



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월29일  
(11) 등록번호 10-2138743  
(24) 등록일자 2020년07월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 47/48 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7032521
- (22) 출원일자(국제) 2013년04월26일  
심사청구일자 2018년04월26일
- (85) 번역문제출일자 2014년11월20일
- (65) 공개번호 10-2015-0035538
- (43) 공개일자 2015년04월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/038540
- (87) 국제공개번호 WO 2013/163631  
국제공개일자 2013년10월31일
- (30) 우선권주장  
61/639,796 2012년04월27일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2010081173 A2\*  
US20100189651 A1  
US20090304719 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
싸이롭스 테라퓨틱스, 인크.  
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스퀘어 400 오이스터 포인트 블러바드 151
- (72) 발명자  
로우만 헨리 버나드  
미국 94018-2256 캘리포니아주 엘 그라나다 피.오.박스 2556  
데스노이어즈 톱 톨란드  
미국 94127 캘리포니아주 샌 프란시스코 클레어몬트 블러바드 250  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
김태홍, 김진희

전체 청구항 수 : 총 66 항

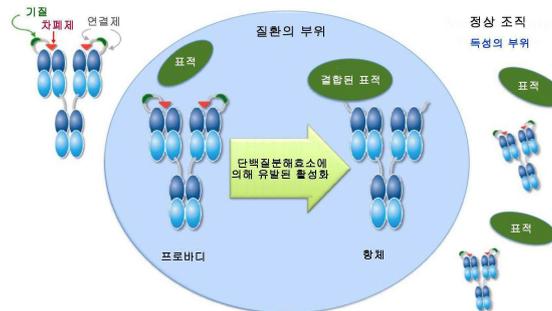
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 표피 성장 인자 수용체에 결합하는 활성화가능한 항체 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 차폐 모이어티(masking moiety)(MM), 절단가능한 모이어티(CM), 및 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하는 항체(AB)를 포함하는 활성화가능한 항체; 이들 항-EGFR 활성화가능한 항체를 제조하는 방법; 및 다양한 치료, 진단 및 예방 적응증에서 이들 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(72) 발명자

**리우 소우첸**

미국 94010 캘리포니아주 벌링게임 헌트 드라이브 1795

**웨스트 제임스 윌리암**

미국 94401 캘리포니아주 샌 마테오 라우렐 애비뉴 724 아파트먼트 샵404

**사거트 제이슨 개리**

미국 94403 캘리포니아주 샌 마테오 라우리에 메도우즈 로드 231 아파트먼트 샵153

**바실제바 올가**

미국 95104 캘리포니아주 쿠파르티노 로드리구에스 애비뉴 샵다 20080

**메넨데즈 엘리자베스-에드나 매리**

미국 94403 캘리포니아주 샌 마테오 사우쓰앰프턴 웨이 2235

(30) 우선권주장

61/662,204 2012년06월20일 미국(US)

61/749,220 2013년01월04일 미국(US)

61/749,529 2013년01월07일 미국(US)

61/763,237 2013년02월11일 미국(US)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

활성화된 상태에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 활성화가능한 항체로서,

EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)으로서, (i) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열, 또는 (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AB;

비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 차폐 모이어티(MM)로서, 아미노산 서열 C1SPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함하는 MM; 및

상기 AB에 커플링된 절단가능한 모이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드이고 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함하는 CM

을 포함하고, 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 이하: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM의 구조적 배열을 갖는 활성화가능한 항체.

**청구항 2**

◆청구항 2은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 단편이 Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv 및 scAb로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 하기 (a) 및 (b)로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄와 경쇄의 조합을 포함하는 활성화가능한 항체:

(a) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및

(b) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 활성화가능한 항체.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

제1항에 있어서, AB가 EGFR과의 결합에 대해 100 nM 이하의 평형 해리 상수를 갖는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 8**

제1항에 있어서, MM이 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 큰, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 9**

제1항에 있어서, MM이 EGFR과의 결합에 대해 절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB를 방해하지 않거나 이 AB와 경쟁하지 않는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 10**

◆청구항 10은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, MM이 길이 40개 이하의 아미노산의 폴리펩티드인 활성화가능한 항체.

**청구항 11**

◆청구항 11은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, MM 폴리펩티드 서열이 EGFR의 폴리펩티드 서열과 상이하고, MM 폴리펩티드 서열이 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 이하 동일한 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 12**

◆청구항 12은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, MM이 EGFR에 대해 25% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 13**

◆청구항 13은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, MM이 EGFR에 대해 10% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 14**

◆청구항 14은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, CM이 길이 최대 15개의 아미노산의 폴리펩티드인 활성화가능한 항체.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 단백질분해효소가 조직에서 EGFR과 함께 위치하고, 활성화가능한 항체가 단백질분해효소에 노출될 때 단백질분해효소가 활성화가능한 항체에서의 CM을 절단하는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 16**

◆청구항 16은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, MM과 CM 사이에 연결 펩티드를 포함하는 활성화가능한 항체.

**청구항 17**

◆청구항 17은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, CM과 AB 사이에 연결 펩티드를 포함하는 활성화가능한 항체.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하고 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 이하: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM의 구조적 배열을 갖는 활성화가능한 항체.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 두 연결 펩티드가 서로 동일할 필요가 없는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 20**

제18항에 있어서, LP1 및 LP2 중 하나 이상이 (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub>(서열번호 15) 및 (GGGS)<sub>n</sub>(서열번호 16)으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 n은 1 이상의 정수인 활성화가능한 항체.

**청구항 21**

제18항에 있어서, LP1 및 LP2 중 하나 이상이 GSGG(서열번호 17), GSGGG(서열번호 18), GSGSG(서열번호 19), GSGGG(서열번호 20), GGGSG(서열번호 21) 및 GSSSG(서열번호 22)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 22**

제18항에 있어서, LP1이 아미노산 서열 GSSGGSGSGGGSG(서열번호 23)를 포함하는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 23**

제18항에 있어서, LP2가 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함하는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 활성화가능한 항체가 비절단된 상태에서 MM에 직접적으로 연결되는 스페이서를 포함하고, N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열을 갖는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 스페이서가 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 26**

제24항에 있어서, 스페이서 및 MM이 아미노산 서열 QGQSGQCISPRGCPDGPVVMY(서열번호 59)를 포함하는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 27**

제1항에 있어서, AB가 작용제(agent)에 접합되는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 작용제가 독소 또는 이의 단편인 활성화가능한 항체.

**청구항 29**

제27항에 있어서, 작용제가 둘라스타틴 또는 이의 유도체인 활성화가능한 항체.

**청구항 30**

제27항에 있어서, 작용제가 아우리스타틴 또는 이의 유도체인 활성화가능한 항체.

**청구항 31**

제27항에 있어서, 작용제가 아우리스타틴 E 또는 이의 유도체인 활성화가능한 항체.

**청구항 32**

제27항에 있어서, 작용제가 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)인 활성화가능한 항체.

**청구항 33**

제27항에 있어서, 작용제가 메이탄시노이드 또는 이의 유도체인 활성화가능한 항체.

**청구항 34**

제27항에 있어서, 작용제가 DM1 또는 DM4인 활성화가능한 항체.

**청구항 35**

제27항에 있어서, 작용제가 듀오카마이신 또는 이의 유도체인 활성화가능한 항체.

**청구항 36**

제27항에 있어서, 작용제가 칼리케아미신 또는 이의 유도체인 활성화가능한 항체.

**청구항 37**

제27항에 있어서, 작용제가 연결제를 통해 AB에 접합되는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 연결제가 절단가능한 연결체인 활성화가능한 항체.

**청구항 39**

제1항에 있어서, 검출가능한 모이어티를 포함하는 활성화가능한 항체.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 검출가능한 모이어티가 진단제인 활성화가능한 항체.

**청구항 41**

◆청구항 41은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, MM이 EGFR에 대한 AB의 해리 상수 이하인, AB와의 결합에 대한 해리 상수를 갖는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 42**

◆청구항 42은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, EGFR에 대한 AB의 결합이 활성화가능한 항체가 절단된 상태에 있을 때 저해되지 않는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 43**

제18항에 있어서, LP1이 아미노산 서열 GSSGGSGSGSG(서열번호 23)를 포함하고 LP2가 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함하며, AB가 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

◆청구항 46은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, AB가 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 것인 활성화가능한 항체.

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

◆청구항 49은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제1항에 있어서, 작용제에 접합되는 활성화가능한 항체.

**청구항 50**

◆청구항 50은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제49항에 있어서, 연결체를 통해 작용제에 접합되는 활성화가능한 항체.

**청구항 51**

◆청구항 51은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제50항에 있어서, 연결체가 절단가능한 연결체인 활성화가능한 항체.

**청구항 52**

대상체에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR)의 비정상적인 발현 또는 활성화와 관련된 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키기 위한 약학 조성물로서, 활성화된 상태에서 EGFR에 결합하고 EGFR의 생물학적 활성 및 EGFR 매개 신호전달 중 하나 이상을 억제하는 활성화가능한 항체의 치료 유효량을 포함하고,

상기 활성화가능한 항체가

EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)으로서, (i) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열, 또는 (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AB;

비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 차폐 모이어티(MM)로서, 아미노산 서열 CISPFGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함하는 MM; 및

상기 AB에 커플링된 절단가능한 모이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드이고 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함하는 CM

을 포함하며,

활성화가능한 항체가 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 이하: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM의 구조적 배열을 갖는 것인, 약학 조성물.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 암이 유방암, 대장암, 위암, 아교모세포종, 두경부암, 폐암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 육종 또는 피부암인 약학 조성물.

**청구항 54**

제52항에 있어서, AB가 작용제에 접합되는 것인 약학 조성물.

**청구항 55**

제54항에 있어서, 작용제가 독소 또는 이의 단편인 약학 조성물.

**청구항 56**

제55항에 있어서, 작용제가 돌라스타틴 또는 이의 유도체, 아우리스타틴 또는 이의 유도체, 메이탄시노이드 또

는 이의 유도체, 듀오카마이신 또는 이의 유도체, 및 칼리케아미신 또는 이의 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 57**

◆청구항 57은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제52항에 있어서, 상기 항원 결합 단편이 Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv, 및 scAb로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 58**

제52항에 있어서, 활성화가능한 항체가 하기 (a) 및 (b)로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄와 경쇄의 조합을 포함하는 것인 약학 조성물:

(a) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및

(b) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.

**청구항 59**

제52항에 있어서, 활성화가능한 항체가 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 60**

삭제

**청구항 61**

삭제

**청구항 62**

제52항에 있어서, MM이 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 큰, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는 것인 약학 조성물.

**청구항 63**

제52항에 있어서, MM이 EGFR과의 결합에 대해 절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB를 방해하지 않거나 이 AB와 경쟁하지 않는 것인 약학 조성물.

**청구항 64**

◆청구항 64은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제52항에 있어서, MM이 길이 40개 이하의 아미노산의 폴리펩티드인 약학 조성물.

**청구항 65**

◆청구항 65은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제52항에 있어서, MM 폴리펩티드 서열이 EGFR의 폴리펩티드 서열과 상이하고, MM 폴리펩티드 서열이 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 이하 동일한 것인 약학 조성물.

**청구항 66**

◆청구항 66은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제52항에 있어서, CM이 길이 최대 15개의 아미노산의 폴리펩티드인 약학 조성물.

**청구항 67**

제52항에 있어서, 단백질분해효소가 조직에서 EGFR과 함께 위치하고, 활성화가능한 항체가 단백질분해효소에 노

출될 때 단백질분해효소가 활성화가능한 항체에서의 CM을 절단하는 것인 약학 조성물.

**청구항 68**

◆청구항 68은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제52항에 있어서, 활성화가능한 항체가 MM과 CM 사이에 연결 펩티드를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 69**

◆청구항 69은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제52항에 있어서, 활성화가능한 항체가 CM과 AB 사이에 연결 펩티드를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 70**

제52항에 있어서, 활성화가능한 항체가 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하고 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 이하: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM의 구조적 배열을 갖는 것인 약학 조성물.

**청구항 71**

제70항에 있어서, 상기 두 연결 펩티드가 서로 동일할 필요가 없는 것인 약학 조성물.

**청구항 72**

제70항에 있어서, LP1 및 LP2 중 하나 이상이 (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub>(서열번호 15) 및 (GGGS)<sub>n</sub>(서열번호 16)으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 n은 1 이상의 정수인 약학 조성물.

**청구항 73**

제70항에 있어서, LP1 및 LP2 중 하나 이상이 GSGG(서열번호 17), GGSGG(서열번호 18), GSGSG(서열번호 19), GS GGG(서열번호 20), GGGSG(서열번호 21) 및 GSSSG(서열번호 22)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 74**

제70항에 있어서, LP1이 아미노산 서열 GSSGGSGSGSGG(서열번호 23)를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 75**

제70항에 있어서, LP2가 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 76**

제52항에 있어서, 활성화가능한 항체가 비절단된 상태에서 MM에 직접적으로 연결되는 스페이서를 포함하고, N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열을 갖는 것인 약학 조성물.

**청구항 77**

제76항에 있어서, 스페이서가 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 78**

제76항에 있어서, 스페이서 및 MM이 아미노산 서열 QGQSGQCISPRGCPDGPVVMY(서열번호 59)를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 79**

제54항에 있어서, 작용제가 연결제를 통해 AB에 접합되는 것인 약학 조성물.

**청구항 80**

제79항에 있어서, 연결체가 절단가능한 연결체인 약학 조성물.

**청구항 81**

◆청구항 81은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제56항에 있어서, 작용제가 돌라스타틴 또는 이의 유도체인 약학 조성물.

**청구항 82**

◆청구항 82은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제56항에 있어서, 작용제가 아우리스타틴 또는 이의 유도체인 약학 조성물.

**청구항 83**

◆청구항 83은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제56항에 있어서, 작용제가 아우리스타틴 E 또는 이의 유도체인 약학 조성물.

**청구항 84**

제56항에 있어서, 작용제가 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)인 약학 조성물.

**청구항 85**

◆청구항 85은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제56항에 있어서, 작용제가 메이탄시노이드 또는 이의 유도체인 약학 조성물.

**청구항 86**

제56항에 있어서, 작용제가 메이탄시노이드 DM1 및 메이탄시노이드 DM4로 구성된 군으로부터 선택된 메이탄시노이드인 약학 조성물.

**청구항 87**

◆청구항 87은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제56항에 있어서, 작용제가 듀오카마이신 또는 이의 유도체인 약학 조성물.

**청구항 88**

◆청구항 88은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제56항에 있어서, 작용제가 칼리케아미신 또는 이의 유도체인 약학 조성물.

**청구항 89**

제70항에 있어서, LP1이 아미노산 서열 GSSGGSGGSGSG(서열번호 23)를 포함하고 LP2가 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 90**

제52항에 있어서, 활성화가능한 항체는, 활성화가능한 항체가 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 이하: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM의 구조적 배열을 갖도록 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하고, LP1은 아미노산 서열 GSSGGSGGSGSG(서열번호 23)를 포함하고 LP2는 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함하며, AB는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 91**

삭제

**청구항 92**

삭제

**청구항 93**

삭제

**청구항 94**

제52항에 있어서, 암이 삼중 음성 유방암, 식도암, 비-소세포폐암, 골육종, 편평세포암, 기저세포암종, 또는 흑색종인 약학 조성물.

**청구항 95**

대상체로부터의 샘플에서 절단제 및 표피 성장 인자 수용체(EGFR)의 존재 또는 부재를 검출하는 시험관내(in vitro) 방법으로서,

(a) 대상체로부터의 샘플을 항-EGFR 활성화가능한 항체와 접촉시키는 단계로서, 항-EGFR 활성화가능한 항체가 활성화된 상태에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 것인 단계, 및

(b) 상기 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 수준을 측정하는 단계로서, 상기 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출가능한 수준은 절단제 및 EGFR이 상기 샘플에 존재한다는 것을 나타내고, 상기 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출불가능한 수준은 절단제, EGFR, 또는 절단제 및 EGFR 둘다가 상기 샘플에 부재한다는 것을 나타내는 것인 단계

를 포함하고,

상기 항-EGFR 활성화가능한 항체가

EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)으로서, (i) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열, 또는 (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AB;

비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 차폐 모이어티(MM)로서, 아미노산 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함하는 MM; 및

상기 AB에 커플링된 절단가능한 모이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드이고 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함하는 CM

을 포함하며,

활성화가능한 항체가 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 이하: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM의 구조적 배열을 갖는 것인, 대상체로부터의 샘플에서 절단제 및 EGFR의 존재 또는 부재를 검출하는 시험관내 방법.

**청구항 96**

제95항에 있어서, 항-EGFR 활성화가능한 항체가 검출가능한 표지를 포함하는 것인 시험관내 방법.

**청구항 97**

제96항에 있어서, 검출가능한 표지가 영상화제, 조영제, 효소, 형광 표지, 발색단, 염료, 하나 이상의 금속 이온 또는 리간드계 표지를 포함하는 것인 시험관내 방법.

**청구항 98**

삭제

**청구항 99**

EGFR-관련 장애의 치료를 위한 환자 집단을 확인하거나 구별하는 키트로서,

상기 EGFR-관련 장애는 암 또는 건선이고,

(i) 제1항의 항-EGFR 활성화가능한 항체;

(ii) 대상체로부터의 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 수준을 측정하는 수단으로서, 상기 샘플 중의 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출가능한 수준은 상기 샘플이 EGFR의 존재 및 제1항의 활성화가능한 항체의 절단가능한 모이어티(CM)에서의 기질을 절단하는 절단제의 존재에 대해 양성임을 나타내는 것인 수단;

(iii) EGFR 및 절단제의 존재에 대해 양성 판정을 받은 하나 이상의 대상체를 확인하고 선택하여 환자 집단을 확인하거나 구별하는 수단; 및

(iv) 치료 유효량의 제1항의 활성화가능한 항체를, EGFR 및 절단제의 존재에 대해 양성 판정을 받은 환자 집단 내의 하나 이상의 대상체에게 투여하기 위한 설명서

를 포함하는, EGFR-관련 장애의 치료를 위한 환자 집단을 확인하거나 구별하는 키트.

**청구항 100**

제99항에 있어서, 항-EGFR 활성화가능한 항체가 검출가능한 표지를 포함하는 것인 키트.

**청구항 101**

제100항에 있어서, 검출가능한 표지가 영상화제, 조영제, 효소, 형광 표지, 발색단, 염료, 하나 이상의 금속 이온 또는 리간드계 표지를 포함하는 것인 키트.

**청구항 102**

제99항에 있어서, EGFR-관련 장애가 암인 키트.

**청구항 103**

제102항에 있어서, 암이 유방암, 대장암, 위암, 아교모세포종, 두경부암, 폐암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 육종 또는 피부암인 키트.

**청구항 104**

제99항에 있어서, EGFR-관련 장애가 건선인 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원**

[0002] 본원은 2012년 4월 27일 출원된 미국 가출원 제61/639,796호; 2012년 6월 20일 출원된 미국 가출원 제 61/662,204호; 2013년 1월 4일 출원된 미국 가출원 제61/749,220호; 2013년 1월 7일 출원된 미국 가출원 제 61/749,529호; 및 2013년 2월 11일 출원된 미국 가출원 제61/763,237호(이들 각각은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)의 이익을 주장한다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하는 활성화가능한 항체, EGFR에 특이적으로 결합하는 접합된 활성화가능한 항체, 이들 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체를 제조하는 방법, 및 다양한 치료, 진단 및 예방 적응증에서 이들 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 항체-기초 치료는 일부 질환들에 대한 효과적인 치료로 입증되었으나, 일부 경우 넓은 표적 발현으로 인한 독성

이 그들의 치료 효과를 제한한다. 또한, 항체-기초 치료제는 다른 한계, 예컨대, 투여 후 순환계로부터의 신속한 제거를 나타낸다.

[0006] 소분자 치료제 분야에서, 활성 화학 물질의 전구약물을 제공하는 방법이 개발되었다. 이러한 전구약물은 상대적으로 불활성(또는 유의하게 보다 낮은 활성) 형태로 투여된다. 일단 투여되면, 전구약물은 생체내에서 활성 화합물로 대사된다. 이러한 전구약물 방법은 그의 의도된 표적에 대한 약물의 증가된 선택성 및 불리한 효과의 감소를 제공할 수 있다.

[0007] 따라서, 소분자 전구약물의 바람직한 특성을 모방하는 항체가 항체-기초 치료제 분야에서 계속 요구된다.

**발명의 내용**

[0008] 본 발명은 차폐 모이어티(masking moiety)(MM)의 커플링이 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 능력을 감소시키도록 MM에 커플링된, EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 활성화가능한 항체를 제공한다. 바람직한 실시양태에서, MM은 단백질분해효소(protease), 예를 들면, 대상체의 치료 부위에서 EGFR과 함께 위치하는(co-localized) 단백질분해효소에 대한 기질을 포함하는 서열을 통해 커플링된다. 본원에서 제공된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 순환계에서 안정하고 의도된 치료 및/또는 진단 부위에서 활성화되나, 정상, 즉 건강한 조직에서 활성화되지 않고, 활성화되었을 때 반응하는 비변경된 항체에 적어도 필적할만한 EGFR과의 결합을 나타낸다.

[0009] 본 발명은 차폐 모이어티(MM)의 커플링이 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 능력을 감소시키도록 MM에 커플링된, EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 접합된 활성화가능한 항체를 제공하고, 이때 상기 활성화가능한 항체는 하나 이상의 추가 물질(작용제)에 접합되어 있다. 접합된 활성화가능한 항체의 바람직한 실시양태에서, MM은 단백질분해효소, 예를 들면, 대상체의 치료 부위에서 EGFR과 함께 위치하는 단백질분해효소에 대한 기질을 포함하는 서열을 통해 커플링된다. 본원에서 제공된 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 순환계에서 안정하고 의도된 치료 및/또는 진단 부위에서 활성화되나, 정상, 즉 건강한 조직에서 활성화되지 않고, 활성화되었을 때 반응하는 비변경된 항체에 적어도 필적할만한 EGFR과의 결합을 나타낸다.

[0010] 본 발명은 치료 분자, 예를 들면, 활성화된 상태에서 EGFR에 결합하는 활성화가능한 항체 및/또는 활성화된 상태에서 EGFR에 결합하는 접합된 활성화가능한 항체, 특히 활성화되었을 때 EGFR에 결합하여 EGFR의 하나 이상의 생물학적 활성 및/또는 EGFR-매개된 신호전달을 중화시키거나 다른 방식으로 억제하는 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체를 사용하여 대상체에서 EGFR의 비정상적인 발현 및/또는 활성과 관련된 적응증, 예를 들면, 질환 또는 장애, 예를 들면, EGFR-관련 장애를 치료하거나, 이러한 장애의 발병 또는 진행을 예방하고/하거나 지연시키거나, 또는 이러한 장애의 증상을 완화하는 방법을 제공한다.

[0011] 본원에 기재된 활성화가능한 항체는 활성화된 상태에서 EGFR에 결합하고, (i) EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)으로서, 세특시맵(cetuximab)이거나 세특시맵으로부터 유도된 AB; (ii) 비결단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 차폐 모이어티(MM); 및 (iii) AB에 커플링된 절단가능한 모이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드인 CM을 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 큰, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는다.

[0013] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 크지 않은, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는다.

[0014] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR과의 결합에 대해 절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB를 방해하지 않거나 이 AB와 경쟁하지 않는다.

[0015] 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 조직에서 EGFR과 함께 위치하고, 단백질분해효소는 활성화가능한 항체가 단백질분해효소에 노출될 때 활성화가능한 항체에서 CM을 절단한다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 EGFR을 유의하게 발현하지 않는 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 건강한, 예를 들면, 병들지 않은 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다.

[0016] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 비결단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을

갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM.

- [0017] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 MM과 CM 사이에 연결 펩티드를 포함한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 CM과 AB 사이에 연결 펩티드를 포함한다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하고, 이때 활성화가능한 항체는 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM. 일부 실시양태에서, 상기 2개의 연결 펩티드들은 서로 동일할 필요가 없다.
- [0020] 일부 실시양태에서, AB는 EGFR과의 결합에 대한 약 100 nM 이하의 평형 해리 상수를 갖는다.
- [0021] 일부 실시양태에서, MM은 길이에 있어서 약 2개 내지 40개의 아미노산, 예를 들면, 길이에 있어서 40개 이하의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다.
- [0022] 일부 실시양태에서, MM 폴리펩티드 서열은 EGFR의 폴리펩티드 서열과 상이하고, MM 폴리펩티드 서열은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 이하의 수준으로 동일하다.
- [0023] 일부 실시양태에서, CM은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 20배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체에 위치한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, CM은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 100배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체에 위치한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, CM은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 200배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체에 위치한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의 해리 상수( $K_d$ )가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 20배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 100배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 1000배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 10,000배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다.
- [0027] 일부 실시양태에서, CM은 길이에 있어서 최대 15개의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 표적 치환 분석, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제WO 2009/025846호 및 제WO 2010/081173호에 기재된 분석을 이용하여 시험관내에서 분석하였을 때, EGFR의 존재 하에서 MM은 CM이 절단되어 있을 때에 비해 CM이 비절단되어 있을 때 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 90% 이상 감소시킨다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편은 단일클론 항체, 도메인 항체, 단일 쇄, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv, scab, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체 및 단일 도메인 경쇄 항체이다. 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 이러한 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편은 마우스, 키메라, 인간화된 또는 전체 인간 단일클론 항체이다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 활성화된 상태에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 활성화가능한 항체는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)으로서, 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 균으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AB; 비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 방해하는 차폐 모이어티(MM)로서, 아미노산 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함하는 차폐 모이어티; 및 AB에 커플링된 절단가능한 모이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드이고 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함하는 CM을

포함하고, 이때 활성화가능한 항체는 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 일부 실시양태에서, 활성화된 상태에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 활성화가능한 항체는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)으로서, 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AB; 비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 방해하는 차폐 모이어티(MM)로서, 아미노산 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함하는 차폐 모이어티; 및 AB에 커플링된 절단가능한 모이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드이고 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함하는 CM을 포함하고, 이때 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0034] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0035] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0036] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 1, 서열번호 5 및 서열번호 9로 구성된 군으로부터 선







- [0062] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 10의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 4의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 34의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0064] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 28의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 4의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0066] 일부 실시양태에서, CM은 uPA, 레구마인(legumain) 및 MT-SP1로 구성된 군으로부터 선택된 효소에 대한 기질이다. 일부 실시양태에서, 효소는 uPA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 레구마인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 MT-SP1을 포함한다.
- [0067] 일부 실시양태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함한다.
- [0068] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 25% 초과인 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 10% 초과인 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다.
- [0069] 일부 실시양태에서, MM은 아미노산 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함한다.
- [0070] 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은 (GS)<sub>n</sub>, (GG)<sub>n</sub>, (GSGG)<sub>n</sub>(서열번호 15) 및 (GGG)<sub>n</sub>(서열번호 6)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 이때 n은 1 이상의 정수이다. 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은 GSGG(서열번호 17), GSGGG(서열번호 18), GSGSG(서열번호 19), GSGGGG(서열번호 20), GGGSG(서열번호 21) 및 GSSSG(서열번호 22)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0071] 일부 실시양태에서, LP1은 아미노산 서열 GSSGGSGGGSGG(서열번호 23)를 포함한다.
- [0072] 일부 실시양태에서, LP2는 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함한다.
- [0073] 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 활성화된 또는 절단된 상태에서 활성화된 항체가 서열번호 69의 경쇄 아미노산 서열을 포함하도록 uPA 또는 MT-SP1에 노출되어 uPA 또는 MT-SP1에 의해 절단된다. 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 활성화된 또는 절단된 상태에서 활성화된 항체가 서열번호 70의 경쇄 아미노산 서열을 포함하도록 레구마인에 노출되어 레구마인에 의해 절단된다.
- [0074] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 AB에 접합된 물질도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 치료제이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 항신생물제이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 독소 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 표 1에 나열된 군으로부터 선택된 물질이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 돌라스타틴(dolastatin)이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 아우리스타틴(auristatin) 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 아우리스타틴 E 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 메이탄시노이드(maytansinoid) 또는 메이탄시노이드 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 DM1 또는 DM4이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 듀오카마이신(duocarmycin) 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은

칼리케아미신(calicheamicin) 또는 이의 유도체이다.

- [0075] 일부 실시양태에서, 상기 물질은 연결체를 통해 AB에 접합된다. 일부 실시양태에서, 연결체는 절단가능한 연결체이다. 일부 실시양태에서, 연결체는 표 2 및 3에 제시된 연결체들로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0076] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 검출가능한 모이어티도 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 진단제이다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 접합가능한 검출 시약이다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 예를 들면, 플루오레세인 유도체, 예컨대, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)이다.
- [0077] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 신호 펩티드도 포함한다. 일부 실시양태에서, 신호 펩티드는 스페이서를 통해 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 신호 펩티드의 부재 하에서 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 활성화가능한 항체의 MM에 직접적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 MM 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)에 직접적으로 연결된 서열 QGQSGQ(서열번호 38)의 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 MM 서열에 직접적으로 연결된 스페이서를 포함하고, N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 아미노산 서열 QGQSGQCISPRGCPDGPYVMY(서열번호 59)를 포함한다.
- [0078] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 5일 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 4일 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 3일 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 2일 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 24시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 20시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 18시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 16시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 14시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 12시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 10시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 8시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 6시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 4시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 3시간 이상이다.
- [0079] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 단일특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 다중특이적, 예를 들면, 비-제한적 예로서 이중특이적 또는 삼작용성 항체이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전구-이중특이적 T 세포 엔게이지(Engager)(BITE) 분자의 일부로서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전구-키메라 항원 수용체(CAR)-변경된 T 세포 또는 다른 조작된 수용체의 일부로서 제제화된다.
- [0080] 일부 실시양태에서, 활성화된 상태에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 활성화가능한 항체는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)으로서, 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AB; 비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 차폐 모이어티(MM)로서, 아미노산 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함하는 차폐 모이어티; 및 AB에 커플링된 절단가능한 모이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드이고 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함하는 CM을 포함하고, 이때 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0081] 일부 실시양태에서, 활성화된 상태에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 활성화가능한 항체는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)으로서, 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로

구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AB; 비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 차폐 모이어티(MM)로서, 아미노산 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함하는 차폐 모이어티; 및 AB에 커플링된 절단가능한 모이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드이고 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함하는 CM을 포함하고, 이때 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0082] 일부 실시양태에서, 이의 항원 결합 단편은 Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv 및 scAb로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0083] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄와 경쇄의 조합을 포함한다.

[0084] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0085] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 4의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0086] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 28의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 26의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 4의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호



- [0099] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 34의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 4의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 28의 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0102] 일부 실시양태에서, AB는 EGFR과의 결합에 대한 약 100 nM 이하의 평형 해리 상수를 갖는다.
- [0103] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 큰, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는다. 일부 실시양태에서, MM은 EGFR과의 결합에 대해 절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB를 방해하지 않거나 이 AB와 경쟁하지 않는다.
- [0104] 일부 실시양태에서, MM은 길이에 있어서 40개 이하의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, MM 폴리펩티드 서열은 EGFR의 폴리펩티드 서열과 상이하고, MM 폴리펩티드 서열은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 이하의 수준으로 동일하다. 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 25% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 10% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다.
- [0105] 일부 실시양태에서, CM은 길이에 있어서 최대 15개의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, CM은 uPA, 레구마인 및 MT-SP1로 구성된 군으로부터 선택된 효소에 대한 기질이다. 일부 실시양태에서, 효소는 uPA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 레구마인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 MT-SP1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 조직에서 EGFR과 함께 위치하고, 이때 단백질분해효소는 활성화가능한 항체가 단백질분해효소에 노출될 때 활성화가능한 항체에서 CM을 절단한다.
- [0106] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 MM과 CM 사이에 연결 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 MM과 AB 사이에 연결 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하고, 활성화가능한 항체는 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM. 일부 실시양태에서, 상기 2개의 연결 펩티드들은 서로 동일할 필요가 없다.
- [0107] 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은 (GS)<sub>n</sub>, (GG)<sub>n</sub>, (GSGG)<sub>n</sub>(서열번호 15) 및 (GGG)<sub>n</sub>(서열번호 16)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 이때 n은 1 이상의 정수이다. 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은 GSGG(서열번호 17), GGSGG(서열번호 18), GSGSG(서열번호 19), GSGGG(서열번호 20), GGGSG(서열번호 21) 및 GSSSG(서열번호 22)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, LP1은 아미노산 서열 GSSGGSGSGG(서열번호 23)를 포함한다. 일부 실시양태에서, LP2는 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함한다.
- [0108] 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 활성화된 또는 절단된 상태에서 활성화된 항체가 서열번호 69의 경쇄 아미노산 서열을 포함하도록 uPA 또는 MT-SP1에 노출되어 uPA 또는 MT-SP1에 의해 절단된다. 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 활성화된 또는 절단된 상태에서 활성화된 항체가 서열번호 70의 경쇄 아미노산 서열을 포함하도록 레구마인에 노출되어 레구마인에 의해 절단된다.
- [0109] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 AB에 접합된 물질(작용제)도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 치료제이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 항신생물제이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 독소 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 표 1에 나열된 군으로부터 선택된 물질이다. 일부 실시양태에

서, 상기 물질은 돌라스타틴이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 아우리스타틴 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 아우리스타틴 E 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 메이탄시노이드 또는 메이탄시노이드 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 DM1 또는 DM4이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 듀오카마이신 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 칼리케아미신 또는 이의 유도체이다.

- [0110] 일부 실시양태에서, 상기 물질은 연결체를 통해 AB에 접합된다. 일부 실시양태에서, 연결체는 절단가능한 연결체이다. 일부 실시양태에서, 연결체는 표 2 및 3에 제시된 연결체들로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 검출가능한 모이어티도 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 진단제이다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 접합가능한 검출 시약이다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 예를 들면, 플루오레세인 유도체, 예컨대, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)이다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 신호 펩티드도 포함한다. 일부 실시양태에서, 신호 펩티드는 스페이서를 통해 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 신호 펩티드의 부재 하에서 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 활성화가능한 항체의 MM에 직접적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQSQ(서열번호 38)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 MM 서열 CISPRGCPDGPVVMY(서열번호 14)에 직접적으로 연결된 서열 QGQSQ(서열번호 38)의 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 MM 서열에 직접적으로 연결된 스페이서를 포함하고, N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 아미노산 서열 QGQSQCISPRGCPDGPVVMY(서열번호 59)를 포함한다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 5일 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 4일 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 3일 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 2일 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 24시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 20시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 18시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 16시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 14시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 12시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 10시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 8시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 6시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 4시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 3시간 이상이다.
- [0114] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 단일특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 다중특이적, 예를 들면, 비-제한적 예로서 이중특이적 또는 삼작용성 항체이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전구-이중특이적 T 세포 엔게이지(BITE) 분자의 일부로서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전구-키메라 항원 수용체(CAR)-변경된 T 세포 또는 다른 조작된 수용체의 일부로서 제제화된다.
- [0115] 본 발명은 활성화된 상태에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하고, EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB); 비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 차폐 모이어티(MM); 및 AB에 커플링된 절단가능한 모이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드인 CM; 및 세포독성제를 포함하는 접합된 활성화가능한 항체도 제공한다.
- [0116] 일부 실시양태에서, AB는 세특시맵이거나 세특시맵으로부터 유도된다.
- [0117] 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 이의 항원 결합 단편은 Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv, scAb, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체 및 단일 도메인 경쇄 항체로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0118] 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태



- [0126] 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 큰, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, MM은 EGFR과의 결합에 대해 절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB를 방해하지 않거나 이 AB와 경쟁하지 않는다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, MM은 길이에 있어서 40개 이하의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, MM 폴리펩티드 서열은 EGFR의 폴리펩티드 서열과 상이하고, MM 폴리펩티드 서열은 AB의 임의의 친연 결합 파트너와 50% 이하의 수준으로 동일하다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 25% 초과와 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 10% 초과와 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, MM은 아미노산 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함한다.
- [0127] 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, CM은 길이에 있어서 최대 15개의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, CM은 uPA, 레구마인 및 MT-SP1로 구성된 군으로부터 선택된 효소에 대한 기질이다. 일부 실시양태에서, 효소는 uPA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 레구마인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 MT-SP1을 포함한다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함한다.
- [0128] 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체는 MM과 CM 사이에 연결 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체는 CM과 AB 사이에 연결 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체는 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하고, 접합된 활성화가능한 항체는 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM. 일부 실시양태에서, 상기 2개의 연결 펩티드들은 서로 동일할 필요가 없다.
- [0129] 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은  $(GS)_n$ ,  $(GGS)_n$ ,  $(GSGGS)_n$ (서열번호 15) 및  $(GGGS)_n$ (서열번호 16)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 이때 n은 1 이상의 정수이다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은 GSGG(서열번호 17), GSGGG(서열번호 18), GSGGG(서열번호 19), GSGGGG(서열번호 20), GGGSG(서열번호 21) 및 GSSSG(서열번호 22)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, LP1은 아미노산 서열 GSSGGSGSGSG(서열번호 23)를 포함한다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, LP2는 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함한다.
- [0130] 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 활성화된 또는 절단된 상태에서 활성화된 항체가 서열번호 69의 경쇄 아미노산 서열을 포함하도록 uPA 또는 MT-SP1에 노출되어 uPA 또는 MT-SP1에 의해 절단된다. 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 활성화된 또는 절단된 상태에서 활성화된 항체가 서열번호 70의 경쇄 아미노산 서열을 포함하도록 레구마인에 노출되어 레구마인에 의해 절단된다.
- [0131] 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체에 포함된 세포독성제는 AB에 접합되는 물질이다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 상기 물질은 치료제이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 항신생물제이다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 상기 물질은 독소 또는 이의 단편이다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 상기 물질은 표 1에 나열된 군으로부터 선택된 물질이다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 상기 물질은 돌라스타틴이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 아우리스타틴 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 아우리스타틴 E 또는 이의 유도체이다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 상기 물질은 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 메이탄시노이드 또는 메이탄시노이드 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 DM1 또는 DM4이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 듀오카마이신 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 칼리케아미신 또는 이의 유도체이다.
- [0132] 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 상기 물질은 연결제를 통해 AB에 접합된다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 연결제는 절단가능한 연결제이다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 연결제는 표 2 및 3에 제시된 연결체들로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0133] 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체는 검출가능한 모이어티도 포함한다. 접합된 활성화가능한 항체의 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 진단제이다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 접합가능한 검출 시약이다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 예를 들면, 플루오레세인 유도체, 예컨대, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)이다.

