



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월15일
(11) 등록번호 10-2385495
(24) 등록일자 2022년04월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6817 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2020-7013706
- (22) 출원일자(국제) 2018년10월12일
심사청구일자 2021년10월12일
- (85) 번역문제출일자 2020년05월13일
- (65) 공개번호 10-2020-0070324
- (43) 공개일자 2020년06월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/055733
- (87) 국제공개번호 WO 2019/075417
국제공개일자 2019년04월18일
- (30) 우선권주장
62/572,467 2017년10월14일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W02016179257 A2

- (73) 특허권자
애브비 인코포레이티드
미국 일리노이주 60064 놀스 시카고 놀스 위키건 로드 1
- (72) 발명자
싱 웨타
미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코 스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151
리차드슨 제니퍼 호프
미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코 스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 15 항

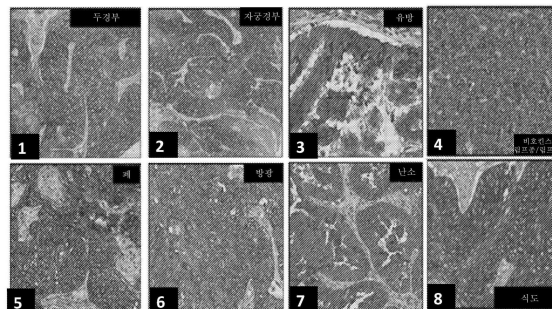
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 항-CD71 활성화 가능한 항체 약물 접합체 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 활성화 형태로 CD71과 결합하는 접합된 활성화 가능한 항체 및 다양한 치료적, 진단적 및 예방적 징후에 있어서 이들 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6851 (2017.08)

A61K 47/6889 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2881 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

C07K 2319/50 (2013.01)

(72) 발명자

서위 로라 패더슨

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코
스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151

테레트 조나단 알렉산더

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코
스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151

모르간-라프 수잔 이.

미국 일리노이주 60064 노스 시카고 노스 위키건
로드 1

헨리크 트레이시

미국 일리노이주 60064 노스 시카고 노스 위키건
로드 1

칼스톤 세리 엘.

미국 일리노이주 60064 노스 시카고 노스 위키건
로드 1

리아나 마빈 로버트

미국 일리노이주 60064 노스 시카고 노스 위키건
로드 1

바다그나니 일라리아

미국 일리노이주 60064 노스 시카고 노스 위키건
로드 1

보스 사하나

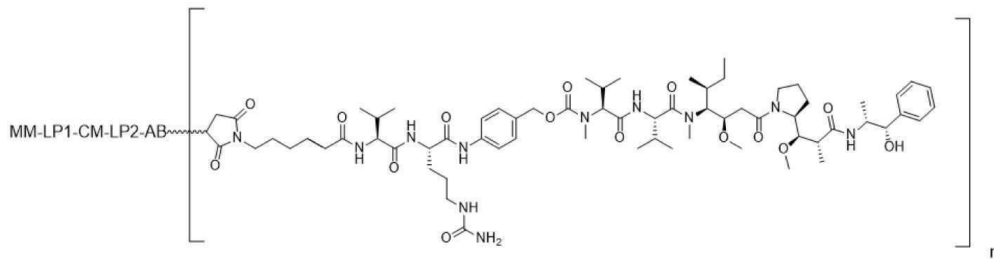
미국 일리노이주 60064 노스 시카고 노스 위키건
로드 1

명세서

청구범위

청구항 1

화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 갖는 활성화 가능한(activatable) 항체 약물 접합체(antibody drug conjugate):



화학식 (I)

(a) 상기 식에서,

(i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하고

i. 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열 번호: 11 서열을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

ii. 서열 번호: 12 또는 서열 번호:13을 포함하는 CDRL1 서열, 서열 번호: 14를 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열 번호: 15를 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항체이고;

(ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티 (masking moiety)이고, 여기서, 상기 MM은 상기 활성화 가능한 항체 약물 접합체가 비절단 상태인 경우 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고;

(iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티이고;

(iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단 가능한 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이고;

(v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티이고;

(b) "n"은 2이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 AB가 IgG1 동형 (isotype)인, 활성화 가능한 항체 약물 접합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 AB가 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 여기서, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기가 리신이 아닌, 활성화 가능한 항체 약물 접합체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역이 서열 번호: 5의 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역이 서열 번호: 7의 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 접합체.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 19의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 201의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 202의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 202의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 상기 서열 번호: 202의 N-말단 아미노산이 피로글루타메이트로 변형되는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 169의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 170의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 170의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하고, 여기서, 상기 서열 번호: 170의 N-말단 아미노산이 피로글루타메이트로 변형되는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 12

제3항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역이 서열 번호: 5의 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역이 서열 번호: 7의 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 13

제3항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 19의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 14

제3항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 201의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 15

제3항에 있어서, 상기 AB가 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 169의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 활성화 가능한 항체 약물 집합체.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 이 출원은 2017년 10 월 14일자로 출원된 미국 임시 출원 제62/572,467호의 이익을 주장하며, 이는 그 전체 내용이 본원에 인용되어 포함된다.

[0003] 서열 목록의 참조

[0004] 파일명 "CYTM056001US_12OCT2018_FINAL_ST25.txt"으로 EFS-웹을 통해 컴퓨터 판독 형태(CFR)로 37 C.F.R. § 1.821에 따라 전자적으로 동시에 동봉하여 제출된 "서열 목록"은 본원에 인용되어 포함된다. 서열 목록의 전자 사본은 2018년 10월 12일에 작성되고, 디스크 크기는 96 킬로바이트이다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 발명은 일반적으로 활성화 상태의 CD71과 결합하는 활성화 가능한 항체 약물 접합체, 및 다양한 치료적, 진단적 및 예방적 징후에 있어서 이들 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 항체 기반의 치료법은 몇 가지 질병에 대한 효과적인 치료법을 입증해 왔지만, 경우에 따라서 광범위한 표적 발현으로 인한 독성은 이의 치료 효과를 제한하였다. 또한, 항체 기반 치료제는 투여 후 순환에서 빠른 제거율 (clearance)과 같은 다른 제한을 보였다.

[0008] 소분자 치료제의 영역에서, 전략은 활성 화학 개체(entity)의 전구약물을 제공하기 위해 개발되었다. 이러한 전구약물은 상대적으로 비활성 (또는 훨씬 적은 활성) 형태로 투여된다. 전구약물은 일단 투여되면 활성 화합물로 생체 내에서 대사된다. 이러한 전구약물 전략은 약물의 의도된 표적에 대한 약물의 증가된 선택성 및 부작용의 감소를 제공할 수 있다.

[0009] 따라서, 항체 기반 치료제의 분야에서 소분자 전구약물의 바람직한 특성을 모방하는 항체에 대한 계속된 요구가 존재한다.

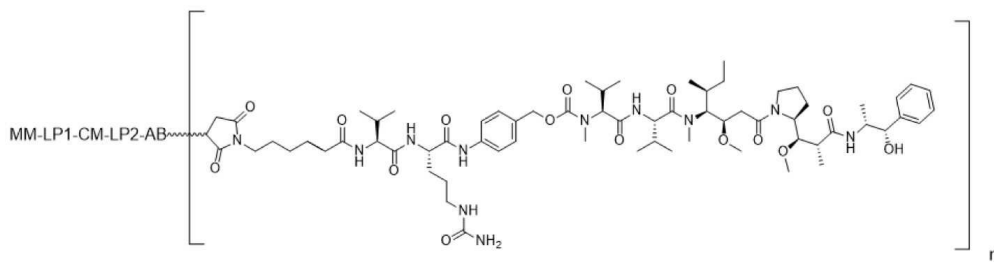
선행기술문헌

국제공개공보 제W02010/081173호 (2010년 7월 15일 공개)

발명의 내용

[0010] 본 개시내용은 트랜스페린 수용체 단백질 1(TfR1)으로도 알려진 CD71과 특이적으로 결합하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공된다:



화학식 (I)

[0012]

[0013] 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열 번호: 11을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 13을 포함하는 CDRL1 서열, 서열 번호: 14를 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열 번호: 15를 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노산 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티이고; (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이고; 및 (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티이며; 및 (b) "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루탐메

이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

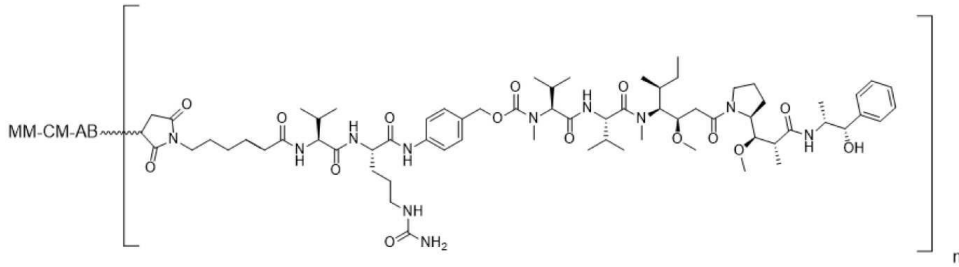
[0014] 본 발명의 관련된 일 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노산 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티이고; (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이고; 및 (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티이며; 및 (b) "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0015] 본 발명의 관련된 일 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 19의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노산 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티이고; (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이고; 및 (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티이며; 및 (b) "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0016] 본 발명의 관련된 일 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공되며, 상기 식에서 MM-LP1-CM-LP2-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체이고, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 169의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며, 및 "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0017] 본 발명의 관련된 일 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공되며, 상기 식에서 MM-LP1-CM-LP2-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체이고, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 170의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며, "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0018] 본 발명의 관련된 일 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공된다:



화학식 (II)

[0019]

[0020]

상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열 번호: 11을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 13을 포함하는 CDRL1 서열, 서열 번호: 14를 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열 번호: 15를 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; 및 (iii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이며; 및 (b) "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0021]

본 발명의 관련된 일 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; 및 (iii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이며; 및 (b) "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0022]

본 발명의 관련된 일 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 19의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; 및 (iii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이며; 및 (b) "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0023]

본 발명의 관련된 일 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공되며, 상기 식에서 MM-LP1-CM-LP2-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체이고, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 169의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며, 및 "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기

는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0024] 본 발명의 관련된 일 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공되며, 식 중, MM-LP1-CM-LP2-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체이고, 상기 활성화 가능한 항체는 SEQ ID NO: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 170의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며, 및 "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0025] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열 번호: 11을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 13을 포함하는 CDRL1 서열, 서열 번호: 14를 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열 번호: 15를 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노산 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티이고; (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이고; (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티이며; 및 (b) "n"은 2임; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노산 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티이고; (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이고; 및 (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티이며; 및 (b) "n"은 2임; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0027] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 19의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노산 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티이고; (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이고; 및 (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티이며; 및 (b) "n"은 2임; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환

원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0028] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 식에서 MM-LP1-CM-LP2-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체이고, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 169의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며; 및 (b) "n"은 2임; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0029] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 식 중, MM-LP1-CM-LP2-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체이고, 상기 활성화 가능한 항체는 SEQ ID NO: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 170의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며; 및 (b) "n"은 2이다; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0030] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열 번호: 11을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호: 12 또는 서열 번호: 13을 포함하는 CDRL1 서열, 서열 번호: 14를 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열 번호: 15를 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이며; 및 (b) "n"은 2임; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0031] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이며; 및 (b) "n"은 2임; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식

(I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0032] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 식에서 (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 19의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비결단 상태인 경우, 상기 MM은 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이며; 및 (b) "n"은 2임; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0033] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 식에서 MM-LP1-CM-LP2-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체이고, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 169의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며; 및 (b) "n"은 2임; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0034] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법이 본원에 제공되며, 식 중, MM-LP1-CM-LP2-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체이고, 상기 활성화 가능한 항체는 SEQ ID NO: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 170의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며; 및 (b) "n"은 2임; 상기 방법은 (i) MM-LP1-CM-LP2-AB를 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및 (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 가능한 항체와 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0035] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 1회 반복의 접합된 활성화 가능한 항체를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 일부 실시형태에서, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 양태에서, 위암, 난소암, 식도암, 비소세포성 폐암, ER+ 유방암, 삼중 음성 유방암, 대장암, 흑색종, 전립선암, 다발골수종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 두경부 소세포 암종, 췌장암, 중피종, 비호킨스 림프종, 간세포암종, 및 교모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된 암에 대하여, 치료학적 유효량의 화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 1회 반복의 접합된 활성화 가능한 항체 및 선택적으로는 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하고, 암의 증상을 완화하거나 암의 진행을 지연하는 방법이 본원에 제공된다.

[0037] 본 발명의 다른 양태에서, 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 비절단 상태로 포함하는 활성화 가능한 항체(AA)를 포함하는 (a) 접합된 활성화 가능한 항체가 본원에 제공된다: MM-CM-AB, 상기 식에서 (i) AB는 포유류 CD71과 특이적으로 결합하며 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 AB에 접합된 MM은 상기 AB의 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) CM은 상기 AB에 접합된 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이며; 및 (b) 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)로서, 상기 활성화 가능한 항체는 MMAE 2 당량에 접합된다. 일부 실시형태에서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 변형된다.

[0038] 본 발명의 다른 양태에서, 화학식 AA-(AG)_p를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체로서, (a) AA는 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 비절단 상태로 포함하는 항체인 것이 본원에 제공된다: MM-CM-AB, 상기 식에서 (i) AB는 포유류 CD71과 특이적으로 결합하며 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 상기 AB에 접합된 MM은 상기 AB의 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) CM은 상기 AB에 접합된 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이며; 및 (b) AG는 상기 AA에 접합된 작용체로서, 상기 작용체는 MMAE이며, p는 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 변형된다.

[0039] 본 발명의 다른 양태에서, 접합된 활성화 가능한 항체를 제작하는 방법에 있어서, (a) 적어도 하나의 MMAE를 활성화 가능한 항체(AA)에 접합함으로써 p는 1 내지 8인 AA-(MMAE)_p를 포함하는 조성물을 생성하는 단계; 및 (b) p는 2인 상기 접합된 활성화 가능한 항체 종을 위한 조성물을 농축하되, AA는 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 비절단 상태로 포함하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다: MM-CM-AB, 상기 식에서 AB는 포유류 CD71과 특이적으로 결합하며 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이고; (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티로서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우 상기 AB에 접합된 MM은 상기 AB의 CD71과의 결합을 억제하고; (iii) CM은 상기 AB에 접합된 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티로서, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이며; 및 (b) AG는 상기 AA에 접합된 작용체로서, 상기 작용체는 MMAE이며, p는 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 변형된다.

[0040] 본 발명의 다른 양태에서, 본원에 개시된 바와 같이, 약제로서 사용하기 위한, 임의의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 약학 조성물이 본원에 제공된다.

[0041] 본 발명의 다른 양태에서, 본원에 개시된 바와 같이, 암의 치료에 사용을 위한 임의의 활성화 가능한 항체 또는 약학적 조성물이 본원에 제공되며, 선택적으로, 상기 암은 위암, 난소암, 식도암, 비소세포성 폐암, ER+ 유방암, 삼중 음성 유방암, 대장암, 흑색종, 전립선암, 다발골수종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 두경부 소세포암종, 췌장암, 중피종, 비호킨스 림프종, 간세포암종, 및 교모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0042] 본 발명의 다른 양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 적어도 하나의 활성화 가능한 항체를 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 상기 키트는 하나 이상의 vcMMAE, 및/또는 환원제를 더 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 실시예 5에서 논의된 바와 같이, 도 1은 다양한 일차 및 전이성 암 조직 유형에서 CD71 발현의 수준을 결정하기 위해 예시적인 면역조직화학(IHC) 검정을 도시한다. 이 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 CD71이 다양한 인간 암의 일차 종양에서 높은 수준으로 발현되는 것을 보여주었다.

실시에 5에서 논의된 바와 같이, 도 2는 다중 환자-유래 전이성 암 샘플에서 CD71의 발현 수준의 예시적인 연구를 시한다. 이 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 CD71이 다양한 인간 암의 일차 종양에서 높은 수준으로 발현되는 것을 보여주었다.

실시에 4에서 논의된 바와 같이, 도 3a 및 도 3b는 본 개시내용의 비접합 및 접합된 항-CD71 활성화 가능한 항체가 인간 또는 시노몰구스(cynomolgus) 재조합 CD71과 결합하는 능력의 예시적인 시험관 내(*in vitro*) 검정을 상기 활성화 가능한 항체가 그대로 또는 단백질 가수분해 활성화될 때("ACT"로 표시) 도시한 것이다. 이들 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체는 이의 비접합된 항-CD71 활성화 가능한 항체 대응물에 필적하는 수준에서 CD71에 결합하고, 또한 프로테아제 활성화시 동등하게 증가된 친화도로 CD71과 결합된 것을 보여주었다.

실시에 4에서 논의된 바와 같이, 도 3c 및 도 3d는 본 개시내용의 비접합 및 접합된 항-CD71 활성화 가능한 항체가 세포 표면 상에서 인간 또는 시노몰구스 CD71과 결합하는 능력의 예시적인 시험관 내 검정을 상기 활성화 가능한 항체가 그대로 또는 단백질 가수분해 활성화될 때("ACT"로 표시) 도시한 것이다. 이들 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체는 이의 비접합된 항-CD71 활성화 가능한 항체 대응물에 필적하는 수준에서 세포-표면 CD71에 결합하고, 또한 프로테아제 활성화시 동등하게 증가된 친화도로 세포-표면 CD71과 결합된 것을 보여주었다.

실시에 6에서 논의된 바와 같이, 도 4a, 도 4b, 및 도 4c는 마우스 이종이식편 모델(항-CD71 TF01-3011-MMAE 대 항-CD71 TF02.13-2011-MMAE)에서 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체(AADC)의 예시적인 효능 연구를 도시한다. 이들 도면 및 실시예에 도시된 이들 예시적인 결과는 친화도 마스킹 모이어티(TF02.13)는 더 낮은 AADC가 친화도 마스킹 모이어티(TF01)가 더 높은 AADC보다 더 높은 효능을 입증하였음을 보여주었다.

실시에 7에서 논의된 바와 같이, 도 5는 마우스 이종이식편 모델에서 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체(AADC)의 예시적인 효능 연구를 도시한다. 이 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 덜 절단성인 기질을 갖는 표시된 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE)의 효능이 도 4b 및 도 4c에 도시된 더 절단성인 기질을 갖는 AADC(항-CD71 TF02.13-3011-vcMMAE)의 효능과 실질적으로 동일함을 입증한다.

실시에 8에서 논의되는 바와 같이, 도 6a, 도 6b, 도 6c, 및 도 6d는 마우스 이종이식편 모델에서 본 개시내용의 상이한 DAR을 갖는 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체(AADC)(DAR 약 3을 갖는 항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE 대 DAR 약 2를 갖는 항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2)의 예시적인 효능 연구를 도시한다. 이 도면들 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 상이한 DAR을 갖는 용량-매칭 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE)의 효능이 필적할만한 효능을 보였음을 입증한다.

실시에 9에서 논의된 바와 같이, 도 7a, 도 7b, 및 도 7c는 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체(AADC)의 투여로 인한 대사 산물을 분석하기 위한 예시적인 개략적 워크플로우를 도시한다.

실시에 11 내지 14에서 논의된 바와 같이, 도 8a, 8b, 9a, 9b, 10, 및 11은 동물 모델에서 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체(AADC)의 투여 후 대사 부산물의 예시적인 시간 경과를 도시한다. 이 도면들 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 본 개시내용의 총 및 온전한 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2)의 양은 용량-비례적으로 투여하는 동안 동물에서 유지되고, 활성화 가능한 항체에 접합된 MMAE의 양은 용량 및 모든 용량 수준에서 비접합된 MMAE의 양보다 실질적으로 더 높음을 입증한다.

실시에 17에서 논의된 바와 같이, 도 12는 표시된 시험 물품의 iC3b 단백질 단편에 대한 예시적인 적정을 도시 하는데, 보체 캐스케이드를 활성화시키는 그들의 능력을 나타낸다. 이 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 본 개시내용의 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2)는 이의 비접합된 활성화 가능한 항체와 비교하여 보체 활성화에 대한 더 낮은 능력을 입증하였음을 입증한다.

실시에 19에서 논의된 바와 같이, 도 13은 인간 대장 세포주를 사용하여 마우스 이종이식편 모델에서 본 개시내용의 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2)의 예시적인 효능을 도시한다. 이 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 본 개시내용의 AADC가 모든 투여량에서 유의한 종양 성장 억제를 보였으며, 가장 높은 투여량에서 완전한 회귀가 관찰됨을 입증한다.

실시에 20에서 논의된 바와 같이, 도 14는 인간 환자-유래 종양(DLBCL)을 사용하여 마우스 이종이식편 모델에서 본 개시내용의 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2)의 예시적인 효능을 도시한다. 이 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 본 개시내용의 AADC가 단일 투여 후 유의한 종양 성장 억제를 보였으며, 일부 경우에 완전

한 반응이 관찰됨을 보여주었다.

실시예 21에서 논의된 바와 같이, 도 15a, 15b, 및 15c는 마우스 환자-유래 이중이식편(PDX) 모델에서 본 개시내용의 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2)의 예시적인 효능을 도시한다. 이들 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 본 개시내용의 AADC는 다양한 인간 암 유형에서 유래된 PDX 모델에서, 일부 경우에 완전한 반응을 포함하여 효능을 입증하였음을 입증한다.

실시예 22에서 논의된 바와 같이, 도 16은 마우스 환자-유래 이중이식편 모델에서 본 개시내용의 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2)의 예시적인 효능을 도시한다. 이 도면 및 실시예에 도시된 예시적인 결과는 본 개시내용의 AADC가 PDX 체장암 모델에 일부 경우에 완전 반응을 포함하여, 효능을 입증함을 입증한다.

실시예 10에서 논의된 바와 같이, 도 17은 본 개시내용의 접합된 독소(AADC)를 갖는 항-인간 CD71 활성화 가능한 항체(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2)는 상응하는 모체 항-CD71 항체 약물 접합체(ADC), 더 큰 절단성을 갖는 기질을 갖는 AADC, 및 더 높은 DAR을 갖는 AADC와 비교하여, 더 높은 상대적 용량에서도 시노물구스 원숭이에서 내약성이 양호하고 안정적인 반응을 보여주는 결과를 요약한다.

실시예 27에서 논의된 바와 같이, 도 18a, 18b, 및 18c는 비정제 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE 및 정제 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2에서 존재하는 종의 HIC-분리 프로파일뿐만 아니라 이들의 마우스에서의 제거율을 도시한다. 이들 도면 및 실시예는 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2는 단일 종의 접합체로서 이동하고 더 낮은 제거율을 갖는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044]

본 개시내용은 활성화 상태에서 CD71과 특이적으로 결합하는 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체를 제공한다. CD71은 또한 트랜스페린 수용체 단백질 1(TfR1)로 알려져 있다. 일반적으로, 본 개시내용은 마스크 모이어티, 절단성 모이어티, vc 링커, 및 MMAE 독소를 포함하는 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체에 관련된 것이다. 마스크 모이어티(MM)는 활성화 가능한 항체가 비절단 상태에 있을 때 항체 결합 부위가 이의 CD71 표적 항원에 결합하는 능력을 감소시키고; 절단성 모이어티(CM)는 종양 미세 환경에서 절단되어 마스크 모이어티를 제거하고 항-CD71 표적화 CDR의 수반되는 활성화를 야기하는 프로테아제-활성화 기질이다. 구체적으로, 본 개시내용은 마우스 종양 모델에서 유의적으로 개선된 효능 및 내약성을 집합적으로 초래하는, 더 낮은 친화도 마스크 모이어티, 덜 절단성인 모이어티 기관, 및 2의 낮은 약물-로딩의 독특한 조합을 갖기 때문에 당 업계에 알려진 다른 항-CD71 접합된 활성화 가능한 단일클론성 항체에 비해 우수한 효능 및 내약성을 갖는 항-CD71 접합된 활성화 가능한 단일클론성 항체의 선택을 기술한다. 또한, 항-CD71 접합된 활성화 가능한 단일클론성 항체는 또한 놀랍게도 야생형 IgG1 Fc를 함유하는 다른 항체와 달리 억제성 FcγRIIb 수용체에 결합하는 능력이 결여되어 있는데, 이는 그러한 수용체에 대한 결합은 탈과립화, 식균작용, 항체 의존성 세포 매개 독성(ADCC), 사이토카인 방출 및 전 염증성 활성화와 같은 칼슘-의존성 과정을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이들 모두는 FcγRIIb 수용체가 활성화된다면 효능의 감소로 이어진다고 예상되기 때문에 중요하다.

[0045]

CD71은 암 세포를 포함하는 분열 세포상에서 발현되는 세포-표면 수용체이다. CD71은 다양한 암 세포 유형에서 높은 수준으로 발현되고, CD71은 내재화되므로, 항체-지향 접합된 독소를 사용하여 표적화된 암 치료법의 매력적인 표적이 되었다. 더 높고 더 낮은 친화도를 갖는 마스크 모이어티(MM)뿐만 아니라, 더 작거나 더 큰 절단성을 갖는 절단성 모이어티(CM)가 확인되고 사용되어 다양한 활성화 가능한 항체 및 vcMMAE 접합된 항체(즉, 활성화 가능한 항체 약물 접합체 또는 AADC)를 구축하였다. 마우스 이중이식편 모델에서 이러한 접합된 활성화 가능한 항체의 예시적인 효능 연구는 더 높은 친화도 마스크 모이어티를 갖는 AADC(예를 들어, CD71-TF01-3011-vcMMAE)는 더 낮은 친화도 마스크를 갖는 것(예를 들어, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE)보다 더 낮은 효능을 입증함을 보였다. 또한, 동일한 더 낮은 친화도 마스크를 갖지만 다른 절단성을 갖는 기질을 갖는 AADC를 사용한 다른 효능 연구는 효능은 동일한 반면에, 비인간 영장류에서 덜 절단성인 기질을 갖는 AADC(CD71-TF02.13-2011-vcMMAE)는 더 절단성인 기질을 갖는 AADC(CD71-TF02.13-3011-vcMMAE)보다 더 양호한 내약성과 활성화된 형태의 순환 AADC가 더 낮은 수준이어서, 더 높은 치료 지수를 제공함을 보였다. 추가 연구에 따르면, 약물 대 활성화 가능한 항체비가 더 낮은 AADC(예를 들어, DAR이 2인 CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2)는 더 높은 DAR(즉, DAR 약 3)인 동일한 접합된 활성화 가능한 항체와 비교하여 더 높은 투여량에서 더 내약성이 있는 것을 보였다. 또한, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2는 인간 암의 다양한 CDX 및 PDX 마우스 모델에서 더 높은 DAR AADC에 대한 용량-일치 투여량과 동일한 효능을 보였다. 마지막으로, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2는 마스크되지 않은 대용물에 대한 상당한 내약성을 보였는데, 이는 심지어 낮은 용량에서도 용인되지 않았다.

- [0046] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 단일클론성 항체는 CD71-함유 세포에 의해 내재화된다. 용어 "CD71"의 사용은 비한정적 예로서, CD-71 및/또는 CD 71과 같은 이의 임의의 변형을 포함하도록 의도되며, 모든 변형은 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0047] CD71은 주로 트랜스페린에 결합하는 막관통 당단백질이다. CD71은 세포 항상성에 필수적이다. CD71은 주요 리간드가 트랜스페린인 리간드-매개 세포 내 이입을 통해 지속적으로 재순환된다. CD71은 또한 분열 세포상에서 편재적으로 발현되는 것으로 알려져 있다.
- [0048] CD71 및 CD71-관련 신호전달의 비정상적 발현 및/또는 활성화는 암과 같은 많은 질병 및 장애의 발병에 연루되어 있다. CD71은 고형암과 혈액암을 포함한 많은 암에서 과발현된다. CD71은 광범위한 세포 표면 발현을 갖는다. 악성 세포에서 CD71은 세포 분열에 필요한 높은 철분 흡수를 매개한다. CD71은 또한 백혈병의 불량한 예후와 연관되어 있다. CD71은 다수의 암 징후에서 우세하기 때문에 바람직한 표적이다.
- [0049] 본 개시내용은 비정상적인 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애의 증상을 치료, 예방, 진행 지연, 개선 및/또는 완화시키는 방법에 유용한 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 제공한다. 예를 들어, 활성화 가능한 항-CD71 항체는 암 또는 다른 신생물 상태의 증상을 치료, 예방, 진행 지연, 개선 및/또는 완화시키는 방법에 사용된다.
- [0050] 본 개시내용은 CD71을 발현하는 세포와 연관된 질병 또는 장애의 증상을 치료, 예방, 진행 지연, 개선 및/또는 완화시키는 방법에 유용한 항 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 세포는 비정상적 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된다. 일부 실시형태에서, 세포는 정상적 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된다. 예를 들어, 활성화 가능한 항-CD71 항체는 암 또는 다른 신생물 상태의 증상을 치료, 예방, 진행 지연, 개선 및/또는 완화시키는 방법에 사용된다.
- [0051] 본 개시내용은 병든 세포가 CD71을 발현하는 질병 또는 장애의 증상을 치료, 예방, 진행 지연, 개선 및/또는 완화시키는 방법에 유용한 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 병든 세포는 비정상적 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된다. 일부 실시형태에서, 병든 세포는 정상적 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된다. 예를 들어, 활성화 가능한 항-CD71 항체는 암 또는 다른 신생물 상태의 증상을 치료, 예방, 진행 지연, 개선 및/또는 완화시키는 방법에 사용된다.
- [0052] 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체는 마스킹 모이어티(MM)의 커플링이 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 CD71과 결합하는 능력을 감소시키도록 MM에 결합된 CD71과 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, MM은 프로테아제, 예를 들어, 대상체의 치료 부위에서 CD71과 공-국소화된(co-localized) 프로테아제에 대한 기질을 포함하는 서열을 통해 커플링된다.
- [0053] 본 발명의 예시적인 활성화 가능한 항-CD71 항체는, 예를 들어, 하기에 기재된 중쇄 가변 및 경쇄 가변 서열들이거나 이로부터 유래된 중쇄 및 경쇄를 포함하는 활성화 가능한 항체를 포함한다(CDR 서열은 볼드체 및 밑줄로 표시되어 있다):
- [0054] muM21_VH:
- [0055] EVQLQESGTVLARPASVVKMSCKAS**GYTFTSYWMH**WVKRPGQGLEWIGAI**YPGNSETG**YNQNFK GKAKLTAVTSASTAYMDLSSLTNEDSAVYYCTRENWD
PGFAFWGQGITLITVSA (서열 번호: 1)
- [0056] muM21_VL:
- [0057] DIVMTQTPAIMSASPGEKVTITCS**SASSVYYMY**WFQKPGTSPKLWIY**STSNLAS**GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYC**QQRNYPYTF**GGGGLKLEIKRA (서열 번호: 2)
- [0058] hu2vHa 가변 중쇄
- [0059] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS**GYTFTSYWMH**WVRQAPGQGLEWMGAI**YPGNSETG**YAKFKQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARENWD
PGFAFWGQGITLVTVSS (서열 번호: 3)
- [0060] hu2vHb 가변 중쇄
- [0061] QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKAS**GYTFTSYWMH**WVRQAPGQGLEWIGAI**YPGNSETG**YAKFKQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWD
PGFAFWGQGITLVTVSS (서열 번호: 4)
- [0062] hu2vHc 가변 중쇄

- [0063] QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWD
PGFAFWGQGLITVSS (서열 번호: 5)
- [0064] hu21vKa 가변 경쇄
- [0065] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYYMYWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTK
LEIK (서열 번호: 6)
- [0066] hu21vKb 가변 경쇄
- [0067] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTK
LEIK (서열 번호: 7)
- [0068] hu21vKc 가변 경쇄
- [0069] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTK
LEIK (서열 번호: 8)
- [0070] 예시적인 활성화 가능한 항-CD71 항체는, 예를 들어, 가변 중쇄 상보성 결정 영역 1(VH CDR1, 본원에서 CDRH1이라고도 함) 서열, 가변 중쇄 상보성 결정 영역 2(VH CDR2, 본원에서 CDRH2라고도 함) 서열, 가변 중쇄 상보성 결정 영역 3(VH CDR3, 본원에서 CDRH3이라고도 함) 서열, 가변 경쇄 상보성 결정 영역 1(VL CDR1, 본원에서 CDRL1이라고도 함) 서열, 가변 경쇄 상보성 결정 영역 2(VL CDR2, 본원에서 CDRL2라고도 함) 서열, 및 가변 경쇄 상보성 결정 영역 3(VL CDR3, 본원에서 CDRL3이라고도 함) 서열의 조합을 포함하는 활성화 가능한 항체를 포함하며, 적어도 하나의 CDR 서열은 아미노산 서열 GYTFTSYWMH(서열 번호: 9)를 포함하는 VH CDR1 서열; 아미노산 서열 AIYPGNSETG(서열 번호: 10)를 포함하는 VH CDR2 서열; 아미노산 서열 ENWDPGFAP(서열 번호: 11)를 포함하는 VH CDR3 서열; 아미노산 서열 SASSSVYYMY(서열 번호: 12) 또는 CRASSSVYYMY(서열 번호: 13)를 포함하는 VL CDR1 서열; 아미노산 서열 STSNLAS(서열 번호: 14)를 포함하는 VL CDR2 서열; 및 아미노산 서열 QQRNYPYT(서열 번호: 15)를 포함하는 VL CDR3 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0071] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 VH CDR1 서열, VH CDR2 서열, VH CDR3 서열, VL CDR1 서열, VL CDR2 서열, 및 VL CDR3 서열의 조합을 포함하며, 적어도 하나의 CDR 서열은 아미노산 서열 GYTFTSYWMH(서열 번호: 9)를 포함하는 VH CDR1 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 VH CDR1 서열; 아미노산 서열 AIYPGNSETG(서열 번호: 10)를 포함하는 VH CDR2 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 VH CDR2 서열; 아미노산 서열 ENWDPGFAP(서열 번호: 11)를 포함하는 VH CDR3 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 VH CDR3 서열; 아미노산 서열 ASSSVYYMY(서열 번호: 12) 또는 CRASSSVYYMY(서열 번호: 13)를 포함하는 VL CDR1 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 VL CDR1 서열; 아미노산 서열 STSNLAS(서열 번호: 14)를 포함하는 VL CDR2 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 VL CDR2 서열; 및 아미노산 서열 QQRNYPYT(서열 번호: 15)를 포함하는 VL CDR3 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 VL CDR3 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0072] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 VH CDR1 서열, VH CDR2 서열, VH CDR3 서열, VL CDR1 서열, VL CDR2 서열, 및 VL CDR3 서열의 조합을 포함하며, VH CDR1 서열은 아미노산 서열 GYTFTSYWMH(서열 번호: 9)를 포함하고; VH CDR2 서열은 아미노산 서열 AIYPGNSETG(서열 번호: 10)를 포함하고; VH CDR3 서열은 아미노산 서열 ENWDPGFAP(서열 번호: 11)을 포함하고; VL CDR1 서열은 아미노산 서열 SASSSVYYMY(서열 번호: 12) 또는 CRASSSVYYMY(서열 번호: 13)을 포함하고; VL CDR2 서열은 아미노산 서열 STSNLAS(서열 번호: 14)을 포함하고; 및 VL CDR3 서열은 아미노산 서열 QQRNYPYT(서열 번호: 15)을 포함한다.
- [0073] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 VH CDR1 서열, VH CDR2 서열, VH CDR3 서열, VL CDR1 서열, VL CDR2 서열, 및 VL CDR3 서열의 조합을 포함하며, VH CDR1 서열은 아미노산 서열 GYTFTSYWMH(서열 번호: 9)에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하고; VH CDR2 서열은 아미노산 서열 AIYPGNSETG(서열 번호: 10)에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하고; VH CDR3 서열은 아미노산 서열

ENWDPGFAF(서열 번호: 11)에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하고; VL CDR1 서열은 아미노산 서열 SASSSVYYMY(서열 번호: 12) 또는 CRASSSVYYMY(서열 번호: 13)에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하고; VL CDR2 서열은 아미노산 서열 STSNLAS(서열 번호: 14)에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함하고; 및 VL CDR3 서열은 아미노산 서열 QQRNYPYT(서열 번호: 15)에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 서열을 포함한다.

[0074] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체는 CD71에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체는 CD71에 결합하는 단일클론성 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD71에 결합하는 이러한 모노클론성 항체는 인간화 또는 완전 인간 단일클론성 항체이다.

[0075] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 5를 포함하는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 5를 포함하는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 및 서열 번호: 7을 포함하는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0076] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 5를 포함하는 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 7을 포함하는 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 1 및 3 내지 5를 포함하는 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 및 서열 번호: 7을 포함하는 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0077] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 5를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 7을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의하여 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 5를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열, 및 서열 번호: 7을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산에 의해 인코딩된다.

[0078] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 5를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 7을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 번호: 5를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열, 및 서열 번호: 7을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0079] 본 개시내용은 또한 활성화 가능한 항체의 발현을 야기하는 조건 하에서 세포를 배양함으로써 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 활성화 가능한 항체를 생성하는 방법으로서, 세포는 본 개시내용의 핵산 서열 또는 본 개시내용의 벡터를 포함하는 방법을 제공한다.

[0080] 본 개시내용은 또한 마스킹 모이어티(MM)의 커플링이 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 CD71과 결합하는 능력을 감소시키도록 MM에 결합된 CD71과 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 접합된 활성화

화 가능한 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, MM은 프로테아제, 예를 들어, 병든 조직에서 활성인 프로테아제 및/또는 대상체의 치료 부위에서 CD71과 공-국소화된 프로테아제에 대한 기질을 포함하는 서열을 통해 커플링된다. 본원에서 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체 또는 CD71 접합된 활성화 가능한 항체로도 지칭되는, 본원에 제공된 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체는 순환 중에 안정화하고, 치료 및/또는 진단의 의도된 부위에서 활성화되지만, 정상적인, 예를 들어, 치료 및/또는 진단을 위해 표적되지 않은 건강한 조직 또는 다른 조직에서는 활성화되지 않으며, 활성화되는 경우, 본원에서 모 항체라고도 지칭되는 상응하는 비변형 항체에 적어도 필적할 만한 CD71에 결합을 나타낸다.

- [0081] 본 발명은 또한 CD71에 결합하는 접합된 활성화 가능한 항체, 특히 CD71 및/또는 CD71-매개 신호전달의 적어도 하나의 생물 활성을 결합하고 중화하거나 그렇지 않으면 억제하는 접합된 활성화 가능한 항체를 사용하여 대상체에서 CD71의 비정상적인 발현 및/또는 활성화와 연관된 증상을 치료, 예방 및/또는 발병 또는 진행 지연, 또는 완화시키는 방법을 제공한다.
- [0082] 본 발명은 또한 CD71에 결합하는 접합된 활성화 가능한 항체, 특히 CD71을 발현하거나 비정상적으로 발현하는 세포의 적어도 하나의 생물학적 활성을 결합, 표적, 중화, 사멸 또는 그렇지 않으면 억제하는 활성화 가능한 항체를 사용하여 대상체에서 CD71을 발현하거나 CD71을 비정상적으로 발현하는 세포의 존재, 성장, 증식, 전이, 및/또는 활성화와 연관된 증상을 치료, 예방 및/또는 발병 또는 진행 지연, 또는 완화시키는 방법을 제공한다.
- [0083] 본 발명은 또한 CD71에 결합하는 접합된 활성화 가능한 항체, 특히 CD71을 발현하는 세포의 적어도 하나의 생물학적 활성을 결합, 표적, 중화, 사멸 또는 그렇지 않으면 억제하는 활성화 가능한 항체를 사용하여 대상체에서 CD71을 발현하는 세포의 존재, 성장, 증식, 전이, 및/또는 활성화와 연관된 증상을 치료, 예방 및/또는 발병 또는 진행 지연, 또는 완화시키는 방법을 제공한다.
- [0084] 본 발명은 또한 CD71에 결합하는 접합된 활성화 가능한 항체, 특히 CD71을 발현하는 세포의 적어도 하나의 생물학적 활성을 결합, 표적, 중화, 사멸 또는 그렇지 않으면 억제하는 접합된 활성화 가능한 항체를 사용하여 대상체에서 CD71을 비정상적으로 발현하는 세포의 존재, 성장, 증식, 전이, 및/또는 활성화와 연관된 증상을 치료, 예방 및/또는 발병 또는 진행 지연, 또는 완화시키는 방법을 제공한다.
- [0085] 활성화 상태의 접합된 활성화 가능한 항체는 CD71에 결합하고, (i) CD71에 특이적으로 결합하는 항체(AB); (ii) 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, AB의 CD71과의 결합을 억제하는 마스킹 모이어티(MM); 및 (iii) AB에 커플링된 절단성 모이어티(CM)으로서, CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드인 절단성 모이어티(CM)를 포함한다.
- [0086] 일부 실시형태에서, 비절단 상태의 접합된 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM.
- [0087] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체는 MM 및 CM 사이에 연결 펩티드를 포함한다.
- [0088] 일부 실시형태에, 접합된 활성화 가능한 항체는 CM 및 AB 사이에 연결 펩티드를 포함한다.
- [0089] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체는제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하며, 비절단 상태의 접합된 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 갖는다: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM. 일부 실시형태에서, 상기 2 가지 연결 펩티드는 서로 동일한 필요가 없다.
- [0090] 일부 실시형태에서, LP1 또는 LP2의 적어도 하나는 n이 적어도 하나의 정수인, (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n(서열 번호: 24), 및 (GGGS)_n(서열 번호: 25)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0091] 일부 실시형태에서, LP1 또는 LP2의 적어도 하나는 GGS(서열 번호: 26), GGSG(서열 번호: 27), GSGSG(서열 번호: 28), GSGGG(서열 번호: 29), GGGSG(서열 번호: 30), 및 GSSSG(서열 번호: 31)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0092] 일부 실시형태에서, LP1은 아미노산 서열 GGGSSGGS(서열 번호: 207), GSSGSGSGSGSG(서열 번호: 32), GSSGSGSGSGG(서열 번호: 33), GSSGSGSGSGGS(서열 번호: 34), GSSGSGSGSGSGGS(서열 번호: 35), GSSGSGSGSGG(서열 번호: 36), GSSGSGSGSGS(서열 번호: 37)을 포함한다.
- [0093] 일부 실시형태에서, LP2는 아미노산 서열 GSS, GGS, GGG(서열 번호: 38), GSSGT(서열 번호: 39) 또는 GSSG(서열 번호: 40)를 포함한다.

- [0094] 일부 실시형태에서, AB는 포유류 CD71에 결합하기 위해 약 100 nM 이하의 해리 상수를 갖는다. 일부 실시형태에서, AB는 포유류 CD71에 결합하기 위해 약 10 nM 이하의 해리 상수를 갖는다. 일부 실시형태에서, AB는 CD71에 결합하기 위해 약 5 nM 이하의 해리 상수를 갖는다. 일부 실시형태에서, AB는 CD71에 결합하기 위해 약 1 nM 이하의 해리 상수를 갖는다. 일부 실시형태에서, AB는 CD71에 결합하기 위해 약 0.5 nM 이하의 해리 상수를 갖는다. 일부 실시형태에서, AB는 CD71에 결합하기 위해 약 0.1 nM 이하의 해리 상수를 갖는다. 일부 실시형태에서, AB는 포유류 CD71에 결합하기 위해 0.01 nM 내지 100 nM, 0.01 nM 내지 10 nM, 0.01 nM 내지 5 nM, 0.01 nM 내지 1 nM, 0.01 내지 0.5 nM, 0.01 nm 내지 0.1 nM, 0.01 nm 내지 0.05 nM, 0.05 nM 내지 100 nM, 0.05 nM 내지 10 nM, 0.05 nM 내지 5 nM, 0.05 nM 내지 1 nM, 0.05 내지 0.5 nM, 0.05 nM 내지 0.1 nM, 0.1 nM 내지 100 nM, 0.1 nM 내지 10 nM, 0.1 nM 내지 5 nM, 0.1 nM 내지 1 nM, 0.1 내지 0.5 nM, 0.5 nM 내지 100 nM, 0.5 nM 내지 10 nM, 0.5 nM 내지 5 nM, 0.5 nM 내지 1 nM, 1 nM 내지 100 nM, 1 nM 내지 10 nM, 1 nM 내지 5 nM, 5 nM 내지 100 nM, 5 nM 내지 10 nM, 또는 10 nM 내지 100 nM의 해리 상수를 갖는다.
- [0095] 일부 실시형태에서, 비절단 상태의 접합된 활성화 가능한 항체는 1 nM 이하, 5 nM 이하, 10 nM 이하, 15 nM 이하, 20 nM 이하, 25 nM 이하, 50 nM 이하, 100 nM 이하, 150 nM 이하, 250 nM 이하, 500 nM 이하, 750 nM 이하, 1000 nM 이하, 및/또는 2000 nM 이하의 해리 상수로 포유류 CD71과 특이적으로 결합한다.
- [0096] 일부 실시형태에서, 비절단 상태의 접합된 활성화 가능한 항체는 1 nM 내지 2000 nM, 1 nM 내지 1000 nM, 1 nM 내지 750 nM, 1 nM 내지 500 nM, 1 nM 내지 250 nM, 1 nM 내지 150 nM, 1 nM 내지 100 nM, 1 nM 내지 50 nM, 1 nM 내지 25 nM, 1 nM 내지 15 nM, 1 nM 내지 10 nM, 1 nM 내지 5 nM, 5 nM 내지 2000 nM, 5 nM 내지 1000 nM, 5 nM 내지 750 nM, 5 nM 내지 500 nM, 5 nM 내지 250 nM, 5 nM 내지 150 nM, 5 nM 내지 100 nM, 5 nM 내지 50 nM, 5 nM 내지 25 nM, 5 nM 내지 15 nM, 5 nM 내지 10 nM, 10 nM 내지 2000 nM, 10 nM 내지 1000 nM, 10 nM 내지 750 nM, 10 nM 내지 500 nM, 10 nM 내지 250 nM, 10 nM 내지 150 nM, 10 nM 내지 100 nM, 10 nM 내지 50 nM, 10 nM 내지 25 nM, 10 nM 내지 15 nM, 15 nM 내지 2000 nM, 15 nM 내지 1000 nM, 15 nM 내지 750 nM, 15 nM 내지 500 nM, 15 nM 내지 250 nM, 15 nM 내지 150 nM, 15 nM 내지 100 nM, 15 nM 내지 50 nM, 15 nM 내지 25 nM, 25 nM 내지 2000 nM, 25 nM 내지 1000 nM, 25 nM 내지 750 nM, 25 nM 내지 500 nM, 25 nM 내지 250 nM, 25 nM 내지 150 nM, 25 nM 내지 100 nM, 25 nM 내지 50 nM, 50 nM 내지 2000 nM, 50 nM 내지 1000 nM, 50 nM 내지 750 nM, 50 nM 내지 500 nM, 50 nM 내지 250 nM, 50 nM 내지 150 nM, 50 nM 내지 100 nM, 100 nM 내지 2000 nM, 100 nM 내지 1000 nM, 100 nM 내지 750 nM, 100 nM 내지 500 nM, 100 nM 내지 250 nM, 100 nM 내지 150 nM, 150 nM 내지 2000 nM, 150 nM 내지 1000 nM, 150 nM 내지 750 nM, 150 nM 내지 500 nM, 150 nM 내지 250 nM, 250 nM 내지 2000 nM, 250 nM 내지 1000 nM, 250 nM 내지 750 nM, 250 nM 내지 500 nM, 500 nM 내지 2000 nM, 500 nM 내지 1000 nM, 500 nM 내지 750 nM, 500 nM 내지 500 nM, 500 nM 내지 250 nM, 500 nM 내지 150 nM, 500 nM 내지 100 nM, 500 nM 내지 50 nM, 750 nM 내지 2000 nM, 750 nM 내지 1000 nM, or 1000 nM 내지 2000 nM의 범위의 해리 상수로 포유류 CD71과 특이적으로 결합한다.
- [0097] 일부 실시형태에서, 활성화 상태의 접합된 활성화 가능한 항체는 0.01 nM, 0.05 nM, 0.1 nM, 0.5 nM, 1 nM, 5 nM, 또는 10 nM 이하의 유리 상수로 포유류 CD71과 특이적으로 결합한다.
- [0098] 일부 실시형태에서, 활성화 상태의 접합된 활성화 가능한 항체는 0.01 nM 내지 100 nM, 0.01 nM 내지 10 nM, 0.01 nM 내지 5 nM, 0.01 nM 내지 1 nM, 0.01 내지 0.5 nM, 0.01 nm 내지 0.1 nM, 0.01 nm 내지 0.05 nM, 0.05 nM 내지 100 nM, 0.05 nM 내지 10 nM, 0.05 nM 내지 5 nM, 0.05 nM 내지 1 nM, 0.05 내지 0.5 nM, 0.05 nm 내지 0.1 nM, 0.1 nM 내지 100 nM, 0.1 nM 내지 10 nM, 0.1 nM 내지 5 nM, 0.1 nM 내지 1 nM, 0.1 내지 0.5 nM, 0.5 nM 내지 100 nM, 0.5 nM 내지 10 nM, 0.5 nM 내지 5 nM, 0.5 nM 내지 1 nM, 1 nM 내지 100 nM, 1 nM 내지 10 nM, 1 nM 내지 5 nM, 5 nM 내지 100 nM, 5 nM 내지 10 nM, or 10 nM 내지 100 nM의 범위의 해리 상수로 포유류 CD71과 특이적으로 결합한다.
- [0099] 일부 실시형태에서, 포유류 CD71은 인간 CD71, 마우스 CD71, 랫트 CD71, 및 시노물구스 원숭이 CD71로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, AB는 1 nM 미만의 해리 상수로 인간 CD71, 마우스 CD71, 또는 시노물구스 원숭이 CD71과 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 포유류 CD71은 인간 CD71이다.
- [0100] 일부 실시형태에서, AB는 하기 특성들 중 하나 이상을 갖는다: (a) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며; 및 (b) AB는 인간 CD71 및 시노물구스 원숭이 CD71과 특이적으로 결합한다.
- [0101] 일부 실시형태에서, AB는 하기 특성들 중 하나 이상을 갖는다: (a) AB는 인간 CD71 및 시노물구스 원숭이 CD71과 특이적으로 결합한다; (b) AB는 트랜스페린의 포유류 CD71과의 결합을 억제한다; (c) AB는 인간 트랜스페린의 인간 CD71과의 결합을 억제한다; 및 (d) AB는 시노물구스 원숭이 트랜스페린의 시노물구스 원숭이 CD71과의 결

합을 억제한다.

- [0102] 일부 실시형태에서, AB는 천연 리간드가 5 nM 이하, 10 nM 이하, 50 nM 이하, 100 nM 이하, 500 nM 이하, 및/또는 1000 nM 이하의 EC₅₀로 포유류 CD71과 결합하는 능력을 차단한다. 일부 실시형태에서, AB는 트랜스페린이 5 nM 이하, 10 nM 이하, 50 nM 이하, 100 nM 이하, 500 nM 이하, 및/또는 1000 nM 이하의 EC₅₀로 포유류 CD71과 결합하는 능력을 차단한다. 일부 실시형태에서, CD71의 천연 리간드는 트랜스페린이다.
- [0103] 일부 실시형태에서, AB는 천연 리간드가 5 nM 내지 1000 nM, 5 nM 내지 500 nM, 5 nM 내지 100 nM, 5 nM 내지 50 nM, 5 nM 내지 10 nM, 10 nM 내지 1000 nM, 10 nM 내지 500 nM, 10 nM 내지 100 nM, 10 nM 내지 50 nM, 50 nM 내지 1000 nM, 50 nM 내지 500 nM, 50 nM 내지 100 nM, 100 nM 내지 1000 nM, 100 nM 내지 500 nM, 500 nM 내지 1000 nM의 EC₅₀로 포유류 CD71과 결합하는 능력을 차단한다. 일부 실시형태에서, AB는 트랜스페린이 5 nM 내지 1000 nM, 5 nM 내지 500 nM, 5 nM 내지 100 nM, 5 nM 내지 50 nM, 5 nM 내지 10 nM, 10 nM 내지 1000 nM, 10 nM 내지 500 nM, 10 nM 내지 100 nM, 10 nM 내지 50 nM, 50 nM 내지 1000 nM, 50 nM 내지 500 nM, 50 nM 내지 100 nM, 100 nM 내지 1000 nM, 100 nM 내지 500 nM, 500 nM 내지 1000 nM의 EC₅₀로 포유류 CD71과 결합하는 능력을 차단한다. 일부 실시형태에서, CD71의 천연 리간드는 트랜스페린이다.
- [0104] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 AB는 포유류 CD71을 발현하는 세포의 성장, 증식, 및/또는 전이를 억제 또는 감소시킨다. 임의의 이론에 구속되지 않고, 본 개시내용의 AB는 CD71과 특이적으로 결합하고 천연 리간드가 포유류 CD71과의 결합을 억제, 차단, 및/또는 예방함으로써 포유류 CD71을 발현하는 세포의 성장, 증식, 및/또는 전이를 억제 또는 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 포유류 CD71의 천연 리간드는 트랜스페린이다.
- [0105] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 CD71과의 해리 상수 초과인 AB와 결합하기 위한 해리 상수를 갖는다.
- [0106] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 CD71과의 해리 상수 이하인 AB와 결합하기 위한 해리 상수를 갖는다.
- [0107] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 CD71과의 해리 상수 미만인 AB와 결합하기 위한 해리 상수를 갖는다.
- [0108] 일부 실시형태에서, MM의 AB로의 해리 상수(K_d)는 AB의 표적으로의 해리 상수보다 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000배 이상의 이하이거나, 1 내지 5, 5 내지 10, 10 내지 100, 10 내지 1,000, 10 내지 10,000, 10 내지 100,000, 10 내지 1,000,000, 10 내지 10,000,000, 100 내지 1,000, 100 내지 10,000, 100 내지 100,000, 100 내지 1,000,000, 100 내지 10,000,000, 1,000 내지 10,000, 1,000 내지 100,000, 1,000 내지 1,000,000, 1000 내지 10,000,000, 10,000 내지 100,000, 10,000 내지 1,000,000, 10,000 내지 10,000,000, 100,000 내지 1,000,000, 또는 100,000 내지 10,000,000배 이상이다.
- [0109] 일부 실시형태에서, MM은 활성화 가능한 항체가 비결단 상태인 경우 CD71에 결합하기 위해 AB를 간섭하거나 AB와 경쟁하지 않는다.
- [0110] 일부 실시형태에서, MM은 길이가 약 2 내지 40 아미노산인 폴리펩티드이다. 일부 실시형태에서, MM은 길이가 최대 40 아미노산인 폴리펩티드이다.
- [0111] 일부 실시형태에서, MM 폴리펩티드 서열은 CD71의 것과 상이하다. 일부 실시형태에서, MM 폴리펩티드 서열은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 동일성 이하이다. 일부 실시형태에서, MM 폴리펩티드 서열은 CD71의 것과 상이하고 AB의 임의의 천연 결합 파트너에 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 또는 10% 동일성 이하이다.
- [0112] 일부 실시형태에서, MM의 AB와의 커플링은 CD71에 대하여 MM과 커플링되는 경우 AB의 해리 상수(K_d)가 CD71에 대하여 MM과 커플링되지 않는 경우의 AB의 K_d보다 적어도 2배 초과가 되도록, AB가 CD71과 결합하는 능력을 감소시킨다.
- [0113] 일부 실시형태에서, MM의 AB와의 커플링은 CD71에 대하여 MM과 커플링되는 경우 AB의 해리 상수(K_d)가 CD71에 대하여 MM과 커플링되지 않는 경우의 AB의 K_d보다 적어도 5배 초과가 되도록, AB가 CD71과 결합하는 능력을 감소시킨다.
- [0114] 일부 실시형태에서, MM의 AB와의 커플링은 CD71에 대하여 MM과 커플링되는 경우 AB의 해리 상수(K_d)가 CD71에 대하여 MM과 커플링되지 않는 경우의 AB의 K_d보다 적어도 10배 초과가 되도록, AB가 CD71과 결합하는 능력을 감소시킨다.

소시킨다.

- [0115] 일부 실시형태에서, MM의 AB와의 커플링은 CD71에 대하여 MM과 커플링되는 경우 AB의 해리 상수(K_d)가 CD71에 대하여 MM과 커플링되지 않는 경우의 AB의 K_d 보다 적어도 20배 초과가 되도록, AB가 CD71과 결합하는 능력을 감소시킨다.
- [0116] 일부 실시형태에서, MM의 AB와의 커플링은 CD71에 대하여 MM과 커플링되는 경우 AB의 해리 상수(K_d)가 CD71에 대하여 MM과 커플링되지 않는 경우의 AB의 K_d 보다 적어도 40배 초과가 되도록, AB가 CD71과 결합하는 능력을 감소시킨다.
- [0117] 일부 실시형태에서, MM의 AB와의 커플링은 CD71에 대하여 MM과 커플링되는 경우 AB의 해리 상수(K_d)가 CD71에 대하여 MM과 커플링되지 않는 경우의 AB의 K_d 보다 적어도 100배 초과가 되도록, AB가 CD71과 결합하는 능력을 감소시킨다.
- [0118] 일부 실시형태에서, MM의 AB와의 커플링은 CD71에 대하여 MM과 커플링되는 경우 AB의 해리 상수(K_d)가 CD71에 대하여 MM과 커플링되지 않는 경우의 AB의 K_d 보다 적어도 1000배 초과가 되도록, AB가 CD71과 결합하는 능력을 감소시킨다.
- [0119] 일부 실시형태에서, MM의 AB와의 커플링은 CD71에 대하여 MM과 커플링되는 경우 AB의 해리 상수(K_d)가 CD71에 대하여 MM과 커플링되지 않는 경우의 AB의 K_d 보다 적어도 10,000배 초과가 되도록, AB가 CD71과 결합하는 능력을 감소시킨다.
- [0120] 일부 실시형태에서, 그 내용의 전부가 본원에 참조로 포함되어 있는, 예를 들어, PCT 공개출원 번호 제WO 2010/081173호에 기재된 검정과 같은 표적 배치 검정을 이용하여 시험관 내에서 검정되는 경우, CD71의 존재하에, CM이 절단되는 경우와 비교하여, CM이 절단되지 않는 경우, MM은 AB가 CD71과 결합하는 능력을 적어도 90% 만큼 감소시킨다.
- [0121] 일부 실시형태에서, MM은 서열 번호: 16 또는 18로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0122] 일부 실시형태에서, CM을 절단하는 프로테아제는 병든 조직에서 활성이다, 예를 들어, 상향-조절되거나 그렇지 않으면 비조절되며, 활성화 가능한 항체가 프로테아제에 노출되는 경우, 프로테아제는 활성화 가능한 항체 내에서 CM을 절단한다.
- [0123] 일부 실시형태에서, 프로테아제는 조직 내에서 CD71과 공-국소화되며, 활성화 가능한 항체가 프로테아제에 노출되는 경우, 프로테아제는 접합된 활성화 가능한 항체 내에서 CM을 절단한다.
- [0124] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 접합된 활성화 가능한 항체의 CD71과의 결합은 변형되지 않은 AB가 CD71과의 결합의 해리 상수보다 적어도 2배 초과인 해리 상수로 발생하도록 감소되는 반면에, 절단된 상태(즉, 접합된 활성화 가능한 항체가 절단된 상태인 경우)에서, AB가 CD71과 결합하도록, CM은 접합된 활성화 가능한 항체 내에 위치된다.
- [0125] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 활성화 가능한 항체의 CD71과의 결합은 변형되지 않은 AB가 CD71과의 결합의 해리 상수보다 적어도 5배 초과인 해리 상수로 발생하도록 감소되는 반면에, 절단된 상태(즉, 접합된 활성화 가능한 항체가 절단된 상태인 경우)에서, AB가 CD71과 결합하도록, CM은 접합된 활성화 가능한 항체 내에 위치된다.
- [0126] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 활성화 가능한 항체의 CD71과의 결합은 변형되지 않은 AB가 CD71과의 결합의 해리 상수보다 적어도 10배 초과인 해리 상수로 발생하도록 감소되는 반면에, 절단된 상태(즉, 접합된 활성화 가능한 항체가 절단된 상태인 경우)에서, AB가 CD71과 결합하도록, CM은 접합된 활성화 가능한 항체 내에 위치된다.
- [0127] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 활성화 가능한 항체의 CD71과의 결합은 변형되지 않은 AB가 CD71과의 결합의 해리 상수보다 적어도 20배 초과인 해리 상수로 발생하도록 감소되는 반면에, 절단된 상태(즉, 접합된 활성화 가능한 항체가 절단된 상태인 경우)에서, AB가 CD71과 결합하도록, CM은 접합된 활성화 가능한 항체 내에 위치된다.

