



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월31일  
(11) 등록번호 10-2538294  
(24) 등록일자 2023년05월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 31/5365 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2851 (2013.01)  
A61K 31/5365 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7028131
- (22) 출원일자(국제) 2018년03월09일  
심사청구일자 2021년02월24일
- (85) 번역문제출일자 2019년09월25일
- (65) 공개번호 10-2019-0129056
- (43) 공개일자 2019년11월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/055939
- (87) 국제공개번호 WO 2018/162727  
국제공개일자 2018년09월13일
- (30) 우선권주장  
1703876.1 2017년03월10일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020160065872 A\*  
WO2016167236 A1\*  
WO2016200676 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
베를린-케미 악티엔 게젤샤프트  
독일연방공화국, 베를린 12489 글리니커 베크 125
- (72) 발명자  
비나스키 모니카  
이탈리아 로마 비아 티토 스페리 10 포메치아 메  
나리니 리서치  
비지오니 마리오  
이탈리아 로마 비아 티토 스페리 10 포메치아 메  
나리니 리서치  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

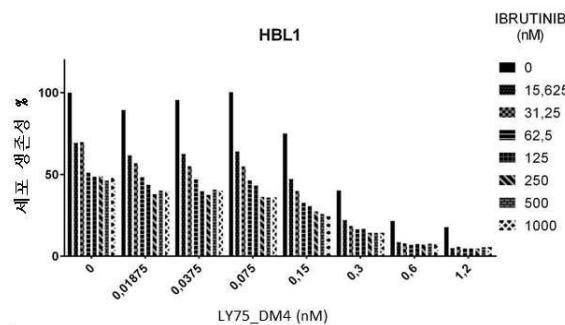
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 **항-LY75 항체를 포함하는 약학적 조합물**

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 면역학 및 분자 생물학에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 (A) LY75에 대한 항체 또는 이의 항원-결합 영역, 및 (B) 제2 항암 물질을 포함하는 약학적 조합물; 항체 조합물을 코딩하는 핵산; 항체 조합물의 제조 방법; 및 LY75 발현 또는 활성화에 의해 매개되는 암과 같은 질환의 치료 방법을 제공한다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

*A61K 47/6831* (2017.08)  
*A61K 47/6849* (2017.08)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*A61P 35/02* (2018.01)  
*C07K 16/2887* (2013.01)  
*C07K 2317/21* (2013.01)  
*C07K 2317/24* (2013.01)  
*C07K 2317/34* (2013.01)  
*C07K 2317/73* (2013.01)

(72) 발명자

**메를리노 주세페**

이탈리아 로마 비아 티토 스페리 10 포메치아 메나리니 리서치

**시모넬리 체칠리아**

이탈리아 피렌체 비아 세테 산티 3 메나리니 리서치

**베르토니 프란체스코**

스위스 6500 벨린초나 비아 벨라 6 인스티튜트 오브 온콜로지 리서치 폰다지온 페르 라 리체르카 에라 쿠라 수이 린포미

**펠라카니 안드레아**

이탈리아 피렌체 비아 세테 산티 3 메나리니 리서치

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

약학적 조합물 (pharmaceutical combination)로서,

하기 (A) 및 (B)를 포함하며:

(A) 하기 a) 중쇄 가변 영역과 b) 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역:

a) i), ii) 및 iii)을 포함하는 중쇄 가변 영역:

i) 서열번호 5를 포함하는 제1 vhCDR;

ii) 서열번호 6을 포함하는 제2 vhCDR; 및

iii) 서열번호 7을 포함하는 제3 vhCDR;

b) i), ii) 및 iii)을 포함하는 경쇄 가변 영역

i) 서열번호 8을 포함하는 제1 v1CDR;

ii) 서열번호 9를 포함하는 제2 v1CDR; 및

iii) 서열번호 10을 포함하는 제3 v1CDR;

상기 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역이 약물에 공유-결합되고, 상기 약물이 DM1 또는 DM4임;

및

(B) 리투시맵 (rituximab);

상기 약학적 조합물이, 미만성 거대 B 세포 림프종 (diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) 또는 비-호지킨 림프종의 치료를 위해, 동시, 개별 또는 순차적으로 사용하기 위한 조합된 조제물 형태인, 약학적 조합물.

**청구항 2**

약학적 조합물로서,

하기 (A) 및 (B)를 포함하며:

(A) 하기 a) 중쇄 가변 영역과 b) 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역:

a) i), ii) 및 iii)을 포함하는 중쇄 가변 영역:

i) 서열번호 5를 포함하는 제1 vhCDR;

ii) 서열번호 6을 포함하는 제2 vhCDR; 및

iii) 서열번호 7을 포함하는 제3 vhCDR;

b) i), ii) 및 iii)을 포함하는 경쇄 가변 영역:

i) 서열번호 8을 포함하는 제1 v1CDR;

ii) 서열번호 9를 포함하는 제2 v1CDR; 및

iii) 서열번호 10을 포함하는 제3 v1CDR;

상기 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역이 약물에 공유-결합되고, 상기 약물이 DM1 또는 DM4임;

(B) 이브루티닙 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염,

상기 약학적 조합물이, 미만성 거대 B 세포 림프종 (diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) 또는 비-호지킨 림프종의 치료를 위해, 동시, 개별 또는 순차적으로 사용하기 위한 조합된 조제물 형태인, 약학적 조합물.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역이 서열번호 1의 중쇄 가변 영역과, 서열번호 2의 경쇄 가변 영역을 포함하는, 약학적 조합물.

**청구항 4**

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항-LY75 항체가 인간 IgG1 단일클론 항체인, 약학적 조합물.

**청구항 5**

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 약물이 DM4인, 약학적 조합물.

**청구항 6**

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 (A) 및/또는 (B)가 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 희석제, 부형제 또는 담체를 더 포함하는, 약학적 조합물.

**청구항 7**

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역이 LY75를 발현하는 세포에 의해 내재화되는, 약학적 조합물.

**청구항 8**

제1항 또는 제2항에 따른 약학적 조합물의 제조 방법으로서,

구성성분 (A)를 구성성분 (B)와 조합하는 단계, 및

하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 희석제, 부형제 또는 담체를 첨가하는 단계를 포함하는, 제조 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 약물이 DM4인, 제조 방법.

**청구항 10**

제1항 또는 제2항에 있어서,

치료법 (therapy)에 사용하기 위한 또는 의약제로서 사용하기 위한, 약학적 조합물.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 일반적으로 면역학 및 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 LY75에 대하여 유도된 (A) 항체 또는 이의 항원-결합 영역, 및 (B) 제2 항암제 (anti-cancer entity)을 포함하는 약학적 조합물; 항체 조합물을 코딩하는 핵산; 항체 조합물의 제조 방법; 및 LY75 발현 또는 활성화에 의해 매개는 암과 같은 질환의 치료 방법을 제공한다.

**배경 기술**

[0002] 백혈병 및 림프종은 혈액, 골수 및 림프계에 발병하는 광범위한 종양 그룹에 속하며; 조혈 및 림프 조직의 종양으로도 알려져 있다.

[0003] 림프종은 림프구에서 발생하는 일군의 혈액 세포 종양이다. 징후와 증상으로는 림프절 비대, 열, 다량의 발한, 의도치 않은 체중 감소, 가려움 및 지속적인 피로감 등이 있을 수 있다. 림프종에는 여러가지 서브타입들이 존재한다: 림프종의 주요 범주 2가지는 호지킨 림프종 (HL)과 비-호지킨 림프종 (NHL)이다. 세계 보건기구 (WHO)에서는 림프종의 유형으로서 또 다른 2가지 범주, 다발성 골수종과 면역중식성 질환을 포함한다. 림프종의 약 90%가 비-호지킨 림프종이다.

[0004] 백혈병은 통상적으로 골수에서 시작해, 많은 수의 비정상적인 백혈구를 만드는 일군의 암이다. 그 증상으로는 출혈 및 타박상 현상, 피로감, 열 및 감염 위험성 증가 등이 있을 수 있다. 이러한 증상들은 정상적인 혈액 세포의 부족으로 인해 발생한다. 진단은 전형적으로 혈액 검사나 골수 생검에 의해 수행된다. 백혈병의 주된 4가지 타입으로는 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프성 백혈병 (CLL) 및 만성 골수성 백혈병 (CML)이 있으며, 또한 몇가지 드문 타입도 존재한다.

[0005] 백혈병과 림프종의 치료는 화학요법, 방사선 치료, 표적 치료 및 수술 (및 백혈병의 경우에는 골수 이식) 중 하나 이상을 수반할 수 있다. 백혈병의 치료 성공은 백혈병의 타입과 환자의 나이에 의해 좌우된다. 림프종 치료 성과는 서브타입에 따라 달라지며, 일부는 치유가능하지만, 대부분이 생존을 연장시키는 치료이다.

[0006] 백혈병을 치료하기 위해 프레드니손 (prednisone), 빈크리스틴 (vincristine), 안트라사이클린 (anthracyclines), L-아스파라기나제 (L-asparaginase), 사이클로포스파미드 (cyclophosphamide), 메토트렉세이트 (methotrexate), 6-머캅토피린 (6-mercaptopurine), 플루다라빈 (fludarabine), 펜토스타틴 (pentostatin) 및 클라드리빈 (cladribine) 등의 다수의 화학요법제들이 기존에 사용되어 왔다. 림프종을 치료하기 위한 화학요법제로는 사이클로포스파미드, 하이드록시다우노루비신 (daunorubicin) (독소루비신 또는 아드리아마이신 (adriamycin)이라고도 함), 온코빈 (oncovin) (빈크리스틴), 프레드니손, 프레드니솔론 (prednisolone), 블레오마이신 (bleomycin), 다카르바진 (dacarbazine), 에토포시드 (etoposide) 및 프로카바

진 (procarbazine) 등이 있다.

[0007] 복합 화학요법 (combination chemotherapy)은 서로 다른 약물 2종 이상을 동시에 사용해 환자를 치료하는 방법이다. 약물은 기전 및 부작용 측면에서 상이할 수 있다. 이의 가장 큰 장점은 어떤 한가지 물질에 대한 내성 발생 가능성을 최소화한다는 것이다. 또한, 이들 약물들은 흔히 저용량으로 사용할 수 있어, 독성을 줄일 수 있다. 호지킨 질환을 치료하기 위한 병용 요법제 (combination therapies)로는 MOPP (무스틴 (mustine), 빈크리스틴, 프로카바진, 프레드니솔론)과 ABVD (독소루비신, 블레오마이신, 빈블라스틴, 다카르바진)이 있다. 비-호지킨 림프종을 치료하기 위한 병용 요법제로는 CHOP (사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니솔론)이 있다. 백혈병 및 림프종의 치료제로 알려진 약물의 수를 감안하면, 가능한 약물 요법의 교체 및 조합의 수는 명백하게 많다. 또한, 전술한 병용 요법제는 항체를 포함하지 않는다.

[0008] 그러나, 백혈병 및 림프종에 대한 새로운 치료제, 특히 효과적인 병용 요법제는 여전히 필요한 실정이다.

[0009] 림프구 항원 75는 포획된 항원을 세포의 공간에서 전문화된 항원 처리 구획으로 인가하는 식균작용 수용체 (endocytic receptor)로 작용하며, B-림프구의 증식 감소를 유발하는 것으로 보인다. 림프구 항원 75의 발현은 췌장암, 난소암, 유방암, 직장결장암, 식도암, 피부암, 갑상선암 및 폐암 (비소세포암)뿐 아니라 다발성 골수종 및 다수의 여러가지 하위 유형의 림프종 및 백혈병에서 관찰된다. WO2009/061996에는 인간 DEC-205(LY75)에 결합하는 단리된 단일클론 항체 및 관련 항체 기반 조성물 및 분자가 개시되어 있다. 또한, 항체를 포함하는 약학 조성물뿐 아니라 항체를 사용하는 치료 및 진단 방법도 개시되어 있다. WO2008/104806에는 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 LY75에 결합할 수 있는 친화성 시약이 개시되어 있다. WO2015/052537에는 LY75에 결합할 수 있는 단리된 특이 항체 및 이의 다양한 암 치료에 있어서의 용도가 개시되어 있다.

[0010] 리투시맵 (rituximab)은 B 세포 상에 널리 발현되는 단백질 CD20에 대한 단일클론 항체이다 (Oncogene (2003 Oct 20), Smith MR, "Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance", 22(47): 7359-68). 리투시맵은 표면에 CD20을 가지고 있는 정상 및 악성 B 세포를 모두 파괴하며, 따라서 매우 많은 수의 B 세포, 과활성 B 세포 또는 기능부전성 B 세포를 가진 것을 특징으로 하는 질환을 치료하는데 사용된다. 기존에 리투시맵은 다수의 자가면역 질환과 일부 유형의 암, 예를 들어, 류마티스 관절염, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 심상성 천포창, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 비-호지킨 림프종, 만성 염증성 탈수초 다발성신경병증, 만성 림프성 백혈병 및 자가면역 빈혈을 치료하는데 사용되어 왔다.

[0011] 이브루티닙 (Ibrutinib) (Imbruvica)은 B 세포에서 중요한 브루톤의 티로신 키나제 (BTK)에 영구적으로 결합하는 소분자 약물이다. 이브루티닙은 기존에 외투 세포 림프종, 만성 림프성 백혈병 및 발덴스트롬의 마크로글로불린혈증과 같은 B 세포 암을 치료하는데 사용되어 왔다.

[0012] 이제, (i) 특정 항-LY75 항체와 리투시맵, 및 (ii) 특정 항-LY75 항체와 이브루티닙의 조합이 림프종을 치료하는데 상승적인 성과를 나타낸다는 것을 발견하게 되었다.

**발명의 내용**

[0013] 일 측면에서, 본 발명은, (A) 및 (B)를 포함하는 약학적 조합물로서:

[0014] (A) LY75에의 결합에 대해, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는, 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역; 또는

[0015] 하기 a) 및 b)를 포함하는, 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역:

[0016] a)

[0017] i) 서열번호 5를 포함하는 제1 vhCDR;

[0018] ii) 서열번호 6을 포함하는 제2 vhCDR; 및

[0019] iii) 서열번호 7을 포함하는 제3 vhCDR;

[0020] 를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0021] b)

[0022] i) 서열번호 8을 포함하는 제1 vICDR;

- [0023] ii) 서열번호 9를 포함하는 제2 v1CDR; 및
- [0024] iii) 서열번호 10을 포함하는 제3 v1CDR;
- [0025] 을 포함하는 경쇄 가변 영역,
- [0026] 선택적으로, 상기 서열번호들 중 임의의 하나 이상은 독립적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 부가 또는 결손을 포함함;
- [0027] (B) 하기 a) 및 b)를 포함하는 항-CD20 항체 또는 이의 항원-결합 영역:
- [0028] a)
- [0029] i) 서열번호 40을 포함하는 제1 vhCDR;
- [0030] ii) 서열번호 41을 포함하는 제2 vhCDR; 및
- [0031] iii) 서열번호 42를 포함하는 제3 vhCDR;
- [0032] 을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- [0033] b)
- [0034] i) 서열번호 43을 포함하는 제1 vlhCDR;
- [0035] ii) 서열번호 44를 포함하는 제2 vlhCDR; 및
- [0036] iii) 서열번호 45를 포함하는 제3 vlhCDR;
- [0037] 을 포함하는 경쇄 가변 영역,
- [0038] 선택적으로, 상기 서열번호들 중 임의의 하나 이상은 독립적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 부가 또는 결손을 포함하며;
- [0039] 약학적 조합물이 동시 사용, 개별 사용 또는 연속 사용을 위해 조합된 조제물의 형태인, 약학적 조합물을 제공한다.
- [0040] 제2 측면에서, 본 발명은, (A) 및 (B)를 포함하는 약학적 조합물로서:
- [0041] (A) LY75에의 결합에 대해, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는, 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역;
- [0042] 또는
- [0043] 하기 a) 및 b)를 포함하는 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역:
- [0044] a)
- [0045] i) 서열번호 5를 포함하는 제1 vhCDR;
- [0046] ii) 서열번호 6을 포함하는 제2 vhCDR; 및
- [0047] iii) 서열번호 7을 포함하는 제3 vhCDR;
- [0048] 을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- [0049] b)
- [0050] i) 서열번호 8을 포함하는 제1 v1CDR;
- [0051] ii) 서열번호 9를 포함하는 제2 v1CDR; 및
- [0052] iii) 서열번호 10을 포함하는 제3 v1CDR;
- [0053] 을 포함하는 경쇄 가변 영역,
- [0054] 선택적으로, 상기 서열번호들 중 임의의 하나 이상은 독립적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 부가

또는 결손을 포함함,

- [0055] (B) 이브루티닙 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염,
- [0056] 상기 약학적 조합물이 동시 사용, 개별 사용 또는 연속 사용을 위해 조합된 조제물의 형태인, 약학적 조합물을 제공한다.
- [0057] 일 구현예에서, 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역은 서열번호 5, 6 및 7을 포함하는 CDR들로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR 1, 2 또는 3개를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호 8, 9 및 10을 포함하는 CDR들로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR 1, 2 또는 3개를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 항-LY75 항체는 LY75 (서열번호 15)에 결합하며, LY75를 발현하는 세포에 의해 내재화(internalization)될 수 있다.
- [0059] 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는 본원에 기술된 특정 항체 (예, 본원에서 "LY75\_A1"로 지칭됨)의 중쇄 및/또는 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 가변 영역 (VR)을 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 서열번호 1에 나타난 서열을 가지는 항체 LY75\_A1의 중쇄 가변 영역 (VH)의 CDR1, CDR2, 및 CDR3 도메인, 및/또는 서열번호 2에 나타난 서열을 가지는 LY75\_A1의 경쇄 가변 영역 (VL)의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0060] 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는 인간 LY75에 결합하고 서열번호 1을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 이의 보존적인 서열 변형을 포함한다. 항체는 서열번호 2를 포함하는 경쇄 가변 영역 및/또는 이의 보존적인 서열 변형을 더 포함할 수 있다.
- [0061] 추가의 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 인간 LY75에 결합하고, 각각 서열번호 1 및/또는 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 이들의 보존적 서열 변형을 포함한다.
- [0062] 임의의 상기한 서열들에 대해 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 또는 그 이상의 서열 동일성을 가지는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체도 또한 본 발명에 포함된다. 상기 언급된 값의 중간 범위, 예를 들어, 임의의 상기 서열에 대해 적어도 80~85%, 85~90%, 90~95% 또는 95~100%의 서열 동일성을 가지는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 역시 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0063] 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 서열번호 1 또는 서열번호 1과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는 서열번호 2 또는 서열번호 2와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는 서열번호 16, 17, 18 및 19에 나타난 바와 같이 서열번호 1의 중쇄 가변 영역의 프레임워크 (framework)와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 영역을 포함한다. 다른 구현예에서, 항체는 서열번호 20, 21, 22 및 23에 나타난 바와 같이, 서열번호 2의 경쇄 가변 영역의 프레임워크와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 프레임워크 영역을 포함한다.
- [0064] 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 각각 서열번호 1 및 2에 기재된 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 LY75에의 결합에 대해 경쟁한다. 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는 서열번호 1 및 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 (LY75\_A1)와 LY75에의 결합에 대해 경쟁한다.
- [0065] 본 발명의 다른 항체는 본원에 기술된 항체에 의해 인지되는 동일한 에피토프 또는 LY75 상의 에피토프에 결합한다. 다른 특정 구현예에서, 항체는, 각각, 서열번호 1 및 2에 기재된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체에 의해 인지되는 LY75 상의 에피토프에 결합한다. 다른 구현예에서, 항체는 서열번호 1 및 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 (LY75\_A1)에 의해 인지되는 LY75 상의 에피토프에 결합한다.

- [0066] 추가의 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 서열번호 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 또는 37 또는 이의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 펩타이드(들)에 특이적으로 결합하되, 상기 단편은 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10개의 연속적으로 인접해있는 (contiguous) 아미노산을 포함한다. 추가의 구현예에서, 항-LY75 항체에 의해 인지되는 에피토프는 서열번호 27, 29, 30, 34, 35, 36 또는 37, 또는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10개의 인접한 아미노산을 포함하는, 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 펩타이드, 2개 이상 또는 3개 이상의 펩타이드를 포함한다. 추가의 구현예에서, 항-LY75 항체에 의해 인지되는 에피토프는 서열번호 30, 36 및 37, 또는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10개의 인접한 아미노산을 포함하는, 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 펩타이드, 예를 들어, 2개 또는 3개의 펩타이드를 포함한다.
- [0067] 추가의 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 본원에 기술된 모 항체 (parent antibody)와 비교해 가변성 CDR을 포함한다. 따라서 본 발명은 모 항체의 변이체 가변 영역을 포함하는 변이체 항체를 제공하며, 모 항체는 서열번호 5를 포함하는 제1 vhCDR, 서열번호 6을 포함하는 제2 vhCDR, 서열번호 7을 포함하는 제3 vhCDR, 서열번호 8을 포함하는 제1 vICDR, 서열번호 9를 포함하는 제2 vICDR 및 서열번호 10을 포함하는 제3 vICDR을 포함하며, 변이체 항체는 제1 vhCDR, 제2 vhCDR, 제3 vhCDR, 제1 vICDR, 제2 vICDR 및 제3 vICDR의 세트에서 총체적으로 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산 치환을 가지며, 특정 용도의 1 내지 4, 1 내지 3 또는 1 내지 2개의 치환을 가지며, 항체는 LY75에 대한 특이적인 결합을 보유한다.
- [0068] 본원에 기술된 항체들 모두 전장일 수 있으며, 예를 들어, 다음의 이소형 중 임의의 것일 수 있다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD 및 IgE. 대안적으로, 항체는 항원 결합 영역 또는 단쇄 항체 (예, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, 단쇄 Fv 단편, 단리된 상보성 결정부 (CDR) 또는 둘 이상의 단리된 CDR들로 된 조합물)와 같은 단편일 수 있다. 항체는, 비-제한적으로, 인간 항체, 인간화된 항체 및 키메라 항체를 비롯한, 임의 타입의 항체일 수 있다.
- [0069] 다른 구현예들에서, 항-LY75 항체는 면역접합체 (즉, 공유 부착된 모이어티를 더 포함함)의 형태이다. 구체적인 구현예에서, 모이어티는 약물, 예를 들어, 메이탄시노이드 (maytansinoid), 돌라스타틴 (dolastatin), 아우리스타틴 (auristatin), 트리코테센 (trichothecene), 칼리케아미신 (calicheamicin), CC1065 또는 이의 유도체이다. 바람직한 일 구현예에서, 약물 모이어티는 DM1 또는 DM4이다.
- [0070] 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 각각 서열번호 3 및 4를 포함하는 핵산 서열 또는 전술한 핵산 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열 또는 서열번호 3 및 4와 유전자 코드의 중복성 (degeneracy)으로 인해 상이한 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0071] 일 구현예에서, 항-CD20 항체는 마우스/인간 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체이다. 바람직하게는, 항-CD20 항체는 리투시맵이다.
- [0072] 본 발명은, 다른 측면에서, 하나 이상의 조절 인자에 작동가능하게 연결된 본원에 기술된 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산을 포함하는 키트 발현 벡터를 제공한다.
- [0073] 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 하기를 코딩하는 발현 벡터를 포함한다:
- [0074] (i) 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 중쇄;
- [0075] (ii) 항-LY75 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 경쇄;
- [0076] (iii) 항-CD20 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 중쇄; 및
- [0077] (iv) 항-CD20 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 경쇄.
- [0078] 다른 측면은, 본 발명에 따른 약학적 조합물의 구성성분 (A) 및 (B)를 치료학적 유효량으로 이를 필요로 하는 환자에게 동시에, 별도로 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0079] 본 발명은, 다른 측면에서, 암 치료에 사용하기 위한 본 발명의 약학적 조합물을 제공한다.
- [0080] 또한, 암 치료에 동시, 별도 또는 연속 사용하기 위한 약학적 조합물의 제조에 있어 본 발명에 따른 구성성분

(A) 및 (B)의 용도를 제공한다. 일 구현예에서, 암은 바람직하게는 백혈병 또는 림프종이다.

[0081] 일부 구현예에서, 암은 비-호지킨 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종 (DLBCL), B 세포 림프종, 소포성 림프종, 외투 세포 림프종, 점막 관련 림프 조직 (MALT)의 림프종, T 세포/조직구 풍부 B 세포 림프종, 버킷 (Burkitt's) 림프종, 림프형질세포 림프종, 소림프구 림프종, 변연부 림프종, T 세포 림프종, 말초 T 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종 및 혈관면역모세포성 T 세포 림프종, 급성 골수성 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더 바람직하게는, 암은 DLBCL 또는 비-호지킨 림프종이다.

[0082] 또한, 본 발명은 본 발명의 약학적 조합물과, 선택적으로 사용 설명서를 포함하는 키트를 범위 내에 포함한다. 키트는 하나 이상의 추가적인 시약 또는 하나 이상의 추가적인 항체를 더 포함할 수 있다.

[0083] 본 발명의 다른 측면 및 이점들은 후술한 상세 설명 및 청구항으로부터 명확해질 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0084] 도 1은 LY75\_A1 중쇄(서열번호 1), 인간 VH 3-15 생식계열(서열번호 11) 및 인간 JH4 생식계열(서열번호 12)의 정렬을 도시한 것이다. LY75\_A1 중쇄의 CDR 영역은 밑줄 표시된다

도 2는 LY75\_A1 경쇄(서열번호 2), 인간 VK 012 생식계열(서열번호 13) 및 인간 JK4 생식계열(서열번호 14)의 정렬을 도시한 것이다. LY75\_A1 경쇄의 CDR 영역은 밑줄 표시된다.

도 3a는 HT-29에서 DM1이 접합된 항-LY75 단일클론 항체의 세포독성 활성을 도시한 것으로, 대부분의 항체가 LY75에 결합하지만 단지 일부만 효능을 나타낸다는 것을 보여준다.

도 3b는 HT-29에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3c는 RAJI 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3d는 Namalwa 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3e는 Karpas 299 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3f는 BxPC3 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3g는 HupT4 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3h는 HPAFF11 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3i는 EHEB 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3j는 Mec-1 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3k는 AML-193 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3l는 HCC 70 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3m은 HCC 1806 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3n은 MDA-MB-468 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3o는 RT4 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3p는 5637 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3q는 SW780 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3r은 SCC-9 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3s는 OE 19 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3t는 OVCAR-3 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3u는 SK-OV-3 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3v는 MOLP-8 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 3w는 RPMI8226 세포에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 4a는 Raji 버킷 림프종 SCID 마우스 이종이식 모델에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 효능을 나타낸 것이다.

도 4b는 Namalwa 버킷 림프종 SCID 마우스 이종이식 모델에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 효능을 나타낸 것이다.

도 4c는 HPAFII 췌장 선암종 무흉선 누드 마우스 이종이식 모델에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 효능을 나타낸 것이다.

도 4d는 SW780 인간 방광 암종 SCID 마우스 이종이식 모델에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 효능을 나타낸 것이다.

도 4e는 MDA-MB-468 무흉선 누드 마우스 이종이식 모델에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 효능을 나타낸 것이다.

도 4f는 COLO205 직장결장 선암종 무흉선 누드 마우스 이종이식 모델에서 DM1 또는 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 효능을 나타낸 것이다.

도 5a는 MCC-DM1이 접합된 항-LY75-mAb 및 항-LY75-mAb의 경쟁적 결합을 나타낸 것이다.

도 5b는 MCC-DM1이 접합된 항-LY75-mAb 및 LY75\_A1의 비경쟁적 결합을 나타낸 것이다.

도 6a 내지 6j는 펩타이드 마이크로어레이 상에서 LY75 펩타이드에 대한 항체 LY75\_A1의 결합성을 나타낸 그래프이다.

도 7은 펩타이드 마이크로어레이 분석 및 펩타이드 풀 다운 분석에서 항체 LY75\_A1에 의해 결합된 펩타이드들의 아미노산을 정렬한 것이다. 강조 표시된 펩타이드는 항체 LY75\_A1에 의해 인지되는 에피토프를 형성하는 경향이 있는 펩타이드이다.

도 8A 및 8B는 여러가지 DLBCL 세포주 (TMD8 및 HBL1)에서 단독 처리 또는 리투시맵과의 조합 처리시 LY75\_DM4의 여러가지 (nM) 용량에 따른 항-증식 효과를 나타낸 것이다 (CI = 슈-탈라라이 조합 지수). 도 8A: 중간값 CI = 0.27. 도 8B: 중간값 CI = 0.57.

도 9는 HBL-1 세포주 (ABC-DLBCL)에서 단독 처리 또는 이브루티닙과의 조합 처리시 LY75\_DM4의 여러가지 (nM) 용량에 따른 항-증식 효과를 나타낸 것이다 (CI = 슈-탈라라이 조합 지수). 중간값 CI = 0.24.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0085] 본 발명은 본원에 정의된 구성성분 (A) 및 (B)를 포함하는 약학적 조합물에 관한 것으로서, 약학적 조합물은 동시적인 사용, 별도의 사용 또는 순차적인 사용을 위해 조합된 조제물 형태이다. 구성성분 (A)는 본원에 정의된 항-LY75 항체에 관한 것이다. 구성성분 (B)는 (i) 본원에 정의된 항-CD20 항체 또는 (ii) 이브루티닙 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.
- [0086] LY75 단백질의 일 예는 본원에서 서열번호 15에 나타난다. 용어 "항-LY75 항체" 및 "LY75 항체"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다.
- [0087] 본원에 기술된 LY75 항체는 LY75 수용체를 발현하는 세포와 접촉되었을 때 내재화될 수 있다. 본원에 논의된 바와 같이, LY75 수용체는, 비-제한적인 예로, 백혈병, 바람직하게는 급성 골수성 백혈병 또는 만성 림프구성 백혈병, 림프종, 바람직하게는 DLBCL B 세포 림프종, 소포성 림프종, 외투 세포 림프종, 점막 관련 림프 조직 (MALT)의 림프종, T 세포/조직구 풍부 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 림포형질세포 림프종, 소림프구 림프종, 변연부 림프종, T 세포 림프종, 말초 T 세포 림프종, 역행성 대세포성 림프종 및 혈관면역모세포성 T 세포 림프종 등의 특정 암 세포 상에서 과발현 및/또는 차별적으로 발현된다.
- [0088] 이와 같이, 본원에 기술된 LY75 항체가 약물과 접합 (때때로 본원에서 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"로 지칭됨)된 경우, 암 세포 내 이들 ADC 분자의 내재화는 세포 사멸 및 그에 따른 종양 치료를 유발한다.
- [0089] 항-LY75 항체는 특정 아미노산 서열을 가진 CDR 영역과 같은 특징한 구조적인 특징을 가진다. 친화성 시약을 형성할 수 있는 한 세트의 CDR, 예를 들어, LY75에 대한 결합성을 나타내는 항체가 본원에 기술된다.
- [0090] 이에, 본 발명은 항체, 바람직하게는 단리된 항체 (개략적으로 후술한 바와 같이, 다양한 종류의 잘 알려진 항체 구조, 유도체, 모방체 및 접합체를 포함함), 항체 조합물을 코딩하는 핵산, 항체 조합물을 제조하기 위해 사

용되는 숙주 세포, 항체 조합물의 제조 방법, 및 항체 및 선택적으로 약학적 담체를 포함하는 약학적 조성물, 약학적 조합물의 사용을 포함하는 치료 방법, 및 암 치료에 있어서의 약학적 조합물의 용도를 제공한다.

- [0091] 림프구 항원 75는 포획된 항원을 세포의 공간으로부터 특수 항원 처리 구획으로 인가하는 식균작용 수용체로 작용하며, B-림프구의 증식 저하를 유발하는 것으로 여겨진다.
- [0092] SWISS-PROT에 따르면, 림프구 항원 75는 비장, 흉선, 결장 및 말초 혈액 림프구에서 발견된다. 림프구 항원 75는 골수 및 B 림프구 세포주에서 검출된다. 본원에서, OGTA076b 및 OGTA076c로 언급된 이소형은 호지킨 및 리드스틴버그 (Hodgkin's and Reed-Sternberg (HRS)) 세포로 지칭되는 악성 호지킨 림프종 세포에서 발견된다. LY75는 포획된 항원을 세포의 공간으로부터 특수 항원 처리 구획으로 인가하는 식균작용 수용체로 작용한다. 이는 B-림프구의 증식 저하를 유발한다.
- [0093] LY75의 발현은 췌장, 방광, 난소, 유방 (3중 음성 포함함), 직장결장, 식도, 피부, 갑상선 및 폐 (비-소 세포)의 암뿐 아니라 다발성 골수종 및 다수의 서로 다른 하위 유형의 림프종 (DLBCL을 포함함) 및 백혈병에서 관찰된다.
- [0094] 항-LY75 항체는, 특정 경우에, 인간이 아닌 다른 종의 LY75와 교차 반응할 수 있다. 예를 들어, 임상 시험을 용이하게 하기 위해, 항-LY75 항체는 무라인 또는 영장류 LY75 분자와 교차 반응할 수 있다. 대안적으로, 특정 구현예에서, 항체는 인간 LY75에 완전히 특이적일 수 있으며, 종 교차 반응성 또는 다른 유형의 비-인간 교차 반응성을 나타내지 않을 수 있다.
- [0095] 본 발명은 항-LY75 항체, 일부 구현예에서 항-CD20 항체, 일반적으로 본원에 기술된 치료 항체에 관한 것이다. 본 발명에서 용도가 확인된 항체는, 통상적인 항체뿐 아니라 아래에 기술된 항체 유도체, 단편 및 모방체를 비롯하여, 본원에 기술된 다수의 포맷을 취할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같이 6개의 CDR들로 구성된 세트 (후술한 수개의 아미노산 변형을 포함함)를 포함하는 항체 구조를 제공한다.
- [0096] 본원에서, "항체"는, 당해 기술 분야의 당업자가 이해하는 바와 같이, 일부 구현예에서, 최소한 본원에 정의된 CDR 6개로 된 한 세트를 포함하는, 매우 다양한 구조를 포함하며; 비-제한적으로, 전통적인 항체 (단일클론 및 다클론 항체를 포함함), 인간화 항체 및/또는 키메라 항체, 항체 단편, 조각된 항체 (예를 들어, 개략적으로 후술된 아미노산 변형을 가짐), 다중특이성 항체 (2 특이성 항체를 포함함), 및 당해 기술 분야에 공지된 기타 유사체를 포함한다.
- [0097] 전통적인 항체의 구조 유닛은 전형적으로 테트라머를 포함한다. 각각의 테트라머는 전형적으로 2개의 동일한 쌍의 폴리펩타이드 사슬로 이루어지며, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄" (전형적으로 분자량 약 25 kDa)와 하나의 "중쇄" (전형적으로 분자량 약 50-70 kDa)를 가진다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 엡실론으로 분류되고, 항체의 이소형은 IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE로 각각 정의된다. IgG는, 비-제한적으로 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 몇가지 서브클래스를 가진다. IgM은, 비-제한적으로, IgM1 및 IgM2를 포함하는 서브클래스를 가진다. 따라서, 본원에서 사용되는 "이소형"은 불변 영역의 화학적 및 항원성 특성에 따라 정의되는 임의의 면역글로불린 서브클래스를 의미한다. 공지된 인간 면역글로불린 이소형은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD 및 IgE이다. 치료 항체는 또한 이소형 및/또는 서브클래스의 임의 조합의 하이브리드를 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0098] 다수 구현예에서, IgG 이소형이 본 발명에 사용되며, IgG1은 다수의 용도에서 구체적인 사용이 확인된다.
- [0099] 각 사슬의 아미노 말단부는 주로 항원 인지를 담당하는 아미노산 약 100 내지 110개 이상으로 된 가변 영역을 포함한다. 가변 영역에서, 중쇄 및 경쇄의 V 도메인 각각은 루프 3개가 합쳐져 항원 결합 영역을 형성한다. 각각의 루프는 아미노산 서열의 변형이 가장 현저한 상보성 결정부 (이하 "CDR")로 지칭된다. "가변성"은 가변 영역의 특정 세그먼트가 항체들에서 서열 상 광범위하게 상이하다는 것을 의미한다. 가변 영역 내 가변성은 고르게 분포되어 있지 않다. 대신, V 영역은, 각각 9-15개 아미노산 길이 또는 더 긴 "과가변 영역"으로 지칭되는 극도의 가변성인 짧은 영역에 의해 이격된, 15-30개의 아미노산으로 된 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 상대적으로 불변성인 가닥으로 이루어져 있다.
- [0100] 각 VH 및 VL은 아미노 말단에서부터 카르복시 말단 방향으로 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 순서로 배열된 3개의 과가변 영역 ("상보성 결정 영역," "CDR")과 4개의 FR로 구성된다.
- [0101] 과가변 영역은 일반적으로 경쇄 가변 영역 내 대략 아미노산 잔기 24-34 (LCDR1; "L"은 경쇄임), 50-56 (LCDR2) 및 89-97 (LCDR3)과, 중쇄 가변 영역 내 대략 아미노산 잔기 약 31-35B (HCDR1; "H"는 중쇄임), 50-65 (HCDR2)

및 95-102 (HCDR3) (Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 및/또는 과가변 루프를 형성하는 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 영역 내 잔기 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) 및 91-96 (LCDR3), 및 중쇄 가변 영역 내 잔기 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) 및 96-101 (HCDR3); Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917)를 포함한다. 본 발명의 구체적인 CDR은 아래에 기술된다.

- [0102] 본 명세서 전체에서, 가변 도메인 내 잔기 (대략, 경쇄 가변 영역의 잔기 1-107 및 중쇄 가변 영역의 잔기 1-113)가 언급되는 경우, 카바트 번호 시스템이 일반적으로 사용된다 (예, 상기 Kabat et al., (1991)).
- [0103] CDR은 항원-결합, 보다 구체적으로는, 항체의 에피토프 결합 부위를 형성하는데 기여한다. "에피토프" 또는 "항원성 결정부"라는 용어는 면역글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 순차적인 아미노산 또는 단백질의 3차 접힘에 의해 나란치 배치된 비-연속적인 아미노산으로 형성될 수 있다. 연속적인 아미노산으로 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 노출되었을 때에도 유지되지만, 3차 접힘에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매로 처리시 없어진다. 에피토프는 전형적으로 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산을 독특한 입체 구조 (spatial conformation)로 포함한다. 본원에 기술된 바와 같이, 주어진 항체에 어떤 에피토프가 결합하는지를 확인하는 방법 (즉, 에피토프 맵핑)은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, LY75로부터 유래된 중첩 또는 연속 펩타이드를 주어진 항-LY75 항체와의 반응성에 대해 검사하는 면역블롯팅 및 면역침전 분석이 있다. 에피토프의 입체 구조를 확인하는 방법은, 당해 기술 분야의 기술 및 본원에 기술된 내용, 예를 들어, X선 결정학 및 2차원 핵 자기 공명 (예를 들어, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996))을 포함한다. 용어 "에피토프 맵핑"은 분자의 항체-항원 인지 결정부를 동정하는 과정을 의미한다.
- [0104] 각 사슬의 카르복시 말단 영역은 주로 작동기 (effector) 기능을 담당하는 불변 영역으로 정의된다. Kabat 등은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 일차 서열들을 다수 수집하였다. 서열의 보존성 정도에 기초하여, Kabat 등은 각각의 일차 서열을 CDR과 프레임워크로 분류하였고, 그 목록을 작성하였다 (SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al. 참조).
- [0105] 면역글로불린의 IgG 서브클래스에서, 중쇄에는 면역글로불린 도메인이 여러개 존재한다. "면역글로불린 (Ig) 도메인"은 본원에서 구분되는 3차 구조를 가진 면역글로불린 영역을 의미한다. 본 발명에서 주목하는 부분은 불변 중쇄 (CH) 도메인 및 힌지 도메인을 포함하는 중쇄 도메인이다. IgG 항체의 경우, IgG 이소형은 각각 CH 영역 3개를 가진다. 즉, IgG의 경우 "CH" 도메인은 다음과 같다: "CH1"은 Kabat의 EU 인덱스에 따른 118-220번 위치이다. "CH2"는 Kabat의 EU 인덱스에 따른 237-340번 위치이며, "CH3"는 Kabat의 EU 인덱스에 따른 341-447번 위치이다.
- [0106] 중쇄의 또 다른 유형의 Ig 도메인은 힌지 영역이다. "힌지" 또는 "힌지 영역" 또는 "항체 힌지 영역" 또는 "면역글로불린 힌지 영역"은 본원에서 항체의 제1 불변 도메인과 제2 불변 도메인 사이에 있는 아미노산을 포함하는 플렉시블 폴리펩타이드 (flexible polypeptide)를 의미한다. 구조적으로, IgG CH1 도메인은 EU 220번 위치에서 끝나고, IgG CH2 도메인은 EU 237번 잔기에서 시작된다. 즉, IgG 항체의 경우, 힌지는 본원에서 221번 (IgG1의 경우 D221)에서 236번 (IgG1의 경우 G236) 위치들을 포함하는 것으로 정의되며, 위치 번호는 Kabat의 EU 인덱스를 따른다. 일부 구현예에서, 예를 들어 Fc 영역의 경우, 저부 힌지 (lower hinge)가 포함되는데, "저부 힌지"는 통상적으로 226 또는 230번 위치이다.
- [0107] 본 발명에서 특히 주목한 영역은 Fc 영역이다. 본원에서 "Fc" 또는 "Fc 영역" 또는 "Fc 도메인"은 제1 불변 영역 면역글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 영역을 포함하며, 일부 경우에는, 힌지의 일부를 또한 포함하는 폴리펩타이드를 의미한다. 즉, Fc는 IgA, IgD, 및 IgG의 마지막 불변 영역 면역글로불린 도메인 2개, IgE 및 IgM의 마지막 불변 영역 면역글로불린 도메인 3개, 그리고 이들 도메인에 대해 N-말단에 위치한 플렉시블 힌지를 의미한다. IgA 및 IgM의 경우, Fc는 J 사슬을 포함할 수 있다. IgG의 경우, Fc 도메인은 면역글로불린 도메인 C<sub>γ</sub>2 및 C<sub>γ</sub>3 (C<sub>γ</sub>2 및 C<sub>γ</sub>3) 및 C<sub>γ</sub>1(C<sub>γ</sub>1)과 C<sub>γ</sub>2(C<sub>γ</sub>2) 사이에 위치한 저부 힌지 영역을 포함한다. 비록 Fc 영역의 경계가 달라질 순 있지만, 인간 IgG 중쇄의 Fc 영역은 대개 잔기 C226 또는 P230에서 이의 카르복시 말단까지를 포함하는 것으로 정의되며, 이때 잔기 번호는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 매겨진다. 보다 충분히 후술된 바와 같이, 일부 구현예에서, 예를 들어, 하나 이상의 Fc<sub>γ</sub>R 수용체 또는 FcRn 수용체에 대한 결합성에 변화를 주기 위해, Fc 영역에 아미노산 변형이 수행된다.
- [0108] 일부 구현예에서, 항체는 전장 항체이다. 본원에서, "전장 항체"는, 본원에 개략적으로 기술된 하나 이상의 변형을 비롯하여, 가변 및 불변 영역을 포함하는, 항체의 천연적인 생물학적 형태를 구성하는 구조를 의미한다.