- [0134] 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체는 신호 펩티드도 포함한다. 일부 실시양태에서, 신호 펩티드는 스페이서를 통해 접합된 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 신호 펩티드의 부재 하에서 접합된 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 접합된 활성화가능한 항체의 MM에 직접적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 MM 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)에 직접적으로 연결된 서열 QGQSGQ(서열번호 38)의 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 MM 서열에 직접적으로 연결된 스페이서를 포함하고, N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 아미노산 서열 QGQSGQCISPRGCPDGPYVMY(서열번호 59)를 포함한다.
- [0135] 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 5일 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 4일 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 3일 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 2일 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 24시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 20시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 18시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 16시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 14시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 12시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 10시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 8시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 6시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 4시간 이상이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체의 혈청 반감기는 유기체에 투여되었을 때 3시간 이상이다.
- [0136] 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 단일특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 다중특이적, 예를 들면, 비-제한적 예로서 이중특이적 또는 삼작용성 항체이다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전구-이중특이적 T 세포 엔케이저(BITE) 분자의 일부로서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전구-키메라 항원 수용체(CAR)-변경된 T 세포 또는 다른 조작된 수용체의 일부로서 제제화된다.
- [0137] 본 발명은 본원에 기재된 활성화가능한 항-EGFR 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자뿐만 아니라, 이 단리된 핵산 서열을 포함하는 벡터도 제공한다. 본 발명은 활성화가능한 항체의 발현을 일으키는 조건 하에서 세포를 배양함으로써 활성화가능한 항체를 제조하는 방법을 제공하는데, 이때 상기 세포는 이러한 벡터를 포함한다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 큰, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는 MM을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 크지 않은, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는 MM을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR과의 결합에 대해 절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB를 방해하지 않거나 이 AB와 경쟁하지 않는 MM을 코딩한다.
- [0139] 일부 실시양태에서, 핵산은 조직에서 EGFR과 함께 위치하는 단백질분해효소에 의해 절단되는 CM을 코딩하고, 단백질분해효소는 활성화가능한 항체가 단백질분해효소에 노출될 때 활성화가능한 항체에서 CM을 절단한다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 EGFR을 유의하게 발현하지 않는 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 건강한, 예를 들면, 병들지 않은 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 핵산은 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는 활성화가능한 항체를 코딩한다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM.
- [0141] 일부 실시양태에서, 핵산은 MM과 CM 사이에 연결 펩티드를 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 핵산은 CM과 AB 사이에 연결 펩티드를 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 핵산은 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩하고, 이때 상기 활성화가능한 항체는 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM. 일부 실시양태에서, 2개의 연결 펩티드들은 서로 동일할 필



하는 중쇄 및 서열번호 27의 핵산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

- [0154] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 9의 핵산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 67의 핵산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 AB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 9의 핵산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 3의 핵산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 9의 핵산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 27의 핵산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0155] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 33의 핵산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 67의 핵산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 AB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 33의 핵산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 3의 핵산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 33의 핵산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 27의 핵산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0156] 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR과의 결합에 대한 약 100 nM 이하의 평형 해리 상수를 갖는 AB를 코딩한다.
- [0157] 일부 실시양태에서, 핵산은 길이에 있어서 약 2개 내지 40개의 아미노산, 예를 들면, 길이에 있어서 40개 이하의 아미노산을 갖는 폴리펩티드인 MM을 코딩한다.
- [0158] 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR의 폴리펩티드 서열과 상이한 MM 폴리펩티드 서열을 코딩하고, 상기 MM 폴리펩티드 서열은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 이하의 수준으로 동일하다.
- [0159] 일부 실시양태에서, 핵산은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 20배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체에 위치하는 CM을 코딩한다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 핵산은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 100배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체에 위치하는 CM을 코딩한다.
- [0161] 일부 실시양태에서, 핵산은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 200배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체에 위치하는 CM을 코딩한다.
- [0162] 일부 실시양태에서, 핵산은 길이에 있어서 최대 15개의 아미노산을 갖는 폴리펩티드인 CM을 코딩한다.
- [0163] 일부 실시양태에서, 핵산은 표적 치환 분석, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제WO 2009/025846호 및 제WO 2010/081173호에 기재된 분석을 이용하여 시험관내에서 분석하였을 때 EGFR의 존재 하에서 CM이 절단되어 있을 때에 비해 CM이 비절단되어 있을 때 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 90% 이상 감소시키는 MM을 코딩한다.
- [0164] 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR에 결합하고 단일클론 항체, 도메인 항체, 단일 쇄, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv, scab, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체 및 단일 도메인 경쇄 항체인 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR에 결합하고 마우스, 키메라, 인간화된 또는 전체 인간 단일클론 항체인 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편을 코딩한다.
- [0165] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 활성화가능한 항체의 AB를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 활성화가능한 항체의 AB를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양

태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0166] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다.

[0167] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다.

[0168] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 1, 서열번호 5 및 서열번호 9로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열 및 서열번호 67을 포함하는 경쇄 핵산 서열을 포함하는 AB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열번호 1, 서열번호 5 및 서열번호 9로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 67을 포함하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 핵산을 포함하는 AB를 포함한다.

[0169] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 1, 서열번호 5 및 서열번호 9로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 27을 포함하는 경쇄 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열번호 1, 서열번호 5 및 서열번호 9로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 27을 포함하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 핵산을 포함한다.

[0170] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 1, 서열번호 5 및 서열번호 9로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 3 포함하는 경쇄 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 1, 서열번호 5 및 서열번호 9로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 3을 포함하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 핵산을 포함한다.

[0171] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AB를 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0172] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다. 일부 실시

양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0173] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 67을 포함하는 경쇄 핵산 서열을 포함하는 AB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 67을 포함하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 핵산을 포함하는 AB를 포함한다.

[0175] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 27을 포함하는 경쇄 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 27을 포함하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 핵산을 포함한다.

[0176] 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 핵산을 포함한다.

[0177] 일부 실시양태에서, 핵산은 uPA, 레구마인 및 MT-SP1로 구성된 군으로부터 선택된 효소에 대한 기질인 CM을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 효소는 uPA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 레구마인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 MT-SP1을 포함한다.

[0178] 일부 실시양태에서, 핵산은 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함하는 CM을 코딩한다.

[0179] 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR에 대한 25% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는 MM을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 EGFR에 대한 10% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는 MM을 코딩한다.

[0180] 일부 실시양태에서, 핵산은 아미노산 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함하는 MM을 코딩한다.

[0181] 일부 실시양태에서, 핵산은 LP1 및/또는 LP2를 코딩하고, 이때 LP1 및 LP2 중 하나 이상은 (GS)<sub>n</sub>, (GG)<sub>n</sub>, (GSGG)<sub>n</sub>(서열번호 15) 및 (GGG)<sub>n</sub>(서열번호 16)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 이때 n은 1 이상의 정수이다.

[0182] 일부 실시양태에서, 핵산은 LP1 및/또는 LP2를 코딩하고, 이때 LP1 및 LP2 중 하나 이상은 GGSG(서열번호 17), GGS GG(서열번호 18), GSGSG(서열번호 19), GSGGG(서열번호 20), GGGSG(서열번호 21) 및 GSSSG(서열번호 22)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0183] 일부 실시양태에서, 핵산은 아미노산 서열 GSSGGSGSGSG(서열번호 23)를 포함하는 LP를 코딩한다.

[0184] 일부 실시양태에서, 핵산은 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함하는 LP2를 코딩한다.

[0185] 일부 실시양태에서, 핵산은 신호 펩티드도 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 스페이서를 통해 활성화가능한 항체에 접합되는 신호 펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 신호 펩티드의 부재 하에서 활성화가능한 항체에 접합된 스페이서를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 활성화가능한

항체의 MM에 직접적으로 연결된 스페이서를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 적어도 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 MM 서열 CISPRGCPDGPVVMY(서열번호 14)에 직접적으로 연결된 서열 QGQSGQ(서열번호 38)의 스페이서를 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 MM 서열에 직접적으로 연결된 스페이서를 포함하고 N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 아미노산 서열 QGQSGQCISPRGCPDGPVVMY(서열번호 59)를 포함하는 활성화가능한 항체를 코딩한다.

- [0186] 본 발명은 (a) 활성화가능한 항체의 발현을 일으키는 조건 하에서 활성화가능한 항체를 코딩하는 핵산 구축물을 포함하는 세포를 배양하고, (b) 활성화가능한 항체를 회수함으로써 활성화된 상태에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 활성화가능한 항체를 제조하는 방법도 제공하고, 이때 상기 활성화가능한 항체는 차폐 모이어티(MM), 절단가능한 모이어티(CM), 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)을 포함하고, (i) 이때 CM은 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드이고; (ii) CM은 비절단된 상태에서 MM이 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하고 활성화가능한 항체가 절단된 상태로 존재할 때 MM이 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하지 않거나 경쟁하지 않도록 활성화가능한 항체에서 위치한다.
- [0187] 일부 실시양태에서, AB는 세특시맵이거나 세특시맵으로부터 유도된다.
- [0188] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 큰, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는다.
- [0189] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 크지 않은, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는다.
- [0190] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR과의 결합에 대해 절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB를 방해하지 않거나 이 AB와 경쟁하지 않는다.
- [0191] 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 조직에서 EGFR과 함께 위치하고, 단백질분해효소는 활성화가능한 항체가 단백질분해효소에 노출될 때 활성화가능한 항체에서 CM을 절단한다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 EGFR을 유의하게 발현하지 않는 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 건강한, 예를 들면, 병들지 않은 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM.
- [0193] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 MM과 CM 사이에 연결 펩티드를 포함한다.
- [0194] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 CM과 AB 사이에 연결 펩티드를 포함한다.
- [0195] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하고, 이때 활성화가능한 항체는 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM.
- [0196] 일부 실시양태에서, 상기 2개의 연결 펩티드들은 서로 동일할 필요가 없다.
- [0197] 일부 실시양태에서, AB는 EGFR과의 결합에 대한 약 100 nM 이하의 평형 해리 상수를 갖는다.
- [0198] 일부 실시양태에서, MM은 길이에 있어서 약 2개 내지 40개의 아미노산, 예를 들면, 길이에 있어서 40개 이하의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다.
- [0199] 일부 실시양태에서, MM 폴리펩티드 서열은 EGFR의 폴리펩티드 서열과 상이하고, MM 폴리펩티드 서열은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 이하의 수준으로 동일하다.
- [0200] 일부 실시양태에서, CM은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 20배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체에 위치한다.
- [0201] 일부 실시양태에서, CM은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 100배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소하는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체에 위치한다.

- [0202] 일부 실시양태에서, CM은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 200배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소하는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체에 위치한다.
- [0203] 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의 해리 상수( $K_d$ )가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 20배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 100배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 1000배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 10,000배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다.
- [0204] 일부 실시양태에서, CM은 길이에 있어서 최대 15개의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다.
- [0205] 일부 실시양태에서, 표적 치환 분석, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제WO 2009/025846호 및 제WO 2010/081173호에 기재된 분석을 이용하여 시험관내에서 분석하였을 때, EGFR의 존재 하에서 MM은 CM이 절단되어 있을 때에 비해 CM이 비절단되어 있을 때 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 90% 이상 감소시킨다.
- [0206] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편은 단일클론 항체, 도메인 항체, 단일 쇄, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv, scab, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체 및 단일 도메인 경쇄 항체이다. 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 이러한 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편은 마우스, 키메라, 인간화된 또는 전체 인간 단일클론 항체이다.
- [0207] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0208] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 28을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0209] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 4를 포함하





서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 및 서열번호 68을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0221] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 26, 서열번호 30 및 서열번호 34로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 및 서열번호 4를 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0222] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 67을 포함하는 경쇄 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 67을 포함하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0223] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 27을 포함하는 경쇄 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 27을 포함하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0224] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 3을 포함하는 경쇄 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 25, 서열번호 29 및 서열번호 33으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 3을 포함하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0225] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이서 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0226] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 28의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.





과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 28의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0239] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 10의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 4의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0240] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 34의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0241] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 28의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0242] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 34의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 4의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0243] 일부 실시양태에서, CM은 uPA, 레구마인 및 MT-SP1로 구성된 군으로부터 선택된 효소에 대한 기질이다. 일부 실시양태에서, 효소는 uPA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 레구마인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 MT-SP1을 포함한다.

[0244] 일부 실시양태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함한다.

[0245] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 25% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다.

[0246] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 10% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다.

[0247] 일부 실시양태에서, MM은 아미노산 서열 CISPRGCPDGPVVMY(서열번호 14)를 포함한다.

[0248] 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은 (GS)<sub>n</sub>, (GGG)<sub>n</sub>, (GSGG)<sub>n</sub>(서열번호 15) 및 (GGG)<sub>n</sub>(서열번호 16)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 이때 n은 1 이상의 정수이다.

[0249] 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은 GSGG(서열번호 17), GGGGG(서열번호 18), GSGGG(서열번호 19), GSGGG(서열번호 20), GGGGG(서열번호 21) 및 GSSGG(서열번호 22)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

- [0250] 일부 실시양태에서, LP1은 아미노산 서열 GSSGGSGGGSGG(서열번호 23)를 포함한다.
- [0251] 일부 실시양태에서, LP2는 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함한다.
- [0252] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 AB에 접합된 물질도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 치료제이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 항신생물제이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 독소 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 연결체를 통해 AB에 접합된다. 일부 실시양태에서, 연결체는 절단가능한 연결제이다.
- [0253] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 검출가능한 모이어티도 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 진단제이다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 접합가능한 검출 시약이다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 예를 들면, 플루오레세인 유도체, 예컨대, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)이다.
- [0254] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 신호 펩티드도 포함한다. 일부 실시양태에서, 신호 펩티드는 스페이서를 통해 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 신호 펩티드의 부재 하에서 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 활성화가능한 항체의 MM에 직접적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 MM 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)에 직접적으로 연결된 서열 QGQSGQ(서열번호 38)의 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 MM 서열에 직접적으로 연결된 스페이서 서열을 포함하고, N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 아미노산 서열 QGQSGQCISPRGCPDGPYVMY(서열번호 59)를 포함한다.
- [0255] 본 발명은 치료 분자, 예를 들면, EGFR에 결합하는 활성화가능한 항체 및/또는 EGFR에 결합하는 접합된 활성화가능한 항체, 특히 EGFR에 결합하여 EGFR의 하나 이상의 생물학적 활성 및/또는 EGFR-매개된 신호전달을 중화시키거나 다른 방식으로 억제하는 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체를 사용하여 대상체에서 EGFR의 비정상적인 발현 및/또는 활성과 관련된 적응증, 예를 들면, 질환 또는 장애, 예를 들면, EGFR-관련 장애 또는 EGFR-관련 질환을 치료하거나, 이러한 장애 또는 질환의 발병 또는 진행을 예방하고/하거나 지연시키거나, 또는 이러한 장애 또는 질환의 증상을 완화하는 방법을 제공한다.
- [0256] 일부 실시양태에서, EGFR의 비정상적인 발현 및/또는 활성과 관련된 적응증, 예를 들면, 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 유방암이고, 비-제한적으로 예를 들면, 유방암은 삼중 음성 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 삼중 음성 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 대장암이다. 일부 실시양태에서, 암은 위암이다. 일부 실시양태에서, 암은 아교모세포종이다. 일부 실시양태에서, 암은 두경부암, 비-제한적으로 예를 들면, 식도암이다. 일부 실시양태에서, 암은 식도암이다. 일부 실시양태에서, 암은 폐암, 비-제한적으로 예를 들면, 비-소세포폐암이다. 일부 실시양태에서, 암은 비-소세포폐암이다. 일부 실시양태에서, 암은 난소암/자궁내막암이다. 일부 실시양태에서, 암은 췌장암이다. 일부 실시양태에서, 암은 전립선암이다. 일부 실시양태에서, 암은 신장암이다. 일부 실시양태에서, 암은 육종, 비-제한적으로 예를 들면, 골육종이다. 일부 실시양태에서, 암은 골육종이다. 일부 실시양태에서, 암은 피부암, 비-제한적으로 예를 들면, 편평세포암, 기저세포암종 및/또는 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 암은 편평세포암이다. 일부 실시양태에서, 암은 기저세포암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종이다.
- [0257] 일부 실시양태에서, EGFR의 비정상적인 발현 및/또는 활성과 관련된 적응증, 예를 들면, 질환 또는 장애는 염증성 장애 및/또는 자가면역 질환이다. 일부 실시양태에서, 염증성 및/또는 자가면역 질환은 건선이다.
- [0258] 치료 분자, 예를 들면, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체는 질환의 임의의 단계에서 투여될 수 있다. 예를 들면, 치료 분자는 초기 암부터 전이성 암까지 임의의 병기의 암을 앓고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 치료 분자는 초기 발병 병기부터 진행된 병기까지 임의의 병기의 염증성 장애 및/또는 자가면역 질환을 앓고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 용어 대상체 및 환자는 본원에서 상호교환적으로 사용된다는 것을 이해해야 한다.
- [0259] 치료 분자, 예를 들면, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 다른 치료 적응증 및 치료 요법에서도 유용하다. 예를 들면, 본원에서 제공된 실시양태들의 치료 분자는 선행보조 치료를 포함하는 치료 요법에서 사용될 수 있다.
- [0260] 일부 실시양태에서, 치료 분자, 예를 들면, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR

항체는 하나 이상의 추가 물질, 비-제한적으로 예를 들면, 화학치료제와 함께 치료 동안 및/또는 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 치료 분자 및 추가 물질(들)은 동시에 투여된다. 예를 들면, 치료 분자 및 추가 물질(들)은 단일 조성물로 제제화될 수 있거나 2개 이상의 별도의 조성물로서 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 분자 및 추가 물질(들)은 순차적으로 투여된다.

- [0261] 본 발명은 치료 유효량의 본원에 기재된 활성화가능한 항-EGFR 항체를 이것이 필요한 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 EGFR-관련 장애, 예를 들면, 암을 예방하거나, 이러한 장애의 진행을 늦추거나, 이러한 장애를 치료하거나, 이러한 장애의 증상을 완화하거나, 또는 이러한 장애를 다른 방식으로 호전시키는 방법도 제공한다.
- [0262] 본 발명은 치료 유효량의 본원에 기재된 활성화가능한 항-EGFR 항체를 이것이 필요한 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 혈관신생을 억제하는 방법도 제공한다.
- [0263] 일부 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 포유동물, 예컨대, 비-인간 영장류, 애완동물(예를 들면, 고양이, 개, 말), 농장 동물, 노동 동물 또는 동물원 동물이다.
- [0264] 활성화가능한 항-EGFR 항체 및 이의 치료 제제는 비정상적인 EGFR 발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있거나 이러한 질환 또는 장애에 민감한 대상체에게 투여된다. 비정상적인 EGFR 발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있거나 이러한 질환 또는 장애에 민감한 대상체는 당분야에서 공지된 다양한 방법들 중 임의의 방법을 이용함으로써 확인된다. 예를 들면, 암 또는 다른 신생물성 병태를 앓고 있는 대상체는 다양한 임상 및/또는 연구 시험 중 임의의 시험, 예컨대, 건강 상태를 평가하기 위한 신체 검사 및 혈액, 소변 및 대변 분석을 이용함으로써 확인된다.
- [0265] 비정상적인 EGFR 발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있는 환자에게 활성화가능한 항-EGFR 항체를 투여하는 것은 다양한 연구 또는 임상 목적들 중 임의의 목적이 달성되는 경우 성공적인 것으로 간주된다. 예를 들면, 비정상적인 EGFR 발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있는 환자에게 활성화가능한 항-EGFR 항체를 투여하는 것은 상기 질환 또는 장애와 관련된 증상들 중 하나 이상의 증상이 완화되거나, 경감되거나, 억제되거나, 또는 추가, 즉 악화 상태로 진행되지 않는 경우 성공적인 것으로 간주된다. 비정상적인 EGFR 발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있는 환자에게 활성화가능한 항-EGFR 항체를 투여하는 것은 당뇨병이 관해에 들어가거나 추가, 즉 악화 상태로 진행되지 않는 경우 성공적인 것으로 간주된다.
- [0266] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 하나 이상의 추가 물질, 예컨대, 화학치료제와 함께 치료 동안 및/또는 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및 추가 물질(들)은 동시에 투여된다. 예를 들면, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및 추가 물질(들)은 단일 조성물로 제제화될 수 있거나, 2개 이상의 별도의 조성물로서 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및 추가 물질(들)은 순차적으로 투여된다.
- [0267] 본 발명은 다양한 진단 및/또는 예방 적응증에서 EGFR에 결합하는 활성화가능한 항체(즉, 본원에서 항-EGFR 활성화가능한 항체로서도 지칭된 활성화가능한 항-EGFR 항체)를 사용하는 방법들뿐만 아니라 이들 방법들에서 사용되는 키트도 제공한다. 예를 들면, 본 발명은 (i) 대상체 또는 샘플을 항-EGFR 활성화가능한 항체와 접촉시키고, (ii) 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 수준을 측정함으로써 상기 대상체 또는 샘플에서 절단제 및 EGFR의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출가능한 수준은 절단제 및 EGFR이 상기 대상체 또는 샘플에 존재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출불가능한 수준은 절단제, EGFR, 또는 절단제 및 EGFR 둘다가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시한다. 이러한 항-EGFR 활성화가능한 항체는 차폐 모이어티(MM), 절단제에 의해 절단되는 절단가능한 모이어티(CM), 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)을 포함하고, 이때 (i) 비절단된(즉, 비-활성화된) 상태에서 항-EGFR 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 포함하고: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (ii) MM은 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 펩티드이고, MM은 AB의 천연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 갖지 않고; (iii) 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 MM은 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하고, 절단된(즉, 활성화된) 상태에서 활성화가능한 항체의 MM은 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하지 않거나 경쟁하지 않는다.
- [0268] 본 발명은 대상체 또는 샘플에서 절단제 및 관심있는 표적(EGFR)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에서 사용되는 키트로서, 적어도 대상체 또는 샘플의 접촉에서 사용되는 본원에 기재된 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는

접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체, 및 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체를 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트도 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출가능한 수준은 절단제 및 EGFR이 상기 대상체 또는 샘플에 존재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출불가능한 수준은 절단제, EGFR, 또는 절단제 및 EGFR 둘다가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시한다.

[0269] 본 발명은 (i) EGFR의 존재 하에서 대상체 또는 샘플을 항-EGFR 활성화가능한 항체와 접촉시키고, (ii) 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 수준을 측정함으로써 상기 대상체 또는 샘플에서 절단제의 존재 또는 부재를 검출하는 방법도 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 존재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출불가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시한다. 이러한 항-EGFR 활성화가능한 항체는 차폐 모이어티(MM), 절단제에 의해 절단되는 절단가능한 모이어티(CM), 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)을 포함하고, 이때 (i) 비절단된(즉, 비-활성화된) 상태에서 항-EGFR 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 포함하고: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (ii) MM은 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 펩티드이고, MM은 AB의 천연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 갖지 않고; (iii) 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 MM은 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하고, 절단된(즉, 활성화된) 상태에서 활성화가능한 항체의 MM은 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하지 않거나 경쟁하지 않는다.

[0270] 본 발명은 대상체 또는 샘플에서 절단제의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에서 사용되는 키트로서, 적어도 대상체 또는 샘플의 접촉에서 사용되는 본원에 기재된 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체, 및 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 수준을 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트도 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 존재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출불가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시한다.

[0271] 본 발명은 (i) CM의 절단 후 방출되는 항-EGFR 활성화가능한 항체의 부분 상에 위치하는 검출가능한 표지를 포함하는 항-EGFR 활성화가능한 항체를 대상체 또는 샘플과 접촉시키고, (ii) 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 수준을 측정함으로써 상기 대상체 또는 샘플에서 절단제 및 EGFR의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출가능한 수준은 절단제 및 EGFR이 상기 대상체 또는 샘플에 존재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출불가능한 수준은 절단제, EGFR, 또는 절단제 및 EGFR 둘다가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시한다. 이러한 항-EGFR 활성화가능한 항체는 차폐 모이어티(MM), 절단제에 의해 절단되는 절단가능한 모이어티(CM), 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)을 포함하고, 이때 (i) 비절단된(즉, 비-활성화된) 상태에서 항-EGFR 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 포함하고: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (ii) MM은 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 펩티드이고, MM은 AB의 천연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 갖지 않고; (iii) 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 MM은 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하고, 절단된(즉, 활성화된) 상태에서 활성화가능한 항체의 MM은 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하지 않거나 경쟁하지 않는다.

[0272] 본 발명은 (i) CM의 절단 후 방출되는 항-EGFR 활성화가능한 항체의 부분 상에 위치하는 검출가능한 표지를 포함하는 항-EGFR 활성화가능한 항체를 대상체 또는 샘플과 접촉시키고, (ii) 상기 대상체 또는 샘플에서 검출가능한 표지의 수준을 측정함으로써 상기 대상체 또는 샘플에서 절단제의 존재 또는 부재를 검출하는 방법도 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 검출가능한 표지의 검출가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 검출가능한 표지의 검출불가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 존재한다는 것을 표시한다. 이러한 항-EGFR 활성화가능한 항체는 차폐 모이어티(MM), 절단제에 의해 절단되는 절단가능한 모이어티(CM), 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 이의 단편(AB)을 포함하고, 이때 (i) 비절단된(즉, 비-활성화된) 상태에서 항-EGFR 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 포함하고: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM; (ii) MM은 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 펩티드이고, MM은 AB의 천연 발생 결합 파트너의 아미노산 서열을 갖지 않고; (iii) 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 MM은 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하고, 절단된(즉, 활성화된) 상태에서 활성화가능한 항체의 MM은 AB와 EGFR의 특이적 결합을 방해하지 않거나 경쟁하지 않는다.

- [0273] 본 발명은 대상체 또는 샘플에서 절단제 및 관심있는 표적(EGFR)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에서 사용되는 키트로서, 적어도 대상체 또는 샘플의 접촉에서 사용되는 본원에 기재된 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체, 및 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 수준을 검출하기 위한 수단을 포함하는 키트도 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 검출가능한 표지의 검출가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 검출가능한 표지의 검출불가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 존재한다는 것을 표시한다.
- [0274] 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 검출가능한 표지를 포함한다. 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 검출가능한 표지는 영상화제, 조영제, 효소, 형광 표지, 발색단, 염료, 하나 이상의 금속 이온 또는 리간드계 표지를 포함한다. 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 영상화제는 방사성동위원소를 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방사성동위원소는 인듐 또는 테크네튬이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방사성동위원소는 요오드이거나 요오드로부터 유도된다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방사성동위원소는 <sup>125</sup>I 또는 <sup>133</sup>I이다. 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 조영제는 요오드, 가돌리늄 또는 산화철을 포함한다. 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 효소는 호스라디쉬 퍼록시다제, 알칼리성 포스파타제 또는 β-갈락토시다제를 포함한다. 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 형광 표지는 황색 형광 단백질(YFP), 청록색 형광 단백질(CFP), 녹색 형광 단백질(GFP), 변경된 적색 형광 단백질(mRFP), 적색 형광 단백질 t이량체(tdimer)2(RFP t이량체2), HCRED, 또는 유로퓸 유도체를 포함한다. 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 발광 표지는 N-메틸아크리듬 유도체를 포함한다. 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 표지는 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)<sup>®</sup> 표지, 예컨대, 알렉사 플루오르<sup>®</sup> 680 또는 알렉사 플루오르<sup>®</sup> 750을 포함한다. 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 리간드계 표지는 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 또는 하나 이상의 헵텐을 포함한다.
- [0275] 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 이들 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 포유동물, 예컨대, 비-인간 영장류, 애완동물(예를 들면, 고양이, 개, 말), 농장 동물, 노동 동물 또는 동물원 동물이다.
- [0276] 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방법은 생체내(*in vivo*) 방법이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방법은 제자리(*in situ*) 방법이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방법은 생체외(*ex vivo*) 방법이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방법은 시험관내(*in vitro*) 방법이다.
- [0277] 상기 방법들 및/또는 키트들의 일부 실시양태에서, 방법 및/또는 키트는 본 개시내용의 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합한 환자 집단을 확인하거나 다른 방식으로 구별하는, 예를 들면, 분류하는 데에 사용된다. 예를 들면, 이들 방법들에서 표적(예를 들면, EGFR), 및 시험되는 항-EGFR 활성화가능한 항체의 절단가능한 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 단백질분해효소 둘다에 대해 양성 판정을 받은 환자는 이러한 CM을 포함하는 이러한 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합한 후보자로서 확인된다. 마찬가지로, 이들 방법을 이용하였을 때 표적(예를 들면, EGFR), 및 시험되는 활성화가능한 항체의 CM에서 기질을 절단하는 단백질분해효소 중 어느 하나 또는 둘다에 대한 음성을 나타내는 것으로 시험되는 환자는 또 다른 형태의 치료에 적합한(즉, 시험되는 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합하지 않은) 후보자로서 확인된다. 일부 실시양태에서, 이러한 환자는 치료에 적합한 항-EGFR 활성화가능한 항체가 확인될 때까지 다른 항-EGFR 활성화가능한 항체(예를 들면, 질환의 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 항-EGFR 활성화가능한 항체)로 시험될 수 있다.
- [0278] 본 발명은 환자 집단을 확인하거나 다른 방식으로 구별하는 방법에서 사용되는 키트로서, 적어도 (i) 대상체 또는 샘플의 접촉에서 사용되는 본원에 기재된 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체, (ii) 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 수준을 검출하기 위한 수단, 및 (iii) EGFR 및 절단제의 존재에 대해 양성 판정을 받은 하나 이상의 대상체를 확인하고 선택함으로써 환자 집단을 확인하거나 구별하기 위한 수단을 포함하는 키트도 제공하고, 이때 상기 샘플에서 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 검출가능한 수준은 상기 샘플이 EGFR의 존재, 및 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 절단가능한 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 절단제의 존재에 대해 양성임을 표시한다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 치료 유효량의 본원에 기재된 항-EGFR 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체를, EGFR 및 절단제의 존재에 대해 양

성 판정을 받은 환자 집단 내의 하나 이상의 대상체에게 투여하기 위한 설명서도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 치료 유효량의 본원에 기재된 또 다른 항-EGFR 치료제를, EGFR 및 절단제 둘다의 존재에 대해 양성 판정을 받지 않은 환자 집단 내의 하나 이상의 대상체에게 투여하기 위한 설명서도 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 검출가능한 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 표지는 영상화제, 조영제, 효소, 형광 표지, 발색단, 염료, 하나 이상의 금속 이온, 또는 리간드계 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR-관련 장애는 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 유방암, 대장암, 위암, 아교모세포종, 두경부암, 폐암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 육종 또는 피부암이다. 일부 실시양태에서, EGFR-관련 장애는 건선이다.

[0279] 이들 방법들의 일부 실시양태에서, MM은 길이에 있어서 약 2개 내지 40개의 아미노산을 갖는 펩티드이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 연결제 펩티드를 포함하고, 이때 연결제 펩티드는 MM과 CM 사이에 위치한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 연결제 펩티드를 포함하고, 이때 연결제 펩티드는 AB와 CM 사이에 위치한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 항-EGFR 활성화가능한 항체는 제1 연결제 펩티드(L1) 및 제2 연결제 펩티드(L2)를 포함하고, 이때 제1 연결제 펩티드는 MM과 CM 사이에 위치하고, 제2 연결제 펩티드는 AB와 CM 사이에 위치한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, L1 및 L2 각각은 길이에 있어서 약 1개 내지 20개의 아미노산을 갖는 펩티드이고, 이때 L1 및 L2 각각은 동일한 연결제일 필요가 없다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, L1 및 L2 중 하나 또는 둘다가 글리신-세린 중합체를 포함한다.

[0280] 이들 방법들의 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은  $(GS)_n$ ,  $(GS)_n$ ,  $(GSGGS)_n$ (서열번호 15) 및  $(GGGS)_n$ (서열번호 16)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 이때 n은 1 이상의 정수이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은 GSGG(서열번호 17), GSGGG(서열번호 18), GSGGG(서열번호 19), GSGGG(서열번호 20), GGGSG(서열번호 21) 및 GSSSG(서열번호 22)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, LP1은 아미노산 서열 GSSGGSGSGGGSG(서열번호 23)를 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, LP2는 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함한다.

[0281] 이들 방법들의 일부 실시양태에서, AB는 본원에서 제공된 항-EGFR 항체 서열들로부터 선택된 항체 또는 항체 단편 서열을 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, AB는 Fab 단편, scFv 또는 단일쇄 항체(SCAB)를 포함한다.

[0282] 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 절단제는 대상체 또는 샘플에서 EGFR과 함께 위치하는 단백질분해효소이고, CM은 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드이고, 이때 단백질분해효소는 항-EGFR 활성화가능한 항체가 단백질분해효소에 노출될 때 항-EGFR 활성화가능한 항체에서 CM을 절단한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, CM은 길이에 있어서 최대 15개의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, CM은 AB의 N-말단에 커플링된다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, CM은 AB의 C-말단에 커플링된다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, CM은 AB의 VL쇄의 N-말단에 커플링된다.

[0283] 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 절단제는 효소이고, CM은 효소에 대한 기질이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 효소는 본원에 개시된 단백질분해효소이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 본원에 개시된 단백질분해효소들 중 하나이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 uPA, 레구마인, MT-SP1, ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, MMP-9, MMP-12, MMP-13 및 MMP-14로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 효소는 uPA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 레구마인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 MT-SP1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 EGFR을 유의하게 발현하지 않는 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 건강한, 예를 들면, 병들지 않은 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다.

[0284] 본 발명은 다양한 진단 및/또는 예방 적응증에서 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체(즉, 본원에서 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 항-EGFR 활성화가능한 항체로서도 지칭되는 활성화가능한 항-EGFR 항체 접합제)를 사용하는 방법도 제공한다. 예를 들면, 본 발명은 (i) 대상체 또는 샘플을 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체와 접촉시키고 (ii) 상기 대상체 또는 샘플에서 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체의 수준을 측정함으로써 상기 대상체 또는 샘플에서 절단제 및 관심있는 표적(EGFR)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체의 검출가능한 수준은 절단제 및 EGFR이 상기 대상체

또는 샘플에 존재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체의 검출불가능한 수준은 절단제, EGFR, 또는 절단제 및 EGFR 둘다가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시한다.