- [0128] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 접합된 활성화 가능한 항체의 CD71과의 결합은 변형되지 않은 AB가 CD71과의 결합의 해리 상수보다 적어도 40배 초과인 해리 상수로 발생하도록 감소되는 반면에, 절단된 상태에서, AB가 CD71과 결합하도록, CM은 접합된 활성화 가능한 항체 내에 위치된다.
- [0129] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 접합된 활성화 가능한 항체의 CD71과의 결합은 변형되지 않은 AB가 CD71과의 결합의 해리 상수보다 적어도 50배 초과인 해리 상수로 발생하도록 감소되는 반면에, 절단된 상태에서, AB가 CD71과 결합하도록, CM은 접합된 활성화 가능한 항체 내에 위치된다.
- [0130] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 접합된 활성화 가능한 항체의 CD71과의 결합은 변형되지 않은 AB가 CD71과의 결합의 해리 상수보다 적어도 100배 초과인 해리 상수로 발생하도록 감소되는 반면에, 절단된 상태에서, AB가 CD71과 결합하도록, CM은 접합된 활성화 가능한 항체 내에 위치된다.
- [0131] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우, 접합된 활성화 가능한 항체의 CD71과의 결합은 변형되지 않은 AB가 CD71과의 결합의 해리 상수보다 적어도 200배 초과인 해리 상수로 발생하도록 감소되는 반면에, 절단된 상태에서, AB가 CD71과 결합하도록, CM은 접합된 활성화 가능한 항체 내에 위치된다.
- [0132] 일부 실시형태에서, CM은 길이가 최대 15 아미노산인 폴리펩티드이다.
- [0133] 일부 실시형태에서, CM은 적어도 하나의 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP)에 대한 기질인 제1 절단성 모이어티(CM1) 및 적어도 하나의 세린 프로테아제(SP)에 대한 기질인 제2 절단성 모이어티(CM2)를 포함하는 폴리펩티드이다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질의 CM1 기질 서열 및 CM2 기질 서열의 각각은 독립적으로 길이가 최대 15 아미노산이다.
- [0134] 일부 실시형태에서, CM은 암에서 상향-조절되거나 그렇지 않으면 조절되지 않거나, 또는 상향-조절되거나 그렇지 않으면 조절되지 않은 것으로 여겨지는 적어도 하나의 프로테아제에 대한 기질이다.
- [0135] 일부 실시형태에서, CM은 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP), 트롬빈, 호중구 엘라스타제, 시스테인 프로테아제, 레구마인, 및 매트립타제(MT-SP1) 및 유로키나제(uPA)와 같은 세린 프로테아제로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 프로테아제에 대한 기질이다. 이론에 구속되지 않고, 이러한 프로테아제는 적어도 하나의 암에서 상향-조절되거나 그렇지 않으면 비조절되는 것으로 여겨진다.
- [0136] 일부 실시형태에서, CM은 특정 프로테아제, 예를 들어, 활성화 가능한 항체의 표적과 공-국소화되는 것으로 알려진 프로테아제와 함께 사용하기 위해 선택된다.
- [0137] 일부 실시형태에서, CM은 적어도 하나의 MMP에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 MMP 9, MMP14, MMP1, MMP3, MMP13, MMP17, MMP11, 및 MMP19로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 MMP9에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 MMP14에 대한 기질이다.
- [0138] 일부 실시형태에서, CM은 서열 TGRGPSWV(서열 번호: 41); SARGPSRW(서열 번호: 42); TARGPSFK(서열 번호: 43); LSGRSDNH(서열 번호: 44); GGWHTGRN(서열 번호: 45); HTGRSGAL(서열 번호: 46); PLTGRSGG(서열 번호: 47); AARGPAIH(서열 번호: 48); RGPANPM(서열 번호: 49); SSRGPAYL(서열 번호: 50); RGPATPIM(서열 번호: 51); RGPA(서열 번호: 52); GGQPSGMWGW(서열 번호: 53); FPRPLGITGL(서열 번호: 54); VHMPGLGLP(서열 번호: 55); SPLTGRSG(서열 번호: 56); SAGFSLPA(서열 번호: 57); LAPLGLQRR(서열 번호: 58); SGGPLGVR(서열 번호: 59); PLGL(서열 번호: 60); LSGRSGNH(서열 번호: 175); SGRSANPRG(서열 번호: 176); LSGRSDDH(서열 번호: 177); LSGRSDIH(서열 번호: 178); LSGRSDQH(서열 번호: 179); LSGRSDTH(서열 번호: 180); LSGRSDYH(서열 번호: 181); LSGRSDNP(서열 번호: 182); LSGRSANP(서열 번호: 183); LSGRSANI(서열 번호: 184); LSGRSDNI(서열 번호: 185); MIAPVAYR(서열 번호: 186); RPSPMWAY(서열 번호: 187); WATPRPMR(서열 번호: 188); FRLLDWQW(서열 번호: 189); ISSGL(서열 번호: 190); ISSGLS(서열 번호: 191); 및/또는 ISSGLL(서열 번호: 192)을 포함하는 기질이다.
- [0139] 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열 번호: 44)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 TGRGPSWV(서열 번호: 41)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 PLTGRSGG(서열 번호: 47)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 GGQPSGMWGW(서열 번호: 53)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 FPRPLGITGL(서열 번호: 54)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 VHMPGLGLP(서열 번호: 55)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 PLGL(서열 번호: 60)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 SARGPSRW(서열 번호: 42)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 TARGPSFK(서열 번호: 43)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 GGWHTGRN(서열 번호: 45)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 HTGRSGAL(서열 번호: 46)을 포함한다. 일부 실

시형태에서, CM은 아미노산 서열 AARGPAIH(서열 번호: 48)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 RGPAPNPM(서열 번호: 49)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 SSRGPAYL(서열 번호: 50)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 RGPATPIM(서열 번호: 51)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 RGP(서열 번호: 52)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSGNH(서열 번호: 175)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 SGRSANPRG(서열 번호: 176)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDDH(서열 번호: 177)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDIH(서열 번호: 178)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDQH(서열 번호: 179)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDTH(서열 번호: 180)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDYH(서열 번호: 181)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDNP(서열 번호: 182)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSANP(서열 번호: 183)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSANI(서열 번호: 184)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDNI(서열 번호: 185)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 MIAPVAYR(서열 번호: 186)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 RPSPMWAY(서열 번호: 187)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 WATPRPMR(서열 번호: 188)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 FRLLDWQW(서열 번호: 189)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 ISSGL(서열 번호: 190)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 ISSGLS(서열 번호: 191)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 및/또는 ISSGL(서열 번호: 192)을 포함한다.

[0140] 일부 실시형태에서, CM은 MMP에 대한 기질이며 서열 ISSGLSS(서열 번호: 61); QNQLRMA(서열 번호: 62); AQNLLGMV(서열 번호: 63); STFPFGMF(서열 번호: 64); PVGYTSSL(서열 번호: 65); DWLYWPGI(서열 번호: 66); ISSGLSS(서열 번호: 67); LKAAPRWA(서열 번호: 68); GPSHLVLT(서열 번호: 69); LPGGLSPW(서열 번호: 70); MGLFSEAG(서열 번호: 71); SPLPLRVP(서열 번호: 72); RMHLRSLG(서열 번호: 73); LAAPLGLL(서열 번호: 74); AVGLLAPP(서열 번호: 75); LLAPSHRA(서열 번호: 76); 및/또는 PAGLWLDP(서열 번호: 77)를 포함한다.

[0141] 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 ISSGLSS(서열 번호: 61)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 QNQLRMA(서열 번호: 62)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 AQNLLGMV(서열 번호: 63)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 STFPFGMF(서열 번호: 64)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 PVGYTSSL(서열 번호: 65)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 DWLYWPGI(서열 번호: 66)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 ISSGLSS(서열 번호: 67)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LKAAPRWA(서열 번호: 68)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 GPSHLVLT(서열 번호: 69)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LPGGLSPW(서열 번호: 70)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 MGLFSEAG(서열 번호: 71)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 SPLPLRVP(서열 번호: 72)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 RMHLRSLG(서열 번호: 73)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LAAPLGLL(서열 번호: 74)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 AVGLLAPP(서열 번호: 75)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 LLAPSHRA(서열 번호: 76)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 PAGLWLDP(서열 번호: 77)를 포함한다.

[0142] 일부 실시형태에서, CM은 트롬빈에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 트롬빈에 대한 기질이며 서열 GPRSFGL(서열 번호: 78) 또는 GPRSFG(서열 번호: 79)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 GPRSFGL(서열 번호: 78)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 GPRSFG(서열 번호: 79)를 포함한다.

[0143] 일부 실시형태에서, CM은 NTLSGRSENHSG(서열 번호: 80); NTLSGRSGNHGS(서열 번호: 81); TSTSGRSANPRG(서열 번호: 82); TSGRSANP(서열 번호: 83); VAGRSMRP(서열 번호: 84); VVPEGRRS(서열 번호: 85); ILPRSPAF(서열 번호: 86); MVLGRSLL(서열 번호: 87); QGRAITFI(서열 번호: 88); SPRSIMLA(서열 번호: 89); 및 SMLRSMPL(서열 번호: 90)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0144] 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 NTLSGRSENHSG(서열 번호: 80)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 NTLSGRSGNHGS(서열 번호: 81)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 TSTSGRSANPRG(서열 번호: 82)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 TSGRSANP(서열 번호: 83)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 VAGRSMRP(서열 번호: 84)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 VVPEGRRS(서열 번호: 85)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 ILPRSPAF(서열 번호: 86)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 MVLGRSLL(서열 번호: 87)을 포함한다. 일부 실시형태에서,

CM은 아미노산 서열 QGRAITFI(서열 번호: 88)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 SPRSIMLA(서열 번호: 89)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 아미노산 서열 SMLRSMPL(서열 번호: 90)을 포함한다.

[0145] 일부 실시형태에서, CM은 호중구 엘라스타제에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 세린 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 uPA에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 레구마인에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 매트립타제에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 시스테인 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 카텡신과 같은 시스테인 프로테아제에 대한 기질이다.

[0146] 일부 실시형태에서, CM은 CM1-CM2 기질이며, 서열 ISSGLSGRSDNH(서열 번호: 91); ISSGLSSGGSGGSLGRSDNH(서열 번호: 92); AVGLLAPPGTSTSGRSANPRG(서열 번호: 93); TSTSGRSANPRGGAVGLLAPP(서열 번호: 94); VHMPGLFLPGGTSTSGRSANPRG(서열 번호: 95); TSTSGRSANPRGGVHMPGLFLGP(서열 번호: 96); AVGLLAPPGSLGRSDNH(서열 번호: 97); LSGRSDNHGGAVGLLAPP(서열 번호: 98); VHMPGLFLPGGSLGRSDNH(서열 번호: 99); LSGRSDNHGGVHMPGLFLGP(서열 번호: 100); LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS(서열 번호: 101); LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS(서열 번호: 102); ISSGLSSGGSGGSLGRSGNH(서열 번호: 103); LSGRSDNHGGSGGSQLRMA(서열 번호: 104); QNQLRMAGGSGGSLGRSDNH(서열 번호: 105); LSGRSDNHGGSGGSQLRMA(서열 번호: 106); QNQLRMAGGSGGSLGRSGNH(서열 번호: 107); ISSGLSGRSGNH(서열 번호: 108); ISSGLSGRSANPRG(서열 번호: 148); AVGLLAPPTSGRSANPRG(서열 번호: 149); AVGLLAPPSGRSANPRG(서열 번호: 150); ISSGLSGRSDDH(서열 번호: 151); ISSGLSGRSDIH(서열 번호: 152); ISSGLSGRSDQH(서열 번호: 153); ISSGLSGRSDTH(서열 번호: 154); ISSGLSGRSDYH(서열 번호: 155); ISSGLSGRSDNP(서열 번호: 156); ISSGLSGRSANP(서열 번호: 157); ISSGLSGRSANI(서열 번호: 158); AVGLLAPPGSLGRSDDH(서열 번호: 159); AVGLLAPPGSLGRSDIH(서열 번호: 160); AVGLLAPPGSLGRSDQH(서열 번호: 161); AVGLLAPPGSLGRSDTH(서열 번호: 162); AVGLLAPPGSLGRSDYH(서열 번호: 163); AVGLLAPPGSLGRSDNP(서열 번호: 164); AVGLLAPPGSLGRSANP(서열 번호: 165); AVGLLAPPGSLGRSANI(서열 번호: 166); ISSGLSGRSDNI(서열 번호: 171); AVGLLAPPGSLGRSDNI(서열 번호: 172); GLSGRSDNHGGAVGLLAPP(서열 번호: 193); 및/또는 GLSGRSDNHGGVHMPGLFLGP(서열 번호: 194)를 포함한다.

[0147] 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2001)로도 지칭되는 서열 ISSGLSGRSDNH(서열 번호: 91)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GSGGS(서열 번호: 205)인, 본원에서 기질(1001/LP' /0001)로도 지칭되는 서열 ISSGLSSGGSGGSLGRSDNH(서열 번호: 92)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(1004/LP' /0003)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGTSTSGRSANPRG(서열 번호: 93)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(0003/LP' /1004)로도 지칭되는 서열 TSTSGRSANPRGGAVGLLAPP(서열 번호: 94)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(1003/LP' /0003)로도 지칭되는 서열 VHMPGLFLPGGTSTSGRSANPRG(서열 번호: 95)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(0003/LP' /1003)로도 지칭되는 서열 TSTSGRSANPRGGVHMPGLFLGP(서열 번호: 96)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(3001) 및/또는 기질(1004/LP' /0001)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGSLGRSDNH(서열 번호: 97)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(0001/LP' /1004)로도 지칭되는 서열 LSGRSDNHGGAVGLLAPP(서열 번호: 98)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(1003/LP' /0001)로도 지칭되는 서열 VHMPGLFLPGGSLGRSDNH(서열 번호: 99)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(0001/LP' /1003)로도 지칭되는 서열 LSGRSDNHGGVHMPGLFLGP(서열 번호: 100)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GSGGS(서열 번호: 205)인, 본원에서 기질(0001/LP' /1001)로도 지칭되는 서열 LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS(서열 번호: 101)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GSGGS(서열 번호: 205)인, 본원에서 기질(0002/LP' /1001)로도 지칭되는 서열 LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS(서열 번호: 102)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GSGGS(서열 번호: 205)인, 본원에서 기질(1001/LP' /0002)로도 지칭되는 서열 ISSGLSSGGSGGSLGRSGNH(서열 번호: 103)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GSGGS(서열 번호: 205)인, 본원에서 기질(1001/LP' /1002)로도 지칭되는 서열 LSGRSDNHGGSQLRMA(서열 번호: 104)를 포함한다. 일부 실시형태에서

서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GGSGGS(서열 번호: 205)인, 본원에서 기질(1002/LP' /0001)로도 지칭되는 서열 QNQLRMAGGSGGSLSGRSDNH(서열 번호: 105)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GGSGGS(서열 번호: 205)인, 본원에서 기질(0002/LP' /1002)로도 지칭되는 서열 LSGRSGNHGGSGGSQNQLRMA(서열 번호: 106)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GGSGGS(서열 번호: 205)인, 본원에서 기질(1002/LP' /0002)로도 지칭되는 서열 QNQLRMAGGSGGSLSGRSGNH(서열 번호: 107)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2002)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSGNH(서열 번호: 108)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2003)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSANPRG(서열 번호: 148)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2004)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPTSGRSANPRG(서열 번호: 149)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2005)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPSGRSANPRG(서열 번호: 150)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2006)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSDDH(서열 번호: 151)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2007)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSDIH(서열 번호: 152)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2008)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSDQH(서열 번호: 153)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2009)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSDTH(서열 번호: 154)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2010)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSDYH(서열 번호: 155)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2011)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSDNP(서열 번호: 156)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2012)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSANP(서열 번호: 157)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2013)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSANI(서열 번호: 158)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 기질(3006)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGGLSGRSDDH(서열 번호: 159)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(3007)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGGLSGRSDIH(서열 번호: 160)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(3008)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGGLSGRSDQH(서열 번호: 161)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(3009)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGGLSGRSDTH(서열 번호: 162)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(3010)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGGLSGRSDYH(서열 번호: 163)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(3011)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGGLSGRSDNP(서열 번호: 164)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(3012)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGGLSGRSANP(서열 번호: 165)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(3013)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGGLSGRSANI(서열 번호: 166)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(2014)로도 지칭되는 서열 ISSGLLSGRSDNI(서열 번호: 171)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 본원에서 기질(3014)로도 지칭되는 서열 AVGLLAPPGGLSGRSDNI(서열 번호: 172)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(0001/LP' /1004)로도 지칭되는 서열 GLSGRSDNHGGAVGLLAPP(서열 번호: 193)를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM1-CM2 기질은 이 CM1-CM2 기질에 사용된 바와 같은 LP' 는 아미노산 서열 GG인, 본원에서 기질(0001/LP' /1003)로도 지칭되는 서열 GLSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP(서열 번호: 194)을 포함한다.

[0148] 일부 실시형태에서, CM은 적어도 2개의 프로테아제에 대한 기질이다. 일부 실시형태에서, CM은 MMP, 트롬빈, 호중구 엘라스타제, 시스테인 프로테아제, uPA, 레구마인, 및 매트립타제로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 프로테아제에 대한 기질이다.

[0149] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체는 적어도 제1 CM 및 제2 CM을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 CM 및 제2 CM은 각각 15개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 일부 실시형태에서, 비절단 상태의 접합된 활성화 가능한 항체 내의 제1 CM 및 제2 CM은 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 갖는다: MM-CM1-CM2-AB 또는 AB-CM2-CM1-MM. 일부 실시형태에서, 제1 CM 및 제2 CM의 적어도 하나는 MMP, 트롬빈, 호중구 엘라스타제, 시스테인 프로테아제, uPA, 레구마인, 및 매트립타제로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제에 대한 기질로 기능하는 폴리펩티드이다. 일부 실시형태에서, 제1 CM은 표적 조직에서 MMP, 트롬빈, 호중구 엘라스타제, 시스테인 프로테아제, uPA, 레구마인, 및 매트립타제로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 절단제에 의해 절단되고, 제2 CM은 표적 조직에서 제2 절단제에 의해 절단된다. 일부 실시형태에서, 다른 프로테아제는 표(1)에 나타낸 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 제1 절단제 및 제2 절단제는 MMP, 트롬빈, 호중구 엘라스타제, 시스테인 프로테아제, uPA, 레구마인, 및 매트립타제로 이루어진 군으로부터 선택된 동일한 프로테아제이며, 제1 CM 및 제2 CM은 효소에 대하여 상이한 기질이다. 일부 실시형태에서, 제1 절단제

및 제2 절단제는 표 (I)에 나타난 것으로 이루어진 군으로부터 선택된 동일한 프로테아제이다. 일부 실시형태에서, 제1 절단제 및 제2 절단제는 상이한 프로테아제이다. 일부 실시형태에서, 제1 절단제 및 제2 절단제는 표적 조직에서 공-국소화된다. 일부 실시형태에서, 제1 CM 및 제2 CM은 표적 조직에서 적어도 하나의 절단제에 의해 절단된다.

- [0150] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체는 활성화 또는 절단된 상태에서, 프로테아제가 CM을 절단한 이후 접합된 활성화 항체가 LP2 및/또는 CM 서열의 적어도 일부를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하도록, 프로테아제에 노출되고 프로테아제에 의해 절단된다.
- [0151] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 1 당량 이상의 작용제에 접합된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 1 당량의 작용제에 접합된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 2, 3, 또는 4 당량의 작용제에 접합된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 균일 당량수의 접합제를 갖는 활성화 가능한 항체의 혼합물의 일부이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 이종의 당량수의 접합제 갖는 활성화 가능한 항체의 혼합물의 일부이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혼합물은 각각의 활성화 항체에 접합된 작용제의 평균 수가 0 내지 1, 1 내지 2, 2 내지 3, 또는 3 내지 4가 되도록 한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혼합물은 각각의 활성화 항체에 접합된 작용제의 평균 수가 1, 2, 3 또는 4가 되도록 한다.
- [0152] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 리신 및/또는 시스테인 잔기의 수가 활성화 가능한 항체의 원래 아미노산 서열에 비해 증가 또는 감소되도록 하나 이상의 부위-특이적 아미노산 서열 변형을 포함하여, 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체에 접합될 수 있는 작용제의 수를 상응하게 증가시키거나 감소시키거나, 또는 일부 실시형태에서 작용제를 활성화 가능한 항체의 부위-특이적 방식으로 접합시키는 것을 제한한다. 일부 실시형태에서, 변형된 활성화 가능한 항체는 부위-특이적 방식으로 하나 이상의 비천연 아미노산으로 변형되므로, 일부 실시형태에서, 작용제의 비천연 아미노산의 부위로의 접합을 제한한다.
- [0153] 본원에 개시된 접합된 활성화 가능한 항체는 항체의 구성 및 적어도 부분적으로 접합에 영향을 미치는데 사용된 방법에 따라 다양한 화학양론적 물비의 약물 분자 및 항체 모이어티를 포함할 수 있다.
- [0154] 용어 "약물 부하(load)" 또는 "약물 로딩(loading)" 개별 접합된 활성화 가능한 항체에서 항체 당 약물 분자의 물비를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 약물 로딩은 1 내지 4개의 약물 분자, 2 내지 4개의 약물 분자, 1 내지 3개의 약물 분자, 2 내지 3개의 약물 분자, 또는 1 내지 2개의 약물 분자를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 약물 로딩은 1개의 약물 분자, 2개의 약물 분자, 3개의 약물 분자, 또는 4개의 약물 분자를 포함할 수 있다.
- [0155] 본 발명의 목적을 위하여, 당업자는 "약물 로딩" 및 "약물 대 항체 비율"(DAR로도 지칭됨)가 동일하지 않다는 것을 이해할 것이다. DAR은 적어도 2개의 접합된 활성화 가능한 항체 분자의 집단에서 항체 당 약물 분자의 평균 물비를 지칭하는 반면, 약물 로딩은 개별 접합된 활성화 가능한 항체 분자에서 항체 당 약물 분자의 물비를 지칭한다. 약물 로딩은 주로 접합된 활성화 가능한 항체의 구성 및 설계와 관련이 있는 반면, DAR은 주로 환자에게 투여될 치료적 접합된 활성화 가능한 항체 약학적 조성물과 관련이 있다.
- [0156] 일부 실시형태에서, 본 발명의 활성화 가능한 항체는 좁은 DAR 분포를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체의 비교적 균질한 체제를 생성하도록 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체 체제는 그의 DAR 분포에 대하여 실질적으로 균질할 수 있는데, 이는 특정 DAR(예를 들어, 2 및/또는 4의 DAR)을 갖는 우세한 부위-특이적 ADC가 체제 내에 존재한다는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 실질적으로 균질한 접합된 활성화 가능한 항체 체제는 또한 로딩 부위(즉, 유리 시스테인 상에)에 대하여 균일할 수 있다.
- [0157] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR은 약 2 및/또는 4일 것이다. 이 맥락에서, 용어 "약"은 대략 동일한 분포(예를 들어, 각각 40% 초과)를 갖는 2 및 4의 DAR을 갖는 응집체에서 80% 초과 2개의 1차 종 및 다른 DAR 종으로 구성된 나머지를 함유하는 접합된 활성화 가능한 체제를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0158] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR은 약 2로 농축될 것이다. 이 맥락에서, 용어 "약"은 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% ± 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9% 초과를 함유하는 접합된 활성화 가능한 항체 체제를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0159] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR은 용어 "약"이 약 94% ± 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9% 초과를 함유하는 접합된 활성화 가능한 항체 체제를 의미하는 것으로 해석되면서, 약 2로 농축될 것이다.

- [0160] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR은 용어 "약"이 약 95% ± 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9% 초과를 함유하는 접합된 활성화 가능한 항체 제제를 의미하는 것으로 해석되면서, 약 2로 농축될 것이다.
- [0161] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR은 용어 "약"이 약 96% ± 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9% 초과를 함유하는 접합된 활성화 가능한 항체 제제를 의미하는 것으로 해석되면서, 약 2로 농축될 것이다.
- [0162] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR은 용어 "약"이 약 97% ± 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9% 초과를 함유하는 접합된 활성화 가능한 항체 제제를 의미하는 것으로 해석되면서, 약 2로 농축될 것이다.
- [0163] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR은 용어 "약"이 약 98% ± 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9% 초과를 함유하는 접합된 활성화 가능한 항체 제제를 의미하는 것으로 해석되면서, 약 2로 농축될 것이다.
- [0164] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR은 용어 "약"이 약 99% ± 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9% 초과를 함유하는 접합된 활성화 가능한 항체 제제를 의미하는 것으로 해석되면서, 약 2로 농축될 것이다.
- [0165] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR은 약 2 및/또는 4일 것이다. 이 맥락에서, 용어 "약"은 대략 동일한 분포(예를 들어, 각각 40% 초과)를 갖는 2 및 4의 DAR을 갖는 응집체에서 80% 초과인 2개의 1차 중 및 다른 DAR 중으로 구성된 나머지를 함유하는 접합된 활성화 가능한 제제를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0166] 일부 실시형태에서, 부위-특이적 활성화 가능한 항체 및/또는 선택적 환원 및 접합의 사용을 통해 원하는 균질성을 달성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 원하는 균질성은 선택적 환원과 조합된 부위-특이적 컨스트럭트(construct)를 통해 달성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제제는 예를 들어, 분석 또는 분취 크로마토그래피 기법을 사용하여 더 정제될 수 있다. 이 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체 제제의 균질성은 질량 분석법, HPLC(예를 들어, 크기 배제 HPLC, RP-HPLC, HIC-HPLC 등) 또는 모세관 전기영동을 포함하지만 이에 한정되지 않는 당업계 공지된 다양한 기법을 사용하여 분석될 수 있다.
- [0167] 접합된 활성화 가능한 항체 제제의 정제에 대하여, 표준 약학적 제제 방법을 사용하여 원하는 순도를 얻을 수 있음을 이해할 것이다. 본원에서 논의된 바와 같이, 역상(RP) 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)와 같은 액체 크로마토그래피 방법은 약물 로딩값에 의해 혼합물에서 화합물을 분리할 수 있다. 일부 경우에, 특정 약물 부하를 갖는 종을 분리하는데 이온 교환(IEC) 또는 혼합 모드 크로마토그래피(MMC)를 사용할 수도 있다.
- [0168] 일부 실시형태에서, 비교적 높은 수준의 약물 부하 균질성을 갖는 주어진 DAR을 갖는 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체 제제는 약물 부하의 범위 또는 분포를 갖는 접합체의 혼합물을 포함할 수 있지만, 상기 혼합물에서 약물 부하의 분포가 평균 DAR 값을 중심으로(또는 가장 평균을 가짐) 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체 제제는 혼합물의 평균 DAR이 각각 +/-0.5인 약 1, 2, 또는 3인 접합체의 혼합물을 포함할 것이다. 특정 바람직한 실시형태에서, 범위 또는 편차는 0.4 미만일 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 다른 실시형태에서, 조성물은 각각 +/-0.3인 1, 2, 또는 3의 평균 DAR을 포함할 것이다.
- [0169] 일부 실시형태에서, 컨쥬게이션 반응으로부터의 접합된 활성화 가능한 항체의 제제에서 항체 당 약물의 분포는 UV-Vis 분광 광도법, 역상 HPLC, HIC, 질량 분석법, ELISA 및 전기영동과 같은 통상적인 수단에 의해 특징될 수 있다.
- [0170] 일부 실시형태에서, 상이한 약물 부하를 갖는 접합체의 혼합물을 포함하는 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 혼합물은 구체적인 약물 부하를 갖는 하나 이상의 접합체 종에 대하여 정제되거나 농축될 수 있다. 예를 들어, 0, 2, 4, 6, 및 8의 약물 부하를 갖는 AADC의 혼합물을 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체 혼합물은 2의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체에 대하여 농축 또는 정제될 수 있다. 일부 실시형태에서, 혼합물은 4의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체 종에 대해서만 정제 또는 농축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 혼합물은 2 및 4의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체 종에 대해서만 정제 또는 농축될 수 있다. 본원에 사용된, 2의 약물 부하를 갖는 접합체 종의 종의 상대적으로 균질한 제제를 갖는 제제 또는 정제 또는 접합된 활성화 가능한 항체는 약 2의 DAR을 갖는 "E2"로 지칭된다. 본원에 사용된, 4의 약물 부하를 갖는

접합체 중의 상대적으로 균질한 제제를 갖는 제제 또는 정제 또는 접합된 활성화 가능한 항체는 "E4"로 지칭된다. 본원에 사용된, 2 또는 4의 약물 부하를 갖는 접합체 중의 혼합물을 갖는 제제 또는 정제 또는 접합된 활성화 가능한 항체는 대략 3의 DAR을 갖는 "DE"(DAR-농축됨)으로 지칭된다. 이 맥락에서, 용어 "약"은 규정된 양의 +/- 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1.0을 의미하는 것으로 해석된다.

[0171] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체는 하기 화학식으로 표시될 수 있다:

[0172] AA-(AG)_p

[0173] 상기 식에서 AA는 MM-CM-AB의 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 비절단 상태로 갖는 활성화 가능한 항체이다. AB는 포유류 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 7의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체이다. MM은 서열 번호: 18의 서열을 포함하는 마스킹 모이어티이며, 상기 MM은 상기 AB에 커플링되며, 상기 AA가 비절단 상태인 경우 상기 AB의 CD71과의 결합을 억제한다. CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 상기 AB에 커플링되며, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이다. AG는 AA-(AG)_p인 상기 AA에 접합된 작용제이다. 일부 실시형태에서, p는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 혼합물을 포함하고, 상기 식에서 각각의 접합된 활성화 가능한 항체는 화학식 AA-(AG)_p로 표시되고, 상기 식에서 p는 0 내지 8의 정수이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 혼합물을 포함하고, 상기 식에서 상기 중의 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%는 접합된 활성화 가능한 항체이며, 상기 식에서 p는 2이다.

[0174] 일부 실시형태에서, 특정 약물 부하를 갖는 접합체의 주어진 중에 대하여 정제 또는 농축되는 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 적어도 특정 백분율의 상기 주어진 약물 부하 중을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 적어도 50%의 2의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체의 제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 적어도 75%의 2의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 적어도 85%의 2의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 적어도 90%의 2의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 적어도 95%의 2의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 적어도 98%의 2의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다.

[0175] 일부 실시형태에서, 주어진 약물 부하 중에 대해 정제 또는 농축된 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 조합된 모든 다른 약물 부하 중의 총 물 당량보다 더 많은 당량의 주어진 약물 부하 중을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 약물 부하가 2가 아닌 조성물의 접합된 활성화 가능한 항체 중의 각각의 조합된 당량이 2의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체의 당량 미만이 되도록 한다. 일부 실시형태에서, E4 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 약물 부하가 4가 아닌 조성물의 접합된 활성화 가능한 항체 중의 각각의 조합된 당량이 4의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체의 당량 미만이 되도록 한다. 일부 실시형태에서, DE 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 약물 부하가 2 또는 4가 아닌 조성물의 접합된 활성화 가능한 항체 중의 각각의 조합된 당량이 2 또는 4의 약물 부하를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체의 당량 미만이 되도록 한다.

[0176] 일부 실시형태에서, 주어진 DAR 중(예를 들어, 본원에 논의된 바와 같이 E2 또는 E4)에 대하여 정제되거나 농축된 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 주어진 약물 부하 중이 아닌 접합된 활성화 가능한 항체를 특정 백분율 미만으로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 50% 미만의 약물 부하가 2가 아닌 중인 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 25% 미만의 약물 부하가 2가 아닌 중인 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 15% 미만의 약물 부하가 2가 아닌 중인 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 10% 미만의 약물 부하가 2가 아닌 중인 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 5% 미만의 약물 부하가 2가 아닌 중인 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, E2 접합된 활성화 가능한 항체의 제제는 2% 미만의 약물 부하가 2가 아닌 중인 접합된 활성화 가능한 항체를 포함한다. 일부 다른 실시형태에서, 농축되거나 정제된 제제(예를 들어,

E4 또는 De)는 농축되거나 정제된 활성화 가능한 항체 조성물에서 상응하는 약물 부하 중을 50% 미만, 25% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 2% 미만인 아닌 양으로 가질 수 있다.

- [0177] 일부 실시형태에서, 상기 작용제는 항-염증성 작용제이다.
- [0178] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체는 또한 검출 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 모이어티는 진단제이다.
- [0179] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체는 또는 단일 펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 신호 펩티드는 스페이서(spacer)를 통해 활성화 가능한 항체에 접합된다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 신호 펩티드의 부재 하에 활성화 가능한 항체에 접합된다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 활성화 가능한 항체의 MM에 직접 연결된다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 스페이서 -MM-CM-AB의 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열에서 활성화 가능한 항체의 MM에 직접 연결된다. 활성화 가능한 항체의 MM의 N-말단에 직접 연결된 스페이서의 예는 QGQSGQ(서열 번호: 109)이다. 활성화 가능한 항체의 MM의 N-말단에 직접 연결된 스페이서의 다른 예는 QGQSGQG(서열 번호: 138), QGQSG(서열 번호: 139), QGQS(서열 번호: 140), QGQ, QG, 및 Q를 포함한다. 활성화 가능한 MM의 N-말단에 직접 연결된 스페이서의 다른 예는 GQSGQG(서열 번호: 143), QSGQG(서열 번호: 144), SGQG(서열 번호: 145), GQG, 및 G를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 MM의 N-말단에 연결되지 않는다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQSGQ(서열 번호: 109)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQSGQG(서열 번호: 138)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQSG(서열 번호: 139)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQS(서열 번호: 140)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQ를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QG를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 잔기 Q를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 GQSGQG(서열 번호: 143)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QSGQG(서열 번호: 144)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 SGQG(서열 번호: 145)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 GQG를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 G를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 존재하지 않는다.
- [0180] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 AB는 자연적으로 하나 이상의 이황화 결합을 함유한다. 일부 실시형태에서, AB는 하나 이상의 이황화 결합을 포함하도록 조작될 수 있다.
- [0181] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 5로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의하여 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 7로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 5로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열 및 서열 번호: 7로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.
- [0182] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 5로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 활성화 항체는 서열 번호: 7로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 활성화 항체는 서열 번호: 5로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열 및 서열 번호: 7로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 인코딩된다.
- [0183] 본 개시내용은 또한 활성화 가능한 항체의 발현을 야기하는 조건 하에서 세포를 배양함으로써 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체를 생성하는 방법으로서, 세포는 본 개시내용의 핵산 서열 또는 본 개시내용의 벡터를 포함하는 방법을 제공한다.

- [0184] 본 개시내용은 또한 하기 단계를 포함하는, 활성화 상태에서 CD71과 결합하는 활성화 가능한 항체를 제조하는 방법을 제공한다: (a) 활성화 가능한 항체의 발현을 야기하는 조건 하에서 활성화 가능한 항체를 인코딩하는 핵산 컨스트럭트를 포함하는 세포를 배양하는 단계로서, 상기 활성화 가능한 항체는 본 개시내용의 활성화 가능한 항체를 포함하는 단계; 및 (b) 상기 활성화 가능한 항체를 회수하는 단계.
- [0185] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 상응하는 항체의 혈청 반감기보다 길고; 예를 들어, 접합된 활성화 가능한 항체의 pK는 상응하는 항체의 pK보다 길다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 상응하는 항체의 혈청 반감기와 유사하다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 15일이다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 12일이다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 11일이다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 10일이다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 9일이다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 8일이다. 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 7일이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 6일이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 5일이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 4일이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 3일이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 2일이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 24시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 20시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 18시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 16시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 14시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 12시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 10시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 8시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 6시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 4시간이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여될 때 적어도 3시간이다.
- [0186] 본 개시내용 또한 폴리펩티드의 발현을 야기하는 조건 하에서 세포를 배양함으로써 항-CD71 항체 및/또는 활성화 가능한 항-CD71 항체 폴리펩티드를 생성하는 방법으로서, 상기 세포는 본원에 기재된 항체 및/또는 활성화 가능한 항체를 인코딩하는 단리된 핵산 분자, 및/또는 이 단리된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는, 방법을 제공한다. 본 개시내용은 항체 및/또는 활성화 가능한 항체의 발현을 야기하는 조건 하에서 세포를 배양함으로써 항체 및/또는 활성화 가능한 항체를 생성하는 방법으로서, 상기 세포는 본원에 기재된 항체 및/또는 활성화 가능한 항체를 인코딩하는 단리된 핵산 분자, 및/또는 이 단리된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0187] 본 발명은 치료학적으로 유효한 양의 본원에 기재된 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 이를 필요로 하는 대상체에 투여함으로써 대상체에서 CD71 매개 질병을 예방, 진행 지연, 증상의 완화, 또는 그렇지 않으면 개선하는 방법을 제공한다.
- [0188] 본 발명은 또한 치료학적으로 유효한 양의 본원에 기재된 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 이를 필요로 하는 대상체에 투여함으로써 대상체에 암을 예방, 진행 지연, 치료, 증상의 완화, 또는 그렇지 않으면 개선하는 방법을 제공한다. CD71은 비한정적 예로서, 선암종, 담관(담즙)암, 방광암, 유방암, 예를 들어, 삼중 음성 유방암 및 Her2-음성 유방암; 유암성 암; 자궁경부암; 담관암; 대장; 자궁내막; 신경아교종; 두경부암, 예를 들어, 두경부 편평 세포암; 백혈병; 간암; 폐암, 예를 들어, NSCLC, SCLC; 림프종; 흑색종; 구강인두암; 난소암; 췌장암; 전립선암, 예를 들어, 전이성 거세 저항성 전립선암종; 신장암; 피부암; 편평 세포암, 위암; 고환암; 갑상선암; 및 요로상피암과 같은 다양한 암에서 발현되는 것으로 알려져 있다.
- [0189] 일부 실시형태에서, 암은 CD71-발현 종양과 연관되어 있다. 일부 실시형태에서, 암은 CD71-발현 종양으로 인한 것이다.
- [0190] 이 방법 및 용도의 임의의 실시형태에서 사용되는 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체는 질병의 임의의 단계에

서 투여될 수 있다. 예를 들어, 이러한 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체는 초기 단계에서 전이 단계에 이르는 임의의 단계의 암을 앓고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 용어 대상체 및 환자는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

- [0191] 일부 실시형태에서, 대상체는 인간 또는 비인간 영장류와 같은 포유류이다.
- [0192] 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체 및 이의 치료학적 제형은 비정상적인 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있거나 이에 민감한 대상체에게 투여된다. 비정상적인 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있거나 이에 민감한 대상체는 당업계에 공지된 임의의 다양한 방법을 사용하여 식별된다. 예를 들어, 암 또는 다른 신생물 상태를 앓고 있는 대상체는 건강 상태를 평가하기 위해 신체 검사 및 혈액, 소변 및/또는 대변 분석과 같은 임의의 다양한 임상 및/또는 실험실 테스트를 사용하여 식별된다. 예를 들어, 염증 및/또는 염증성 질환을 앓고 있는 대상체는 건강 상태를 평가하기 위해 신체 검사 및/또는 체액 분석, 예를 들어, 혈액, 소변 및/또는 대변 분석과 같은 임의의 다양한 임상 및/또는 실험실 테스트를 사용하여 식별된다.
- [0193] 비정상적인 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있는 환자에게 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체의 투여는 임의의 다양한 실험실 또는 임상 목표가 달성되면 성공적인 것으로 간주된다. 예를 들어, 비정상적인 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있는 환자에게 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체의 투여는 질병 또는 장애와 연관된 하나 이상의 증상이 완화, 감소, 억제되거나 더 이상의, 즉, 더 악화된 상태로 진행되지 않으면 성공적인 것으로 간주된다. 비정상적인 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있는 환자에게 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체의 투여는 질병 또는 장애가 완화상태로 들어가거나, 또는 더 이상의, 즉, 더 악화된 상태로 진행되지 않으면 성공적인 것으로 간주된다.
- [0194] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체 및 이의 치료 제형은 암 또는 다른 신생물 상태를 앓고 있는 대상체와 같은 질병 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이에 민감한 대상체에게 투여되며, 여기서 대상체의 병든 세포는 CD71을 발현한다. 일부 실시형태에서, 병든 세포는 비정상적 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된다. 일부 실시형태에서, 병든 세포는 정상적 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된다. 대상체의 병든 세포가 CD71을 발현하는 질병 또는 장애를 앓고 있거나 이에 민감한 대상체는 당업계에 공지된 임의의 다양한 방법을 식별된다. 예를 들어, 암 또는 다른 신생물 상태를 앓고 있는 대상체는 건강 상태를 평가하기 위해 신체 검사 및 혈액, 소변 및/또는 대변 분석과 같은 임의의 다양한 임상 및/또는 실험실 테스트를 사용하여 식별된다. 예를 들어, 염증 및/또는 염증성 질환을 앓고 있는 대상체는 건강 상태를 평가하기 위해 신체 검사 및/또는 체액 분석, 예를 들어, 혈액, 소변 및/또는 대변 분석과 같은 임의의 다양한 임상 및/또는 실험실 테스트를 사용하여 식별된다.
- [0195] 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체 및 이의 치료학적 제형은 암 또는 다른 신생물 상태를 앓고 있는 대상체와 같이 CD71을 발현하는 세포 또는 그러한 세포의 존재, 성장, 증식, 전이, 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있거나 이에 민감한 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 세포는 비정상적 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된다. 일부 실시형태에서, 세포는 정상적 CD71 발현 및/또는 활성화와 연관된다. CD71을 발현하는 세포와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있거나 이에 민감한 대상체는 당업계에 공지된 임의의 다양한 방법을 사용하여 식별된다. 예를 들어, 암 또는 다른 신생물 상태를 앓고 있는 대상체는 건강 상태를 평가하기 위해 신체 검사 및 혈액, 소변 및/또는 대변 분석과 같은 임의의 다양한 임상 및/또는 실험실 테스트를 사용하여 식별된다. 예를 들어, 염증 및/또는 염증성 질환을 앓고 있는 대상체는 건강 상태를 평가하기 위해 신체 검사 및/또는 체액 분석, 예를 들어, 혈액, 소변 및/또는 대변 분석과 같은 임의의 다양한 임상 및/또는 실험실 테스트를 사용하여 식별된다.
- [0196] CD71을 발현하는 세포와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있는 환자에게 접합된 활성화 가능한 항-CD71의 투여는 임의의 다양한 실험실 또는 임상 목표가 달성되면 성공적인 것으로 간주된다. 예를 들어, CD71을 발현하는 세포와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있는 환자에게 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체의 투여는 질병 또는 장애와 연관된 하나 이상의 증상이 완화, 감소, 억제되거나 더 이상의, 즉, 더 악화된 상태로 진행되지 않으면 성공적인 것으로 간주된다. CD71을 발현하는 세포와 연관된 질병 또는 장애를 앓고 있는 환자에게 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체의 투여는 질병 또는 장애가 완화상태로 들어가거나, 또는 더 이상의, 즉, 더 악화된 상태로 진행되지 않으면 성공적인 것으로 간주된다.
- [0197] 본 개시내용은 또한 치료학적 유효량의 본 개시내용의 접합된 항체 또는 본 개시내용의 항체를 포함하는 약학적 조성물 또는 본 개시내용의 접합된 항체를 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, CD71을 발현하는 장애 또는 질병을 치료, 증상의 완화, 또는 이의 진행을 지연하는 방법을 제공

한다. 일부 실시형태에서, 장애 또는 질병은 암이다.

[0198] 본 개시내용은 또한 치료학적 유효량의 본 개시내용의 접합된 항체 또는 본 개시내용의 접합된 항체를 포함하는 약학적 조성물을 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, CD71을 발현하는 세포와 연관된 장애 또는 질병을 치료, 증상의 완화, 또는 이의 진행을 지연하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, CD71을 발현하는 세포와 연관된 장애 또는 질병은 암이다. 일부 실시형태에서, 상기 암은 선암종, 담관(담즙)암, 방광암, 골암, 유방암, 삼중 음성 유방암, Her2-음성 유방암, 유암성 암, 자궁경부암, 담관암, 대장암, 결장암, 자궁내막암 신경아교종, 두경부암, 예를 들어, 두경부 편평 세포암, 백혈병, 간암, 폐암, 비소세포성 폐암, 소세포성 폐암, 림프종, 흑색종, 구강인두암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 전이성 거세 저항성 전립선암종, 신장암, 육종, 피부암, 편평 세포암, 위암, 고환암, 갑상선암, 비뇨 생식기암, 또는 요로상피암이다. 일부 실시형태에서, 천연 리간드는 트랜스페린이다. 일부 실시형태에서, 포유류 CD71의 발현 및/또는 활성화는 비정상적이다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 추가적인 작용제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 추가적인 작용제는 치료제이다.

[0199] 본 개시내용은 또한 치료학적 유효량의 본 개시내용의 항체 또는 본 개시내용의 접합된 항체 또는 본 개시내용의 접합된 항체를 포함하는 약학적 조성물 또는 본 개시내용의 접합된 항체를 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 CD71을 발현하는 세포의 성장, 증식, 또는 전이를 억제 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 천연 리간드는 트랜스페린이다. 일부 실시형태에서, 포유류 CD71의 발현 및/또는 활성화는 비정상적이다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 추가적인 작용제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 추가적인 작용제는 치료제이다.

[0200] 본 개시내용은 또한 치료학적 유효량의 본 개시내용의 항체 또는 본 개시내용의 접합된 항체 또는 본 개시내용의 접합된 항체를 포함하는 약학적 조성물 또는 본 개시내용의 접합된 항체를 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 천연 리간드의 포유류 CD71과의 결합을 억제, 차단, 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 천연 리간드는 트랜스페린이다. 일부 실시형태에서, 포유류 CD71의 발현 및/또는 활성화는 비정상적이다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 추가적인 작용제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 추가적인 작용제는 치료제이다.

[0201] 본 개시내용은 또한 치료학적 유효량의 본 개시내용의 활성화 가능한 항체 또는 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 본 개시내용의 활성화 가능한 항체를 포함하는 약학적 조성물 또는 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체를 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 병든 세포가 CD71을 발현하는 장애 또는 질병을 치료, 증상의 완화, 또는 이의 진행을 지연하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 장애 또는 질병은 암이다.

[0202] 본 개시내용은 치료학적 유효량의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체를 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, CD71을 발현하는 세포와 연관된 장애 또는 질병을 치료, 증상의 완화, 또는 이의 진행을 지연하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, CD71을 발현하는 세포와 연관된 장애 또는 질병은 암이다. 일부 실시형태에서, 상기 암은 선암종, 담관(담즙)암, 방광암, 골암, 유방암, 삼중 음성 유방암, Her2-음성 유방암, 유암성 암, 자궁경부암, 담관암, 대장암, 결장암, 자궁내막암 신경아교종, 두경부암, 예를 들어, 두경부 편평 세포암, 백혈병, 간암, 폐암, 비소세포성 폐암, 소세포성 폐암, 림프종, 흑색종, 구강인두암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 전이성 거세 저항성 전립선암종, 신장암, 육종, 피부암, 편평 세포암, 위암, 고환암, 갑상선암, 비뇨 생식기암, 또는 요로상피암이다. 일부 실시형태에서, 천연 리간드는 트랜스페린이다. 일부 실시형태에서, 포유류 CD71의 발현 및/또는 활성화는 비정상적이다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 추가적인 작용제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 추가적인 작용제는 치료제이다.

[0203] 본 개시내용은 또한 치료학적 유효량의 본 개시내용의 활성화 가능한 항체 또는 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 본 개시내용의 활성화 가능한 항체를 포함하는 약학적 조성물 또는 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체를 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 CD71을 발현하는 세포의 성장, 증식, 또는 전이를 억제 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 천연 리간드는 트랜스페린이다. 일부 실시형태에서, 포유류 CD71의 발현 및/또는 활성화는 비정상적이다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 추가적인 작용제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 추가적인 작용제는 치료제이다.

[0204] 본 개시내용은 또한 치료학적 유효량의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 본 개시내용의 접합된

활성화 가능한 항체를 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 천연 리간드의 포유류 CD71과의 결합을 억제, 차단 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 천연 리간드는 트랜스페린이다. 일부 실시형태에서, 포유류 CD71의 발현 및/또는 활성은 비정상적이다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 추가적인 작용제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 추가적인 작용제는 치료제이다.

[0205] 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 영상화제, 조영제, 효소, 형광 표지, 발색단, 염료, 하나 이상의 금속 이온, 또는 리간드-기반 표지를 포함한다. 이 방법 및 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 영상화제는 방사성 동위원소를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 방사성 동위원소는 인듐 또는 테크네튬이다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 조영제는 요오드, 가돌리늄 또는 산화철을 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 효소는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제 또는 β -갈락토시다제를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 형광 표지는 황색 형광 단백질(YFP), 시안 형광 단백질(CFP), 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 적색 형광 단백질(mRFP), 적색 형광 단백질 t이량체2(RFP tdimer2), HCRED, 또는 유로퓸 유도체를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 발광 표지는 N-메틸 아크릴레이트 유도체를 포함한다. 이 방법의 일부 실시형태에서, 표지는 Alex Fluor[®] 680 또는 Alex Fluor[®] 750과 같은 Alex Fluor[®] 표지를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 리간드-기반 표지는 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 또는 하나 이상의 합텐을 포함한다.

[0206] 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 대상체는 포유류이다. 이 방법의 일부 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 비인간 영장류, 반려 동물(예를 들어, 고양이, 개, 말), 농장 동물, 일하는 동물, 또는 동물원 동물과 같은 비인간 포유류이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 설치류이다.

[0207] 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 상기 방법은 생체 내(*in vivo*) 방법이다. 이 방법의 일부 실시형태에서, 상기 방법은 인 시튜(*in situ*) 방법이다. 이 방법의 일부 실시형태에서, 상기 방법은 생체 외(*ex vivo*) 방법이다. 이 방법의 일부 실시형태에서, 상기 방법은 시험관 내 방법이다.

[0208] 상기 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 상기 방법은 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체로 치료하기에 적합한 환자 집단을 식별하거나 그렇지 않으면 개선하고, 이어서 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 치료를 수행하는데 이용된다. 예를 들어, 표적(예를 들어, CD71) 및 이들 방법에서 시험되는 항-CD71 활성화 가능한 항체의 절단성 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 프로테아제 둘 다에 대해 양성으로 시험된 환자는 이러한 CM을 포함하는 이러한 항-CD71 활성화 가능한 항체로 치료하기에 적합한 후보로 식별되며, 이후 환자는 치료적 유효량의 시험되었던 활성화 가능한 항-CD71 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체가 투여된다. 마찬가지로, 표적(예를 들어, CD71) 및 이들 방법을 사용하여 시험되는 활성화 가능한 항체에서 CM 내에서 기질을 절단하는 프로테아제 중 어느 하나 또는 둘 다에 대해 음성으로 시험된 환자는 다른 형태의 요법에 적합한 후보로 식별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 환자는 치료에 적합한 항-CD71 활성화 가능한 항체가 식별될 때까지 다른 항-CD71 활성화 가능한 항체(예를 들어, 질병 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 항-CD71 활성화 가능한 항체)로 시험될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이후 환자에게 치료적 유효량의 활성화 가능한 항-CD71 항체가 투여되고/되거나 양성으로 시험된 환자에 대해 접합된다. 적합한 AB, MM, 및/또는 CM은 본원에 개시된 임의의 AB, MM, 및/또는 CM을 포함한다.

[0209] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 항체 및 선택적으로는 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 이 약학적 조성물은 예를 들어, 진단 키트와 같은 키트에 포함될 수 있다.

[0210] 일부 실시형태에서, 약학적 조성물은 본 개시내용의 접합된 활성화 항체, 및 선택적으로는 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학적 조성물은 추가적인 작용제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 추가적인 작용제는 치료제이다.

[0211] 본 개시내용의 활성화 가능한 항체에서 항-CD71 항체 및 AB는 예를 들어, 포유류 CD71, 및/또는 인간 CD71과 같은 CD71 표적과 특이적으로 결합한다. 본 개시내용의 항체 및/또는 본원에 기재된 활성화된 활성화 가능한 항체와 동일한 CD71 에피토프에 결합하는 항-CD71 항체 및 AB가 본 개시내용에 또한 포함된다. CD71 표적, 예를 들어, 인간 CD71에 결합하기 위해 본원에 기재된 항-CD71 항체 및/또는 활성화된 항-CD71 활성화 가능한 항체와 경쟁하는 항-CD71 항체 및 AB가 본 개시내용에 또한 포함된다. CD71 표적, 예를 들어, 인간 CD71에 결합하기 위해 본원에 기재된 항-CD71 항체 및/또는 활성화된 항-CD71 활성화 가능한 항체와 교차경쟁하는 항-CD71 항체 및

AB가 본 개시내용에 또한 포함된다.

[0212] 본원에 제공된 활성화 가능한 항-CD71 항체는 마스킹 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 마스킹 모이어티는 마스킹 모이어티가 CD-71에 특이적으로 결합하는 항-CD71 항체의 능력을 감소시키도록 항-CD71 항체에 커플링되거나 그렇지 않으면 부착되며, 활성화 가능한 항-CD71 항체 컨스트럭트 내에 위치되는 아미노산 서열이다. 적합한 마스킹 모이어티는 임의의 다양한 공지된 기법을 사용하여 식별된다. 예를 들어, 펩티드 마스킹 모이어티는 Daugherty 등에 의해 국제공개 WO 2009/025846호에 기재된 방법을 사용하여 식별되며, 이는 그 전체 내용 본원에 인용되어 포함된다.

[0213] 본원에 제공된 활성화 가능한 항-CD71 항체는 절단성 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 절단성 모이어티는 프로테아제, 일반적으로 세포외 프로테아제에 대한 기질인 아미노산 서열을 포함한다. 적합한 기질은 임의의 다양한 공지 기법을 사용하여 식별된다. 예를 들어, 펩티드 기질은 Daugherty 등에 의해 미국 특허 제 7,666,817호; Stagliano 등에 의해 미국 특허 제 8,563,269호; 및 La Porte 등에 의해 국제공개 WO 2014/026136호에 기재된 방법을 사용하여 식별되며, 이는 각각의 전체 내용이 본원에 인용되어 포함된다. (또한 문헌 [Boulware et al. "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics." Biotechnol. Bioeng. 106.3 (2010): 339-46] 참조).

[0214] 예시적인 기질은 표 (I)에 열거된 하나 이상의 하기 효소 또는 프로테아제에 의해 절단 가능한 기질을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

표 (I): 예시적인 프로테아제 및/또는 효소

ADAMS, ADAMTS, 예를 들어 ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM12 ADAM15 ADAM17/TACE ADAMDEC1 ADAMTS1 ADAMTS4 ADAMTS5	시스테인 프로테아제, 예를 들어, 크루지페인 레구마인 오투바인-2 KLK, 예를 들어, KLK4 KLK5 KLK6 KLK7 KLK8 KLK10 KLK11 KLK13 KLK14	세린 프로테아제, 예를 들어, 활성화 단백질 C 카텝신 A 카텝신 G 키마제 응고 인자 프로테아제 (예를 들어, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa) 엘라스타제 그랜자임 B 구아니디노벤조아타제 HtrA1 인간 호중구 엘라스타제 락토페린 마립신 NS3/4A PACE4 플라스민 PSA tPA 트롬빈 트립타제 uPA II 형 막관통 세린 프로테아제(TTSP), 예를 들어, DESC1 DPP-4 FAP 헵신 매트립타제-2 MT-SPI1/매트립타제 TMPRSS2 TMPRSS3 TMPRSS4
아스파르테이트 프로타아제, 예를 들어, BACE 레닌	메탈로 프로테아제, 예를 들어, 메프린 네프릴리신 PSMA BMP-1	
아스파르트 카텝신, 예를 들어, 카텝신 D 카텝신 E		
카스파제, 예를 들어, 카스파제 1 카스파제 2 카스파제 3 카스파제 4 카스파제 5 카스파제 6 카스파제 7 카스파제 8 카스파제 9 카스파제 10 카스파제 14	MMP, 예를 들어, MMP1 MMP2 MMP3 MMP7 MMP8 MMP9 MMP10 MMP11 MMP12 MMP13 MMP14 MMP15 MMP16 MMP17 MMP19 MMP20 MMP23 MMP24 MMP26 MMP27	
시스테인 카텝신, 예를 들어, 카텝신 B 카텝신 C 카텝신 K 카텝신 L 카텝신 S 카텝신 V/L2 카텝신 X/Z/P		

[0215]

- [0216] 본원에 기재된 활성화 가능한 항-CD71 항체는 항체 치료제, 특히 생체 내에서 어느 정도 독성이 있는 것으로 알려진 항체 치료제의 한계를 극복한다. 표적-매개 독성은 치료 항체의 개발에 대한 주요 한계를 구성한다. 본원에 제공된 활성화 가능한 항-CD71 항체는 종래 치료 항체에 의해 정상 조직에서 표적의 억제와 연관된 독성을 다루도록 설계된다. 이들 활성화 가능한 항-CD71 항체는 질병 부위에서 단백질 분해적으로 활성화될 때까지 마스킹된 상태로 유지된다. 모 치료 항체로서 항-CD71 항체로 시작하여, 본 발명의 활성화 가능한 항-CD71 항체는 프로테아제 기질을 포함하는 링커를 통해 항체를 억제 마스킹에 커플링함으로써 조작되었다.
- [0217] AB가 MM으로 변형되고 표적의 존재 하에 있는 경우, MM으로 변형되지 않은 AB의 특이적 결합 또는 모 AB의 표적과의 특이적 결합과 비교하여 AB의 그의 표적에 대한 특이적 결합이 감소되거나 억제된다.
- [0218] 표적에 대하여 MM으로 변형된 AB의 K_d 는 MM으로 변형되지 않은 AB 또는 표적에 대한 모 AB의 K_d 보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000 배 이상, 또는 5 내지 10, 10 내지 100, 10 내지 1,000, 10 내지 10,000, 10 내지 100,000, 10 내지 1,000,000, 10 내지 10,000,000, 100 내지 1,000, 100 내지 10,000, 100 내지 100,000, 100 내지 1,000,000, 100 내지 10,000,000, 1,000 내지 10,000, 1,000 내지 100,000, 1,000 내지 1,000,000, 1000 내지 10,000,000, 10,000 내지 100,000, 10,000 내지 1,000,000, 10,000 내지 10,000,000, 100,000 내지 1,000,000, 또는 100,000 내지 10,000,000 배 초과이다. 이에 반하여, 표적에 대하여 MM으로 변형된 AB의 결합 친화도는 MM으로 변형되지 않은 AB 또는 표적에 대한 모 AB의 결합 친화도보다 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000 배 이상, 또는 5 내지 10, 10 내지 100, 10 내지 1,000, 10 내지 10,000, 10 내지 100,000, 10 내지 1,000,000, 10 내지 10,000,000, 100 내지 1,000, 100 내지 10,000, 100 내지 100,000, 100 내지 1,000,000, 100 내지 10,000,000, 1,000 내지 10,000, 1,000 내지 100,000, 1,000 내지 1,000,000, 1000 내지 10,000,000, 10,000 내지 100,000, 10,000 내지 1,000,000, 10,000 내지 10,000,000, 100,000 내지 1,000,000, 또는 100,000 내지 10,000,000 배 미만이다.
- [0219] AB에 대한 MM의 해리 상수(K_d)는 일반적으로 표적에 대한 AB의 K_d 초과이다. AB에 대한 MM의 K_d 는 표적에 대한 AB의 K_d 보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 100,000, 1,000,000 또는 심지어 10,000,000 배 초과이다. 이에 반하여, AB에 대한 MM의 결합 친화도는 일반적으로 표적에 대한 AB의 결합 친화도 미만이다. AB에 대한 MM의 결합 친화도는 AB의 표적에 대한 결합 친화도보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 100,000, 1,000,000 또는 심지어 10,000,000 배 미만일 수 있다.
- [0220] 일부 실시형태에서, AB에 대한 MM의 해리 상수(K_d)는 표적에 대한 AB의 K_d 와 대략 동일하다. 일부 실시형태에서, AB에 대한 MM의 해리 상수(K_d)는 표적에 대한 Ab의 해리 상수 이하이다.
- [0221] 일부 실시형태에서, AB에 대한 MM의 해리 상수(K_d)는 표적에 대한 Ab의 해리 상수 미만이다.
- [0222] 일부 실시형태에서, AB에 대한 MM의 해리 상수(K_d)는 표적에 대한 AB의 해리 상수 초과이다.
- [0223] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합을 위한 K_d 이하인 AB에 결합하기 위한 K_d 를 갖는다.
- [0224] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합을 위한 K_d 이상인 AB에 결합하기 위한 K_d 를 갖는다.
- [0225] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합을 위한 K_d 와 대략 동일한 AB에 결합하기 위한 K_d 를 갖는다.
- [0226] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합을 위한 K_d 미만인 AB에 결합하기 위한 K_d 를 갖는다.
- [0227] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합을 위한 K_d 초과인 AB에 결합하기 위한 K_d 를 갖는다.
- [0228] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합을 위한 K_d 보다 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 또는 1,000 배 이하인 AB에 결합하기 위한 K_d 를 갖는다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합을 위한 K_d 보다 1 내지 5, 2 내지 5, 2 내지 10, 5 내지 10, 5 내지 20, 5 내지 50, 5 내지 100, 10 내지 100, 10 내지 1,000, 20 내지 100, 20 내지 1000, 또는 100 내지 1,000 배 초과인 AB에 결합하기 위한 K_d 를 갖는다.

- [0229] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합의 친화도 미만인 AB에 대한 결합을 위한 친화도를 갖는다.
- [0230] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합의 친화도 이하인 AB에 대한 결합을 위한 친화도를 갖는다.
- [0231] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합의 친화도와 대략 동일한 AB에 대한 결합을 위한 친화도를 갖는다.
- [0232] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합의 친화도 이상인 AB에 대한 결합을 위한 친화도를 갖는다.
- [0233] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합의 친화도 초과인 AB에 대한 결합을 위한 친화도를 갖는다.
- [0234] 일부 실시형태에서, MM은 AB의 표적에 대한 결합의 친화도 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 또는 1,000 배 미만인 AB에 대한 결합을 위한 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에서, MM은 표적에 대한 AB의 결합의 친화도 1 내지 5, 2 내지 5, 2 내지 10, 5 내지 10, 5 내지 20, 5 내지 50, 5 내지 100, 10 내지 100, 10 내지 1,000, 20 내지 100, 20 내지 1000, 또는 100 내지 1,000 배 미만인 AB에 대한 결합을 위한 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에서, MM은 표적에 대한 AB의 결합의 친화도 2 내지 20 배 미만인 AB에 대한 결합을 위한 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에서, AB에 공유적으로 연결되지 않고 AB에 대해 등몰농도인 MM은 표적에 대한 AB의 결합을 억제하지 않는다.
- [0235] AB가 MM으로 변형되고 표적의 존재 하에 있는 경우, MM으로 변형되지 않은 AB의 특이적 결합 또는 모 AB의 표적과의 특이적 결합과 비교하여 AB의 그의 표적에 대한 특이적 결합이 감소되거나 억제된다. MM으로 변형되지 않은 AB의 결합 또는 모 AB의 표적과의 결합과 비교할 경우, MM으로 변형될 때 표적에 결합하는 AB의 능력은 생체 내 또는 시험관 내 검정에서 측정될 때 적어도 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 또는 96 시간, 또는 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 또는 180 일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 개월 이상 동안 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 심지어 100% 감소될 수 있다.
- [0236] MM은 표적에 대한 AB의 결합을 억제한다. MM은 AB의 항원 결합 도메인에 결합하고 AB의 표적에 대한 결합을 억제한다. MM은 AB의 표적에 대한 결합을 입체적으로 억제할 수 있다. MM은 AB의 그의 표적에 대한 결합을 동종학적으로(allosterically) 억제할 수 있다. 이 실시형태에서, AB가 변형되거나 MM과 커플링되고 표적의 존재 하에 있는 경우, MM으로 변형되지 않은 AB, 모 AB, 또는 표적에 대하여 MM에 커플링되지 않은 결합과 비교하여, 생체 내 또는 시험관 내 분석에서 측정될 때 적어도 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 또는 96 시간, 또는 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 또는 180 일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 개월 이상 동안 AB의 표적에 대한 결합이 없거나 실질적으로 없거나, 또는 AB의 표적에 대한 결합이 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 또는 50% 존재한다.
- [0237] AB가 MM에 커플링되거나 MM에 의해 변형될 때, MM은 AB의 표적에 대한 특정 결합을 '마스킹'하거나 감소시키거나 그렇지 않으면 억제한다. AB가 MM에 커플링되거나 MM에 의해 변형될 때, 그러한 커플링 또는 변형은 AB가 그의 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 감소시키거나 억제하는 구조적 변화에 영향을 줄 수 있다.
- [0238] MM에 커플링되거나 MM으로 변형된 AB는 (아미노(N) 말단 영역에서 카르복실(C) 말단 영역까지 순서대로 하기 화학식으로 나타낼 수 있다:
- [0239] (MM)-(AB)
- [0240] (AB)-(MM)
- [0241] (MM)-L-(AB)
- [0242] (AB)-L-(MM)
- [0243] , 상기 식에서 MM은 마스킹 모이어티이고, AB는 항체 또는 이의 항체 단편이며, L은 링커이다. 많은 실시형태에서, 유연성을 제공하기 위해 하나 이상의 링커, 예를 들어, 유연성 링커를 조성물에 삽입하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0244] 특정 실시형태에서, MM은 AB의 천연 결합 파트너가 아니다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 상동성이 없거나 실질적으로 없다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 80% 이하로 유사하다. 일부 실시형

태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 80% 이하로 동일하다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 25% 이하로 동일하다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 이하로 동일하다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 20% 이하로 동일하다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 10% 이하로 동일하다.

