



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0128256
(43) 공개일자 2017년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 47/6803 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2017-7024226
(22) 출원일자(국제) 2016년03월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년08월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/022943
(87) 국제공개번호 WO 2016/149535
국제공개일자 2016년09월22일
(30) 우선권주장
62/134,981 2015년03월18일 미국(US)

(71) 출원인
시애틀 지네틱스, 인크.
미국 98021 워싱턴주 보텔 30번 드라이브
에스.이. 21823
(72) 발명자
루이스 티모시
미국 워싱턴 98021 보텔 30 드라이브 사우스이스
트 21823
고든 크리스틴
미국 워싱턴 98021 보텔 30 드라이브 사우스이스
트 21823
베스텐도르프 로리
미국 워싱턴 98021 보텔 30 드라이브 사우스이스
트 21823
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

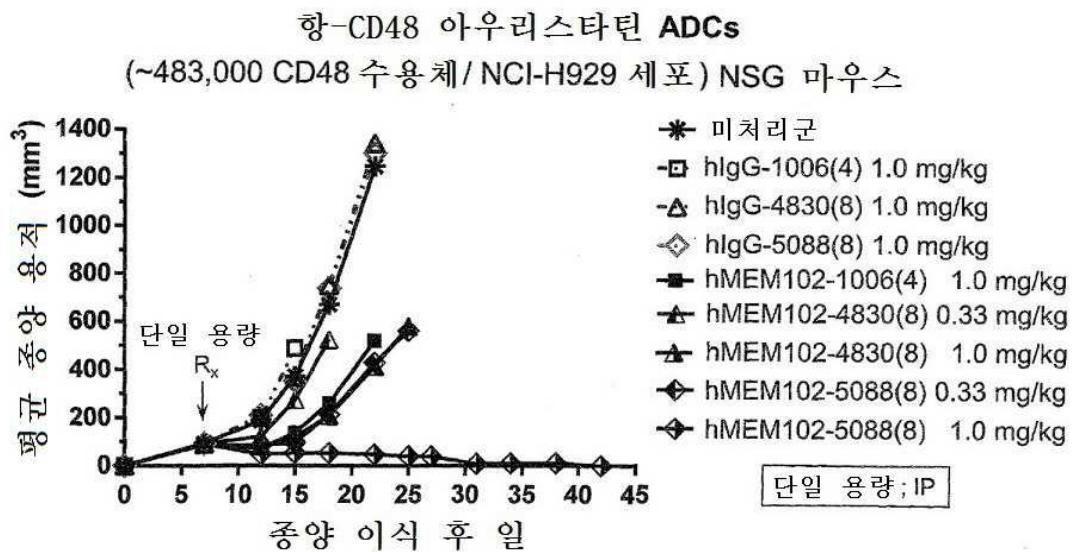
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 CD48 항체 및 이의 접합체

(57) 요약

본 발명은 CD48에 특이적으로 결합하는 무린 항체, 키메라 항체 및 인간화 항체, 및 이들의 접합체를 제공한다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 47/6807 (2017.08)

A61K 47/6849 (2017.08)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CD48 단백질에 특이적으로 결합하는 키메라 항체 또는 인간화 항체로서, 상기 항체가 서열 번호 3 내지 5의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 6 내지 8의 경쇄 CDR 서열을 포함하고, 그리고 상기 항체가, 상기 인간 CD48 단백질에 특이적으로 결합하고 서열 번호 3 내지 5의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 6 내지 8의 경쇄 CDR 서열을 포함하는 무린(murine) 항체와 비교하여, 상기 인간 CD48 단백질에 대하여 더 높은 결합 친화력을 나타내는, 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 키메라 항체 또는 인간화 항체가, 상기 무린 항체와 비교하여, 상기 인간 CD48 단백질에 대하여 적어도 2배 더 높은 결합 친화력을 나타내는, 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체가 인간화 항체인, 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체가 서열 번호 1의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체가 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 6

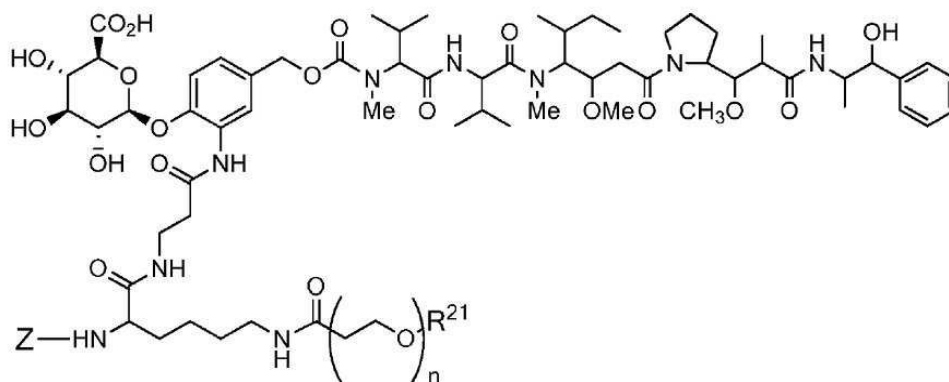
제4항에 있어서, 상기 항체가 서열 번호 1의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 링커에 부착된 세포독성 약물에 접합되는, 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 약물-링커가 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항체:



식 중, Z는 상기 항체 상의 작용기와 반응하여 이에 대한 공유 결합(covalent attachment)을 형성할 수 있는 반응성 부위를 갖는 유기 모이어티를 나타내고, n은 8 내지 36의 범위이며, R^{PR} 은 수소 또는 보호기이고, R^{21} 은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 위한 캡핑 단위(capping unit)이다.

청구항 9

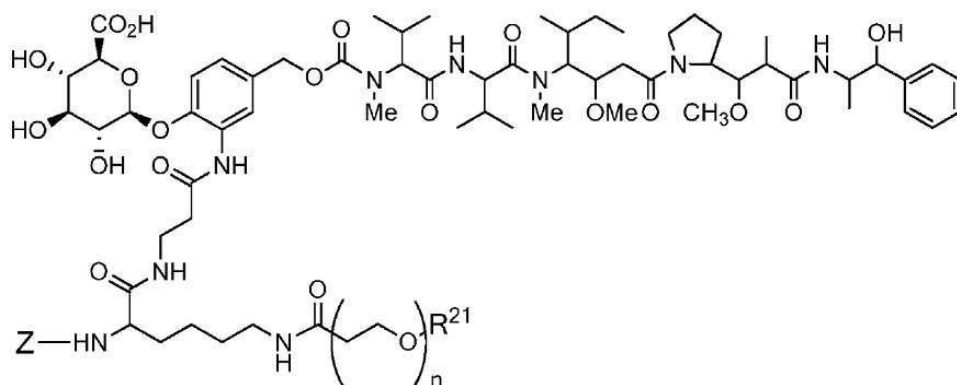
인간 CD48 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화 항체로서, 상기 항체가 서열 번호 1의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항체가 링커에 부착된 세포독성 약물에 접합되는, 항체.

청구항 11

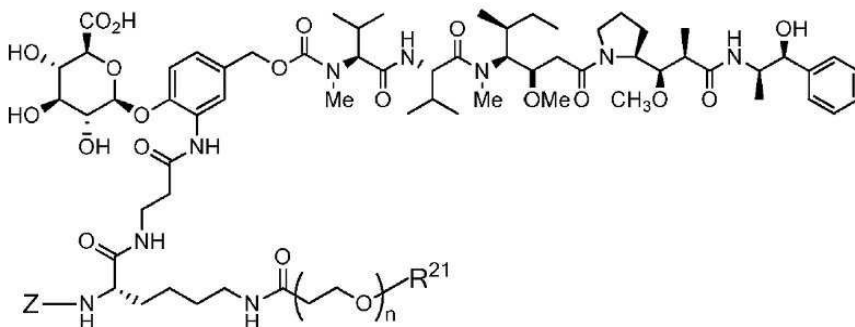
제10항에 있어서, 상기 약물-링커가 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항체:



식 중, Z는 상기 항체 상의 작용기와 반응하여 이에 대한 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위를 갖는 유기 모이어티를 나타내고, n은 8 내지 36의 범위이며, R^{PR}은 수소 또는 보호기이고, R²¹은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 위한 캡핑 단위이다.

청구항 12

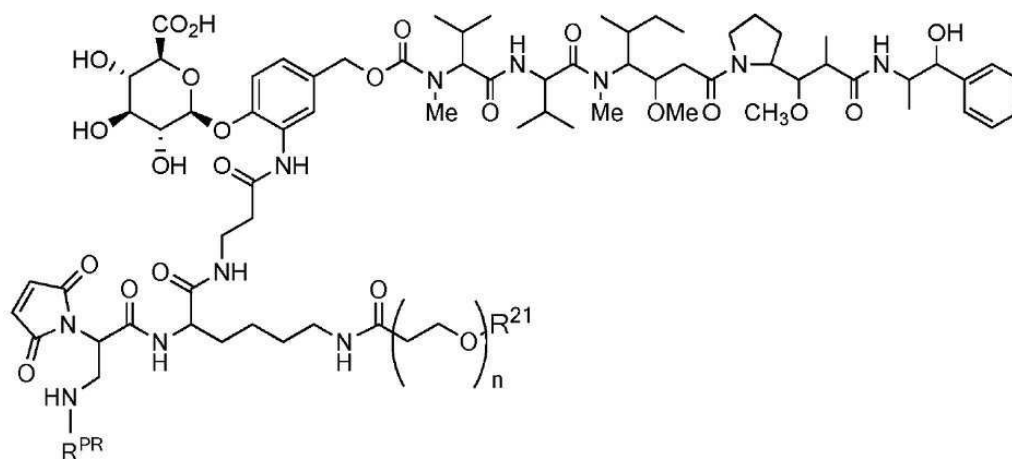
제10항에 있어서, 상기 약물-링커가 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항체:



식 중, Z는 상기 항체 상의 작용기와 반응하여 이에 대한 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위를 갖는 유기 모이어티를 나타내고, n은 8 내지 36의 범위이며, R^{PR}은 수소 또는 보호기이고, R²¹은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 대한 캡핑 단위이다.

청구항 13

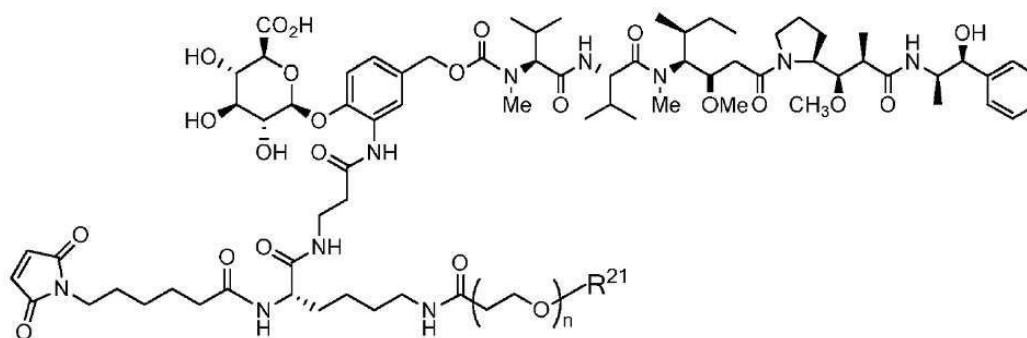
제10항에 있어서, 약물-링커가 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항체:



식 중, n 은 8 내지 36의 범위이고, R^{PR} 은 수소 또는 보호기이며, R^{21} 은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 대한 캡핑 단위이다.

청구항 14

제10항에 있어서, 약물-링커가 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항체:



식 중, n 은 8 내지 36의 범위이고, R^{PR} 은 수소 또는 보호기이며, R^{21} 은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 대한 캡핑 단위이다.

청구항 15

제1항 또는 제9항에 있어서, n 이 8 내지 14의 범위인, 항체.

청구항 16

제1항 또는 제9항에 있어서, n 이 10 내지 12의 범위인, 항체.

청구항 17

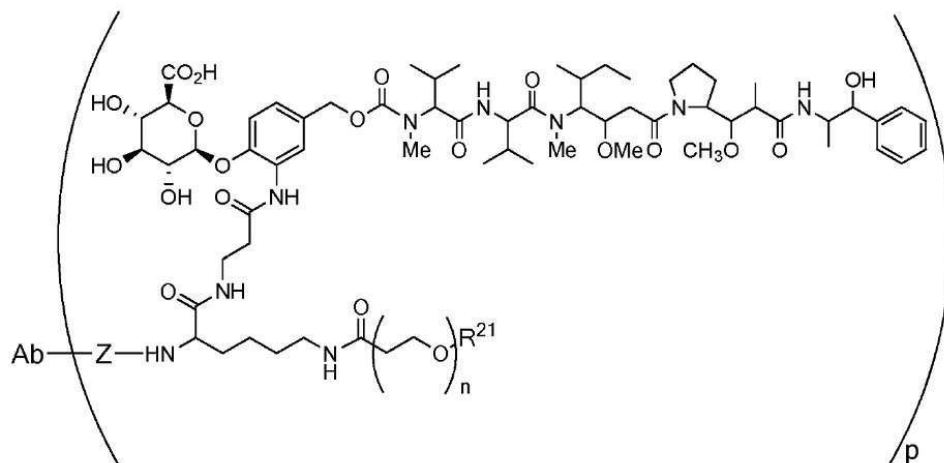
제1항 또는 제9항에 있어서, n 이 12인, 항체.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, R^{21} 이 $-CH_3$ 또는 $-CH_2CH_2CO_2H$ 인, 항체.

청구항 19

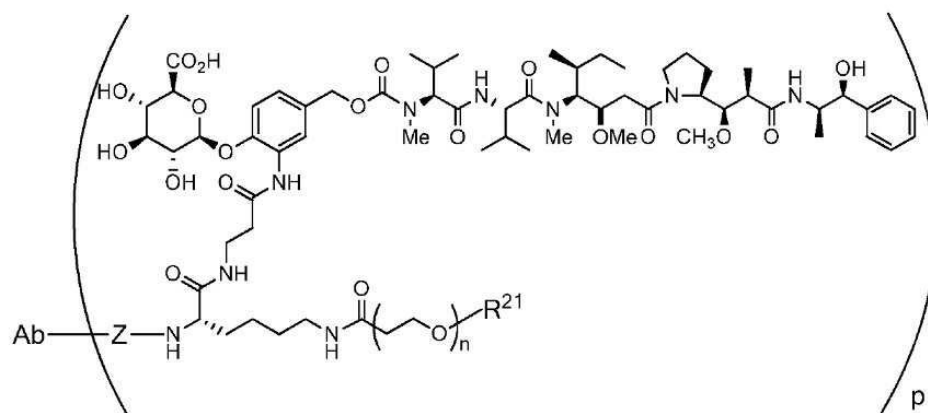
하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물:



식 중, Ab는 제1항 또는 제9항의 항-CD48 항체이고, Z는 공유 결합을 통해 상기 항체와 약물-링커의 나머지를 연결하는 유기 모이어티를 나타내며, n은 8 내지 36의 범위이고, R²¹은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 위한 캡핑 단위이며, 그리고 p는 1 내지 16이다.

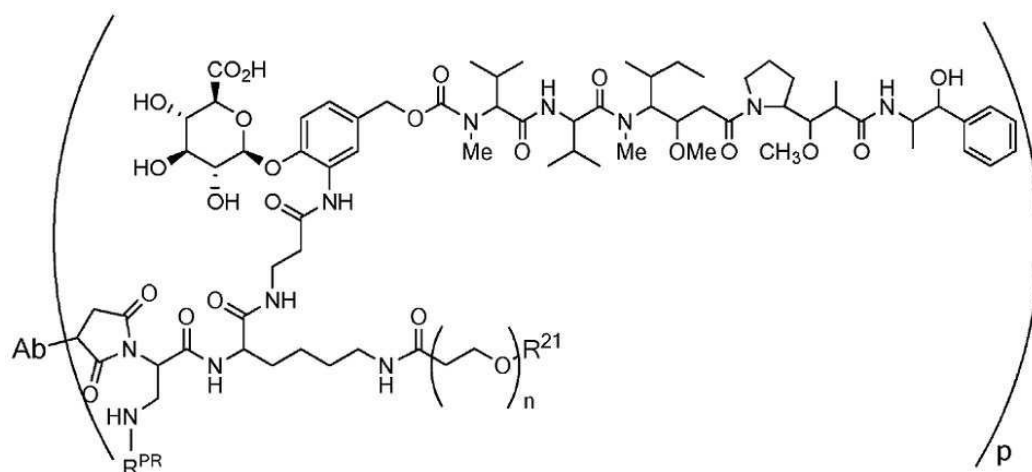
청구항 20

제19항에 있어서, 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물:



청구항 21

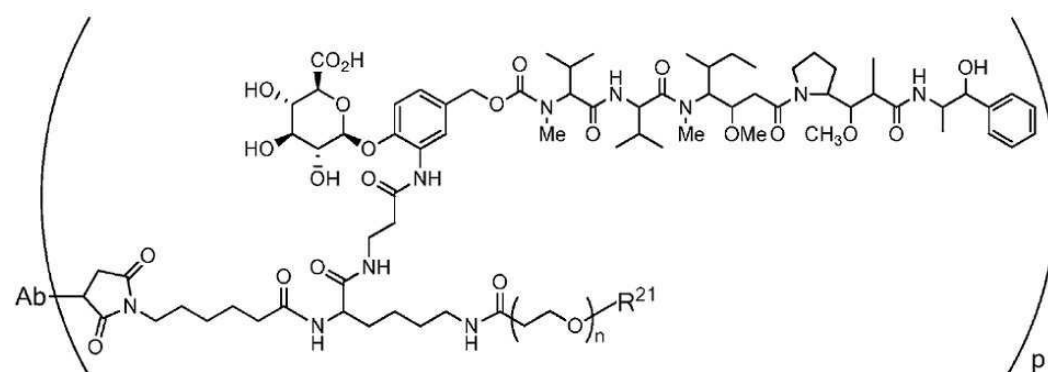
제19항에 있어서, 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물:



식 중, R^{PR} 은 수소 또는 보호기이다.

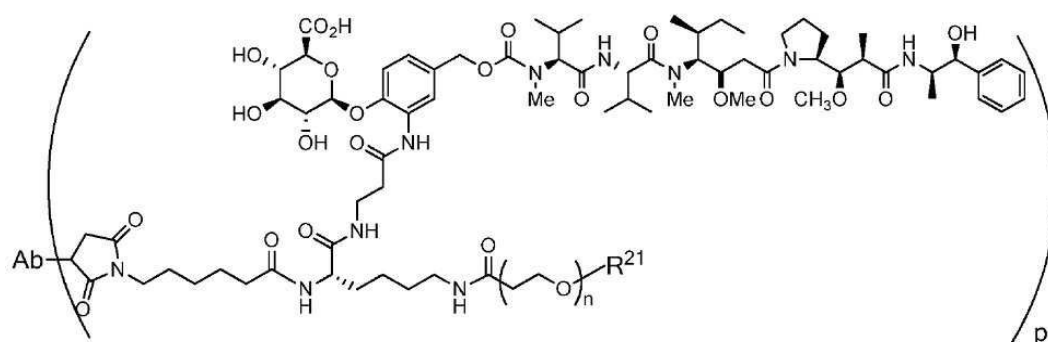
청구항 22

제19항에 있어서, 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물:



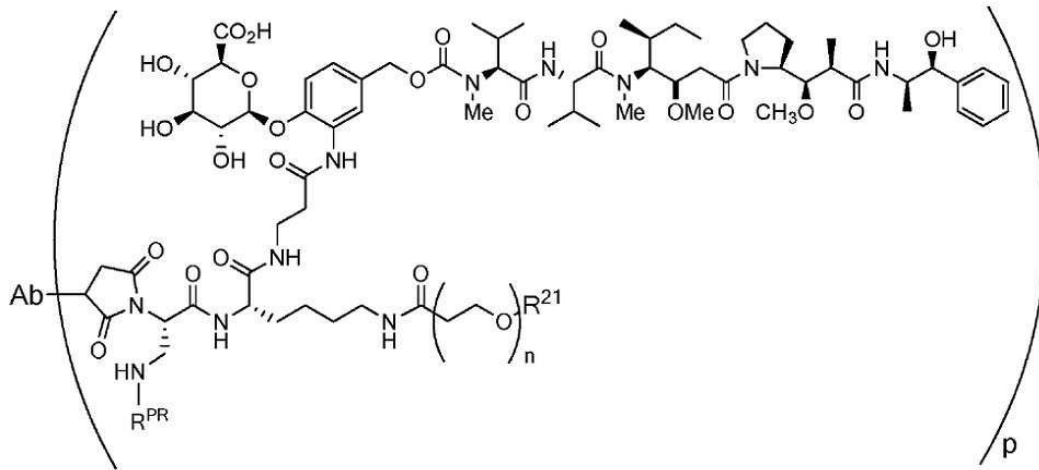
청구항 23

제19항에 있어서, 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물:



청구항 24

제19항에 있어서, 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물:



식 중, R^{PR} 은 수소 또는 보호기이다.

청구항 25

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, n 이 8 내지 14의 범위인, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 26

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, n 이 10 내지 12의 범위인, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 27

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, n 이 12인, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 28

제19항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, R^{21} 이 $-CH_3$ 또는 $-CH_2CH_2CO_2H$ 인, 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 29

제19항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, p 가 8인, 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 30

제19항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, Ab에 대한 부착이 상기 항체의 사슬 간 이황화 결합의 시스템인 잔기를 통하는 것인, 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 31

제19항 내지 제30항 중 어느 한 항의 항-CD48 항체-약물 접합체 분자의 집단을 포함하는 항체-약물 접합체 조성물로서, 상기 조성물의 평균 약물 부하(average drug load)가 8이고, 그리고 상기 조성물의 우세한 약물 부하(predominant drug load)가 8인, 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 약제학적 조성물인, 조성물.

청구항 33

CD48 발현 암을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 제31항의 조성물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 CD48 발현 암이 다발성 골수종인, 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 CD48 발현 암이 B 세포 악성종양 및 급성 골수성 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 36

인간 CD48 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 서열 번호 3 내지 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 6 내지 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 37

제36항의 핵산을 포함하는 단리된 벡터.

청구항 38

제37항의 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 숙주 세포가 포유동물 숙주 세포인, 숙주 세포.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 숙주 세포가 CHO, COS, HeLA, HEK293, L, Sp2/0 및 NS0로 이루어진 군으로부터 선택되는, 숙주 세포.

청구항 41

항-CD48 항체의 제조 방법으로서,

상기 항체를 인코딩하는 핵산의 발현에 적합한 조건하에 제38항의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

상기 항체를 단리시키는 단계를 포함하는, 항-CD48 항체의 제조 방법.

청구항 42

항-CD48 항체 약물 접합체의 제조 방법으로서,

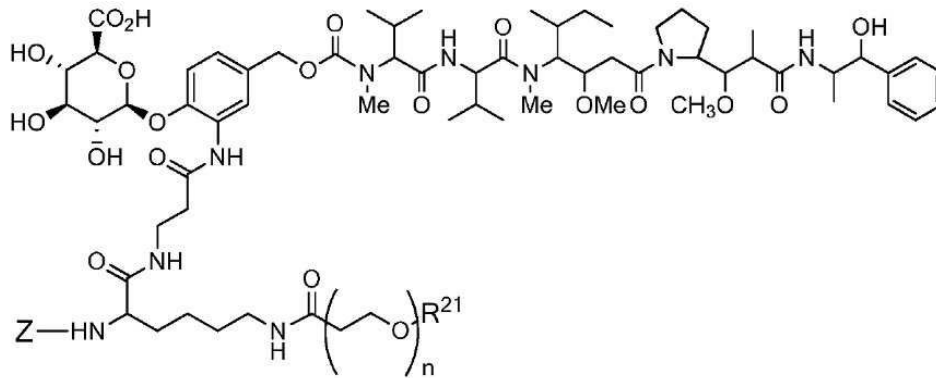
제38항의 숙주 세포를, 상기 항체를 인코딩하는 핵산의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 단계;

상기 항체를 단리시키는 단계; 및

링커에 부착된 세포독성 약물을 상기 항체에 접합시키는 단계를 포함하는, 항-CD48 항체 약물 접합체의 제조 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 약물-링커가 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항-CD48 항체 약물 접합체의 제조 방법:



식 중, Z는 상기 항체 상의 작용기와 반응하여 이에 대한 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위를 갖는 유기 모이어티를 나타내고, n은 8 내지 36의 범위이며, R^{PR}은 수소 또는 보호기이고, R²¹은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 위한 캡핑 단위이다.