[0285] 본 발명은 (i) EGFR의 존재 하에서 대상체 또는 샘플을 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체와 접촉시키고, (ii) 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체의 수준을 측정함으로써 상기 대상체 또는 샘플에서 절단제의 존재 또는 부재를 검출하는 방법도 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 활성화된 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체의 검출가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 존재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체의 검출불가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시한다.

[0286] 본 발명은 (i) 대상체 또는 샘플을 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체와 접촉시키고, (ii) 상기 대상체 또는 샘플에서 검출가능한 표지의 수준을 측정함으로써 상기 대상체 또는 샘플에서 절단제의 존재 또는 부재를 검출하는 방법도 제공하고, 이때 상기 대상체 또는 샘플에서 상기 검출가능한 표지의 검출가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 부재한다는 것을 표시하고, 상기 대상체 또는 샘플에서 상기 검출가능한 표지의 검출불가능한 수준은 절단제가 상기 대상체 또는 샘플에 존재한다는 것을 표시한다.

[0287] 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 영상화제, 조영제, 효소, 형광 표지, 발색단, 염료, 하나 이상의 금속 이온 및 리간드계 표지로 구성된 군으로부터 선택된 검출가능한 표지를 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 영상화제는 방사성동위원소를 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방사성동위원소는 인듐 또는 테크네튬이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 조영제는 요오드, 가돌리늄 또는 산화철을 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 효소는 호스라디쉬 퍼록시다제, 알칼리성 포스파타제 또는  $\beta$ -갈락토시다제를 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 형광 표지는 황색 형광 단백질(YFP), 청록색 형광 단백질(CFP), 녹색 형광 단백질(GFP), 변경된 적색 형광 단백질(mRFP), 적색 형광 단백질 t이량체2(RFP t이량체2), HCRED, 또는 유로퓸 유도체를 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 발광 표지는 N-메틸아크리딴 유도체를 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 표지는 알렉사 플루오르<sup>®</sup> 표지, 예컨대, 알렉사 플루오르<sup>®</sup> 680 또는 알렉사 플루오르<sup>®</sup> 750을 포함한다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 리간드계 표지는 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 또는 하나 이상의 헵틴을 포함한다.

[0288] 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 포유동물, 예컨대, 비-인간 영장류, 애완동물(예를 들면, 고양이, 개, 말), 농장 동물, 노동 동물 또는 동물원 동물이다.

[0289] 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방법은 생체내 방법이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방법은 제자리 방법이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방법은 생체외 방법이다. 이들 방법들의 일부 실시양태에서, 방법은 시험관내 방법이다.

[0290] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 방법은 본 개시내용의 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체를 사용한 치료에 적합한 환자 집단을 확인하거나 다른 방식으로 구별하는 데에 사용된다. 예를 들면, 이들 방법들에서 표적(예를 들면, EGFR), 및 시험되는 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체의 절단가능한 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 단백질분해효소 둘다에 대해 양성 판정을 받은 환자는 이러한 CM을 포함하는 이러한 항-EGFR 항체 및/또는 이러한 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체를 사용한 치료에 적합한 후보자로서 확인된다. 마찬가지로, 이들 방법을 이용하였을 때 표적(예를 들면, EGFR), 및 시험되는 활성화가능한 항체의 CM에서 기질을 절단하는 단백질분해효소 중 어느 하나 또는 둘다에 대한 음성을 나타내는 것으로 시험되는 환자는 또 다른 형태의 치료에 적합한(즉, 시험되는 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체를 사용한 치료에 적합하지 않은) 후보자로서 확인된다. 일부 실시양태에서, 이러한 환자는 치료에 적합한 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체가 확인될 때까지 다른 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체(예를 들면, 질환의 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체)로 시험될 수 있다.

[0291] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 활성화된 상태에서 EGFR에 결합하고, (i) EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(AB)으로서, 설텍시맵이거나 설텍시맵으로부터 유도된 AB; (ii) 비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB와 EGFR의 결합을 억제하는 차폐 모이어티(MM); 및 (iii) AB에 커플링된 절단가능한 모

이어티(CM)로서, 단백질분해효소에 대한 기질로서 작용하는 폴리펩티드인 CM을 포함한다.

- [0292] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 큰, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는다. 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 AB의 평형 해리 상수보다 더 크지 않은, AB와의 결합에 대한 평형 해리 상수를 갖는다. 일부 실시양태에서, MM은 활성화가능한 항체가 결합될 때 EGFR과의 결합에 대해 절단된 상태의 활성화가능한 항체의 AB를 방해하지 않거나 이 AB와 경쟁하지 않는다.
- [0293] 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 조직에서 EGFR과 함께 위치하고, 단백질분해효소는 활성화가능한 항체가 단백질분해효소에 노출될 때 활성화가능한 항체에서 CM을 절단한다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 EGFR을 유의하게 발현하지 않는 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 단백질분해효소는 건강한, 예를 들면, 병들지 않은 조직에서 활성을 나타내지 않거나 유의하게 더 낮은 활성을 나타낸다.
- [0294] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체는 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-CM-AB 또는 AB-CM-MM.
- [0295] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체는 MM과 CM 사이에 연결 펩티드를 포함한다.
- [0296] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체는 CM과 AB 사이에 연결 펩티드를 포함한다.
- [0297] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체는 제1 연결 펩티드(LP1) 및 제2 연결 펩티드(LP2)를 포함하고, 이때 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체는 비절단된 상태에서 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: MM-LP1-CM-LP2-AB 또는 AB-LP2-CM-LP1-MM. 일부 실시양태에서, 상기 2개의 연결 펩티드들은 서로 동일할 필요가 없다.
- [0298] 일부 실시양태에서, AB는 EGFR과의 결합에 대한 약 100 nM 이하의 평형 해리 상수를 갖는다.
- [0299] 일부 실시양태에서, MM은 길이에 있어서 약 2개 내지 40개의 아미노산, 예를 들면, 길이에 있어서 40개 이하의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다.
- [0300] 일부 실시양태에서, MM 폴리펩티드 서열은 EGFR의 폴리펩티드 서열과 상이하고, MM 폴리펩티드 서열은 AB의 임의의 천연 결합 파트너와 50% 이하의 수준으로 동일하다.
- [0301] 일부 실시양태에서, CM은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 20배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체에 위치한다.
- [0302] 일부 실시양태에서, CM은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 100배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체에 위치한다.
- [0303] 일부 실시양태에서, CM은 비절단된 상태에서 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합이 EGFR에 결합하는 비변경된 AB의 평형 해리 상수보다 200배 이상 더 큰 평형 해리 상수로 일어날 정도로 감소되는 반면, 절단된 상태에서 활성화가능한 항체의 AB가 EGFR에 결합하도록 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체에 위치한다.
- [0304] 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의 해리 상수( $K_d$ )가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 20배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 100배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 1000배 이상 더 크도록 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, MM의 커플링은 MM에 커플링되었을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 가 MM에 커플링되지 않았을 때 EGFR에 대한 AB의  $K_d$ 보다 10,000배 이상 더 크도록

EGFR에 결합하는 AB의 능력을 감소시킨다.

- [0305] 일부 실시양태에서, CM은 길이에 있어서 최대 15개의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다.
- [0306] 일부 실시양태에서, 표적 치환 분석, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제WO 2009/025846호 및 제WO 2010/081173호에 기재된 분석을 이용하여 시험관내에서 분석하였을 때, EGFR의 존재 하에서 MM은 CM이 절단되어 있을 때에 비해 CM이 비절단되어 있을 때 EGFR에 결합하는 AB의 능력을 90% 이상 감소시킨다.
- [0307] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편은 단일클론 항체, 도메인 항체, 단일 체, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv, scab, dAb, 단일 도메인 중쇄 항체 및 단일 도메인 경쇄 항체이다. 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 이러한 항체 또는 이의 면역학적 활성 단편은 마우스, 키메라, 인간화된 또는 전체 인간 단일클론 항체이다.
- [0308] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0309] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및 서열번호 68을 포함하는 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0310] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 1, 서열번호 5 및 서열번호 9로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 핵산 서열, 및 서열번호 67의 경쇄 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 1, 서열번호 5 및 서열번호 9로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,





93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0318] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 10의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0319] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 AB는 서열번호 34의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 68의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열 및 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열, 및 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함하는 스페이스 아미노산 서열에 직접적으로 연결된 서열번호 68의 경쇄 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0320] 일부 실시양태에서, CM은 uPA, 레구마인 및 MT-SP1로 구성된 군으로부터 선택된 효소에 대한 기질이다. 일부 실시양태에서, 효소는 uPA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 레구마인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 MT-SP1을 포함한다.

[0321] 일부 실시양태에서, CM은 아미노산 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)를 포함한다.

[0322] 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 25% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, MM은 EGFR에 대한 10% 초과 아미노산 서열 동일성을 포함하지 않는다.

[0323] 일부 실시양태에서, MM은 아미노산 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)를 포함한다.

[0324] 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은  $(GS)_n$ ,  $(GG)_n$ ,  $(GSGG)_n$ (서열번호 15) 및  $(GGG)_n$ (서열번호 16)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 이때  $n$ 은 1 이상의 정수이다. 일부 실시양태에서, LP1 및 LP2 중 하나 이상은 GGSG(서열번호 17), GGSGG(서열번호 18), GSGSG(서열번호 19), GSGGG(서열번호 20), GGGSG(서열번호 21) 및 GSSSG(서열번호 22)로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, LP1은 아미노산 서열 GSSGGSGSGSG(서열번호 23)를 포함한다. 일부 실시양태에서, LP2는 아미노산 서열 GSSGT(서열번호 24) 또는 GSSG(서열번호 37)를 포함한다.

- [0325] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 AB에 접합된 물질도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 치료제이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 항신생물제이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 독소 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 표 1에 나열된 군으로부터 선택된 물질이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 돌라스타틴이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 아우리스타틴 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 아우리스타틴 E 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이다. 일부 실시양테에서, 상기 물질은 메이탄시노이드 또는 메이탄시노이드 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 DM1 또는 DM4이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 듀오카마이신 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 칼리케아미신 또는 이의 유도체이다.
- [0326] 일부 실시양태에서, 상기 물질은 연결체를 통해 AB에 접합된다. 일부 실시양태에서, 연결체는 절단가능한 연결체이다. 일부 실시양태에서, 연결체는 표 2 및 3에 제시된 연결체들로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0327] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체는 신호 펩티드도 포함한다. 일부 실시양태에서, 신호 펩티드는 스페이서를 통해 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 신호 펩티드의 부재 하에서 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체의 MM에 직접적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 적어도 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 MM 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)에 직접적으로 연결된 서열 QGQSGQ(서열번호 38)의 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항체는 MM 서열에 직접적으로 연결된 스페이서를 포함하고, N-말단에서 C-말단으로 스페이서-MM-CM-AB의 구조적 배열로 아미노산 서열 QGQSGQCISPRGCPDGPYVMY(서열번호 59)를 포함한다.
- [0328] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 단일특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 다중특이적, 예를 들면, 비-제한적 예로서 이중특이적 또는 삼작용성 항체이다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전구-이중특이적 T 세포 엔지니어(BITE) 분자의 일부로서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체 및/또는 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전구-키메라 항원 수용체(CAR)-변경된 T 세포 또는 다른 조작된 수용체의 일부로서 제제화된다.
- [0329] 본 발명에 따른 약학 조성물은 본 발명의 항체 및/또는 접합된 항체 및 담체를 포함할 수 있다. 이들 약학 조성물은 키트, 예를 들면, 진단 키트에 포함될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0330] 도 1a는 제1 상태에서 차폐되고 질환-관련 단백질분해효소의 존재 하에서 활성화되는 본 발명의 활성화가능한 항체를 보여주는 도면이다.  
 도 1b는 원하는 위치에서 본 발명의 활성화가능한 항-EGFR 항체를 선택적으로 활성화시킬 적합한 기질을 확인하는 데에 이용되는 기질 선택 과정을 보여주는 도면이다.  
 도 2의 a는 활성화가능한 항체의 개략도이다.  
 도 2의 b 내지 d는 본원에서 "Pb-1204" 또는 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체로서 지칭되는 항-EGFR 활성화가능한 항체의 시험관내 특징규명을 보여주는 일련의 그래프이다. 도 2의 b는 Pb-1204를 절단함에 있어서 2종의 단백질분해효소, 즉 MT-SP1 및 uPA의 효소 효율을 보여주는 그래프이다. 도 2의 c는 단백질분해효소 uPA, MT-SP1 및 레구마인을 사용한 분해 전 및 후 Pb-1204의 모세관 전기영동 분석을 보여주는 그래프이다. 도 2의 d는 H292 세포의 증식에 대한 항-EGFR 항체 세척시뮬, Pb-1204 및 uPA-활성화된 Pb-1204의 효과를 보여주는 그래프이다.  
 도 3a는 근적외선 소광된 프로브 Cy5.5-1204-Q의 화학 구조의 개략도이다.  
 도 3b 내지 3h는 본원에서 Pb-1204로서 지칭되는 활성화가능한 항-EGFR 항체가 어떻게 이중이식 종양에서 축적되는 지를 보여주는 일련의 도면이다. 도 3b는 알렉사 플루오르 750-접합된 Pb-NSUB(적색) 및 본원에서 "IQ-NSUB"로서 지칭되는 소광된 프로브 Cy5-NSUB-Q(청색; 좌측 패널)(이때, NSUB는 단백질분해효소 절단에 민감하지 않은 아미노산 서열을 나타냄), 또는 알렉사 플루오르 750-접합된 Pb-1204(적색) 및 본원에서 "IQ-1204"로서 지칭되는 소광된 프로브 Cy5.5-1204-Q(청색; 우측 패널)(이때, 1204는 적어도 uPA에 의한 절단에 민감한 기질

서열 1204인 LSGRSDNH(서열번호 13)임을 복강내로 주사받은 HT29 이종이식 종양 보유 마우스의 광학 영상화를 보여주는 도면이다. 고강도 증첩 형광 신호는 활성화가능한 항-EGFR 항체 및 프로브 함유 1204 기질을 투여받은 마우스의 종양에서만 검출되었다. 도 3c 및 3d는 알렉사 플루오르 750-접합된 Pb-1204(도 3c) 또는 알렉사 플루오르 750-접합된 Pb-NSUB(도 3d)를 마우스에게 주사한 후 7일째 날에 HT29 이종이식 종양에서 활성화가능한 항-EGFR 항체의 면역형광 검출을 보여주는 도면이다. 도 3e 및 3f는 Pb-NSUB, 3954-1204-C225v4 또는 세특시맵(즉, 비변경된 세특시맵)을 복강내로 주사받은 H292 이종이식 종양 보유 마우스의 광학 영상화의 일련의 사진이다. 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체는 H292 이종이식 마우스 모델에서 종양 부위에 위치한다. 도 3g는 세특시맵, Pb-NSUB 또는 3954-1204-C225v4를 투여받은 H292 이종이식 마우스 모델에서 동물의 3차원적 광학 및 컴퓨터 단층촬영(3D/CT 단층촬영)을 보여주는 일련의 사진이다. 도 3h는 생체내 영상화 연구로부터 대표적인 H292 종양에 대한 인간 IgG 면역조직화학 염색을 보여주는 일련의 사진이다.

도 4의 a 내지 f는 이종이식 모델에서 종양 성장을 억제하는 활성화가능한 항-EGFR 항체(본원에서 Pb-1204로서 지칭됨)의 능력을 보여주는 일련의 사진이다. 도 4a는 세특시맵(25 mg/kg, 청색 선), Pb-1204(25 mg/kg, 적색 선), Pb-NSUB(25 mg/kg, 녹색 선) 또는 비히클(흑색 선)을 사용하여 매주 치료한 H292 이종이식 종양 보유 마우스에서 관찰된 효과를 보여주는 그래프이고, 이때 Pb-NSUB는 EGFR에 결합하는 항체 부분을 갖고 단백질분해효소 절단에 민감하지 않은 NSUB 아미노산 서열도 포함하는 활성화가능한 항-EGFR 항체 구축물을 나타낸다. 데이터는 평균 종양 부피 ± SEM으로서 제시되어 있다. 퍼센트 종양 성장 억제(TGI)는 20일째 날에 평가되었다. 도 4의 b 및 c는 25 mg/kg의 세특시맵, Pb-NSUB 또는 Pb-1204를 주사받은 H292 이종이식 종양 보유 마우스로부터 채취된 혈장 샘플(투약 후 1시간, 8시간, 24시간, 72시간)(도 4의 b) 및 종양 샘플(투약 후 72시간)(도 4의 c)에서 IgG 농도의 수준 및 EGFR 결합 IgG의 수준을 보여주는 그래프이다. IgG 농도(청색) 및 EGFR 결합(적색)은 ELISA에 의해 측정되었다. 도 4의 d는 세특시맵((25 mg/kg, 청색 선), Pb-1204(25 mg/kg, 적색 선) 또는 비히클(흑색 선)을 복강내로 1회 주사받은 LXFA677 종양 보유 마우스에서 관찰된 종양 부피를 보여주는 그래프이다. 데이터는 평균 종양 부피 ± SEM으로서 제시되어 있다. 퍼센트 종양 성장 억제(TGI)는 25일째 날에 평가되었다. 도 4의 e 및 f는 비히클, 25 mg/kg의 세특시맵 또는 25 mg/kg의 Pb-1204를 주사받은 LXFA677 이종이식 종양 보유 마우스로부터 채취된 혈장 샘플(투약 후 1일, 7일, 14일, 21일, 28일)(도 4의 e) 및 종양 샘플(투약 후 72시간)(도 4의 f)에서 IgG 농도의 수준 및 EGFR 결합 IgG의 수준을 보여주는 그래프이다. IgG 농도(청색) 및 EGFR 결합(적색)은 ELISA에 의해 측정되었다.

도 5의 a 내지 c는 활성화가능한 항-EGFR 항체의 추가 시험관내 특징규명을 보여주는 일련의 그래프이다. 도 5의 a는 MT-SP1 및 uPA에 의한 Pb-1204 절단의 단백질용해 전환의 수준을 보여주는 그래프이다. 도 5의 b는 레구마인, MT-SP1 및 uPA를 사용한 분해 전 및 후 Pb-1204의 SDS-PAGE 분석의 사진이다. 도 5의 c는 세특시맵, 모Ab, Pb-1204 또는 uPA-활성화된 Pb-1204와 고정된 EGFR-ECD의 결합을 보여주는 그래프이다.

도 6의 a 및 b는 Pb-1204가 어떻게 정상 간에서 활성화되지 않는 지를 보여주는 도면이다. 도 6의 a 및 b는 알렉사 플루오르 750-접합된 Pb-1204(도 6의 a) 또는 알렉사 플루오르 750-접합된 Pb-NSUB(도 6의 b)를 마우스에게 주사한 후 7일째 날에 간에서 활성화가능한 항-EGFR 항체의 면역형광 검출을 보여준다.

도 7의 a 및 b는 종양 보유 마우스에서 세특시맵 및 Pb-1204의 종양 활성화 및 PK를 보여주는 도면 및 그래프이다. 도 7의 a에서, 세특시맵, Pb-NSUB 및 Pb-1204(25 mg/kg)로 치료받은 H292 이종이식 종양의 용해물을 치료 후 72시간에서 발생시켰고 인간 IgG 경쇄를 면역블롯팅으로 분석하였다. 도 7의 b에서, 0일째 날에 25 mg/kg의 세특시맵 또는 Pb-1204를 주사받은 LXFA677 이종이식 종양 보유 마우스로부터 투약 후 1일째 날, 7일째 날, 14일째 날, 21일째 날 및 28일째 날에 혈장을 채취하였고, 고정된 EGFR-ECD와의 결합(세특시맵, 청색; Pb-1204, 적색)을 측정하였다.

도 8의 A 및 B는 단백질분해효소가 관련되는 여러 독립적인 과정으로부터 비롯된 종양의 진행, 침습 및 전이를 보여주는 일련의 도면이다. 이들 도면들은 문헌(Affara NI, et al. "Delineating protease functions during cancer development." *Methods Mol Biol.* 539 (2009): 1-32)으로부터 채택된다.

도 9a 및 9b는 IQ 프로브에서 1204 기질 서열 LSGRSDNH(서열번호 13)에 대한 단백질분해효소 uPA(인간 및 마우스), MT-SP1(인간 및 마우스), 레구마인(인간), 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA, 인간) 및 트롬빈(인간)의 절단을 및 기질 선택성을 보여주는 표 및 그래프이다. 도 9c 및 9d는 재조합 인간 uPA(도 9c) 및 재조합 인간 MT-SP1(도 9d)에 의한 1204 기질 서열의 절단을 보여주는 일련의 그래프이다. 1204 기질 서열은 각각의 연구에서 500 nM의 최종 농도로 존재하였다.

도 10a는 단백질분해효소의 부재 하에서 EGFR에 결합하는 비변경된 세특시맵 항체("모"), Pb-NSUB 구축물

("NSUB") 및 비절단된 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체의 상대적인 능력을 보여주는 그래프이다. 도 10b는 2종의 단백질분해효소, 즉 인간 uPA 및 인간 MT-SP1의 존재 하에서 EGFR에 결합하는 비변경된 세톡시맵 항체("모"), Pb-NSUB 구조물("NSUB") 및 활성화된, 즉 절단된 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체의 상대적인 능력을 보여주는 그래프이다. 도 10b는 적절한 단백질분해효소에 의해 일단 활성화되면 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체가 모 항체에 필적할만한 수준으로 EGFR에 결합한다는 것을 입증한다.

도 11a 및 11b는 마우스에서 투약 후 4주 이상 후 활성화가능한 항-EGFR 항체 3954-1204-C225v4가 순환계에서 안정하고 혈장에서 낮은 활성화를 나타낸다는 것(이것은 우수한 독성 프로파일을 암시함)을 보여주는 일련의 그래프이다. 도 11a 및 11b에서 사용된 바와 같이, "모 Ab"는 비변경된 세톡시맵 항체를 지칭하고, Pb-NSUB 구조물은 단백질분해효소 절단에 민감하지 않은 NSUB 서열을 포함하는 활성화가능한 항-EGFR 항체를 나타내고, "PB-NSELECT"는 비-선택적 기질, 즉 순환계에서 효소에 의해 인식되는 아미노산 서열을 포함하는 활성화가능한 항-EGFR 항체이다.

도 12는 세톡시맵, Pb-NSUBv5(즉, 3954-NSUB-C225v5) 또는 3954-1204-C225v5를 투여한 후 피부 발진을 나타내는 비-인간 영장류의 수를 보여주는 그래프이다.

도 13의 A 내지 D는 초기 40 mg/kg 적재 용량 후 25 mg/kg 매주 투약을 제공받은 사이노몰구스 원숭이의 혈액에서 검출된 세톡시맵의 수준과 3954-1204-C225v5의 수준을 비교하는 일련의 그래프이다.

도 14의 A 내지 C는 MT-SP1의 활성 부위를 특이적으로 인식하는 항체(항체 A11)를 사용한 H292 이종이식 종양의 형광 영상화를 보여주는 일련의 사진이다.

도 15는 활성화가능한 항체의 제자리 영상화의 개략도이다: 1. 조직 박편을 슬라이드 상에 놓는다. 2. 표지된 활성화가능한 항체를 함유하는 용액으로 상기 슬라이드를 덮고 항온처리한다. 3. 광범위한 세척 후, 활성화된 항체의 결합을 가시화한다.

도 16은 제자리 영상화를 이용하였을 때 활성화되고 동결된 인간 암 조직에 결합하는 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 능력을 보여주는 일련의 사진이다. 도 16의 패널 A에서 적색 형광 조직 영상은 항-EGFR 활성화가능한 항체의 조직 유래 단백질용해성 절단에 의해 활성화된 C225v5 항체의 결합을 입증한다. 도 16의 패널 B에 나타난 바와 같이 상업적으로 입수가 가능한 항-EGFR 항체를 조직에 노출시킴으로써 조직 염색의 동일한 패턴을 검출하였다. 도 16의 패널 C는 패널 A에 나타난 형광 신호가 넓은 스펙트럼 억제제 각테일 세트 III 및 50 mM EDTA의 1:100 희석물을 사용한 조직의 전처리에 의해 억제되었다는 것을 입증한다. 청색 염색은 DAPI 핵 염색을 나타낸다.

도 17은 3954-1204-C225v5가 광범위한 인간 종양 샘플들에서 활성화가능하다는 것을 보여주는 일련의 표이다. 제2열은 다양한 인간 암 조직 샘플들에서 상업적으로 입수가 가능한 항-EGFR 항체에 의해 검출된 EGFR 수용체의 발현 수준을 표시한다. 제3열은 다양한 인간 암 조직 샘플에서 항체 A11에 의해 검출된 활성 매트립타제(matriptase)(MT-SP1)의 양을 표시한다. 제4열 및 제5열은 세톡시맵(Cetux) 조직 염색(제4열)에 비해 EGFR 활성화가능한 항체(제5열)의 제자리 활성화 및 결합의 평가를 나타낸다. 조직 샘플에 결합하는 EGFR 및 A11 항체의 양을 측정하는 IHC 염색은 0부터 3+까지 점수화되었다: 0, 염색 부재; 1+(즉, "+"), 약한 염색; 2+(즉, "++"), 중간 염색; 및 3+(즉, "+++"), 강한 염색. 제자리 영상화 염색 점수화는 세톡시맵 항체 염색과의 비교에 기초하고, 다음과 같이 정의된다: 0, 염색 부재; 1+(즉, "+"), 모 항체에 비해 약한 염색; 2+(즉, "++"), 모 항체에 비해 중간 염색; 및 3+(즉, "+++"), 모 항체와 유사한 염색.

도 18은 종양 성장을 억제하는 항-EGFR 활성화가능한 항체-물질 접합체 3954-1204-C225v5-MMAE의 능력을 보여주는 그래프이다.

도 19는 세톡시맵의 반감기와 비교된 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 반감기를 보여주는 그래프이다.

도 20a 및 20b는 MMAE의 라이신 접합이 차폐력 및 활성화력을 유지하면서 3954-1204-C225v5 효능을 증가시킨다는 것을 보여주는 일련의 그래프이다. MMAE와 3954-1204-C225v5의 접합은 그와 EGFR의 결합을 변경시키지 않는다. MMAE와 3954-1204-C225v5의 접합은 그의 세포 사멸 활성을 증가시킨다.

도 21은 인간 대장암 간 전이 종양 샘플에서 EGFR과 A11이 함께 위치한다는 것을 보여주는 도면이다.

도 22는 항-EGFR 활성화가능한 항체를 활성화시키고 이 항체에 결합하는 인간 대장암 간 전이 조직의 능력을 보

여주는 도면이다.

도 23은 제자리 영상화, EGFR IHC 및 A11 IHC의 삼중 염색을 보여주는 일련의 사진이다. 상부 줄에 있는 영상은 (좌측에서 우측으로) 제자리 영상화 조건 하에서의 EGFR 발현, 매트립타제(MT-SP1)의 활성화 및 세특시맵의 결합을 입증하는, 단일 조직 슬라이스에 대해 수행된 염색을 보여준다. 하부 줄에 있는 영상은 (좌측에서 우측으로) EGFR 발현, 매트립타제(MT-SP1)의 활성화 및 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 제자리 영상화를 입증하는, 단일 조직 슬라이스에 대해 수행된 염색을 보여준다. 도 23에서 우측 열의 영상은 제자리 영상화 조건 하에서 세특시맵의 결합(상부 영상)과 조직 유래 단백질용해성 절단에 의해 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 결합(하부 영상)을 비교한다. 도 23에서 좌측 열의 영상들에 나타난 바와 같이, 상업적으로 입수가 가능한 항-EGFR 항체를 조직에 노출시킴으로써 조직 염색의 동일한 패턴을 검출하였다. 도 23에서 중간 열의 영상들은 매트립타제(MT-SP1) 활성화와 EGFR 발현이 함께 위치한다는 것을 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0331] 본 발명은 EGF 수용체, 인간 EGF 수용체-1(HER1), erbB, erbB1 및 종 항원 7(SA-7)로서도 공지된 인간 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하는 활성화가능한 단일클론 항체(mAb)를 제공한다. 본원에서 항-EGFR 활성화가능한 항체 또는 EGFR 활성화가능한 항체로서도 지칭되는 상기 활성화가능한 항-EGFR 항체는 비정상적인 EGFR 발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애를 치료하고/하거나, 이러한 질환 또는 장애를 예방하고/하거나, 이러한 질환 또는 장애의 진행을 지연시키고/시키거나, 이러한 질환 또는 장애를 호전시키고/시키거나, 또는 이러한 질환 또는 장애의 증상을 완화하는 방법에서 사용된다. 예를 들면, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 암 또는 다른 신생물 병태를 치료하고/하거나, 이러한 병태를 예방하고/하거나, 이러한 병태의 진행을 지연시키고/시키거나, 이러한 병태를 호전시키고/시키거나, 또는 이러한 병태의 증상을 완화하는 방법에서 사용된다.
- [0332] 활성화가능한 항-EGFR 항체는 차례 모이어티(MM)의 커플링이 EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 능력을 감소시키도록 MM에 커플링된, 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, MM은 단백질분해효소, 예를 들면, 대상체 내의 치료 부위에서 EGFR과 함께 위치하는 단백질분해효소에 대한 기질을 포함하는 서열을 통해 커플링된다. 다수의 연구들이 고형 종양에서 비정상적인 단백질분해효소 수준, 예를 들면, uPA, 레구마인, MT-SP1 및 매트릭스 메탈로단백질분해효소(MMP)의 상관관계를 입증하였다(예를 들면, 문헌(Murthy RV, et al. "Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer." Clin Cancer Res. 11 (2005): 2293-2299); 문헌(Nielsen BS, et al. "Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer." Lab Invest 81 (2001): 1485-1501); 및 문헌(Mook OR, et al. "In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin." J Histochem Cytochem. 51 (2003): 821-829) 참조).
- [0333] 본원에서 제공된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 치료 및/또는 진단 부위에서 종양 세포의 단백질분해효소 활성을 표적화된 항체 활성화에 이용하는 데에 유용한 단백질분해효소에 대한 기질을 포함한다. 이 과정의 일반적인 개요는 도 1a에 나타나 있고, 단백질분해효소, 예컨대, uPA, MT-SP1, 레구마인 등에 적합한 기질이 선택되는 과정의 일반적인 개요는 도 1b에 나타나 있다. 기질 선택 과정은 다수의 바람직한 특성을 갖는 기질을 확인하는 데에 이용된다. 예를 들면, 선택된 기질은 전신적으로 안정하고(즉, 대상체의 전신 순환계에서 안정하고), 순환하는 단백질분해효소, 예컨대, 플라스민, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA) 또는 칼리크레인(kallikrein)(KLK), 예컨대, KLK-5 및/또는 KLK-7에 의한 절단에 일반적으로 민감하지 않고, 독성을 나타내지 않고, 단백질분해효소, 예컨대, ADAM 9, ADAM 10, ADAM 17 및/또는 칼리크레인, 예컨대, KLK-5 및 KLK-7에 의한 잠재적 독성 부위, 예컨대, 피부에서의 절단에 일반적으로 민감하지 않고, 의도된 치료 및/또는 진단 부위에서 활성을 나타낸다. 바람직하게는, 확인된 기질은 의도된 치료 및/또는 진단 부위에서 과다발현되지만, 전형적으로 정상, 건강한 또는 병들지 않거나 손상되지 않은 조직에서 발현되지 않는 단백질분해효소에 대해 선택된 후, 선택된 기질은 정상, 예를 들면, 병들지 않은 조직에서 발현된 단백질분해효소에 대해 반대-스크리닝된다.
- [0334] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항-EGFR 항체 세특시맵으로부터 유도된다. 에르비투스(Erbitux) 또는 C225로서도 공지된 세특시맵은 EGFR에 특이적으로 결합하는 키메라(마우스/인간) 단일클론 항체이다. 세특시맵은 전이성 대장암 및 두경부암의 치료에 현재 사용되고 있다.
- [0335] 바람직하게는, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 서열번호 26의 아미노산 서열, 서열번호 30의 아미노산 서열 또는 서열번호 34의 아미노산 서열이거나 이러한 아미노산 서열로부터 유도된 중쇄를 포함한다.

- [0336] 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 서열은 글리코실화의 잠재적 부위를 제거하기 위해 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 예를 들면, EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 글리코실화의 잠재적 부위를 제거하기 위해 중쇄 및/또는 경쇄 내에 아미노산 치환을 함유한다. 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 30의 아미노산 서열을 갖는 중쇄의 위치 88에 있는 아스파라긴에 상응하는 아스파라긴(N)이 글루타민(Q) 잔기로 치환됨으로써 발생된 서열번호 26의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 갖는다.
- [0337] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체에서 EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 특히 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Fc 영역에서 추가 변경을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Fc 영역은 글리코실화의 잠재적 부위를 제거하고/하거나 Fc 영역과 그의 수용체의 결합을 파괴하기 위해 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 30의 아미노산 서열을 갖는 중쇄의 위치 299에 있는 아스파라긴에 상응하는 아스파라긴(N)이 알라닌(A) 잔기로 치환되어 있는 중쇄를 갖는다. 이 돌연변이는 Fc 영역에서 글리코실화 부위를 제거하고, Fc에 의한 Fc 수용체 결합을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, EGFR에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 30의 아미노산 서열을 갖는 중쇄의 위치 88에 있는 아스파라긴에 상응하는 아스파라긴(N)이 글루타민(Q) 잔기로 치환되어 있고 서열번호 30의 아미노산 서열을 갖는 중쇄의 위치 299에 있는 아스파라긴에 상응하는 아스파라긴(N)이 알라닌(A) 잔기로 치환됨으로써 발생된 서열번호 34의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 갖는다.
- [0338] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 신호 펩티드를 포함한다. 신호 펩티드는 스페이스에 의해 활성화가능한 항-EGFR 항체에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이스는 신호 펩티드의 부재 하에서 활성화가능한 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 스페이스는 활성화가능한 항체의 MM에 직접적으로 연결된다. 일부 실시양태에서, 스페이스는 아미노산 서열 QGQSGQ(서열번호 38)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 스페이스-MM-CM-AB의 구조적 배열로 MM 서열 CISPRGCPDGPYVMY(서열번호 14)에 직접적으로 연결된 서열 QGQSGQ(서열번호 38)의 스페이스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 MM 서열에 직접적으로 연결된 스페이스를 포함하고, N-말단에서 C-말단으로 스페이스-MM-CM-AB의 구조적 배열로 아미노산 서열 QGQSGQCISPRGCPDGPYVMY(서열번호 59)를 포함한다.
- [0339] 본원에서 제공된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 차폐 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차폐 모이어티는 항-EGFR 항체에 커플링되거나 다른 방식으로 부착되고, 차폐 모이어티가 EGFR에 특이적으로 결합하는 항-EGFR 항체의 능력을 감소시키도록 활성화가능한 항-EGFR 항체 구축물 내에 위치하는 아미노산 서열이다. 적합한 차폐 모이어티는 다양한 공지된 기법들 중 임의의 기법을 이용함으로써 확인된다. 예를 들면, 펩티드 차폐 모이어티는 미국 특허출원 공보 제2009/0062142호(Daugherty et al.)(이의 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 방법을 이용함으로써 확인된다.
- [0340] 본원에서 제공된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 절단가능한 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 모이어티는 단백질분해효소, 통상적으로 세포의 단백질분해효소에 대한 기질인 아미노산 서열을 포함한다. 적합한 기질은 다양한 공지된 기법들 중 임의의 기법을 이용함으로써 확인된다. 예를 들면, 펩티드 기질은 미국 특허 제7,666,817호(Daugherty et al.)(이의 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 방법을 이용함으로써 확인된다(문헌(Boulware et al. "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics." *Biotechnol Bioeng.* 106.3 (2010): 339-46) 또한 참조).
- [0341] 본원에 기재된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 항체 치료제, 특히 생체내에서 적어도 어느 정도 독성을 나타내는 것으로 공지되어 있는 항체 치료제의 한계를 극복한다. 표적-매개된 독성은 치료 항체의 개발에 대한 주요 한계를 구성한다. 이것은 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하고 대장암 및 두경부암의 치료용으로 승인되어 있는 항체인 세특시맙으로 치료받은 환자의 88%에게 고통을 주는 피부 발진에 의해 가장 잘 예시된다. 본원에서 제공된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전통적인 치료 항체에 의한 정상 조직 내의 표적의 억제와 관련된 독성을 해결하도록 디자인된다. 이들 활성화가능한 항-EGFR 항체는 질환의 부위에서 단백질분해에 의해 활성화될 때까지 차폐된 상태로 유지된다. 모 치료 항체로서 세특시맙으로부터 출발하여 단백질분해효소 기질을 포함하는 연결체를 통해 항체를 억제 차폐제에 커플링시킴으로써 본 발명의 활성화가능한 항-EGFR 항체를 조작하였다. 시험관내 연구에서 수행된 연구에서, 상기 활성화가능한 항-EGFR 항체의 EGFR과의 결합 및 세포-기초 활성은 세특시맙에 비해 감소되었다. 생체내 연구에서 수행된 연구에서, 상기 활성화가능한 항-EGFR 항체는 정상 조직에서 차폐된 상태로 유지되었지만, 중앙 환경에서 활성화되고 축적되었다. 상기 활성화가능한 항-EGFR 항체

의 종양 활성화는 세특시말의 효능과 동등한 생체내 효능으로 해석되었다.

