SCID 마우스 내의 인간 췌장암 이종이식편에서의 종양 성장을 억제하지 않은 것으로 나타났다. 또한, 다른 191P4D12 MAbs도 이 연구에 이용하였다. 결과는 나타내지 않았다. (Figure 13).

[0576] [0359] SCID 마우스 내의 인간 췌장암 이종이식편 AG-Panc3의 피하 종양형성 모델 중의 Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 평가.

[0577] [0360] 또 다른 실험에서, 환자-유래된 췌장암 이종이식편 AG-Panc3을 SCID 마우스에서 계대시켜 유지하였다. 스톡 종양을 멸균 수확하고 1 mm^3 크기의 시편으로 잘게 다졌다. 6개의 시편들을 각각의 SCID 마우스의 옆구리 내로 이식하였다. 이어서 동물들을 다음의 집단들로 무작위적으로 할당하였다, 즉: 2개의 191P4D12 MAb 처리군 및 1개의 대조군 항체 H3-1.4.1.2 군. 모든 항체들을 연구 종료시까지 1주일에 2회 동물 1 마리 당 500 μg의 양으로 복강 투여하였다. 종양 성장을 3 내지 4일마다 칼리퍼 측정함으로써 모니터링하였다. 종양 크기는 폭^2 x 길이/2로서 계산하였고, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기값이다.

[0578] [0361] 평가 결과 191P4D12 MAb는 대조군 항체와 비교할 때, SCID 마우스 내의 인간 췌장암 이종이식편에서의 종양 성장을 억제하지 않은 것으로 나타났다. 또한, 다른 191P4D12 MAbs도 이 연구에 이용하였다. 결과는 나타내지 않았다. (Figure 14).

[0579] SCID 마우스 내의 피하수립된 인간 폐암 이종이식편 AG-L4에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능

[0580] [0362] 또 다른 실험에서, 환자-유래된 폐암 이종이식편 AG-L13을 SCID 마우스에서 계대시켜 유지하였다. 스톡 종양을 멸균 수확하고 1 mm^3 크기의 시편으로 잘게 다졌다. 6개의 시편들을 각각의 SCID 마우스의 옆구리 내로 이식하였다. 종양의 크기가 약 200 mm^{3}이 될 때까지 종양들을 미처리 상태로 계속 성장시켰다. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 및 대조군 ADC를 정맥 볼루스 주사에 의하여 7일마다 10 mg/kg씩 2회 투여하였다. ADC 투여량은 투여 직전 계량된 개개 동물의 체중에 기초해서 정하였다. 종양 성장을 3 내지 4일마다 칼리퍼 측정함으로써 모니터링하였다. 종양 크기는 폭^2 x 길이/2로서 계산하였고, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기값이다.

[0581] [0363] 평가 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE는 대조군 ADC와 비교할 때 누드 마우스에 피하 이식된 AG-L4 폐암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다. 또한, 다른 191P4D12 MAbs도 이 연구에 이용하였다. 그에 관한 결과는 나타내지 않았다. (Figure 15).

[0582] SCID 마우스 내의 피하 수립된 인간 유방암 이종이식편 BT-483에서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능

[0583] [0364] 이 실험에서, 인간 유방암 BT-483 세포를 이용하여 스톡 이종이식편을 생성하고, 이들을 SCID 마우스에서 계대시켜 유지하였다. 스톡 종양들을 멸균 수확하고 1 mm^3 크기의 시편으로 잘게 다졌다. 6개의 시편들을 각각의 SCID 마우스의 옆구리 내로 이식하였다. 종양의 크기가 약 100 mm^{3}이 될 때까지 종양들을 미처리 상태로 계속 성장시켰다. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 및 대조군 ADC를 정맥 볼루스 주사에 의하여 4일 마다 5 mg/kg의 양으로 4회 투여하였다. ADC 투여량은 투여 직전 계량된 개개 동물의 체중에 기초해서 정하였다. 종양 성장을 3 내지 4일마다 칼리퍼 측정함으로써 모니터링하였다. 종양 크기는 폭^2 x 길이/2로서 계산하였고, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기값이다.

[0584] [0365] 평가 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE는 대조군 ADC와 비교할 때 SCID 마우스에 피하 이식된 BT-483 유방암

이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다. 또한, 다른 191P4D12 MAbs도 이 연구에 이용하였다. 그에 관한 결과는 나타내지 않았다. (Figure 16).

[0585] SCID 마우스 내의 피하 수립된 인간 방광암 이종이식편 AG-B1에서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능

[0586] [0366] 또 다른 실험에서, 환자로부터 유래한 방광암 이종이식편 AG-B1을 SCID 마우스에서 계대시켜 유지하였다. 스톡 종양들을 멸균 수확하고 1 mm^3 크기의 시편으로 잘게 다졌다. 6개의 시편들을 각각의 SCID 마우스의 옆구리 내로 이식하였다. 종양의 크기가 약 230 mm^3이 될 때까지 종양들을 미처리 상태로 계속 성장시켰다. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 및 대조군 ADC를 정맥 볼루스 주사에 의하여 4 mg/kg의 투여량으로 1회 투여하였다. ADC 투여량은 투여 직전 계량된 개개 동물의 체중에 기초해서 정하였다. 종양 성장을 3 내지 4일마다 칼리퍼 측정함으로써 모니터링하였다. 종양 크기는 $폭^2$ x 길이/2로서 계산하였고, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기값이다.

[0587] [0367] 평가 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE는 대조군 ADC와 비교할 때 AG-B1 방광암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다. 또한, 다른 191P4D12 MAbs도 이 연구에 이용하였다. 그에 관한 결과는 나타내지 않았다. (Figure 17).

[0588] SCID 마우스 내의 피하 수립된 인간 췌장암 이종이식편 AG-Panc2에서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능

[0589] [0368] 또 다른 실험에서, 환자로부터 유래한 췌장암 이종이식편 AG-Panc2를 SCID 마우스에서 계대시켜 유지하였다. 스톡 종양들을 멸균 수확하고 1 mm^3 크기의 시편으로 잘게 다졌다. 5개의 시편들을 각각의 SCID 마우스의 옆구리 내로 이식하였다. 종양의 크기가 약 100 mm^3이 될 때까지 종양들을 미처리 상태로 계속 성장시켰다. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 및 대조군 ADC를 정맥 볼루스 주사에 의하여 4일마다 5 mg/kg의 투여량으로 4회 투여하였다. ADC 투여량은 투여 직전 계량된 개개 동물의 체중에 기초해서 정하였다. 종양 성장을 3 내지 4일마다 칼리퍼 측정함으로써 모니터링하였다. 종양 크기는 $폭^2$ x 길이/2로서 계산하였고, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기값이다.

[0590] [0369] 평가 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE는 대조군 ADC와 비교할 때 AG-Panc2 췌장암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다. 또한, 다른 191P4D12 MAbs도 이 연구에 이용하였다. 그에 관한 결과는 나타내지 않았다. (Figure 18).

[0591] SCID 마우스 내의 피하 수립된 인간 췌장암 이종이식편 AG-Panc4에서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능

[0592] [0370] 또 다른 실험에서, 환자로부터 유래한 췌장암 이종이식편 AG-Panc4를 SCID 마우스에서 계대시켜 유지하였다. 스톡 종양들을 멸균 수확하고 1 mm^3 크기의 시편으로 잘게 다졌다. 6개의 시편들을 각각의 SCID 마우스의 옆구리 내로 이식하였다. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 및 대조군 ADC를 정맥 볼루스 주사에 의하여 7일마다 5 mg/kg의 투여량으로 3회 투여하였다. ADC 투여량은 투여 직전 계량된 개개 동물의 체중에 기초해서 정하였다. 종양 성장을 3 내지 4일마다 칼리퍼 측정함으로써 모니터링하였다. 종양 크기는 $폭^2$ x 길이/2로서 계산하였고, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기값이다.

[0593] [0371] 평가 결과 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE는 대조군 ADC와 비교할 때 AG-Panc4 췌장암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다. 또한, 다른 191P4D12 MAbs도 이 연구에 이용하였다. 그에 관한 결과는 나타내지 않았다. (Figure 19).

[0594] SCID 마우스 내의 피하 수립된 인간 방광암 이종이식편 AG-B8에서의 비교 투여량에 있어서 22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능

[0595] [0372] 또 다른 실험에서, 환자로부터 유래한 췌장암 이종이식편 AG-B8을 SCID 마우스에서 계대시켜 유지하였다. 스톡 종양들을 멸균 수확하고 1 mm^3 크기의 시편으로 잘게 다졌다. 6개의 시편들을 각각의 SCID 마우스의 옆구리 내로 이식하였다. 종양의 크기가 약 200 mm^3이 될 때까지 종양들을 미처리 상태로 계속 성장시켰다. 이어서, 동물들을 다음의 3 집단 (n=6), 즉: 2 그룹의 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 처리군 및 1 그룹의 대조군 ADC VCD 37-5ce5p-vcMMAE 군으로 무작위적으로 나누었다. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE를 5 mg/kg 또는 10 mg/kg의 양으로 투여하고 대조군 ADC는 5 mg/kg의 양으로 투여하였다. 모든 ADC는 정맥 볼루스 주사에 의하여 1회 투여하였다. ADC의 투여량은 투여 직전 계량된 개개 동물의 체중에 기초해서 정하였다. 종양 성장을 3 내지 4일마다

칼리퍼 측정함으로써 모니터링하였다. 종양 크기는 폭^2 x 길이/2로서 계산하였고, 여기서 폭은 가장 작은 크기, 길이는 가장 큰 크기값이다.

[0596] [0373] 평가 결과 10 mg/kg 투여량의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE는 5 mg/kg 투여량의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE에 비해 AG-B8 방광암 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제한 것으로 나타났다. (Figure 20).

[0597] 결론

[0598] [0374] 요약하면, Figures 12-20은 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE로 명명된 191P4D12 ADC가 대조군 ADCs에 비해, 191P4D12를 발현하는 종양 세포의 성장을 유의적으로 억제한 것을 나타낸다. 따라서, Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE는 표 I에 제시된 암들을 치료 및 관리하기 위한 치료 목적에 이용할 수 있다.

[0599] 실시예 8

[0600] 191P4D12 ADC의 사용을 통한 인간 암의 치료 및 진단을 위한 인간 임상 시험

[0601] [0375] 191P4D12 ADC를 191P4D12에 특이적으로 결합하는 본 발명에 따라 사용하고, 특정암, 바람직하게는 표 I에 나열된 것들의 치료에 사용한다. 이러한 각각의 지침과 관련하여 두 가지 임상적 접근법이 성공적으로 추구된다.

[0602] [0376] I.) 보조 요법(Adjunctive therapy): 보조 요법에서, 환자는 화학적 요법 또는 항-종양성 약제 및/또는 방사능 요법 또는 이들의 결합과 조합하여 191P4D12 ADC으로 처리된다. 표 I에 열거된 것과 같은 원발암 표적을 191P4D12 ADC을 표준 제1선 및 제2선 치료법에 부가하는 것에 의하여 표준 프로토콜하에서 처리하였다. 다음의 실시예에서 검토된 바와 같이, 프로토콜 디자인은 비제한적인 예로서, 표준 화학요법 및 다른 생물학적 약제의 일반적 투여량을 감소시키는 능력뿐만 아니라, 원발암 또는 전이성 병변의 암 질량 감소, 증가된 자유 생존 발전, 전체적 생존, 환자 건강의 개선, 질병 안정화를 목적으로 한다. 이러한 투여량의 감소에 의해 화학요법 또는 생물학적 약제의 투여-관련 독성을 감소시킴에 의하여 추가된 및/또는 연장된 요법이 가능해진다. 191P4D12 ADC는 화학치료적 또는 항-종양성 약제와 조합하여 수개의 보조적 임상 시험에서 활용된다.

[0603] [0377] II.) 단일 요법(Monotherapy): 암의 단일 치료법에서 191P4D12 ADC의 사용과 관련하여, 화학치료적 또는 항-종양성 약제 없이 191P4D12 ADC를 환자에게 투여한다. 일 실시상태에서 단일 요법은 광범위한 전이성 질병을 가진 말기-단계 환자에게 임상적으로 수행된다. 다음의 실시예에서 검토된 바와 같이, 프로토콜 디자인은 비제한적인 예로서, 표준 화학요법 및 다른 생물학적 약제의 일반적 투여량을 감소시키는 능력뿐만 아니라, 일차 또는 전이성 병변의 암 질량 감소, 증가된 자유 생존 발전, 전체적 생존, 환자 건강의 개선, 질병 안정화를 목적으로 한다.

[0604] 투여량

[0605] [0378] 투여 계획은 최적화된 목적하는 반응을 제공하기 위하여 조절될 수 있다. 예를 들어 단일의 볼루스(bolus)을 투여할 수도 있고, 수개의 분할된 투여량을 시간에 걸쳐 투여할 수도 있고, 또는 치료적 상황의 위급함에 의해 지시되는 바에 따라 비례하여 투여량을 감소 또는 증가시킬 수도 있다. 투여의 용이함 및 투약의 일정함을 위하여 비경구적 조성물을 투여 단위 형태로 제제화하는 것은 특히 유익하다. 본 명세서에서 사용되는 투여 단위 형태란 치료하고자 하는 포유류 대상체를 위한 단일 투약으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미한다; 각각의 단위는 목적하는 치료적 효과를 발생시키기 위하여 계산된, 활성 화합물의 미리 정해진 양을 요구되는 약제학적 담체와 함께 포함한다. 본 발명의 투여 단위 형태의 세목은 (a) 항체 및/또는 ADC의 특유한 성질 및 달성하고자 하는 특정 치료적 또는 예방적 효과 및 (b) 개인에 있어 민감성의 치료를 위한 상기 활성 화합물을 조합하는 기술 분야의 고유한 제한에 의해 지시되고, 직접적으로 의존한다.

[0606] [0379] 본 발명에 따라 조합하여 투여되는 191P4D12 ADC의 치료적 유효량의 예시적이고, 제한되지 않은 범위는 약 0.5 내지 약 10 mg/kg, 약 1 내지 약 5 mg/kg, 적어도 1 mg/kg, 적어도 2 mg/kg, 적어도 3 mg/kg, 또는 적어도 4 mg/kg이다. 다른 예시적이고 제한되지 않은 범위는 예컨대 약 0.5 내지 약 5 mg/kg, 또는 예컨대 약 0.8 내지 약 5 mg/kg, 또는 예컨대 약 1 내지 약 7.5mg/kg이다. 본 발명의 높은 투여량의 실시상태는 10 mg/kg 초과의 투여량과 관련된다. 투여량 값은 완화시키고자 하는 상태의 종류 및 심각성에 따라 변할 수 있으며, 단일 또는 다수의 투여량을 포함할 수 있음을 주목할 것이다. 더 나아가, 특정 대상체에 대하여 특정한 투여량 계획은 개인의 요구 및 조성물을 투여하거나 투여를 감독하는 자의 전문적인 판단에 따라 시간에 걸쳐 조절되어야 하고, 본 명세서에서 기술된 투여량 범위는 오직 예시적인 것이며, 청구된 조성물의 범위 또는 활용을 제한하고자 하는 의도가 아니라는 것이 이해될 것이다.

[0607] 임상 개발 계획(Clinical Development Plan: CDP)

[0608] [0380] CDP는 보조 요법 또는 단독 요법과 관련한 191P4D12 ADC의 처리를 따르고 발전시킨다. 시험은 우선 안전성을 입증하고, 이어서 반복된 투여량의 효과를 확증한다. 시험은 표준 요법과 191P4D12 ADC이 결합된, 오픈 라벨 비교 표준 화학요법이다. 평가될 바와 같이, 환자의 등록과 관련하여 활용될 수 있는 하나의 비제한적 표준은 생검에 의하여 결정되는 환자 종양 중의 191P4D12 발현이다.

[0609] [0381] 임의의 단백질 또는 항체 융합-기반 치료법처럼, 안전성 문제는 주로 (i) 사이토카인 방출 신드롬, 즉 저혈압, 열, 경련, 오한, (ii) 물질에 대한 면역원성 반응의 발전(즉, 항체 요법에 대하여 환자에 의한 인간 항체의 발전, 또는 HAMA 반응) 및 (iii)191P4D12 를 발현하는 정상 세포에 대한 독성과 관련된다. 이러한 안전성 문제 각각을 모니터하기 위하여 표준 테스트 및 추적 검사가 활용된다. 191P4D12 ADCs는 인간 투여에 대하여 안전한 것으로 발견된다.

[0610] 실시예 9

[0611] IHC에 의한 암환자 표본에서의 191P4D12 단백질의 검출

[0612] [0382] 면역조직화학법에 의하여 191P4D12 단백질의 발현을 (i) 방광암, (ii) 유방암, (iii) 췌장암, (iv) 폐암, (v) 난소암 (vi) 식도암, 및 (vii) 두경부암에 걸린 환자들로부터의 환자 종양 표본에 대하여 검사하였다. 간단히 설명하면, 포르말린 고정시키고, 파라핀-왁스에 포매시킨 조직들을 4개의 마이크론 섹션으로 절단하여 유리 슬라이드 위에 장착하였다. 이 섹션들로부터 왁스를 제거하고 재수화시켜 95℃에서 30분간 EZ-Retriever 마이크로웨이브(Biogenex, San Ramon, CA)에서 EDTA 항원 부활 용액 (Biogenex, San Ramon, CA)으로 처리하였다. 이어서 섹션들을 3% 과산화수소 용액으로 처리하여 내인성 퍼옥시다제 활성을 불활성화시켰다. 모노클로날 마우스 항-191P4D12 항체 또는 이소형(isotype) 대조군과 함께 인큐베이션시키기 전에, 무혈청 단백질 블록(Dako, Carpenteria, CA)를 이용하여 비특이적인 결합을 억제하였다. 이어서, 시편을 Super Enhancer™ 시약 중에서 인큐베이션시킨 다음 폴리머-HRP 제2 항체 컨쥬게이트(BioGenex, San Ramon, CA) 중에서 인큐베이션시키는 것으로 이루어지는 초고감도 폴리머-포스래디쉬 퍼옥시다제 검출 시스템 (Super Sensitive™ Polymer-horseradish peroxidase (HRP) Detection System)을 이용하여 시편들을 처리하였다. 이어서 섹션들을 DAB 키트(BioGenex, San Ramon, CA)를 이용하여 디벨로핑시켰다. 헤마톡실린을 이용하여 핵을 염색하고, 명시야(bright field) 현미경에 의해 분석하였다. 갈색 염색이 가리키는 바와 같이, 191P4D12 면역반응성 항체를 이용하여 환자 표본 중의 특이적 염색이 검출되었다. (Figure 21(A), 21(C), 21(E), 21(G), 21(I), 21(K), 및 21(M) 참조). 이와 대조적으로, 대조군 항체는 환자 표본을 염색시키지지 않았다. (Figure 21(B), 21(D), 21(F), 21(H), 21(J), 21(L), 및 21(N) 참조).

[0613] [0383] 상기 결과는 환자의 방광암, 유방암, 췌장암, 폐암, 난소암, 식도암 및 두경부암 조직의 종양 세포들에서 191P4D12가 발현되었음을 나타낸다. 이러한 결과는 191P4D12가 인간 암에서 발현된다는 것, 그리고 이 항원에 지향된 항체들과 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE)로 명명된 항체 약물 컨쥬게이트가 진단 및 치료 목적에 유용하다는 것을 보여주는 것이다 (Figure 21).