[0245] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 MM에 의해 변형된 AB를 포함하고, 또한 하나 이상의 절단성 모이어티(CM)를 포함한다. 이러한 활성화 가능한 항체는 AB의 표적에 활성화 가능한/전환 가능한 결합을 나타낸다. 활성화 가능한 항체는 일반적으로 마스킹 모이어티(MM) 및 변형성 절단성 모이어티(CM)에 의해 변형되거나 커플링된 항체 또는 항체 단편(AB)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 하나 이상의 프로테아제에 대한 기질로서 작용하는 아미노산 서열을 함유한다.

[0246] 활성화 가능한 항체의 요소가 배열되어, MM 및 CM는 절단된 (또는 상대적으로 활성화된) 상태로 그리고 표적의 존재 하에, AB는 표적에 결합하고 활성화 가능한 항체는 표적의 존재 하에 절단되지 않은 (또는 상대적으로 비활성인)의 상태에서, AB의 그의 표적에 대한 특이적 결합이 감소되거나 억제되도록 위치된다. AB의 표적에 대한 특이적 결합은 MM에 의해 그의 표적을 특이적으로 결합하는 AB의 능력의 억제 또는 마스킹으로 인해 감소될 수 있다.

[0247] 표적에 대하여 MM 및 CM으로 변형된 Ab의 K_d 는 MM으로 변형되지 않은 AB 또는 표적에 대한 모 AB의 K_d 보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000 배 이상, 또는 5 내지 10, 10 내지 100, 10 내지 1,000, 10 내지 10,000, 10 내지 100,000, 10 내지 1,000,000, 10 내지 10,000,000, 100 내지 1,000, 100 내지 10,000, 100 내지 100,000, 100 내지 1,000,000, 100 내지 10,000,000, 1,000 내지 10,000, 1,000 내지 100,000, 1,000 내지 1,000,000, 1000 내지 10,000,000, 10,000 내지 100,000, 10,000 내지 1,000,000, 10,000 내지 10,000,000, 100,000 내지 1,000,000, 또는 100,000 내지 10,000,000 배 초과이다. 이에 반하여, 표적에 대하여 MM 및 CM으로 변형된 AB의 결합 친화도는 MM 및 CM으로 변형되지 않은 AB 또는 표적에 대한 모 AB의 결합 친화도보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000 배 이상, 또는 5 내지 10, 10 내지 100, 10 내지 1,000, 10 내지 10,000, 10 내지 100,000, 10 내지 1,000,000, 10 내지 10,000,000, 100 내지 1,000, 100 내지 10,000, 100 내지 100,000, 100 내지 1,000,000, 100 내지 10,000,000, 1,000 내지 10,000, 1,000 내지 100,000, 1,000 내지 1,000,000, 1000 내지 10,000,000, 10,000 내지 100,000, 10,000 내지 1,000,000, 10,000 내지 10,000,000, 100,000 내지 1,000,000, 또는 100,000 내지 10,000,000 배 미만이다.

[0248] AB가 MM 및 CM으로 변형되고 표적의 존재 하에 있지만, 변형체(예를 들어, 적어도 하나의 프로테아제)의 존재 하에 있지 않는 경우, MM 및 CM으로 변형되지 않은 AB 또는 모 AB의 표적과의 특이적 결합과 비교하여 AB의 그의 표적에 대한 특이적 결합이 감소되거나 억제된다. 모 AB의 결합 또는 그의 표적에 대하여 MM 및 CM으로 변형되지 않은 AB의 결합과 비교할 경우, MM 및 CM으로 변형될 때 표적에 결합하는 AB의 능력은 생체 내 또는 시험관 내 분석에서 측정될 때 적어도 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 또는 96 시간 또는 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, or 180 일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, or 12 개월 이상 동안 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 심지어 100% 감소될 수 있다.

[0249] 본원에 사용된, 용어 절단된 상태는 적어도 하나의 프로테아제에 의한 CM의 변형 후 활성화 가능한 항체의 상태를 지칭한다. 본원에 사용된, 용어 비절단 상태는 프로테아제에 의한 CM의 절단의 부재 하에 활성화 가능한 항체의 상태를 지칭한다. 상기 논의된 바와 같이, 용어 "활성화 가능한 항체"는 본원의 비절단(천연) 상태 및 절단된 상태 양쪽 모두에서 활성화 가능한 항체를 지칭하기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서 절단된 활성화 가능한 항체는 프로테아제에 의한 CM의 절단으로 인해 MM이 결합되어 적어도 MM의 방출(예를 들어, MM이 공유 결합(예를 들어, 시스템인 잔기 사이의 이황화 결합)에 의해 활성화 가능한 항체에 결합되지 않은 경우)이 일어난다는 것이 당업자에게 명백할 것이다.

[0250] 활성화 가능한 또는 전환 가능한 활성화 가능한 항체는 활성화 가능한 항체가 억제, 마스킹 또는 비절단 상태(즉, 제1 입체 형태)에 있을 때 표적에 대한 제1 수준의 결합 및 억제되지 않고, 마스킹되지 않고/않거나 절단된 상태(즉, 제2 입체 형태)의 표적에 대한 제2 수준의 결합을 나타내며, 제2 수준의 표적 결합이 제1 수준의 결합을 초과하는 의미이다. 일반적으로, 활성화 가능한 항체의 AB에 대한 표적의 접근은 이러한 절단체가 부재

한 경우보다 CM을 절단할 수 있는 절단제, 즉 프로테아제의 존재 하에서 더 크다. 따라서, 활성화 가능한 항체가 비절단 상태에 있을 때, AB는 표적 결합으로부터 억제되고 표적 결합으로부터 마스킹될 수 있으며(즉, 제1 입체 형태는 AB가 표적에 결합할 수 없도록 한다), 그리고 절단된 상태에서, AB는 억제되지 않거나 표적 결합에 마스킹되지 않는다.

[0251] 활성화 가능한 항체의 CM 및 AB는 AB가 주어진 표적에 대한 결합 모이어티를 나타내고, CM은 프로테아제에 대한 기질을 나타내도록 선택된다. 일부 실시형태에서, 프로테아제는 대상체의 치료 부위 또는 진단 부위에서 표적과 공-국소화된다. 본원에 사용된, 공-국소화된 것은 같은 사이트에 있거나 상대적으로 가까이 있는 것을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 프로테아제는 CM을 절단하여 절단 부위 근처에 위치한 표적에 결합하는 활성화된 항체를 생성한다. 본원에 개시된 활성화 가능한 항체는, 예를 들어, CM에서 부위를 절단할 수 있는 프로테아제, 즉, 프로테아제가 비-치료 부위(예를 들어, 건강한 조직에서)의 조직에서 보다 치료 부위 또는 진단 부위의 표적-함유 조직에서 상대적으로 더 높은 수준으로 존재하는 특정 용도를 찾는다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 CM은 또한 하나 이상의 다른 프로테아제에 의해 절단된다. 일부 실시형태에서, 표적과 공-국소화되고 생체 내에서 CM의 절단을 담당하는 것은 하나 이상의 다른 프로테아제이다.

[0252] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 AB가 마스킹되지 않거나 그렇지 않으면 표적에 대한 결합으로 억제되지 않은 경우, 비-치료 부위에서 AB의 결합으로 인한 독성 및/또는 부작용을 감소시킨다.

[0253] 일반적으로, 활성화 가능한 항체는 관심 AB를 선택하고 활성화 가능한 항체의 나머지를 구성함으로써 구조적으로 제한될 때 MM이 AB의 마스킹 또는 AB의 그의 표적에 대한 결합의 감소를 제공하도록 설계될 수 있다. 이 기능적 특징을 제공하기 위해 구조적 설계 기준이 고려될 수 있다.

[0254] 억제된 대 억제되지 않은 입체구조로 표적 결합을 위한 바람직한 동적 범위의 전환 가능한 표현형을 나타내는 활성화 가능한 항체가 제공된다. 동적 범위는 일반적으로 (a) 제1 조건 세트 하에서 매개변수의 최대 검출 레벨 대 (b) 제2 조건 세트하에서 그 매개변수의 최소 검출 값의 비율을 지칭한다. 예를 들어, 활성화 가능한 항체의 맥락에서, 동적 범위는 (a) 활성화 가능한 항체의 CM을 절단할 수 있는 적어도 하나의 프로테아제의 존재 하에서 활성화 가능한 항체에 대한 표적 단백질 결합의 최대 검출 수준의 대 (b) 프로테아제의 부재 하에 활성화 가능한 항체에 결합하는 표적 단백질의 최소 검출 수준의 비율을 지칭한다. 활성화 가능한 항체의 동적 범위는 활성화 가능한 항체 절단 제 처리의 해리 상수에 대한 활성화 가능한 항체 절단제(예를 들어, 효소) 처리의 해리 상수의 비율로서 계산될 수 있다. 활성화 가능한 항체의 동적 범위가 클수록 활성화 가능한 항체의 전환 가능한 표현형이 더 우수하다. 비교적 더 높은 동적 범위 값(예를 들어, 1 초과)을 갖는 활성화 가능한 항체는 활성화 가능한 항체에 의한 표적 단백질 결합이 절단제의 부재 하 보다 활성화 가능한 항체의 CM을 절단할 수 있는 절단제(예를 들어, 효소)의 존재 하에 더 높은 정도로 발생(예를 들어, 대부분 발생)하도록 더 바람직한 전환 표현형을 보인다.

[0255] 활성화 가능한 항체는 다양한 구조적 형태로 제공될 수 있다. 활성화 가능한 항체에 대한 예시적인 공식이 아래에 제공된다. AB, MM 및 CM의 N- 말단 C-말단 순서는 활성화 가능한 항체 내에서 역전될 수 있는 것으로 구체적으로 고려된다. CM 및 MM은 예를 들어, CM이 MM 내에 포함되도록 아미노산 서열에서 중첩될 수 있음이 또한 구체적으로 고려된다.

[0256] 예를 들어, 활성화 가능한 항체는 (아미노(N) 말단 영역에서 카르복실(C) 말단 영역까지 순서대로 하기 화학식으로 나타낼 수 있다:

[0257] (MM)-(CM)-(AB)

[0258] (AB)-(CM)-(MM)

[0259] , 상기 식에서 MM은 마스킹 모이어티이고, CM은 절단성 모이어티이며, AB는 항체 또는 이의 단편이다. MM 및 CM은 상기 식에서 별개의 성분으로 표시되어 있지만, 본원에 개시된 (화학식을 포함하여) 모든 예시적인 실시형태에서, MM 및 CM의 아미노산 서열은 예를 들어, CM이 MM 내에 완전히 또는 부분적으로 포함되도록 중첩될 수 있는 것으로 고려된다는 것에 주목해야 한다. 또한, 상기 화학식은 활성화 가능한 항체 요소에 N-말단 또는 C-말단에 위치될 수 있는 추가 아미노산 서열을 제공한다.

[0260] 특정 실시형태에서, MM은 AB의 천연 결합 파트너가 아니다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 상동성이 없거나 실질적으로 없다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 80% 이하로 유사하다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%,

65%, 70%, 75%, 또는 80% 이하로 동일하다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 이하로 동일하다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 25% 이하로 동일하다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 20% 이하로 동일하다. 일부 실시형태에서, MM은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 10% 이하로 동일하다.

[0261] 많은 실시형태에서, MM-CM 접합, CM-AB 접합, 또는 양쪽 모두의 하나 이상에서 유연성을 제공하도록 하나 이상의 링커, 예를 들어, 유연성 링커를 활성화 가능한 항체 컨스트럭트에 삽입하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, AB, MM 및/또는 CM은 원하는 유연성을 제공하기에 충분한 수의 잔기(예를 들어, Gly, Ser, Asp, Asn, 특히 Gly 및 Ser, 특히 Gly)를 함유하지 않을 수 있다. 이와 같이, 그러한 활성화 가능한 항체 컨스트럭트의 전환 가능한 표현형은 유연성 링커를 제공하기 위해 하나 이상의 아미노산의 도입으로부터 유리할 수 있다. 또한, 다음에 기재된 바와 같이, 활성화 가능한 항체가 입체 형태적으로 구속된 컨스트럭트로서 제공되는 경우, 유연성 링커는 작동 가능하게 삽입되어 비절단 활성화 가능한 항체에서 사이클릭 구조의 형성 및 유지를 용이하게 할 수 있다.

[0262] 예를 들어, 특정 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 하기 화학식 중 하나를 포함한다(하기 화학식은 N- 내지 C- 말단 방향 또는 C- 내지 N-말단 방향 중 어느 하나로 아미노산 서열을 나타냄):

[0263] (MM)-LP1-(CM)-(AB)

[0264] (MM)-(CM)-LP2-(AB)

[0265] (MM)-LP1-(CM)-LP2-(AB)

[0266] , 상기 식에서 MM, CM, 및 AB는 상기 정의된 바와 같고; 상기 식에서 LP1 및 LP2는 각각 독립적으로 그리고 선택적으로 존재하거나 부재하며, 적어도 하나의 유연성 아미노산(예를 들어, Gly)을 포함하는 동일하거나 상이한 유연성 링커이다. 또한, 상기 화학식은 활성화 가능한 항체 요소에 N-말단 또는 C-말단에 위치될 수 있는 추가 아미노산 서열을 제공한다. 이의 예는 표적화 모이어티(예를 들어, 표적 조직에 존재하는 세포의 수용체에 대한 리간드) 및 혈청 반감기 연장 모이어티(예를 들어, 면역글로불린(예를 들어, IgG) 또는 혈청 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민(HAS))과 같은 혈청 단백질과 결합하는 폴리펩티드)를 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다.

[0267] CM은 구체적으로 약 0.001 내지 $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 또는 적어도 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, 또는 $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 의 속도로 적어도 하나의 프로테아제에 의해 절단된다. 일부 실시형태에서, CM은 구체적으로 약 100,000 $\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 의 속도로 절단된다. 일부 실시형태에서, CM은 구체적으로 약 1×10^2 내지 약 $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ (즉, 약 1×10^2 내지 약 $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)의 속도로 절단된다.

[0268] 효소에 의한 특이적 절단을 위해, 효소와 CM 사이의 접촉이 이루어진다. MM 및 CM에 커플링된 AB를 포함하는 활성화 가능한 항체가 표적 및 충분한 효소 활성의 존재 하에 있을 때, CM은 절단될 수 있다. 충분한 효소 활성은 효소가 CM과 접촉하여 절단을 수행하는 능력을 지칭할 수 있다. 효소가 CM 근처에 있을 수 있지만 다른 세포 인자 또는 효소의 단백질 변형으로 인해 절단될 수 없음을 용이하게 구상할 수 있다.

[0269] 본원에 기재된 조성물에 사용하기에 적합한 링커는 일반적으로 변형된 AB 또는 활성화 가능한 항체의 유연성을 제공하여 AB의 표적에 대한 결합의 억제를 용이하게 하는 것들이다. 그러한 링커는 일반적으로 유연성 링커로 지칭된다. 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있으며, 1 아미노산(예를 들어, Gly) 내지 20 아미노산, 2 아미노산 내지 15 아미노산, 4 아미노산 내지 10 아미노산을 포함하는 3 아미노산 내지 12 아미노산, 5 아미노산 내지 9 아미노산, 6 아미노산 내지 8 아미노산, 또는 7 아미노산 내지 8 아미노산과 같은 적당한 상이한 길이 중 어느 하나일 수 있으며, 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 아미노산일 수 있다.

[0270] 예시적인 유연성 링커는 글리신 중합체($(G)_n$), 글리신-세린 중합체(예를 들어, $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$ (서열 번호: 24) 및 $(GGGS)_n$ (서열 번호: 25) 포함, 상기 식에서 n은 적어도 하나의 정수임), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 및 당 업계에 공지된 다른 유연성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 비교적 비구조적이므로, 성분들 사이의 중성 테더(tether)로서 작용할 수 있다. 글리신은 심지어 알라닌보다 훨씬 더 많은 phi-psi 공간에 접근하며, 더 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한적이다(Scheraga, Rev. Computational Chem.

11173-142 (1992) 참조). 예시적인 유연성 링커는 Gly-Gly-Ser-Gly(서열 번호: 26), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(서열 번호: 27), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(서열 번호: 28), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(서열 번호: 29), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(서열 번호: 30), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(서열 번호: 31) 등을 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다. 당업자는 링커가 유연성 링커뿐만 아니라 원하는 활성화 가능한 항체를 제공하기 위해 덜 유연한 구조를 부여하는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있도록, 활성화 가능한 항체의 설계가 전부 또는 부분적으로 유연한 링커를 포함할 수 있음을 인식할 것이다.

[0271] 본 개시내용은 또한 CD71에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편(AB)을 포함하는 활성화 가능한 항-CD71 항체를 포함하는 조성물 및 방법을 제공하며, 상기 식에서 Ab는 AB의 그 표적에 결합하는 능력을 감소시키는 마스킹 모이어티(MM)에 결합된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항-CD71 항체는 프로테아제에 대한 기질인 절단성 모이어티(CM)를 더 포함한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법은 활성화 가능한 항-CD71 항체의 활성(예를 들어, 마스킹, 활성화 또는 결합 활성)을 손상시키지 않으면서 AB에서 하나 이상의 시스테인 잔기에 하나 이상의 작용제의 부착을 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법은 MM 내의 하나 이상의 이황화 결합을 감소시키거나 그렇지 않으면 방해하지 않으면서 AB에서 하나 이상의 시스테인 잔기에 하나 이상의 작용제의 부착을 가능하게 한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법은 하나 이상의 작용제, 예를 들어, 임의의 다양한 치료제, 진단제 및/또는 예방제, 예를 들어, 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항-CD71 항체의 MM에 접합되는 임의의 작용제(들) 없이, 하나 이상의 작용제에 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 생성한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법은 MM은 비절단 상태에서 활성화 가능한 항체의 AB를 효과적으로 그리고 효율적으로 마스킹하는 능력을 보유하는, 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 생성한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법은 CM을 절단할 수 있는 프로테아제의 존재 하에서 활성화 가능한 항체가 여전히 활성화되는, 즉, 절단되는 접합된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 생성한다.

[0272] 활성화 가능한 항-CD71 항체는 작용제에 대한 적어도 하나의 접합점을 갖지만, 본원에 제공된 방법 및 조성물에서 모든 가능한 접합점 미만이 작용제에 대한 접합에 이용 가능하다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 접합점은 이황화 결합에 관여하는 황 원자이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 접합점은 쇠간(interchain) 이황화 결합에 관여하는 황 원자이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 접합점은 쇠간 황화 결합에 관여하는 황 원자이지만, 쇠내(intrachain) 이황화 결합에 관여하는 황 원자는 아니다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 접합점은 시스테인의 황 원자이거나 또는 황 원자를 함유하는 다른 아미노산 잔기이다. 이러한 잔기는 항체 구조에서 자연적으로 발생할 수 있거나, 부위 지향적 돌연변이 유발, 화학적 전환 또는 비 천연 아미노산의 잘못된 혼입에 의해 항체에 도입될 수 있다.

[0273] 또한, AB에서 하나 이상의 쇠간 이황화 결합 및 MM에서 하나 이상의 쇠내 이황화 결합을 갖는 활성화 가능한 항-CD71 항체의 접합체를 제조하는 방법이 제공되며, 유리 티올과 반응성인 약물이 제공된다. 상기 방법은 일반적으로 활성화 가능한 항체에서 쇠간 이황화 결합을 예를 들어, TCEP와 같은 환원제로 부분적으로 환원하는 단계; 및 자유 티올과 반응성인 약물을 부분적으로 환원된 활성화 가능한 항체에 접합시키는 단계를 포함한다. 본원에 사용된, 용어 부분 환원은 활성화 가능한 항-CD71 항체가 환원제와 접촉되고 모든 이황화 결합 미만, 예를 들어 모든 가능한 접합 부위 미만이 환원되는 상황을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 모든 가능한 접합 부위의 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% 미만 또는 5% 미만이 환원된다.

[0274] 또 다른 실시형태에서, 작용제, 예를 들어, 약물을 환원시키고 활성화 가능한 항-CD71 항체에 접합시켜 작용제의 배치(placement)에서 선택성을 제공하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 일반적으로 활성화 가능한 항체의 마스킹 모이어티 또는 다른 비-AB 부분에서 임의의 접합 부위가 환원되지 않도록 환원제로 활성화 가능한 항-CD71 항체를 부분적으로 환원시키는 단계, 및 AB에서 쇠간 티올에 작용제를 접합시키는 단계를 포함한다. 접합 부위(들)는 접합이 원하는 사이트에서 발생하도록 작용제의 원하는 배치를 허용하도록 선택된다. 환원제는, 예를 들어, TCEP이다. 예를 들어, 환원제 대 활성화 가능한 항체의 비율, 배양의 길이, 배양 동안의 온도, 환원 반응 용액의 pH 등과 같은 환원 반응 조건은 MM이 비절단 상태에서 활성화 가능한 항체의 AB를 효과적으로 그리고 효율적으로 마스킹하는 능력을 보유하는 접합된 활성화 가능한 항체를 식별함으로써 결정된다. 환원제 대 활성화 가능한 항-CD71 항체의 비율은 활성화 가능한 항체에 따라 달라질 것이다. 일부 실시형태에서, 환원제 대 활성화 가능한 항-CD71 항체의 비율은 약 20:1 내지 1:1, 약 10:1 내지 1:1, 약 9:1 내지 1:1, 약 8:1 내지 1:1, 약 7:1 내지 1:1, 약 6:1 내지 1:1, 약 5:1 내지 1:1, 약 4:1 내지 1:1, 약 3:1 내지 1:1, 약 2:1 내지 1:1, 약 20:1 내지 1:1.5, 약 10:1 내지 1:1.5, 약 9:1 내지 1:1.5, 약 8:1 내지 1:1.5, 약 7:1 내지 1:1.5, 약 6:1 내지 1:1.5, 약 5:1 내지 1:1.5, 약 4:1 내지 1:1.5, 약 3:1 내지 1:1.5, 약 2:1 내지 1:1.5, 약 1.5:1 내지

1:1.5, 또는 약 1:1 to 1:1.5의 범위일 것이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 5:1 내지 1:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 5:1 내지 1.5:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 4:1 내지 1:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 4:1 내지 1.5:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 8:1 내지 약 1:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 2.5:1 내지 1:1의 범위이다.

[0275] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항-CD71 항체의 Ab에서 쇠간 이황화 결합을 환원하고 작용제, 예를 들어, 약 물과 같은 티올-함유 작용제를 얻어진 쇠간 티올에 접합시켜 AB 상에서 작용제(들)를 선택적으로 위치시키는 방법이 제공된다. 상기 방법은 일반적으로 AB를 환원제로 부분적으로 환원하여 활성화 가능한 항체에서 모든 가능한 쇠간 티올을 형성하지 않고 적어도 2 개의 쇠간 티올을 형성하는 단계; 및 부분적으로 환원된 AB의 쇠간 티올에 작용제를 접합시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 활성화 가능한 항체의 AB는 환원제:활성화 가능한 항체의 원하는 비율로 약 37°C에서 약 1시간 동안 부분적으로 환원된다. 일부 실시형태에서, 작용제 대 활성화 가능한 항체의 비율은 약 20:1 내지 1:1, 약 10:1 내지 1:1, 약 9:1 내지 1:1, 약 8:1 내지 1:1, 약 7:1 내지 1:1, 약 6:1 내지 1:1, 약 5:1 내지 1:1, 약 4:1 내지 1:1, 약 3:1 내지 1:1, 약 2:1 내지 1:1, 약 20:1 내지 1:1.5, 약 10:1 내지 1:1.5, 약 9:1 내지 1:1.5, 약 8:1 내지 1:1.5, 약 7:1 내지 1:1.5, 약 6:1 내지 1:1.5, 약 5:1 내지 1:1.5, 약 4:1 내지 1:1.5, 약 3:1 내지 1:1.5, 약 2:1 내지 1:1.5, 약 1.5:1 내지 1:1.5, or 약 1:1 내지 1:1.5의 범위일 것이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 5:1 내지 1:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 5:1 내지 1.5:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 4:1 내지 1:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 4:1 내지 1.5:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 8:1 내지 약 1:1의 범위이다. 일부 실시형태에서, 비율은 약 2.5:1 내지 1:1의 범위이다.

[0276] 티올-함유 시약은 예를 들어, 시스테인 또는 N-아세틸 시스테인일 수 있다. 환원제는 예를 들어, TCEP일 수 있다. 일부 실시형태에서, 환원된 활성화 가능한 항체는 예를 들어, 칼럼 크로마토그래피, 투석 또는 투석 여과를 사용하여 접합 전에 정제될 수 있다. 대안적으로, 환원된 항체는 부분 환원 후 및 접합 전에 정제되지 않는다.

[0277] 본 발명은 또한 활성화 가능한 항체는 항체 또는 CD71에 특이적으로 결합하는 이의 항원 결합 단편(AB), 비절단 상태에서 활성화 가능한 항체의 AB가 CD71 표적에 결합하는 것을 억제하는 마스킹 모이어티(MM), 및 AB에 커플링된 절단성 모이어티(CM)를 포함하며, CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드인, 활성화 가능한 항체에서 쇠내 이황화 결합을 방해하지 않으면서 활성화 가능한 항체에서 적어도 하나의 쇠간 이황화 결합이 환원제로 환원된 부분적으로 환원된 활성화 가능한 항-CD71 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, MM은 CM을 통해 AB에 커플링된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 하나 이상의 쇠내 이황화 결합(들)은 환원제에 의해 방해받지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체 내의 MM의 하나 이상의 쇠내 이황화 결합(들)은 환원제에 의해 방해받지 않는다. 일부 실시형태에서, 비절단 상태에서 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM. 일부 실시형태에서, 환원제는 TCEP이다.

[0278] 또 다른 실시형태에서, 작용제, 예를 들어, 약물을 환원시키고 활성화 가능한 항-CD71 항체에 접합시켜 활성화 가능한 항체 항-CD71에 정의된 수 및 위치의 리신 및/또는 시스테인 잔기를 제공함으로써 작용제의 배치에서 선택성을 제공하게 된다. 일부 실시형태에서, 리신 및/또는 시스테인 잔기의 정의된 수는 모 항체 또는 활성화 가능한 항체의 아미노산 서열에서 상응하는 잔기의 수보다 높거나 낮다. 일부 실시형태에서, 정의된 수의 리신 및/또는 시스테인 잔기는 항-CD71 항체 또는 활성화 가능한 항-CD71 항체에 접합될 수 있는 정의된 수의 작용제 등가물을 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 정의된 수의 리신 및/또는 시스테인 잔기는 부위-특이적 방식으로 항-CD71 항체 또는 활성화 가능한 항-CD71 항체에 접합될 수 있는 정의된 수의 작용제 등가물을 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 활성화 가능한 항체는 부위-특이적 방식으로 하나 이상의 비천연 아미노산으로 변형되므로, 일부 실시형태에서, 작용제의 비천연 아미노산의 부위로의 접합을 제한한다. 일부 실시형태에서, 정의된 수 및 위치의 리신 및/또는 시스테인 잔기를 갖는 항-CD71 항체 또는 활성화 가능한 항-CD71 항체는 활성화 항체의 마스킹 모이어티 또는 다른 비-AB 부분에서 임의의 접합 부위가 환원되도록 본원에 논의된 바와 같은 환원제로 부분적으로 환원될 수 있으며, AB에서 작용제를 쇠간 티올에 접합시킨다.

[0279] 본 개시내용은 또한 활성화 가능한 항체는 항체 또는 표적, 예를 들어, CD71에 특이적으로 결합하는 이의 항원 결합 단편(AB), 비절단 상태에서 활성화 가능한 항체의 AB가 표적에 결합하는 것을 억제하는 마스킹 모이어티(MM), 및 AB에 커플링된 절단성 모이어티(CM)를 포함하며, CM은 적어도 하나의 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드인, 활성화 가능한 항체에서 쇠내 이황화 결합을 방해하지 않으면서 활성화 가능한 항체에서 적어도 하나의 쇠간 이황화 결합이 환원제로 환원된 부분적으로 환원된 활성화 가능한 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, MM은 CM을 통해 AB에 커플링된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체의 하나 이상의 쇠내

이항화 결합(들)은 환원제에 의해 방해받지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체 내의 MM의 하나 이상의쇄내 이항화 결합(들)은 환원제에 의해 방해받지 않는다. 일부 실시형태에서, 비절단 상태에서 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM. 일부 실시형태에서, 환원제는 TCEP이다.

[0280] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 활성화 가능한 항체는 또한 활성화 가능한 항체에 접합된 작용제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 접합제는 항염증제 및/또는 항종양제와 같은 치료제이다. 그러한 실시형태에서, 작용제는 활성화 가능한 항체의 탄수화물 모이어티에 접합되며, 예를 들어, 일부 실시형태에서, 탄수화물 모이어티는 활성화 가능한 항체에서 항체 또는 항원-결합 단편의 항원-결합 영역의 외부에 위치된다. 일부 실시형태에서, 작용제는 활성화 가능한 항체에서 항체 또는 항원-결합 단편의 설프히드릴기에 접합된다.

[0281] 일부 실시형태에서, 작용제는 독소(예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 이의 단편), 또는 방사성 동위원소(즉, 방사성 접합체)와 같은 세포독성제이다.

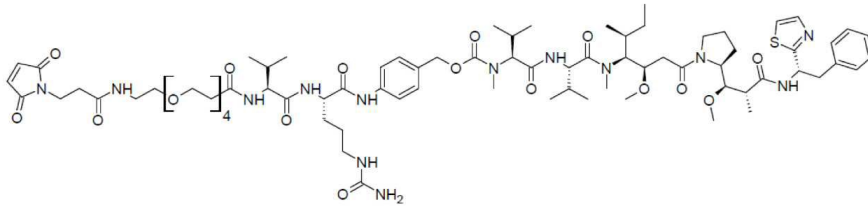
[0282] 일부 실시형태에서, 작용제는 예를 들어, 표지 또는 다른 마커와 같은 검출 가능한 모이어티이다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 모이어티는 진단제이다. 예를 들어, 작용제는 방사성표지된 아미노산, 마킹된 아비딘(예를 들어, 광학 또는 열량 측정법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙타비딘)에 의해 검출될 수 있는 하나 이상의 비오티닐 모이어티, 하나 이상의 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종, 하나 이상의 형광 표지, 하나 이상의 효소 표지, 및/또는 하나 이상의 화학발광제이거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 모이어티는 스페이서 분자에 의해 부착된다.

[0283] 본 개시내용은 또한 독소(예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 이의 단편) 또는 방사성 동위원소(즉, 방사성 접합체)와 같은 세포독성제에 접합된 항체를 포함하는 면역 접합체에 관한 것이다. 적합한 세포독성제는 예를 들어, 돌라스타틴 및 이의 유도체(예를 들어, 아우리스타틴 E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE)를 포함한다. 예를 들어, 작용제는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE) 또는 모노메틸 아우리스타틴 D(MMAD)이다. 일부 실시형태에서, 작용제는 돌라스타틴이다. 일부 실시형태에서, 작용제는 아우리스타틴 또는 이의 유도체이다. 일부 실시형태에서, 작용제는 아우리스타틴 E 또는 이의 유도체이다. 일부 실시형태에서, 작용제는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이다. 일부 실시형태에서, 작용제는 모노메틸 아우리스타틴 D(MMAD)이다. 일부 실시형태에서, 작용제는 메이탄시노이드 또는 메이탄시노이드 유도체이다.

[0284] 일부 실시형태에서, AB에 접합된 링커 및 독소는 SPDB-DM4 모이어티, vc-MMAD 모이어티, vc-MMAE 모이어티, vc-듀오카마이신, 또는 PEG2-vc-MMAD 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 절단성 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 비-절단성 링커이다. 일부 실시형태에서, 작용제는 검출 가능한 모이어티이다.

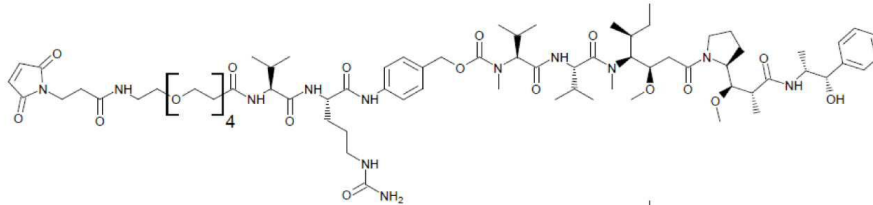
[0285] 일부 실시형태에서, 작용제는 말레이미드 카프로일-발린-시트룰린 링커 또는 말레이미드 PEG- 발린-시트룰린 링커를 사용하여 AB에 연결된다. 일부 실시형태에서, 작용제는 말레이미드 카프로일-발린-시트룰린 링커를 사용하여 AB에 연결된다. 일부 실시형태에서, 작용제는 말레이미드 카프로일-발린-시트룰린 링커를 사용하여 AB에 연결된 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이고, 이 링커 페이로드(payload) 컨스트럭트는 본원에서 "vc-MMAE"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 작용제는 말레이미드 PEG-발린-시트룰린 링커를 사용하여 AB에 연결된다. 일부 실시형태에서, 작용제는 말레이미드 테트라-PEG-발린-시트룰린-파라-아미노벤질옥시카르보닐 링커를 사용하여 AB에 연결된 모노메틸 아우리스타틴 D(MMAD)이고, 이 링커 페이로드 컨스트럭트는 본원에서 "PEG4-vc-MMAD"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 작용제는 말레이미드 테트라-PEG-발린-시트룰린-파라-아미노벤질옥시카르보닐 링커를 사용하여 AB에 연결된 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이고, 이 링커 페이로드 컨스트럭트는 본원에서 "PEG4-vc-MMAE"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 작용제는 말레이미드 PEG-발린-시트룰린 링커를 사용하여 AE에 연결된다. 일부 실시형태에서, 작용제는 말레이미드 bis-PEG-발린-시트룰린-파라-아미노벤질옥시카르보닐 링커를 사용하여 AB에 연결된 모노메틸 아우리스타틴 D이고, 이 링커 페이로드 컨스트럭트는 본원에서 "PEG2-vc-MMAD"로 지칭된다. PEG4-vc-MMAD, PEG4-vc-MMAE, PEG2-vc-MMAD, 및 vc-MMAE의 구조는 아래에 나타내어 있다:

[0286] PEG4-vc-MMAD:



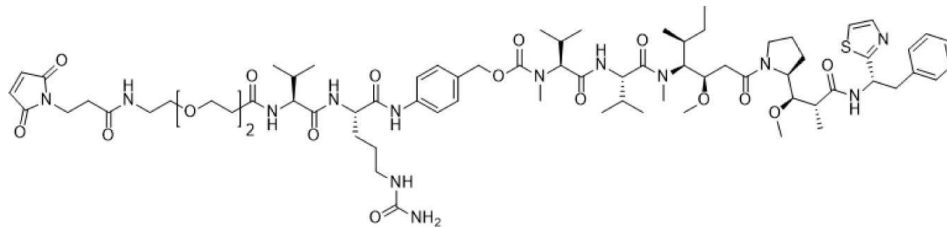
[0287]

[0288] PEG4-vc-MMAE:



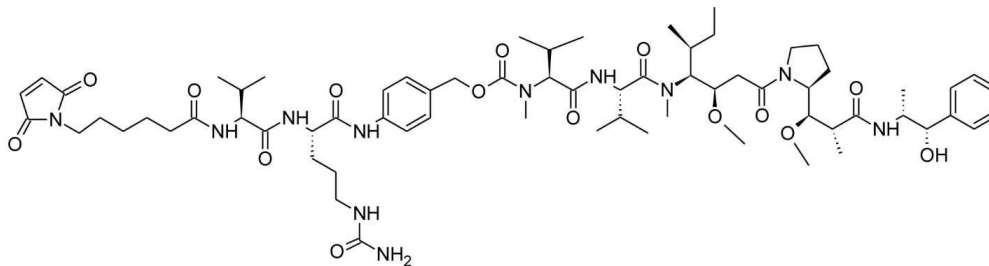
[0289]

[0290] PEG2-vc-MMAD:



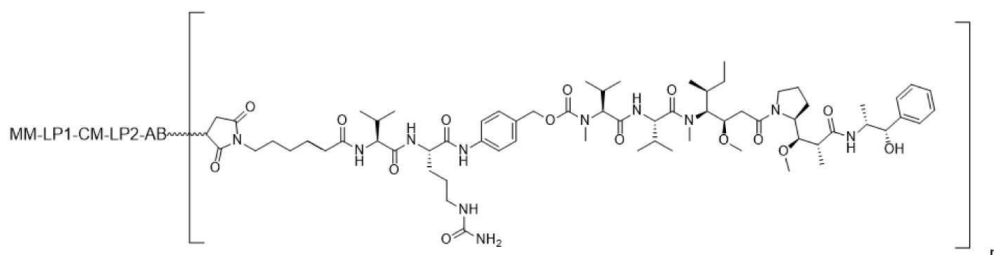
[0291]

[0292] vc-MMAE



[0293]

[0294] 본 개시내용은 또한 val-cit(vc) 링커를 갖는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)인 vcMMAE에 연결된 활성화 가능한 항체를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체로서, 상기 식에서 활성화 가능한 항체는 표적에 특이적으로 결합하는 항체(AB), 접합된 활성화 가능한 항체가 비결단 상태인 경우 AB의 표적과의 결합을 억제하는 AB에 커플링된 마스킹 모이어티(MM), 및 AB에 커플링된 절단성 모이어티(CM)를 포함하며, CM은 프로테아제에 대한 기질로 기능하는 폴리펩티드인, 접합된 활성화 가능한 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체는 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 가지며,



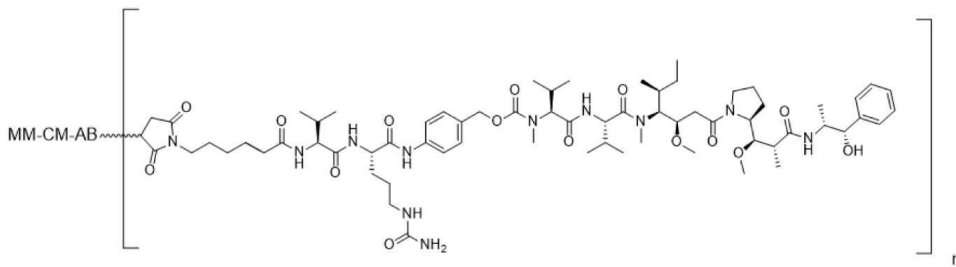
화학식 (I)

상기 식에서 AB는 표

[0295]

적에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역, 중쇄, 및/또는 하나 이상의 중쇄 CDR(CDRH) 영역을 포함하는 항체이다. AB는 또한 경쇄 가변 영역, 경쇄, 및/또는 하나 이상의 경쇄 CDR(CDRL) 영역을 포함한다. 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체는 또한 마스킹 모이어티(MM), 상기 식에서 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우 MM은 AB가 그의 표적에의 결합을 억제함, 제1 연결 모이어티(LP1), 절단성 모이어티(CM), 및 제2 연결 모이어티(LP2)를 포함한다. 화학식 (I)의 특정 일 실시형태에서, "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0296] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체는 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 가지며,



화학식 (II)

[0297] 상기 식에서 AB는 표적에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역, 중쇄, 및/또는 하나 이상의 중쇄 CDR(CDRH) 영역을 포함하는 항체이다. AB는 또한 경쇄 가변 영역, 경쇄, 및/또는 하나 이상의 경쇄 CDR(CDRL) 영역을 포함한다. 화학식 (I)의 접합된 활성화 가능한 항체는 또한 마스킹 모이어티(MM), 상기 식에서 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우 MM은 AB가 그의 표적에의 결합을 억제함, 및 절단성 모이어티(CM)을 포함한다. 화학식 (II)의 특정 일 실시형태에서, "n"은 2이다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 IgG1 동형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체, 상기 식에서 중쇄 및/또는 경쇄 상의 N-말단 글루타메이트는 선택적으로 피로글루타메이트이거나 피로글루타메이트로 번역 후 개질된다.

[0298] 화학식 (I) 또는 (II)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, 표적은 포유류 CD71이다. 화학식 (I) 또는 (II)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, 표적은 인간 CD71이다.

[0299] 화학식 (I) 또는 (II)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열 번호: 11을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호: 12 또는 서열 번호:13을 포함하는 CDRL1 서열, 서열 번호: 14를 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열 번호: 15를 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 MM, 및 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 CM을 포함하며, "n"은 2이다. 화학식 (I)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열 번호: 11를 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호: 12 또는 서열 번호:13를 포함하는 CDRL1 서열, 서열 번호: 14를 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열 번호: 15를 포함하는 a CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 MM, 서열 번호: 207의 아미노산 서열을 포함하는 LP1, 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 CM, 및 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 LP2를 포함하며, "n"은 2이다.

[0300] 화학식 (I) 또는 (II)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 MM, 및 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 CM을 포함하며, "n"은 2이다. 화학식 (I)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 MM, 서열

번호: 207의 아미노산 서열을 포함하는 LP1, 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 CM, 및 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 LP2를 포함하며, "n"은 2이다.

[0301] 화학식 (I) 또는 (II)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 19의 서열을 포함하는 경쇄, 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 MM, 및 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 CM을 포함하며, "n"은 2이다. 화학식 (I)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 167을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 19의 서열을 포함하는 경쇄, 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 MM, 서열 번호: 207의 아미노산 서열을 포함하는 LP1, 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 CM, 및 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 LP2를 포함하며, "n"은 2이다.

[0302] 화학식 (I) 또는 (II)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 169의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며, "n"은 2이다. 화학식 (I)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 169의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며, "n"은 2이다. 화학식 (I) 또는 (II)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 201의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하며, "n"은 2이다.

[0303] 화학식 (I) 또는 (II)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 화학식 (I) 또는 (II)의 본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 일부 실시형태에서, AB는 서열 번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0304] 본 개시내용은 또한 활성화 가능한 항체는 항체 또는 표적에 특이적으로 결합하는 이의 항원 결합 단편(AB), 비절단 상태에서 활성화 가능한 항체의 AB가 표적에 결합하는 것을 억제하는 마스킹 모이어티(MM), 및 AB에 커플링된 절단성 모이어티(CM)를 포함하며, CM은 적어도 하나의 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드인, 모노메틸 아우리스타틴 D(MMAD) 페이로드에 연결된 활성화 가능한 항체를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제공한다.

[0305] 일부 실시형태에서, MMAD-접합된 활성화 가능한 항체는 작용제를 AB에 부착하는 몇몇 방법 중 어느 하나를 사용하여 접합될 수 있다: (a) AB의 탄수화물 모이어티에 부착, 또는 (b) AB의 설프하이드릴기에 부착, 또는 (c) AB의 아미노기에 부착, 또는 (d) AB의 카르복실레이트기에 부착.

[0306] 일부 실시형태에서, MMAD 페이로드는 링커를 통해 AB에 접합된다. 일부 실시형태에서, MMAD 페이로드는 링커를 통해 AB에서 시스템인에 접합된다. 일부 실시형태에서, MMAD 페이로드는 링커를 통해 AB에서 리신에 접합된다. 일부 실시형태에서, MMAD 페이로드는 본원에 개시된 그러한 잔기와 같이, 링커를 통해 AB의 다른 잔기에 접합된다. 일부 실시형태에서, 링커는 티올-함유 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 절단성 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 비-절단성 링커이다. 일부 실시형태에서, 링커는 표 (II) 및 (III)에 나타난 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체 및 MMAD 페이로드는 말레이미드 카프로일-발린-시트룰린 링커를 통해 연결된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체 및 MMAD 페이로드는 말레이미드 PEG-발린-시트룰린 링커를 통해 연결된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체 및 MMAD 페이로드는 말레이미드 카프로일-발린-시트룰린-파라-아미노벤질옥시카르보닐 링커를 통해 연결된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체 및 MMAD 페이로드는 말레이미드 PEG-발린-시트룰린-파라-아미노벤질옥시카르보닐 링커를 통해 연결된다. 일부 실시형태에서, MMAD 페이로드는 본원에 기재된 부분 환원 및 접합 기술을 사용하여 AB에 접합된다.

[0307] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 링커의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 성분은 2개의 에틸렌 글리콜 모노머, 3개의 에틸렌 글리콜 모노머, 4개의 에틸렌 글리콜 모노머, 5개의 에틸렌 글리콜 모노머, 6개의 에틸렌 글리콜 모노머, 7개의 에틸렌 글리콜 모노머, 8개의 에틸렌 글리콜 모노머, 9개의 에틸렌 글리콜 모노머, 또는 적어도 10개의 에틸렌 글리콜 모노머로 형성된다. 본 개시내용의 일부 실시형태에서, PEG 성분은 분지형 중합체이다. 본 개시내용의 일부 실시형태에서, PEG 성분은 비분지형 중합체이다. 일부 실시형태에서, PEG 중합체 성분은 아미노기 또는 이의 유도체, 카르복실기 또는 이의 유도체, 또는 아미노기 또는 이의 유도체 및 카르복실기 또는 이의 유도체로 작용화된다.

[0308] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 링커의 PEG 성분은 아미노-테트라-에틸렌 글리콜-카르복실기 또는 이의 유도

체이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 링커의 PEG 성분은 아미노-트리-에틸렌 글리콜-카르복실기 또는 이의 유도체이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 링커의 PEG 성분은 아미노-디-에틸렌 글리콜-카르복실기 또는 이의 유도체이다. 일부 실시형태에서, 아미노 유도체는 아미노기와 이것이 접합된 카르복실기 사이의 아미드 결합의 형성이다. 일부 실시형태에서, 카르복실 유도체는 카르복실기와 이것이 접합된 아미노기 사이의 아미드 결합의 형성이다. 일부 실시형태에서, 카르복실 유도체는 카르복실기와 이것이 접합된 히드록실기 사이의 에스테르 결합의 형성이다.

[0309] 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 이의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의), 리신(ricin) A 사슬, 아브린(abrin) A 사슬, 모데신(modeccin) A 사슬, 알파-사르신(sarcin), 알루라이트 포티(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*mimordica charantia*) 억제제, 커신(curcin), 크로틴(crotin), 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 젤로닌(gelonin), 미토겔린(mitogellin), 레스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 에노마이신(enomycin) 및 트리코테신(tricothecene)을 포함한다. 방사성 접합 항체의 생산을 위해 다양한 방사성 핵종이 이용 가능하다. 이의 예는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다.

[0310] 항체 및 세포독성제의 접합체는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트(SPDP), 이미노티올레인(IT), (디메틸 아디피메이트(HCL)와 같은) 이미도에스테르의 이관능성 유도체, (디숙신이미딜 수베레이트와 같은) 활성 에스테르, (글루타르알데히드와 같은) 알데히드, (비스-(p-아지도벤조일) 헥산디아민과 같은) 비스-아지도 화합물, (비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민과 같은) 비스-디아조늄 유도체, (톨리엔 2,6-디이소시아네이트와 같은) 디이소시아네이트, 및 (1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠과 같은) 비스-활성 불소 화합물과 같은 다양한 이관능성 단백질-커플링제를 사용하여 제조된다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌[Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트제이다. (W094/11026호 참조).

[0311] 당업자는 다양한 가능한 모이어티가 본 개시내용의 얻어진 항체에 커플링될 수 있음을 인식할 것이다. (예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 인용되어 포함된 문헌["Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989)] 참조).

[0312] 커플링은 항체 및 다른 모이어티가 각각의 활성을 유지하는 한 2개의 분자에 결합하는 임의의 화학 반응에 의해 달성될 수 있다. 이 결합은 많은 화학적 메커니즘, 예를 들어, 공유 결합, 친화성 결합, 삽입(intercalation), 좌표 결합 및 착화를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 그러나, 결합은 공유 결합이다. 공유 결합은 기존 측쇄의 직접 축합 또는 외부 가교 분자의 혼입에 의해 달성될 수 있다. 많은 2가 또는 다가 연결체는 본 개시내용의 항체와 같은 단백질 분자를 다른 분자에 커플링하는데 유용하다. 예를 들어, 대표적인 커플링제는 티오에스테르, 카보디이미드, 석신이미드 에스테르, 디이소시아네이트, 글루타르알데히드, 디아조벤젠 및 헥사메틸렌 디아민과 같은 유기 화합물을 포함할 수 있다. 이 목록은 당업계에 공지된 다양한 부류의 커플링제를 전부 사용하려는 것이 아니라, 오히려 더 일반적인 커플링제의 예이다. (문헌[Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984)]; 문헌[Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982)]; 및 문헌[Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)] 참조).

[0313] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법 이외에, 접합된 활성화 가능한 항체는 활성화 가능한 항체 서열에 삽입되거나 그렇지 않으면 포함된 변형된 아미노산 서열을 통해 부위-특이적 접합을 위해 변형될 수도 있다. 이들 변형된 아미노산 서열은 접합된 활성화 가능한 항체 내에서 접합된 작용제의 제어된 배치 및/또는 투여를 허용하도록 설계된다. 예를 들어, 활성화 가능한 항체는 반응성 티올기를 제공하고 단백질 폴딩 및 조립에 부정적인 영향을 미치지 않거나 항원 결합을 변경시키지 않는 경쇄 및 중쇄상의 위치에 시스테인 치환을 포함하도록 조작될 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 활성화 가능한 항체 내에 하나 이상의 비천연 아미노산 잔기를 포함하거나 그렇지 않으면 도입하여 접합에 적합한 부위를 제공하도록 조작될 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 활성화 가능한 항체 서열 내에 효소적으로 활성화 가능한 펩티드 서열을 포함하거나 그렇지 않으면 도입하도록 조작될 수 있다.

[0314] 적합한 링커는 문헌에 기재되어 있다. (예를 들어, MBS(M-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르)의 사용을 기재하고 있는 문헌[Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984)] 참조). 또한, 올리고펩티드 링커를 통해 항체에 커플링된 할로젠화 아세틸 히드라지드 유도체의 사용을 기재하고 있는 미국 특허 제

5,030,719호 참조. 일부 실시형태에서, 적합한 링커는: EDC에 접합된 (i) EDC(1-에틸-3-(3-디메틸아미노-프로필) 카보디이미드 히드로클로라이드; (ii) SMPT (4-숙신이미딜옥시카르보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티올)-톨루엔(Pierce Chem. 사, Cat. (21558G); (iii) SPDP (숙신이미딜-6 [3-(2-피리딜디티올) 프로피온아미도]헥사노에이트(Pierce Chem. 사, Cat #21651G); (iv) 설포-LC-SPDP (설포숙신이미딜 6 [3-(2-피리딜디티오)-프로피아나미드] 헥사노에이트(Pierce Chem. 사, Cat. #2165-G); 및 (v) 설포-NHS (N-히드록시설포-숙신이미드: Pierce Chem. 사, Cat. #24510)를 포함한다. 추가적인 링커는 SMCC((숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트), 설포-SMCC(설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트), SPDB(N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오) 부타노에이트), 또는 설포-SPDB (N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)-2-설포 부타노에이트)를 포함하지만, 여기에 한정되지 않는다.

[0315] 상기 기재된 링커는 상이한 속성을 갖는 성분을 함유하므로, 상이한 물리-화학적 성질을 갖는 접합체를 생성하게 된다. 예를 들어, 알킬 카르복실레이트의 설포-NHS 에스테르는 방향족 카르복실레이트의 설포-NHS 에스테르보다 더 안정하다. NHS-에스테르 함유 링커는 설포-NHS 에스테르보다 가용성이 낮다. 또한, 링커 SMPT는 입체 장애 이황화 결합을 함유하고, 안정성이 증가된 접합체를 형성할 수 있다. 이황화 결합은 시험 관내에서 절단되어 접합체가 덜 이용되기 때문에 일반적으로 다른 결합보다 덜 안정적이다. 특히, 설포-NHS는 카보디이미드 커플링의 안정성을 향상시킬 수 있다. 설포-NHS와 함께 사용될 때 (EDC와 같은) 카보디이미드 커플링은 카보디이미드 커플링 반응 단독보다 가수 분해에 더 저항하는 에스테르를 형성한다.

[0316] 일부 실시형태에서, 링커는 절단성이다. 일부 실시형태에서, 링커는 비-절단성이다. 일부 실시형태에서, 둘 이상의 링커가 존재한다. 둘 이상의 링커는 모두 동일하거나, 즉 절단성 또는 비-절단성이거나, 또는 둘 이상의 링커가 상이하며, 즉 적어도 하나는 절단성 및 적어도 하나는 비-절단성이다.

[0317] 본 개시내용은 작용제를 AB에 부착하는 몇몇 방법을 활용한다: (a) AB의 탄수화물 모이어티에 부착, 또는 (b) AB의 설프히드릴기에 부착, 또는 (c) AB의 아미노기에 부착, 또는 (d) AB의 카르복실레이트기에 부착. 본 개시내용에 따르면, AB는 적어도 두개의 반응성기를 갖는 중간체 링커를 통해 작용제에 공유적으로 부착될 수 있으며, 하나는 AB와 반응하고 다른 하나는 작용제와 반응한다. 임의의 상용성 유기 화합물을 포함할 수 있는 링커는 AB (또는 작용제)와의 반응이 AB 반응성 및 선택성에 악영향을 미치지 않도록 선택될 수 있다. 또한, 작용제에 링커를 부착하면 작용제의 활성을 파괴하지 않을 수 있다. 산화된 항체 또는 산화된 항체 단편과의 반응에 적합한 링커는 1차 아민, 2차 아민, 히드라진, 히드라지드, 히드록실아민, 페닐히드라진, 세미카르바지드 및 티오세미카르바지드로 이루어진 군으로부터 선택된 아민을 함유하는 것들을 포함한다. 이러한 반응성 작용기는 링커의 구조의 일부로서 존재할 수 있거나, 이러한 기를 함유하지 않는 링커의 적합한 화학적 변형에 의해 도입될 수 있다.

[0318] 본 개시내용에 따르면, 환원된 AB에 부착하기에 적합한 링커는 환원된 항체 또는 단편의 설프히드릴기와 반응할 수 있는 특정 반응성기를 갖는 것들을 포함한다. 이러한 반응성기는 반응성 할로 알킬기(예를 들어, 할로아세틸기를 포함함), p-머큐리벤조에이트기 및 마이클-타입 부가 반응을 할 수 있는 기(예를 들어, 말레이미드 및 문헌[Mitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101:3097-3110]에 의해 기재된 유형의 기를 포함함)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0319] 본 개시내용에 따르면, 산화도 환원도 되지 않은 Ab에 부착하기에 적합한 링커는 Ab에서 변형되지 않은 리신 잔기에 존재하는 1차 아미노기와 반응할 수 있는 특정 작용기를 갖는 것들을 포함한다. 이러한 반응성기는 NHS 카르복실 또는 카르보닉 에스테르, 설포-NHS 카르복실 또는 탄산 에스테르, 4-니트 페닐 카르복실 또는 카르보닉 에스테르, 펜타플루오로페닐 카르복실 또는 카르보닉 에스테르, 아실 이미다졸, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0320] 본 개시내용에 따르면, 산화도 환원도 되지 않은 Ab에 부착하기에 적합한 링커는 적합한 시약으로 활성화된, Ab에서 아스파르트이트 또는 글루탐이트 잔기에 존재하는 카르복실산기와 반응할 수 있는 특정 작용기를 갖는 것들을 포함한다. 적합한 활성화 시약은 NHS 또는 설포-NHS가 첨가되거나 첨가되지 않은 EDC 및 카르복사미드 형성에 이용되는 다른 탈수제를 포함한다. 이러한 예에서, 적합한 링커에 존재하는 작용기는 1차 및 2차 아민, 히드라진, 히드록실아민 및 히드라지드를 포함할 것이다.

[0321] 링커가 AB에 부착되기 전 또는 후에 링커에 작용제가 부착될 수 있다. 특정 응용에서, 링커에 관련 작용제가 없는 AB-링커 중간체를 먼저 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 용도에 따라, 특정 작용제가 이어서 링커에 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, AB는 먼저 MM, CM 및 관련 링커에 부착된 후 접합 목적으로 링커에 부착된다.

- [0322] 분지형 링커: 특정 실시형태에서, 작용제의 부착을 위한 다수의 부위를 갖는 분지형 링커가 활용된다. 다수의 사이트 링커의 경우, AB에 대한 단일 공유 부착은 다수의 부위에서 작용제를 결합할 수 있는 AB-링커 중간체를 생성할 것이다. 부위는 알데히드 또는 설프히드릴기 또는 작용제가 부착될 수 있는 임의의 화학적 부위일 수 있다.
- [0323] 일부 실시형태에서, AB상의 복수의 부위에서 단일 사이트 링커의 부착에 의해 보다 높은 특정 활성 (또는 더 높은 작용제 대 AB의 비율)이 달성될 수 있다. 이 복수의 부위는 두 가지 방법 중 하나에 의해 AB에 도입될 수 있다. 첫째, 동일한 AB에서 다수의 알데히드기 및/또는 설프히드릴기를 생성할 수 있다. 둘째, AB의 알데히드 또는 설프히드릴에 후속하는 링커에의 부착을 위한 다수의 기능성 부위를 갖는 "분지형 링커"를 부착시킬 수 있다. 분지형 링커 또는 다수의 사이트 링커의 기능성 부위는 알데히드 또는 설프히드릴기일 수 있거나, 또는 링커가 부착될 수 있는 임의의 화학적 부위일 수 있다. 이 두 가지 접근 방식을 결합하여, 즉, AB 상의 여러 부위에 다수의 사이트 링커를 부착하여 더 높은 특정 활성을 얻을 수 있다.
- [0324] 절단성 링커: u-플라스미노겐 활성화제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 트립신, 플라스민 또는 단백질 분해 활성을 갖는 다른 효소와 같지만, 여기에 한정되지 않는 보체 시스템의 효소에 의해 절단되기 쉬운 펩티드 링커가 본 개시내용의 한 실시형태에서 사용될 수 있다. 본 개시내용의 한 방법에 따르면, 작용제는 보체에 의해 절단되기 쉬운 링커를 통해 부착된다. 항체는 보체를 활성화시킬 수 있는 부류로부터 선택된다. 따라서, 항체-작용제 접합체는 보체 캐스케이드(cascade)를 활성화시키고 표적 부위에서 작용제를 방출한다. 본 개시내용의 다른 방법에 따르면, 작용제는 u-플라스미노겐 활성화제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 플라스민 또는 트립신과 같은 단백질 분해 활성을 갖는 효소에 의해 절단되기 쉬운 링커를 통해 부착된다.
- [0325] 절단 가능한 링커 서열의 비한정적 예는 표 1(II)에 제공된다.

표 (II): 접합을 위한 예시적인 링커 서열

절단성 서열의 유형	아미노산 서열
<u>플라스민 절단성 서열</u> 프로-우로키나아제	PRFKIIGG(서열 번호: 110) PRFRIIGG(서열 번호: 111)
TGFβ 플라스미노겐 스타필로키나제	SSRHRRALD(서열 번호: 112) RKSSIIIRMRDVVL(서열 번호: 113) SSSFDKGGYKKGDDA(서열 번호: 114) SSSFDKGGYKRGDDA(서열 번호: 115)
<u>인자 Xa 절단성 서열</u>	IEGR(서열 번호: 116) IDGR(서열 번호: 117) GGSIDGR(서열 번호: 118)
<u>MMP 절단성 서열</u> 젤라티나제 A	PLGLWA(서열 번호: 119)
<u>콜라게나제 절단성 서열</u> 송아지 피부 콜라겐(α1(I) 사슬) 송아지 피부 콜라겐(α2(I) 사슬) 소 연골 콜라겐(α1(II) 사슬) 인간 간 콜라겐(α1(III) 사슬) 인간 α ₂ M 인간 PZP	GPQGIAGQ(서열 번호: 120) GPQGLLGA(서열 번호: 121) GIAGQ(서열 번호: 122) GPLGIAGI(서열 번호: 123) GPEGLRVG(서열 번호: 124) YGAGLGVV(서열 번호: 125) AGLGVVER(서열 번호: 126) AGLGISST(서열 번호: 127)
랫트 α ₁ M	EPQALAMS(서열 번호: 128) QALAMSAI(서열 번호: 129)
랫트 α ₂ M	AAYHLVSQ(서열 번호: 130) MDAFLESS(서열 번호: 131)
랫트 α ₁ I ₃ (2J) 랫트 α ₁ I ₃ (27J) 인간 섬유아세포 콜라게나제 (자가용해 절단)	ESLPVVAV(서열 번호: 132) SAPAVESE(서열 번호: 133) DVAQFVLT(서열 번호: 134) VAQFVLTE(서열 번호: 135) AQFVLTEG(서열 번호: 136) PVQPIGPQ(서열 번호: 137)

- [0326]
- [0327] 또한, 작용제는 이황화 결합(예를 들어, 시스템인 분자상의 이황화 결합)을 통해 AB에 부착될 수 있다. 많은 중앙이 자연적으로 높은 수준의 글루타티온(환원제)을 방출하기 때문에, 이는 전달 부위에서 작용제의 후속 방출

과 함께 이황화 결합을 환원시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, CM을 변형시키는 환원제는 또한 접합된 활성화 가능한 항체의 링커를 변형시킬 것이다.