[0342] 본원에서 제공된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 유의한 임상적 요구를 충족시킨다. EGFR은 종양 세포의 증식, 혈관신생 및 침습/전이를 촉진할뿐만 아니라 종양 세포의 아폽토시스도 억제하는 것으로 밝혀진 임상적으로 검증된 표적이다. EGFR을 표적화하는 항체 및 소분자 티로신 키나제 억제제는 암 치료용으로 승인되어 있다 (Nature Rev Cancer 5 (2005) 341; Curr Opin Cell Biol 21, (2009) 177). 그러나, EGFR 억제제(EGFRi)로서도 지칭되는 현재 항-EGFR 치료는 예를 들면, 특히 인간 대상체의 안면 및 상부 몸통에서의 구진농포성 발진; 건조하고 가려운 피부; 손발톱 주변의 염증; 두피 상의 모발 손실; 및 속눈썹 및 안면 털의 증가된 성장을 포함하는, 치료 후 다수의 부작용을 나타내는 것으로 밝혀져 있다. EGFRi를 사용한 치료로부터 비롯된 피부 독성은 환자의 45% 내지 100%에게 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다(예를 들면, 문헌(Segaert and Van Cutsem. Ann Oncol. 16(9) (2005):1425-33) 참조).

[0343] 본 발명의 예시적인 활성화가능한 항-EGFR 항체는 예를 들면, 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는, 본원에서 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항체로서 지칭되는 활성화가능한 항체를 포함한다. 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항-EGFR 항체의 2개 서열이 아래에 제시되어 있는데, 이때 서열 1은 신호 펩티드를 포함하는 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항-EGFR 항체의 버전의 서열이고, 서열 2는 신호 펩티드를 갖지 않는 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항-EGFR 항체의 서열이다.

[0344] 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항체 중쇄 뉴클레오티드 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 60)][C225v5(서열번호 25)]  
 [atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcaactaagtcttgcacttgtcacaattcg  
 ] [caggtgcagctgaaacagagcggcccgccctgggtgcagccgagccagagcctgagcat  
 tacctgcaccgtgagcggctttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcccagagc  
 ccggggcaaaaggcctggaatggctggcgtgatttggagcggcggcaaacaccgattataaca  
 ccccgtttaccagccgctgagcattaacaaagataaacagcaaaagccaggtgttttttaa  
 aatgaacagcctgcaaaagccaggataaccgcgatttattattgcgcgcgcgcgctgacctat  
 tatgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctgggtgaccgtgagcggcggttagca  
 ccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagc  
 ggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactca  
 ggcgcccctgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtcctacagtcctcaggactctact  
 ccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaa  
 cgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgac  
 aaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcc  
 tcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctg  
 ggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg  
 gaggtgcataatgccaaagacaaagcccgcgggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtgg  
 tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtacaagtgcaaggt  
 ctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc  
 cgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgaactgaccaagaaccaggtca  
 gcctgacctgcctgggtcaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaa  
 tgggcagccggagacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttc  
 ttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcat  
 gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc  
 gggtaaatga] (서열번호 1)

이탤릭체: 신호 펩티드

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0345]

[0346] 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항체 중쇄 아미노산 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 61)][C225v5(서열번호 26)]

[MYRMQLLS	ALSLALVTNS]	[QVQLKQSGPG	LVQPSQSLSI	TCTVSGFSLT
NYGVHWVRQS	PGKGLEWLGV	IWSGGNTDYN	TPFTSRLSIN	KDNSKSQVFF
KMNSLQSQDT	AIYYCARALT	YYDYEFAYWG	QGTLVTVSAA	STKGPSVFPL
APSSKSTSGG	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG
LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKVEPK	SCDKTHTCPP
CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY
VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	TYRIVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL
PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA
VEWESNGQPE	NNYKTTPPVL	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM
HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK*]	(서열번호 2)		

이탤릭체: 신호 펩티드

[0347] 일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0348] 3954-1204-C225v5 완성화가능한 항체 경쇄 뉴클레오티드 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 60)][스페이서(서열번호 62)][차폐제(서열번호 63)][연결제 1(서열번호 64)][1204 기질(서열번호 65)][연결제 2(서열번호 66)][C225(서열번호 67)]

[atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcactaagtcttgcacttgtcacgaattcg]  
 [caaggccagtctggccag] [tgcattcacctcgtggttgtccggacggcccatacgtcatgtac] [ggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggtggatccggt] [**ctgagcggccggtccgataatcat**] [**ggcagtagcgggtacc**] [cagatcttgcctgacccagagcccgggtgattctgagcgtgagcccggggaacgtgtgagcttttagctgccgcgcgagccagagcattggcaccaacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgctgattaaatatgcgagcgaagcatttagcggcattccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattattattgccagcagaacaa caactggccgaccacctttggcgcggggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgca ccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgc cctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctac agcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct gcgaagtcaacctcagggcctgagctcgcccgtcaciaaagagcttcaacaggggagagtg ttag](서열번호 3)

*이탤릭체*: 신호 펩티드

**굵은 글자체**: 스페이서

밑줄표시: 차폐제

이탤릭체 및 밑줄표시: 연결제 1

**굵은 글자체 및 밑줄표시**: 1204 기질

**굵은 글자체, 이탤릭체 및 밑줄표시**: 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0349]

[0350] 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항체 경쇄 아미노산 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 61)][스페이서(서열번호 38)][차폐제(서열번호 14)][연결제 1(서열번호 23)][1204 기질(서열번호 13)][연결제 2(서열번호 24)][C225(서열번호 68)]

[MYRMQLLSCI ALSLALVTNS] [**QGQSGQ**] [CISPRGCPDGPVVMY] [GSSGGSGGS  
GGSG] [**LSGRSDNH**] [**GSSGT**] [QIL LTQSPVILSV SPGERVSFSC RASQSIGTNI  
HWYQORTNGS PRLLIKYASE SISGIPSRFS GSGSGTDFTL SINSVESEDI  
ADYYCQQNNN WPTTFGAGTK LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV  
CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK  
ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C\*](서열번호 4)

이탈릭체: 신호 펩티드

굵은 글자체: 스페이서

밑줄표시: 차폐제

이탈릭체 및 밑줄표시: 연결제 1

굵은 글자체 및 밑줄표시: 1204 기질

굵은 글자체, 이탈릭체 및 밑줄표시: 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0351]

[0352] 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항체 중쇄 뉴클레오티드 서열 2:

[C225v5(서열번호 25)]

[caggtgcagctgaaacagagcggccccggcctggtgcagccgagccagagcctgagcatt  
 acctgcaccgtgagcggctttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcccagagcc  
 cgggcaaaggcctggaatggctggcgctgatttggagcggcgcaacaccgattataaac  
 cccgtttaccagccgcctgagcattaacaaagataacagcaaaagccaggtgttttttaa  
 atgaacagcctgcaaagccaggataaccgcgatttattattgcgcgcgcgcgctgacctatt  
 atgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcgggctagcac  
 caagggcccatcggctcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctgggggacagcg  
 gccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctgctggaactcag  
 gcgacctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctacagtcctcaggactctactc  
 cctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccacagcctacatctgcaac  
 gtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattctgtgaca  
 aaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttctct  
 ctccccccaaaaccaaggacacctcatgatctccccggaccctgaggtcacatgctgtg  
 gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgg  
 aggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggt  
 cagcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctc  
 tccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagcccc  
 gagaaccacaggtgtacacctgccccatccccgggatgaactgaccaagaaccaggtcag  
 cctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaat  
 gggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttct  
 tcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg  
 ctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccg  
 ggtaaatga](서열번호 25)

[0353]

[0354] 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항체 중쇄 아미노산 서열 2:

[C225v5(서열번호 26)]

[QVQLKQSGPG	LVQPSQSLSI	TCTVSGFSLT	NYGVHWVRQS	PGKGLEWLGV
IWSGGNTDYN	TPFTSRLSIN	KDNSKSQVFF	KMNSLQSQDT	AIYYCARALT
YYDYEFAYWG	QGTLVTVSAA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG	TAAALGCLVKD
YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSN	TKVDKKVEPK	SCDKTHTCPP	CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK
DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV
YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTPPVL
DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK*]

(서열번호 26)

[0355]

[0356] 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항체 경쇄 뉴클레오티드 서열 2:

[스페이서(서열번호 62)][차폐제(서열번호 63)][연결제 1(서열번호 64)][1204 기질(서열번호 65)][연결제 2(서열번호 66)][C225(서열번호 67)]  
 [caagggcagctctggccag] [tgcatctcacctcgtgggtgtccggacggcccatacgtca  
 tgtacggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggtggatccgg] [ctgagcggccgttcc  
 gataatcat] [ggcagtagcgggtacc] [cagatcttgctgacccagagcccgggtgattctg  
 agcgtgagcccggggaacgtgtgagcttttagctgccgcgcgagccagagcattggcacca  
 acattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgctgattaatatgcgag  
 cgaaagcatttagcggcattccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattttacc  
 ctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggtattattattgccagcagaacaaca  
 actggccgaccacctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggtgcacc  
 atctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtg  
 tgctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgccc  
 tccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacag  
 cctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgc  
 gaagtcaaccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtggt  
 ag](서열번호 27)

짧은 글자체: 스페이서

밀줄표시: 차폐제

이탤릭체 및 밀줄표시: 연결제 1

짧은 글자체 및 밀줄표시: 1204 기질

짧은 글자체, 이탤릭체 및 밀줄표시: 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0357]

[0358] 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항체 경쇄 아미노산 서열 2:

[스페이서(서열번호 38)][차폐제(서열번호 14)][연결제 1(서열번호 23)][1204 기질(서열번호 13)][연결제 2(서열번호 24)][C225(서열번호 68)]  
 [QGQSGQ] [CISPRGCPDGPYVMY] [GSSGGSGGSGGSG] [LSGRSDNH] [GSSGT] [QIL  
 LTQSPVILSV SPGERVSFSC RASQSIGTNI HWYQQRRTNGS PRLLIKAYASE  
 SISGIPSRFS GSGSGTDFTL SINSVESEDI ADYQCQNNN WPTTFGAGTK  
 LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA  
 LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS  
 PVTKSFNRGE C\*](서열번호 28)

짧은 글자체: 스페이서

밀줄표시: 차폐제

이탤릭체 및 밀줄표시: 연결제 1

짧은 글자체 및 밀줄표시: 1204 기질

짧은 글자체, 이탤릭체 및 밀줄표시: 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0359]

[0360] 본 발명의 또 다른 예시적인 활성화가능한 항-EGFR 항체는 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는, 본원에서

3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체로서도 지칭되는 활성화가능한 항체이다. 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항-EGFR 항체의 2개 서열이 아래에 제시되어 있는데, 이때 서열 1은 신호 펩티드를 포함하는 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항-EGFR 항체의 버전의 서열이고, 서열 2는 신호 펩티드를 갖지 않는 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항-EGFR 항체의 서열이다.

[0361] 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체 중쇄 뉴클레오티드 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 60)][C225v4(서열번호 29)]

[atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcaactaagtcttgcacttgtcacgaattcg  
 ] [caggtgcagctgaaacagagcggccccggcctggtgcagccgagccagagcctgagcat  
 tacctgcaccgtgagcggctttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgccagagc  
 ccgggcaaaggcctggaatggctggcgctgatttggagcggcggcaacaccgattataaca  
 ccccgctttaccagcgcctgagcattaacaaagataacagcaaaagccaggtgttttttaa  
 aatgaacagcctgcaaagcaacgataccgcgatttattattgcgcgcgcgctgacctat  
 tatgattatgaatttgcgtatttggggccagggcaccctgggtgaccgtgagcgcggctagca  
 ccaagggcccatcggctcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagc  
 ggcctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggaactca  
 ggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtcctacagtcctcaggactctact  
 ccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaa  
 cgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtgac  
 aaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctctcc  
 tcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgt  
 ggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg  
 gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgg  
 tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggt  
 ctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc  
 cgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccgggatgaactgaccaagaaccaggtca  
 gcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa  
 tgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttc  
 ttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcat  
 gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc  
 gggtaaatga](서열번호 5)

*이탤릭체*: 신호 펩티드

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0362]

[0363] 3954-1204-C225v4 완성화가능한 항체 중쇄 아미노산 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 61)][C225v4(서열번호 30)]

[MYRMQLLSCI	ALSLALVTNS]	[QVQLKQSGPG	LVQPSQSLSI	TCTVSGFSLT
NYGVHWVRQS	PGKGLEWLGV	IWSGGNTDYN	TPFTSRLSIN	KDNSKSQVFF
KMNSLQSN	AIYYCARALT	YYDYEFAYWG	QGTLVTVSAA	STKGPSVFPL
APSSKSTSGG	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG
LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKVEPK	SCDKTHTCPP
CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY
VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL
PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA
VEWESNGQPE	NNYKTTPPVL	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM
HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK*]	(서열번호 6)		

이탤릭체: 신호 펩티드

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0364]

[0365] 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체 경쇄 뉴클레오티드 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 60)][스페이서(서열번호 62)][차폐제(서열번호 63)][연결제 1(서열번호 64)][1204 기질(서열번호 65)][연결제 2(서열번호 66)][C225(서열번호 67)]

[atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcactaagtcttgcacttgtcacgaattcg]  
 [caaggccagtctggccag] [tgcattctcacctcgtggttgtccggacggcccatacgtca  
 tgtac] [ggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggtggatccgggt] [ctgagcggccggtt  
ccgataatcat] [ggcagtagcgggtacc] [cagatcttgctgacctagagcccgggtgattc  
 tgagcgtgagcccggggaacgtgtgagcttttagctgccgcgcgagccagagcattggcac  
 caacattcattggatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgtgattaaatagcg  
 agcgaaagcatttagcggcattccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgatttta  
 ccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggtattattatgccagcagaacia  
 caactggccgaccacctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgca  
 ccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
 tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagtgataacgc  
 cctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctac  
 agcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct  
 gcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcaciaaagagcttcaacaggggagagtg  
 ttag](서열번호 3)

*이탤릭체*: 신호 펩티드

**굵은 글자체**: 스페이서

밑줄표시: 차폐제

이탤릭체 및 밑줄표시: 연결제 1

**굵은 글자체 및 밑줄표시**: 1204 기질

**굵은 글자체, 이탤릭체 및 밑줄표시**: 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0366]

[0367] 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체 경쇄 아미노산 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 61)][스페이서(서열번호 38)][차폐제(서열번호 14)][연결제 1(서열번호 23)][1204 기질(서열번호 13)][연결제 2(서열번호 24)][C225(서열번호 68)]

[MYRMQLLSCI ALSLALVTNS] [**QGQSGQ**] [CISPRGCPDGPVVMY] [**GSSGGSGGS**  
**GGSG**] [**LSGRSD NH**] [**GSSGT**] [QIL LTQSPVILSV SPGERVSFSC RASQSIGTNI  
 HWYQQRNGS PRLLIKYASE SISGIPSRFS GSGSGTDFTL SINSVESEDI  
 ADYYCQQNNN WPTTFGAGTK LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV  
 CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK  
 ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C\*](서열번호 4)

*이탤릭체*: 신호 펩티드

**굵은 글자체**: 스페이서

밑줄표시: 차폐제

이탤릭체 및 밑줄표시: 연결제 1

**굵은 글자체 및 밑줄표시**: 1204 기질

**굵은 글자체, 이탤릭체 및 밑줄표시**: 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0368]

[0369] 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체 중쇄 뉴클레오티드 서열 2:

[C225v4(서열번호 29)]

[caggtgcagctgaaacagagcggcccgctggtgcagccagagcctgagcatt  
 acctgcaccgtgagcggccttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgcccagagcc  
 cgggcaaaggcctggaatggctgggctgatttggagcggcggcaacaccgattataacac  
 cccgtttaccagccgctgagcattaacaaagataacagcaaaagccaggtgttttttaa  
 atgaacagcctgcaaagcaacgataaccgcgatttattattgcgcgcgcgctgacctatt  
 atgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcgcggctagcac  
 caagggcccacgtccttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcg  
 gccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcag  
 gcgacctgaccagcggcgtgcacaccttccccggtgtcctacagtctcaggactctactc  
 cctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaac  
 gtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagcccaaactctgtgaca  
 aaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttct  
 cttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtg  
 gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgg  
 aggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggt  
 cagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtc  
 tccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc  
 gagaaccacaggtgtacacctgccccatccccgggatgaactgaccaagaaccaggtcag  
 cctgacctgcctggtcaaagccttctatcccagcgcacatgcctggtggtggagagcaat  
 gggcagccgggagaacaactacaagaccgcctcccgtgctggactccgacggctccttct  
 tctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatg  
 ctccgtgatgcatgaggtctgtcacaacctacacgcagaagagcctctccctgtctccg  
 ggtaaatga](서열번호 29)

[0370]

[0371] 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체 중쇄 아미노산 서열 2:

[C225v4(서열번호 30)]

[QVQLKQSGPG	LVQPSQSLSI	TCTVSGFSLT	NYGVHWVRQS	PGKGLEWLGV
IWSGGNTDYN	TPFTSRLSIN	KDNSKSQVFF	KMNSLQSNDD	AIYYCARALT
YYDYEFAYWG	QGTLVTVSAA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG	TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSN	TKVDKKVEPK	SCDKTHTCPP	CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK
DTLMISRTP	VTCVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV
YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTPPVV
DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK*]

[0372] (서열번호 30)

[0373] 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체 경쇄 뉴클레오티드 서열 2:

[스페이서(서열번호 62)][차폐제(서열번호 63)][연결제 1(서열번호 64)][**1204**  
기질(서열번호 65)][연결제 2(서열번호 66)][C225(서열번호 67)]

[**caaggccagtctggccag**] [tgcatctcacctcgtgggtgtccggacggcccatacgtcagtgtac] [ggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggtggatccgggt] [**ctgagcggccggttccgataatcat**] [ggcagtagcgggtacc] [cagatcttgctgaccagagcccgggtgattctgagcgtgagccccggcgcaacgtgtgagcttttagctgccgcgcgagccagagcattggcaccaacattcattgggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgctgattaaatatgcgagcgaaagcattagcggcattccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgatttta ccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggtattattattgccagcagaacaa caactggccgaccacctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgca ccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg tgtgcctgctgaataaacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgc cctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctac agcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct gcgaaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtg ttag](서열번호 27)

**짧은 글자체:** 스페이서

**밑줄표시:** 차폐제

**이탤릭체 및 밑줄표시:** 연결제 1

**짧은 글자체 및 밑줄표시:** 1204 기질

**짧은 글자체, 이탤릭체 및 밑줄표시:** 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0374]

[0375] 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체 경쇄 아미노산 서열 2:

[스페이서(서열번호 38)][차폐제(서열번호 14)][연결제 1(서열번호 23)][**1204**  
기질(서열번호 13)][연결제 2(서열번호 24)][C225(서열번호 68)]

[**QGQSGQ**] [CISPRGCPDGPYVMY] [GSSGGSGGSGGSG] [**LSGRSDNH**] [**GSSGT**] [QIL  
LTQSPVILSV SPGERVDFSC RASQSIGTNI HWYQQRITNGS PRLLIKYASE  
SISGIPSRFS GSGSGTDFTL SINSVESEDI ADYYCQQNNN WPTTFGAGTK  
LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA  
LQSGNSQESV TEQDSKDYTY SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGE C\*](서열번호 28)

**짧은 글자체:** 스페이서

**밑줄표시:** 차폐제

**이탤릭체 및 밑줄표시:** 연결제 1

**짧은 글자체 및 밑줄표시:** 1204 기질

**짧은 글자체, 이탤릭체 및 밑줄표시:** 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0376]

[0377] 본 발명의 또 다른 예시적인 활성화가능한 항-EGFR 항체는 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는, 본원에서 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항체로서도 지칭되는 활성화가능한 항체이다. 3954-1204-C225v6 활성화가능한

항-EGFR 항체의 2개 서열이 아래에 제시되어 있는데, 이때 서열 1은 신호 펩티드를 포함하는 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항-EGFR 항체의 버전의 서열이고, 서열 2는 신호 펩티드를 갖지 않는 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항-EGFR 항체의 서열이다.

[0378] 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항체 중쇄 뉴클레오티드 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 60)][C225v6(서열번호 33)]  
 [atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcactaagtcttgcaactgtcacgaattcg  
 ] [caggtgcagctgaaacagagcggcccgggcctggtgcagccgagccagagcctgagcat  
 tacctgcaccgtgagcggcttttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgccagagc  
 ccgggcaaaggcctggaatggctgggctgatttggagcggcggcaacaccgattataaca  
 ccccgtttaccagccgcctgagcattaacaaagataacagcaaaagccaggtgttttttaa  
 aatgaacagcctgcaaagccaggataccgcgatttattattgcgcgcgcgctgacctat  
 tatgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcggcctagca  
 ccaagggcccatcggctcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagc  
 ggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactca  
 ggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctacagtcctcaggactctact  
 ccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaa  
 cgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagcccaaactctgtgac  
 aaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcc  
 tcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccccggaccctgaggtcacatgcgt  
 ggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg  
 gaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtagccagcacgtaccgtgtgg  
 tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt  
 ctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccc  
 cgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccccgggatgaactgaccaagaaccaggtca  
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaa  
 tgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttc  
 ttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcat  
 gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc  
 gggtaaatga](서열번호 9)

*이탤릭체*: 신호 펩티드

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0379]

[0380] 3954-1204-C225v6 완성화가능한 항체 중쇄 아미노산 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 61)][C225v6(서열번호 34)]

[MYRMQLLSCI	ALSLALVTNS]	[QVQLKQSGPG	LVQPSQSLSI	TCTVSGFSLT
NYGVHWVRQS	PGKGLEWLGV	IWSGGNTDYN	TPFTSRLSIN	KDNSKSQVFF
KMNSLQSQDT	AIYYCARALT	YYDYEFAYWG	QGTLVTVSAA	STKGPSVFPPL
APSSKSTSGG	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG
LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKKVEPK	SCDKTHTCPP
CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY
VDGVEVHNAK	TKPREEQY <b>AS</b>	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL
PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA
VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL	DSDGSFFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM
HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK*]	(서열번호 10)		

이탈릭체: 신호 펩티드

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0381]

[0382] 3954-1204-C225v6 완성화가능한 항체 경쇄 뉴클레오티드 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 60)][스페이서(서열번호 62)][차폐제(서열번호 63)][연결제 1(서열번호 64)][1204 기질(서열번호 65)][연결제 2(서열번호 66)][C225(서열번호 67)]

[atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcactaagtcttgcacttgtcacgaattcg]  
 ] [**caaggccagtctggccag**] [tgcattcactcctcgtggttgtccggacggcccatacgtc  
 atgtac] [ggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggtggatccgggt] [**ctgagcggccgt  
 tccgataatcat**] [**ggcagtagcgggtacc**] [cagatcttgctgacctcagagcccgggtgatt  
 ctgagcgtgagcccgggcgaacgtgtgagcttttagctgccgcgcgagccagagcattggca  
 ccaacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgctgattaaatatgc  
 gagcgaagcattagcggcattccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgatttt  
 accctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgctggattattattgccagcagaaca  
 acaactggccgaccacctttggcgcggggcaccaaactggaactgaaacgtacgggtggctgc  
 accatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctggt  
 gtgtgctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacg  
 ccctccaatcgggtaactccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcaccta  
 cagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcc  
 tgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcaciaaagagcttcaacaggggagagt  
 gttag](서열번호 3)

*이탤릭체*: 신호 펩티드

**굵은 글자체**: 스페이서

밑줄표시: 차폐제

이탤릭체 및 밑줄표시: 연결제 1

**굵은 글자체 및 밑줄표시**: 1204 기질

**굵은 글자체, 이탤릭체 및 밑줄표시**: 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0383]

[0384] 3954-1204-C225v6 완성화가능한 항체 경쇄 아미노산 서열 1:

[신호 펩티드(서열번호 61)][스페이서(서열번호 38)][차폐제(서열번호 14)][연결제 1(서열번호 23)][1204 기질(서열번호 13)][연결제 2(서열번호 24)][C225(서열번호 68)]

[MYRMLLSI ALSLALVTNS] [QGQSGQ] [CISPRGCPDGPYVMY] [GSSGGSGGS  
GGSG] [LSGRSDNH] [GSSGT] [QILLTQSPVILSV SPGERVSFSC RASQSIGTNI  
HWYQQRNGS PRLLIKYASE SISGIPSRFS GSGSGTDFTL SINSVESEDI  
ADYYCQNNN WPTTFGAGTK LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV  
CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK  
ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C\*](서열번호 4)

이탈릭체: 신호 펩티드

굵은 글자체: 스페이서

밑줄표시: 차폐제

이탈릭체 및 밑줄표시: 연결제 1

굵은 글자체 및 밑줄표시: 1204 기질

굵은 글자체, 이탈릭체 및 밑줄표시: 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0385]

[0386] 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항체 중쇄 뉴클레오티드 서열 2:

[C225v6(서열번호 33)]

[caggtgcagctgaaacagagcggcccgccctgggtgcagccgagccagagcctgagcatt  
 acctgcaccgtgagcggcttttagcctgaccaactatggcgtgcattgggtgcgccagagcc  
 cgggcaaaggcctggaatggctggcgtgatttggagcggcggcaacaccgattataacac  
 ccggtttaccagccgcctgagcattaacaaagataacagcaaaagccaggtgttttttaa  
 atgaacagcctgcaaagccaggataaccgcgatttattattgcgcgcgcgctgacctatt  
 atgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctgggtgaccgtgagcgcggctagcac  
 caagggcccatcggctcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcg  
 gccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcag  
 gcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactc  
 cctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaac  
 gtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagcccaaactctgtgaca  
 aaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttct  
 ctccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgtg  
 gtgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgg  
 aggtgcataatgccaagacaaagccgcggggaggagcagtagccagcacgtaccgtgtggt  
 cagcgtcctcacctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtc  
 tccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc  
 gagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggtgactgaccaagaaccaggtcag  
 cctgacctgctggtcaaagcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaat  
 gggcagccgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttct  
 tctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg  
 ctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccg  
 ggtaaataga](서열번호 33)

[0387]

[0388] 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항체 중쇄 아미노산 서열 2:

[C225v6(서열번호 34)]

[QVQLKQSGPG	LVQPSQSLSI	TCTVSGFSLT	NYGVHWVRQS	PGKGLEWLGV
IWSGGNTDYN	TPFTSRLSIN	KDNSKSQVFF	KMNSLQSQDT	AIYYCARALT
YYDYEFAYWG	QGTLVTVSAA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG	TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN	TKVDKKEPK	SCDKHTCPP	CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK
DTLMISRPE	VTCVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQY <b>AS</b>
TYRVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV
YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL
DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK* ]

(서열번호 34)

[0389]

[0390] 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항체 경쇄 뉴클레오티드 서열 2:

[스페이서(서열번호 62)][차폐제(서열번호 63)][연결제 1(서열번호 64)][1204 기질(서열번호 65)][연결제 2(서열번호 66)][C225(서열번호 67)]

[caaggccagctctggccag] [tgcattctcacctcgtgggttgtccggacggccatacgtcatgttac] [ggctcgagcgggtggcagcgggtggctctggtggatccgg] [ctgagcggccggtccgataatcat] [ggcagtagcgggtacc] [cagatcttgctgacccagagcccggtgattctgagcgtgagcccgggcgaacgtgtgagctttagctgccgcgcgagccagagcattggcaccaacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgctgattaaatatgcgagcgaaagcattagcggcattccgagccgcttagcggcagcggcagcggcaccgatttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgctggattattattgccagcagaacaa caactggccgaccacctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgca ccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgc cctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctac agcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct gcgaaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcaciaaagagcttcaacaggggagagtg ttag](서열번호 27)

**짧은 글자체:** 스페이서

**밀줄표시:** 차폐제

**이탤릭체 및 밀줄표시:** 연결제 1

**짧은 글자체 및 밀줄표시:** 1204 기질

**짧은 글자체, 이탤릭체 및 밀줄표시:** 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0391]

[0392] 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항체 경쇄 아미노산 서열 2:

[스페이서(서열번호 38)][차폐제(서열번호 14)][연결제 1(서열번호 23)][1204 기질(서열번호 13)][연결제 2(서열번호 24)][C225(서열번호 68)]

[QGQSGQ] [CISPRGCPDGPVYMY] [GSSGGSGGSGGSG] [LSGRSDNH] [GSSGT] [QIL LTQSPVILSV SPGERVSFSC RASQSIGTNI HWYQQRTNGS PRLLIKYASE SISGIPSRFS GSGSGTDFTL SINSVESEDI ADYQCQNNN WPTTFGAGTK LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C\*](서열번호 28)

**짧은 글자체:** 스페이서

**밀줄표시:** 차폐제

**이탤릭체 및 밀줄표시:** 연결제 1

**짧은 글자체 및 밀줄표시:** 1204 기질

**짧은 글자체, 이탤릭체 및 밀줄표시:** 연결제 2

일반 텍스트: 항-EGFR 항체 유래 서열

[0393]

[0394] 본 발명의 활성화가능한 항-EGFR 항체가 단백질분해효소에 의해 절단될 때, 즉, 활성화가능한 항-EGFR이 활성 또는 절단된 상태로 존재할 때, 활성화된 항-EGFR 항체는 불활성 또는 비절단된 상태의 활성화가능한 항체의 아

미노산 서열의 일부만을 보유할 것이다. 상이한 단백질분해효소가 상이한 인식 부위를 가질 수 있기 때문에, 활성 또는 절단된 상태의 활성화가능한 항-EGFR의 서열은 어떤 단백질분해효소가 기질(CM)을 절단하는 지에 따라 달라질 것이다.

[0395] 예를 들면, 본 발명의 예시적인 항-EGFR 항체인 3954-1204-C225v5 활성화가능한 항체, 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체 및/또는 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항체 각각은 동일한 경쇄 아미노산 서열(본원에서 경쇄 아미노산 서열 2로 지칭됨)을 갖는다. 유로키나제 플라스미노겐 활성화제(uPA) 또는 MT-SP1에 노출되어 이들에 의해 활성화될 때, 항-EGFR 활성화가능한 항체의 활성화된 형태는 하기 아미노산 서열을 가질 것이다.

[0396] uPA 또는 MT-SP1에 의해 활성화되었을 때, 3954-1204-C225v5, 3954-1204-C225v4 및/또는 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항체 경쇄 아미노산 서열 2의 활성화된 형태

SDNHGSSGTQILLTQSPVILSVSPGERVFSFCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYAS  
 ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAP  
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS  
 LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*(서열번호 69)

[0398] 레구마인에 노출되어 이에 의해 활성화될 때, 항-EGFR 활성화가능한 항체의 활성화된 형태는 하기 아미노산 서열을 가질 것이다.

[0399] 레구마인에 의해 활성화되었을 때, 3954-1204-C225v5, 3954-1204-C225v4 및/또는 3954-1204-C225v6 활성화가능한 항체 경쇄 아미노산 서열 2의 활성화된 형태

HGSSGTQILLTQSPVILSVSPGERVFSFCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESI  
 SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVF  
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS  
 TLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*(서열번호 70)

[0401] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 활성화가능한 항체에 접합된 물질도 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합된 물질은 치료제, 예컨대, 항신생물제이다. 이러한 실시양태에서, 상기 물질은 활성화가능한 항체의 탄수화물 모이어티에 접합되고, 바람직하게는 이때 탄수화물 모이어티는 활성화가능한 항체에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 항원 결합 영역 외부에 위치한다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 활성화가능한 항체에서 항체 또는 항원 결합 단편의 설프하이드릴 기에 접합된다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 활성화가능한 항체의 항체 또는 항원 결합 단편의 아미노 기에 접합된다. 일부 실시양태에서, 상기 물질은 활성화가능한 항체의 항체 또는 항원 결합 단편의 카복실산 기에 접합된다.

[0402] 일부 실시양태에서, 상기 물질은 세포독성 물질, 예컨대, 독소(예를 들면, 세균, 진균, 식물 또는 동물 유래의 효소 활성 독소, 또는 이의 단편), 또는 방사성동위원소(즉, 방사성접합체)이다. 적합한 세포독성 물질은 예를 들면, 표 1에 나열된 세포독성 물질들 중 임의의 세포독성 물질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 물질은 돌라스타틴 또는 이의 유도체(예를 들면, 아우리스타틴 E, AFP, MMAF, MMAE, DMAP, DMAE)이다. 예를 들면, 세포독성 물질은 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)이다.

[0403] 일부 실시양태에서, 접합된 활성화가능한 항체는 활성화가능한 항체 서열에 삽입된 또는 다른 방식으로 포함된 변경된 아미노산 서열을 통해 부위 특이적 접합을 위해 변경될 수 있다. 이들 변경된 아미노산 서열들은 접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체 내의 접합된 물질의 조절된 배치 및/또는 용량을 가능하게 하도록 디자인된다. 예를 들면, 활성화가능한 항체는 반응성 티올 기를 제공하고 단백질 폴딩 및 조립에 부정적인 영향을 미치지 않고 항원 결합도 변경시키지 않는 시스테인 치환을 경쇄 및 중쇄 상의 위치에서 포함하도록 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 접합에 적합한 부위를 제공하기 위해 활성화가능한 항체 내에 하나 이상의 비-천연 아미노산 잔기를 포함하거나 다른 방식으로 도입하도록 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 활성화가능한 항체 서열 내에 효소적으로 활성화가능한 펩티드 서열을 포함하거나 다른 방식으로 도입하도록 조작될 수 있다.

[0404] 일부 실시양태에서, 상기 물질은 검출가능한 모이어티, 예컨대, 표지 또는 다른 마커이다. 예를 들면, 상기 물질은 방사성표지된 아미노산, 표지된 아비딘에 의해 검출될 수 있는 하나 이상의 바이오티닐 모이어티(예를 들면, 광학 또는 비색 방법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙타비딘), 하나 이

상의 방사성동위원소 또는 방사성핵종, 하나 이상의 형광 표지, 하나 이상의 효소 표지, 및/또는 하나 이상의 화학발광 물질이거나 이러한 물질들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 모이어티는 스페이서 분자에 의해 부착된다.

[0405] 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 이의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, (슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의) 외독소 A 쇄, 리신 A 쇄, 에브린 A 쇄, 모텍신 A 쇄, 알파-사르신, 유동나무(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이톨라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 다양한 방사성핵종들이 방사성접합된 항체의 제조를 위해 이용될 수 있다. 예로는 <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y 및 <sup>186</sup>Re이 있다.

[0406] 다양한 이작용성 단백질 커플링제, 예컨대, N-석신이미달-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르(예컨대, 디석신이미달 수베레이트), 알데하이드(예컨대, 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스-(p-아지도벤조일)핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 툴루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 항체와 세포독성 물질의 접합체를 제조한다. 예를 들면, 문헌(Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987))에 기재된 바와 같이 리신 면역독소를 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성뉴클레오티드와 항체의 접합을 위한 예시적인 킬레이팅제이다(국제 특허출원 공보 제W094/11026호 참조).