[0614] 실시예 10

[0615] Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 결합 에피토프의 측정

[0616] [0384] 인간, 시노몰구스, 래트 및 쥐 기원의 191P4D12 단백질을 PC3 세포에서 재조합적으로 과발현시켜 Ha22-2(2,4)6.1의 이들 오솔로그들(orthologs)에 대한 교차-반응성을 검사하였다. Ha22-2(2,4)6.1은 191P4D12의 시노몰구스 및 래트 오솔로그들과 강하게 교차 반응한 것으로 나타났다 (Figure 23). EC50 결합 값들을 표 VII에 나타내었다. Ha22-2(2,4)6.1의 쥐(murine) 오솔로그에 대한 결합은 결합 EC50 값이 유의적으로 감소한 것을 보여주는데, 이는 V 도메인에서의 중요한 아미노산 치환 (인간 및 래트 서열과 비교할 때)이 191P4D12에 대한 Ha22-2(2,4)6.1의 친화도에 영향을 미친다는 것을 보여주는 것이다.

[0617] [0385] 표 VIII은 V-도메인을 함유하는 191P4D12 오솔로그들의 아미노산(aa) 1-180 단백질 서열 정렬을 나타낸다. 래트 오솔로그 서열 중 오직 2개의 아미노산인 Thr-75 및 Ser-90만이 쥐의 오솔로그 서열에서 Ile와 Asn으로 각각 치환되었다 (굵은 문자로 표시됨). 인간 서열에서는 대응하는 아미노산이 Ala-76과 Ser-91인 것을 알 수 있다. 이들 아미노산들이 Ha22-2(2,4)6.1의 결합 에피토프를 포함하는지를 알아보기 위해, 191P4D12의 몇몇 돌연변이 구조물 및 그의 쥐 오솔로그들을 만들어서 PC3 세포 내에서 발현시켰다 (표 IX). 표준 알라닌 치환 돌

연변이 대신 "쥐의(Murine) 아미노산들을 인간 서열 내로 도입하고 마우스 서열에 그 역으로 도입하였다.

[0618] [0386] 191P4D12에서 Ser-91의 Asn으로의 돌연변이는 Ha22-2(2,4)6.1의 결합을 심하게 훼손시키는 것으로 나타났는데, 이는 이 아미노산 Ser-91이 결합에 필수적이라는 것, 그리고 Ha22-2(2,4)6.1 MAb에 의해 인식되는 에피토프를 구성함이 분명하다는 것을 시사하는 것이다. 위치 76에서의 Ala의 부가적인 돌연변이(A76I, S91N 이중 돌연변이) 역시 191P4D12에 도입되었다. Ha22-2(2,4)6.1의 이중 돌연변이주 A76I, S91N에 대한 결합은 쥐의 오솔로그 결합과 매우 유사한 것으로 나타났다 (Figure 24). 이와 반대로, 쥐의 서열 중 Asn-90의 Ser으로의 돌연변이는 Ha22-2(2,4)6.1의 쥐의 돌연변이 오솔로그에 대한 결합을 극적으로 향상시켰는데, 이는 이 위치의 아미노산이 Ha22-2(2,4)6.1의 결합에 매우 중요함을 재차 확인해주는 것이다. 쥐의 오솔로그 이중 돌연변이 A90S, I75A에 대한 Ha22-2(2,4)6.1의 결합은 191P4D12의 인간 오솔로그와 매우 유사한 것으로 보인다.

[0619] [0387] 이를 종합할 때, 이들 데이터는 Ser-91 및 Ala-76이 세포 표면 상의 191P4D12 단백질에 대한 Ha22-2(2,4)6.1의 결합에 있어서 중요한 역할을 한다는 것과 191P4D12 표면 상에서 Ha22-2(2,4)6.1에 의해 인식되는 에피토프 부분을 구성함을 입증하는 것이다.

[0620] [0388] 이 개념을 가시화하기 위하여, 본 발명자들은 PyMOL을 이용하여 191P4D12의 패밀리 멤버 및 Ig-도메인 함유 단백질에 대한 공개된 결정 구조에 기반하여 191P4D12의 V-도메인의 컴퓨터 모델을 만들었다(Figure 25). Ala-76 (점묘처리 부분) 및 Ser-91 (교차빗금 처리 부분)이 도시되어 있다.

[0621] [0389] 이에 더해, 191P4D12 분자 상의 Ha22-2(2,4)6.1의 결합 부위를 더욱 정제하기 위하여, 본 발명자들은 Rat(1)E 세포 표면 상의 V-도메인에 대응하는 191P4D12 단편을 고안 및 발현하였다. 다음의 구조물을 레트로바이러스 벡터에서 생성시켰다:

[0622] 191P4D12 (aa1-150,347-510)

[0623] [0390] Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 결합을 FACS에 의해 평가하였다. Figure 26에 도시된 바와 같이, Ha22-2(2,4)6.1은 V-도메인 발현 세포 (A)와 야생형191P4D12 (B)에 결합하지만, 먼저 생성된 C1C2 도메인 발현 세포 (C)에는 결합하지 않는다. 이것은 이 항체에 대한 결합 부위가 191P4D12의 최초 150개 아미노산 내의 V-도메인에 위치함을 입증하는 것이다.

[0624] [0391] 상기 결과는 Ha22-2(2,4)6.1 MAb가 아미노산 위치 1-150의 191P4D12 단백질의 V-도메인과 결합함을 나타내며, 이에 더하여 아미노산 Ser-91 및 아미노산 Ala-76을 포함하는 특이적인 에피토프가 Ha22-2(2,4)6.1 MAb의 결합에 필수적임을 아울러 나타내는 것이다.

[0625] [0392] 본 출원 전반에 걸쳐, 다양한 웹사이트 데이터 내용, 공보, 특허출원 및 특허가 참조되었다. (웹사이트는 전 세계 웹상의 주소인 URL(Uniform Resource Locator)에 의해 언급된다.) 이들 참조 문헌들 각각의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조 포함된다.

[0626] [0393] 본 발명은, 본 발명의 개별 측면들을 단적으로 설명하는, 전술한 실시상태에 의해 그 범위가 제한되지 않으며, 기능적 균등물은 어느 것이든 본 발명의 범위에 포함된다. 당업자라면 본 발명에 설명된 것들에 더해서, 본 발명의 모델과 방법에 대한 다양한 변형예가 가능함을 전술한 설명과 기술로부터 잘 이해할 수 있을 것이며, 이들 역시 본 발명의 범위에 포함되는 것이다. 이러한 변형예 및 기타 실시상태들은 본 발명의 진정한 범위 및 정신으로부터 벗어남이 없이 실시될 수 있다.

[0627] **표 (TABLES)**

표 I: 악성일 때 **191P4D12** 를 발현하는 조직들.

결장
췌장
난소
유방
폐
방광

표 II: 아미노산 약어

1 문자 표기	3 문자 표기	정식 명칭
F	Phe	페닐알라닌
L	Leu	류신
S	Ser	세린
Y	Tyr	티로신
C	Cys	시스테인
W	Trp	트립토판
P	Pro	프롤린
H	His	히스티딘
Q	Gln	글루타민
R	Arg	아르기닌
I	Ile	이소류신
M	Met	메티오닌
T	Thr	쓰레오닌
N	Asn	아스파라긴
K	Lys	라이신
V	Val	발린
A	Ala	알라닌
D	Asp	아스파르트산
E	Glu	글루탐산
G	Gly	글라이신

[0628]

표 III: 아미노산 치환 매트릭스

GCG 소프트웨어 9.0 BLOSUM62 로부터 채택된 아미노산 치환 매트릭스 (블록 치환 매트릭스). 값이 클수록 관련된 천연 단백질에서 그 치환이 더 발견되기 쉽다.

```
 A  C  D  E  F  G  H  I  K  L  M  N  P  Q  R  S  T  V  W  Y  .
 4  0 -2 -1 -2  0 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 -1 -1  1  0  0 -3 -2  A
    9 -3 -4 -2 -3 -3 -1 -3 -1 -1 -3 -3 -3 -3 -1 -1 -1 -2 -2  C
       6  2 -3 -1 -1 -3 -1 -4 -3  1 -1  0 -2  0 -1 -3 -4 -3  D
          5 -3 -2  0 -3  1 -3 -2  0 -1  2  0  0 -1 -2 -3 -2  E
             6 -3 -1  0 -3  0  0 -3 -4 -3 -3 -2 -2 -1  1  3  F
                6 -2 -4 -2 -4 -3  0 -2 -2 -2  0 -2 -3 -2 -3  G
                   8 -3 -1 -3 -2  1 -2  0  0 -1 -2 -3 -2  2  H
                      4 -3  2  1 -3 -3 -3 -3 -2 -1  3 -3 -1  I
                         5 -2 -1  0 -1  1  2  0 -1 -2 -3 -2  K
                            4  2 -3 -3 -2 -2 -2 -1  1 -2 -1  L
                               5 -2 -2  0 -1 -1 -1  1 -1 -1  M
                                  6 -2  0  0  1  0 -3 -4 -2  N
                                     7 -1 -2 -1 -1 -2 -4 -3  P
                                        5  1  0 -1 -2 -2 -1  Q
                                           5 -1 -1 -3 -3 -2  R
                                              4  1 -2 -3 -2  S
                                                 5  0 -2 -2  T
                                                    4 -3 -1  V
                                                       11  2  W
                                                           7  Y
```

[0629]

표 IV: vcMMAE 의 일반적 합성법

여기서: AA1 = 아미노산 1
AA2 = 아미노산 2
AA5 = 아미노산 5
DIL = 돌라이소류신
DAP = 돌라프롤린
링커 = Val-Cit (vc)

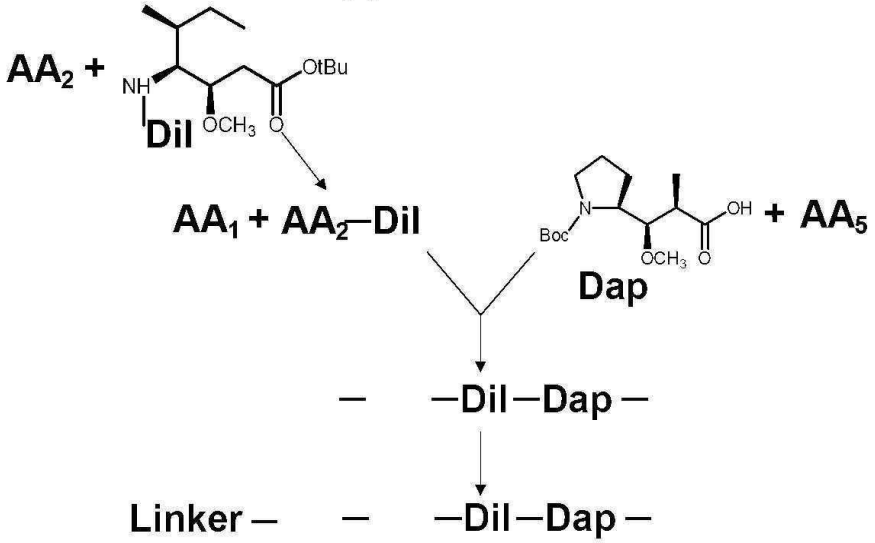


표 V: 바이아코어 결합율 및 분리율 및 결과적인 친화도 계산

	kon, M-1s-1	koff, s-1	KD, M
Ha22-2(2,4)6.1	3.8E+05	5.8E-03	1.6E-08
Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE	4.5E+05	5.2E-03	1.1E-08

표 VI: 도메인 매핑 분석에 이용된 **191P4D12** 구조물

구조물	명칭
191P4D12 (aa 1-242, 347-510)	VC1, Rat1(E) 발현주
191P4D12 (aa 1-31, 147-510)	C1C2, Rat1(E) 발현주
191P4D12 (aa 1-242)	mFc-VC1, 융합 단백질
191P4D12 (aa 1-31, 147-346)	mFc-C1C2, 융합 단백질
191P4D12 (aa 1-141)	mFc-V, 융합 단백질

[0630]

표 VII

	PC3-191P4D12	시노 오솔로그	래트 오솔로그	쥐 오솔로그
Bmax (MFI)	816	1146	679	325
EC_{50} (nM)	0.28	0.30	0.44	70.3

표 VIII (SEQ ID NOS:11-13, 출현 순서임)

```
마우스          MPLSLGAEMWGPEAWLR-LLFLASFTGQYSAGELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDE 59
래트            MPLSLGAEMWGPEAWLL-LLFLASFTGRYSAGELETSDLVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDE 59
인간            MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLLLASFTGRCPAGELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGE 60
                **********************  **:******: .********:******************..*
마우스          QVGQVAWARVDPNEGIRELALLHSKYGLHVNPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSVLLRNAVQA 119
래트            QVGQVAWARVDPNEGTRELALLHSKYGLHVSPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSILLRNAVQA
119
인간            QVGQVAWARVDAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQA 120
                ************..**  :**************.****.*********:*****:********
마우스          DEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLVPPLPSLNPGPPLEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS 179
래트            DEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLVPPLPSLNPGPPLEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS
179
인간            DEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS 180
                ********************:****************.**********************
```

표 IX

야생형 구조물	돌연변이 구조물	이중 돌연변이 구조물
191P4D12, 야생형	S91N	S91N, A76I
191P4D12 의 쥐 오솔로그, 야생형	N90S	N90S, I75A

[0631]

도면

도면1

Figure 1: 191P4D12의 cDNA (SEQ ID NO:1) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:2). 개시 메티오닌에 밑줄이 그어져 있다. 오픈 리딩 프레임은 종결 코돈을 포함하여 핵산 264-1796에 연장되어 있다.

```
   1 ggccgtcgttgttggccacagcgtgggaagcagctctgggggagctcggagctcccgatc
  61 acggcttcttgggggtagctacggctgggtgtgtagaacggggccggggctggggctggg
 121 tcccctagtggagacccaagtgcgagaggcaagaactctgcagcttcctgccttctgggt
 181 cagttccttattcaagtctgcagccggctcccagggagatctcggtggaacttcagaaac
   1                       M  P  L  S  L  G  A  E  M  W  G  P  E
 241 gctgggcagtctgcctttcaaccATGCCCCTGTCCCTGGGAGCCGAGATGTGGGGGCCTG
  14   A  W  L  L  L  L  L  L  A  S  F  T  G  R  C  P  A  G  E
 301 AGGCCTGGCTGCTGCTGCTGCTACTGCTGGCATCATTTACAGGCCGGTGCCCCGCGGGTG
  34   L  E  T  S  D  V  V  T  V  V  L  G  Q  D  A  K  L  P  C  F
 361 AGCTGGAGACCTCAGACGTGGTAACTGTGGTGCTGGGCCAGGACGCAAAACTGCCCTGCT
  54   Y  R  G  D  S  G  E  Q  V  G  Q  V  A  W  A  R  V  D  A  G
 421 TCTACCGAGGGGACTCCGGCGAGCAAGTGGGGCAAGTGGCATGGGCTCGGGTGGACGCGG
  74   E  G  A  Q  E  L  A  L  L  H  S  K  Y  G  L  H  V  S  P  A
 481 GCGAAGGCGCCCAGGAACTAGCGCTACTGCACTCCAAATACGGGCTTCATGTGAGCCCGG
  94   Y  E  G  R  V  E  Q  P  P  P  P  R  N  P  L  D  G  S  V  L
 541 CTTACGAGGGCCGCGTGGAGCAGCCGCCGCCCCCACGCAACCCCCTGGACGGCTCAGTGC
 114   L  R  N  A  V  Q  A  D  E  G  E  Y  E  C  R  V  S  T  F  P
 601 TCCTGCGCAACGCAGTGCAGGCGGATGAGGGCGAGTACGAGTGCCGGGTCAGCACCTTCC
 134   A  G  S  F  Q  A  R  L  R  L  R  V  L  V  P  P  L  P  S  L
 661 CCGCCGGCAGCTTCCAGGCGCGGCTGCGGCTCCGAGTGCTGGTGCCTCCCCTGCCCTCAC
 154   N  P  G  P  A  L  E  E  G  Q  G  L  T  L  A  A  S  C  T  A
 721 TGAATCCTGGTCCAGCACTAGAAGAGGGCCAGGGCCTGACCCTGGCAGCCTCCTGCACAG
 174   E  G  S  P  A  P  S  V  T  W  D  T  E  V  K  G  T  T  S  S
 781 CTGAGGGCAGCCCAGCCCCCAGCGTGACCTGGGACACGGAGGTCAAAGGCACAACGTCCA
 194   R  S  F  K  H  S  R  S  A  A  V  T  S  E  F  H  L  V  P  S
 841 GCCGTTCCTTCAAGCACTCCCGCTCTGCTGCCGTCACCTCAGAGTTCCACTTGGTGCCTA
 214   R  S  M  N  G  Q  P  L  T  C  V  V  S  H  P  G  L  L  Q  D
 901 GCCGCAGCATGAATGGGCAGCCACTGACTTGTGTGGTGTCCCATCCTGGCCTGCTCCAGG
 234   Q  R  I  T  H  I  L  H  V  S  F  L  A  E  A  S  V  R  G  L
 961 ACCAAAGGATCACCCACATCCTCCACGTGTCCTTCCTTGCTGAGGCCTCTGTGAGGGGCC
 254   E  D  Q  N  L  W  H  I  G  R  E  G  A  M  L  K  C  L  S  E
1021 TTGAAGACCAAAATCTGTGGCACATTGGCAGAGAAGGAGCTATGCTCAAGTGCCTGAGTG
 274   G  Q  P  P  P  S  Y  N  W  T  R  L  D  G  P  L  P  S  G  V
1081 AAGGGCAGCCCCCTCCCTCATACAACTGGACACGGCTGGATGGGCCTCTGCCCAGTGGGG
 294   R  V  D  G  D  T  L  G  F  P  P  L  T  T  E  H  S  G  I  Y
1141 TACGAGTGGATGGGGACACTTTGGGCTTTCCCCCACTGACCACTGAGCACAGCGGCATCT
 314   V  C  H  V  S  N  E  F  S  S  R  D  S  Q  V  T  V  D  V  L
1201 ACGTCTGCCATGTCAGCAATGAGTTCTCCTCAAGGGATTCTCAGGTCACTGTGGATGTTC
 334   D  P  Q  E  D  S  G  K  Q  V  D  L  V  S  A  S  V  V  V  V
```