- [0109] 대안적으로, 항체는, 비-제한적으로, 항체 단편, 단일클론 항체, 이중특이성 항체, 미니바디, 도메인 항체, 합성 항체 (때때로 본원에서 "항체 모방체"로 지칭됨), 키메라 항체, 인간화된 항체, 항체 융합체 (때때로 "항체 접합체"로 지칭됨) 및 이들 각각의 단편 등의, 다양한 구조를 가질 수 있다. CDR 세트의 사용에 따라 결정되는 구조들도 "항체"의 정의 내에 포함된다.
- [0110] 일 구현예에서, 항체는 항체 단편이다. 구체적인 항체 단편은, 비-제한적으로, (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fab 단편, (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편, (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) 단일 가변 영역으로 이루어진 dAb 단편 (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546, 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨), (v) 단리된 CDR 영역, (vi) Fab 단편 2개가 연결된 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편, (vii) 2개의 도메인을 결합시켜 항원 결합부를 형성시킬 수 있는 펩타이드 링커에 의해 VH 도메인과 VL 도메인이 연결된, 단쇄 Fv 분자 (scFv) (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, 전체가 참조로서 포함됨), (viii) 이중 특이성의 단쇄 Fv (WO 03/1 1161, 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨), 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제조된 다가 또는 다중 특이성 단편인 "다이아바디" 또는 "트리아바디" (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)을 포함한다.
- [0111] 일부 구현예에서, 항체는 서로 다른 종으로부터 유래된 혼성, 예를 들어, 키메라 항체 및/또는 인간화된 항체일 수 있다. 즉, 본 발명에서, CDR 세트는 본원의 서열에 의해 구체적으로 기술된 것 외의 프레임워크 및 불변 영역과 함께 사용될 수 있다.
- [0112] 통상적으로, "키메라 항체" 및 "인간화된 항체"는 2 이상의 종으로부터 유래된 영역들이 조합된 항체를 의미한다. 예를 들어, "키메라 항체"는 전통적으로 마우스 (또는 일부 경우, 랫)의 가변 영역(들)과 인간으로부터 유래된 불변 영역(들)을 포함한다. "인간화된 항체"는 통상적으로 인간 항체에서 발견되는 서열로 교체된 가변-도메인 프레임워크 영역을 가지고 있는, 비-인간 항체를 지칭한다. 통상적으로, 인간화된 항체의 경우, CDR을 제외한 전체 항체 (entire antibody)가 인간 기원의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되거나, 또는 CDR을 제외하고는 이러한 항체와 동일하다. 일부 또는 전체가 비-인간 유기체에서 기원하는 핵산에 의해 코딩된 CDR을, 인간 항체 가변 영역의 베타-시트 프레임워크에 이식하여, 이식된 CDR에 의해 특이성이 결정된 항체를 제조한다. 이러한 항체의 제조는, 예를 들어, WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536에 기술되어 있으며, 이들 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 종종 초기 이식 구조체에서 없어진 친화성을 다시 획득하기 위해 상응하는 도너 잔기에 대한 선택된 어셉터 프레임워크 잔기의 "역돌연변이"가 요구된다 (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, 모두 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 또한, 인간화된 항체는, 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역인, 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부를 최적으로 포함할 것이며, 이에 따라 전형적으로 인간 Fc 영역을 포함할 것이다. 인간화된 항체는 또한 유전자 조작된 면역 시스템을 가진 마우스를 사용해 생산할 수 있다. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654를 참조하며, 이 문헌의 전체 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 비-인간 항체의 인간화 및 표면치환 (reshaping)을 수행하는 다양한 기술 및 방법들이 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다 (Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), 및 인용된 참조문헌, 이들 모두 원용에 의해 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 인간화 방법은, 비-제한적으로, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8에 기술되어 있으며, 이들 모두 원용에 의해 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 인간화 또는 비-인간 항체 가변 영역의 면역원성을 낮추는 다른 방법은, 예를 들어, Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973에 기술된 바와 같은 표면치환 방법을 포함할 수 있으며, 상기 문헌은 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 일 구현예에서, 모 항체는 당해 기술 분야에 알려진 바와 같이 친화성 성숙화된 것이다. 예를 들어, USSN 1 1/004,590에 기술된 바와 같이, 구조-기반의 방법들도 인간화 및 친화성 성숙화를 위해 적용될 수 있다. 항체 가변 영역을 인간화 및/또는 친화성 성숙화하기 위해 선택 기반 방법 (selection based method)을 채택할 수 있으며, 비-제한적으로, Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684;

Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759에 기술된 방법들을 포함하며, 이들 모두 원용에 의해 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 다른 인간화 방법으로는 CDR들 중 일부만 이식하는 것을 포함할 수 있으며, 비-제한적인 예로, USSN 09/810,510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084에 기술된 방법 등이 있으며, 이들 모두 원용에 의해 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0113] 본원에 기술된 항체는 단리되거나 또는 재조합될 수 있다. 본원에 개시된 다양한 폴리펩타이드를 설명하기 위해 사용되는 경우, "단리된"은 발현된 세포 또는 세포 배양물로부터 동정 및 분리 및/또는 회수된 폴리펩타이드를 의미한다. 즉, 단리된 항체는 서로 다른 항원 특이성을 가진 다른 항체가 실질적으로 없는 항체 (예를 들어, LY75가 아닌 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없는 LY75에 특이적으로 결합하는 단리된 항체)를 지칭하기 위한 의도이다. 따라서 "단리된" 항체는 자연계에서 보통 발견되지 않는 (예를 들어, 자연적으로 발생하지 않는) 형태로 발견되는 것이다. 본원에 정의된 단리된 항체는, 일 구현예에서, "자연적으로" 발생하는 항체에서는 생기지 않는 적어도 하나의 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 아미노산은 첨가 또는 치환의 방식에 의해 도입될 수 있다. 도입된 아미노산은 자연적으로 생기거나 또는 자연적으로 생기지 않는 아미노산일 수 있는 것으로 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항체는 재조합 단백질, 단리된 단백질 또는 실질적으로 순수한 단백질이다. "단리된" 단백질은 자연적인 상태에서 통상적으로 결합된 물질들 중 적어도 일부를 수반하지 않으며, 예를 들어 해당 시료 내 총 단백질의 적어도 약 5% 또는 적어도 약 50 중량%를 차지한다. 단리된 단백질은 상황에 따라 총 단백질 함량의 5 내지 99.9 중량%를 차지할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 단백질이 증가된 농도 수준으로 생산되도록 유도성 프로모터 또는 고발현성 프로모터를 사용함으로써 단백질을 유의하게 높은 농도로 제조할 수 있다. 재조합 단백질의 경우, 그 정의는, 자연적으로 생성되지 않는, 당해 기술 분야에 알려진 매우 다양한 유기체 및/또는 숙주 세포에서의 항체 생산을 포함한다. 통상, 단리된 폴리펩타이드는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다. "단리된 항체"는 서로 다른 항원 특이성을 가진 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭한다. 예를 들어, LY75에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는, CD20에 결합하는 항체를 제외하고는, LY75가 아닌 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 존재하지 않는다.

[0114] 서로 다른 특이성을 가진 단리된 단일클론 항체는 잘 정의된 조성물과 조합될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 항체는, 후술한 바와 같이, 제형에 선택적이고 개별적으로 포함 또는 제외될 수 있다.

[0115] 본 발명의 항-LY75 항체는 LY75 (예를 들어, 서열번호 15)에 특이적으로 결합한다. 특정 항원 또는 에피토프에 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다" 또는 "특이적이다"라는 것은 비-특이적 상호작용과는 측정가능하게 상이한 결합을 의미한다. 특이적 결합은, 예를 들어, 통상적으로 결합 활성이 없는 유사한 구조의 분자인 대조군 분자의 결합성과 비교해, 분자의 결합성을 확인함으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 타겟과 유사한 대조군 분자와의 경쟁을 통해 결정될 수 있다.

[0116] 특정 항원 또는 에피토프에 대한 특이적인 결합은, 예를 들어, 항원 또는 에피토프에 대한  $K_D$ 가 적어도 약  $10^{-4}$  M, 적어도 약  $10^{-5}$  M, 적어도 약  $10^{-6}$  M, 적어도 약  $10^{-7}$  M, 적어도 약  $10^{-8}$  M, 적어도 약  $10^{-9}$  M, 대안적으로 적어도 약  $10^{-10}$  M, 적어도 약  $10^{-11}$  M, 적어도 약  $10^{-12}$  M 또는 그 이상인 항체에 의해 나타날 수 있으며, 여기서  $K_D$ 는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도이다. 전형적으로, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는, 항원 또는 에피토프에 대해, 대조군 분자보다 20배, 50배, 100배, 500배, 1000배, 5,000배, 10,000배 또는 그 이상 높은  $K_D$ 를 가질 것이다. 그러나, 본 발명에서, 본 발명의 LY75 항체의 ADC를 투여하는 경우, 중요한 사항은  $K_D$ 가 유의한 부작용 없이 내재화 및 그에 따른 세포 사멸을 가능하게 하기에 충분하다는 것이다.

[0117] 또한, 특정 항원 또는 에피토프에 대한 특이적인 결합은, 예를 들어, 대조군의 에피토프에 대한 경우와 비교해, 항원 또는 에피토프에 대한  $K_A$  또는  $K_a$ 가 적어도 20배, 50배, 100배, 500배, 1000배, 5,000배, 10,000배 또는 그 이상으로 높은 항체에 의해 나타날 수 있으며, 여기서  $K_A$  또는  $K_a$ 는 특정 항체-항원 상호작용의 결합 속도이다.

[0118] 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, RIA, BIAcore<sup>®</sup> 분석 및 유세포 분석 등의, LY75 또는 CD20에 대한 항체의 결합력을 평가하기 위한 표준 분석법을 단백질 또는 세포 수준에서 수행할 수 있으며, 이는 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 적합한 분석법은 실시예에 자세히 기술되어 있다. 항체의 결합 카이네틱스 (예를 들어, 결합 친화

성)는 또한 Biacore® 시스템 분석과 같이 당해 기술 분야에 알려진 표준 분석법으로 평가할 수 있다. Raji 또는 Daudi B 세포 종양 세포에 대한 결합성을 평가하기 위해, Raji (ATCC 기탁 번호 CCL-86) 또는 Daudi (ATCC 기탁 번호 CCL-213) 세포를 미국 미생물 보존 센터 (American Type Culture Collection)와 같은 공개적으로 이용 가능한 소스로부터 취득할 수 있으며, 유세포 분석과 같은 표준 분석법을 적용할 수 있다.

- [0119] LY75 (서열번호 15)에 결합하는 LY75 항체는 세포 표면 상에 LY75를 발현하는 세포와 접촉하였을 때 내재화될 수 있다. 이들 항체는 본원에서 "항-LY75" 항체로서 지칭되거나, 또는 간단히 기술하기 위해 "LY75 항체"로 지칭된다. 이들 2가지 용어 모두 본원에서 상호 호환적으로 사용된다.
- [0120] LY75 항체는 표면 상에 LY75를 발현하는 세포, 특히 종양 세포와 접촉하였을 때 내재화된다. 즉, 약물 접합체를 또한 포함하는 본원에 정의된 LY75 항체는 종양 세포에 의해 내재화되어, 약물의 방출과 후속적인 세포 사멸을 유도하며, 이로써 LY75 발현을 나타내는 암을 치료할 수 있다. 이러한 맥락에서 내재화는 몇가지 방식으로 측정할 수 있다. 일 구현예에서, LY75 항체는 MabZap과 같은 표준 분석법을 사용해 세포, 예를 들어, 본원에 개략적으로 기술된 세포주와 접촉된다. MabZap 분석이 항체-약물 접합체 (ADC)를 이용하여 나타낼 것으로 기대되는 효과를 보여준은 당업자에게 명백할 것이다. 후자의 경우, ADC가 내재화됨으로써, 약물이 세포 안으로 흡수될 것이다. 독성 약물이 세포를 살상하는 능력, 즉, 표적화된 암 세포를 살상하는 능력을 가질 것이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, MabZap 분석 데이터가 ADC 분석을 나타내는 것임을 쉽게 인지할 것이다 (Kohls, M and Lappi, D., [2000] Biotechniques, vol. 28, no. 1, 162-165).
- [0121] 이러한 시험관 내 분석에 대한 구현예에서, LY75 항체는 독소를 포함하는 항-LY75 항체와 함께 첨가되며; 예를 들어, LY75 항체는 뮤라인 또는 인간화될 수 있으며, 항-LY75 항체는 항-뮤라인 또는 항-인간화될 수 있으며, 사포린 (saporin)과 같은 독소를 함유할 수 있다. [LY75 항체]-[항-LY75 항체-약물 접합체] 복합체가 형성되면, 복합체는 내재화되고, 약물 (예를 들어, 사포린)이 방출되어, 세포는 사멸된다. 내재화되었을 때에만 약물이 방출되므로, 따라서 내재화되지 않은 경우에는 세포는 생존 상태로 유지된다. 개략적으로 후술한 바와 같이, 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니나, 치료학적 용도에서, 항-LY75 항체는 독소를 함유하며, 내재화 시, 항체와 독소 사이의 결합이 절단되어 독소가 방출되고 세포는 사멸된다.
- [0122] 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 본원에 기술된 특정 항체 (예를 들어, 본원에서 "LY75\_A1"으로 지칭됨)의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 가변 영역 (VR)을 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, 항체는 서열번호 1에 나타난 서열을 가진 항체 LY75\_A1의 중쇄 가변 영역 (VH)의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열번호 2에 나타난 서열을 가지는 항체 LY75\_A1의 경쇄 가변 영역 (VL)의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0123] 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는 서열번호 5를 포함하는 제1 vhCDR; 서열번호 6을 포함하는 제2 vhCDR; 및 서열번호 7을 포함하는 제3 vhCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 8을 포함하는 제1 vICDR; 서열번호 9를 포함하는 제2 vICDR; 및 서열번호 10을 포함하는 제3 vICDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0124] 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는 인간 LY75에 결합하며, 서열번호 1을 포함하는 아미노산 서열 및 이의 보존적 서열 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 항체는 서열번호 2를 포함하는 아미노산 서열 및 이의 보존적 서열 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역을 더 포함할 수 있다.
- [0125] 추가의 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 인간 LY75에 결합하며, 각각 서열번호 1 및/또는 2에 기재된 아미노산 서열 및 이의 보존적 서열 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원에서, 보존적인 서열 변형이라는 용어는, 예를 들어, 유사한 특성을 가지는 아미노산으로의 아미노산의 치환을 의미한다. 어떠한 치환이 보존적이라고 간주될 수 있는지는 당업자에게 상식이다. 보존적인 서열 변형으로 간주될 수 있는 다른 변형으로는, 예를 들어, 당화를 포함한다.
- [0126] 선택적으로, 서열번호 5-10 중 하나 이상은 독립적으로 보존적인 아미노산 치환 1, 2, 3, 4 또는 5개를 포함하며; 선택적으로, 서열번호 5-10 중 하나 이상은 독립적으로 1 또는 2개의 보존적인 아미노산 치환을 포함한다.
- [0127] 바람직하게는, 용어 "보존적인 서열 변형"은, 아미노산 서열을 함유한 항체의 결합 특징에 현저한 영향을 미치지 않거나 또는 변형시키지 않는, 아미노산 변형을 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 보존적인 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결손을 포함한다. 변형은 부위-특이적인 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이와 같은 당해 기술 분야에 공지된 표준 기법을 통해 본 발명의 항체에 도입할 수 있다. 보존적인 아미노산 치환은, 아미노산 잔기를 비슷한 측쇄를 가진 아미노산 잔기로 치환하는 것이다. 비슷한 측쇄를 가진 아미노산 잔기 패밀리들은 당해 기술 분야에 잘 정의되어 있다. 이러한 패밀리는 염기성 측쇄를 가진 아미노산 (예, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 가진 아미노산 (예, 아스파르트산, 글루탐산), 비-하전된 극성 측쇄를 가진 아미노산 (예,

글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비-극성의 측쇄를 가진 아미노산 (예, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄를 가진 아미노산 (예, 트레오닌, 발린, 이소루신) 및 방향족 측쇄를 가진 아미노산 (예, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 이에, 본 발명의 항체의 CDR 영역에 포함된 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리어서 유래된 다른 아미노산 잔기로 치환될 수 있으며, 변형된 항체는 본원에 기술된 기능 분석을 사용해 보유된 기능을 검사할 수 있다.

[0128] 임의의 전술한 서열에 대해 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 91%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 93%, 또는 적어도 94%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 또는 그 이상의 서열 동일성을 가진 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체도 또한 본 발명에 포함된다. 상기 언급된 값의 중간 범위, 예를 들어, 임의의 상기 서열에 적어도 80-85%, 85-90%, 90-95% 또는 95-100%의 서열 동일성을 가진 중쇄 및 경쇄 가변 영역도 또한 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 서열번호 1 또는 서열번호 1과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는 서열번호 2 또는 서열번호 2와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는, 서열번호 16, 17 및 18을 포함하여, 서열번호 1의 중쇄 가변 영역의 프레임워크와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 영역을 포함한다. 다른 구현예에서, 항-LY75 항체는, 서열번호 19, 20 및 21을 포함하여, 서열번호 2의 경쇄 가변 영역의 프레임워크와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 프레임워크 영역을 포함한다.

[0129] 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 본원에서 다음의 CDR을 포함하는 "LY75\_A1 항체"로 지칭될뿐 아니라 제한된 수의 아미노산 변이를 가진 변이체이다:

A1	서열 번호
가변 중쇄 CDR1	5
가변 중쇄 CDR2	6
가변 중쇄 CDR3	7
가변 경쇄 CDR1	8
가변 경쇄 CDR2	9
가변 경쇄 CDR3	10

[0130]

[0131] 또한, 본 발명의 CDR 세트를 포함하는 가변 중쇄 및 경쇄뿐 아니라 전장 중쇄 및 경쇄 (예를 들어, 불변 영역도 포함함)도 또한 본원에 개시된다. 당해 기술 분야의 당업자에게 이해되는 바와 같이, 항-LY75 항체의 CDR 세트는 무라틴, 인간화된 또는 인간 불변 영역 (프레임워크 영역을 포함함)에 통합될 수 있다. 이에, 본 발명은 본원에 개시된 서열번호들과 적어도 약 90%-99% 동일한 가변 중쇄 및 경쇄를 제공하며, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 및 99% 모두 본 발명에서 이용된다.

[0132] 일부 구현예에서, 항-LY75 항체는 인간 LY75에의 결합에 대해 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 결합에 대해 경쟁하는 항체는 일반적인 기법을 사용해 동정할 수 있다. 이러한 기법으로는, 예를 들어, 하나의 항체가 표적 항원에 대한 다른 항체의 결합을 차단하는 능력을 보여주는 면역분석, 즉, 경쟁적인 결합 분석을 포함한다. 경쟁적인 결합은 시험 중인 면역글로불린이 공통 항원, 예를 들어 LY75에 대한 참조 항체의 특이적인 결합을 저해하는 분석법으로 측정한다. 많은 유형의 경쟁적인 결합 분석들이 알려져 있으며, 예를 들어, 고상 직접 또는 간접 방사면역분석 (RIA), 고상 직접 또는 간접 효소 면역분석 (EIA), 샌드위치 경쟁 분석 (Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242(1983)); 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA (Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614(1986)); 고상 직접 표지 분석, 고상 직접 표지 샌드위치 분석 (Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press(1988)); I-125 표지를 이용한 고상 직접 표지 RIA (Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7(1988)); 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA (Cheung *et al.*, *Virology*

176:546(1990)); 및 직접 표지 RIA (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77(1990)) 등이 있다. 전형적으로, 이러한 분석은 고체 표면에 결합된 정제된 항원 또는 비-표지된 시험 면역글로불린 및 표지된 참조 면역글로불린 중 하나를 가진 세포의 사용을 수반한다. 경쟁적인 저해는 시험 면역글로불린의 존재 하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지 물질의 양을 확인함으로써 측정한다. 통상적으로, 시험 면역글로불린은 과량으로 존재한다. 통상적으로, 경쟁 항체가 과량으로 존재할 경우, 공동 항원에 대한 참조 항체의 특이적인 결합은 적어도 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-99% 또는 그 이상으로 저해될 것이다.

[0133] 단일클론 항체는 공지된 다양한 기술을 이용하여 LY75 또는 CD20에 대한 결합성을 특정할 수 있다. 통상적으로, 항체는 일차적으로 ELISA에 의해 특징이 규명된다. 간략하게는, 마이크로타이터 플레이트를 PBS 중의 정제된 LY75 또는 CD20으로 코팅한 다음 PBS으로 희석한 소 혈청 알부민 (BSA)과 같은 관련 없는 단백질로 차단 처리할 수 있다. LY75로 면역화된 마우스 또는 CD20으로 면역화된 마우스로부터 유래된 혈장의 희석액을 각 웰에 첨가하여, 37°C에서 1-2시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 PBS/트윈 20으로 세척한 다음 알칼라인 포스파타제가 접합된 염소-항-인간 IgG Fc-특이 다클론 시약과 함께 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션한다. 플레이트를 세척한 후, ABTS 기질을 첨가하여 현상한 다음, OD 405에서 분석한다. 바람직하게는, 가장 높은 역가를 보인 마우스가 융합에 사용될 것이다.

[0134] 전술한 ELISA 분석은 항체, 즉 LY75/Cd20 면역원에 양성 반응성을 나타내는 항체를 생산하는 하이브리도마를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 높은 친화성으로 LY75에 결합하는 하이브리도마를 이후 서브 클로닝하고, 추가적으로 특징을 규명할 수 있다. 그런 후, (ELISA에 의해) 모 세포의 반응성을 보유한 각각의 하이브리도마로부터의 하나의 클론을 세포 은행 구축 및 항체 정제를 위해 선택할 수 있다.

[0135] 항-LY75 항체 또는 항-CD20 항체를 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마를 볼러 바틀, 2L 스피너-플라스크 또는 기타 배양 시스템에서 배양할 수 있다. 단백질을 정제하기 위해, 상층액을 여과 및 농축한 후 단백질 A 세파로스 (Pharmacia, Piscataway, NJ)를 이용한 친화성 크로마토그래피를 수행할 수 있다. 완충액을 PBS로 교체한 후, OD<sub>280</sub> 1.43 흡광 계수 또는 바람직하게는 혼탁 분석에 의해 농도를 결정할 수 있다. IgG는 겔 전기영동 및 항원 특이 방법에 의해 체크할 수 있다.

[0136] 선택한 항-LY75 단일클론 항체 또는 항-CD20 단일클론 항체가 고유한 에피토프에 결합하는지를 확인하기 위해, 각각의 항체를 상업적으로 이용가능한 시약 (Pierce, Rockford, IL)으로 바이오틴화할 수 있다. 바이오틴화된 MAb의 결합은 스트렙타비딘으로 표지된 프로브로 검출할 수 있다. 정제된 항체의 이소형을 결정하기 위해, 당해 기술 분야에 공지된 기술을 사용하여 이소형 ELISA를 수행할 수 있다. 예를 들어, 마이크로타이터 플레이트의 웰을 10 µg/ml 항-Ig로 4°C에서 밤새 코팅할 수 있다. 5% BSA로 차단한 후, 플레이트를 10 µg/ml 단일클론 항체 또는 정제된 이소형 대조군과 주위 온도에서 2시간 동안 반응시킨다. 그런 다음 웰을 IgG1 또는 다른 이소형의 특이 접합 프로브와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 현상하고 전술한 바와 같이 분석한다.

[0137] LY75 또는 CD20을 발현하는 살아있는 세포에 대한 단일클론 항체의 결합성을 검사하기 위해, 유세포 분석법을 사용할 수 있다. 간략하게는, 막-결합형 LY75 또는 CD20을 발현하는 세포주 및/또는 인간 PBMC (표준 배양 조건 하에 배양)을 0.1% BSA를 함유한 PBS 중에 다양한 농도의 단일클론 항체와 혼합하여 4°C에서 1시간 동안 둔다. 이를 세척한 후, 세포를 일차 항체 염색과 동일한 조건 하에 플루오레세인으로 표지된 항-IgG 항체와 반응시킨다. 단일 세포를 게이팅하기 위해 빛 및 측방 산란 성질을 이용한 FACScan 장치로 시료를 분석할 수 있으며, 표지된 항체의 결합성을 확인한다. 형광 현미경을 이용한 대안적인 분석의 경우 유세포 측정 분석 (이와 더불어 또는 그 대신)을 이용할 수 있다. 세포는 전술한 바와 같이 정확하게 염색할 수 있으며, 형광 현미경으로 검정할 수 있다. 이러한 방법으로 개별 세포를 시각화할 수 있지만, 항원의 밀도에 따라 민감성 감소가 나타날 수 있다.

[0138] 항-LY75 IgG는 웨스턴 블롯팅을 통해 LY75 항원과의 반응성에 대해 추가적으로 검사할 수 있으며; 항-CD20 항체를 사용해 동일하게 수행할 수 있다. 간략하게는, LY75/CD20을 발현하는 세포로부터 세포 추출물을 제조하고, 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 수행할 수 있다. 전기영동 후, 분리된 항원을 니트로셀룰로오스 막으로 이동시키고, 20% 마우스 혈청으로 차단 처리한 다음, 검사할 단일클론 항체로 탐지한다. IgG 결합성은 항-IgG 알칼라인 포스파타제를 사용해 검출할 수 있으며, BCIP/NBT 기질 정제 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)로 현상할 수 있다.

[0139] 다양한 항-LY75 항체의 결합 친화성, 교차 반응성 및 결합 카이네틱스를 분석하는 방법으로는 당해 기술 분야에 알려진 표준 분석, 예를 들어, Biacore™ 2000 SPR 기기 (Biacore AB, Uppsala, 스웨덴)를 이용하는 Biacore™

표면 플라즈몬 공명 (SPR) 분석을 포함한다.

- [0140] 일 구현예에서, 항체는 서열번호 15를 포함하는 인간 LY75에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, 항-LY75 항체는 인간 LY75에 고 친화성으로 결합한다.
- [0141] 바람직하게는, 항-LY75 항체는  $K_D$   $5 \times 10^{-8}$  M 이하로 LY75 단백질에 결합하거나,  $K_D$   $2 \times 10^{-8}$  M 이하로 LY75 단백질에 결합하거나,  $K_D$   $5 \times 10^{-9}$  M 이하로 LY75 단백질에 결합하거나,  $K_D$   $4 \times 10^{-9}$  M 이하로 LY75 단백질에 결합하거나,  $K_D$   $3 \times 10^{-9}$  M 이하로 LY75 단백질에 결합하거나,  $K_D$   $2 \times 10^{-9}$  M 이하로 LY75 단백질에 결합하거나,  $K_D$   $1 \times 10^{-9}$  M 이하로 LY75 단백질에 결합하거나,  $K_D$   $5 \times 10^{-10}$  M 이하로 LY75 단백질에 결합하거나, 또는  $K_D$   $1 \times 10^{-10}$  M 이하로 LY75 단백질에 결합한다.
- [0142] 일 구현예에서, 항-LY75 항체는 본원에 기술된 특정 항-LY75 항체 (예를 들어, LY75\_A1)와 LY75에의 결합에 대해 경쟁 (예를 들어, 교차-경쟁)한다. 이러한 경쟁 항체는 표준 LY75 결합 분석에서 하나 이상의 mAb의 LY75에 대한 결합을 경쟁적으로 저해하는 항체의 능력을 토대로 식별할 수 있다. 예를 들어, 제조한 인간 LY75 단백질을 플레이트 상에 고정시키고; 항체 중 하나를 형광으로 표지하고; 비-표지된 항체가 표지된 항체와 결합에 대해 경쟁하는 능력을 평가하는, 표준 ELISA 분석을 사용할 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, BIAcore 분석을 사용해, 항체의 교차 경쟁능을 평가할 수 있다. 본 발명의 항-LY75 항체의 인간 LY75에의 결합을 저해하는 시험 항체의 능력은, 시험 항체가 인간 LY75에의 결합에 대해 항체와 경쟁할 수 있다는 것을 입증해준다.
- [0143] 일 구현예에서, 경쟁 항체는 본원에 기술된 특정 항-LY75 단일클론 항체 (예를 들어, LY75\_A1)와 동일한 인간 LY75 상의 에피토프에 결합하는 항체이다. X 선 결정학 및 2차원 핵 자기 공명과 같은 표준 에피토프 맵핑 기술을 사용해, 항체가 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지를 확인할 수 있다 (예를 들어, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed.(1996)에서 에피토프 맵핑 프로토콜 참조).
- [0144] 일 구현예에서, LY75에의 결합에 대해 경쟁하거나 및/또는 인간 LY75 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 인간 항체이다.
- [0145] 일단 본원에 기술된 원하는 특성을 가지는 단일한, 전형적인 항-LY75 mAb가 단리되면, 유사한 특성을 가진, 예를 들어, 동일한 에피토프를 가진 다른 mAb를 제조할 수 있다. 예를 들어, 마우스를 본원에 기술된 바와 같이 LY75로 면역화하여, 하이브리도마를 구축하고, 구축된 mAb를 대상으로 LY75에의 결합에 대해 전형적인 mAb와 경쟁하는 능력을 스크리닝할 수 있다. 마우스는 또한 전형적인 mAb가 결합하는 에피토프를 함유한 LY75의 더 작은 단편으로도 면역화할 수 있다. 에피토프는, 예를 들어, LY75에 걸쳐있는 일련의 중첩성 펩타이드들을 스크리닝함으로써 위치를 파악할 수 있다. 대안적으로, Jespers et al., *Biotechnology* 12:899, 1994의 방법을 사용해, 전형적인 mAb와 동일한 에피토프, 즉 유사한 특성을 가지는 mAb의 선택을 안내할 수 있다. 파지 디스플레이를 이용해, 먼저 전형적인 항체의 중쇄를 (바람직하게는 인간) 경쇄의 레퍼토리와 쌍을 지워 LY75-결합성 mAb를 선별하고, 그런 다음, 새로운 경쇄를 (바람직하게는 인간) 중쇄의 레퍼토리와 쌍을 지워 전형적인 mAb와 동일한 에피토프를 가진 (바람직하게는 인간) LY75-결합 mAb를 선별한다. 대안적으로, 전형적인 mAb의 변이체는 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 cDNA의 돌연변이 유발에 의해 수득할 수 있다.
- [0146] 항체 2종 간의 경쟁성 정도를 평가하기 위해, 예를 들어, 방사면역분석 또는 항체에 대한 다른 표지를 이용한 분석이 사용될 수 있다. 예를 들어, LY75 항원을, 동량의 제2 비-표지된 항-LY75 항체의 존재 하에, 표지된 화합물 (예를 들어,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ , 바이오틴 또는 루비듐)이 접합된 포화량의 제1 항-LY75 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 함께 인큐베이션할 수 있다. 그런 후, 비-표지된 차단 항체의 존재 하에 항원에 결합된 표지된 항체의 양을 측정하고, 비-표지된 차단 항체의 부재 하에서의 결합과 비교한다. 경쟁은 차단 항체의 부재시와 비교해 비-표지된 차단 항체의 존재 하의 결합 신호에 대한 백분율 변화로 결정된다. 즉, 차단 항체의 부재시의 결합과 비교해, 차단 항체의 존재 하에 표지된 항체의 결합이 50% 저해되면, 2종의 항체 간에 50%의 경쟁성이 존재하는 것이다. 즉, 제1 및 제2 항체 간의 경쟁성이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 예를 들어, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상이라는 것은, 제1 항체가 항원에 대한 제2 항체의 결합 (또는 그 반대)을 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 (제1 항체 부재시의 제2 항체에 의한 항원의 결합성과 비교)까지 저해한다는 것을 의미한다. 즉, 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의, 제2 항체에 의한 항원에 대한 제1 항체의 결합 저해는, 2종의 항체가 동일한 에피토프에 결합한다는 것을 의미한다.

다.

- [0147] 일부 구현예에서, 약학적 조합물의 구성성분 (B)은 본원에 정의된 항-CD20 항체이다.
- [0148] B-림프구 항원 CD20 또는 CD20은 프로-B 단계 (CD45R+, CD117+)에서 시작하여 성숙할 때까지 점차 농도 증가하는, 모든 B 세포의 표면 상에서 발현되는 활성화된-당화된 포스포단백질이다 (Hardy, Richard (2008). "Chapter 7: B Lymphocyte Development and Biology". In Paul, William. *Fundamental Immunology* (Book) (6th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 237-269. ISBN 0-7817-6519-6).
- [0149] CD20은 처음과 마지막을 제외한 모든 B 세포 발생 단계들에서 발현되며; 기억 세포를 통해 후기 프로-B 세포 (late pro-B cell)로부터 전달되지만, 초기 프로-B 세포 또는 형질모세포 및 형질세포 중 어느 것에도 존재하지 않는다. 이는 B 세포 림프종, 모발상세포 백혈병, B 세포 만성 림프성 백혈병 및 흑색종 암 줄기 세포 상에서 발견된다. CD20의 발현은 CXCR4/SDF1 축을 통해 케모카인 신호전달에 의해 조절된다.
- [0150] 면역조직화학법은 조직학적 조직 단편에서 세포 상의 CD20의 존재를 확인하기 위해 사용될 수 있다.
- [0151] 인간에서 CD20은 MS4A1 유전자에 의해 코딩된다. 이 유전자는 막-스패닝 4A 유전자 패밀리의 멤버를 코딩한다.
- [0152] 일 구현예에서, 약학적 조합물의 구성성분 (B)는 항-CD20 항체 또는 이의 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서 항체는
  - [0153] a) i), ii) 및 iii)을 포함하는 중쇄 가변 영역:
    - [0154] i) 서열번호 40을 포함하는 제1 vhCDR;
    - [0155] ii) 서열번호 41을 포함하는 제2 vhCDR; 및
    - [0156] iii) 서열번호 42를 포함하는 제3 vhCDR; 및
  - [0157] b) i), ii) 및 iii)을 포함하는 경쇄 가변 영역:
    - [0158] i) 서열번호 43을 포함하는 제1 vlhCDR;
    - [0159] ii) 서열번호 44를 포함하는 제2 vlhCDR; 및
    - [0160] iii) 서열번호 45를 포함하는 제3 vlhCDR;
- [0161] 을 포함하며,
- [0162] 선택적으로, 상기 서열번호들 중 임의의 하나 이상은 독립적으로 아미노산 치환, 부가 또는 결손을 1, 2, 3, 4 또는 5개 포함한다.
- [0163] 선택적으로, 전술한 서열번호 40-45 중 임의의 하나 이상은 독립적으로 보존적인 아미노산 치환을 1, 2, 3, 4 또는 5개 포함하며; 더 바람직하게는, 상기 서열번호 40-45 중 임의의 하나 이상은 독립적으로 보존적인 아미노산 치환을 1 또는 2개 포함한다.
- [0164] 바람직하게는, 항-CD20 항체는 단일클론 항체, 더 바람직하게는 인간, 단일클론 항체이며, 보다 더 바람직하게는 완전한 인간 IgG1 단일클론 항체이다.
- [0165] 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서, 항-CD20 항체는 리툭시맵이다. 리툭시맵은 B 세포에서 광범위하게 발현되는 단백질 CD20에 대한 단일클론 항체이다 (Oncogene (2003 Oct 20), Smith MR, "Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance", 22(47): 7359-68). 리툭시맵은 표면에 CD20을 가진 정상 및 악성 B 세포를 둘다 파괴하므로, 과다한 B 세포, 과활성 B 세포 또는 기능부전의 B 세포를 특징으로 하는 질환을 치료하는데 사용된다. 리툭시맵은 기존에 다수의 자가면역 질환과 일부 타입의 암, 예를 들어, 류마티스 관절염, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 심상성 천포창, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루프스, 비-호지킨 림프종, 만성 염증성 탈수초 다발성신경병증, 만성 림프성 백혈병 및 자가면역 빈혈을 치료하는데 사용되어 왔다. 리툭시맵은 Roche 사에서 상품명 Rituxan®으로 판매된다.
- [0166] 바람직하게는, 리툭시맵 항체의 중쇄 및/또는 경쇄는 서열번호 38 및 39로 각각 나타낸 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.
- [0167] 본 발명은 때때로 "항체 유도체" 또는 "항체 유사체"로도 물론 지칭되는 변이체 항체를 포괄한다. 즉, 비-제한적으로, CDR 내 아미노산 변형 (친화성 성숙), 프레임워크 영역 내 아미노산 변형, Fc 영역 내 아미노산 변형,

당화 변이체, 다른 유형의 공유결합성 변형 (예를 들어, 약물 접합체를 부착하기 위해서 등)을 비롯하여, 본원에 기술된 항체에 적용될 수 있는 다수의 변형들이 존재한다.

- [0168] 본원에서 "변이체"는 모 폴리펩타이드와 하나 이상의 아미노산 변형 차이를 가진 폴리펩타이드 서열을 의미한다. 이러한 경우, LY75의 경우, 모 폴리펩타이드는 각각 서열번호 1 또는 2에 열거된 전장의 가변 중쇄 또는 경쇄, 또는 서열번호 5-10 및 16-21에 열거된 중쇄 및 경쇄의 CDR 영역 또는 프레임워크 영역이다. 아미노산 변형은 치환, 삽입 및 결손을 포함할 수 있으며, 많은 경우 전자가 바람직하다. 아미노산 치환은 보존적인 치환 또는 비-보존적 치환일 수 있으며, 보존적인 치환이 바람직한 것으로 이해될 것이다. 또한, 이러한 치환은 천연 또는 비-천연 아미노산으로의 치환일 수 있다.
- [0169] 통상적으로, 변이체는, 본원에 기술된 바와 같이, 항체의 기능이 여전히 존재하는 한, 임의의 갯수의 변형을 포함할 수 있다. 즉, LY75\_A1, 예를 들어, 항체는 여전히 인간 LY75에 특이적으로 결합하여야 한다. 마찬가지로, 항-CD20 항체는 인간 CD20에 여전히 특이적으로 결합하여야 한다. 아미노산 변이체가 Fc 영역을 이용해 제조된다면, 예를 들어, 변이체 항체는 항체의 특정한 용도 또는 표시 (indication)에 필요한 수용체 결합 기능을 유지하여야 한다.
- [0170] 이러한 경우에 "변이체"는 항체의 열거된 CDR 서열, 프레임워크 또는 Fc 영역 내에서 제조될 수 있다.
- [0171] 그러나, 통상적으로, 흔히 목표는 최소한의 변형으로 기능을 바꾸는 것이기 때문에, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환이 통상적으로 적용된다. 일부 경우에, 1 내지 5개의 변형 (예를 들어, 개별적인 아미노산 치환, 삽입 또는 결손)이 존재하며, 다수의 구현예에서는 1-2, 1-3 및 1-4개가 사용된다. 변형 갯수는 변형되는 영역의 크기에 따라 좌우될 수 있으며; 예를 들어, 통상적으로, CDR 영역에서 보다 적은 수의 변형이 바람직하다. CDR 영역 내에서도 변형 위치가 효과를 현저하게 바꿀 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 일 구현예에서, 변형은 중쇄 및/또는 경쇄의 임의의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에서 이루어질 수 있다. 추가의 구현예에서, 변형은 중쇄 및/또는 경쇄의 임의의 CDR1 또는 CDR2에서 이루어진다. 또 다른 구현예에서, 변형은 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR1 내에 위치한다.
- [0172] 다수의 아미노산 변형이 기능성 도메인 내에 존재할 수 있음에 유념하여야 한다: 예를 들어, 야생형 또는 조각된 단백질의 Fc 영역 내 1 내지 5개의 변형뿐 아니라, 예를 들어, Fv 영역 내 1 내지 5개의 변형이 바람직할 수 있다. 변이체 폴리펩타이드 서열은, 바람직하게는, 모 서열 (예를 들어, LY75\_A1 또는 리톡시맙의 가변 영역, 불변 영역 및/또는 중쇄 및 경쇄 서열 및/또는 CDR)과 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 가질 것이다. 서열의 크기에 따라, 동일성 %는 아미노산의 갯수에 따라 결정됨에 유념하여야 한다.
- [0173] 본원에서, "아미노산 치환" 또는 "치환"은 모 폴리펩타이드 서열 내 특정 위치에서 아미노산이 천연 또는 비-천연 아미노산일 수 있는 다른 아미노산으로 교체되는 것을 의미한다. 예를 들어, 치환 S100A는 100번 위치에서 세린이 알라닌으로 치환된 변이체 폴리펩타이드를 지칭한다. 본원에서, "아미노산 삽입" 또는 "삽입"은 모 폴리펩타이드 서열 내 특정 위치에서 아미노산의 첨가를 의미한다. 본원에서, "아미노산 결손" 또는 "결손"은 모 폴리펩타이드 서열 내 특정 위치에서 아미노산의 제거를 의미한다.
- [0174] 본원에서, "모 폴리펩타이드", "모 단백질", "전구체 폴리펩타이드" 또는 "전구체 단백질"은 변이체를 제조하기 위해 이후 변형되는 비-변형 폴리펩타이드를 의미한다. 통상적으로, 본원에서, 모 폴리펩타이드는 LY75\_A1 및 리톡시맙이다. 즉, 본원에서, "모 항체"는 변이체 항체를 제조하기 위해 변형되는 항체를 의미한다.
- [0175] 본원에서, "야생형" 또는 "WT" 또는 "천연"은, 대립 유전자 변이체를 포함하여, 자연에서 발견되는 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. WT 단백질, 폴리펩타이드, 항체, 면역글로불린, IgG 등은 의도적으로 변형되지 않은 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 가진다.
- [0176] 본원에서, "변이체 Fc 영역"은 야생형 Fc 서열과 하나 이상의 아미노산 변형 차이를 가진 Fc 서열을 의미한다. Fc 변이체는 Fc 폴리펩타이드 자체, Fc 변이체 폴리펩타이드를 포함하는 조성물 또는 아미노산 서열을 지칭한다.
- [0177] 일부 구현예에서, LY75\_A1 또는 리톡시맙의 하나 이상의 CDR에서 하나 이상의 아미노산 변형이 이루어진다. 통상적으로, 아미노산 1 또는 2 또는 3개만 임의의 단일한 CDR 내에서 치환되며, 통상적으로 6개의 CDR로 구성된 세트에서 4개 이하, 5개 이하, 6개 이하, 7개 이하, 8개 이하, 9개 이하 또는 10개 이하의 변형이 이루어진다. 그러나, 임의의 CDR에서의 비-치환, 1개의 치환, 2개의 치환 또는 3개 중 임의 조합이 독립적으로 선택적으로 임의의 다른 치환과 조합될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 치환은 6개의 CDR 중 임의의 CDR에서 이루어질 수

있음이 명백할 것이다. 일 구현예에서, 치환은 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR1에서 이루어진다.