[0407] 당분야에서 통상의 기술을 가진 자는 매우 다양한 가능한 모이어티들이 본 발명의 발생된 항체에 커플링될 수 있다는 것을 인식할 것이다(예를 들면, 문헌("Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989))(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨) 참조).

[0408] 표 1은 본원에 기재된 본 발명에서 사용될 수 있는 예시적인 약제들 중 일부를 나열하나, 결코 배타적 목록이 아니다.

표 1

접합을 위한 예시적인 약제

세포독성 물질

아우리스타틴  
 아우리스타틴 E  
 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)  
 데스메틸 아우리스타틴 E(DMAE)  
 아우리스타틴 F  
 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF)  
 데스메틸 아우리스타틴 F(DMAF)  
 아우리스타틴 유도체, 예를 들면, 이의 아마이드  
 아우리스타틴 티라민  
 아우리스타틴 퀴놀린  
 둘라스틴  
 둘라스틴 유도체  
 둘라스틴 16 DmJ  
 둘라스틴 16 Dpv  
 메탄시노이드, 예를 들면, DM-1; DM-4  
 메탄시노이드 유도체  
 듀오카마이신  
 듀오카마이신 유도체  
 알파-아마니틴  
 안쓰라사이클린  
 독소루비신  
 다우노루비신

브리오스타틴  
 캄프토테신  
 캄프토테신 유도체  
 7-치환된 캄프토테신  
 10, 11- 디플루오로메틸렌디옥시캄프토테신  
 콤프레타스타틴  
 데브로모아플리시아톡신  
 카할라라이드-F  
 디스코더몰라이드  
 액테이나스시딘

항바이러스제

아사이클로비어(Acyclovir)  
 비라(Vira) A  
 심메트렐(Symmetrel)

항진균제

나이스타틴(Nystatin)

투르보스타틴  
 펜스타틴  
 하이드록시펜스타틴  
 스폰기스타틴 5  
 스폰기스타틴 7  
 할리스타틴 1  
 할리스타틴 2  
 할리스타틴 3  
 변경된 브리오스타틴  
 할로콤포스타틴  
 피롤로벤조이미다졸(PBI)  
 시브로스타틴 6  
 독살리포름  
 안쓰라사이클린 유사체  
 안쓰라사이클린 유사체  
  
 세마도틴 유사체(CemCH2-SH)  
 슈도모나스 독소 A(PE38) 변이체  
 슈도모나스 독소 A(ZZ-PE38) 변이체  
 ZJ-101  
 OSW-1  
 O6-벤질구아닌의 4-니트로벤질옥시카보닐  
 유도체  
 토포이소머라제 억제제  
 헤미아스틸린(Hemiasterlin)  
 세팔로탁신  
 호모해링토닌(Homoharringtonine)  
 피롤로벤조디아제핀 이량체(PBDs)  
 작용기화된 피롤로벤조디아제핀  
 칼리케아미신  
 포도필로톡신  
 탁산  
 빈카 알칼로이드

접합가능한 검출 시약

플루오레세인 및 이의 유도체  
 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)

[0409]

추가 항-신생물제

아드리아마이신  
세루비딘  
블레오마이신  
알케란  
벨반  
온코빈  
플루오로우라실  
메토트렉세이트  
티오테파  
비스안트렌  
노반트론  
티오구아닌  
프로카라비진  
사이타라빈

항균제

아미노글리코사이드  
스트렙토마이신  
네오마이신  
카나마이신  
아미카신  
젠탐미신  
토브라마이신  
스트렙토마이신 B  
스펙티노마이신  
암피실린  
설파닐아미드  
폴리믹신  
클로람페니콜

방사성약제

<sup>125</sup>I  
<sup>131</sup>I  
<sup>89</sup>Zr  
<sup>111</sup>In  
<sup>123</sup>I  
<sup>131</sup>I  
<sup>99m</sup>Tc  
<sup>201</sup>Tl  
<sup>133</sup>Xe  
<sup>11</sup>C  
<sup>62</sup>Cu  
<sup>18</sup>F  
<sup>68</sup>Ga  
<sup>13</sup>N  
<sup>15</sup>O  
<sup>38</sup>K  
<sup>82</sup>Rb  
<sup>99m</sup>Tc (테크네튬)

중금속

바륨  
금  
백금

항-마이코플라스마제

타일로신  
스펙티노마이신

[0410]

[0411]

항체 및 다른 모이어티가 그들 각각의 활성을 보유하는 한, 커플링은 2개의 분자들을 결합시킬 임의의 화학 반응에 의해 달성될 수 있다. 이 연결은 많은 화학 기작, 예를 들면, 공유 결합, 친화성 결합, 인터칼레이션, 배위 결합 및 착물화를 포함할 수 있다. 그러나, 바람직한 결합은 공유 결합이다. 공유 결합은 존재하는 측쇄의 직접적인 축합 또는 외부 가교형성 분자의 도입에 의해 달성될 수 있다. 많은 2가 또는 다가 연결체들이 단백질 분자, 예컨대, 본 발명의 항체를 다른 분자에 커플링시키는 데에 유용하다. 예를 들면, 대표적인 커플링제는 유기 화합물, 예컨대, 티오에스테르, 카보디이미드, 석신이미드 에스테르, 디이소시아네이트, 글루타르알데하이드, 디아조벤젠 및 헥사메틸렌 디아민을 포함할 수 있다. 이 목록은 당분야에서 공지된 다양한 클래스의 커플링제들을 배제하기 위한 것이 아니라, 오히려 보다 통상적인 커플링제들을 예시하기 위한 것이다 (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).

[0412]

바람직한 연결체는 문헌에 기재되어 있다(예를 들면, MBS(M-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르)를 기술하는 문헌(Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984)) 참조). 올리고펩티드 연결체에 의해 항체에 커플링된 할로겐화된 아세틸 하이드라자이드 유도체의 사용을 기술하는 미국 특허 제5,030,719호도 참조한다. 특히 바람직한 연결체는 (i) SMPT(4-석신이미딜옥시카보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)-톨루엔)(피어스 케미칼 컴퍼니(Pierce Chem. Co.), 카탈로그 번호 21558G); (ii) SPDP(석신이미딜-6 [3-(2-피리딜디티오)프로피온아미드]헥사노에이트)(피어스 케미칼 컴퍼니, 카탈로그 번호 21651G); 및 (iii) 설포-LC-SPDP(설포석신이미딜 6 [3-(2-피리딜디티오)-프로피온아미드]헥사노에이트)(피어스 케미칼 컴퍼니, 카탈로그 번호 2165-G)를 포함한다.

[0413]

전술된 연결체는 상이한 특성을 갖는 성분을 함유하여 상이한 물리화학적 성질을 갖는 접합체를 발생시킨다. 예를 들면, 연결체 SMPT는 입체장애된 이황화 결합을 함유하고 증가된 안정성을 갖는 접합체를 형성할 수 있다.

이황화 연결은 시험관내에서 절단되어 이용가능한 접합체를 덜 발생시키기 때문에 일반적으로 다른 연결보다 덜 안정하다.

- [0414] 시약 EDC(1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 하이드로클로라이드는 카복실산 및 일차 또는 이차 아민으로 출발하여 카복사미드를 생성하는 데에 유용하다. 따라서, EDC는 항체 내의 라이신 잔기를 연결체 또는 독소 내의 카복실산과 연결하거나, 항체 내의 아스파르테이트 또는 글루타메이트 잔기를 연결체 또는 독소 내의 아민과 연결하는 데에 사용될 수 있다. EDC를 사용하는 이러한 접합 반응은 NHS(N-하이드록시석신이미드) 또는 설포-NHS(N-하이드록시-3-옥시설포닐석신이미드)의 첨가에 의해 향상될 수 있다. 이러한 접합 반응에의 NHS 또는 설포-NHS의 첨가는 접합 반응의 속도, 완결성, 선택성 및/또는 재현성을 향상시킬 수 있다.
- [0415] 일부 실시양태에서, 연결체는 절단가능하다. 일부 실시양태에서, 연결체는 절단불가능하다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 연결체가 존재한다. 2개 이상의 연결체는 모두 동일하거나(예를 들면, 절단가능하거나 절단불가능함), 2개 이상의 연결체는 상이하다(예를 들면, 하나 이상은 절단가능하고, 하나 이상은 절단불가능함).
- [0416] 본 발명은 물질을 AB에 부착시키기 위해 여러 방법을 이용한다: (a) AB의 탄수화물 모이어티에의 부착, (b) AB의 설프하이드릴 기에의 부착, (c) AB의 아미노 기에의 부착, 또는 (d) AB의 카복실레이트 기에의 부착. 본 발명에 따라, AB는 2개 이상의 반응성 기, 즉 AB와 반응하는 기 및 물질과 반응하는 기를 갖는 중간체 연결체를 통해 물질에 공유부착될 수 있다. 임의의 상용가능한 유기 화합물을 포함할 수 있는 연결체는 AB(또는 물질)와의 반응이 AB 반응성 및 선택성에 불리하게 영향을 미치지 않도록 선택될 수 있다. 나아가, 물질에의 연결체의 부착은 상기 물질의 활성을 파괴하지 않을 것이다. 산화된 항체 또는 산화된 항체 단편과의 반응에 적합한 연결체는 일차 아민, 이차 아민, 하이드라진, 하이드라자이드, 하이드록실아민, 페닐하이드라진, 세미카바자이드 및 티오세미카바자이드 기로 구성된 군으로부터 선택된 아민을 함유하는 연결체를 포함한다. 이러한 반응성 작용기는 연결체의 구조의 일부로서 존재할 수 있거나, 이러한 기를 함유하지 않는 연결체의 적합한 화학적 변경에 의해 도입될 수 있다.
- [0417] 본 발명에 따라, 환원된 AB에의 부착에 적합한 연결체는 환원된 항체 또는 단편의 설프하이드릴 기와 반응할 수 있는 특정 반응성 기를 갖는 연결체를 포함한다. 이러한 반응성 기는 반응성 할로알킬 기(예를 들면, 할로아세틸 기를 포함함), p-머큐리벤조에이트 기 및 마이클-유형 첨가 반응을 할 수 있는 기(예를 들면, 말레이미드 및 문헌(Mitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110)에 기재된 유형의 기를 포함함)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0418] 본 발명에 따라, 산화되지 않고 환원되지도 않은 Ab에의 부착에 적합한 연결체는 AB 내의 비변경된 라이신 잔기에 존재하는 일차 아미노 기와 반응할 수 있는 특정 작용기를 갖는 연결체를 포함한다. 이러한 반응성 기는 NHS 카복실산 또는 탄산 에스테르, 설포-NHS 카복실산 또는 탄산 에스테르, 4-니트로페닐 카복실산 또는 탄산 에스테르, 펜타플루오로페닐 카복실산 또는 탄산 에스테르, 아실 이미다졸, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0419] 본 발명에 따라, 산화되지 않고 환원되지도 않은 Ab에의 부착에 적합한 연결체는 적합한 시약에 의해 활성화되어 있는, Ab 내의 아스파르테이트 또는 글루타메이트 잔기에 존재하는 카복실산 기와 반응할 수 있는 특정 작용기를 갖는 연결체를 포함한다. 적합한 활성화 시약은 첨가된 NHS 또는 설포-NHS를 갖거나 갖지 않는 EDC, 및 카복사미드 형성을 위해 이용되는 다른 탈수제를 포함한다. 이들 경우, 적합한 연결체에 존재하는 작용기는 일차 아민, 이차 아민, 하이드라진, 하이드록실아민 및 하이드라자이드를 포함할 것이다.
- [0420] 물질은 연결체가 AB에 부착되기 전 또는 후에 연결체에 부착될 수 있다. 특정 적용에서, 연결체가 관련된 물질을 갖지 않는 AB-연결체 중간체를 먼저 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 그 다음, 특정 적용에 따라, 특정 물질이 연결체에 공유부착될 수 있다. 다른 실시양태에서, AB는 MM, CM 및 관련된 연결체에 먼저 부착된 후, 접합 목적을 위한 연결체에 부착된다.
- [0421] 분지된 연결체: 특정 실시양태에서, 물질의 부착을 위한 다중 부위를 갖는 분지된 연결체가 사용된다. 다중 부위 연결체의 경우, AB에의 단일 공유부착은 다수의 부위에서 물질에 결합할 수 있는 AB-연결체 중간체를 발생시킬 것이다. 상기 부위는 알데하이드 또는 설프하이드릴 기; 또는 물질이 부착될 수 있는 임의의 화학적 부위일 수 있다.
- [0422] 대안적으로, 보다 높은 특이적 활성(또는 물질 대 AB의 보다 높은 비)은 AB 상의 다수의 부위에서 단일 부위 연결체의 부착에 의해 달성될 수 있다. 이 다수의 부위는 2종의 방법들 중 어느 하나에 의해 AB 내로 도입될 수

있다. 첫째, 동일한 AB에서 다수의 알데하이드 기 및/또는 설프하이드릴 기를 발생시킬 수 있다. 둘째, 연결제에의 후속 부착을 위해 다수의 작용 부위를 갖는 "분지된 연결제"를 AB의 알데하이드 또는 설프하이드릴에 부착시킬 수 있다. 분지된 연결제 또는 다중 부위 연결제의 작용 부위는 알데하이드 또는 설프하이드릴 기일 수 있거나, 연결제가 부착될 수 있는 임의의 화학적 부위일 수 있다. 훨씬 더 높은 특이적 활성은 이들 2종의 방법들을 조합함으로써, 즉 다중 부위 연결제를 AB 상의 여러 부위에 부착시킴으로써 수득될 수 있다.

[0423] 절단가능한 연결제: 보체 시스템의 효소, 예컨대, 유로키나제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 트립신, 플라스민, 또는 단백질용해 활성을 갖는 또 다른 효소(그러나, 이들로 한정되지 않음)에 의한 절단에 민감한 펩티드 연결제가 본 발명의 한 실시양태에서 사용될 수 있다. 본 발명의 한 방법에 따라, 물질은 보체에 의한 절단에 민감한 연결제를 통해 부착된다. 항체는 보체를 활성화시킬 수 있는 클래스로부터 선택된다. 따라서, 항체-물질 접합체는 보체 캐스케이드(cascade)를 활성화시키고 표적 부위에서 물질을 방출한다. 본 발명의 또 다른 방법에 따라, 물질은 단백질용해 활성을 갖는 효소, 예컨대, 유로키나제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 플라스민 또는 트립신에 의한 절단에 민감한 연결제를 통해 부착된다. 이들 절단가능한 연결제는 세포의 독소, 비-제한적으로 예를 들면, 표 1에 제시된 세포의 독소들 중 임의의 세포의 독소를 포함하는 접합된 활성화가능한 항체에서 유용하다.

[0424] 절단가능한 연결제 서열의 비-제한적 예는 표 2에서 제공되어 있다.

**표 2**

**접합을 위한 예시적인 연결제 서열**

절단가능한 서열의 유형	아미노산 서열
<b>플라스민 절단가능한 서열</b>	
전구-유로키나제	PRFKIIGG(서열번호 7) PRFRIIGG(서열번호 8) SSRHRRALD(서열번호 11) RKSSIIIRMRDVVL(서열번호 12) SSSFDKGKYKKGDDA(서열번호 31) SSSFDKGKYKRGDDA(서열번호 32)
TGFβ 플라스미노겐 스타펠로키나제	
<b>인자 Xa 절단가능한 서열</b>	
	IEGR(서열번호 35) IDGR(서열번호 36) GGSIDGR(서열번호 39)
<b>MMP 절단가능한 서열</b>	
젤라티나제 A	PLGLWA(서열번호 40)
<b>콜라게나제 절단가능한 서열</b>	
소 피부 콜라겐(α1(I) 쇠)	GPQGIAGQ(서열번호 41)
소 피부 콜라겐(α2(I) 쇠)	GPQGLLGA(서열번호 42)
소 연골 콜라겐(α1(II) 쇠)	GIAGQ(서열번호 43)
인간 간 콜라겐(α1(III) 쇠)	GPLGIAGI(서열번호 44)
인간 α <sub>2</sub> M	GPEGLRVG(서열번호 45)
인간 PZP	YGAGLGVV(서열번호 46) AGLGVVER(서열번호 47) AGLGISST(서열번호 48)
랫트 α <sub>1</sub> M	EPQALAMS(서열번호 49) QALAMSAI(서열번호 50)
랫트 α <sub>2</sub> M	AAAYHLVSQ(서열번호 51) MDAFLESS(서열번호 52)
랫트 α <sub>1</sub> I <sub>3</sub> (2J)	ESLPVVAV(서열번호 53)
랫트 α <sub>1</sub> I <sub>3</sub> (27J)	SAPAVESE(서열번호 54)
인간 섬유모세포 콜라게나제 (자가용해 절단)	DVAQFVLT(서열번호 55) VAQFVLTE(서열번호 56) AQFVLTEG(서열번호 57) PVQPIGPQ(서열번호 58)

[0425]

[0426] 추가로, 물질은 이황화 결합(예를 들면, 시스테인 분자 상의 이황화 결합)을 통해 AB에 부착될 수 있다. 많은 중앙들이 높은 수준의 글루타티온(환원제)을 천연적으로 방출하기 때문에, 이것은 전달 부위에서 물질을 후속적

으로 방출하면서 이황화 결합을 환원시킬 수 있다. 일부 특정 실시양태에서, CM을 변경시킬 환원제는 접합된 활성화가능한 항체의 연결제도 변경시킬 수 있다.

- [0427] 스페이서 및 절단가능한 요소: 또 다른 실시양태에서, 물질과 활성화가능한 항체의 AB 사이의 간격을 최적화하는 방식으로 연결제를 구축할 필요가 있을 수 있다. 이것은 하기 일반 구조를 갖는 연결제의 사용에 의해 달성될 수 있다:
- [0428]  $W-(CH_2)_n-Q$
- [0429] 상기 식에서,
- [0430] W는  $--NH--CH_2--$  또는  $--CH_2--$ 이고;
- [0431] Q는 아미노산 펩티드이고;
- [0432] n은 0 내지 20의 정수이다.
- [0433] 다른 실시양태에서, 연결제는 스페이서 요소 및 절단가능한 요소를 포함할 수 있다. 스페이서 요소는 절단가능한 요소가 절단을 담당하는 효소에 보다 더 접근할 수 있도록 AB의 코어로부터 떨어진 위치에 절단가능한 요소를 위치시키는 작용을 한다. 전술된 분지된 연결제들 중 일부는 스페이서 요소로서 작용할 수 있다.
- [0434] 이 논의 전체에서, 물질에의 연결제의 부착(또는 절단가능한 요소에의 스페이서 요소의 부착, 또는 물질에의 절단가능한 요소의 부착)은 특정 방식의 부착 또는 반응일 필요가 없다는 것을 이해해야 한다. 적합한 안정성 및 생물학적 상용성을 갖는 생성물을 제공하는 임의의 반응이 허용가능하다.
- [0435] 혈청 보체 및 연결제의 선택: 본 발명의 한 방법에 따라, 물질의 방출이 요구되는 경우, 보체를 활성화시킬 수 있는 클래스의 항체인 AB가 사용된다. 발생된 접합체는 항원에 결합하는 능력 및 보체 캐스케이드를 활성화시키는 능력 둘다를 보유한다. 따라서, 본 발명의 이 실시양태에 따라, 물질은 절단가능한 연결제 또는 절단가능한 요소의 한 말단에 연결되고, 연결제의 다른 말단은 AB 상의 특정 부위에 부착된다. 예를 들면, 물질이 하이드록시 기 또는 아미노 기를 갖는 경우, 상기 물질은 에스테르 또는 아미드 결합을 통해 펩티드, 아미노산 또는 다른 적합하게 선택된 연결제의 카복시 말단에 부착될 수 있다. 예를 들면, 이러한 물질은 카보디이미드 반응을 통해 연결제 펩티드에 부착될 수 있다. 물질이 연결제에의 부착을 방해할 작용기를 함유하는 경우, 이들 방해 작용기는 부착 전에 차단될 수 있고 일단 생성물 접합체 또는 중간체가 만들어지면 탈차단될 수 있다. 그 다음, 연결제의 반대 또는 아미노 말단은 직접적으로 사용되거나, 보체를 활성화시킬 수 있는 AB와의 결합을 위한 추가 변경 후에 사용될 수 있다.
- [0436] 연결제(또는 연결제의 스페이서 요소)는 임의의 원하는 길이를 가질 수 있고, 연결제의 한 말단은 활성화가능한 항체의 AB 상의 특정 부위에 공유부착될 수 있다. 연결제 또는 스페이서 요소의 다른 말단은 아미노산 또는 펩티드 연결제에 부착될 수 있다.
- [0437] 따라서, 이들 접합체가 보체의 존재 하에서 항원에 결합할 때, 물질을 연결제에 부착시키는 아미드 또는 에스테르 결합이 절단되어 물질을 그의 활성 형태로 방출할 것이다. 이들 접합체는 대상체에게 투여되었을 때 표적 부위에서 물질의 전달 및 방출을 달성할 것이고, 표 1에 제시되어 있으나 이들로 한정되지 않는 약제, 항생제, 항대사물질, 항증식제 등의 생체내 전달에 특히 효과적이다.
- [0438] 보체 활성화 없는 방출을 위한 연결제: 표적화된 전달의 또 다른 적용에서, 보체 캐스케이드의 활성화가 궁극적으로 표적 세포를 용해할 것이기 때문에 보체 활성화 없는 물질의 방출이 요구된다. 따라서, 이 방법은 물질의 전달 및 방출이 표적 세포를 사멸하지 않고 달성되어야 할 때 유용하다. 이러한 표적 세포의 사멸 없는 물질의 전달 및 방출은 세포 매개자, 예컨대, 호르몬, 효소, 코르티코스테로이드, 신경전달물질, 유전자 또는 효소를 표적 세포에 전달하는 것이 요구될 때의 목표이다. 이들 접합체는 혈청 단백질분해효소에 의한 절단에 약간 민감한 연결제를 통해 보체를 활성화시킬 수 없는 AB에 물질을 부착시킴으로써 제조될 수 있다. 이 접합체가 개체에 투여될 때, 항원-항체 복합체는 신속히 형성되는 반면, 물질의 절단은 서서히 일어남으로써, 화합물을 표적 부위에서 방출할 것이다.
- [0439] 생화학적 가교연결제: 다른 실시양태에서, 특정 생화학적 가교연결제를 사용하여 활성화가능한 항체를 하나 이상의 치료제에 접합시킬 수 있다. 가교연결 시약은 2개의 상이한 분자들의 작용기들을 함께 묶는 분자 가교를 형성한다. 2개의 상이한 단백질들을 단계적 방식으로 연결하기 위해, 원치 않는 단독중합체 형성을 제거하는 이중작용성 가교연결제를 사용할 수 있다.

[0440] 라이소좀 단백질분해효소에 의해 절단될 수 있는 펩티딜 연결제, 예를 들면, Val-Cit, Val-Ala 또는 다른 디펩티드도 유용하다. 추가로, 라이소좀의 낮은 pH 환경에서 절단가능한 산-불안정성 연결제, 예를 들면, 비스-시알릴 에테르가 사용될 수 있다. 다른 적합한 연결제는 카텝신-불안정성 기질, 특히 산성 pH에서 최적 기능을 보이는 카텝신-불안정성 기질을 포함한다.

[0441] 예시적인 이중-이작용성 가교연결제는 표 3에 언급되어 있다.

표 3

예시적인 이중이작용성 가교연결제

이중이작용성 가교연결제			
연결제	반응성	장점 및 적용	가교연결 후 스페이서 아암 길이(Å)
SMPT	일차 아민 설프하이드릴	보다 큰 안정성	11.2 Å
SPDP	일차 아민 설프하이드릴	티올화 절단가능한 가교연결	6.8 Å
LC-SPDP	일차 아민 설프하이드릴	연장된 스페이서 아암	15.6 Å
설프-LC-SPDP	일차 아민 설프하이드릴	연장제 스페이서 아암 수용성	15.6 Å
SMCC	일차 아민 설프하이드릴	안정한 말레이미드 반응성 기 효소-항체 접합 헵텐-담체 단백질 접합	11.6 Å
설프-SMCC	일차 아민 설프하이드릴	안정한 말레이미드 반응성 기 수용성 효소-항체 접합	11.6 Å
MBS	일차 아민 설프하이드릴	효소-항체 접합 헵텐-담체 단백질 접합	9.9 Å
설프-MBS	일차 아민 설프하이드릴	수용성	9.9 Å
SIAB	일차 아민 설프하이드릴	효소-항체 접합	10.6 Å
설프-SIAB	일차 아민 설프하이드릴	수용성	10.6 Å
SMPB	일차 아민 설프하이드릴	연장된 스페이서 아암 효소-항체 접합	14.5 Å
설프-SMPB	일차 아민 설프하이드릴	연장된 스페이서 아암 수용성	14.5 Å
EDE/설프-NHS	일차 아민 카복실 기	헵텐-담체 접합	0
ABH	탄수화물 비선택적	당 기와 반응함	11.9 Å

[0442]

[0443] 절단불가능한 연결제 또는 직접적인 부착: 본 발명의 다른 실시양태에서, 접합체는 물질이 표적으로 전달되도록 방출되지 않도록 디자인될 수 있다. 이것은 직접적으로 또는 절단불가능한 연결제를 통해 물질을 AB에 부착시킴으로써 달성될 수 있다.

[0444] 이들 절단불가능한 연결제는 본원에 기재된 방법에 의해 후속적으로 AB에의 부착에 사용될 수 있는 작용기를 포함하도록 변경될 수 있는 아미노산, 펩티드, D-아미노산 또는 다른 유기 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 유기 연결제에 대한 화학식은 다음과 같을 수 있다:

[0445] W-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Q

[0446] 상기 식에서,

- [0447] W는 --NH--CH<sub>2</sub>-- 또는 --CH<sub>2</sub>--이고;
- [0448] Q는 아미노산 펩티드이고;
- [0449] n은 0 내지 20의 정수이다.
- [0450] 절단불가능한 집합체: 대안적으로, 화합물은 보체를 활성화시키지 않는 AB에 부착될 수 있다. 보체를 활성화시킬 수 없는 AB를 사용할 때, 이 부착은 활성화된 보체에 의한 절단에 민감한 연결체의 사용, 또는 활성화된 보체에 의한 절단에 민감하지 않은 연결체의 사용을 통해 달성될 수 있다.
- [0451] 정의:
- [0452] 달리 정의되어 있지 않은 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학 용어 및 기술 용어는 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 또한, 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형 용어를 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수형 용어를 포함할 것이다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 단백질 및 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 화학 및 혼성화와 관련하여 이용된 명명법 및 이들의 기법은 당분야에서 잘 공지되어 있고 통상적으로 이용되는 명명법 및 기법이다. 제조 합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환(예를 들면, 전기천공, 지질감염)을 위해 표준 기법이 이용된다. 효소 반응 및 정제 기법은 제조자의 설명서에 따라, 또는 당분야에서 통상적으로 달성되는 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행된다. 상기 기법 및 절차는 일반적으로 본 명세서 전체에서 인용되고 논의된 다양한 일반 참고문헌들 및 보다 구체적인 참고문헌들에 기재된 바와 같이 당분야에서 잘 공지된 보편적인 방법에 따라 수행된다. 예를 들면, 문헌(Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))을 참조한다. 본원에 기재된 분석화학, 합성 유기화학, 및 의약 및 약품 화학과 관련하여 이용된 명명법, 및 이들의 실험 절차 및 기법은 당분야에서 잘 공지되어 있고 통상적으로 이용되는 명명법, 및 실험 절차 및 기법이다. 화학 합성, 화학 분석, 약학 제조, 제제화 및 전달, 및 환자의 치료를 위해 표준 기법이 이용된다.
- [0453] 본 개시내용에 따라 이용된 바와 같이, 달리 표시되어 있지 않은 한, 하기 용어들은 하기 의미를 갖는 것으로 이해될 것이다.
- [0454] 본원에서 사용된 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린(Ig) 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 항원과 특이적으로 결합하는(면역반응하는) 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭한다. "특이적으로 결합하는", "면역반응하는" 또는 "면역특이적으로 결합하는"은 항체가 원하는 항원의 하나 이상의 항원성 결정인자와 반응하고 다른 폴리펩티드와 반응하지 않거나 훨씬 더 낮은 친화성( $K_d > 10^{-6}$ )에서 결합한다는 것을 의미한다. 항체는 다중 클론, 단일클론, 키메라, 도메인 항체, 단일 쇠, Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv, 및 Fab 발현 라이브러리를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0455] 기본 항체 구조 유닛은 사량체를 포함하는 것으로 공지되어 있다. 각각의 사량체는 2쌍의 동일한 폴리펩티드 쇠로 구성되고, 각각의 쌍은 1개의 "경쇄"(약 25 kDa) 및 1개의 "중쇄"(약 50 내지 70 kDa)를 갖는다. 각각의 쇠의 아미노-말단 부분은 항원 인식을 일차적으로 담당하는 약 100개 내지 110개 이상의 아미노산으로 구성된 가변 영역을 포함한다. 각각의 쇠의 카복시-말단 부분은 이펙터 기능을 일차적으로 담당하는 불변 영역을 정의한다. 일반적으로, 인간으로부터 수득된 항체 분자는 분자에 존재하는 중쇄의 성질에 의해 서로 상이한 클래스 IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD 중 임의의 클래스에 속한다. 특정 클래스는 서브클래스, 예컨대, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> 등도 갖는다. 나아가, 인간에서 경쇄는 카파 쇠 또는 람다 쇠일 수 있다.
- [0456] 본원에서 사용된 용어 "단일클론 항체"(mAb) 또는 "단일클론 항체 조성물"은 독특한 경쇄 유전자 생성물 및 독특한 중쇄 유전자 생성물로 구성된 항체 분자의 1개 분자 종만을 함유하는 항체 분자의 집단을 지칭한다. 특히, 단일클론 항체의 상보성 결정 영역(CDR)은 집단의 모든 분자들에서 동일하다. mAb는 그에 대한 독특한 결합 친화성을 특징으로 하는 항원의 특정 에피토프와 면역반응할 수 있는 항원 결합 부위를 함유한다.
- [0457] 용어 "항원 결합 부위" 또는 "결합 부분"은 항원 결합에 참여하는 면역글로불린 분자의 일부를 지칭한다. 항원 결합 부위는 중쇄("H") 및 경쇄("L")로 구성된 N-말단 가변("V") 영역의 아미노산 잔기에 의해 형성된다. "초가변 영역"으로서 지칭되는, 중쇄 및 경쇄의 V 영역 내의 3개 고도 가변성 스트레치가 "골격 영역" 또는 "FR"로서 공지된 보다 보존된 플랭킹 스트레치 사이에 개재되어 있다. 따라서, 용어 "FR"은 면역글로불린에서 초가변 영역 사이에서 및 근처에서 천연적으로 발견되는 아미노산 서열을 지칭한다. 항체 분자에서, 경쇄의 3개 초가변

영역들 및 중쇄의 3개 추가변 영역들은 3차원적 공간에서 서로 상대적으로 배치되어 항원 결합 표면을 형성한다. 항원 결합 표면은 결합된 항원의 3차원적 표면에 상보적이고, 중쇄 및 경쇄 각각의 3개 추가변 영역들은 "상보성 결정 영역들" 또는 "CDR들"로서 지칭된다. 아미노산은 문헌(Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 문헌(Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) 또는 문헌(Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989))에 따라 각각의 도메인으로 배정된다.

[0458] 본원에서 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. 에피토프성 결정인자는 통상적으로 분자의 화학적 활성 표면 기, 예컨대, 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되고, 통상적으로 특정 3차원적 구조적 특징뿐만 아니라 특정 진화 특징도 갖는다. 예를 들면, 항체는 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 펩티드에 대해 발생할 수 있다. 항체는 해리 상수가  $\leq 1 \mu\text{M}$ , 바람직하게는  $\leq 100 \text{ nM}$ , 가장 바람직하게는  $\leq 10 \text{ nM}$ 일 때 항원에 특이적으로 결합한다고 주장된다.

[0459] 본원에서 사용된 용어 "특이적 결합", "면역학적 결합" 및 "면역학적 결합 성질"은 면역글로불린 분자와 면역글로불린에 대한 특이적 항원 사이에 일어나는 유형의 비-공유 상호작용을 지칭한다. 면역학적 결합 상호작용의 강도 또는 친화성은 상호작용의 해리 상수( $K_d$ )의 관점에서 표현될 수 있고, 이때 보다 작은  $K_d$ 는 보다 큰 친화성을 나타낸다. 선택된 폴리펩티드의 면역학적 결합 성질은 당분야에서 잘 공지된 방법을 이용함으로써 정량될 수 있다. 이러한 한 방법은 항원 결합 부위/항원 복합체 형성 및 해리의 속도를 측정하는 것을 수반하고, 이때 상기 속도는 복합체 파트너의 농도, 상호작용의 친화성, 및 양 방향에서 속도에 동등하게 영향을 미치는 기하학적 파라미터에 달려 있다. 따라서, "결합 속도 상수"( $K_{on}$ ) 및 "해리 속도 상수"( $K_{off}$ ) 둘다가 농도, 및 실제 결합 및 해리 속도의 계산에 의해 측정될 수 있다(문헌(Nature 361:186-87 (1993)) 참조).  $K_{off}/K_{on}$ 의 비는 친화성과 관련되지 않은 모든 파라미터들의 무효화를 가능하게 하고, 해리 상수  $K_d$ 와 동등하다(일반적으로, 문헌(Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473) 참조). 당업자에게 공지된 분석, 예컨대, 방사성리간드 결합 분석 또는 유사한 분석에 의해 측정될 때 평형 결합 상수( $K_d$ )가  $\leq 1 \mu\text{M}$ , 바람직하게는  $\leq 100 \text{ nM}$ , 보다 바람직하게는  $\leq 10 \text{ nM}$ , 가장 바람직하게는  $\leq 100 \text{ pM}$  내지 약  $1 \text{ pM}$ 일 때, 본 발명의 항체는 EGFR에 특이적으로 결합한다고 주장된다.

[0460] 본원에서 사용된 용어 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 게놈, cDNA 또는 합성 유래의 폴리뉴클레오티드, 또는 이들의 일부 조합을 의미할 것이고, 이때 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 그의 기원에 의해 (1) "단리된 폴리뉴클레오티드"가 천연 상태에서 발견되는 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부와 연결되어 있지 않거나, (2) 천연 상태에서 연결되어 있지 않은 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되어 있거나, (3) 보다 큰 서열의 일부로서 천연 상태에서 발생되지 않는다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 본원에 제시된 중쇄 면역글로불린 분자를 코딩하는 핵산 분자, 및 본원에 제시된 경쇄 면역글로불린 분자를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다.

[0461] 용어 "단리된 단백질"은 cDNA, 제조 RNA 또는 합성 유래의 단백질, 또는 이들의 일부 조합물을 의미하고, "단리된 단백질"은 그의 기원 또는 유도화 공급원에 의해 (1) 천연 상태에서 발견되는 단백질과 연결되어 있지 않거나, (2) 동일한 공급원으로부터의 다른 단백질을 갖지 않거나, 예를 들면, 무린 단백질을 갖지 않거나, (3) 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발견되거나, (4) 천연 상태에서 발생되지 않는다.

[0462] 용어 "폴리펩티드"는 천연 단백질, 단편, 또는 폴리펩티드 서열의 유사체를 지칭하기 위한 일반적인 용어로서 본원에서 사용된다. 따라서, 천연 단백질 단편 및 유사체는 폴리펩티드 속의 종이다. 본 발명에 따른 폴리펩티드는 본원에 제시된 중쇄 면역글로불린 분자 및 본원에 제시된 경쇄 면역글로불린 분자뿐만 아니라, 중쇄 면역글로불린 분자 및 경쇄 면역글로불린 분자, 예컨대, 카과 경쇄 면역글로불린 분자를 포함하는 조합물에 의해 형성된 항체 분자(그 역의 경우도 마찬가지임), 및 이들의 단편 및 유사체도 포함한다.

[0463] 객체에 적용될 본원에서 사용된 용어 "천연 발생"은 객체가 천연 상태에서 발견될 수 있다는 사실을 지칭한다. 예를 들면, 천연 상태에서 공급원으로부터 단리될 수 있고 실험실의 인간 또는 다른 방식에 의해 의도적으로 변경되지 않은, 유기체(바이러스를 포함함)에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 천연 발생 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열이다.