도면1a

```
1261 TTGACCCCCAGGAAGACTCTGGGAAGCAGGTGGACCTAGTGTCAGCCTCGGTGGTGGTGG
 354   G  V  I  A  A  L  L  F  C  L  L  V  V  V  V  V  L  M  S  R
1321 TGGGTGTGATCGCCGCACTCTTGTTCTGCCTTCTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCATGTCCC
 374   Y  H  R  R  K  A  Q  Q  M  T  Q  K  Y  E  E  E  L  T  L  T
1381 GATACCATCGGCGCAAGGCCCAGCAGATGACCCAGAAATATGAGGAGGAGCTGACCCTGA
 394   R  E  N  S  I  R  R  L  H  S  H  H  T  D  P  R  S  Q  P  E
1441 CCAGGGAGAACTCCATCCGGAGGCTGCATTCCCATCACACGGACCCCAGGAGCCAGCCGG
 414   E  S  V  G  L  R  A  E  G  H  P  D  S  L  K  D  N  S  S  C
1501 AGGAGAGTGTAGGGCTGAGAGCCGAGGGCCACCCTGATAGTCTCAAGGACAACAGTAGCT
 434   S  V  M  S  E  E  P  E  G  R  S  Y  S  T  L  T  T  V  R  E
1561 GCTCTGTGATGAGTGAAGAGCCCGAGGGCCGCAGTTACTCCACGCTGACCACGGTGAGGG
 454   I  E  T  Q  T  E  L  L  S  P  G  S  G  R  A  E  E  E  E  D
1621 AGATAGAAACACAGACTGAACTGCTGTCTCCAGGCTCTGGGCGGGCCGAGGAGGAGGAAG
 474   Q  D  E  G  I  K  Q  A  M  N  H  F  V  Q  E  N  G  T  L  R
1681 ATCAGGATGAAGGCATCAAACAGGCCATGAACCATTTTGTTCAGGAGAATGGGACCCTAC
 494   A  K  P  T  G  N  G  I  Y  I  N  G  R  G  H  L  V  *
1741 GGGCCAAGCCCACGGGCAATGGCATCTACATCAATGGGCGGGGACACCTGGTCTGAccca
1801 ggcctgcctcccttccctaggcctggctccttctgttgacatgggagattttagctcatc
1861 ttgggggcctccttaaacacccccatttcttgcggaagatgctccccatcccactgactg
1921 cttgacctttacctccaacccttctgttcatcgggagggctccaccaattgagtctctcc
1981 caccatgcatgcaggtcactgtgtgtgtgcatgtgtgcctgtgtgagtgttgactgactg
2041 tgtgtgtgtggaggggtgactgtccgtggaggggtgactgtgtccgtggtgtgtattatg
2101 ctgtcatatcagagtcaagtgaactgtggtgtatgtgccacgggatttgagtggttgcgt
2161 gggcaacactgtcagggtttggcgtgtgtgtcatgtggctgtgtgtgacctctgcctgaa
2221 aaagcaggtattttctcagaccccagagcagtattaatgatgcagaggttggaggagaga
2281 ggtggagactgtggctcagacccaggtgtgcgggcatagctggagctggaatctgcctcc
2341 ggtgtgagggaacctgtctcctaccacttcggagccatgggggcaagtgtgaagcagcca
2401 gtccctgggtcagccagaggcttgaactgttacagaagccctctgccctctggtggcctc
2461 tgggcctgctgcatgtacatattttctgtaaatatacatgcgccgggagcttcttgcagg
2521 aatactgctccgaatcacttttaatttttttctttttttttttcttgccctttccattagt
2581 tgtatttttttatttatttttattttattttttttagagatggagtctcactatgttgc
2641 tcaggctggccttgaactcctgggctcaagcaatcctcctgcctcagcctccctagtagc
2701 tgggactttaagtgtacaccactgtgcctgctttgaatcctttacgaagagaaaaaaaaa
2761 attaaagaaagcctttagatttatccaatgtttactactgggattgcttaaagtgaggcc
2821 cctccaacaccaggggggttaattcctgtgattgtgaaaggggctacttccaaggcatctt
2881 catgcaggcagccccttgggagggcacctgagagctggtagagtctgaaattagggatgt
2941 gagcctcgtggttactgagtaaggtaaaattgcatccaccattgtttgtgatacctttagg
3001 gaattgcttggacctggtgacaagggctcctgttcaatagtggtgttggggagagagaga
3061 gcagtgattatagaccgagagagtaggagttgaggtgaggtgaaggaggtgctgggggtg
3121 agaatgtcgccttttccccctgggttttggatcactaattcaaggctcttctggatgtttc
3181 tctgggttggggctggagttcaatgaggtttatttttagctggcccacccagatacactc
3241 agccagaatacctagatttagtacccaaactcttcttagtctgaaatctgctggatttct
3301 ggcctaagggagaggctcccatccttcgttccccagccagcctaggacttcgaatgtgga
3361 gcctgaagatctaagatcctaacatgtacattttatgtaaatatgtgcatatttgtacat
3421 aaaatgatattctgtttttaaataaacagacaaaacttgaaaaa
```

Figure 1 (Continued)

도면2

Figure 2A: Ha22-2(2,4)6.1 중쇄의 cDNA (SEQ ID NO:3) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:4). 이중 밑줄은 리더 서열, 밑줄은 중쇄 가변부, 점선으로 된 밑줄은 인간 IgG1 불변부이다.

```
                                                  M  E  L  G  L  C  W  V  F  L  V  A  I  L  E
  1  GGTGATCAGCACTGAACACAGAGGACTCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTATTTTAGA
        ·  G  V  Q  C  E  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S
 76  AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
        ·  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  N  M  N  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E
151  CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA
        ·  W  V  S  Y  I  S  S  S  S  S  T  I  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S
226  GTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTAGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTC
        ·  R  D  N  A  K  N  S  L  S  L  Q  M  N  S  L  R  D  E  D  T  A  V  Y  Y  C
301  CAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTG
        ·  A  R  A  Y  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S  A  S  T  K
376  TGCGAGAGCATACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAA
        ·  G  P  S  V  F  P  L  A  P  S  S  K  S  T  S  G  G  T  A  A  L  G  C  L  V
451  GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
        ·  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S  W  N  S  G  A  L  T  S  G  V  H  T  F  P
526  CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC
        ·  A  V  L  Q  S  S  G  L  Y  S  L  S  S  V  V  T  V  P  S  S  S  L  G  T  Q
601  GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
        ·  T  Y  I  C  N  V  N  H  K  P  S  N  T  K  V  D  K  R  V  E  P  K  S  C  D
676  GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA
        ·  K  T  H  T  C  P  P  C  P  A  P  E  L  L  G  G  P  S  V  F  L  F  P  P  K
751  CAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA
        ·  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S  H  E  D  P
826  ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
        ·  E  V  K  F  N  W  Y  V  D  G  V  E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  Y
901  TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA
        ·  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C
976  CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
        ·  K  V  S  N  K  A  L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E  P
1051 CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
        ·  Q  V  Y  T  L  P  P  S  R  E  E  M  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G
1126 ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
        ·  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P
1201 CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC
        ·  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S  K  L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N
1276 CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
        ·  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G
1351 CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGG
        ·  K  *
1426 TAAATGA
```

도면2a

Figure 2B: 경쇄의 cDNA (SEQ ID NO:5) 및 아미노산 서열 (SEQ ID NO:6). 이중 밑줄은 리더 서열, 밑줄은 경쇄 가변부, 점선으로 된 밑줄은 인간 카파 불변부이다.

```
                                                  M  D  M  R  V  P  A  Q  L  L  G  L  L  L  L  W  F
  1  AGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTC
        P  G  S  R  C  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  V  S  A  S  V  G  D  R  V  T
 76  CCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCACC
        I  T  C  R  A  S  Q  G  I  S  G  W  L  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K
151  ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCGGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG
        F  L  I  Y  A  A  S  T  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D
226  TTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
        F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  A  N  S  F  P
301  TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCT
        P  T  F  G  G  G  T  K  V  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F  I  F  P  P
376  CCCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
        S  D  E  Q  L  K  S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N  N  F  Y  P  R  E  A  K
451  TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
        V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V  T  E  Q  D  S  K  D
526  GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
        S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V  Y  A  C  E
601  AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
        V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N  R  G  E  C  *
676  GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
```

도면3a

Figure 3A: Ha22-2(2,4)6.1 중쇄의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:7).
이중 밑줄은 리더 서열, 밑줄은 중쇄 가변부, 점선으로 된 밑줄은 인간 IgG1 불변부이다.

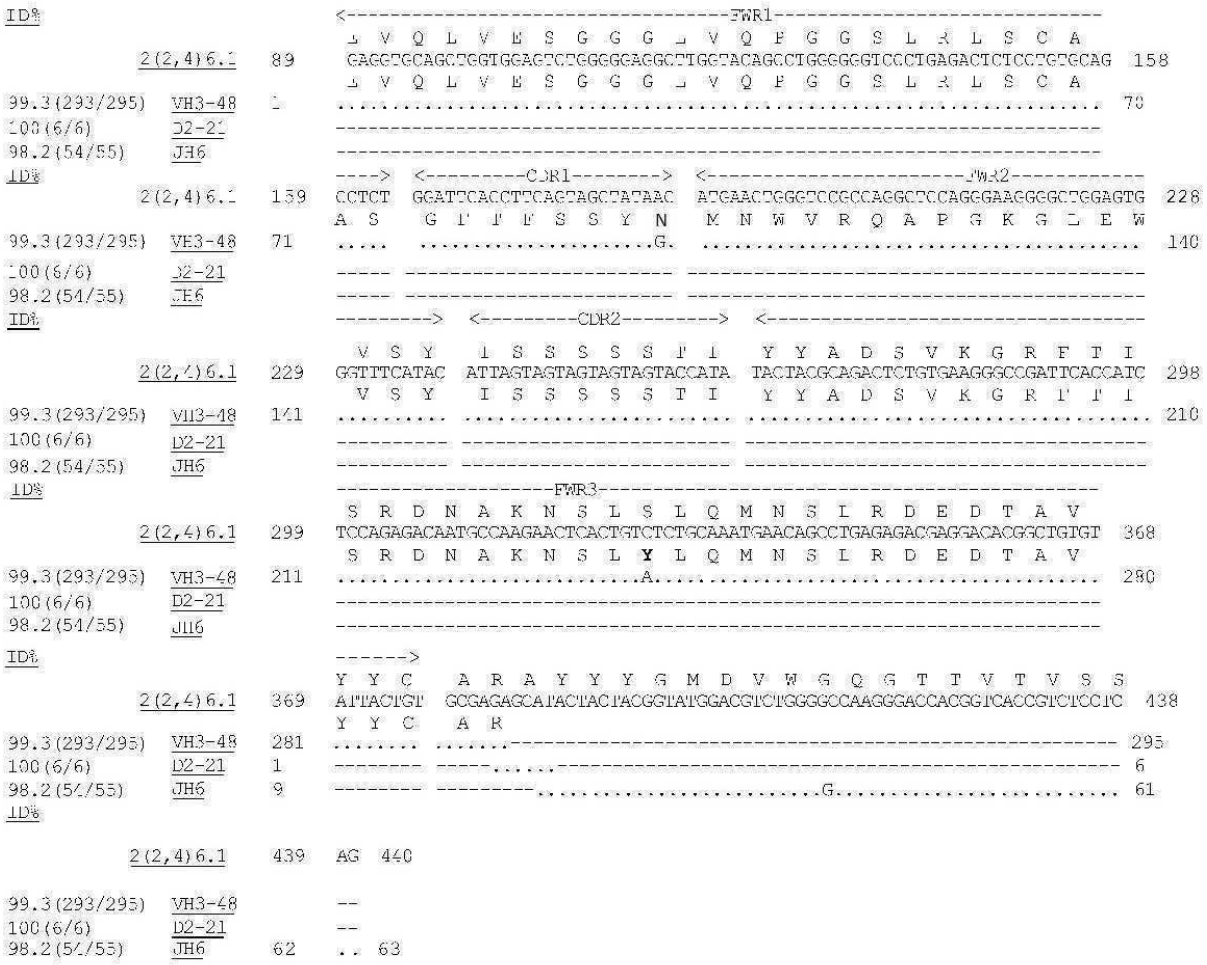
```
  1 MELGLCWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
 51 YNMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLSL
101 QMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
151 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
201 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
251 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
301 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
351 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
401 ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
451 LHNHYTQKSLSLSPGK
```

도면3b

Figure 3B: Ha22-2(2,4)6.1 경쇄의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:8).
이중 밑줄은 리더 서열, 밑줄은 경쇄 가변부, 점선으로 된 밑줄은 인간 카파 불변부이다.

```
  1 MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQG
 51 ISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
101 QPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
201 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

Figure 4A: 인간 Ig 생식세포 VH3-48 (SEQ ID NO:9)에 대한 Ha22-2(2,4)6.1 중쇄(SEQ ID NO:3,4의 일부)의 정렬도.



도면4a

Figure 4B: 인간 Ig 생식세포 L5 (SEQ ID NO:10)에 대한 Ha22-2(2,4)6.1 경쇄(SEQ ID NO:5.6의 일부)의 정렬도.

```
ID%                                  <-----------------------------------FWR1-----------------------------
                                      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  V  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C
                     2(2,4)6.1  91    GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTC  160
                                      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  V  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C
98.6(283/287)        L5          1   ..........................................A.........................  70
100(35/35)           Jk4              ------------------------------------------------------------------
ID%                                  -------> <------CDR1------> <-----------------------FWR2---------------
                                     R  A  S   Q  G  I  S  G  W   L  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  F  L
                     2(2,4)6.1  161   GGGCGAGT  CAGGGTATTAGCGGCTGG  TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCT  230
                                     R  A  S   Q  G  I  S  S  W   L  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L
98.6(283/287)        L5          71  ........  ............A.....  .....................................C....  140
100(35/35)           JK4              --------  ----------------  ----------------------------------------
ID%                                  ------>  <--CDR2->  <-----------------------------------------------F
                                       I  Y   A  A  S   T  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D
                     2(2,4)6.1  231   GATCTAT  GCTGCATCC  ACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT  300
                                       I  Y   A  A  S   S  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D
98.6(283/287)        L5          141 .......  .........  .G.............................................  210
100(35/35)           JK4              -------  ---------  ------------------------------------------------
ID%                                  WR3-------------------------------------------------->
                                      F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C   Q  Q  A  N  S
                     2(2,4)6.1  301   TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGT  CAACAGGCTAACAGTT  370
                                      F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C   Q  Q  A  N  S
98.6(283/287)        L5          211 ..................................................  ................  280
100(35/35)           JK4              --------------------------------------------------  ----------------
ID%