- [0328] *스페이서 및 절단성 요소*: 일부 실시형태에서, 작용제와 활성화 가능한 항체의 AB 사이의 간격을 최적화하는 방식으로 링커를 구축하는 것이 필요할 수 있다. 이는 일반적인 구조의 링커를 사용하여 수행할 수 있다:
- [0329] $W - (CH_2)_n - Q$
- [0330] 상기 식에서
- [0331] W는 --NH--CH₂-- 또는 --CH₂--이고;
- [0332] Q는 아미노산, 펩티드이며; 그리고
- [0333] n은 0 내지 20의 정수이다.
- [0334] 일부 실시형태에서, 링커는 스페이서 요소 및 절단성 요소를 포함할 수 있다. 스페이서 요소는 절단성 요소가 절단을 담당하는 효소에 더욱 접근 가능하도록 절단성 요소를 AB의 코어로부터 멀리 위치시키는 역할을 한다. 상술한 특정 분지형 링커는 스페이서 요소로서 기능할 수 있다.
- [0335] 이러한 논의를 통해, 링커의 작용제 (또는 스페이서 요소의 절단성 요소 또는 절단성 요소의 작용제)에의 부착은 특정한 부착 또는 반응 모드일 필요는 없음이 이해되어야 한다. 적합한 안정성 및 생물학적 상용성의 생성물을 제공하는 임의의 반응이 허용 가능하다.
- [0336] *링커의 혈청 보체 및 선택*: 본 개시내용의 한 방법에 따르면, 작용제의 방출이 요구될 때, 보체를 활성화시킬 수 있는 부류의 항체인 AB가 사용된다. 생성된 접합체는 항원에 결합하고 보체 캐스케이드를 활성화시키는 능력을 유지한다. 따라서, 본 발명의 이 실시형태에 따르면, 작용제는 절단성 링커 또는 절단성 요소의 한 말단에 연결되고, 링커의 다른 말단은 AB상의 특정 부위에 부착된다. 예를 들어, 작용제가 히드록시기 또는 아미노기를 갖는 경우, 이는 펩티드 또는 아미노산의 카르복시 말단에 또는 에스테르 또는 아마이드 결합을 통해 다른 적합하게 선택된 링커에 각각 부착될 수 있다. 예를 들어, 이러한 작용제는 카보디이미드 반응을 통해 링커 펩티드에 부착될 수 있다. 작용제가 링커에의 부착을 간섭할 작용기를 함유하는 경우, 이러한 간섭 작용기는 부착 전에 차단될 수 있고, 생성물 접합체 또는 중간체가 일단 만들어지면 차단 해제될 수 있다. 이어서, 링커의 반대 또는 아미노 말단은 보체를 활성화시킬 수 있는 AB에 결합하기 위해 직접 또는 추가 변형 후 사용된다.
- [0337] 링커 (또는 링커의 스페이서 요소)는 임의의 원하는 길이 일 수 있으며, 이의 한 말단은 활성화 가능한 항체의 AB상의 특정 부위에 공유적으로 부착될 수 있다. 링커 또는 스페이서 요소의 다른 말단은 아미노산 또는 펩티드 링커에 부착될 수 있다.
- [0338] 따라서, 이들 접합체가 보체의 존재 하에 항원에 결합할 때, 링커에 작용제를 부착시키는 아마이드 또는 에스테르 결합이 절단되어 작용제를 활성 형태로 방출하게 될 것이다. 이들 접합체는 대상체에게 투여될 때 표적 부위에서 작용제의 전달 및 방출을 달성할 것이며, 특히 약제, 항생제, 항 대사제, 항 증식제 등의 생체 내 전달에 효과적이다.
- [0339] *보체 활성화 없이 방출을 위한 링커*: 표적화된 전달의 또 다른 응용에서, 보체 캐스케이드의 활성화가 궁극적으로 표적 세포를 용해시키기 때문에 보체 활성화가 없는 작용제의 방출이 바람직하다. 따라서, 이 접근법은 표적 세포를 사멸시키지 않고 작용제의 전달 및 방출이 달성되어야 할 때 유용하다. 이러한 것은 호르몬, 효소, 코르티코스테로이드, 신경전달물질, 유전자 또는 효소와 같은 세포 매개체를 표적 세포로 전달하는 것이 바람직한 경우의 목표이다. 이들 접합체는 혈청 프로테아제에 의해 절단되기에 약하게 민감한 링커를 통해 보체를 활성화시킬 수 없는 AB에 작용제를 부착시킴으로써 제조될 수 있다. 이 접합체가 개체에게 투여될 때, 항원-항체 복합체는 빠르게 형성되는 반면, 작용제의 절단은 천천히 발생하여, 표적 부위에서 화합물의 방출을 초래한다.
- [0340] *생화학적 가교제*: 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 특정 생화학적 가교제를 사용하여 하나 이상의 치료제에 접합될 수 있다. 가교 시약은 두 개의 상이한 분자의 작용기를 함께 묶는 분자 가교를 형성한다. 두 개의 상이한 단백질을 단계적으로 연결하기 위해, 원치 않는 단독중합체 형성을 제거하는 이중-이관능성 가교제가 사용될 수 있다.
- [0341] 리소솜 프로테아제에 의해 절단 가능한 펩티드 링커, 예를 들어 Val-Cit, Val-Ala 또는 다른 디펩티드가 또한 유용하다. 또한, 리소솜의 낮은 pH 환경에서 절단 가능한 산-불안정성 링커, 예를 들어 비스-시알릴 에테르가

사용될 수 있다. 다른 적합한 링커는 카텡신-불안정성 기질, 특히 산성 pH에서 최적의 기능을 나타내는 것들을 포함한다.

[0342] 예시적인 이중-이관능성 가교제는 표 (III)에 참조되어 있다.

표 (III): 예시적인 이중-이관능성 가교제

<u>이중-이관능성 가교제</u>			
링커	반응성이 있는 대상	장점 및 응용	가교 후 스페이스 압 길이(옹스트롬)
SMPT	1 차 아민 설프히드릴	더 큰 안정성	11.2 Å
SPDP	1 차 아민 설프히드릴	티올화 절단성 가교	6.8 Å
LC-SPDP	1 차 아민 설프히드릴	확장된 스페이서 압	15.6 Å
설프-LC-SPDP	1 차 아민 설프히드릴	익스텐더(extender) 스페이서 압	15.6 Å
SMCC	1 차 아민 설프히드릴	수용성 적합한 말레이미드 반응성기	11.6 Å
설프-SMCC	1 차 아민 설프히드릴	효소-항체 접합 합텐-담체 단백질 접합 적합한 말레이미드 반응성기	11.6 Å
MBS	1 차 아민 설프히드릴	수용성 효소-항체 접합 합텐-담체 단백질 접합	9.9 Å
설프-MBS	1 차 아민 설프히드릴	수용성	9.9 Å
SIAB	1 차 아민 설프히드릴	효소-항체 접합	10.6 Å
설프-SIAB	1 차 아민 설프히드릴	수용성	10.6 Å
SMPB	1 차 아민 설프히드릴	확장된 스페이서 압 효소-항체 접합	14.5 Å
설프-SMPB	1 차 아민 설프히드릴	확장된 스페이서 압 수용성	14.5 Å
EDE/설프-NHS	1 차 아민 카르복실기	합텐-담체 접합	0
ABH	탄수화물 비선택성	당기(sugar group)와 반응	11.9 Å

[0343]

[0344] 비-절단성 링커 또는 직접 부착: 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 접합체는 작용제가 표적에 전달되지만 방출되지 않도록 설계될 수 있다. 이는 직접적으로 또는 비-절단성 링커를 통해 작용제를 AB에 부착함으로써 달성될 수 있다.

[0345] 이들 비-절단성 링커는 아미노산, 펩티드, D-아미노산 또는 이후에 본원에 기재된 방법에 의해 AB에 부착시 활용될 수 있는 작용기를 포함하도록 변형될 수 있는 다른 유기 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 유기 링커에 대한 일반적인 화학식은 아래와 같을 수 있으며

[0346] $W - (CH_2)_n - Q$

[0347] 상기 식에서

[0348] W는 --NH--CH₂-- 또는 --CH₂--이고;

[0349] Q는 아미노산, 펩티드이며; 그리고

[0350] n은 0 내지 20의 정수이다.

[0351] 비-절단성 접합체: 일부 실시형태에서, 보체를 활성화시키지 않는 화합물은 AB에 부착될 수 있다. 보체 활성화

가 불가능한 AB를 사용할 때, 이 부작은 활성화된 보체에 의해 절단에 민감한 링커를 사용하거나 활성화된 보체에 의해 절단에 민감하지 않은 링커를 사용하여 달성될 수 있다.

[0352] 정의:

[0353] 달리 정의되지 않는 한, 본 개시내용과 관련하여 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자에게 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 용어 "하나" 개체(entity) 또는 "하나의" 개체는 그 개체 중 하나 이상을 지칭한다. 예를 들어, 화합물은 하나 이상의 화합물을 지칭한다. 이와 같이, 용어 "하나", "하나의", "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수형은 복수를 포함하고 복수형은 단수를 포함해야 한다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 및 단백질 및 올리고-또는 폴리뉴클레오티드 화학 및 혼성화와 관련하여 활용된 명명법 및 이의 기법은 당업계에 주지되어 있고 통상적으로 사용되는 것들이다. 제조한 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환(예를 들어, 전기 천공, 리포펙션)에 표준 기법이 사용된다. 효소 반응 및 정제 기법은 제조업체의 사양에 따라 또는 당업계에서 일반적으로 달성된 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행된다. 전술한 기법 및 절차는 일반적으로 당업계에 주지된 통상적인 방법에 따라 그리고 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고 문헌에 기재된 바와 같이 수행된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))] 참조. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 및 제약 화학과 관련하여 활용된 명명법 및 실험실 절차 및 기법은 당업계에 주지되어 있고 통상적으로 사용되는 것들이다. 표준 기법은 화학 합성, 화학 분석, 제약 제조, 제제 및 전달 및 환자의 치료에 사용된다.

[0354] 본 개시내용에 따라 활용되는 바와 같이, 다음의 용어는 달리 지시되지 않는 한 다음의 의미를 갖는 것으로 이해될 것이다:

[0355] 본원에 사용된 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린(Ig) 분자의 면역학적 활성 부분, 즉, 항원에 특이적으로 결합하는 (면역 반응하는) 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭한다. "특이적으로 결합" 또는 "면역 반응하는" 또는 "면역특이적으로 결합"은 항체가 원하는 항원의 하나 이상의 항원 결정기와 반응하고 다른 폴리펩티드와 반응하지 않거나 훨씬 낮은 친화도로 결합함을 의미한다($K_d > 10^{-6}$).

[0356] 염기성 항체 구조 단위는 사량체(tetramer)를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각각의 사량체는 2개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경"쇄(약 25 kDa) 및 하나의 "중"쇄(약 50 내지 70 kDa)를 갖는다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각 사슬의 카르복시-말단 부분은 주로 이펙터 기능을 담당하는 불변 영역을 정의한다. 일반적으로, 인간으로부터 수득된 항체 분자는 분자에 존재하는 중쇄의 성질에 의해 서로 상이한 클래스 IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD 중 어느 하나에 관한 것이다. 특정 클래스도 IgG₁, IgG₂ 등과 같은 하위 클래스가 있다. 또한, 인간에서, 경쇄는 카파 사슬 또는 람다 사슬일 수 있다.

[0357] 본원에 사용된 용어 "단일클론성 항체"(mAb) 또는 "단일클론성 항체 조성물"은 독특한 경쇄 유전자 생성물 및 독특한 중쇄 유전자로 이루어진 항체 분자의 유일한 분자 종을 함유하는 항체 분자의 집단을 지칭한다. 특히, 단일클론성 항체의 상보성 결정 영역(CDR)은 집단의 모든 분자에서 동일하다. mAb는 독특한 결합 친화도를 특징으로 하는 항원의 특정 에피토프와 면역 반응할 수 있는 항원 결합 부위를 함유한다.

[0358] 용어 "항원-결합 부위" 또는 "결합 부분"은 항원 결합에 참여하는 면역글로불린 분자의 일부를 지칭한다. 항원 결합 부위는 중쇄("H") 및 경쇄("L")의 N-말단 가변("V") 영역의 아미노산 잔기에 의해 형성된다. "초가변(hypervariable) 영역"으로 지칭되는 중쇄 및 경쇄의 V 영역 내에서 3개의 고도로 발산되는 스트레치(stretch)는 "골격(framework) 영역" 또는 "FR"로 알려진 보다 보존된 측면(flanking) 스트레치 사이에 개재된다. 따라서, 용어 "FR"은 면역글로불린에서 초가변 영역 사이에서 및 그에 인접하여 자연적으로 발견되는 아미노산 서열을 지칭한다. 항체 분자에서, 경쇄의 3개의 초가변 영역 및 중쇄의 3개의 초가변 영역은 3차원 공간에서 서로에 대해 배치되어 항원-결합 표면을 형성한다. 항원-결합 표면은 결합된 항원의 3 차원 표면에 상보적이고, 중쇄 및 경쇄 각각의 3개의 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로 지칭된다. 각 도메인에 아미노산을 할당하는 것은 면역학적 관심 단백질의 Kabat 서열의 정의에 따른 것이다(문헌[National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)], 또는 문헌[Chothia & Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)], 문헌[Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989)]).

[0359] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 면역글로불린, scFv 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의

단백질 결정인자를 포함한다. 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질 결정인자를 포함한다. 에피토프 결정인자는 주로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹핑으로 구성되며, 주로 특정 3 차원 구조적 특성뿐만 아니라 특정 전하 특성을 갖는다. 예를 들어, 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 펩티드에 대해 항체가 발생될 수 있다. 해리 상수가 $\leq 1 \mu\text{M}$ 일 때 항체는 항원에 특이적으로 결합한다고 한다; 일부 실시형태에서, $\leq 100 \text{ nM}$ 이며, 일부 실시형태에서, $\leq 10 \text{ nM}$ 이다.

[0360] 본원에 사용된 용어 "특이적 결합", "면역학적 결합" 및 "면역학적 결합 특성"은 면역글로불린 분자와 면역글로불린이 특이적인 항원 사이에서 발생하는 유형의 비공유 상호작용을 지칭한다. 면역학적 결합 상호작용의 강도 또는 친화도는 상호작용의 해리 상수(K_d) 측면에서 표현될 수 있으며, 더 작은 K_d 는 더 큰 친화도를 나타낸다. 선택된 폴리펩티드의 면역학적 결합 특성은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 정량될 수 있다. 하나의 이러한 방법은 항원-결합 부위/항원 복합체 형성 및 해리의 속도를 측정하는 것을 수반하며, 이들 속도는 복합체 파트너의 농도, 상호작용의 친화도, 및 양방향으로 속도에 동일하게 영향을 미치는 기하학적 매개변수에 의존한다. 따라서, "온 레이트 상수(on rate constant)"(K_{on}) 및 "오프 레이트 상수(off rate constant)"(K_{off})는 농도 및 실제 연관 및 해리의 속도를 계산함으로써 결정될 수 있다. (문헌[Nature 361:186-87 (1993)] 참조). K_{off} / K_{on} 의 비율은 친화도와 관련이 없는 모든 매개변수의 제거를 가능하게 하며, 해리 상수 K_d 와 동일하다. (일반적으로 문헌[Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473] 참조). 본 개시내용의 항체는 방사성 리간드 결합 분석법 또는 당업자에게 공지된 유사한 분석법과 같은 분석법에 의해 측정되는 바와 같이, 결합 상수(K_d)가 $\leq 1 \mu\text{M}$, 일부 실시형태에서, $\leq 100 \text{ nM}$, 일부 실시형태에서, $\leq 10 \text{ nM}$, 및 일부 실시형태에서, $\leq 100 \text{ pM}$ 내지 약 1 pM 인 경우 표적에 특이적으로 결합하는 것이라고 한다.

[0361] 본원에 사용된 용어 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 게놈, cDNA 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드 또는 이들의 일부 조합을 의미할 것이며, 그 기원에 의해 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 (1) "단리된 폴리뉴클레오티드"가 자연에서 발견되는 전체 또는 일부의 폴리뉴클레오티드와 연관되지 않고, (2) 자연에서 연결되지 않은 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되고, 또는 (3) 큰 서열의 일부로서 자연에 발생하지 않는다. 본 개시내용에 따른 폴리뉴클레오티드는 본원에 도식된 중쇄 면역글로불린 분자를 인코딩하는 핵산 분자, 및 본원에 도식된 경쇄 면역글로불린 분자를 인코딩하는 핵산 분자를 포함한다.

[0362] 본원에서 지칭된 용어 "단리된 단백질"은 cDNA, 재조합 RNA 또는 합성 기원의 단백질 또는 이들의 일부 조합을 의미하며, 이의 기원 또는 유도원에 의해 "단리된 단백질"은 (1) 자연에서 발견되는 단백질과 연관되지 않고, (2) 동일한 공급원으로부터의 다른 단백질이 없고, 예를 들어, 무린 단백질이 없고, (3) 다른 종으로부터의 세포에 의해 발현되고, 또는 (4) 자연에서 발생하지 않는다.

[0363] 용어 "폴리펩티드"는 본원에서 폴리펩티드 서열의 천연 단백질, 단편 또는 유사체를 지칭하는 일반적인 용어로 사용된다. 따라서, 천연 단백질 단편 및 유사체는 폴리펩티드 속의 종이다. 본 개시내용에 따른 폴리펩티드는 본원에 도식된 중쇄 면역글로불린 분자, 및 본원에 도식된 경쇄 면역글로불린 분자뿐만 아니라, 및 중쇄 면역글로불린 분자와 카파 경쇄 면역글로불린과 같은 경쇄 면역글로불린 분자를 포함하는 조합에 의해 형성된 항체 분자 및 그 반대로뿐만 아니라 이의 단편 및 유사체를 포함한다.

[0364] 대상에 적용되는 본원에 사용되는 용어 "자연 발생"은 대상이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 지칭한다. 예를 들어, 자연에서 공급원으로부터 단리될 수 있고 실험실에서 사람에게 의해 의도적으로 변형되지 않았거나 그렇지 않으면 자연적으로 발생하는 유기체(바이러스 포함)에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리 뉴클레오티드 서열.

[0365] 본원에 사용된 용어 "작동 가능하게 연결된"은 그렇게 설명된 성분의 위치가 의도된 방식으로 기능하도록 하는 관계에 있음을 지칭한다. 코딩 서열에 "작동 가능하게 연결된" 제어 서열은 코딩 서열의 발현이 제어 서열과 호환되는 조건하에 달성되는 방식으로 결합된다.

[0366] 본원에 사용된 용어 "제어 서열"은 이들이 결합되는 코딩 서열의 발현 및 프로세싱에 영향을 미치는데 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이러한 제어 서열의 성질은 원핵 생물에서 숙주 유기체에 따라 다르며, 이러한 제어 서열은 일반적으로 진핵 생물에서 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함하고, 일반적으로 이러한 제어 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 용어 "제어 서열"은 존재가 발현 및 프로세싱에 필수적인 모든 성분을 최소한 포함하도록 의도되고, 또한 존재가 유리한 추가 성분, 예를 들어, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다. 본원에 지칭된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드이든 길이가 적어도 10개의 염기의 뉴클레오티드, 또는 임의의 유형의 뉴클레오티드의 변형

된 형태를 의미한다. 용어는 단일 및 이중 가닥 형태의 DNA를 포함한다.

- [0367] 본원에 지칭된 용어 올리고뉴클레오티드는 자연 발생 및 비 자연 발생 올리고뉴클레오티드 연결에 의해 함께 연결된 자연 발생 및 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 200 염기 이하의 길이를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서브세트이다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드는 길이가 10 내지 60 염기이고, 일부 실시형태에서, 길이가 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 내지 40 염기이다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 유전자 돌연변이체의 구축에 사용하기 위한 이중 가닥일 수 있지만, 올리고 뉴클레오티드는 예를 들어, 프로브용의 주로 단일 가닥이다. 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.
- [0368] 본원에 지칭되는 용어 "자연 발생 뉴클레오티드"는 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함한다. 본원에 지칭되는 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 변형되거나 치환된 당기 등을 갖는 뉴클레오티드를 포함한다. 본원에 지칭된 용어 "올리고뉴클레오티드 연결"은 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로아닐로티오에이트(phosphoroseleroate), 포스포로디셀레노에이트(phosphorodiselenoate), 포스포로아닐로티오에이트(phosphoroanilothioate), 포스포라닐라테이트(phosphoraniladate), 포스포론미테이트(phosphoronmidate) 등과 같은 올리고 뉴클레오티드 연결을 포함한다. 예를 들어, 문헌[LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986)]; 문헌[Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984)], 문헌[Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988)], 문헌[Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991)]; 문헌[Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991))]; 문헌[Stec *et al.* U.S. Patent No. 5,151,510]; 문헌[Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)] 참조. 올리고뉴클레오티드는 필요하면 검출용 표지를 포함할 수 있다.
- [0369] 본원에 사용된 바와 같이, 20개의 통상적인 아미노산 및 그들의 약어는 통상적인 용도를 따른다. 문헌 [Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))] 참조. 20개의 통상적인 아미노산의 입체 이성질체(예를 들어, D-아미노산), α -, α -이치환된 아미노산과 같은 비천연 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산 및 다른 비통상적인 아미노산이 또한 본 개시내용의 폴리펩티드에 대하여 적합한 성분일 수 있다. 비통상적인 아미노산의 예는: 4 히드록시프롤린, γ -카르복시글루타메이트, ϵ -N,N-트리메틸리신, ϵ -N-아세틸리신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-히드록시리신, σ -N-메틸아르기닌, 및 다른 유사한 아미노산 및 이미노산(예를 들어, 4-히드록시프롤린)을 포함한다. 본원에 사용된 폴리펩티드 표기법에서, 표준 사용법 및 규칙에 따라, 좌측 방향은 아미노 말단 방향이고, 우측 방향은 카르복시-말단 방향이다.
- [0370] 유사하게는, 달리 명시되지 않는 한, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 말단은 5' 말단이고 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 방향은 5' 방향으로 지칭된다. 초기(nascent) RNA 전사체의 5' 내지 3' 첨가의 방향은 RNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥상의 전사 방향 서열 영역으로 지칭되고, RNA 전사체의 5' 내지 5' 말단은 "상류(upstream) 서열"로서, RNA와 동일한 서열을 갖고 DNA 전사체의 3' 내지 3' 말단인 DNA 가닥상의 서열 영역은 "하류(downstream) 서열"로 지칭된다.
- [0371] 폴리펩티드에 적용되는 용어 "실질적 동일성"은, 예를 들어 기본 값 중량을 사용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬될 때, 2개의 펩티드 서열이 적어도 80%의 서열 동일성, 일부 실시형태에서, 적어도 90% 서열 동일성, 일부 실시형태에서, 적어도 95% 서열 동일성, 및 일부 실시형태에서, 적어도 99% 서열 동일성을 공유한다는 것을 의미한다.
- [0372] 일부 실시형태에서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 상이하다.
- [0373] 본원에서 논의된 바와 같이, 아미노산 서열의 변이가 적어도 75%, 일부 실시형태에서, 적어도 80%, 90%, 95%, 및 일부 실시형태에서 99%를 유지하면, 항체 또는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열의 작은 변이는 본 개시내용에 포함되는 것으로 고려된다. 특히, 보존적 아미노산 치환이 고려된다. 보존적 치환은 이의 측쇄와 관련된 아미노산의 패밀리 내에서 일어나는 것들이다. 유전적으로 인코딩된 아미노산은 일반적으로 패밀리로 분류된다: (1) 산성 아미노산은 아스파르테이트, 글루타메이트이다; (2) 염기성 아미노산은 리신, 아르기닌, 히스티딘이다; (3) 비극성 아미노산은 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판이며, 그리고 (4) 하전되지 않은(uncharged) 극성 아미노산은 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신이다. 친수성 아미노산은 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르테이트, 글루타민, 글루타메이트, 히스티딘, 리신, 세린, 및 트레오닌을 포함한다. 소수성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 티로신, 및 발린을 포함한다. 아미노산의 다른 패밀리는 (i) 지방족-

하이드록시 페닐리인 세린 및 트레오닌; (ii) 아마이드 함유 페닐리인 아스파라긴 및 글루타민; (iii) 지방족 페닐리인 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신; 및 (iv) 방향족 페닐리인 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신을 포함한다. 예를 들어, 류신을 이소류신 또는 발린으로, 아스파르테이트를 글루타메이트로, 트레오닌을 세린으로 단리 대체(isolated replacement)하거나 아미노산을 구조적으로 연관된 아미노산으로 유사하게 대체하면, 특히, 이러한 대체가 골격 부위 내에서 아미노산을 포함하지 않는 경우, 생성된 분자의 결합 또는 특성에 대한 중요한 영향을 갖지 않을 것으로 예상하는 것은 합리적이다. 아미노산 변화가 기능성 펩티드를 초래하는지 여부는 폴리펩티드 유도체의 특이적 활성을 분석함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 분석은 본원에 상세하게 기술되어 있다. 항체 또는 면역글로불린 분자의 단편 또는 유사체는 당업자에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 단편 또는 유사체의 적합한 아미노- 및 카르복시-말단은 기능성 도메인의 경계 근처에서 발생한다. 구조적 및 기능적 도메인은 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 데이터를 공개 또는 독점 서열 데이터베이스와 비교함으로써 식별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 컴퓨터화된 비교 방법은 공지된 구조 및/또는 기능의 다른 단백질에서 발생하는 서열 모티프 또는 예측된 단백질 형태 도메인을 식별하는데 사용된다. 공지된 3 차원 구조로 접히는 단백질 서열을 식별하는 방법이 공지되어 있다. 문헌[Bowie *et al.* Science 253:164 (1991)]. 따라서, 전술한 실시예는 당업자가 본 개시내용에 따라 구조적 및 기능적 도메인을 정의하는데 사용될 수 있는 서열 모티프 및 구조적 입체 구조를 인식할 수 있음을 입증한다.

[0374] 적합한 아미노산 치환은: (1) 단백질 분해에 대한 감수성 감소, (2) 산화에 대한 감수성 감소, (3) 단백질 복합체 형성을 위한 결합 친화도 변경, (4) 결합 친화도 변경, 및 (5) 이러한 유사체의 기타 물리 화학적 또는 기능적 특성 부여 또는 변형하는 것들이다. 유사체는 자연 발생 펩티드 서열 이외의 서열의 다양한 무 테인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단일 또는 다수의 아미노산 치환(예를 들어, 보존적 아미노산 치환)은 자연 발생 서열에서 (예를 들어, 분자간 접촉을 형성하는 도메인(들) 외부의 폴리펩티드 부분에서) 이루어질 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 모 서열의 구조적 특성을 실질적으로 변화시키지 않아야 한다(예를 들어, 치환 아미노산은 모 서열에서 발생하는 나선을 파괴하거나 모 서열을 특징 짓는 다른 유형의 2차 구조를 방해하는 경향이 있어서는 안 된다). 당업계에 인식된 폴리펩티드 2차 및 3차 구조의 예는 문헌[Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984))]; 문헌[Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))]; 및 문헌 [Thornton *et al.* Nature 354:105 (1991)]에 기재되어 있다.

[0375] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드 단편"은 아미노 말단 및/또는 카르복시-말단 결실 및/또는 하나 이상의 내부 결실(들)을 갖지만 나머지 아미노산 서열은 예를 들어, 전장 cDNA 서열로부터 추론된 자연 발생 서열에서 상응하는 위치와 동일한 폴리펩티드를 지칭한다. 단편은 통상적으로 적어도 5, 6, 8 또는 10개의 아미노산 길이, 일부 실시형태에서 적어도 14개의 아미노산 길이, 일부 실시형태에서, 적어도 20개의 아미노산 길이, 주로 적어도 50개의 아미노산 길이, 및 일부 실시형태에서, 적어도 70개의 아미노산 길이이다. 본원에 사용된 용어 "유사체"는 추론된 아미노산 서열의 일부와 실질적으로 동일하고, 적합한 결합 조건 하에 표적에 특이적인 결합을 갖는 적어도 25개의 아미노산의 세그먼트로 구성되는 폴리펩티드를 지칭한다. 통상적으로, 폴리펩티드 유사체는 자연 발생 서열에 대하여 보존적 아미노산 치환 (또는 첨가 또는 결실)을 포함한다. 유사체는 통상적으로 적어도 20개의 아미노산 길이, 일부 실시형태에서, 적어도 50개의 아미노산 길이이며, 종종 전장 자연 발생 폴리펩티드만큼 길 수 있다.

[0376] 본원에서 용어 "작용제"는 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대 분자, 또는 생물학적 물질로 제조된 추출물을 나타내기 위해 사용된다.

[0377] 본원에 사용된 용어 "표지" 또는 "표지된"은 예를 들어, 방사성 표지된 아미노산의 도입 또는 마킹된 아비딘(예를 들어, 광학적 또는 열량 측정법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙토아비딘)에 의해 검출될 수 있는 비오틴일 모이어티의 폴리펩티드에 부착함으로써 검출 가능한 표지의 도입을 지칭한다. 특정 상황에서, 표지 또는 마커는 또한 치료적일 수 있다. 폴리펩티드 및 당단백질을 표지하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있으며 사용될 수 있다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예는 하기를 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종(예를 들어, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), 형광 표지(예를 들어, FITC, 로다민, 란타나이드 형광체), 효소 표지(예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제, p-갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리 포스파타제), 화학발광, 비오틴닐기, 2차 리포터에 의해 인식되는 소정의 폴리펩티드 에피토프(예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그). 일부 실시형태에서, 표지는 다양한 길이의 스페이서 암에 의해 부착되어 잠재적인 입체 장애를 감소시킨다. 본원에 사용된 용어 "약제 또는 약물"은 환자에게 적절히 투여될 때 원하는 치료 효과를 유도할 수 있는 화학적 화합물

또는 조성물을 지칭한다.

- [0378] 본원의 다른 화학 용어는 문헌[The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))]에 의해 예시된 바와 같이, 당업계의 통상적인 용도에 따라 사용된다.
- [0379] 본원에 사용된 용어 "실질적으로 순수한"은 대상 종이 존재하는 우세한 종(즉, 몰 기준으로 조성물에서 임의의 다른 개별 종보다 더 풍부함)임을 의미하며, 일부 실시형태에서, 실질적으로 정제된 분획은 대상 종은 존재하는 모든 거대 분자 종의 적어도 약 50%(몰 기준)을 포함하는 조성물이다.
- [0380] 일반적으로, 실질적으로 순수한 조성물은 조성물에 존재하는 약 80% 초과, 일부 실시형태에서, 약 85%, 90%, 95% 및 99% 초과와 모든 거대분자 종을 포함할 것이다. 일부 실시형태에서, 대상 종은 필수적인 균질성으로 정제되며 (오염물 종은 통상적인 검출 방법에 의해 조성물에서 검출될 수 없음), 여기서 조성물은 단일 거대분자 종으로 필수적으로 구성된다.
- [0381] 용어 환자는 인간 및 수의학 대상체를 포함한다.
- [0382] 본 개시내용의 항체 및/또는 활성화 가능한 항체는 주어진 표적, 예를 들어, 인간 CD71과 같은 인간 표적 단백질에 특이 적으로 결합한다. 본원에 기재된 항체 및/또는 활성화 가능한 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및/또는 활성화 가능한 항체가 본 개시내용에 또한 포함된다. CD71 표적, 예를 들어, 인간 CD71에 결합하기 위해 본원에 기재된 항-CD71 항체 및/또는 항-CD71 활성화 가능한 항체와 경쟁하는 항체 및/또는 항체 활성화 가능한 항체가 본 개시내용에 또한 포함된다. CD71 표적, 예를 들어 인간 CD71에 결합하기 위해 본원에 기재된 항-CD71 항체 및/또는 항-CD71 활성화 가능한 항체와 교차경쟁하는 항체 및/또는 항체 활성화 가능한 항체가 본 개시내용에 또한 포함된다.
- [0383] 당업자는 단일클론성 항체(예를 들어, 무린 단일클론성 또는 인간화 항체)가 본원에 기재된 방법에서 사용된 단일클론성 항체와 동일한 특이성을 갖는지를 전자는 후자가 표적에 결합하는 것을 방지하는 지 확인함으로써 과도한 실험없이 결정하는 것이 가능하다는 것을 인식할 것이다. 시험되는 단일클론성 항체가 본 개시내용의 단일클론성 항체에 의한 결합의 감소로 나타난 바와 같이 본 개시내용의 단일클론성 항체와 경쟁하는 경우, 2개의 단일클론성 항체는 동일하거나 밀접하게 관련된 에피토프에 결합한다. 단일클론성 항체가 본 개시내용의 단일클론성 항체의 특이성을 갖는지 여부를 결정하기 위한 대안적인 방법은 본 개시내용의 단일클론성 항체를 표적과 예비-배양한 다음 테스트되는 단일클론성 항체를 첨가하여 시험되는 단일클론성 항체가 표적에 결합하는 능력이 억제되는지 여부를 결정하는 것이다. 시험되는 단일클론성 항체가 억제되는 경우, 모든 가능성에서, 이는 본 개시내용의 단일클론성 항체와 동일하거나 기능적으로 등가인 에피토프 특이성을 갖는다.
- [0384] 접합된 활성화 가능한 항체의 사용
- [0385] 본 개시내용에 따른 치료 개체의 투여는 개선된 전이, 전달, 내성 등을 제공하기 위해 제형에 포함되는 적합한 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 다른 작용제와 함께 투여될 것임을 이해할 것이다.
- [0386] 비 한정적 예로서, 접합된 활성화 가능한 항체를 포함하는 본 개시내용의 치료 제형은 비정상적 표적 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애를 예방, 치료 또는 그렇지 않으면 개선하는데 사용된다. 예를 들어, 접합된 활성화 가능한 항체를 포함하는 본 개시내용의 치료 제형은 암 또는 다른 신생물 상태, 염증, 염증성 장애 및/또는 자가면역 질병을 치료 또는 그렇지 않으면 개선하는데 사용된다. 일부 실시형태에서, 암은 표적이 발현되는 고형 종양 또는 혈액악성종양이다. 일부 실시형태에서, 암은 표적이 발현되는 고형 종양이다. 일부 실시형태에서, 암은 표적이 발현되는 혈액악성종양이다. 일부 실시형태에서, 표적은 실질(parenchyma)(예를 들어, 암에서, 기관 또는 조직의 기능(들)을 종종 수행하는 기관 또는 조직의 일부) 상에 발현된다. 일부 실시형태에서, 표적은 세포, 조직, 또는 기관 상에 발현된다. 일부 실시형태에서, 표적은 기질(stroma)(즉, 세포, 조직, 또는 기관의 결합 지지 골격) 상에 발현된다. 일부 실시형태에서, 표적은 조골 세포 상에 발현된다. 일부 실시형태에서, 표적은 내피(혈관) 상에 발현된다. 일부 실시형태에서, 표적은 암 줄기 세포 상에 발현된다. 일부 실시형태에서, 항체 및/또는 활성화 가능한 항체가 접합되는 작용제는 미세소관 억제제이다. 일부 실시형태에서, 항체 및/또는 활성화 가능한 항체가 접합되는 작용제는 핵산 손상제이다.
- [0387] 예방, 개선 또는 치료의 효능성은 예를 들어, 비정상적 표적 발현 및/또는 활성화와 같은 표적 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애를 진단 또는 치료하기 위한 임의의 공지된 방법과 연관하여 결정된다. 대상체에서 표적 발현 및/또는 활성화, 예를 들어, 비정상적 표적 발현 및/또는 활성화와 연관된 질병 또는 장애의 진행을 지연시키거나 피험자의 생존을 연장하는 것은 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한

항체는 임상적 이점을 제공함을 나타낸다.

- [0388] 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 약학적 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 항체 단편이 사용되는 일부 실시형태에서, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소 단편이 선택된다. 예를 들어, 항체의 가변-영역 서열에 기초하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하는 펩티드 분자가 설계될 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성되고/되거나 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. (예를 들어, 문헌[Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)] 참조).
- [0389] 생체 내 투여를 위해 사용되는 제형은 멸균되어야 한다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.
- [0390] 일부 실시형태에서, 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 함유한다. 온전한 항체 또는 이의 단편(예를 들어, Fab, scFv, 또는 F(ab)₂)이 사용된다. 프로브 또는 항체와 관련하여 용어 "표지된"은 프로브의 검출 가능한 물질을 프로브 또는 항체에 커플링(즉, 물리적으로 연결)함으로써 프로브 또는 항체의 직접적인 표지, 및 프로브의 간접 표지를 포함한다. 또는 직접 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접적인 표지를 포함하는 것으로 의도된다. 간접 표지의 예는 형광 표지된 2차 항체를 사용하여 1차 항체의 검출 및 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있도록 비오틴으로 DNA 프로브의 말단 표지를 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 대상체로부터 단리된 조직, 세포 및 생물학적 유체뿐만 아니라 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 유체를 포함하는 것으로 의도된다. 그러므로, 혈액 및 혈청, 혈장 또는 림프를 포함하는 혈액의 분획 또는 성분이 용어 "생물학적 샘플" 내에 포함된다. 즉, 본 개시 내용의 검출 방법은 생체 내뿐만 아니라 시험관 내에서 생물학적 샘플에서 분석물 mRNA, 단백질 또는 게놈 DNA를 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 분석물 mRNA의 검출을 위한 시험 관내 기법은 노던(Northern) 혼성화 및 인 시튜 혼성화를 포함한다. 분석물 단백질의 검출을 위한 시험 관내 기법은 효소 연결 면역흡착 분석(ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전, 면역화학 염색, 및 면역형광을 포함한다. 분석물 게놈 DNA의 검출을 위한 시험 관내 기법은 서던(Southern) 혼성화를 포함한다. 면역분석을 수행하기 위한 절차는, 예를 들어, 문헌["ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995]; 문헌["Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996]; 및 문헌["Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985]에 기재되어 있다. 또한, 분석물 단백질의 검출을 위한 생체 내 기법은 대상체에 표지된 항-분석물 단백질 항체를 도입하는 것을 포함한다. 예를 들어, 항체는 대상체에서의 존재 및 위치가 표준 이미징 기법에 의해 검출될 수 있는 방사성 마커로 표지될 수 있다.
- [0391] 본 개시내용의 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 또한 다양한 진단 및 예방 제형에 유용하다. 일 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체는 상기 언급된 장애 중 하나 이상이 발생할 위험이 있는 환자에게 투여된다. 상기 언급된 장애 중 하나 이상에 대한 환자 또는 기관의 소인은 유전자형, 혈청학적 또는 생화학적 마커를 사용하여 결정될 수 있다.
- [0392] 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 접합된 활성화 가능한 항체는 상기 언급된 장애 중 하나 이상과 연관된 임상 징후로 진단된 인간 개체에게 투여된다. 진단시, 접합된 활성화 가능한 항체는 임상 징후의 효과를 완화시키거나 역전시키기 위해 투여된다.
- [0393] 본 개시내용의 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 또한 환자 샘플에서 표적의 검출에 유용하고 따라서 진단으로서 유용하다. 예를 들어, 본 개시내용의 항체 및/또는 활성화 가능한 항체 및 이의 접합된 버전(version)은 환자 샘플에서 표적 수준을 검출하기 위해 시험관 내 분석, 예를 들어, ELISA에서 사용된다.
- [0394] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 고체 지지체(예를 들어, 마이크로타이터 플레이트의 웰(들)) 상에 고정된다. 고정된 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 시험 샘플에 존재할 수 있는 임의의 표적에 대한 포획(capture) 항체로서 작용한다. 고정된 항체 및/또는 활성화 가능한 항체 및/또는 이의 접합된 버전을 환자 샘플과 접촉시키기 전에, 고체 지지체를 행구고 우유 단백질 또는 알부민과 같은 차단제로 처리하여 분석물의 비특이적 흡착을 방지한다.
- [0395] 이어서, 웰을 항원 함유를 의심하는 시험 샘플 또는 표준량의 항원을 함유하는 용액으로 처리한다. 이러한 샘플은, 예를 들어, 병리의 진단으로 간주되는 순환 항원 수준을 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터의 혈청 샘플이

다. 시험 샘플 또는 표준물을 행군 후, 고체 지지체를 검출 가능하게 표지된 제2 항체로 처리한다. 표지된 2 항체는 검출 항체로서 작용한다. 검출 가능한 표지의 수준이 측정되고, 시험 샘플에서 표적 항원의 농도는 표준 샘플로부터 전개된 표준 곡선과 비교함으로써 결정된다.

[0396] 시험 관내 진단 분석에서 본 개시내용의 항체 및 활성화 가능한 항체 및 이의 접합된 버전을 사용하여 얻은 결과에 기초하여, 표적 항원의 발현 수준에 기초하여 대상체에서 질병을 병기(stage)할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 주어진 질병에 대해, 혈액의 샘플은 질병의 진행의 다양한 단계 및/또는 질병의 치료적 처리의 다양한 시점에서 진단된 대상으로부터 채취된다. 각각의 진행 또는 치료 단계에 대해 통계적으로 유의한 결과를 제공하는 샘플 집단을 사용하여, 각 단계의 특징으로 간주될 수 있는 항원의 농도 범위가 지정된다.

[0397] 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 또한 진단 및/또는 영상화 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 시험관 내 방법이다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 생체 내 방법이다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 인 시튜 방법이다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 생체 외 방법이다. 예를 들어, 효소적으로 절단 가능한 CM을 갖는 활성화 가능한 항체를 사용하여 CM을 절단할 수 있는 효소의 존재 또는 부재를 검출할 수 있다. 이러한 활성화 가능한 항체는 주어진 숙주 유기체의 주어진 세포 또는 조직에서 활성화된 항체(즉, 활성화 가능한 항체의 절단으로 인한 항체)의 측정된 축적을 통한 효소 활성의 생체 내 검출(예를 들어, 정성적으로 또는 정량적으로)을 포함할 수 있는 진단법 (또는, 일부 실시형태에서, 이화화 결합의 환원을 제공할 수 있는 것과 같은 증가된 환원 전위의 환경)에 사용될 수 있다. 활성화된 항체의 이러한 축적은 조직이 효소 활성 (또는 CM의 성질에 따라 증가된 환원 전위)을 발현할 뿐만 아니라 조직이 활성화된 항체가 결합하는 표적을 발현한다는 것을 나타낸다.

[0398] 예를 들어, CM은 중앙 부위, 생물학적으로 한정된 부위(예를 들어, 농양에서, 기관에서 등과 같이)에서 바이러스 또는 박테리아 감염 부위 등에서 발견되는 적어도 하나의 프로테아제에 대한 기질이 되도록 선택될 수 있다. AB는 표적 항원에 결합하는 것일 수 있다. 본원에 개시된 바와 같은 방법, 또는 적절한 경우, 당업자에게 친숙한 방법을 사용하여, 검출 가능한 표지(예를 들어, 형광 표지 또는 방사성 표지 또는 방사성 추적자)는 항체 및/또는 활성화 가능한 항체의 AB 또는 다른 영역에 접합될 수 있다. 적합한 검출 가능한 표지가 상기 스크리닝 방법의 맥락에서 논의되고 추가의 특정 예가 하기에 제공된다. 관심 질병 조직에서 활성이 증가된 적어도 하나의 프로테아제와 함께 질병 상태의 단백질 또는 펩티드에 특이적인 AB를 사용하여, 활성화 가능한 항체는 CM 특이적인 효소가 검출 가능한 수준으로 존재하거나 질병 조직내 보다 더 낮은 수준으로 존재하거나 또는 비활성인 (예를 들어, 자이모겐(zymogen) 형태 또는 억제제와의 복합체에서) 조직에 비하여 질병 조직에의 결합의 증가된 속도를 보일 것이다. 신장 여과 시스템에 의해 작은 단백질 및 펩티드가 혈액으로부터 신속하게 제거되기 때문에, 그리고 CM에 특이적인 효소가 검출 가능한 수준으로 존재하지 않기 (또는 비-질병 조직에서 더 낮은 수준으로 존재하거나 또는 비활성 입체 형태로 존재하기) 때문에, 질병 조직에서 활성화된 항체의 축적은 비-질병 조직에 비해 향상된다.

[0399] 다른 예에서, 활성화 가능한 항체는 샘플에서 절단체의 존재 또는 부재를 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 활성화 가능한 항체가 효소에 의해 절단에 민감한 CM을 함유하는 경우, 활성화 가능한 항체는 샘플에서 효소의 존재를 (정성적으로 또는 정량적으로) 검출하는데 사용될 수 있다. 다른 예에서, 활성화 가능한 항체가 환원제에 의해 절단에 민감한 CM을 함유하는 경우, 활성화 가능한 항체는 샘플에서 환원 조건의 존재를 (정성적으로 또는 정량적으로) 검출하는데 사용될 수 있다. 이들 방법에서의 분석을 용이하게 하기 위해, 활성화 가능한 항체는 검출 가능하게 표지될 수 있고, 지지체(예를 들어, 슬라이드 또는 비드와 같은 고체 지지체)에 결합될 수 있다. 검출 가능한 표지는 절단 후 방출되지 않는 활성화 가능한 항체의 일부 상에 위치될 수 있으며, 예를 들어, 검출 가능한 표지는 퀀팅된 형광 표지 또는 절단이 발생할 때까지 검출할 수 없는 다른 표지일 수 있다. 분석은 예를 들어 고정화되고 검출 가능하게 표지된 활성화 가능한 항체를 효소 및/또는 환원제를 함유하는 것으로 의심되는 샘플과 절단이 발생하기에 충분한 시간 동안 접촉한 후 세척하여 과량의 샘플 및 오염물을 제거함으로써 수행될 수 있다. 이후, 샘플에서 절단체(예를 들어, 효소 또는 환원제)의 존재 또는 부재는 샘플과 접촉하기 전에 활성화 가능한 항체의 검출 가능한 신호의 변화, 예를 들어, 샘플에서 절단체에 의한 활성화 가능한 항체의 절단으로 인한 검출 가능한 신호의 존재 및/또는 검출 가능한 신호의 증가에 의해 평가된다.

[0400] 이러한 검출 방법은 또한 절단될 때 활성화 가능한 항체의 AB에 결합할 수 있는 표적의 존재 또는 부재의 검출을 제공하도록 구성될 수 있다. 따라서, 분석은 절단체의 존재 또는 부재 및 관심 표적의 존재 또는 부재를 평가하도록 구성될 수 있다. 절단체의 존재 또는 부재는 상기 기재된 바와 같은 활성화 가능한 항체의 검출 가능한 표지의 존재 및/또는 검출 가능한 표지의 증가에 의해 검출될 수 있고, 표적의 존재 또는 부재는 표적-AB 복

합체의 검출에 의해 검출, 예를 들어, 검출 가능하게 표지된 항-표적 항체의 사용에 의해 검출될 수 있다.

- [0401] 활성화 가능한 항체는 또한 예를 들어, 프로테아제 절단에 의한 활성화 가능한 항체 활성화의 확인 및 특정 표적에 대한 결합을 위한 인 시튜 이미징에 유용하다. 인 시튜 이미징은 세포 배양 또는 조직 섹션과 같은 생물학적 샘플에서 단백질 분해 활성 및 표적의 국소화를 가능하게 하는 기법이다. 이 기법을 사용하여, 검출 가능한 표지(예를 들어, 형광 표지)의 존재에 기초하여 주어진 표적에 대한 결합 및 단백질 분해 활성 양쪽 모두를 식별할 수 있다.
- [0402] 이들 기법은 질병 부위(예를 들어, 종양 조직) 또는 건강한 조직으로부터 유래된 임의의 냉동 세포 또는 조직에 유용하다. 이들 기법은 또한 신선한 세포 또는 조직 샘플에 유용하다.
- [0403] 이들 기법에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지로 표지된다. 검출 가능한 표지는 형광 염료(예를 들어, 형광단, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민 이소티오시아네이트(TRITC), Alexa Fluor® 표지), 근적외선(NIR) 염료(예를 들어, Qdot® 나노크리스탈), 콜로이드 금속, 합텐, 방사성 마커, 비오틴 및 스트렙타비딘과 같은 증폭 시약, 또는 효소(예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제)일 수 있다.
- [0404] 표지된 활성화 가능한 항체와 함께 배양된 샘플에서 표지의 검출은 샘플이 표적을 함유하고 활성화 가능한 항체의 CM에 특이적인 프로테아제를 함유한다는 것을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 프로테아제의 존재는 본원에 기재된 것과 같은 광범위의 프로테아제 억제제를 사용하고/하거나 프로테아제에 특이적인 작용제, 예를 들어, 프로테아제 매트립타제에 특이적이고 매트립타제의 단백질 분해 활성을 억제하는 A11과 같은 항체를 사용하여 확인될 수 있다; 예를 들어, 2010년 11월 11일자로 공개된 국제공개 WO 2010/129609호 참조. 본원에 기재된 것과 같은 광범위의 프로테아제 억제제를 사용하고/하거나 보다 선택적인 억제제를 사용하는 것과 동일한 접근법은 활성화 가능한 항체의 CM에 특이적인 프로테아제를 식별하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적의 존재는 표적에 특이적인 작용제, 예를 들어 다른 항체를 사용하여 확인될 수 있거나, 검출 가능한 표지는 표지되지 않은 표적과 경쟁할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표지되지 않은 활성화 가능한 항체가 표지된 2차 항체 또는 보다 복잡한 검출 시스템에 의한 검출과 함께 사용될 수 있다.
- [0405] 대상체, 예를 들어, 인간을 포함한 포유류에서 형광 신호의 검출이 질병 부위가 표적을 포함하고 활성화 가능한 항체의 CM에 특이적인 프로테아제를 함유하는 것을 나타내는 경우 유사한 기법이 또한 생체 내 영상화에 유용하다.
- [0406] 이들 기법은 또한 활성화 가능한 항체에서 프로테아제-특이적 CM에 기초한 다양한 세포, 조직 및 유기체에서 프로테아제 활성의 검출, 동정 또는 특성화를 위한 키트에서 및/또는 이를 위한 시약으로서 유용하다.
- [0407] 본 개시내용은 다양한 진단 및/또는 예방 징후에서 항체 및/또는 활성화 가능한 항체를 사용하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용은 (i) 대상체 또는 샘플을 활성화 가능한 항체와 접촉시키고, 여기서 활성화 가능한 항체는 마스킹 모이어티(MM), 절단체, 예를 들어, 프로테아제에 의해 절단되는 절단성 모이어티(CM), 및 관심 표적에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)를 포함하고, 여기서 비절단, 비활성화 상태의 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단에서 C-말단으로의 구조적 배열을 포함함: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (a) 상기 식에서 MM은 AB의 표적과의 결합을 억제하는 펩티드이고, 상기 식에서 MM은 AB의 자연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 가지지 않으며, AB의 자연 결합 파트너의 변형된 형태가 아니며; 그리고 (b) 비절단 비활성화 상태에서, MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭하고, 절단, 활성화 상태에서 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭 또는 경쟁하지 않음; 그리고 (ii) 대상체 또는 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하고, 여기서 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 절단체 및 표적이 대상체 또는 샘플에 존재하는 것을 나타내고, 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체가 없는 것은 절단체, 표적 또는 절단체 및 표적 양쪽 모두가 대상체 또는 샘플에 존재하지 않고/않거나 충분히 존재하지 않음을 나타냄으로써, 대상체 또는 샘플에서 절단체 및 관심 표적의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 작용제에 접합되지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 AB 상에 위치된다. 일부 실시형태에서, 대상체 또는 샘플에서 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하는 단계는 활성화된 항체에 특이적으로 결합하는 2차 시약을 사용하여 달성되며, 여기서 시약은 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2차 시약은 검출 가능한 표지를 포함하는 항체이다.
- [0408] 본 개시내용은 또한 (i) 대상체 또는 샘플을 관심 표적, 예를 들어, 표적의 부재 하에 활성화 가능한 항체와 접

촉시키고, 여기서 활성화 가능한 항체는 마스킹 모이어티(MM), 절단제, 예를 들어, 프로테아제에 의해 절단되는 절단성 모이어티(CM), 및 관심 표적에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)를 포함하고, 여기서 비절단, 비활성화 상태의 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단에서 C- 말단으로의 구조적 배열을 포함함: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (a) 상기 식에서 MM은 AB의 표적과의 결합을 억제하는 펩티드이고, 상기 식에서 MM은 AB의 자연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 가지지 않으며, AB의 자연 결합 파트너의 변형된 형태가 아니며; 그리고 (b) 비절단 비활성화 상태에서, MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭하고, 절단, 활성화 상태에서 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭 또는 경쟁하지 않음; 그리고 (ii) 대상체 또는 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하고, 여기서 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 절단제가 대상체 또는 샘플에 존재하는 것을 나타내고, 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체가 없는 것은 절단제가 대상체 또는 샘플에 존재하지 않고/않거나 충분히 존재하지 않음을 나타냄으로써, 대상체 또는 샘플에서 절단제의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 작용제에 접합되지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 AB 상에 위치된다. 일부 실시형태에서, 대상체 또는 샘플에서 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하는 단계는 활성화된 항체에 특이적으로 결합하는 2차 시약을 사용하여 달성되며, 여기서 시약은 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2차 시약은 검출 가능한 표지를 포함하는 항체이다.

[0409] 본 개시내용은 또한 대상체 또는 샘플에서 절단제 및 표적의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, 키트는 적어도 활성화 가능한 항체를 포함하고, 마스킹 모이어티(MM), 절단제, 예를 들어, 프로테아제에 의해 절단되는 절단성 모이어티(CM), 및 관심 표적에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)를 포함하고, 여기서 비절단, 비활성화 상태의 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단에서 C- 말단으로의 구조적 배열을 포함함: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (a) 상기 식에서 MM은 AB의 표적과의 결합을 억제하는 펩티드이고, 상기 식에서 MM은 AB의 자연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 가지지 않으며, AB의 자연 결합 파트너의 변형된 형태가 아니며; 그리고 (b) 비절단 비활성화 상태에서, MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭하고, 절단, 활성화 상태에서 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭 또는 경쟁하지 않음; 그리고 (ii) 대상체 또는 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하고, 여기서 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 절단제가 대상체 또는 샘플에 존재하는 것을 나타내고, 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체가 없는 것은 절단제가 대상체 또는 샘플에 존재하지 않고/않거나 충분히 존재하지 않음을 나타냄으로써, 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 작용제에 접합되지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 AB 상에 위치된다. 일부 실시형태에서, 대상체 또는 샘플에서 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하는 단계는 활성화된 항체에 특이적으로 결합하는 2차 시약을 사용하여 달성되며, 여기서 시약은 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2차 시약은 검출 가능한 표지를 포함하는 항체이다.

[0410] 본 개시내용은 또한 (i) 대상체 또는 샘플을 활성화 가능한 항체와 접촉시키고, 여기서 활성화 가능한 항체는 마스킹 모이어티(MM), 절단제, 예를 들어, 프로테아제에 의해 절단되는 절단성 모이어티(CM), 표적에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인(AB), 및 검출 가능한 표지를 포함하고, 여기서 비절단, 비활성화 상태의 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단에서 C- 말단으로의 구조적 배열을 포함함: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (a) 상기 식에서 MM은 AB의 표적과의 결합을 억제하는 펩티드이고, 상기 식에서 MM은 AB의 자연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 가지지 않으며, AB의 자연 결합 파트너의 변형된 형태가 아니며; 그리고 (b) 비절단 비활성화 상태에서, MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭하고, 절단, 활성화 상태에서 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭 또는 경쟁하지 않음; 및 상기 식에서 검출 가능한 표적은 CM의 절단 후 방출되는 활성화 가능한 항체의 부분 상에 위치됨; 그리고 (ii) 대상체 또는 샘플에서 활성화된 검출 가능한 표지의 수준을 측정하고, 여기서 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 검출 가능한 표지는 절단제가 대상체 또는 샘플에 부재하고/하거나 충분히 존재하지 않는 것을 나타내고, 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 검출 가능한 표지가 없는 것은 절단제가 대상체 또는 샘플에 존재하는 것을 나타냄으로써, 대상체 또는 샘플에서 절단제의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 작용제에 접합되지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 AB 상에 위치된다. 일부 실시형태에서, 대상체 또는 샘플에서 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하는 단계는 활성화된 항체에 특이적으로 결합

합하는 2차 시약을 사용하여 달성되며, 여기서 시약은 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2차 시약은 검출 가능한 표지를 포함하는 항체이다.

[0411] 본 개시내용은 또한 대상체 또는 샘플에서 절단제 및 표적의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, 키트는 적어도 대상체 또는 생물학적 샘플을 접촉하는데 사용하기 위해 본원에 기재된 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체 및 대상체 또는 생물학적 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체의 수준을 검출하기 위한 수단을 포함하고, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 대상체 또는 생물학적 샘플에 절단제 및 표적이 존재함을 나타내며, 그리고 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체가 없는 것은 프로테아제 절단제, 표적 또는 절단제 및 표적 양쪽 모두가 대상체 또는 생물학적 샘플에 부재하고/하거나 충분히 존재하지 않는 것을 나타내어, 활성화 가능한 항체의 표적 결합 및/또는 프로테아제 절단이 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출될 수 없는, 키트를 제공한다.

[0412] 본 개시내용은 또한 (i) 대상체 또는 생물학적 샘플을 표적의 부재 하에 활성화 가능한 항체와 접촉하고, 그리고 (ii) 대상체 또는 생물학적 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하고, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 대상체 또는 생물학적 샘플에 절단제가 존재함을 나타내며, 그리고 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체가 없는 것은 절단제가 대상체 또는 생물학적 샘플에 부재하고/하거나 검출 가능한 수준으로 충분히 존재하지 않는 것을 나타내어, 활성화 가능한 항체의 프로테아제 절단이 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출될 수 없음으로써, 대상체 또는 샘플에서 절단제의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 이러한 활성화 가능한 항체는 마스킹 모이어티(MM), 절단제, 예를 들어, 프로테아제에 의해 절단된 절단성 모이어티(CM), 및 표적과 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)를 포함하며, 여기서 비절단(즉, 비-활성화) 상태의 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단에서 C- 말단으로의 구조적 배열을 포함함: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (a) 상기 식에서, MM은 AB의 표적과의 결합을 억제하는 펩티드이고, 상기 식에서 MM은 AB의 자연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 가지지 않으며; 그리고 (b) 비절단 상태에서, 활성화 가능한 항체의 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭하고, 절단(즉, 활성화) 상태에서 활성화 항체의 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭 또는 경쟁하지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 작용제에 접합되지 않는다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 마스킹 모이어티에 부착된다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 프로테아제 절단 부위의 절단성 모이어티 N-말단에 부착된다. 일부 실시형태에서, AB의 단일 항원 결합 부위가 마스킹된다. 본 개시내용의 항체가 적어도 2개의 항원 결합 부위를 갖는 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 부위는 마스킹되며, 적어도 하나의 항원 결합 부위는 마스킹되지 않는다. 일부 실시형태에서, 모든 항원 결합 부위는 마스킹된다. 일부 실시형태에서, 측정 단계는 검출 가능한 표지를 포함하는 2차 시약의 사용을 포함한다.

[0413] 본 개시내용은 또한 대상체 또는 샘플에서 절단제 및 표적의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, 키트는 대상체 또는 생물학적 샘플을 표적의 존재 하에 활성화 가능한 항체에 접촉하고 대상체 또는 생물학적 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하며, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 대상체 또는 생물학적 샘플에 절단제가 존재함을 나타내며, 그리고 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체가 없는 것은 절단제가 대상체 또는 생물학적 샘플에 부재하고/하거나 검출 가능한 수준으로 충분히 존재하지 않는 것을 나타내어, 활성화 가능한 항체의 프로테아제 절단이 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출될 수 없는 것에 사용하기 위한 본원에 기재된 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체를 적어도 포함하는, 키트를 제공한다. 이러한 활성화 가능한 항체는 마스킹 모이어티(MM), 절단제, 예를 들어, 프로테아제에 의해 절단된 절단성 모이어티(CM), 및 표적과 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)를 포함하며, 여기서 비절단(즉, 비-활성화) 상태의 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단에서 C- 말단으로의 구조적 배열을 포함함: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (a) 상기 식에서, MM은 AB의 표적과의 결합을 억제하는 펩티드이고, 상기 식에서 MM은 AB의 자연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 가지지 않으며; 그리고 (b) 비절단 상태에서, 활성화 가능한 항체의 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭하고, 절단(즉, 활성화) 상태에서 활성화 항체의 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭 또는 경쟁하지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 작용제에 접합되지 않는다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 마스킹 모이어티에 부착된다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 프로테아제 절단 부위의 절단성 모이어티 N-말단에 부착된다. 일부 실시형태에서, AB의 단일 항원 결합 부위가 마스킹된다. 본 개시내용의 항체가 적어도 2개의 항원 결합 부위를 갖는 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 부위는 마스킹되며, 적어

도 하나의 항원 결합 부위는 마스킹되지 않는다. 일부 실시형태에서, 모든 항원 결합 부위는 마스킹된다. 일부 실시형태에서, 측정 단계는 검출 가능한 표지를 포함하는 2차 시약의 사용을 포함한다.

[0414] 본 개시내용은 또한 대상체 또는 샘플에서 절단체의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, 키트는 적어도 대상체 또는 생물학적 샘플을 접촉하는데 사용하기 위해 본원에 기재된 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체 및 대상체 또는 생물학적 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체의 수준을 검출하기 위한 수단을 포함하고, 검출 가능한 표적은 CM의 절단 후 방출되는 활성화 가능한 항체의 부분 상에 위치되는 검출 가능한 표지를 포함하고, 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 절단체가 대상체 또는 생물학적 샘플에 부재하고/하거나 충분히 존재하지 않는 것을 나타내어, 활성화 가능한 항체의 표적 결합 및/또는 프로테아제 절단은 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출될 수 없으며, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체가 없는 것은 절단체가 대상체 또는 생물학적 샘플에 검출 가능한 수준으로 존재하는 것을 나타내는, 키트를 제공한다.