- [0178] 일부 경우에, CDR 내 아미노산 변형은 "친화성 성숙"으로 지칭된다. "친화성 성숙화된" 항체는 하나 이상의 CDR 내 하나 이상의 변형(들)을 가져 이러한 변형(들)이 없는 모 항체와 비교해, 항원에 대한 항체의 친화성이 개선된, 항체이다. 일부 경우에, 드물기는 하지만, 항원에 대한 항체의 친화성 감소가 요망될 수 있지만, 이는 통상적으로 바람직하지 않다.
- [0179] 친화성 성숙은 항원에 대한 항체의 결합 친화성을 "모" 항체와 비교하여 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 약 110%, 약 120%, 약 130%, 약 140%, 약 150% 이상, 또는 1배, 2배, 3배, 4 내지 5배 높이기 위해 수행될 수 있다. 바람직한 친화성 성숙화된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화성을 가질 것이다. 친화성 성숙화된 항체는 공지된 공정에 의해 제조된다. 예를 들어, 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL) 도메인 서플링에 의한 친화성 성숙을 기술한 Marks *et al.*, 1992, *Biotechnology* 10:779-783을 참조한다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발은 하기 문헌에 기술되어 있다: 예를 들어, Barbas, *et al.* 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813; Shier *et al.*, 1995, *Gene* 169:147-155; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9; 및 Hawkins *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 226:889-896.
- [0180] 대안적으로, 본 발명에 따른 항체의 하나 이상의 CDR에, 예를 들어, 항원에 대한 항체 친화성을 유의하게 변형시키지 않는, "침묵"인, 아미노산 변형이 이루어질 수 있다. 이는 (본 발명의 항체를 코딩하는 핵산에 대해 수행될 수 있는 바와 같이) 발현의 최적화를 비롯하여, 여러가지 이유로 달성될 수 있다.
- [0181] 따라서, CDR 및 본원에 기술된 항체의 정의에는 변이체 CDR 및 항체가 포함되며; 즉, 항체는 LY75\_A1 또는 리툽시맙의 하나 이상의 CDR에 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 또한, 후술한 바와 같이, 아미노산 변형은, 또한, 본원에 기술된 프레임워크 및 불변 영역을 포함하는, CDR 이외의 임의의 영역에서 독립적이고 선택적으로 이루어질 수 있다.
- [0182] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항-LY75 항체 및/또는 항-CD20 항체는 변이체 Fc 도메인으로 구성된다. 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이, 항체의 Fc 영역은 다수의 Fc 수용체 및 리간드와 상호작용하여, 작동자 기능 (effector function)으로 지칭되는 다수의 중요한 기능적 능력을 부여한다. 이들 Fc 수용체는, 비-제한적으로, (인간에서) 이소형 Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIb 및 Fc $\gamma$ RIc 등의 Fc $\gamma$ RI(CD64); 이소형 Fc $\gamma$ RIIa (동종이형 H131 및 R131을 포함함), Fc $\gamma$ RIIb (Fc $\gamma$ RIIb-1 및 Fc $\gamma$ RIIb-2를 포함함) 및 Fc $\gamma$ RIIc 등의 Fc $\gamma$ RII(CD32); 및 이소형 Fc $\gamma$ RIIIa (항체 의존성 세포독성 (ADCC)과 관련된 동종이형 V158 및 F158를 포함) 및 Fc $\gamma$ RIIIb (동종이형 Fc $\gamma$ RIIIb-NA1 및 Fc $\gamma$ RIIIb-NA2 포함) 등의 Fc $\gamma$ RIII(CD16), FcRn (신생아 수용체), C1q (보체 의존성 세포독성 (CDC)과 관련된 보체 단백질) 및 FcRn (혈청 반감기에 참여하는 신생아 수용체)를 포함한다. 적합한 변형은, 예를 들어, 미국 특허 출원 11/841,654 및 이에 인용된 참조 문헌, US 2004/013210, US 2005/0054832, US 2006/0024298, US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341,769, 미국 특허 번호 6,737,056, 미국 특허 번호 7,670,600, 미국 특허 번호 6,086,875에 통상적으로 기술된 바와 같이, 하나 이상의 위치에서, 보다 상세하게는 Fc 수용체에 대한 결합성을 높이는 특이적인 아미노산 치환을 위한 것이며, 상기한 문헌들은 그 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 명백하게 포함된다.
- [0183] 전술한 변형과 더불어, 다른 변형도 적용될 수 있다. 예를 들어, 분자는 VH 도메인과 VL 도메인을 연결하는 이황화 결합을 포함함으로써 안정화될 수 있다 (Reiter *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245, 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).
- [0184] 또한, 추가로 후술한 항체-약물 접합체 (ADC)를 이용하는 경우에는 시스테인 변형이 특히 유용하다. 일부 구현예에서, 항체의 불변 영역은 특히 "티올 반응성"인 하나 이상의 시스테인을 포함하도록 조작되어, 약물 모이어티의 더욱 특이적이고 제어된 배치를 허용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 7,521,541을 참조하며, 이의 전체 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0185] 또한, 개략적으로 후술한 바와 같이 이루어질 수 있는 다양한 항체의 공유결합성 변형 (covalent modification)도 존재한다.
- [0186] 항체의 공유결합성 변형은 본 발명의 범위에 포함되며, 항상 그런 것은 아니지만 통상적으로는 번역 후 수행된다. 예를 들어, 항체의 몇몇 유형의 공유결합성 변형은, 항체의 특정 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화 물질과 반응시킴으로써, 분자에 도입된다.
- [0187] 시스테인 잔기는 가장 흔하게는 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 같은,  $\alpha$ -할로아세테이트 (및 상

응하는 아민)와 반응하여, 카르복시메틸 또는 카복실아미도에틸 유도체를 제공한다. 시스테이닐 잔기는 또한 브로모트리플루오로아세톤,  $\alpha$ -브로모- $\beta$ -(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 다이설파이드, 메틸 2-피리딜 다이설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-다이아졸 등과의 반응에 의해 유도체화될 수 있다.

- [0188] 히스티딜 잔기는 pH 5.5-7.0에서 다이에틸피로카보네이트와의 반응에 의해 유도체화되는데, 이는 이 물질이 히스티딜 측쇄에 대해 상대적으로 특이성을 가지기 때문이다. 파라-브로모페나실 브로마이드도 또한 사용가능하며; 이 반응은 바람직하게는 pH 6.0에서 0.1 M 소듐 카코딜레이트 내에서 수행된다.
- [0189] 라이시닐 및 아미노 말단 잔기는 숙신 또는 다른 카르복실산 무수물과 반응시킨다. 이러한 시약을 이용한 유도체화는 라이시닐 잔기의 전하를 역전시키는 효과를 가진다. 알파-아미노-함유 잔기를 유도체화하는데 적합한 또다른 시약으로는 메틸 피롤린이미데이트; 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로하이드라이드; 트리니트로벤젠설포산; 0-메틸이소우레아; 2,4-펜타다이온; 및 글리옥실레이트와의 트랜스아미나제-촉매 반응과 같은 이미도 에스테르 등이 있다.
- [0190] 아르기닐 잔기는 페닐글리옥살, 2,3-부타다이온, 1,2-사이클로헥산다이온 및 난하이드린 중 하나 또는 수개의 통상적인 시약과의 반응에 의해 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 구아니딘 관능기의 높은 pKa로 인해 염기성 조건에서 반응을 수행하여야 한다. 또한, 이들 시약은 아르기닌 엠실론-아미노기뿐 아니라 라이신의 기와 반응할 수 있다.
- [0191] 티로실 잔기에 특이적인 변형이 이루어질 수 있으며, 특히 흥미롭게는 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과의 반응에 의한 스펙트럼 표지 물질의 티로실 잔기 내 도입이다. 가장 일반적으로는, 0-아세틸 티로실 중 및 3-니트로 유도체를 각각 제조하기 위해 N-아세틸이미다졸 및 테트라니트로메탄이 사용된다. 방사면역분석에 사용하기 위한 표지된 단백질을 제조하기 위해, 티로실 잔기는 <sup>125</sup>I 또는 <sup>131</sup>I를 사용하여 요오드화되며, 전술한 클로라민 T 방법이 적합하다.
- [0192] 카르복실 측쇄 기 (아스파르트릴 또는 글루타밀)는 카르보디이미드 (R'-N=C=N-R')와의 반응에 의해 선택적으로 변형되며, 여기서 R 및 R'은 선택적으로 서로 다른 알킬 기, 예를 들어 1-사이클로헥실-3-(2-모폴리닐-4-에틸)카르보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-다이메틸펜틸)카르보디이미드이다. 또한, 아스파르트릴 및 글루타밀 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타밀 잔기로 변환된다.
- [0193] 후술한 방법들 외에도, 다양한 방법에 사용하기 위한 수-불용성 지지 매트릭스 또는 표면에 항체를 가교하는데에는 2중 기능성 물질을 이용한 유도체화가 유용하다. 통상적으로 사용되는 가교제로는 예를 들어 1,1-비스(다이아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데하이드, N-하이드록시숙신이미드 에스테르, 예를 들어, 4-아지도살리실산을 가진 에스테르, 동종 2중 기능성 이미도에스테르, 예로 3,3'-다이티오비스 (숙신이미딜프로피오네이트)와 같은 다이숙신이미딜 에스테르 및 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄과 같은 2중 기능성 말레이미드 등이 있다. 메틸-3-[(p-아지도페닐)다이티오]프로피오이미데이트와 같은 유도체화제는 광 조사 하에 가교 결합을 형성할 수 있는 광활성 중간산물을 형성한다. 대안적으로, 미국 특허 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 및 4,330,440에 기술된 반응성 기질 및 시노물구소겐 (cynomolgusogen) 브로마이드-활성화된 탄수화물과 같은 반응성의 수-불용성 매트릭스가 단백질 고정에 사용되며, 상기 문헌들은 모두 원용에 의해 전체 내용이 본 명세서에 포함된다.
- [0194] 글루타밀 및 아스파라기닐 잔기는 각각 대응되는 글루타밀 및 아스파르트릴 잔기로 종종 탈아미드화된다. 대안적으로, 이들 잔기는 약 산성 조건 하에 탈아미드화된다. 이러한 2가지 잔기 형태 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0195] 또 다른 변형으로는 포롤린 및 라이신의 수산화, 세틸 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실기의 인산화, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의  $\alpha$ -아미노기의 메틸화 (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨), N-말단 아민의 아세틸화 및 임의의 C-말단 카르복실기의 아미드화 등이 있다.
- [0196] 또한, 당해 기술 분야의 당업자에게 이해되는 바와 같이, 표지 물질 (형광, 효소, 자기, 방사성 등을 포함함) 모두 항체 (뿐만 아니라 본 발명의 다른 조성물)에 첨가될 수 있다.
- [0197] 다른 유형의 공유결합성 변형으로는 당화 변형이 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항체는 완전히 또는 일

부 비-당화 (aglycosylation), 예를 들어, 비-푸코실화 (afucosylated)될 수 있다.

[0198] 항체 대한 또 다른 유형의 공유결합성 변형은 항체를, 다양한 비-단백질성 폴리머, 예로, 비-제한적으로, 폴리 에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌과 같은 다양한 폴리올과, 예를 들어, Nektar Therapeutics (Nektar 웹사이트에서 입수가능함)의 2005-2006 PEG 카탈로그 및 미국 특허 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 기술된 방식으로 연결하는 것을 포함하며, 상기 문헌은 모두 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 또한, 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이, PEG와 같은 폴리머의 부가를 용이하게 하기 위해 아미노산 치환이 항체 내 다양한 위치에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 공보 2005/0114037A1을 참조하며, 이의 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0199] 추가적인 구현예에서, 항체는 표지 물질을 포함할 수 있다. 본원에서, "표지된"은 화합물의 검출을 가능하게 하기 위해 부착된 하나 이상의 요소, 동위원소 또는 화학적 화합물을 화합물이 가지는 것을 의미한다. 비록 표지 물질이 효소 및 자성 입자와 같은 입자도 물론 포함하지만, 통상적으로 표지 물질은 다음과 같이 3가지 범주로 나뉜다: a) 방사성 또는 헤비 동위원소일 수 있는 동위원소 표지 물질; b) 자기, 전기, 열; 및 c) 비색 또는 발광 염료. 바람직한 표지 물질로는, 비-제한적으로, 형광 라탄족 원소 복합체 (유로퓸 및 테르븀의 것을 포함함)과 형광성 표지 물질, 비-제한적인 예로, 양자점, 플루오레세인, 로다민, 테트라메틸로다민, 예오신, 에리트 로신, 쿠마린, 메틸-쿠마린, 피렌, 말라카이트 그린, 스틸벤, 루시퍼 옐로우, 캐스케이드 블루, 텍사스 레드, 알렉사 염료, Cy 염료 및 6th Edition of the Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland에 기술된 기타 물질 등이 있으며, 상기 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 명확하게 포함된다.

[0200] 항체-약물 접합체

[0201] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항-LY75 항체는 약물과 접합되어 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성한다. 통상적으로, ADC는, 세포독성 또는 세포증식억제제 (cytostatic agent)의 국소 전달용 항체-약물 접합체는 약물 모이어티의 표적화된 종양내 전달을 가능하게 하는 중앙학적 용도로 사용되며, 이는 더 높은 효능과 더 낮은 독성 등을 가능하게 할 수 있다. 이러한 기술에 대한 개요는 Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21:5-13 (2010), Carter et al., Cancer J. 14(3):154 (2008) 및 Senter, Current Opin. Chem. Biol. 13:235-244 (2009)에 제공되며, 이들 문헌 모두 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0202] 이에, 본 발명은 약물이 접합된 항-LY75 항체를 포함하는 약학적 조합물을 제공한다. 통상적으로, 접합은, 추가적으로 후술한 바와 같이, 항체와의 공유 결합에 의해 달성되며, 통상적으로, 링커, 종종 펩타이드 연결 (후술한 바와 같이, 표적 부위에서 프로테아제에 의한 절단에 민감하거나 또는 그렇지 않도록 설계될 수 있음)에 의존한다. 또한, 전술한 바와 같이, 링커-약물 유닛 (LU-D)의 결합은 항체 내 시스템에 부착시킴으로써 수행될 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자에게 이해되는 바와 같이, 항체 당 약물 모이어티의 갯수는 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 약물:항체는 1:1 내지 10:1로 다양할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자에게 이해되는 바와 같이, 실제 갯수는 평균이다.

[0203] 즉, 항-LY75 항체는 약물과 접합될 수 있다. 후술한 바와 같이, ADC의 약물은, 비-제한적인 예로, 화학요법제, 증식 저해제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 이의 단편) 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)와 같은 세포독성제를 비롯하여, 임의 갯수의 물질일 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명은 ADC 이용 방법을 추가로 제공한다.

[0204] 본 발명에서 사용하기 위한 약물은 세포독성 약물, 특히 암 치료요법에 사용되는 약물을 포함한다. 이러한 약물은, 통상적으로, DNA 손상제, 항-대사산물제, 천연 산물 및 이들의 유사체를 포함한다. 세포독성제의 예시적인 타입으로는 효소 저해제, 예를 들어, 다이하이드로폴레이트 환원효소 저해제, 및 티미딜레이트 합성효소 저해제, DNA 인터칼레이터, DNA 절단제, 토포이소머라제 저해제, 약물의 안트라사이클린 패밀리, 빈카 (vinca) 약물, 미토마이신 (mitomycin), 블레오마이신 (bleomycine), 세포독성 뉴클레오시드, 약물의 프테리딘 패밀리, 디이넨 (diynene), 포도필로톡신 (podophyllotoxins), 돌라스타틴 (dolastatin), 메이탄시노이드 (maytansinoid), 분화 유도제 및 탁솔 (taxol) 등이 있다.

[0205] 이러한 타입에 속하는 구성원으로는, 예를 들어, 탁솔, 메토포렉세이트 (methotrexate), 메토프테린 (methopterin), 다이클로로메토포렉세이트, 5-플루오로우라실, 6-머캅토포린, 시토신 아라비노시드 (cytosine arabinoside), 멜팔란 (melphalan), 레우로신 (leurosine), 레우로시데인 (leurosideine), 액티노마이신 (actinomycin), 다우노루비신 (daunorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 미토마이신 (mitomycin) C, 미토마이신 A, 카미노마이신 (caminomycin), 아미노프테린 (aminopterin), 탈리소마이신 (tallysomycin), 포도필로톡

신 및 포도필로톡신 유도체, 예를 들어, 에토포시드 (etoposide) 또는 에토포시드 포스페이트, 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine), 빈데신 (vindesine), 탁산, 예로, 탁솔, 탁소테레 (taxotere) 레티노익산, 부티르산, N8-아세틸 스페르미딘 (spermidine), 캄프토테신 (camptothecin), 칼리케아미신 (calicheamicin), 에스페라미신 (esperamicin), 엔-다이인, 두오카마아신 (duocarmycin) A, 두오카마아신 SA, 칼리케아미신, 캄프토테신 (camptothecin), 헤미아스테를린 (hemiasterlin), 메이탄시노이드 (DM1을 포함함), 모노메틸아우리스타틴 E (monomethylauristatin E, MMAE), 모노메틸아우리스타틴 F (MMAF) 및 메이탄시노이드 (DM4) 및 이들의 유사체 등이 있다.

[0206] 독소는 항체-독소 접합체로서 사용될 수 있으며, 박테리아 독소, 예로 디프테리아 독소, 식물 독소, 예로 리신, 소분자 독소, 예로 겔다나마이신 (geldanamycin) (Mandler et al(2000) J. 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) 및 칼리케아미신 (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al(1993) Cancer Res. 53:3336-3342), 헤미아스테를린 (WO2004/026293; Zask et al.,(2004) J. Med. Chem, 47:4774-4786) 등이 있다. 독소는 튜블린 결합, DNA 결합 또는 토포이소머라제 저해 등의 기전에 의해 세포독성 및 세포증식억제 효과를 발휘할 수 있다.

[0207] 항-LY75 항체와 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우리스타틴, 트리코테센, 칼리케아미신, 두오카르마이신, 피롤로벤자디아아제핀 및 CC1065, 및 독소 활성을 가지는 상기한 독소의 유도체로 된 접합체 역시 이용될 수 있다.

[0208] 바람직하게는, 항-LY75 항체는 DM1 또는 DM4와, 가장 바람직하게는 DM4와 접합된다. 메이탄시노이드 약물 모이어티로서 사용하기 적합한 메이탄신 화합물은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 공지된 방법에 따라 천연 소스로부터 단리하거나, 유전자 조작 기술 (Yu et al(2002) PNAS 99:7968-7973 참조)을 이용해 제조하거나, 또는 공지된 방법에 따라 합성 제조된 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체를 사용해 제조할 수 있다. 후술한 바와 같이, 약물은 항체에 접합하기 위해 티올 또는 아민기와 같은 기능적으로 활성인기를 삽입하여 변형할 수 있다.

[0209] 예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티로는 변형된 방향족 고리를 가진 모이어티, 예를 들어, C-19-테클로로 (미국 특허 4,256,746) (안사미토신 (ansamycin) P2의 리튬 알루미늄 하이드라이드 환원에 의해 제조됨); C-20-하이드록시 (또는 C-20-테메틸) +/-C-19-테클로로 (미국 특허 4,361,650 및 4,307,016) (스트렙토마이세스 또는 액티노미세스를 이용한 탈메틸화 또는 LAH를 이용한 탈염소화에 의해 제조됨); 및 C-20-테메톡시, C-20-아실옥시 (-OCOR), +/-테클로로 (미국 특허 4,294,757) (아실 클로라이드를 이용한 아실화에 의해 제조됨) 및 다른 위치에서 변형된 것 등이 있다.

[0210] 예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티로는 또한, C-9-SH (미국 특허 4,424,219) (H<sub>2</sub>S 또는 P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>와 메이탄시놀의 반응으로 제조됨); C-14-알콕시메틸 (테메톡시/CH<sub>2</sub>OR) (미국 특허 4,331,598); C-14-하이드록시 메틸 또는 아실옥시메틸 (CH<sub>2</sub>OH 또는 CH<sub>2</sub>OAc) (미국 특허 4,450,254) (Nocardia 사에서 제조); C-15-하이드록시/아실옥시 (미국 특허 4,364,866) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 변환에 의해 제조됨); C-15-메톡시 (미국 특허 4,313,946 및 4,315,929) (트레비아 누들플로라 (Trewia nudiflora)로부터 단리됨); C-18-N-테메틸 (미국 특허 4,362,663 및 4,322,348) (스트렙토마이세스에 의해 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조됨); 및 4,5-테옥시 (미국 특허 4,371,533) (메이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드/LAH 환원에 의해 제조됨)와 같은 변형을 가진 것 등이 있다.

[0211] 특허 DM1 (미국 특허 5,208,020에 개시됨, 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함됨) 및 DM4 (미국 특허 7,276,497에 개시됨, 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)가 사용된다. 또한, 5,416,064, WO/01/24763, 7,303,749, 7,601,354, USSN 12/631,508, W002/098883, 6,441,163, 7,368,565, W002/16368 및 W004/1033272 (이들 모두 전체 내용이 명백하게 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)에 기술된 다수의 추가적인 메이탄시노이드 유도체 및 그 방법을 참조한다.

[0212] 메이탄시노이드를 포함하는 ADC, 이의 제조 방법 및 이의 치료학적 용도는, 예를 들어, 미국 특허 5,208,020; 5,416,064; 6,441,163 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 기술되어 있으며, 이들 문헌의 내용은 명백하게 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)에는 인간 직장결장암에 대해 유도된 단일클론 항체 C242가 연결된 DM1으로 지칭되는 메이탄시노이드를 포함하는 ADC가 기술되어

있다. 이 접합체는 대장암 배양 세포에 대해 세포독성이 강한 것으로 밝혀졌으며, 생체 내 종양 증식 분석에서 항종양 활성을 나타내었다.

- [0213] Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)에는 메이탄시노이드가 이황화 링커를 통해 인간 대장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤라인 항체 A7, 또는 HER-2/neu 종양 유전자에 결합하는 다른 뮤라인 단일클론 항체 TA.1과 접합된 ADC가 기술되어 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은, 시험관 내에서 세포 당  $3 \times 10^5$  HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 평가하였다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물과 유사한 수준의 세포독성을 달성하였으며, 이는 항체 분자 당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시킴으로써 높일 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타내었다.
- [0214] 복수의 항체를 포함하는 조성물의 경우, 약물 부하 (drug loading)는 항체 당 약물 분자의 평균 수인 p로 표시한다. 약물 부하는 항체 당 약물 (D) 1 내지 20개 범위일 수 있다. 접합 반응의 조제물에서 항체 당 약물의 평균 갯수는 질량 분광법, ELISA 분석 및 HPLC와 같은 통상적인 수단에 의해 확인할 수 있다. p 측면에서 항체-약물-접합체의 정량적인 분포 역시 확인할 수 있다.
- [0215] 일부 사례에서, 약물 부하가 다른 항체-약물-접합체로부터 특정 p 값을 가진 균일한 항체-약물-접합체의 분리, 정제 및 특성 분석은 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단으로 달성될 수 있다. 예시적인 구현예에서, p는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 또는 이의 일부 (fraction)이다.
- [0216] 항체-약물 접합체 화합물의 제조는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 기법으로 달성할 수 있다. 간략하게는, 항체-약물 접합체 화합물은 항체 유닛으로서 항-LY75 항체, 약물, 및 선택적으로 약물과 결합제 (binding agent)를 연결하는 링커를 포함할 수 있다.
- [0217] 약물 및/또는 링커를 공유 부착하기 위해 여러가지 다양한 반응들을 이용할 수 있다. 이는 결합제, 예를 들어, 아미노산 잔기, 예를 들어, 라이신의 아민기, 글루탐산 및 아스파르트산의 유리 카르복실기, 시스테인의 설프하이드릴기 및 방향족 아미노산의 다양한 모이어티 등의 항체 분자의 아미노산 잔기의 반응에 의해 달성될 수 있다. 일반적으로 사용되는 비-특이적인 공유 부착 방법은 화합물의 카르복시 (또는 아미노) 기를 항체의 아미노 (또는 카르복시)기와 결합시키는 카르보디이미드 반응이다. 추가적으로, 다이알데하이드 또는 이미도에스테르와 같은 2 기능성 물질을 사용해 화합물의 아미노 기를 항체 분자의 아미노 기와 연결한다.
- [0218] 또한, 약물을 결합제에 부착하기 위해, 슈프 (Schiff) 염기 반응도 이용가능하다. 이 방법은 글리콜 또는 하이드록시기를 함유한 약물을 피아이오데이트 산화하여 알데하이드를 형성시킨 다음 이를 결합제와 반응시키는 것을 포함한다. 부착은 결합제의 아미노 기와의 슈프 염기의 형성을 통해 이루어진다. 이소티오시아네이트는 또한 약물을 결합제에 공유 부착하기 위한 커플링제로 사용될 수도 있다. 다른 기법들도 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되어 있으며, 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0219] 일부 구현예에서, 링커의 전구체인 중간산물을 적절한 조건 하에 약물과 반응시킨다. 다른 구현예에서, 반응성은 약물 및/또는 중간산물 상에서 이용된다. 약물과 중간산물 간의 반응 산물, 또는 유도체화 약물을, 이후 적절한 조건에서 본 발명의 항-LY75 항체와 반응시킨다.
- [0220] 본 발명의 접합체를 제조하기 위한 목적으로 화합물의 반응을 더욱 편리하게 하기 위해, 원하는 화합물에 화학적 변형도 또한 가할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 관능기, 예를 들어, 아민, 하이드록실 또는 설프하이드릴은, 약물의 활성 또는 다른 성질에 대해 최소한의 영향 또는 허용가능한 영향을 미치는 위치에서, 약물에 부가될 수 있다.
- [0221] 전형적으로, 항체-약물 접합체 화합물은 약물 유닛과 항체 유닛 사이에 링커 유닛을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 세포 내 또는 세포 외 조건 하에 절단가능하여, 링커의 절단으로 적절한 환경에서 항체로부터 약물 유닛이 방출된다. 예를 들어, 특정 프로테아제를 분비하는 고형 종양이 절단가능한 링커의 표적으로서의 이용될 수 있으며; 다른 구현예에서, 세포 내 프로테아제가 이용된다. 또 다른 구현예에서, 링커 유닛은 절단가능하지 않으며, 약물은, 예를 들어, 리소좀 내 항체 분해에 의해 방출된다.
- [0222] 일부 구현예에서, 링커는 세포 내 환경 (예를 들어, 리소좀 또는 엔도솜 또는 소포 내)에 존재하는 절단제에 의해 절단가능하다. 링커는, 예를 들어, 비-제한적으로, 리소좀 또는 엔도솜 프로테아제 등의 세포 내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티딜 링커는 적어도 2개의 아미노산 길이 또는 적어도 3개의 아미노산 길이를 가진다.
- [0223] 절단제는, 비-제한적으로, 카텝신 B 및 D 및 플라스민을 포함할 수 있는데, 이들 모두 다이펩타이드 약물 유도

체를 가수분해하여 표적 세포 내에서 활성 약물을 방출하는 것으로 알려져 있다 (예를 들어, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123 참조). LY75를 발현하는 세포에 존재하는 효소에 의해 절단될 수 있는 펩티딜 링커. 예를 들어, 암성 조직에서 많이 발현되는 티올 의존성 프로테아제 카텡신-B에 의해 절단될 수 있는 펩티딜 링커 (예를 들어, Phe-Leu 또는 Gly-Phe-Leu-Gly 링커(서열번호 52))가 사용될 수 있다. 이러한 링커의 다른 예시는, 예를 들어, 미국 특허 6,214,34 (그 전체가 사실상 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)에 기술되어 있다.

[0224] 일부 구현예에서, 세포 내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 Val-Cit 링커 또는 Phe-Lys 링커 (예를 들어, val-cit 링커를 가진 독소루비신의 합성을 기술한 미국 특허 6,214,345를 참조)이다.

[0225] 다른 구현예에서, 절단가능한 링커는 pH에 민감하며, 즉, 특정 pH에서 가수분해에 민감하다. 전형적으로, pH 민감 링커는 산성 조건 하에 가수분해가능하다. 예를 들어, 리소솜에서 가수분해가능한 산 불안정 링커 (예를 들어, 하이드라존 (hydrazone), 세미카바존 (semicarbazone), 티오세미카바존 (thiosemicarbazone), 시스-아코니트 아미드 (cis-aconic amide), 오르토에스테르, 아세탈, 케탈 등)가 사용될 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik 및 Walker 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661)을 참조한다. 이러한 링커는 혈중과 같은 중성 pH 조건 하에서는 상대적으로 안정적이지만, 리소솜의 대략적인 pH인 pH 5.5 또는 5.0 미만에서는 불안정하다. 특정 구현예에서, 가수분해 가능한 링커는 (예를 들어, 아실하이드라존 결합에 의해 치료제에 부착된 티오에테르와 같은) 티오에테르 링커이다 (예를 들어, 미국 특허 5,622,929 참조).

[0226] 또 다른 구현예에서, 링커는 환원 조건 하에 절단가능하다 (예를 들어, 이황화 링커). 예를 들어, SATA (N-숙신이미딜-5-아세틸티오아세테이트), SPDP (N-숙신이미딜-3-(2-피리딜다이티오)프로피오네이트), SPDB (N-숙신이미딜-3-(2-피리딜다이티오)부티레이트) 및 SMPT (N-숙신이미딜-옥시카르보닐-alpha-메틸-alpha-(2-피리딜-다이티오)톨루엔)-, SPDB 및 SMPT를 이용해 형성가능한 링커 등의, 다양한 이황화 링커들이 당해 기술 분야에 알려져 있다. (예, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987)을 참조한다. 또한 미국 특허 4,880,935도 참조한다).

[0227] 다른 구현예에서, 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.

[0228] 또 다른 구현예에서, 링커 유닛은 절단가능하지 않으며 약물은 항체 분해에 의해 방출된다. (미국 공개 번호 2005/0238649 참조, 이 문헌은 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0229] 다수의 구현예에서, 링커는 자가 희생적 (self-immolative)이다. 본원에서, "자가-희생 스페이서"라는 용어는 2개의 이격된 화학적 모이어티를 안정한 3자 분자로 공유 결합시킬 수 있는 2중 기능성 화학적 모이어티를 지칭한다. 제1 모이어티에 대한 결합이 절단되면 제2 화학적 모이어티로부터 자가-희생 스페이서가 자발적으로 분리될 것이다. 예를 들어, 약물 및 절단가능한 기질이 자가-희생 링커를 통해 선택적으로 결합된 약물-절단가능한 기질 접합체에 관한 WO 2007/059404A2, WO06/110476A2, WO05/112919A2, WO2010/062171, WO09/017394, WO07/089149, WO 07/018431, WO04/043493 및 WO02/083180을 참조하며, 이들 문헌 모두 원용에 의해 본 명세서에 명백하게 포함된다.

[0230] 종종 링커는 세포 외 환경에 실질적으로 민감하지 않다. 링커와 관련하여 본원에서, "세포 외 환경에 실질적으로 민감하지 않은"은, 항체-약물 접합체 화합물이 세포 외 환경 (예를 들어, 혈장 내)에 존재할 때, 항체-약물 접합체 화합물 샘플에서 링커 절단 수준이 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 3% 이하 또는 약 1% 이하인 것을 의미한다.

[0231] 링커가 세포 외 환경에 실질적으로 민감하지 않은지 여부는, 예를 들어, 혈장과 항체-약물 접합체 화합물을 사전 결정된 기간 (예를 들어, 2, 4, 8, 16 또는 24시간)동안 인큐베이션한 다음 혈장 내 존재하는 유리 약물의 양을 정량함으로써 결정할 수 있다.

[0232] 다른, 비-상호적으로 배타적인 구현예에서, 링커는 세포 내재화를 촉진한다. 특정 구현예에서, 링커가 치료학적 물질 (즉, 본원에 기술된 항체-약물 접합체 화합물의 링커-치료학적 물질 모이어티의 환경에서)에 접합되었을 때, 세포 내재화를 촉진한다. 또 다른 구현예에서, 링커가 아우리스타틴 화합물 및 본 발명의 항-LY75 항체에 접합되었을 때, 세포 내재화를 촉진한다.

- [0233] 본 발명의 조성물과 함께 사용될 수 있는 다양한 예시적인 링커 및 방법들은 WO 2004/010957, 미국 공개 번호 2006/0074008, 미국 공개 번호 20050238649 및 미국 공개 번호 2006/0024317 (각각 그 전체가 사실상 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)에 기술되어 있다. 바람직하게는, 링커는 SPDB (N-숙신이미딜-3-(2-피리딜다이티오)부티레이트)이다.
- [0234] 약물 부하는 p로 표시하며, 분자 내 항체 당 약물 모이어티의 평균 갯수이다. 평균 갯수는 종종 분수 또는 소수일 수 있지만, 약물 부하 ("p")는 항체 당 모이어티 (D) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상일 수 있다. 통상적으로, 약물 부하 1 내지 4이 대개 유용하고, 1 내지 2도 또한 유용하다. 본 발명의 ADC는 1 내지 20, 예를 들어, 1-15, 1-10, 2-9, 3-8, 4-7, 5-6개의 다양한 약물 모이어티가 접합된 항체 콜렉션을 포함한다. 접합 반응으로 ADC 제조시 항체 당 약물 모이어티의 평균 갯수는 질량 분광법 및 ELISA 분석과 같은 통상적인 수단에 의해 규명할 수 있다.
- [0235] P 측면에서 ADC의 정량적인 분포도 또한 결정될 수 있다. 일부 경우에, 약물 부하가 상이한 ADC로부터 특정 p 값을 가진 균질한 ADC의 분리, 정제 및 특성 분석은 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다.
- [0236] 일부 항체-약물 접합체의 경우, p는 항체 상의 부착 부위의 갯수에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 전술한 예시적인 구현예에서처럼 부착 부위가 시스템인 티올인 경우, 항체는 단 하나 또는 수개의 시스템인 티올기를 가질 수 있거나, 단 하나 또는 수개의 충분히 반응성인 티올기를 가질 수 있으며, 이를 통해 링커가 부착될 수 있다. 특정 구현예에서, 더 높은, 예를 들어, p>5인 약물 부하는 특정 항체-약물 접합체의 응집, 불용성, 독성 또는 세포 내 투과성의 소실을 유발할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 ADC에 대한 약물 부하는 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 ADC의 경우, 항체 당 약물 모이어티의 최적비는 8 미만일 수 있으며, 약 2 내지 약 5일 수 있는 것으로, 확인되었다. US 2005/0238649 A1 (그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)을 참조한다.
- [0237] 특정 구현예에서, 약물 모이어티는 이론적인 최대치보다 더 적은 갯수로 접합 반응 중에 항체에 접합된다. 항체는, 예를 들어, 후술한 바와 같이 약물-링커 중간산물 또는 링커 시약과 반응하지 않는 라이신 잔기를 함유할 수 있다. 통상적으로, 항체는 약물 모이어티에 결합될 수 있는 많은 유리 및 반응성 시스템인 티올기를 함유하지 않으며; 실제, 항체에서 대부분의 시스템인 티올 잔기는 이황화 가교로서 존재한다. 특정 구현예에서, 항체는 일부 또는 완전 환원 조건 하에 다이티오프탈 (DTT) 또는 트리카르보닐에틸포스핀 (TCEP)과 같은 환원제를 사용해 환원되어, 반응성 시스템인 티올기를 형성할 수 있다. 특정 구현예에서, 항체는 라이신 또는 시스템인과 같은 반응성 친핵성 기를 노출시키기 위해 변성 조건을 거친다.
- [0238] ADC의 부하 (약물/항체 비)는, 여러가지 방식, 예를 들어 (i) 항체에 대한 약물-링커 중간산물 또는 링커 시약의 몰 초과를 제한하거나, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도를 제한하거나, (iii) 시스템인 티올 변형을 위한 일부 또는 제한적 환원 조건에 의해, (iv) 시스템인 잔기의 수 및 위치가 링커-약물 부착 (예를 들어, 본원 및 WO2006/034488에 기술된 바와 같이 제조된 thioMab 또는 thioFab, 상기 특허 문헌은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)의 수 및/또는 위치 조절을 위해 변형되도록 항체의 아미노산 서열을 재조합 기술에 의해 조작함으로써, 조절될 수 있다.
- [0239] 1개 보다 많은 친핵기가 약물-링커 중간산물 또는 링커 시약과, 이후 약물 모이어티 시약과 반응하는 경우, 얻어진 생성물은 항체에 하나 이상의 약물 모이어티가 부착된 ADC 화합물의 혼합물인 것으로 이해된다. 항체 당 약물의 평균 갯수는 항체에 특이적이고 약물에 특이적인 이중 ELISA 항체 분석을 통해 혼합물로부터 계산될 수 있다. 개개 ADC 분자는 질량 분광법으로 혼합물에서 식별하고, HPLC, 예를 들어, 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 분리할 수 있다.
- [0240] 일부 구현예에서, 단일 부하 값을 가진 균질한 ADC는 전기영동 또는 크로마토그래피에 의해 접합 혼합물로부터 분리할 수 있다.
- [0241] ADC의 세포독성 효과를 결정하는 방법
- [0242] 약물 또는 항체-약물 접합체가 세포에 세포증식억제 및/또는 세포독성 효과를 발휘하는지를 결정하는 방법은 공지되어 있다. 통상적으로, 항체 약물 접합체의 세포독성 또는 세포증식억제 활성은 항체 약물 접합체의 표적 단백질 발현하는 포유류 세포를 세포 배양 배지에 노출시켜 세포를 약 6시간 내지 약 5일 동안 배양하고, 세포 생존성을 측정함으로써 측정할 수 있다. 세포 기반의 시험관 내 분석은 항체 약물 접합체의 생존성 (증식), 세포독성 및 세포사살 (카스파제 활성화)의 유도를 측정하는 데 사용될 수 있다.

- [0243] 항체 약물 접합체가 세포증식억제 효과를 발휘하는지를 결정하기 위해, 티미딘 삽입 분석 (thymidine incorporation assay)을 사용할 수 있다. 예를 들어, 표적 항원을 발현하는 암 세포를 72시간 동안 96웰 플레이트에서 5,000 세포/웰의 밀도로 배양하고, 72시간 중 마지막 8시간 동안 0.5  $\mu\text{Ci}$ 의  $^3\text{H}$ -티미딘에 노출시킬 수 있다. 배양물의 세포내  $^3\text{H}$ -티미딘의 삽입을 항체 약물 접합체의 존재 및 부재 하에 측정한다.
- [0244] 세포독성을 결정하기 위해, 괴사 또는 세포자살 (프로그램화된 세포 사멸)을 측정할 수 있다. 괴사는 전형적으로 원형질막의 투과성 증가; 세포의 팽윤, 및 원형질막의 파괴를 수반한다. 세포자살은 전형적으로 막 수포 형성, 세포질 응축 및 내인성 엔도뉴클라제의 활성화를 특징으로 한다. 암 세포에서 임의의 이러한 효과들이 확인되는 것은 항체 약물 접합체가 암의 치료에 유용하다는 것을 의미한다.
- [0245] 세포 생존성은 뉴트랄 레드, 트립판 블루 또는 ALAMAR™ 블루와 같은 염료의 흡수를 세포 내에서 결정함으로써 측정할 수 있다 (예를 들어, Page et al., 1993, *Int'l. J. Oncology* 3:473-476 참조). 이러한 분석에서, 세포를 염료 함유 배지에서 배양하고, 세포를 세척한 후 염료의 세포 흡수를 나타내는 잔류 염료를 분광측정으로 측정한다. 단백질-결합 염료 셀포도타민 B (SRB) 역시 세포독성을 측정하기 위해 사용될 수 있다 (Skehan et al., 1990, *J. Nat'l. Cancer Inst.* 82:1 107-12).
- [0246] 대안적으로, 테트라졸륨 염, 예를 들어 MTT를, 죽은 세포가 아닌 살아 있는 세포를 검출함으로써, 포유류 세포 생존 및 증식에 대한 정량적인 비색 분석에 사용한다 (예를 들어, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63 참조).
- [0247] 세포자살은, 예를 들어, DNA 단편화 (DNA fragmentation)를 측정함으로써 정량할 수 있다. DNA 단편화를 정량적으로 시험관 내 결정하는 측광법이 이용가능하다. TUNEL (단편화된 DNA에서 표지된 뉴클레오티드의 삽입 검출) 및 ELISA 기반의 분석 등의 이러한 분석의 예들은 문헌 (Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals))에 기술되어 있다.
- [0248] 세포자살은 또한 세포에서 형태학적 변화를 측정함으로써 확인할 수 있다. 예를 들어, 괴사에서처럼, 원형질막의 온전성 소실은 특정 염료 (예를 들어, 아크리딘 오렌지 또는 에티디움브로마이드와 같은 형광 염료)의 흡수를 측정함으로써 확인할 수 있다. 세포자살 세포 수를 측정하기 위한 방법은 Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16)에 기술되어 있다. 또한, 세포를 DNA 염료 (예를 들어, 아크리딘 오렌지 또는 에티디움브로마이드 또는 요오드화 프로피디움)로 표지하여, 세포에서 염색체 응축 및 내핵막을 따른 변연화 (margination)를 관찰할 수 있다. 세포자살을 확인하기 위해 측정할 수 있는 다른 형태학적 변화로는, 예를 들어, 세포질 응축, 막 수포 형성 증가 및 세포 수축을 포함한다.
- [0249] 세포자살 세포의 존재는 배양물의 부착 및 "부유" 영역 둘다에서 측정할 수 있다. 예를 들어, 2가지 영역은 상층액을 제거함으로써 수집할 수 있으며, 부착된 세포는 트립신 처리한 다음 원심분리 세척 단계 (예를 들어, 2000 rpm에서 10분) 후 조제물들을 조합하고, (예를 들어, DNA 단편화를 측정함으로써) 세포자살을 검출한다. (예를 들어, Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:31 10-16 참조).
- [0250] 본 발명의 항-LY75 항체의 치료학적 조성물의 생체내 효과는 적절한 동물 모델에서 평가할 수 있다. 예를 들어, 이종의 암 모델을 사용할 수 있으며, 암 외식편 또는 계대 배양한 이종이식 조직을 면역 약화 동물, 예를 들어 누드 또는 SCID 마우스 (Klein et al., 1997, *Nature Medicine* 3: 402-408)에 도입한다. 종양 형성, 종양 퇴행 또는 전이 등의 저해를 측정하는 분석으로 효능을 측정할 수 있다.
- [0251] 전술한 방법의 실시예 사용되는 치료학적 조성물은 원하는 전달 방법에 적합한 담체를 포함하는 약학적 조성물로 제형화될 수 있다. 적합한 담체는 치료학적 조성물과 조합될 때 치료학적 조성물의 항-종양 기능을 유지시키고 통상적으로 환자의 면역계와 반응하지 않는 임의의 물질을 포함한다. 그 예로는, 비-제한적으로, 멸균 포스페이트 완충화된 염수 용액, 정균수 (bacteriostatic water) 등과 같은 임의의 다수의 표준 약학적 담체 등이 있다 (통상적으로, Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> Edition, A. Osal., Ed., 1980 참조).
- [0252] 항체의 제조 방법
- [0253] 본 발명에 개시된 항체는 임의의 적절한 방법으로 제조할 수 있다. 이 방법은 항체를 코딩하는 단리된 핵산 (들)을 함유한 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 당해 기술 분야의 당업자에게 이해되는 바와 같이, 이러한 방법은 항체의 특성에 따라 다양한 방식으로 수행할 수 있다. 항체가 전통적인 전장 항체인 경우, 예를 들어, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 항체 제조 조건 하에 제조 및 단리할 수 있다.

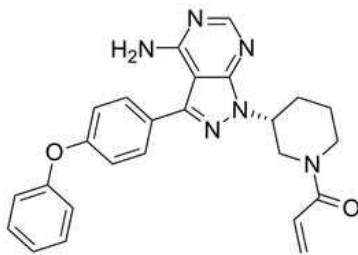
- [0254] LY75\_A1의 가변 중쇄 및 경쇄 (단백질 및 핵산 서열)는 본원에 개시되어 있으며; 당해 기술 분야에서 이해되는 바와 같이, 이를 쉽게 증폭시켜 전장 중쇄 및 경쇄를 제조할 수 있다. 즉, 본원에 개략적으로 기술된  $V_H$  및  $V_K$  세그먼트를 코딩하는 DNA 단편이 제공되어, 이들 DNA 단편을, 예를 들어, 가변 영역 유전자를 전장 항체 사슬 유전자로, Fab 단편 유전자로 또는 scFv 유전자로 변환하기 위해, 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작할 수 있다. 이러한 조작에서,  $V_K$  또는  $V_H$ 를 코딩하는 DNA 단편은 항체 불변 영역 또는 플렉시블 링커와 같은 다른 단백질을 코딩하는 다른 DNA 단편에 작동가능하게 연결된다. 이러한 맥락에서 "작동가능하게 연결된"이라는 용어는, 2개의 DNA 단편이 2개의 DNA 단편에 의해 코딩되는 아미노산 서열이 프레임에 맞게 유지되도록 연결되는 것을 의미한다.
- [0255]  $V_H$  영역을 코딩하는 단리된 DNA는  $V_H$ 를 코딩하는 DNA를 중쇄 불변 영역 ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ )을 코딩하는 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결함으로써 전장 중쇄 유전자로 변환할 수 있다. 무라인 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며 [예를 들어, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참조], 이 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 수득할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역이다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우,  $V_H$ 를 코딩하는 DNA는 단지 중쇄  $C_{H1}$  불변 영역만 코딩하는 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결할 수 있다.
- [0256] VL/VK 영역을 코딩하는 단리된 DNA는  $V_L$ 를 코딩하는 DNA를 경쇄 불변 영역  $C_L$ 를 코딩하는 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결함으로써 전장 경쇄 유전자 (뿐만 아니라 Fab 경쇄 유전자)로 변환할 수 있다. 무라인 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며 [예를 들어, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참조], 이 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 수득할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다.
- [0257] scFv 유전자를 구축하기 위해,  $V_H$  및  $V_L/V_K$ 를 코딩하는 DNA 단편을 플렉시블 링커, 예를 들어, 아미노산 서열  $(Gly_4-Ser)_3$ 을 코딩하는 다른 단편에 작동가능하게 연결하여,  $V_H$  및  $V_L/V_K$  서열이 플렉시블 링커에 의해 연결된  $V_L/V_K$  및  $V_H$  영역을 가지는 연속적인 단일-사슬 단백질로 발현시킬 수 있다 [예를 들어, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554 참조].
- [0258] 본원에 기술된 항체를 코딩하는 핵산이 제공된다. 비록 본원에 기술된 조성물에 따른 다른 조합도 본 발명에 포함되지만, 이러한 폴리뉴클레오티드는 각각의 중쇄 및 경쇄의 가변 및 불변 영역을 코딩한다.
- [0259] 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA의 형태일 수 있다. DNA, cDNA, 게놈 DNA, 핵산 유사체 및 합성 DNA 형태의 폴리뉴클레오티드 역시 이용가능하다. DNA는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있으며, 만일 단일 가닥이라면 코딩 (센스) 가닥 또는 비-코딩 (안티센스) 가닥일 수 있다. 폴리펩타이드를 코딩하는 코딩 서열은 본원에 제공된 코딩 서열과 동일할 수 있거나 또는 상이한 코딩 서열일 수 있으며, 유전자 코드의 겹침 또는 중복의 결과로, 이 서열은 본원에 제공된 DNA와 동일한 폴리펩타이드를 코딩한다.
- [0260] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항체를 코딩하는 핵산(들)은 염색체 외일수 있는 발현 벡터 또는 발현 벡터가 도입되는 숙주 세포의 게놈 내에 삽입되도록 설계될 수 있는 발현 벡터에 삽입된다. 발현 벡터는 임의의 수의 적절한 조절 서열 (비-제한적으로, 전사 및 번역 조절 서열, 프로모터, 리보솜 결합 부위, 인핸서, 복제 오리진 등을 포함함) 또는 다른 구성요소 (선택 유전자 등)를 포함할 수 있으며, 이들 모두 당해 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 2종의 핵산을 사용하여, 각각 서로 다른 발현 벡터 (예를 들어, 제1 발현 벡터 내 중쇄, 제2 발현 벡터 내 경쇄)에 넣거나, 또는 대안적으로 이들 핵산을 동일한 발현 벡터에 넣을 수 있다. 조절 서열의 선택을 비롯한 발현 벡터(들)의 설계는 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자들에 결정될 수 있는 것으로, 당해 기술 분야의 당업자에게 이해될 것이다.
- [0261] 통상적으로, 핵산 및/또는 발현은, 핵산 분자(들)가 (예를 들어, 벡터, 세포 내 가공에 의해 구축된 구조체, 숙주 세포 게놈에 삽입된) 하나 이상의 발현 조절 인자에 작동가능하게 연결되도록, 선택된 숙주 세포에 적합한 임의의 방법 (예를 들어, 형질전환, 형질감염, 전기천공, 감염)을 사용해, 적절한 숙주 세포에 도입하여, 재조합 숙주 세포를 구축할 수 있다. 제조된 재조합 숙주 세포는 발현에 적합한 조건 (예를 들어, 유도인자의 존재

하, 적합한 비-인간성 동물에서, 적절한 염, 성장 인자, 항생제, 영양 보충제 등이 첨가된 적정 배양 배지에서) 하에 유지될 수 있으며, 여기서 코딩된 폴리펩타이드(들)가 만들어진다. 일부 경우, 중쇄가 하나의 세포에서 제조되고, 다른 세포에서 경쇄가 만들어진다.