청구항 44

서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 45

제44항의 핵산을 포함하는 단리된 벡터.

청구항 46

제45항의 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 숙주 세포가 포유동물 숙주 세포인, 숙주 세포.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 숙주 세포가 CHO, COS, HeLA, HEK293, L, Sp2/0 및 NS0로 이루어진 군으로부터 선택되는, 숙주 세포.

청구항 49

항-CD48 항체의 제조 방법으로서,

상기 항체를 인코딩하는 핵산의 발현에 적합한 조건하에 제46항의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

상기 항체를 단리시키는 단계를 포함하는, 항-CD48 항체의 제조 방법.

청구항 50

항-CD48 항체 약물 접합체의 제조 방법으로서,

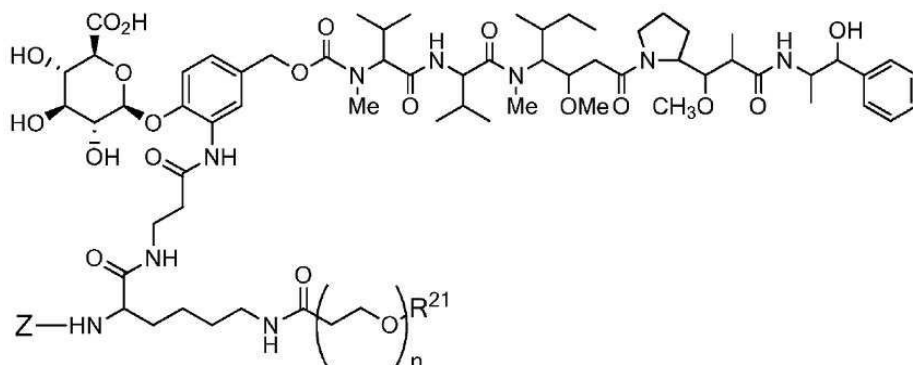
상기 항체를 인코딩하는 핵산의 발현에 적합한 조건하에 제46항의 숙주 세포를 배양하는 단계;

상기 항체를 단리시키는 단계; 및

링커에 부착된 세포독성 약물을 상기 항체에 접합시키는 단계를 포함하는, 항-CD48 항체 약물 접합체의 제조 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 약물-링커가 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는, 항-CD48 항체 약물 접합체의 제조 방법:



식 중, Z는 상기 항체 상의 작용기와 반응하여 이에 대한 공유 결합을 형성하는 반응성 부위를 갖는 유기 모이어티를 나타내고, n은 8 내지 36의 범위이며, R^{PR}은 수소 또는 보호기이고, R²¹은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 위한 캡핑 단위이다.

발명의 설명

기 술 분 야

관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2015년 3월 18일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/134,981호의 35 USC 119(e) 하의 유익을 주장하고, 이는 본 명세서에 그 전문이 참고로 인용된다.

발명의 분야

본 발명은 CD48에 특이적으로 결합하는 무린(murine) 항체, 키메라 항체 및 인간화 항체, 및 이의 접합체를 제공한다.

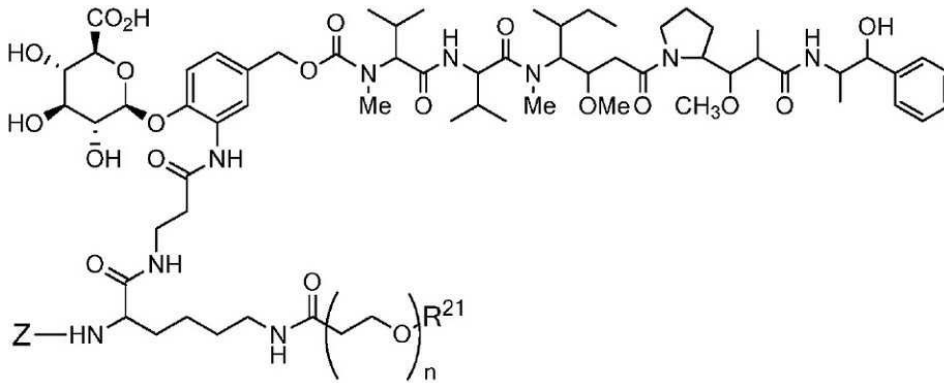
배경 기술

CD48 항원(분화 클러스터 48)은 또한 B-림프구 활성화 마커(BLAST-1) 또는 신호전달 림프구성 활성화 분자 2(SLAMF2)로도 알려져 있다. CD48은 SLAM(신호전달 림프구 활성화 분자) 단백질, 예를 들면, CD84, CD150, CD229 및 CD244를 포함하는 면역글로불린 수퍼패밀리(IgSF)의 CD2 서브패밀리의 일원이다. CD48은 림프구 및 다른 면역 세포의 표면, 및 수지상 세포에서 발견되고, 이들 세포의 활성화 및 분화 경로에 참여한다. CD48은 다발성 골수종 세포 및 B 세포 기원의 다른 암, 예를 들면, 비호지킨 림프종(NHL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 알려지지 않은 유익성의 단세포군 감마글로불린병증(MGUS), 발덴스트롬 거대글로불린혈증(WM), 원발성/전신성 아밀로이드증 환자 중앙 세포, 및 여포성 림프종(FL)에서 발견되는 것으로 알려져 있다.

발명의 내용

하나의 측면에서 본 기재내용은 인간 CD48 단백질에 특이적으로 결합하는 키메라 항체 또는 인간화 항체를 제공한다. 항체는 서열 번호 3 내지 5의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 6 내지 8의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 항체는 인간 CD48 단백질에 특이적으로 결합하며, 또한 서열 번호 3 내지 5의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 6 내지 8의 경쇄 CDR 서열을 포함하는 무린 항체와 비교하여 인간 CD48 단백질에 대한 더 높은 결합 친화력을 나타낸다. 하나의 실시형태에 있어서, 키메라 항체 또는 인간화 항체는 무린 항체와 비교하여 인간 CD48 단백질에 대한 적어도 2배 더 높은 결합 친화력을 나타낸다. 또 다른 실시형태에 있어서, 항체는 인간화 항체이다. 추가의 실시형태에 있어서, 항체는 서열 번호 1의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 또 다른 실시형태에 있어서, 항체는 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 추가의 실시형태에 있어서, 항체는 서열 번호 1의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 항체는 링커에 부착된 세포독성 약물에 접합된다.

추가의 실시형태에 있어서, 항체에 부착된 약물-링커는 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



[0008]

[0009]

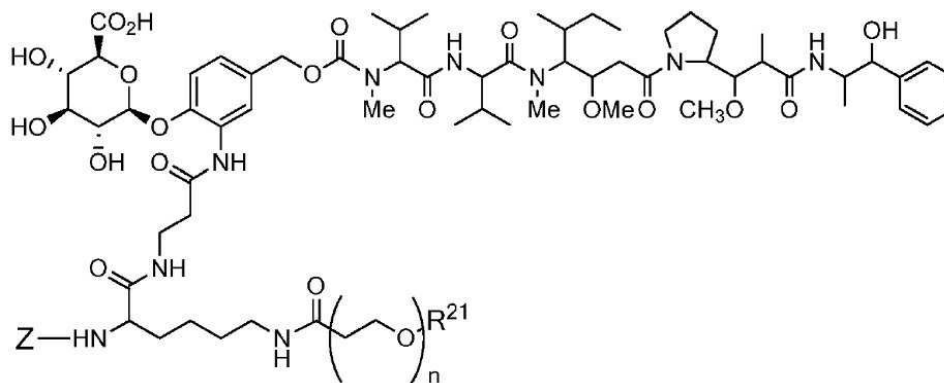
식 중, Z는 항체 상의 작용기와 반응하여 이에 대한 공유 결합(covalent attachment)을 형성할 수 있는 반응성 부위를 갖는 유기 모이어티를 나타내고, n은 8 내지 36의 범위이며, R^{PR}은 수소 또는 보호기이고, R²¹은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 대한 캡핑 단위(capping unit)이다.

[0010]

또 다른 측면에 있어서, 본 기재내용은 인간 CD48 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화 항체를 제공하고, 이는 서열 번호 1의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0011]

항체는, 하나의 실시형태에 있어서, 링커에 부착된 세포독성 약물에 접합된다. 예시적인 약물-링커는 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



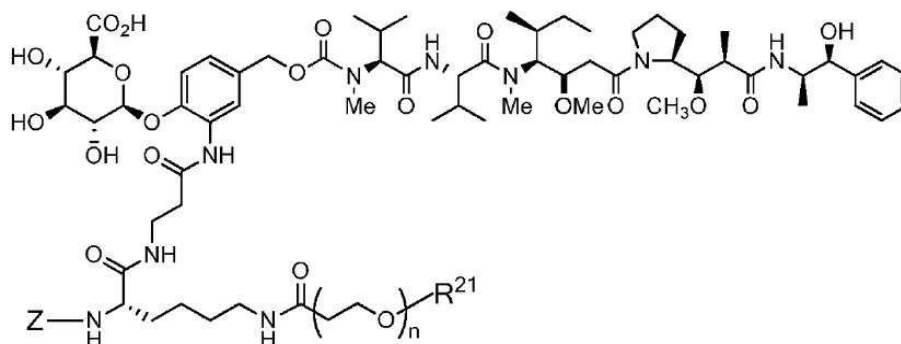
[0012]

[0013]

식 중, Z는 항체 상의 작용기와 반응하여 이에 대한 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위를 갖는 유기 모이어티를 나타내고, n은 8 내지 36의 범위이며, R^{PR}은 수소 또는 보호기이고, R²¹은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 대한 캡핑 단위이다.

[0014]

기재된 항체에 접합을 위한 또 다른 예시적인 약물-링커는 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



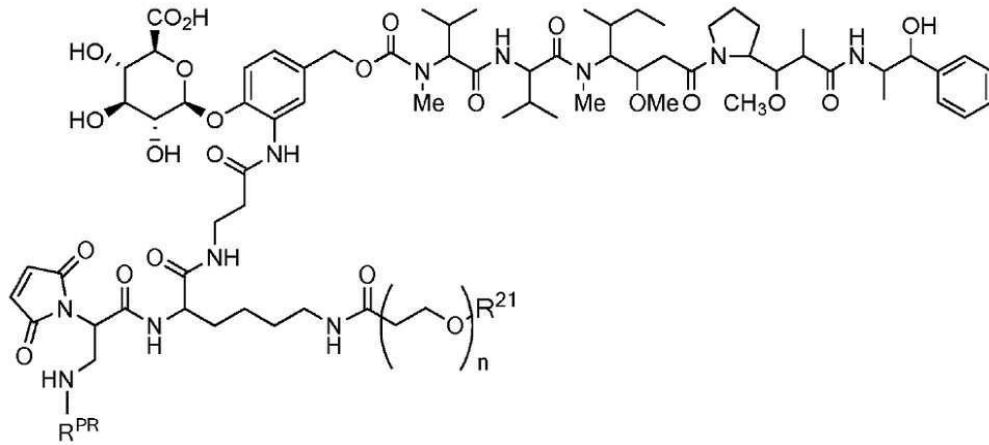
[0015]

[0016]

식 중, Z는 항체 상의 작용기와 반응하여 이에 대한 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위를 갖는 유기 모이어티를 나타내고, n은 8 내지 36의 범위이며, R^{PR}은 수소 또는 보호기이고, R²¹은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에

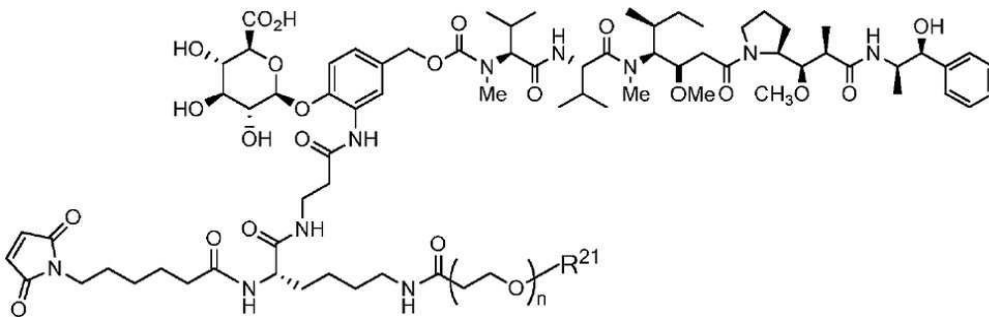
대한 캡핑 단위이다.

[0017] 기재된 항체에 접합을 위한 또 다른 예시적인 약물-링커는 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



[0018]

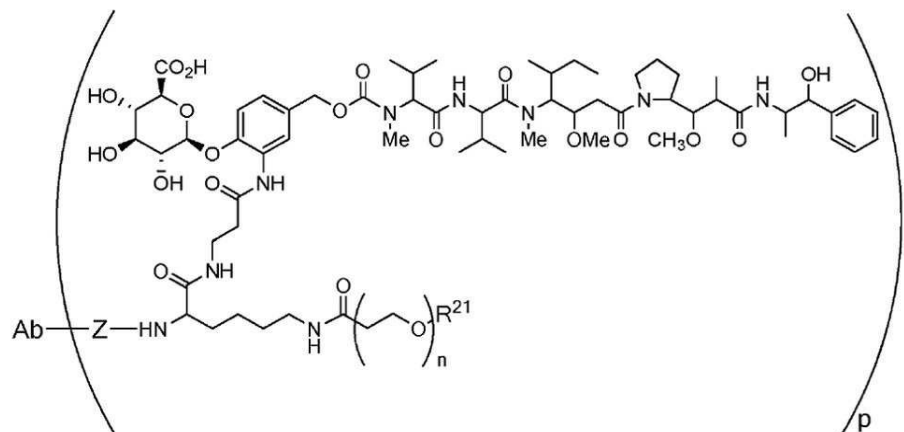
[0019] 식 중, n 은 8 내지 36의 범위이고, R^{PR} 은 수소 또는 보호기이고, R^{21} 은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 대한 캡핑 단위이다. 기재된 항체에 접합을 위한 또 다른 예시적인 약물-링커는 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



[0020]

[0021] 식 중, n 은 8 내지 36의 범위이고, R^{PR} 은 수소 또는 보호기이고, R^{21} 은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 대한 캡핑 단위이다. 본 기재내용의 몇몇 실시형태에 있어서, 값 n 은 8 내지 14의 범위일 수 있다. 본 기재내용의 다른 실시형태에 있어서, 값 n 은 10 내지 12의 범위이다. 본 기재내용의 추가의 실시형태에 있어서, 값 n 은 12이다. 또 다른 실시형태에 있어서, R^{21} 은 $-CH_3$ 또는 $-CH_2CH_2CO_2H$ 이다.

[0022] 또 다른 측면에 있어서, 본 기재내용은 화학식을 갖는 항-CD48 항체-약물 접합체 화합물 또는 이의 약제학적으로

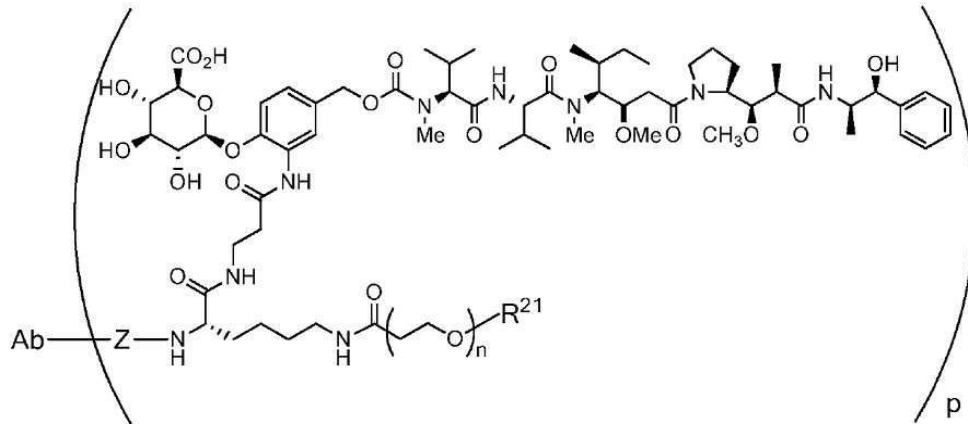


로 허용 가능한 염을 제공한다

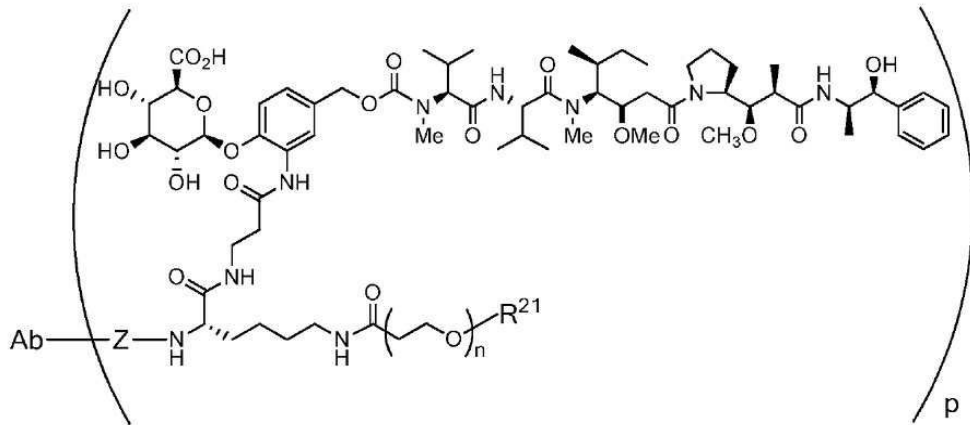
[0023] 식 중, Z 는 약물-링커의 나머지를 공유 결합을 통해 연결하는 유기 모이어티를 나타내고, n 은 8 내지 36의 범위

이며, R^{21} 은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 대한 캡핑 단위이고, p 는 1 내지 16이다. 항체는 임의의 기재된 항-CD48 항체일 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, 항체는 서열 번호 1의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역을 갖는다.

[0024] 기재된 항체에 접합을 위한 또 다른 예시적인 약물-링커는 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염

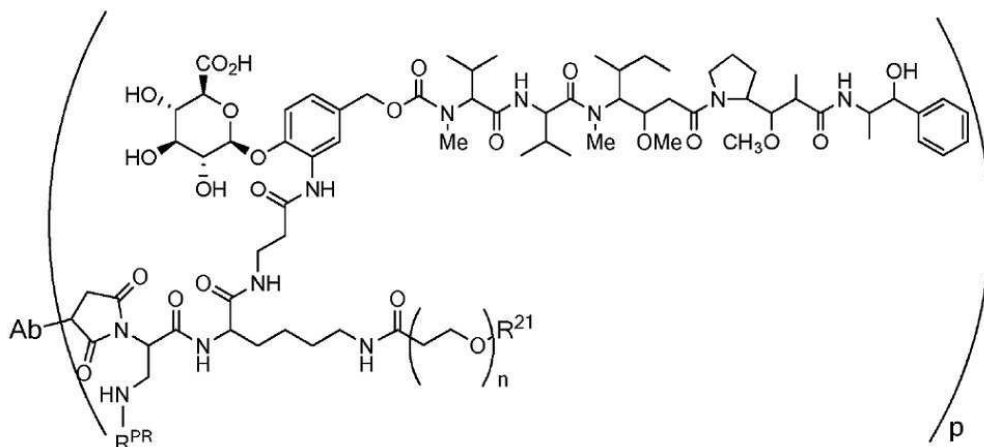


을 갖는



[0025]

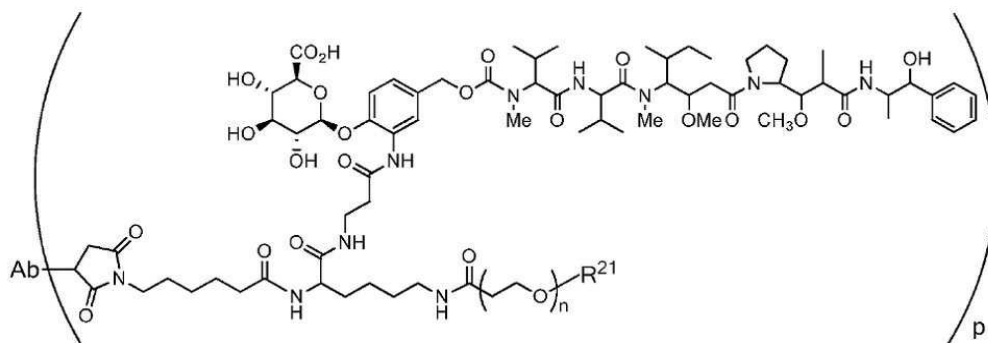
[0026] 기재된 항체에 접합을 위한 또 다른 예시적인 약물-링커는 하기 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



[0027]

[0028] 식 중, R^{PR} 은 수소 또는 보호기이다.

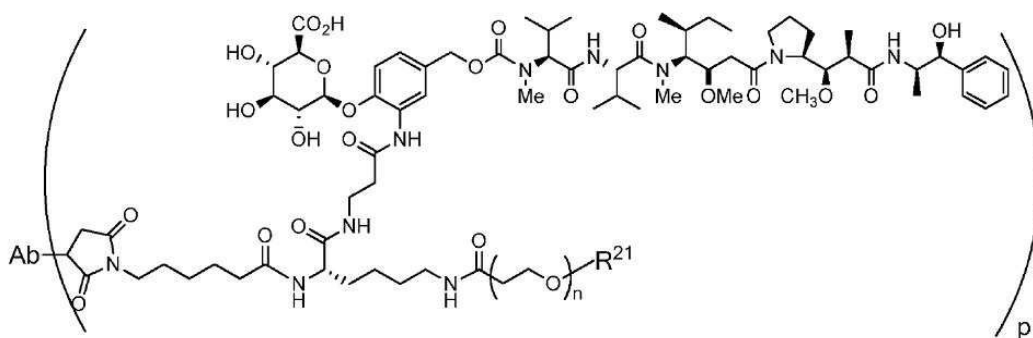
[0029] 기재된 항체에 접합을 위한 또 다른 예시적인 약물-링커는 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



[0030]

[0031]

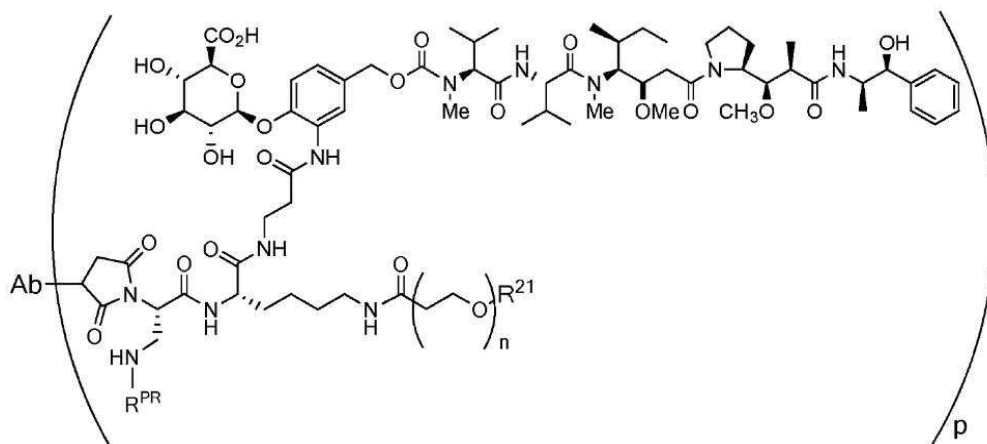
기재된 항체에 접합을 위한 또 다른 예시적인 약물-링커는 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



[0032]

[0033]

기재된 항체에 접합을 위한 또 다른 예시적인 약물-링커는 화학식 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



[0034]

[0035]

식 중, R^{PR} 은 수소 또는 보호기이다.

[0036]

본 기재내용의 몇몇 실시형태에 있어서, 값 n은 8 내지 14의 범위일 수 있다. 본 기재내용의 다른 실시형태에 있어서, 값 n은 10 내지 12의 범위이다. 본 기재내용의 추가의 실시형태에 있어서, 값 n은 12이다. 또 다른 실시형태에 있어서, R²¹은 -CH₃ 또는 -CH₂CH₂CO₂H이다.

[0037]

또 다른 실시형태에 있어서, 임의의 기재된 항체-약물 접합체는 8의 p 값을 갖는다. 또 다른 실시형태에 있어서, 약물-링커는 항체의 사슬 간 이화화 결합의 시스템인 잔기를 통해 항체에 부착된다.