                                     F  P  P  T  F  G  G  G  T  K  V  E  I  K
                     2(2,4)6.1  371   TCCCTCCCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC  412
                                     F  P  P
98.6(283/287)        L5          281 .......----------------------------------  287
100(35/35)           JK4         4   -------.................................  38
```

도면4b

도면5a

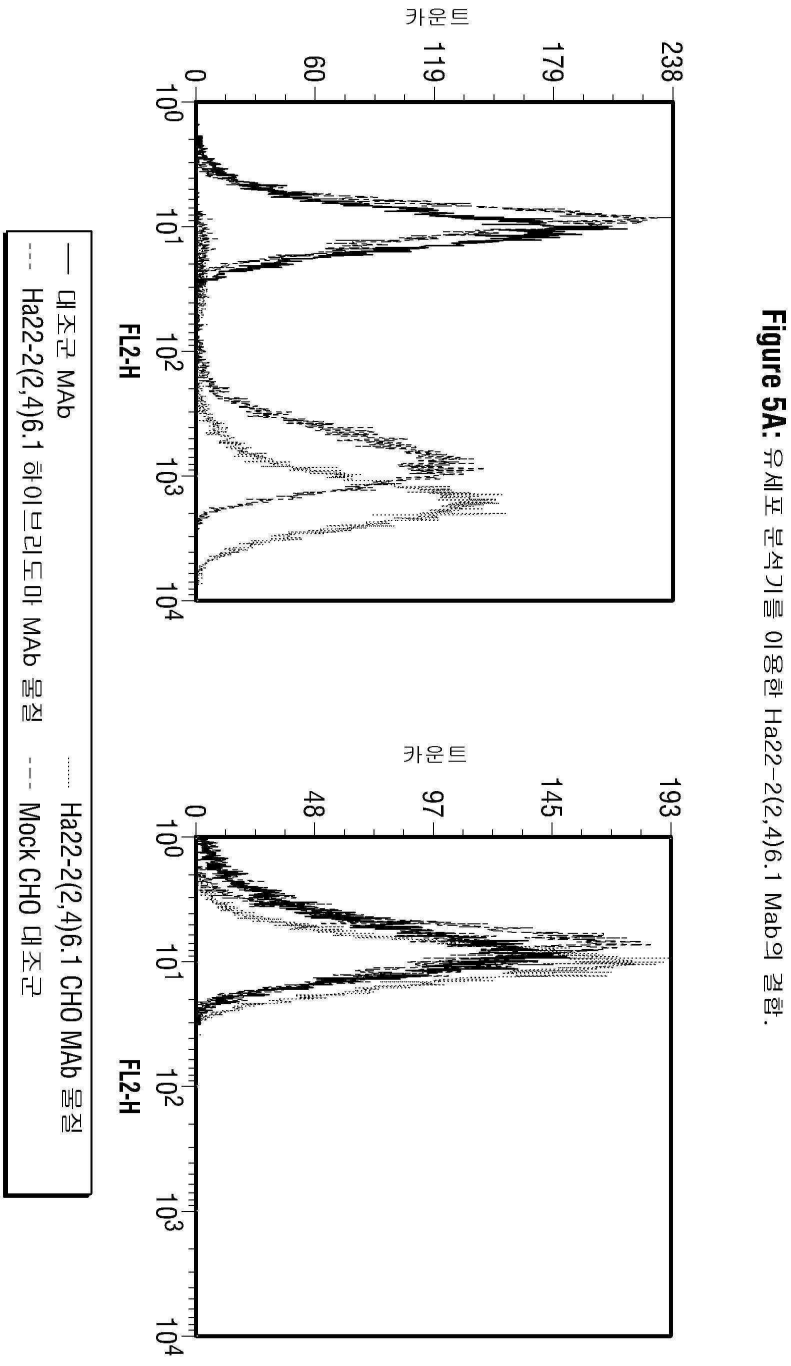


Figure 5A: 유세포 분석기를 이용한 Ha22-2(2,4)6.1 Mab의 결합.

도면5b

Figure 5B: ELISA를 이용한 Ha22-2(2,4)6.1 Mab의 결합.

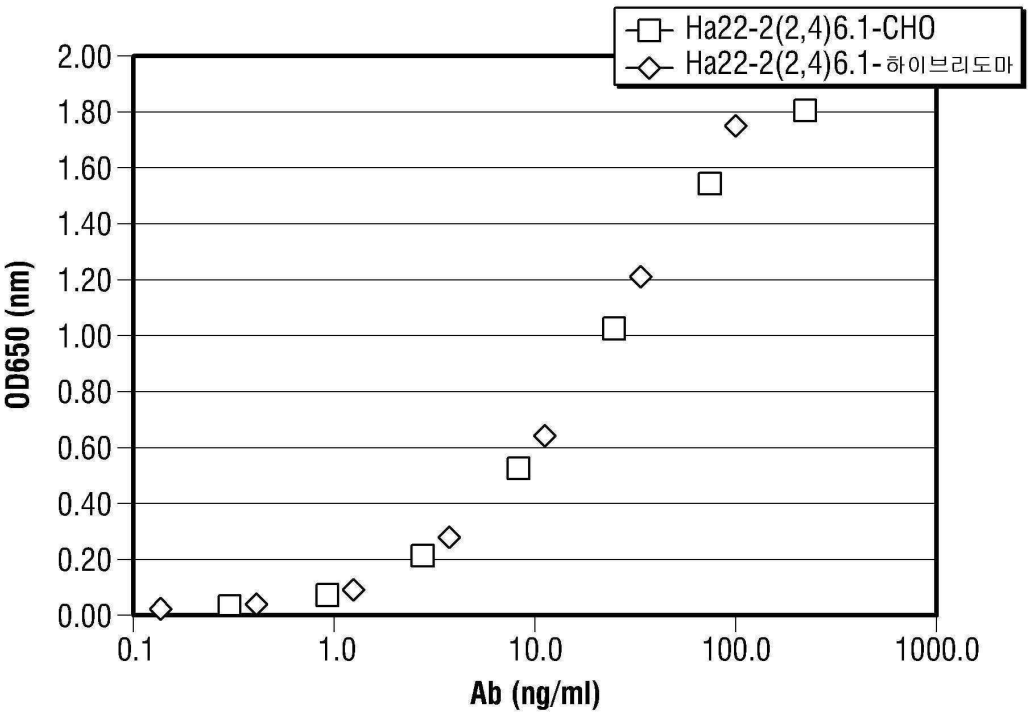
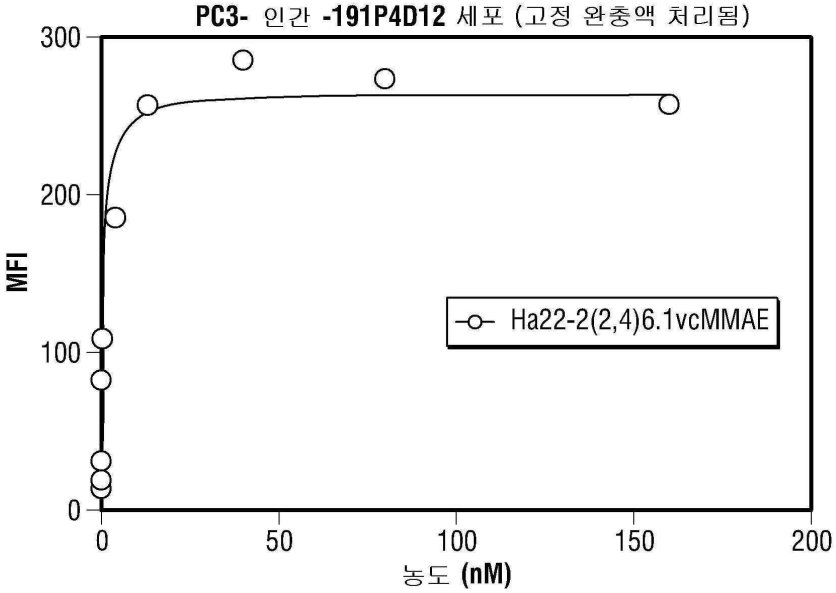


Figure 6: PC3-인간-191P4D12를 이용한 FACS에 의한 Ha22-2(2,4)6.1vc 친화도 측정.

MFI 값 (nM)	Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE
	Lot vcE-03
160	257
80	273
40	285
13.33	256
4.44	183
1.48	183
0.49	105
0.16	78
0.05	26
0.02	14
0.01	9
0.000	1



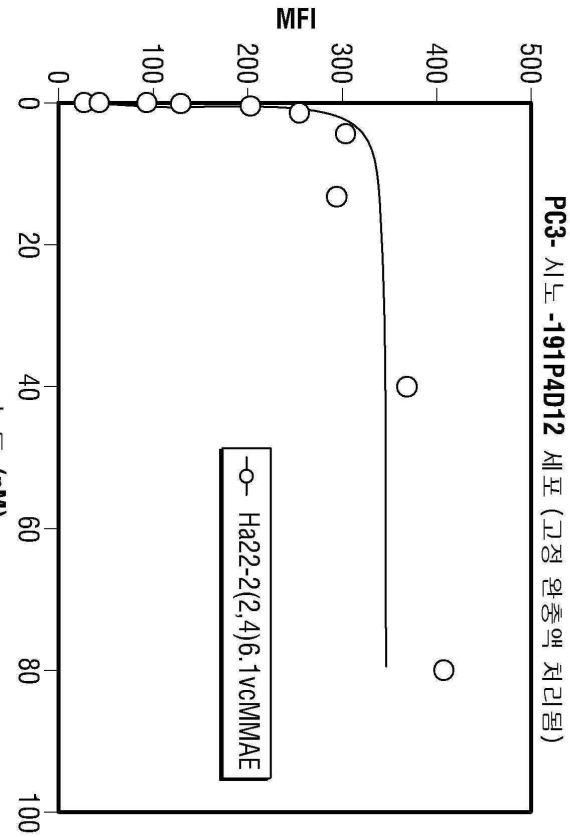
	Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE
	Lot vcE-03
Bmax	265
Kd (nM)	0.69

도면6

도면7

Figure 7: PC3-시노몰구스-191P4D12를 이용한 FACS에 의한 Ha22-2(2,4)6.1vc MMAE 친화도 측정.

MFI 값 (nM)	Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE
	Lot vcE-03
160	**375**
80	403
40	364
13.33	288
4.44	298
1.48	248
0.49	196
0.16	122
0.05	86
0.02	34
0.01	19
0.000	1

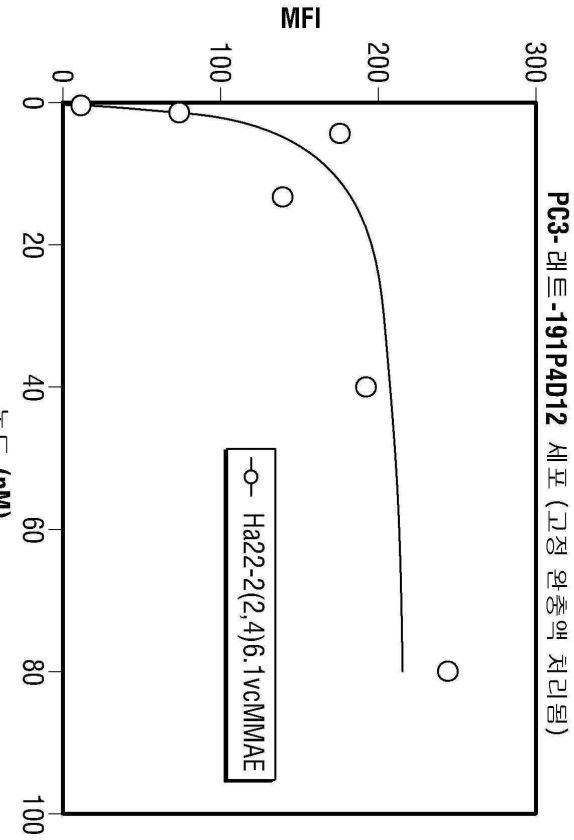


	Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE
	Lot vcE-03
Bmax	343
Kd (nM)	0.34

도면8

Figure 8: PC3-래트-191P4D12를 이용한 FACS에 의한 Ha22-2(2,4)6.1vc MMAE 친화도 측정.

MFI 값 (nM)	Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE
	Lot vcE-03
160	**205**
80	296
40	243
13.33	192
4.44	224
1.48	121
0.49	56
0.16	40
0.05	22
0.02	11
0.01	8
0.000	4



	Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE
	Lot vcE-03
Bmax	265
Kd (nM)	1.6

도면9a

Figure 9: Ha22-2(2,4)6.1vc MMAE에 의해 매개된 세포독성

PC-3 인간-191P4D12: 4일 사멸/웰 당 1500 세포

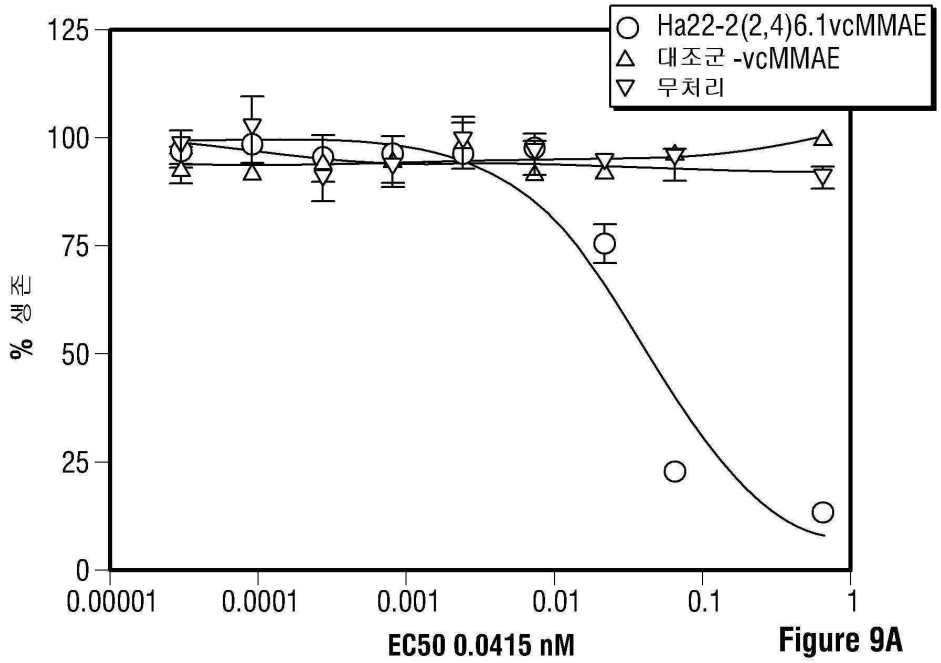


Figure 9A

도면9b

Figure 9: Ha22-2(2,4)6.1vc MMAE에 의해 매개된 세포독성

PC-3 시노-191P4D12: 4일 사멸/웰 당 1500 세포

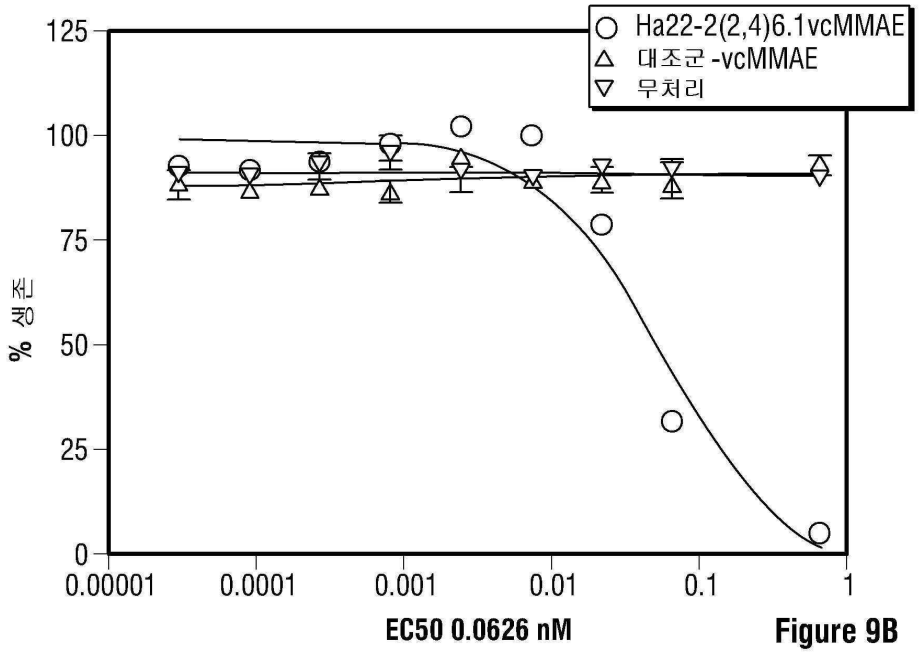
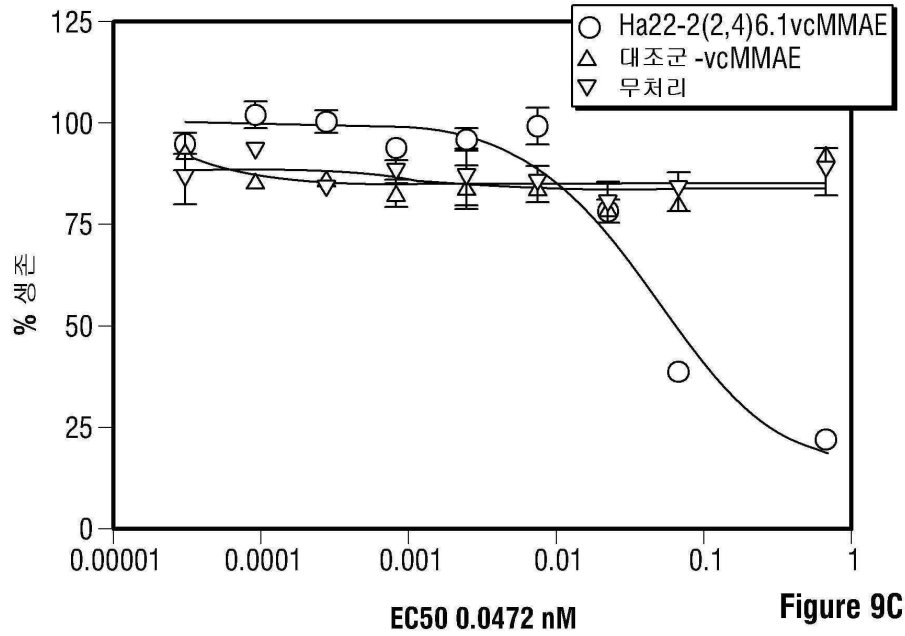


Figure 9B

도면9c

Figure 9: Ha22-2(2,4)6.1vc MMAE에 의해 매개된 세포독성

PC-3 래트-191P4D12: 4일 사멸/웰 당 1500 세포



EC50 0.0472 nM

Figure 9C

도면9d

Figure 9: Ha22-2(2,4)6.1vc MMAE에 의해 매개된 세포독성

PC-3 네오: 4일 사멸/웰 당 1500 세포

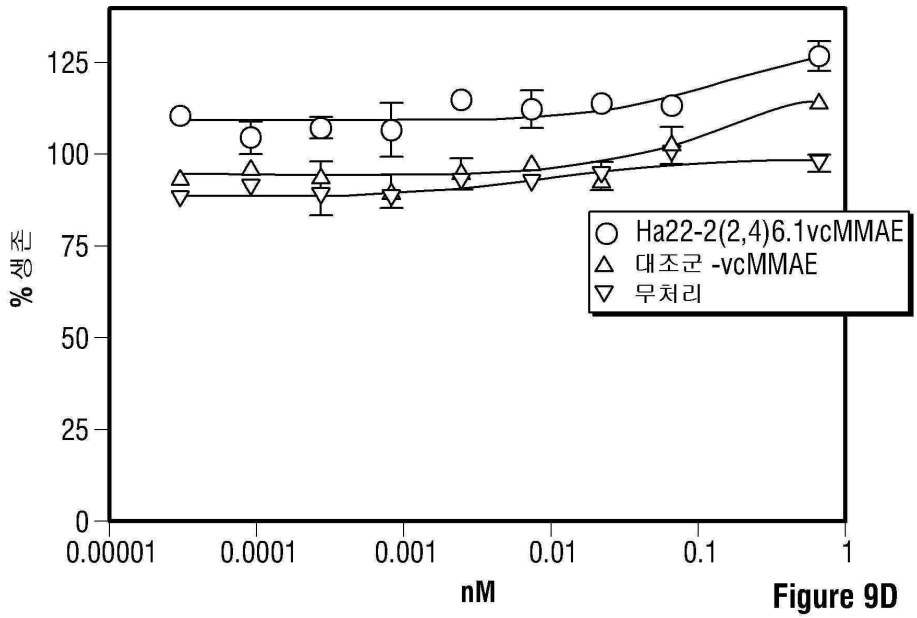


Figure 9D

도면10

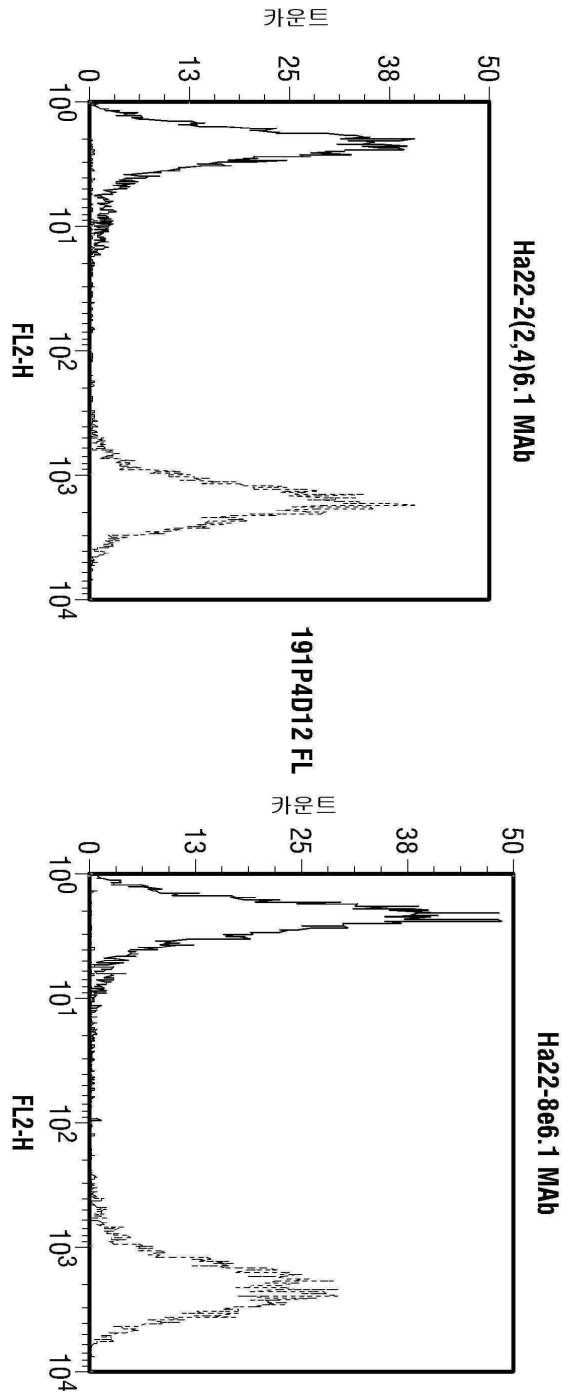


Figure 10: FACS에 의한 Ha22-2(2,4)6.1 Mab의 도메인 매핑

도면10a

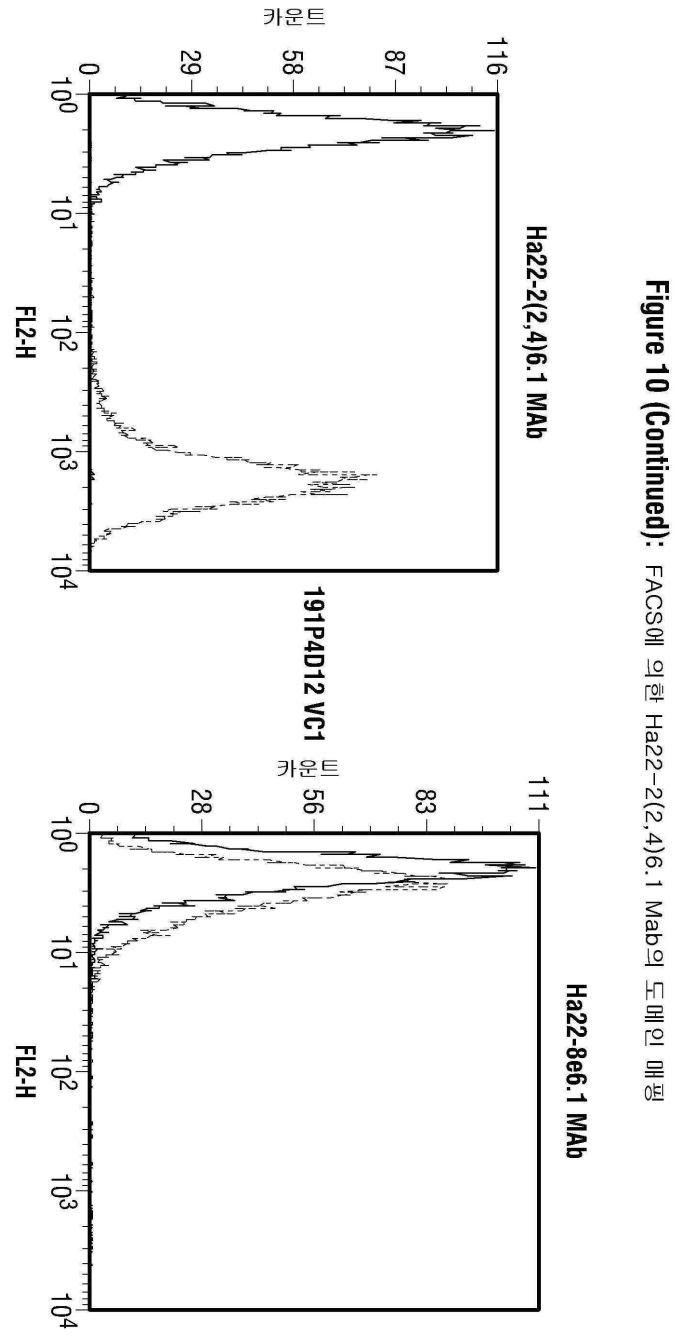


Figure 10 (Continued): FACS에 의한 Ha22-2(2,4)6.1 Mab의 도메인 매핑

도면10b

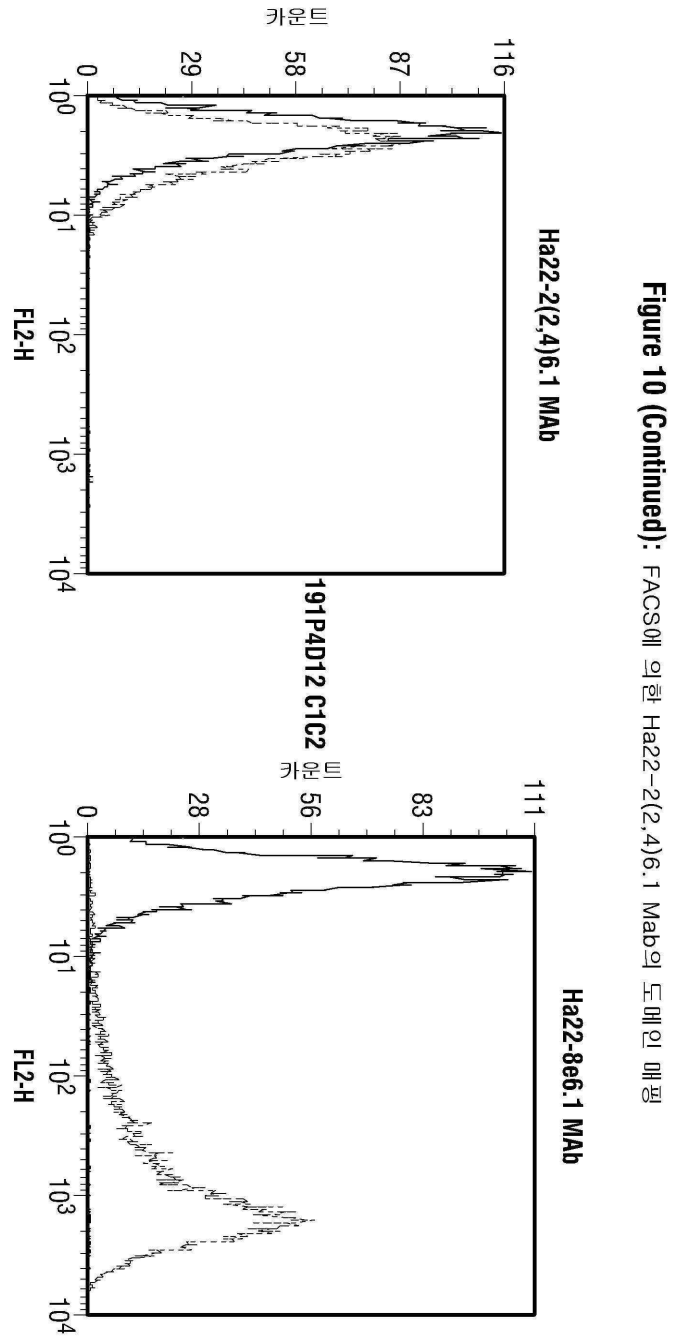
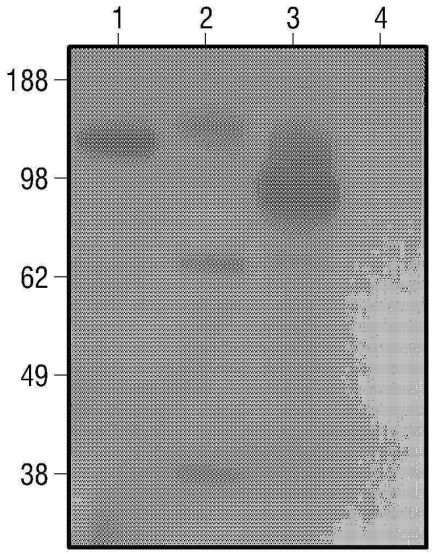


Figure 10 (Continued): FACS에 의한 Ha22-2(2,4)6.1 Mab의 도메인 매핑

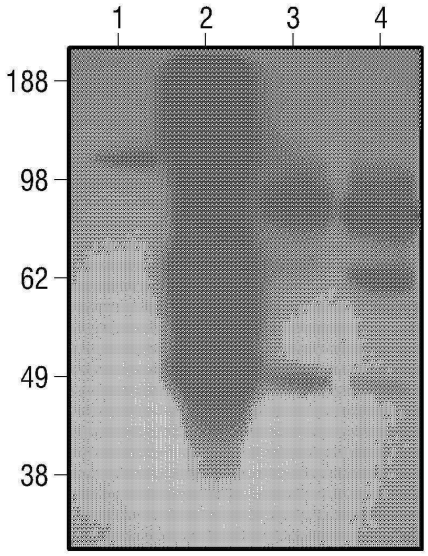
도면11

Figure 11: 웨스턴 블랏 분석에 의한
Ha22-2(2,4)6.1 Mab의 도메인 매핑



Ha22-2 (2,4)6.1-바이오틴 및
스트렙트아비딘-HRP을 이용하여
프로브시킴

- 191P4D12 전장
  ECD, mFc Fusion
- 191P4D12 (aa 1-147, V 도메인)
  mFc Fusion
- 191P4D12 (aa1-242, VC1 도메인)
  mFc Fusion
- 191P4D12
  (aa1-31,147-346, C1C2 도메인)
  mFc Fusion



염소-항-마우스 HRP 컨쥬게이트를
이용하여 프로브시킴

- 191P4D12 전장 ECD,
  mFc Fusion
- 191P4D12 (aa 1-147, V 도메인)
  mFc Fusion
- 191P4D12 (aa1-242, VC1 도메인)
  mFc Fusion
- 191P4D12
  (aa1-31,147-346, C1C2 도메인)
  mFc Fusion

도면12

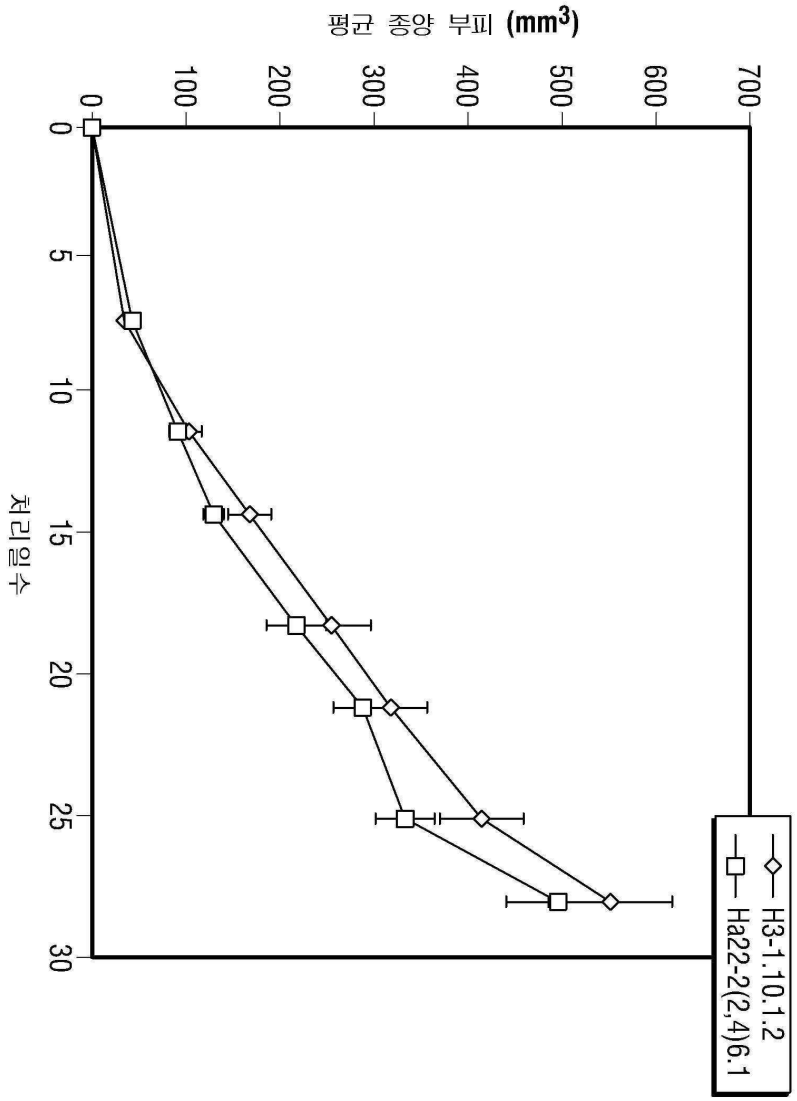


Figure 12: SCID 마우스에서 인간 폐암 이종이식편 AG-L4의 피하 종양형성 모델에서의 Ha22-2(2,4)6.1 Mab의 평가.

도면13

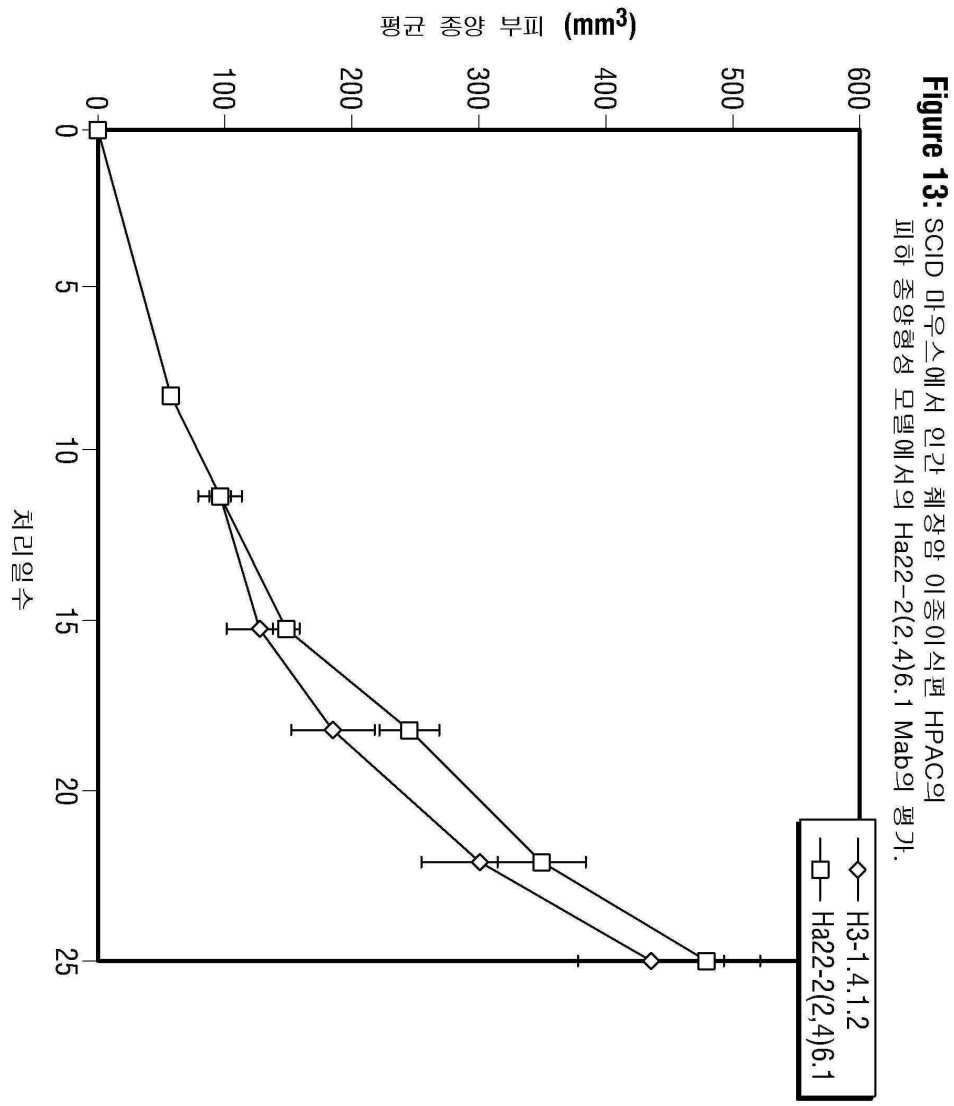


Figure 13: SCID 마우스에서 인간 췌장암 이종이식편 HPAC의 피하 종양형성 모델에서의 Ha22-2(2,4)6.1 Mab의 평가.

도면14

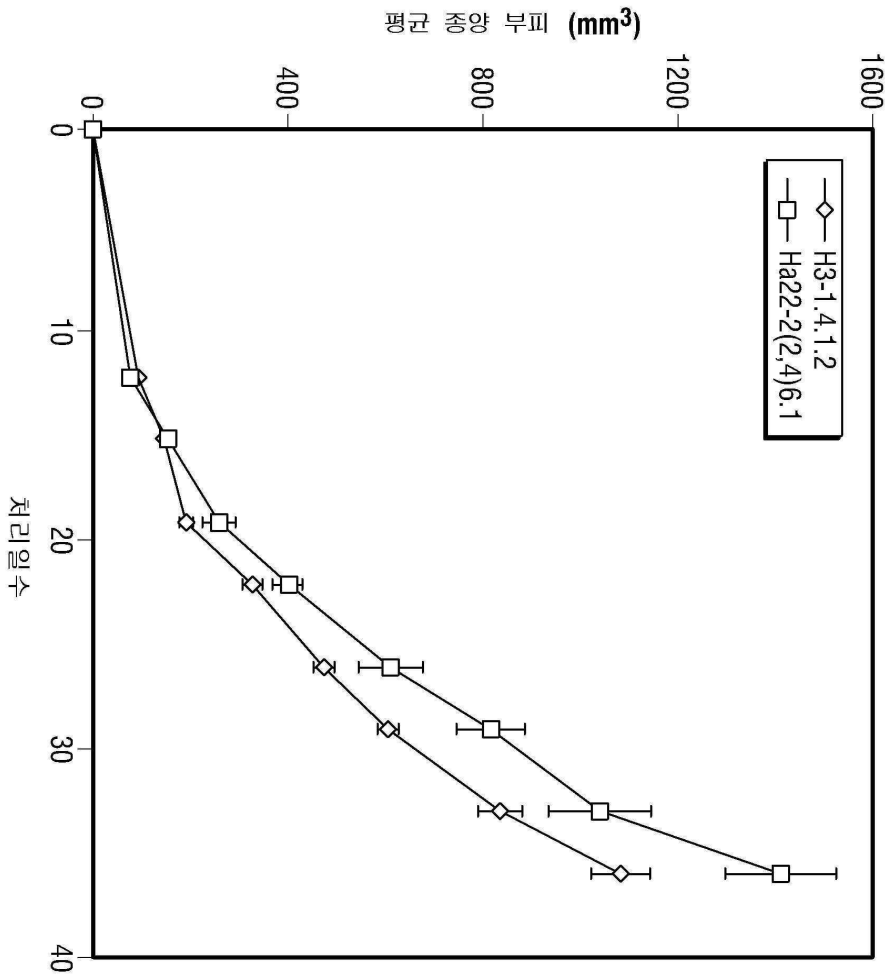


Figure 14: 마우스에서 인간 폐암 이종이식편 AG-Panc3의 피하 종양형성 모델에서의 Ha22-2(2,4)6.1 Mab의 평가.

도면15

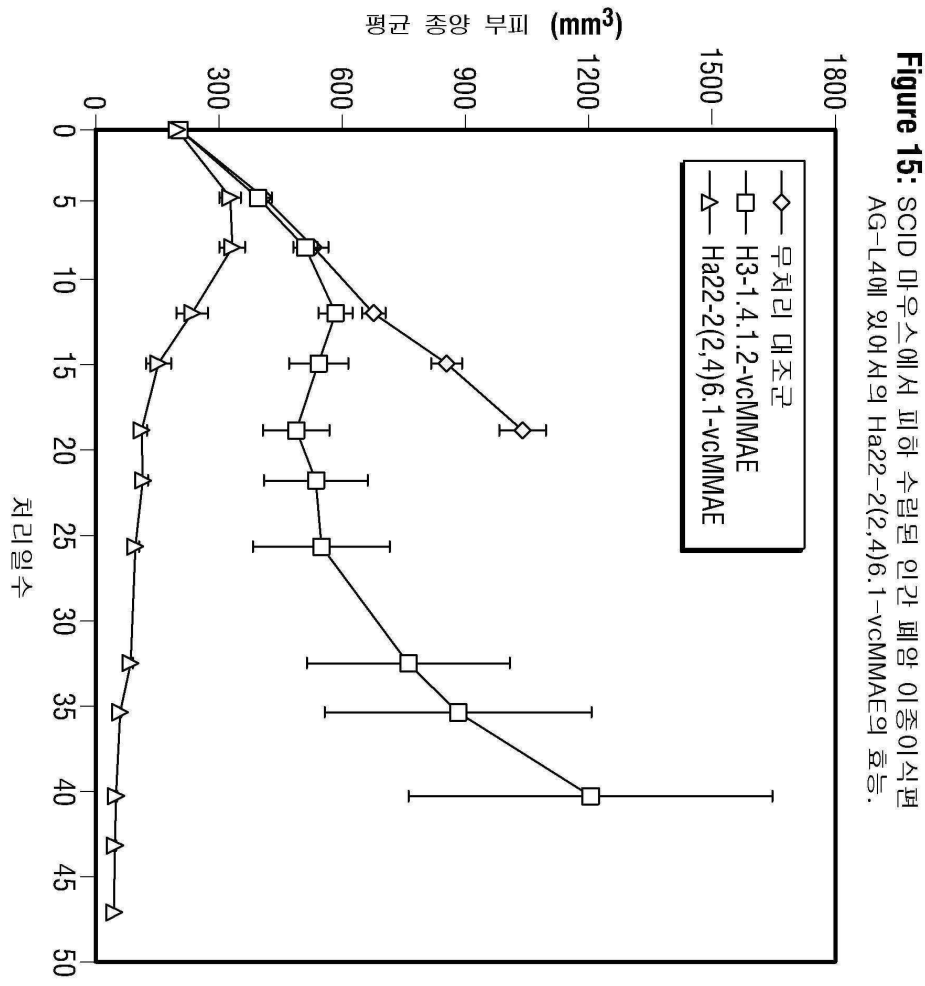


Figure 15: SCID 마우스에서 피하 수립된 인간 폐암 이종이식편 AG-L4에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능.

도면16

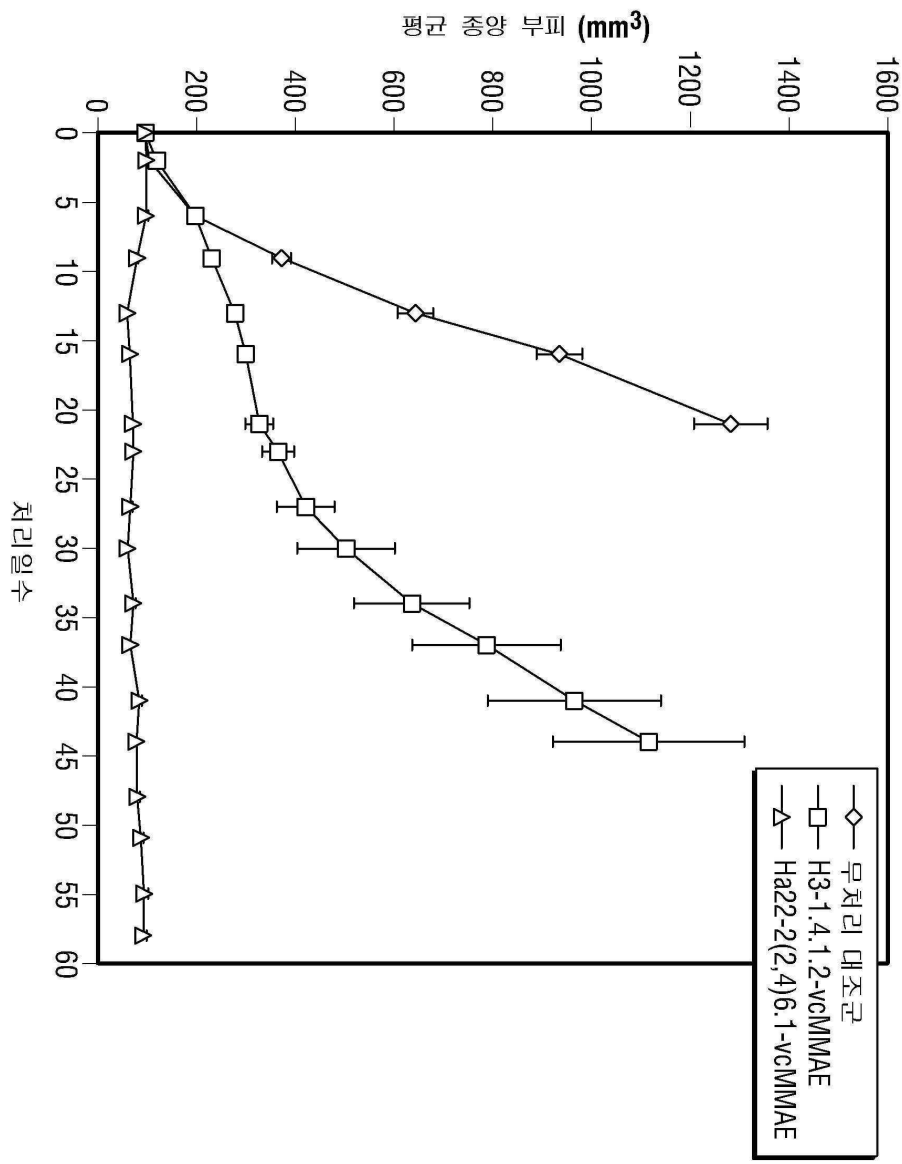


Figure 16: SCID 마우스에서 피하 수립된 인간 유방암 이종이식편 BT-483에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능.

도면17

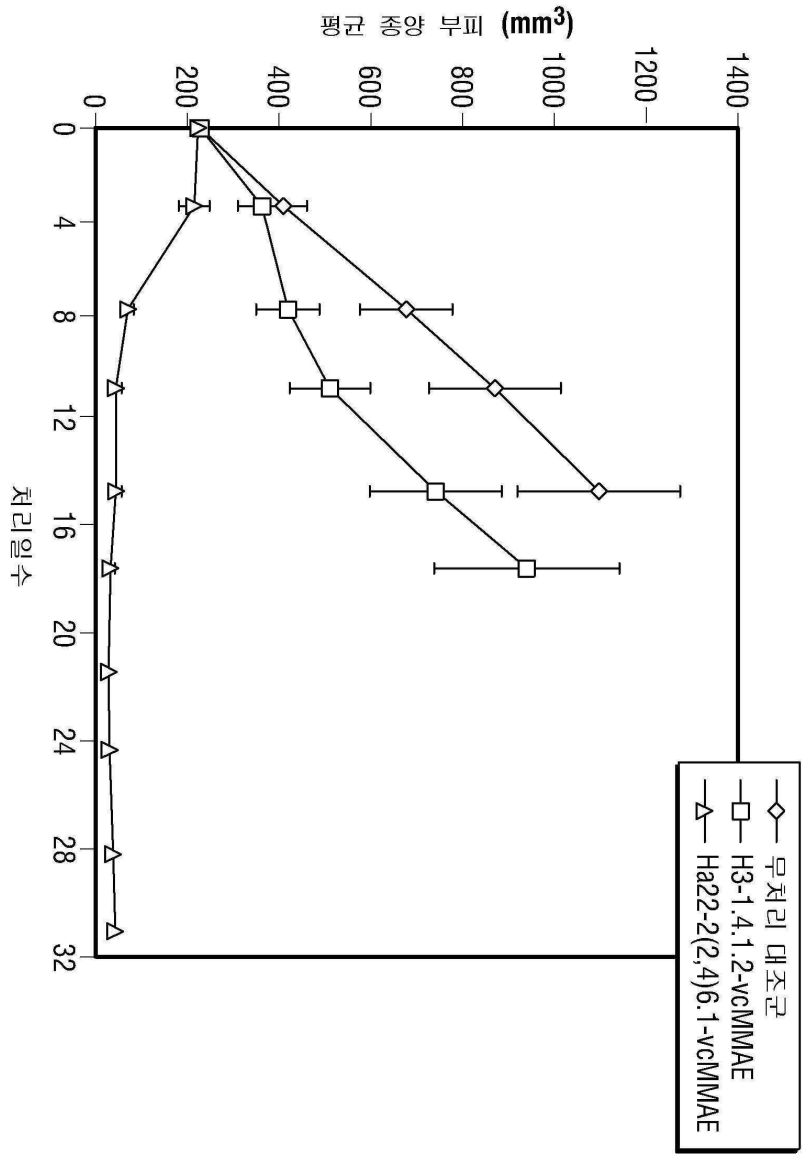


Figure 17: SCID 마우스에서 피하 수립된 인간 방광암 이종이식편 AG-B1에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능.

도면18

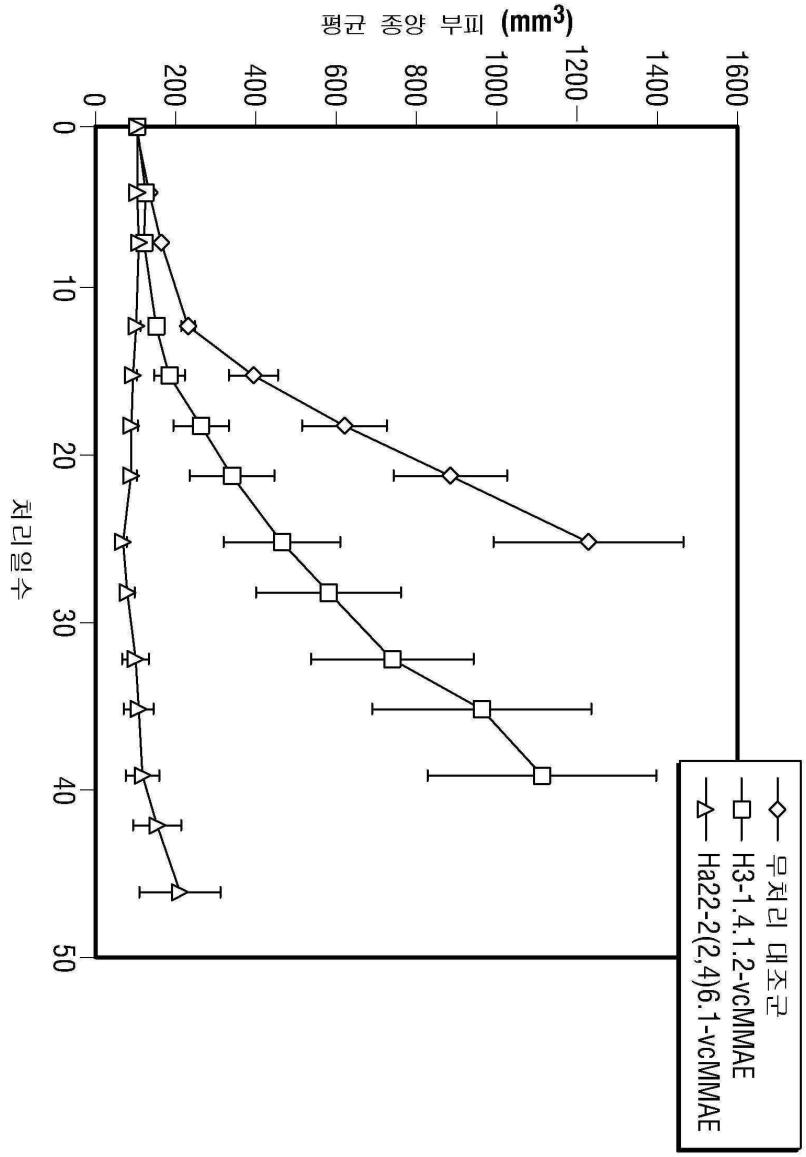


Figure 18: SCID 마우스에서 피하 수립된 인간 췌장암 이종이식편 AG-Panc2에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능.

도면19

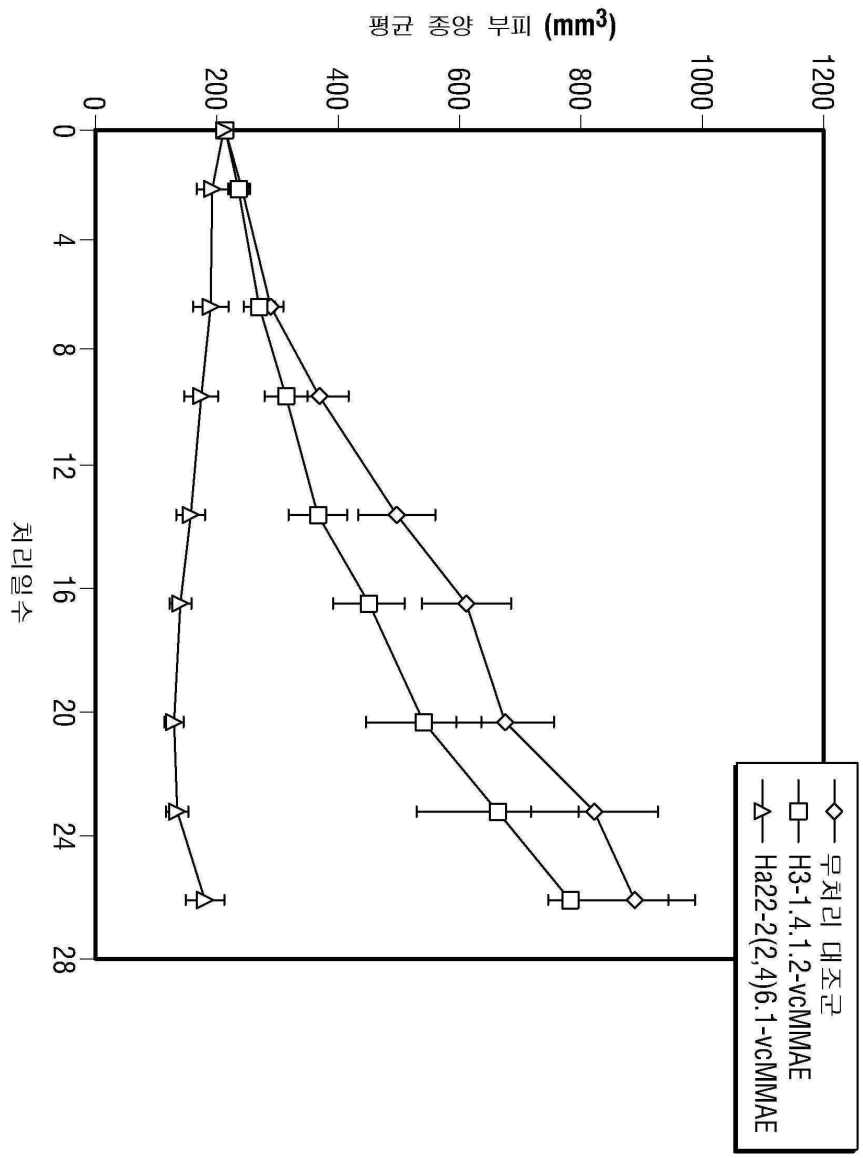


Figure 19: SCID 마우스에서 피하 수립된 인간 췌장암 이종이식편 AG-Panc4에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능.