[0262] 발현 숙주로 이용가능한 포유류 세포주는 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 비-제한적으로 차이나이즈 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary, CHO) 세포, HEK 293 세포, NSO 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장 (BHK) 세포, 원숭이 신장 세포 (COS), 인간 간세포 암종 세포 (예를 들어, Hep G2) 및 다수의 다른 세포주를 비롯하여, 미국 미생물 보존 센터 (ATCC, Manassas, VA)로부터 입수가능한 다수의 불멸화 세포주를 포함한다. 비-제한적인 예로, 박테리아, 효모, 곤충 및 식물 등의 비-포유류 세포도 또한 재조합 항체 발현에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 소 또는 닭과 같은 형질전환 동물에서 생산될 수 있다.

[0263] 통상적인 항체 분자 생물학, 발현, 정제 및 스크리닝 방법들은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 4,816,567, 4,816,397, 6,331,415 및 7,923,221뿐 아니라 Antibody Engineering, edited by Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 and 2010 Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76; 및 Morrison, S. (1985) Science 229:1202를 참조한다.

[0264] 본 발명에 대한 다른 구현예에서, 약학적 조합물의 구성성분 (B)은 이브루티닙 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다. 이브루티닙 (Imbruvica®)은 브루톤의 티로신 키나제 (BTK)에 영구적으로 결합하는 소분자 약물이다. 이는 외투 세포 림프종, 만성 림프성 백혈병 및 발렌스트롬 마크로글로불린 혈증 (비-호지킨 림프종 형태) 과 같은 B 세포 암을 치료하는데 기존에 사용되어 왔다. 이브루티닙의 구조 및 화학식은 아래에 나타낸다:



[0265] (R)-1-(3-(4-아미노-3-(4-페녹시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피페리딘-1-일)프로프-2-en-1-one.

[0266] 이브루티닙은 상품명 Imbruvica®로 판매된다. 이는 Pharmacyclics, Inc. (US)로부터 구입가능하다.

[0267] 약학적 조성물

[0268] 본 발명의 약학적 조합물은 동시 사용, 개별 사용 또는 순차적인 사용을 위한 조합된 조제물 형태이다. 마찬가지로, 본 발명의 방법에서, 약학적 조합물의 구성성분 (A) 및 (B)는 환자에게 동시에, 별도로 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0270] 용어 "조합된 조제물"은 고정된 조합물 (fixed combination) 및 비-고정된 조합물 (non-fixed combination) 둘 다를 포함한다.

[0271] 용어 "고정된 조합물"은 활성 성분 (예, 구성성분 (A) 및 (B))이 단일체 (single entity) 또는 도제지 (dosage) 형태인 것을 의미한다. 다시 말해, 활성 성분은 단일 조성물 또는 제형으로 존재한다.

[0272] 용어 "비-고정된 조합물"은 활성 성분 (예, 구성성분 (A) 및 (B))이 서로 다른 개체 또는 도제지로 (예, 분리된 조성물 또는 제형으로), 예를 들어 부품 키트 (kit of parts)로서 존재하는 것을 의미한다. (바람직한 조성물 또는 제형내) 독립적인 구성성분 (A) 및 (B)는 이후 별도로 또는 순차적으로 동시에 또는 서로 다른 시점에 투여될 수 있다.

[0273] 투여가 순차적인 경우, 제2 구성성분의 투여 지연은 조합물의 사용으로 발생하는 효능의 이점이 없어지지 않도록 하여야 한다. 즉, 일 구현예에서, 순차적인 처리는 조합물의 각 구성성분이 11일 이내의 투여를 포함한다. 다른 구현예에서, 이 기간은 10일이다. 다른 구현예에서, 이 기간은 9일이다. 다른 구현예에서, 이 기간은 8일이다. 다른 구현예에서, 이 기간은 7일 이내이다. 다른 구현예에서, 이 기간은 6일 이내이다. 다른 구현예에서, 이 기간은 5일 이내이다. 다른 구현예에서, 이 기간은 4일 이내이다. 다른 구현예에서, 이 기간은 3일 이내이다. 다른 구현예에서, 이 기간은 2일 이내이다. 다른 구현예에서, 이 기간은 24시간이다. 다른 구현예에

서, 이 기간은 12시간이다.

- [0274] 구성성분 (A) 및 (B)는 임의의 순서로, 예컨대 구성성분 (A)가 먼저 투여된 후 구성성분 (B)가 투여되거나; 또는 구성성분 (B)가 먼저 투여된 후 구성성분 (A)가 투여될 수 있다.
- [0275] 조합된 조제물에서 투여되는 구성성분 (A) : 구성성분 (B)의 총 양의 비율은 달라질 수 있으며, 예를 들어, 환자의 성별, 나이, 체중 등의 이유로 서로 다를 수 있는 한명의 환자의 필요성 또는 치료할 서브 집단의 환자의 필요성에 대처하기 위해, 달라질 수 있다.
- [0276] 구성성분 (A) 및 (B)는, 단일 조성물 또는 개별 조성물에 존재하던 간에, 독립적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 본 발명의 약학적 조합물은 또한 하나 이상의 항-종양제 또는 항-염증제 또는 면역억제제를 포함할 수 있다. 병용 요법에 사용될 수 있는 치료학적 물질의 예들은 본원에 기술된 항체의 사용에 대한 섹션에서 보다 상세하게 기술된다.
- [0277] 본원에서, "약제학적으로 허용가능한 담체"는 생리학적으로 적합한 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의한) 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 피부 투여에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉 항체, 면역접합체 또는 2중 특이성 분자는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산의 작용 및 다른 천연 조건으로부터 화합물을 보호하기 위해 물질 중에 코팅될 수 있다.
- [0278] 구성성분 (A) 및/또는 (B)는 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있다. "약제학적으로 허용가능한 염"은 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 보유하고 임의의 원치 않는 독성학적 효과는 부여하지 않는 염을 지칭한다 [예를 들어, Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19 참조]. 이러한 염의 예로는 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 산 부가 염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등과 같은 무독성 무기 산으로부터 유래된 염뿐 아니라 지방족 모노- 및 다이카르복실산, 페닐-치환 알카논산, 하이드록시 알카논산, 방향족산, 지방족 및 방향족 설폰산 등과 같은 무독성 유기산으로부터 유래된 염을 포함한다. 염기 부가 염으로는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼리 토금속으로부터 유래된 염뿐 아니라, N,N'-다이벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 다이에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등과 같은 무독성 유기 아민으로부터 유래된 것을 포함한다.
- [0279] 본 발명의 약학적 조합물 또는 이의 일부는 또한 약제학적으로 허용가능한 항산화제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 항산화제의 예로는, (1) 수용성 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 소듐 바이셀레이트, 소듐 메타바이셀파이트, 소듐 셀파이트 등; (2) 지용성 항산화제, 예를 들어, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔 (BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트제, 예를 들어 시트르산, 에틸렌디아민 테트라 아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함한다.
- [0280] 본 발명의 약학적 조합물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비-수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적정 혼합물, 식물성 유지류, 예를 들어, 올리브 오일 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레이트 등이 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산제의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써, 그리고 계면활성제를 사용함으로써 유지할 수 있다.
- [0281] 이들 조합물 또는 이의 일부는 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산화제와 같은 보강제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재 방지는 전술한 살균 절차 및 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함시킴으로써 확보할 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 등장제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사가 가능한 약학적 형태의 연장된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 제제를 포함시킴으로써 유도할 수 있다.
- [0282] 약제학적으로 허용가능한 담체는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 주사가 가능한 멸균 용액 또는 분산액의 즉석 제조용 멸균 분말을 포함한다. 약제학적으로 활성인 물질에 이러한 매질 및 물질의 사용은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 물질이 활성 화합물과 혼용가능하지 않은 경우를 제외하고, 본 발명의 약학적 조성물 내 이의 사용이 고려된다. 보충적인 활성 화합물이 또한 조성물에 투입될 수 있다.
- [0283] 치료학적 조성물은 전형적으로 멸균 처리되어야 하며, 제조 및 저장 조건에서 안정적이어야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜 또는 높은 농도의 약물에 적합한 다른 고차 구조로 제형화될 수 있다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등)을 함유하

는 용매 또는 분산 매질, 및 이들의 적절 혼합물일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지시킴으로써, 그리고 계면활성제를 사용함으로써, 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성할 수 있다.

[0284] 주사가 가능한 멸균 용액은, 필요에 따라, 상기에서 열거된 성분들 중 하나 또는 이의 조합과 함께 적절한 용매에 활성 화합물을 필요한 양으로 투입한 후, 멸균 미세여과함으로써 제조할 수 있다. 통상적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기에 열거된 성분들 중 필요한 다른 성분을 포함하는 멸균 비히클에 포함시킴으로써 제조된다. 주사가 가능한 멸균 용액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은, 사전에 멸균 여과된 용액으로부터의 임의의 추가적인 원하는 성분과 활성 성분의 분말을 수득하는, 진공 건조 및 냉동-건조 (동결건조)이다.

[0285] 단일 투여 형태 (single dosage form)를 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료할 대상 및 구체적인 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 통상적으로 치료 효과를 발생시키는 조성물의 양일 것이다. 통상적으로, 그 양은, 100% 중, 약제학적으로 허용가능한 담체와 활성 성분을 합한 양의 약 0.01% 내지 약 99%의 범위, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 1% 내지 약 30%의 범위일 것이다.

[0286] 투여 계획은 최적의 원하는 반응 (예, 상승적인 조합, 치료학적 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 수회 분할된 용량들이 일정한 시간 동안 투여될 수 있거나, 또는 치료 상황의 긴박성에 따라 용량은 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 용량 균일성을 위해, 비경구 조성물을 투여 단위 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서, 투여 단위 형태는 치료할 개체에 대한 단일 투여량 (unitary dosage)으로 물리적으로 구분된 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 필요한 약학적 담체와 함께 원하는 치료 효과를 발휘하도록 계산된 사전 결정된 양으로 활성 화합물을 포함한다. 본 발명의 단위 투여 형태에 대한 사양은 (a) 활성 화합물의 고유한 특성과 달성할 구체적인 치료 효과, 및 (b) 개체에서 민감성을 치료하는 경우 이러한 활성 화합물의 컴파운드 분야에 내재된 한계에 따라 지정되며, 이로 직접적으로 결정된다.

[0287] 항-LY75 또는 항-CD20 항체를 투여하는 경우, 투여량은 숙주 체중의 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 예를 들어, 0.001 내지 50 mg/kg, 0.005 내지 20 mg/kg, 0.01 내지 10 mg/kg, 보다 일반적으로는 0.01 내지 5 mg/kg의 범위이다. 예를 들어, 투여량은 0.05 mg/kg 체중, 0.1 mg/kg 체중, 0.3 mg/kg 체중, 0.3 mg/kg 체중, 0.5 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 2 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 4 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 6 mg/kg 체중, 7 mg/kg 체중, 8 mg/kg 체중, 9 mg/kg 체중, 10 mg/kg 체중, 12 mg/kg 체중, 15 mg/kg 체중, 20 mg/kg 체중, 25 mg/kg 체중, 30 mg/kg 체중이거나, 또는 0.1-20 mg/kg, 0.5-15 mg/kg, 1-10 mg/kg, 2-8 mg/kg, 3-7 mg/kg, 4-6 mg/kg의 범위 이내일 수 있다. 예시적인 치료 용법은 매일 1회, 2일마다 1회, 매주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 매월 1회, 6주마다 1회, 3달마다 1회 또는 3 내지 6개월마다 1회 투여를 포함한다. 본 발명의 항-LY75 항체의 바람직한 투여 계획은 정맥내 투여를 통한 1 mg/kg 체중 또는 3 mg/kg 체중이며, 항체는 다음의 투여 일정 중 하나를 사용하여 제공된다: (i) 4주 간격으로 6회 투여한 후 3개월 간격; (ii) 3주 간격; (iii) 3 mg/kg 체중으로 1회 투여한 후 3주 간격으로 1 mg/kg 체중으로 투여.

[0288] 일부 구현예에서, 항-LY75 항체 (예, LY75-DM4) 투여량은, 0.01 내지 1.5 nM 또는 0.018 내지 1.2 nM (예, 약 0.018, 0.037, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6 또는 1.2 nM)의 혈장 항체 농도를 달성하도록, 조절된다. 바람직하게는, 항-LY75 항체는 0.03 nM 내지 0.30 nM의 혈장 항체 농도를 달성하도록 조절된다.

[0289] 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 10 mg/ml 용액으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 350-400 mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로, 바람직하게는 매주 1회로 정맥내 투여된다. 일부 구현예에서, 항-CD20 항체 (예, 리투시맵) 투여량은 약 2.34 내지 150 nM (예, 약 2.34, 4.68, 9.37, 18.75, 37.5, 75 또는 150 nM)의 혈장 항체 농도를 달성하도록 조절된다. 항-CD20 항체 (예, 리투시맵)은 약 1400 mg/23,400 unit의 투여량으로 피하로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 투여량은 200 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg, 1000 mg 또는 1200 mg이다. 항-CD20 항체 (예, 리투시맵)는 사이클로포스파미드, 하이드록시다우노루비신 (daunorubicin), 온코빈 및 프레디손 또는 프레드니솔론 (즉, CHOP 요법) 중 하나 이상과 함께 투여될 수 있다.

[0290] 일부 구현예에서, 이브루티닙 투여량은 약 15.6 내지 1000 nM (예, 약 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 또는 1000 nM)의 혈장 농도를 달성하도록 조절된다. 다른 구현예들에서, 이브루티닙 투여량은 약 1.56 내지 100 nM (예, 약 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 또는 100 nM)의 혈장 농도를 달성하도록 조절된다. 이브루티닙 투여량은

약 560 mg (예, 140 mg 캡슐제 4개)일 수 있다. 이는 경구 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 이브루티닙 투여량은 약 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg 또는 500 mg이다.

- [0291] 바람직하게는, 구성성분 (A) 및 (B)의 조합물은 상승적인 조합물 (synergistic combination)이다. 당업자라면, 상승적인 조합물이 이 조합물의 효과가 개별 구성성분들의 효과를 합한 것 보다 큰 것으로 이해할 것이다. 상승작용은 슈-탈라라이 조합 지수 (CI)를 사용해 정량할 수 있다 ("Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses", Zhao L, *et al.* Clin Cancer Res. (2004) Dec 1;10(23):7994-8004; 및 "Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design", Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ., J. Natl. Cancer Inst. (1994) Oct 19;86(20):1517-24 참조). 이러한 조합 지수 (CI) 방법은 질량 작용의 법칙의 중간-효과 개념 (median-effect principle)으로부터 유추된 복수의 약물 효과 등식에 기반한다. 이는 강한 상승작용 (CI < 0.3), 상승작용 (CI = 0.3-0.9), 상가 효과 (additive effect) (CI = 0.9-1.1) 또는 길항작용/무-효능 (CI > 1.1)에 대한 정량적인 정의를 제시해주며, 이는 약물 조합물을 자동 시뮬레이션하기 위한 컴퓨터 소프트웨어 알고리즘을 제공해준다. 이는 각 약물 및 이의 조합물의 효능 (D(m) 값)과 약물-효능 곡선의 형태 (m 값) 둘다를 고려한다. 슈-탈라라이 조합 지수 (CI)는 Synergy R package를 사용해 추산할 수 있다 ("Preclinical versus Clinical Drugs Combination Studies", Chou TC. Leuk. Lymphoma. (2008);49(11):2059-2080 및 이에 인용된 참조문헌, 이들 문헌들 모두 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 조합물의 CI는 적합한 세포주, 예를 들어 ABC-DLBC 세포주 (예, TMD8 또는 HBL1)에서, 예를 들어 실시예 26에 사용된 조건 하에 검사할 수 있다.
- [0292] 바람직하게는, 본 발명의 약학적 조합물은, 슈-탈라라이 조합 지수 (CI)가 0.9 미만, 0.8 미만, 0.7 미만, 0.6 미만, 0.5 미만, 0.4 미만, 0.3 미만 또는 0.2 미만인, 상승적인 조합물이다. 바람직하게는, CI는 0.1-0.5, 0.1-0.3 또는 0.1-0.2이다.
- [0293] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조합물의 구성성분 (A) 및 (B)를 치료학적으로-유효한 상승적인 양으로 이를 필요로 하는 환자에게 동시, 개별 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암 치료 방법을 제공한다. 또한, 구성성분 (A) 및 (B)의 상승적인 함량이 암을 치료하기 위해 환자에게 동시, 개별 또는 순차적으로 투여되는, 암 치료에 사용하기 위한 본 발명의 약학적 조합물을 제공한다. 바람직하게는, 구성성분 (A) 및 (B)의 양은 전술한 혈장 농도를 제공하도록 환자에게 제공된다.
- [0294] 또한, 암 치료에 동시, 개별 또는 순차적으로 사용되는 약학적 조합물의 제조에 있어 본 발명의 약학적 조합물의 구성성분 (A) 및 (B)의 상승적인 함량의 용도를 제공한다. 또한, 요법에 사용하기 위한 또는 약제로 사용하기 위한 본 발명의 상승적인 약학적 조합물을 제공한다.
- [0295] 일부 방법에서, 서로 다른 결합 특이성을 가진 2종 이상의 단일클론 항체가 동시에 투여되며, 이 경우 투여되는 각 항체의 투여량은 지정된 범위 이내이다. 항체는 대개 여러가지 상황에 투여된다. 단일 투여 간격은, 예를 들어, 매일, 주 2회, 매주, 매월, 3개월 간격, 6개월 간격 또는 매년 간격일 수 있다. 간격은 또한 환자에서 표적 항원에 대한 항체의 혈액 수준을 측정함으로써 확인되는 바와 같이 불규칙적일 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 약 1-1000 µg/ml, 5-750 µg/ml, 10-600 µg/ml, 15-500 µg/ml, 20-400 µg/ml, 일부 방법의 경우 약 25-300 µg/ml의 혈장 항체 농도를 달성하도록 조정된다.
- [0296] 대안적으로, 항-LY75 및/또는 항-CD20 항체는 지속 방출 제형 (sustained release formulation)으로 투여될 수 있으며, 이 경우 투여 빈도는 적다. 투여량 및 빈도는 환자의 항체 반감기에 따라 달라진다. 통상적으로, 인간 항체는 가장 긴 반감기를 나타내며, 그 다음이 인간화된 항체, 키메라 항체 및 비-인간 항체이다. 투여의 투여량 및 빈도는 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적 용도의 경우에는 상대적으로 적은 투여량이 상대적으로 덜 빈번한 간격으로 장기간에 걸쳐 투여된다. 일부 환자는 남은 생애 동안 치료를 계속 받는다. 치료적 용도의 경우에는, 질환의 진행이 저하 또는 중단될 때까지, 그리고 바람직하게는 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 나타낼 때까지, 상대적으로 짧은 빈도로, 상대적으로 높은 투여량이 때때로 요구된다. 이 후, 환자는 예방적 용법으로 투여받을 수 있다.
- [0297] 환자에게 유해하지 않게, 구체적인 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 바람직한 치료학적 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양이 달성되도록, 본 발명의 약학적 조합물의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 달라질 수 있다. 선택된 투여량 수준은 채택된 본 발명의 구체적인 조성물, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출률, 치료 지속 기간, 다른 약물, 사용된 특정 조성물과 조

합하여 사용되는 화합물 및/또는 물질, 치료 중인 환자의 연령, 성별, 체중, 병태, 전반적인 건강 및 이전 병력 및 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자 등의, 다양한 약동학적 인자에 의해 결정될 것이다.

- [0298] 본 발명의 항-LY75 항체 또는 항-CD20 항체의 "치료학적으로 유효한 투여량"은 바람직하게는 질환 증상의 중증도 감소, 질환의 증상이 없는 기간의 빈도 및 지속 기간의 증가 또는 질환 원인으로 인한 손상 또는 장애의 방지를 달성한다. 예를 들어, LY75 또는 CD20 매개 종양을 치료하기 위해, "치료학적으로 유효한 투여량"은, 바람직하게는, 세포 증식 또는 종양 증식을, 비-치료 개체와 비교해, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 80% 또는 적어도 약 90%까지 저해한다. 종양 증식을 저해하는 화합물의 능력은 인간 종양에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가할 수 있다. 대안적으로, 조성물의 이러한 특성은 세포 증식을 저해하는 화합물의 능력을 검증함으로써 평가할 수 있으며, 이러한 저해는 숙련된 실무자에게 공지된 분석에 의해 시험관 내에서 측정할 수 있다. 치료적 화합물의 치료학적 유효량은 종양 크기를 줄일 수 있거나, 또는 그렇지 않으면 개체에서 증상을 개선할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면 개체의 신체 크기, 개체의 증상의 중증도 및 구체적인 조성물 또는 선택된 투여 경로와 같은 인자에 기초하여, 상기한 함량을 결정할 수 있다.
- [0299] 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야에 공지된 다양한 방법들 중 한가지 방법을 이용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여할 수 있다. 구성성분 (A) 및 (B)는 동일한 경로로 또는 서로 다른 경로로 투여할 수 있다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 투여 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 본 발명에 따른 항체의 바람직한 투여 경로는, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의해, 정맥내, 근육내, 진피내, 복막내, 피하, 척추 또는 다른 비경구 투여 경로를 포함한다. 본원에서, "비경구 투여"라는 표현은, 대개 주사에 의한, 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 비-제한적으로, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 관절낭내, 안내, 심장내, 진피내, 복막내, 경기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0300] 대안적으로, 항-LY75 항체 또는 항-CD20 항체는 비경구가 아닌 경로, 예를 들어, 국소, 피부 또는 점막 투여 경로를 통해, 예를 들어, 비강내, 경구, 질, 직장, 설하 또는 국소적으로 투여될 수 있다.
- [0301] 활성 화합물은, 임플란트, 경피 패치 및 마이크로캡슐화 전달 시스템 등의, 제어 방출 제형과 같은 화합물을 신속하게 방출시키지 않는 담체를 사용해 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성의 생체적합한 폴리머가 사용될 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 많은 방법들이 출원되어 있거나 또는 당업자에게 통상적으로 공지되어 있다 [예를 들어, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y 참조].
- [0302] 치료학적 조성물은 당해 기술 분야에 알려진 의료 디바이스를 사용해 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 일 구현예에서, 구성성분 (A) 및/또는 (B)는 미국 특허 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; 또는 4,596,556에 개시된 디바이스와 같은 니들이 없는 피하 주사 디바이스를 사용해 투여될 수 있다. 본 발명에 이용가능한 잘 알려진 임플란트 및 모듈의 예로는 다음을 포함한다: 제어된 속도로 약제를 분배하기 위한 이식가능한 미세 주입 펌프를 개시한 미국 특허 4,487,603; 피부를 통해 약제를 투여하기 위한 치료적 디바이스를 개시한 미국 특허 4,486,194; 정확한 주입률로 약제를 전달하기 위한 약제 주입 펌프를 개시한 미국 특허 4,447,233; 지속적인 약물 전달을 위한 이식가능한 가변 유동성 주입 장치를 개시한 미국 특허 4,447,224; 다중 챔버 구획을 구비한 삼투성 약물 전달 시스템을 개시한 미국 특허 4,439,196; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 개시한 미국 특허 4,475,196. 이들 특허는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 다수의 다른 임플란트, 전달 시스템 및 모듈들도 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되어 있다.
- [0303] 특정 구현예에서, 항-LY75 및/또는 항-CD20 항체는 적절한 생체내 분배를 보장하도록 제형화될 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽 (BBB)은 많은 고 친수성 화합물을 배제한다. 치료적 화합물이 (원하는 경우) BBB를 통과하도록 보장하기 위해, 화합물은, 예를 들어, 리포솜 내에 제형화될 수 있다. 리포솜 제조 방법은, 예를 들어, 미국 특허 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331을 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 수송되어, 표적화된 약물 전달을 강화할 수 있는, 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다 [예를 들어, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685 참조]. 예시적인 표적화 모이어티로는 플레이트 또는 비오틴 (예를 들어, 미국 특허 5,416,016 참조); 만노시드 [Umezawa *et al.* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]; 항체 [P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]; 계면활성제 단백질 A 수용체 [Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]; p120

[Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090] 등이 있으며, 또한 K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273을 참조한다.

- [0304] 용도 및 방법
- [0305] 본원에서, "개체"라는 용어는 인간 및 인간이 아닌 동물을 포함하는 것으로 의도된다. 인간이 아닌 동물은 모든 척추 동물, 예를 들어, 포유류 및 비-포유류, 예를 들어, 인간을 제외한 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 바람직한 개체는 LY75 활성 및/또는 CD20 활성에 의해 매개되는 장애를 가진 인간 환자를 포함한다.
- [0306] 본 방법은 비정상적인 LY75 발현 및/또는 CD20 발현과 관련된 장애를 가진 인간 환자를 치료하는데 특히 적합하다. LY75가 종양 세포 상에서 발현됨을 감안하면, 본 발명의 조합물 및 방법은 종양 형성 장애, 예를 들어, LY75를 발현하는 종양 세포의 존재를 특징으로 하는 장애를 가진 개체를 치료하거나, 또는 예를 들어 백혈병, 예로, 만성 림프구성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병, 비-호지킨 림프종, 예로, DLBCL, B 세포 림프종, 소포성 림프종, 외투 세포 림프종, 점막 관련 림프 조직 (MALT)의 림프종, T 세포/조직구 풍부 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 림포형질세포 림프종, 소림프구 림프종, 변연부 림프종, T 세포 림프종, 말초 T 세포 림프종, 역형성 대세포성 림프종 및 혈관면역모세포 T 세포 림프종 등의, 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에 사용될 수 있다. LY75는, 아래 실시예 5 및 7에 예시된 바와 같이, 항체 결합시 내재화되는 것으로 입증되었으므로, 따라서 항-LY75 항체는 임의의 페이로드 (payload) 작용 기전, 예를 들어, ADC 접근법, 방사면역접합체 또는 ADEPT 접근 방식으로 사용할 수 있다.
- [0307] 통상적으로 ADC로서 투여되는 항-LY75 항체는, LY75 기능을 저해 또는 차단하기 위해 사용될 수 있으며, 이는 특정 질환 증상의 예방 또는 완화와 연결될 수 있으며, 즉 질환의 매개인자로서의 LY75를 암시한다. 이는, 항체와 LY75 간에 복합체를 형성시킬 수 있는 조건 하에, 샘플 및 대조군 샘플을 항-LY75 항체와 접촉시킴으로써, 달성할 수 있다. 항체와 LY75 간에 형성된 임의의 복합체를 샘플 및 대조군에서 검출 및 비교한다.
- [0308] 항체 조성물 (예를 들어, 단일클론 항체 및 면역접합체)을 생체내 및 시험관내 투여하기에 적합한 경로는 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있으며, 당업자가 선택할 수 있다. 예를 들어, 항체 조성물은 (예를 들어, 정맥 내 또는 피하) 주사에 의해 투여할 수 있다. 사용되는 분자의 적정 투여량은 개체의 연령과 체중 및 항체 조성물의 농도 및/또는 제형에 따라 결정될 것이다.
- [0309] 앞서 언급한 바와 같이, 항-LY75 항체 및/또는 항-CD20 항체는 하나 이상의 다른 치료학적 물질, 예를 들어, 세포독성 물질, 방사독성 물질 또는 면역억제 물질과 함께 공동-투여될 수 있다. 항체는 (면역복합체로서) 상기한 물질에 연결되거나, 또는 상기 물질과는 별개로 투여될 수 있다. 후자 (별개 투여)의 경우, 항체는 상기 물질의 투여 전, 투여 후 또는 동시에 투여될 수 있거나, 또는 다른 공지된 치료, 예를 들어, 항암 요법, 예를 들어, 방사선과 공동-투여될 수 있다. 이러한 치료학적 물질로는 특히 자체적으로 환자에게 독성 또는 아독성인 수준에서만 효과적인, 항-신생물성 물질, 예를 들어, 독소루비신 (아드리아마이신 (adriamycin)), 시스플라стин, 블레오마이신 설페이트, 카무스틴 (carmustine), 클로람부실 (chlorambucil) 및 사이클로포스파미드 하이드록시우레아 등이 있다. 시스플라стин은 100 mg/kg 용량으로 4주 간격으로 1회씩 정맥내 투여되며, 아드리아마이신은 60-75 mg/ml 용량으로 21일 간격으로 1회로 정맥내 투여된다. 본 발명의 항체와 공동-투여하기에 적합한 다른 물질로는 암, 예를 들어, 위암, 직장결장암, 전립선암, 유방암, 난소암 또는 폐암의 치료에 사용되는 기타 물질, 예를 들어 아바스틴 (Avastin<sup>®</sup>), 5FU 및 겐시타빈 (gemcitabine) 등이 있다. 본 발명의 항-LY75 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 화학요법제와의 공동-투여는, 인간 종양 세포에 세포 독성 효과를 나타내는 서로 다른 기전을 통해 작용하는, 2가지 항암제를 제공한다. 이러한 공동-투여는 항체에 비-반응성 있게 할 수 있는 약물 내성 발생 또는 종양 세포의 항원성 변화로 인한 문제를 해결할 수 있다.
- [0310] 본 발명의 약학적 조합물은 또한 혈청 및/또는 보체와 함께 투여될 수 있다. 이러한 조성물은, 보체가 항체와 매우 인접하게 위치될 때 유리할 수 있다. 대안적으로, 항체 및 보체 또는 혈청은 별도로 투여될 수 있다.
- [0311] 또한, 구성성분 (A) 및 (B)을 사용 설명서와 함께 포함하는 키트도 본 발명의 범위에 포함된다. 키트는 면역억제 시약, 세포독성 물질 또는 방사독성 물질과 같은 하나 이상의 부가적인 시약, 또는 하나 이상의 부가적인 항체 (예, 제1 항체와는 다른 LY75 항원 내 에피토프에 결합하는 상보적인 활성을 가진 항체)를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0312] 이에, 본 발명의 약학적 조합물을 이용해 치료되는 환자는, 항체의 치료 효과를 강화 또는 높이는, 세포독성 물질 또는 방사독성 물질과 같은, 다른 치료학적 물질을 (본원에 기술된 항체의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투

여 후) 추가적으로 투여받을 수 있다.

- [0313] 다른 구현예에서, 개체는, 예를 들어, 개체를 사이토카인으로 치료함으로써 Fc $\gamma$  또는 Fc $\gamma$  수용체의 발현 또는 활성을 조절, 예를 들어, 강화 또는 저해하는 물질로 추가적으로 치료받을 수 있다. 다중 특이성 분자를 이용한 치료시 투여하기 바람직한 사이토카인으로는 과립구 콜로니-자극인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극인자 (GM-CSF), 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 및 종양 괴사 인자 (TNF)를 포함한다.
- [0314] 본원에 인용된 모든 참조 문헌, 비-제한적인 예로, 모든 논문, 간행물, 특허, 특허 출원, 프리젠테이션, 문서, 보고서, 원고, 브로셔, 책, 인터넷 포스팅, 저널 기사, 정기 간행물, 제품 자료표 등은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 본원에서, 참조 문헌에 대한 언급은 단지 문헌의 저자가 제시한 주장을 요약하기 위한 것이며, 임의의 참조 문헌이 선행 기술을 구성하고, 출원인이 인용된 참조 문헌의 정확성 및 적절성에 대해 이의를 제기할 권리가 있다고 용인하는 것은 아니다.
- [0315] 전술한 본 발명이 이해를 명확하게 하기 위한 목적으로 예시적이고 예를 드는 방식으로 일부 상세히 기술되어 있지만, 당해 기술 분야의 당업자라면 청구항의 범위 및 사상으로부터 이탈하지 않으면서도 본원의 교시 내용에 비추어 일부 수정 및 변경을 가할 수 있음이 자명할 것이다.
- [0316] 본 발명은 후술한 실시예를 들어 추가로 설명되지만, 실시예들은 추가적인 한정으로서 해석되어서는 안된다.
- [0317] 실시예 1: LY75-항원에 대한 인간 단일클론 항체 제조
- [0318] 표준 절차에 따라, 마우스 (이종마우스 IgG1)를 전장 LY75로 형질감염된 CHO 세포로 면역화하였다.
- [0319] LY75에 대해 생성된 항체의 특이성을 LY75로 형질감염된 HEK293 세포, 이어서 LY75를 발현하는 HT29 세포에서 유세포 분석법으로 시험하였다. 세포 표면 LY75 단백질에 결합하는 항체의 능력을 시험하기 위해, 항체를 LY75를 발현하는 세포와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 완충액 (DPBS, 2% FBS)으로 세척하고, 원심분리한 다음 1차 LY75 항체 희석액 (또한 FACS 완충액에 희석됨) 100  $\mu$ l에 재현탁하였다. 항체-세포주 복합체를 얼음 위에서 60분간 인큐베이션한 다음 전술한 바와 같이 FACS 완충액으로 2번 세척하였다. 세포-항체 펠렛을 이차 항체 희석액 (또한 FACS 완충액에 희석됨) 100  $\mu$ l에 재현탁하였고, 얼음 위에서 60분간 인큐베이션하였다. 펠렛을 상기와 같이 세척한 다음 200  $\mu$ l FACS 완충액에 재현탁하였다. 시료를 BD FACScanto II 유세포 분석기에 로딩하고, BD FACSDiva 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다 (결과는 도시 안함).
- [0320] 실시예 2: LY75에 대한 단일클론 항체의 구조 특징 분석
- [0321] LY75\_A1 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA 서열을 표준 PCR 기법으로 획득하고, 이를 표준 DNA 서열분석 기법으로 서열분석하였다.
- [0322] 항체 서열은 돌연변이화 되어 하나 이상의 잔기에서 생식계열 잔기로 역 복귀될 수 있다.
- [0323] LY75\_A1의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 3 및 1에 나타난다.
- [0324] LY75\_A1의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 4 및 2에 나타난다.
- [0325] LY75\_A1 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교한 바, LY75\_A1 중쇄는 인간 생식계열 V<sub>H</sub> 3-15 유래의 V<sub>H</sub> 세그먼트 및 인간 생식계열 J<sub>H</sub> JH4 유래의 J<sub>H</sub> 세그먼트를 이용하는 것으로 확인되었다. 카바트 시스템에 따른 CDR 영역 결정시 LY75\_A1 V<sub>H</sub> 서열을 추가적으로 분석한 바, 각각 서열번호 5, 6 및 7에 나타난 바와 같은 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역이 확인되었다. 생식계열 V<sub>H</sub> 3-15 및 생식계열 J<sub>H</sub> JH4 서열에 대한 LY75\_A1 CDR1, CDR2 및 CDR3 V<sub>H</sub> 서열 정렬을 도 1에 나타낸다.
- [0326] LY75\_A1 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교한 바, LY75\_A1 경쇄는 인간 생식계열 V<sub>K</sub> 012 유래의 V<sub>K</sub> 세그먼트 및 인간 생식계열 J<sub>K</sub> JK4 유래의 J<sub>K</sub> 세그먼트를 이용하는 것으로 확인되었다. 카바트 시스템에 따른 CDR 영역 결정시 LY75\_A1 V<sub>K</sub> 서열을 추가적으로 분석한 바, 각각 서열번호 8, 9 및 10에 나타난 바와 같은 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역이 확인되었다. 생식계열 V<sub>K</sub> 012 및 생식계열 J<sub>K</sub> JK4 서열에 대한 LY75\_A1 CDR1, CDR2 및 CDR3 V<sub>K</sub> 서열의 정렬을 도 2에 나타낸다.
- [0327] 실시예 3: LY75에 대한 단일클론 항체를 이용한 면역조직화학
- [0328] LY75에 특이적인 인간 단일클론 항체를 이용해, FFPE HT-29 및 A549 세포 펠렛, FFPE 비-호지킨 림프종 및 췌장

암 어레이, 및 신선하게 동결된 림프종/백혈병 종양, 난소암, 췌장암 및 유방암 조직 절편 및 정상 조직 어레이를 대상으로 면역조직화학을 수행하였다.

- [0329] *재료 및 방법*
- [0330] *재료*
- [0331] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 크실렌 (X5P-1 gal).
- [0332] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 Histoprep 100% 에탄올 (HC-800-1 GAL).
- [0333] Thermo Scientific (MA, USA) 사의 열 유도 에피토프 회수 (heat induced epitope retrieval)용 10x 시트레이트 완충제 (AP9003125).
- [0334] Thermo Scientific (MA, USA) 사의 Thermo Scientific\* Pierce\* 퍼옥시다제 억제제 (35000).
- [0335] Dako (CA, USA) 사의 무혈청성 단백질 차단제 (X0909)
- [0336] 2차 항체: Jackson ImmunoResearch (PA, USA) 사의 염소 항-인간 IgG Fab-FITC 접합체 (109-097-003)
- [0337] Jackson ImmunoResearch (PA, USA) 사의 크롬 순수 인간 IgG, 전체 분자 (09-000-003)
- [0338] 3차 항체: Abcam (MA, USA) 사의 마우스 항-FITC (ab10257)
- [0339] R&D Systems (MN, USA) 사의 정제된 인간 IgG 이소형 대조군 (1-001A)
- [0340] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 Tween-20 (BP337-100)
- [0341] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 아세톤 (BP2403-4)
- [0342] Dako (CA, USA) 사의 Dual Link EnVision+ HRP-접합된 폴리머, 마우스 및 토끼 (K4063).
- [0343] Invitrogen (NY, USA) 사의 DAB 2-용액 키트 (882014).
- [0344] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 해리스 헤마톡실린 (23-245-677).
- [0345] Dako (CA, USA) 사의 파라마운트 마운팅 매질 (S302580).
- [0346] 조직 절편 및 어레이는 US Biomax Inc. (MD, USA) 또는 Origene (MD, USA)사에서 구입하였다.
- [0347] *FFPE 슬라이드 제작: 탈파라핀화 및 재수화*
- [0348] FFPE 슬라이드를 크실렌 (2 x 3분) 중에 파라핀 제거한 다음 1:1 크실렌: 100% 에탄올 (1 x 3분), 100% 에탄올 (2 x 3분), 95% 에탄올 (1 x 3분), 70% 에탄올 (1 x 3분), 50% 에탄올 (1 x 3분), 및 수돗물 (1 x 3분)에 의해 재수화 처리하였다.
- [0349] FFPE 슬라이드의 제조: 항원 복원 (마이크로파).
- [0350] LY75 항원을 1x 시트레이트 완충액 50 mL 중에서 끓을 때까지 고 전력의 마이크로파 열을 적용한 다음 10분간 저 전력으로 조사하여, 코플린 자 (Coplin jar)에서 복원하였다. 그런 다음 슬라이드를 상온으로 냉각되도록 추가적으로 15분간 방치한 다음, 3분간 수돗물로 세척하였다. 소수성 배리어 펜으로 각각의 조직 절편/TMA 주위로 원을 그린 다음 슬라이드를 PBS에서 세척 당 3분씩 3번 세척하였다.
- [0351] *FF 슬라이드 제조*
- [0352] 슬라이드를 -80°C 저장고로부터 꺼내, 상온에서 흡 후드 (fume hood) 하에 20-30분간 건조시켰다. 슬라이드를 -20°C에서 빙랭한 아세톤에서 10분간 고정된 다음 상온에서 흡 후드에서 20분간 건조시켰다. 슬라이드를 PBS에서 각각 3분씩 3번 세척 및 재수화하였다. 소수성 배리어 펜으로 조직 절편의 윤곽을 그렸다.
- [0353] *항체 복합체의 제조*
- [0354] 일차 항-LY75 항체를 무혈청 단백질 차단제 (SFPB)에 희석하여, 원하는 최종 농도의 20배 농도의 (최종 1 µg/mL의 경우 20 µg/mL) 용액을 수득하였다. 이차 항체인 염소 항-인간 면역글로불린 G (IgG) 항원 결합 단편 (Fab)을 SFPB에서 마찬가지로 제조하여 동일한 농도의 용액을 준비하였다.
- [0355] 동일한 부피의 일차 및 이차 항체를 라벨링된 튜브에서 조합하여, 부드럽게 혼합하고, 상온에서 3분간 인큐베이

선하여, 원하는 최종 농도보다 10배 높은 일차 항체 농도 (최종 1 µg/mL의 경우 10 µg/mL)로 만들었다. 이 혼합물을 SFPB로 1:5로 희석하여 부드럽게 혼합한 다음 상온에서 30분간 인큐베이션하여, 원하는 최종 농도의 2배 인 일차 항체 농도 (최종 1 µg/mL의 경우 2 µg/mL)를 수득하였다.

[0356] 최종 염색 복합체를 형성하기 위해, 인간 IgG의 1% (10 µg/µL) 용액을 SFPB로 제조하였고 동일한 부피로 일차/이차 항체 혼합물에 첨가하였다. 이러한 조합물을 부드럽게 혼합하고 상온에서 30분간 인큐베이션한 다음, 일차/이차 항체 혼합물의 일차 항체 농도의 절반으로 희석하여 원하는 최종 일차 항체 농도 (1 µg/mL)를 수득하였다.

[0357] *면역염색*

[0358] 가슴 챔버에서 조직을 RT로 퍼옥시다제 억제제와 5-10분간 인큐베이션하여, 내인성 조직 퍼옥시다제 활성을 차단하였다. 그런 다음, 슬라이드를 PBS로 각 3분씩 3번 세척하였다. 조직을 가슴 챔버에서 상온에서 30분간 SFPB 중에 인큐베이션하였다. 최종 염색 복합체를 각 조직 단편 및/또는 마이크로어레이에 적용하였으며, 슬라이드를 가슴 챔버 내에서 30분간 상온에서 인큐베이션하였다. 그런 다음, 슬라이드를 PBS로 1회, PBST (PBS+0.125% Tween-20)로 1회, 각각 3분씩 세척하였다. 가슴 챔버에서, 3차 항체인 마우스 항-FITC를 2 µg/mL 농도로 상온에서 30분간 적용하였다. 그 후, 조직 단편을 PBS로 1회, PBST로 1회로 각각 3분씩 세척하였다. Dual Link EnVision+ 항-마우스/토끼-HRP-접합 폴리머를, 그런 다음, 조직에 적용하여, 슬라이드를 가슴 챔버에서 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그런 다음 슬라이드를 PBS로 1회, PBST로 1회로 각각 3분씩 세척하였다. 조직을 상온에서 제조사의 지침에 따라 제조한 DAB 용액 중에 10분간 인큐베이션하였다. 슬라이드를, 그런 다음 흐르는 수돗물로 2분간 1번, PBS로 3분간 1번 세척하였다. 슬라이드를 상온에서 30초간 헤마톡실린으로 대조 염색하고, 흐르는 수돗물로 세척하였다. 슬라이드를 상온에서 30분간 건조시키고, 파라마운트 마운팅 매질 (Faramount mounting media)을 사용해 커버슬립을 슬라이드 위에 탑재하였다.