[0038]

또 다른 실시형태에 있어서, 항체-약물 접합체 조성물은 8의 평균 약물 로딩 및 8의 조성물 중의 우세한 약물 부하(predominant drug load)를 갖는 항-CD48 항체-약물 접합체 분자의 집단을 포함한다.

[0039]

또 다른 측면에 있어서, 본 기재내용은 본 명세서에 기재된 CD48 항체-약물 접합체를 포함하는 약제학적 조성물 및 제형을 제공한다.

- [0040] 추가의 측면에 있어서, CD48 항체-약물 접합체는 CD48을 발현하는 암을 가진 환자를 치료하는데 사용된다. CD48 발현 암은, 하나의 실시형태에 있어서, 다발성 골수종이다. 다른 실시형태에 있어서, CD48 발현 암은 B 세포 악성종양, 예를 들면, 비호지킨 림프종, 여포성 림프종, 맨틀 세포 림프종, 알려지지 않은 유의성의 단세포군 감마글로불린병증(MGUS), 발덴스트롬 거대글로불린혈증(WM), 원발성/전신성 아밀로이드증 환자 종양 세포, 및 만성 림프성 백혈병이다. 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 치료할 수 있는 CD48 발현 암의 또 다른 예는 급성 골수성 백혈병이다.
- [0041] 정의
- [0042] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터의 항체를 나타내고, 즉, 집단을 포함하는 개별적인 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 수식어 "단일클론"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 수득된 바와 같은 항체의 특징을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체의 제조를 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용되는 단클론성 항체는 문헌[Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495]에 의해 먼저 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조되거나, 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제4816567호 참조). "단클론성 항체"는 또한 문헌[Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352:624-628 및 Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597]에 기재된 기술을 사용하여 과거 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있거나, 예를 들면, 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 명세서에 기재된 항체는 단클론성 항체이다.
- [0043] 항체는 전형적으로 단리된 형태로 제공된다. 이는 항체가 전형적으로 간접 단백질 및 이의 제조 또는 정제로부터 발생한 다른 오염물질이 적어도 50% w/w 없는 것을 나타내지만, 항체가 과량의 약제학적 허용 가능한 캐리어(들) 또는 이의 사용을 촉진하도록 의도된 다른 비히클과 조합되는 가능성을 배제하지 않는다. 가끔 항체는 간접 단백질 및 제조 또는 정제로부터의 오염 물질이 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95 또는 99% 없다. 단리된 항체를 포함하는 항체는 세포독성 제제에 접합되고, 항체 약물 접합체로서 제공된다.
- [0044] "단리된" 폴리뉴클레오타이드는 이의 천연 구성분으로부터 확인되고 분리되고/분리되거나 회수되는 폴리뉴클레오타이드를 나타낸다.
- [0045] 이의 표적 항원에 대한 단클론성 항체의 특이적인 결합은 적어도 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 또는 10^{10} M^{-1} 의 친화력을 의미한다. 특이적인 결합은 적어도 하나의 관련되지 않은 표적에 대하여 발생하는 비특이적인 결합보다 검출가능하게 더 높은 규모로 이와 구별된다. 특이적 결합은 특정한 작용기 또는 특정한 공간 핏(예를 들면, 자물쇠 및 열쇠 유형) 사이의 결합 형성의 결과일 수 있지만, 비특이적 결합은 일반적으로 반데르발스 힘의 결과이다. CD48 관련 항체-약물 접합체 및 항-CD48 항체는 CD48에 특이적으로 결합한다.
- [0046] 기본적인 항체 구조 단위는 아단위의 테트라머이다. 각각의 테트라머는 폴리펩타이드 쇄의 2개의 동일한 쌍을 포함하고, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄"(약 50 내지 70 kDa)를 갖는다. 각각의 쇄의 아미노 말단-부분은 항원 인지에 1차적으로 책임이 있는 약 100 내지 110 이상의 아미노산 가변 영역을 포함한다. 이러한 가변 영역은 초기에 절단 가능한 신호 펩타이드에 연결되어 발현된다. 신호 펩타이드가 없는 가변 영역은 때때로 성숙한 가변 영역으로서 지칭된다. 따라서, 예를 들면, 경쇄 성숙 가변 영역은 경쇄 신호 펩타이드가 없는 경쇄 가변 영역을 의미한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되고, 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE와 같은 항체의 아이소타입을 정의한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 첨자 및 불변 영역은 약 12 이상의 아미노산의 "J" 영역과 연결되고, 중쇄는 또한 약 10 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다(이의 전문이 모든 목적으로 인용되는, 일반적으로 문헌[Fundamental Immunology(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7] 참조). 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 성숙 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다. 따라서, 온전한 항체는 2개의 결합 부위를 갖는다. 쇄는 모두 상보성 결정 영역 또는 CDR로도 불리는 3개의 초가변 영역에 연결된 상대적으로 보존된 프레임워크 영역(FR)의 동일한 일반적인 구조를 나타낸다. 각각의 쌍의 2개의 쇄로부터의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 정렬되고, 이는 특정한 에피토폭에 대한 결합을 가능하게 한다. N-말단에서 C-말단으로, 경쇄 및 중쇄 둘 다는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 도메인의 아미노산의 배정은 카바트(Kabat)(*Sequences of Proteins of Immunological Interest*(National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)), 또는 코티아(Chothia)와 레스크(Lesk)(*J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987); Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883(1989))의 정의에 따른다. 카바트는 또한 광범위하게 사용되는 넘버링 관례(카바트 넘버링 시스템)를 제공하고, 여기서 상이한 중쇄 가변 영역 사이 또는 상이한 경쇄 가변 영역 사이의 상응하는 잔기는 동일한 번호로 지정된다. 중쇄 불변 영역의 넘버링은 카바트(Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*(National Institutes

of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)에 기재된 EU 인덱스를 통한다.

- [0047] 용어 "항체"는 온전한 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. "온전한 항체"는 항원-결합 가변 영역뿐만 아니라, 항체 클래스에 적절한 경우, 경쇄 불변 도메인(C_L) 및 중쇄 불변 도메인, C_H1 , C_H2 , C_H3 및 C_H4 를 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들면, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이일 수 있다. 항체 단편은 온전한 항체와 경쟁하고, 이로부터 개별적인 중쇄, 경쇄 Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, 디아바디, Dabs, 나노바디, 및 Fv를 포함하는 표적에 대한 특이적인 결합으로부터 유래된다. 단편은 재조합 DNA 기술에 의해, 또는 온전한 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 분리에 의해 제조될 수 있다. 용어 "항체"는 또한 디아바디(단독이량체 Fv 단편) 또는 미니바디(V_L - V_H - C_H3), 이중특이성 항체 등을 포함한다. 이중특이성 또는 이작용성 항체는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개이 상이한 결합 부위를 갖는 인공적인 하이브리드 항체이다(예를 들면, 문헌[Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321(1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53(1992)] 참조).
- [0048] 용어 "환자"는 인간 및 예방학적 또는 치료적 치료를 받는 다른 포유동물 대상체를 포함한다.
- [0049] 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환을 분류하는 목적으로, 아미노산을 하기와 같이 그룹화한다: 그룹 I(소수성 측쇄): met, ala, val, leu, ile; 그룹 II(중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 III(산성 측쇄): asp, glu; 그룹 IV(염기성 측쇄): asn, gln, his, lys, arg; 그룹 V(쇄 배향에 영향을 주는 잔기): gly, pro; 및 그룹 VI(방향족 측쇄): trp, tyr, phe. 보존적 치환은 동일한 클래스의 아미노산 사이의 치환을 포함한다. 비보존적 치환은 이들 클래스 중 하나의 일원을 다른 일원으로 교체하는 것으로 이루어진다.
- [0050] 백분율 서열동일성은 카바트 넘버링 전환에 의해 최대 정렬된 항체 서열에 의해 결정된다. 정렬 후, 대상 항체 영역(예를 들면, 전체 성숙 가변 영역 of 중쇄 또는 경쇄)를 참조 항체의 동일한 영역과 비교하는 경우, 대상과 참조 항체 영역 사이의 백분율 서열 동일성은 대상 및 참조 항체 영역 둘 다에서 동일한 아미노산에 의해 점유된 위치의 수를 2개의 영역의 정렬된 위치의 총 수로 나누고, 이때 겹은 세지 않으며, 이에 100을 곱하여 백분율로 전환한 것이다.
- [0051] 하나 이상의 기재된 원소를 "포함하는" 조성물 또는 방법은 구체적으로 기재되지 않은 다른 원소를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체를 포함하는 조성물은 항체를 단독으로 또는 다른 성분들과의 조합으로 함유할 수 있다.
- [0052] 용어 "치료적 유효량" 또는 "유효량"은 포유동물에서 질환 또는 질병을 치료하는데 효과적인 항체-약물 접합체의 양을 나타낸다. 암의 경우에, 접합체의 치료적 유효량은 암 세포의 수를 감소시키고; 종양 크기를 감소시키고; 말초 기관으로의 암 세포 침윤을 억제하고(즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중단시키고); 종양 전이를 억제하고(즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중단시키고); 종양 성장을 억제하고; 그리고/또는 암과 관련된 증상 중 하나 이상을 완화시킬 수 있다. 암 치료에 있어서, 효능은, 예를 들면, 질환 진행 시간(TTP)을 평가하고/평가하거나 반응 비율(RR)을 측정함으로써 측정될 수 있다. 용어 "유효한 치료계획"은 투여되는 접합체의 양과 질병의 치료를 달성하는데 적절한 투여 빈도의 조합을 나타낸다.
- [0053] 용어 "치료하다" 또는 "치료"는, 문맥에 의해 달리 지시되지 않는 한, 목적이 바람직하지 않은 생리적인 변화 또는 질병, 예를 들면, 암의 발단 또는 확산을 억제하거나 느리게 하는(완화시키는) 것인 치료적 치료를 나타낸다. 유리하거나 바람직한 임상적 결과는, 검출 가능 또는 검출 불가능과 관계없이, 증상의 완화, 질환 정도의 축소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않은) 상태, 질환 진행의 지연 또는 늦춤, 질환 상태의 완화 또는 경감, 및 차도(부분적 또는 완전한)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않는 경우에 예상되는 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미할 수 있다. 치료가 필요한 경우는 검출 가능한 질환의 경우를 포함한다. 치료가 필요한 경우는 또한 검출 불가능한 질환을 가진 경우, 예를 들면, CD48 발현 질병에 대한 치료 후 완전한 반응을 달성하였지만 재발을 예방하기 위하여 치료가 필요한 환자를 포함할 수 있다.
- [0054] 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 동물, 더욱 특히 인간에서, 연방 정부 또는 주정부의 관리 기관에 의해 승인되거나 승인될 수 있거나, 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인식된 약전에 열거된 것을 의미한다. 용어 "약제학적 혼화성 성분"은 항-CD48 항체 또는 항체-약물 접합체와 함께 대상체에게 투여되는 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 보조제, 부형제, 또는 비히클을 나타낸다.
- [0055] 구 "약제학적으로 허용 가능한 염"은 약제학적으로 허용 가능한 유기 또는 무기 염을 나타낸다. 예시적인 염은 설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 니트레이트, 비설페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레

이트, 옥레에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 비타르트레이트, 아스코르베이트, 석시네이트, 말레에이트, 젠티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설폰에이트, 에탄설폰에이트, 벤젠설폰에이트, p 톨루엔설폰에이트, 및 파모에이트(즉, 1,1'-메틸렌 비스-(2 하이드록시 3 나프토에이트)) 염을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 염은 또 다른 분자의 포함물, 예를 들면, 아세테이트 이온, 석시네이트 이온 또는 다른 카운터 이온을 포함할 수 있다. 카운터이온은 모 화합물에 대한 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 추가로, 약제학적으로 허용 가능한 염은 이의 구조에서 하나의 이상의 하전된 원자를 가질 수 있다. 다중 하전된 원자의 예시는 다중 카운터이온을 가질 수 있는 약제학적으로 허용 가능한 염의 부분이다. 따라서, 약제학적으로 허용 가능한 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 카운터이온을 가질 수 있다.

[0056] 본 발명의 맥락에서 용매화물은 용매 분자와 배위를 통해 고체 또는 액체 상태의 착물을 형성하는 본 발명의 화합물의 형태이다. 수화물은 배위가 물과 일어나는 하나의 특정한 용매화물의 형태이다. 본 발명의 맥락에서 바람직한 용매화물은 수화물이다.

[0057] 맥락으로부터 달리 명백하지 않는 한, 용어 "약"은 기재된 값의 표준 편차 내의 값을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 무린 MEM102 항체 및 인간화 vHA, vHB, 및 vHC 중쇄의 중쇄 가변 영역에 대한 아미노산 서열 및 선택된 인간 생식선 어셉터 가변 영역 서열을 도시한다.

도 2는 무린 MEM102 항체 및 인간화 vLA, vLB, 및 vLC 경쇄의 경쇄 가변 영역에 대한 아미노산 서열 및 선택된 인간 생식선 어셉터 가변 영역 서열을 도시한다.

도 3은 인간 U-266 다발성 골수종 세포에 대한 MEM102 항체의 포화 결합 곡선을 도시한다.

도 4는 시노물구스 원숭이 CD48로 형질감염된 CHO 세포에 대한 MEM102 항체의 포화 결합 곡선을 도시한다.

도 5는 MEM-102 ADC로 처리 후, 인간 NCI-H929 다발성 골수종 세포에서 카스파제 3/7 활성화(아포토시스 세포 사멸)를 도시한다.

도 6은 MEM-102 ADC로 처리 후, 인간 U-266 다발성 골수종 세포에서 카스파제 3/7 활성화를 도시한다.

도 7은 NCI-H929 세포가 이식된 마우스 이종이식 모델에서 hMEM102 ADC의 생체내 활성을 도시한다. 이것은 다발성 골수종의 파종성 모델이다

도 8은 NCI-H929 세포가 이식된 마우스 이종이식 모델에서 hMEM102 ADC의 생체내 활성을 도시한다. 이는 다발성 골수종의 피하 모델이다.

도 9는 MM.1R 세포가 이식된 마우스 이종이식 모델에서 hMEM102 ADC의 생체내 활성을 도시한다. 이는 다발성 골수종의 파종성 모델이다.

도 10은 MM.1R가 이식된 마우스 이종이식 모델에서 hMEM102 ADC의 생체내 활성을 도시한다. 이는 다발성 골수종의 피하 모델이다.

도 11은 EJM 세포가 이식된 마우스 이종이식 모델에서 hMEM102 ADC의 생체내 활성을 도시한다. 이는 다발성 골수종의 파종성 모델이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 본 발명은, 부분적으로, CD48을 표적으로 하는 폐길화된-MMAE 항체-약물 접합체를 포함하는 항체-약물 접합체가 CD48+ 발현 세포의 살해에 특히 효과적이라는 발견을 기반으로 한다. 특히, 고친화성 MEM102 인간화 항체가 중쇄 가변 영역 어셉터 서열로서 hIgG VH7-4-1/hIgG-JH5 중쇄 가변 영역 인간 생식선을 사용하도록 건설될 수 있다는 것이 확인되었다. 경쇄 가변 영역에 있어서, 바람직한 어셉터 서열은 hIgG-VK6-21/hIgG-JK4 경쇄 가변 영역 인간 생식선이다. 특히, 고친화성 MEM102 인간화 항체는 무린 항체의 CDR의 동일성을 유지하면서 친화성 돌연변이를 수행할 필요 없이 건설된다. 고친화성 MEM102 인간화 항체는 또한 항체 약물 접합체의 부분으로서 약물 전달에 효과적이었다. SGD-5088 폐길화된-MMAE 약물-링커에 접합되는 경우, 수득된 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드 접합체는 다발성 골수종 세포주의 패널에 대하여 매우 활성이었다.

[0060] 표적 분자

- [0061] 달리 기재되지 않는 한, CD48은 인간 CD48을 나타낸다. 예시적인 인간 서열은 배정된 젠뱅크(GenBank) 등록 번호 CAG33293.1이다.
- [0062] **본 발명의 항체**
- [0063] 인간화 항체는 비인간 "도너" 항체로부터의 CDR이 인간 "어셉터" 항체 서열 내에 이식된 유전 공학적 항체이다 (예를 들면, 문헌[Queen, US 5,530,101 and 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; and Foote, US 6,881,557] 참조). 어셉터 항체 서열은, 예를 들면, 성숙 인간 항체 서열, 이러한 서열의 합성, 인간 항체 서열의 콘센서스 서열, 또는 생식선 영역 서열일 수 있다.
- [0064] 따라서, 인간화 항체는 전체적으로 또는 실질적으로 비인간 도너 항체 및 가변 영역 프레임워크 서열 및 불변 영역으로부터, 존재하는 경우, 전체적으로 또는 실질적으로 인간 항체 서열로부터 몇몇 또는 모든 CDR을 갖는 항체이다. 유사하게, 인간화 중쇄는 전체적으로 또는 실질적으로 도너 항체 중쇄, 및 중쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 중쇄 불변 영역으로부터, 존재하는 경우, 실질적으로 인간 중쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터 적어도 1, 2 및 일반적으로 모든 3개의 CDR을 갖는다. 유사하게 인간화 경쇄는 전체적으로 또는 실질적으로 도너 항체 경쇄, 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 경쇄 불변 영역, 존재하는 경우, 실질적으로 인간 경쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터 적어도 1, 2 및 일반적으로 모든 3개의 CDR을 갖는다. 나노바디 및 디아바디 이외에, 인간화 항체는 전형적으로 인간화 중쇄 및 인간화 경쇄를 포함한다. 인간화 또는 인간 항체에서 CDR은 적어도 60%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 상응하는 잔기(카바트에 의해 정의되는 바와 같음)가 각각의 CDR 사이에서 동일한 경우, 비인간 항체에서 상응하는 CDR로부터 실질적으로 유래되거나, 이와 실질적으로 동일하다. 몇몇 실시형태에서, 인간화 항체 또는 인간 항체에서 CDR은 각각의 CER에서 3개 이하의 보존적 아미노산 치환이 존재하는 경우, 비인간 항체에서 상응하는 CDR로부터 실질적으로 유래되거나 이와 실질적으로 동등하다. 항체 쇄의 가변 영역의 프레임워크 서열 또는 또는 항체 쇄의 불변 영역은 카바트에 의해 정의되는 상응하는 잔기의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%가 동일한 경우 각각 인간 가변 영역 프레임워크 서열 또는 인간 불변 영역으로부터 실질적으로 유래된다. 본 발명의 몇몇 인간화 항체에서, 항체의 중쇄 가변 프레임워크 영역 역돌연변이 및 항체의 경쇄 가변 영역에서 역돌연변이가 존재하지 않는다.
- [0065] 인간화 항체가 마우스 항체로부터의 종종 모든 6개의 CDR(바람직하게는 카바트(Kabat)로 정의됨)을 도입하지만, 이들은 또한 모든 CDR보다 적은(예를 들면, 적어도 3, 4, 또는 5) CDR을 마우스 항체로부터 제조할 수 있다(예를 들면, 문헌[Pascalis *et al.*, *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos *et al.*, *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi *et al.*, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura *et al.*, *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000]).
- [0066] 인간 가변 영역 프레임워크 잔기로부터의 특정한 아미노산은 CDR 형태 및/또는 항원에 대한 결합에 대한 이들의 가능한 영향을 기반으로 한 치환에 대하여 선택될 수 있다. 이러한 가능한 영향의 조사는 모델링, 특정한 위치에서 아미노산의 특징의 시험, 또는 특정한 아미노산의 치환 또는 돌연변이의 영향에 대한 실증적 관찰에 의한 다.
- [0067] 본 발명은 CD48 항원에 대항하여 지시된 항체를 제공한다. 바람직한 항체는 뮤린 MEM102 항체로부터 유래된 키메라 항체 또는 인간화 항체이다. 중쇄 가변 영역에 대한 바람직한 어셉터 서열은 hIgG VH7-4-1/hIgG-JH5 중쇄 가변 영역 인간 생식선이다. 경쇄 가변 영역에 있어서, 바람직한 어셉터 서열은 hIgG-VK6-21/hIgG-JK4 경쇄 가변 영역 인간 생식선이다.
- [0068] 예시적인 항-CD48 항체는 서열 번호 1에 기재된 바와 같은 중쇄 CDR 및 서열 번호 2에 기재된 경쇄 CDR을 포함하고, 서열 번호 1과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95% 동일성을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 2와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95% 동일성을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 추가로 갖는 인간화 항체이다. CDR은 카바트에 의해 정의된다.
- [0069] 마우스 MEM102 항체의 인간화 형태는 3개의 예시적인 인간화 중쇄 성숙 가변 영역(HA-HC) 및 3개의 예시적인 인간화 경쇄 성숙 가변 영역(LA-LC)을 포함한다. 이들 쇄의 순열은 HALA, HALB, HALC, HBLA, HBLB, HBLC, HCLA, HCLB, 및 HCLC를 포함한다. 이들 순열 중에서, HALA가 바람직하다. HALA는 서열 번호 1에 기재된 중쇄 및 서열 번호 2에 기재된 경쇄를 포함한다. HALB, HALC, HBLA, HBLB, HBLC, HCLA, HCLB, 및 HCLC 중의 임의의 하나가, 그러나, HALA 대신에 사용될 수 있다.
- [0070] 몇몇 측면에 있어서, 인간 CD48에 대한 인간화 MEM102 항체의 분명한 해리 상수(K_d)는 바람직하게는 0.1nM 내지 10nM 범위, 심지어 더욱 바람직하게는 0.1nM 내지 5nM 범위, 심지어 바람직하게는 1nM 내지 3nM 또는 2nM 내지

약 3nM 범위이다. 몇몇 측면에 있어서, 본 발명의 항체는 인간 CD48에 대한 류린 MEM102 항체의 분명한 해리 상수의 0.1 내지 2.0배, 또는 심지어 0.5 내지 4배 범위에서 분명한 해리 상수를 갖는다. 몇몇 측면에 있어서, 인간 CD48에 대한 항체의 분명한 해리 상수(kd)는 약 5.0이다.

[0071] **불변 영역의 선택**

[0072] 인간화 MEM102 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 인간 불변 영역의 적어도 일부분에 연결될 수 있다. 불변 영역의 선택은 항체-의존성 세포-매개된 세포독성, 항체 의존적 세포 식균작용 및/또는 보체 의존 세포독성이 목적되는지 여부와 관계없이, 부분적으로, 의존적일 수 있다. 예를 들면, 인간 아이소토프 IgG1 및 IgG3은 강한 보체 의존 세포독성을 갖고, 인간 아이소타입 IgG2는 약한 보체 의존 세포독성을 갖고, 인간 IgG4는 보체 의존 세포독성이 부족하다. 인간 IgG1 및 IgG3은 또한 인간 IgG2 및 IgG4보다 더 강한 세포 매개된 이펙터 기능을 유도한다. 경쇄 불변 영역은 람다 또는 카파일 수 있다. 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 함유하는 테트라머로서, 개별적인 중쇄, 경쇄로서, Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv로서, 또는 단일쇄 항체로서 발현될 수 있고, 여기서 중쇄 및 경쇄 첨자 도메인이 스페이서를 통해 연결된다.

[0073] 인간 불변 영역은 상이한 개체들 사이에서 알로타입 변이 및 아이소알로타입 변이를 보여주고, 즉, 불변 영역은 하나 이상의 다형태 위치에서 상이한 개체에서 상이할 수 있다. 아이소알로타입은 아이소알로타입을 인식하는 혈청이 하나 이상의 다른 아이소타입의 비다형성 영역에 결합하므로 알로타입과 상이하다.

[0074] 경쇄 및/또는 중쇄의 아미노 또는 카복시 말단, 예를 들면, 중쇄의 C-말단 리신에서 하나 또는 몇몇의 아미노산은 분자의 부분 또는 모두를 손실하거나 유도될 수 있다. 치환은 불변 영역에서 만들어져 이펙터 기능, 예를 들면, 보체-매개된 세포독성 또는 ADCC를 감소시키거나 증가시키거나(예를 들면, 문헌[Winter et al., US Patent No. 5,624,821; Tso et al., US Patent No. 5,834,597; 및 Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006] 참조), 인간에서 반감기를 연장시킬 수 있다(예를 들면, 문헌[Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004] 참조).