도면20

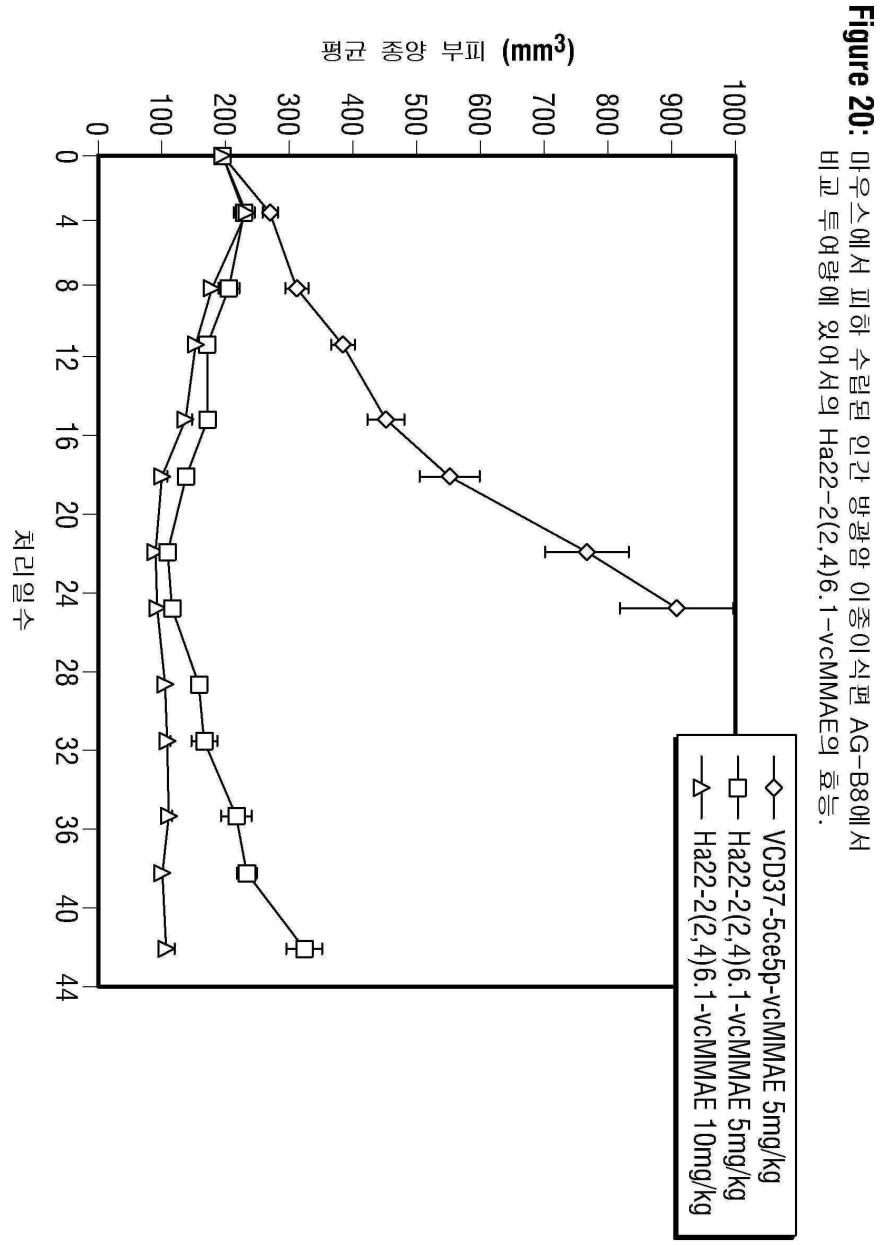


Figure 20: 마우스에서 피하 수립된 인간 방광암 이종이식편 AG-B8에서 비교 투여량에 있어서의 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE의 효능.

도면21

Figure 21: 면역조직화학에 의한 암환자 피검물 중 191P4D12 단백질의 검출.

방광암 피검물

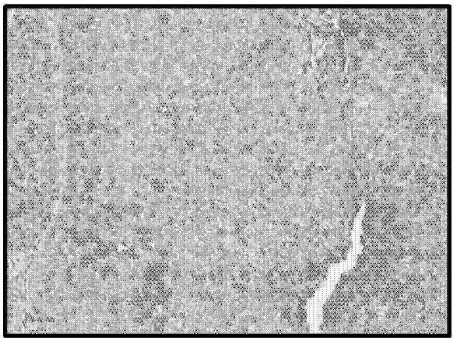


Figure 21A

방광암 피검물

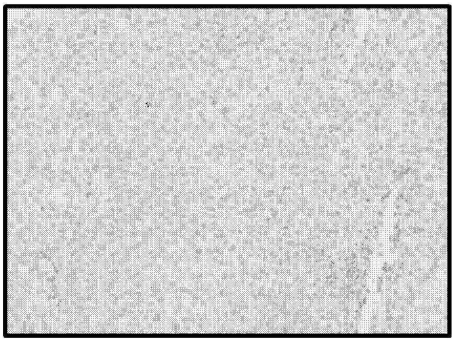


Figure 21B

유방암 피검물

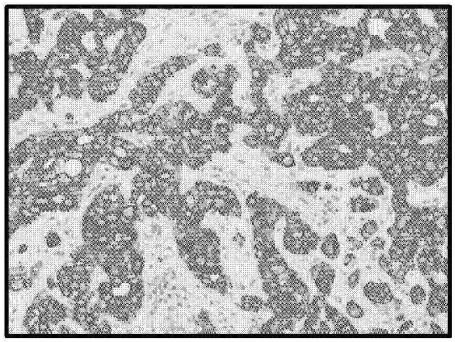


Figure 21C

유방암 피검물

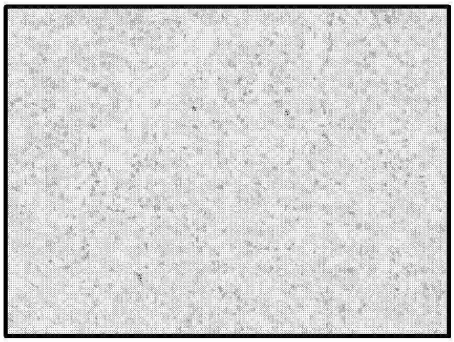


Figure 21D

도면21a

췌장암 피검물

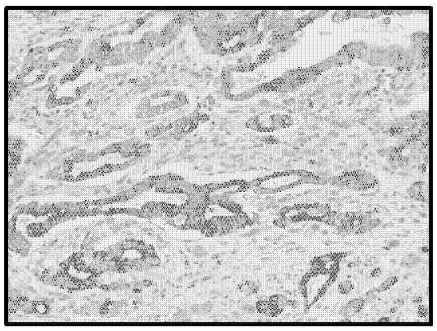


Figure 21E

췌장암 피검물

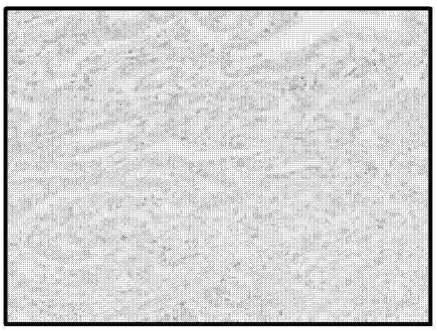


Figure 21F

폐암 피검물

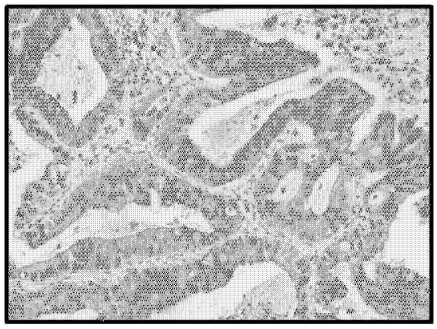


Figure 21G

폐암 피검물

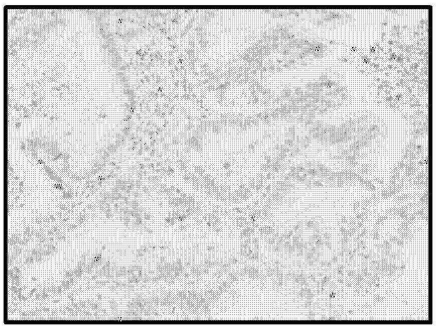


Figure 21H

난소암 피검물

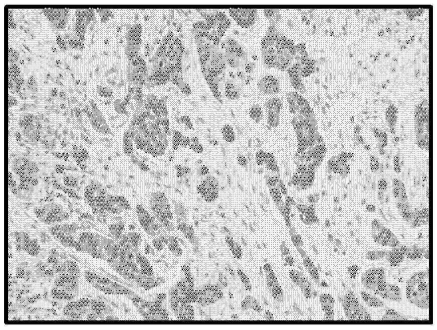


Figure 21I

난소암 피검물

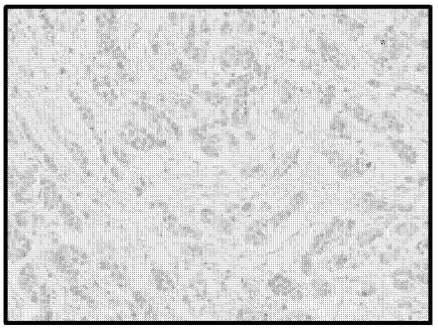


Figure 21J

도면21b

식도암 피검물

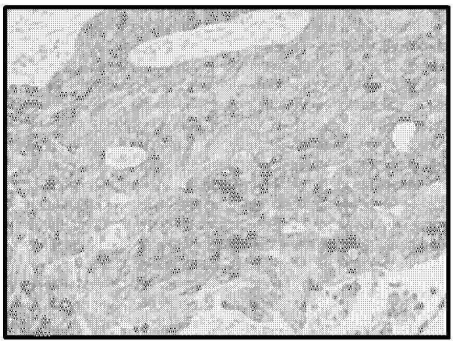


Figure 21K

식도암 피검물

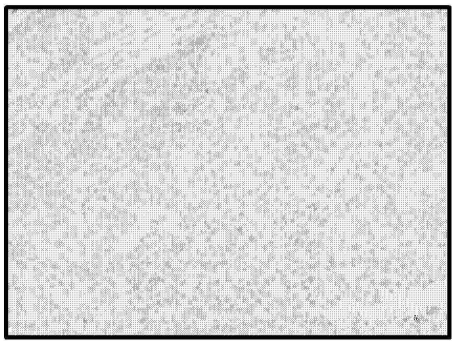


Figure 21L

두경부암 피검물

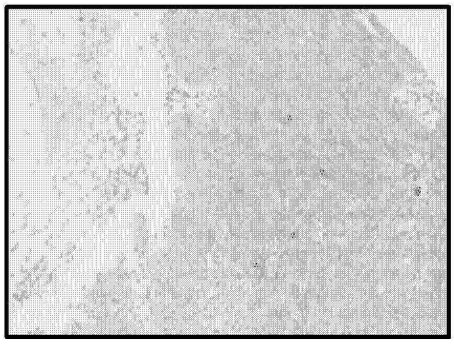


Figure 21M

두경부암 피검물

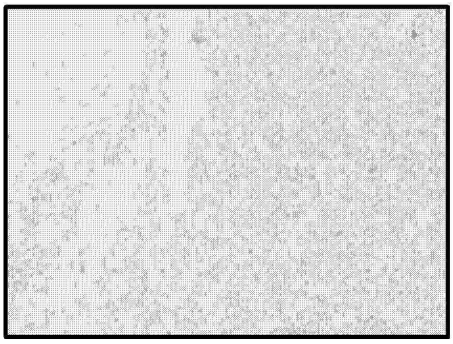


Figure 21N

도면22

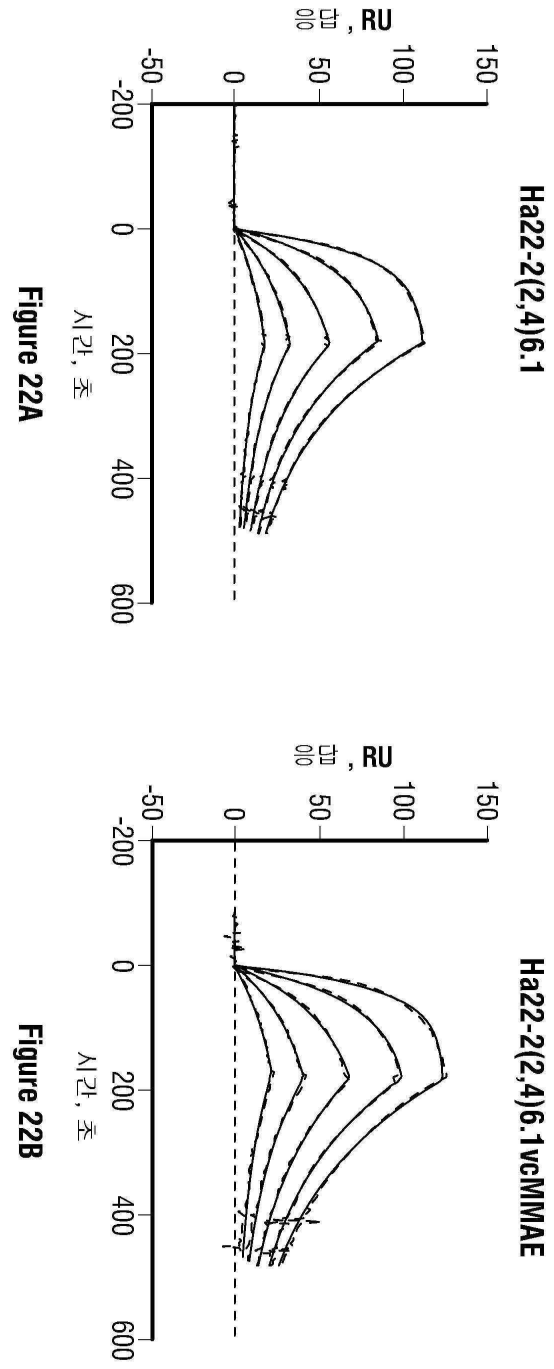


Figure 22: SPR을 통한 친화도 측정에 사용된 결합 곡선 (센소그램).

Figure 23: (A) 191P4D12 및 (B) 시노몰구스 원숭이로부터의 오솔로그 (C) 래트로부터의 오솔로그 및 (D) 마우스로부터의 오솔로그를 발현하는 PC3 세포에 대한 Ha22-2(2,4)6.1의 결합.

도면23

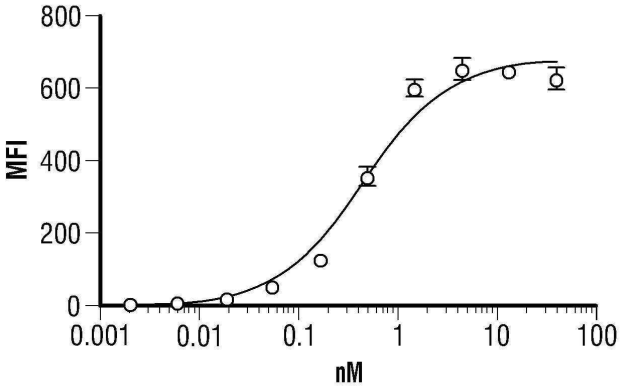


Figure 23A

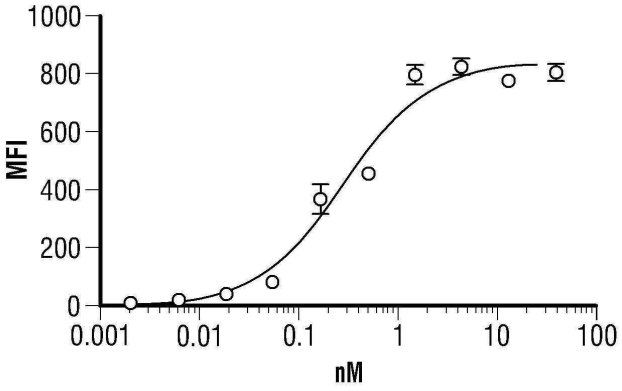


Figure 23B

Figure 23 (Continued): (A) 191P4D12 및 (B) 시노몰구스 원숭이로부터의 오솔로그 (C) 래트로부터의 오솔로그 및 (D) 마우스로부터의 오솔로그를 발현하는 PC3 세포에 대한 Ha22-2(2,4)6.1의 결합.

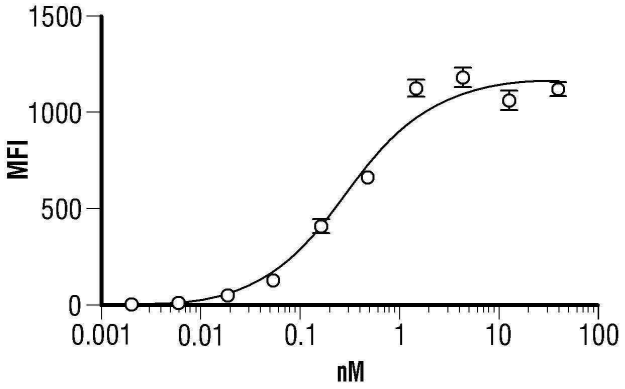


Figure 23C

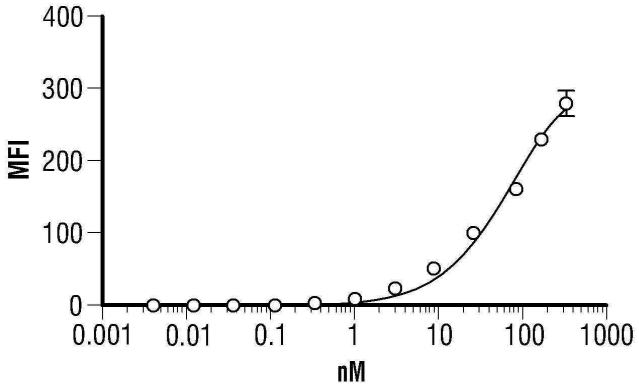


Figure 23D

도면23a

도면24a

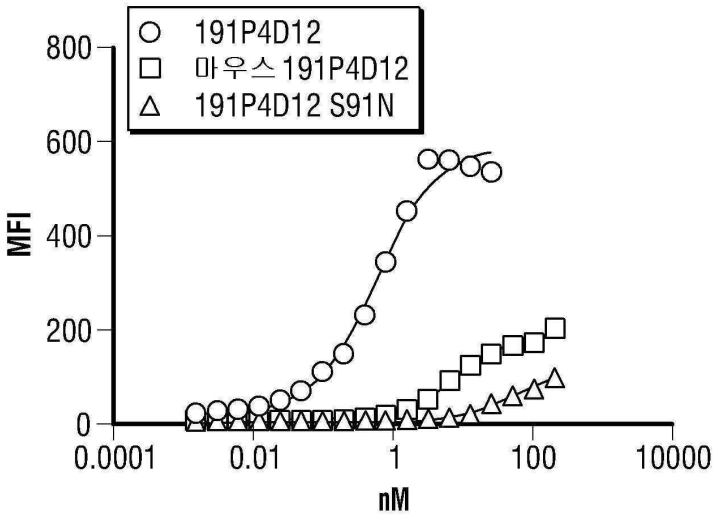


Figure 24A

도면24b

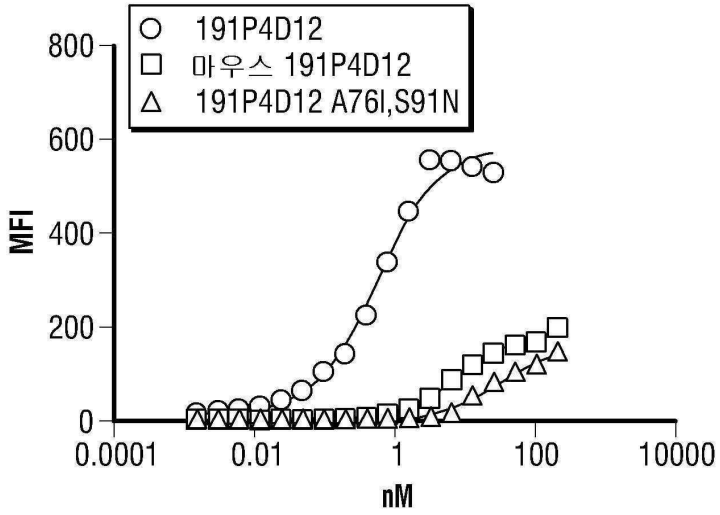


Figure 24B

도면24c

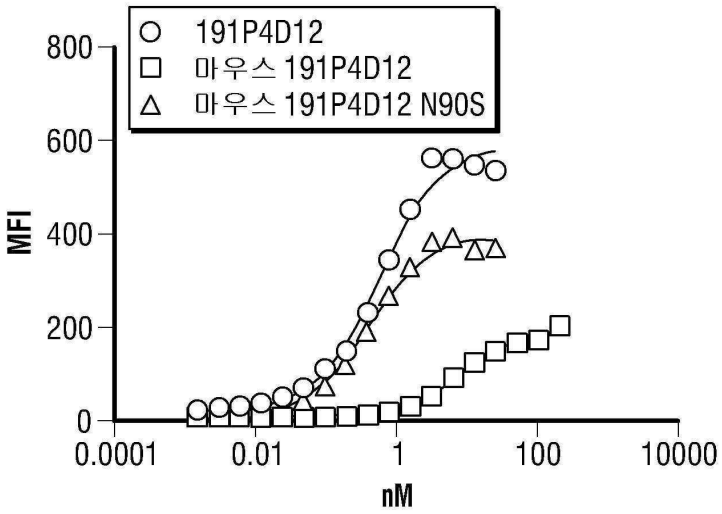


Figure 24C

도면24d

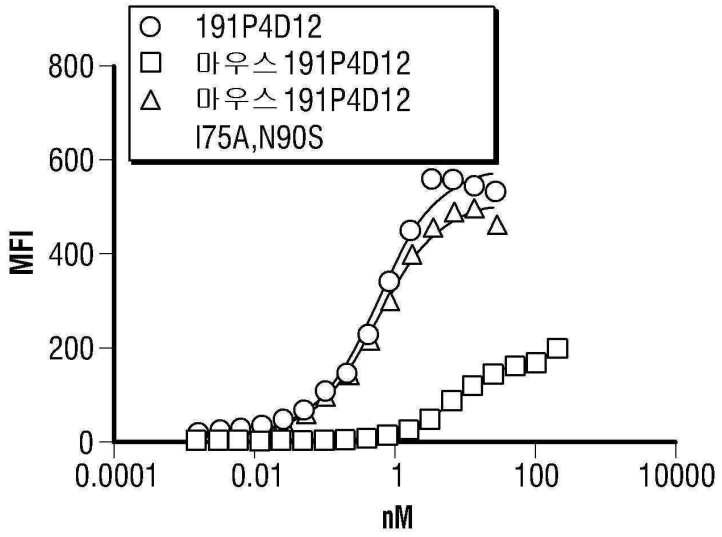


Figure 24D

도면25

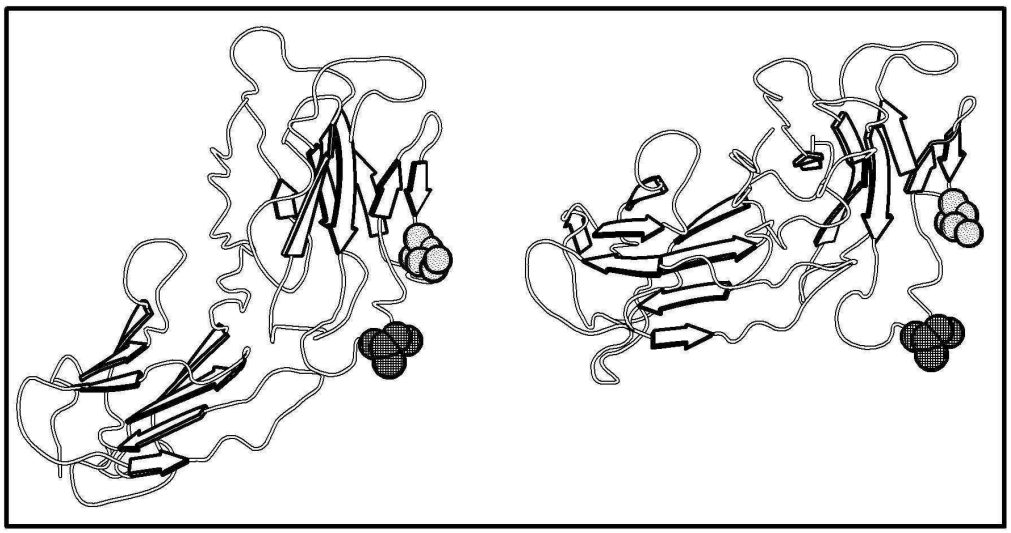


Figure 25

도면26a

Figure 26: FACS에의해 평가된 Ha22-2(2,4)6.1 Mab 의 결합.

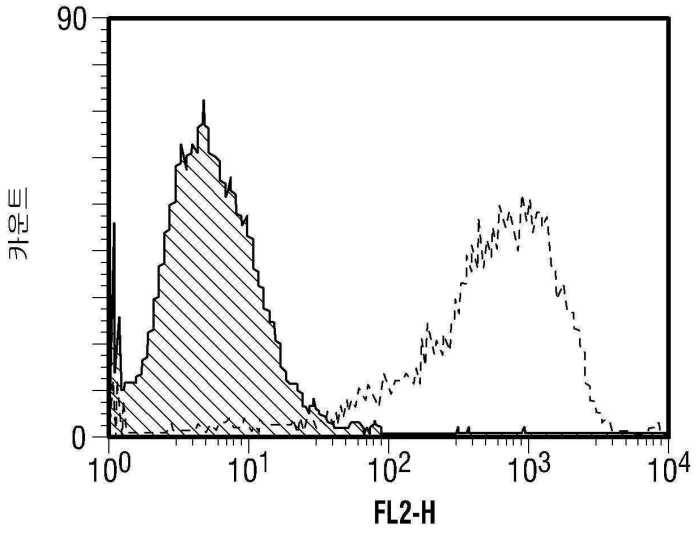


Figure 26A

도면26b

Figure 26(Continued): FACS에의해 평가된 Ha22-2(2,4)6.1 Mab 의 결합.

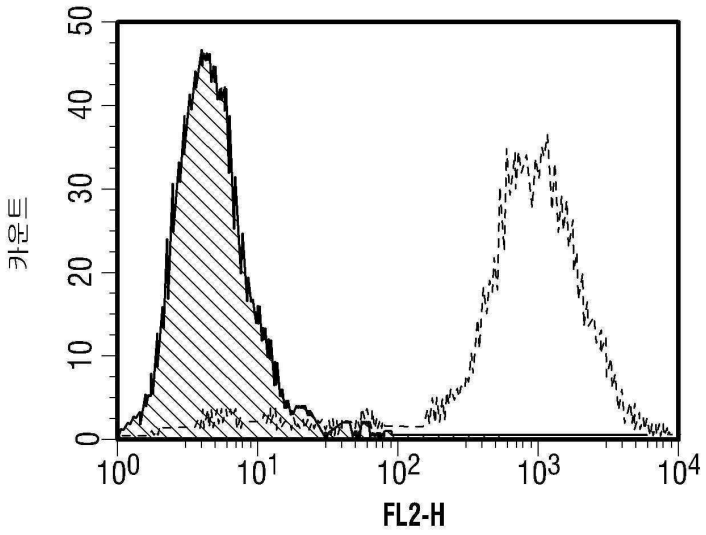


Figure 26B

도면26c

Figure 26(Continued): FACS에의해 평가된 Ha22-2(2,4)6.1 Mab 의 결합.

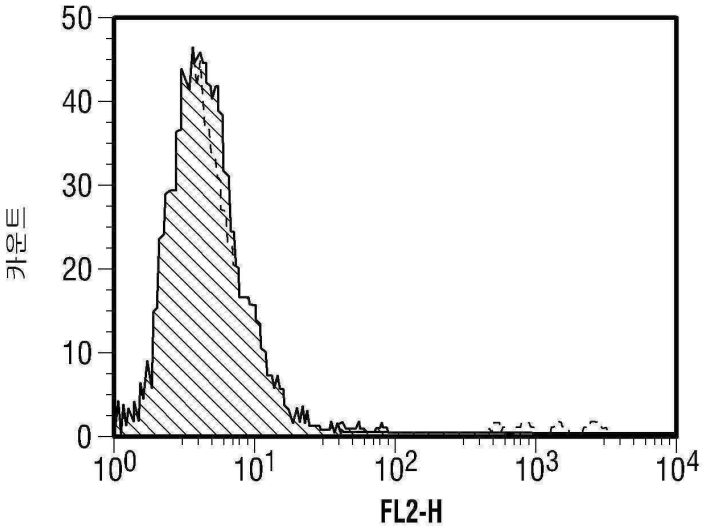


Figure 26C

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> AGENSYS, INC.

SEATTLE GENETICS, INC.

SATPAYEV, Daulet

MORRISON, Robert Kendall

MORRISON, Karen Jane Meyrick

GUDAS, Jean

JAKOBOVITS, Aya

TORGOV, Michael

AN, Zili

<120> ANTIBODY DRUG CONJUGATES (ADC) THAT BIND TO 191P4D12 PROTEINS

<130> 511582008250

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 61/387,933

<151> 2010-09-29

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3464

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (264)...(1796)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(3464)

<223> 191P4D12

<400> 1

ggccgtcgtt gttggccaca gcgtgggaag cagctctggg ggagctcgga gctcccgatc 60

acggcttctt gggggtagct acggctgggt gtgtagaacg gggccggggc tggggctggg 120

tcccctagtg gagacccaag tgcgagaggc aagaactctg cagcttcctg ccttctgggt 180

cagttcctta ttcaagtctg cagccggctc ccagggagat ctcggtggaa cttcagaaac 240

gctgggcagt ctgcctttca acc atg ccc ctg tcc ctg gga gcc gag atg tgg 293

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp

1 5 10

ggg cct gag gcc tgg ctg ctg ctg ctg cta ctg ctg gca tca ttt aca 341

Gly Pro Glu Ala Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr

15 20 25

ggc cgg tgc ccc gcg ggt gag ctg gag acc tca gac gtg gta act gtg 389

Gly Arg Cys Pro Ala Gly Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val

30 35 40

gtg ctg ggc cag gac gca aaa ctg ccc tgc ttc tac cga ggg gac tcc 437

Val Leu Gly Gln Asp Ala Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser

45 50 55

ggc gag caa gtg ggg caa gtg gca tgg gct cgg gtg gac gcg ggc gaa 485

Gly Glu Gln Val Gly Gln Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu

60 65 70

ggc gcc cag gaa cta gcg cta ctg cac tcc aaa tac ggg ctt cat gtg 533

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

75 80 85 90

agc ccg gct tac gag ggc cgc gtg gag cag ccg ccg ccc cca cgc aac 581

Ser Pro Ala Tyr Glu Gly Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn

95 100 105