[0359] *결과*

[0360] LY75\_A1은 FFPE 3중 음성 유방암 시료에서 양성으로 나타났으며, 조직 절편들 중 77%가 양성 염색 결과를 나타내었고, 55%는 강한 (+++) 염색 결과를 나타내었다.

[0361] FF 정상 조직에서 LY75에 대한 염색 결과는 통상적으로 없거나 낮았다. 유방의 도관 표피, 침샘, 및 폐장에서는 현저하게 낮은 염색 내지는 중간 정도의 염색성이 관찰되었고, 비장에서는 낮은 양성 수준으로 염색되었다. 따라서, LY75에 대한 항체는 검사한 암의 일부에서, 가능하게는 LY75의 발현을 나타내는 다른 암 타입들에서 진단제 및 치료제로서 유용할 수 있다.

[0362] 실시예 4: HT-29 세포에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0363] *재료*

[0364] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (Cell stripper) (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).

[0365] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).

[0366] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).

[0367] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).

[0368] *방법*

[0369] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스피ن 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.

[0370] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50 µl/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비처리 시료의 경우) 배지 (50 µl/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200 µl/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.

[0371] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100 µl/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). 100 µl/웰 PBS 및 100 µl Cell titer glo를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여

혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 판독하였다.

[0372] **결과**

[0373] 도 3a에 도시된 결과는, HT-29 세포의 세포 사멸을 유도할 수 있는, LY75에 결합하는 것으로 알려진, 항체의 하위 집단을 보여준다. 이는, 항체가 DM1과 접합되었을 때, LY75에 결합하여 약간의 효능을 나타냄을 시사한다. 향후 세포독성 활성 분석을 위해 하위 집단에서 항체를 선택하였다.

[0374] 실시예 5: 직장결장암 세포에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0375] **재료**

[0376] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (Cell stripper) (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).

[0377] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).

[0378] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).

[0379] Promega (W1, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).

[0380] **방법**

[0381] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스피ن 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.

[0382] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.

[0383] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). 100  $\mu$ l/웰 PBS 및 100  $\mu$ l Cell titer glo를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 판독하였다.

[0384] **결과**

[0385] 도 3b는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 HT-29 세포에 대한 세포독성 활성을 보여준다. 이러한 결과는 항체 농도 및 독소가 접합된 다른 항-LY75 항체 (실시예 1로부터 선택됨)와 비례하여 세포독성 활성이 증가함을 입증해준다.

[0386] 실시예 6: 림프종 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0387] **재료**

[0388] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (Cell stripper) (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).

[0389] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).

[0390] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).

[0391] Promega (W1, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).

[0392] **방법**

[0393] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스피ن 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.

[0394] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하

여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.

[0395] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). PBS 100  $\mu$ l/웰 및 Cell titer glo 100  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 판독하였다.

[0396] *결과*

[0397] 도 3c는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 RAJI 세포에 대한 세포독성 활성을 보여준다. 도 3d는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 Namalwa 세포에 대한 세포독성 활성을 보여준다. 도 3e는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 Karpas 299 세포에 대한 세포독성 활성을 보여준다. 이들 결과는, 항체 농도 및 DM1 및 DM4가 접합된 다른 항-LY75 항체 (실시에 1로부터 선택됨)에 비례하여 세포독성 활성이 증가됨을 입증해준다.

[0398] 실시에 7: 웨장암 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0399] *재료*

[0400] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).

[0401] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).

[0402] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).

[0403] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).

[0404] *방법*

[0405] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스피ن 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.

[0406] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배수 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.

[0407] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). PBS 100  $\mu$ l/웰 및 Cell titer glo 100  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 판독하였다.

[0408] *결과*

[0409] 도 3f는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 BxPC3 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 도 3g는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 HupT4 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 도 3h는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 HPAFFII 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 이들 결과는 항체 농도 및 DM1 및 DM4가 접합된 다른 항-LY75 항체 (실시에 1로부터 선택됨)에 비례하여 세포독성 활성이 증가됨을 입증해준다.

[0410] 실시에 8: 만성 림프구성 백혈병 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0411] *재료*

[0412] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).

[0413] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).

- [0414] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).
- [0415] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).
- [0416] **방법**
- [0417] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스핀 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.
- [0418] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배수 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0419] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). PBS 100  $\mu$ l/웰 및 Cell titer glo 100  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 판독하였다.
- [0420] **결과**
- [0421] 도 3i는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 EHEB 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 도 3j는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 Mec-1 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 이들 결과는 항체 농도 및 DM1 및 DM4가 접합된 다른 항-LY75 항체 (실시에 1로부터 선택됨)에 비례하여 세포독성 활성이 증가됨을 입증해 준다.
- [0422] 실시에 9: 급성 단핵구성 백혈병 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능
- [0423] **재료**
- [0424] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056C1).
- [0425] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).
- [0426] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).
- [0427] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).
- [0428] **방법**
- [0429] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스핀 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.
- [0430] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배수 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0431] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). PBS 100  $\mu$ l/웰 및 Cell titer glo 100  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 판독하였다.
- [0432] **결과**
- [0433] 도 3k는 DM1 및 DM4가 접합된 항-LY75 항체의 AML-193 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 이 결과는 항체 농도 및 DM1 및 DM4가 접합된 다른 항-LY75 항체 (실시에 1로부터 선택됨)에 비례하여 세포독성 활성이 증

가됨을 입증해준다.

[0434] 실시예 10: 유방암 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0435] 재료

[0436] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).

[0437] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).

[0438] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).

[0439] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).

[0440] 방법

[0441] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스핀 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.

[0442] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배수 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.

[0443] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). PBS 100  $\mu$ l/웰 및 Cell titer glo 100  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 관독하였다.

[0444] 결과

[0445] 도 31은 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 HCC 70 (ER 음성, PR 음성 및 Her2 음성) 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 도 3m은 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 HCC 1806 (ER 음성, PR 음성 및 Her2 음성) 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 도 3n은 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 MDA-MB-468 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 이들 결과는 항체 농도에 비례하여 세포독성 활성이 증가됨을 입증해준다.

[0446] 실시예 11: 방광암 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0447] 재료

[0448] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).

[0449] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).

[0450] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).

[0451] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).

[0452] 방법

[0453] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스핀 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.

[0454] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배수 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.

[0455] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포

를 펠렛화함). PBS 100  $\mu$ l/웰 및 Cell titer glo 100  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 관독하였다.

[0456] *결과*

[0457] 도 3o는 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 RT4 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 도 3p는 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 5637 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 도 3q는 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 SW780 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 이들 결과는 항체 농도에 비례하여 세포독성 활성이 증가됨을 입증해준다.

[0458] 실시예 12: 두경부암 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0459] *재료*

[0460] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).

[0461] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).

[0462] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).

[0463] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).

[0464] *방법*

[0465] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스핀 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.

[0466] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배수 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.

[0467] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). PBS 100  $\mu$ l/웰 및 Cell titer glo 100  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 관독하였다.

[0468] *결과*

[0469] 도 3r은 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체의 SCC-9 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 이들 결과는 항체 농도에 비례하여 세포독성 활성이 증가됨을 입증해준다.

[0470] 실시예 13: 식도암 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0471] *재료*

[0472] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).

[0473] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).

[0474] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).

[0475] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).

[0476] *방법*

[0477] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스핀 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.

- [0478] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배수 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0479] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). PBS 100  $\mu$ l/웰 및 Cell titer glo 100  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 판독하였다.
- [0480] **결과**
- [0481] 도 3s는 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 OE 19 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 이들 결과는 항체 농도에 비례하여 세포독성 활성이 증가됨을 입증해준다.
- [0482] 실시예 14: 난소암 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능
- [0483] **재료**
- [0484] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).
- [0485] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).
- [0486] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).
- [0487] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).
- [0488] **방법**
- [0489] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다. 5e3 세포/웰을 펠렛으로 스피ن 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라, 10e3 세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에 1e5 세포/mL의 농도로 재현탁하였다.
- [0490] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에 50  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배수 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 (50  $\mu$ l/웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 (200  $\mu$ l/웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0491] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고 100  $\mu$ l/웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). PBS 100  $\mu$ l/웰 및 Cell titer glo 100  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 판독하였다.
- [0492] **결과**
- [0493] 도 3t는 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 OVCAR-3 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 도 3u는 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 SK-OV-3 세포에서의 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 이들 결과는 항체 농도에 비례하여 세포독성 활성이 증가됨을 입증해준다.
- [0494] 실시예 15: 다발성 골수종 세포주에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능
- [0495] **재료**
- [0496] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 세포 스트리퍼 (비-효소적 세포 해리) (MT-25-056CI).
- [0497] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 PBS pH 7.4 (1X) (SH30028LS).
- [0498] Fisher Scientific (PA, USA) 사의 RPMI 1640 배지 (MT-10-041-CM).
- [0499] Promega (WI, USA) 사의 Cell Titer Glo (G7572).

- [0500] 방법
- [0501] 세포를 세포 스트리퍼로 회수하여 계수하였다.  $5 \times 10^3$  세포/웰을 펠렛으로 스핀 다운시켰다 (현탁 세포의 경우, 세포의 배가 시간에 따라,  $10 \times 10^3$  세포/웰과 같은 더 많은 양이 사용될 수 있음). 펠렛을 배양 배지에  $1 \times 10^5$  세포/mL의 농도로 재현탁하였다.
- [0502] 세포 현탁액을 백색 측면과 투명한 바닥을 구비한 96웰 플레이트의 웰에  $50 \mu\text{l}$ /웰로 첨가하였다. 항체를 희석하여, 0-20 nM의 농도 (시험 농도의 2배)에 상응하는 8가지 농도로 적정 (3배수 적정)하였다. 희석 항체 또는 (비-처리 시료의 경우) 배지 ( $50 \mu\text{l}$ /웰)를 적정 웰에 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해 과량의 배지 ( $200 \mu\text{l}$ /웰)를 플레이트의 바깥쪽 행과 열에 첨가하였다. 플레이트를  $37^\circ\text{C}$ 에서 72시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0503] 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 상온에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 동안 Cell Titer Glo 용액을 해동시켰다. 플레이트를 털고  $100 \mu\text{l}$ /웰 PBS로 1번 세척하였다 (현탁 세포의 경우, 우선 플레이트를 원심분리하여 세포를 펠렛화함). PBS  $100 \mu\text{l}$ /웰 및 Cell titer glo  $100 \mu\text{l}$ 를 각각의 웰에 첨가하고, 트리투레이션하여 혼합하였다. 플레이트를 암 조건에서 15분간 상온에서 인큐베이션하였으며, 효과적인 세포 용해 발생을 확인하기 위해 현미경으로 가시화하였다. 그런 다음 플레이트를 Glomax 광도계에서 관독하였다.
- [0504] 결과
- [0505] 도 3v는 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 MOLP-8 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 도 3w는 DM1- 및 DM4-접합된 항-LY75 항체들의 RPMI8226 세포에 대한 세포독성 활성을 나타낸 것이다. 이들 결과는 항체 농도에 비례하여 세포독성 활성이 증가됨을 입증해준다.
- [0506] 실시예 16: Raji 이종이식 모델에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능
- [0507] LY75\_DM1 및 LY75\_DM4의 효능을 피하 Raji 버킷 림프종 SCID 마우스 이종이식 모델에서 시험하였다.
- [0508] 면역결핍 SCID 마우스에 Raji (인간 버킷 림프종) 종양 세포를 피하로 접종하였다. 종양을 확립시키고, 마우스를 군 당 3-6마리씩 5개의 처리군으로 분류하였다. 평균 종양 체적이 군 당  $129-132 \text{ mm}^3$ 의 평균 크기에 도달하면, 각 군에 지정된 투여량으로 다음 화합물 중 하나를 정맥 내 투여로 처리하였다: 1군 (비히클; 포스페이트 완충화된 염수 (PBS)); 2군 (LY75\_DM1;  $10 \text{ mg/kg}$ ), 3군 (이소형 대조군-DM1;  $10 \text{ mg/kg}$ ), 4군 (LY75\_DM4;  $5 \text{ mg/kg}$ ), 5군 (이소형 대조군-SPBDDM4;  $5 \text{ mg/kg}$ ). 2차 투여량을 1주일 후 투여하였다. 체중 (BW)을 모니터링하였으며, 마우스의 건강 및 유해 부작용을 자주 검사하고, 종양은 매주 2회 측정하였다. 종양이  $2000 \text{ mm}^3$ 의 종양 체적 종료점에 도달하였을 때 또는 60일 후 (어느 쪽이든 빠른 시기), 마우스를 안락사시켰다. ADC-처리 마우스 대 PBS-처리 마우스에서 종양 증식 지연 (TGD), 종료점까지의 시간 (TTE) 종양값 증가 및 카플란 마이어 (Kaplan Meier) 생존 곡선 차이에 대한 로그 순위 분석으로 효능을 결정하였다. 종료점에 먼저 도달한 비히클-처리 대조군 마우스 5마리에서, 종양을 샘플로 취하였으며, 이는 포르말린 고정 및 파라핀 포매에 의해 가공처리하였다.
- [0509] 결과
- [0510] 도 4a는, LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 각각, Raji 버킷 림프종 SCID 마우스 이종이식 모델에 대해, 대조군과 비교해, 유의한 항-종양 활성 및 유의하게 연장된 생존성을 나타내었음을 보여준다; 그러나, LY75\_DM4  $5 \text{ mg/kg}$  용량이 LY75\_DM1의  $10 \text{ mg/kg}$  용량보다 유의하게 더욱 효과적이었으며, 마우스 6마리 중 5마리에서 완전하지만 일시적인 종양 퇴행이 나타났다. 모든 처치는 충분히 허용적이었으며, 어떠한 임상적인 독성의 징후도 관찰되지 않았다. 이러한 데이터는, LY75에 대하여 유도된 ADC, 예를 들어 LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 인간 비-호지킨 림프종 암 환자를 치료하는데 임상적인 효과를 제공할 가능성이 있음을 시사해준다.
- [0511] 실시예 17: Namalwa 이종이식 모델에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능
- [0512] LY75\_DM1 및 LY75\_DM4의 효능을 피하 Namalwa 버킷 림프종 SCID 마우스 이종이식 모델에서 시험하였다.
- [0513] 면역결핍 SCID 마우스에 피하로 Namalwa (인간 버킷 림프종) 종양 세포를 접종하였다. 종양을 확립시키고, 마우스를 군 당 6마리씩 5개의 처리군으로 분류하였다. 평균 종양 체적이 군 당 평균 크기  $114 \text{ mm}^3$ 에 도달하면, 각 군에 지정된 투여량으로 하기 화합물 중 하나를 정맥 내로 투여하였다: 1군 (비히클; 포스페이트 완충화된 염수

(PBS)); 2군 (LY75\_DM1; 10 mg/kg), 3군 (이소형 대조군-DM1; 10 mg/kg), 4군 (LY75\_DM4; 5 mg/kg), 5군 (이소형 대조군-SPBDDM4; 5 mg/kg). 체중 (BW)을 모니터링하고, 마우스에서 건강 및 유해한 부작용을 자주 검사하였으며, 매주 2회 종양을 측정하였다. 종양이 2000 mm<sup>3</sup>의 종양 체적 종료점에 도달하였을 때 또는 60일 후 어느 쪽이든 빠른 시점에, 마우스를 안락사시켰다. ADC-처리 마우스 대 PBS-처리 마우스에서 종양 증식 지연 (TGD), 종료점까지의 시간 (TTE) 종양값 증가 및 카플란 마이어 (Kaplan Meier) 생존 곡선 차이에 대한 로그 순위 분석으로 효능을 결정하였다. 종료점에 먼저 도달한 비히클-처리 대조군 마우스 5마리에서 종양 샘플을 수집하고, 포르말린 고정 및 파라핀 포매에 의해 가공처리하였다.

[0514] 결과

[0515] 도 4b는, LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 각각, Namalwa 버킷 림프종 SCID 마우스 이종이식 모델에서, 대조군과 비교해, 유의한 항-종양 활성 및 생존 연장성을 나타냄을 보여준다; 그러나, LY75\_DM4 용량 5 mg/kg이 LY75\_DM1 10 mg/kg 용량보다 유의한 수준으로 보다 효과적이었으며, 종양 체적의 일시적인 감소를 유발하였다. 모든 처치는 충분히 허용적이었으며 어떠한 임상적인 독성의 징후도 관찰되지 않았다. 이러한 데이터는 LY75에 대하여 유도된 ADC, 예를 들어, LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 인간 비-호지킨 림프종 암 환자의 치료에 임상적인 혜택을 제공할 가능성이 있음을 시사해준다.

[0516] 실시예 18: 췌장암 이종이식 모델에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0517] LY75\_DM1 및 LY75\_DM4의 효능을 피하 HPAFII 췌장 선암종 무흉선 누드 마우스 이종이식 모델에서 시험하였다.

[0518] 면역결핍 무흉선 누드 마우스에 HPAFII (인간 췌장 선암종) 종양 세포를 피하로 접종하였다. 종양을 확립시키고, 마우스를 군 당 6마리씩 5개의 처리군으로 분류하였다. 평균 종양 체적이 군 당 ~114 mm<sup>3</sup>의 평균 크기에 도달하면, 각 군에 지정된 투여량으로 하기 화합물 중 하나를 정맥 내로 투여하였다: 1군 (비히클; 포스페이트 완충화된 염수 (PBS)); 2군 (LY75\_DM1; 10 mg/kg), 3군 (이소형 대조군-DM1; 10 mg/kg), 4군 (LY75\_DM4; 5 mg/kg), 5군 (이소형 대조군-SPBDDM4; 5 mg/kg). 체중 (BW)을 모니터링하고, 마우스에서 건강 및 유해한 부작용을 자주 검사하였으며, 매주 3번 종양을 측정하였다. 종양이 종양 체적 종료점 2000 mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 또는 90일 경과시, 이중 빠른 시점에 마우스를 안락사시켰다. 효능은, ADC로 처리된 마우스 대 PBS로 처리된 마우스에서, 종양 체적에 대한 치료 효과 및 카플란 마이어 생존 곡선 차이에 대한 로그 순위 분석으로 결정하였다. 비히클-처리 대조군 마우스로부터 종양 샘플을 취하여, 포르말린 고정 및 파라핀 포매에 의해 가공 처리하였다.

[0519] 결과

[0520] 도 4c는, 대조군과 비교해, LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 HPAFII 누드 마우스 이종이식 모델에서 유의하고 유사한 강력한 항종양 활성 및 생존 연장성을 나타내었음을 보여준다. 모든 처치는 충분히 허용적이었으며 어떠한 임상적인 독성의 징후도 관찰되지 않았다. 이러한 데이터는 LY75에 대하여 유도된 ADC, 예를 들어 LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 인간 췌장암 환자를 치료하는데 임상적인 이점을 제공할 가능성이 있음을 시사해준다

[0521] 실시예 19: 방광암 이종이식 모델에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0522] LY75\_DM1 및 LY75\_DM4의 효능을 피하 SW780 인간 방광 암종 SCID 마우스 이종이식 모델에서 시험하였다.

[0523] 면역결핍 무흉선 누드 마우스에 피하로 HPAFII (인간 췌장 선암종) 종양 세포를 접종하였다. 종양을 확립시키고, 마우스를 군 당 6마리씩 5개의 처리군으로 나누었다. 평균 종양 체적이 평균 크기 ~114 mm<sup>3</sup>/군에 도달하면, 각 군에 지정된 투여량으로 하기 화합물 중 하나를 정맥 내로 투여하였다: 1군 (비히클; 포스페이트 완충화된 염수 (PBS)); 2군 (LY75\_DM1; 1 mg/kg), 3군 (LY75\_DM1; 2.5 mg/kg), 4군 (LY75\_DM1; 5 mg/kg), 5군 (LY75\_DM4; 1 mg/kg), 6군 (LY75\_DM4; 2.5 mg/kg), 7군 (LY75\_DM4; 5 mg/kg), 8군 (이소형 대조군-SPBDDM4; 5 mg/kg). 체중 (BW)을 모니터링하고, 마우스에서 건강 및 유해한 부작용을 자주 검사하였으며, 매주 3번 종양을 측정하였다. 종양이 종양 체적 종료점 2000 mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 또는 90일 경과시, 이중 빠른 시점에 마우스를 안락사시켰다. 효능은, ADC로 처리된 마우스 대 PBS로 처리된 마우스에서, 종양 체적에 대한 치료 효과 및 카플란 마이어 생존 곡선 차이에 대한 로그 순위 분석으로 결정하였다. 비히클-처리 대조군 마우스로부터 종양 샘플

을 취하여, 포르말린 고정 및 파라핀 포매에 의해 가공 처리하였다.

[0524] 결과

[0525] 도 4d는, 대조군과 비교해, LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 SW780 nude 마우스 이종이식 모델에서 유의하고 유사한 강력한 항종양 활성 및 생존 연장성을 나타내었음을 보여준다. 모든 처치는 충분히 허용적이었으며 어떠한 임상적인 독성의 징후도 관찰되지 않았다. 이러한 데이터는 LY75에 대하여 유도된 ADC, 예를 들어 LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 인간 방광암 환자를 치료하는데 임상적인 이점을 제공할 가능성이 있음을 시사해준다.

[0526] 실시예 20: 유방암 이종이식 모델에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체의 효능

[0527] LY75\_DM1 및 LY75\_DM4의 효능을 피하 MDA-MB-468 무흉선 nude 마우스 이종이식 모델에서 시험하였다.

[0528] 면역결핍 무흉선 nude 마우스에 피하로 MDA-MB-468 (3중 음성의 인간 유방 선암종) 종양 세포를 접종하였다. 종양을 확립시키고, 마우스를 군 당 10마리씩 7개의 처리군으로 나누었다. 평균 종양 체적이 평균 크기 167 mm<sup>3</sup> / 군, 각 군에 지정된 투여량으로 하기 화합물 중 하나를 정맥 내로 투여하였다: 1군 (비히클; 20 mM 소듐 숙시네이트, pH 5.0, 6% 트레할로스, 0.04% 폴리소르베이트); 2군 (LY75\_DM1; 5 mg/kg), 3군 (LY75\_DM1; 10 mg/kg), 4군 (LY75\_DM4; 5 mg/kg), 5군 (LY75\_DM4; 2.5 mg/kg), 6군 (LY75\_DM4; 1 mg/kg), 7군 (이소형 대조군-DM4; 5 mg/kg). 체중 (BW)을 모니터링하고, 마우스에서 건강 및 유해한 부작용을 자주 검사하였으며, 매주 2회로 종양을 측정하였다. 종양 접종 후 82일째에 마우스를 안락사시켰다. ADC로 처리된 마우스 대 PBS로 처리된 마우스에서, 항-종양 활성 (치료군의 평균 종양 크기/대조군의 평균 종양 크기 x 100) 및 종료점까지의 평균 소요 시간 (TTE)의 증가를 통해 효능을 결정하였다. 접종 후 71일째에 비히클-처리 대조군 마우스에서 가장 큰 종양 5개에서 샘플을 취하고, 이를 포르말린 고정 및 파라핀 포매로 가공하였다.

[0529] 결과

[0530] 도 4e는, 대조군과 비교해, LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 각각 MDA-MB-468 nude 마우스 이종이식 모델에서 현저한 항종양 활성을 나타내었음을 보여준다. 용량 의존적인 활성이 LY75\_DM4에서 관찰되었으며, 2.5 및 5 mg/kg이 1 mg/kg 보다 훨씬 더 효과적이었다. 5 mg/kg의 경우, LY75\_DM1 및 LY75\_DM4 둘다 비슷한 효과를 나타내었다. LY75\_DM1 10 및 5 mg/kg, LY75\_DM4 5 및 2.5 mg/kg에서 평균 종양 체적의 지속적인 퇴행이 관찰되었다. 모든 처치는 충분히 허용적이었으며, 어떠한 임상적인 독성의 징후도 관찰되지 않았다. 이러한 데이터는 LY75에 대하여 유도된 ADC, 예를 들어 LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 인간 3중 음성 유방암 환자를 치료하는데 임상적인 이점을 제공할 가능성이 있음을 시사해준다.

[0531] 실시예 21: 직장결장암 이종이식 모델에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4-접합된 항-LY75 단일클론 항체 항체의 효능

[0532] LY75\_DM1 및 LY75\_DM4의 효능을 피하 COLO205 결장직장 선암종 무흉선 nude 마우스 이종이식 모델에서 시험하였다.

[0533] 면역결핍 무흉선 nude 마우스에 피하로 COLO205 (인간 결장직장 선암종) 종양 세포를 접종하였다. 종양을 확립시키고, 마우스를 군 당 6마리씩 5개의 처리군으로 나누었다. 평균 종양 체적이 군 당 평균 크기 117 mm<sup>3</sup>에 도달하면, 각 군에 지정된 투여량으로 하기 화합물 중 하나를 정맥 내로 투여하였다: 1군 (비히클; 포스페이브 완충화된 염수 (PBS)); 2군 (LY75\_DM1; 10 mg/kg), 3군 (이소형 대조군-DM1; 10mg/kg), 4군 (LY75\_DM4; 5 mg/kg), 5군 (이소형 대조군-DM4; 5 mg/kg). 2번째 투여량은 1차 투여 후 12일 경과시 투여하였다. 체중 (BW)을 모니터링하고, 마우스에서 건강 및 유해한 부작용을 자주 검사하였으며, 매주 2번 종양을 측정하였다. 종양이 종양 체적 종료점 1000 mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 또는 60일 경과시, 이중 빠른 시점에 마우스를 안락사시켰다. 효능은, ADC-처리 마우스 대 PBS-처리 마우스에서, 종양 증식 지연 (TGD), 종료점까지의 시간 (TTE) 증양값 증가 및 카플란 마이어 생존 곡선 차이에 대한 로그 순위 분석으로 결정하였다. 종료점에 먼저 도달한 비히클-처리 대조군 마우스 5마리에서, 종양 샘플을 취하여 포르말린 고정 및 파라핀 포매에 의해 가공 처리하였다.

[0534] 결과

[0535] 도 4f는, 대조군과 비교해, LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 COLO205 결장직장 선암종 nude 마우스 이종이식 모델에서 비슷한 정도의 항종양 활성 및 생존 연장성을 나타내었음을 보여준다. 모든 처치는 충분히 허용적이었으며, 어떠한 임상적인 독성의 징후도 관찰되지 않았다. 이러한 데이터는 LY75에 대하여 유도된 ADC, 예를 들어

LY75\_DM1 및 LY75\_DM4가 인간 결장직장암 환자를 치료하는데 임상적인 이점을 제공할 가능성이 있음을 시사해준다.

[0536] 실시예 22: 시노몰구스 원숭이에서 DM1-접합된 항-LY75 단일클론 항체 및 DM4에 접합된 항-LY75 단일클론 항체의 독성

[0537] 수컷 원숭이 6마리를, 군 당 2마리씩 실험에 배정하였다. 비히클 (PBS), LY75\_DM4 (절단가능) 또는 LY75\_DM1 (절단불가)을 0 mg/kg/용량 (PBS, 비히클), 5 mg/kg/용량 (LY75\_DM4, 절단가능) 또는 10 mg/kg/용량 (LY75\_DM1, 절단가능하지 않음)으로 15분 정맥내 주입에 의해 2번 (1일 및 29일) 투여하였다. 독성 역학 평가를 위해 투여 개시 (1일) 전, 그리고 각 투여 후 1, 2, 3, 7, 14, 21 및 28일에 혈액 샘플을 수집하였다. 임상 병리학 분석을 위한 혈액 샘플은 투여 개시 (1일) 전, 그리고 각 투여 후 1, 3, 7, 14, 21 및 28일에 (1차 투여 후 28일은 2차 투여에 대한 사전 투여 시점이 됨) 수집하였다. 57일째에 마지막 혈액 수집 후, 모든 실험 동물을 안락사시키고, 부검하였다. 각 혈액 드로우로부터 분리된 혈장을 분리하여, 냉동시키고, 이를 ELISA에 의해 ADC 농도 분석을 위해 Oxford BioTherapeutics, Inc 사로 이송하였다.

[0538] 치료-관련 임상 병리학적 결과는 가벼운 재생성 빈혈 및 혈액 림프구 프로파일에서의 일시적인 감소, 특히 호중구 카운트의 일시적인 감소를 포함하였다. 빈혈은 5 mg/kg LY75\_DM4로 처리된 동물 2마리와 10 mg/kg LY75\_DM1으로 처리된 2마리 중 1마리에서 관찰되었다. 투여한지 1주일 후에 최저치를 보인 후 빠르게 수치 회복을 나타내는 중증의 호중구 감소증이 모든 동물들에서 관찰되었는데; 절대 호중구 카운트의 최저값은 LY75\_DM4 처리된 동물에서 더 낮았다. APTT 및 PT 응집 파라미터에 대해서는 시험 물질과 관련된 효과는 없었다. 혈청의 화학적 변화로 5 mg/kg LY75\_DM4 및 10 mg/kg LY75\_DM1의 투여 후 AST, CK, LDH (각 치료군에서 2마리 중 1마리에서) 및 글로빈의 일시적인 증가가 나타났다. 또한, 간 특이 효소 ALT의 일시적인 증가가 LY75\_DM4 처리 동물에서만 관찰되었다. 혈청의 화학적 파라미터에서 증가가 지속되는 기간이 짧고 및/또는 그러한 수준의 증가는 이것이 유해하지 않았다는 것을 의미한다. 시험 물질과 관련된 요 검사에서 특이 사항은 없었다. 4주의 회복 기간 후 부검하여 조사한 바, 처치 관련 육안으로 관찰되는 병리학적 특이 사항 또는 절대적 및 상대적 장기 중량 변화는 없었다. 갑상샘 (소포 내 콜로이드 형태에서의 변형) 및 신장 (외피 내 확장된 소관)에서만 조직병리학적 결과가 최소한의 중증도로 평가되었으며; 다른 실험 파라미터의 변화와 무관하였으며; 유해하지 않는 최소한의 독성학적 유의성을 나타내었다. 결론: 5 mg/kg LY75\_DM4 또는 10 mg/kg LY75\_DM1 2가지 용량의 반복 투여 치료는 시노몰구스 원숭이에서 충분히 허용적이다. 치료-관련 모든 독성 결과들은 4주간의 회복 기간 후 회복되었다.

[0539] 실시예 23: 경쟁적 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 결합 분석에 의한 LY75 A1 의 에피토프 특성 분석

[0540] 방법

[0541] COLO205 세포 (ATCC, 카탈로그 # CCL-222)를 세포 스트리퍼 (Cellgro, 카탈로그 # MT-25-056CI)를 사용해 조직 배양 플라스크로부터 떼어내었다. 세포를 FACS 완충액 (PBS + 2% FBS)으로 세척 및 재현탁하고, 증식 배지로 중화한 다음 계수하였다. 세포를 V자형 바닥의 96웰 플레이트에 웰 당 세포 50,000개로 접종하였다. 세포를 FACS 완충액 (PBS (Fisher, 카탈로그 # SH30028-03) + 2% FBS)으로 1회 세척하였다. 250 nM에서 시작해 3배수로 연속 희석하면서 항-LY75-mAb (실시예 1로부터 선택됨) 또는 LY75\_A1을 웰에 첨가하고, 45분간 얼음 위에 둔 상태로 해당 웰에 적용하였다. 모든 시험 조건에서 최종 염색이 동시에 완료될 수 있도록, 단일 또는 다중 염색 단계가 필요한 시험 웰을, 적절한 경우 FACS 완충액 중에 방치하였다. 대조군으로서 2개의 웰을 염색하지 않은 채로 FACS 완충액 중에 두었다.

[0542] 세포를 차단 항체와 인큐베이션한 후, FACS 완충액으로 2번 세척하였다. 세포를 MCC-DM1-접합된 항-LY75-mAb (1 nM)를 함유하는 FACS 완충액에 재현탁하고, 얼음 위에 두어 45분간 인큐베이션하였다. 세포를 상기와 같이 세척하고, 1 µg/ml 마우스 항-메이탄신 항체가 첨가된 FACS 완충액에 재현탁하여, 얼음 위에서 45분간 인큐베이션하였다. 세포를 상기와 같이 세척하고, 2 µg/ml 염소 항-마우스 카파 RPE를 포함하는 FACS 완충액에 재현탁하였다. 세포를 얼음 위에서 45분간 인큐베이션한 다음 상기와 같이 세척하였다. 세포를 웰 당 200 µl로 FACS 완충액에 재현탁하였다. 각 샘플의 평균 형광 강도를 Guava EasyCyte Plus HT 유세포 분석기 (96 웰 플레이트 포맷)를 사용해 측정하고, 원 데이터를 Guava Cytosoft로 분석하였다.

[0543] 결과

[0544] 도 5a는 항-LY75-mAb-MCC-DM1을 이용한 차단이 항-LY75-mAb의 결합을 감소시킴을 보여준다. COLO205 세포에 대한 LY75\_A1의 결합성 분석에서, LY75\_A1은 항-LY75-mAb-MCC-DM1의 결합을 차단할 수 없는 것으로 나타났다 (도 5b 참조). 즉, 항-LY75-mAb 및 LY75\_A1은 비-경쟁적인 항체이고, LY75\_A1은 다른 항-LY75 항체의 에피토프와는

다른 고유한 LY75의 에피토프를 인식하는 것으로, 확인할 수 있었다.

[0545] 실시예 24 펩타이드 마이크로 어레이 분석에 의한 LY75 A1의 에피토프 특성 분석.

[0546] 방법

[0547] 펩타이드 마이크로어레이 분석은 LC Sciences (Houston TX)에서 수행하였으며, 간략하게는 이 방법은 다음의 단계들을 포함한다: - 전장 LY75 단백질의 216번에서 1666번까지의 잔기들에 걸쳐져 있는, 하나의 아미노산 중첩을 가진 LY75 단백질의 연속적인 8 mer 펩타이드를 합성하고, 마이크로어레이 칩에 고정하였다. 이 칩은 실험을 3개의 반복 세트로 수행할 수 있도록 3개의 패널로 구성된다. 항체가 결합된 펩타이드를 식별하기 위해 마이크로어레이에 LY75\_A1을 어드레스하였다. 하기 조건에서 결합 분석을 수행하였다: - 3개의 반복 세트로 연속적인 펩타이드를 포함하는 마이크로어레이를 결합 완충액 1 ml로 4°C에서 20분간 세척하였다. 그런 다음, 마이크로어레이를 결합 완충액 (pH 7.0) 중에서 1 µg/mL LY75\_A1과 함께 4°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 어레이를 다시 세척 완충액 0.5 ml로 4°C에서 30분간 세척한 다음 결합 완충액 (pH 7.0) 내에서 25 ng/mL 항-인간 IgG 알렉사 647 접합체와 함께 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 어레이를 다시 세척 완충액 0.5 ml로 4°C에서 30분간 세척하였다.

[0548] 그런 다음, 어레이를 PMT 500에서 635 nm에서 스캔하였고, 신호 강도를 기록하였다. 만일 펩타이드가 적어도 2/3 레갈 듀플리케이트 (legal duplicate)로 존재한다면 펩타이드를 검출가능한 것으로 분류하였다. 듀플리케이트의 평균 신호 강도를 최종 신호 강도로 기록하였다.

[0549] 결과

[0550] 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 항체 LY75\_A1는 어레이 상에 위치한 다수의 펩타이드에 대해 특이적인 결합성을 나타내었다. LY75\_A1 결합성에 대해 관찰된 최고 신호는 25000 (스케일 1-65535)이었으며, 어레이 상의 전체 스팟의 평균 신호는 약 885이었다. 신호 강도 3000을 비-특이적 결합에 백그라운드 컷 오프 값으로 설정하였다. 관찰된 항체 결합 신호 강도 수치를 토대로, LY75\_A1에 대한 에피토프를 형성할 가능성이 있는 서열을 식별하였다. 이들 영역은 도 6a 내지 6j 및 서열번호 22-31에 나타난다.

[0551] 실시예 25 LY75 A1 펩타이드 풀 다운 분석 (Peptide pull down assay)

[0552] 방법

[0553] 1.1 풀 다운 분석

[0554] 재조합 LY75 단백질을 비드 상 트립신 단백질 가수분해 (on-bead tryptic proteolysis, Promega, US)에 의해 분해하였다. 수득된 절단 펩타이드는 C18 포획 컬럼 (Thermo Fisher Scientific)을 사용해 회수하였다. 그런 다음, 정제된 펩타이드를 LY75A1 항체와 가교된 단백질 A 비드 200 µl와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 결합되지 않은 펩타이드를 수집하고, 비드를 PBS 1 ml로 2번 세척하였다. 펩타이드에 결합된 항체를 PBS 100 µl 중에서 90°C에서 5분 가열하여 비드로부터 용리시켰다. 이러한 용리 단계를 반복 실시하였다.

[0555] 1.2 질량 분광분석

[0556] 샘플을 nanoACQUITY UPLC BEH 130 C18 컬럼 (75 µm x 250 mm (186003545)) 및 LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific)가 장착된 Waters nanoACQUITY UPLC 시스템을 사용한 액체 크로마토그래피-질량 분광분석으로 분석하였다. 펩타이드를 120분에 걸쳐 아세트니트릴 3% → 35%으로 증가시키는 300 nl/분 농도 구배를 적용해 용리시켰다. 풀-스캔 질량 스펙트럼을 Orbitrap에서 400-2000 m/z 질량 범위에서 해상도 60000로 입수하였다. 각 사이클에서, 장치에 장착된 나노분무 이온 소스를 구비한 선형 이온 트랩에서 CID MS/MS 스캔하기 위해 가장 강한 펩타이드 20개를 선택하였다.

[0557] 1.3 펩타이드의 아미노산 서열 분석

[0558] LTQ Orbitrap Velos로부터 생성된 원 데이터를, Mascot 알고리즘 (Curr Biol. 1993 Jun 1 ;3 (6):327-3)을 사용하는 Mascot 소프트웨어 (Matrix Science)로 처리하여, Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), IPI ([www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html](http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html)) 및 SwissProt (<http://www.uniprot.org>)로 구성된 서열 데이터베이스에서 검색함으로써 피크 리스트로부터 아미노산 서열을 추정하였다. 펩타이드 식별을 위한 범주로 트립신 분해, 최대 2개의 절단부 소실 및 다양한 생물학적 및 화학적 변형 (산화된 메티오닌, MMTS 또는 아이오도아세트아미드에 의한 시스테인 변형 및 세린, 트레오닌 및 티로신의 인산화)을 포함시켰다. 예상치 0.05% 이하, 이온 스코어 28 이상인 1 순위로 매겨진 펩타이드를 OGAP 데이터베이스에 로딩하였다

[0559] 1.4 LY75와 관련된 펩타이드의 구분

[0560] LY75를 식별하기 위한 프로세스는 전술한 바와 같이 질량 분광분석기에 의해 실험적으로 취득된 천연적인 인간 단백질의 펩타이드 서열을 사용하여, 공개된 인간 게놈 서열에서 코딩 엑손을 식별 및 조직화한다. 이러한 실험적으로 결정된 서열을 가공 처리 및 펩타이드 질량, 펩타이드 시그니처, EST 및 국제 특허 출원 W02009/087462에 기술된 바와 같은 공개된 도메인 유전체 서열 데이터 입력에 의해 편집된, OGAP® 데이터베이스와 비교하였다.

[0561] 결과

[0562] 항체 LY75\_A1를 이용한 펩타이드 풀다운 분석의 결과는 아래 표 1 및 도 7에 나타낸다. 마이크로어레이 분석 및 풀다운 분석의 펩타이드 용리물 1a 및 1b 둘다에서 식별된 펩타이드를 에피토프를 형성할 가능성이 가장 높은 후보로 간주하였다.

[0563] 표 1: 펩타이드 마이크로어레이 및 펩타이드 풀 다운 실험의 비교

표 1

서열번호	마이크로어레이에 의해 동정된 펩타이드	풀 다운 분석에 의해 동정된 펩타이드
	영역 1 (aa609-618)	-
	영역 2 (aa651-662)	-
46	영역 3 (aa761-780)	GWHFYDDR (765-772)
47	영역 4 (aa883-901)	ISEWPIDHFTYSR(877-890)
48		FPVTFGEECLYMSAK(896-910)
49	영역 5 (aa1029-1040)	ELTYSNFHPLLVSGR(1030-1044)
50	영역 6 (aa1077-1093)	HFVSLCQK (1084-1091)
51	영역 7 (aa1107-1118)	QTLQNASETVK (1099-1109)
	영역 8 (aa1368-1378)	-
	영역 9 (aa1518-1528)	-
	영역 10 (aa1535-1554)	-

[0565] 표 1은 복수의 중첩성 LY75 펩타이드 영역들이 펩타이드 마이크로어레이 분석과 펩타이드 풀 다운 분석의 용리물 1 a 및 1 b 둘다에서 식별되었음을 보여준다. 이들 영역은 적용된 두 가지 기법에 의해 검사한 LY75\_A1에 결합하므로, 항체 LY75\_A1에 의해 인지되는 에피토프를 함유할 가능성이 가장 높은 것으로 보인다.

[0566] 실시예 26

[0567] 활성화된 B 세포 미만성 라지 B 세포 림프종 (ABC-DLBCL) 세포주 (즉 TMD8 및 HBL1 세포주) 여러개를, LY75\_DM4 (즉 0.018 - 0.037 - 0.075 - 0.15 - 0.3 - 0.6 - 1.2 nM)의 용량을 증가시키면서 단독으로 또는 리톡시맵 (2.34 - 4.68 - 9.37 - 18.75 - 37.5 - 75 - 150) 또는 이브루티닙 (15.6 - 31.2 - 62.5 - 125 - 250 - 500 - 1000 nM)의 용량을 증가시키면서 이와 조합하여, 72시간 동안 이에 노출시켰다. 이후, MTT [3-(4,5-다이메틸티아졸릴-2)-2,5-다이페닐테트라졸륨브로마이드] 분석을 수행하였다.

[0568] 슈-탈라라이 조합 지수 (CI)를 시너지 R 패키지 (Preclinical versus Clinical Drugs Combination Studies. Chou TC. Leuk. Lymphoma. 2008;49(11):2059-2080)를 사용해 추정하였다. 이는 강한 상승작용 (<0.3), 상승작용 (0.3-0.9), 상가 효과 (0.9-1.1) 및 길항 효과/효능 없음 (> 1.1)에 대한 정량적인 정의를 제공해준다.

[0569] 도 8A-B는 LY75\_DM4와 리톡시맵 간에 관찰된 상승적인 효과를 나타낸 것이다. 도 9는 LY75\_DM4와 이브루티닙 간에 관찰된 상승적인 효과를 나타낸 것이다. 관련 데이터는 아래 표 2, 3 및 4에 나타낸다.

[0570] 표 2: TMD8 ABC-DLBCL 세포주 3종에서 리톡시맵과의 조합시 여러가지 용량의 LY75\_DM4의 슈-탈라라이 조합 지수 (CI).