[0075] 불변 영역은 약물-링커의 부위 특이적 접합을 허용하도록 개질될 수 있다. 이러한 기술은 천연 발생 또는 조작된 시스테인 잔기, 이황화 브릿지, 폴리아-히스티딘 서열, 당조작 태그, 및 트랜스글루타미나제 인지 서열의 사용을 포함한다. 박테리아 트랜스글루타미나제를 사용하는 부위 특이적 접합에 대한 예시적인 치환은 N297S 또는 N297Q이다. 조작된 시스테인을 사용하는 부위 특이적 접합에 대한 예시적인 치환은 S239C이다. 항체 단편은 또한 약물-링커의 부위 특이적 접합을 위하여 개질될 수 있고, 예를 들면, 문헌[Kim et al., *Mol Cancer Ther* 2008;7(8)]을 참조한다.

[0076] **재조합 항체의 발현**

[0077] 인간화 또는 키메라 MEM102 항체는 재조합 발현에 의해 제조될 수 있다. 재조합 폴리뉴클레오타이드 구조물은 전형적으로 항체쇄의 코딩 서열에 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 포함하고, 이는 천연적으로 연관되거나 이중기원 프로모터 영역을 포함한다. 바람직하게는, 발현 조절 서열은 진행 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터에서 진행 프로모터 시스템이다. 일단 벡터가 적절한 호스트 내로 도입되면, 호스트는 뉴클레오타이드 서열의 고레벨 발현, 및 교차반응 항체의 수집 및 정제에 적합한 조건 하에 유지된다.

[0078] 포유동물 세포는 면역글로불린 또는 이의 단편을 인코딩하는 뉴클레오타이드 부분을 발현하는데 바람직한 호스트이다. 문헌[Winnacker, *From Genes to Clones*(VCH Publishers, NY, 1987)]을 참조한다. 온전한 이중 단백질 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 당해 분야에 개발되어 있고, CHO 세포주(예를 들면, DG44), 다양한 COS 세포주, HeLa 세포, HEK293 세포, L 세포, 및 Sp2/0 및 NS0를 포함한 비-항체-생성 골수종을 포함한다. 바람직하게는, 세포는 비인간이다. 이들 세포를 위한 발현 벡터는 발현 조절 서열, 예를 들면, 복제의 기원, 프로모터, 인핸서(Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49(1986)), 및 필수 가공 정보 부위, 예를 들면, 리보솜 결합 부위, RNA 슬라이스 부위, 폴리아데닐레이션 부위, 및 전사 터미네이터 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 발현 조절 서열은 내인성 유전자, 사이토메갈로바이러스, SV40, 아데노바이러스, 보빈 파빌로마바이러스 등으로부터 유래된 프로모터이다. 문헌[Co et al., *J. Immunol.* 148:1149(1992)]을 참조한다.

[0079] 일단 발현되면, 항체는 HPLC 정제, 컬럼 크로마토그래피, 젤 전기영동 등을 포함하는 당해 분야의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다(일반적으로, 문헌[Scopes, *Protein Purification*(Springer-Verlag, NY, 1982)] 참조).

[0080] **핵산**

[0081] 본 발명은 임의의 본 명세서에 기재된 인간화 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 핵산을 추가로 제공한다. 전형적으로,

핵산은 또한 성숙 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 융합된 신호 펩타이드를 인코딩한다. 핵산에 대한 코딩 서열은 코딩 서열의 발현을 확실하게 하는 조절 서열, 예를 들면, 프로모터, 인핸서, 리보솜 결합 부위, 전사 말단 신호 등과 작동적으로 연결될 수 있다. 핵산 코딩 중쇄 및 경쇄는 단리된 형태로 발생할 수 있거나, 하나 이상의 벡터로 클로닝될 수 있다. 핵산은, 예를 들면, 오버랩핑 올리고뉴클레오타이드의 고체 상태 합성 또는 PCR에 의해 합성될 수 있다. 핵산 인코딩 중쇄 및 경쇄는 하나의 인접한 핵산으로서, 예를 들면, 발현 벡터 내에서 결합될 수 있거나, 분리될 수 있고, 예를 들면, 이의 그 자신의 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다.

[0082] 하나의 실시형태에 있어서, 본 기재내용은 HA, HB, 또는 HC로 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 예를 들면, 단리된 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 인코딩할 수 있다. 이러한 단리된 폴리뉴클레오타이드는 추가로 인간 IgG 중쇄 불변 영역을 인코딩할 수 있다. IgG 불변 영역의 아이소타입은, 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4이다. 하나의 실시형태에 있어서, IgG 불변 영역의 아이소타입은 IgG1이다. 추가의 실시형태에 있어서, 인코딩된 IgG1 불변 영역은 카바트 시스템에 기재된 바와 같은 EU 인덱스, 즉, S239C에 따른 잔기 239에서의 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다. 기재내용은 또한 HA, HB, 또는 HC에 기재된 바와 같은 아미노산 서열(예를 들면, 서열 번호 1 또는 이의 변이)을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터, 및 추가로, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 숙주 세포는 포유동물 세포, 예를 들면, CHO 세포이다.

[0083] 또 다른 실시형태에 있어서, 본 기재내용은 LA, LB 또는 LC로 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 예를 들면, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드. 이러한 단리된 폴리뉴클레오타이드는 인간 IgG 경쇄 불변 영역을 추가로 인코딩할 수 있다. IgG 경쇄 불변 영역의 아이소타입은, 예를 들면, 카파 불변 영역이다. 기재내용은 또한 LA 또는 LB 또는 LC로 기재된 바와 같은 아미노산 서열(예를 들면, 서열 번호 2 또는 이의 변이)을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터, 및 추가로, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 숙주 세포는 포유동물 숙주 세포, 예를 들면, CHO 세포이다.

[0084] 또 다른 실시형태에 있어서, 본 기재내용은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 제공하고, 여기서 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 인간 CD48에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 형성한다. 본 기재내용은 또한 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 발현 벡터 또는 벡터들을 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다. 숙주 세포는 바람직하게는 포유동물 세포, 예를 들면, CHO 세포이다.

[0085] 또 다른 실시형태에 있어서, 본 기재내용은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제1 및 제2 벡터를 제공하고, 여기서 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 인간 CD48에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 형성한다. 벡터를 포함하는 숙주 세포, 바람직하게는 포유동물 숙주 세포, 예를 들면, CHO 세포가 제공된다.

[0086] 항체-약물 접합체

[0087] 항-CD48 항체는 치료제, 진단제 또는 안정화제에 접합되어 항체 접합체를 형성할 수 있다. 치료제에 접합된 항-CD48 항체는 본 명세서에서 항체-약물 접합체(ADC)로서 지칭된다. 예시적인 치료제는 세포증식억제 또는 세포독성 효과를 갖고, 또한 세포독성제 또는 세포증식억제제로도 지칭될 수 있다. 예시적인 세포독성제는, 예를 들면, 아우리스타틴, 캄포토테신, 칼리케아미신, 듀오카르마이신, 에토포시드, 마이탄시노이드(예를 들면, DM1, DM2, DM3, DM4), 타산, 벤조디아제핀(예를 들면, 피롤로[1,4]벤조디아제핀, 인돌리노벤조디아제핀, 및 피롤로[1,4]벤조디아제핀 이량체, 인돌리노벤조디아제핀 이량체, 및 옥사졸리디노벤조디아제핀 이량체를 포함하는 옥사졸리디노벤조디아제핀) 및 빈카 알칼로이드를 포함한다.

[0088] 치료제를 단백질, 특히 항체에 접합하는 기술은 잘 알려져 있다(예를 들면, 문헌[Alley et al., Current Opinion in Chemical Biology 2010 14:1-9; Senter, Cancer J., 2008, 14(3):154-169.]을 참조). 전형적으로, 치료제는 링커 단위를 통해 항체에 접합된다. 링커 단위는 절단 가능하거나 절단 가능하지 않을 수 있다. 예를 들면, 치료제는 CD48-발현 암 세포의 세포내 환경에서 절단에 민감하지만, 세포외 환경에서 실질적으로 민감하

지 않은 절단 가능한 링커와 항체에 부착될 수 있고, 따라서 접합체는 CD48-발현 암 세포(예를 들면, 엔도솜, 리소솜 환경, 또는 소포 환경에서)에 의해 내재화되는 경우 항체로부터 절단된다. 또 다른 예에서, 치료제는 절단 가능하지 않은 링커를 통해 항체에 접합될 수 있고, 약물 방출은 CD48-발현 암 세포에 의한 내재화에 따른 총 항체 분해에 의존한다.

[0089] 전형적으로, ADC는 세포독성제 또는 세포증식억제제와 항-CD48 항체 사이의 링커 영역을 포함할 것이다. 상기 기재된 바와 같이, 전형적으로, 링커는 세포내 조건하에 절단 가능할 수 있고, 따라서 링커의 절단은 세포내 환경(예를 들면, 리소솜 또는 엔도솜 또는 소포)에서 항체로부터 치료제를 방출한다. 링커는, 예를 들면, 리소솜 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하는 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커일 수 있다. 절단제는 카텝신 B 및 D 및 플라스민을 포함할 수 있다(예를 들면, 문헌[Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999]을 참조). 가장 전형적인 것은 CD48-발현 세포에 존재하는 효소에 의해 절단 가능한 펩티딜 링커이다. 예를 들면, 암 조직에서 높게 발현되는, 티올-의존적 프로테아제 카텝신-B에 의하여 절단 가능한 펩티딜 링커가 사용될 수 있다(예를 들면, Phe-Leu 또는 Val-Cit 펩타이드를 포함하는 링커). 링커는 또한 세포내 글리코시다제에 의해 절단 가능한 당 링커(예를 들면, 글루쿠로니다제에 의해 절단 가능한 글루쿠로나이드 링커 절단)를 포함하는 당 링커를 포함하는, 탄수화물 링커일 수 있다.

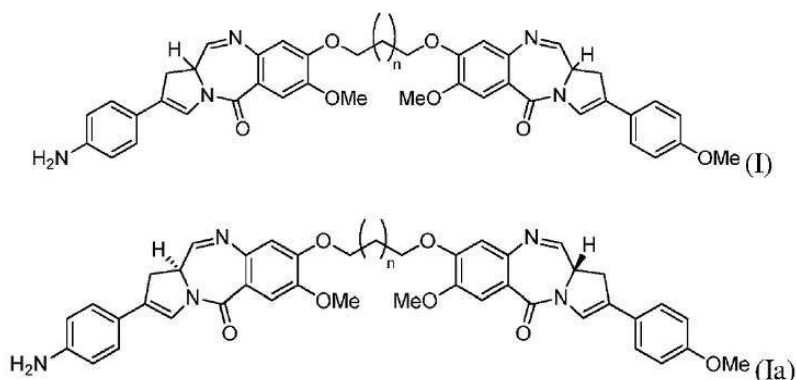
[0090] 링커는 또한 절단 가능하지 않은 링커, 예를 들면, 치료제에 직접적으로 부착되고 항체의 단백질분해 분해에 의해 방출되는 말레이미도-알킬렌- 또는 말레이미드-아릴 링커이다.

[0091] 항-CD48 항체는 항체의 헤테로원자를 통해 링커에 접합될 수 있다. 이들 헤테로원자는 항체 위의 이의 천연 상태로 존재할 수 있거나 항체 내에 도입될 수 있다. 몇몇 측면에서, 항-CD48 항체는 리신 잔기의 질소 원자를 통해 링커에 접합될 것이다. 다른 측면에 있어서, 항-CD48 항체는 시스테인 잔기의 황 원자를 통해 링커에 접합될 것이다. 시스테인 잔기는 천연 발생이거나 항체 내로 조작된 것일 수 있다. 리신 및 시스테인 잔기를 통해 링커 및 약물-링커를 항체에 접합하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0092] 예시적인 항체-약물 접합체는 아우리스타틴계 항체-약물 접합체(즉, 약물 성분은 아우리스타틴 약물임)를 포함한다. 튜불린에 결합하는 아우리스타틴은 미소관 역학 및 핵 및 세포 분열에 의한 간섭으로 보여주었고, 항암 활성을 갖는다. 전형적으로 아우리스타틴계 항체-약물 접합체는 아우리스타틴 약물과 항-CD48 항체 사이의 링커를 포함한다. 링커는, 예를 들면, 절단 가능한 링커(예를 들면, 펩티딜 링커, 카보하이드레이트 링커) 또는 절단 가능하지 않은 링커(예를 들면, 항체의 분해에 의해 방출된 링커)일 수 있다. 아우리스타틴은 MMAF, 및 MMAE를 포함한다. 예시적인 아우리스타틴의 합성 및 구조는 미국 특허 공개 제7,659,241호, 제7,498,298호, 제2009-0111756호, 제2009-0018086호, 및 제7,968,687호에 기재되고, 각각은 이의 전체 또는 모든 목적을 위하여 참조로서 인용된다.

[0093] 다른 예시적인 항체-약물 접합체는 메이탄시노이드 항체-약물 접합체(즉, 약물 성분이 메이탄시노이드 약물임), 및 벤조디아제핀 항체 약물 접합체(즉, 약물 성분이 벤조디아제핀(예를 들면, 피롤로[1,4]벤조디아제핀 이량체(PBD 이량체), 인돌리노벤조디아제핀 이량체, 및 옥사졸리디노벤조디아제핀 이량체)임)를 포함한다.

[0094] 본 발명에서 사용을 위한 바람직한 PBD 이량체는 화학식 I로 나타낸다. PBD 이량체의 바람직한 입체화학은 화학식 Ia:

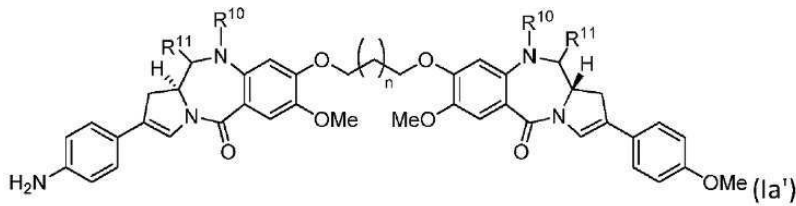
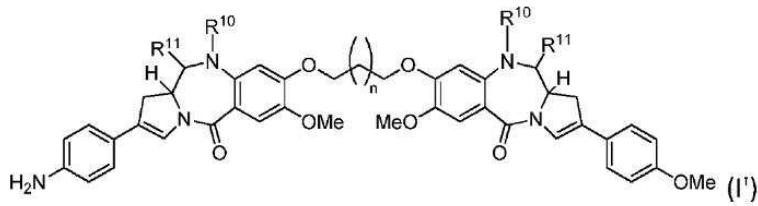


[0095] 또는 약제학적으로 염, 용매화물, 또는 염의 용매화물로서 나타나고; 상기 식에서 첨자 n은 1 또는 3이다.

[0096] 또는 약제학적으로 염, 용매화물, 또는 염의 용매화물로서 나타나고; 상기 식에서 첨자 n은 1 또는 3이다.

[0097] 화학식 I 및 Ia의 용매화물은 전형적으로 PBD 단량체 중 하나 또는 둘 다의 이민 작용기를 교차하는 물 또는 알

코울성 용매의 첨가하여 카빈올아민(들) 및/또는 카빈올아민 에테르를 형성함으로써 형성된다. 예를 들면, N10-C11 위치에서, 하기 화학식 I' 및 Ia'로 나타낸 이민(N=C), 카빈올아민(NH-CH(OH)), 또는 카빈올아민 에터(NH-CH(OMe))가 존재할 수 있다:



[0098]

[0099]

식 중,

[0100]

(a) R^{10} 은 H이고, R^{11} 은 OH 또는 OR^A 이고, 여기서 R^A 는 포화된 C_{1-4} 알킬(바람직하게는 메틸)이거나;

[0101]

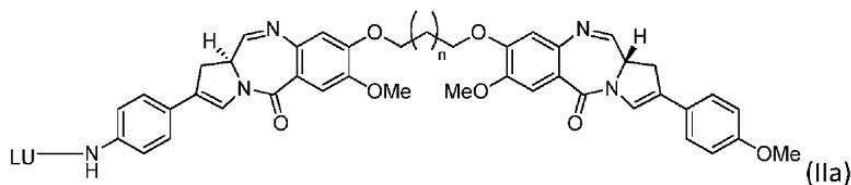
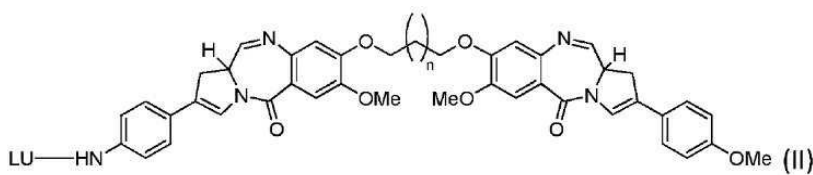
(b) R^{10} 과 R^{11} 은 이들에 결합된 질소와 탄소 원자 사이의 질소-탄소 이중 결합을 형성하거나;

[0102]

(c) R^{10} 중 하나는 H이고, R^{11} 은 OH 또는 OR^A 이고, 여기서 R^A 는 포화 C_{1-4} 알킬(바람직하게는 메틸)이고; R^{10} 및 R^{11} 중 다른 하나는 이들이 결합된 질소 및 탄소 원자 사이에 질소-탄소 이중 결합을 형성한다.

[0103]

화학식 I 또는 Ia의 PBD 이량체(또는 이의 약제학적으로 염, 용매화물, 또는 염의 용매화물)은 전형적으로 링커 단위인 LU를 통해 항체에 연결된다. 링커 단위는 표적 부위에서(예를 들면, 암 세포의 내부에서) 화학식 I 또는 Ia의 PBD 이량체(또는 이의 약제학적으로 염, 용매화물, 또는 염의 용매화물)를 방출하는 작용을 한다. 본 발명에서 사용을 위한 PBD 약물-링커 화합물은 화학식 II(IIa에 나타낸 바와 같은 바람직한 입체화학)로 하기 나타내고, 여기서 LU는 링커 단위이다. 링커 단위는, 예를 들면, 절단 가능한 펩타이드 링커 단위(예를 들면, 발린-알라닌 펩타이드를 포함하는 링커) 또는 절단 가능한 이황화 링커 단위:



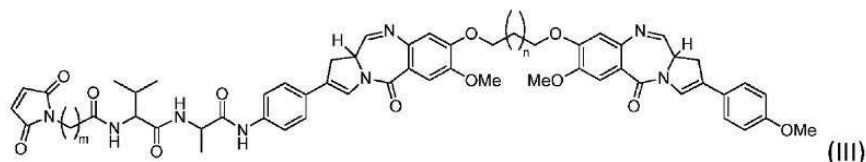
[0104]

또는 약제학적으로 염, 용매화물, 또는 염의 용매화물일 수 있고; 식 중, 첨자 n은 1 또는 3이다.

[0105]

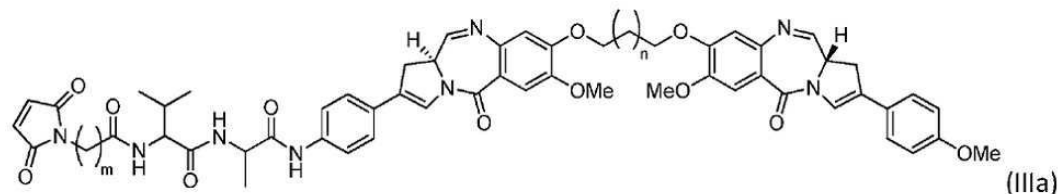
[0106]

본 발명에서 사용을 위한 바람직한 PBD 약물-링커 화합물은 하기 화학식 III 또는 약제학적으로 염, 용매화물, 또는 염의 용매화물로 나타낸다:

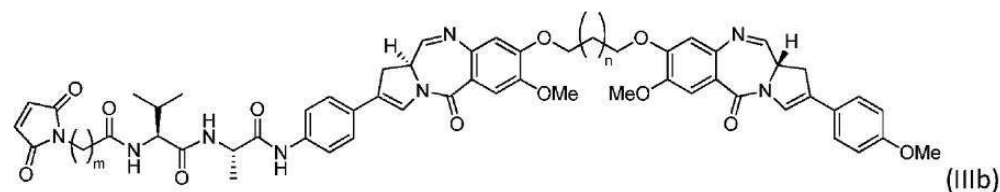


식 중, 첨자 n 은 1 또는 3이고, 첨자 m 은 2 내지 5의 정수이다.

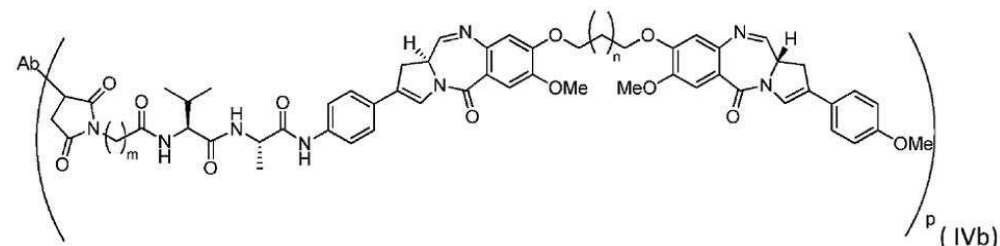
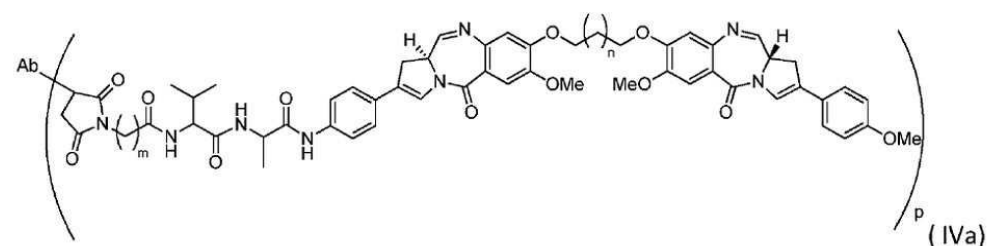
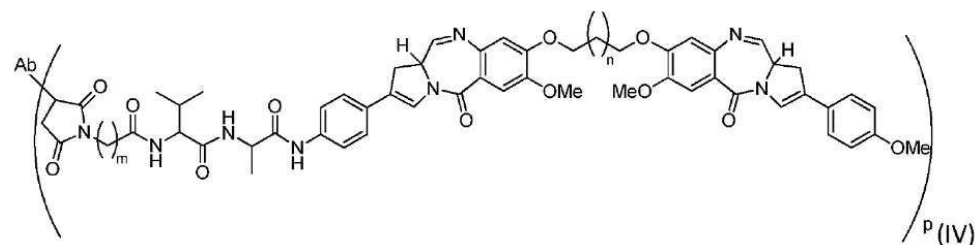
약물-링커의 PBD 약물 성분의 바람직한 입체화학은 하기 화학식 IIIa로 나타낸다:



PBD 약물 및 링커 성분의 바람직한 입체화학은 하기 화학식 IIIb로 나타낸다:



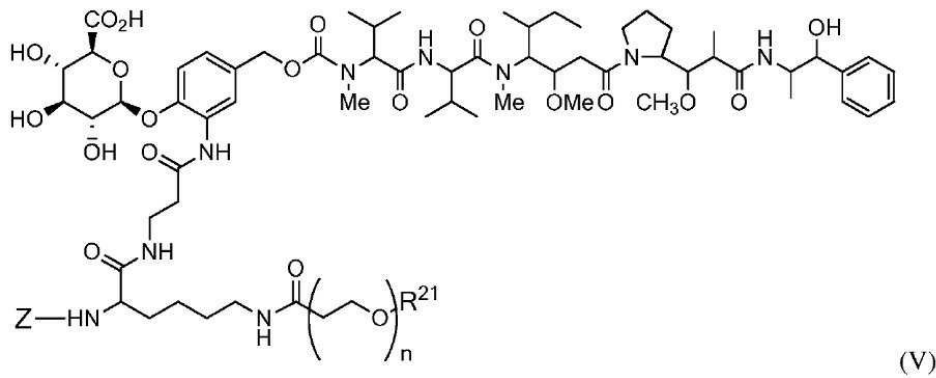
PBD 약물-링커는 항-CD48 항체에 접합되어 CD48 표적화된 항체-약물 접합체를 생성한다. 예를 들면, 항체는 화학식 II 또는 화학식 III의 약물-링커에 접합될 수 있다. 예시적인 CD48 표적화된 항체-약물 접합체는 하기 화학식 IV, IVa, 및 IVb 또는 약제학적으로 염, 용매화물, 또는 염의 용매화물로 나타낸다:



식 중, 첨자 n 은 1 또는 3이고; 첨자 m 은 2 내지 5의 정수이고; 첨자 p 는 1 내지 4이다.