ccc ctg gac ggc tca gtg ctc ctg cgc aac gca gtg cag gcg gat gag 629

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

110 115 120

ggc gag tac gag tgc cgg gtc agc acc ttc ccc gcc ggc agc ttc cag 677

Gly Glu Tyr Glu Cys Arg Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln

125 130 135

gcg cgg ctg cgg ctc cga gtg ctg gtg cct ccc ctg ccc tca ctg aat 725
Ala Arg Leu Arg Leu Arg Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn
140 145 150

cct ggt cca gca cta gaa gag ggc cag ggc ctg acc ctg gca gcc tcc 773
Pro Gly Pro Ala Leu Glu Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser
155 160 165 170

tgc aca gct gag ggc agc cca gcc ccc agc gtg acc tgg gac acg gag 821
Cys Thr Ala Glu Gly Ser Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu
175 180 185

gtc aaa ggc aca acg tcc agc cgt tcc ttc aag cac tcc cgc tct gct 869
Val Lys Gly Thr Thr Ser Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala
190 195 200

gcc gtc acc tca gag ttc cac ttg gtg cct agc cgc agc atg aat ggg 917
Ala Val Thr Ser Glu Phe His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly
205 210 215

cag cca ctg act tgt gtg gtg tcc cat cct ggc ctg ctc cag gac caa 965
Gln Pro Leu Thr Cys Val Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln
220 225 230

agg atc acc cac atc ctc cac gtg tcc ttc ctt gct gag gcc tct gtg 1013
Arg Ile Thr His Ile Leu His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val
235 240 245 250

agg ggc ctt gaa gac caa aat ctg tgg cac att ggc aga gaa gga gct 1061

Arg Gly Leu Glu Asp Gln Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala

255 260 265

atg ctc aag tgc ctg agt gaa ggg cag ccc cct ccc tca tac aac tgg 1109
Met Leu Lys Cys Leu Ser Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp
270 275 280

aca cgg ctg gat ggg cct ctg ccc agt ggg gta cga gtg gat ggg gac 1157
Thr Arg Leu Asp Gly Pro Leu Pro Ser Gly Val Arg Val Asp Gly Asp
285 290 295

act ttg ggc ttt ccc cca ctg acc act gag cac agc ggc atc tac gtc 1205
Thr Leu Gly Phe Pro Pro Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val
300 305 310

tgc cat gtc agc aat gag ttc tcc tca agg gat tct cag gtc act gtg 1253
Cys His Val Ser Asn Glu Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val
315 320 325 330

gat gtt ctt gac ccc cag gaa gac tct ggg aag cag gtg gac cta gtg 1301
Asp Val Leu Asp Pro Gln Glu Asp Ser Gly Lys Gln Val Asp Leu Val

335 340 345

tca gcc tcg gtg gtg gtg gtg ggt gtg atc gcc gca ctc ttg ttc tgc 1349
Ser Ala Ser Val Val Val Val Gly Val Ile Ala Ala Leu Leu Phe Cys
350 355 360

ctt ctg gtg gtg gtg gtg gtg ctc atg tcc cga tac cat cgg cgc aag 1397
Leu Leu Val Val Val Val Val Leu Met Ser Arg Tyr His Arg Arg Lys
365 370 375

gcc cag cag atg acc cag aaa tat gag gag gag ctg acc ctg acc agg 1445

Ala Gln Gln Met Thr Gln Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Leu Thr Arg

380 385 390

gag aac tcc atc cgg agg ctg cat tcc cat cac acg gac ccc agg agc 1493
Glu Asn Ser Ile Arg Arg Leu His Ser His His Thr Asp Pro Arg Ser
395 400 405 410

cag ccg gag gag agt gta ggg ctg aga gcc gag ggc cac cct gat agt 1541
Gln Pro Glu Glu Ser Val Gly Leu Arg Ala Glu Gly His Pro Asp Ser
415 420 425

ctc aag gac aac agt agc tgc tct gtg atg agt gaa gag ccc gag ggc 1589
Leu Lys Asp Asn Ser Ser Cys Ser Val Met Ser Glu Glu Pro Glu Gly
430 435 440

cgc agt tac tcc acg ctg acc acg gtg agg gag ata gaa aca cag act 1637
Arg Ser Tyr Ser Thr Leu Thr Thr Val Arg Glu Ile Glu Thr Gln Thr
445 450 455

gaa ctg ctg tct cca ggc tct ggg cgg gcc gag gag gag gaa gat cag 1685
Glu Leu Leu Ser Pro Gly Ser Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Asp Gln
460 465 470

gat gaa ggc atc aaa cag gcc atg aac cat ttt gtt cag gag aat ggg 1733
Asp Glu Gly Ile Lys Gln Ala Met Asn His Phe Val Gln Glu Asn Gly
475 480 485 490

acc cta cgg gcc aag ccc acg ggc aat ggc atc tac atc aat ggg cgg 1781
Thr Leu Arg Ala Lys Pro Thr Gly Asn Gly Ile Tyr Ile Asn Gly Arg
495 500 505

gga cac ctg gtc tga cccaggcctg cctcccttcc ctaggcctgg ctccttctgt 1836

Gly His Leu Val *

510

tgacatggga gattttagct catcttgggg gcctccttaa acacccccat ttcttgcgga 1896

agatgctccc catcccactg actgcttgac ctttacctcc aacccttctg ttcatcggga 1956

gggctccacc aattgagtct ctcccaccat gcatgcaggt cactgtgtgt gtgcatgtgt 2016

gcctgtgtga gtgttgactg actgtgtgtg tgtggagggg tgactgtccg tggaggggtg 2076

actgtgtccg tggtgtgtat tatgctgtca tatcagagtc aagtgaactg tggtgtatgt 2136

gccacgggat ttgagtggtt gcgtgggcaa cactgtcagg gtttggcgtg tgtgtcatgt 2196