표 2

번호	리톡시맵 (nM)	LY75_DM4 (nM)	CI
1	2.3438	0.01875	17.124
2	2.3438	0.075	0.225
3	2.3438	0.15	0.346

4	2.3438	0.3	0.583
5	2.3438	0.6	1.165
6	2.3438	1.2	2.514
7	2.3438	0.0375	0.145
8	4.6875	0.01875	1.499
9	4.6875	0.0375	0.147
10	4.6875	0.075	0.216
11	4.6875	0.15	0.346
12	4.6875	0.3	0.628
13	4.6875	0.6	1.165
14	4.6875	1.2	2.514
15	9.375	0.01875	2.918
16	9.375	0.0375	0.144
17	9.375	0.075	0.219
18	9.375	0.15	0.332
19	9.375	0.3	0.583
20	9.375	0.6	1.025
21	9.375	1.2	2.514
22	18.75	0.01875	0.8
23	18.75	0.0375	0.145
24	18.75	0.075	0.213
25	18.75	0.15	0.346
26	18.75	0.3	0.628
27	18.75	0.6	1.165
28	18.75	1.2	2.514
29	37.5	0.01875	11.427
30	37.5	0.075	0.216
31	37.5	0.15	0.332
32	37.5	0.3	0.583
33	37.5	0.6	1.165
34	37.5	1.2	2.655
35	37.5	0.0375	0.151
36	75	0.01875	0.216
37	75	0.0375	0.147
38	75	0.075	0.209
39	75	0.15	0.332
40	75	0.3	0.628
41	75	0.6	1.165
42	75	1.2	2.514
43	150	0.01875	45.466
44	150	0.0375	0.152
45	150	0.075	0.209
46	150	0.15	0.332
47	150	0.3	0.628
48	150	0.6	1.257
49	150	1.2	2.770

[0572] 표 3: HBL-1 ABC-DLBCL 세포주 3종에서 리투시맵과의 조합시 여러가지 용량의 LY75\_DM4의 슈-탈라라이 조합 지수 (CI).

**표 3**

번호	리투시맵 (nM)	LY75_DM4 (nM)	CI
1	2.3438	0.0188	0.534
2	2.3438	0.0750	0.958
3	2.3438	0.1500	0.603
4	2.3438	0.3000	0.509
5	2.3438	0.6000	0.454

6	2.3438	1.2000	0.817
7	2.3438	0.0375	0.413
8	4.6875	0.0188	0.568
9	4.6875	0.0375	0.837
10	4.6875	0.0750	0.919
11	4.6875	0.1500	0.635
12	4.6875	0.3000	0.580
13	4.6875	0.6000	0.501
14	4.6875	1.2000	0.908
15	9.375	0.0188	0.249
16	9.375	0.0375	1.576
17	9.375	0.0750	0.717
18	9.375	0.1500	0.439
19	9.375	0.3000	0.618
20	9.375	0.6000	0.501
21	9.375	1.2000	0.908
22	18.75	0.0188	0.787
23	18.75	0.0375	0.497
24	18.75	0.0750	0.562
25	18.75	0.1500	0.545
26	18.75	0.3000	0.510
27	18.75	0.6000	0.366
28	18.75	1.2000	0.817
29	37.50	0.0375	0.734
30	37.50	0.0750	0.548
31	37.50	0.0188	0.543
32	37.50	0.1500	0.465
33	37.50	0.3000	0.476
34	37.50	0.6000	0.324
35	37.50	1.2000	0.648
36	75	0.0188	0.442
37	75	0.0375	1.578
38	75	0.0750	0.432
39	75	0.1500	0.493
40	75	0.3000	0.383
41	75	0.6000	0.409
42	75	1.2000	0.908
43	150	0.0188	0.680
44	150	0.0375	0.640
45	150	0.0750	0.911
46	150	0.1500	0.498
47	150	0.3000	0.355
48	150	0.6000	0.366
49	150	1.2000	0.817

[0574] 표 4: HBL-1 ABC-DLBCL 세포주 3중에서 이브루티닙과의 조합시 여러가지 용량의 LY75 DM4의 슈-탈라라이 조합 지수 (CI).

표 4

[0575]

번호	이브루티닙 (nM)	LY75_DM4 (nM)	CI
1	1.5625	0.01875	0.481
2	1.5625	0.0375	0.627
3	1.5625	0.075	0.862
4	1.5625	0.15	0.360
5	1.5625	0.3	0.287
6	1.5625	0.6	0.270
7	1.5625	1.2	0.343

8	3.125	0.01875	0.411
9	3.125	0.0375	0.358
10	3.125	0.075	0.461
11	3.125	0.15	0.287
12	3.125	0.3	0.251
13	3.125	0.6	0.246
14	3.125	1.2	0.394
15	6.25	0.01875	0.204
16	6.25	0.0375	0.219
17	6.25	0.075	0.275
18	6.25	0.15	0.226
19	6.25	0.3	0.216
20	6.25	0.6	0.222
21	6.25	1.2	0.343
22	12.5	0.01875	0.205
23	12.5	0.0375	0.152
24	12.5	0.075	0.287
25	12.5	0.15	0.217
26	12.5	0.3	0.228
27	12.5	0.6	0.222
28	12.5	1.2	0.343
29	25	0.01875	0.152
30	25	0.0375	0.183
31	25	0.075	0.202
32	25	0.15	0.199
33	25	0.3	0.193
34	25	0.6	0.222
35	25	1.2	0.343
36	50	0.01875	0.374
37	50	0.0375	0.473
38	50	0.075	0.287
39	50	0.15	0.192
40	50	0.3	0.194
41	50	0.6	0.246
42	50	1.2	0.394
43	100	0.01875	0.715
44	100	0.0375	0.748
45	100	0.075	0.457
46	100	0.15	0.187
47	100	0.3	0.195
48	100	0.6	0.222
49	100	1.2	0.394

[0576] 서열:

표 5

[0577]

서열번호	설명	서열
1	A1_VH aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRISKTDGGTTDYAAPVQGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTIFGVVSFDYWGQGLVTVSS
2	A1_VL aa	DVQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISDYLSWYQQRPGKAPNLLIYAASNLKTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYCQSYRSPWTFGQGTKVEIKR
3	A1_VH nt	gaggtgcagctggtggagtctggggaggcttggtaaagccgggggggtccttagactctcctgtgcagcctctggcttcacttacagtaacgcctggatgagctgggtccgccaggctccagggaagggctggagtgggtggccgtataaaagcaaaactgatgggtgggacaacagactacgctgcaccctgcaaggcagattccacatctcaagatgatcaaaaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacagccgtgtattactgtacgattttggagtggtagctttgactactggggccagggaacacctggtcacgctcctca

4	A1_VL nt	gacgtccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgttggagacagagtaccatcacttgcc gggcaagt cagagcat tagcgact at ttaagt tggat cagcagagaccaggaaagcccctaacctcct gatctatgctgcatccaat ttaagactggggtcccatcaaggttcagtgccagtgcatctgggacagat ttcactctcaccatcagcactctgcaacctgaagatttgcacgtactactgtcaacagagt tacaggt ccccgtggacgttcggccaagggaccaaggtggaatcaaacga
5	A1_VH_CDR1 aa	NAWMS
6	A1_VH_CDR2 aa	RIKSKTDGGTTDYAAPVQG
7	A1_VH_CDR3 aa	FGVVSFDY
8	A1_VL_CDR1 aa	RASQISDYLS
9	A1_VL_CDR2 aa	AASNLKT
10	A1_VL_CDR3 aa	QQSYRSPWT
11	VH3 3-15/D4 411	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIRKSKTDGGTTDYAAPVKGRF TISRDDSKNTLYQMNSLKTEDTAVVYCTTTT
12	JH4	YFDYWGGTGLVTVSS
13	O12	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQSYS
14	JK1	WTFGQGTKVEIKR
15	LY75 (DEC-205)	MRTGWATPRRPAAGLLMLLFWFFDLAEPSSGRAANDPFTIVHGNTGKCIKPVYGWIVADDCDETEDKLWQWV SQHRLFHLHSQKCLGLDITKSVNELRMFSCDSSAMLWWKCEHHSLYGAARYRLALKDGHGTAISNASDWW KKGSEESLCDQPYHEIYTRDGNYSYGRPCFPFLIDGTWHHDCILDEHDSGPWCATTLNVEYDRKWI KPENGCEDNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSWKEAYVSCQNQGADLLSINSAEALTYLKEKEGIAKIFWIGL NQLYSARGWEWSDHKPLNFLNWDPRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFCEAQLPYVCRKPLNNTVEL TDVWVYSDTRCDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKAHAKCKAFSSDLISIHSLADVEVVVTKLHNEDIKEE VWIGLKNINIPFLQWSDGTEVTLTYWDENEPNVPYKTPNCVSYLGELGQWQVQSCEEKLKYVCKRKE KLNDASSDKMCPDEGWKRHGETCYKIEDEVVPGTNCNLTITSRFEQEYLNLMKKYDKSLRKYFWTGL RDVDSGCEYNWATVGGRRRAVTFSNWNFLPASPGGCVAMSTGKSVGKWEVKDCRSFKALSICKKMSGPL GPEEASPKPDDPCPEGWQSPFASLSCYKVFHAERIVRKRNWEEAERFCQALGAHLSSFSHVDEIKEFLHF LTDQFSGQHWLWIGLNKRSPDLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDYDIRDCAAVKVFHRPWRRGWHFYD DREFIYLRPFACDTKLEWVCQIPKGRTPKTPDWYNPDRAGIHGPPLEIEGSEYWFVADLHLNVEEAVLYC ASNHSFLATITSFVGLKAIKNIANISGDGQKWWIRISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFGEECLYMSAK TWLIDLKPTDCSTKLPFICEKYNVSSLEKYSPPSAAKVCSEQWIPFQNKCFLIKPVSLTFSQASDTC HSYGGTLPVLSQIEQDFITSLLPDMEATLWIGLRWTAYEKINKWTNRELTYSNFHPLLVSGRLRIPEN FFEEESRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSCSERHFVSLCQKYSEVKSRQTLQNASETVKYLNNLYKII PKTLTWHSAKRECLKSNMQLVSTDPYQAFLSVQALLHNSSLWIGLFSDDELNFGWSDGKRLHFSRWAET NGQLEDCVVLDTDGFWKTVDNDNQPGAICYSGNETEKEVKPVDSVKCPSVLPWIPFQNCYNI TKNRHMATTQDEVHTKQKLNPKSHILSIRDEKENNFVLEQLLYFNMASWVMLGITYRNKSLMWFDKTP LSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDFGWDIQTFKVIEEAVYFHQSILACKIEMVDYKEEYNTLPQFMP YEDGIYSVIQKKVTWYEALNMQSQQGHLASVHNQNGQLFLEDIVKRDGFPLVWGLSSHGSESSFEWSD GSTFDYIPWKGQTPGNCVLLDPKGTWKEKCNVSKDGAICYKPTKSKLSRLTYSSRCPAAKENGSRWI QYKGHICYKSDQALHSFSEAKKCSKHDHSATIVSIKDEDENKFSRLMRENNITMRVWGLSQHSVDQS WSWLDGSEVTFVKWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKKVECEHGFGRVVCVPLGPDYTAIAIIVATLSIL VLMGGLIWFQHRHLHLAGFSSVRYAQQVNEDEIMLPSFHD
16	A1_VH_FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYS
17	A1_VH_FR2	WVRQAPGKGLEWVG
18	A1_VH_FR3	RFTISRDDSKNTLYQMNSLKTEDTAVVYCTI
19	A1_VH_FR4	WGQGTGLVTVSS
20	A1_VL_FR1	DVQMTQSPSSLSASVGRVTITC
21	A1_VL_FR2	WYQQRPGKAPNLLIY
22	A1_VL_FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYC
23	A1_VL_FR4	FGQGTKVEIKR
24	LY75 609-618	WEVKDCRSFK
25	LY75 651-662	PASLSCYKVFHA
26	LY75 761-780	PWRRGWHFYDDREFIYLRPF
27	LY75 883-901	DDHFTYSRYPWHRFPVTFG
28	LY75 1029-1040	RELTYSNFHPLL
29	LY75 1077-1093	FTSCSERHFVSLCQKYS
30	LY75 1107-1118	TVKYLNNLYKII
31	LY75 1368-1378	EAVYFHQSIL
32	LY75 1518-1528	KKLSRLTYSSC
33	LY75 1535-1554	NGSRWIQYKGHICYKSDQALH
34	LY75 877-901	ISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFG
35	LY75 1099-1118	QTLQNASETVKYLNNLYKII
36	LY75 883-892	DDHFTYSRYP

37	LY75 1077-1091	FTSCSERHFVSLCQK
38	리툽시맵 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWAGTITVSAASTKGPSVFLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSPGK
39	리툽시맵 VL	QIVLSQSPAILLSASPGKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTI SRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
40	RituximabVH_CDR1	SYNMH
41	RituximabVH_CDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG
42	RituximabVH_CDR3	STYYGGDWYFNV
43	RituximabVL_CDR1	RASSSVSYIH
44	RituximabVL_CDR2	ATSNLAS
45	RituximabVL_CDR3	QQWTSNPPTF
46	(765-772)	GWHFYDDR
47	(877 to 890)	ISEWPIDDHFTYSR
48	(896-910)	FPVTFGEECLYMSAK
49	(1030-1044)	ELTYSNFHPLLVSGR
50	(1084-1091)	HFVSLCQK
51	(1099-1109)	QTLQNASETVK
52	Linker	Gly-Phe-Leu-Gly

[0578] 서열목록 자유 텍스트:

- [0579] 서열번호 38 <223> 리툽시맵 VH 서열
- [0580] 서열번호 39 <223> 리툽시맵 VL 서열
- [0581] 서열번호 40 <223> 리툽시맵 VH\_CDR1
- [0582] 서열번호 41 <223> 리툽시맵 VH\_CDR2
- [0583] 서열번호 42 <223> 리툽시맵 VH\_CDR3
- [0584] 서열번호 43 <223> 리툽시맵 VL\_CDR1
- [0585] 서열번호 44 <223> 리툽시맵 VL\_CDR2
- [0586] 서열번호 45 <223> 리툽시맵 VL\_CDR3
- [0587] 서열번호 52 <223> 링커
- [0588] 서열번호 53-163 <223> 펩타이드
- [0589] 서열번호 165-207 <223> 펩타이드

도면

도면1

```

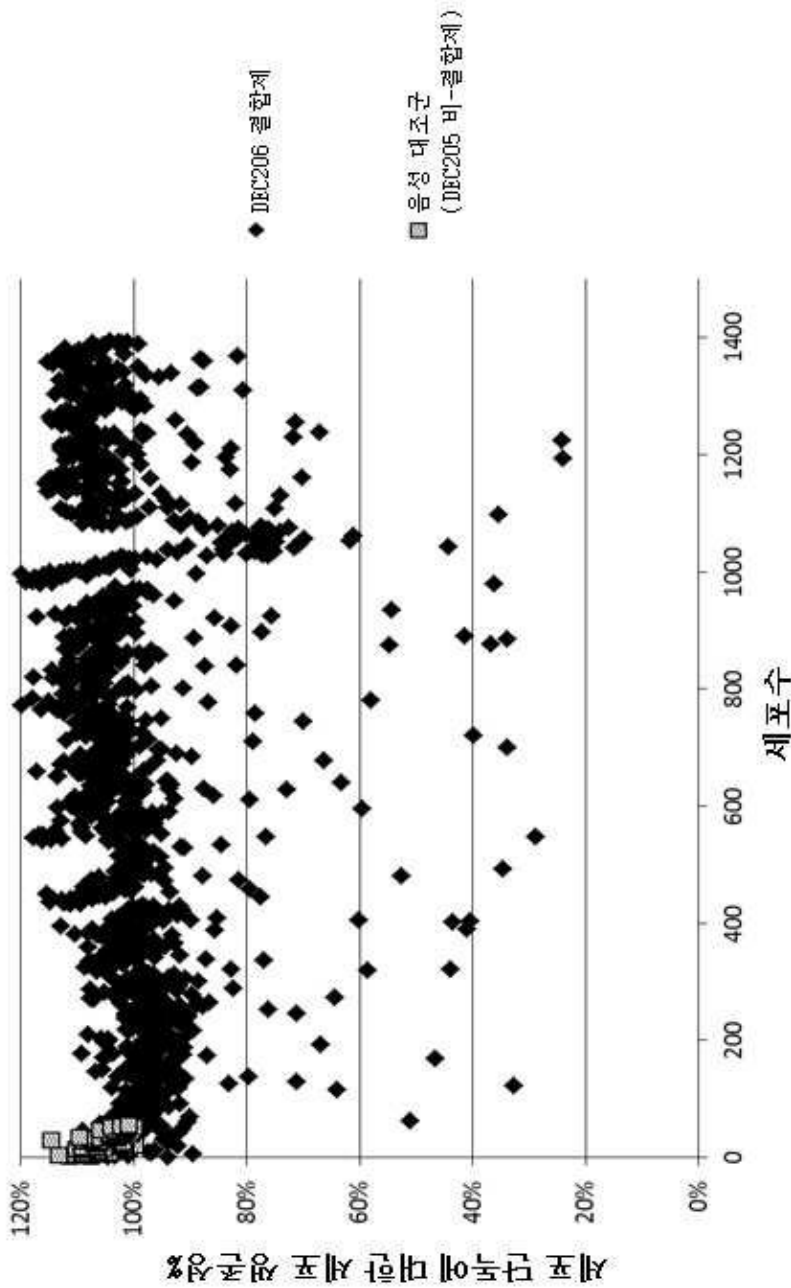
서열번호 11      EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIGSKTDGGTI
서열번호 1      EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIGSKTDGGTI
서열번호 12      -----
                  *****:*****
서열번호 11      DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCTTTVT-----
서열번호 1      DYAAPVQGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCTIFGVVSEFDYWGQGTILVTVSS
서열번호 12      -----YFDYWGQGTILVTVSS
                  *****:*****
    
```

도면2

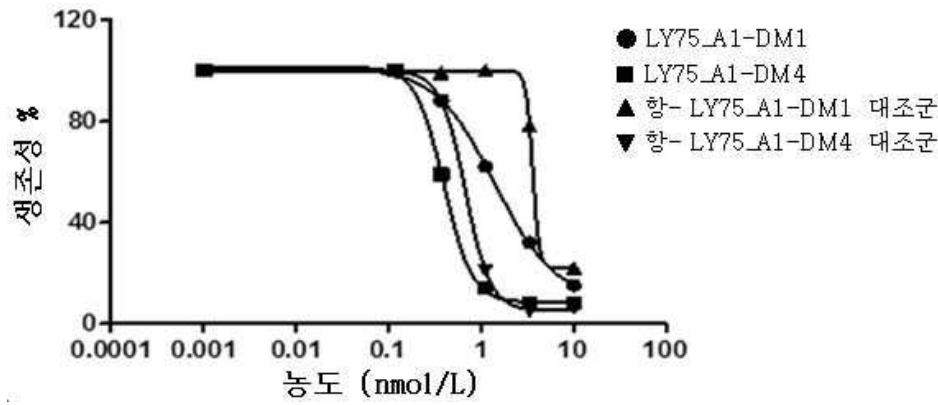
```

서열번호 2      DVQMTQSPSSLSASVGDRVTIITCRASQISIDYLSWYQQRPGKAPNLLIYAASNLKIGVPS
서열번호 13     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIITCRASQISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
서열번호 14     -----
*:***** ** *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
서열번호 2      RFGSGSGIDFTLTIISTLQPEDFATYYCQQSYRSPWIFGQGIKVEIKR
서열번호 13     RFGSGSGIDFTLTIISLQPEDFATYYCQQSYS-----
서열번호 14     -----WTFGQGIKVEIKR
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
    
```