[0464] 본원에서 사용된 용어 "작동가능하게 연결된"은 기재된 성분들이 그들의 의도된 방식으로 작용할 수 있게 하는 관계로 위치하는 것을 지칭한다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서

열에 적합한 조건 하에서 달성되는 방식으로 연결된다.

- [0465] 본원에서 사용된 용어 "조절 서열"은 그 자신에 연결된 코딩 서열의 발현 및 프로세싱에 영향을 미치는 데에 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이러한 조절 서열의 성질은 원핵생물에서 숙주 유기체에 따라 상이하고, 이러한 조절 서열은 진핵생물에서 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함하고, 일반적으로 이러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 용어 "조절 서열"은 최소한 그의 존재가 발현 및 프로세싱에 필수적인 모든 성분들을 포함하기 위한 것이고, 그의 존재가 유리한 추가 성분, 예를 들면, 리더 서열 및 융합 파트너 서열도 포함할 수 있다. 본원에서 지칭된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드, 또는 어느 한 유형의 뉴클레오티드의 변경된 형태로 존재하는, 길이에 있어서 10개 이상의 염기를 갖는 뉴클레오티드를 의미한다. 상기 용어는 DNA의 단일 가닥 형태 및 이중 가닥 형태를 포함한다.
- [0466] 본원에서 지칭된 용어 올리고뉴클레오티드는 천연 발생 또는 비-천연 발생 올리고뉴클레오티드 연결에 의해 함께 연결된 천연 발생 뉴클레오티드 및 변경된 뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 길이에 있어서 200개 이하의 염기의 길이를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서브세트이다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드는 길이에 있어서 10개 내지 60개의 염기, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개 내지 40개의 염기를 갖는다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 유전자 돌연변이체의 구축에 사용되는 경우 이중 가닥일 수 있을지라도, 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 프로브의 경우 통상적으로 단일 가닥이다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다.
- [0467] 본원에서 지칭된 용어 "천연 발생 뉴클레오티드"는 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함한다. 본원에서 지칭된 용어 "변경된 뉴클레오티드"는 변경된 또는 치환된 당 기를 갖는 뉴클레오티드 등을 포함한다. 본원에서 지칭된 용어 "올리고뉴클레오티드 연결"은 올리고뉴클레오티드 연결, 예컨대, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐라데이트, 포스포몬미데이트 등을 포함한다. 예를 들면, 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))), 미국 특허 제5,151,510호(Stec et al.), 및 문헌(Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990))을 참조한다. 올리고뉴클레오티드는 원하는 경우 검출을 위한 표지를 포함할 수 있다.
- [0468] 본원에서 사용된 바와 같이, 20개의 보편적인 아미노산들 및 이들의 약어는 보편적인 용법을 따른다. 문헌(Immunology - A Synthesis, 2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991))을 참조한다. 20개의 보편적인 아미노산의 입체이성질체(예를 들면, D-아미노산), 비-천연 아미노산, 예컨대,  $\alpha$ -,  $\alpha$ -이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 젯산, 및 다른 비-보편적인 아미노산도 본 발명의 폴리펩티드에 적합한 성분일 수 있다. 비-보편적인 아미노산의 예로는 4-하이드록시프롤린,  $\gamma$ -카복시글루탐레이트,  $\epsilon$ -N,N-트리메틸라이신,  $\epsilon$ -N-아세틸라이신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신,  $\sigma$ -N-메틸아르기닌, 및 다른 유사한 아미노산 및 이미노산(예를 들면, 4-하이드록시프롤린)이 있다. 본원에서 사용된 폴리펩티드 표기법에서, 표준 용법 및 약정에 따라 좌측 방향은 아미노-말단 방향이고 우측 방향은 카복시-말단 방향이다.
- [0469] 유사하게, 달리 특정되어 있지 않은 한, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 말단은 5' 말단이고, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 방향은 5' 방향으로서 지칭된다. 신생 RNA 전사체의 5'에서 3'으로의 추가 방향은 전사 방향으로서 지칭되고, RNA와 동일한 서열을 갖고 RNA 전사체의 5' 말단에 대해 5' 방향으로 존재하는 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "업스트림 서열"로서 지칭되고, RNA와 동일한 서열을 갖고 RNA 전사체의 3' 말단에 대해 3' 방향으로 존재하는 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "다운스트림 서열"로서 지칭된다.
- [0470] 폴리펩티드에 적용될 때, 용어 "실질적인 동일성"은 예컨대, 디폴트 갭 중량을 이용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬되어 있을 때 2개의 펩티드 서열들이 80% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는, 90% 이상의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성, 가장 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 공유한다.
- [0471] 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치들은 보존적 아미노산 치환에 의해 상이하다.

[0472] 본원에서 논의된 바와 같이, 아미노산 서열에서의 변경이 75% 이상, 보다 바람직하게는 80%, 90% 또는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상을 유지하는 경우, 항체 또는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열에서의 미미한 변경은 본 발명에 의해 포괄되는 것으로서 고려된다. 구체적으로, 보존적 아미노산 치환이 고려된다. 보존적 치환은 그들의 측쇄에서 관련되어 있는 아미노산 패밀리 내에서 일어나는 치환이다. 유전적으로 코딩된 아미노산은 일반적으로 하기 패밀리로 나누어진다: (1) 산성 아미노산은 아스파르테이트 및 글루타메이트이고; (2) 염기성 아미노산은 라이신, 아르기닌 및 히스티딘이고; (3) 비-극성 아미노산은 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌 및 트립토판이고; (4) 비하전된 극성 아미노산은 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 스레오닌 및 티로신이다. 친수성 아미노산은 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르테이트, 글루타민, 글루타메이트, 히스티딘, 라이신, 세린 및 스레오닌을 포함한다. 소수성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 티로신 및 발린을 포함한다. 아미노산의 다른 패밀리는 (i) 지방족-하이드록시 패밀리인 세린 및 스레오닌; (ii) 아미드 함유 패밀리인 아스파라긴 및 글루타민; (iii) 지방족 패밀리인 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 및 (iv) 방향족 패밀리인 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함한다. 예를 들면, 이소류신 또는 발린에 의한 류신의 단리된 치환, 글루타메이트에 의한 아스파르테이트의 단리된 치환, 세린에 의한 스레오닌의 단리된 치환, 또는 구조적으로 관련된 아미노산에 의한 아미노산의 유사한 치환은, 특히 이 치환이 골격 부위 내의 아미노산을 수반하지 않는 경우 발생된 분자의 결합 또는 성질에 중요한 영향을 미치지 않을 것임을 예상하는 것이 타당하다. 아미노산 변화가 기능성 펩티드를 발생시키는 지는 폴리펩티드 유도체의 특이적 활성을 분석함으로써 용이하게 확인될 수 있다. 분석은 본원에 상세히 기재되어 있다. 항체 또는 면역글로불린 분자의 단편 또는 유사체는 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 단편 또는 유사체의 바람직한 아미노-말단 및 카복시-말단은 기능성 도메인의 경계 근처에 존재한다. 구조적 및 기능적 도메인은 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 데이터와 공유 또는 사유 서열 데이터베이스의 비교에 의해 확인될 수 있다. 바람직하게는, 전산화된 비교 방법을 이용하여 공지된 구조 및/또는 기능의 다른 단백질에 존재하는 서열 모티프 또는 예측된 단백질 입체구조 도메인을 확인할 수 있다. 공지된 3차원 구조로 폴딩되는 단백질 서열을 확인하는 방법은 공지되어 있다(Bowie et al. Science 253:164 (1991)). 따라서, 상기 예는 당업자가 본 발명에 따라 구조적 및 기능적 도메인을 정의하는 데에 사용될 수 있는 서열 모티프 및 구조적 입체구조를 인식할 수 있다는 것을 입증한다.

[0473] 바람직한 아미노산 치환은 (1) 단백질용해에 대한 민감성을 감소시키는 치환, (2) 산화에 대한 민감성을 감소시키는 치환, (3) 단백질 복합체의 형성에 대한 결합 친화성을 변경시키는 치환, (4) 결합 친화성을 변경시키는 치환, 및 (5) 이러한 유사체의 다른 물리화학적 또는 기능적 성질을 부여하거나 변경시키는 치환이다. 유사체는 천연 발생 펩티드 서열 이외의 서열의 다양한 돌연변이체들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 단일 또는 다수의 아미노산 치환(바람직하게는 보존적 아미노산 치환)이 천연 발생 서열(바람직하게는 분자간 접촉을 형성하는 도메인(들) 외부의 폴리펩티드 부분)에서 만들어질 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 모 서열의 구조적 특징을 실질적으로 변경시키지 않아야 한다(예를 들면, 치환 아미노산은 모 서열에 존재하는 나선을 분해하거나 모 서열을 특징짓는 다른 유형의 이차 구조를 파괴하는 경향을 나타내지 않아야 한다). 당분야에서 인정된 폴리펩티드 이차 구조 및 삼차 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.

[0474] 본원에서 사용된 용어 "폴리펩티드 단편"은 아미노-말단 및/또는 카복시-말단 결실 및/또는 하나 이상의 내부 결실(들)을 갖되, 나머지 아미노산 서열이 예를 들면, 전장 cDNA 서열로부터 유추된 천연 발생 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 폴리펩티드를 지칭한다. 단편은 전형적으로 길이에 있어서 5개, 6개, 8개 또는 10개 이상의 아미노산, 바람직하게는 길이에 있어서 14개 이상의 아미노산, 보다 바람직하게는 길이에 있어서 20개 이상의 아미노산, 통상적으로 길이에 있어서 50개 이상의 아미노산, 훨씬 더 바람직하게는 길이에 있어서 70개 이상의 아미노산을 갖는다. 본원에서 사용된 용어 "유사체"는 유추된 아미노산 서열의 부분에 대한 실질적인 동일성을 갖고 적합한 결합 조건 하에서 EGFR에 특이적으로 결합하는, 25개 이상의 아미노산으로 구성된 절편으로 구성된 폴리펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 폴리펩티드 유사체는 천연 발생 서열에 대한 보존적 아미노산 치환(또는 추가 또는 결실)을 포함한다. 유사체는 전형적으로 길이에 있어서 20개 이상의 아미노산, 바람직하게는 길이에 있어서 50개 이상의 아미노산 또는 보다 더 긴 길이를 갖고, 종종 전장 천연 발생 폴리펩티드만큼 길 수 있다.

[0475] 용어 "물질(작용제)(agent)"은 본원에서 화합물, 화합물들의 혼합물, 생물학적 거대분자, 또는 생물학적 물질로부터 만들어진 추출물을 표시하기 위해 사용된다.

- [0476] 본원에서 사용된 용어 "표지(label)" 또는 "표지된"은 검출가능한 마커를 도입하는 것, 예를 들면, 방사성표지된 아미노산을 도입하는 것, 또는 표지된 아비딘에 의해 검출될 수 있는 바이오티닐 모이어티(예를 들면, 광학 또는 비색 방법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙타비딘)를 폴리펩티드에 부착시키는 것을 지칭한다. 특정 경우, 표지 또는 마커는 치료제일 수도 있다. 폴리펩티드 및 당단백질을 표지하는 다양한 방법들이 당분야에서 공지되어 있고 이용될 수 있다. 폴리펩티드를 위한 표지의 예로는 하기 표지들이 있으나 이들로 한정되지 않는다: 방사성동위원소 또는 방사성핵종(예를 들면, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), 형광 표지(예를 들면, FITC, 로다민, 란타나이드 포스포르스), 효소 표지(예를 들면, 호스라디쉬 퍼록시다제, p-갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스포타제), 화학발광제, 바이오티닐 기, 및 이차 레포터에 의해 인식되는 예정된 폴리펩티드 에피토프(예를 들면, 류신 지퍼 쌍 서열, 이차 항체를 위한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그). 일부 실시양태에서, 표지는 잠재적인 입체장애를 감소시키기 위해 다양한 길이의 스페이서 아암에 의해 부착된다. 본원에서 사용된 용어 "약제 또는 약물"은 환자에게 적절하게 투여되었을 때 원하는 치료 효과를 유도할 수 있는 화합물 또는 조성물을 지칭한다.
- [0477] 본원의 다른 화학 용어들은 문헌(The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))에 의해 예시된 바와 같이 당분야의 보편적인 용법에 따라 사용된다.
- [0478] 본원에서 사용된 "실질적으로 순수한"은 객체 종이 존재하는 우세한 종이라는 것을 의미하고(즉, 물을 기준으로 조성물 중의 임의의 다른 개별 종보다 더 풍부하고), 바람직하게는 실질적으로 정제된 분획은 객체 종이 존재하는 모든 거대분자 종들의 (물 기준으로) 약 50% 이상을 차지하는 조성물이다.
- [0479] 일반적으로, 실질적으로 순수한 조성물은 조성물에 존재하는 모든 거대분자 종의 약 80% 이상, 보다 바람직하게는 약 85%, 90%, 95% 또는 99% 이상을 포함한다. 바람직하게는, 객체 종은 본질적인 균질성까지 정제되고(오염 종은 보편적인 검출 방법에 의해 조성물에서 검출될 수 없고), 이때 조성물은 본질적으로 단일 거대분자 종으로 구성된다.
- [0480] 용어 환자는 인간 및 수의학 대상체를 포함한다.
- [0481] 항체
- [0482] 본 발명의 활성화가능한 항체는 인간 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합한다. 본원에 기재된 활성화가능한 항-EGFR 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 활성화가능한 항체도 본 발명에 포함된다.
- [0483] 당업자는 단일클론 항체(예를 들면, 무린 단일클론 또는 인간화된 항체)가 본원에 기재된 방법에서 사용된 단일클론 항체와 EGFR의 결합을 방해하는 지를 확인함으로써 본원에 기재된 방법에서 사용된 단일클론 항체와 동일한 특이성을 갖는 지를 과도한 실험 없이 확인할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 본 발명의 단일클론 항체에 의한 결합에서의 감소에 의해 확인될 때, 시험되는 단일클론 항체가 본 발명의 단일클론 항체와 경쟁하는 경우, 2개의 단일클론 항체들은 동일한 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합한다. 단일클론 항체가 본 발명의 단일클론 항체의 특이성을 갖는 지를 확인하는 대안적인 방법은 본 발명의 단일클론 항체를 EGFR과 함께 예비혼용처리한 후, 시험되는 단일클론 항체가 EGFR에 결합하는 그의 능력에 있어서 억제되는 지를 확인하기 위해 시험되는 단일클론 항체를 첨가하는 것이다. 시험되는 단일클론 항체가 억제되는 경우, 십중팔구 상기 단일클론 항체는 본 발명의 단일클론 항체와 동일한 또는 기능적으로 동등한 에피토프 특이성을 갖는다.
- [0484] 활성화가능한 항-EGFR 항체의 용도
- [0485] 본 발명에 따른 치료제의 투여가 개선된 이송, 전달, 내약성 등을 제공하기 위해 제제 내로 도입되는 적합한 담체, 부형제 및 다른 물질과 함께 투여될 것이라는 것을 인식할 것이다. 다수의 적절한 제제들이 모든 약품 화학자들에게 공지된 처방서(Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975), particularly Chapter 87 by Blaug, Seymour)에서 발견될 수 있다. 이들 제제들은 예를 들면, 산제, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질(양이온성 또는 음이온성) 함유 소포(예컨대, 리포펙틴(Lipofectin)<sup>TM</sup>), DNA 접합체, 무수 흡수 페이스트, 수중유 에멀전 및 유중수 에멀전, 에멀전 카보왁스(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고체 겔, 및 카보왁스를 함유하는 반고체 혼합물을 포함한다. 제제 중의 활성 성분이 제제화에 의해 불활성화되지 않고 제제가 투여 경로에 생리학적으로 적합하고 허용될 수 있다면, 상기 혼합물들 중 임의의 혼합물이 본 발명에 따른 치료 및 요법에서 적합할 수 있다. 문헌(Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000)), 문헌(Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals."

Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000)), 문헌(Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000)), 문헌(Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998)), 및 약품 화학자에게 잘 공지된 제제, 부형제 및 담체와 관련된 추가 정보에 대한 상기 문헌들 내의 인용문헌을 참조한다.

- [0486] 활성화가능한 항-EGFR 항체를 포함하는 본 발명의 치료 제제는 비정상적인 EGFR 발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애를 예방하거나, 치료하거나, 또는 다른 방식으로 호전시키는 데에 사용된다. 예를 들면, 활성화가능한 항-EGFR 항체를 포함하는 본 발명의 치료 제제는 암 또는 다른 신생물성 병태를 치료하거나 다른 방식으로 호전시키는 데에 사용된다.
- [0487] 증가된 단백질용해는 암의 특징인 것으로 공지되어 있다(예를 들면, 문헌(Affara NI, et al. "Delineating protease functions during cancer development." Methods Mol Biol. 539 (2009): 1-32) 참조). 종양의 진행, 침습 및 전이는 단백질분해효소가 관여하는 여러 독립적인 과정으로부터 비롯된다. 이 과정은 도 8의 A 및 B에 일반적으로 제시되어 있다.
- [0488] 예방, 호전 또는 치료의 효능은 비정상적인 EGFR 발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애를 진단하거나 치료하는 임의의 공지된 방법과 관련하여 측정된다. 대상체의 생존을 연장하거나 대상체에서 비정상적인 EGFR 발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 장애의 진행을 다른 방식으로 지연시키는 것은 활성화가능한 항체가 임상 이익을 부여한다는 것을 표시한다.
- [0489] 활성화가능한 항-EGFR 항체는 약학 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 이러한 조성물의 제조와 관련된 원리 및 고려사항뿐만 아니라 성분들의 선택에 있어서의 지침도 예를 들면, 문헌(Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995); 문헌 (Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994); 및 문헌(Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York)에서 제공되어 있다.
- [0490] 활성화가능한 항체 단편이 사용되는 경우, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 가장 작은 단편이 바람직하다. 예를 들면, 항체의 가변 영역 서열을 기초로 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하는 펩티드 분자를 디자인할 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성될 수 있고/있거나 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다(예를 들면, 문헌(Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)) 참조). 제제는 치료되는 특정 적응증을 위해 필요한 경우 하나 초과와 활성화 화합물들, 바람직하게는 서로 불리하게 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 활성화 화합물들을 함유할 수도 있다. 대안적으로 또는 추가로, 조성물은 그의 기능을 향상시키는 물질, 예컨대, 세포독성 물질, 사이토카인, 화학치료제 또는 성장억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자들은 적합하게는 의도된 목적에 효과적인 양으로 함께 존재한다.
- [0491] 활성 성분은 예를 들면, 코아세르베이션 기법 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면, 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐; 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들면, 리포솜, 알부민 마이크로캡슐, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐); 또는 마크로에멀전 내에 포획될 수도 있다.
- [0492] 생체내 투여를 위해 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이것은 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.
- [0493] 지속 방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예로는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 있고, 이 매트릭스는 성형된 제품, 예를 들면, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태로 존재한다. 지속 방출 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 하이드로겔(예를 들면, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드(미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과  $\gamma$  에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 젯산-글리콜산 공중합체, 예컨대, 루프로프 데포(LUPRON DEPO T)<sup>TM</sup>(젯산-글리콜산 공중합체 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로캡슐), 및 폴리-D-( $\alpha$ )-3-하이드록시부티르산이 있다. 중합체, 예컨대, 에틸렌-비닐 아세테이트 및 젯산-글리콜산이 100일에 걸쳐 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 하이드로겔들은 보다 짧은 시간 동안 단백질을 방출한다.
- [0494] 일부 실시양태에서, 활성화가능한 항체는 검출가능한 표지를 함유한다. 온전한 항체 또는 이의 단편(예를 들면, Fab, scFv 또는 F(ab)<sub>2</sub>)이 사용된다. 프로브 또는 항체와 관련하여 용어 "표지된"은 검출가능한 물질과 프로브 또는 항체의 커플링(즉, 물리적 연결)에 의한 프로브 또는 항체의 직접적인 표지 부착뿐만 아니라, 직접적으로

표지된 또 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접적인 표지 부착도 포괄하기 위한 것이다. 간접적인 표지 부착의 예로는 형광 표지된 이차 항체를 사용하여 일차 항체를 검출하는 것, 및 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있도록 DNA 프로브를 바이오틴으로 말단 표지 부착하는 것을 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 대상체로부터 단리된 조직, 세포 및 생물학적 체액뿐만 아니라 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 체액도 포함하기 위한 것이다. 따라서, 혈액, 및 혈청, 혈장 또는 림프를 포함하는 혈액의 분획 또는 성분이 용어 "생물학적 샘플"의 사용 내에 포함된다. 즉, 본 발명의 검출 방법은 시험관내에서뿐만 아니라 생체내에서도 생물학적 샘플에서 분석물 mRNA, 단백질 또는 게놈 DNA를 검출하는 데에 이용될 수 있다. 예를 들면, 분석물 mRNA의 검출을 위한 시험관내 기법은 노던 혼성화 및 제자리 혼성화를 포함한다. 분석물 단백질의 검출을 위한 시험관내 기법은 효소 연결된 면역흡착 분석(ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전, 면역화학적 염색, 및 면역형광을 포함한다. 분석물 게놈 DNA의 검출을 위한 시험관내 기법은 서던 혼성화를 포함한다. 면역분석을 수행하기 위한 절차는 예를 들면, 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. 나아가, 분석물 단백질의 검출을 위한 생체내 기법은 표지된 항-분석물 단백질 항체를 대상체 내로 도입하는 것을 포함한다. 예를 들면, 항체는 대상체에서의 그의 존재 및 위치가 표준 영상화 기법에 의해 검출될 수 있는 방사성 마커로 표지될 수 있다.

[0495] 진단 및 예방 제제

[0496] 본 발명의 항-EGFR 항체 및/또는 활성화가능한 항-EGFR 항체는 진단 및 예방 제제에서 사용된다. 한 실시양태에서, 항-EGFR 항체 및/또는 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전술된 암들 중 하나 이상 또는 다른 장애를 발생시킬 위험에 있는 환자에게 투여된다. 전술된 장애들 중 하나 이상에 대한 환자 또는 장기의 소인은 유전형, 혈청학적 또는 생화학적 마커의 사용을 통해 확인될 수 있다.

[0497] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 항-EGFR 항체 및/또는 활성화가능한 항-EGFR 항체는 전술된 장애들 중 하나 이상과 관련된 임상 적응증으로 진단받은 인간 개체에게 투여된다. 진단 시, 항-EGFR 항체 및/또는 활성화가능한 항-EGFR 항체는 임상 적응증의 효과를 경감시키거나 역전시키기 위해 투여된다.

[0498] 본 발명의 항체 및/또는 활성화가능한 항체는 환자 샘플에서의 EGFR의 검출에서도 유용하므로 진단제로서 유용하다. 예를 들면, 본 발명의 항-EGFR 항체 및/또는 활성화가능한 항-EGFR 항체는 환자 샘플에서 EGFR 수준을 검출하기 위해 시험관내 분석, 예를 들면, ELISA에서 사용된다.

[0499] 한 실시양태에서, 본 발명의 항-EGFR 항체 및/또는 활성화가능한 항-EGFR 항체는 고체 지지체(예를 들면, 마이크로타이터 플레이트의 웰(들)) 상에 고정된다. 고정된 항체 및/또는 활성화가능한 항체는 시험 샘플에 존재할 수 있는 임의의 EGFR에 대한 포획 항체로서 작용한다. 고정된 항체를 환자 샘플과 접촉시키기 전, 고체 지지체를 세정하고 차단제, 예컨대, 유단백질 또는 알부민으로 처리하여 분석물의 비-특이적 흡착을 방지한다.

[0500] 그 후, 웰을 항원을 함유하는 것으로 의심되는 시험 샘플, 또는 표준 양의 항원을 함유하는 용액으로 처리한다. 이러한 샘플은 예를 들면, 병적 상태로 진단되는 것으로 간주되는 수준의 순환하는 항원을 갖는 것으로 의심되는 대상체의 혈청 샘플이다. 시험 샘플 또는 표준물을 세정한 후, 고체 지지체를 검출가능하게 표지된 이차 항체로 처리한다. 표지된 이차 항체는 검출 항체로서 작용한다. 검출가능한 표지의 수준을 측정하고, 시험 샘플 중의 EGFR 항원의 농도를 표준 샘플로부터 발생된 표준 곡선과 비교함으로써 측정한다.

[0501] 시험관내 진단 분석에서 본 발명의 항-EGFR 항체를 사용하여 수득한 결과에 근거할 때, EGFR 항원의 발현 수준을 기초로 대상체에서 질환을 병기분류할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 주어진 질환에 대해, 질환의 진행에 있어서 다양한 병기에 있고/있거나 질환의 치유적 치료에 있어서 다양한 시점에 있는 것으로서 진단된 대상체로부터 혈액 샘플을 채취한다. 진행 또는 치료의 각 단계에 대한 통계적으로 유의한 결과를 제공하는 샘플 집단을 사용하여 각 단계의 특징으로서 간주될 수 있는 항원의 농도 범위를 지정한다.

[0502] 항-EGFR 항체 및/또는 활성화가능한 항-EGFR 항체는 진단 및/또는 영상화 방법에서 사용될 수도 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 시험관내 방법이다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 생체내 방법이다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 제자리 방법이다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 생체외 방법이다. 예를 들면, 효소적으로 절단가능한 CM을 갖는 활성화가능한 항-EGFR 항체는 CM을 절단할 수 있는 효소의 존재 또는 부재를 검출하는 데에 사용될 수 있다. 이러한 활성화가능한 항-EGFR 항체는 주어진 세포에서 또는 주어진 숙주 유기체의 조직에서 활성화된 항-EGFR 항체(즉, 활성화가능한 항-EGFR 항체의 절단으로부터 발생된 항체)의 측정된 축적을

통한 효소 활성화(또는 일부 실시양태에서, 증가된 환원력의 환경, 예컨대, 이황화 결합의 환원을 제공할 수 있는 환경)의 (예를 들면, 정성적 또는 정량적) 생체내 검출을 포함할 수 있는 진단에서 사용될 수 있다. 활성화된 항-EGFR 항체의 이러한 축적은 조직이 효소 활성화(또는 CM의 성질에 따라 증가된 환원력)를 발현한다는 것뿐만 아니라 조직이 활성화된 항체에 결합하는 표적을 발현한다는 것도 시사한다.

[0503] 예를 들면, CM은 종양의 부위, 생물학적으로 국한된 부위(예를 들면, 농양, 장기 등)에서의 바이러스 또는 세균 감염의 부위 등에서 발견된 단백질분해효소에 대한 단백질분해효소 기질이라도 선택될 수 있다. AB는 표적 항원에 결합하는 AB일 수 있다. 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 검출가능한 표지(예를 들면, 형광 표지, 방사성 표지 또는 방사성 추적자)를 항-EGFR 항체 및/또는 활성화가능한 항-EGFR 항체의 AB 또는 다른 영역에 접합시킬 수 있다. 적합한 검출가능한 표지는 상기 스크리닝 방법과 관련하여 논의되어 있고, 추가 구체적인 예는 하기 제공되어 있다. 관심있는 질환 조직에서 상승된 활성을 갖는 단백질분해효소와 함께 질환 상태의 단백질 또는 펩티드에 대해 특이적인 AB를 사용할 때, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 CM 특이적 효소가 검출가능한 수준으로 존재하지 않거나, 질환 조직에서의 수준보다 더 낮은 수준으로 존재하거나, 또는 불활성 형태(예를 들면, 자이모겐 형태 또는 억제제와의 복합체)로 존재하는 조직에 비해 상대적으로 질환 조직에 대한 증가된 결합물을 나타낼 것이다. 작은 단백질 및 펩티드는 신장 여과 시스템에 의해 혈액으로부터 신속히 제거되고 CM에 대해 특이적인 효소는 검출가능한 수준으로 존재하지 않기 때문에(또는 비-질환 조직에서 보다 낮은 수준으로 존재하거나 불활성 입체구조로 존재하기 때문에), 질환 조직에서의 활성화된 항-EGFR 항체의 축적은 비-질환 조직에 비해 상대적으로 향상된다.

[0504] 또 다른 예에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 샘플 중의 절단체의 존재 또는 부재를 검출하는 데에 사용될 수 있다. 예를 들면, 활성화가능한 항-EGFR 항체가 효소에 의한 절단에 민감한 CM을 함유하는 경우, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 샘플 중의 효소의 존재를 (정성적으로 또는 정량적으로) 검출하는 데에 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체가 환원제에 의한 절단에 민감한 CM을 함유하는 경우, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 샘플 중의 환원 조건의 존재를 (정성적으로 또는 정량적으로) 검출하는 데에 사용될 수 있다. 이들 방법들에서 분석을 용이하게 하기 위해, 활성화가능한 항체를 검출가능하게 표지할 수 있고 지지체(예를 들면, 고체 지지체, 예컨대, 슬라이드 또는 비드)에 결합시킬 수 있다. 검출가능한 표지를 절단 후 방출되지 않는 활성화가능한 항-EGFR 항체의 부분 상에 위치시킬 수 있다(예를 들면, 검출가능한 표지는 절단이 일어날 때까지 검출될 수 없는 소광된 형광 표지 또는 다른 표지일 수 있다). 예를 들면, 절단이 일어나기에 충분한 시간 동안, 고정된 검출가능하게 표지된 활성화가능한 항-EGFR 항체를, 효소 및/또는 환원제를 함유하는 것으로 의심되는 샘플과 접촉시킨 후, 세척하여 과량의 샘플 및 오염물질을 제거함으로써 분석을 수행할 수 있다. 그 다음, 샘플과 접촉시키기 전 활성화가능한 항-EGFR 항체의 검출가능한 신호에서의 변화, 예를 들면, 샘플 중의 절단체에 의한 활성화가능한 항체의 절단으로 인한 검출가능한 신호의 존재 및/또는 증가로 샘플 중의 절단체(예를 들면, 효소 또는 환원제)의 존재 또는 부재를 평가한다.

[0505] 이러한 검출 방법은 절단될 때 활성화가능한 항-EGFR 항체의 AB에 결합할 수 있는 표적의 존재 또는 부재의 검출도 제공하도록 개조될 수 있다. 따라서, 분석은 절단체의 존재 또는 부재 및 관심있는 표적(EGFR)의 존재 또는 부재를 평가하도록 개조될 수 있다. 절단체의 존재 또는 부재는 전술된 바와 같이 활성화가능한 항-EGFR 항체의 검출가능한 수준의 존재 및/또는 증가에 의해 검출될 수 있고, 표적의 존재 또는 부재는 표적-AB 복합체의 검출, 예를 들면, 검출가능하게 표지된 항-표적 항체의 사용에 의해 검출될 수 있다.

[0506] 활성화가능한 항-EGFR 항체는 예를 들면, 단백질분해효소 절단 및 특정 표적에의 결합에 의한 활성화가능한 항체 활성화의 검증을 위한 제자리 영상화에서도 유용하다. 제자리 영상화는 생물학적 샘플, 예컨대, 세포 배양물 또는 조직 박편에서 단백질용해 활성 및 표적의 위치확인을 가능하게 하는 기법이다. 이 기법을 이용하여 검출가능한 표지(예를 들면, 형광 표지)의 존재를 기초로 주어진 표적과의 결합 및 단백질용해 활성 둘다를 확인할 수 있다.

[0507] 이들 기법들은 질환 부위(예를 들면, 종양 조직)로부터 유래된 임의의 동결된 세포 또는 조직, 또는 건강한 조직을 사용할 때 유용하다. 이들 기법들은 새로 채취된 세포 또는 조직 샘플을 사용할 때에도 유용하다.

[0508] 이들 기법들에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 검출가능한 표지로 표지된다. 검출가능한 표지는 형광 염료(예를 들면, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민 이소티오시아네이트(TRITC), 근적외선(NIR) 염료(예컨대, Qdot<sup>®</sup> 나노결정), 콜로이드성 금속, 랩텐, 방사성 마커, 바이오틴 및 증폭 시약, 예컨대, 스트렙타비딘, 또는 효소(예를 들면, 호스라디쉬 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제)일 수 있다.

[0509] 표지된 활성화가능한 항-EGFR 항체와 함께 항온처리된 샘플에서의 표지의 검출은 상기 샘플이 표적, 즉 EGFR을

함유하고 활성화가능한 항-EGFR 항체의 CM에 대해 특이적인 단백질분해효소를 함유한다는 것을 시사한다. 일부 실시양태에서, 넓은 스펙트럼 단백질분해효소 억제제, 본원에 기재된 단백질분해효소 억제제를 사용하고/하거나, 단백질분해효소에 대해 특이적인 물질, 예를 들면, 항체, 예컨대, 단백질분해효소 매트립타제(MT-SP1)에 대해 특이적이고 MT-SP1의 단백질분해효소 활성을 억제하는 A11을 사용함으로써 단백질분해효소의 존재를 확인할 수 있다(예를 들면, 2010년 11월 11일자로 공개된 국제 특허출원 공보 제WO 2010/129609호 참조). 넓은 스펙트럼 단백질분해효소 억제제, 예컨대, 본원에 기재된 단백질분해효소 억제제를 사용하고/하거나 보다 선택적인 억제제를 사용하는 동일한 방식을 이용하여 활성화가능한 항-EGFR 항체의 CM에 대해 특이적인 단백질분해효소 또는 단백질분해효소의 클래스를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적에 대해 특이적인 물질, 예를 들면, 또 다른 항-EGFR 항체를 사용하여 표적의 존재를 확인할 수 있거나, 검출가능한 표지를 비-표지된 EGFR과 경쟁시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-표지된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 표지된 이차 항체 또는 보다 복잡한 검출 시스템에 의한 검출과 함께 사용될 수 있다.

[0510] 유사한 기법이 생체내 영상화에서도 유용하고, 이때 대상체, 예를 들면, 인간을 포함하는 포유동물에서 형광 신호의 검출은 질환 부위가 표적, 즉 EGFR을 함유하고 활성화가능한 항-EGFR 항체의 CM에 대해 특이적인 단백질분해효소를 함유한다는 것을 시사한다.

[0511] 이들 기법들은 활성화가능한 항-EGFR 항체의 단백질분해효소 특이적 CM을 기초로 다양한 세포, 조직 및 유기체에서 단백질분해효소 활성을 검출하거나, 확인하거나 특징구명하기 위한 키트 및/시약에서도 유용하다.

[0512] 일부 실시양태에서, 제자리 영상화 및/또는 생체내 영상화는 치료할 환자를 확인하는 방법에서 유용하다. 예를 들면, 제자리 영상화에서, 활성화가능한 항-EGFR 항체를 사용하여 환자 샘플을 스크리닝함으로써 적절한 위치, 예를 들면, 중앙 부위에서 적절한 단백질분해효소(들) 및 표적(들)을 갖는 환자를 확인한다.

[0513] 일부 실시양태에서, 제자리 영상화를 이용하여 본 개시내용의 항-EGFR 활성화가능한 항체로 치료하기에 적합한 환자 집단을 확인하거나 다른 방식으로 구별한다. 예를 들면, 표적(예를 들면, EGFR), 및 시험되는 항-EGFR 활성화가능한 항체의 절단가능한 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는(예를 들면, 질환 부위에서 활성화된 항체를 추적하는) 단백질분해효소 둘다에 대해 양성 판정을 받은 환자는 이러한 CM을 포함하는 이러한 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합한 후보자로서 확인된다. 마찬가지로, 이들 방법들을 이용하여 표적(예를 들면, EGFR), 및 시험되는 활성화가능한 항체의 CM에서 기질을 절단하는 단백질분해효소 중 어느 하나 또는 둘다에 대한 음성을 나타내는 것으로 시험되는 환자는 또 다른 형태의 치료에 적합한(즉, 시험되는 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합하지 않은) 후보자로서 확인된다. 일부 실시양태에서, 제1 항-EGFR 활성화가능한 항체에 대한 음성을 나타내는 것으로 시험되는 이러한 환자는 치료에 적합한 항-EGFR 활성화가능한 항체가 확인될 때까지 상이한 CM을 포함하는 다른 항-EGFR 활성화가능한 항체(예를 들면, 질환 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 항-EGFR 활성화가능한 항체)로 치료될 수 있다.