ggctgtgtgt gacctctgcc tgaaaaagca ggtattttct cagaccccag agcagtatta 2256

atgatgcaga ggttggagga gagaggtgga gactgtggct cagacccagg tgtgcgggca 2316

tagctggagc tggaatctgc ctccggtgtg agggaacctg tctcctacca cttcggagcc 2376

atgggggcaa gtgtgaagca gccagtccct gggtcagcca gaggcttgaa ctgttacaga 2436

agccctctgc cctctggtgg cctctgggcc tgctgcatgt acatattttc tgtaaatata 2496

catgcgccgg gagcttcttg caggaatact gctccgaatc acttttaatt tttttctttt 2556

ttttttcttg ccctttccat tagttgtatt ttttatttat ttttatttttt attttttttt 2616

agagatggag tctcactatg ttgctcaggc tggccttgaa ctcctgggct caagcaatcc 2676

tcctgcctca gcctccctag tagctgggac tttaagtgta caccactgtg cctgctttga 2736

atcctttacg aagagaaaaa aaaaattaaa gaaagccttt agatttatcc aatgtttact 2796

actgggattg cttaaagtga ggcccctcca acaccagggg gttaattcct gtgattgtga 2856

aaggggctac ttccaaggca tcttcatgca ggcagcccct tgggagggca cctgagagct 2916

ggtagagtct gaaattaggg atgtgagcct cgtggttact gagtaaggta aaattgcatc 2976

caccattgtt tgtgatacct tagggaattg cttggacctg gtgacaaggg ctcctgttca 3036

atagtggtgt tggggagaga gagagcagtg attatagacc gagagagtag gagttgaggt 3096

gaggtgaagg aggtgctggg ggtgagaatg tcgcctttcc ccctgggttt tggatcacta 3156

attcaaggct cttctggatg tttctctggg ttggggctgg agttcaatga ggtttatttt 3216

tagctggccc acccagatac actcagccag aatacctaga tttagtaccc aaactcttct 3276

tagtctgaaa tctgctggat ttctggccta agggagaggc tcccatcctt cgttccccag 3336

ccagcctagg acttcgaatg tggagcctga agatctaaga tcctaacatg tacattttat 3396

gtaaatatgt gcatatttgt acataaaatg atattctgtt tttaaataaa cagacaaaac 3456

ttgaaaaa 3464

<210> 2

<211> 510

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(510)

<223> 191P4D12

<400> 2

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln

50 55 60

Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala

65 70 75 80

Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Gly

85 90 95

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

100 105 110

Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu Val Lys Gly Thr Thr Ser

180 185 190

Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala Ala Val Thr Ser Glu Phe

195 200 205

His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly Gln Pro Leu Thr Cys Val

210 215 220

Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln Arg Ile Thr His Ile Leu

225 230 235 240

His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val Arg Gly Leu Glu Asp Gln

245 250 255

Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala Met Leu Lys Cys Leu Ser

260 265 270

Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp Thr Arg Leu Asp Gly Pro

275 280 285

Leu Pro Ser Gly Val Arg Val Asp Gly Asp Thr Leu Gly Phe Pro Pro

290 295 300

Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val Cys His Val Ser Asn Glu

305 310 315 320

Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val Asp Val Leu Asp Pro Gln

325 330 335

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

340 345 350

Val Gly Val Ile Ala Ala Leu Leu Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val

355 360 365

Val Leu Met Ser Arg Tyr His Arg Arg Lys Ala Gln Gln Met Thr Gln

370 375 380

Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Leu Thr Arg Glu Asn Ser Ile Arg Arg

385 390 395 400

Leu His Ser His His Thr Asp Pro Arg Ser Gln Pro Glu Glu Ser Val

405 410 415

Gly Leu Arg Ala Glu Gly His Pro Asp Ser Leu Lys Asp Asn Ser Ser

420 425 430

Cys Ser Val Met Ser Glu Glu Pro Glu Gly Arg Ser Tyr Ser Thr Leu

435 440 445

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

450 455 460

Ser Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Asp Gln Asp Glu Gly Ile Lys Gln

465 470 475 480

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

485 490 495

Thr Gly Asn Gly Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Gly His Leu Val

500 505 510

<210> 3

<211> 1432

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (32)...(1432)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(1432)

<223> Ha22-2(2,4)6.1 heavy chain

<400> 3

ggtgatcagc actgaacaca gaggactcac c atg gag ttg ggg ctg tgc tgg 52

Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp

1 5

gtt ttc ctt gtt gct att tta gaa ggt gtc cag tgt gag gtg cag ctg 100

Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu

10 15 20

gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc 148

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

25 30 35