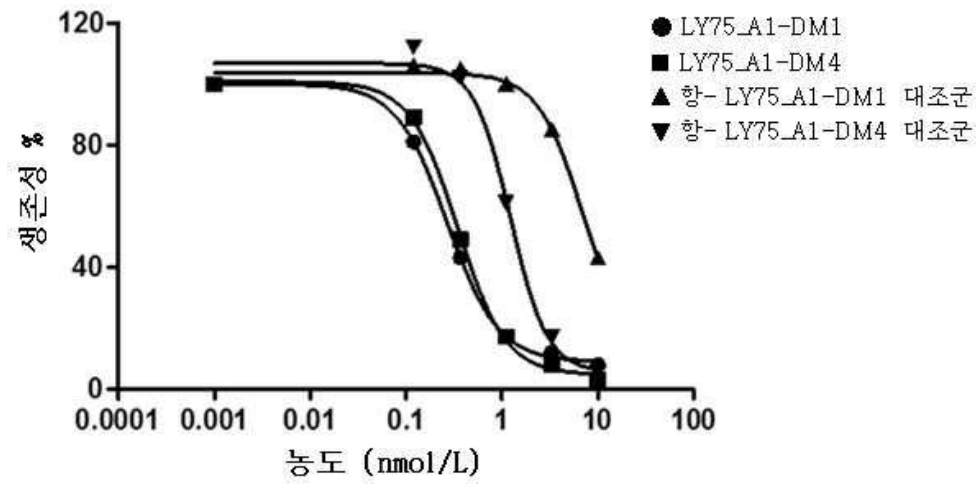
도면3a



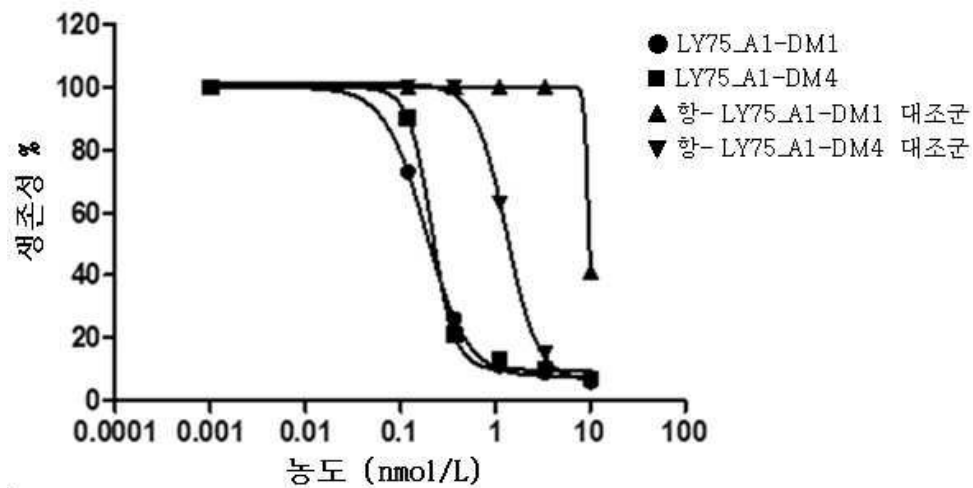
도면3b



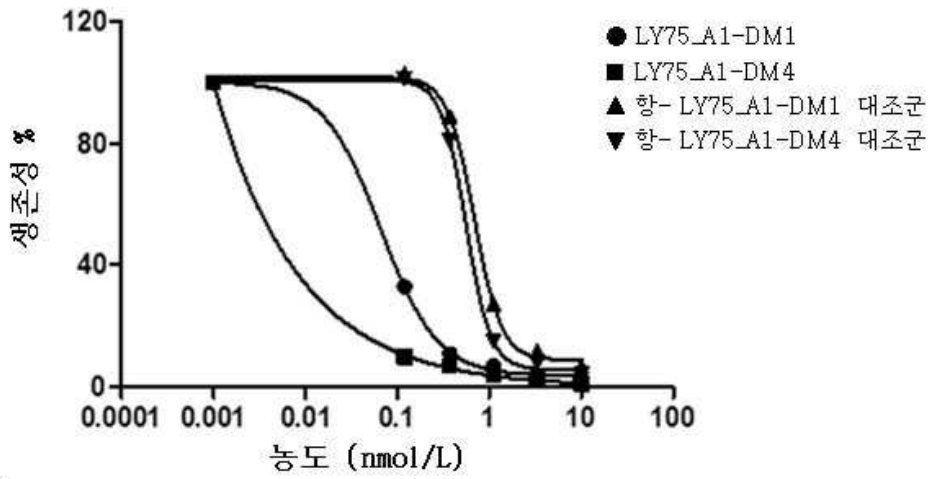
도면3c



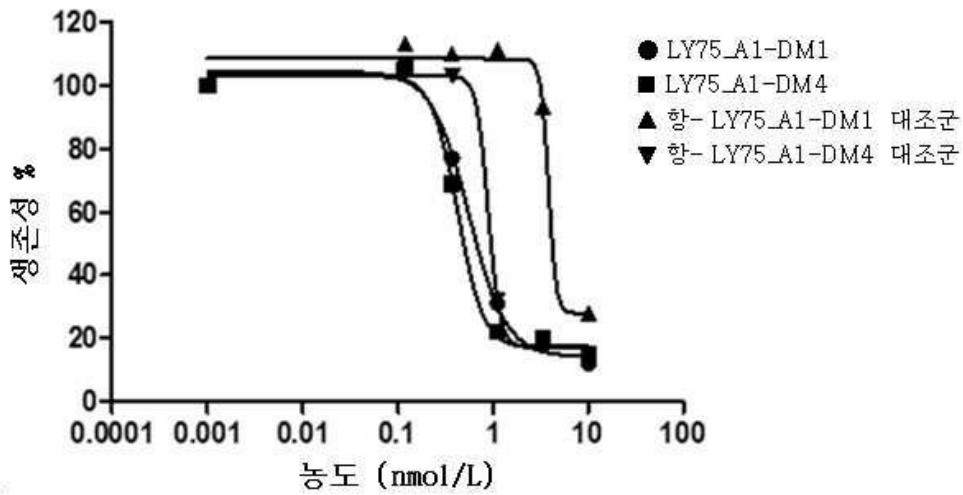
도면3d



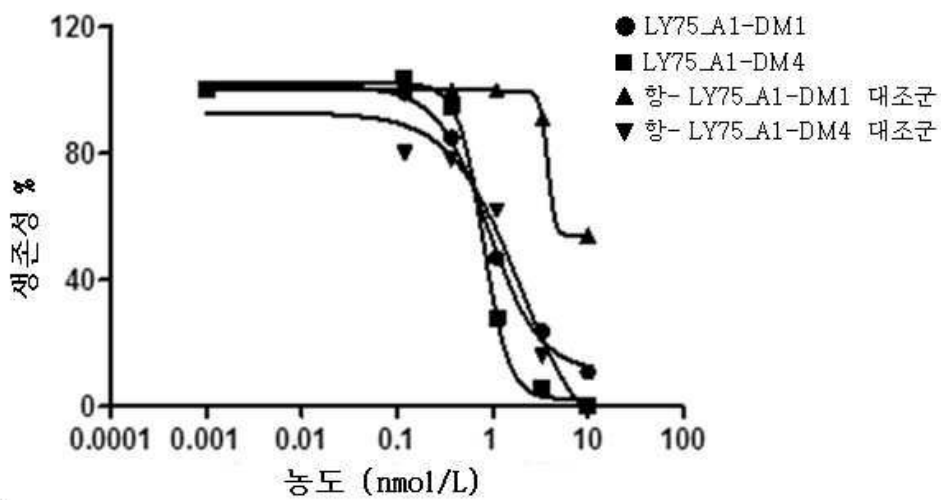
도면3e



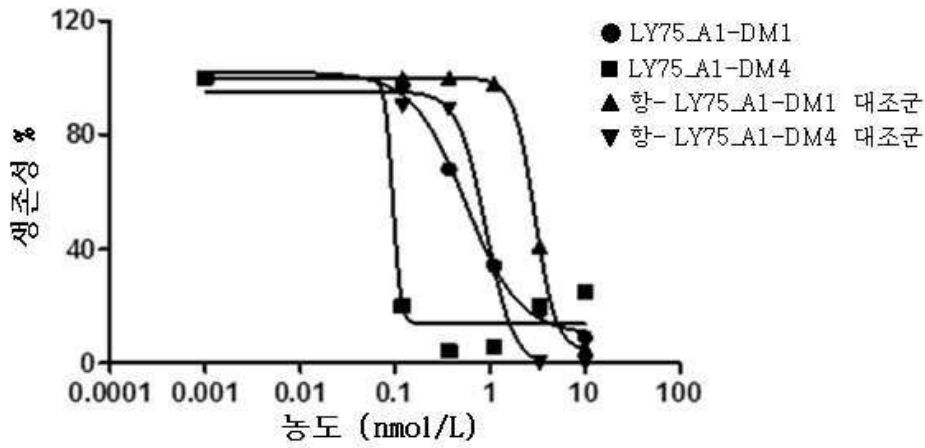
도면3f



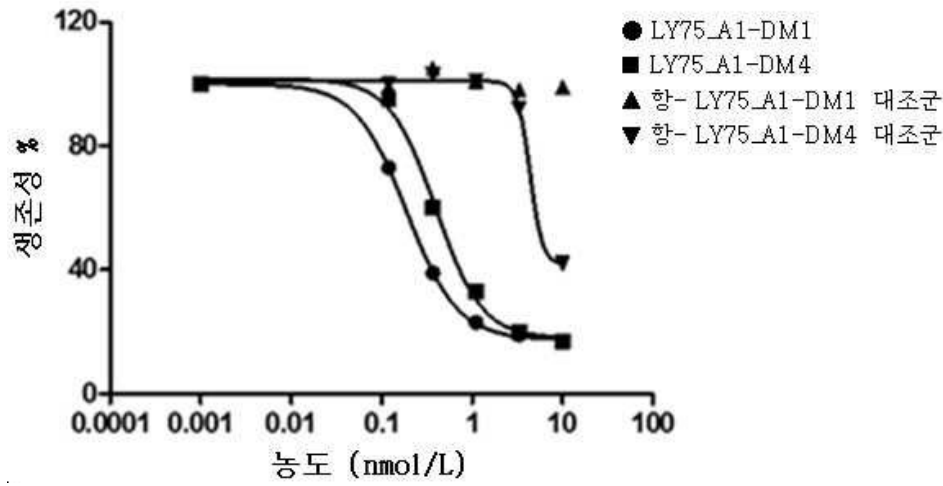
도면3g



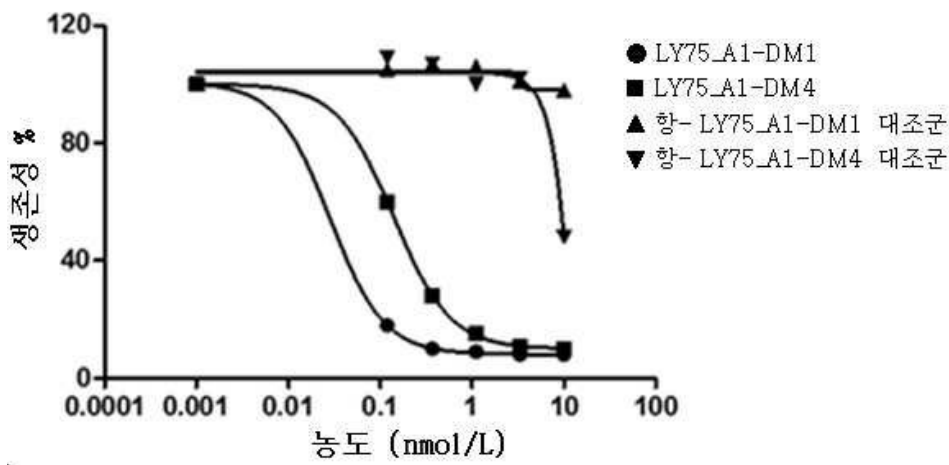
도면3h



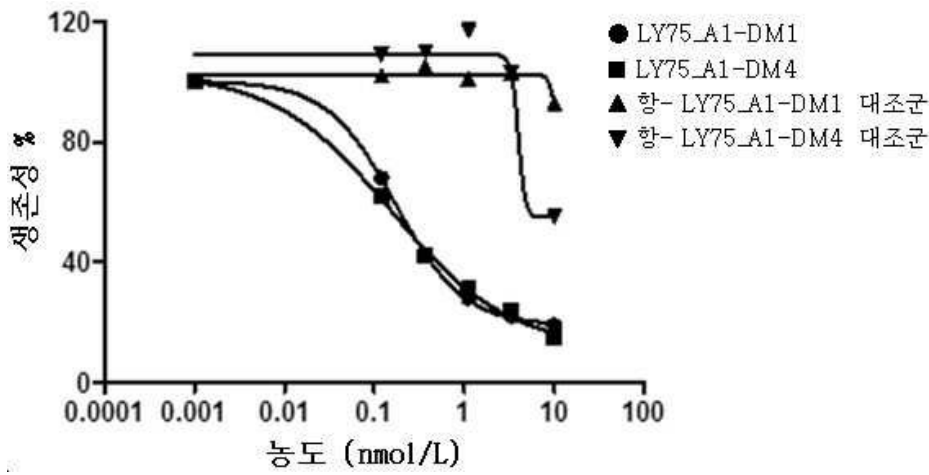
도면3i



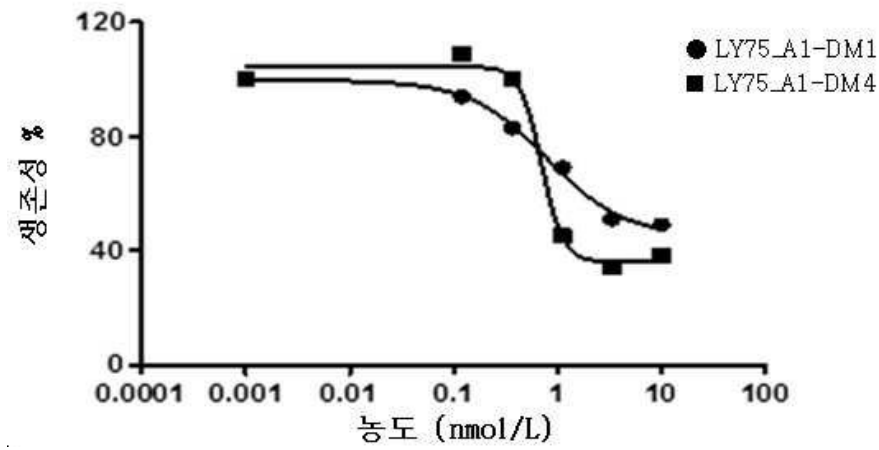
도면3j



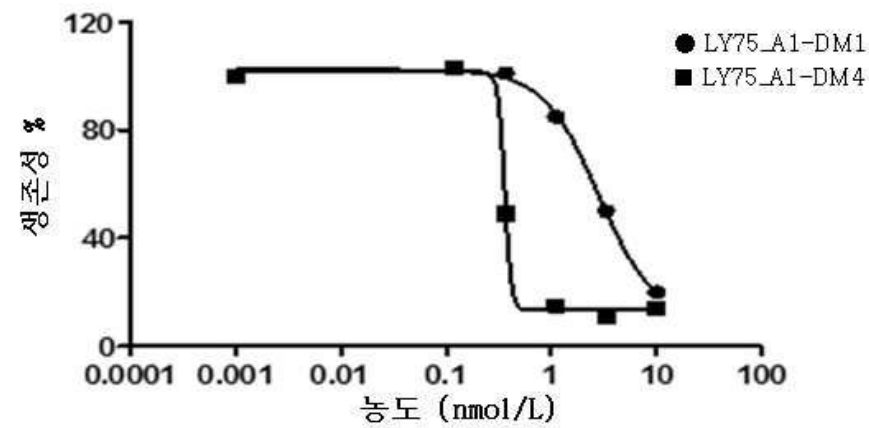
도면3k



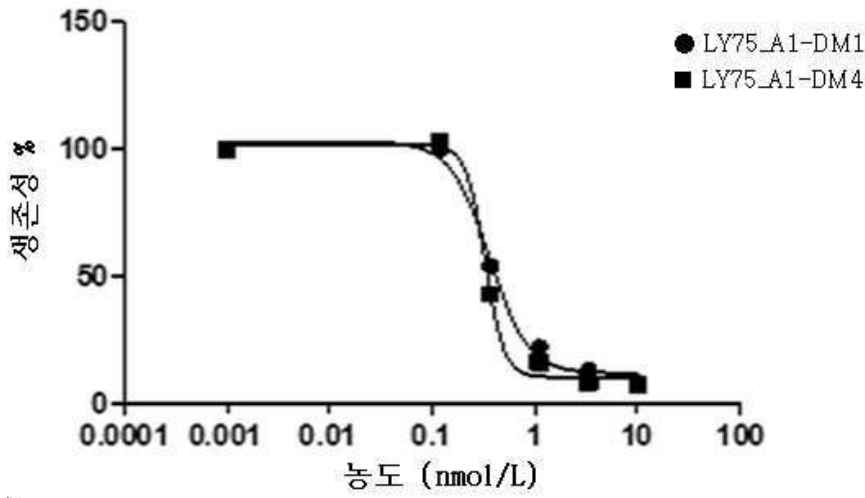
도면3l



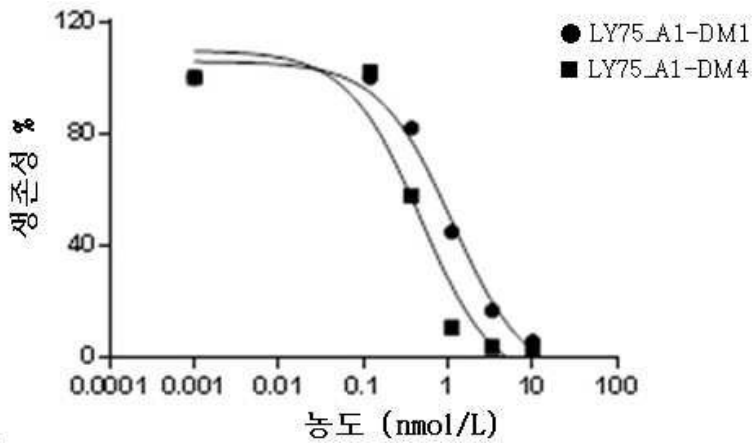
도면3m



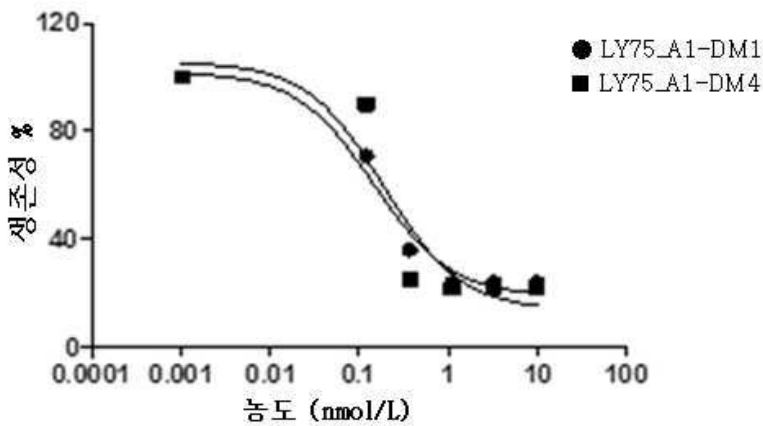
도면3n



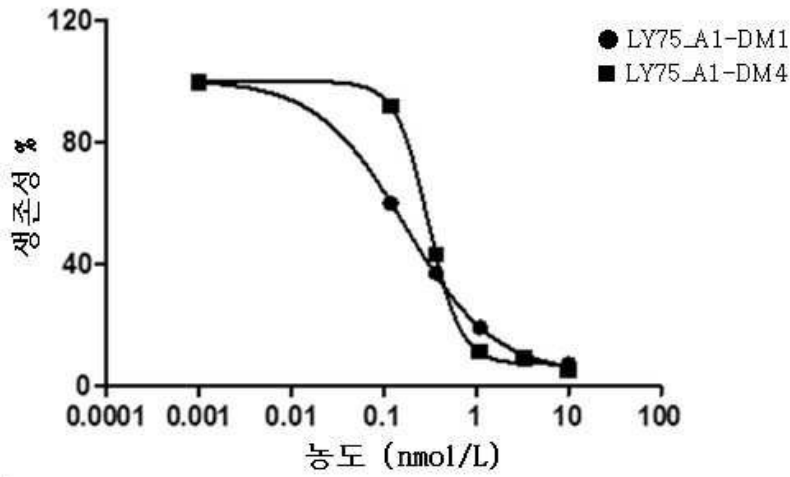
도면3o



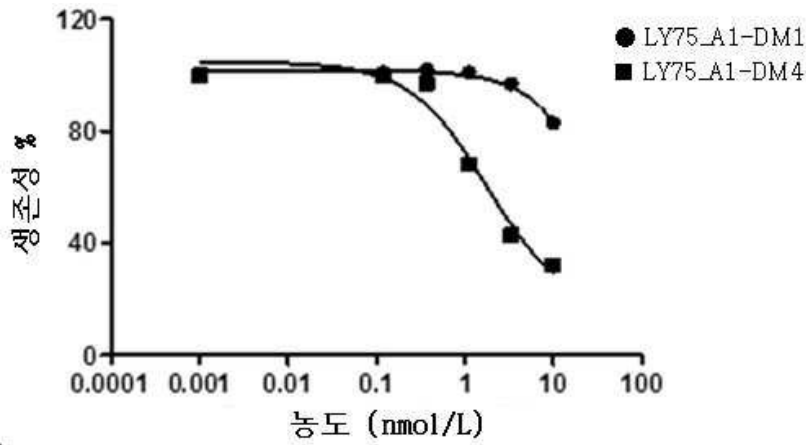
도면3p



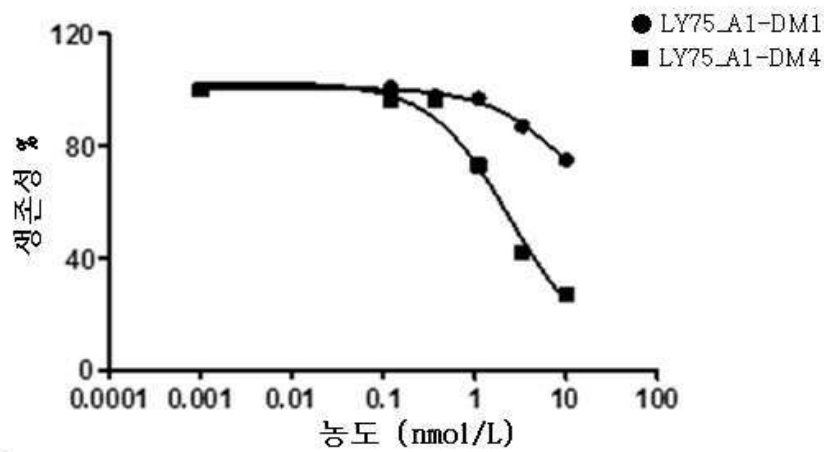
도면3q



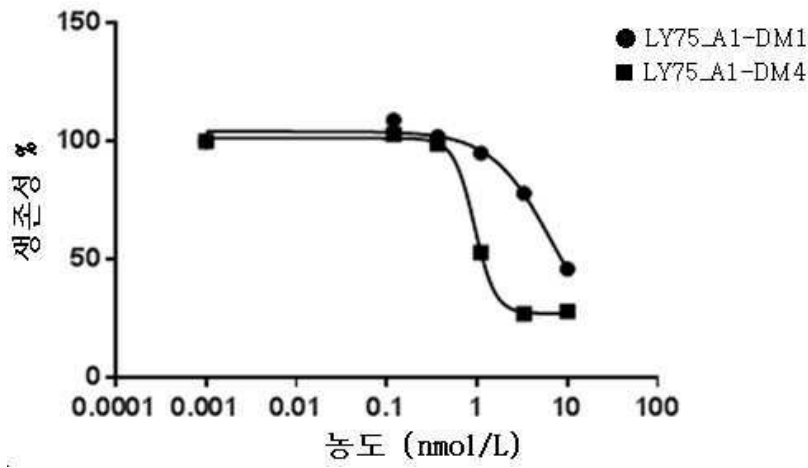
도면3r



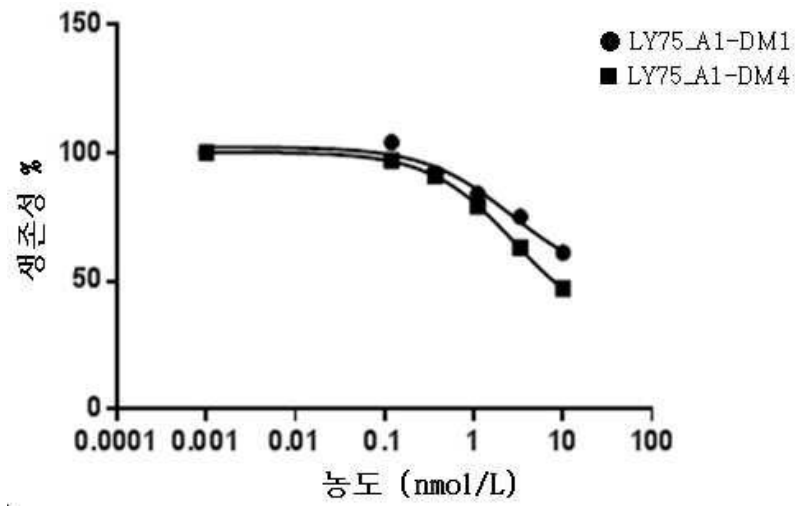
도면3s



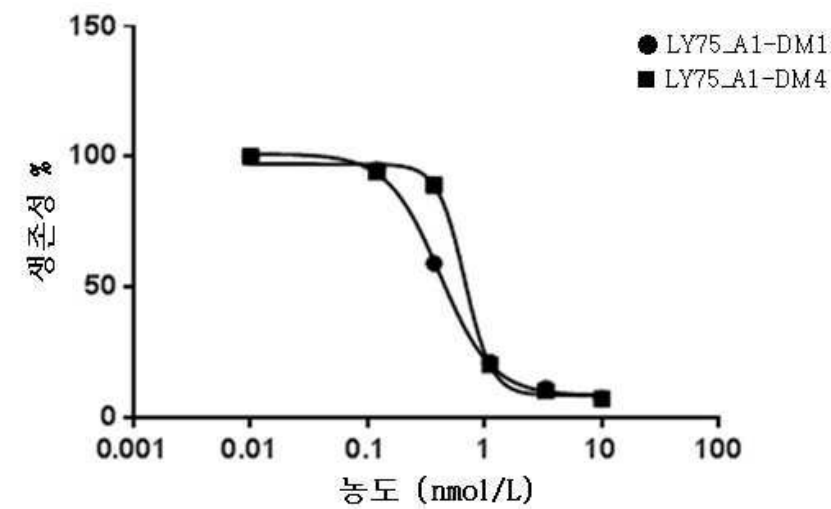
도면3t



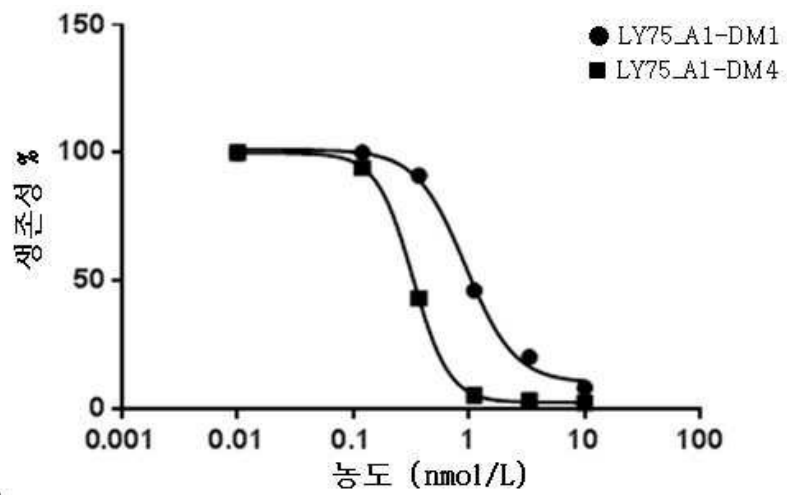
도면3u



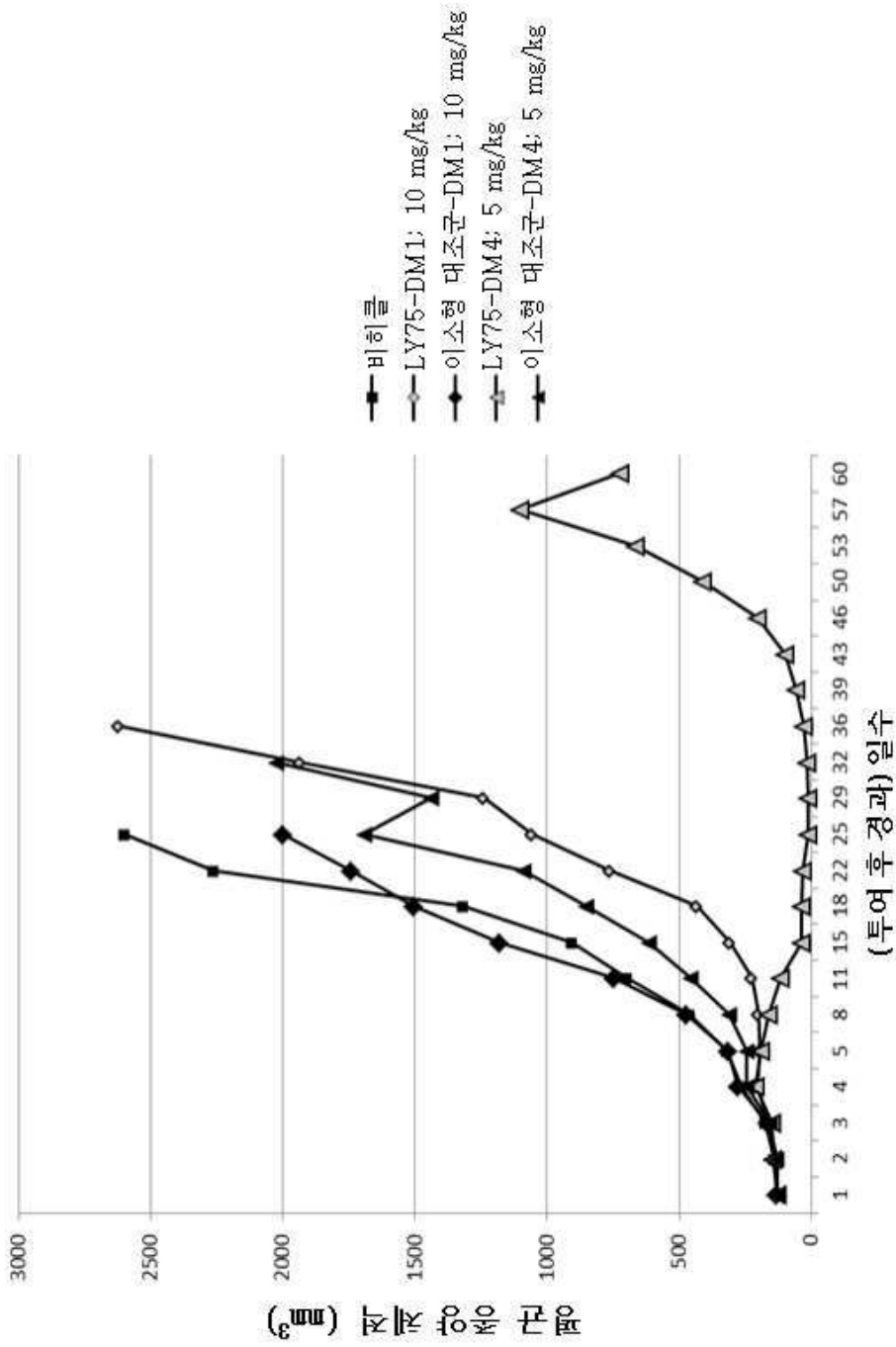
도면3v



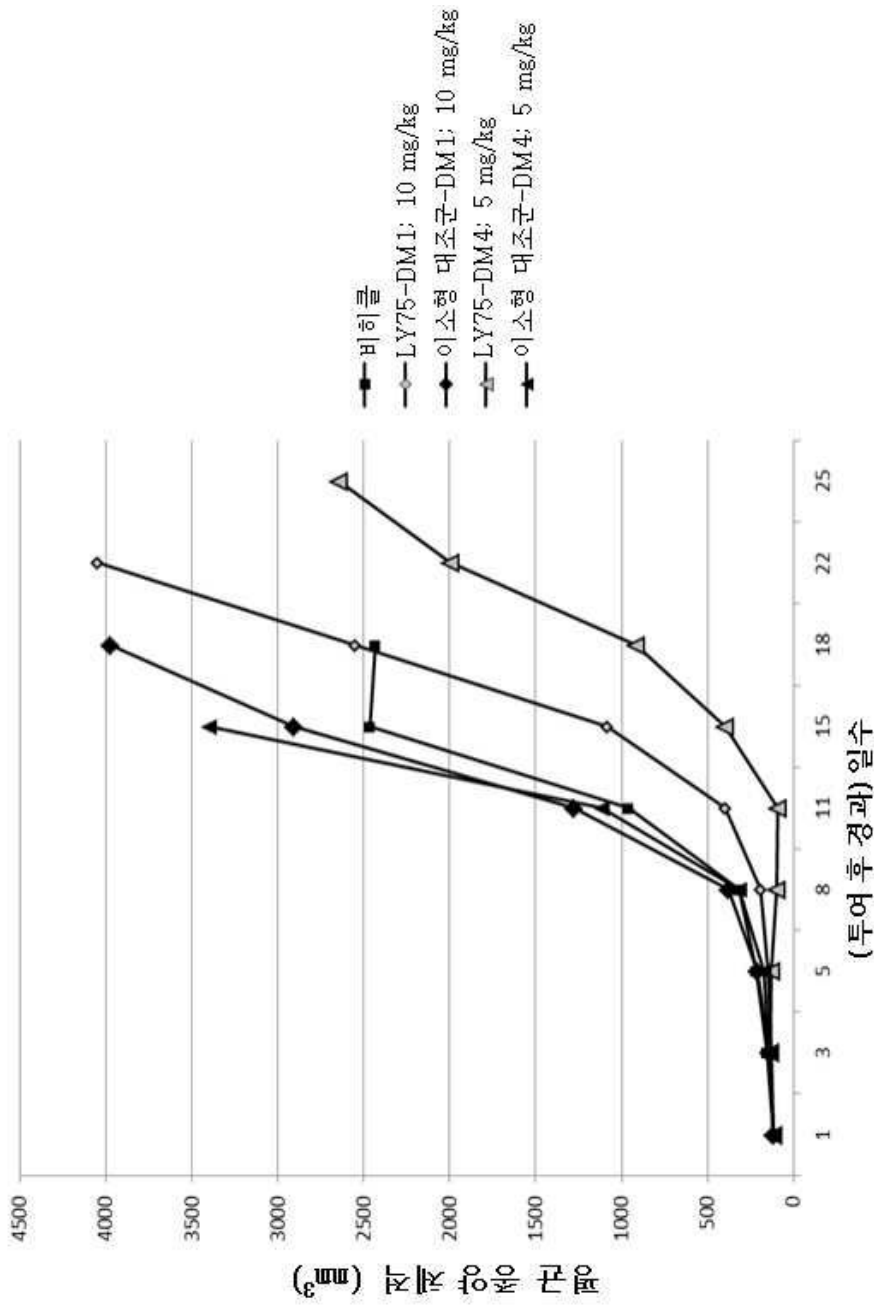
도면3w



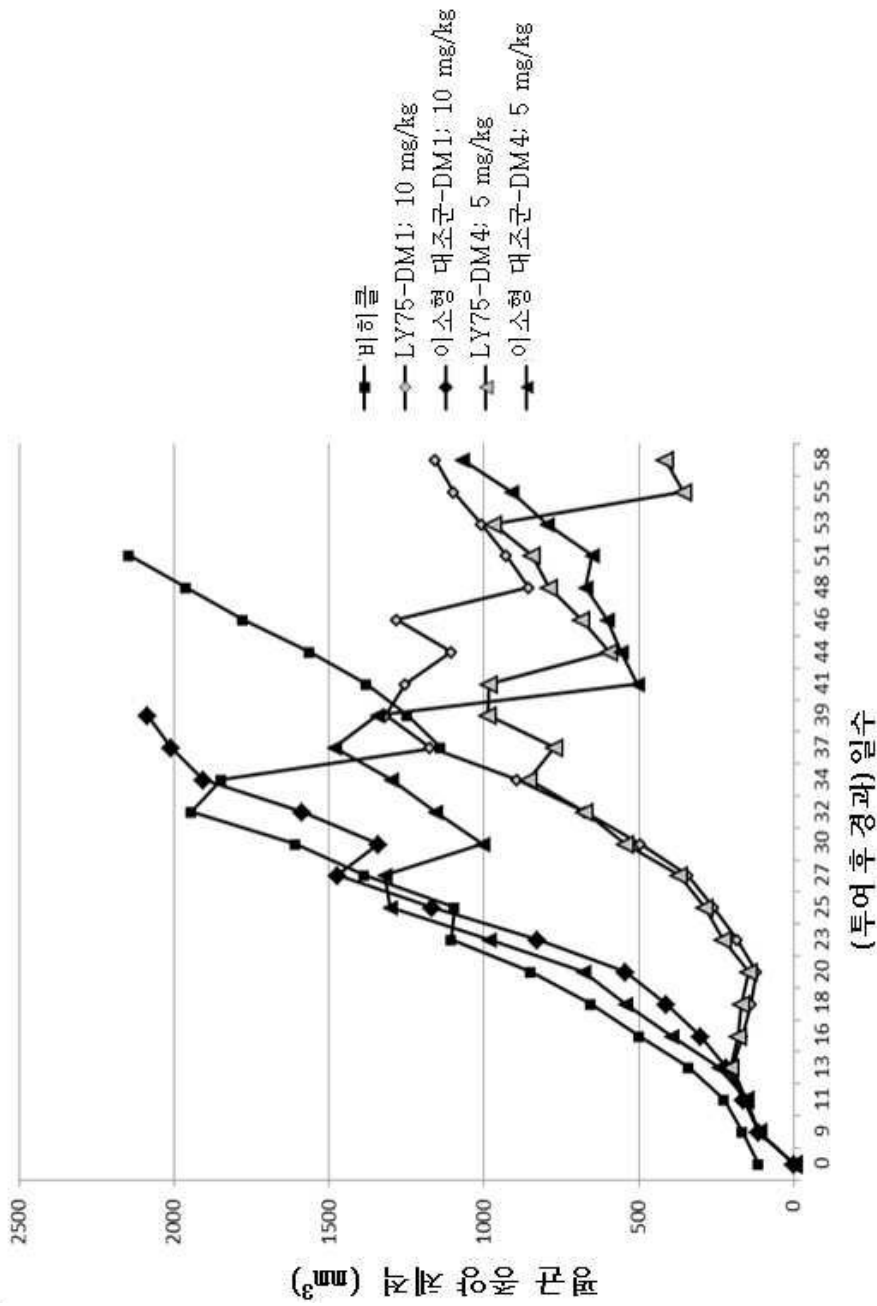
도면4a



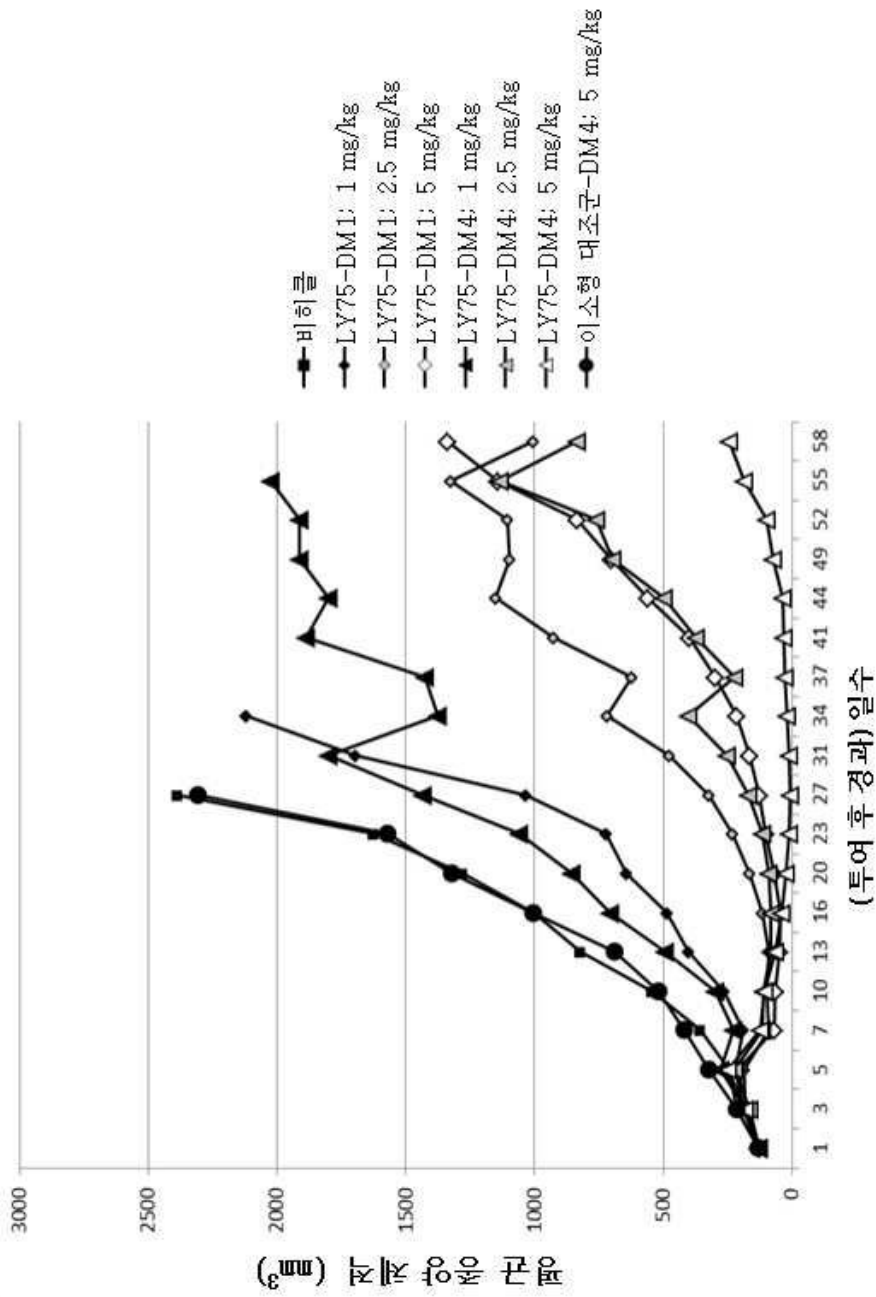
도면4b



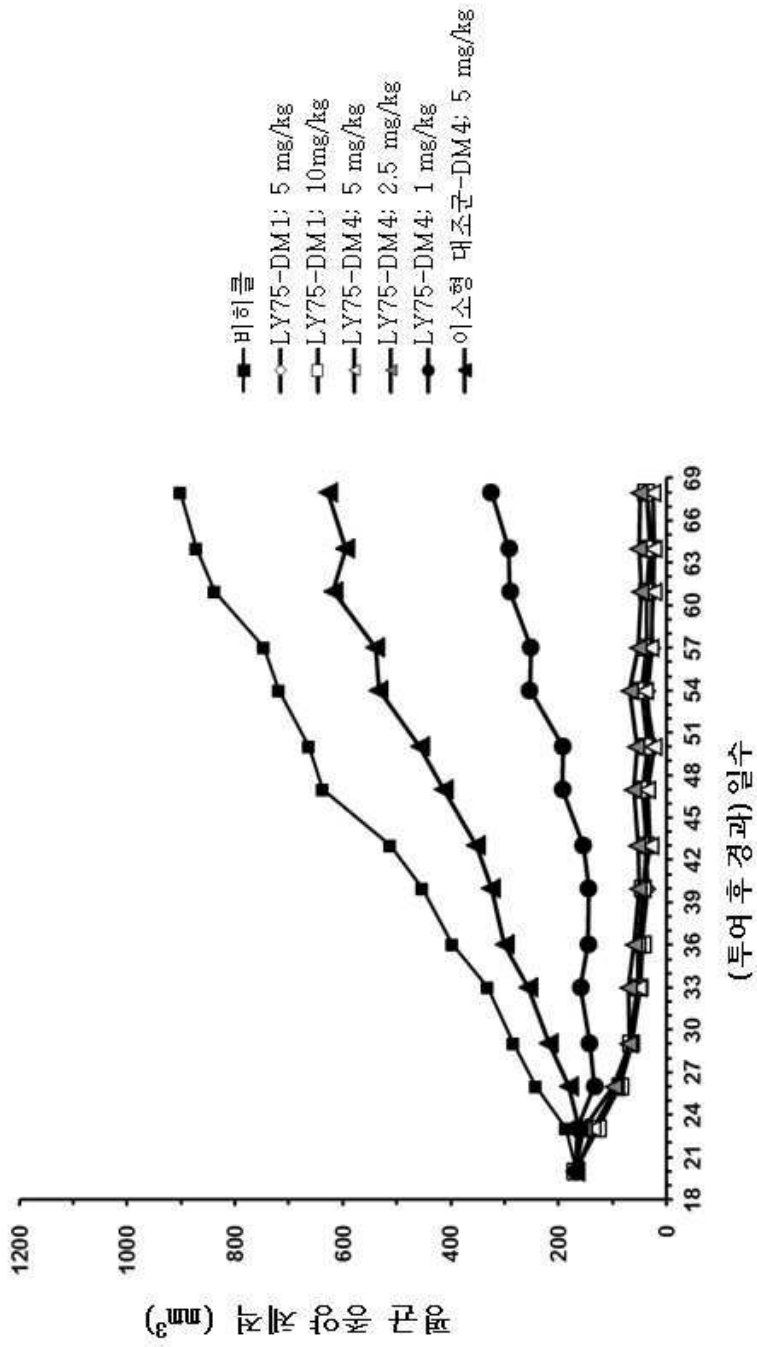
도면4c



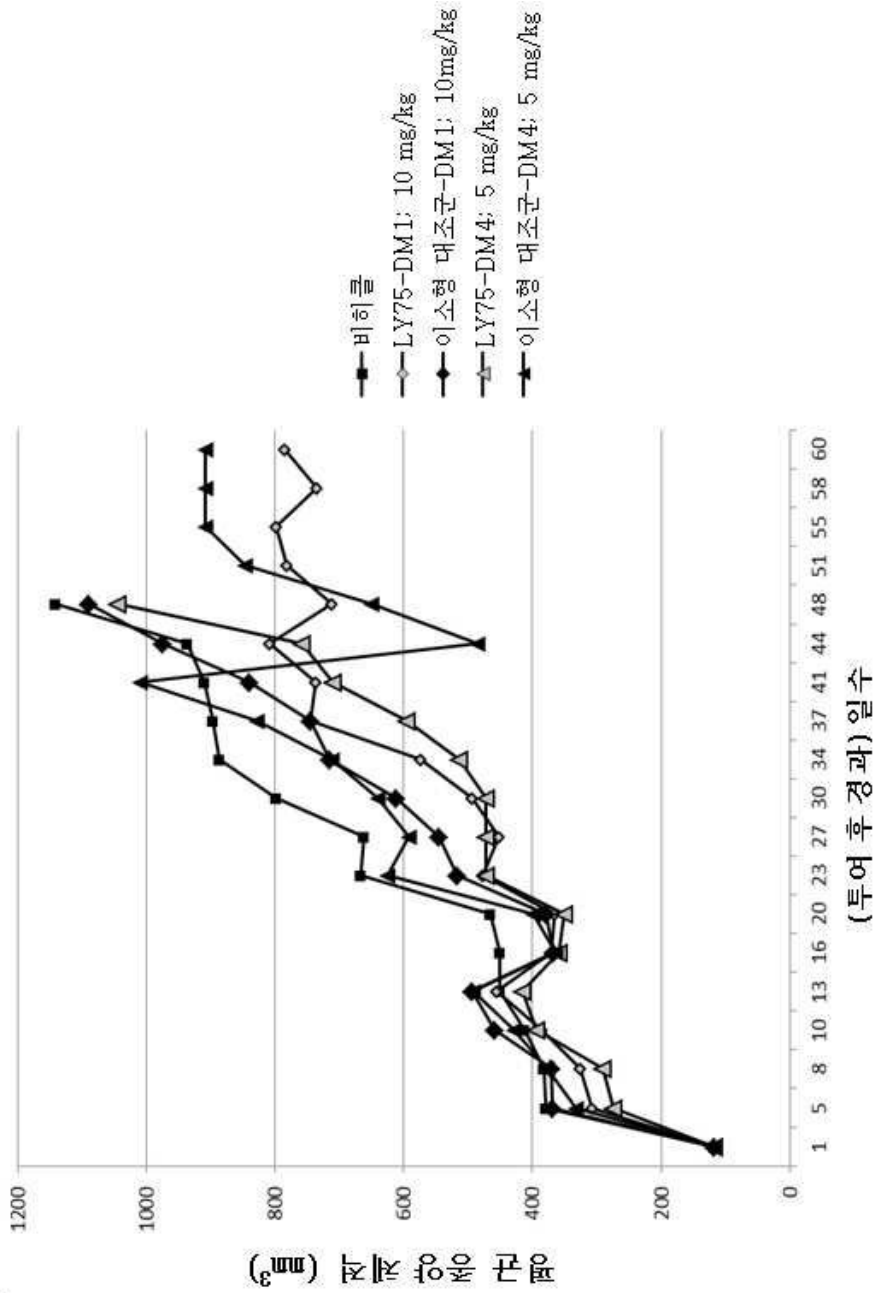
도면4d



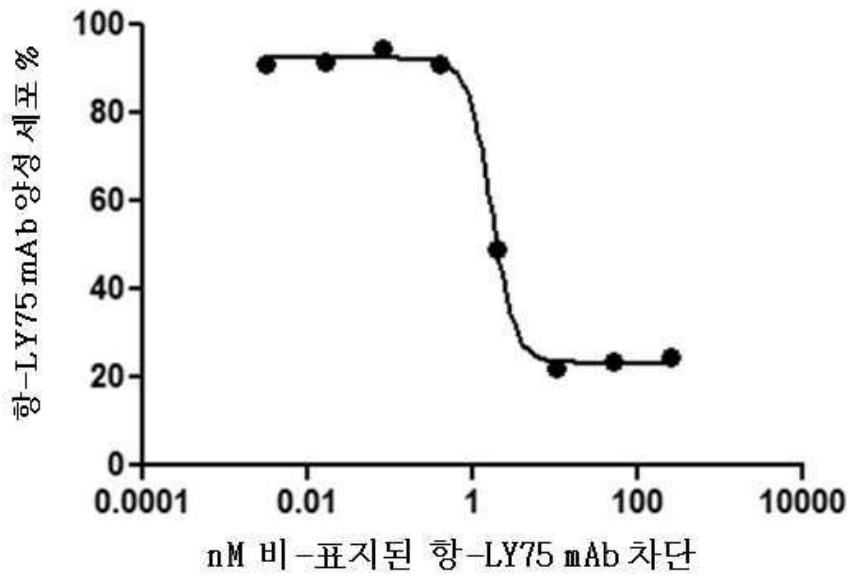
도면4e



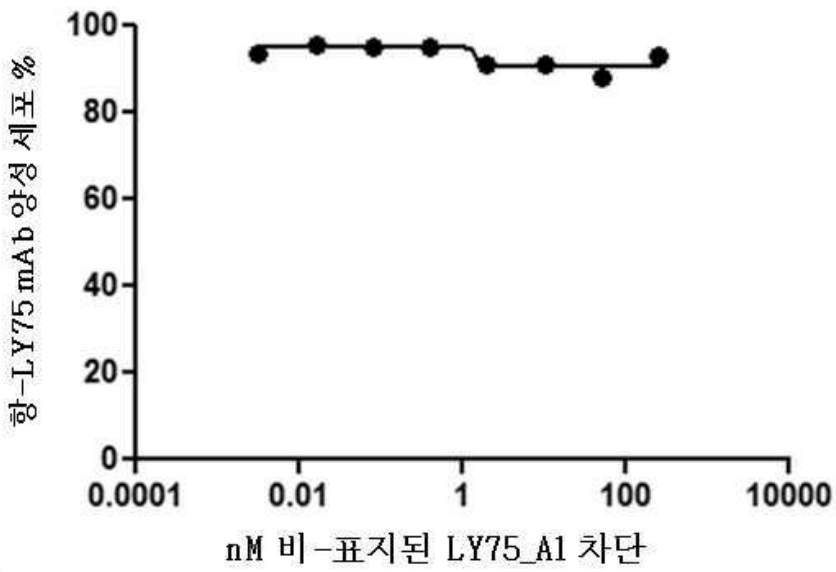
도면4f



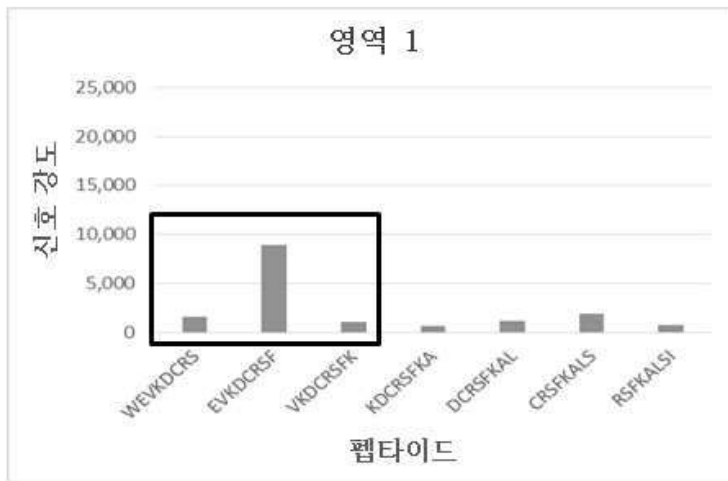
도면5a



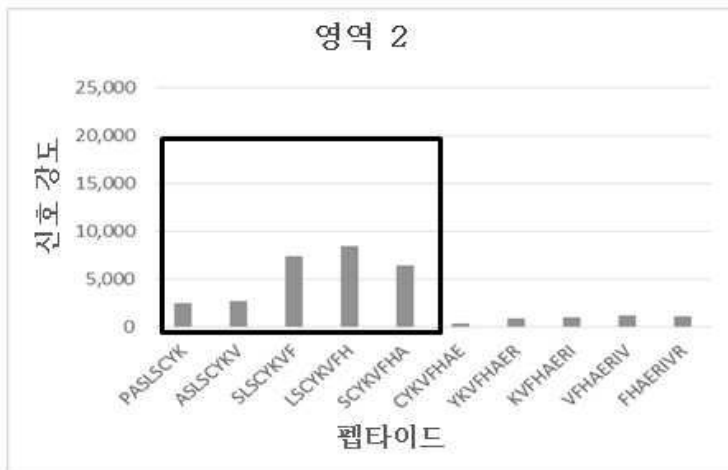
도면5b



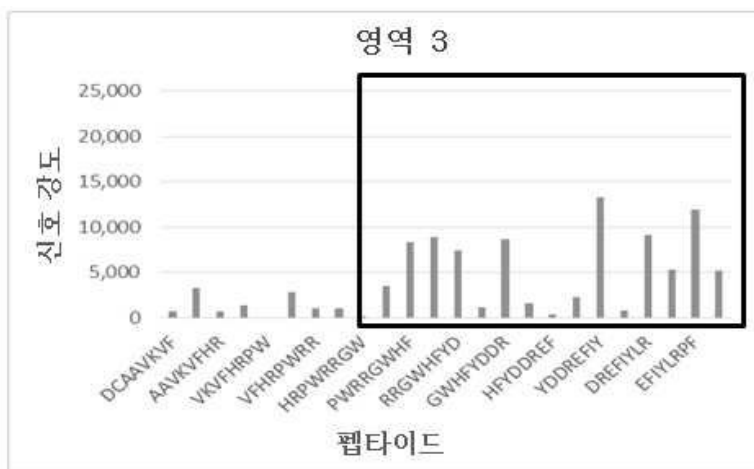
도면6a



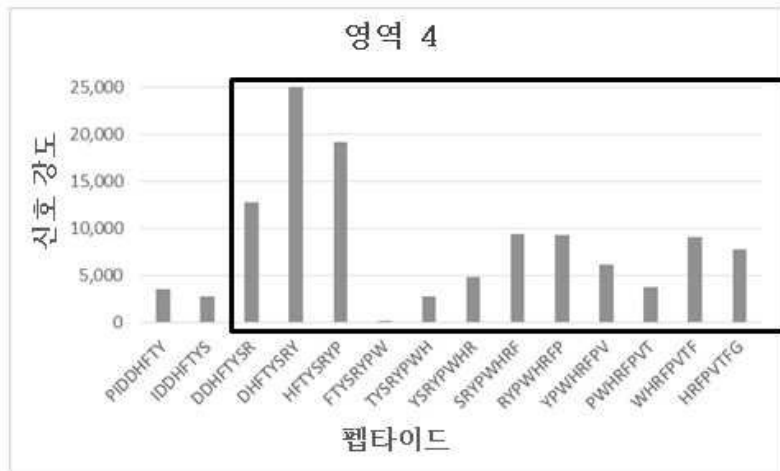
도면6b



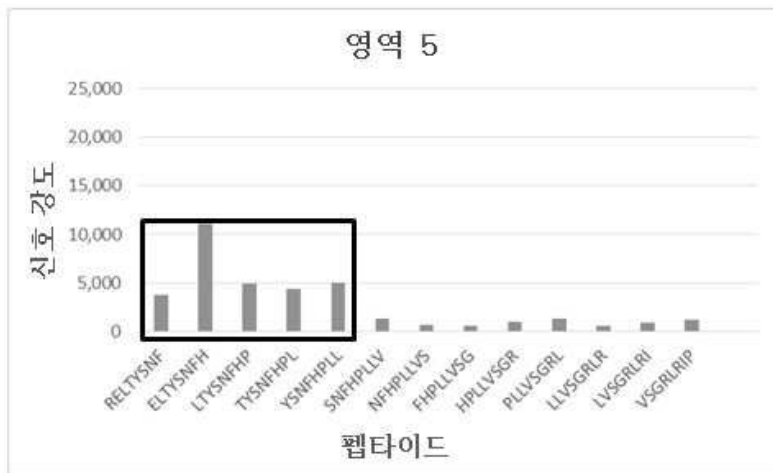
도면6c



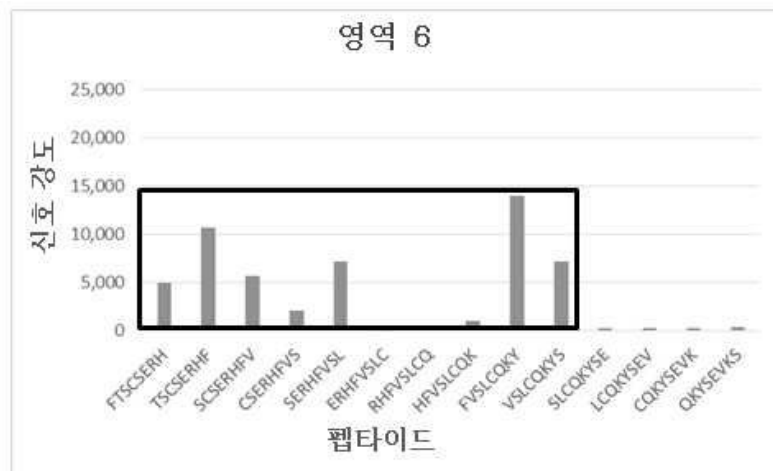
도면6d



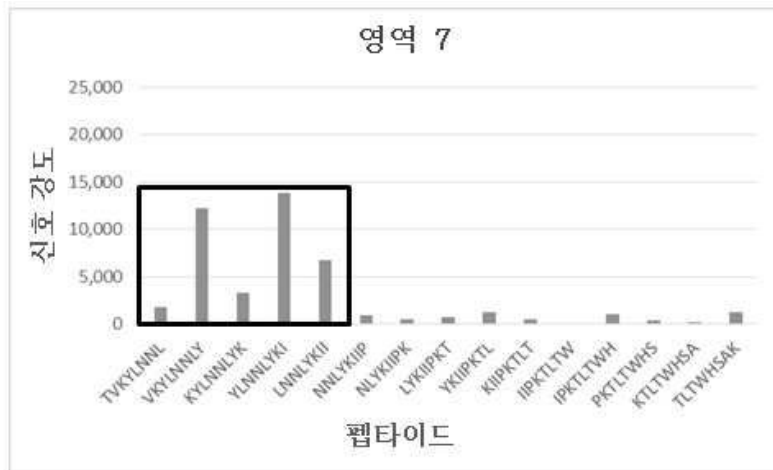
도면6e



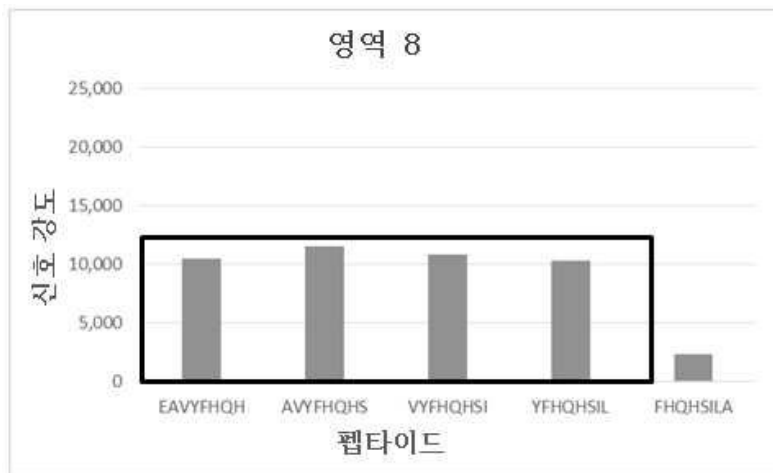
도면6f



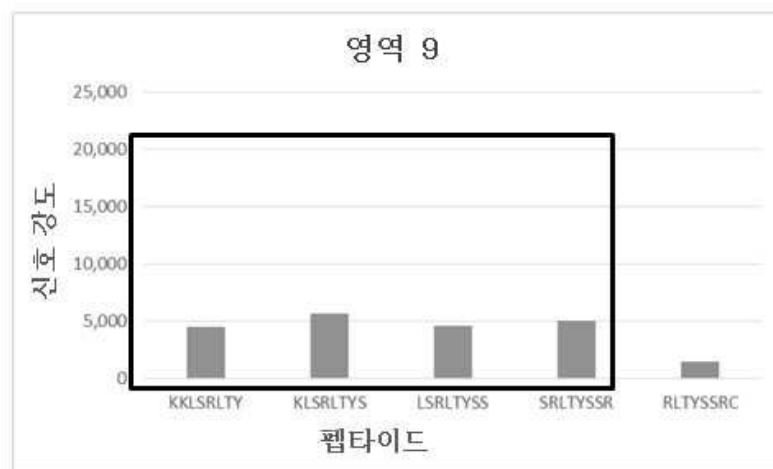
도면6g



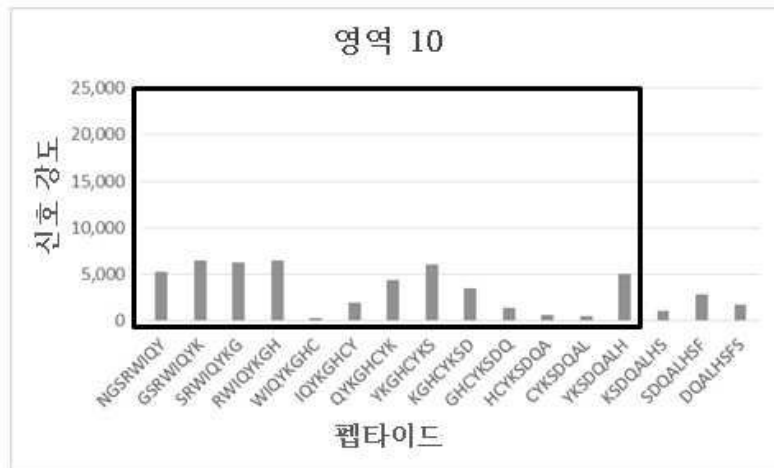
도면6h



도면6i



도면6j



도면7

```

sp|O60449|LY75_HUMAN      MRTGWATPRR PAGLLMLLFWPFDLAEPSGRAANDPFTIVHGNIGKCIKPVYGWIVADDCD 60
MS-Peptides_Elute1a      -----CIKPVYGWIVADDCD
MS-Peptides_Elute1b      -----CIKPVYGWIVADDCD
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      ETEDKLWKWV SQHRLFLHSQKCLGLDITKSVNELRMFSCDSSAMLWKKCEHHSLYGAAR 120
MS-Peptides_Elute1a      ETEDKLWK-----CEHHSLYGAAR
MS-Peptides_Elute1b      ETEDKLWK-----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      YRLALKDGHGTAI SNASDVWKRKGGSEESLCDQFYHEIYTRDGNVYGRPCEFPFLIDGTWH 180
MS-Peptides_Elute1a      -----DGHGTAI SNASDVWKRKGGSEESLCDQFYHEIYTR-----
MS-Peptides_Elute1b      -----KGGSEESLCDQFYHEIYTR-----
MS-Peptides_Elute2a      -----GGSEESLCDQFYHEIYTR-----
MS-Peptides_Elute2b      -----GGSEESLCDQFYHEIYTR-----
LC-Peptides               -----DGHGTAI SNASDVWKR-----

sp|O60449|LY75_HUMAN      HDCILDEDHS GFWCATTLNVEYDRKKGICLKPENGCEDNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSW 240
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----WGICLKPENGCEDNWEK-----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      KEAYVSCQNQGADLLSINSAEELTYLKEKEGIARIFWIGLNQLYSARGWEWSDHKPLNFL 300
MS-Peptides_Elute1a      -----IFWIGLNQLYSAR-----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----IFWIGLNQLYSAR-----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      NWDPDFRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCEAQLPYVCRKELNNTVELIDVMTYSDTR 360
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      CDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKAHAKCKAPSSDLISIHSLADVEVVVTKLHNEDIKEE 420
MS-Peptides_Elute1a      -----LHNEDIKEE
MS-Peptides_Elute1b      -----LHNEDIKEE
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      VWIGLKNINIPTLFWQSDGTEVTLTYWDENEPNVFNKTPNCVSYLGGELGQWVQSCEEK 480
MS-Peptides_Elute1a      VWIGLK-----TPNCVSYLGGELGQWV-----
MS-Peptides_Elute1b      VWIGLK-----TPNCVSYLGGELGQWV-----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

```

도면7a

```

sp|O60449|LY75_HUMAN      LK YVCKRREGKLNDASSDMC PDEGWKRHGETCYKIYEDVFP GTNCNLTITSRFEQEY 540
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      LNDIMKKYDKSLRKYFTGLRDVDS CGEYNWATVGGRRRAVTFSNWN FLEPASPGGCVAM 600
MS-Peptides_Elute1a      -----YFWTGLRDVDS CGEYNWATVGGR-----
MS-Peptides_Elute1b      -----YFWTGLRDVDS CGEYNWATVGGR-----
MS-Peptides_Elute2a      -----YFWTGLRDVDS CGEYNWATVGGR-----
MS-Peptides_Elute2b      -----YFWTGLRDVDS CGEYNWATVGGR-----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      STGKSVGKWEVKDCRSFKALS ICKKMSGFLGPEEASPKPDDPCPEGW QSPASLS CYKVF 660
MS-Peptides_Elute1a      ----SVGKWEVKDCR---ALSICKK-----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----WEVKDCRSFK-----PASLS CYKVF

sp|O60449|LY75_HUMAN      HAERIVRKRNWEEAERFCQAL GAHLSFSFSHVDEIKE FLHFLTDQFSGQHWLWIGLNKRS P 720
MS-Peptides_Elute1a      -----RNWEEAER-----RSP
MS-Peptides_Elute1b      -----RNWEEAER-----RSP
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               HA-----

sp|O60449|LY75_HUMAN      DLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNE FQQDYDIRDCAAVKVFHRFWRRGWHFYDDREFIYLRF 780
MS-Peptides_Elute1a      -----TPVSTIIMPNE FQQDYDIR-----
MS-Peptides_Elute1b      DLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNE FQQDYDIR-----
MS-Peptides_Elute2a      -----GWHFYDDR-----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----FWRRGWHFYDDREFIYLRF

sp|O60449|LY75_HUMAN      ACDTRLEWVCQIPKGRTPKTP DWYNPDRAGIHGPPLIIEGSEYW FVADLHLNVEEAVLYC 840
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      ASNHSFLATITSPVGLKAIKNI ANISGDQQRWWIRISEWFI DDHFTYSRYF WHRFPVTF 900
MS-Peptides_Elute1a      -----ISEWFI DDHFTYSR-----FPVTF
MS-Peptides_Elute1b      -----ISEWFI DDHFTYSR-----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----DDHFTYSRYF WHRFPVTF
*****

sp|O60449|LY75_HUMAN      GE ECLYMSAKIWLIDLGKPTDC STKLPFI CEKYNVS SLEKYSFD SAAKVCSEQW IPPQN 960
MS-Peptides_Elute1a      GE ECLYMSAKIWLIDLGKPTDC STK-----YNVS SLEK-----VQCSEQW IPPQN
MS-Peptides_Elute1b      -----TWLIDLGKPTDCSTK-----YNVS SLEK-----VQCSEQW IPPQN
MS-Peptides_Elute2a      -----TWLIDLGKPTDCSTK-----
MS-Peptides_Elute2b      -----TWLIDLGKPTDCSTK-----
LC-Peptides               G-----
    
```