[0514] 일부 실시양태에서, 생체내 영상화를 이용하여 본 개시내용의 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합한 환자 집단을 확인하거나 다른 방식으로 구별한다. 예를 들면, 표적(예를 들면, EGFR), 및 시험되는 항-EGFR 활성화가능한 항체의 절단가능한 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는(예를 들면, 질환 부위에서 활성화된 항체를 추적하는) 단백질분해효소 둘다에 대해 양성 판정을 받은 환자는 이러한 CM을 포함하는 이러한 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합한 후보자로서 확인된다. 마찬가지로, 음성을 나타내는 것으로 시험되는 환자는 또 다른 형태의 치료에 적합한(즉, 시험되는 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합하지 않은) 후보자로서 확인된다. 일부 실시양태에서, 제1 항-EGFR 활성화가능한 항체에 대한 음성을 나타내는 것으로 시험되는 이러한 환자는 치료에 적합한 항-EGFR 활성화가능한 항체가 확인될 때까지 상이한 CM을 포함하는 다른 항-EGFR 활성화가능한 항체(예를 들면, 질환 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 항-EGFR 활성화가능한 항체)로 치료될 수 있다.

[0515] 약학 조성물

[0516] 본 발명의 활성화가능한 항-EGFR 항체(본원에서 "활성 화합물"로서도 지칭됨), 및 이의 유도체, 단편, 유사체 및 상동체는 투여에 적합한 약학 조성물 내로 도입될 수 있다. 이러한 조성물은 전형적으로 활성화가능한 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 약학 투여에 적합한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 향균제, 항진균제, 등장제, 흡수 지연제 등을 포함하기 위한 것이다. 적합한 담체는 본원에 참고로 도입되는, 이 분야의 표준 참고교재인 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences)의 가장 최근 개정판에 기재되어 있다. 이러한 담체 또는 희석제의 바람직한 예로는 물, 식염수, 링거용액, 텍스트로스 용액 및 5% 인간 혈청 알부민이 있으나, 이들로 한정되지 않는다. 리포솜 및 비-수성 비히클,

예컨대, 고정유도 사용될 수 있다. 약학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 물질의 사용은 당분야에서 잘 공지되어 있다. 임의의 보편적인 매질 또는 물질이 활성 화합물과 상용될 수 없는 경우를 제외하고, 조성물에서의 그의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물도 조성물 내로 도입될 수 있다.

[0517] 본 발명의 약학 조성물은 그의 의도된 투여 경로에 적합하도록 제제화된다. 투여 경로의 예로는 비경구, 예를 들면, 정맥내, 피내, 피하, 경구(예를 들면, 흡입), 경피(즉, 국소), 경점막 및 직장 투여가 있다. 비경구, 피내 또는 피하 적용을 위해 사용되는 용액 또는 현탁액은 하기 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대, 주사용수, 식염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항균제, 예컨대, 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 향산화제, 예컨대, 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이팅제, 예컨대, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA); 완충제, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트; 및 긴장성 조절용 물질, 예컨대, 염화나트륨 또는 텍스트로스. pH는 산 또는 염기, 예컨대, 염산 또는 수산화나트륨에 의해 조절될 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기, 또는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 다회 용량 바이알 내에 봉입될 수 있다.

[0518] 주사 용도에 적합한 약학 조성물은 멸균 수성 용액(수용성인 경우) 또는 분산액, 및 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체는 생리식염수, 정균수, 크레모포르 EL™(바스프(BASF), 미국 뉴저지주 파시파니 소재) 또는 포스페이트 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우, 조성물은 멸균되어야 하고 용이한 주사가 가능성이 존재할 정도로 유체이어야 한다. 상기 조성물은 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 하고 미생물, 예컨대, 세균 및 진균의 오염 작용으로부터 보호되어야 한다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리에틸렌(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면, 코팅제, 예컨대, 레시틴의 사용, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우, 등장제, 예를 들면, 당, 폴리알코올, 예컨대, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0519] 멸균 주사 용액은 요구되는 경우 상기 나열된 성분들 중 하나 또는 이들 성분들의 조합물과 함께 요구되는 양의 활성 화합물을 적절한 용매에 도입시킨 후 멸균 여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 나열된 성분들로부터의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 활성 화합물을 도입함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 미리 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가 원하는 성분으로 구성된 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조이다.

[0520] 경구 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 이 조성물은 젤라틴 캡슐 내로 봉입될 수 있거나 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료 투여를 목적으로, 활성 화합물은 부형제와 함께 도입될 수 있고 정제, 트로치 또는 캡슐제의 형태로 사용될 수 있다. 경구 조성물은 구강세척제로서 사용될 유체 담체를 사용함으로써 제조될 수도 있고, 이때 유체 담체 중의 화합물은 경구 적용되어 구강을 세척하고 뱉어지거나 삼켜진다. 약학적으로 상용가능한 결합제 및/또는 보조제 물질은 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐제, 트로치 등은 하기 성분들 중 임의의 성분, 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대, 미세 결정성 셀룰로스, 검 트라가칸스 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대, 전분 또는 락토스; 붕해제, 예컨대, 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대, 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로테스(Sterotes); 활택제, 예컨대, 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대, 수크로스 또는 사카린; 또는 풍미제, 예컨대, 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 풍미제.

[0521] 흡입에 의한 투여의 경우, 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 기체, 예컨대, 이산화탄소를 함유하는 가압된 용기 또는 분배기, 또는 분사기로부터의 에어로졸 분무의 형태로 전달된다.

[0522] 전신 투여도 경점막 또는 경피 수단에 의해 달성될 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 투과될 장벽에 적합한 침투제가 제제에서 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, 경점막 투여의 경우 세제, 담즙산염 및 푸시드산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 코 분무제 또는 좌제의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물은 당분야에서 일반적으로 공지된 바와 같이 연고, 고약, 겔 또는 크림으로 제제화된다.

[0523] 화합물은 직장 전달을 위한 좌제(예를 들면, 보편적인 좌제 기제, 예컨대, 코코아 버터 및 다른 글리세라이드를

가짐) 또는 체류 관장제의 형태로 제조될 수도 있다.

[0524] 한 실시양태에서, 활성 화합물은 신체로부터의 신속한 제거로부터 화합물을 보호할 담체를 사용하여 예컨대, 이 식물 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 조절 방출 제제로서 제조된다. 생체분해성 생체적합한 중합체, 예컨대, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리젯산이 사용될 수 있다. 이러한 제제의 제조 방법은 당업자에게 자명할 것이다. 물질은 알자 코퍼레이션(Alza Corporation) 및 노바 파마슈티칼스 인코포레이티드(Nova Pharmaceuticals, Inc.)로부터 상업적으로 입수될 수도 있다. 리포솜 현탁액(바이러스 항원에 대한 단일클론 항체와 함께 감염된 세포로 표적화된 리포솜을 포함함)도 약학적으로 허용가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 당업자에게 공지된 방법, 예를 들면, 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0525] 투여의 용이함 및 용량의 균일성을 위해 경구 또는 비경구 조성물을 용량 유닛 제형으로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용된 용량 유닛 제형은 치료될 대상체를 위한 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 분산된 유닛을 지칭하고; 각각의 유닛은 요구되는 약학 담체와 함께 원하는 치료 효과를 생성하기 위해 계산된 예정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 용량 유닛 제형에 대한 요건은 활성 화합물의 독특한 특징 및 달성되어야 하는 구체적인 치료 효과, 및 개체의 치료를 위한 이러한 활성 화합물의 조제 분야의 본질적인 한계에 의해 좌우되고 이들에 직접적으로 의존한다.

[0526] 약학 조성물은 투여에 대한 설명서와 함께 용기, 팩 또는 분배기 내에 포함될 수 있다.

[0527] 본 발명은 특허청구범위에 기재된 본 발명의 범위를 한정하지 않는 하기 실시예에 더 기재될 것이다.

[0528] **실시예**

[0529] **실시예 1. 재료 및 방법**

[0530] 활성화가능한 항-EGFR 항체 발현 및 정제

[0531] 활성화가능한 항-EGFR 항체들 각각의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 cDNA를 변경된 pcDNA3.1 포유동물 발현 벡터(라이프 테크놀로지스(Life Technologies)) 내로 따로 클로닝하였다. 프리스타일(FreeStyle) MAX 형질감염 시약(라이프 테크놀로지스)을 제조자의 설명서에 따라 사용하여 CHO-S 세포(라이프 테크놀로지스)를 각각의 활성화가능한 항-EGFR 항체에 대한 플라스미드로 5일 내지 7일 동안 일시적으로 형질감염시켰다. AKTA 정제기(지이 헬스케어(GE Healthcare))에 커플링된 하이트랩(HiTrap) Mab 셀렉트 슈어(Select Sure) 단백질 A 컬럼(지이 헬스케어)을 사용하여 활성화가능한 항-EGFR 항체를 정제하였다. 정제된 활성화가능한 항-EGFR 항체의 순도 및 균질성을, 각각 환원 조건 및 비-환원 조건 하에서의 SDS-PAGE 및 수퍼덱스(Superdex) 200, 10/300 GL 컬럼(지이 헬스케어)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피로 분석하였다.

[0532] 활성화가능한 항-EGFR 항체 절단을 및 Kcat/Km 측정

[0533] 재조합 인간 uPA 및 MT-SP1(알앤드디 시스템스(R&D Systems); 1.6 내지 100 nM의 최종 농도)을 37°C에서 24시간 동안 50 mM 트리스-HCl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% 트윈-20 및 5 mM 염화칼슘(TBST)에서 500 nM(uPA) 및 2 μM (MT-SP1)의 농도로 항온처리하였다. 5 μl의 샘플을 7 μl의 HT 단백질 익스프레스(Express) 샘플 완충제(칼리퍼 라이프사이언시스(Caliper LifeSciences))에 첨가하고 95°C에서 10분 동안 항온처리하여 반응을 중지시켰다. 샘플을 모세관 전기영동(GXII; 칼리퍼 라이프사이언시스)으로 분석하고, 랩칩(LabChip) GX 소프트웨어(칼리퍼 라이프사이언시스)를 이용하여 절단된 경쇄 및 비절단된 경쇄의 농도를 측정하였다. kcat/Km을 하기 수학적 식을 이용하여 측정하였다:

[0534] 
$$\frac{kcat}{Km} = -\ln(1 - C)/(t * p)$$

[0535] C = 전환된 생성물의 상대적인 부분(절단된 경쇄/절단된 경쇄 + 비절단된 경쇄), t = 시간(초), 및 p = 단백질 분해효소 농도(M). 기질 농도는 Km 미만으로 유지되었고, 단백질분해효소는 과량으로 존재하였다.

[0536] 활성화가능한 항-EGFR 항체의 단백질분해효소 분해/활성화. 본원에서 Pb-1204로서도 지칭되는 3954-1204-C225v4 활성화가능한 항체(100 μg)를 실온에서 4일 동안 하기 다양한 단백질분해효소들과 함께 항온처리하였다: uPA(PBS 중의 50 nM, pH 7.2), MT-SP1(PBS 중의 10 nM, pH 7.2), 또는 레구마인(50 mM MES 및 250 mM NaCl 중의 30 μg/ml, pH 6.0). 세포 증식 및 EGFR 결합 분석을 위해, uPA에 의해 절단된 Pb-1204를 단백질 A 아가로스 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. Pb-1204의 절단을 SDS-PAGE 및 모세관 전기영동(랩칩 GXII; 칼리퍼 라이프

프 사이언시스)으로 분석하였다.

- [0537] 세포 배양 및 증식 분석. H292 인간 폐암 세포(아메리칸 타입 컬처 콜렉션)를 10% 태아 소 혈청(FBS)으로 보충된 RPMI 배지에서 37°C(5% CO<sub>2</sub>)에서 유지하였다. 증식 분석을 위해, 세포를 낮은 혈청 조건(RPMI +1% FBS) 하에서 96웰 플레이트에서 3000개 세포/웰의 밀도로 접종하였다. 다음 날, 항체 또는 활성화가능한 항-EGFR 항체를 표시된 농도로 첨가하고, 세포를 37°C에서 추가 4일 동안 항온처리하였다. 셀-타이터 글로(Cell-Titer Glo)(프로메가(Promega))를 제조자의 설명서에 따라 사용하여 세포 생존력을 측정하였다.
- [0538] EGFR 결합 분석. 96-웰 플레이트(넉크(Nunc))를 행크의 균형잡힌 염 용액(HBSS, pH 7.4, 10 mM 헤페스(Hepe s))에서 EGFR-Fc(50 ng/웰; 알앤디 시스템스)로 코팅하고 1% BSA를 함유하는 HBSS로 차단하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 HBSS/1% BSA에서 표시된 농도의 항체 또는 활성화가능한 항-EGFR 항체와 함께 항온처리하였다. 그 다음, 플레이트를 30분 동안 HBSS에서 호스라디쉬 퍼옥시다제(HRP)-접합된 항-인간 F(ab')<sub>2</sub>(잭슨 이뮤노리서치 라보라토리스(ImmunoResearch Laboratories))와 함께 항온처리하고, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 기질(1-단계 울트라-TMB, 피어스(Pierce))에 이어서 동등한 부피의 1 M 염산을 첨가하여 검출을 수행하였다. 그 다음, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 광학 밀도(OD 450 nm)로서 보고하였다.
- [0539] 일부 경우, 세특시맵 표준 곡선(1 nM 출발 농도, 10점 연속 희석)을 이용하여 상대적인 EGFR 결합을 IgG 농도로 전환하였다. 표준 곡선을 4 파라미터 곡선 상에 피팅하고, 결과를 Elx 800 소프트웨어를 이용하여 내삽하였다.
- [0540] 광학 영상화에 의한 생체내 활성화가능한 항-EGFR 항체 분포의 평가. 12.5 mg/kg의 알렉사 플루오르 750-접합된 활성화가능한 항-EGFR 항체를 HT29 이종이식 종양 보유 마우스에게 복강내로 주사하였다. 영상화하기 1시간 전, 소강된 폐길화된(PEGylated) Cy5.5 기질 프로브(2 nmol)를 마우스에게 정맥내로 주사하였다. 활성화가능한 항-EGFR 항체를 주사한 지 24시간 후, IVIS 스펙트럼/CT 영상화 시스템(칼리퍼 라이프사이언시스)을 이용하여 마우스를 영상화하였다. 절차 동안, 마우스를 37°C에서 기체 마취(5% 이소플루오란) 하에서 유지하였다. 750 nm에서의 영상화를 이용하여 활성화가능한 항-EGFR 항체(예를 들면, 3954-1204-C225v4 또는 3954-1204-C225v5뿐만 아니라, 3954-1204-C225v4 또는 3954-1204-C225v5로부터의 단백질분해효소 기질 서열이 단백질분해효소 절단에 민감하지 않은 서열로 치환되어 있는 Pb-NSUB 구축물)의 측정 수준을 평가하는데, 이는 이 과정에서 표시된 활성화가능한 항-EGFR 항체 구축물의 분포가 항체 활성화 및 EGFR 수용체 결합의 지표이기 때문이다. 680 nm에서의 영상화를 이용하여 종양 조직에서 프로브 활성화 반응속도를 모니터링함으로써 기질 절단의 수준을 평가한다. 최종적으로, 부검을 이용하여 생체의 생체분포를 평가한다.
- [0541] 면역형광. 활성화가능한 항-EGFR 항체를 주사한 지 7일 후, 마우스를 희생시키고 조직 샘플을 절개하여 냉동보존하였다. HT29 이종이식 종양 및 간의 샘플을 -20°C에서 박편화하였다(5 μm). 박편을 알렉사 플루오르 488-접합된 당나귀 항-인간 IgG로 염색하고 DAPI 탈색방지 마운팅 배지로 반대염색하였다. 형광 현미경(올림푸스 IX 81) 및 라이프 사이언스 현미경 세포용 영상화 소프트웨어를 이용하여 염색된 박편을 영상화하였다.
- [0542] 인간 IgG ELISA. 96웰 맥시소프 플레이트(넉크)를 HBSS(인비트로젠(Invitrogen))에서 마우스 항-인간 IgG Fc 항체(50 ng/웰; 잭슨 이뮤노리서치)로 코팅하고 1% BSA를 함유하는 HBSS로 차단하였다. 샘플을 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 그 다음, 플레이트를 30분 동안 HBSS에서 호스라디쉬 퍼옥시다제(HRP)-접합된 항-인간 F(ab')<sub>2</sub>(잭슨 이뮤노리서치 라보라토리스)와 함께 항온처리하고, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 기질(1-단계 울트라-TMB, 피어스)에 이어서 동등한 부피의 1 M 염산을 첨가하여 검출을 수행하였다. 그 다음, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 광학 밀도(OD 450 nm)로서 보고하였다. 세특시맵(1 nM 출발 농도, 10점 연속)을 사용하여 각각의 플레이트에 대한 표준 곡선을 발생시켰다. 표준 곡선을 4 파라미터 곡선 상에 피팅하고, 결과를 Elx 800 소프트웨어를 이용하여 내삽하였다.
- [0543] 면역침전 및 웨스턴 블롯팅. 2 ml 용해 완충제 당 1 g 종양/조직의 비에서 스테인레스 강철 비드 함유 볼렛 블렌더(Bullet Blender) 균질화 튜브(넥스트 어드밴스(Next Advance))를 이용하여 조직 샘플을 용해 완충제(HBSS/2% 트리톤 X-100, 중단 단백질분해효소 억제제 카테일; 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))에서 균질화하였다. 조직 균질화물을 3000xg에서 원심분리하고 상청액을 4°C에서 20,800xg에서 45분 동안 더 원심분리하였다. 조직 용해물을 4°C에서 하룻밤 동안 10 μl 염소 항-인간 IgG Fc 특이적 자기 비드(뱅스 라보라토리스 인코포레이티드(Bangs Laboratories, Inc.))와 함께 즉시 항온처리하였다. 비드를 세척한 후, 변성 조건 하에서(5분, 95°C) 베타-머캅토에탄올(시그마(Sigma), 미국 미조리주 세인트 루이스 소재)을 함유하는 LDS 샘플 완충제(인비트로젠)로 용출하였다. 샘플을 전기영동하고 니트로셀룰로스로 옮기고 HRP-접합된 마우스 항-인간 IgG Fc(잭슨 이뮤노리서치)를 사용하여 블롯팅하였다. 슈퍼시그널 피코(SuperSignal Pico) 화학

발광 기질(써모 피셔 사이언티픽) 및 이미지퀀트(ImageQuant) LAS 4000(지이 헬스케어)을 이용하여 밴드를 가시화하였다.

[0544] 생체내 효능 연구. 잭슨 연구소에서 수행된 생체내 연구는 동물 보호 및 사용 조직위원회(IACUC)에 의해 검토되고 승인되었다. 온코테스트 게엠베하(Oncotest GmbH)에서 수행된 생체내 연구는 독일 소재의 레기에룬그스-프라시디움 프레이부르크(Regierungs-prasidium Freiburg)에 의해 검토되고 승인되었고, 독일 동물 복지법의 지침에 따라 수행되었다.

[0545] 생체내 이종이식 연구. 잭슨 연구소에서 수행된 한 세트의 이종이식 연구에서, 무혈청 배지 중의 매트리지엘™로 1:1 현탁된  $5 \times 10^6$ 개의 NCI-H292 세포(ATCC)를 6주령 내지 8주령의 암컷 NU/J(JAX #2019) 마우스의 우측 뒤쪽 옆구리에 피하 접종하였다. 일단 종양이 측정가능하게 되면, 임상 관찰, 체중 및 디지털 칼리퍼 종양 부피 측정을 매주 3회 수행하였다. 약  $150 \text{ mm}^3$  내지  $200 \text{ mm}^3$ 의 평균 종양 부피를 갖는 코호트(cohort)(12마리/군)에서 동물들을 종양 크기 등급 일치시키고 치료를 시작하였다. 동물을 4주 동안 매주 정맥내로 치료하였다. 연구의 지속기간 동안 종양을 주마다 2회 칼리퍼로 측정하였다. 1시간, 8시간, 24시간 및 72시간에서 군 당 3마리의 마우스들로부터 혈장을  $\text{K}_2\text{EDTA}$  내로 채취하고, 코호트 내의 마우스들 사이에 교대로 혈액을 채취하였다. 군 당 4마리 마우스를 3일째 날에 안락사시키고 종양을 채취하고 분석을 위해 급속 동결시켰다.

[0546] LXFA677 이종이식 모델을 사용하는 또 다른 세트의 이종이식 연구를 온코테스트 게엠베하에서 사전동의 후 일차 환자 물질로부터 확립하였다. 이종이식물을 무흉선 NMRI nu/nu 마우스에서 피하 성장시키고,  $100 \text{ mm}^3$  내지  $300 \text{ mm}^3$ 의 종양 부피에 도달한 후 무작위화하였다. 마우스(12마리/군)를 복강내로 주마다 1회 항체로 치료하고, 종양을 주마다 2회 칼리퍼로 측정하였다. 주마다 1회 군 당 3마리의 마우스들로부터 혈액을 채취하고, 코호트 내의 마우스들 사이에 교대로 혈액을 채취하였다. 군 당 4마리의 마우스를 3일째 날에 안락사시키고, 종양을 채취하고 분석을 위해 급속 동결시켰다.

[0547] 면역조직화학: 이종이식 종양 및 간의 샘플을 박편화하였다( $5 \mu\text{m}$ ). 슬라이드를 탈파라핀화하고 증류수에서 재수화한 후, 시트레이트 완충제(pH 6.0)(써모 사이언티픽)로 회수하였다. 내재성 퍼록시다제를 0.3% 과산화수소로 소광시켰다. 박편을 아비딘/바이오틴 차단 키트(벡터 라보라토리스(Vector Laboratories))에 이어서 3% BSA로 차단하였다. ABC 엘리트 검출 키트(벡터 라보라토리스)를 사용하여 박편을 바이오틴-접합된 당나귀 항-인간 IgG(잭슨) 항체로 염색하고 DAB(피어스 사이언티픽)로 가시화하였다. 슬라이드를 헤마톡실린으로 반대염색하고, 탈수화하고 세정하고 커버 슬립을 덮었다. 명시야 현미경(레이카(Leica) DM750) 및 LAS EZ 소프트웨어(레이카 어플리케이션 스위트(Leica Application Suite))를 이용하여 염색된 박편을 영상화하였다.

[0548] 약동학: 각각의 시점에서 각각의 군에 대한 개별 동물 농도를 폴링하면서 저비율 샘플링을 이용한 비-구획 분석(포에닉스 윈놀린(Phoenix WinNonlin), v 5.2; 파사이트(Pharsight); 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재)을 이용하여 세특시맵 또는 활성화가능한 항-EGFR 항체 농도로부터 혈장 약동학 파라미터를 유도하였다. 값은 추정치의 표준 오차를 갖는 집단 추정치로서 보고된다.

[0549] **실시예 2. 활성화가능한 항-EGFR 항체의 제조**

[0550] 본원에 기재된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 항-EGFR 항체 세특시맵으로부터 유도된 항체 또는 항원 결합 단편을 포함한다. 세특시맵은 대장암 및 두경부암의 치료용으로 승인된 잘 특징규명된 치료 항체이다. 21개 아미노산 길이의 결합 펩티드, 즉 차폐 모이어티를 경쇄의 N-말단에 추가함으로써 본원에서 Pb-1204로서 지칭되는 세특시맵-기초 활성화가능한 항-EGFR 항체를 조작하였다(도 2의 a). uPA, MT-SP1 또는 레구마인 특이적 기질 서열인 8개 잔기 길이의 서열을 보유하는 26개 아미노산 길이의 연결체를 통해 차폐체를 항체에 부착시켰다. Pb-1204 활성화가능한 항체 내의 기질(본원에서 1204 기질 또는 단순히 1204로서 지칭됨)에 대한 다양한 단백질분해효소들(uPA, MT-SP1, 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA) 및/또는 트롬빈)의 효율, 절단을 및 선택성은 도 9a 내지 9d에 제시되어 있다.

[0551] 상이한 단백질분해효소에 의한 Pb-1204의 절단 효율 및 특이성을 평가하였다. Pb-1204는 인간 MT-SP1( $2200 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \pm 470 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), 인간 uPA( $530 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \pm 40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) 및 레구마인에 의해 효율적으로 절단되었다. 그러나, Pb-1204는 tPA 또는 플라스민, ADAM 9, 10 및 17, 칼리크레인 5 및 7에 의해 절단되지 않았다. Pb-1204를 거의 완벽하게 분해하고 SDS-PAGE, 모세관 전기영동 및 N-말단 서열결정으로 분석하였다(도 2의 c 및 도 5의 b). 절단된 생성물의 N-말단 서열은 3개의 단백질분해효소들에 대한 예측된 절단 부위를 나타내었다. MT-SP1 및 uPA는 동일한 P1 부위에서 Pb-1204 기질 서열을 절단하여 동일한 분자량의 경쇄 생성물을 생성하였다. 레구마인

에 의한 절단은 3개의 아미노산만큼 더 짧은, 보다 느리게 이동하는 경쇠를 생성하였다.

[0552] **실시예 3. 활성화가능한 항-EGFR 항체의 시험관내 활성**

[0553] 다음으로, 세특시맵, Pb-1204, 및 uPA에 의해 완전히 분해된 Pb-1204의 상대적인 시험관내 활성을 평가하였다. Pb-1204와 EGFR의 결합은 각각 0.02 nM에 비해 0.36 nM의 겉보기  $K_d$ 를 보이는 세특시맵에 비해 상대적으로 23배 감소되었다(도 5의 c). 완전히 활성화된 Pb-1204의 겉보기  $K_d$ 와 세특시맵의 겉보기  $K_d$ 는 동일하였다(0.02 nM). H292 세포 증식에 대한 Pb-1204의 억제 활성은 세특시맵에 비해 상대적으로 990배 감소되었다(각각  $IC_{50}$  46.6 nM 및 0.05 nM; 도 2의 d). 일단 활성화되면, Pb-1204는 세특시맵에 필적할만한 억제 활성을 보였다( $IC_{50}$  0.07 nM).

[0554] **실시예 4. 활성화가능한 항-EGFR 항체의 생체내 분포**

[0555] Pb-1204를 절단할 수 있는 단백질용해 활성의 생체내 분포를 평가하기 위해, 근적외선 형광 자체-소광 영상화(IQ) 프로브를 사용하였다. Pb-1204의 기질 서열을 보유하는 IQ 프로브(IQ-1204; 도 3a) 및 기질 서열을 갖지 않는 펩티드 연결체를 보유하는 음성 대조군 IQ 프로브(IQ-NSUB)를 HT29 종양 보유 마우스에 주사하였다. 본원에서 사용된 용어 "NSUB"는 글리신 및 세린 잔기를 포함하지만 단백질분해효소 절단에 민감하지 않은 아미노산 기질 서열을 지칭한다. IQ-1204를 주사한 지 1시간 후, 영상화는 종양 부위로 제한된 형광을 보여주었다(도 3b). 형광 표지된 Pb-1204를 주사한 지 48시간 후 이들 마우스들의 동시적인 영상화는 IQ-1204와 동일하고 종양으로 제한된 형광 분포를 나타내었다. IQ-NSUB 및 형광 표지된 Pb-NSUB 음성 대조군을 주사받은 동물에서 형광이 검출되지 않았다. 주사한 지 7일 후, 면역형광 염색을 이용하여 치료된 마우스의 종양 및 간 샘플에서 활성화가능한 항-EGFR 항체의 국소화를 평가하였다. Pb-1204를 주사받은 동물의 종양은 상피 세포 상에서 막 형광 염색을 나타낸 반면, Pb-NSUB를 주사받은 마우스의 종양에서는 염색이 검출되지 않았다(도 3c 및 3d). Pb-1204 또는 Pb-NSUB로 치료된 동물의 간 샘플에서 염색이 검출되지 않았다(도 6의 a 및 b). 이들 결과는 종양 부위와 관련된 단백질용해 활성이 1204 기질 서열을 특이적으로 절단한다는 것을 시사한다. 기질 서열의 절단은 항체가 그의 표적에 결합하여 종양 부위에서 축적되게 한다.

[0556] **실시예 5. 이종이식 모델에서 활성화가능한 항-EGFR 항체의 분석**

[0557] NSCLC 이종이식 모델 H292를 이용하여 EGFR 의존적 종양 성장에 대한 Pb-1204의 효과를 조사하였다. 종양 퇴행이 Pb-1204 치료군 및 세특시맵 대조군 치료군에서 관찰되었다(도 4의 a). 이들 치료군들 사이에 평균 종양 부피는 연구 종결시점(20일째 날)에서 통계적으로 상이하지 않았는데, 이것은 Pb-1204가 세특시맵만큼 효과적이라는 것을 암시한다. 통계적으로 유의한 종양 감소는 Pb-NSUB 대조군으로 치료받은 마우스에서 관찰되지 않았다. 마우스 하위세트(n=4)에서, 마우스를 희생시키고 종양을 절개한 시점인 72시간까지 상이한 기간에서 혈장 샘플을 채취하였다. Pb-1204의 순환 농도가 세특시맵 및 Pb-NSUB 농도보다 더 높을지라도, Pb-1204( $2.2\% \pm 0.2$ ) 및 Pb-NSUB( $3.9\% \pm 0.3$ )의 발생된 EGFR 결합 활성은 세특시맵( $95.6\% \pm 3.5$ ; 도 4의 b)에 비해 미미하였다. 종양에서 발견된 Pb-1204, Pb-NSUB 및 세특시맵의 농도는 동등하였다. 이들 종양들로부터 수득된 용해물의 웨스턴 블롯 분석은 상당한 분율의 Pb-1204가 활성화된 반면, Pb-NSUB가 온전한 불활성화된 상태로 남아있다는 것을 보여주었다. 예측된 바와 같이, 종양에서 발견된 Pb-1204의 EGFR 결합 활성( $51.6\% \pm 0.8$ )은 혈장에서의 그의 활성 또는 Pb-NSUB의 결합 활성( $18.2\% \pm 0.3$ ; 도 4의 c)보다 더 컸다.

[0558] 다음으로, 세특시맵에 비해 상대적인 단회 용량의 Pb-1204의 활성을 환자 유래 비-소세포폐암 종양 이종이식 모델(LXFA677)에서 측정하였다. 활성화가능한 항-EGFR 항체 및 항체는 종양 성장의 억제에 있어서 동등하게 효과적이었다. 21일째 날, 세특시맵은 종양 성장을 96%까지 억제하였고 Pb-1204는 종양 성장을 100%까지 억제하였다(도 4의 d). 동일한 노출( $3331 \mu\text{g/ml} \times \text{일}$ )을 이용하였을 때 연구 전체에 걸쳐 세특시맵의 혈장 농도와 Pb-1204의 혈장 농도는 동등하였다(도 7의 b). 혈장에서의 EGFR 결합 활성의 농도는 세특시맵에 대한 항체의 농도와 동등하였다. 그러나, Pb-1204의 경우, EGFR 결합 활성의 농도는 순환하는 활성화가능한 항-EGFR 항체의 총 농도에 비해 크게 감소되었다. Pb-1204의 EGFR 결합 활성에 대한 노출(1일 내지 28일)( $1214 \mu\text{g/ml} \times \text{일}$ )은 총 활성화가능한 항-EGFR 항체 순환 농도에 대한 노출의 36%를 나타내었다. 치료한 지 72시간 후, 마우스의 하위세트(n=4)로부터 종양을 절개하고 활성화가능한 항-EGFR 항체 및 항체 농도 및 활성에 대해 평가하였다. 종양에서 Pb-1204의 평균 농도는 세특시맵의 농도와 동등하였다. 종양에서 발견된 상당한 분율( $35 \pm 4\%$ )의 활성화가능한 항-EGFR 항체가 EGFR 결합 활성을 나타내었다.

[0559] 요약하건대, 2개의 세균 디스플레이 스크리닝 플랫폼의 개발을 통해 세특시맵에 대한 억제 결합 펩티드, 즉 차

폐제, 및 단백질분해효소 MT-SP1, uPA 및 레구마인에 대한 신규 펩티드 기질을 확인하였다. 신규 펩티드 기질을 보유하는 유연성 펩티드 연결체를 통해 억제 펩티드를 경체의 N-말단에 연결하도록 모 항체를 변경시켰다. 이 활성화가능한 항-EGFR 항체는 Pb-1204로서 명명되었다. Pb-1204의 시험관내 특징구명은 차폐 펩티드가 세특시매파에 비해 활성화가능한 항-EGFR 항체의 활성을 상당히 억제하였다는 것을 보여주었다. 기질 함유 연결체는 MT-SP1, uPA 및 레구마인에 의한 활성화가능한 항-EGFR 항체의 특이적 활성화를 가능하게 하고, 일단 활성화되면, 활성화가능한 항-EGFR 항체는 세특시매파와 동등한 활성을 나타내었다. 생체내에서, Pb-1204는 순환계 및 정상 조직에서 안정한 상태로 유지되었지만, 이종이식 종양에서 효율적으로 활성화되었다. Pb-1204의 특이적 종양 활성화는 세특시매파와 동등한 항-종양 효능을 이끌어내었다.

[0560] 따라서, 본원에 기재된 활성화가능한 항-EGFR 항체는 표적 매개된 독성을 나타내는 대다수의 항체 치료제들의 치료 창(window)을 개선하는 데에 유용하다. 추가로, 활성화가능한 항-EGFR 항체의 사용은 관련된 독성으로 인해 종래 항체들로 고려될 수 없는 표적에 대해 유도된 암 치료제의 개발을 가능하게 함으로써 암 표적 범위를 확장한다.

[0561] 실시예 6. 비-인간 영장류 모델에서 활성화가능한 항-EGFR 항체의 분석

[0562] 세특시매파를 투여받은 인간 및 비-인간 영장류에서 관찰된 독성들 중에는 안면 및 상부 몸통의 구진농포성 발진, 및 건조하고 가려운 피부를 포함하는 피부 발진이 있다. 본원에 기재된 연구에서, 비-인간 영장류 동물 모델을 사용하여 활성화가능한 항-EGFR 항체 3954-1204-C225v5를 평가하였다. 요약하건대, 세특시매파(즉, 비변경된 세특시매파), 3954-1204-C225v5, 또는 Pb-NSUB(즉, 단백질분해효소 절단에 민감하지 않은 NSUB 서열을 포함하는 활성화가능한 항-EGFR 항체인 3954-NSUB-C225v5)를 3마리의 암컷 사이노몰구스 원숭이들로 구성된 3개의 군에 정맥내(IV)로 투약하였다. 40 mg/kg의 적재 용량을 투여한 후(5일에 걸쳐 3회 2시간 간격 관주), 25 mg/kg의 용량을 매주 투여하였다(주 당 2회 2시간 관주). 동물을 5주 기간에 걸쳐 투약한 후(마지막 용량을 32일째 날에 투여하였음), 4주 치료 부재 회복 기간을 두었다. 모든 동물들을 피부 발진에 대해 매일 조사하였다. 또한, 모든 동물들을 임상 화학적 및 조직학적으로 분석하였을 뿐만 아니라 TK 및 면역원성에 대해서도 분석하였다. 도 12 및 표 4에 제시된 바와 같이, 활성화가능한 항-EGFR 항체 3954-1204-C225v5를 투여받은 동물들은 세특시매파를 투여받은 동물들에 비해 검출가능한 발진을 나타내지 않았다. 추가로, 활성화가능한 항-EGFR 항체 3954-1204-C225v5를 투여받은 동물들은 세특시매파를 투여받은 동물들에 비해 감소된 피부 독성을 나타내었다.

표 4

비-인간 영장류에서 관찰된 피부 독성 결과의 요약

25 mg/kg 군	동물 번호	연구일						
		22	25	27	29	32	35	40
세특시매파	WT0101	1	1	1	2	2	2	2
	WT0102 (a)	0	0-1	0	0-1	0-1	0-1	0
	WT0103	1	1	1	2	2	2	1
Pb-NSUB	WT1101	0	0	0	0	0	0	0
	WT1102	0	0	0	0	0	0	0
	WT1103	0	0	0	0	0	0	0
3954-1204-C225v4	WT2101	0	0	0	0	0	0	0
	WT2102	0	0	0	0	0	0	0
	WT2103	0	0	0	0	0	0	0

0 = 홍반 부재  
 1 = 약한 홍반  
 2 = 잘 정의된 홍반  
 3 = 중간 내지 심한 홍반  
 4 = 약한 피사까지 형성의 심한 홍반  
 (a) = 이 동물에서 인지된 “발적”은 다른 2마리의 동물들에서 인지된 “발진”을 대표하지 않았다.

[0563]

[0564] 초기 40 mg/kg의 적재 용량 후 매주 25 mg/kg 투약을 제공받은 사이노몰구스 원숭이의 혈액에서 검출된 세특시매파의 수준과 3954-1204-C225v5의 수준의 비교는 도 13의 A 내지 D에 제시되어 있다.