```
tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat aac atg aac tgg   196
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asn Met Asn Trp
 40                  45                  50                  55

gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt tca tac att agt   244
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser

                 60                  65                  70

agt agt agt agt acc ata tac tac gca gac tct gtg aag ggc cga ttc   292
Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
             75                  80                  85

acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tct ctg caa atg aac   340
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Ser Leu Gln Met Asn
         90                  95                 100

agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gca tac   388

Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr
    105                 110                 115

tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc   436
Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
120                 125                 130                 135

tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc   484
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
                140                 145                 150

aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac   532
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
            155                 160                 165
```

```
tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc   580
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
        170                 175                 180

agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac   628
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

    185                 190                 195

tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag   676
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
200                 205                 210                 215

acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac   724
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
                220                 225                 230

aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg   772

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
            235                 240                 245

tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc   820
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
        250                 255                 260

cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca   868
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
    265                 270                 275

tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac   916
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
280                 285                 290                 295
```

```
tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg   964
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
                300                 305                 310

gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc   1012
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

            315                 320                 325

ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc   1060
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
        330                 335                 340

aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa   1108
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    345                 350                 355

ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag   1156

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
360                 365                 370                 375

gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc   1204
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                380                 385                 390

tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag   1252
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
            395                 400                 405

aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc   1300
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
        410                 415                 420
```

ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg 1348
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
425 430 435

aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac 1396
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

440 445 450 455

acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga 1432
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *
460 465

<210> 4
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(466)
<223> Ha22-2(2,4)6.1 heavy chain
<400> 4
Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

325 330 335

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 5
<211> 735
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (25)...(735)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(735)
<223> Ha22-2(2,4)6.1 light chain
<400> 5
agtcagaccc agtcaggaca cagc atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc 51

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu

1 5

ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ttc cca ggt tcc aga tgc gac atc cag 99

Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln

10 15 20 25

atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct gtt gga gac aga gtc 147

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val

30 35 40

acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc ggc tgg tta gcc tgg 195

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Gly Trp Leu Ala Trp

45 50 55

tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ttc ctg atc tat gct gca 243

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

60 65 70

tcc act ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct 291

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

75 80 85

ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt 339

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

90 95 100 105

gca act tac tat tgt caa cag gct aac agt ttc cct ccc act ttc ggc 387

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly

110 115 120

gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc 435

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
125 130 135

ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct 483
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
140 145 150

gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag 531
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
155 160 165

tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc 579
Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
170 175 180 185

aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg 627

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
190 195 200

acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa 675
Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
205 210 215

gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg 723
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
220 225 230

gga gag tgt tag 735
Gly Glu Cys *
235

<210> 6

<211> 236

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(236)

<223> Ha22-2(2,4)6.1 light chain

<400> 6

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Gly Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 7
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(466)
<223> Ha22-2(2,4)6.1 heavy chain
<400> 7

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

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

Ser Leu Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
115 120 125
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

130 135 140

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

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

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460
Gly Lys
465

<210> 8
<211> 236
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(236)

<223> Ha22-2(2,4)6.1 light chain
<400> 8
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30
Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Gly Ile Ser Gly Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235

<210> 9

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(98)

<223> Human Ig germline VH3-48

<400> 9

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 Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

<210> 10
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(96)
<223> Human Ig germline L5
<400> 10
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95
<210> 11

<211> 179

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(179)

<223> 191P4D12 ortholog containing the V-domain

<400> 11

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15

Arg Leu Leu Phe Leu Ala Ser Phe Thr Gly Gln Tyr Ser Ala Gly Glu
20 25 30

Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala Lys
35 40 45

Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Pro Asp Glu Gln Val Gly Gln Val
50 55 60

Ala Trp Ala Arg Val Asp Pro Asn Glu Gly Ile Arg Glu Leu Ala Leu
65 70 75 80

Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Asn Pro Ala Tyr Glu Asp Arg
85 90 95

Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asp Pro Leu Asp Gly Ser Val Leu
100 105 110

Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg Val
115 120 125

Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Met Arg Leu Arg Val
130 135 140

Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Pro Leu Glu Glu
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser Pro
165 170 175

Ala Pro Ser

<210> 12

<211> 179

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(179)

<223> 191P4D12 ortholog containing the V-domain

<400> 12

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Glu Thr Ser Asp Leu Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala Lys
35 40 45

Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Pro Asp Glu Gln Val Gly Gln Val
50 55 60

Ala Trp Ala Arg Val Asp Pro Asn Glu Gly Thr Arg Glu Leu Ala Leu
65 70 75 80

Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Asp Arg

85 90 95

Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asp Pro Leu Asp Gly Ser Ile Leu
100 105 110

Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg Val
115 120 125

Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Met Arg Leu Arg Val
130 135 140

Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Pro Leu Glu Glu

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Pro Ser

<210> 13

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(180)

<223> 191P4D12 ortholog containing the V-domain

<400> 13

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr Gly Arg Cys Pro Ala Gly
20 25 30

Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala
35 40 45

Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln
50 55 60

Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala
65 70 75 80

Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Gly
85 90 95

Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly Ser Val
100 105 110

Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg
115 120 125

Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Leu Arg Leu Arg
130 135 140

Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Glu
145 150 155 160

Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser
165 170 175

Pro Ala Pro Ser

180