[0415] 본 개시내용은 (i) 대상체 또는 생물학적 샘플을 활성화 가능한 항체와 접촉하고, 활성화 가능한 항체는 CM의 절단 후 방출되는 활성화 가능한 항체의 부분 상에 위치되는 검출 가능한 표지를 포함하며; 그리고 (ii) 대상체 또는 생물학적 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하고, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 대상체 또는 생물학적 샘플에 절단체, 표적, 또는 절단체 및 표적 양쪽 모두가 존재함을 나타내어, 활성화 가능한 항체의 표적 결합 및/또는 프로테아제 절단은 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출될 수 없으며, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 감소된 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 절단체 및 표적이 대상체 또는 생물학적 샘플에 존재하는 것을 나타냄으로써, 대상체 또는 샘플에서 절단체 및 표적의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다가 없는 것은 절단체가 대상체 또는 생물학적 샘플에 부재하고/하거나 검출 가능한 수준으로 충분히 존재하지 않는 것을 나타내어, 활성화 가능한 항체의 프로테아제 절단이 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출될 수 없음으로써, 대상체 또는 샘플에서 절단체의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 검출 가능한 표지의 감소된 수준은, 예를 들어, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 및/또는 약100%의 감소이다. 이러한 활성화 가능한 항체는 마스킹 모이어티 (MM), 절단체에 의해 절단된 절단성 모이어티(CM), 및 표적과 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)를 포함하며, 여기서 비절단(즉, 비-활성화) 상태의 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단에서 C-말단으로의 구조적 배열을 포함함: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (a) 상기 식에서, MM은 AB의 표적과의 결합을 억제하는 펩티드이고, 상기 식에서 MM은 AB의 자연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 가지지 않으며; 그리고 (b) 비절단 상태에서, 활성화 가능한 항체의 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭하고, 절단(즉, 활성화) 상태에서 활성화 항체의 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭 또는 경쟁하지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 작용제에 접합되지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 AB 상에 위치된다. 일부 실시형태에서, 대상체 또는 샘플에서 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하는 단계는 활성화된 항체에 특이적으로 결합하는 2차 시약을 사용하여 달성되며, 여기서 시약은 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2차 시약은 검출 가능한 표지를 포함하는 항체이다.

[0416] 본 개시내용은 또한 대상체 또는 샘플에서 절단체의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, 키트는 적어도 대상체 또는 생물학적 샘플을 접촉하는데 사용하기 위해 본원에 기재된 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체 및 대상체 또는 생물학적 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체의 수준을 검출하기 위한 수단을 포함하고, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 작용제는 대상체 또는 생물학적 샘플에 절단체, 표적, 또는 절단체 및 표적 양쪽 모두가 존재함을 나타내어, 활성화 가능한 항체의 표적 결합 및/또는 프로테아제 절단은 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출될 수 없으며, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 감소된 검출 가능한 수준의 활성화된 활성화 가능한 항체는 절단체 및 표적이 대상체 또는 생물학적 샘플에 존재하는 것을 나타내는, 키트를 제공한다. 검출 가능한 표지의 감소된 수준은, 예를 들어, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 및/또는 약100%의 감소이다.

[0417] 본 개시내용은 또한 (i) 대상체 또는 생물학적 샘플을 활성화 가능한 항체와 접촉하고, 활성화 가능한 항체는 CM의 절단 후 방출되는 활성화 가능한 항체의 부분 상에 위치되는 검출 가능한 표지를 포함하며; 그리고 (ii)

대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 표지의 수준을 측정하고, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출 가능한 수준의 검출 가능한 표지는 절단체가 대상체 또는 생물학적 샘플에 부재하고/하거나 검출 가능한 수준으로 충분히 존재하지 않는 것을 나타내어, 활성화 가능한 항체의 프로테아제 절단이 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출될 수 없으며, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 감소된 검출 가능한 수준의 검출 가능한 표지는 절단체가 대상체 또는 생물학적 샘플에 존재하는 것을 나타냄으로써, 대상체 또는 샘플에서 절단체의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 검출 가능한 표지의 감소된 수준은, 예를 들어, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 및/또는 약 100%의 감소이다. 이러한 활성화 가능한 항체는 마스킹 모이어티(MM), 절단체에 의해 절단된 절단성 모이어티(CM), 및 표적과 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)를 포함하며, 여기서 비절단(즉, 비-활성화) 상태의 활성화 가능한 항체는 다음과 같이 N-말단에서 C- 말단으로의 구조적 배열을 포함함: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (a) 상기 식에서, MM은 AB의 표적과의 결합을 억제하는 펩티드이고, 상기 식에서 MM은 AB의 자연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 가지지 않으며; 그리고 (b) 비절단 상태에서, 활성화 가능한 항체의 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭하고, 절단(즉, 활성화) 상태에서 활성화 항체의 MM은 AB의 표적과의 특이적 결합을 간섭 또는 경쟁하지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 작용제에 접합되지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 AB 상에 위치된다. 일부 실시형태에서, 대상체 또는 샘플에서 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하는 단계는 활성화된 항체에 특이적으로 결합하는 2차 시약을 사용하여 달성되며, 여기서 시약은 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2차 시약은 검출 가능한 표지를 포함하는 항체이다.

[0418] 본 개시내용은 또한 대상체 또는 샘플에서 관심 절단체의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에 사용하기 위한 키트로서, 키트는 적어도 대상체 또는 생물학적 샘플을 접촉하는데 사용하기 위해 본원에 기재된 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체 및 대상체 또는 생물학적 샘플에서 활성화된 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체의 수준을 검출하기 위한 수단을 포함하고, 활성화 가능한 항체는 CM의 절단 후 방출되는 활성화 가능한 항체의 부분 상에 위치되는 검출 가능한 표지를 포함하고, 대상체 또는 샘플에서 검출 가능한 수준의 검출 가능한 표지는 절단체, 표적, 또는 절단체 및 표적 양쪽 모두가 대상체 또는 생물학적 샘플에 부재하고/하거나 충분히 존재하지 않는 것을 나타내어, 활성화 가능한 항체의 표적 결합 및/또는 프로테아제 절단은 대상체 또는 생물학적 샘플에서 검출될 수 없으며, 대상체 또는 생물학적 샘플에서 감소된 검출 가능한 수준의 검출 가능한 표지는 절단체 및 표적이 대상체 또는 생물학적 샘플에 존재하는 것을 나타내는, 키트를 제공한다. 검출 가능한 표지의 감소된 수준은, 예를 들어, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 및/또는 약 100%의 감소이다.

[0419] 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 영상화제, 조영제, 효소, 형광 표지, 발색단, 염료, 하나 이상의 금속 이온, 또는 리간드-기반 표지를 포함한다. 이 방법 및 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 영상화제는 방사성 동위원소를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 방사성 동위원소는 인듐 또는 테크네튬이다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 조영제는 요오드, 가돌리늄 또는 산화철을 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 효소는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제 또는 β -갈락토시다제를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 형광 표지는 황색 형광 단백질(YFP), 시안 형광 단백질(CFP), 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 적색 형광 단백질(mRFP), 적색 형광 단백질 t이량체2(RFP tdimer2), HCRED, 또는 유로퓸 유도체를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 발광 표지는 N-메틸 아크릴레이트 유도체를 포함한다. 이 방법의 일부 실시형태에서, 표지는 Alex Fluor[®] 680 또는 Alex Fluor[®] 750과 같은 Alex Fluor[®] 표지를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 리간드-기반 표지는 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 또는 하나 이상의 합텐을 포함한다.

[0420] 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 대상체는 포유류이다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 비인간 영장류, 반려 동물(예를 들어, 고양이, 개, 말), 농장 동물, 일하는 동물, 또는 동물원 동물과 같은 비인간 포유류이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 설치류이다.

[0421] 이 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 생체 내 방법이다. 이 방법의 일부 실시형태에서, 상기 방법은 인 시튜(*in situ*) 방법이다. 이 방법의 일부 실시형태에서, 상기 방법은 생체 외(*ex vivo*) 방법이다. 이 방법의 일부

실시형태에서, 상기 방법은 시험관 내 방법이다.

- [0422] 일부 실시형태에서, 인 시료 영상화 및/또는 생체 내 영상화는 치료할 환자를 식별하는 방법에 유용하다. 예를 들어, 인 시료 영상화에서, 활성화 가능한 항체는 환자 샘플을 스크리닝하여 적절한 위치, 예를 들어, 종양 부위에서 적절한 프로테아제(들) 및 표적(들)을 갖는 환자를 식별하는데 사용된다.
- [0423] 일부 실시형태에서, 인 시료 영상화는 본 개시내용의 활성화 가능한 항체로의 치료에 적합한 환자 집단을 식별하거나 그렇지 않으면 정제하는데 사용된다. 예를 들어, 표적(예를 들어, 표적) 및 시험되는 활성화 가능한 항체의 절단성 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 프로테아제(예를 들어, 질병 부위에서 활성화된 항체를 추적함) 양쪽 모두에 대해 양성으로 시험된 환자는 이러한 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체로 치료하기에 적합한 후보로서 식별된다. 마찬가지로, 표적(예를 들어, 표적) 및 이들 방법을 사용하여 시험되는 활성화 가능한 항체에서 CM 내에서 기질을 절단하는 프로테아제 중 어느 하나 또는 둘 다에 대해 음성으로 시험된 환자는 다른 형태의 요법에 적합한 후보로 식별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 활성화 항체에 대하여 음성으로 시험된 이러한 환자는 치료에 적합한 활성화 가능한 항체가 식별될 때까지 다른 활성화 가능한 항체(예를 들어, 질병 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체)로 시험될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이후 환자에게 치료적 유효량의 환자가 음성으로 시험된 활성화 가능한 항체가 투여된다.
- [0424] 일부 실시형태에서, 생체 내 영상화는 본 개시내용의 활성화 가능한 항체로의 치료에 적합한 환자 집단을 식별하거나 그렇지 않으면 정제하는데 사용된다. 예를 들어, 표적(예를 들어, 표적) 및 시험되는 활성화 가능한 항체의 절단성 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 프로테아제(예를 들어, 질병 부위에서 활성화된 항체를 추적함) 양쪽 모두에 대해 양성으로 시험된 환자는 이러한 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체로 치료하기에 적합한 후보로서 식별된다. 마찬가지로, 음성으로 시험된 환자는 다른 형태의 요법에 적합한 후보로 식별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 활성화 항체에 대하여 음성으로 시험된 이러한 환자는 치료에 적합한 활성화 가능한 항체가 식별될 때까지 다른 활성화 가능한 항체(예를 들어, 질병 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체)로 시험될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이후 환자에게 치료적 유효량의 환자가 음성으로 시험된 활성화 가능한 항체가 투여된다.
- [0425] 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 방법 또는 키트는 본 개시내용의 활성화 가능한 항체로의 치료에 적합한 환자 집단을 식별하거나 그렇지 않으면 정제하는데 사용된다. 예를 들어, 표적(예를 들어, 표적) 및 이러한 방법에서 시험되는 활성화 가능한 항체의 절단성 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 프로테아제 양쪽 모두에 대해 양성으로 시험된 환자는 이러한 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체로 치료하기에 적합한 후보로서 식별된다. 마찬가지로, 표적(예를 들어, 표적) 및 이들 방법을 사용하여 시험되는 활성화 가능한 항체에서 CM 내에서 기질을 절단하는 프로테아제 중 둘 다에 대해 음성으로 시험된 환자는 다른 형태의 요법에 적합한 후보로 식별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 환자는 치료에 적합한 활성화 가능한 항체가 식별될 때까지 다른 활성화 가능한 항체(예를 들어, 질병 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체)로 시험될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적(예를 들어, 표적) 중 어느 하나에 대해 음성으로 시험된 환자는 이러한 CM을 포함하는 활성화 가능한 이러한 항체로 치료하기에 적합한 후보가 아닌 것으로 식별된다. 일부 실시형태에서, 이러한 환자는 치료에 적합한 활성화 가능한 항체가 식별될 때까지 다른 활성화 가능한 항체(예를 들어, 질병 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체)로 시험될 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 작용제에 접합되지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 AB 상에 위치된다. 일부 실시형태에서, 대상체 또는 샘플에서 활성화 가능한 항체의 수준을 측정하는 단계는 활성화된 항체에 특이적으로 결합하는 2차 시약을 사용하여 달성되며, 여기서 시약은 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2차 시약은 검출 가능한 표지를 포함하는 항체이다.
- [0426] 일부 실시형태에서, 방법 또는 키트는 본 개시내용의 항-표적 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체(예컨대, 치료제가 접합된 활성화 가능한 항체)로 치료에 적합한 환자 집단을 식별 또는 그렇지 않으면 정제한 후에, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 치료하는데 사용된다. 예를 들어, 표적(예를 들어, 표적) 및 이들 방법에서 시험되는 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체의 절단성 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 프로테아제 둘 다에 대해 양성으로 시험된 환자는 이러한 CM을 포함하는 이러한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체로 치료하기에 적합한 후보로 식별되며, 이후 환자는 치료적 유효량의 시험되었던 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능

한 항체가 투여된다. 마찬가지로, 표적(예를 들어, 표적) 및 이들 방법을 사용하여 시험되는 활성화 가능한 항체에서 CM 내에서 기질을 절단하는 프로테아제 중 어느 하나 또는 둘 다에 대해 음성으로 시험된 환자는 다른 형태의 요법에 적합한 후보로 식별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 환자는 치료에 적합한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체가 식별될 때까지 다른 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체(예를 들어, 질병 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체)로 시험될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이후 환자에게 치료적 유효량의 환자가 음성으로 시험되는 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체가 투여된다.

[0427] 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, MM은 약 4 내지 40개의 아미노산 길이를 갖는 펩티드이다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 링커 펩티드를 포함하고, 여기서 링커 펩티드는 MM과 CM 사이에 위치된다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 링커 펩티드를 포함하고, 여기서 링커 펩티드는 AB와 CM 사이에 위치된다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 제1 링커 펩티드(LP1) 및 제2 링커 펩티드(LP2)를 포함하고, 여기서 제1 링커 펩티드는 MM과 CM 사이에 위치되고 제2 링커 펩티드는 AB와 CM 사이에 위치된다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, LP1 및 LP2 각각은 약 1 내지 20개의 아미노산 길이의 펩티드이고, 여기서 LP1 및 LP2는 동일한 링커일 필요는 없다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, LP1 및 LP2 중 하나 또는 둘 다는 글리신-세린 중합체를 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, LP1 및 LP2 중 적어도 하나는 (GS)_n, (GSGGS)_n(서열 번호: 24) 및 (GGGS)_n(서열 번호: 25)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 식에서 n은 적어도 하나의 정수이다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, LP1 및 LP2 중 적어도 하나는 화학식 (GGGS)_n을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 식에서 n은 적어도 하나의 정수이다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, LP1 및 LP2 중 적어도 하나는 Gly-Gly-Ser-Gly(서열 번호: 26), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(서열 번호: 27), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(서열 번호: 28), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(서열 번호: 29), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(서열 번호: 30), 및 Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(서열 번호: 31)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0428] 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, AB는 본원에 제시된 교차-반응성 항체 서열로부터 선택된 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, AB는 Fab 단편, scFv 또는 단일 사슬 항체(scAb)를 포함한다.

[0429] 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, 절단제는 대상체 또는 샘플에서 표적과 공-국소화되는 프로테아제이며, CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드로서, 프로테아제는 활성화 항체가 프로테아제에 노출되는 경우 활성화 가능한 항체에서 CM을 절단한다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, CM은 최대 15개의 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, CM은 AB의 N-말단에 커플링된다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, CM은 AB의 C-말단에 커플링된다. 이 방법 및 키트의 일부 실시형태에서, CM은 AB의 VL 사슬의 N-말단에 커플링된다.

[0430] 본 발명의 항체 펩티드 사슬의 N- 및 C-말단은 일반적으로 관찰된 번역 후 변형으로 인해 본원에 기재된 서열과 상이할 수 있다. 예를 들어, C-말단 리신 잔기는 종종 항체 중쇄에서 누락된다. 문헌[Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132]. N- 말단 글루타민 잔기, 및 더 적은 정도로, 글루타메이트 잔기는 종종 치료 항체의 경쇄 및 중쇄 양쪽 모두에서 피로글루타메이트 잔기로 전환된다. 문헌[Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544]; 문헌[Liu et al. (2011) *JBC* 286:11211]; 문헌[Liu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211]. 따라서, 화학식 (I) 및/또는 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체는 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기가 말단에서 하나 이상의 아미노산이 결여되고, C-말단 리신이 결여되고, 번역 후 프로세싱으로 인해 C-말단 리신이 제거되었거나, C-말단 리신은 리신 이외의 아미노산인 항체 (AB)를 가질 수 있다. 중쇄 불변 영역의 C- 말단 잔기가 리신 이외의 아미노산인 경우, 일 실시형태에서, 이는 일반적으로 이황화 결합을 형성할 수 없거나, 그렇지 않으면 세포독성제와의 접합이 불가능한 아미노산이다.

[0431] 특정 실시형태에서, 화학식 (I) 및/또는 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체는 중쇄 및/또는 경쇄상의 N-말단 글루타메이트가 선택적으로 피로글루타메이트이거나 또는 피로글루 번역 후 변형된 항체(AB)를 가질 수 있다.

[0432] 특정 실시형태에서, 화학식 (I) 및/또는 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체의 중쇄 불변 영역은 C-말단에서 리신 또는 다른 아미노산을 포함하고, 예를 들어, 다음의 마지막 아미노산을 포함한다: 중쇄에 대한 PGK. 특정 실시형태에서, 중쇄 불변 영역은 C-말단에서 하나 이상의 아미노산이 결여되고, 예를 들어, C-말단 서열 PG 또는 P를 갖는다.

- [0433] 특정 실시형태에서, 화학식 (I) 및/또는 화학식 (II)의 접합된 활성화 가능한 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역은 N-말단에서 글루타메이트 또는 피로글루타메이트 아미노산을 포함하고, 예를 들어, 다음의 마지막 아미노산을 포함한다: 경쇄에 대한 pQGQ, 및/또는 중쇄에 대한 pQVQ, 상기 식에서 "pQ"는 피로글루타메이트를 나타낸다.
- [0434] 본 개시내용의 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 진단 및 예방 제형에 사용된다. 일 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 상기 언급된 염증, 염증성 장애, 암 또는 다른 장애 중 하나 이상이 발생할 위험이 있는 환자에게 투여된다.
- [0435] 상기 언급된 장애 중 하나 이상에 대한 환자 또는 기관의 소인은 유전자형, 혈청학적 또는 생화학적 마커를 사용하여 결정될 수 있다.
- [0436] 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체, 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 상기 언급된 장애 중 하나 이상과 연관된 임상 징후로 진단된 인간 개체에게 투여된다. 진단시, 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체, 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 임상 징후의 효과를 완화시키거나 역전시키기 위해 투여된다.
- [0437] 본 개시내용의 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체, 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 또한 환자 샘플에서 표적의 검출에 유용하고 따라서 진단으로서 유용하다. 예를 들어, 본 개시내용의 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 환자 샘플에서 표적 수준을 검출하기 위해 시험관 내 분석, 예를 들어, ELISA에서 사용된다.
- [0438] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 및/또는 활성화 가능한 항체는 고체 지지체(예를 들어, 마이크로타이터 플레이트의 웰(들) 상에 고정된다. 고정된 항체 및/또는 활성화 가능한 항체는 시험 샘플에 존재할 수 있는 임의의 표적에 대한 포획 항체로서 작용한다. 고정된 항체 및/또는 활성화 가능한 항체를 환자 샘플과 접촉시키기 전에, 고체 지지체를 행구고 우유 단백질 또는 알부민과 같은 차단제로 처리하여 분석물의 비특이적 흡착을 방지한다.
- [0439] 이어서, 웰을 항원 함유를 의심하는 시험 샘플 또는 표준량의 항원을 함유하는 용액으로 처리한다. 이러한 샘플은, 예를 들어, 병리의 진단으로 간주되는 순환 항원 수준을 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터의 혈청 샘플이다. 시험 샘플 또는 표준물을 행군 후, 고체 지지체를 검출 가능하게 표지된 제2 항체로 처리한다. 표지된 2 항체는 검출 항체로서 작용한다. 검출 가능한 표지의 수준이 측정되고, 시험 샘플에서 표적 항원의 농도는 표준 샘플로부터 전개된 표준 곡선과 비교함으로써 결정된다.
- [0440] 시험 관내 진단 분석에서 본 개시내용의 항체 및/또는 활성화 가능한 항체를 사용하여 얻은 결과에 기초하여, 표적 항원의 발현 수준에 기초하여 대상체에서 질병을 병기할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 주어진 질병에 대해, 혈액의 샘플은 질병의 진행의 다양한 단계 및/또는 질병의 치료적 처리의 다양한 시점에서 진단된 대상으로부터 채취된다. 각각의 진행 또는 치료 단계에 대해 통계적으로 유의한 결과를 제공하는 샘플 집단을 사용하여, 각 단계의 특징으로 간주될 수 있는 항원의 농도 범위가 지정된다.
- [0441] 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체는 또한 진단 및/또는 영상화 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 시험관 내 방법이다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 생체 내 방법이다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 인 시투 방법이다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 생체 외 방법이다. 예를 들어, 효소적으로 절단 가능한 CM을 갖는 활성화 가능한 항체를 사용하여 CM을 절단할 수 있는 효소의 존재 또는 부재를 검출할 수 있다. 이러한 활성화 가능한 항체는 주어진 숙주 유기체의 주어진 세포 또는 조직에서 활성화된 항체(즉, 활성화 가능한 항체의 절단으로 인한 항체)의 측정된 축적을 통한 효소 활성의 생체 내 검출(예를 들어, 정성적으로 또는 정량적으로)을 포함할 수 있는 진단법 (또는, 일부 실시형태에서, 이항화 결합의 환원을 제공할 수 있는 것과 같은 증가된 환원 전위의 환경)에 사용될 수 있다. 활성화된 항체의 이러한 축적은 조직이 효소 활성 (또는 CM의 성질에 따라 증가된 환원 전위)을 발현할 뿐만 아니라 조직이 활성화된 항체가 결합하는 표적을 발현한다는 것을 나타낸다.
- [0442] 예를 들어, CM은 중앙 부위, 생물학적으로 한정된 부위(예를 들어, 농양에서, 기관에서 등과 같이)에서 바이러스 또는 박테리아 감염 부위 등에서 발견되는 프로테아제에 대한 기질이 되도록 선택될 수 있다. AB는 표적 항원에 결합하는 것일 수 있다. 당업자에게 친숙한 방법을 사용하여, 검출 가능한 표지(예를 들어, 형광 표지 또는 방사성 표지 또는 방사성 추적자)는 활성화 가능한 항체의 AB 또는 다른 영역에 접합될 수 있다. 적합한 검출 가능한 표지가 상기 스크리닝 방법의 맥락에서 논의되고 추가의 특정 예가 하기에 제공된다. 관심 질병 조직

에서 활성이 증가된 프로테아제와 함께 질병 상태의 단백질 또는 펩티드에 특이적인 AB를 사용하여, 활성화 가능한 항체는 CM 특이적인 효소가 검출 가능한 수준으로 존재하거나 질병 조직내 보다 더 낮은 수준으로 존재하거나 또는 비활성인(예를 들어, 자이모겐 형태 또는 억제제와의 복합체에서) 조직에 비하여 질병 조직에서의 결합의 증가된 속도를 보일 것이다. 신장 여과 시스템에 의해 작은 단백질 및 펩티드가 혈액으로부터 신속하게 제거되기 때문에, 그리고 CM에 특이적인 효소가 검출 가능한 수준으로 존재하지 않기 (또는 비-질병 조직에서 더 낮은 수준으로 존재하거나 또는 비활성 입체 형태로 존재하기) 때문에, 질병 조직에서 활성화된 항체의 축적은 비-질병 조직에 비해 향상된다.

[0443] 다른 예에서, 활성화 가능한 항체는 샘플에서 절단제의 존재 또는 부재를 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 활성화 가능한 항체가 효소에 의해 절단에 민감한 CM을 함유하는 경우, 활성화 가능한 항체는 샘플에서 효소의 존재를 (정성적으로 또는 정량적으로) 검출하는데 사용될 수 있다. 다른 예에서, 활성화 가능한 항체가 환원제에 의해 절단에 민감한 CM을 함유하는 경우, 활성화 가능한 항체는 샘플에서 환원 조건의 존재를 (정성적으로 또는 정량적으로) 검출하는데 사용될 수 있다. 이들 방법에서의 분석을 용이하게 하기 위해, 활성화 가능한 항체는 검출 가능하게 표지될 수 있고, 지지체(예를 들어, 슬라이드 또는 비드와 같은 고체 지지체)에 결합될 수 있다. 검출 가능한 표지는 절단 후 방출되지 않는 활성화 가능한 항체의 일부 상에 위치될 수 있으며, 예를 들어, 검출 가능한 표지는 퀴칭된 형광 표지 또는 절단이 발생할 때까지 검출할 수 없는 다른 표지일 수 있다. 분석은 예를 들어 고정화되고 검출 가능하게 표지된 활성화 가능한 항체를 효소 및/또는 환원제를 함유하는 것으로 의심되는 샘플과 절단이 발생하기에 충분한 시간 동안 접촉한 후 세척하여 과량의 샘플 및 오염물을 제거함으로써 수행될 수 있다. 이후, 샘플에서 절단제(예를 들어, 효소 또는 환원제)의 존재 또는 부재는 샘플과 접촉하기 전에 활성화 가능한 항체의 검출 가능한 신호의 변화, 예를 들어, 샘플에서 절단제에 의한 활성화 가능한 항체의 절단으로 인한 검출 가능한 신호의 존재 및/또는 검출 가능한 신호의 증가에 의해 평가된다.

[0444] 이러한 검출 방법은 또한 절단될 때 활성화 가능한 항체의 AB에 결합할 수 있는 표적의 존재 또는 부재의 검출을 제공하도록 구성될 수 있다. 따라서, 분석은 절단제의 존재 또는 부재 및 관심 표적의 존재 또는 부재를 평가하도록 구성될 수 있다. 절단제의 존재 또는 부재는 상기 기재된 바와 같은 활성화 가능한 항체의 검출 가능한 표지의 존재 및/또는 검출 가능한 표지의 증가에 의해 검출될 수 있고, 표적의 존재 또는 부재는 표적-AB 복합체의 검출에 의해 검출, 예를 들어, 검출 가능하게 표지된 항-표적 항체의 사용에 의해 검출될 수 있다.

[0445] 활성화 가능한 항체는 또한 예를 들어, 프로테아제 절단에 의한 활성화 가능한 항체 활성화의 확인 및 특정 표적에 대한 결합을 위한 인 시튜 이미징에 유용하다. 인 시튜 이미징은 세포 배양 또는 조직 섹션과 같은 생물학적 샘플에서 단백질 분해 활성 및 표적의 국소화를 가능하게 하는 기법이다. 이 기법을 사용하여, 검출 가능한 표지(예를 들어, 형광 표지)의 존재에 기초하여 주어진 표적에 대한 결합 및 단백질 분해 활성 양쪽 모두를 식별할 수 있다.

[0446] 이들 기법은 질병 부위(예를 들어, 종양 조직) 또는 건강한 조직으로부터 유래된 임의의 냉동 세포 또는 조직에 유용하다. 이들 기법은 또한 신선한 세포 또는 조직 샘플에 유용하다.

[0447] 이들 기법에서, 활성화 가능한 항체는 검출 가능한 표지로 표지된다. 검출 가능한 표지는 형광 염료(예를 들어, 형광단, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민 이소티오시아네이트(TRITC)), 근적외선(NIR) 염료(예를 들어, Qdot® 나노크리스탈), 콜로이드 금속, 합텐, 방사성 마커, 비오틴 및 스트렙타비딘과 같은 증폭 시약, 또는 효소(예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제)일 수 있다.

[0448] 표지된 활성화 가능한 항체와 함께 배양된 샘플에서 표지의 검출은 샘플이 표적을 함유하고 활성화 가능한 항체의 CM에 특이적인 프로테아제를 함유한다는 것을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 프로테아제의 존재는 본원에 기재된 것과 같은 광범위의 프로테아제 억제제를 사용하고/하거나 프로테아제에 특이적인 작용제, 예를 들어, 프로테아제 매트립타제에 특이적이고 매트립타제의 단백질 분해 활성을 억제하는 A11과 같은 항체를 사용하여 확인될 수 있다; 예를 들어, 2010년 11월 11일자로 공개된 국제공개 WO 2010/129609호 참조. 본원에 기재된 것과 같은 광범위의 프로테아제 억제제를 사용하고/하거나 보다 선택적인 억제제를 사용하는 것과 동일한 접근법은 활성화 가능한 항체의 CM에 특이적인 프로테아제 또는 부류를 식별하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적의 존재는 표적에 특이적인 작용제, 예를 들어 다른 항체를 사용하여 확인될 수 있거나, 검출 가능한 표지는 표지되지 않은 표적과 경쟁할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표지되지 않은 활성화 가능한 항체가 표지된 2차 항체 또는 보다 복잡한 검출 시스템에 의한 검출과 함께 사용될 수 있다.

[0449] 대상체, 예를 들어, 인간을 포함한 포유류에서 형광 신호의 검출이 질병 부위가 표적을 포함하고 활성화 가능한 항체의 CM에 특이적인 프로테아제를 함유하는 것을 나타내는 경우 유사한 기법이 또한 생체 내 영상화에 유용하다

다.

- [0450] 이들 기법은 또한 활성화 가능한 항체에서 프로테아제-특이적 CM에 기초한 다양한 세포, 조직 및 유기체에서 프로테아제 활성의 검출, 동정 또는 특성화를 위한 키트에서 및/또는 이를 위한 시약으로서 유용하다.
- [0451] 일부 실시형태에서, 인 시튜 영상화 및/또는 생체 내 영상화는 치료할 환자를 식별하는 방법에 유용하다. 예를 들어, 인 시튜 영상화에서, 활성화 가능한 항체는 환자 샘플을 스크리닝하여 적절한 위치, 예를 들어, 중앙 부위에서 적절한 프로테아제(들) 및 표적(들)을 갖는 환자를 식별하는데 사용된다.
- [0452] 일부 실시형태에서, 인 시튜 영상화는 본 개시내용의 활성화 가능한 항체로의 치료에 적합한 환자 집단을 식별하거나 그렇지 않으면 정제하는데 사용된다. 예를 들어, 표적 및 시험되는 활성화 가능한 항체의 절단성 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 프로테아제(예를 들어, 질병 부위에서 활성화된 항체를 축적함) 양쪽 모두에 대해 양성으로 시험된 환자는 이러한 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체로 치료하기에 적합한 후보로서 식별된다. 마찬가지로, 표적 및 이들 방법을 사용하여 시험되는 활성화 가능한 항체에서 CM 내에서 기질을 절단하는 프로테아제 중 어느 하나 또는 둘 다에 대해 음성으로 시험된 환자는 다른 형태의 요법에 적합한 후보로 식별될 수 있다(즉, 시험되는 활성화 가능한 항체로 치료에 적합하지 않음). 일부 실시형태에서, 제1 활성화 항체에 대하여 음성으로 시험된 이러한 환자는 치료에 적합한 활성화 가능한 항체가 식별될 때까지 다른 활성화 가능한 항체(예를 들어, 질병 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체)로 시험될 수 있다.
- [0453] 일부 실시형태에서, 생체 내 영상화는 본 개시내용의 활성화 가능한 항체로의 치료에 적합한 환자 집단을 식별하거나 그렇지 않으면 정제하는데 사용된다. 예를 들어, 표적 및 시험되는 활성화 가능한 항체의 절단성 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 프로테아제(예를 들어, 질병 부위에서 활성화된 항체를 축적함) 양쪽 모두에 대해 양성으로 시험된 환자는 이러한 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체로 치료하기에 적합한 후보로서 식별된다. 마찬가지로, 음성으로 시험된 환자는 다른 형태의 요법에 적합한 후보로 식별된다(즉, 시험되는 활성화 가능한 항체로의 치료에 적합하지 않음). 일부 실시형태에서, 제1 활성화 항체에 대하여 음성으로 시험된 이러한 환자는 치료에 적합한 활성화 가능한 항체가 식별될 때까지 다른 활성화 가능한 항체(예를 들어, 질병 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 활성화 가능한 항체)로 시험될 수 있다.

[0454] 약학적 조성물

[0455] 본 개시내용의 항체, 접합된 항체, 활성화 가능한 항체, 및/또는 접합된 활성화 가능한 항체(본원에서 "활성 화합물"로도 지칭됨), 및 이의 유도체, 단편, 유사체 및 상 동체는 투여에 적합한 약학적 조성물에 혼입 될 수 있다.

[0456] 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 경구 또는 비경구 조성물을 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단위 투여량으로 적합한 물리적 이산 단위를 지칭하고; 필요한 약학적으로 허용가능한 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성화 화합물을 함유하는 각각의 단위. 본 개시내용의 투여 단위 형태에 대한 명세서는 활성화 화합물의 고유한 특성 및 달성될 특정 치료 효과 및 개인의 치료용 이러한 활성화 화합물을 배합하는 기술에 내재된 한계에 의해 지시되고 이에 직접적으로 의존한다.

[0457] 약학적 조성물은 투여 지침서와 함께 용기, 팩, 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.

[0458] 본 발명은 청구 범위에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는 하기 열거된 실시형태 및 실시예에서 추가로 설명될 것이다.

[0459] **열거된 실시형태**

[0460] 본 발명은 하기 열거된 예시적인 실시형태를 참조하여 정의될 수 있다.

[0461] **세트 I**

[0462] I-1. 하기를 포함하는 접합된 활성화 항체:

[0463] (A) 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 비절단 상태로 포함하는 활성화 가능한 항체(AA): MM-CM-AB, 상기 식에서:

[0464] (i) AB는 포유류 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 7의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체임;

- [0465] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스크 모이어티이고, 상기 AB에 커플링된 상기 MM은 상기 접합된 활성화 항체가 비절단 상태인 경우 상기 AB의 CD71과의 결합을 억제함;
- [0466] (iii) CM은 상기 AB에 커플링된 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프 로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드임; 및
- [0467] (b) 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 상기 활성화 가능한 항체는 2 당량의 MMAE에 접합된다.
- [0468] I-2. 화학식 AA-(AG)_p를 갖는 접합된 활성화 가능한 항체를 포함하는 조성물, 상기 식에서
- [0469] (A) AA는 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열을 비절단 상태로 포함하는 활성화 가능한 항체 임: MM-CM-AB, 상기 식에서:
- [0470] (i) AB는 포유류 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 7의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체임,
- [0471] (ii) MM은 서열 번호: 18의 서열을 포함하는 마스크 모이어티이고, 상기 AB에 커플링된 상기 MM은 상기 접합된 활성화 항체가 비절단 상태인 경우 상기 AB의 CD71과의 결합을 억제함, 그리고
- [0472] (iii) CM은 상기 AB에 커플링된 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프 로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드임; 및
- [0473] (b) AG는 상기 AA에 접합된 작용제이고, 상기 작용제는 MMAE이며, p는 2이다.
- [0474] I-3. 적어도 하나의 MMAE를 활성화 가능한 항체(AA)에 접합함으로써 p는 1 내지 8인 AA-(MMAE)_p를 포함하는 조성물을 생성하는 단계; 및 (b) p는 2인 상기 접합된 활성화 가능한 항체 종을 위한 조성물을 농축하되, AA는 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열: MM-CM-AB을 비절단 상태로 포함하는 단계를 포함하는 방법, 상기 식에서
- [0475] (i) AB는 포유류 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 7의 경쇄 가 변 영역 서열을 포함하는 항체임,
- [0476] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스크 모이어티이고, 상기 AB에 커플링된 상기 MM은 상 기 접합된 활성화 항체가 비절단 상태인 경우 상기 AB의 CD71과의 결합을 억제함, 그리고
- [0477] (iii) CM은 상기 AB에 커플링된 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제 에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드이다.
- [0478] I-4. 상기 실시형태 I-1에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3에 있어서, 상 기 AB는 서열 번호: 20의 중쇄 서열을 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0479] I-5. 상기 실시형태 I-1에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3에 있어서, 상 기 AB는 서열 번호: 167의 중쇄 서열을 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0480] I-6. 상기 실시형태 I-1, I-4 및 I-5 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2, I-4, 및 I-5 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-5 중 어느 하나에 있어서, 상기 AB는 서열 번호: 19의 경쇄 서 열을 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0481] I-7. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-6 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-6 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-6 중 어느 하나에 있어서, 상기 AA는 상기 AB 및 상기 MM 사이에 결합 펩티드 LP1을 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0482] I-8. 상기 실시형태 I-7에 있어서, 상기 LP1은 GGGSSGGGS(서열 번호: 207)의 아미노산 서열을 포함하는, 접합 된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0483] I-9. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-8 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-8 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-8 중 어느 하나에 있어서, 상기 AA는 상기 AB 및 상기 CM 사이에 결합 펩티드 LP2를 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0484] I-10. 상기 실시형태 I-9에 있어서, 상기 LP2는 GGS(서열 번호: 38)의 아미노산 서열을 포함하는, 접합된 활 성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.

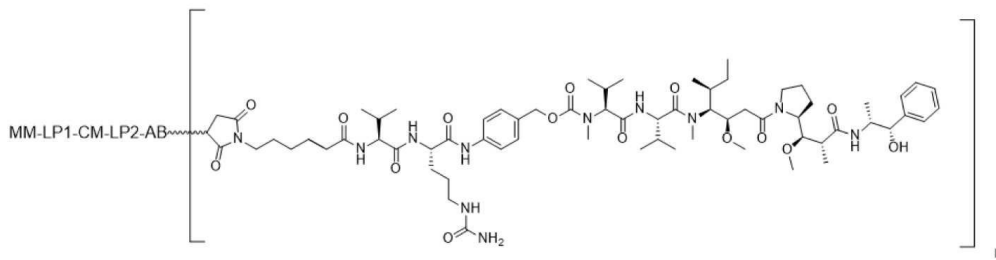
- [0485] I-11. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-10 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-10 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-10 중 어느 하나에 있어서, 상기 AA는 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하며, 상기 AA는 다음과 같이 N-말단으로부터 C-말단으로의 구조적 배열: MM-LP1-CM-LP2-AB를 비절단 상태로 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0486] I-12. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-11 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-4 내지 I-11 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-11 중 어느 하나에 있어서, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 138 및 143 내지 145, 및 GQG로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이스 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0487] I-13. 실시형태 I-12에 있어서, 상기 스페이스 서열은 상기 MM으로의 N-말단인, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0488] I-14. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 201의 경쇄 서열을 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0489] I-15. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 202의 경쇄 서열을 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0490] I-16. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 169의 경쇄 서열을 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0491] I-17. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-13 중 어느 하나에 있어서, 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 170의 경쇄 서열을 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0492] I-18. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-17 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-17 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-17 중 어느 하나에 있어서, 상기 AB는 인간 CD71 및 시노물구스 원숭이 CD71과 특이적으로 결합하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0493] I-19. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-18 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-18 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-18 중 어느 하나에 있어서, 상기 MM은 상기 AB의 CD71과의 해리 상수 초과인 상기 AB와 결합하기 위한 해리 상수를 갖는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0494] I-20. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-19 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-19 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-19 중 어느 하나에 있어서, 상기 MM은 상기 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우 CD71에 결합하기 위해 상기 AB를 간섭하거나 AB와 경쟁하지 않는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0495] I-21. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-20 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-20 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-20 중 어느 하나에 있어서, 상기 MM은 40개 이하의 아미노산 길이의 폴리펩티드인, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0496] I-22. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-21 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-21 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-21 중 어느 하나에 있어서, 상기 CM은 병든 조직에서 활성인 프로테아제에 대한 기질인, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0497] I-23. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-22 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-22 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-22 중 어느 하나에 있어서, 상기 작용제는 링커를 통해 상기 AB에 접합된, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0498] I-24. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-23 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-23 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-23 중 어느 하나에 있어서, 상기 작용제는 링커를 통해 상기 AB에 접합된, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.

- [0499] I-25. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-24 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-24 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-24 중 어느 하나에 있어서, 상기 작용제가 상기 AB 에 접합된 링커는 말레이미드 카프로일-발린-시트룰린 모이어터를 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0500] I-26. 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-25 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-25 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-25 중 어느 하나에 있어서, 상기 작용제가 상기 AB 에 접합된 링커는 말레이미드 카프로일-발린-시트룰린 파라 아미노벤질옥시카르보닐 모이어터를 포함하는, 접합된 활성화 가능한 항체, 또는 조성물, 또는 방법.
- [0501] I-27. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 적어도 50%는 p가 2인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.
- [0502] I-28. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 적어도 75%는 p가 2인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.
- [0503] I-29. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 적어도 90%는 p가 2인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.
- [0504] I-30. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 적어도 95%는 p가 2인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.
- [0505] I-31. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 적어도 98%는 p가 2인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.
- [0506] I-32. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, p가 1 또는 3 내지 8인 조성물의 접합된 활성화 가능한 항체 종의 각각의 당량은 p가 2인 조성물의 접합된 활성화 가능한 항체 종의 당량 미만인, 조성물 또는 방법.
- [0507] I-33. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, p가 1 또는 3 내지 8인 조성물의 접합된 활성화 가능한 항체 종의 각각의 당량은 p가 2인 조성물의 접합된 활성화 가능한 항체 종의 당량 미만인, 조성물 또는 방법.
- [0508] I-34. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 50% 미만은 p가 1 또는 3 내지 8인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.
- [0509] I-35. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 25% 미만은 p가 1 또는 3 내지 8인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.
- [0510] I-36. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 10% 미만은 p가 1 또는 3 내지 8인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.
- [0511] I-37. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 5% 미만은 p가 1 또는 3 내지 8인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.
- [0512] I-38. 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 또는 상기 실시형태 I-3 내지 I-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물의 상기 접합된 활성화 가능한 항체의 2% 미만은 p가 1 또는 3 내지 8인 경우의 종인, 조성물 또는 방법.

- [0513] I-39. 하기를 포함하는 약학적 조성물:
- [0514] 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-38 중 어느 하나의 조성물; 및 담체.
- [0515] I-40. 치료적 유효량의 상기 실시형태 I-1 및 I-4 내지 I-26 중 어느 하나의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 상기 실시형태 I-2 및 I-4 내지 I-38 중 어느 하나의 조성물 또는 상기 실시형태 I-39의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료, 암의 증상을 완화하거나 암의 진행을 지연하는 방법.
- [0516] I-41. 상기 실시형태 I-40에 있어서, 상기 암은 위암인 방법.
- [0517] I-42. 상기 실시형태 I-40에 있어서, 상기 암은 난소암인 방법.
- [0518] I-43. 상기 실시형태 I-40에 있어서, 상기 암은 식도암인 방법.
- [0519] I-44. 상기 실시형태 I-40에 있어서, 상기 암은 비소세포성 폐암인 방법.
- [0520] I-45. 상기 실시형태 I-40에 있어서, 상기 암은 유방암인 방법.
- [0521] I-46. 상기 실시형태 I-40에 있어서, 상기 암은 대장암인 방법.
- [0522] I-47. 상기 실시형태 I-40에 있어서, 상기 암은 흑색종인 방법.
- [0523] I-48. 상기 실시형태 I-40에 있어서, 상기 암은 전립선암인 방법.
- [0524] I-49. 상기 실시형태 I-40에 있어서, 상기 암은 중피종인 방법.

[0525] **세트 II**

- [0526] II-1. 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체:



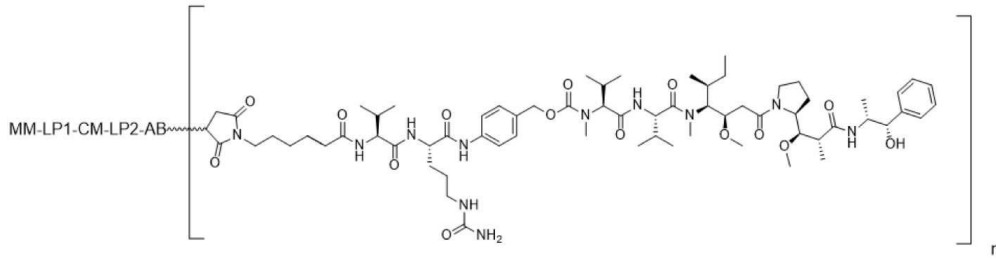
화학식 (I)

- [0527] (a) 상기 식에서,
- [0528] (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하고 하기를 포함하는 항체임
- [0529] i. 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2, 및 서열 번호: 11을 포함하는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0530] ii. 서열 번호: 12 또는 서열 번호:13을 포함하는 CDRL1, 서열 번호: 14을 포함하는 CDRL2, 및 서열 번호: 15을 포함하는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0531] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티이고, 상기 MM은 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비결단 상태인 경우 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제함;
- [0532] (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티임;
- [0533] (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드임; 및
- [0534] (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티임; 및
- [0535] (b) "n"은 2이다.
- [0536]

[0537] II-2. 상기 실시형태 II-1에 있어서, 상기 AB는 IgG1 동형을 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체.

[0538] II-3. 상기 실시형태 II-1 또는 II-2에 있어서, 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아닌 접합된 활성화 가능한 항체.

[0539] II-4. 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체:



화학식 (I)

[0540] (a) 상기 식에서,

[0542] (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 7의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체임;

[0543] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티이고, 상기 MM은 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비결단 상태인 경우 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제함;

[0544] (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티임;

[0545] (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드임; 및

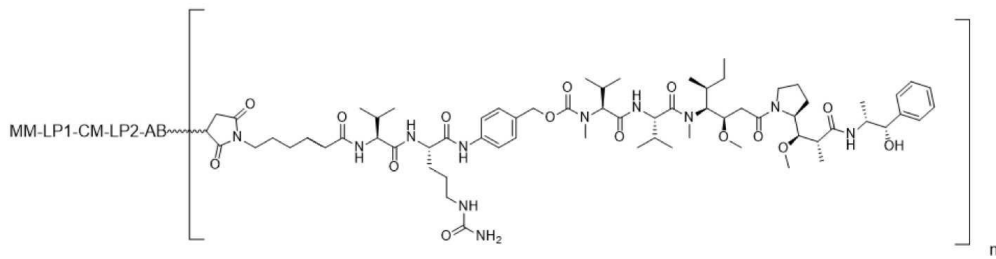
[0546] (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티임; 및

[0547] (b) "n"은 2이다.

[0548] II-5. 상기 실시형태 II-4에 있어서, 상기 AB는 IgG1 동형을 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체.

[0549] II-6. 상기 실시형태 II-4 또는 II-5에 있어서, 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아닌 접합된 활성화 가능한 항체.

[0550] II-7. 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체:



화학식 (I)

[0551] (a) 상기 식에서,

[0553] (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 167의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 19의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체임;

[0554] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티이고, 상기 MM은 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비결단 상태인 경우 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제함;

[0555] (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티임;

[0556] (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질

로서 기능하는 폴리펩티드임; 및

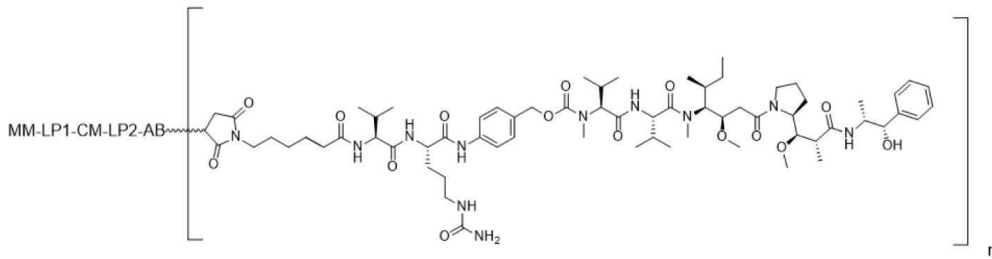
[0557] (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티임; 및

[0558] (b) "n"은 2이다.

[0559] II-8. 상기 실시형태 II-7에 있어서, 상기 AB는 IgG1 동형을 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체.

[0560] II-9. 상기 실시형태 II-7 또는 II-8에 있어서, 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아닌 접합된 활성화 가능한 항체.

[0561] II-10. 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체:



화학식 (I)

[0562]

[0563] 상기 식에서, MM-LP1-CM-LP2-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체임,

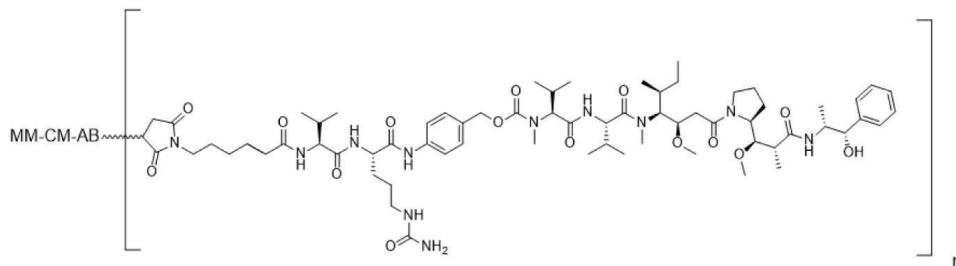
[0564] 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 170의 서열을 포함하는 경쇄를 포함함, 및

[0565] "n"은 2이다.

[0566] II-11. 상기 실시형태 II-10에 있어서, 상기 AB는 IgG1 동형을 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체.

[0567] II-12. 상기 실시형태 II-10 또는 II-11에 있어서, 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아닌 접합된 활성화 가능한 항체.

[0568] II-13. 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체:



화학식 (II)

[0569]

[0570] (a) 상기 식에서,

[0571] (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하고 하기를 포함하는 항체임

[0572] i. 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2, 및 서열 번호: 11을 포함하는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0573] ii. 서열 번호: 12 또는 서열 번호:13을 포함하는 CDRL1, 서열 번호: 14을 포함하는 CDRL2, 및 서열 번호: 15을 포함하는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0574] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티이고, 상기 MM은 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제함; 및

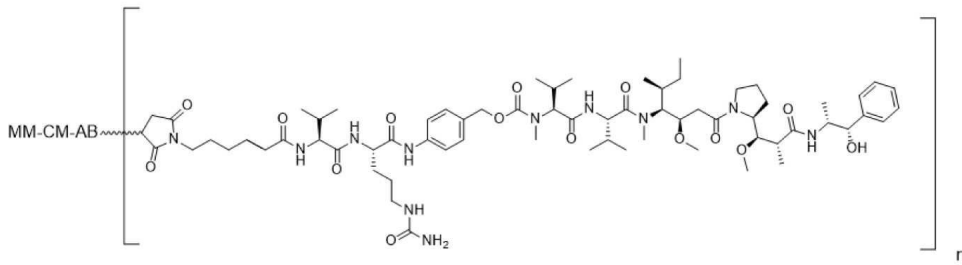
[0575] (iii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드임; 및

[0576] (b) "n"은 2이다.

[0577] II-14. 상기 실시형태 II-13에 있어서, 상기 AB는 IgG1 동형을 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체.

[0578] II-15. 상기 실시형태 II-13 또는 II-14에 있어서, 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아닌 접합된 활성화 가능한 항체.

[0579] II-16. 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체:



화학식 (II)

[0580] (a) 상기 식에서,

[0582] (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 7의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체임;

[0583] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티이고, 상기 MM은 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제함; 및

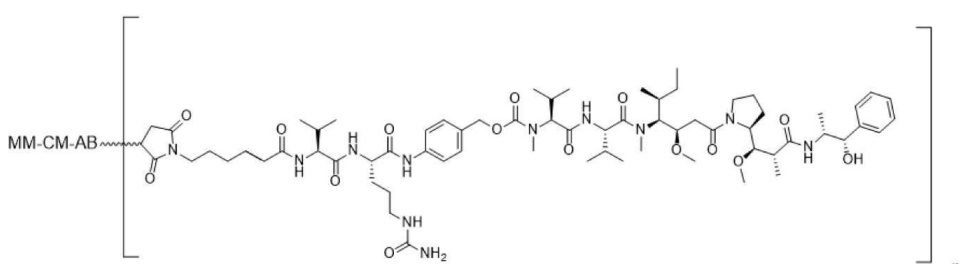
[0584] (iii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드임; 및

[0585] (b) "n"은 2이다.

[0586] II-17. 상기 실시형태 II-16에 있어서, 상기 AB는 IgG1 동형을 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체.

[0587] II-18. 상기 실시형태 II-16 또는 II-17에 있어서, 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아닌 접합된 활성화 가능한 항체.

[0588] II-19. 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체:



화학식 (II)

[0590] (a) 상기 식에서,

[0591] (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하며, 서열 번호: 167의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호: 19의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체임;

[0592] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티이고, 상기 MM은 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제함; 및

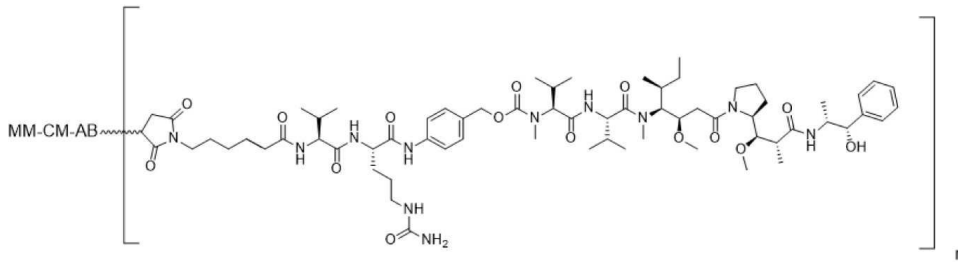
[0593] (iii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드임; 및

[0594] (b) "n"은 2이다.

[0595] II-20. 상기 실시형태 II-19에 있어서, 상기 AB는 IgG1 동형을 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체.

[0596] II-21. 상기 실시형태 II-19 또는 II-20에 있어서, 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아닌 접합된 활성화 가능한 항체.

[0597] II-22. 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체:



화학식 (II)

[0598] 상기 식에서, MM-CM-AB는 활성화 가능한 항체이고, 상기 AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하는 항체임,

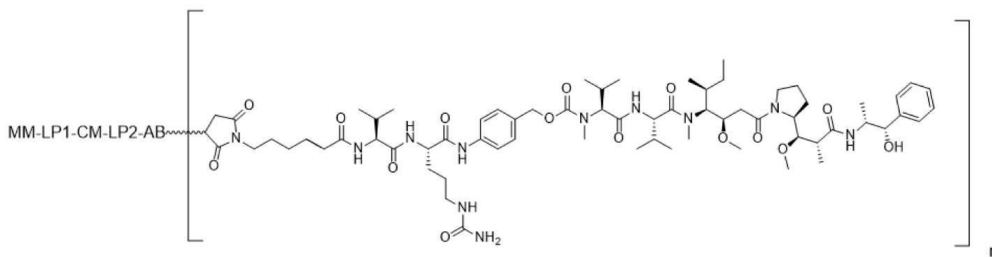
[0600] 상기 활성화 가능한 항체는 서열 번호: 167의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 169의 서열을 포함하는 경쇄를 포함함, 및

[0601] "n"은 2이다.

[0602] II-23. 상기 실시형태 II-22에 있어서, 상기 AB는 IgG1 동형을 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체.

[0603] II-24. 상기 실시형태 II-22 또는 II-23에 있어서, 상기 AB는 중쇄 불변 영역을 갖는 항체이고, 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기는 리신이 아닌 접합된 활성화 가능한 항체.

[0604] II-25. 화학식 (I) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제조하는 방법:



화학식 (I)

[0605] (a) 상기 식에서,

(i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하고 하기를 포함하는 항체임

[0608] i. 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2, 및 서열 번호: 11을 포함하는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0609] ii. 서열 번호: 12 또는 서열 번호:13을 포함하는 CDRL1, 서열 번호: 14을 포함하는 CDRL2, 및 서열 번호: 15을 포함하는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0610] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티이고, 상기 MM은 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비절단 상태인 경우 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제함;

[0611] (iii) LP1은 서열 번호: 207의 아미노 서열을 포함하는 제1 연결 모이어티임;

[0612] (iv) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질

로서 기능하는 폴리펩티드임; 및

[0613] (v) LP2는 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 제2 연결 모이어티임;

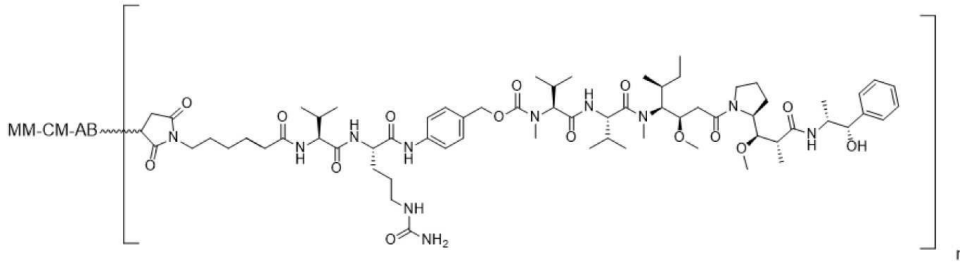
[0614] 및 "n"은 2임;

[0615] (b) 상기 방법은

[0616] (i) MM-LP1-CM-LP2-AB을 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및

[0617] (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 항체에 접합하는 단계를 포함한다.

[0618] II-26. 화학식 (II) 또는 이의 염의 구조를 포함하는 접합된 활성화 가능한 항체를 제조하는 방법:



화학식 (II)

[0619]

[0620] (a) 상기 식에서,

[0621] (i) AB는 인간 CD71과 특이적으로 결합하고 하기를 포함하는 항체임

[0622] i. 서열 번호: 9를 포함하는 CDRH1 서열, 서열 번호: 10을 포함하는 CDRH2, 및 서열 번호: 11을 포함하는 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0623] ii. 서열 번호: 12 또는 서열 번호:13을 포함하는 CDRL1, 서열 번호: 14을 포함하는 CDRL2, 및 서열 번호: 15을 포함하는 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0624] (ii) MM은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 마스킹 모이어티이고, 상기 MM은 상기 접합된 활성화 가능한 항체가 비결단 상태인 경우 상기 AB의 인간 CD71과의 결합을 억제함;

[0625] (ii) CM은 서열 번호: 156의 서열을 포함하는 절단성 모이어티이고, 상기 CM은 프로테아제에 대한 기질로서 기능하는 폴리펩티드임; 및

[0626] 및 "n"은 2임;

[0627] (b) 상기 방법은

[0628] (i) MM-CM-AB을 포함하는 활성화 가능한 항체를 환원제로 환원하는 단계; 및

[0629] (ii) 하나 이상의 vcMMAE를 상기 환원된 활성화 항체에 접합하는 단계를 포함한다.

[0630] II-27. 상기 실시형태 II-1 내지 II-24 중 어느 하나의 접합된 활성화 가능한 항체; 및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

[0631] II-28. 위암, 난소암, 식도암, 비소세포성 폐암, ER+ 유방암, 삼중 음성 유방암, 대장암, 흑색종, 전립선암, 다발골수종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 두경부 소세포 암종, 췌장암, 중피종, 비호킨스 림프종, 간세포암종, 및 교모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된 암에 대하여, 치료학적 유효량의 상기 실시형태 II-1 내지 II-24 중 어느 하나의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 상기 실시형태 II-27의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하고, 암의 증상을 완화하거나 암의 진행을 지연하는 방법.

[0632] II-29. 약제로서 사용을 위한, 상기 실시형태 II-1 내지 II-24 중 어느 하나의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 상기 실시형태 II-27의 약학적 조성물.

[0633] II-30. 암의 치료에 사용을 위한 상기 실시형태 II-1 내지 II-24 중 어느 하나의 접합된 활성화 가능한 항체 또는 상기 실시형태 II-27의 약학적 조성물로서, 선택적으로, 상기 암은 위암, 난소암, 식도암, 비소세포성 폐

암, ER+ 유방암, 삼중 음성 유방암, 대장암, 흑색종, 전립선암, 다발골수종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 두경부 소세포 암종, 췌장암, 중피종, 비호킨스 림프종, 간세포암종, 및 교모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0634] 실시예

[0635] 실시예 1. 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체(AADC)

[0636] 본원에 제공된 연구는 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체 중 일부를 제조하도록 설계되었다.

[0637] 그 전체 내용이 본원에 인용되어 포함된 미국 특허출원 US 2016/0355599 A1호에 기재된 바와 같이, 항-CD71 M21 단일클론성 항체는 당업계에서 공지된 기법에 따라 마우스 하이브리도마 기술을 사용하여 획득되었다. 마우스를 인간 CD71 세포의 도메인(ECD)으로 면역시키고, 후속 하이브리도마를 세포독성 피기백(piggyback) 분석을 사용하여 스크리닝하고, 이 분석으로부터의 세포독성 양성 클론을 ELISA에 확인하여 인간 CD71 ECD 폴리펩티드에 결합하고 FACS에 의해 세포 표면에 결합하는 것을 확인 하였다. 항-CD71 M21 단일클론성 항체는 서열 번호: 1의 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열 번호: 2의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.

[0638] 항-CD71 마우스 단일클론성 항체 M21에 기초한 하기 인간화 항-CD71 항체를 또한 시험하였다: Ab21.10 LcB:HcA (서열 번호: 3의 VH 및 서열 번호: 7의 VL), Ab21.11 LcB:HcB (서열 번호: 4의 VH 및 서열 번호: 7의 VL), Ab21.12 LcB:HcC (서열 번호: 5의 VH 및 서열 번호: 7의 VL), 및 M21 (서열 번호: 1의 VH 및 서열 번호: 2의 VL). 세포 표면 CD71에 결합하는 본 개시내용의 다양한 항-CD71 항체의 능력을 FACS에 의해 확인하였다.

[0639] 모든 인간화된 항-CD71 항체는 CD71 M21 마우스 항체에 의해 입증된 결합에 필적하는 인간 및 시노물구스 CD71에 대한 결합을 나타냈다. 인간화된 항-CD71 항체의 결합을 FACS에 의해 BxPC3 세포주 상에서 확인하였다. 간략하게, BxPC3 세포를 지지된 농도에서 마우스 단일클론성 Mab21 또는 huCD71 (Ab21.10, Ab21.11 및 Ab21.12) 항체로 표지하고, 이어서 Alexa Fluor 647 표지된 염소 항-마우스 또는 항-인간 IgG Alexa Fluor 647로 검출하였다.