예시적인 약물-링커는 MMAE 약물-링커를 포함한다. 본 발명자들은 절단 가능한 β -글루쿠로나이드 MMAE 약물-링

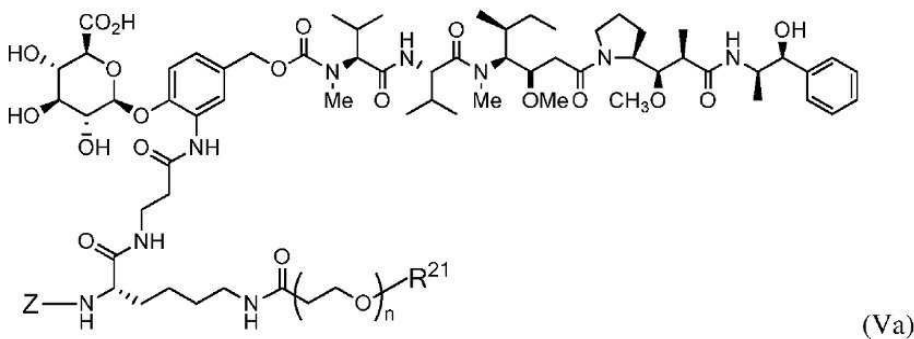
커 내로 측쇄로서 폴리에틸렌 글리콜 중합체의 도입이 폐길화되지 않은 대조군과 비교하여 이중이식 모델에서 감소된 혈장 청소율 및 증가된 항종양 활성을 갖는 항체 약물-접합체를 제공하는 것을 확인되었다. 따라서, 본 발명의 항체에 부착에 특히 유리한 약물-링커는 하기 V 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다:



[0118]

[0119]

이러한 약물-링커에 대한 바람직한 입체화학은 하기 Va 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염으로 나타낸다:



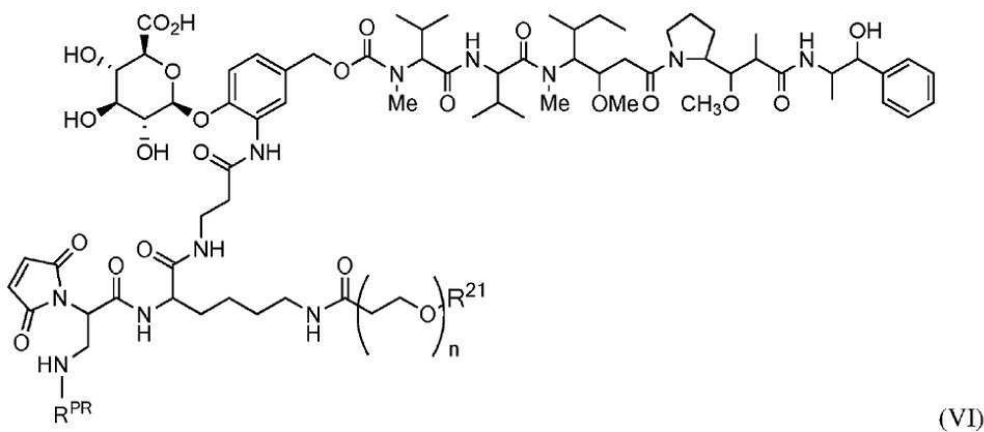
[0120]

[0121]

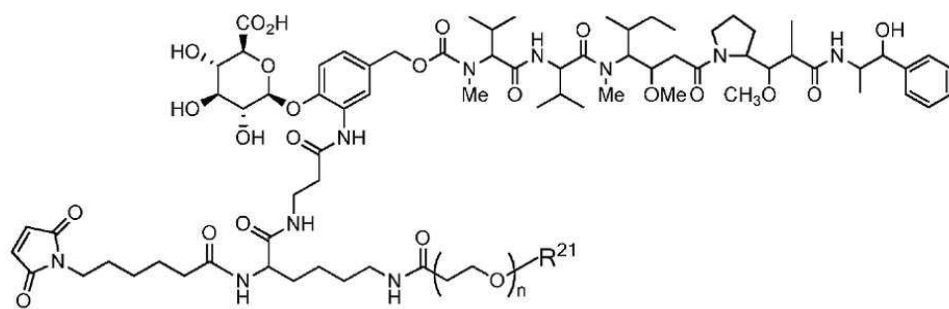
상기 화학식 V 및 Va에서, Z는 항체 상의 작용기와 반응하여 이에 대한 공유 결합을 형성할수 있는 반응성 부위를 갖는 유기 모이어티를 나타내고, n은 8 내지 36의 범위이며, 가장 바람직하게는 8 내지 14의 범위(가장 바람직하게는 12)이고, R^{21} 은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티, 바람직하게는 $-CH_3$ 또는 $-CH_2CH_2CO_2H$ 에 대한 캡핑 단위이다.

[0122]

바람직한 Z 모이어티는 말레이미도-함유 모이어티이다. 특히 바람직한 Z 모이어티는 하기 약물-링커 VI, VII 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염으로 나타낸다:

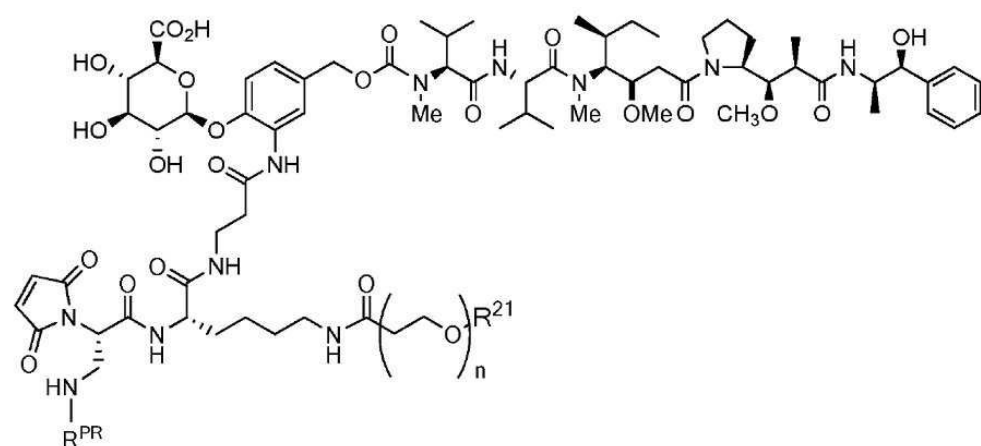


[0123]

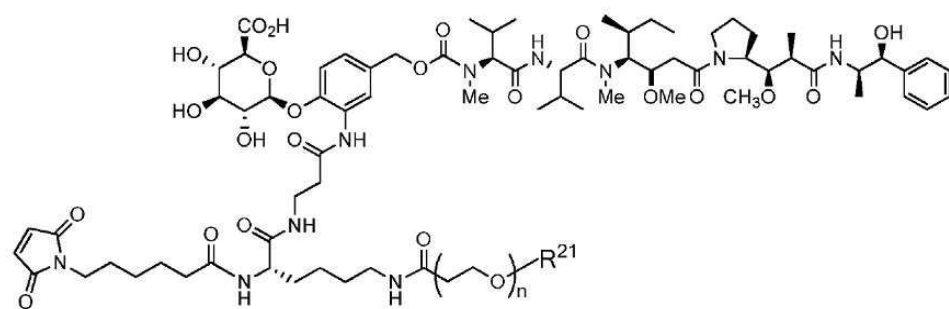


(VII)

이러한 약물-링커에 대한 바람직한 입체화학은 하기 화학식 VIa, VIIa, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염으로 나타낸다:



(VIa)



(VIIa)

상기 화학식 VI, VIa, VII 및 VIIa에서, n 은 8 내지 36의 범위이고, 가장 바람직하게는 8 내지 14의 범위(가장 바람직하게는 12)이고, R^{PR} 은 수소 또는 보호기, 예를 들면, 산 불안정 보호기, 예를 들면, BOC이고, R^{21} 은 폴리 에틸렌 글리콜 모이어티를 위한 캡핑 단위, 바람직하게는 $-CH_3$ 또는 $-CH_2CH_2CO_2H$ 이다.

상기 기재된 바와 같이, R^{PR} 은 수소 또는 보호기일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 보호기는 다작용성 화합물에서 반응성 부위를 일시적으로 또는 영구적으로, 선택적으로 차단하는 기를 나타낸다. 보호기는 분자에서 바람직한 화학적 변형에 영향을 주는데 필요한 반응 조건하에, 바람직한 경우 신규하게 형성된 정제 동안, 보호기의 원치않는 부반응 또는 미성숙한 손실을 예방하거나 피할 수 있는 경우 적합한 보호기이고, 신규하게 형성된 분자의 구조 또는 입체화학적 완결성에 역으로 영향을 주지 않는 조건하에 제거될 수 있다. 적합한 아민 보호기는 문헌[Isidro-Llobet et al., "Amino acid-protecting groups" *Chem. Rev.*(2009) 109: 2455-2504]에 의해 제공된 것들을 포함한, 산 불안정 질소 보호기를 포함한다. 전형적으로, 산 불안정 질소-보호기는 1급 또는 2급 아미노기를 이의 상응하는 카바메이트로 전환시키고, t-부틸, 알릴, 및 벤질 카바메이트를 포함한다.

상기 기재된 바와 같이, R^{21} 은 폴리 에틸렌 글리콜 모이어티를 위한 캡핑 단위이다. 숙련자에게 인식되는 바와 같이, 폴리 에틸렌 글리콜 단위는 매우 다양한 유기 모이어티, 전형적으로 상대적으로 비반응성인 것들로 말단 캡핑될 수 있다. 예를 들면, $-C_{1-10}$ 알킬, $-C_{2-10}$ 알킬- CO_2H , $-C_{2-10}$ 알킬-OH, $-C_{2-10}$ 알킬- NH_2 , C_{2-10} 알킬- $NH(C_{1-3}$ 알

킬), 또는 C_{2-10} 알킬- $N(C_{1-3}$ 알킬) $_2$ 를 포함하는 알킬기 및 치환된 알킬기가 바람직하다.

[0131] 일반적으로, 각각의 항체에 부착된 1 내지 16 약물-링커가 존재한다.

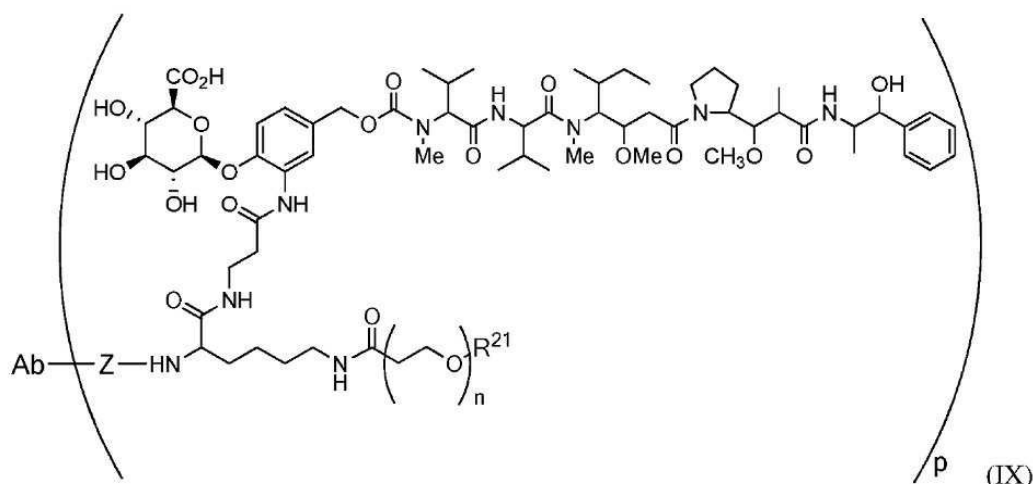
[0132] **약물 로딩 - "p"**

[0133] CD48 표적화된 항체-약물 접합체에 관하여, 첨자 p는 약물 부하(drug load)를 나타내고, 문맥에 따라, 개별적인 항체 분자에 부착된 약물-링커 분자의 분자의 수를 나타낼 수 있고, 이는 이와 같이 정수 값이거나 평균 약물 부하(average drug load)를 나타낼 수 있고, 이와 같이, 정수 또는 비-정수 값일 수 있지만 전형적으로 비-정수 값이다. 평균 약물 부하는 집단에서 항체당 약물-링커 분자의 평균 수를 나타낸다. 종종, 항상은 아니지만, 우기라 항체, 예를 들면, 단클론성 항체를 나타내는 경우, 우리는 항체 분자의 집단을 나타낸다. 항체-약물 접합체 분자의 집단을 포함하는 조성물에서, 평균 약물 부하는 표적 세포에 전달될 수 있는 약물의 양을 결정하기 때문에 중요한 품질 속성이다. 조성물에서 접합되지 않은 항체 분자의 백분율은 평균 약물 부하 값에 포함된다.

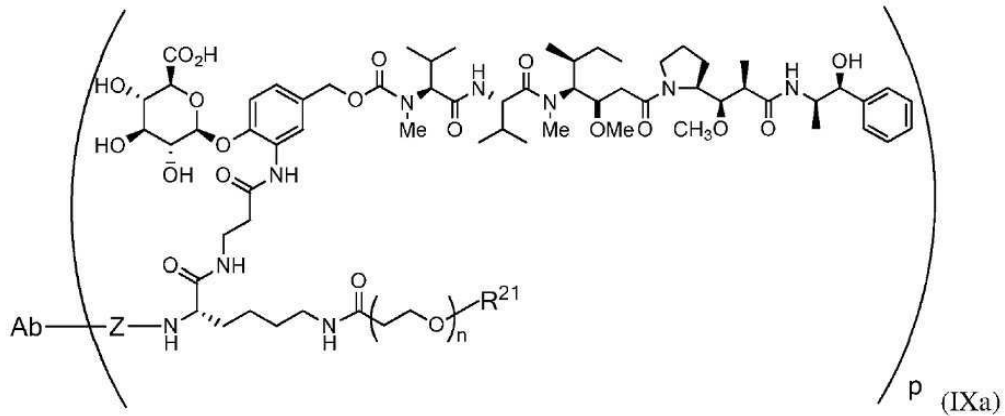
[0134] 본 발명의 바람직한 측면에서, 평균 약물 부하는, 항체-약물 접합체 화합물의 집단을 포함하는 조성물을 나타내는 경우, 1 내지 약 16, 바람직하게는 약 2 내지 약 14, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 약 10이다. PBD 항체 약물 접합체, 예를 들면, 본 명세서에 예시화도니 것들에 있어서, 특히 바람직한 평균 약물 부하는 약 2이다. 몇몇 측면에 있어서, 항체-약물 접합체 화합물의 집단에서 개별적인 항체 분자에 대한 실제 약물 부하는 1 내지 4, 1 내지 3 또는 1 내지 2이고, 우세한 약물 부하는 2이다. 바람직한 측면에 있어서, 2의 평균 약물 부하는 부위 특이적 접합 기술을 통해 달성된다(예를 들면, EU 인덱스 넘버링 시스템에 따른, 위치 239에서 포함된 항체로 도입된 조작된 시스템).

[0135] MMAE 폐길화된 ADC에 있어서, 예를 들면, 본 명세서에 예시화된 것들, 특히 바람직한 평균 약물 부하는 약 8이다. 예시적인 실시형태에 있어서, 약물-링커는 감소된 사슬 간 이황화의 시스테인 잔기에 접합된다. 몇몇 측면에 있어서, 항체-약물 접합체 화합물의 집단에서 개별적인 항체 분자에 있어서 실제 약물 부하는 1 내지 10(또는 6 내지 10 또는 6 내지 8)이고, 우세한 약물 부하는 8이다. 더 높은 약물 부하는, 예를 들면, 사슬 간 이황화 이외에, 약물-링커가 도입된 시스테인 잔기(예를 들면, EU 인덱스에 따른, 위치 239에서 도입된 시스테인 잔기)에 접합되는 경우 달성될 수 있다.

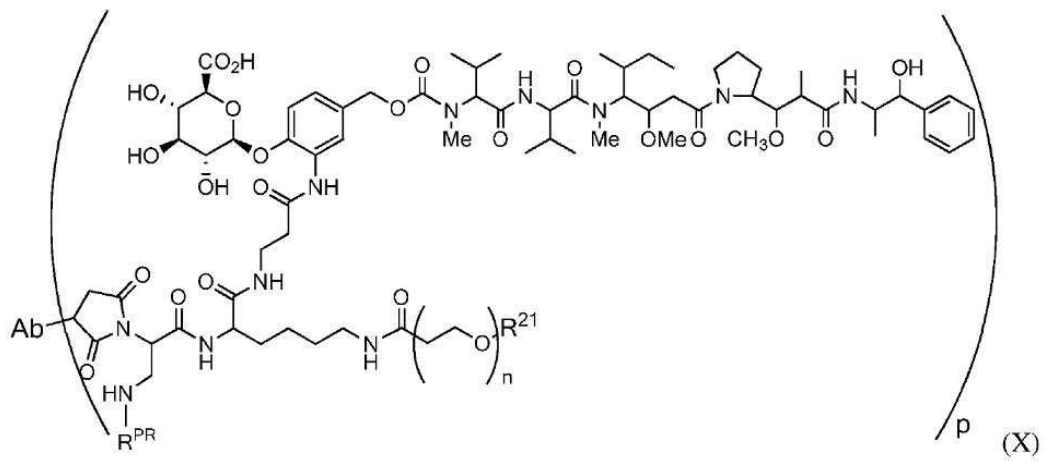
[0136] 예시적인 ADC는 하기 IX 내지 XIa 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함한다:



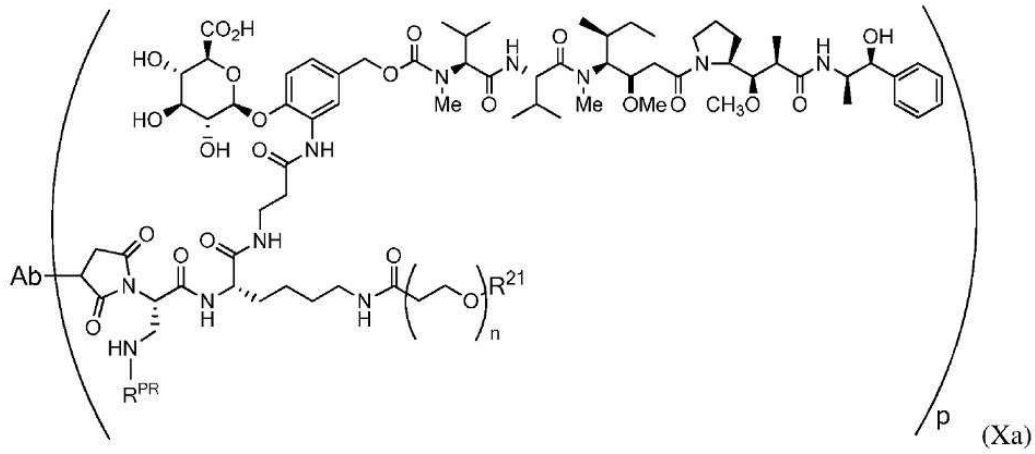
[0137]



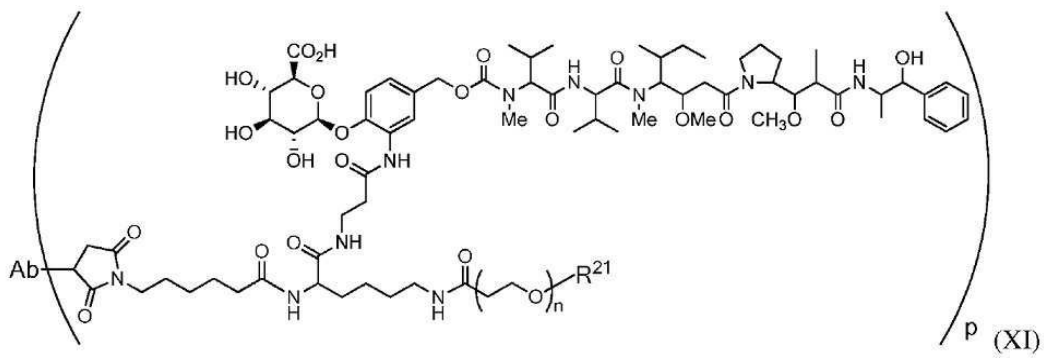
[0138]



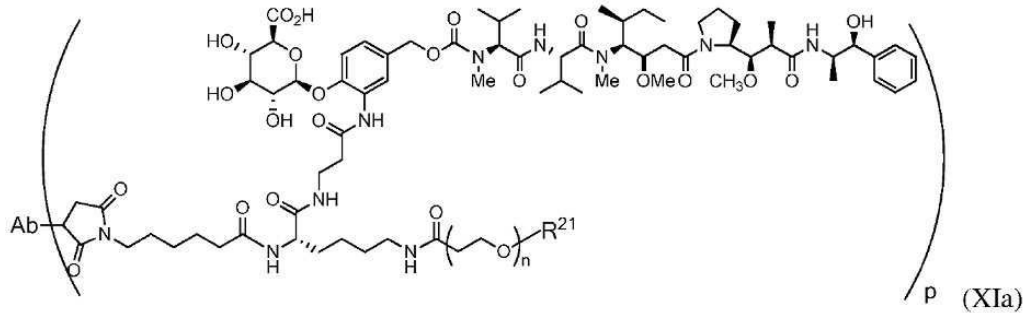
[0139]



[0140]



[0141]



[0142]

[0143]

식 중, n 은 8 내지 36의 범위, 가장 바람직하게는 8 내지 14의 범위(가장 바람직하게는 12)이고, R^{PR} 은 수소 또는 보호기, 예를 들면, 산 불안정 보호기, 예를 들면, BOC이고, R^{21} 은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티, 바람직하게는 $-CH_3$ 또는 $-CH_2CH_2CO_2H$ 를 위한 캡핑 단위이고, Ab는 항-CD48 항체를 나타내고, p 는 개별적인 항체 분자를 나타내는 경우, 1 내지 16, 바람직하게는 1 내지 14, 6 내지 12, 6 내지 10, 또는 8 내지 10 범위의 정수를 나타내고, 항체 분자의 집단을 나타내는 경우, 약 4 또는 약 6 내지 약 14, 바람직하게는 약 8의 평균 약물 부하를 나타낸다.

[0144]

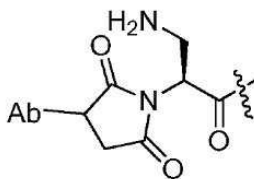
상기 기재된 바와 같이, 약물 링커의 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 부분은 8 내지 36의 범위일 수 있고, 그러나, 12 개의 에틸렌 옥사이드 단위의 PEG가 특히 바람직한 것으로 확인되었다. PEG 쇠가 길수록 더 느린 청소를 야기할 수 있는 반면, PEG 쇠가 짧을수록 감소된 활성을 야기할 수 있다는 것이 확인되었다. 따라서, 상기 모든 실시형태에서 첨자 n 은 바람직하게는 8 내지 14, 8 내지 12, 10 내지 12 또는 10 내지 14이고, 가장 바람직하게는 12이다.

[0145]

다분산 PEGs, 단분산 PEGs 및 개별적인 PEG는 본 발명의 폐결화된 항체 약물 접합체를 제조하는데 사용될 수 있다. 다분산 PEG는 크기와 분자량의 불균질 혼합물인 반면, 단분산 PEG는 전형적으로 불균질 혼합물로부터 정제되고, 따라서 단일 쇠 길이 및 분자량으로 제공된다. 바람직한 PEG 단위는 중합 공정을 통하지 않고 단계식 방식으로 합성된 화합물인 개별적인 PEG이다. 개별적인 PEG는 정의되고 특정된 쇠 길이를 갖는 단일 분자를 제공한다. 첨자 " p "와 같이, 항체-약물 접합체의 집단을 나타내는 경우, 첨자 " n "에 대한 값은 평균 수일 수 있고, 정수 또는 비-정수일 수 있다.