도면7b

```

sp|O60449|LY75_HUMAN      KCFLKIKPVSLTFSQASDICHSYGGTLESVLSQIEQDFITSLLPDMEATLWIGLRWTAYE 1020
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides              -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      KINKWTDNRELTYSNFHPLLVSGLRIRIPENFFEEESRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSC 1080
MS-Peptides_Elute1a      K-----ELTYSNFHPLLVSGLRIRIPENFFEEESRYHCALILNLQK-----
MS-Peptides_Elute1b      K-----YHCALILNLQK-----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides              -----RELTYSNFHPLL-----FTSC

sp|O60449|LY75_HUMAN      SERHFVSLCQRYS EVKSRQTLQNAS EIVKYLNNLYKII EKTLTWHS AKRECLKSNMQLV S 1140
MS-Peptides_Elute1a      --HFVSLCQR-----QTLQNAS EIVK-----TLTWHS AK-----
MS-Peptides_Elute1b      --HFVSLCQR-----QTLQNAS EIVK-----TLTWHS AK-----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides              SERHFVSLCQRYS          EIVKYLNNLYKII
                          *****                ***

sp|O60449|LY75_HUMAN      ITDPYQQAFLSVQALLHNSLWIGLFSQDDELNFGWSDGKRLHF SRWAETNGQLEDCVVL 1200
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides              -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      DT DGFWKTVDCNDNQPGAICY YSGNETER EKV FVDSVKCP SPVLNTPWIPFQNC YNFI I 1260
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides              -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      TKNRHMATTQDEVHTKQQLNFKSHILSI RDEKENNFVLEQLLYFNYMASWVMLG I TYRN 1320
MS-Peptides_Elute1a      -----SHILSIR-----
MS-Peptides_Elute1b      --NRHMATTQDEVHTK-----SHILSIR-----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides              -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      KSLMWFDKTFLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDGFWDIQTFKVIIEAVYFHQHSILAC 1380
MS-Peptides_Elute1a      -SLMWFDKTFLSYTHWR-----
MS-Peptides_Elute1b      -SLMWFDK-----
MS-Peptides_Elute2a      -SLMWFDK-----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides              -----EAVYFHQHSIL-----

sp|O60449|LY75_HUMAN      KIEMVDYKKE YNTILPQFMPYEDGIYSVIQKRVTWY EALNMCSQSGGHLASVHNQNGQLF 1440
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides              -----

```

도면7c

```

sp|O60449|LY75_HUMAN      LE DIVKRDGPFPLWVGLS SHDGSSESS FEWS DGSTFDY IPWKQQTSPGN CVLLDPRGTWRHE 15 00
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

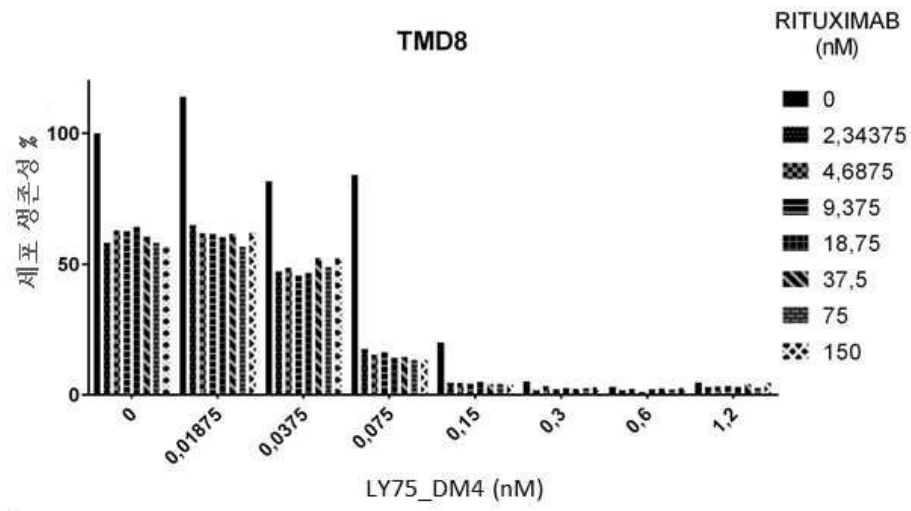
sp|O60449|LY75_HUMAN      KCNSVKDGAICYKPTKSKKLSRLTYSSRC PAAKENGSRWIQYKGHCYKSDQALHSFSEAK 15 60
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----KKL SRLTYSS-C-----NGSRWIQYKGHCYKSDQALH-----

sp|O60449|LY75_HUMAN      KLCSEKHDHSA TIVSIRKDEDE NKFVSRIMRENNNITMRVWLGLSQHSVDQSWSWLDGSEVT 16 20
MS-Peptides_Elute1a      -----HDHSA TIVSIRKDEDE NKFVSR-----
MS-Peptides_Elute1b      -----HDHSA TIVSIRKDEDE NKFVSR-----
MS-Peptides_Elute2a      -----HDHSA TIVSIRKDEDE NKFVSR-----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

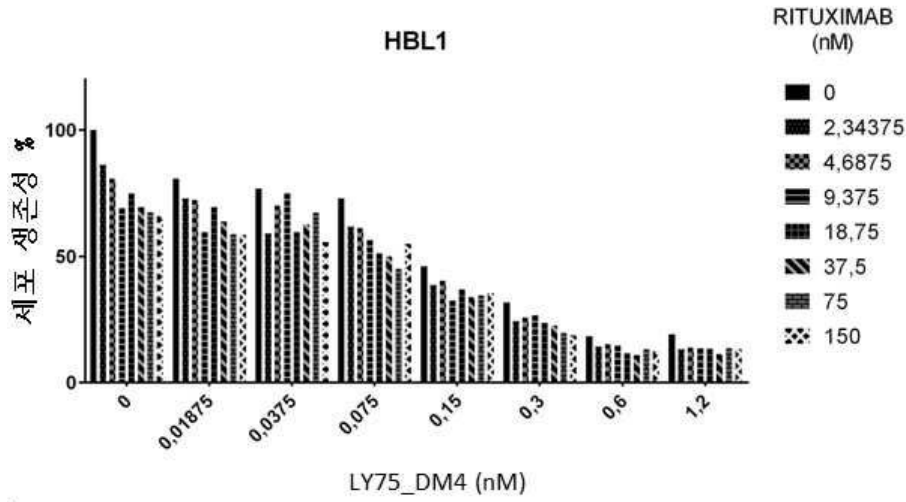
sp|O60449|LY75_HUMAN      FVKWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKKVE CEHGFGFGRVVCVKVPLGPDYTAIAIIVATLSIL 16 80
MS-Peptides_Elute1a      -----VECEHGFGFGR-----
MS-Peptides_Elute1b      -----VECEHGFGFGR-----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      VLMGGLIWFLFQRHRLHLAGFSSVR YAQGVNEDEIMLPSPFD 1 722
MS-Peptides_Elute1a      -----
MS-Peptides_Elute1b      -----
MS-Peptides_Elute2a      -----
MS-Peptides_Elute2b      -----
LC-Peptides               -----
    
```

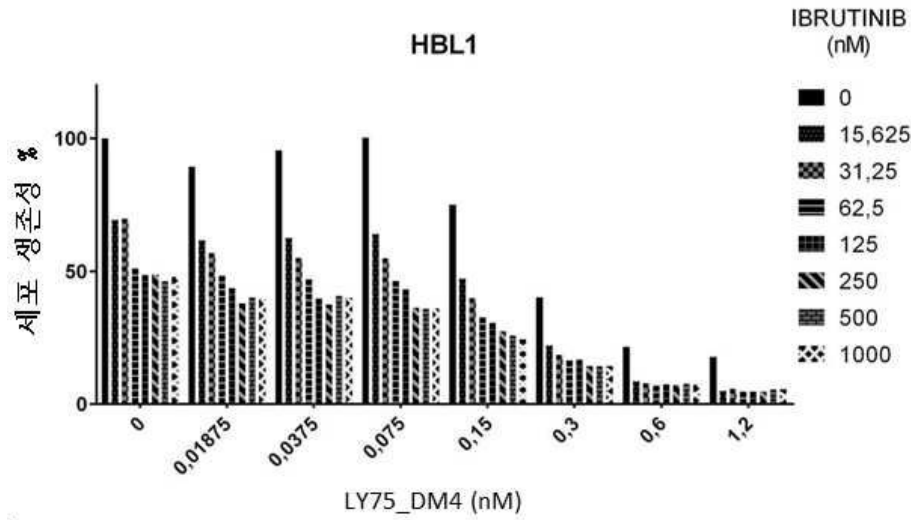
도면8a



도면8b



도면9



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Berlin-Chemie AG

<120> Pharmaceutical combinations

<130> 489.131183/01

<160> 207

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Ser Asn Ala  
                   20                    25                    30  
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
                   50                    55                    60  
 Pro Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                    90                    95  
 Tyr Cys Thr Ile Phe Gly Val Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   100                    105                    110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

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



Asn Ala Trp Met Ser

1 5

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro

1 5 10 15

Val Gln Gly

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Phe Gly Val Val Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Human

<400>

> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Human

<400> 9

Ala Ala Ser Asn Leu Lys Thr

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Human

<400> 10

Gln Gln Ser Tyr Arg Ser Pro Trp Thr

1                    5

<210> 11

<211> 104

<212> PRT

<213> Human

<400> 11

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala

                  50                    55                    60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65                    70                    75                    80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

                  85                    90                    95

Tyr Cys Thr Thr Thr Thr Val Thr

                  100

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 12

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10                    15

<210> 13

<211> 93

<212> PRT

<213> Human

<400> 13

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

1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
                   20                    25                    30  
 Leu Asn 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 Ser Tyr Ser  
                   85                    90

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Human

<400> 14

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1                    5                    10

<210> 15

<211> 1722

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Met Arg Thr Gly Trp Ala Thr Pro Arg Arg Pro Ala Gly Leu Leu Met

1                    5                    10                    15

Leu Leu Phe Trp Phe Phe Asp Leu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ala Ala  
                   20                    25                    30

Asn Asp Pro Phe Thr Ile Val His Gly Asn Thr Gly Lys Cys Ile Lys



Trp Glu Trp Ser Asp His Lys Pro Leu Asn Phe Leu Asn Trp Asp Pro  
 290 295 300  
 Asp Arg Pro Ser Ala Pro Thr Ile Gly Gly Ser Ser Cys Ala Arg Met  
 305 310 315 320  
 Asp Ala Glu Ser Gly Leu Trp Gln Ser Phe Ser Cys Glu Ala Gln Leu  
 325 330 335  
  
 Pro Tyr Val Cys Arg Lys Pro Leu Asn Asn Thr Val Glu Leu Thr Asp  
 340 345 350  
 Val Trp Thr Tyr Ser Asp Thr Arg Cys Asp Ala Gly Trp Leu Pro Asn  
 355 360 365  
 Asn Gly Phe Cys Tyr Leu Leu Val Asn Glu Ser Asn Ser Trp Asp Lys  
 370 375 380  
 Ala His Ala Lys Cys Lys Ala Phe Ser Ser Asp Leu Ile Ser Ile His  
 385 390 395 400  
  
 Ser Leu Ala Asp Val Glu Val Val Val Thr Lys Leu His Asn Glu Asp  
 405 410 415  
 Ile Lys Glu Glu Val Trp Ile Gly Leu Lys Asn Ile Asn Ile Pro Thr  
 420 425 430  
 Leu Phe Gln Trp Ser Asp Gly Thr Glu Val Thr Leu Thr Tyr Trp Asp  
 435 440 445  
 Glu Asn Glu Pro Asn Val Pro Tyr Asn Lys Thr Pro Asn Cys Val Ser  
 450 455 460  
  
 Tyr Leu Gly Glu Leu Gly Gln Trp Lys Val Gln Ser Cys Glu Glu Lys  
 465 470 475 480  
 Leu Lys Tyr Val Cys Lys Arg Lys Gly Glu Lys Leu Asn Asp Ala Ser  
 485 490 495  
 Ser Asp Lys Met Cys Pro Pro Asp Glu Gly Trp Lys Arg His Gly Glu  
 500 505 510  
 Thr Cys Tyr Lys Ile Tyr Glu Asp Glu Val Pro Phe Gly Thr Asn Cys  
 515 520 525  
  
 Asn Leu Thr Ile Thr Ser Arg Phe Glu Gln Glu Tyr Leu Asn Asp Leu

530                      535                      540  
 Met Lys Lys Tyr Asp Lys Ser Leu Arg Lys Tyr Phe Trp Thr Gly Leu  
 545                      550                      555                      560  
 Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn Trp Ala Thr Val Gly Gly  
                          565                      570                      575  
 Arg Arg Arg Ala Val Thr Phe Ser Asn Trp Asn Phe Leu Glu Pro Ala  
                          580                      585                      590  
  
 Ser Pro Gly Gly Cys Val Ala Met Ser Thr Gly Lys Ser Val Gly Lys  
                          595                      600                      605  
 Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser Ile Cys Lys  
                          610                      615                      620  
 Lys Met Ser Gly Pro Leu Gly Pro Glu Glu Ala Ser Pro Lys Pro Asp  
 625                      630                      635                      640  
 Asp Pro Cys Pro Glu Gly Trp Gln Ser Phe Pro Ala Ser Leu Ser Cys  
                          645                      650                      655  
  
 Tyr Lys Val Phe His Ala Glu Arg Ile Val Arg Lys Arg Asn Trp Glu  
                          660                      665                      670  
 Glu Ala Glu Arg Phe Cys Gln Ala Leu Gly Ala His Leu Ser Ser Phe  
                          675                      680                      685  
 Ser His Val Asp Glu Ile Lys Glu Phe Leu His Phe Leu Thr Asp Gln  
                          690                      695                      700  
 Phe Ser Gly Gln His Trp Leu Trp Ile Gly Leu Asn Lys Arg Ser Pro  
 705                      710                      715                      720  
  
 Asp Leu Gln Gly Ser Trp Gln Trp Ser Asp Arg Thr Pro Val Ser Thr  
                          725                      730                      735  
 Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr Asp Ile Arg Asp Cys  
                          740                      745                      750  
 Ala Ala Val Lys Val Phe His Arg Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe  
                          755                      760                      765  
 Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Phe Ala Cys Asp Thr  
                          770                      775                      780

Lys Leu Glu Trp Val Cys Gln Ile Pro Lys Gly Arg Thr Pro Lys Thr  
 785                      790                      795                      800  
 Pro Asp Trp Tyr Asn Pro Asp Arg Ala Gly Ile His Gly Pro Pro Leu  
                                  805                      810                      815  
 Ile Ile Glu Gly Ser Glu Tyr Trp Phe Val Ala Asp Leu His Leu Asn  
                                  820                      825                      830  
 Tyr Glu Glu Ala Val Leu Tyr Cys Ala Ser Asn His Ser Phe Leu Ala  
                                  835                      840                      845  
  
 Thr Ile Thr Ser Phe Val Gly Leu Lys Ala Ile Lys Asn Lys Ile Ala  
                                  850                      855                      860  
 Asn Ile Ser Gly Asp Gly Gln Lys Trp Trp Ile Arg Ile Ser Glu Trp  
 865                      870                      875                      880  
 Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe  
                                  885                      890                      895  
 Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr Trp  
                                  900                      905                      910  
  
 Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys Leu Pro Phe  
                                  915                      920                      925  
 Ile Cys Glu Lys Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys Tyr Ser Pro Asp  
                                  930                      935                      940  
 Ser Ala Ala Lys Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn  
 945                      950                      955                      960  
 Lys Cys Phe Leu Lys Ile Lys Pro Val Ser Leu Thr Phe Ser Gln Ala  
                                  965                      970                      975  
  
 Ser Asp Thr Cys His Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Pro Ser Val Leu Ser  
                                  980                      985                      990  
 Gln Ile Glu Gln Asp Phe Ile Thr Ser Leu Leu Pro Asp Met Glu Ala  
                                  995                      1000                      1005  
 Thr Leu Trp Ile Gly Leu Arg Trp Thr Ala Tyr Glu Lys Ile Asn  
                                  1010                      1015                      1020  
 Lys Trp Thr Asp Asn Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro

1025	1030	1035
Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu		
1040	1045	1050
Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys		
1055	1060	1065
Ser Pro Phe Thr Gly Thr Trp Asn Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg		
1070	1075	1080
His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser Arg		
1085	1090	1095
Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn		
1100	1105	1110
Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys		
1115	1120	1125
Arg Glu Cys Leu Lys Ser Asn Met Gln Leu Val Ser Ile Thr Asp		
1130	1135	1140
Pro Tyr Gln Gln Ala Phe Leu Ser Val Gln Ala Leu Leu His Asn		
1145	1150	1155
Ser Ser Leu Trp Ile Gly Leu Phe Ser Gln Asp Asp Glu Leu Asn		
1160	1165	1170
Phe Gly Trp Ser Asp Gly Lys Arg Leu His Phe Ser Arg Trp Ala		
1175	1180	1185
Glu Thr Asn Gly Gln Leu Glu Asp Cys Val Val Leu Asp Thr Asp		
1190	1195	1200
Gly Phe Trp Lys Thr Val Asp Cys Asn Asp Asn Gln Pro Gly Ala		
1205	1210	1215
Ile Cys Tyr Tyr Ser Gly Asn Glu Thr Glu Lys Glu Val Lys Pro		
1220	1225	1230
Val Asp Ser Val Lys Cys Pro Ser Pro Val Leu Asn Thr Pro Trp		
1235	1240	1245
Ile Pro Phe Gln Asn Cys Cys Tyr Asn Phe Ile Ile Thr Lys Asn		
1250	1255	1260

Arg His Met Ala Thr Thr Gln Asp Glu Val His Thr Lys Cys Gln  
 1265 1270 1275

Lys Leu Asn Pro Lys Ser His Ile Leu Ser Ile Arg Asp Glu Lys  
 1280 1285 1290

Glu Asn Asn Phe Val Leu Glu Gln Leu Leu Tyr Phe Asn Tyr Met  
 1295 1300 1305

Ala Ser Trp Val Met Leu Gly Ile Thr Tyr Arg Asn Lys Ser Leu  
 1310 1315 1320

Met Trp Phe Asp Lys Thr Pro Leu Ser Tyr Thr His Trp Arg Ala  
 1325 1330 1335

Gly Arg Pro Thr Ile Lys Asn Glu Lys Phe Leu Ala Gly Leu Ser  
 1340 1345 1350

Thr Asp Gly Phe Trp Asp Ile Gln Thr Phe Lys Val Ile Glu Glu  
 1355 1360 1365

Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu Ala Cys Lys Ile Glu  
 1370 1375 1380

Met Val Asp Tyr Lys Glu Glu Tyr Asn Thr Thr Leu Pro Gln Phe  
 1385 1390 1395

Met Pro Tyr Glu Asp Gly Ile Tyr Ser Val Ile Gln Lys Lys Val  
 1400 1405 1410

Thr Trp Tyr Glu Ala Leu Asn Met Cys Ser Gln Ser Gly Gly His  
 1415 1420 1425

Leu Ala Ser Val His Asn Gln Asn Gly Gln Leu Phe Leu Glu Asp  
 1430 1435 1440

Ile Val Lys Arg Asp Gly Phe Pro Leu Trp Val Gly Leu Ser Ser  
 1445 1450 1455

His Asp Gly Ser Glu Ser Ser Phe Glu Trp Ser Asp Gly Ser Thr  
 1460 1465 1470

Phe Asp Tyr Ile Pro Trp Lys Gly Gln Thr Ser Pro Gly Asn Cys  
 1475 1480 1485

Val Leu Leu Asp Pro Lys Gly Thr Trp Lys His Glu Lys Cys Asn

1490	1495	1500
Ser Val Lys Asp Gly Ala Ile Cys Tyr Lys Pro Thr Lys Ser Lys		
1505	1510	1515
Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Cys Pro Ala Ala Lys		
1520	1525	1530
Glu Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys		
1535	1540	1545
Ser Asp Gln Ala Leu His Ser Phe Ser Glu Ala Lys Lys Leu Cys		
1550	1555	1560
Ser Lys His Asp His Ser Ala Thr Ile Val Ser Ile Lys Asp Glu		
1565	1570	1575
Asp Glu Asn Lys Phe Val Ser Arg Leu Met Arg Glu Asn Asn Asn		
1580	1585	1590
Ile Thr Met Arg Val Trp Leu Gly Leu Ser Gln His Ser Val Asp		
1595	1600	1605
Gln Ser Trp Ser Trp Leu Asp Gly Ser Glu Val Thr Phe Val Lys		
1610	1615	1620
Trp Glu Asn Lys Ser Lys Ser Gly Val Gly Arg Cys Ser Met Leu		
1625	1630	1635
Ile Ala Ser Asn Glu Thr Trp Lys Lys Val Glu Cys Glu His Gly		
1640	1645	1650
Phe Gly Arg Val Val Cys Lys Val Pro Leu Gly Pro Asp Tyr Thr		
1655	1660	1665
Ala Ile Ala Ile Ile Val Ala Thr Leu Ser Ile Leu Val Leu Met		
1670	1675	1680
Gly Gly Leu Ile Trp Phe Leu Phe Gln Arg His Arg Leu His Leu		
1685	1690	1695
Ala Gly Phe Ser Ser Val Arg Tyr Ala Gln Gly Val Asn Glu Asp		
1700	1705	1710
Glu Ile Met Leu Pro Ser Phe His Asp		
1715	1720	

<210> 16  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 16  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Ser  
                   20                    25                    30

<210> 17  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 17  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly  
 1                    5                    10

<210> 18  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 18  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile  
                   20                    25                    30

<210>  
 > 19  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 19  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1                    5                    10  
 <210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> Human

<400> 20

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

1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr

1                    5                    10                    15

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

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

1                    5                    10                    15

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

20

25

30

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Human

<400> 23

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1                    5                    10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Human

<400> 24

Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys

1                    5                    10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Human

<400> 25

Pro Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala

1                    5                    10

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 26

Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr

1                    5                    10                    15

Leu Arg Pro Phe

20

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Human

<400> 27

Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro Val

1                    5                    10                    15

Thr Phe Gly

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Human

<400> 28

Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu

1                    5                    10

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Human

<400> 29

Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr

1                    5                    10                    15

Ser

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Human

<400> 30

Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile

1                    5                    10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Human

<400> 31

Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu

1                    5                    10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Human

<400> 32

Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Cys

1                    5                    10

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 33

Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp

1                    5                    10                    15

Gln Ala Leu His

20

<210> 34

<211> 25

<212> PRT

<213> Human

<400> 34

Ile Ser Glu Trp Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro

1                    5                    10                    15

Trp His Arg Phe Pro Val Thr Phe Gly

20

25

<210>

35

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 35

Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu

1                    5                    10                    15

Tyr Lys Ile Ile

20

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Human

<400> 36

Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro

1                    5                    10

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 37

Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys  
 1                    5                    10                    15

<210> 38

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab VH sequence

<400> 38

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
                   50                    55                    60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly  
                   100                    105                    110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                   115                    120                    125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
                   130                    135                    140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145                    150                    155                    160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
                          165                    170                    175  
  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
                          180                    185                    190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
                          195                    200                    205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys  
                          210                    215                    220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225                    230                    235                    240  
  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                          245                    250                    255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                          260                    265                    270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                          275                    280                    285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
                          290                    295                    300  
  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305                    310                    315                    320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
                          325                    330                    335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
                          340                    345                    350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                          355                    360                    365  
  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
                          370                    375                    380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385                    390                    395                    400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

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

Pro Gly Lys  
 450

<210> 39

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab VL sequence

<400> 39

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145                      150                      155                      160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
                                  165                      170                      175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
                                  180                      185                      190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
                                  195                      200                      205

Asn Arg Gly Glu Cys  
                                  210

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Rituximab VH\_CDR1

<400> 40

Ser Tyr Asn Met His

1                      5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab VH\_CDR2

<400> 41

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

1                      5                      10                      15

Gly

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab VH\_CDR3

<400> 42

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val

1                    5                    10

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab VL\_CDR1

<400> 43

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His

1                    5                    10

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab VL\_CDR2

<400> 44

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1                    5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rituximab VL\_CDR3

<400> 45

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe

1                    5                    10

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg

1                    5  
 <210> 47  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 47  
 Ile Ser Glu Trp Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg  
 1                    5                    10  
 <210> 48  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 48  
 Phe Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 49  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 49  
 Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 50  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 50  
 His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys  
 1                    5  
 <210> 51  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 51

Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys

1                    5                    10

<210> 52

<211

> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 52

Gly Phe Leu Gly

1

<210> 53

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 53

Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser

1                    5

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 54

Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe

1                    5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 55

Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys

1                    5  
 <210> 56  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 56  
 Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala

1                    5  
 <210> 57  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 57  
 Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu

1                    5  
 <210> 58  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > Peptide  
 <400> 58

Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser  
 1                    5  
 <210> 59  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 59

Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser Ile  
 1                    5  
 <210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 60

Pro Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys

1                    5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 61

Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val

1                    5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 62

Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe

1                    5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 63

Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His

1                    5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 64

Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala

1 5

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 65

Cys Tyr Lys Val Phe His Ala Glu

1 5

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 66

Tyr Lys Val Phe His Ala Glu Arg

1 5

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 67

Lys Val Phe His Ala Glu Arg Ile

1 5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 68

Val Phe His Ala Glu Arg Ile Val

1 5

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 69

Phe His Ala Glu Arg Ile Val Arg

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 70

Asp Cys Ala Ala Val Lys Val Phe

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 71

Ala Ala Val Lys Val Phe His Arg

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 72

Val Lys Val Phe His Arg Pro Trp

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 73

Val Phe His Arg Pro Trp Arg Arg

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 74

His Arg Pro Trp Arg Arg Gly Trp

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 75

Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 76

Arg Arg Gly Trp His Phe Tyr Asp

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 77

Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg

1                    5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 78

His Phe Tyr Asp Asp Arg Glu Phe

1                    5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 79

Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr

1                    5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 80

Asp Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Arg

1                    5

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 81

Glu Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Phe

1                    5

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 82

Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr

1                    5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 83

Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser

1                    5

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 84

Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg

1                    5

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 85  
 Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr  
 1 5  
 <210> 86  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > Peptide  
 <400> 86  
 His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro  
 1 5  
 <210> 87  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 87  
 Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp  
 1 5  
 <210> 88  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 88  
 Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His  
 1 5  
 <210> 89  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 89

Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg

1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 90

Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe

1 5

<210> 91

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 91

Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro

1 5

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 92

Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro Val

1 5

<210> 93

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 93

Pro Trp His Arg Phe Pro Val Thr

1                    5

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 94

Trp His Arg Phe Pro Val Thr Phe

1                    5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 95

His Arg Phe Pro Val Thr Phe Gly

1                    5

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 96

Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe

1                    5

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 97

Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His

1                    5  
<210> 98  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Peptide  
<400> 98  
Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro

1                    5  
  
<210> 99  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Peptide  
<400> 99  
Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu

1                    5  
<210> 100  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Peptide  
<400> 100  
Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu

1                    5  
<210> 101  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Peptide  
<400> 101  
Ser Asn Phe His Pro Leu Leu Val

1                    5  
<210>

102  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 102  
 Asn Phe His Pro Leu Leu Val Ser  
 1                    5  
 <210> 103  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 103  
 Phe His Pro Leu Leu Val Ser Gly  
 1                    5  
 <210> 104  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 104  
 His Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg  
 1                    5  
 <210> 105  
  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 105  
 Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu  
 1                    5  
 <210> 106  
 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 106

Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg

1                    5

<210> 107

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 107

Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile

1                    5

<210> 108

<211

> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 108

Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro

1                    5

<210> 109

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 109

Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His

1                    5

<210> 110

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 110

Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe

1                    5

<210> 111

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 111

Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val

1                    5

<210> 112

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 112

Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser

1                    5

<210> 113

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 113

Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu

1                    5

<210> 114

<211> 8

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 114

Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys

1                    5

<210> 115

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 115

Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln

1                    5

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 116

His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys

1                    5

<210> 117

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 117

Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr

1                    5

<210> 118

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 118

Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser

1                    5  
 <210> 119  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 119  
 Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu

1                    5  
 <210> 120  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213>  
 > Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 120  
 Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val

1                    5  
 <210> 121  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 121  
 Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys

1                    5  
 <210> 122  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 122  
 Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser

1                    5  
 <210> 123

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 123

Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu

1 5

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 124

Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr

1 5

<210> 125

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 125

Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys

1 5

<210> 126

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Peptide

<400> 126

Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile

1 5

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 127

Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile

1                    5

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 128

Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile Pro

1                    5

<210> 129

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Peptide

<400> 129

Asn Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys

1                    5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 130

Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr

1                    5

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 131

Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu

1                    5

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 132

Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr

1                    5

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 133

Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp

1                    5

<210> 134

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 134

Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp His

1                    5

<210> 135

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400>

> 135

Pro Lys Thr Leu Thr Trp His Ser

1                    5

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 136

Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala

1                    5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 137

Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys

1                    5

<210> 138

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 138

Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His

1                    5

<210> 139

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 139

Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser

1                    5  
 <210> 140  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 140  
 Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile

1                    5  
 <210> 141  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 141  
 Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu

1                    5  
 <210> 142  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 142  
 Phe His Gln His Ser Ile Leu Ala

1                    5  
 <210> 143  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 143  
 Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr

1                    5  
 <210> 144

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 144

Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser

1                    5

<210> 145

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 145

Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser

1                    5

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 146

Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg

1                    5

<210> 147

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 147

Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Cys

1                    5

<210

> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 148

Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr

1                    5

<210> 149

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 149

Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys

1                    5

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 150

Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly

1                    5

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 151

Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His

1                    5

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide  
 <400> 152  
 Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys  
 1                   5  
 <210> 153  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 153  
 Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr  
 1                   5  
 <210> 154  
 <211>  
 > 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 154  
 Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys  
 1                   5  
 <210> 155  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 155  
 Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser  
 1                   5  
 <210> 156  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 156

Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp

1 5

<210> 157

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 157

Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp Gln

1 5

<210> 158

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 158

His Cys Tyr Lys Ser Asp Gln Ala

1 5

<210> 159

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 159

Cys Tyr Lys Ser Asp Gln Ala Leu

1 5

<210> 160

<211> 8

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 160

Tyr Lys Ser Asp Gln Ala Leu His

1                    5  
 <210> 161  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 161

Lys Ser Asp Gln Ala Leu His Ser

1                    5  
 <210> 162  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 162

Ser Asp Gln Ala Leu His Ser Phe

1                    5  
 <210> 163  
 <211> 8  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide  
 <400> 163

Asp Gln Ala Leu His Ser Phe Ser

1                    5  
 <210> 164  
 <211> 1722  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 164

Met Arg Thr Gly Trp Ala Thr Pro Arg Arg Pro Ala Gly Leu Leu Met

1                    5                    10                    15  
 Leu Leu Phe Trp Phe Phe Asp Leu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ala Ala  
                   20                    25                    30

Asn Asp Pro Phe Thr Ile Val His Gly Asn Thr Gly Lys Cys Ile Lys  
 35 40 45  
 Pro Val Tyr Gly Trp Ile Val Ala Asp Asp Cys Asp Glu Thr Glu Asp  
 50 55 60  
 Lys Leu Trp Lys Trp Val Ser Gln His Arg Leu Phe His Leu His Ser  
 65 70 75 80  
 Gln Lys Cys Leu Gly Leu Asp Ile Thr Lys Ser Val Asn Glu Leu Arg  
 85 90 95  
 Met Phe Ser Cys Asp Ser Ser Ala Met Leu Trp Trp Lys Cys Glu His  
 100 105 110  
 His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Asp Gly  
 115 120 125  
 His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys Lys Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Asp Gly Asn Ser Tyr Gly Arg Pro Cys Glu Phe Pro Phe Leu Ile Asp  
 165 170 175  
 Gly Thr Trp His His Asp Cys Ile Leu Asp Glu Asp His Ser Gly Pro  
 180 185 190  
 Trp Cys Ala Thr Thr Leu Asn Tyr Glu Tyr Asp Arg Lys Trp Gly Ile  
 195 200 205  
 Cys Leu Lys Pro Glu Asn Gly Cys Glu Asp Asn Trp Glu Lys Asn Glu  
 210 215 220  
 Gln Phe Gly Ser Cys Tyr Gln Phe Asn Thr Gln Thr Ala Leu Ser Trp  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Ala Tyr Val Ser Cys Gln Asn Gln Gly Ala Asp Leu Leu Ser  
 245 250 255  
 Ile Asn Ser Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Lys Glu Lys Glu Gly Ile  
 260 265 270  
 Ala Lys Ile Phe Trp Ile Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ser Ala Arg Gly



Asn Leu Thr Ile Thr Ser Arg Phe Glu Gln Glu Tyr Leu Asn Asp Leu  
 530 535 540  
 Met Lys Lys Tyr Asp Lys Ser Leu Arg Lys Tyr Phe Trp Thr Gly Leu  
  
 545 550 555 560  
 Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn Trp Ala Thr Val Gly Gly  
 565 570 575  
 Arg Arg Arg Ala Val Thr Phe Ser Asn Trp Asn Phe Leu Glu Pro Ala  
 580 585 590  
 Ser Pro Gly Gly Cys Val Ala Met Ser Thr Gly Lys Ser Val Gly Lys  
 595 600 605  
 Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser Ile Cys Lys  
  
 610 615 620  
 Lys Met Ser Gly Pro Leu Gly Pro Glu Glu Ala Ser Pro Lys Pro Asp  
 625 630 635 640  
 Asp Pro Cys Pro Glu Gly Trp Gln Ser Phe Pro Ala Ser Leu Ser Cys  
 645 650 655  
 Tyr Lys Val Phe His Ala Glu Arg Ile Val Arg Lys Arg Asn Trp Glu  
 660 665 670  
 Glu Ala Glu Arg Phe Cys Gln Ala Leu Gly Ala His Leu Ser Ser Phe  
  
 675 680 685  
 Ser His Val Asp Glu Ile Lys Glu Phe Leu His Phe Leu Thr Asp Gln  
 690 695 700  
 Phe Ser Gly Gln His Trp Leu Trp Ile Gly Leu Asn Lys Arg Ser Pro  
 705 710 715 720  
 Asp Leu Gln Gly Ser Trp Gln Trp Ser Asp Arg Thr Pro Val Ser Thr  
 725 730 735  
 Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr Asp Ile Arg Asp Cys  
  
 740 745 750  
 Ala Ala Val Lys Val Phe His Arg Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe  
 755 760 765  
 Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Phe Ala Cys Asp Thr



Lys Trp Thr Asp Asn Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro  
 1025 1030 1035  
 Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu  
 1040 1045 1050  
 Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys  
 1055 1060 1065  
 Ser Pro Phe Thr Gly Thr Trp Asn Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg  
 1070 1075 1080  
 His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser Arg  
 1085 1090 1095  
 Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn  
 1100 1105 1110  
 Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys  
 1115 1120 1125  
 Arg Glu Cys Leu Lys Ser Asn Met Gln Leu Val Ser Ile Thr Asp  
 1130 1135 1140  
 Pro Tyr Gln Gln Ala Phe Leu Ser Val Gln Ala Leu Leu His Asn  
 1145 1150 1155  
 Ser Ser Leu Trp Ile Gly Leu Phe Ser Gln Asp Asp Glu Leu Asn  
 1160 1165 1170  
 Phe Gly Trp Ser Asp Gly Lys Arg Leu His Phe Ser Arg Trp Ala  
 1175 1180 1185  
 Glu Thr Asn Gly Gln Leu Glu Asp Cys Val Val Leu Asp Thr Asp  
 1190 1195 1200  
 Gly Phe Trp Lys Thr Val Asp Cys Asn Asp Asn Gln Pro Gly Ala  
 1205 1210 1215  
 Ile Cys Tyr Tyr Ser Gly Asn Glu Thr Glu Lys Glu Val Lys Pro  
 1220 1225 1230  
 Val Asp Ser Val Lys Cys Pro Ser Pro Val Leu Asn Thr Pro Trp  
 1235 1240 1245  
 Ile Pro Phe Gln Asn Cys Cys Tyr Asn Phe Ile Ile Thr Lys Asn

1250	1255	1260
Arg His Met Ala Thr Thr Gln Asp Glu Val His Thr Lys Cys Gln		
1265	1270	1275
Lys Leu Asn Pro Lys Ser His Ile Leu Ser Ile Arg Asp Glu Lys		
1280	1285	1290
Glu Asn Asn Phe Val Leu Glu Gln Leu Leu Tyr Phe Asn Tyr Met		
1295	1300	1305
Ala Ser Trp Val Met Leu Gly Ile Thr Tyr Arg Asn Lys Ser Leu		
1310	1315	1320
Met Trp Phe Asp Lys Thr Pro Leu Ser Tyr Thr His Trp Arg Ala		
1325	1330	1335
Gly Arg Pro Thr Ile Lys Asn Glu Lys Phe Leu Ala Gly Leu Ser		
1340	1345	1350
Thr Asp Gly Phe Trp Asp Ile Gln Thr Phe Lys Val Ile Glu Glu		
1355	1360	1365
Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu Ala Cys Lys Ile Glu		
1370	1375	1380
Met Val Asp Tyr Lys Glu Glu Tyr Asn Thr Thr Leu Pro Gln Phe		
1385	1390	1395
Met Pro Tyr Glu Asp Gly Ile Tyr Ser Val Ile Gln Lys Lys Val		
1400	1405	1410
Thr Trp Tyr Glu Ala Leu Asn Met Cys Ser Gln Ser Gly Gly His		
1415	1420	1425
Leu Ala Ser Val His Asn Gln Asn Gly Gln Leu Phe Leu Glu Asp		
1430	1435	1440
Ile Val Lys Arg Asp Gly Phe Pro Leu Trp Val Gly Leu Ser Ser		
1445	1450	1455
His Asp Gly Ser Glu Ser Ser Phe Glu Trp Ser Asp Gly Ser Thr		
1460	1465	1470
Phe Asp Tyr Ile Pro Trp Lys Gly Gln Thr Ser Pro Gly Asn Cys		
1475	1480	1485

Val Leu Leu Asp Pro Lys Gly Thr Trp Lys His Glu Lys Cys Asn  
 1490 1495 1500

Ser Val Lys Asp Gly Ala Ile Cys Tyr Lys Pro Thr Lys Ser Lys  
 1505 1510 1515

Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Cys Pro Ala Ala Lys  
 1520 1525 1530

Glu Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys  
 1535 1540 1545

Ser Asp Gln Ala Leu His Ser Phe Ser Glu Ala Lys Lys Leu Cys  
 1550 1555 1560

Ser Lys His Asp His Ser Ala Thr Ile Val Ser Ile Lys Asp Glu  
 1565 1570 1575

Asp Glu Asn Lys Phe Val Ser Arg Leu Met Arg Glu Asn Asn Asn  
 1580 1585 1590

Ile Thr Met Arg Val Trp Leu Gly Leu Ser Gln His Ser Val Asp  
 1595 1600 1605

Gln Ser Trp Ser Trp Leu Asp Gly Ser Glu Val Thr Phe Val Lys  
 1610 1615 1620

Trp Glu Asn Lys Ser Lys Ser Gly Val Gly Arg Cys Ser Met Leu  
 1625 1630 1635

Ile Ala Ser Asn Glu Thr Trp Lys Lys Val Glu Cys Glu His Gly  
 1640 1645 1650

Phe Gly Arg Val Val Cys Lys Val Pro Leu Gly Pro Asp Tyr Thr  
 1655 1660 1665

Ala Ile Ala Ile Ile Val Ala Thr Leu Ser Ile Leu Val Leu Met  
 1670 1675 1680

Gly Gly Leu Ile Trp Phe Leu Phe Gln Arg His Arg Leu His Leu  
 1685 1690 1695

Ala Gly Phe Ser Ser Val Arg Tyr Ala Gln Gly Val Asn Glu Asp  
 1700 1705 1710

Glu Ile Met Leu Pro Ser Phe His Asp

1715

1720

<210> 165

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 165

Cys Ile Lys Pro Val Tyr Gly Trp Ile Val Ala Asp Asp Cys Asp Glu

1                    5                    10                    15

Thr Glu Asp Lys Leu Trp Lys

20

<210> 166

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 166

Cys Glu His His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg

1                    5                    10

<210> 167

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 167

Asp Gly His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys Lys

1                    5                    10                    15

Gly Gly Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr

20                    25                    30

Thr Arg

<210> 168

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 168

Lys Gly Gly Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile

1                    5                    10                    15

Tyr Thr Arg

<210> 169

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 169

Gly Gly Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr

1                    5                    10                    15

Thr Arg

<210> 170

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 170

Asp Gly His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys

1                    5                    10                    15

<210> 171

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 171

Trp Gly Ile Cys Leu Lys Pro Glu Asn Gly Cys Glu Asp Asn Trp Glu

1                    5                    10                    15

Lys

<210> 172

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 172

Ile Phe Trp Ile Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ser Ala Arg

1                    5                    10

<210> 173

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 173

Leu His Asn Glu Asp Ile Lys Glu Glu Val Trp Ile Gly Leu Lys

1                    5                    10                    15

<210> 174

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 174

Thr Pro Asn Cys Val Ser Tyr Leu Gly Glu Leu Gly Gln Trp Lys

1                    5                    10                    15

<210> 175

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 175

Tyr Phe Trp Thr Gly Leu Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn

1                    5                    10                    15

Trp Ala Thr Val Gly Gly Arg

20

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 176

Ser Val Gly Lys Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg

1                    5                    10

<210> 177

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 177

Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys

1                    5                    10

<210> 178

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 178

Ala Leu Ser Ile Cys Lys Lys

1                    5

<210> 179

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 179

Pro Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala

1                    5                    10

<210> 180

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 180

Arg Asn Trp Glu Glu Ala Glu Arg

1                    5

<210> 181

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 181

Arg Ser Pro Asp Leu Gln Gly Ser Trp Gln Trp Ser Asp Arg Thr Pro

1                    5                    10                    15

Val Ser Thr Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr Asp Ile

                  20                    25                    30

Arg

<210> 182

<211> 19

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 182

Thr Pro Val Ser Thr Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr

1                    5                    10                    15

Asp Ile Arg

<210> 183



Thr Phe Gly

<210> 187

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 187

Phe Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr

1                    5                    10                    15

Trp Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys

                  20                    25                    30

<210> 188

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 188

Thr Trp Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys

1                    5                    10                    15

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 189

Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys

1                    5

<210> 190

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 190

Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn

1 5 10

<210> 191

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 191

Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu

1 5 10

<210> 192

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 192

Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu

1 5 10 15

Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala

20 25 30

Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys

35

<210> 193

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 193

Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys

1 5 10

<210> 194

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 194

Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr

1                    5                    10                    15

Ser

<210> 195

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 195

His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys

1                    5

<210> 196

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 196

Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys

1                    5                    10

<210> 197

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 197

Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile

1                    5                    10

<210> 198

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 198

Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys

1                    5

<210> 199

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 199

Asn Arg His Met Ala Thr Thr Gln Asp Glu Val His Thr Lys

1                    5                    10

<210> 200

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 200

Ser His Ile Leu Ser Ile Arg

1                    5

<210> 201

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 201

Ser Leu Met Trp Phe Asp Lys Thr Pro Leu Ser Tyr Thr His Trp Arg

1                    5                    10                    15

<210> 202

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 202

Ser Leu Met Trp Phe Asp Lys

1                    5

<210> 203

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 203

Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu

1                    5                    10

<210> 204

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 204

Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser

1                    5                    10

<210> 205

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 205

Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp

1                    5                    10                    15

Gln Ala Leu His

20

<210> 206

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 206

His Asp His Ser Ala Thr Ile Val Ser Ile Lys Asp Glu Asp Glu Asn

1                    5                    10                    15

Lys Phe Val Ser Arg

20

<210> 207

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 207

Val Glu Cys Glu His Gly Phe Gly Arg

1                    5