[0640] 예시적인 연구에서, 인간, 시노물구스 원숭이, 원숭이, 및 랫트 소스로부터 제조된 CD71(ELISA 사용) 및 CD71-발현 세포(유동 세포 계측법 사용)에 대한 항-CD71 Ab21.12 LcB:HcC(서열 번호: 5의 VH 및 서열 번호: 7의 VL)의 결합 활성을 측정하였다. 표 1의 예시적인 결과에 나타난 바와 같이, 항-CD71 항체는 ELISA에 의해 측정된 바와 같은 동등한 친화도로 인간 및 원숭이 제조된 CD71에 결합하였으며, 이는 인간 홀로-트랜스페린의 인간 CD71에 대한 친화도와 동일하였다. 항체는 유동 세포 계측법에 의해 측정된 바와 같이 동등한 친화도로 인간 및 원숭이 CD71-발현 세포주(각각 인간 BxPC3 췌장암 세포 및 시노물구스 원숭이 1차 신장 상피 세포)에 결합하였다. 항-CD71 항체에 의한 유의한 결합을 제조된 마우스 CD71 또는 랫트 CD71-발현 세포주(레이트(rate) H-4-11-E 간암 세포)에 대해 측정하지 않았다.

표 1: ELISA 및 유동 세포 계측법에 의해 인간, 원숭이, 랫트, 및 마우스 CD71에 대한 항-CD71의 결합 및 ELISA에 의해 인간 CD71에 대한 홀로-트랜스페린의 결합

시험 물질	CD71 종	ELISA (ECD)	유동 세포 계측법 (세포주)
		K _{app} (nM)	K _{app} (nM)
항-CD71 Ab21.12 항체	인간	0.3	3.0
	원숭이	0.4	3.0
	랫트	미시험	미결합
	마우스	미결합	미시험
*홀로-트랜스페린	인간	0.5	미시험

[0641]

[0642] 실시예 2. 마스크 발견

[0643] 본원에 제공된 연구는 본 개시내용의 활성화 가능한 항-CD71 항체에 사용하기 위한 마스크 모이어티를 식별하고 특성화 하도록 설계되었다.

[0644] 미국 특허출원 US 2016/0355599 A1호에 기재된 바와 같이, 2010년 7월 15일자로 공개된 국제 공개 WO 2010/081173호에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여, X는 아미노산인 6x10¹⁰의 총 다양성을 갖는 랜덤 X₁₅ 펩티드 라이브러리를 스크리닝하는데 서열 번호: 5의 VH 및 서열 번호: 7의 VL을 포함하는 항-CD71 21.12 항체를 사용하였다. 스크리닝은 1라운드의 MACS 및 5라운드의 FACS 분류로 구성되었다. 초기 MACS 분류를 단백질-A

다이나비드(Invitrogen) 및 항-CD71 21.12 항체로 200 nM의 농도로 수행하였다. MACS의 경우, 결합에 대해 대략 1×10^{12} 개 세포를 스크리닝하였고, 1×10^7 개 세포를 수집하였다. 항-CD71 21.12를 DyLight-488(ThermoFisher)과 접합시켰고, CD71 결합 활성을 확인하였으며, 항-CD71 21.12-488을 모든 FACS 라운드에 대한 형광 프로브로서 사용하였다. 박테리아 세포를 염색하고 양성 클론을 다음과 같이 수집하였다: FACS 라운드 1에서 수집된 1×10^6 개의 세포를 갖는 20 nM 항-CD71 21.12-488, FACS 라운드 2에서 수집된 6.2×10^4 개의 세포를 갖는 5 nM 항-CD71 21.12-488 및 라운드 3에서 수집된 5×10^3 개의 세포를 갖는 5 nM 항-CD71 21.12-488 및 5×10^2 개의 세포를 갖는 1 nM 항-CD71 21.12-488, FACS 라운드 4 및 5에서 수집된 2×10^2 개 초과 세포를 갖는 1 nM 항-CD71 21.12-488. 제2 FACS 라운드로부터의 양성 집단은 제조항 CD71 단백질에 대한 항-CD71 21.12-488 항체의 결합을 억제하는 것으로 검증되었다. FACS 라운드 3의 5 nM 결합제 및 FACS 라운드 3, 4, 및 5의 1 nM 결합제로부터 서열 분석에 의해 개별 펩티드 클론을 식별하였다.

[0645] 식별된 마스킹 모이어티는 TF01(QFCPWSYYLIGDCDI; 서열 번호: 16) 및 TF02(NLCTEHSFALDCRSY; 서열 번호: 17)를 포함한다. TF01 및 TF02 마스크를 절단하고 알라닌-스캔하여 마스킹 모이어티 TF02.13(NLCTEHSAAALDCRSY; 서열 번호: 18)을 포함하여 상이한 마스킹 효율을 갖는 활성화 가능한 항체 패밀리를 생성하였다.

[0646] 본 개시내용의 항-CD71 활성화 가능한 항체를 생성하는데 이들 마스킹 펩티드를 사용하였다. 이들 항-CD71 활성화 가능한 항체 중 일부에 대한 서열은 하기 표 A에 나타나 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 항-CD71 활성화 가능한 항체는 지시된 바와 같이 절단성 모이어티 2001(ISSGLLSGRSDNH; 서열 번호: 91), 절단성 모이어티 3001(AVGLLAPPGLSGRSDNH; 서열 번호: 97), 절단성 모이어티 2011(ISSGLLSGRSDNP; 서열 번호: 156) 또는 절단성 모이어티 3011(AVGLLAPPGLSGRSDNP; 서열 번호: 164)를 포함한다.

[0647] 하기에 나타난 특정 서열은 서열 번호: 138의 스페이스 서열을 포함하지만, 당업자는 본 개시내용의 활성화 가능한 항-CD71 항체는 예를 들어, QGQSGQ(서열 번호: 138), QGQSGQ(서열 번호: 109), QGQSG(서열 번호: 139), QGQS(서열 번호: 140), QGQ, QG, GQSGQ(서열 번호: 143), QSGQ(서열 번호: 144), SGQ(서열 번호: 145), GQG, G, 또는 Q로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이스 서열과 같은 임의의 적합한 스페이스 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 활성화 가능한 항-CD71 항체는 이의 N-말단에 연결된 스페이스 서열을 가질 수 없다.

[0648] **표 A. 항-CD71 활성화 가능한 항체 서열**

[0649] HuCD71_HcC 중쇄 가변 영역

[0650] 아미노산 서열

[0651] QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWD PGFAFWGQGLITVSS(서열 번호: 5)

[0652] 뉴클레오티드 서열

[0653] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAACTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGGCTCCGGCTACACCTCACCAGCTACTGGATG CACTGGGTGCACAGGCTCCAGGCCAGGGCTCGAATGGATCGGCGCCATCTACCCCGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCAGAGTCCAGGGCAGAGCC ACCCTGACCGCCGACACCTCCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACAGAGAGAACTGGGAC CCCGGCTTCGCTTCTGGGGCCAGGGCACCTGATCACCGTGTCTCC(서열 번호: 206)

[0654] HuCD71_HcC-des 중쇄

[0655] 아미노산 서열

[0656] QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWD PGFAFWGQGLITVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPG(서열 번호: 167)

[0657] 뉴클레오티드 서열

[0658] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAACTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGGCTCCGGCTACACCTCACCAGCTACTGGATG

CACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCGGCGCCATCTACCCCGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCAGAAGTTCAGGGCAGAGCC
 ACCCTGACCGCCGACACCTCCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGAC
 CCCGGCTTCGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCTGATCACCCTGTCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCCACC
 TCTGGCGGCACAGCTGCCTGGGCTGCCTGGTGAAGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACC
 TTCCCTGCGGTGCTCAGTCTCCGGCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACAGTGCCTCCTCCAGCCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC
 CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTCGGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCTGCCCTGACCTGCTGGGCGGA
 CCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCAAAGGACACCTGATGATCTCCCGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCTT
 GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG
 CTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCC
 AAGGGCCAGCCCGGAGCCCAAGGTGTACACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGCTTCTAC
 CCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCACCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTCTGTAC
 TCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCAGCGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG
 TCCCTGAGCCCCGGC(서열 번호: 168)

[0659] HuCD71_HcC 중쇄

[0660] 아미노산 서열

[0661] QVQLVQSGAEVKKPKGASVKMSCKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRENWD
 PGFAFWGQGLITLVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQSLSLTKLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFELY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호: 20)

[0662] 뉴클레오티드 서열

[0663] CAGGTGCAGTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAACTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGGCCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATG
 CACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCGGCGCCATCTACCCCGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCAGAAGTTCAGGGCAGAGCC
 ACCCTGACCGCCGACACCTCCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGAC
 CCCGGCTTCGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCTGATCACCCTGTCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCCACC
 TCTGGCGGCACAGCTGCCTGGGCTGCCTGGTGAAGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACC
 TTCCCTGCGGTGCTCAGTCTCCGGCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACAGTGCCTCCTCCAGCCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC
 CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTCGGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCTGCCCTGACCTGCTGGGCGGA
 CCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCAAAGGACACCTGATGATCTCCCGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCTT
 GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG
 CTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCC
 AAGGGCCAGCCCGGAGCCCAAGGTGTACACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGCTTCTAC
 CCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCACCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTCTGTAC
 TCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCAGCGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG
 TCCCTGAGCCCCGCAAG(서열 번호: 21)

[0664] HuCD71_LcB

[0665] 아미노산 서열

[0666] DIQMTQSPSSLSASVGRVITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTK
 LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 TKSFNREGC(서열 번호: 19)

[0667] HuCD71_LcB

[0668] 뉴클레오티드 서열

[0669] GACATCCAGATGACCCAGTCCCATCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTACAATCACCTGTTCCGCCAGCTCCTCCGTGACTACATGTACTGG
 TTCCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACC
 GACTACACCTGACCATCTCCAGCATGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCAGCAGCGGGAACTACCCCTACACCTTCGCCAGGGCACCAAG
 CTGGAATCAAGCGACCGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTCCACCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCCAGCGTGTGCTGCTGAAAC

AACTTCTACCCCGGAGGCCAAGGTGCAGTGGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGC
 ACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTG
 ACCAAGTCCTTCAACCGCGGAGTGC(서열 번호: 208)

- [0670] 활성화 가능한 항체 경쇄 항-CD71-TF01-2001
- [0671] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF01_2001(서열 번호: 141)]
- [0672] 아미노산 서열
- [0673] [QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSN
 LASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC](서열 번호: 22)
- [0674] 활성화 가능한 항체 경쇄 항-CD71-TF02.13-2001
- [0675] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2001(서열 번호: 142)]
- [0676] 아미노산 서열
- [0677] [QGQSGQG][NLCTEHAALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSN
 LASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC](서열 번호: 23)
- [0678] 활성화 가능한 항체 경쇄 항-CD71-TF02.13-3011
- [0679] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_3011(서열 번호: 146)]
- [0680] 아미노산 서열
- [0681] [QGQSGQG][NLCTEHAALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIY
 STSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC](서열 번호: 147)
- [0682] 활성화 가능한 항체 경쇄 항-CD71-TF02.13-2011
- [0683] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2011(서열 번호: 169)]
- [0684] 아미노산 서열
- [0685] [QGQSGQG][NLCTEHAALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSN
 LASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC](서열 번호: 170)
- [0686] 활성화 가능한 항체 경쇄 항-CD71-TF01-3011
- [0687] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF01_3011(서열 번호: 173)]
- [0688] 아미노산 서열
- [0689] [QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIY
 STSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC](서열 번호: 174)
- [0690] 활성화 가능한 항체 경쇄 가변 영역 항-CD71-TF02.13-2001
- [0691] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2001 VL domain(서열 번호: 197)]
- [0692] 아미노산 서열
- [0693] [QGQSGQG][NLCTEHAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSN
 LASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK](서열 번호: 198)
- [0694] 활성화 가능한 항체 경쇄 가변 영역 항-CD71-TF02.13-3011
- [0695] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_3011 VL domain(서열 번호: 199)]

- [0696] 아미노산 서열
- [0697] [QGQSGQG][NLCTEHAALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQKQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (서열 번호: 200)
- [0698] 활성화 가능한 항체 경쇄 가변 영역 항-CD71-TF02.13-2011
- [0699] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2011 VL domain(서열 번호: 201)]
- [0700] 아미노산 서열
- [0701] [QGQSGQG][NLCTEHAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQKQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (서열 번호: 202)
- [0702] 활성화 가능한 항체 경쇄 가변 영역 항-CD71-TF01-2001
- [0703] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF01_2001 VL 도메인(서열 번호: 195)]
- [0704] 아미노산 서열
- [0705] [QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQKQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK](서열 번호: 196)
- [0706] 활성화 가능한 항체 경쇄 가변 영역 항-CD71-TF01-3011
- [0707] [스페이서(서열 번호: 138)] [huCD71Lc_TF01_3011 VL 도메인(서열 번호: 203)]
- [0708] 아미노산 서열
- [0709] [QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQKQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (서열 번호: 204)

[0710] **실시예 3. 활성화 가능한 항-CD71 활성화 가능한 항체 및 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체**

- [0711] 본원에 제공된 연구는 본 개시내용의 일부 항-CD71 활성화 가능한 항체를 생성하도록 설계되었다.
- [0712] 항-CD71 활성화 가능한 항체는 상이한 마스킹 효율로 생성되었다(즉, 활성화 가능한 항체의 MM이 표적에 대한 활성화 가능한 항체의 AB의 결합을 차단하는 능력의 측정치). 펩티드 TF01 및 TF02를 실시예 2에 기재된 바와 같이 절단 및 알라닌 스캐닝에 의해 돌연변이 시키고, 본 개시내용의 항-CD71 활성화 가능한 항체의 패밀리를 다양한 마스킹 효율로 생성시키는데 이들 마스킹 펩티드 변이체를 사용하였다.
- [0713] 본 개시내용의 항-CD71 활성화 가능한 항체의 NCI H292(본원에서 H292로도 지칭됨) 세포주에의 결합을 FACS를 사용하여 평가하였다. 간략하게, 세포를 다양한 농도의 huCD71 항체 또는 활성화 가능한 항체로 표지 한 후, Alexa Fluor 647-표지된 염소 항-인간 IgG 2차 항체로 검출하여 결합 곡선을 결정하였다. 하기 표 2의 예시적인 결합 데이터에 요약된 바와 같이, 본 개시내용의 항-CD71 활성화 가능한 항체는 모체 항-CD71 항체(huCD71 21.12 Ab)와 비교하여 마스킹 효율의 범위를 나타낸다.

표 2: 마스킹 모이어티의 마스킹 효율

활성화 가능한 항체 마스킹 모이어티	경쇄 VL 서열 번호	K _{app} (nM)	마스킹 효율
없음(Ab 21.12)	7	2.288	1
TF01	809	809.5	352
TF02.13	813	127.4	55

- [0714]
- [0715] 표 2의 이러한 예시적인 데이터는 활성화 가능한 항체가 온전한 또는 비절단 상태에 있을 때 2개의 마스크(TF01 및 TF02.13)가 항-CD71 항체의 CD71에 대한 결합을 억제함을 보여준다. 이들 예시적인 데이터는 또한 TF01 마스크 모이어티가 TF02.13 마스크 모이어티보다 더 높은 마스킹 효율을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0716] **실시예 4: CD71 활성화 가능한 항체 및 CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 결합 활성의 특성화**

- [0717] 이 실시예는 본 개시내용의 항-CD71 활성화 가능한 항체 및 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체가 그의 상응하는 프로테아제-절단된 형태와 비교하여 온전한, 비절단 형태일 때 제조합 및 세포 표면 인간 및 시노물구스 CD71 단백질에 대한 결합 친화도가 낮다는 것을 보여준다.

[0718] 도 3a 및 도 3b에 도시된 바와 같이, 본 개시내용의 항-CD71 활성화 가능한 항체 및 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 온전한, 비절단 형태 및 프로테아제-활성화, 절단된 형태의 재조합 CD71에 대한 결합 친화도를 입증하는데 고상 결합 검정(ELISA)을 사용하였다. 이들 실시예에서, 재조합 시노물구스(도 3b) 또는 인간 CD71(도 3a) 단백질(R & D 시스템)을 1 µg/mL의 농도로 ELISA 플레이트 상에 코팅한 후, 표시된 농도의 본 개시내용의 온전한, 비절단 항-CD71 활성화 가능한 항체("항-CD71-TF02.13-2011") 또는 본 개시내용의 온전한, 비절단 E2(즉, 약 2의 DAR을 갖는) 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체("항-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2")와 함께 배양하였다. 또한 활성화 가능한 항체 성분의 절단 가능한 부분을 절단하는 프로테아제로 처리한 후, 본 개시내용의 항-CD71 활성화 가능한 항체("항-CD71-TF02.13-2011 (활성)") 또는 E2(즉, 약 2의 DAR을 가짐) 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체("항-CD71-TF02.13-2011 (활성)")를 분석하였다.

[0719] 본원에 논의된 바와 같이, "E2"는 약물 부하가 각각의 활성화 가능한 항체 분자에 대해 2개의 약물 분자인 본질적으로 접합된 활성화 가능한 항체의 중만을 포함하고, 본질적으로 임의의 또는 최소량의 다른 가능한 중을 포함하지 않은(즉, 약물 부하가 0, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 등인 경우) 본 개시내용의 주어진 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 조성물을 지칭한다. 본원에 논의된 바와 같이, "DAR"은 이러한 접합된 활성화 가능한 항체의 집단에서 약물(이 경우 MMAE) 대 활성화 가능한 항체(즉, CD71-TF02.13-2011) 사이의 평균비를 지칭한다. 따라서, 이 실시예에서, 항-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2는 각각의 활성화 가능한 항체가 실시예 26에 기재된 바와 같이 2 당량의 vc-MMAE의 약물 부하 및 약 2의 DAR을 갖는 항-CD71-TF02.13-2011 활성화 가능한 항체만을 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0720] 각 샘플에서 결합된 항체의 양을 양고추냉이 퍼옥시다제 및 Ultra TMB(Thermo Fisher Scientific)에 접합된 염소 항-인간 항체에 의한 배양 및 검출에 의해 검출하였다. 결합 친화도의 요약은 다음과 같다:

표 3A: 비절단 및 절단 항-CD71 활성화 가능한 항체 및 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 예시적인 관찰된 CD71 결합 활성

시험 물품	인간 CD71 K _{d(app)} nM	시노물구스 CD71 K _{d(app)} nM
항-CD71-TF02.13-2011	0.42	1.24
항-CD71-TF02.13-2011 (활성화)	0.04	0.06
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	0.48	1.49
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (활성화)	0.05	0.07

[0721]

[0722] 도 3c 및 도 3d는 FACS 분석에서 본 개시내용의 항-CD71 활성화 가능한 항체 및 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체는 본 개시내용의 상응하는 프로테아제-활성화 항-CD71 활성화 가능한 항체 또는 프로테아제-활성화 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 것보다 더 높은 해리 상수 및 더 낮은 친화도로 인간 CD71(도 3c) 및 시노물구스 CD71(도 3d)을 발현하는 세포에 결합하는 예시적인 결과를 도시한다. 이 예시적인 결과는 본 개시내용의 절단된, 프로테아제-활성화된 항-CD71 활성화 가능한 항체 및 본 개시내용의 절단된, 프로테아제-활성화된 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 결합 친화도는 모체 항-CD71 항체의 친화도와 유사한 친화도로 세포에 결합되는 것을 보여줌으로써, 온전한 활성화 가능한 항체 또는 온전한 접합된 활성화 가능한 항체에서 그의 표적에 대한 항-CD71의 결합을 억제하는데 있어서 마스킹 모이어티의 효과를 입증한다.

[0723] 도 3c 및 도 3d에 도시된 예시적인 연구에서, 본 개시내용의 항체의 지시된 세포주에 대한 결합을 표준 FACS 표지 방법을 사용하여 수행하였다. 간략하게, 세포를 본 개시내용의 지시된 항체 또는 활성화 가능한 항체로 표지하였다: 대조 항체(AB095), 인간 항-CD71 항체(Ab 21.12, 서열 번호: 5의 VH 및 서열 번호: 7의 VL), 항-CD71 활성화 가능한 항체(항-CD71 TF02.13-2011), 또는 E2(즉, 약 2의 DAR를 가짐) 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2). 또한, 항-CD71 활성화 가능한 항체(항-CD71 TF02.13-2011 (활성)) 및 E2(즉, 약 2의 DAR를 가짐) 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체 (항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2 (활성))의 결합 친화도를 또한 그 안에서 절단 가능한 부분을 절단하는 프로테아제-활성화 후에 분석하였다. 각각의 시험 물품을 지시된 농도로 적용하였고, 이어서 Alexa Fluor 647 표지된 염소 항-인간 IgG 2차 항체로 검출하였다.

[0724] 하기 표 3B는 도 3c 내지 도 3d에 도시된 결합 곡선에 기초한 EC50 값을 보여준다. 이들 결과는 온전한 활성화 가능한 항체 및 온전한 접합된 활성화 가능한 항체가 그의 프로테아제 활성화된 대응물보다 더 낮은 친화도로 그의 표적에 결합되고, 프로테아제 활성화된 활성화 가능한 항체는 모체 항-CD71 항체의 그것과 유사한 친화도로 결합됨을 보여준다.

표 3B: 항-CD71 바인더의 예시적인 관찰된 CD71 결합 활성

시험 물품	인간 H292 세포 FACS EC50	시노물구스 CD71 이 있는 CHO FACS EC50
Ab 21.12	1.021	-
Ab 21.12-vc-MMAE	-	0.2912
항-CD71-TF02.13-2011	46.06	27.83
항-CD71-TF02.13-2011 (활성화)	1.429	0.4639
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	50.97	35.30
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (활성화)	1.854	0.7292

[0725]

[0726]

유사한 예시적인 연구에서, 본 개시내용의 항-CD71 항체, 항-CD71 접합된 항체, 항-CD71 활성화 가능한 항체(온전한, 비절단 형태 및 프로테아제-활성화, 절단된 형태) 및 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체(온전한, 비절단 형태 및 프로테아제-활성화, 절단된 형태)의 재조합 CD71 내지 재조합 인간 및 시노물구스 CD71 및 인간 및 시노물구스 CD71-발현 세포주 ELIS와의 결합 친화도를 입증하는데 ELISA 및 유동 세포 계측법을 사용하였다. 시험 물품은 항-CD71 Ab21.12 항체(서열 번호: 5의 VH 및 서열 번호: 7의 VL), 접합된 항체 항-CD71 Ab21.12-vcMMAE E2(즉, 약 2의 DAR를 가짐), 활성화 가능한 항체 항-CD71-TF02.13-2011, 및 DAR2 접합된 활성화 가능한 항체 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2(즉, 약 2의 DAR를 가짐)였다.

[0727]

IELISA 예에서, 재조합 시노물구스 또는 인간 CD71 ECD 단백질을 ELISA 플레이트 상에 코팅한 후, 본 개시내용의 시험 물품의 농도 범위 중 하나와 배양한 후, 2차 항체로 결합된 시험 물품의 양을 측정하였다. 활성화된 시험 물품을 매트립타제 프로테아제 효소와 함께 배양하였다. 각 시험 물품에 대한 예시적인 겔보기 Kd 값은 표 3C에 나타내어 있다.

[0728]

표 3C에 나타낸 예시적인 연구에서, 본 개시내용의 항체의 지시된 세포주에 대한 결합을 표준 FACS 표지 방법을 사용하여 수행하였다. 유동 세포 계측법 결과는 4개의 인간 세포주(HCC1806 인간 유방암, HT-29 인간 대장암, NCI-H292 인간 폐암, 및 NCI-H520 인간 폐암) 및 시노물구스 원숭이 CD71을 발현하는 1개의 CHO-K1 세포주로부터의 평균 측정된 Kapp를 반영한다. 각 시험 물품에 대한 예시적인 겔보기 Kd 값은 표 3C에 나타내어 있다.

표 3C: 항-CD71 항체, 항-CD71 접합된 항체, 비절단 및 절단 항-CD71 활성화 가능한 항체 및 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 예시적인 관찰된 CD71 결합 활성

시험 물품	ELISA rhCD71	ELISA rcCD71	4 개의 인간 세포주의 유동 세포 계측법 평균	유동 세포 계측법 CHO-K1 시노 CD71
	Kapp (nM)	Kapp (nM)	Kapp (nM)	Kapp (nM)
1 Ab21.12	0.03	0.03	0.8	0.3
2 Ab21.12-vc-MMAE E2	0.04	0.03	미시험	미시험
3 항-CD71-TF02.13-2011	1.94	1.11	105.5	28
4 항-CD71-TF02.13-2011, 매트립타제 활성화	0.06	0.04	2.0	0.5
5 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2.58	1.02	98.1	35
6 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, 매트립타제 활성화	0.05	0.04	2.0	0.7
비율				
항-CD71-TF02.13-2011 / Ab21.12	65	37	127	93
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 / Ab21.12	86	34	117	117
항-CD71-TF02.13-2011 / 항-CD71-TF02.13-2011, 매트립타제 활성화	32	28	55	56
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 / 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, 매트립타제 활성화	52	26	48	50

[0729]

[0730] 이러한 예시적인 결과는 온전한 활성화 가능한 항체 및 온전한 접합된 활성화 가능한 항체는 그들의 활성화된 대응 물 또는 그의 모 항체와 비교하여 CD71에 대한 겔보기 친 화도가 더 낮음을 보여준다.

[0731] **실시예 5: 다수의 환자-유래 원발성 및 전이성 종양에서의 CD71 발현**

[0732] 이 실시예는 CD71이 항-CD71 항체를 사용한 면역 조직화학(IHC) 염색에 의해 매우 다양한 원발성 및 전이성 종양 유형으로 발현됨을 보여준다.

[0733] 도 1 및 2는 CD71이 다수의 환자-유래 원발성 종양 및 환자-유래 전이성 조직 마이크로어레이(TMA)에서 상업적으로 구매된 항-CD71 항체로 IHC 염색을 사용하여 다수의 원발성 및 전이성 종양 샘플에서 고도로 발현됨을 보여준다. 도 1은 두경부암(1), 자궁경부암(2), 유방암(3), 림프절의 비호킨스 림프종(NHL)(4), 폐암(5), 방광암(6), 난소암(7), 및 식도암(8)에서의 CD71의 IHC 염색을 나타낸다. 도 2는 전이성 종양으로부터의 코어로 구성된 조직 마이크로어레이(TMA)에서 CD71의 IHC 염색이 대부분의 코어에서 CD71의 중등도 내지 고수준의 발현을 입증하는 것을 보여준다. 면역조직화학(IHC)에 의한 인간 종양 샘플에서의 CD71 발현의 요약이 표 4A에 나타나 있다.

표 4A: IHC 에 의한 인간 종양 샘플에서의 CD71 발현의 요약

징후	부위	총 사례	% 강력/적당한(2+ 이상 IHC)
식도	원발성	56	82.1
	전이성	69	75.4
위	원발성	209	63.6
	전이성	74	83.7
췌장	원발성	151	57
	전이성	15	80
비호킨스 림프종	원발성	132	66.7
	전이성	59	88.1
비소세포성 폐암종	원발성	127	74.8
	전이성	87	70.1
유방	원발성	45	66.7
	전이성	80	85
자궁내막	원발성	147	98
	전이성	9	88.9
대장	원발성	146	77.4
	전이성	98	74.5
두경부 편평 세포 암종	원발성	160	53.8
	전이성	25	60

[0734] **실시예 6: CRC 이종이식편 모델에서의 마스킹 효율 및 활성화 가능한 항-CD71-AADC 생체 내 효능**

[0736] 이 실시예는 본 개시내용의 접합된 독소(AADC)를 갖는 항-인간 CD71 활성화 가능한 항체의 마스킹 효율이 HT29 대장암(CRC) 마우스 이종이식편 모델에서의 효능의 인자라는 것을 보여준다.

[0737] 이들 연구에서, 마우스에서의 HT29 이종이식편 종양을 평균 부피 150 mm³으로 성장시켰다. 이후, 마우스를 그룹으로 무작위화하고, 1 일째에 3 mg/kg (또는 달리 표시된)의 각각의 표시된 시험 물품을 투여하였다. 평균 종양 부피 ± SEM을 각 시점에 대해 플롯팅 하였다.

[0738] 도 4a는 더 높은 친화도 마스크를 갖는 본 개시내용의 예시적인 항-CD71 AADC(항-CD71 TF01-3011-vc-MMAE)가 단일 3 mg/kg 용량 후 운반체 대조군에 비해 약간의 종양 성장 억제를 나타냄을 보여준다. 비교하면, 도 4b는 친화도 마스크는 더 낮지만 동일한 절단성 기질을 갖는 본 개시내용의 예시적인 항-CD71 AADC(항-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE)가 단일 3 mg/kg 용량 후 이종이식편의 본질적으로 완전한 회귀를 나타냄을 보여주었다. FIG. 4c는 친화도 마스크는 더 낮지만 동일한 절단성 기질을 갖는 본 개시내용의 예시적인 항-CD71 AADC(항-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE)가 단일 투여량 2 mg/kg 또는 3 mg/kg 양쪽 모두에서 HT29 이종이식편의 본질적으로 완전한 회귀를 나타냄을 보여주었다. 이들 예시적인 결과는 친화도 마스킹 모이어티는 더 낮은 AADC가 친화도 마스킹 모이어티가 더 높은 AADC보다 더 높은 효능을 입증하였음을 보여준다.

[0739] **실시예 7: CRC 이종이식편 모델에서의 절단성 기질 및 활성화 가능한 항-CD71-AADC 생체 내 효능**

- [0740] 이 실시예는 마우스 이종이식편 모델에서 본 개시내용의 예시적인 항-인간 CD71 접합된 활성화 가능한 항체 (AADC)의 효능에 미치는 절단성 기질의 효과를 보여준다.
- [0741] 이들 연구에서, 마우스에서의 Ht29 (대장암 유래) 이종이식편 종양을 평균 부피 150 mm³으로 성장시켰다. 이후, 마우스를 그룹으로 무작위화하고, 1 일째에 표시된 양의 표시된 시험 물품을 투여하였다. 평균 종양 부피 ± SEM을 각 시점에 대해 플롯팅 하였다.
- [0742] 도 5는 본 개시내용의 예시적인 항-CD71 AADC(CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE)가 2 종의 상이한 투여량으로 마우스 이종이식편 모델에서 완전 또는 거의 완전한 회귀를 나타냄을 보여준다. 이 예시적인 데이터는 덜 절단성인 기질을 갖는 표시된 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE)의 효능이 도 4b 및 도 4c에 도시된 더 절단성인 기질을 갖는 AADC(항-CD71 TF02.13-3011-vcMMAE)의 효능과 실질적으로 동일함을 입증한다.
- [0743] **실시예 8: 다수의 이종이식편 모델에서의 활성화 가능한 항-CD71-AADC 생체 내 효능**
- [0744] 이 실시예는 다양한 마우스 이종이식편 모델에서 2 종의 상이한 약물 대 항체 비율(DAR)에서 본 개시내용의 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE AADC의 효능을 보여준다.
- [0745] 이들 연구에서, 마우스에서 난소암(OV-90; 도 6b), 위암(NCI-N87; 도 6a), ER+ 유방암(BT474; 도 6c), 또는 삼중 음성 유방암(HCC-70; 도 6d) 이종이식편 종양을 평균 부피 150 mm³으로 성장시켰다. 이후, 마우스를 그룹으로 무작위화하고, 1 일째에 표시된 시험 물품을 투여하였다. 투여된 각 AADC의 양은 MMAE 독소의 양에 기초하여 용량-정합되어, 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE(약 3의 평균 DAR을 가짐)를 3 mg/kg으로 및 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2(약 2의 평균 DAR을 가짐)를 4.3 mg/kg으로 투여하였다. 평균 종양 부피 ± SEM을 각 시점에 대해 플롯팅 하였다.
- [0746] 도 6a 및 6b는 본 개시내용의 예시적인 항-CD71 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE)가 난소암 및 위암 마우스 이종이식편 모델에서 완전 또는 거의 완전한 회귀를 나타냄을 보여준다. 각각 2 당량의 MMAE 독소를 갖는 정제된 AADC를 포함하는 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2(즉, 약 2의 DAR을 가짐)는 또한 동일한 모델에서 완전한 회귀를 보여주었다. 모든 경우에, 도 6c 및 6d에서 도시된 바와 같이, 완전 또는 거의 완전 회귀가 관찰되지 않더라도, E2(즉, 약 2의 DAR를 가짐) 및 더 높은 DAR AADC의 활성화는 동등하거나 거의 동등 하였다. 이들 예시적인 데이터는 E2(즉, 약 2의 DAR을 가짐) AADC (항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2)의 용량-일치 효능이 상응하는 더 높은 DAR AADC와 필적함을 입증한다.
- [0747] 표 4B에 나타낸 바와 같이, 약 2의 DAR을 갖는 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 AADC의 효능을 다양한 환자-유래(PDX) 또는 암(CDX) 세포주에 대해 시험하였고, 마우스 이종 이식편 모델을 사용하고, 1 회 또는 2 회 6 mg/kg 이하로 투여하였다. 하기에 요약된 결과는 AADC가 거의 모든 시험된 모델에서 회귀에서 정체 내지 종양 성장 억제에 이르기까지 적어도 일부 효능을 입증함을 보여준다.

표 4B: 세포주 유래 이중이식편에서 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2의 효능

종양 유형	CDX 또는 PDC	회귀 또는 정체	종양 성장 억제	무반응
위	CDX	1		
	PDX	4		1
식도	CDX	3	1	
	CDX	4		
난소	PDX	2	1	
비소세포성 폐암	CDX	3	1	
	PDX	2	1	1
유방	CDX	3	2	
	PDX	5		
대장	CDX	2		1
다발골수종			1	
전립선	CDX	1		
중피종			1	
미만성 거대 B 세포 림프종	PDX	4	1	
두경부 소세포암종	PDX	5		
췌장	PDX	6		1

[0748]

[0749]

실시예 9: 처리된 동물로부터의 샘플에서 접합 및 유리 독소, 및 온전한 및 총 AADC의 수준을 결정하기 위한 생체분석 검정

[0750]

이 실시예는 접합 및 유리 독소의 수준과 온전한 및 총 접합된 활성화 가능한 항체의 수준을 포함하는 시험 샘플에서 대사물의 수준을 측정하기 위한 검정을 위한 예시적인 워크플로우를 보여준다.

[0751]

도 7a, 7b, 및 7c는 처리된 원숭이에서 온전한 및 총(즉, 온전한 및 절단된) 활성화 가능한 항체의 양뿐만 아니라 처리된 원숭이에서 온전한 AADC(비절단 독소를 갖는) 및 절단된 독소의 양을 결정하기 위한 예시적인 생물학적 검정에 대한 개략적인 워크플로우를 도시한다. 도 7a에 도시된 예시적인 검정 프로토콜을 사용하여, 샘플에서 온전한 및 절단된 활성화 가능한 항체(예를 들어, 항-CD71 TF02.13-3001)의 총량은 자성 단백질 A 비드에 의해 포획되고, 이어서 변성된(RapiGest™), 디티오트레이톨로 환원되고, 알킬화되며 트립신 분해될 수 있다. 생성된 펩티드 단편을 역상 LC-MS/MS를 사용하여 항체 중쇄 및 경쇄로부터 특징적인 펩티드 단편을 식별 및 정량화함으로써 분석할 수 있다. 이러한 특정 검정에서, 활성화 가능한 항체 또는 접합된 활성화 가능한 항체의 항체 부분에 특징적인 하나 이상의 펩티드를 역상 LC-MS/MS를 사용하여 식별하고 정량화하여 온전한 및 절단된 활성화 가능한 항체 양쪽 모두의 총량을 결정할 수 있어서, 샘플에서 온전한 및 절단된 활성화 가능한 항체의 양을 측정하게 된다.

[0752]

동일한 검정에서, 활성화 가능한 항체(예를 들어, 항-CD71-TF02.13-2011의 경쇄의 N-말단으로부터의)의 절단되지 않은 절단성 모이어티(CM) 및 마스킹 모이어티(MM) 부분에 특징적인 하나 이상의 펩티드를 역상 LC-MS/MS를 사용하여 식별 및 정량하여 온전한 활성화 가능한 항체의 총량을 결정함으로써, 샘플에서 온전한 활성화 가능한 항체의 양을 측정한다.

[0753]

도 7b에 도시된 예시적인 검정 프로토콜을 사용하여, 샘플에서 이의 독소(MMAE)에 접합된 AADC(예를 들어, 항-CD71 TF02.13-3001-vc-MMAE)의 총량을 결정할 수 있다. 이 검정에서, 접합 및 비접합된 활성화 가능한 항체의 총량은 MabSelect® Protein A에 의해 포획된다. 이 분획은 시스테인 프로테아제로 처리되어 링커-독소를 절단하여, 활성화 가능한 항체에 접합된 상태인 임의의 독소를 방출한다. 시스테인 프로테아제-절단 분획을 분석하기 위해 역상 LC-MS/MS를 사용하여, 포획된 활성화 가능한 항체에 접합된 상태인 특징적인 독소(예를 들어, MMAE)를 식별하고 정량할 수 있으며, 따라서 샘플에서 접합된 독소의 양을 측정할 수 있다.

[0754]

도 7c에 도시된 예시적인 검정 프로토콜을 사용하여, 동물에서 AADC로부터 절단된 독소를 포함하는 샘플의 독소의 총량을 결정할 수 있다. 도 7c에 도시된 이 예시적인 검정에서, 샘플로부터의 총 단백질이 침전되어, 상청액에 유리한 비접합 독(MMAE)이 남는다. 상청액을 역상 LC-MS/MS를 사용하여 분석하여 침전된 단백질과 연관되지 않은 특징적인 독소(예: MMAE)를 식별하고 정량화하여, 샘플에서 비접합 독소의 양을 측정할 수 있다. 이 검정에서, 내부 표준(예를 들어, SILu™ Mab, Sigma-Aldrich)이 정량을 허용하기 위해 포함된다.

[0755] **실시예 10: 시노몰구스 원숭이에서 항-CD71-AADC 및 항-CD71 ADC의 내약성 및 안정성**

[0756] 이 실시예는 본 개시내용의 접합된 독소 (AADC)를 갖는 항-인간 CD71 활성화 가능한 항체가 하나 이상의 혈액학적 관독 및 임상적 증상에 기초한 상응하는 모체 항-CD71 항체 약물 접합체(ADC)와 비교하여 시노몰구스 원숭이에서 내약성이 양호함을 보여준다. 결과는 아래 표 5에 요약되어 있고, 도 17에 요약되어 있다.

[0757] 이 연구에서, 시노몰구스 원숭이는 1 일 및 21 일에 표시된 용량으로 표시된 AADC 또는 ADC를 정맥 내로 처리되었다. 항-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE AADC에 대해서는 1 회 용량만 내약성이 있었고, 항-CD71-vc-MMAE E2(즉, 약 2의 DAR를 가짐) ADC에 대해서는 1 회 용량만 투여되었다. 각 동물로부터 수득된 샘플에서 활성화 가능한 항체(즉, 총 활성화 가능한 항체 대 온전한 활성화 가능한 항체)의 안정성을 역상 LC/MS/MS를 사용하여 실시예 9에 기재된 바와 같이 수행하였다.

표 5: 시노몰구스 원숭이에서 항-CD71 AADC 및 ADC 내약성 및 안정성

시험 물품 (약물-단백질 비율(DAR))	용량 (mg/kg)	체중 손실	평균 호중구 수 ± 표준편차 (μ L 당)	순환 활성화 가능한 항체의 상대적 안정성	임상 징후/내약성
항-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE (약 3)	6	약 10%	98 ± 60	더 낮음	중증 호중구 감소증, 무기력증, 식욕 부진. 내약성 없음
항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE (약 3)	6	약 8%	290 ± 290	더 높음	없음. 내약성 있음
항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (약 2)	12	0%	180 ± 210	더 높음	없음. 내약성 있음
Ab21.12-vc-MMAE E2 (약 2)	2	약 8%	70	해당 없음	제 1 투여후 약 1 주에 치명적

[0758] 체중 손실을 제1 투여 용량 후 최저 측정 체중에서 측정하였다. 기준선 호중구 수는 μ L 당 적어도 1000이었다.

[0760] 표 5에 요약된 바와 같이, 마스킹되지 않은 E2(즉, 약 2의 DAR을 가짐) ADC(항-CD71-vc-MMAE E2)는 제1 투여 후 8 일 이내에 치사율을 나타내었다.

[0761] 표 5에 요약된 예시적인 결과는 또한 덜 절단성 기질(즉, 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE 및 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2)을 갖는 AADC가 더 절단성인 기질(즉, 항-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE)을 갖는 상응하는 AADC보다 비인간 영장류에서 더 내약성이 있으며 더 높은 수준의 순환 안정성을 보였다. 마지막으로, 예시적인 결과는 AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2(즉, 약 2의 DAR을 가짐))가 상응하는 더 높은 DAR AADC(항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE)보다 비-인간 영장류에서 상당히 개선된 내약성을 입증하였다는 것을 보여준다.

[0762] **실시예 11: 시노몰구스 원숭이에서 항-CD71-AADC의 안정성 및 약동학**

[0763] 이 실시예는 시노몰구스 원숭이에서 본 개시내용의 접합된 독소(AADC)를 갖는 항-인간 CD71 활성화 가능한 항체의 안정성 및 약동학을 보여준다.

[0764] 그 결과가 실시예 12 내지 14에 더 상세히 기재되어 있는 이 연구에서, 4 그룹의 시노몰구스 원숭이를 표시된 E2 (즉, 약 2의 DAR을 가짐) 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE 또는 표 6에 나타낸 표시된 투여량 및 스케줄을 갖는 운반체 대조군으로 정맥 내 처리하였다. 각각의 동물로부터의 샘플을 표 6에 표시된 날에 수득하였으며, 이는 총 및 온전한 활성화 가능한 항체 및 실시 예 9에 기재된 방식으로 접합 및 비접합된 MMAE 독소에 대해 검정되었다.

표 6: 항-CD71 AADC 독성 연구 설계

그룹	시험 물품	용량 (mg/kg)	투여 횟수	동물 수	투여 대비 샘플링 시점(일)
1	운반체	해당 없음	2 (Q3W)	3 (2 수컷; 1 암컷)	1 일: + 0.003, 0.17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 22 일: + 0.003, 0.17, 1, 2, 4, 7
2	항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	6	2 (Q3W)	3 (2 수컷; 1 암컷)	1 일: + 0.003, 0.17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 22 일: + 0.003, 0.17, 1, 2, 4, 7
3	항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	12	2 (Q3W)	3 (2 수컷; 1 암컷)	1 일: + 0.003, 0.17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 22 일: + 0.003, 0.17, 1, 2, 4, 7
4	항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	18	1	3 (2 수컷; 1 암컷)	1 일: + 0.003, 0.17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21

[0765]

[0766]

표 6에 요약된 바와 같이, 시노물구스 원숭이에게 운반체 또는 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 AADC를 용량 수준 및 스케줄에 따라 느린 IV 볼루스(bolus)로 투여하였다. 독성동력학적 분석을 위한 혈액 샘플을 혈장으로 처리하고 분석 전에 -80°C에서 저장하였다. 혈청 샘플을 약물 투여 전 및 그룹 1 내지 3에 대하여 제2 용량 후 7 일 및 그룹 4에 대하여 제1 용량 후 22 일 후에 항-약물 분석을 위해 수득하였다. 모든 그룹은 3 마리의 동물 (수컷 2 마리 및 암컷 1 마리)을 포함하였다.

[0767]

실시예 12: 시노물구스 원숭이에서 항-CD71-AADC의 안정성

[0768]

이 실시예는 시노물구스 원숭이에서 본 개시내용의 접합된 독소(AADC)를 갖는 항-인간 CD71 활성화 가능한 항체의 안정성을 보여준다.

[0769]

도 8a 및 8b의 예시적인 결과에 도시된 바와 같이, 투여된 AADC의 총 및 온전한 활성화 가능한 항체(항-CD71 TF02.13-2011)의 혈장 농도를 실시예 9 및 11에 기재된 방식으로 결정하였다. 온전한 항체 및 총 활성화 가능한 항체 양쪽 모두에 대한 정량의 하한치(LLOQ)는 표시된 바와 같이 0.633 nM이었다. 이들 예시적인 결과는 온전한 활성화 가능한 항체의 혈장 농도가 일반적으로 21 일 투약 간격 동안 및 원래 투여된 용량에 비례한 수준으로 유지되었음을 입증한다. 투여 후 7 일조차도, 혈장 중 대략 80%의 접합된 활성화 가능한 항체(항-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2)는 온전한 전구 약물 형태였다.

[0770]

도 9a 및 9b의 예시적인 결과에 도시된 바와 같이, 접합 및 비접합 MMAE의 혈장 농도를 실시예 9 및 11에 기재된 방식으로 결정하였다. 정량의 하한치(LLOQ)는 표시된 바와 같이 접합된 MMAE의 경우 1.77 nM이고, 비접합 MMAE의 경우 0.31 nM이었다. 이들 예시적인 결과는 혈장 농도에서 측정된 1% 미만의 총 MMAE가 비접합 형태임을 입증한다.

[0771]

실시예 13: 시노물구스 원숭이에서 항-CD71-AADC 투약 후 약물 대 활성화 가능한 항체 비율의 변화

[0772]

이 실시예는 본 개시내용의 접합된 독소(AADC)를 갖는 항-인간 CD71 활성화 가능한 항체로 시노물구스 원숭이에 투여한 후 혈장에서 약물(MMAE) 대 활성화 가능한 항체(항-CD71 TF02.13-2011)의 관찰된 비율을 보여준다.

[0773]

총 및 온전한 활성화 가능한 항체(항-CD71 TF02.13-2011)의 혈장 농도를 실시예 9 및 11에 기재된 방식으로 측정하였다. 도 10에 도시된 바와 같이, 약물 대 활성화 가능한 항체 비율은 각각의 표시된 시점에서 접합된 MMAE의 농도(실시예 12 및 도 9a 참조)를 총 활성화 가능한 항체의 농도(실시예 11 및 도 8a 참조)로 나누어 계산하였다. 특정 시점에 대한 평균 비율과 표준 편차는 표 7에 나타나 있다. 이들 예시적인 결과는 MMAE 약물 대 활성화 가능한 항체의 관찰된 비율이 3 종 투여량 각각에서 일관된 방식으로 시간에 따라 변했음을 입증한다. 각각의 투여량에서, 온전한 AADC의 계산된 DAR은 투여 직후 및 4시간 이내에 약 2에서 시작하였고, 이 비율은 투여 후 약 1 대략 96시간(즉, 약 4일)으로 떨어졌다.

표 7: 약물 대 활성화 가능한 항체 비율

시험 물품	용량 (mg/kg)	비율 (5 분)	비율 (4 시간)	비율 (24 시간)	비율 (4 일)	비율 (7 일)
항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	6	1.98 ± 0.081	1.95 ± 0.008	1.65 ± 0.075	1.08 ± 0.029	0.874 ± 0.077
항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	12	2.05 ± 0.080	2.00 ± 0.283	1.69 ± 0.030	1.06 ± 0.023	0.835 ± 0.100
항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	18	2.34 ± 0.295	2.01 ± 0.072	1.63 ± 0.164	1.03 ± 0.030	0.835 ± 0.119

[0774]

[0775]

실시예 14: 시노물구스 원숭이에서 항-CD71-AADC의 약동학적 매개변수

[0776]

이 실시예는 시노물구스 원숭이에서 본 개시내용의 접합된 독소(AADC)를 갖는 항-인간 CD71 활성화 가능한 항체의 약동학적 매개변수를 보여준다.

[0777]

총 및 온전한 활성화 가능한 항체(항-CD71 TF02.13-2011)의 혈장 농도를 실시예 9 및 11에 기재된 방식으로 측정하였다. 표 8에 나타난 바와 같이, 주어진 분석물에 대한 평균 C_{max}는 최대 관찰된 혈장 농도에 기초하였다. 평균 AUC₀₋₇은 0일 내지 7일의 혈장 농도-시간 곡선 하의 면적에 기초하였다. 총 접합된 활성화 가능한 항체, 온전한 접합된 활성화 가능한 항체 및 컨쥬 게이트 MMAE에 대한 반감기 추정치는 2.5 내지 6.3일 범위였다. 비접합된 MMAE에 대한 반감기 추정치는 생성되지 않았다.

표 8: 약물 대 활성화 가능한 항체 비율

분석물	평균 C _{max} (nM)			평균 AUC ₀₋₇ (일·nM)		
	18 mg/kg	12 mg/kg	6 mg/kg	18 mg/kg	12 mg/kg	6 mg/kg
총 활성화 가능한 항체	2610	1810	1060	5560	5490	2850
온전한 활성화 가능한 항체	2530	1190	1080	4804	4970	2520
접합된 MMAE	6090	3820	2090	12500	7850	4000
비접합 MMAE	0.696	0.487	0.195	1680	1170	531

[0778]

[0779]

실시예 15: 항-약물 항체의 검정

[0780]

이 실시예는 시험된 동물에서 항-약물 항체(ADA)의 형성을 모니터링하기 위한 브리징(bridging) 검정의 사용을 설명한다.

[0781]

ADA 분석을 위한 혈장 샘플을 연구 전 및 제2 용량 후 7 일에 수집하였다. 항-약물 항체를 연구에서 투여된 9 마리 동물 중 3 마리에서 검출하였다.

[0782]

실시예 16: 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 시험관 내 세포독성

[0783]

이 실시예는 동형 대조군 ADC와 비교하여 본 개시내용의 온전한 및 활성화된 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 인간 종양-유래 세포주에 대한 시험관 내 세포독성 검정을 기재한다.

[0784]

본 개시내용의 접합된 활성화 가능한 항체의 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2(서열 번호: 167의 HC 및 서열 번호: 169의 LC)의 예시적인 시험관 내 세포독성을 매트립타제의 사전처리 존재 또는 부재 하에 평가하였고, 동형 비-CD71 접합된 항체 대조군(DAR이 2인 AB095-vcMMAE, 여기서 AB095는 과상표 독소에 특이적임)과 비교하였다. 시험 물품의 세포독성을 HT29(인간 대장암 세포주), H292(인간 폐암 세포주), H520(인간 폐암 세포주), 및 HCC1806(인간 유방암 세포주)에 대하여 각각의 시험 물품을 각각의 세포주로 5일에 걸쳐 배양한 후에, EC50을 결정하기 위해 각 시험 물품의 농도 범위에 걸쳐 세포 생존율을 측정함으로써 시험하였다. 결과는 아래 표 9에 요약되어 있다.

표 9: 인간 종양 세포에서 시험관 내 세포독성 분석을 위한 EC50 값

시험 물품	HT29 EC ₅₀ (nM)	HCC1806 EC ₅₀ (nM)	H520 EC ₅₀ (nM)	H292 EC ₅₀ (nM)
항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	≥50	≥50	≥50	≥50
항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2, matriptase activated	1.3	3.2	1.2	3.3
동형 ADC	무반응	>50	>50	>50

[0785]

[0786]

[0787]

[0788]

[0789]

[0790]

[0791]

[0792]

[0793]

[0794]

이들 예시적인 결과는 온전한 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 시험관 내 세포독성이 동형 대조군의 그것과 유사하지만, 매트립타제 활성화시 실질적으로 증가되었음을 보여준다.

실시예 17: 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체에 의한 Fc 결합 및 보체 활성화

이 실시예는 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC) 및 보체-의존적 세포독성(CDC)과 같은 이펙터 기능-기반 메커니즘을 매개하는 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 능력을 입증하였다.

IgG 항체의 단편 결정화 가능(Fc) 부분은 다양한 기능을 매개할 수 있으며, 이 중 일부는 Fc 수용체 및 C1q에의 결합을 통해 발생한다. 이러한 기능은 사이토카인 유도, 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC), 보체 시스템의 고전적인 경로의 활성화를 통한 보체 의존적 세포독성(CDC), 식균작용, 및 IgG 리사이클링을 통한 항체 항상성을 포함한다. (문헌[Ravetch *et al.*, *Annu Rev Immunol.*, 2001;19:275-290]; 문헌[Roopenian *et al.*, *Nat Rev Immunol.* 2007;7:715-725]).

항체 항상성은 장상피세포, 혈관내피세포, 및 전문 항원 제시 세포에 존재하는 Fc-관련 신생아 수용체, FcRn에 의해 부분적으로 조절된다. 세포내에서, FcRn은 소포에 존재한다; 낮은 pH의 산성 엔도솜에서, 피노사이토시스에 의해 취해진 IgG의 Fc 부분에 결합할 수 있다. 이후, 세포의 중성 pH에 노출된 결과로서 엔도솜이 세포 표면으로 재순환될 때 IgG가 방출된다. 이 과정은 단일층 상피 장벽을 가로 지르는 IgG 트래피킹의 제어할 수 있게 하며, IgG 분자를 이화 작용으로부터 보호하여 IgG 혈청 반감기를 연장시킨다. (문헌[Roopenian]). 실제로, 낮은 pH에서 FcRn 결합을 향상시키지만 생리적 pH에서 낮은 결합을 유지하는 돌연변이는 더 긴 혈청 반감기를 갖는 것으로 나타났다. (문헌[Hinton *et al.*, *J Biol Chem.* 2004;279:6213-6216]; 문헌[Hinton *et al.*, *J Immunol.* 2006;176:346-356])

인간 Fc γ R 시스템은 활성화(Fc γ RI, Fc γ RIIa, 및 Fc γ RIIIa) and 억제성(Fc γ RIIb) 수용체 양쪽 모두로 구성된다. 고친화도 IgG1 수용체인 Fc γ RI는 단핵구 계통의 세포에 의해 발현된다. (문헌[Li *et al.*, *J Immunol.* 2008;181:1012-1018]) Fc γ RIIa는 면역 복합체에 우선적으로 결합하는 보다 널리 발현되는 저 친화도 IgG 수용체이다. (문헌[Littaua *et al.*, *J Immunol.*, 1990;144:3183-3186]) Fc γ RIIb는 대부분 단핵구 계통 및 B 세포에서 발현되며, 친화도가 낮은 저해 IgG 수용체이다. IgG 복합체에 대한 Fc γ RIIb 결합시 탈과립화, 식균작용, ADCC, 사이토카인 방출 및 전-염증성 활성화와 같은 칼슘-의존적 과정이 모두 차단된다. (문헌[Clynes *et al.*, *Nat. Med.*, 6:446-446 (2000)]; 문헌[Minard-Colin *et al.*, *Blood*, 112:1205-1213 (2008)]; 및 문헌[Hamaguchi *et al.*, *J. Exp. Med.*, 203:743-753 (2006)]). Fc γ RIII는 NK 세포의 ADCC 활성을 담당하는 저친화도 수용체이다. (문헌[Ravetch]) Fc γ RIIa 수용체의 다양성에 추가하기 위해, IgG 분자에 대한 친화도 차이가 있는 (H131 대 R131) 및 Fc γ RIIIa (V158 대 F158)의 다형성 변이체가 존재한다. (문헌[Bruhns *et al.*, *Blood*, 2008;113:3716-3725]).

Fc γ R 또는 보체 이펙터 시스템을 통해 다양한 기능을 매개하는 항체의 능력은 IgG 기반 공학 생물학에서 의도하지 않은 과장된 약리학의 가능성을 허용한다. 말초 혈액 림프구에 대한 미지의 교차 반응성은 Fc γ 수용체의 가교를 유발할 수 있다. 가교 Fc γ 수용체 상호작용은 사이토카인 유도, ADCC 및 식균작용(Ravetch)을 포함한 다양한 기능을 매개할 수 있기 때문에, 혈액 또는 조직에서 의도하지 않은 표적에 결합하는 치료용 항체의 능력을 결정하는 것이 중요하다.

방법 - 표면 플라즈몬 공명 Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, 및 FcRn 결합 검정

재조합 인간 Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 표면 플라즈몬 공명(Biacore)에 의하여 6xHis-태그를 통해 포획하여 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE, 항-CD71 Ab21.12 (IgG1/ κ), ABO95-MMAE-E2, 및 ABO95 (IgG1/ κ)에 대한 결합을 평가하였다. 마우스 항-6xHis 항체를 10000 RU의 밀도에 대한 제조업체의 프로토콜에 따라 아민 커플링에 의해 CM5 칩 상에 직접 고정하였다. 이후, 인간 Fc γ R을 플로우 셀 2, 3 및 4에서 포획하여 250 내지 500 RU의 Fc γ R

의 포획 수준을 달성하였다. 플로우 셀 1을 기준 표면으로 사용하였다. 러닝 완충액으로는 HBS-EP + 완충액(GE, Healthcare)을 사용하였다. 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2, 항-CD71 Ab21.12(IgG1/κ), AB095-MMAE-E2, AB095 (IgG1/κ), 및 트라스투주맙(IgG1/κ)을 FcγRII의 경우 46.9 내지 12000 nM 및 FcγRIII의 경우 7.8 내지 4000 nM(양쪽 모두에 대하여 2-배 연속 희석)에 이르는 농도로 50 μL/분의 유속으로 1분 내지 2분(FcγRIIb 및 FcγRIIa H131의 경우 1분, 및 FcγRIIIa F158 및 FcγRIIIa V158의 경우 2분) 동안 모든 유동 세포에 대하여 주사한 이후에, 1 내지 5 분의 해리 시간(FcγRIIb, FcγRIIa H131의 경우 1분, 및 FcγRIIIa F158 및 FcγRIIIa V158의 경우 5분)이 이어졌다. 칩 표면을 모든 4개의 유동 셀에 걸쳐 2초 동안 100 μL/분의 유속으로 100 mM HCl의 주입으로 재생시켰다. 모든 유형의 실험 오류(계측기, 표면, 및 조작자)를 수용하기 위해 각 샘플마다 3개의 서로 다른 CM5 칩을 사용한 3 가지 실험(각각 중복)을 실시하였다. 이 세 가지 실험의 결과는 평균화 되었다.

[0795] FcRn 결합 분석의 경우, 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2, 항-CD71 TF02.13-2011 (vc-MMAE 없이 IgG1/κ), AB095-vcMMAE-E2 (농축된 DAR=2를 갖는 MMAE를 함유하는 비특이적, 단일클론성 인간 항-과상표 변성독소 IgG1/κ 항체), AB095 (비특이적, 단일클론성 인간 항-과상표 변성독소 IgG1/κ 항체), 및 트라스투주맙(IgG1/κ)을 500 Ru의 밀도에 대한 제조업체의 프로토콜에 따라 아민 커플링에 의해 CM5 칩 상에 직접 고정하였다. Hu FcRn 을 5.5 내지 12000 nM (3 배 연속 희석) 범위의 농도에서 1분 동안 50 μL/분의 유속으로 모든 플로우 셀에 주입한 이후, 2분의 해리 시간이 이어졌다. 표면을 100 mM HCl의 주입으로 2초 동안 재생한 다음 HBS-EP+, pH 7.4 로 재생시켰다. 샘플을 제조하고 2개의 실행 완충액 시스템, MES-EP+ pH 6.0 및 HBS-EP pH 7.4에서 가동시켰다. 계측기, 표면 및 작업자 오류를 설명하기 위해 각 샘플마다 3개의 서로 다른 CM5 칩을 사용한 3 가지 실험을 수행하였다(각각 중복). 이 세 가지 실험의 결과는 평균화 되었다.

[0796] 모든 제조합 인간 FcγRIIIa V158 데이터 및 FcγRIIIa F158 데이터는 포획 수준의 변동성을 설명하기 위해 국소적으로 Rmax 고정된 1:1 결합 적합 모델에 맞추어졌다. 제조합 인간 FcγRIIb, FcγRIIa H131, 및 FcRn 결합 데이터를 정상 상태 친화도 모델에 맞추었다. 모든 데이터를 맞추는데 Biacore T200 평가 소프트웨어 버전 2.0 을 사용하였다.

[0797] 결과

[0798] 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2은 인간 IgG1/κ 동형 Fc를 함유한다. 다른 야생형 IgG1/κ 항체와 일관되게 FcγRI, FcγIIa, FcγIIb, FcγIII에 결합하는 것으로 예상되었다. 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2의 FcγR 와의 결합을 표면 플라즈몬 공명, FcγRI 경쟁 결합 ELISA(결과 미도시), 및 FcγRIII 경쟁 결합 ELISA(결과 미도시)으로 분석하였고, 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2의 보체와의 결합을 기능성 인간 및 시노물구스 보체 활성화 검정(결과 미도시)로 분석하였다. 이러한 검정을 상업적 및 사내(in-house) 생성된 인간 항체에 의해 벤치마킹하였다. 임상 등급의 인간 항-HER2, IgG1/κ, 트라스투주맙 물질을 FcγR 결합 분석을 위한 양성 대조군 으로서 사용하였다. Fc 수용체 및 보체는 야생형 IgG1 항체에 결합하는 것으로 알려져 있다. (문헌[Ravetch; Roopenian; Burton et al., Nature. 1980;288:338-344]; 문헌[Hughes-Jones et al., Mol Immunol., 1979;16:697-701]; 및 문헌[Hezareh et al., J Virol. 2001;75:12161-12168]). 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE 의 조사는 양성 대조군인 트라스투주맙과 비교하여 FcγRIII에 대한 결합이 약간 감소된 것 관찰되었지만, 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE이 FcγRI, FcγIIa H131, FcγRIII 및 FcRn과 결합하는 것으로 드러났다. 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2의 FcγRIIb에 대한 결합은 1.0 e-05 KD에서 Biacore 기기의 검출 한계 미만으로 떨어졌기 때문에 결정하기에는 너무 약했다. (표 10A 및 10B 참조).