[0146]

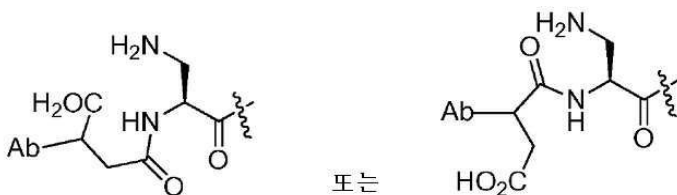
바람직한 실시형태에서, 약물-링커에 대한 항체의 공유 결합은 티오-치환된 석신이미드를 형성하는 약물 링커의 말레이미드 작용기와 상호작용하는 항체의 설포하이드릴 작용기를 통해 달성된다. 설포하이드릴 작용기는 리간드의 천연 상태의 리간드 유닛, 예를 들면, 천연 발생 잔기(사슬 간 이황화 잔기) 위에 존재할 수 있거나, 화학적 개질 또는 생물학적 조작, 또는 둘의 조합을 통하여 리간드 내로 도입될 수 있다. 항체-치환된 석신이미드는 가수분해된 형태(들)로 존재할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, 바람직한 실시형태에서, ADC는 항체에 결합되는 경우,



[0147]

[0148]

의 구조로 나타난 석신이미드 모이어티를 포함하고, 항체에 결합되는 경우



[0149]

[0150]

의 구조로 나타난 이의 상응하는 산-아미드 모이어티를 포함한다.

- [0151] 물결선은 약물-링커의 나머지에 대한 연결을 지시한다.
- [0152] **치료적 적용**
- [0153] 본 명세서에 기재된 CD48 표적화된 항체-약물 접합체는 CD48 발현 질병, 예를 들면, CD48 발현 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 전형적으로 이러한 암은 단백질(예를 들면, 면역검정) 또는 RNA 수준에서 측정된 CD48의 검출 가능한 수준을 보여준다. 몇몇 이러한 암은 바람직하게는 동일한 환자로부터 동일한 형태의 비암성 조직과 관련된 CD48의 상승된 수치를 보여준다. 임의로, 암의 CD48의 수준은 치료를 수행하기 전에 측정된다.
- [0154] CD48 발현과 연관된 암의 예는 다발성 골수종, 및 호지킨 질환, 비호지킨 림프종, 여포성 림프종, 만성 림프성 백혈병(CLL), 맨틀 세포 림프종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증, 원발성/전신성 아밀로이드증 환자 종양 세포, MGUS, 및 아밀로이드증을 포함하는 다른 B 세포 악성종양을 포함한다. 몇몇 급성 골수성 백혈병(AML) 세포주(예를 들면, AML 환자 백혈병 아세포)는 CD48을 발현하는 것을 관찰되었고, 따라서, CD48을 발현하는 AML 암을 가진 환자는 기재된 CD48 ADC를 사용하여 치료할 수 있다.
- [0155] 본 발명의 방법은 환자에게 본 발명의 항체-약물 접합체를 투여하는 것을 포함하는 CD48을 발현하는 암을 갖는 환자를 치료하는 것이다. 암은 예를 들면, 다발성 골수종을 포함하는 임의의 CD48 발현 암일 수 있다.
- [0156] CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체는 개시를 지연시키고, 중증도를 감소시키고, 추가의 해로움을 억제하고, 그리고/또는 암의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 완화시키는 투여량, 투여 경로 및 투여 빈도를 의미하는 유효한 치료계획으로 투여된다.
- [0157] CD48에 대하여 지시된 폐길화된-MMAE 접합체에 대한 예시적인 투여량은 일반적으로 약 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 내지 10.0 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 5.0 mg/kg 또는 약 0.5 mg/kg 내지 1.0, 2.0, 또는 4.0 $\mu\text{g/kg}$ 이지만, 대안적인 투여량이 고려된다. 바람직한 용량 범위는 약 0.3 mg/kg 내지 약 2.0 mg/kg이다.
- [0158] 투여는 다양한 투여 경로에 의할 수 있다. 특정한 실시형태에 있어서, 접합체는 비경구로, 예를 들면, 정맥내로, 근육내로, 또는 피하로 투여된다. 암의 치료를 위한 ADC의 투여에 있어서, 전달은 정맥내 또는 피하 투여에 의해 전신성 순환될 수 있다. 특히 실시형태에 있어서, 투여는 정맥내 전달을 통한다. 정맥내 투여는, 예를 들면, 일정 기간, 예를 들면, 30 내지 90분 동안 주입에 의해 또는 단일 볼루스 주사에 의할 수 있다. 몇몇 측면에 있어서, 투여는 말초 삽입된 중심 카테터에서 느린 IV 푸쉬(즉, 30 내지 60초 동안)를 통할 것이다.
- [0159] 투여의 빈도는 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간 또는 동물인지 여부, 및 투여되는 다른 약제를 포함하는 많은 상이한 인자에 따라 좌우된다. 빈도는 매일, 매주, 매월, 분기별, 또는 환자의 상태 또는 치료되는 암의 진행에서의 변화에 반응하는 불규칙적인 간격일 수 있다. 정맥내 투여의 예시적인 빈도는 치료의 연속적인 과정 동안 주당 2회 내지 분기별이지만, 더 많거나 적은 빈도가 또한 가능하다. 정맥내 투여에 대한 다른 예시적인 빈도는 치료의 연속적인 과정 동안 3주마다 또는 1주마다 또는 1개월마다이지만, 더 많거나 적은 빈도가 또한 가능하다. 또 다른 예시적인 빈도는 6주마다 투여이다. 피하 투여에 있어서, 예시적인 용량 빈도는 매일 내지 매월이지만, 더 많거나 적은 빈도가 또한 가능하다.
- [0160] 비경구 투여를 위한 약제학적 조성물은 GMP 조건하에 제조된, 바람직하게는 무균 및 실질적으로 등장성이다. 약제학적 조성물은 단위 투여량 형태(즉, 단일 투여를 위한 투여량)로 제공될 수 있다. 약제학적 조성물은 하나 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 선택된 투여 경로에 따라 좌우된다. 주사를 위하여, 접합체는 수성 용액, 바람직하게는 생리학적 혼화성 버퍼, 예를 들면, 헹크액, 링거액, 또는 생리학적 식염수 또는 아세테이트 버퍼(주사 부위에서 불편함을 감소시키기 위함) 중에서 제형화될 수 있다. 용액은 제형화제, 예를 들면, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 대안적으로 항체는 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들면, 무균 피로겐-무함유 물에 의해 구성되는 동결건조 형태일 수 있다. 액체 제형 중의 접합체의 농도는 매우 넓다. 몇몇 측면에 있어서, ADC는 약 0.5 mg/ml 내지 약 30 mg/ml, 약 0.5 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 약 2 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 또는 약 2 mg/ml 내지 약 5 mg/ml의 농도로 존재한다.
- [0161] 본 발명의 접합체에 의한 치료는 치료되는 특정한 질병에 대한 치료 기준을 포함하여 화학요법, 방사선, 줄기 세포 치료, 수술, 및 치료되는 질병에 대하여 효과적인 다른 치료와 조합될 수 있다. 따라서, 본 발명은 단일요법으로 또는 예를 들면, 이러한 질환 및/또는 질병의 치료에 대한 치료 기준 또는 연구 약물과 조합 요법으로 본 명세서에 기재된 질환 및 질병을 치료하는 방법을 포함한다. 암의 치료 방법은 환자에게 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체의 유효량을 추가의 항암제 또는 다른 암을 치료하는 제제와 조합으로 투여하는

것을 포함한다.

- [0162] 조합 요법을 위한 예시적인 제제는 다발성 골수종을 치료하는데 사용되는 프로테아좀 억제제인 카르필조밍(예를 들면, KYPROLIS®)이다(문헌[Siegel DS et al., A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 2012; 120:2817-2825]을 참조). 카르필조밍은 정맥내/IV 주입으로서 투여될 수 있다. 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.
- [0163] 카르필조밍은 또한 본 발명 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로 투여될 수 있다. 카르필조밍은 다발성 골수종을 치료하는 다양한 추가의 제제와 조합되었다. 예를 들면, 카르필조밍은 레날리도마이드는 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Stewart KA et al., Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2015; 372:142-152] 참조). 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.
- [0164] 카르필조밍은 또한 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Dimopoulos MD et al., Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma(ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncology* 2016; 17:27-38] 참조). 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 텍사메타손은 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 텍사메타손은 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 텍사메타손은 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.
- [0165] 카르필조밍은 또한 파노비노스타트와 조합되었다(문헌[Berdeja JG et al., Phase I/II study of the combination of panobinostat and carfilzomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Haematologica* 2015; 100:670-676] 참조). 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 파노비노스타트는 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 파노비노스타트는 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 파노비노스타트는 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다. 카르필조밍은 또한 포말리도마이드는 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Shah J et al., Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* 2015; 126: 2284-2290] 참조). 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 포말리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 포말리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 카르필조밍은 포말리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드의 조합 요법으로 투여된다.
- [0166] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 CD38에 결합하는 인간 단클론성 항체(다발성 골수종 세포에서 높게 발현된 당단백질)인 다라투무맙(예를 들면, DARZALEX™)이다. 다라투무맙은 환자에게 정맥내 주입으로 투여되어 다발성 골수종을 치료할 수 있다(참조 문헌[Lokhorst HM et al., Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373:1207-1219]). 실시형태에 있어서, 다라투무맙은 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 다라투무맙은 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 다라투무맙은 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.
- [0167] 다라투무맙은 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로 투여될 수 있다. 다라투무맙은 다발성 골수종을 치료하는 다양한 추가의 제제와 조합되었다. 예를 들면, 다라투무맙은 보르테조밍은 및 레날리도마이드와 조합되었다(문헌[Phipps C et al., Daratumumab and its potential in the treatment of multiple myeloma: overview of the preclinical and clinical development. *Ther Adv Hematol* 2015; 6:120-127] 참조). 실시형태에 있어서, 다라투무맙은 보르테조밍, 레날리도마이드, 및 본 발명의 CD48에

대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 다라투무맵은 보르테조밍, 레날리도마이드, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 다라투무맵은 보르테조밍, 레날리도마이드, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0168] 다라투무맵은 보르테조밍은 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Phipps C et al.] 참조). 실시형태에 있어서, 다라투무맵은 보르테조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 다라투무맵은 보르테조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 다라투무맵은 보르테조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0169] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 CD319에 결합하는 단클론성 항체, 또는 신호전달 림프구성 활성화 분자 F7(SLAMF7), 악성 다발성 골수종 세포에 대한 마커인 엘로투주맵(예를 들면, EMPliciti™)이다. 엘로투주맵은 정맥내 주입으로 투여되어 다발성 골수종을 치료할 수 있다(문헌[Zonder JA et al., A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood* 2012; 120: 552-559]) 참조). 실시형태에 있어서, 엘로투주맵은 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 엘로투주맵은 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 엘로투주맵은 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0170] 엘로투주맵은 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로 투여될 수 있다. 엘로투주맵은 다발성 골수종을 치료하는 다양한 추가의 제제와 조합되었다. 예를 들면, 엘로투주맵은 레날리도마이드는 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Lonial S et al., Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373:621-631] 참조). 실시형태에 있어서, 엘로투주맵은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 엘로투주맵은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 엘로투주맵은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0171] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 다발성 골수종을 치료하기 위하여 환자에게 제공되는 면역조절제인 레날리도마이드(예를 들면, REVLIMID®)이다(문헌[Richardson PG, A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 2006, 108: 3458-3464] 참조). 레날리도마이드는 경구 투여를 위한 캡슐, 필, 또는 정제로서 팩킹될 수 있다. 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0172] 레날리도마이드는 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로 투여될 수 있다. 레날리도마이드는 다발성 골수종을 치료하는 다양한 추가의 제제와 조합되었다. 예를 들면, 레날리도마이드는 보르테조밍은 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Richardson PG et al., Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2010; 116:679-686] 참조). 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 보르테조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 보르테조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 보르테조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0173] 레날리도마이드는 또한 카르필조밍 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Stewart KA et al.] 참조). 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 카르필조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 카르필조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 카르필조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0174] 레날리도마이드는 또한 다라투무맵 및 보르테조밍과 조합되었다(문헌[Phipps C et al.] 참조). 실시형태에 있어

서, 레날리도마이드는 다라투무맙, 보르테조밋, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 다라투무맙, 보르테조밋, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 다라투무맙, 보르테조밋, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0175] 레날리도마이드는 또한 엘로투주맙 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Lonial S et al., Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373:621-631] 참조). 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 엘로투주맙, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 엘로투주맙, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 레날리도마이드는 엘로투주맙, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0176] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 다발성 골수종 및 맨틀 세포 림프종을 치료하기 위하여 환자에게 제공되는 프로테아좀 억제제 보르테조밋(예를 들면, VELCADE®)이다(문헌[Richardson PG et al., A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348:2609-2617] 참조). 보르테조밋은 환자에게 정맥내 주사를 통해 투여될 수 있다. 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0177] 보르테조밋은 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로 투여될 수 있다. 보르테조밋은 다발성 골수종을 치료하는 다양한 추가의 제제와 조합되었다. 예를 들면, 보르테조밋은 탈리도마이드 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Kapoor P et al., Bortezomib combination therapy in multiple myeloma. *Semin Hematol* 2012; 3:228-242] 참조). 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 탈리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 탈리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 탈리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다. 보르테조밋은 또한 텍사메타손, 탈리도마이드, 시스플라틴, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 및 에토포시드와 조합 요법으로 투여될 수 있다(문헌[Kapoor P et al.] 참조). 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 텍사메타손, 탈리도마이드, 시스플라틴, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 에토포시드, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 텍사메타손, 탈리도마이드, 시스플라틴, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 에토포시드, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 텍사메타손, 탈리도마이드, 시스플라틴, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 에토포시드, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0178] 보르테조밋은 또한 다라투무맙 및 레날리도마이드와 조합되었다(문헌[Phipps C et al.] 참조). 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 다라투무맙, 레날리도마이드, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 다라투무맙, 레날리도마이드, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 다라투무맙, 레날리도마이드, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0179] 보르테조밋은 또한 레날리도마이드는 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Richardson PG et al., 2010] 참조). 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0180] 보르테조밋은 또한 파노비노스타트는 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Richardson P et al., PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory mye. *Blood* 2013; 122:2331-2337] 참조). 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 파노비노스타트, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 파노비노스타트, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 보르테조밋은 파노비노스타트, 텍사메타손, 및 본 발명의

hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

- [0181] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 암(다발성 골수종, 백혈병, 및 림프종 포함), 염증, 알레르기, 및 메스꺼움을 치료하는데 사용되는 글루코코르티코스테로이드인 텍사메타손(예를 들면, DECADRON®)이다. 텍사메타손은 경구 투여를 위한 정제, 필, 또는 캡슐로서, 또는 정맥내 주입을 통해 투여될 수 있다. 실시형태에 있어서, 텍사메타손은 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 텍사메타손은 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 텍사메타손은 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다. 텍사메타손은 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로 투여될 수 있다.
- [0182] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 암(그 중에서도 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 호지킨 및 비호지킨 림프종, 유방암, 및 폐암을 포함)을 치료하는데 사용되는 알킬화제인 사이클로포스파미드(예를 들면, CYTOXAN®)이다. 사이클로포스파미드는 주사, 주입에 의해, 경구 투여를 위한 정제, 필, 또는 캡슐로서, 또는 근육내 주사에 의해, 복부 라이닝 내로, 또는 폐 라이닝 내로 투여될 수 있다. 실시형태에 있어서, 사이클로포스파미드는 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 사이클로포스파미드는 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 사이클로포스파미드는 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다. 사이클로포스파미드는 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로서 투여될 수 있다.
- [0183] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 암(다발성 골수종 및 난소암을 포함)을 치료하는데 사용되는 알킬화제인 멜팔란이다. 멜팔란은 경구적으로, 주사 또는 주입으로 투여될 수 있다. 실시형태에 있어서, 멜팔란은 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 멜팔란은 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 멜팔란은 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.
- [0184] 멜팔란은 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로 투여될 수 있다.
- [0185] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 다발성 골수종을 치료하는데 사용되는 면역조절제인 포말리도마이드(예를 들면, POMALYST®)이다. 포말리도마이드는 경구 투여를 위한 캡슐, 필, 또는 정제로서 투여될 수 있다. 실시형태에 있어서, 포말리도마이드는 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 포말리도마이드는 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 포말리도마이드는 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.
- [0186] 포말리도마이드는 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로서 투여될 수 있다. 포말리도마이드는 다발성 골수종을 치료하는 다양한 추가의 제제와 조합되었다. 포말리도마이드는 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Richardson P et al., Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. Blood 2014; 123:1826-1832] 참조). 실시형태에 있어서, 포말리도마이드는 텍사메타손 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 포말리도마이드는 텍사메타손 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 포말리도마이드는 텍사메타손 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.
- [0187] 포말리도마이드는 또한 카르필조밍 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Shah J et al., Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. Blood 2015; 126: 2284-2290] 참조). 실시형태에 있어서, 포말리도마이드는 카르필조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 포말리도마이드는 카르필조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 포말리도마이드는 카르필조밍, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.
- [0188] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 암(다발성 골수종을 포함)을 치료하는데 사용되는 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제인 파노비노스타트(예를 들면, FARYDAK®)이다(문헌[Wolf JL et al., A phase II study of

oral panobinostat (LBH589) in adult patients with advanced refractory multiple myeloma. ASH Annual Meeting Abstracts, 2008] 참조). 파노비노스타트는 경구 투여를 위한 필, 캡슐, 또는 정제로서 투여될 수 있다. 실시형태에 있어서, 파노비노스타트는 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 파노비노스타트는 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 파노비노스타트는 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0189] 파노비노스타트는 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로 투여될 수 있다. 파노비노스타트는 다발성 골수종을 치료하는 다양한 추가의 제제와 조합되었다. 예를 들면, 파노비노스타트는 카르필조립과 조합되었다(문헌[Berdeja JG et al.] 참조). 실시형태에 있어서, 파노비노스타트는 카르필조립 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 파노비노스타트는 카르필조립 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 파노비노스타트는 카르필조립 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다. 파노비노스타트는 또한 보르테조립 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Richardson P et al., 2013] 참조). 실시형태에 있어서, 파노비노스타트는 보르테조립, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 파노비노스타트는 보르테조립, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 파노비노스타트는 보르테조립, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0190] 조합 요법을 위한 또 다른 예시적인 제제는 암(다발성 골수종을 포함)을 치료하는데 사용되는 프로테아좀 억제제인 익사조립(NINLARO®)이다. 익사조립은 경구적으로 투여될 수 있다. 실시형태에 있어서, 익사조립은 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 익사조립은 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 익사조립은 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다. 익사조립은 또한 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체 및 추가의 제제와 조합 요법으로 투여될 수 있다. 익사조립은 다발성 골수종을 치료하는 다양한 추가의 제제와 조합되었다. 예를 들면, 익사조립은 레날리도마이드 및 텍사메타손과 조합되었다(문헌[Moreau P et al., Ixazomib, an investigational oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone, significantly extends progression-free survival for patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma: the phase 3 tourmaline-MM1 study. ASH Annual Meeting Abstracts, 2015] 참조). 실시형태에 있어서, 익사조립은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 CD48에 대하여 지시된 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 익사조립은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102 항체-약물 접합체와 조합 요법으로 투여된다. 추가의 실시형태에 있어서, 익사조립은 레날리도마이드, 텍사메타손, 및 본 발명의 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-로드와 조합 요법으로 투여된다.

[0191] 본 발명의 임의의 특징, 단계, 원소, 실시형태, 또는 측면은, 달리 특정하게 지시되지 않는 한, 임의의 다른 것과 조합으로 사용될 수 있다. 본 발명은 명확성 및 이해의 목적으로 설명 및 예시의 방식으로 일부 상세하게 기재되었지만, 특정한 변화 및 변형이 첨부된 청구항의 범위 내에서 실시될 수 있다는 것이 명백할 것이다.

[0192] **실시예**

[0193] 하기 실시예는 설명을 제공하지만 청구된 발명을 제한하지 않는다.

[0194] 실시예 1: 항체 선택 및 인간화

[0195] 뮤린 MEM102 항체는 인간 CD48 단백질에 결합하고, 문헌[Bazil et al., *Folia Biologica* 35:289-297(1989)]에 먼저 기재되었다. 뮤린 MEM102 항체를 인코딩하는 핵산을 시퀀싱하고, 인코딩된 중쇄 및 경쇄 CDR 서열, 즉, 서열 번호 3-8을 확인하였다. hIgG VH7-4-1/hIgG-JH5 중쇄 가변 영역 인간 생식선 및 인간 어셉터 서열로서 hIgG-VK6-21/hIgG-JK4 경쇄 가변 영역 인간 생식선을 사용하여 몇몇 인간화 MEM102 항체를 건설하였다. 항체는 마우스 항체 또는 마우스 생식선 서열로 복귀 돌연변이되는 아미노산 잔기의 선택에서 차이가 있다. 항체 지정된 HALA(서열 번호 1(vHA)로 기재된 중쇄 및 서열 번호 2(vLA)로 기재된 경쇄를 이의 (i) 결합 특징, (ii) 약물을 전달하는 능력 및 (iii) 다른 변이와 비교하여 복귀 돌연변이의 수를 기반으로 한 리드 인간화 MEM102 항체로서 선택하였다. 인간화 MEM102 항체는 또한 hMEM102로도 지칭된다.

[0196] 항체 지정된 HCLA(중쇄 가변 영역 지정된 vHC 및 경쇄 가변 영역 지정된 vLA를 갖는 항체), HALB(중쇄 가변 영역 지정된 vHA 및 경쇄 가변 영역 지정된 vLB를 갖는 항체), HBLA(중쇄 가변 영역 지정된 vHB 및 경쇄 가변 영역 지정된 vLA를 갖는 항체), HBLB(중쇄 가변 영역 지정된 vHB 및 the 경쇄 가변 영역 지정된 vLB를 갖는 항체), HCLB(중쇄 가변 영역 지정된 vHC 및 경쇄 가변 영역 지정된 vLB를 갖는 항체)는 HALA 항체를 대신하여 본 발명에서 사용될 수 있다. vHA, vHB, vHC, vLA, vLB, 및 vLC 서열에 대하여 도 1 및 2를 참조한다. MEM102의 다양한 인간화 형태에 대한 결합 친화력은 세포 발현 인간 또는 cyno CD48에 대하여 처리되는지 여부와 유사하다.

[0197] 실시예 2: hMEM102 결합 특징

[0198] **방법:** 항-CD48 항체의 포화 결합을 측정하기 위하여, 인간 U-266 다발성 골수종 종양 세포 또는 시아노물구스 원숭이 CD48 안정하게 형질감염된 CHO-DG44 클론성 세포를 항체당 약 2-4 형광단으로 로딩된 Alexa Fluor-647 접합된 항체(0.8 ng/ml - 50 µg/mL)로 적정하여 염색하였다. 얼음 위에서 1시간 배양 후, 2% 소태아 혈청 및 0.02% 나트륨 아지드를 함유하는 인산염 완충 식염수로 세포를 2회 세척하였다. 형광성을 LSRII 유세포분석기로 검출하고, Kd 값을 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)에서 1-부위 결합(하이퍼볼라) 비선형 회귀를 사용하여 측정하였다.

[0199] **결과:** 표 1 및 도 3 및 4는 낮은 Kd 값에 의해 지시된 바와 같이, hMEM102-HALA 항체가 U-266 세포에서 cMEM102와 비교하여 유사한 결합 친화력을 갖는다고 나타낸다. 안정하게 형질감염된 CHO-DG44 클론성 세포에서 시아노물구스 원숭이 CD48에 대한 hMEM102-HALA 및 cMEM102의 결합 친화력은 또한 비슷하였다. hMEM102-HALA 및 cMEM102 둘 다는 세포주 둘 다에서 mMEM102와 비교하여 4배 낮은 Kd보다 컸다. 항-CD48 항체는 시아노물구스 원숭이 CD48과 비교하여 인간 CD48에 대한 약 6배 더 강한 결합 친화력을 가졌다.