표 10A: 표면 플라스몬 공명에 의해 FcγRIIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa 에 대한 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 결합

포획된 FcγR	Kd(M)				
	항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	항-CD71-TF02.13-2011(IgG1/κ)	AB095-vcMMAE-E2	AB095(IgG1/κ)	트라스투주맙
huFcγRIIb	결정하기에 너무 약한 결합	결정하기에 너무 약한 결합	결정하기에 너무 약한 결합	7.2 ± 1.2 E-06	8.6 ± 1.4 E-06
huFcγRIIIa H131	6.2 ± 2.3 E-06	4.7 ± 0.5 E-06	2.9 ± 0.3 E-06	2.1 ± 0.1 E-06	3.8 ± 0.2 E-06
huFcγRIIIa F158	2.1 ± 0.3 E-06	1.8 ± 0.1 E-06	8.9 ± 0.6 E-07	1.5 ± 0.1 E-06	7.5 ± 0.9 E-07
huFcγRIIIa V158	2.0 ± 0.4 E-07	1.8 ± 0.2 E-07	1.2 ± 0.2 E-07	1.6 ± 0.8 E-07	8.5 ± 1.3 E-08

표 10B: 인간 FcRn 표면 플라스몬 공명

시험 물품	KD (M)	
	pH 6.0 에서 FcRn	pH 7.4 에서 FcRn
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	5.3 ± 0.3 E-06	유의한 결합 없음
항-CD71-TF02.13-2011(IgG1/κ)	4.7 ± 0.3 E-06	유의한 결합 없음
AB095-vcMMAE-E2	5.7 ± 1.3 E-06	유의한 결합 없음
AB095(IgG1/κ)	5.5 ± 1.2 E-06	유의한 결합 없음
트라스투주맙	4.5 ± 1.0 E-06	유의한 결합 없음

보체-의존적 세포 독성(CDC)에 대해, ELISA에 의해 iC3b(인간) 또는 C3(시노)를 포획함으로써 인간 및 시노물구스 혈청 보체를 활성화시키는 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 능력을 평가함으로써 CDC를 평가하였다.

도 12의 예시적인 결과에 도시된 바와 같이, 표시된 농도에서 표시된 시험 물품의 iC3b에 대한 결합은 인간 보체 활성화에 대한 검정으로서 도시되어 있다. 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2는 인간 및 시노물구스 혈청 둘다에서 보체 활성화 검정에서 iC3b에 결합하였으나, CDC 검정에 사용된 양성 대조군인 7C6 항체보다 적은 정도로 결합하였다. 표시된 돌연변이를 갖는 7C6.7 항체를 음성 대조군으로 사용하였다. 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2의 iC3b 결합은 또한 그의 비접합된 활성화 가능한 항체 대응물(항-CD71-TF02.13-2011)보다 적었다.

실시예 18: 인간 PBMC에서 사이토카인 방출

이 실시예는 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2가 인간 또는 시노물구스 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 결합하지 않지만, IgG1 항체는 말초 혈액 림프구에서 Fcγ 수용체를 가교 결합하여, 다양한 사이토 카인 유도를 포함한 기능을 매개하는 것을 보였다.

인간 PBMC에서 시험관내 사이토카인 방출을 유도하는 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 또는 항-CD71-TF02.13-2011의 능력을 하기 사이토카인: 인터류킨 (IL)-1β, IL 6, IL 2, 인터페론(IFN)γ, 및 종양 괴사 인자 알파 (TNF α)에 대한 용해성 또는 고상(플레이트-결합) 형식으로 평가하였다. 고상 실험을 위해, 8개의 건강한 인간 공여자로부터의 PBMC를 0.96 μg의 시험 물품으로 미리 코팅된 폴리프로필렌 플레이트에 첨가하고 1.5 시간 후에 세척하였다. 48시간 후에 상청액을 수집하여 분석하였다. 트라스투주맙 및 비결합 동형 대조군 ADC, AB095-vcMMAE E2를 음성 대조군으로서 사용하였다. 3종의 양성 대조군: T 세포 자극 항체, TGN1412 또는 비실리주맙 및 B 세포, 및 골수성 세포 자극 리포폴리사카라이드(LPS)를 사용하였다. 시험된 8명의 공여자 중 1명에서, 5종의 측정된 사이토카인, IL-1β, IL-6, 및 TNF α 중 3종의 실질적인 방출이 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 및 AB095-vcMMAE-E2에 대한 반응으로 관찰되었다. IL-6 및 TNF α 방출은 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 및 AB095-vcMMAE E2 모두에 대한 반응으로 8명의 공여자 중 2명에서 추가로 관찰되었다. 24시간의 높은 세포 밀도 제시 검정인 가용성 제시 검정에서 3명의 공여자를 시험하였다.

이 연구에서, 인간 공여자 PBMC로부터의 사이토카인 방출을 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 및 항-CD71-TF02.13-2011 (IgG1κ)로 0.96 μg/웰의 프리코트르 자극 후 측정하였다. 트라스투주맙은 음성 대조군 IgG1κ 항체로 사용하였다. AB095-vcMMAE-E2 및 AB095(IgG1κ)를 동형 대조군 항체로 사용하였다. 사이토카인 방출에

대한 양성 대조군으로서 TGN1412, 비실리주맙 및 리포폴리사카라이드(LPS)를 첨가하였다. 볼드체 및 박스형의 수치는 트라스투주맙에 의한 방출의 2 배를 초과하는 사이토카인 방출을 유도한 시험 물품을 강조한다.

[0807]

표 11의 예시적인 결과에 나타난 바와 같이, 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2는 음성 대조군 트라스투주맙에 의해 유도된 수준 이상의 사이토카인 방출을 유도하지 않았다. 사이토카인 방출을 또한 하기 사이토카인: IL-1 β , IL-6, IL-2, IFN γ , IL-8, 및 IL 10에 대해 3명의 시노물구스 원숭이 공여자에서 고상 형식으로 평가하였다. 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2는 시험된 3명의 공여자 중 1명에서 트라스투주맙에 의해 정의된 바와 같이 배경 수준보다 약간 높은 IL-8 생성을 유도하였다. 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2에 대한 시노물구스 원숭이 비-GLP 및 GLP 독성학 연구에서, 사이토카인 방출을 나타내는 급성 임상 증상은 어떠한 용량 수준에서도 관찰되지 않았다.

표 11: 고상 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체 및 다른 시험 물품에 대한 반응으로 인간 PBMC의 사이토카인 방출

기증자 번호:	기증자 번호에 의해 열거된 pg/mL							
	32150	32151	32289	32165	32314	32147	32156	32169
IL-1β								
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	735	89	39	77	4	96	5594	493
항-CD71-TF02.13-2011(IgG1 κ)	294	90	40	64	6	111	4088	299
AB095-vcMMAE-E2	49	24	7	68	0	51	2704	141
AB095(IgG1 κ)	121	44	10	8	1	72	70	50
완충액	1	0	0	0	0	0	0	0
트라스투주맙	570	111	29	14	2	103	381	525
TGN1412	288	208	148	128	58	875	104	200
비실리주맙	439	231	616	465	270	172	61	35
LPS	3007	1570	1994	803	2272	0	0	0
IL-6								
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2022	176	110	102	8	71	>10000	1182
항-CD71-TF02.13-2011(IgG1 κ)	763	160	116	111	15	83	>10000	1213
AB095-vcMMAE-E2	278	59	37	103	5	78	9781	423
AB095(IgG1 κ)	195	63	42	19	2	37	305	132
완충액	15	1	1	0	1	1	1	8
트라스투주맙	1262	119	60	23	3	33	2776	879
TGN1412	655	521	296	214	207	151	208	248
비실리주맙	292	103	253	76	291	397	234	202
LPS	9668	9244	>10000	5655	>10000	1	1	10
TNFα								
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	3741	497	583	2110	133	2830	8581	3854
항-CD71-TF02.13-2011(IgG1 κ)	3438	693	881	1425	114	1554	5163	2309
AB095-vcMMAE-E2	1660	568	296	1458	51	1221	4815	815
AB095(IgG1 κ)	3703	634	349	443	50	1906	664	658
완충액	93	0	1	0	1	0	2	15
트라스투주맙	5276	931	506	553	70	1131	2180	3701
TGN1412	>10000	9651	8913	>10000	>10000	>10000	9126	>10000
비실리주맙	>10000	6593	>10000	>10000	>10000	>10000	3157	1642
LPS	470	308	293	322	257	2	0	12

[0808]

기증자 번호:	기증자 번호에 의해 열거된 pg/mL							
	32150	32151	32289	32165	32314	32147	32156	32169
IFNγ								
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	1950	19	3	12	7	349	354	52
항-CD71-TF02.13-2011(IgG1 κ)	7099	44	8	10	2	129	139	245
AB095-vcMMAE-E2	6119	35	4	4	1	161	53	14
AB095(IgG1 κ)	>10000	125	13	14	3	433	30	33
완충액	26	0	2	1	0	0	0	8
트라스투주맵	9173	59	6	7	1	300	58	4100
TGN1412	>10000	>10000	>10000	>10000	3488	>10000	8685	>10000
비실리주맵	>10000	6159	7957	>10000	7965	>10000	2048	873
LPS	376	607	30	7	29	0	0	14
IL-2								
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	145	4	3	3	3	2	3	3
항-CD71-TF02.13-2011(IgG1 κ)	217	2	3	5	1	1	3	13
AB095-vcMMAE-E2	126	2	3	2	1	1	8	2
AB095(IgG1 κ)	301	8	3	4	2	1	5	3
완충액	447	6	8	30	7	2	24	33
트라스투주맵	262	5	4	8	1	2	3	12
TGN1412	>10000	8485	9018	8223	>10000	821	636	1318
비실리주맵	396	459	1863	609	4643	>10000	1517	1038
LPS	78	3	6	4	4	7	15	34

[0809]

[0810]

[0811]

[0812]

실시예 19: SW-48 이종이식편 마우스 모델에서 항-CD71 AADC의 항종양 효능

이 실시예는 SW-48 세포(인간 대장암)를 사용하여 마우스 종양 이종이식편 모델에서 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화된 항체의 효능을 보여준다.

이 예시적인 연구에서, 표시된 투여량으로 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2(AADC)의 단일 복강 내 주사를 8마리 마우스 그룹에 투여하고, 평균 종양 부피를 시간이 지남에 따라 관찰하였다. 도 13 및 표 12에 도시된 바와 같이, 운반체 대조군과 비교한 23일째의 총 성장 억제(TGI) 범위는 모든 투여량에서 관찰되었으며, 완전한 종양 회귀는 6 및 12 mg/kg 투여량에서 관찰되었다.

표 12: 항-CD71 AADC 치료 후 이종이식편 종양 성장 억제

AADC 용량 (mg/kg)	TGI(%)	TGD(%)	PR(%)	CR(%)	TR(%)
0.75	35	21	0	0	0
1.5	66	71	0	0	0
3	96	>521	12.5	50	62.5
6	100	>521	0	100	100
12	100	>521	0	100	100

[0813]

[0814]

[0815]

[0816]

CR = 완전 반응; PR = 일부 반응; TGI = 종양 성장 억제; TGD = 종양 성장 지연; TR = 총 반응.

실시예 20: DLBCL PDX 마우스 모델에서 항-CD71 AADC의 항종양 효능

이 실시예는 암컷 SCID 또는 NOG 마우스에서 HuPrime 환자 유래 미만성 거대 B-세포림프종(DLBCL)을 사용하여 5마리의 마우스 종양 환자-유래 이종이식편(PDX) 모델에서 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화된 항체의 효능을 나타낸다.

이 예시적인 연구에서, 3마리 마우스 그룹을 피하 종양(100 내지 200 mm³)으로 확립하고, 0일 및 7일에 6 mg/kg의 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2(AADC) 또는 운반체 대조군을 투여하였다. 도 14의 예시적인 결과에 도시된 바와 같이, AADC 시험 물품은 운반체 대조군과 비교하여 5개 모델 중 4개 모델에서 > 100 % TGI 및 1개 모델에서 72% TFI를 달성하였다. AADC가 투여된 모델에서 완전한 반응(즉, 연구 종료시 측정 가능한 종양의 부재)은 LY2345의 경우 3마리의 마우스 중 2마리, 모델 LY6933의 경우 3마리 마우스 중 3마리, LY6934의 경우 3마리의 마우스 중 2마리, 및 모델 Ly2318의 경우 2 또는 3마리에서 관찰되었다. 모델 LY3604에 대해서는 완전한 반응이 관찰되지 않았다. 이들 예시적인 결과는 본 개시내용의 AADC가 일부 모델에서 완전한 반응까지 효능을 입증했음을 입증한다.

[0817] 실시예 21: 이종이식편 PDX 마우스 모델에서 항-CD71 AAD의 항종양 효능

[0818] 이 실시예는 누드 마우스에서 종양 이식(TumorGraft) 환자-유래 인간 유방암(CTG-0437, CTG-0869, CTG-1059), 비소세포성 폐암(NSCLC)(CTG-1082, CTG-0860, CTG-0160, CTG-1012), 및 두경부 소세포 암종(HNSCC)(CTG-1140, CTG-1082)을 사용하여 9개의 마우스 종양 환자-유래 이종이식편(PDX) 모델에서 본 개시 내용의 항-CD71 접합된 활성화된 항체의 효능을 보여준다.

[0819] 이 예시적인 연구에서, 각 PDX 모델에 대한 3마리 마우스 그룹을 피하 종양(150 내지 300 mm³)으로 확립하고, 0 일 및 7일에 6 mg/kg의 항 -CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2(AADC) 또는 운반체 대조군을 투여하였다. 도 15a, 15b, 및 15c의 예시적인 결과에 도시된 바와 같이, AADC 시험 물품은 3개의 암 징후에 걸쳐 9개 모델 중 6개 모델에서 > 100% 종양 성장 억제(TGI)를 달성하였다. > 100% TGI가 관찰된 이들 6개의 모델에서, AADC를 제공받은 18마리 마우스 중 6마리는 완전한 반응을 달성하였다(즉, 연구 종료시 측정 가능한 종양의 부재). 2개의 추가 모델에서, 92% 및 78% TGI가 각각 HNSCC 및 NSCLC에 대해 관찰되었다. 하나의 NSCLC 모델이 AADC에 반응하지 않았다. 이들 예시적인 결과에 도시된 바와 같이, 본 개시내용의 AADC는 다양한 인간 암 유형으로부터 유래된 PDX 모델에 대한 일부 경우에 완전한 반응을 포함하는 효능을 입증하였다.

[0820] 실시예 22: HuPrime 췌장 PDX 마우스 모델에서 항-CD71 AADC의 항종양 효능

[0821] 이 실시예는 SCID 마우스에서 HuPrime 환자-유래 인간 췌장암(PA6237)을 사용하여, 환자-유래 이종이식편(PDX) 마우스 모델에서 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화된 항체의 효능을 보여준다.

[0822] 이 예시적인 연구에서, 3마리 마우스 그룹을 피하 종양(100 내지 200 mm³)으로 확립하고, 0일 및 7일에 3 또는 6 mg/kg의 항 -CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2(AADC) 또는 운반체 대조군을 투여하였다. 도 16의 예시적인 결과에 도시된 바와 같이, AADC 시험 물품은 3 및 6 mg/kg에서 > 100% 종양 성장 억제(TGI)를 달성하였다. 이들 6 mg/kg 그룹에서, 3개 중 3개의 완전한 반응이 59 일까지 관찰되었고, 3 mg/kg 그룹은 31일까지 완전한 반응을 유지한 후, 종양 재성장이 이어졌다.

[0823] 실시예 23: 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 비-GLP 파일럿 독성 연구

[0824] 이 실시예는 3주마다 1회(Q3W) 또는 2주마다 1회(Q2W) IV 볼루스 주사 후 사이노볼구스 원숭이(그룹당 성별 1 내지 2 마리)에서 0.6 내지 6 mg/kg 범위의 용량 수준에서 항-CD71 접합된 항체(ADC) Ab21.12-vcMMAE E2에 대한 6 내지 18 mg/kg 범위의 용량 수준에서 본 개시내용의 항-CD71 접합된 활성화 가능한 항체(AADC) 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2의 상대 독성을 나타낸다. 시험 동물에 대해 29일 (마지막 투여 후 7일)에 종결 부검을 수행하였다. 연구 중 평가는 임상 징후, 체중, 음식 소비, 임상 병리학, 해부학적 병리학, TK, 및 면역 원성을 포함하였다. 파일럿 독성 연구의 요약은 표 13에 나타내 있다.

표 13: 시노물구스 원숭이에서 비-GLP 파일럿 독성 연구

시험 물품	용량 수준 (mg/kg)	약물-대-단백질 비율	용량 일	수컷/암컷
항-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE	6	2.7	1 (제 2 투여 없음)	1/1
항-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE	3	2.7	1, 22	1/1
항-CD71-TF01-3011-vcMMAE	6	2.9	1, 22	1/1
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE	6	2.9	1, 22	1/1
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2.0	1, 22	1/1

시험 물품	용량 수준 (mg/kg)	약물-대-단백질 비율	용량/부검 일	수컷/암컷
운반체 대조군	0	해당 없음	1, 22 / 29	2/1
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	2.0	1, 22 / 29	2/1
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2.0	1, 22 / 29	2/1
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	18	2.0	1 / 22 (제 2 투여 없음)	2/1
항-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2	9	2.0	1, 22 / 29	1/1
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	8	2.0	1, 15 / 50	1/1
Ab21.12-vcMMAE E2	6	2.0	1 / 10 (제 2 투여 없음)	1/0
Ab21.12-vcMMAE E2	2	2.0	1 (제 2 투여 없음)	0/1
Ab21.12-vcMMAE E2	0.6	2.0	1, 22 / 29	1/1

[0825]

[0826]

심한 독성은 고용량의 CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2(18 mg/kg), 빈번한 용량의 CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2(1 일 및 15일 투여), 또는 6 및 2 mg/kg으로 마스킹되지 않은 모체 항-CD71 항체 약물 집합체(ADC)(Ab21.12-vcMMAE E2)를 받은 그룹들에서 굽은 자세, 감소된 활성, 및 체중 상승에 의해 뚜렷하게 관찰되었다. 사망 원인이 확립될 수 있었을 때, 이는 약물 관련 면역 억제에 2차적인 감염인 것으로 결정되었다.

[0827]

시험 물품 관련 결과는 CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 및 Ab21.12-vcMMAE E2에 대해 유사하였고, 주로 혈액학적 독성으로 구성되었다. 주요 결과는 included (1) 18 mg/kg의 CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2의 단일 투여, 1일 및 15일에 8 mg/kg의 CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, 또는 ≥ 2 mg/kg의 ADC(Ab21.12-vcMMAE E2)의 단일 투여를 받은 그룹에서 관찰된 2차 감염으로 인하여 사망, (2) CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2의 12 mg/kg 이상에서 투여 후 3 주에 회복하여, 투여 후 2주에 체중 감소, (3) 적혈구 질량 및 투여 후 3주에 관찰된 부분 내지 완전 회복을 갖는 모든 백혈구 집단에서의 용량 의존적 감소, (4) 투여 후 2주에 혈소판 수준의 일시적 증가, (5) 섬유소원의 경증에서 중등도 증가, 알부민 감소 및 글로불린 증가, (6) 골수, 비장 및 흉선 세포질의 경증에서 중등도 감소와 이에 상응하는 흉선 및 비장에서 중량 감소를 포함하였다. 감소된 세포성은 또한 몇몇 림프 조직에서 관찰되었다.

[0828]

이 예시적인 연구에서, CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 및 Ab21.12-vcMMAE E2 (상응하는 ADC)의 이들 연구에서의 최고 허용 용량은 2회 투여를 위해 3주 마다 1회 투여된 각각 12 mg/kg 및 0.6 mg/kg이었다.

[0829]

실시예 24: 항-CD71 집합된 활성화 가능한 항체의 GLP 독성 연구

[0830]

이 실시예는 IV 볼루스 주입을 통해 1일 및 22일에 0, 2, 6, 또는 12 mg/kg의 용량 수준에서 본 개시내용의 항-CD71 집합된 활성화 가능한 항체(AADC) 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2의 시노물구스 원숭이에서의 GLP 반복 용량 독성 연구를 보여준다. 용량 그룹은 표 14에 나타내 있다.

표 14: 시노몰구스 원숭이에서 GLP 독성 연구

시험 물품	용량 수준 (mg/kg)	약물-대-단백질 비율	용량 일	수컷/암컷
운반체	0	해당 없음	1, 22	6/6
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2	2.0	1, 22	6/6
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	2.0	1, 22	6/6
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2.0	1 (제 2 투여 없음)	6/6

이 예시적인 연구에서, 표 14에 나타난 바와 같이, 6 마리의 수컷 및 6 마리의 암컷 원숭이의 각 그룹에 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 또는 운반체(1일 및 22일에 표시된 투여량의 IV 볼루스)을 투여하였다. 종결 부검을 29일에 수행하였고, 회복 부검을 64일에 수행하였다. 독성 평가는 사망, 임상 징후, 체중 변화, 음식 소비, 임상 병리학, 해부학적 병리학, 안과 검사, 및 심혈관, 호흡기 및 중추 신경계 기능의 평가를 포함하였다. 연구는 TK 분석 및 ADA 형성의 평가를 포함하였다. 하기 예시적인 관찰이 이루어졌다. 마스킹되지 않은 항-CD71 항체 약물 접합체(ADC) Ab21.12-vcMMAE E2(약 2의 DAR을 가짐)의 상응하는 비-GLP 연구와 비교하여 약 2의 DAR을 갖는 항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2의 GLP 독성 연구로부터 선택된 결과의 요약은 표 15에 요약되어 있다.

표 15: 시노몰구스 원숭이에서 GLP 독성 연구 결과

시험 물품(q3wx2)	용량 수준 (mg/kg)	체중 손실	평균 호중구 수 ± SD	내약성
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	0 %	61 ± 44	내약성 없음
항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	0 %	277 ± 132	내약성 있음
Ab21.12-vcMMAE E2	2	6 %	70	내약성 없음
Ab21.12-vcMMAE E2	0.6	4 %	280 ± 42	내약성 있음

체중, 음식 소비, 호흡률, 심전도, 응고 및 소변 검사 매개변수에 대한 AADC 관련 영향은 없었으며 신경학적 영향, 안구 효과 또는 심한 병리 소견도 없었다.

AADC-관련 사망률은 12 mg/kg 용량에서 관찰되었으며; 임상 조건이 감소함에 따라 10일에 암컷 1마리가 죽었고 11일에 암컷 2마리를 안락사시켰다. 이 동물들에서 AADC-관련 임상 병리학 및 현미경적 소견은 AADC-관련 면역억제의 결과로 여겨지는 박테리아 감염의 미세한 증거를 제외하고는, 예정된 부검(29 일)에 생존한 동물에 존재하는 것과 유사하였다.

표 15에 나타난 바와 같이, 항 -CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2는 체중 감소가 검출되지 않으면서 Ab21.12-vcMMAE E2에 비해 우수한 내약성을 입증하였다. 이와 같이, Ab21.12-vcMMAE E2는 2 mpk에서 단일 용량의 8일 이내에 내약성이 부족한 반면, 항-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2는 마스킹되지 않은 Ab21.12-vcMMAE E2에 대해 10 배 이상의 보호를 제공하였다.

예정된 부검까지 생존한 12 mg/kg-투여된 동물에서 AADC-관련 임상 징후는 백혈구 집단 감소 및 급성기 반응(알부민 및 콜레스테롤 감소 및 글로불린, 총 빌리루빈, 및 트리글리세리드 증가)의 징후와 관련된 감염과 일치하는 피부 병변/상처였다.

제1 용량 후 6 mg/kg 이상에서 혈액학적 매개변수의 변화는 혈소판의 증가와 함께 적혈구 질량, 망상 적혈구 및 모든 백혈구 서브 세트의 감소로 구성되었다. 2 mg/kg에서의 혈액학적 변화는 제1 및 제2 용량에 따라 약간 증가된 혈소판으로 한정되었다.

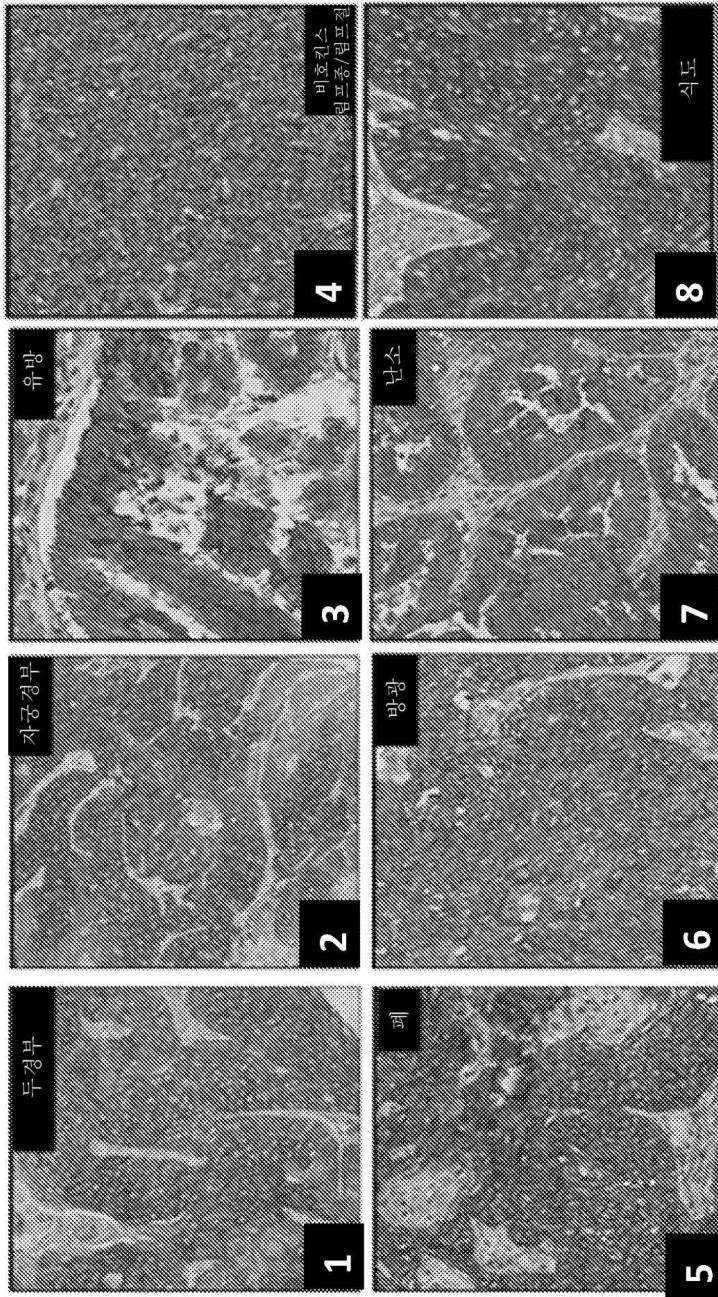
제1 용량 후 임상 화학 매개변수의 AADC-관련 변화는 12 mg/kg에서 가장 현저하였으며, 급성기 반응(알부민 및 콜레스테롤 감소 및 글로불린, 트리글리세리드 [암컷 만], 총 빌리루빈 증가), 및 우레아 질소 (개체 만)와 크레아티닌의 증가, 및 인의 감소였다. 6 mg/kg의 임상 화학 변화는 제1 용량 이후에만 나타났으며, 개별 암컷에서 최소 증가 빌리루빈 및 증가된 글로불린으로 한정되었다.

- [0840] AADC-관련 혈액 및 임상 화학 소견은 회복 단계 말미에 회복되었다.
- [0841] 종말 안락사에서의 AADC-관련 현미경 소견은 흥선, 부신 및 골수에 6 mg/kg/용량 이상으로 존재하였다. 주사 부위에서의 소견은 모든 그룹에서 관찰되었으며, 특히 AADC가 아닌 투여 절차와 관련이 있는 것으로 해석된다. 12 mg/kg을 투여한 수컷 원숭이와 6 mg/kg을 투여한 암컷 원숭이에서 흥선 무게가 감소하였으며, 이는 조직적으로 감소된 세포질, 특히 흥선 피질의 조직학적으로 상관 관계가 있었다. 12 mg/kg을 투여한 수컷 원숭이와 6 mg/kg을 투여한 암컷 원숭이에서 부신 샘 무게가 증가하였고 조직학적 상관 관계는 부신피질 비대였다. 감소된 세포성은 6 mg/kg 이상을 투여한 수컷 원숭이에서 골수, 특히 대퇴골에 존재하였다. 6주 무용량 간격 후, 흥선 및 부신피질 비대의 감소된 세포 성은 존재하지 않았으며, 이러한 변화의 완전한 회복과 일치하였다. 골수의 증가된 세포성은 지속되었지만, 부분 회복과 일치하여 심각성이 감소되었다.
- [0842] **실시예 25: MMAE의 CD71 활성화 가능한 항체에 대한 접합 및 생성된 CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR을 약 DAR 3으로 감소시키는 방법**
- [0843] 이 실시예는 DAR을 약 3으로 농축하는데 사용된 방법 외에 각각의 항-CD71 TF02.13-2011 분자에 대하여 2의 약물 부하를 함유하는 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE를 생성하기 위해 vc-MMAE를 항-CD71 활성화 가능한 항체, 항-CD71 TF02.13-2011에 접합시키는데 사용된 방법을 요약한다.
- [0844] 접합 방법
- [0845] E2-농축된 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE - 2 내지 8°C에서 항-CD71 TF02.13-2011 용액(13.95 mg/mL), 39 g 용액, 544 mg, 3.5 nmol)에 0.5 M EDTA (0.39 mL) 및 TCEP (0.77 mL, WFI 중 10 mM, 7.7 nmol, 2.2 당량)를 첨가하였다. 이후, 실온에서 환원된 항체를 DMSO 중 vcMMAE (DMSO 중 9.49 mM vcMMAE 1.89 mL, 17.9 nmol, 5.1 당량)로 1 시간 동안 처리한 DMSO(2.29 mL)로 희석하였다. 접합된 항체를 N-아세틸 시스테인(WFI 중 0.29 mL의 100 mM, 29 nmol, 8.2 당량)으로 처리하여 과량의 vcMMAE를 켄칭시켰다. 켄칭된 용액을 DAR 중> E4(더 높은 DAR 중, 상기 제조에서 20.9%)에 대해 HIC(소수성 상호작용 크로마토그래피)에 의해 분석하였다.
- [0846] DAR을 감소시키기 위한 농축 방법
- [0847] 접합 반응을 Tosoh Biosciences에서 시판되는 것(일례로 Toyopearl 알킬)과 같은 HIC 수지로 실온에서 2 시간 동안 부분적으로 현탁시켜, 더 높은 DAR 중을 목표 수준(일반적으로 <2 %)으로 감소시켰다. 처리된 용액을 여과하고 수지를 PBSE(125 mM 인산칼륨, 150 mM NaCl, 6.3 mM EDTA, pH 7.2, 22 g)로 세척하고, 이어서 PBS (5 mM 인산칼륨, 200 mM NaCl, pH 7, 35 g)로 연속적으로 세척하였다. 합한 여액 및 린스를 농축하고 30 kD 분자량 컷-오프 원심 분리 필터를 사용하여 완충액 교환한 다음, 저장을 위해 제형 성분으로 희석하였다.
- [0848] 생성된 생성물은 228 mg(A280 6.5 mg/mL)를 함유하고 시판되는 HIC 컬럼으로부터 측정할 때 약 2.9의 DAR을 가지며 하기 특성 및 DAR 중을 구성하는 것으로 나타났다: SEC 98.7% 모노머, 0.2% 더 높은 분자량, 1.1% 더 낮은 분자량, 내 독소 <0.06 EU/mg, E4보다 큰 DAR 중은 2 면적% 미만; DAR E0은 약 6.2 면적%, DAR E2는 약 40.7 면적 %, 및 DAR E4는 약 46.8 면적%였다).
- [0849] 본원에 기재된 실시예에서, 이 농축된 DAR 생성물은 "항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE(약 3의 평균 DAR을 가짐)"로 지칭된다.
- [0850] **실시예 26: MMAE의 CD71 활성화 가능한 항체에 대한 접합 및 생성된 CD71 접합된 활성화 가능한 항체의 DAR을 약 DAR 2("E2")로 농축시키는 방법**
- [0851] 이 실시예는 DAR을 약 2으로 농축하는데 사용된 방법 외에 각각의 항-CD71 TF02.13-2011 분자에 대하여 2의 약물 부하를 함유하는 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE를 생성하기 위해 vc-MMAE를 항-CD71 활성화 가능한 항체, 항-CD71 TF02.13-2011에 접합시키는데 사용된 방법을 요약한다.
- [0852] 접합 방법
- [0853] 항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 - 항-CD71 TF02.13-2011(20.3 mg/mL)의 용액에 1457 g PBSE(125 mM 인산칼륨, 150 mM NaCl, 6.3 mM EDTA, pH 7.7)로 희석하고 4°C로 냉각시켰다. 냉각된 용액에, TCEP (WFI 중 10 mM, 30.2 mL, 0.30 mmol, 1.5 당량)를 첨가하고 4°C에서 15시간 동안 유지시켰다. 환원된 항체에, DMSO (300 g) 중 vc-MMAE(1.056 g, 0.80 mmol, 4 당량)의 용액을 냉각하며 첨가한 후 DMSO 린스(65 g)를 첨가한 후, 용액을 실온으로 가온시켰다. 3.5시간 후, N-아세틸 시스테인(0.262 g, 1.60 mmol, 8 당량)을 첨가하여 과량의 vc-MMAE를 켄칭하고, 반응 혼합물을 정제될 때까지 2 내지 8°C에서 저장하였다.

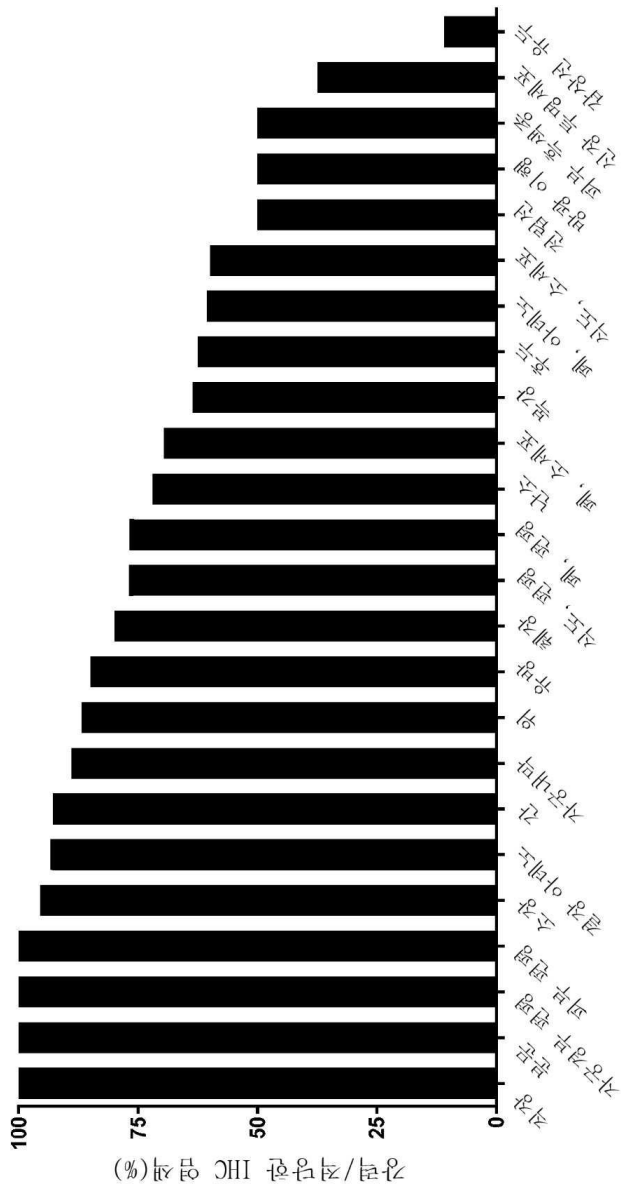
- [0854] DAR을 감소시키기 위한 농축 방법
- [0855] 생성물을 UV에 의해 280 nm에서 모니터링하면서 pH 7.1에서 황산 암모늄/포스페이트 완충액의 구배를 사용하여 GE Life Sciences(알킬 세파로스)로부터 시판되는 것들과 같은 시판되는 HIC 정제 컬럼상에서 부분적으로 정제하였다. 수집된 DAR 2 생성물 풀(대략 9.5 g, 30% 수율)을 Pellicon 3 Ultracel 30 kD 막을 사용하여 TFF에 의해 pH 6.0에서 완충액으로 완충제 교환한 다음 저장을 위해 제형 성분으로 희석하였다.
- [0856] 생성된 생성물(A280 6.4 mg/mL)은 시판되는 HIC 컬럼으로부터 측정된 바와 같이 약 2의 DAR을 가지며 하기 특성 및 DAR 종을 구성하는 것으로 나타났다: SEC 99.6% 모노머, 0.2% HMW, 0.2% LMW, 내독소 < 0.06 EU/mg, 및 DAR E2는 약 99.0 면적%이며 94 내지 99% DAR E2 사이의 런-투-런 가변성.
- [0857] 본원에 기재된 실시예에서, 이 농축 DAR 2("E2") 생성물은 "항-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2"로 지칭된다.
- [0858] **실시예 27: 전임상 무린 모드에서 더 높은 DAR 종에 대한 E2의 생물물리학적 특성 평가**
- [0859] 실시예 25에 기재된 방법으로부터 수득된 비-HIC 정제된 접합된 생성물을 본원에 약술된 표준 완충액 및 절차를 사용하여 HIC 컬럼에 걸쳐 수행하였다. 도 18a에 도시된 바와 같이, 0 내지 8의 약물 부하를 갖는 다수의 종이 식별되었다.
- [0860] 실시예 26에서 수득된 정제된 E2 생성물에 동일한 HIC 크로마토그래피를 수행하였다. 도 18b에 도시된 바와 같이, 약물 부하가 2 인 단일종만이 관찰되었다.
- [0861] 비-정제 및 E2 생성물을 방사성 표지하고 마우스에 주입하여 각 생성물의 전체 제거율 및 독성을 평가 하였다. 도 18c에 도시된 바와 같이, 정제된 E2 생성물은 비정제된 고 약물 부하의 제품에 비해 상당히 낮은 제거율을 갖는 것으로 나타났다.
- [0862] **기타 실시형태**
- [0863] 본 발명은 그 상세한 설명과 관련하여 설명되었지만, 전술한 설명은 첨부된 청구 범위의 범주에 의해 정의된 본 발명의 범위를 예시하며 제한하려는 것이 아니다. 다른 양태, 장점 및 변형은 다음의 범위 내에 있다.

도면

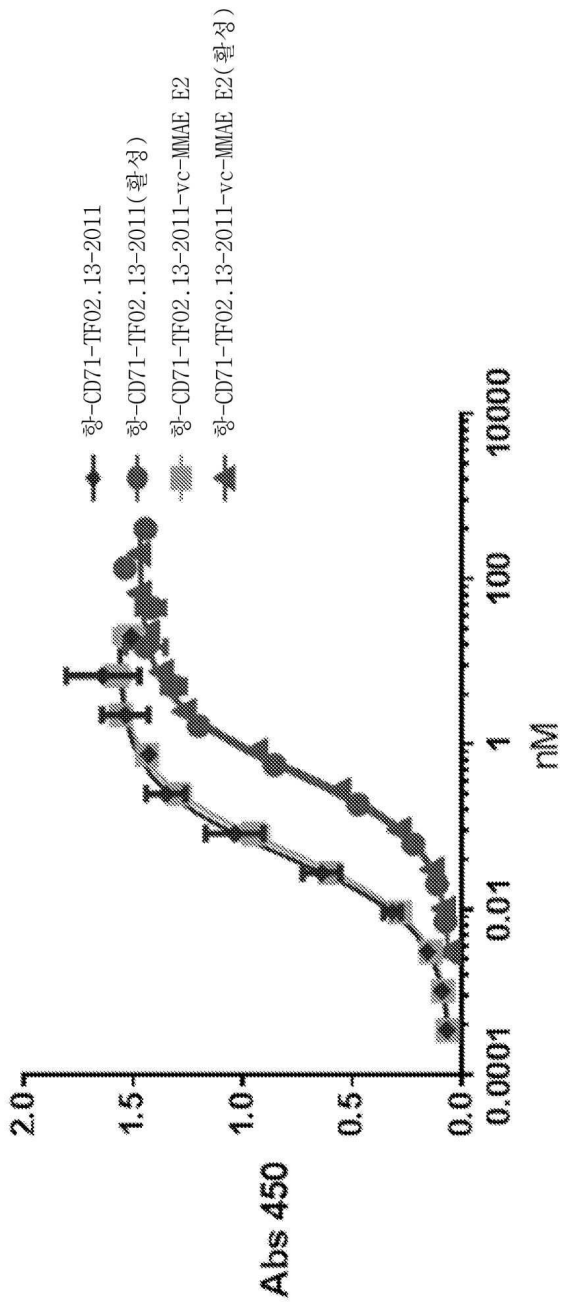
도면1



도면2

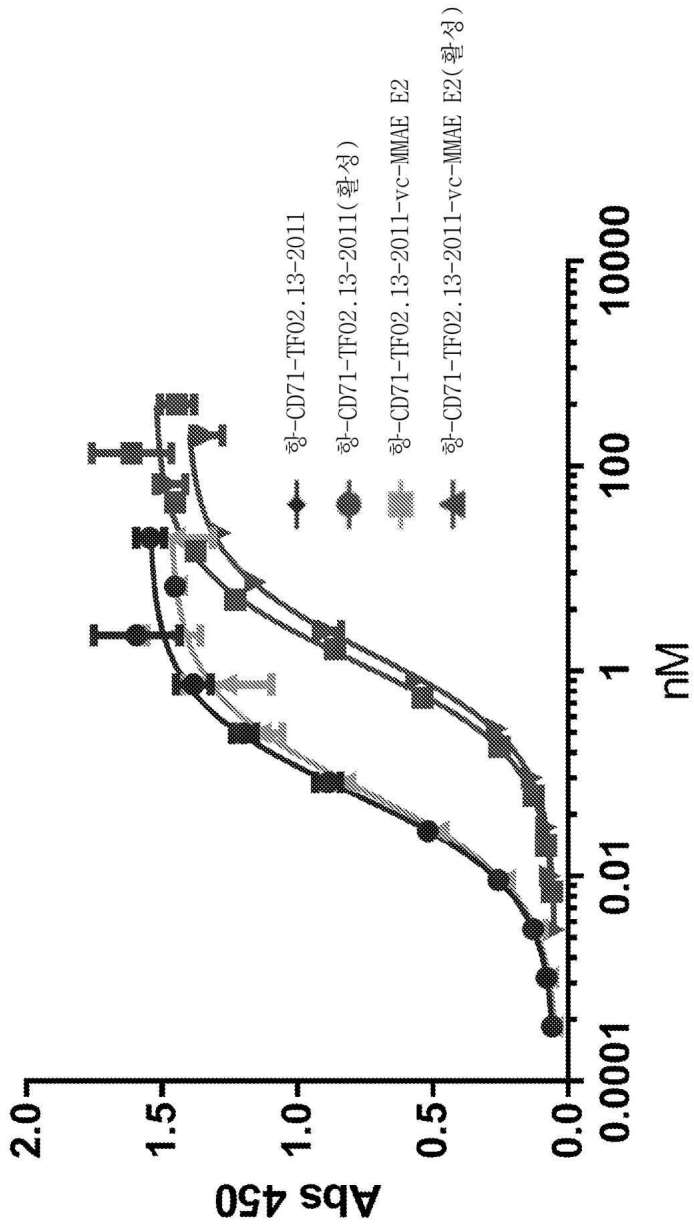


도면3a



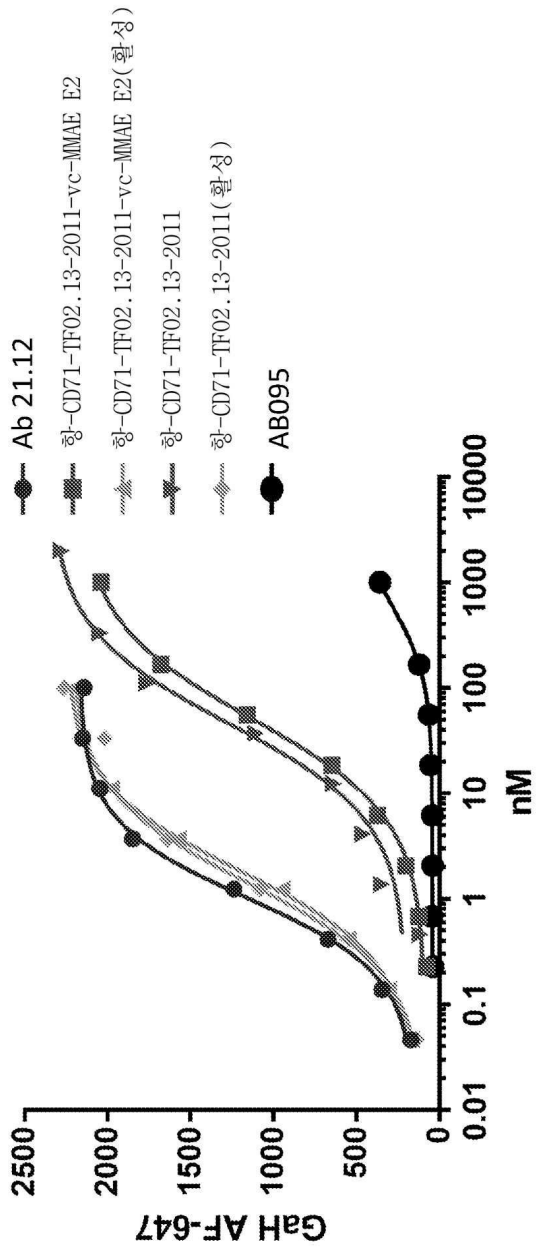
제조합 인간 CD71 결합

도면3b



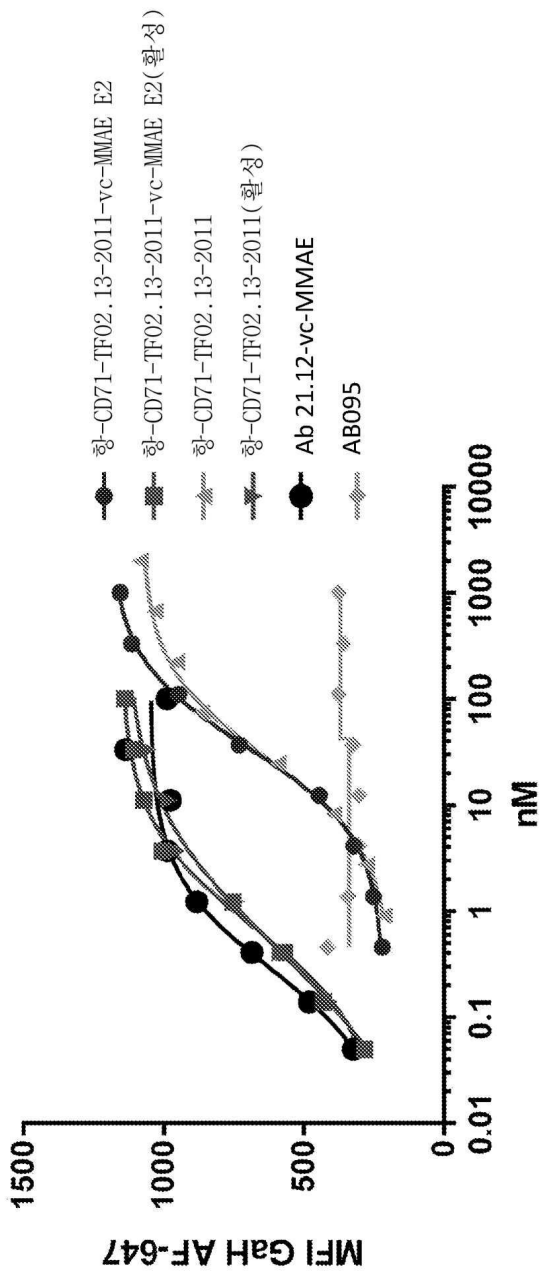
제조합 시노폴구스 CD71 결합

도면3c



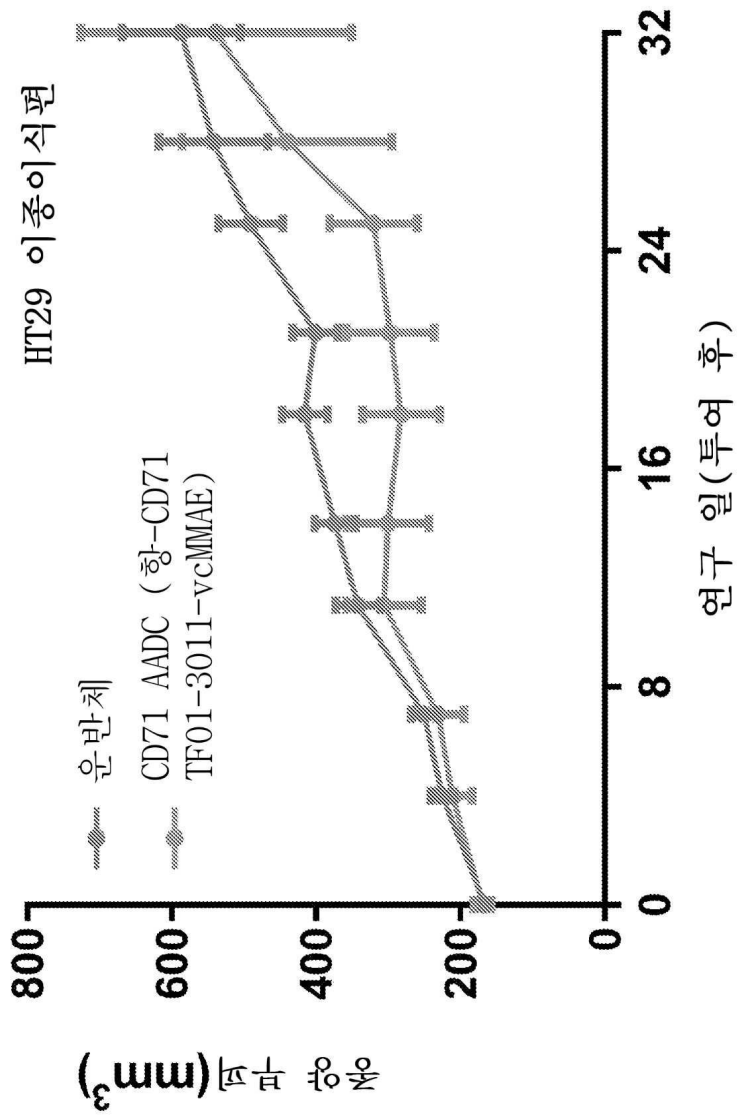
인간 CD71 결합(H292)

도면3d

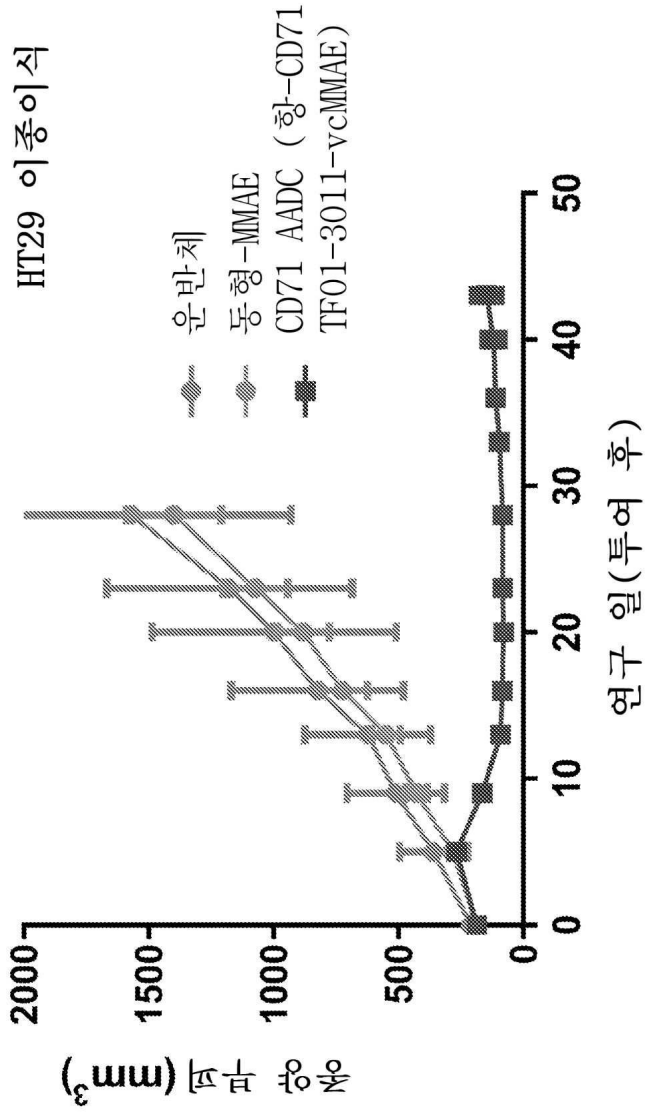


시노물구스 CD71 결합(CHO-시노 CD71)