표 1

[0200]

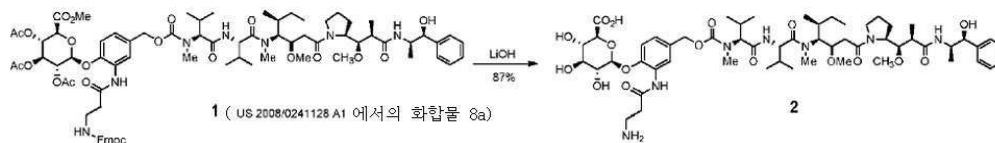
항체	로트#	Kd(nM)	
		U-266	CHO-DG44-시아노물구스 원숭이 CD48
hMEM102-HALA	9915029F	5.0	31.1
cMEM102	7713039A	5.8	40.5
mMEM102	275036T	20.8	164.7

[0201] 실시예 3: MDpr-PEG(12)-glyc-MMAE의 합성 및 hMEM102에 대한 결합

[0202] **일반적인 정보.** 모든 상업적으로 이용 가능한 용매는 추가의 정제없이 사용하였다. PEG 시약은 쿼타 바이오디자인(Quanta BioDesign)(미국 오하이오주 포웰 소재)로부터 구입하였다. 분석용 박막 크로마토그래피를 실리카 겔 60 F254 알루미늄 시트(EMD 케미칼스(EMD Chemicals), 미국 뉴저지주 김스타운 소재) 상에서 수행하고, 라디알 크로마토그래피는 크로마토트론(Chromatotron) 장치(하리스 리서치(Harris Research), 미국 캘리포니아주 팔로알토 소재) 상에서 수행하였다. 컬럼 크로마토그래피는 마이오타지 이솔레아 원 플래쉬 정제 시스템(미국 노스캐롤라이나주 샬럿 소재) 상에서 수행하였다. 분석용 HPLC를 바리안 프로스타(Varian ProStar) 330 PDA 검출기와 구성된 바리안 프로스타 210(Varian ProStar 210) 용매 전달 시스템 상에서 수행하였다. 샘플은 C12 페노메덱스 시너지(Phenomenex Synergi) 2.0 x 150mm, 4µm, 80 역상 컬럼 상에서 용리시켰다. 산성 이동상은 둘 다 0.05% 트리플루오로아세트산 또는 0.1% 포름산(각각의 화합물에 대하여 기재)을 함유하는 아세트로나이트릴 및 물로 구성되었다. 화합물은 1분 후 주사에서 5%로부터 11분에 95%로 산성 아세트로나이트릴의 선형 구배로 용리된 후, 15분까지 등용매 95% 아세트로나이트릴(유속 = 1.0 mL/분)로 용리되었다. LC-MS를 2개의 상이한 시스템 상에서 수행하였다. LC-MS 시스템 1은 C12 페노메덱스 시너지 2.0 x 150mm, 4µm, 80 Å 역상 컬럼이 장착된 HP 애질런트(Agilent) 1100 HPLC 장치에 접하고 있는 ZMD 마이크로매스(Micromass) 질량 분석기로 구성되었다. 산성 용리액은 10분 동안 0.1% 수성 포름산에서 5% 내지 95%의 아세트로나이트릴 후, 5분 동안 등용매 95% 아세트로나이트릴의 선형 구배로 이루어졌다(유속=0.4 mL/분). LC-MS 시스템 2는 워터스(Waters) 2996 포토다이오드 어레이 디텍터(Photodiode Array Detector)가 있는 워터스 2695 세퍼레이션스 모듈(Separations Module)과 접하는 워터스 켄보(Waters Xevo) G2 Tof 질량 분석기로 이루어지고; 컬럼, 이동상, 구배, 및 유속은 LC-MS 시스템 1과 동일하였다. UPLC-MS는 액유티(Acquity) UPLC BEH C18 2.1 x 50mm, 1.7µm 역상 컬럼이 장착된 액유티 울트라 퍼포먼스(Acquity Ultra Performance) LC와 접하고 있는 워터스 SQ 질량 검출기 상에서 수행하였다. 산성 이동상(0.1% 포름산)은 3% 아세트로나이트릴/97% 물 내지 100% 아세트로나이트릴(유속=0.5 mL/분)의 구배로 이루어졌다. 분취용 HPLC는 바리안 프로스타 330 PDA 검출기로 구성된 바리안 프로스타 210 용매 전달 시스템 상에서 수행되

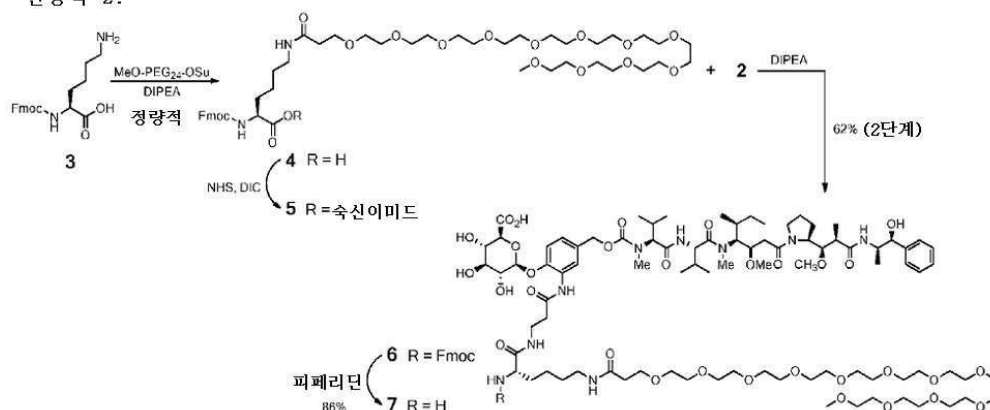
었다. 생성물은 물(용매 A) 중의 0.1% 포름산 및 아세트나이트릴(용매 B) 중의 0.1% 포름산으로 용리되는 C12 페노메덱스 시너지 10.0 x 250 mm, 4 μ m, 80 Å 역상 컬럼 상에서 정제되었다. 정제 방법은 0 내지 5분 동안 용매 A 대 용매 B: 90:10; 5분 내지 80분 동안 90:10에서 10:90로; 그 후, 5분 동안 등용매 10:90의 하기 구배로 이루어졌다. 유속은 254 nm에서 모니터링으로 4.6 mL/분이었다. 반응식 3 및 4에서 화합물에 대한 분취용 HPLC는 0.1% 포름산 대신에 두 이동상 중의 0.1% 트리플루오로아세트산으로 수행되었다.

반응식 1.



(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-아미노프로판아미도)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-부틸)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,8-디소프로필-4,10-디메틸-3,6,9-트리옥소-2,13-디옥사-4,7,10-트리아자테트라데실)페녹시)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-카복실산(2): 공지된(제US 2008/0241128 A1호의 화합물 8a) 글루쿠로나이드-MMAE 중간체 2(40mg, 26.8 μ mol)를 함유하는 플라스크에 메탄올 0.9 mL 및 테트라하이드로푸란 0.9 mL을 가하였다. 그 다음, 용액을 얼음 욕조에서 냉각시키고, 수산화리튬 일수화물(6.8mg, 161 μ mol)을 물 0.9mL 중의 용액으로서 적가하였다. 그 다음, 반응을 얼음 위에서 1.5시간 동안 교반하고, 이때 LC/MS는 생성물로의 완전한 전환을 나타내었다. 그 다음, 빙초산(9.2 μ L, 161 μ mol)을 가하고, 반응을 건조물로 농축시켰다. 분취용 HPLC로 완전하게 탈보호화된 글루쿠로나이드-MMAE 링커 중간체 3(26mg, 87%)을 유성 잔여물로서 수득하였다. 분석용 HPLC(0.1% 포름산): t_R 9.3분. LC-MS 시스템 1: t_R 11.10분, m/z (ES⁺) 실측치 1130.48(M+H)⁺, m/z (ES⁻) 실측치 1128.63(M-H)⁻.

반응식 2.



(S)-44-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카보닐)아미노)-38-옥소-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-도데카옥사-39-아제펜타테트라콘탄-45-오익산(4): N_α-Fmoc-리신 3(59mg, 161 μ mol)을 함유하는 플라스크에 2.9 mL 무수 다이클로로메탄 후, 메톡시-PEG12-OSu(100mg, 146 μ mol)를 가하였다. 그 다음, DIPEA(127 μ L, 730 μ mol)를 가하고, 반응을 질소하에 실온에서 교반한 후, TLC 및 LC/MS를 수행하였다. 2시간 후, LC/MS는 생성물로의 전환을 나타내었다. 반응 용액을 다이클로로메탄 중에 희석시키고, 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 정지상은 다이클로로메탄으로 용리시켰다. 목적하는 생성물 4(153mg, 112%)을 제공하는 메탄올(0% 내지 20%)의 증가하는 양을 갖는 다이클로로메탄에 의해 용리되었다. UPLC-MS: t_R 1.77분, m/z (ES⁺) 실측치 939.58(M+H)⁺.

(S)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일 44-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카보닐)아미노)-38-옥소-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-도데카옥사-39-아제펜타테트라콘탄-45-오익트(5): 플라스크를 N_α-Fmoc-리신(PEG12)-OH 4(153mg, 163 μ mol) 및 무수 테트라하이드로푸란 1.6 mL로 충전하였다. N-하이드록시석신이미드(28mg, 245 μ mol) 후, 디소프로필카보디이미드(38 μ L, 245 μ mol)를 가하였다. 반응물을 질소하에 밀봉하고 밤새 교반하였다. 미정제 반응물을 다이클로로메탄 중에 희석하고, 실리카 겔 상의 순수한 것은 목적하는 활성화된 에스터 5(155mg)를 제공하는 메탄올(0%에서 10%)의 증가 양을 갖는 다이클로로메탄에 의해 용리되었다. 물

질은 추가의 특징없이 계속 수행하였다. UPLC-MS: t_R 1.92분, $m/z(ES^+)$ 실측치 1036.48(M+H)⁺.

[0208]

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카보닐)아미노)-38,45-디옥소-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-도데카옥사-39,46-디아자노나테트라콘탄아미도)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-부틸)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,8-디이소프로필-4,10-디메틸-3,6,9-트리옥소-2,13-디옥사-4,7,10-트리아자테트라데실)페녹시)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-카복실산(6): 탈보호화된 글루쿠로나이드-MMAE 링커 중간체 2(92mg, 81 μ mol)를 무수 디메틸포름아미드(1.6mL) 중에 용해시키고, Na-Fmoc-리신(PEG12)-OSu 5(101mg, 97 μ mol)을 함유하는 플라스크에 가하였다. 그 다음, 디이소프로필에틸아민(70 μ L, 405 μ mol)을 가한 다음, 반응을 질소하에 실온에서 교반하였다. 4.5시간 후, LC-MS는 생성물로의 전환을 나타내었다. 생성물을 분취용 HPLC로 정제하여 Fmoc-Lys(PEG12)-글루쿠로나이드-MMAE 중간체 6(111mg, 2 단계에 걸쳐 62%)을 유성 잔여물로서 제공하였다. UPLC-MS: t_R 2.01분, $m/z(ES^+)$ 실측치 2050.92(M+H)⁺.

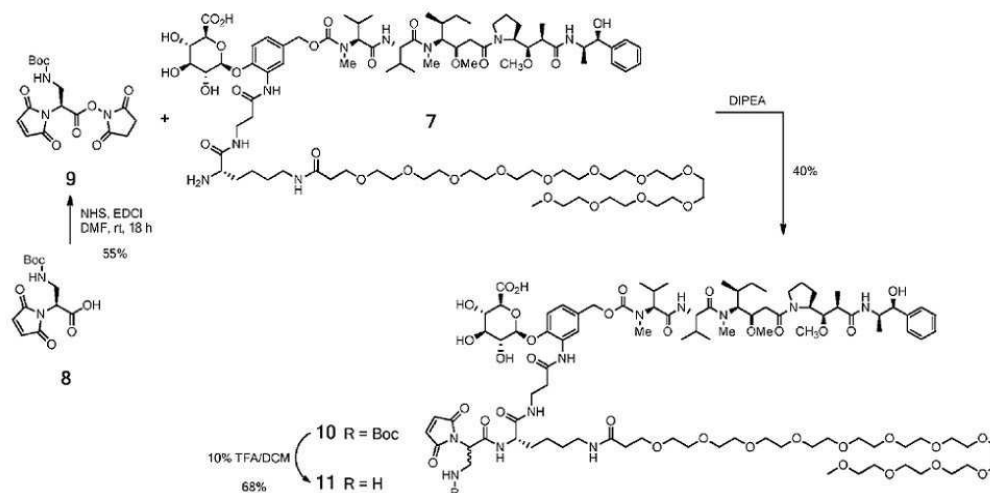
[0209]

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-아미노-38,45-디옥소-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-도데카옥사-39,46-디아자노나테트라콘탄아미도)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-부틸)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,8-디이소프로필-4,10-디메틸-3,6,9-트리옥소-2,13-디옥사-4,7,10-트리아자테트라데실)페녹시)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-카복실산(7): Fmoc-Lys(PEG12)-글루쿠로나이드-MMAE 중간체 6(111mg, 54 μ mol)을 무수 디메틸포름아미드 2.2mL 중에 용해시킨 후, 피페리딘 0.5mL를 첨가하였다. 반응을 질소하에 3시간 동안 교반한 다음, 건조물로 농축시켰다. 생성물을 분취용 HPLC로 정제하여 H-Lys(PEG12)-글루쿠로나이드-MMAE 중간체 7(85 mg, 86%)를 유성 잔여물로서 수득하였다. UPLC-MS: t_R 1.50분, $m/z(ES^+)$ 실측치 1829.31(M+H)⁺.

[0210]

(S)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일 3-((tert-부톡시카보닐)아미노)-2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로파노에이트(9): (S)-N_a-말레이미도-N_β-Boc-디아미노프로판산 8(*Nature Biotechnology*, 2014, 32, 1059-1062)(400mg, 1.4 mmol)을 무수 디메틸포름아미드 7mL 중에 용해시켰다. N-하이드록시석신이미드(178mg, 1.5 mmol)를 가한 후, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드(298mg, 1.5 mmol)을 가하였다. 반응을 실온에서 질소하에 3시간 동안 교반하였다. 물 120mL 중에 회석을 통해 수성 후처리를 달성한 다음, 에틸 아세테이트 60 mL로 3회 추출하였다. 그 다음, 조합된 유기 층을 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 건조물로 농축시켰다. 생성물을 헥산:에틸 아세테이트(50:50 대 0:100)의 혼합물로 용리시키는 플래쉬 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, (S)-N_a-말레이미도-N_β-Boc-디아미노프로판산 NHS 에스터[MDpr(Boc)-OSu] 9(297mg, 55%)를 제공하였다. LC-MS 시스템 1: t_R 12.23분, $m/z(ES^+)$ 실측치 282.0599(M+H-Boc기)⁺. LC-MS 시스템 2: t_R 11.30분, $m/z(ES^+)$ 실측치 2580.2515(M+H)⁺.

반응식 3.



[0211]

[0212]

(2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((S)-3-((tert-부톡시카보닐)아미노)-2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로판아미도)-38,45-디옥소-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-도데카옥사-39,46-디아자노나테트라콘

탄아미도)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-부틸)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,8-디이소프로필-4,10-디메틸-3,6,9-트리옥소-2,13-디옥사-4,7,10-트리아자테트라데실)페녹시)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-카복실산(10): MDpr(Boc)-OSu 9(20mg, 53 μ mol)를 무수 디메틸포름아미드 2.2mL 중에 용해시키고, H-Lys(PEG12)-글루쿠로나이드-MMAE 링커 중간체 7(86mg, 44 μ mol)를 함유하는 플라스크에 가하였다. 그 다음, 디이소프로필에틸아민(15 μ L, 88 μ mol)를 가한 다음, 반응을 질소하에 실온에서 2.5시간 동안 교반하였다. 반응을 빙초산 15 μ L로 퀀칭시키고, 분취용 HPLC로 정제하여 MDpr(Boc)-Lys(PEG12)-글루쿠로나이드-MMAE 중간체 10(37 mg, 40%)를 디아스테레오머의 혼합물로서 수득하였다. 디아스테레오머는 키랄 크로마토그래피로 분리 가능하였다. UPLC-MS: t_R 1.84분, m/z (ES⁺) 실측치 2095.44(M+H)⁺.

[0213] (2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((R)-3-아미노-2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로판아미도)-38,45-디옥소-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-도데카옥사-39,46-디아자노나테트라콘탄아미도)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-부틸)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,8-디이소프로필-4,10-디메틸-3,6,9-트리옥소-2,13-디옥사-4,7,10-트리아자테트라데실)페녹시)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-카복실산(11): MDpr(Boc)-Lys(PEG12)-글루쿠로나이드-MMAE 중간체 10(34mg, 16 μ mol)을 함유하는 플라스크를 0℃로 얼음 욕조에서 질소하에 냉각시켰다. 다이클로로메탄(0.8mL) 중의 10% 트리플루오로아세트산 용액을 적가하였다. 그 다음, 반응을 0℃에서 2시간 동안 교반하고, 이때 LC-MS는 Boc 탈보호화가 완료되었음을 나타내었다. 그 다음, 반응을 미정제 잔여물로 농축시키고, 분취용 HPLC로 정제하여 MDpr-Lys(PEG12)-글루쿠로나이드-MMAE 링커 11(22 mg, 68%)을 제공하였다. UPLC-MS: t_R 1.50분, m/z (ES⁺) 실측치 1995.18(M+H)⁺.

[0214] 화합물 11을 당해 분야에 공지된 방법(예를 들면, 미국 특허 제7,659,241호 참조)을 사용하여 항체당 8 약물의 평균 약물 로딩에서 사슬 간 티올을 통해 항-CD48 항체에 접합시켰다.

[0215] 실시예 4: 다발성 골수종 암 세포주에 대한 hMEM-102 ADC의 세포독성.

[0216] **방법:** 인간 다발성 골수종 세포주 EJM(DSMZ; IMDM +20% FBS), L363(DSMZ; RPMI 1640 +15% FBS), MM.1R(ATCC; RPMI 1640 + 10% FBS), NCI-H929(ATCC: RPMI 1640 + 10% FBS), U-266(ATCC; RPMI 1640 +15% FBS), 및 LP-1(DSMZ; IMDM +20% FBS)을 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 항-CD48 아우리스타틴 항체 약물 접합체를 배지 중에 3배 연속 희석하여 10점 용량 곡선(1,000 ng/mL 내지 0.05081 ng/mL)을 생성하고, 96-웰 검정 플레이트 중에 배양된 다발성 골수종 세포에 적용하였다(배지 200 μ L 중의 웰당 10,000 내지 15,000 세포). 세포를 ADC와 총 96시간 동안 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포 생존능을 셀 티터 클로(Cell Titer Glo) 발광성 세포독성 검정(프로메가(Promega))를 사용하여 분석하고, 엔비전(EnVision) 플레이트 리더(퍼킨엘머(PerkinElmer))를 사용하여 데이터를 수집하였다. 모든 세포독성 검정을 4중 데이터 점으로 수행하고, 2 내지 3개의 독립 실험으로부터의 평균 IC₅₀ 값을 기록한다.

[0217] 아포토시스 세포 사멸은 상기 기재된 바와 동일한 검정 조건을 사용하여 카스파제-Glo 3/7 검정(프로메가)을 사용하여 측정하였다.

[0218] **결과:** 결과를 표 2에 나타낸다. hMEM102 항체를 hMEM102-5088(8)로서 언급된 8개의 로드로서 vcMMAE(4-로드), mcMMAF(4-로드), 및 MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE에 접합시켰다. 유사한 접합을 대조군 항체, non-CD48 결합 항체에 수행하였다. vcMMAE(4) 및 mcMMAF(4)에 접합된 동일한 항체와 비교하여, hMEM102-5088(8)은 exhibited 개선된 세포독성 활성을 나타냈다. 음성 대조군으로서, CD48을 발현하지 않는 세포주인 LP-1을 또한 포함시켰다.

표 2

항체	약물 링커	약물 부하	다발성 골수종 세포주 (# CD48 수용체/세포)					
			EJM (135,000)	L363 (460,000)	MM.1R (336,000)	NCI-H929 (483,000)	U-266 (270,000)	LP-1 (0)
hMEM102	vcMMAE	4	8.7	36	12	13	6.0	>1000
hMEM102	mcMMAF	4	4.0	34	7.0	시험되지 않음	3.0	>1000
hMEM102	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	2.0	11	2.0	2.5	1.0	>1000
hMEM102	아우리스타틴 T	8	1.0	15	1.7	1.5	1.0	>1000

hIgG	vcMMAE	4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	mcMMAF	4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	아우리스타틴 T	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

[0220] 2개의 세포주, NCI-H929 및 U-266을 아홉토시스 세포 사멸에 대하여 평가하였다. 결과를 도 5 및 도 6에 나타낸다. 두 세포주에서, hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8) 접합체는 약물에 노출 70시간 후 아홉토시스 세포 사멸을 유도하였다. MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)에 접합된 대조군 항체로 처리된 세포에서는 아홉토시스 사멸이 보이지 않았다. 도면에서 약물 링커는 5088로 표시되고, 항체당 8개의 약물 링커가 접합된다. 도 5 및 도 6 둘 다에서, hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8) 접합체는 흑색 사각형으로 표시되며, 대조군 항체-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8) 접합체는 백색 사각형으로 표시된다.

[0221] 실시예 5: 생체내 다발성 골수종 이종이식 연구

[0222] 암컷 NSG(NOD scid 감마; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스에 동물당 2백5십만개의 NCI-H929 세포를 정맥내로 이식하여 다발성 골수종의 파종성 모델을 생성시켰다. 종양 세포 이식 5일 후, 처리군당 n=8 마우스에 단일 복강내 주사 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 또는 비결합 대조군 hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 또는 hMEM102-아우리스타틴 T(4830) 또는 비결합 대조군 hIgG-아우리스타틴 T(4830)를 제공하였다. 시험된 ADC 용량 수준은 0.33 mg/kg 및 1.0 mg/kg이었다. 뒷다리 마비, 두개골 팽창, 및/또는 빈사의 증상을 나타내는 진행된 종양 부담을 갖는 마우스를 희생시켰다. 도 7에 도시된 바와 같이, ADC는 모두 8/8 마우스에서 모든 용량 수준(단일 용량)에서 지속적인 완전한 반응을 생성하였고, 비결합 대조군 ADC 투여된 마우스는 연구 60-일까지 질환으로 인하여 희생되었다.

[0223] 암컷 NSG(NOD scid 감마; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스에 동물당 1백만개의 NCI-H929 다발성 골수종 세포를 피하로 이식하였다. 평균 종양 용적이 100 mm³에 도달시, 처리군당 n=7 마우스에 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 또는 비결합 대조군 hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 또는 hMEM102-아우리스타틴 T(4830) 또는 비결합 대조군 hIgG-아우리스타틴 T(4830), 또는 hMEM102-vcMMAE(1006) ADC 또는 비결합 대조군 hIgG-vcMMAE(1006)의 단일 복강내 주사를 제공하였다. 시험된 ADC 용량 수준은 0.33 mg/kg 및 1.0 mg/kg이었다. 피하 NCI-H929 종양 용적이 1,000 mm³에 도달하면 개별적인 마우스를 희생시켰다. 도 8에 도시된 바와 같이, hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC는 1.0 mg/kg 용량 수준에서 모든 마우스에서 지속적인 완전한 반응을 생성하였다. 0.33 mg/kg의 더 낮은 용량 수준에서, hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)는 종양 지연을 생성하였다. vcMMAE 및 아우리스타틴 T ADC는 오직 가장 높은 용량에서만 종양 지연을 유도하였다.

[0224] 암컷 NSG(NOD scid 감마; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스에 동물당 1백만개의 MM.1R 세포를 정맥내로 이식하여 다발성 골수종의 파종성 모델을 발생시켰다. 종양 세포 이식 5일 후, 처리군당 n=7 마우스에 단일 복강내 주사 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMMAE(5088) ADC 또는 비결합 대조군 hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 또는 hMEM102-아우리스타틴 T(4830) 또는 비결합 대조군 hIgG-아우리스타틴 T(4830)을 제공하였다. 시험된 ADC 용량 수준은 1.0 mg/kg 및 3.0 mg/kg이었다. 뒷다리 마비, 두개골 팽창, 및/또는 빈사의 증상을 나타내는 진행된 종양 부담을 갖는 마우스를 희생시켰다. 도 9에 도시된 바와 같이, ADC는 모두 마우스에서 모든 용량 수준(단일 용량)에서 지속적인 완전한 반응을 생성하였고, 비결합 대조군 ADC 투여된 마우스는 연구 60-일까지 질환으로 인하여 희생되었다.

[0225] 암컷 NSG(NOD scid 감마; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스에 동물당 5백만개의 MM.1R 다발성 골수종 세포를 피하로 이식하였다. 평균 종양 용적이 100 mm³에 도달시, 처리군당 n=7 마우스에 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 또는 비결합 대조군 hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 또는 hMEM102-아우리스타틴 T(4830) 또는 비결합 대조군 hIgG-아우리스타틴 T(4830), 또는 hMEM102-vcMMAE(1006) ADC 또는 비결합 대조군 hIgG-vcMMAE(1006)의 단일 복강내 주사를 제공하였다. 시험된 ADC 용량 수준은 0.33 mg/kg 및 1.0 mg/kg이었다. 피하 MM.1R 종양 용적이 1,000mm³에 도달시 개별적인 마우스를 희생시켰다. 도 10에 도시된 바와 같이, hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC는 가장 강력한 항암 반응 및 가장 긴 종양 지연을 생성하였다.