도면4a

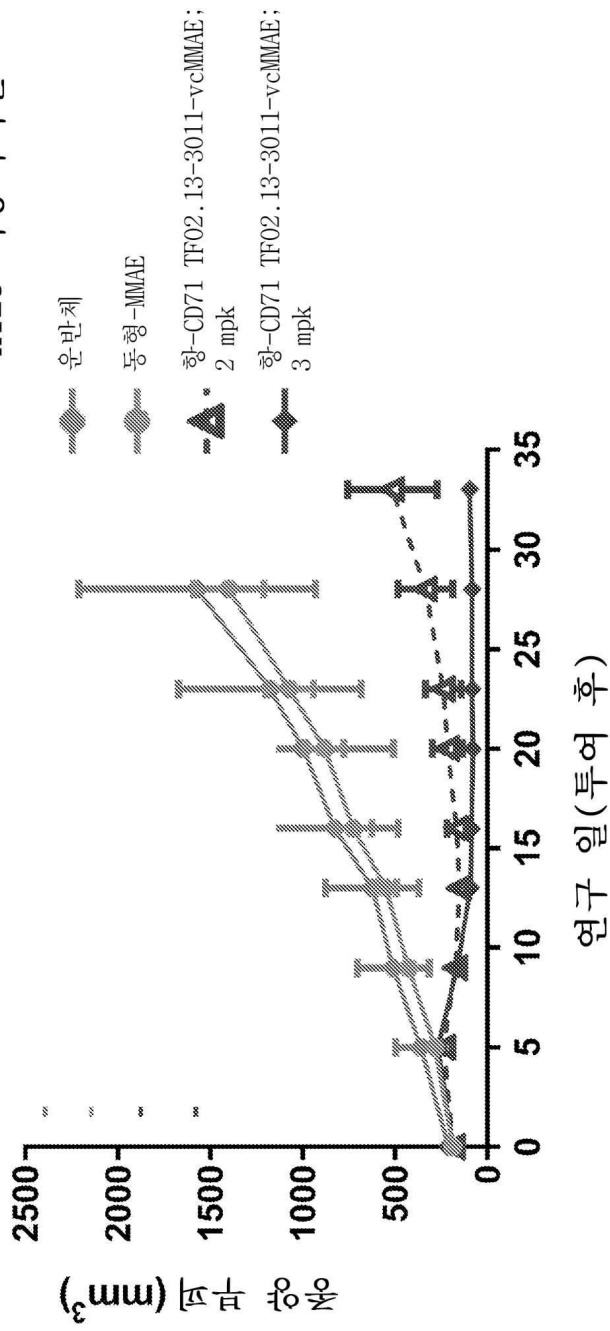


도면4b

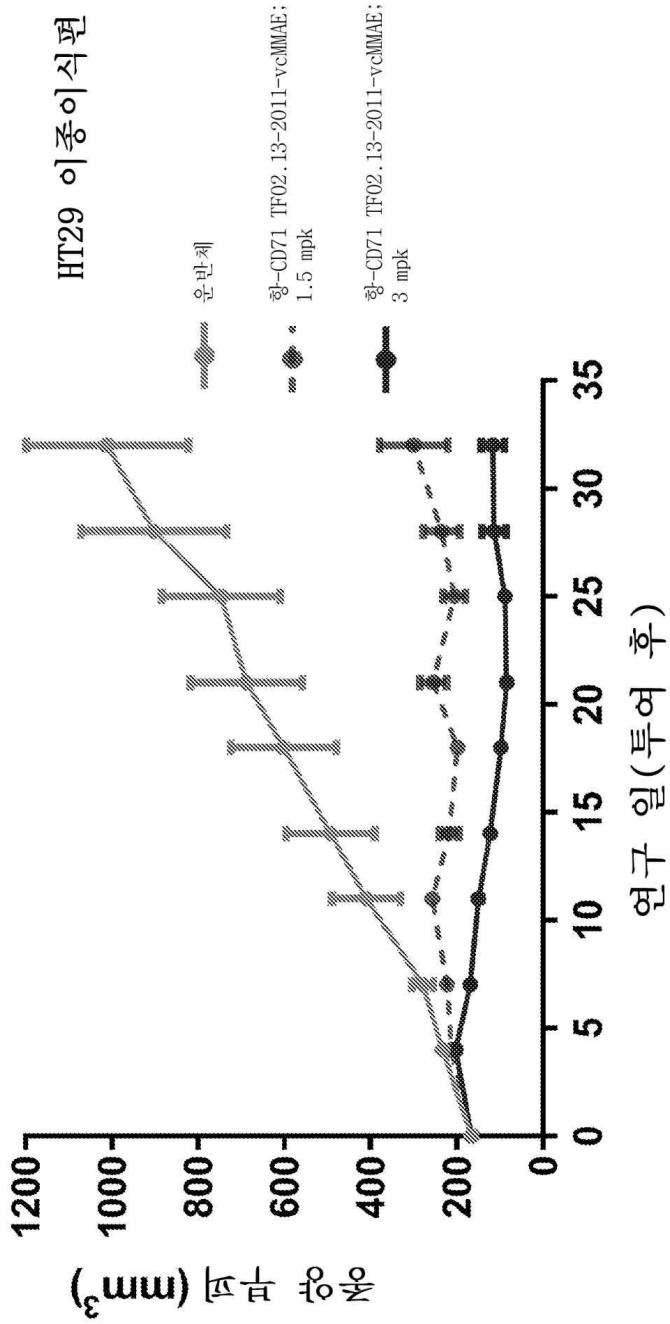


도면4c

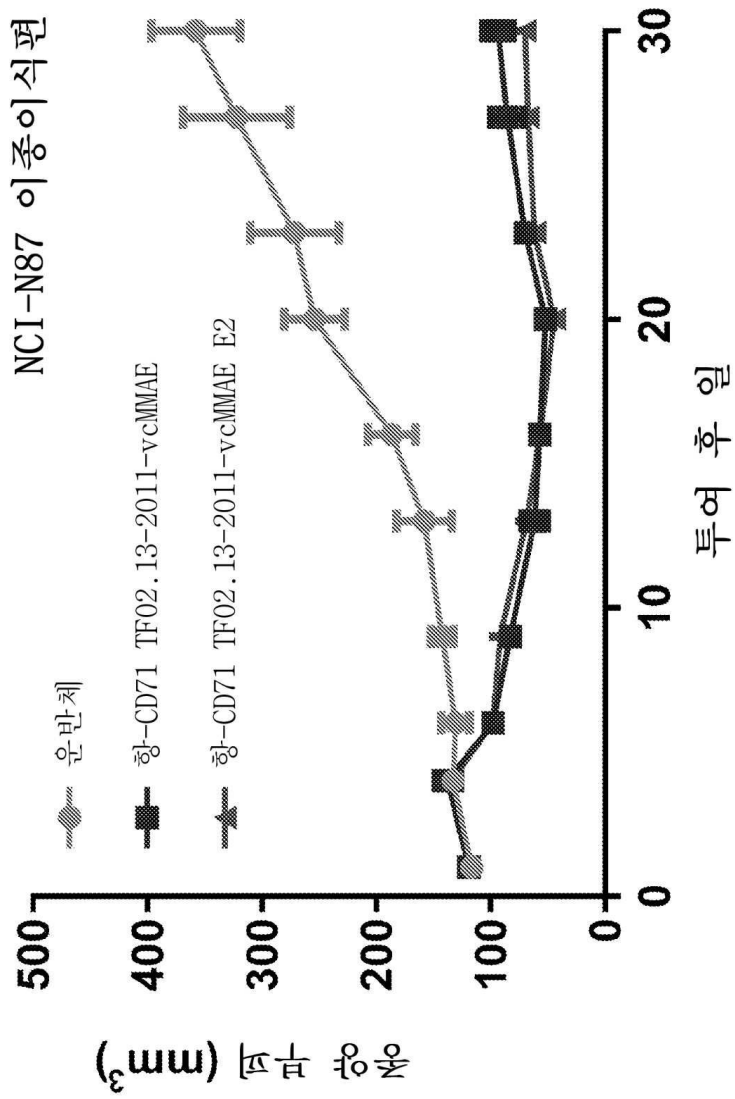
HT29 이종이식편



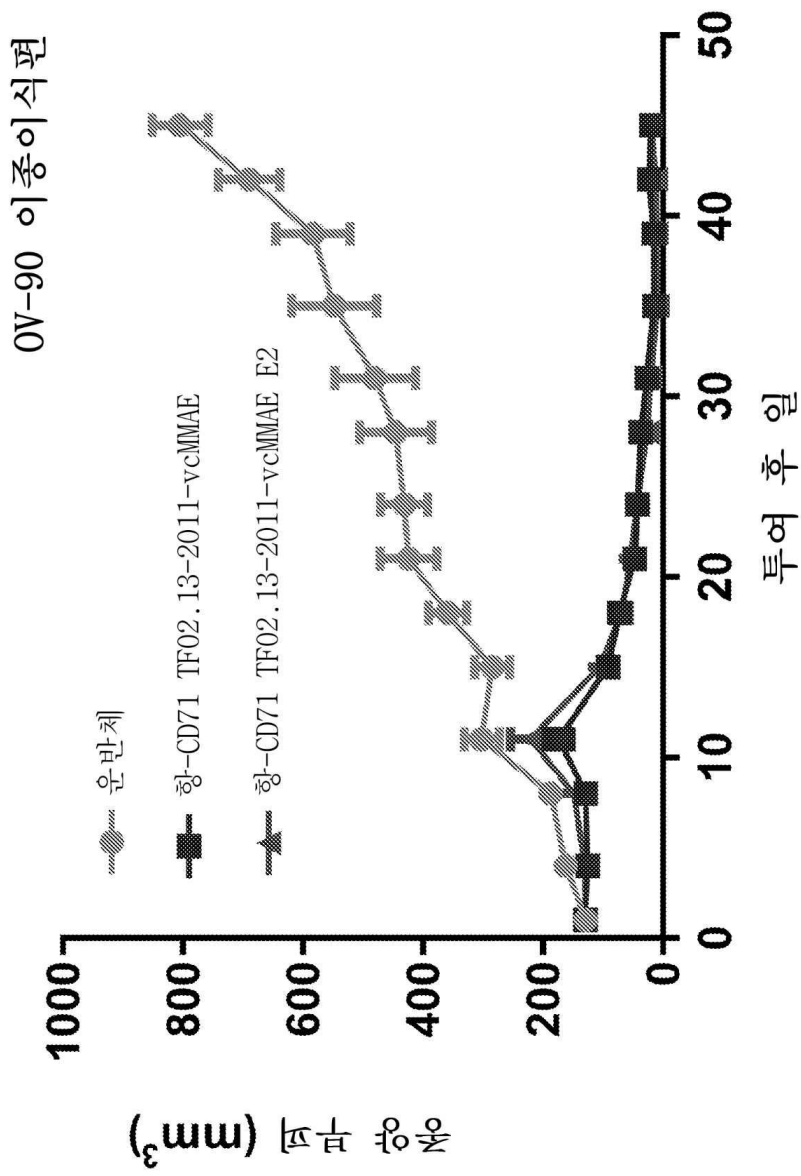
도면5



도면6a

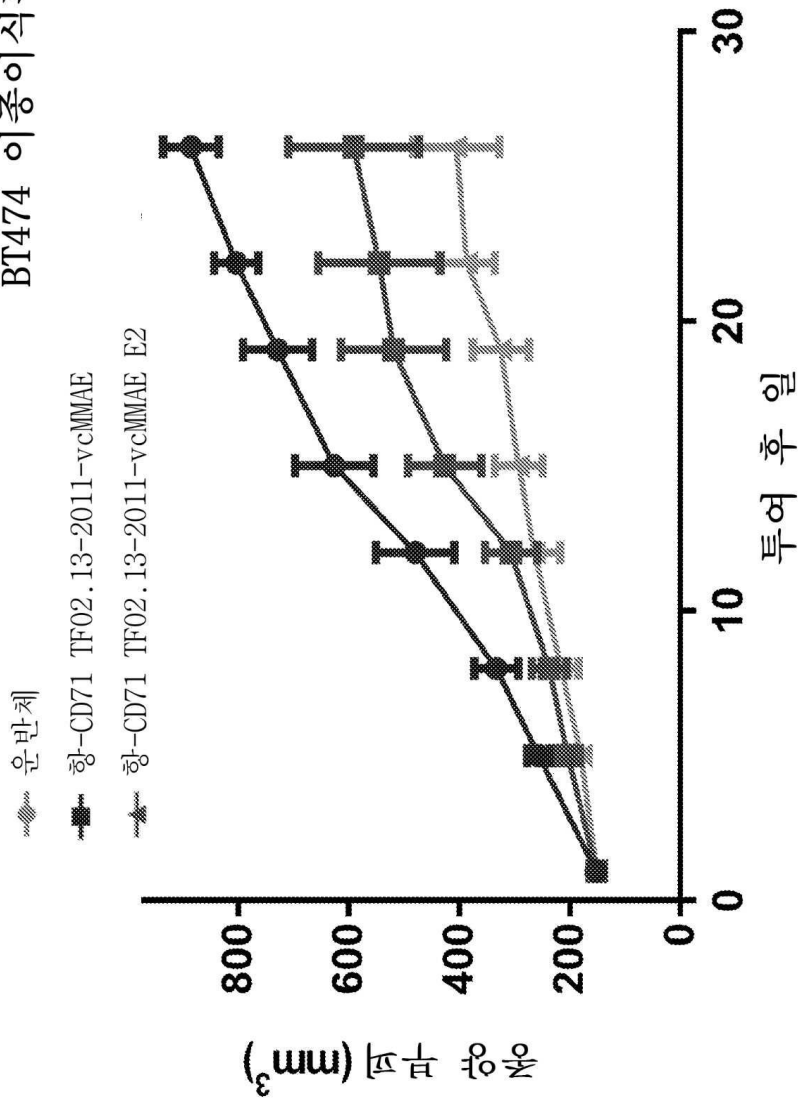


도면6b



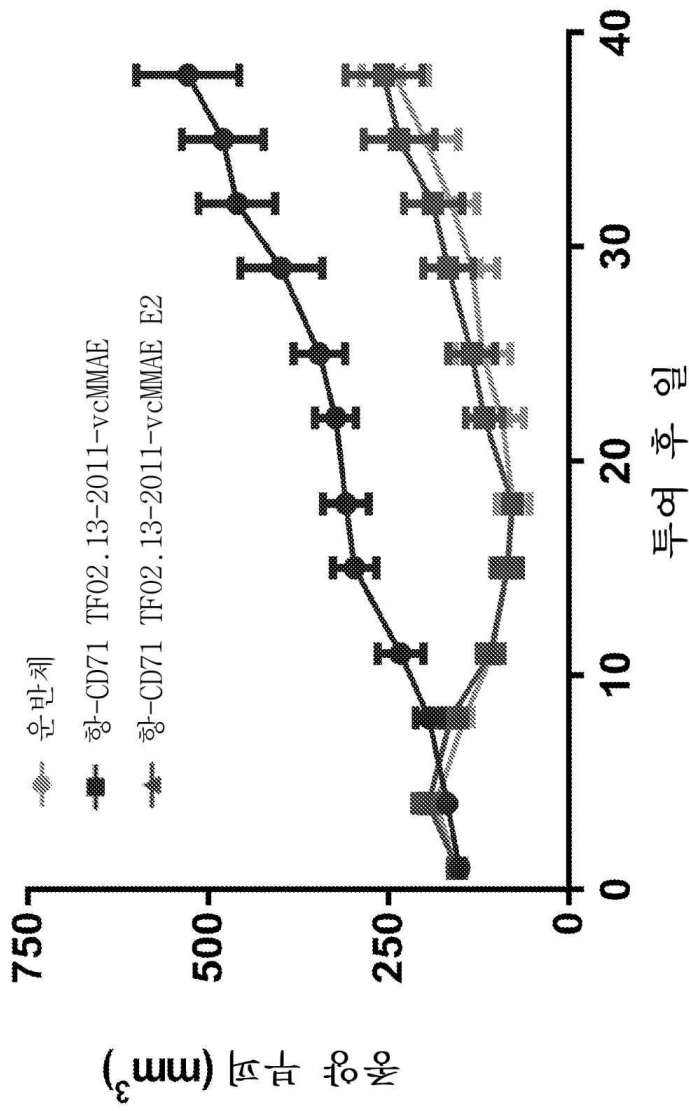
도면6c

BT474 이종이식편

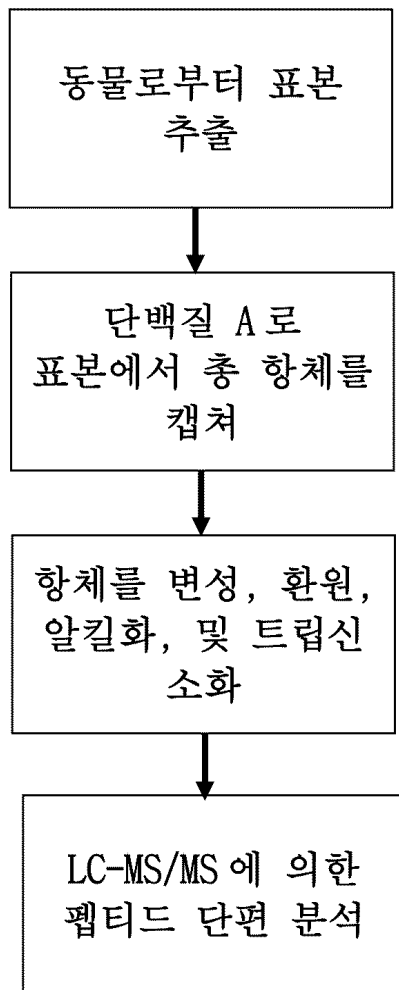


도면6d

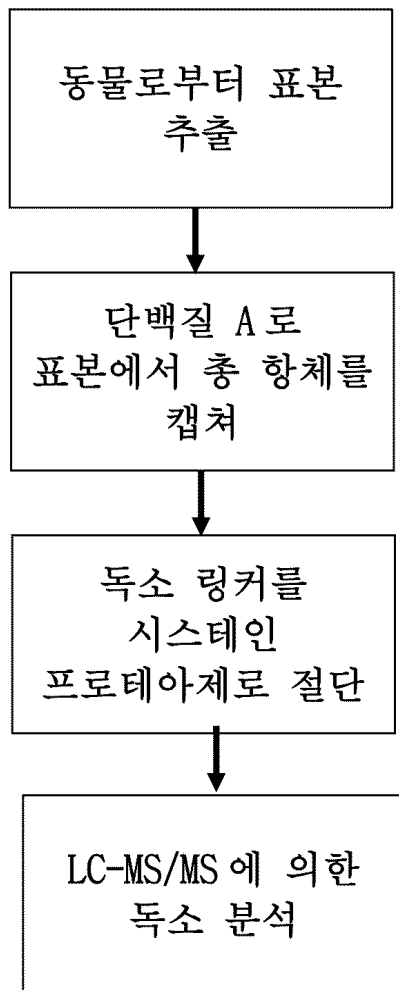
HCC-70 이종이식편



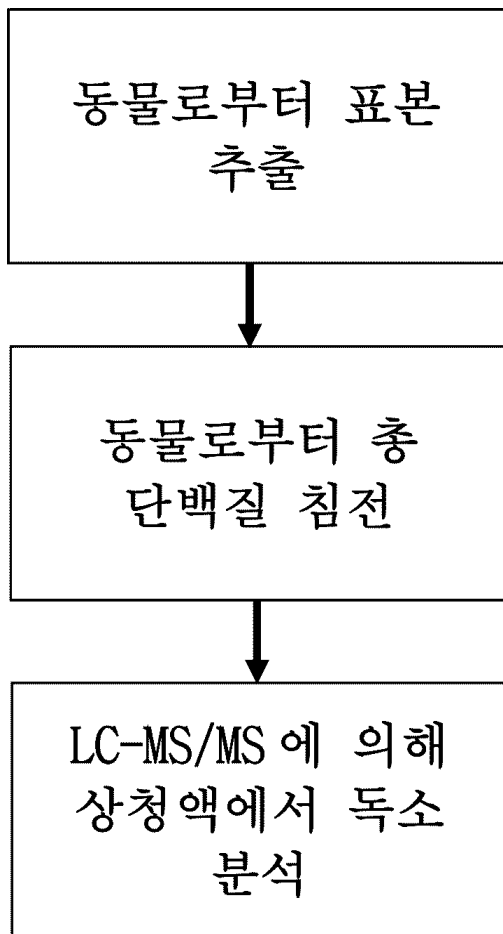
도면7a



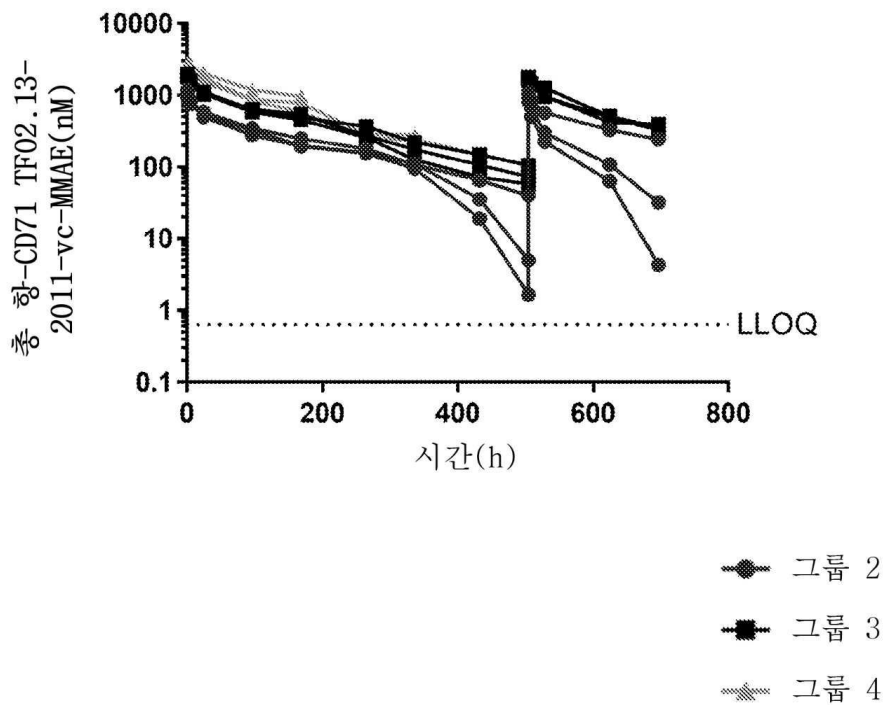
도면7b



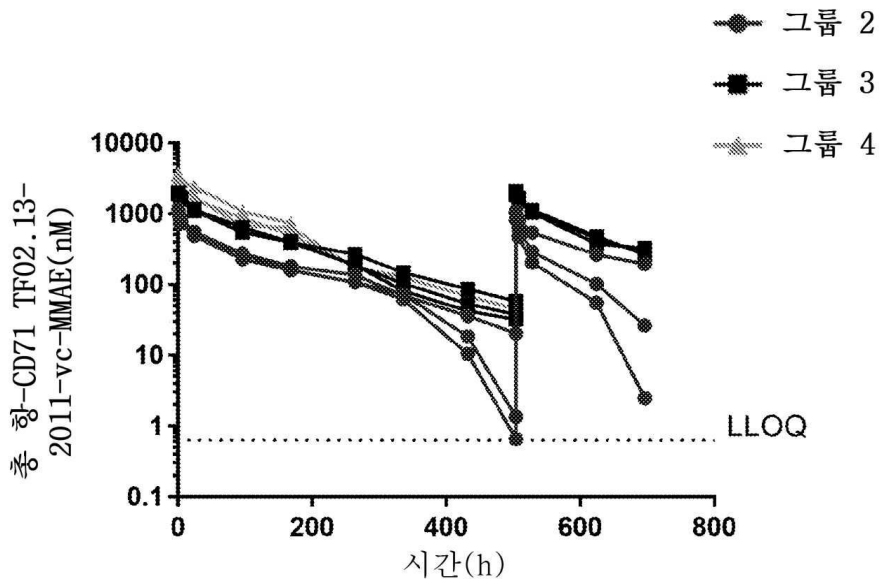
도면7c



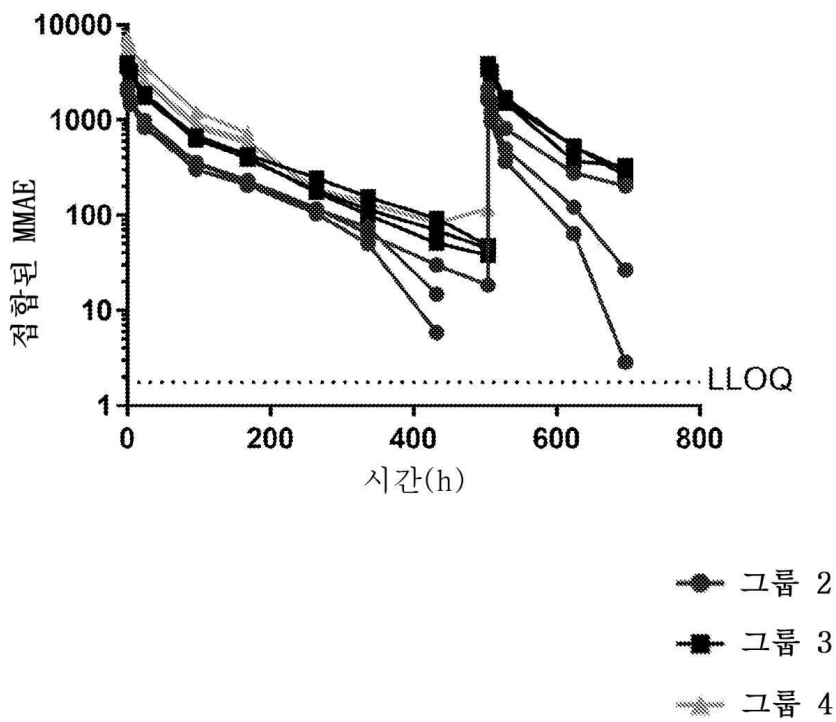
도면8a



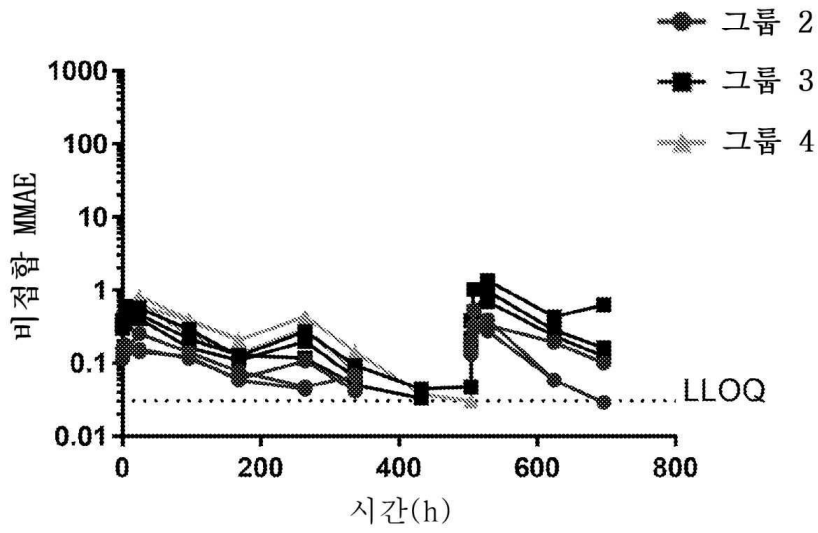
도면8b



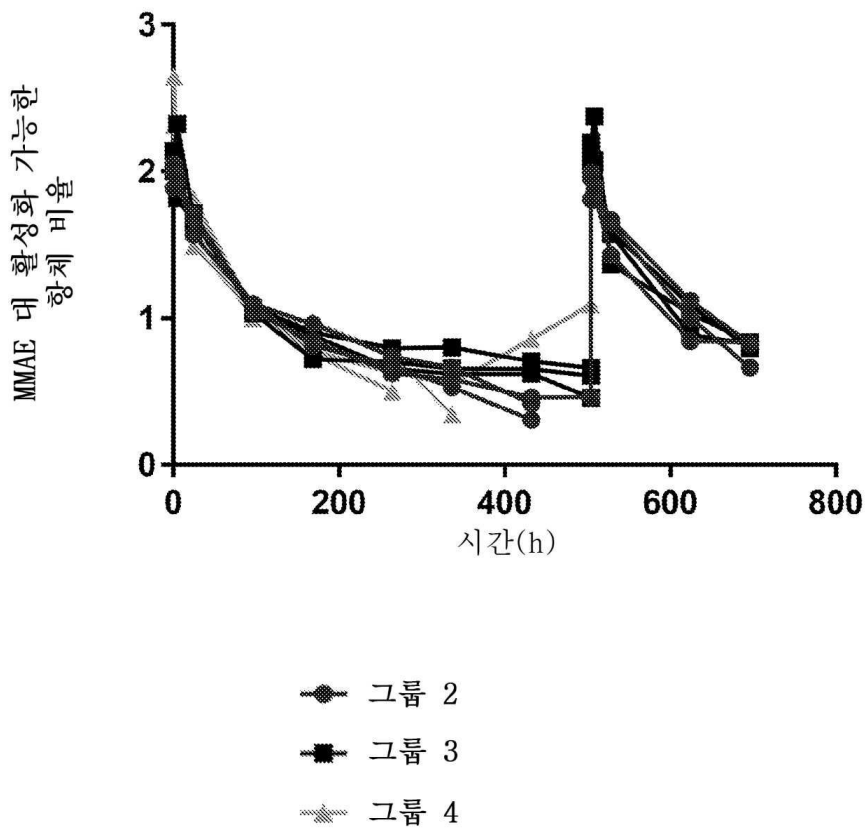
도면9a



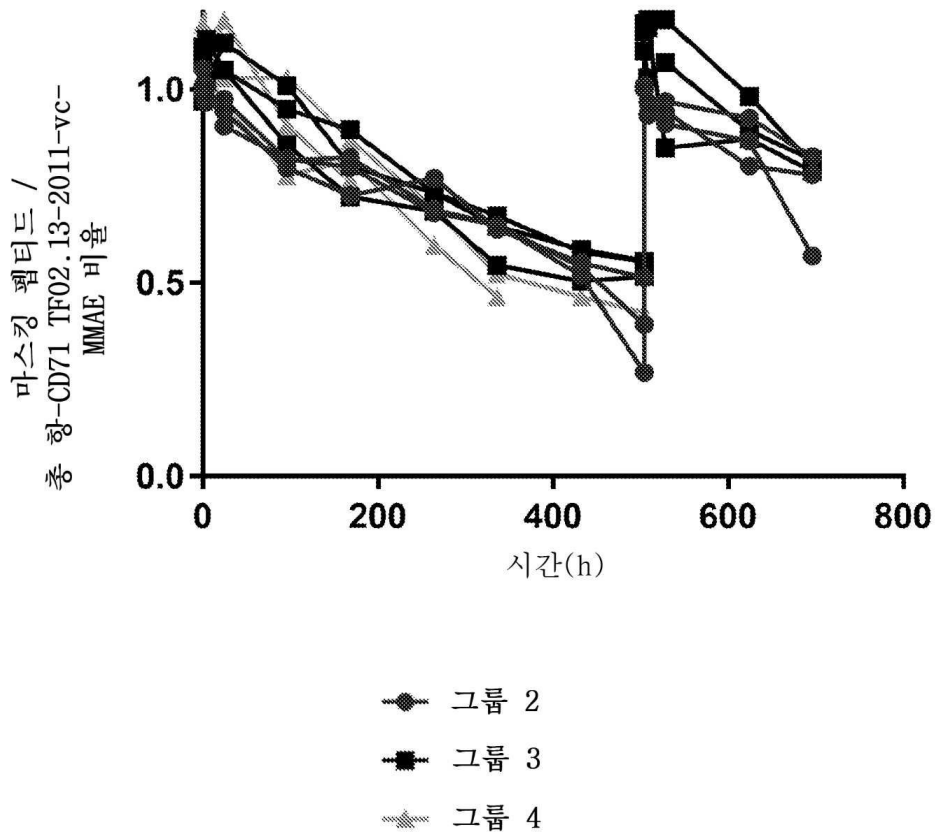
도면9b



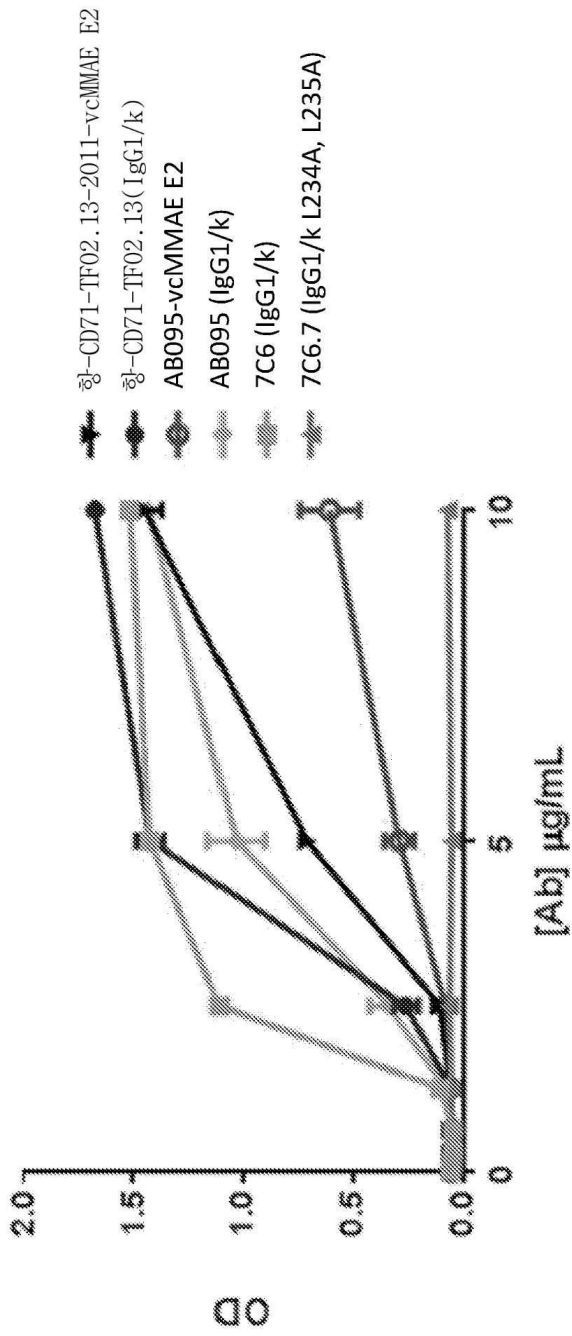
도면10



도면11

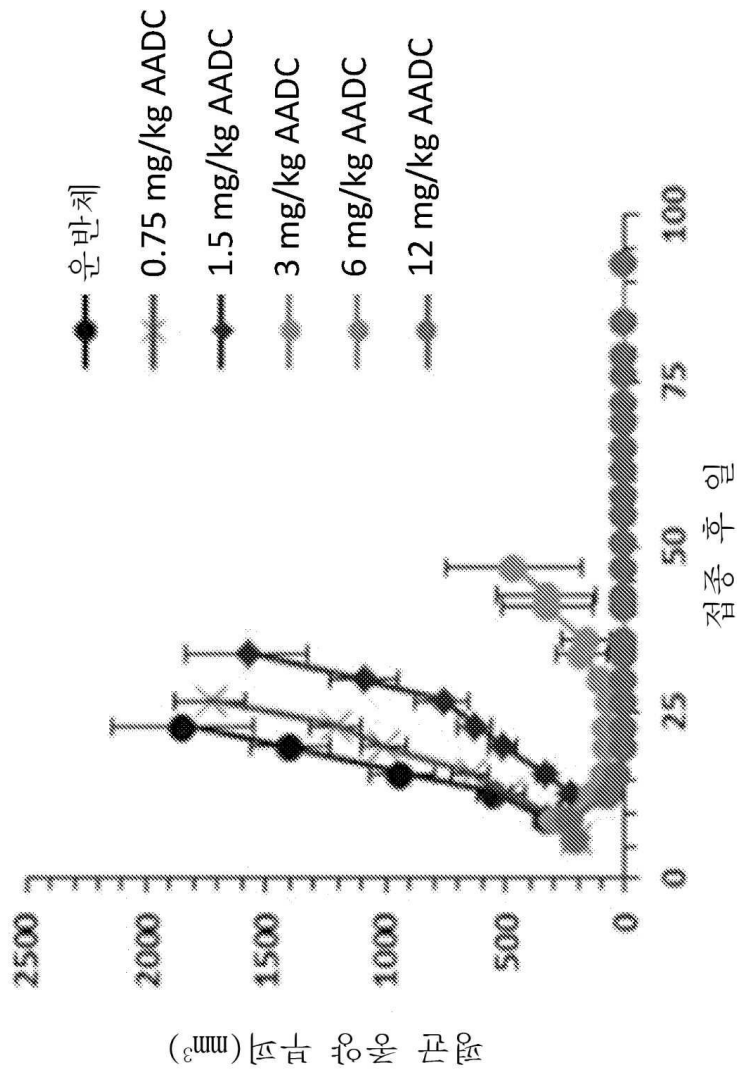


도면12



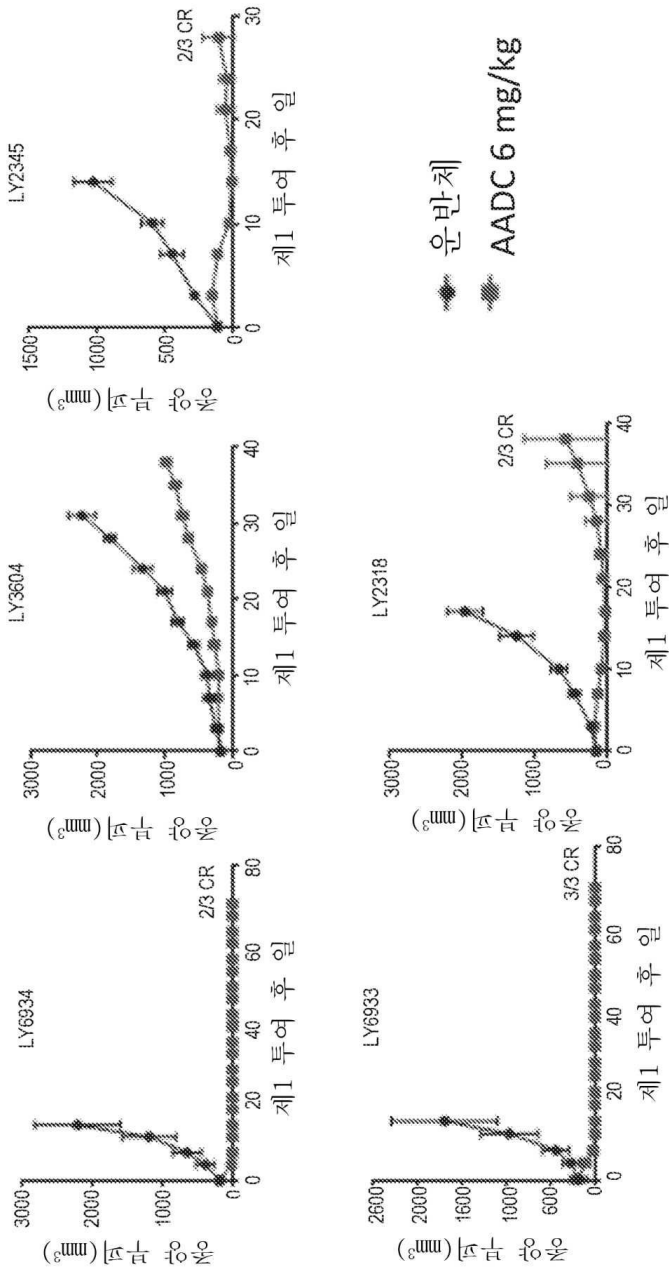
도면13

SW-48 마우스 CDX



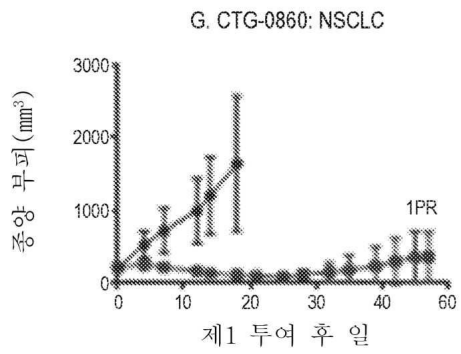
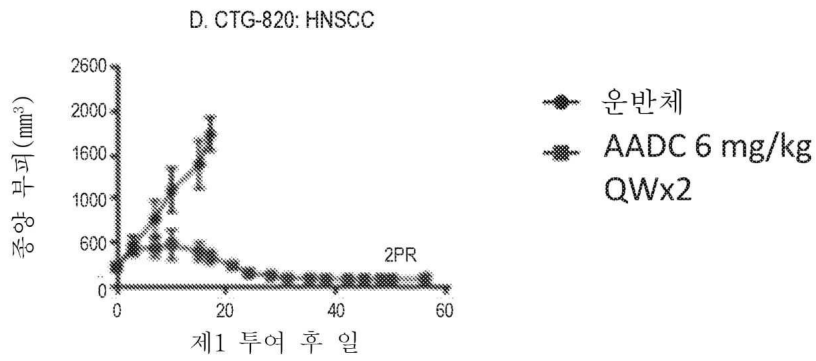
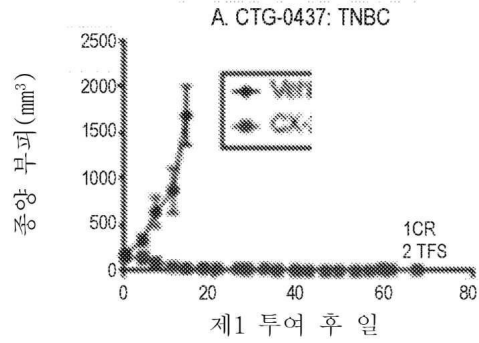
도면14

DLBCL 마우스 PDX



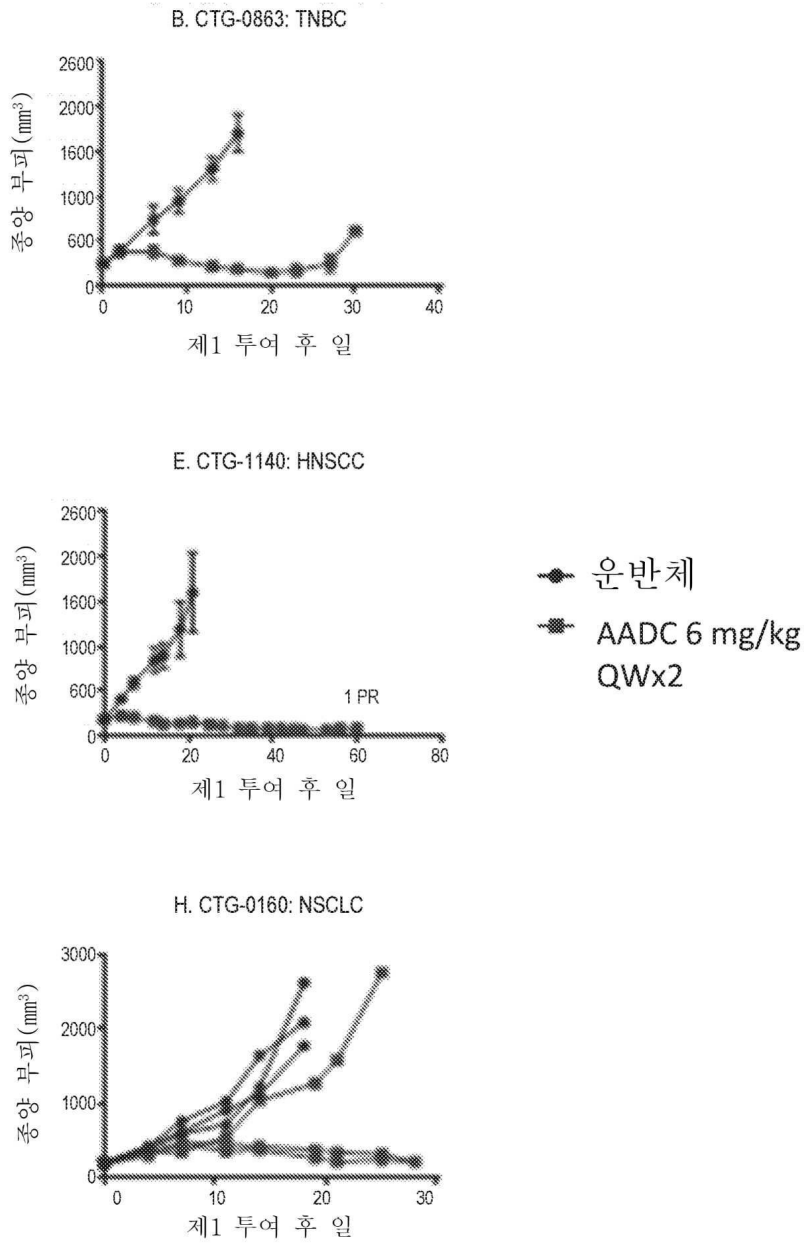
도면15a

마우스 PDX



도면15b

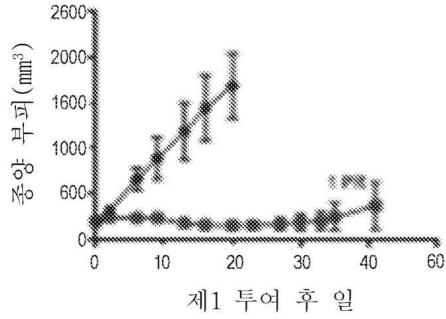
마우스 PDX



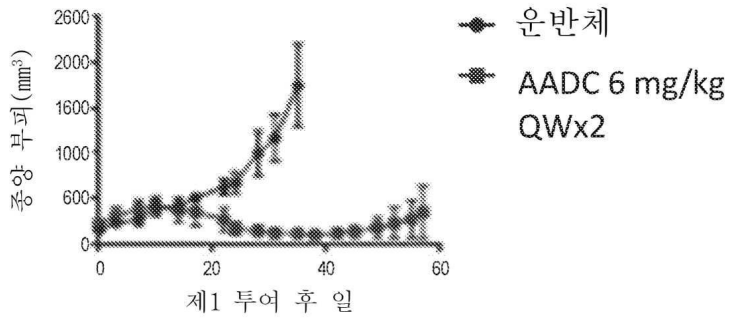
도면15c

마우스 PDX

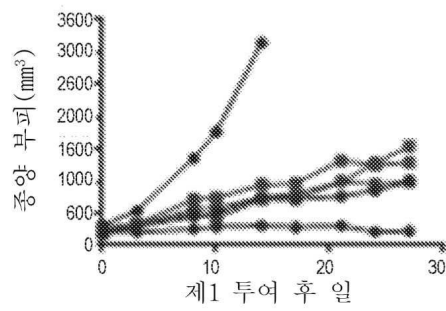
C. CTG-1053: Breast



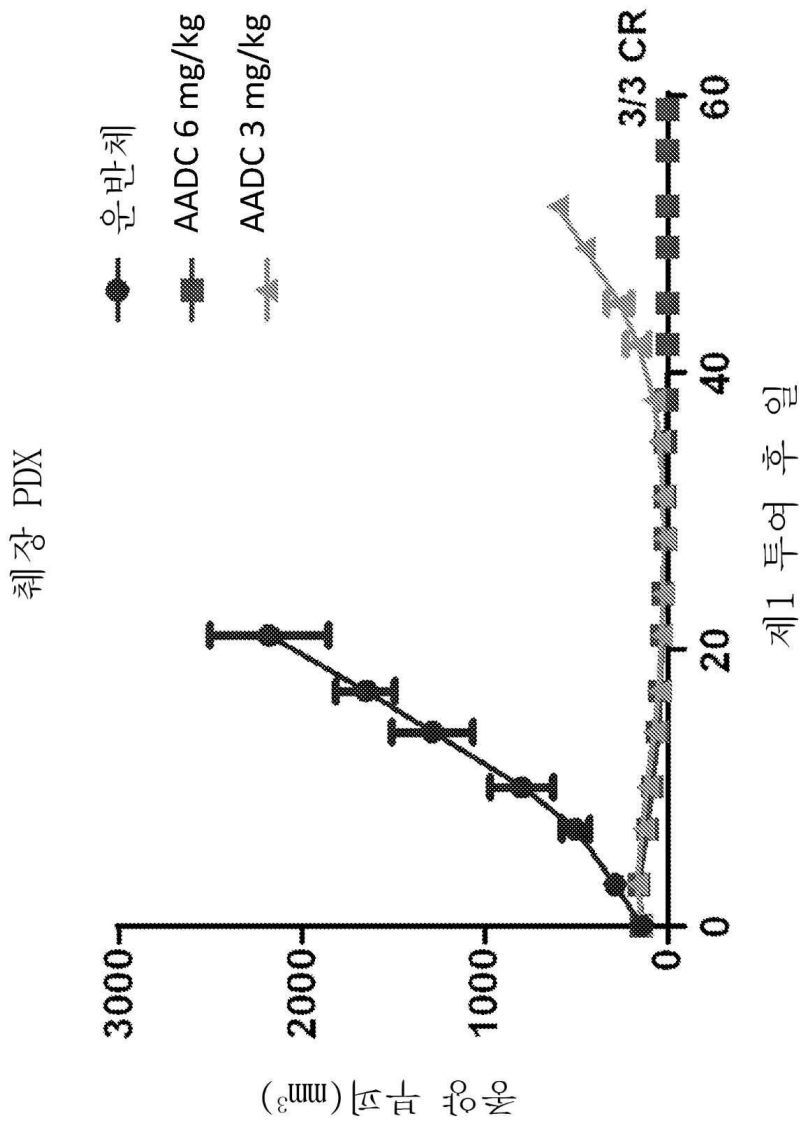
F. CTG-1032: NSCLC



I. CTG-1012: NSCLC



도면16

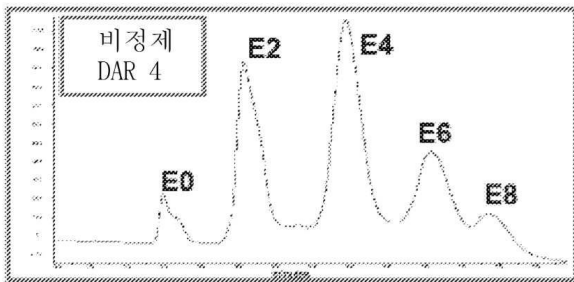


도면17

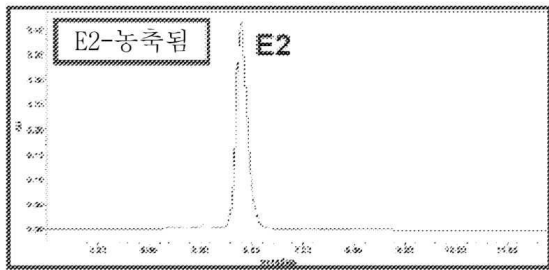
시노물구스 원승이에서 항-CD71 AADC 및 ADC 내약성 및 안정성의 요약

시험 물질품 (약물-단백질 비율 (DAR))	용량(mg/kg)	체중 손실	평균 호중구 수 ± 표준편차 (μL 당)	순환 활성화 가능한 항체의 상대적 안정성	임상 징후 / 내약성
항-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE (약 3)	6	약 10%	98 ± 60	더 낮음	중증 호흡기 감소증, 식욕 부진. 내약성 없음
항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE (약 3)	6	약 8%	290 ± 290	더 높음	없음. 내약성 있음
항-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (약 2)	12	0%	180 ± 210	더 높음	없음. 내약성 있음
항-CD71-vc-MMAE E2 (약 2)	2	약 8%	70	해당 없음	제 1 투여 후 약 1 주에 치명적

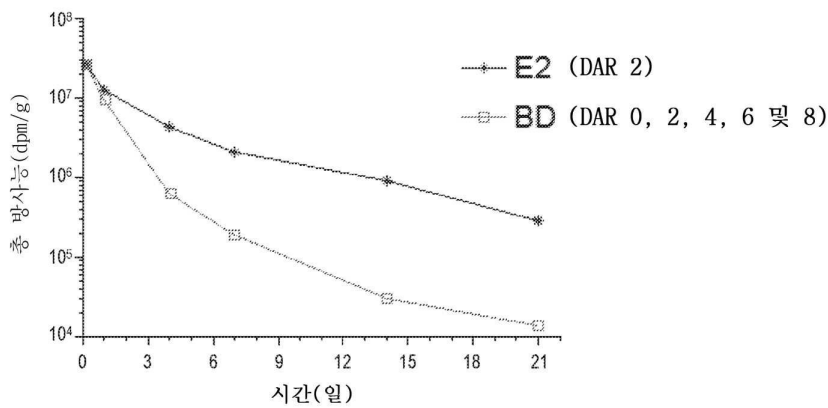
도면18a



도면18b



도면18c



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ABBVIE INC.

<120> ANTI-CD71 ACTIVATABLE ANTIBODY DRUG CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> CYTM-056/001US 322001-2522

<150> US 62/572,467

<151> 2017-10-14

<160> 208

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

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

 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Asn Phe

 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
 Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
 Thr Arg Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110
 Leu Ile Thr Val Ser Ala

 115
 <210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 2

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met

 20 25 30
 Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

 35 40 45
 Ser 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 Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr

85 90 95

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

100 105

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

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

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

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

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

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

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

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

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Ile Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

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

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Glu Thr Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 17
 Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Phe Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr

1 5 10 15

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 18

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr

1 5 10 15

<210> 19
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 19

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr

85 90 95
Phe Gly Gln 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> 20

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys 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
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Glu Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

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

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

<210> 21

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaagatg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactgga tgcaactggg gcgacaggct 120
 ccaggccagg gctcgaatg gatcggcgcc atctacccc gcaactccga gacaggctac 180
 gccagaagt tccagggcag agccaccctg accgcccaca cctccacctc caccgcctac 240

 atggaactgt ccagcctgcg gagcaggac accgccgtgt actactgcac cagagagaac 300
 tgggaccccg gcttcgctt ctggggccag ggcaccctga tcaccgtgic ctcccgcagc 360
 accaagggcc cctccgtgtt ccctctggcc ccttcagca agtccacctc tggcggcaca 420
 gctgccttg gctgctggt gaaagactac tccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaaac 480
 tctggcgccc tgaccagcgg agtgcacacc ttcctgccc tgctgcagtc ctccggcctg 540
 tactcctgt cctccgtggt gacagtgcc tcctccagcc tgggcacca gacctacatc 600

tgcaactga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaggtgga acccaagtcc 660

tgcgacaaga cccacacctg tcttcctgc cctgccctg aactgctggg cggaccttcc 720

gtgtttctgt tcccccaaa gcccaaggac acctgatga tctcccgac ccccgaagtg 780

acctgctgg tggggacgt gtcccacgag gacctgaag tgaagttcaa ttggtactg 840

gacggctgg aagtgcaca cgccaagacc aagcccagag aggaacagta caactccacc 900

taccgggtgg tgtccgtgct gacctgctg caccaggact ggctgaacgg caaagagtac 960

aagtgaagg tgtccaaca ggccctgcct gcccctatcg aaaagacat ctccaaggcc 1020

aagggccagc cccgcgagcc ccaggtgtac aactgccac ctagccggga agagatgacc 1080

aagaaccagg tgcacctgac ctgtctggig aaaggcttct accctccga tatcgccgtg 1140

gaatgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccacccacc tgtgctggac 1200

tccgacggct catttctct gtactccaag ctgacctgg acaagtccg gtggcagcag 1260

ggcaactgt tctctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320

tcctgtccc tgagccccgg caag 1344

<210> 22

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu

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

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp
 115 120 125
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe
 130 135 140
 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 145 150 155 160
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 165 170 175
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 180 185 190
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 195 200 205
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 210 215 220
 Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 225 230 235 240
 Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 245 250 255
 Arg Gly Glu Cys
 260

<210> 23

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
 1 5 10 15
 Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser
 20 25 30

Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp
 35 40 45
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
 65 70 75 80
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
 85 90 95
 Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp
 115 120 125
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe
 130 135 140
 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 145 150 155 160
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 165 170 175
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 180 185 190
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 195 200 205
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 210 215 220
 Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 225 230 235 240
 Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 245 250 255
 Arg Gly Glu Cys
 260
 <210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic

<400> 30

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 38

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

Gly Ser Ser Gly Thr

1 5

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

Gly Ser Ser Gly

1

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

Thr Gly Arg Gly Pro Ser Trp Val

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

Ser Ala Arg Gly Pro Ser Arg Trp

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

Thr Ala Arg Gly Pro Ser Phe Lys

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His

1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> Synthetic
 <400> 45
 Gly Gly Trp His Thr Gly Arg Asn
 1 5
 <210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 46
 His Thr Gly Arg Ser Gly Ala Leu
 1 5
 <210> 47
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 47
 Pro Leu Thr Gly Arg Ser Gly Gly
 1 5
 <210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223
 > Synthetic
 <400> 48
 Ala Ala Arg Gly Pro Ala Ile His
 1 5
 <210> 49
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 49
Arg Gly Pro Ala Phe Asn Pro Met
1 5
<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 50
Ser Ser Arg Gly Pro Ala Tyr Leu
1 5
<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic

<400> 51
Arg Gly Pro Ala Thr Pro Ile Met
1 5
<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 52
Arg Gly Pro Ala
1
<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic

<400> 53

Gly Gly Gln Pro Ser Gly Met Trp Gly Trp

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

Phe Pro Arg Pro Leu Gly Ile Thr Gly Leu

1 5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 55

Val His Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro

1 5 10

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

Ser Pro Leu Thr Gly Arg Ser Gly

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 57

Ser Ala Gly Phe Ser Leu Pro Ala

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 58

Leu Ala Pro Leu Gly Leu Gln Arg Arg

1 5

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 59

Ser Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg

1 5

<210> 60

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 60

Pro Leu Gly Leu

1

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 61

Ile Ser Ser Gly Leu Ser Ser

1 5
<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 62
Gln Asn Gln Ala Leu Arg Met Ala

1 5
<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 63
Ala Gln Asn Leu Leu Gly Met Val

1 5
<210> 64

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 64
Ser Thr Phe Pro Phe Gly Met Phe

1 5
<210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 65
Pro Val Gly Tyr Thr Ser Ser Leu

1 5
<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 66

Asp Trp Leu Tyr Trp Pro Gly Ile

1 5

<210> 67

<211

> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 67

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Ser

1 5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 68

Leu Lys Ala Ala Pro Arg Trp Ala

1 5

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 69

Gly Pro Ser His Leu Val Leu Thr

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 70

Leu Pro Gly Gly Leu Ser Pro Trp

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 71

Met Gly Leu Phe Ser Glu Ala Gly

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 72

Ser Pro Leu Pro Leu Arg Val Pro

1 5

<210> 73

<211> 8

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 73

Arg Met His Leu Arg Ser Leu Gly

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 74

Leu Ala Ala Pro Leu Gly Leu Leu

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 75

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 76

Leu Leu Ala Pro Ser His Arg Ala

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 77

Pro Ala Gly Leu Trp Leu Asp Pro

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 78

Gly Pro Arg Ser Phe Gly Leu

1 5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 79

Gly Pro Arg Ser Phe Gly

1 5

<210> 80

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 80

Asn Thr Leu Ser Gly Arg Ser Glu Asn His Ser Gly

1 5 10

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 81

Asn Thr Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His Gly Ser

1 5 10

<210> 82

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 82

Thr Ser Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly

1 5 10

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 83

Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro

1 5

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 84

Val Ala Gly Arg Ser Met Arg Pro

1 5

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 85

Val Val Pro Glu Gly Arg Arg Ser

1 5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 86

Ile Leu Pro Arg Ser Pro Ala Phe

1 5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 87

Met Val Leu Gly Arg Ser Leu Leu

1 5

<210

> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 88

Gln Gly Arg Ala Ile Thr Phe Ile

1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 89

Ser Pro Arg Ser Ile Met Leu Ala

1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 90

Ser Met Leu Arg Ser Met Pro Leu

1 5

<210> 91

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 91

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His

1 5 10

<210> 92

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 92

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Ser

1 5 10 15

Gly Arg Ser Asp Asn His

20

<210> 93

<211> 22

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 93

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

1 5 10 15

Ser Ala Asn Pro Arg Gly

20

<210> 94

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 94

Thr Ser Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly Gly Gly Ala Val

1 5 10 15

Gly Leu Leu Ala Pro Pro

20

<210> 95

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 95

Val His Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro Gly Gly Thr Ser Thr Ser

1 5 10 15

Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly

20

<210> 96

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 96

Thr Ser Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly Gly Gly Val His

1 5 10 15

Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro

20

<210> 97

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 97

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

1 5 10 15

Asn His

<210> 98

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 98

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Ala Val Gly Leu Leu Ala

1 5 10 15

Pro Pro

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 99

Val His Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg

1 5 10 15

Ser Asp Asn His

20

<210> 100

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 100

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Val His Met Pro Leu Gly

1 5 10 15

Phe Leu Gly Pro

20

<210> 101

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 101

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ser

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Ser Ser

20

<210> 102

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 102

Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ser

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Ser Ser

20

<210> 103

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 103

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Ser

1 5 10 15

Gly Arg Ser Gly Asn His

20

<210> 104

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 104

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Asn

1 5 10 15

Gln Ala Leu Arg Met Ala

20

<210> 105

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 105

Gln Asn Gln Ala Leu Arg Met Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Ser

1 5 10 15

Gly Arg Ser Asp Asn His

20

<210> 106

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 106

Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Asn

1 5 10 15

Gln Ala Leu Arg Met Ala

20

<210> 107

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 107

Gln Asn Gln Ala Leu Arg Met Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Ser

1 5 10 15

Gly Arg Ser Gly Asn His

20

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 108

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His

1 5 10

<210> 109

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 109

Gln Gly Gln Ser Gly Gln

1 5

<210> 110

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 110

Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly

1 5

<210> 111

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 111

Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly

1 5

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 112

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp

1 5

<210> 113

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 113

Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu

1 5 10

<210> 114

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 114

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala

1 5 10 15

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 115

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Arg Gly Asp Asp Ala

1 5 10 15

<210> 116

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 116

Ile Glu Gly Arg

1

<210> 117

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 117

Ile Asp Gly Arg

1

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 118

Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg

1 5

<210> 119

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 119

Pro Leu Gly Leu Trp Ala

1 5

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 120

Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln

1 5

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 121

Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala

1 5

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 122

Gly Ile Ala Gly Gln

1 5

<210> 123

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 123

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile

1 5

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 124

Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly

1 5

<210> 125

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 125

Tyr Gly Ala Gly Leu Gly Val Val

1 5

<210> 126

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 126

Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg

1 5

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 127

Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr

1 5

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 128

Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser

1 5

<210> 129

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 129

Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile

1 5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 130

Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln

1 5

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 131

Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser

1 5

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 132

Glu Ser Leu Pro Val Val Ala Val

1 5

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 133

Ser Ala Pro Ala Val Glu Ser Glu

1 5

<210> 134

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 134

Asp Val Ala Gln Phe Val Leu Thr

1 5

<210> 135

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 135

Val Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu

1 5

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 136

Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly

1 5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 137

Pro Val Gln Pro Ile Gly Pro Gln

1 5

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 138

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly

1 5

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 139

Gln Gly Gln Ser Gly

1 5

<210> 140

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 140

Gln Gly Gln Ser

1

<210> 141

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 141

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

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

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

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

225 230 235 240
 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 245 250
 <210> 142

 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 142
 Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg
 20 25 30
 Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 35 40 45
 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser

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

 115 120 125
 Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 130 135 140
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

245 250

<210> 143

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 143

Gly Gln Ser Gly Gln Gly

1 5

<210> 144

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 144

Gln Ser Gly Gln Gly

1 5

<210> 145

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 145

Ser Gly Gln Gly

1

<210> 146

<

211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 146

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly

 20 25 30

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met

 35 40 45

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

 50 55 60

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln

65 70 75 80

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly

 130 135 140

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

145 150 155 160

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val

 165 170 175

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys

 180 185 190

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 195 200 205
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 210 215 220
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 225 230 235 240
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu

245 250 255

Cys

<210> 147

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 147

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
 1 5 10 15
 Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val
 20 25 30
 Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro

35 40 45

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

Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

100 105 110

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met
 115 120 125

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr
 130 135 140
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 145 150 155 160
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 165 170 175
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 180 185 190
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 195 200 205
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 210 215 220
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 225 230 235 240
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 245 250 255
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 260

<210> 148

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 148

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 149

<211>

> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 149

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro

1 5 10 15

Arg Gly

<210> 150

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 150

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

1 5 10 15

Gly

<210> 151

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 151

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asp His

1 5 10

<210> 152

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 152

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Ile His

1 5 10

<210> 153

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 153

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Gln His

1 5 10

<210> 154

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 154

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Thr His

1 5 10

<210> 155

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 155

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Tyr His

1 5 10

<210> 156

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 156

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro

1 5 10

<210> 157

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 157

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

1 5 10

<210> 158

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 158

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Ile

1 5 10

<210> 159

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 159

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

1 5 10 15

Asp His

<210> 160

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 160

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

1 5 10 15

Ile His

<210> 161

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 161

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

1 5 10 15

Gln His

<210> 162

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 162

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

1 5 10 15

Thr His

<210> 163

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 163

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

1 5 10 15

Tyr His

<210> 164

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 164

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

1 5 10 15

Asn Pro

<210> 165

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 165

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Ala

1 5 10 15

Asn Pro

<210> 166

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 166

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Ala

1 5 10 15

Asn Ile

<210> 167

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 167

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

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 168

<211> 1341

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 168

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtaagaaac ctggcgctc cgtgaagatg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactgga tgcaactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatcggcgcc atctaccccg gcaactccga gacaggctac 180

gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgaca cctccacctc caccgcctac 240

atggaactgt ccagcctgcg gagcaggac accgccgtgt actactgcac cagagagaac 300

tgggaccccg gcttcgcctt ctggggccag ggcaccctga tcaccgtgtc ctcccaccgc 360

accaagggcc cctccgtgtt ccctctggcc ccttccagca agtccacctc tggcggcaca 420

gctgcctctg gctgcctggt gaaagactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 480

tctggcgccc tgaccagcgg agtgcacacc ttccctgccg tegtgcagtc ctccggcctg 540

tactcctgt cctccgtggt gacagtgcc tcttccagcc tgggcacca gacctacatc 600

tgcaactga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaggtgga acccaagtc 660

tgcgacaaga cccacacctg tcttcctgc cctgccctg aactgctggg cggaccttcc 720

gtgtttctgt tcccccaaa gccaaggac acctgatga tctcccggac ccccgaagtg 780

acctgcgtgg tggtagcgt gtcccacgag gacctgaag tgaagttaa ttggtacgtg 840

gacggcgtgg aagtgcaca cgccaagacc aagcccagag aggaacagta caactccacc 900

taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagagtac 960

aagtgaagg tgtccaaca ggccctgect gccccatcg aaaagacat ctccaagcc 1020

aagggccagc cccgcgagcc ccaggtgtac aactgccac ctaccggga agagatgacc 1080

aagaaccagg tgcctctgac ctgtctggtg aaagcttct accctccga tatgccctg 1140

gaatgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccacc tgtgctggac 1200

tccgacgct cattcttct gtaactcaag ctgaccgtgg acaagtccc gtggcagcag 1260

ggcaactgt tctctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccaeta cacccagaag 1320

tccctgtccc tgagccccgg c 1341

<210> 169

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 169

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg

 20 25 30

Ser Asp Asn Pro Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro

><223> Synthetic

<400> 170

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

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

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

 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 195 200 205
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 210 215 220
 Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 225 230 235 240

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 245 250 255

Arg Gly Glu Cys
 260

<210> 171

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 171

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Ile

1 5 10

<210> 172

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 172

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

1 5 10 15

Asn Ile

<210> 173

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 173

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

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly

20 25 30

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 174

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val
 20 25 30
 Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro
 35 40 45
 Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 85 90 95
 Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 100 105 110
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met
 115 120 125
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr
 130 135 140
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 145 150 155 160
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 165 170 175
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 180 185 190
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 195 200 205
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

260

<210> 175

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 175

Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His

1 5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic

<400> 176

Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly

1 5

<210> 177

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 177

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asp His

1 5

<210> 178

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 178
Leu Ser Gly Arg Ser Asp Ile His
1 5

<210> 179
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
<400> 179
Leu Ser Gly Arg Ser Asp Gln His
1 5

<210> 180
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
<400> 180
Leu Ser Gly Arg Ser Asp Thr His
1 5

<210> 181
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
<400> 181
Leu Ser Gly Arg Ser Asp Tyr His
1 5

<210> 182
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 182

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro

1 5

<210> 183

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 183

Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro

1 5

<210> 184

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 184

Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Ile

1 5

<210> 185

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 185

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Ile

1 5

<210> 186

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 186

Met Ile Ala Pro Val Ala Tyr Arg

1 5

<210> 187

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 187

Arg Pro Ser Pro Met Trp Ala Tyr

1 5

<210> 188

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 188

Trp Ala Thr Pro Arg Pro Met Arg

1 5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 189

Phe Arg Leu Leu Asp Trp Gln Trp

1 5

<210> 190

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 190

Ile Ser Ser Gly Leu

1 5

<210> 191

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 191

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser

1 5

<210> 192

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 192

Ile Ser Ser Gly Leu Leu

1 5

<210> 193

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 193

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Ala Val Gly Leu Leu

1 5 10 15

Ala Pro Pro

<210> 194

<211

> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 194

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Val His Met Pro Leu

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 196

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu

1 5 10 15

Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser

 20 25 30

Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp

 35 40 45

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

 50 55 60

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp

 115 120 125

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe

 130 135 140

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

145 150

<210> 197

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 197

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg

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

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

Ile Lys

145

<210> 198

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 198

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
 1 5 10 15
 Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser
 20 25 30
 Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp
 35 40 45

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr

115 120 125
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly

130 135 140
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys

145 150

<210> 200

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 200

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val
 20 25 30

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

35 40 45
 Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

50 55 60
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val

65 70 75 80

Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 85 90 95

Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

100 105 110
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met

115 120 125
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr

130 135 140
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

145 150 155

<210> 201

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 201

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg

 20 25 30

Ser Asp Asn Pro Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro

 35 40 45

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser

 50 55 60

Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly

65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu

 130 135 140

Ile Lys

145

<210> 202

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 202

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

1 5 10 15
 Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser
 20 25 30

Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Gly Ser Asp
 35 40 45

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 50 55 60

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
 65 70 75 80

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
 85 90 95

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 100 105 110

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp
 115 120 125

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe
 130 135 140

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 145 150

<210> 203

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 203

Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly
 20 25 30

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 35 40 45

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 50 55 60
 Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln
 65 70 75 80
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 115 120 125
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 130 135 140
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 145 150
 <210> 204
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 204
 Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val
 20 25 30
 Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro
 35 40 45
 Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

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

145 150 155

<210> 205

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 205

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 206

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 206

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaagatg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatcggcgcc atctaccccg gcaactccga gacaggctac 180

gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgcccaca cctccacctc caccgcctac 240

atggaactgt ccagcctcgg gagcgaggac accgcccgtgt actactgcac cagagagaac 300

tgggaccccg gcttcgcctt ctggggccag ggcaccctga tcaccgtgtc ctcc 354

<210> 207

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 207

Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 208

<211> 639

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 208

gacatccaga tgaccagtc cccatccagc ctgtccgct ccgtgggca cagagtgaca 60

atcacctgtt ccgccagctc ctccgtgtac tacatgtact ggttccagca gaagcccggc 120

aaggcccca agctgtggat ctactccacc tccaacctgg cctccggcgt gcctccaga 180

ttctccggt ctggctccgg caccgactac acctgacca tctccagcat gcagcccag 240

gacttcgcca ctiactactg ccagcagcgg cggaactacc cctacacctt cggccagggc 300

accaagctgg aaatcaagcg gaccgtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccacctcc 360

gacgagcagc tgaagtccgg caccgccagc gtcgtgtgcc tgetgaacaa ctctacccc 420

cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccggcaa ctcccaggaa 480

tccgtcaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgtcctccac cctgacctg 540

tccaaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgcg aagtgacca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagtc cttcaaccgc ggcgagtgc 639