[0226] 암컷 NSG(NOD scid 감마; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스에 마우스당 5백만개의 EJ2 세포를 정맥내로

이식하여 다발성 골수종의 파종성 모델을 유발하였다. 종양 세포 이식 5일 후, 처리군당 n=8 마우스에 단일 복강내 주사 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 또는 비결합 대조군 hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 또는 hMEM102-아우리스타틴 T(4830) 또는 비결합 대조군 hIgG-아우리스타틴 T(4830)를 제공하였다. 시험된 ADC 용량 수준은 0.33 mg/kg 및 1.0 mg/kg이었다. 뒷다리 마비, 두개골 팽창, 및/또는 빈사의 증상을 나타내는 진행된 종양 부담을 갖는 마우스를 희생시켰다. 도 11에 도시된 바와 같이, hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC는 가장 강력한 항암 반응, 0.33 mg/kg에서 6/8 완전한 반응 및 1.0 mg/kg에서 7/8 완전한 반응을 생성하였다. 비결합 대조군 ADC 투여된 마우스는 연구 60-일까지 질환으로 인하여 희생되었다.

[0227] 실시예 6: 이펙터 기능

[0228] WIL2-S 표적 세포 방법에 있어서, 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC)을 항체 코팅된 CD48-양성 표적 세포와 조합된 정제된 자연 살해(NK) 세포를 사용하여 크롬-51 방출을 통해 측정하였다. WIL2-S 종양 세포를 크롬-51로 라벨링하고, 30분 동안 항체(0.1 ng/mL 내지 10 µg/mL)와 전배양시켰다. 그 다음, 표적 세포를 NK 이펙터 세포와 조합하고(이펙터/표적 비 10:1), 37°C, 5% CO₂에서 추가 4시간 동안 배양하였다. 그 다음, 상청액 중의 크롬-51을 퍼킨엘머 탑카운트(TopCount) 플레이트 리더에서 정량하였다. ADCC 활성은 1% 트리톤(Triton) X-100 처리된 대조군 표적 세포에 대한 최대 용해의 백분율로서 측정하였다. 동일한 NK 세포 이펙터 비 및 항-CD48 항체 또는 상기 기재된 ADC 적정 범위를 사용하여 ADCC를 정상 인간 휴지 T 세포(모든 세포)에 대하여 검정하고; 그러나, PKH2 녹색 형광 세포 링커 키트(시그마(Sigma))를 세포막을 라벨링하는데 사용하였다(크롬-51이 아님). LSRII 유세포분석기(백톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하는 유세포분석기로 7-AAD 염료를 사용하여 T 세포 생존능을 측정하였다.

[0229] 정상 인간 T 세포 또는 WIL2-S 종양 세포를 연속 희석된 항체(0.02 내지 50 µg/mL)와 함께 10% 열-활성화된 인간 AB 혈청 및 5µM 사이토스 그린(Sytox Green) 형광 염료를 함유하는 RPMI 1640 배양 배지 중에 배양함으로써 보체 의존적 세포독성을 측정하였다. 그 다음, 세포를 2시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 용해된 세포로부터의 형광성을 엔비전 플레이트 리더에서 측정하였다. 표적 세포의 최대 특이적 용해를 1% 트리톤 X-100 처리된 대조군 세포의 백분율로서 계산하였다.

[0230] 이펙터 세포로서 단세포 유래된 대식세포 및 PKH26 적색 형광 염료 라벨링된 정상 인간 T 세포(모든 세포), WIL2-S, 또는 Raji 종양 세포를 사용하여 항체 의존적 세포성 식균작용을 측정하였다. 표적 세포를 연속 희석된 항체(0.2 ng/mL 내지 2 µg/mL)와 30분 동안 전배양한 다음, 인산염 완충 식염수로 2회 세척하였다. 대식세포를 표적 세포에 4:1 비로 10% 저 IgG 소태아 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배양 배지 중에서 가하고, 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 배양하였다. 그 다음, 대식세포를 알렉스 플루오르(Alexa Fluor)®-488 접합된 마우스 항-인간 CD11b 항체로 라벨링시켰다. FACSCalibur 유세포분석기에서 녹색 및 적색 이중 형광성 발생으로서 종양 세포 양성 대식세포를 검출시켰다. 최대 특이적 식세포 활성은 비-결합 아이소타입 대조군 배경 활성의 차감 후 종양 양성 대식세포의 백분율로서 나타낸다.

[0231] **결과:** 접합되지 않은 hMEM102 항체 및 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC의 ADCC 활성을 평가하고, 캠페스(CAMPATH)®(알렘투주맙, 항-CD52 항체) 및 리툽시맙(항-CD20 항체)의 ADCC 활성과 비교하였다. 표 3에 나타난 바와 같이, 인간화 MEM102-HALA 항체는 정상 휴지 T 세포 및 WIL2-S 종양 세포주에 대하여 ADCC 활성을 조절하였다. ADCC 활성은 5088 접합에서 유의미하게 감소하였고, 네이키드 항체와 비교하여 T 세포에서 2.7배 미만의 ADCC 활성을 야기하였다.

표 3

[0232]

ADCC							
				최대 % 특이적 세포 용해			
세포 유형	CD48 수용체 #	CD52 수용체 #	CD20 수용체 #	hMEM102--HALA	hMEM102-HALA-5088	캠페스(CD52)	리툽시맙(CD20)
정상 인간 T 세포(n=2)	38,900	115,200		65±3.1	24±4.4	60±3.5	
WIL2-S(n=2)	359,558	34,200	502,700	43±0.6	17±1.0		42±6.0

[0233] CDC 활성 결과를 표 4에 나타낸다. 접합되지 않은 hMEM102 항체 또는 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC는 정상 휴지 T 세포 및 WIL2-S 종양 세포에 대하여 CDC 활성을 나타내지 않았다. 알렘투주맙 및 리툽시맙은

둘 다 표적 세포에 대하여 실질적인 CDC 활성을 나타냈다.

표 4

CDC								
세포 유형	CD48 수용체 #	CD52 수용체 #	CD20 수용체 #	최대 % 특이적 hMEM102--HALA	세포 용해 hMEM102-HALA-5088	캄패스(CD52)	리툽시맵(CD20)	
정상 인간 T 세포(n=2)	38,900	115,200		2.4±0.6	1.9±2.7	108±5.2		
WIL2-5(n=2)	359,558	34,200	502,700	0.9±0.2	1.4±0.9			66±1.4

ADCP 결과를 표 5에 나타낸다. 접합되지 않은 hMEM102 항체 및 hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088) ADC 둘 다는 정상 휴지 T 세포 또는 WIL2-S 및 Raji 종양 세포주에 대하여 중간의 ADCP 활성을 나타냈고, 이는 캄패스 및 리툽시맵에서 관찰된 수준과 일치한다.

표 5

ADCP								
세포 유형	CD48 수용체 #	CD52 수용체 #	CD20 수용체 #	최대 % 특이적 hMEM102--HALA	세포 용해 hMEM102-HALA-5088	캄패스(CD52)	리툽시맵(CD20)	
정상 인간 T 세포(n=2)	38,900	115,200		56	54	57		
WIL2-5(n=2)	359,558	34,200	502,700	62	60			56
Raji	249,023(24%)	29,200	394,100	37	34			57

본 명세서에 기재된 실시예 및 실시형태는 오직 설명의 목적을 위한 것이고, 이의 관점에서 다양한 변형 또는 변화가 당해 분야의 숙련가에 의해 제시될 것이고, 본 출원 및 첨부된 청구범위의 취지 및 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다. 본 명세서에 기재된 모든 문헌, 특허, 및 특허 출원은 모든 목적을 위하여 이의 전문이 참조로서 인용된다.

비공식적 서열 목록

서열 번호 1, hMEM102 HA - 중쇄 가변 영역

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDFGMNWRQAPGQGLEWMGWINTFTGEPSYGNVFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAV
YYCARRHGNGNVFDSWGQGLVTYSS

서열 번호 2, hMEM102 LA - 경쇄 가변 영역

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSNIHWWYQQKPDQSPKLLIKYTSESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNS
WPLTFGGGKVEIKR

서열 번호 3, 중쇄 CDR1

DFGMN

서열 번호 4, 중쇄 CDR2

WINTFTGEPSYGNVFKG

서열 번호 5, 중쇄 CDR3

RHGNGNVFDS

서열 번호 6, 경쇄 CDR1

RASQSIGSNIH

서열 번호 7, 경쇄 CDR2

YTSESIS

서열 번호 8, 경쇄 CDR3

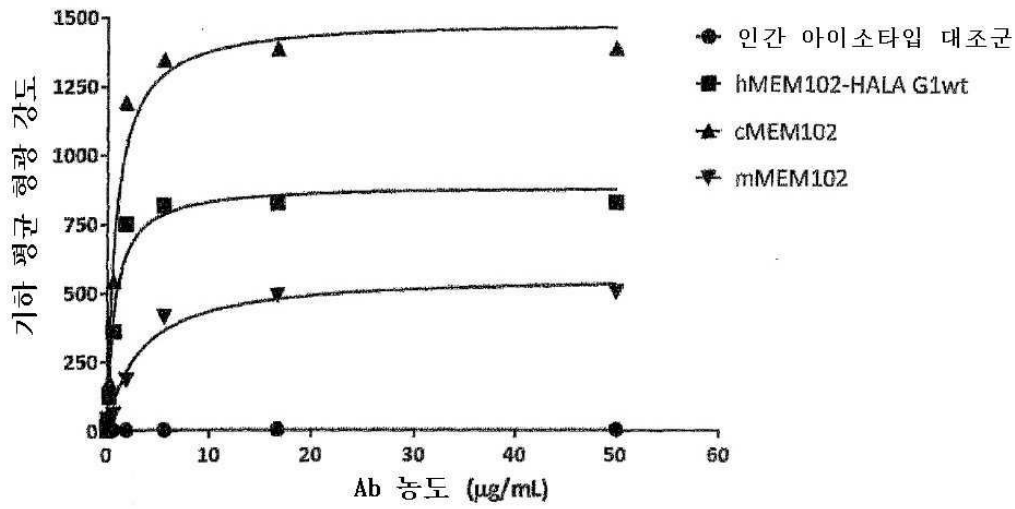
QQSNSWPLT

서열 번호 9, hMEM102 HA H-쇄 G1

[0238]

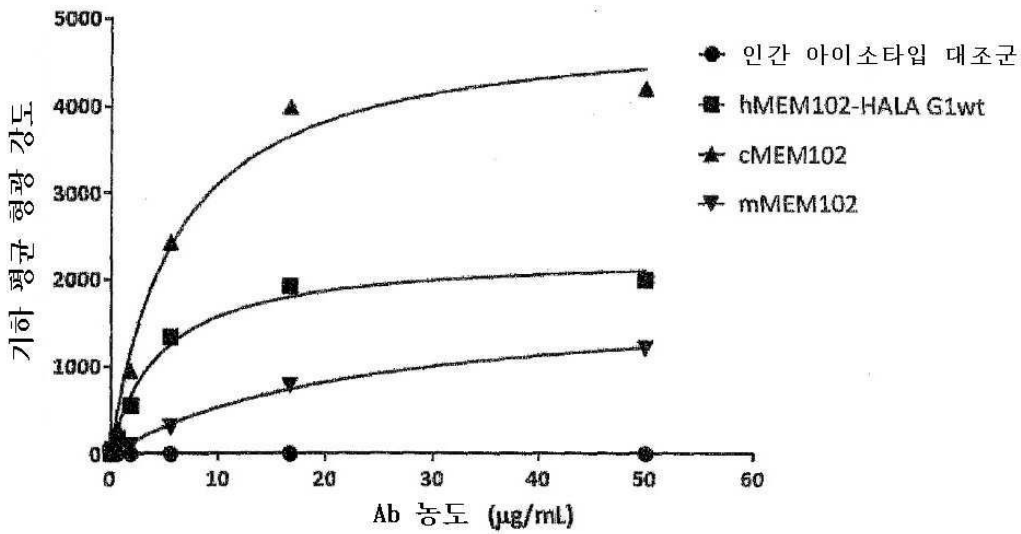
도면3

U-266에 대한 항-CD48 항체 포화 결합

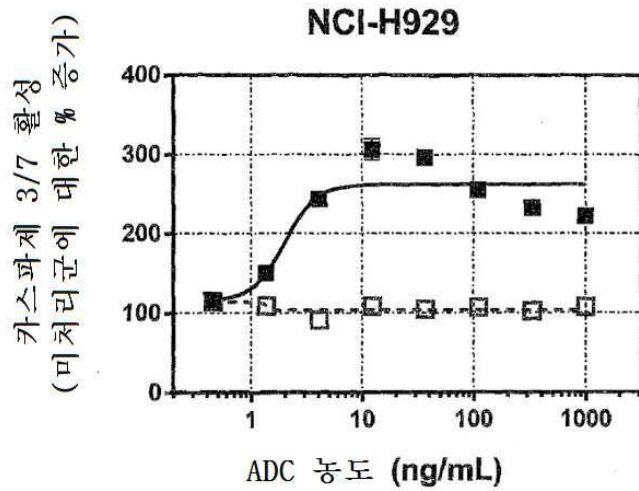


도면4

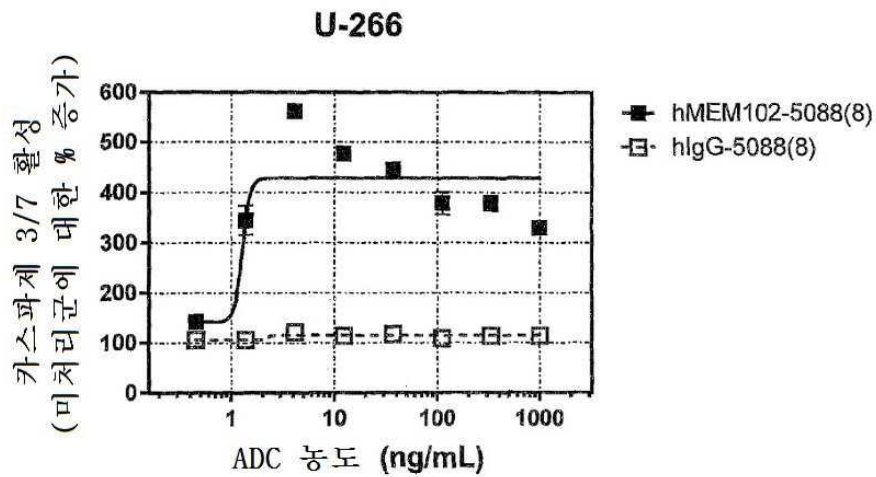
CHO-cynoCD48에 대한 항-CD48 항체 포화 결합



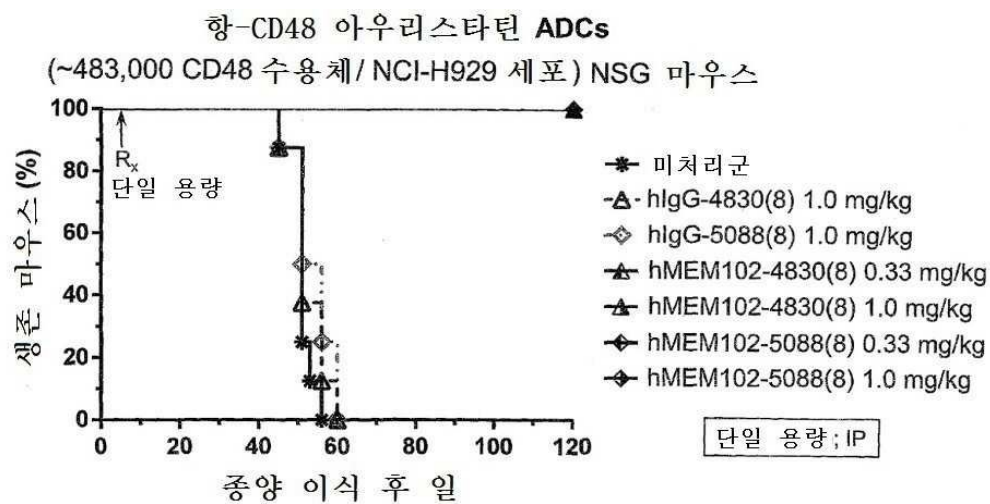
도면5



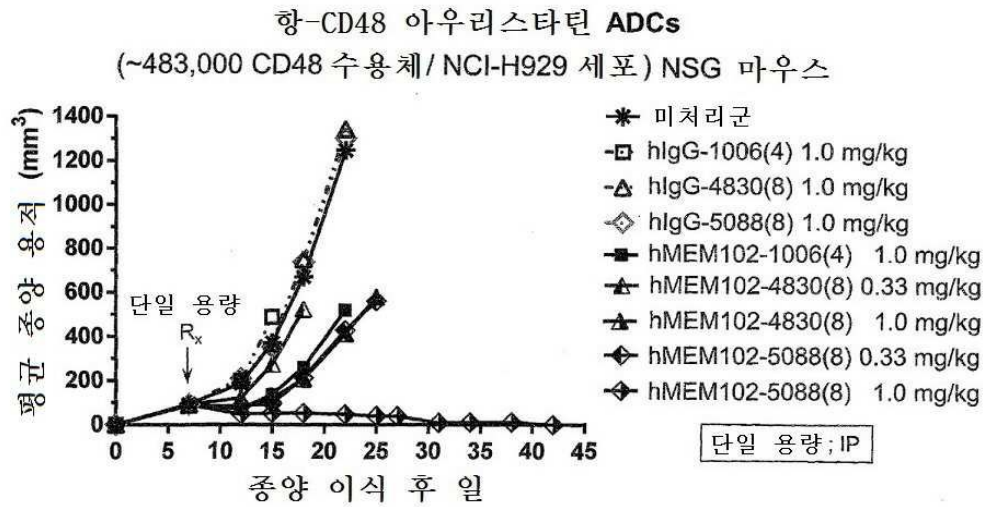
도면6



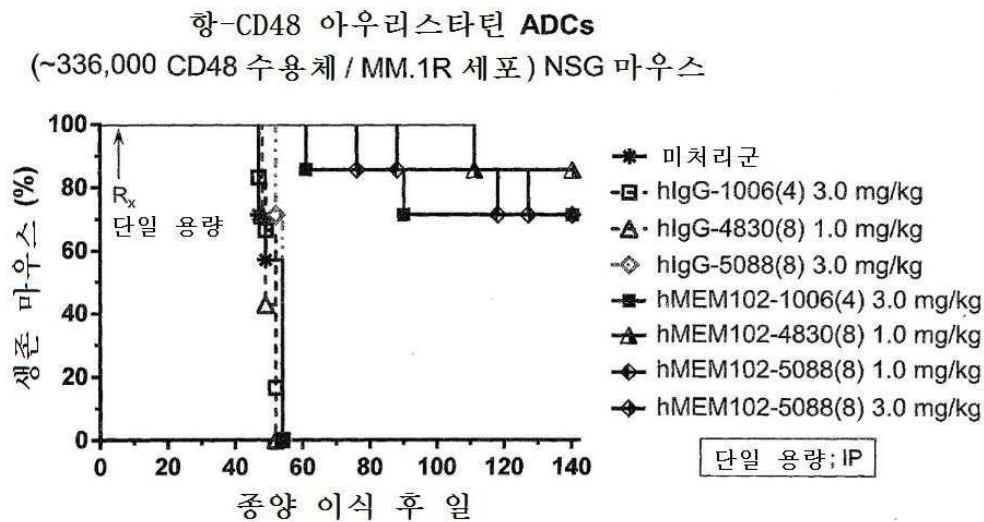
도면7



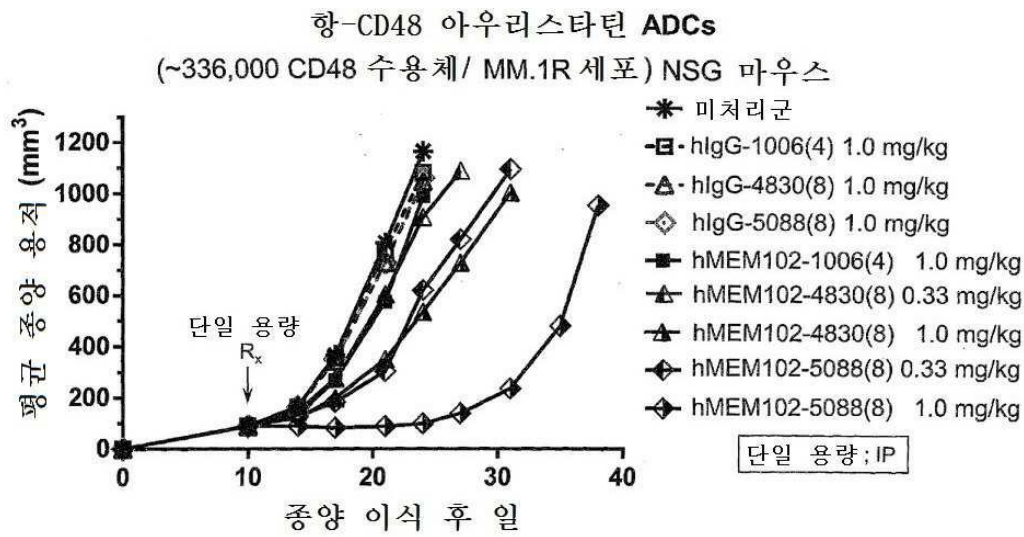
도면8



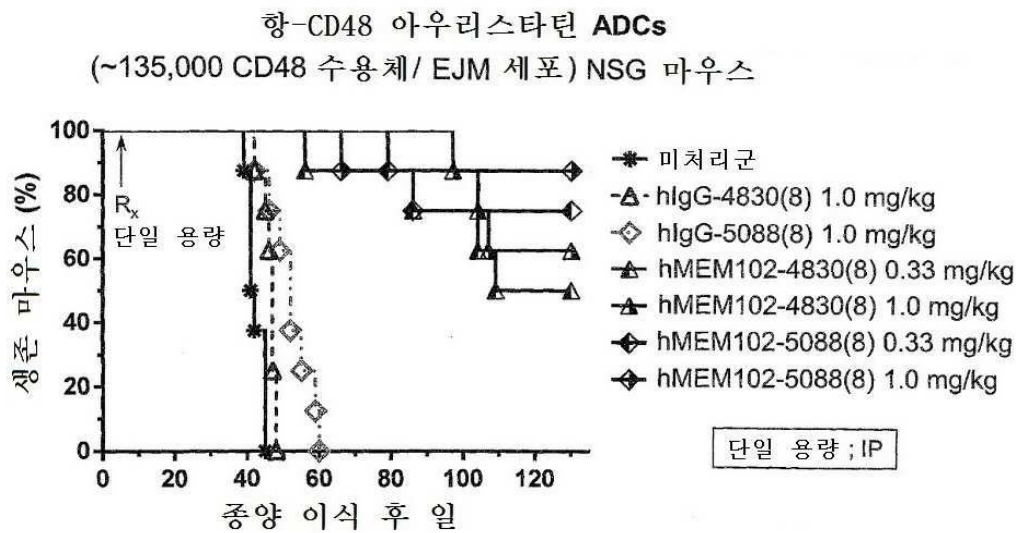
도면9



도면10



도면11



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> SEATTLE GENETICS, INC.
- <120> CD48 ANTIBODIES AND CONJUGATES THEREOF
- <130> 4000-00111PC
- <140> PCT/US2016/022943
- <141> 2016-03-17
- <150> US 62/134,981
- <151> 2015-03-18
- <160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> hMEM102 HA - Heavy chain variable region

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Gly Asn Val Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Gly Asn Gly Asn Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> hMEM102 LA - Light chain variable region

<400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

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

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

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

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR1

<400> 3

Asp Phe Gly Met Asn

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR2

<400> 4

Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Gly Asn Val Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR3

<400> 5

Arg His Gly Asn Gly Asn Val Phe Asp Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR1

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Ile His

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR2

<400> 7

Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR3

<400> 8

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 9

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> hMEM102 HA H-chain G1

<400> 9

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Gly Asn Val Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Gly Asn Gly Asn Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> hMEM102 LA L-chain

<400> 10

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 11

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Naturally occurring heavy chain constant region

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

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

 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain constant region

<400

> 12

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

 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

				85					90										95
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
				100															105