[0565] 사이노몰구스 원숭이의 피부에서 인간 IgG의 IHC 분석은 피부에서의 세특시매파의 유의한 결합 및 피부에서의 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 검출불가능한 결합을 보여주었다.

- [0566] 시간에 따른 혈청 농도를 비교하는 약동학 연구는 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 반감기가  $6.6 \pm 0.5$ 일인 반면, 세특시맙의 반감기가  $3.2 \pm 0.4$ 일이라는 것을 보여주었다. 세특시맙의 반감기에 비해 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 반감기를 보여주는 예시적인 연구는 도 19에 제시되어 있다. 세특시맙의 반감기는 종래 보고된 값과 유사하였다. 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 약동학은 전신 항원 매개된 제거(정상 조직에서의 EGFR)의 결여와 일치한다.
- [0567] **실시예 7. A11 활성화 부위 항체를 사용한 종양 조직의 영상화 및 면역조직화학 염색**
- [0568] 본원에 기재된 연구는 본원에 기재된 활성화가능한 항-EGFR 항체의 표적 단백질분해효소, 특히 MT-SP1 단백질분해효소가 종양 조직에서 활성을 나타낸다는 것을 입증하도록 디자인되었다.
- [0569] 도 14의 A 내지 C에 나타낸 바와 같이, A11 활성화 부위 항체(Darragh et al., "Tumor detection by imaging proteolytic activity." *Cancer Res.* 70 (2010): 1505-1512)를 사용한 종양 조직의 생체내 영상화 및 면역조직화학(IHC) 염색은 H292 이종이식 모델에서 활성 MT-SP1의 존재를 확인시켜주었다. A11은 매트립타제로서도 공지된 MT-SP1 단백질분해효소의 활성 부위에 특이적으로 결합하는 항체이다.
- [0570] **실시예 8. 항-EGFR 활성화가능한 항체의 제자리 영상화**
- [0571] 본 실시예는 본 개시내용의 항-EGFR 활성화가능한 항체의 활성화 및 결합의 제자리 영상화의 이용을 기술한다. 결과는 본 개시내용의 항-EGFR 활성화가능한 항체가 조직에 의해 발현된 단백질분해효소에 의해 활성화될 수 있고 그 조직 상의 EGFR 표적에 결합할 수 있다는 것을 시사한다.
- [0572] 활성화가능한 항체의 제자리 영상화는 세포 및 조직에서 단백질분해효소 활성을 특징구명하는 유일한 방법을 나타낸다. 이 기술은 활성화가능한 항체를 절단할 수 있는 단백질분해효소를 발현하는 세포 및 조직의 조직학적 박편에서 활성화가능한 항체 활성화 및 표적과의 결합을 검증할 수 있게 한다. 이러한 제자리 방법의 개략도는 도 15에서 제공되어 있다.
- [0573] 활성화된 항체에 의해 인식되는 표적과 함께 위치하는 부위에서 활성화가능한 항체를 절단할 수 있는 세포 또는 조직에 의한 항-EGFR 활성화가능한 항체의 활성화 및 결합의 제자리 영상화(본원에서 제자리 영상화로서도 지칭됨)를 다음과 같이 수행하였다: 동결된 조직 박편을 유리 슬라이드 상에 올려놓았다. 표지된 항-EGFR 활성화가능한 항체(예를 들면, 형광 태그로 표지됨)를 함유하는 용액을 조직에 적용하고, 예를 들면, 실온(약 22°C 내지 24°C)에서 1시간 동안 150 mM NaCl, 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub> 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 50 mM 트리스-HCl 완충제(pH 7.4)인 항온처리 완충제에서 항온처리하였다(약 1  $\mu$ g/ml의 농도의 활성화가능한 항체). 예를 들면, 용액의 pH(예를 들면, 약 pH 7 내지 약 pH 8.5의 범위 내의 pH), 항온처리의 온도(예를 들면, 약 20°C 내지 약 40°C의 범위 내의 온도, 예를 들면, 실온 또는 37°C), 항온처리 시간(예를 들면, 약 15분 내지 약 150분의 범위 내의 시간), 및/또는 활성화가능한 항체 농도(예를 들면, 약 0.05  $\mu$ g/ml 내지 약 10  $\mu$ g/ml의 범위 내의 농도)를 변경시킴으로써 이러한 항온처리의 조건을 조직 박편에서 절단체에 도움이 되도록 조절할 수 있다. 그 다음, 조직을 광범위하게 세척하여 비-결합된 물질을 제거하고 검출가능한 표지를 측정하였다. 예를 들면, 형광 태그가 사용되었을 때, 조직을 형광 현미경으로 관찰하였다. 조직 상에서의 활성화된 항체의 검출은 조직이 활성화가능한 항체를 절단하는 단백질분해효소를 발현하였고 활성화된 항체에 결합되는 EGFR 표적도 발현하였다는 것을 시사하였다.
- [0574] 제자리 영상화를 이용하여 동결된 인간 폐암 조직에서 활성화되어 이 조직에 결합하는 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 능력을 평가하였다. 활성화가능한 항체를 알렉사 플루오르<sup>®</sup> 680(인비트로젠)으로 표지하여 표지된 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5-AF680을 생성하였다. 표지된 활성화가능한 항체를 전술된 바와 같이 동결된 인간 폐암 조직 샘플과 함께 항온처리하였다. 결과는 도 16의 패널 A에 제시되어 있다. 적색 형광 조직 영상은 항-EGFR 활성화가능한 항체의 조직 유래 단백질용해 절단에 의해 활성화된 C225v5 항체의 결합을 입증한다. 도 16의 패널 B에 나타낸 바와 같이, EGFR 항체(단일클론 토끼 항-EGFR 항체, 셀 시그널링(Ce11 Signaling))를 조직에 노출시킴으로써 조직 염색의 동일한 패턴을 검출하였다. 도 16의 패널 C에 나타낸 바와 같이, 패널 A에 나타낸 형광 신호는 조직을 넓은 스펙트럼 억제제 콕테일 세트 III(539134, 이엠디 밀리포어(EMD Millipore), 미국 매사추세츠주 빌러리카 소재) 및 50 mM EDTA의 1:100 희석물로 전처리함으로써 억제되었다. 청색 염색은 DAPI 핵 염색을 나타낸다.
- [0575] 도 17은 3954-1204-C225v5가 광범위한 인간 종양 샘플들에서 활성화될 수 있다는 것을 입증한다. 제2열은 EGFR 항체(단일클론 토끼 항-EGFR 항체, 셀 시그널링)에 의해 검출되었을 때 다양한 인간 암 조직 샘플들에 대한

EGFR 수용체의 발현 수준을 표시한다. 제3열은 항체 A11에 의해 검출되었을 때 다양한 인간 암 조직 샘플들에서 활성 매트립타제(MT-SP1)의 양을 표시한다. 제4열 및 제5열은 세특시맵(Cetux) 조직 염색(제4열)에 비해 EGFR 활성화가능한 항체(제5열)의 제자리 활성화 및 결합의 평가를 나타낸다. 조직 샘플에 결합하는 EGFR, A11 및 세특시맵 항체의 양을 측정하는 염색을 0부터 3+까지 점수화하였다: 0, 염색 부재; 1+(즉, "+"), 약한 염색; 2+(즉, "++"), 중간 염색; 및 3+(즉, "+++"), 강한 염색. 활성화가능한 항체 제자리 영상화 염색 점수화는 세특시맵 항체 염색과의 비교에 기초하고 다음과 같이 정의된다: 0, 염색 부재; 1+(즉, "+"), 모 항체에 비해 약한 염색; 2+(즉, "++"), 모 항체에 비해 중간 염색; 및 3+(즉, "+++"), 모 항체와 유사한 염색. 도 17에 나타난 바와 같이, 높은 수준의 활성 매트립타제가 대장암(CRC) 종양으로부터의 9개 샘플들 중 8개 샘플들에서 관찰되었고, 높은 수준의 활성 매트립타제가 10개 폐암(NSCLC) 종양들 중 5개 종양들로부터의 샘플들에서 관찰되었다. 인접한 건강한 폐 조직으로부터의 샘플들에서는 활성 매트립타제가 관찰되지 않았다.

[0576] 이들 테이터는 본 개시내용의 항-EGFR 활성화가능한 항체, 예컨대, 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5를 사용한 치료에 적합한 환자 집단을 효과적으로 및 효율적으로 확인하거나 다른 방식으로 구별하는 방법에서의 제자리 영상화의 유용성을 암시한다. 예를 들면, 이들 제자리 영상화 기법을 이용하였을 때 표적(예를 들면, EGFR), 및 항-EGFR 활성화가능한 항체의 절단가능한 모이어티(CM)에서 기질을 절단하는 단백질분해효소(예를 들면, MT-SP1) 둘다에 대해 양성 판정을 받은 환자는 시험되는 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합한 후보자로서 확인될 수 있었다. 마찬가지로, 이들 제자리 영상화 기법을 이용하였을 때 표적(예를 들면, EGFR), 및 CM에서 기질을 절단하는 단백질분해효소(예를 들면, MT-SP1) 중 어느 하나 또는 둘다에 대한 음성을 나타내는 것으로 시험되는 환자는 또 다른 형태의 치료에 적합한(즉, 시험되는 항-EGFR 활성화가능한 항체를 사용한 치료에 적합하지 않은) 후보자로서 확인된다. 일부 실시양태에서, 이러한 환자는 치료에 적합한 항-EGFR 활성화가능한 항체가 확인될 때까지 다른 항-EGFR 활성화가능한 항체(예를 들면, 질환의 부위에서 환자에 의해 절단되는 CM을 포함하는 항-EGFR 활성화가능한 항체)로 시험될 수 있다.

[0577] **실시예 9. 물질에 접합된 활성화가능한 항체**

[0578] 본 실시예는 종양 성장을 억제하는 본 개시내용의 활성화가능한 항체-물질 접합체의 능력을 입증한다.

[0579] Val-Cit-기초 연결제(K-lock C5-vc-PAB; 콘코티스 바이오시스템스 코퍼레이션(Concortis Biosystems Corp.), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)를 통해 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5를 합성 항-유사분열 튜블린 중합 억제제인 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)에 접합시켜 활성화가능한 항체-물질 접합체 3954-1204-C225v5-MMAE를 발생시켰다. H292 폐암 세포주 이종이식 마우스 모델을 이용하여 3954-1204-C225v5 및 세특시맵에 비해 상대적인 3954-1204-C225v5-MMAE의 생체내 효능을 시험하였다. 무혈청 배지 중의 매트릭셀™로 1:1 현탁된 5 X 10<sup>6</sup> 개의 NCI-H292 세포(ATCC)를 6주령 내지 8주령의 암컷 NU/J(JAX #2019) 마우스의 우측 뒤쪽 옆구리에 피하 접종하여 H292 이종이식 모델을 확립하였다. 일단 종양이 측정가능하게 되면, 종양 부피 측정을 매주 3회(3X) 수행하였다. 약 150 mm<sup>3</sup> 내지 200 mm<sup>3</sup>의 평균 종양 부피를 갖는 코호트(8마리/군)에서 동물들을 종양 크기 등급 일치시키고 치료제를 0일째 날에 다음과 같이 군들에게 1회 투여하였다: (a) 정맥내로 적용된 12.5 mg/kg 3954-1204-C225v5-MMAE; (b) 정맥내로 적용된 2.5 mg/kg 3954-1204-C225v5-MMAE; (c) 정맥내로 적용된 12.5 mg/kg 리톡산-MMAE(즉, 리톡산-MMAE; 리톡산은 제넨테크(Genentech)(미국 캘리포니아주 샌 프란시스코 소재)로부터 입수가 가능함); (d) 복강내로 적용된 12.5 mg/kg 3954-1204-C225v5; (e) 복강내로 적용된 12.5 mg/kg 세특시맵; 또는 (f) 복강내로 적용된 12.5 mg/kg IVIg. 종양을 연구의 지속기간 동안 매주 2회 칼리퍼로 측정하였다.

[0580] 도 18에 나타난 바와 같이, 투여한 지 28일 후 12.5 mg/kg 세특시맵의 단회 주사(78% 종양 감소; p = 0.000006)와 마찬가지로, 12.5 mg/kg 활성화가능한 항체-물질 접합체 3954-1204-C225v5-MMAE의 단회 주사는 12.5 mg/kg IVIg에 비해 유의한 효능을 나타내었다(92% 종양 감소; p = 0.000003). 3954-1204-C225v5-MMAE의 효능은 28일째 날 이 용량의 세특시맵의 효능보다 유의하게 더 높았다(p=0.03). 28일째 날 보다 낮은 용량(2.5 mg/kg)의 3954-1204-C225v5-MMAE(p=0.007) 및 12.5 mg/kg의 용량의 리톡산-MMAE(p=0.008)의 경우 감소된 효능을 기록하였다. 12.5 mg/kg의 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 경우 통계적으로 유의한 효능이 관찰되지 않았다(28일째 날 p=0.06).

[0581] 12.5 mg/kg의 단회 용량으로 투여되었거나 총 5회 용량을 위해 각각 2.5 mg/kg의 용량(연구기간에 걸쳐 투여된 총 12.5 mg/kg 활성화가능한 항체)으로 매주 2회(0일째 날, 3일째 날, 7일째 날, 10일째 날 및 14일째 날) 투여된 세특시맵과 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5-MMAE의 활성을 비교하기 위해 동일한 H292 이종이식 종양 모델에서 추가 용량 분할 연구를 수행하였다. 이 용량 분할 연구는 H292 이종이식 모델, EGFR 결합 분석, 및 세포 배양 및 증식 분석에 대해 전술된 바와 동일한 대조군(12.5 mg/kg IVIg) 및 방법을 이용하였다. 이 용량 분

할 연구에서, 치료된 마우스에서의 체중 손실의 결여에 의해 입증된 바와 같이, 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5-MMAE는 잘 허용되었다. 단일 대조군 동물을 20% 초과하는 체중 손실을 보이는 23일째 날에 안락사시켰지만, 모든 다른 동물들은 35일째 날까지 생존하였다.

[0582] 유의한 항-종양 활성이 하기 표 5에 제시된 바와 같이 모든 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5-MMAE 및 세특시맵으로 치료된 군에서 관찰되었는데, 하기 표 5에서 100%보다 더 큰 값은 종양 수축을 나타낸다.

표 5

대조 치료군에 비해 상대적인 종양 성장 억제

치료	종양 성장 억제(%)				
	7일	14일	21일	28일	35일
IVIG 25 mg/kg	0%	0%	0%	0%	0%
세특시맵 12.5 mg/kg	91%	102%	90%	74%	61%
세특시맵 2.5 mg/kg x 5	82%	98%	93%	87%	77%
3954-1204-C225v5-MMAE 12.5 mg/kg	104%	124%	112%	112%	109%
3954-1204-C225v5-MMAE 2.5 mg/kg x 5	39%	107%	107%	107%	107%

[0583]

[0584] 12.5 mg/kg의 단회 용량으로서 투여된 세특시맵은 8마리의 마우스들 중 8마리 모두에서 종양 정체 또는 종양 퇴행을 발생시켰지만, 이 효과는 8마리의 마우스들 중 6마리의 마우스들에서 35일째 날에 종양 재성장의 증거를 보이면서 짧게 지속되었다. 2.5 mg/kg의 분할된 용량으로서 투여된 세특시맵도 마찬가지로 모든 동물들에서 종양 정체 또는 퇴행을 발생시킨 후, 35일째 날까지 8마리의 마우스들 중 5마리의 마우스들에서 재성장을 발생시켰다. 12.5 mg/kg의 단회 용량으로서 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5-MMAE의 투여는 보다 현저한 항-종양 효과를 나타내어, 35일째 날까지 종양 재성장의 증거를 보이지 않으면서 7마리의 마우스들 중 7마리 모두에서 종양 퇴행을 발생시켰다. 2.5 mg/kg 3954-1204-C225v5-MMAE의 주 당 2회 투여는 8마리의 마우스들 중 8마리 모두에서 종양 퇴행을 발생시켰고, 이들 중 1마리만이 35일째 날에 종양 재성장의 증거를 보였다. 35일째 날 종양 부피의 통계적 분석은 3954-1204-C225v5-MMAE를 사용한 상기 두 요법들이 분할된 용량의 세특시맵보다 유의하게 더 효과적이라는 것을 보여주었다(각각의 경우 일원 ANOVA  $p < 0.005$ ). 세특시맵 단회 용량 군과 비교될 때에도 마찬가지였다. 35일째 날 3954-1204-C225v5-MMAE를 사용한 상기 두 요법들의 활성 사이에 유의한 차이는 없었다(양측 t-검정을 이용할 때  $p = 0.22$ ).

[0585] 종합하건대, 활성화가능한 항-EGFR 항체-물질 접합체 3954-1204-C225v5-MMAE는 일치하는 용량의 세특시맵보다 더 뛰어난 활성을 가지면서 H292 종양 모델에서 강력한 지속적인 효능을 보였다. 활성화가능한 항체-물질 접합체 3954-1204-C225v5-MMAE는 12.5 mg/kg의 단회 용량, 또는 총 5회 용량을 위해 매주 2회 제공된 2.5 mg/kg의 반복된 용량으로서 투여되었을 때 동등하게 효과적이었다.

[0586] 실시예 10. 물질에 접합된 활성화가능한 항체의 시험관내 특징규명

[0587] 본 실시예는 EGFR과의 결합을 보유하고 배양에서 H292 세포의 증식을 억제하는 본 개시내용의 활성화가능한 항체-물질 접합체의 능력을 기술한다.

[0588] 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5를 본원의 실시예에 기재된 합성 항-유사분열 튜블린 종합 억제제인 모노메틸아우리스타틴 E(MMAE)에 접합시켜 활성화가능한 항체-물질 접합체 3954-1204-C225v5-MMAE를 발생시켰다. 평균 약물 대 항체 비(DAR)는 3.44이었다.

[0589] ELISA-기초 분석에서 EGFR에 결합하고 세포 배양에서 H292 세포 증식을 억제하는 하기 화합물들의 능력을 측정하였다: 항-EGFR 활성화가능한 항체-물질 접합체 3954-1204-C225v5-MMAE; uPA에 의해 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체-물질 접합체 3954-1204-C225v5-MMAE; 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5; uPA에 의해 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5; 및 항-EGFR 항체 C225v5. 트리스(pH 8.5)에서 활성 부위-적정된 uPA(500 nM)를 사용하여 37°C에서 하룻밤 동안 분해함으로써 활성화가능한 항체 및 활성화가능한 항체-물질 접합체의 활성화를 수행하였고, 활성화를 CE 분석(랩셋 GXII)으로 측정하였다. 단백질 A를 사용하여

uPA-활성화된 활성화가능한 항체 및 uPA-활성화된 활성화가능한 항체-물질 접합체를 정제한 후, 연구 전에 4°C에서 저장하였다.

[0590] ELISA-기초 결합 실험을 위해, EGFR-Fc(알앤드디 시스템스)를 96웰 ELISA 플레이트의 웰에 코팅하였다. 화합물의 1:3 연속 희석물을 상기 플레이트에 적용하고 결합되게 하였다. 결합된 항체를 항-인간 F(ab')<sub>2</sub> IgG-HRP 접합체(잭슨 이뮤노리서치 라보라토리스)로 가시화하고 발색 기질 TMB로 현상하였다. 도 20a는 MMAE와 활성화가능한 항체의 접합이 활성화가능한 항체와 EGFR의 결합을 억제하는 차폐 모이어티의 능력을 방해하지 않았다는 것을 입증한다. 또한, MMAE와 uPA-활성화된 활성화가능한 항체의 접합은 EGFR에 결합하는 활성화된 항체의 능력을 변경시키지 않았다.

[0591] 세포 증식 분석을 위해, 인간 폐암 세포주 H292를 ATCC로부터 입수하였다. H292 세포를 대기 중 5% CO<sub>2</sub>의 대기 하에서 37°C에서 완전 배지(10% 태아 소 혈청으로 보충된 RPMI-1640)에서 성장시켰다. H292 세포를 대수성장기 동안 수거하고, 완전 배지에 재현탁하고, 96웰 백색 벽 굴뚝형 플레이트에서 웰 당 10,000개 세포의 밀도로 플레이트하였다. 하룻밤 동안 항온처리한 후, 10 µg/ml에서 시작하고 본질적으로 0 µg/ml에서 종결되는, 각각의 화합물의 10-점 1:3 연속 희석물을 반복실험체로 배양물 중의 세포에 첨가하였다. 세포를 3일 동안 배양하였고, 제조자의 프로토콜에 따라 셀 타이터 글로(프로메가) 및 발광측정기(테칸(Tecan))를 이용하여 세포 생존력을 측정하였다. 프리즘 그래프패드를 이용하여 데이터를 분석하였다. 도 20b는 MMAE와 uPA-활성화된 활성화가능한 항체의 접합이 활성화된 항체의 세포 사멸 활성을 증가시킨다는 것을 입증한다. 또한, MMAE와 활성화가능한 항체의 접합은 비절단된 활성화가능한 항체에 의한 세포 사멸을 억제하는 차폐 모이어티의 능력을 방해하지 않았다.

[0592] **실시에 11. 항-EGFR 활성화가능한 항체의 제자리 영상화**

[0593] 본 실시예는 항-EGFR 활성화가능한 항체의 활성화 및 결합에 대해 환자의 조직 샘플을 스크리닝하는 제자리 영상화 방법의 이용을 기술한다. 결과는 본 개시내용의 항-EGFR 활성화가능한 항체가 암 환자의 조직에 의해 발현된 단백질분해효소에 의해 활성화될 수 있고 그 조직 상의 EGFR 수용체에 결합할 수 있다는 것을 시사한다.

[0594] 동결된 조직을 각각 1 µg/ml 및 5 µg/ml 농도의 표지된 EGFR 및 A11 항체로 1시간 동안 처리함으로써 인간 대장암, 비-소세포폐암(NSCLC) 및 간 전이 조직 샘플들을 EGFR 및 MT-SP1 발현에 대해 프로파일링하였다(도 21 및 표 6 내지 8). 나아가, 활성화되어 인간 종양 또는 간 전이 조직에 결합하는 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225V5의 능력을 제자리 영상화를 이용하여 평가하였다. 상기 활성화가능한 항체를 전술된 바와 같이 알렉사 플루오르® 680(인비트로젠)으로 표지하였다. 발생된 활성화가능한 항체 3954-1204-C225V5-AF680(1204-C225v5 또는 1204-C225로서도 지칭됨)을 본원에 기재된 제자리 영상화의 프로토콜에 따라 동결된 환자 조직 샘플과 함께 항온처리하였다. 도 22는 항-EGFR 활성화가능한 항체를 활성화시키고 이 항체에 결합하는 대장암 간 전이 조직의 능력을 보여준다. 항-EGFR 활성화가능한 항체를 활성화시키고 이 항체에 결합하는 암 환자의 조직 샘플의 능력에 대한 결과는 표 6 내지 8에 요약되어 있다. 조직 샘플에 결합하는 EGFR 및 A11 항체의 양을 측정하는 IHC 염색을 0부터 3+까지 점수화하였다: 0, 염색 부재; 1+(즉, "+"), 약한 염색; 2+(즉, "++"), 중간 염색; 및 3+(즉, "+++"), 강한 염색. 제자리 영상화 염색 점수화는 세특시맵 항체 염색과의 비교에 기초하고, 다음과 같이 정의된다: 0, 염색 부재; 1+(즉, "+"), 모 항체에 비해 약한 염색; 2+(즉, "++"), 모 항체에 비해 중간 염색; 및 3+(즉, "+++"), 모 항체와 유사한 염색.

표 6

대장암 환자 종양 조직에서 EGFR 및 MT-SP1 발현에 대한 스크리닝 및 3954-1204-C225 활성화가능한 항체의 제자리 영상화

환자 #	IHC*		IHZ**		종양 유형	병기	등급	AJCC 제 7 판	치료
	EGFR	MT-SP1	세특시말	활성화가 가능한 항체					
5577	+++	+++	++	++	선암종	N/A	G2 중간 분화됨	N/A	비공지됨
5579	+++	-	++	++	선암종	N/A	G3 약하게 분화됨	(pT4, pN2, pM1)	비공지됨
5638	++	+	++	++	선암종	IIA 기	G2 중간 분화됨	(pT3, pN0, pMn/a)	비공지됨
5640	++	++	++	+++	선암종	IIA 기	G2 중간 분화됨	IIA (pT3, pN0, pMn/a)	비공지됨
5642	++	+	+++	+	선암종	IIA 기	G3 약하게 분화됨	II (pT3, pN0, pMn/a)	비공지됨
5650	++	+	++	++	선암종	IIIB 기	G2 중간 분화됨	IIIB (pT3, pN0, pMn/a)	비공지됨
5652	+++	+++	+++	++	선암종	IIA 기	G2 중간 분화됨	(pT3, pN0, pMn/a)	비공지됨
5656	+++	++	+++	+++	선암종	IIB 기	G2 중간 분화됨	(pT3c/d, pN1, pMn/a)	비공지됨
5658	+	++	++	+++	선암종	IIIB 기	G3 약하게 분화됨	(pT3, pN1, pMn/a)	비공지됨
5660	+++	+++	++	+++	선암종	I 기	G2 중간 분화됨	(pT2, pN0, pMn/a)	비공지됨
5662	-	-	-	-	선암종	IIA 기	G2 중간 분화됨	(pT3, pN0, pMn/a)	비공지됨
5663	+	-	+	-	선암종	IIA 기	G3 약하게 분화됨	(pT3, pN0, pMn/a)	비공지됨
5665	++	+	++	++	선암종	N/A	N/A	(pT4, pN1, pMn/a)	비공지됨

\*항체 결합의 양을 측정하는 0 부터 3+ 까지 점수화된 IHC 염색: 0, 염색 부재; 1+, 약한 염색; 2+, 중간 염색; 및 3+, 강한 염색.

\*\* IHZ 염색 점수화는 모 항체 염색과의 비교에 기초한다: 0, 염색 부재; 1+, 모 항체에 비해 약한 염색; 2+, 모 항체에 비해 중간 염색; 및 3+, 모 항체와 유사한 염색.

[0595]

표 7

인간 대장암 간 전이 조직에서 EGFR 및 MT-SP1 발현에 대한 스크리닝 및 3954-1204-C225 활성화가능한 항체의 제자리 영상화

환자 #	IHC*		IHZ**		종양 유형	병기	등급	AJCC 제 7 판	치료
	EGFR	MT-SP1	세록시맙	1204 를 갖는 활성화가능한 항체					
10398	++	++	++	+	전이성 선암종	N/A	N/A	N/A	N/A
10404	+++	++	+++	+++	전이성 선암종	IV 기	N/A	N/A	유 - N/A
10444	+++	+	++	+++	전이성 선암종	IV 기	N/A	N/A	유 - N/A
10465	++	++	++	++	전이성 선암종	IV 기	N/A	N/A	유 - N/A
10470	++	++	++	++	전이성 선암종	IV 기	N/A	N/A	폴피리(FOLFIRI) 아바스틴
10484	-	++	-	-	전이성 선암종	IV 기	N/A	N/A	폴폭스(FOLFOX)
10498	++/+	++	++	+++	전이성 선암종	N/A	N/A	N/A	화학-폴피리 방사선-골반 XRT
10510	++	+++	+	+++	전이성 선암종	IV 기	N/A	N/A	화학-5FU 류코보린 방사선-골반 XRT
10515	+	++	+	+/-	전이성 선암종	N/A	N/A	N/A	폴피리 아바스틴
10517	++	+	++/+	+++ / ++	전이성 선암종	IV 기	N/A	N/A	폴폭스
10519	++	+	++	+++	전이성 선암종		G2, 중간 분화된	N/A	폴폭스(종래) CPT11, 류코보린, 5FU (현재)

\*항체 결합의 양을 측정하는 0 부터 3+ 까지 점수화된 IHC 염색: 0, 염색 부재; 1+, 약한 염색; 2+, 중간 염색; 및 3+, 강한 염색.

\*\* IHZ 염색 점수화는 모 항체 염색과의 비교에 기초한다: 0, 염색 부재; 1+, 모 항체에 비해 약한 염색; 2+, 모 항체에 비해 중간 염색; 및 3+, 모 항체와 유사한 염색.

[0596]

표 8

NSCLC 환자 조직에서 EGFR 및 MT-SP1 발현에 대한 스크리닝 및 3954-1204-C225 활성화가능한 항체의 제자리 영상화

환자 #	IHC*		IHZ**		종양 유형	병기	등급	AJCC 제 7 판	치료
	EGFR	MT-SP1	세톡시맵	활성화가 가능한 항체					
5648	-	-	-	-	선암종	I 기	G2 중간 분화됨	IB (pT2, pN0 (0/12), pM n/a)	비공지됨
5608	-	+++	-	-	선암종	I 기	G2 중간 분화됨	IB (pT2, pN0(0/12), pM n/a)	무
5624	-	-	-	-	편평세포암종	I 기	G2 중간 분화됨	IB (pT2a, pN0, pMn/a)	무
5613	+	-	++	+	편평세포암종	I 기	G3 약하게 분화됨	IB (pT2a, pN0, M n/a)	무
5614	+++	++	+++	++	편평세포암종	I 기	G3 약하게 분화됨	IB (pT2, pN0(0/12), pM n/a)	무
5633	+	+/-	+	+	선암종	I 기	G2 중간 분화됨	IA (pT1b, pN0, pMn/a)	유 - N/A
5636	+	+	+	+	대세포암종	I 기	G3 약하게 분화됨	IA (pT1a, pN0, pMn/a)	무
5630	+	+	+	-	편평세포암종	I 기	G2 중간 분화됨	IB (pT2a, pN0, pMn/a)	무
5618	+++	+	+++	+++	편평세포암종	I 기	G2 중간 분화됨	IB (pT2, pN0, pMn/a)	무
5619	+	+/-	++	+	선암종	II 기	G2 중간 분화됨	IIB (pT2, pN1, pM n/a)	무
5627	++	-	++		편평세포암종	II 기	G2 중간 분화됨	IIB (pT2b, pN1, pM n/a)	무
5629	+++	-	+++	++	선암종	II 기	G2 중간 분화됨	IIB (pT2b, pN1, pMn/a)	무
5646	+/-	+	+	+	대세포 신경내분비암종	II 기	G3 약하게 분화됨	IIB (pT2, pN1, pMX).	비공지됨
5654	+/-	++	-	-	대세포 신경내분비암종	II 기	G3 약하게 분화됨	IIA (pT2, pN0, pMn/a)	비공지됨
5607	-	+	-	-	선암종	III 기	G3 약하게 분화됨	IIIA (pT2, pN0, pMn/a)	무
5610	-	-	-	-	편평세포암종	III 기	G2 중간 분화됨	IIIA (pT3, pN1)	무
5615	+	-	++	+	편평세포암종	III 기	G3 약하게 분화됨	IIIA (pT3, pN1, M n/a)	무
5620	+/-	-	-	-	대세포 기저양암종	II 기	G3 약하게 분화됨	IIIA (pT3, pN1, pMn/a)	무
5621	+++	++	+++	++	편평세포암종	III 기	G2 중간 분화됨	IIIA (pT4, pN0, M n/a).	무
5625	+++	++	+++	++	편평세포암종	III 기	G2 중간 분화됨	IIIA (pT4, pN2, pM n/a)	유 - N/A

\*항체 결합의 양을 측정하는 0 부터 3+ 까지 점수화된 IHC 염색: 0, 염색 부재; 1+, 약한 염색; 2+, 중간 염색; 및 3+, 강한 염색.

\*\* IHZ 염색 점수화는 모 항체 염색과의 비교에 기초한다: 0, 염색 부재; 1+, 모 항체에 비해 약한 염색; 2+, 모 항체에 비해 중간 염색; 및 3+, 모 항체와 유사한 염색.

[0597]

[0598]

실시예 12. 항-EGFR 활성화가능한 항체의 제자리 영상화의 정량

[0599]

본 실시예는 항-EGFR 항체 IHC 및 A11 항체 IHC와 함께 생체외에서의 항-EGFR 활성화가능한 항체의 활성화 및 이 항체와 생물학적 조직의 결합의 제자리 영상화를 기술한다. 상업적으로 입수가 가능한 항-EGFR 항체 IHC의 이용은 모 항체(예를 들면, 세톡시맵) 및 항-EGFR 활성화가능한 항체의 염색을 조직에서의 EGFR 발현의 양으로 표준화할 수 있게 한다. 또한, EGFR 항체를 사용한 동시-염색은 EGFR 발현으로 표준화된 세톡시맵 염색에 비해 상대적으로 항-EGFR 활성화가능한 항체의 제자리 영상화를 정성적으로 정량할 수 있게 한다. 연구 영상화를 위한 생체분석 소프트웨어, 예컨대, 메타모르프(MetaMorph)를 이용하여 형광 신호의 정량을 수행할 수 있다. MT-SP1의 활성 부위를 특이적으로 인식하는 항체(항체 A11)를 사용한 조직의 염색도 수행하여, 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v4, 3954-1204-C225v5 및 3954-1204-C225v6의 기질을 단백질용해적으로 절단하는 효소인 MT-SP1의 활성을 모니터링할 수 있다.

[0600] EGFR IHC와 함께 수행된, 세포 또는 조직에 의한 항-EGFR 활성화가능한 항체 절단의 제자리 영상화의 정량을 다음과 같이 수행하였다: 동결된 조직 박편을 유리 슬라이드 상에 올려놓고 1x PBS-T로 세정하였다. 표지된 항-EGFR 활성화가능한 항체(예를 들면, 형광 태그로 표지됨)를 함유하는 용액을 조직에 적용하고, 예를 들면, 실온에서 1시간 동안 150 mM NaCl, 100 μM ZnCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub> 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 50 mM 트리스-HCl 완충제(pH 7.4)인 항온처리 완충제에서 항온처리하였다(약 1 μg/ml 농도의 활성화가능한 항체). 그 다음, 조직을 1x PBS-T로 세정하여 비-결합된 물질을 제거하고, 내재성 IgG를 3% BSA로 차단하였다. 박편을 예를 들면, 실온에서 1시간 동안 상업적으로 입수가능한 항-토끼 항-EGFR 항체 및 표지된 A11 항체(예를 들면, 형광 태그로 표지됨)와 함께 항온처리하였다. 세정 후, 형광 태그로 표지된 이차 항체 항-토끼 IgG를 적용하고, 일차 항체를 증폭하기 위해 예를 들면, 5 μg/ml의 농도로 실온에서 30분 동안 박편 상에서 항온처리하였다. 박편을 세정하고 검출 가능한 표지를 측정하였다. 예를 들면, 형광 태그가 사용되었을 때, 조직을 형광 현미경으로 관찰하였다. 활성화되어 제자리에서 수용체에 결합하는 항-EGFR 활성화가능한 항체의 능력을 하기 수학적식으로 정량하였다:

[0601] 
$$PbA = \frac{(Ab\ EGFR \cdot Pb\ \text{제자리 영상화})}{(Pb\ EGFR \cdot Ab\ \text{제자리 영상화})} \cdot 100\%$$

[0602] PbA = 모 항체(예를 들면, 세특시맵)에 비해 항-EGFR 활성화가능한 항체 활성화 및 결합의 %, Ab EGFR = 세특시맵 결합을 이용할 때 박편에 대한 EGFR IHC의 염색 강도, Pb EGFR = 항-EGFR 활성화가능한 항체 제자리 영상화를 이용할 때 박편에 대한 EGFR IHC의 염색 강도, Ab 제자리 영상화 = 세특시맵 결합의 강도, Pb 제자리 영상화 = 항-EGFR 활성화가능한 항체 결합의 강도.

[0603] 인간 식도암 및 췌장암 조직 샘플들을 EGFR 및 MT-SP1 발현에 대해 프로파일링하였고, 활성화되어 인간 종양에 결합하는 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 능력을 제자리 영상화를 이용하여 평가하였다. 상기 활성화가능한 항체를 전술된 바와 같이 알렉사 플루오르<sup>®</sup> 680(인비트로젠)으로 표지하였다. 발생된 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5-AF680을 본원에 기재된 제자리 영상화의 프로토콜에 따라 동결된 환자 조직 샘플과 함께 항온처리하였다. 나아가, 동결된 조직을 각각 1 μg/ml 및 5 μg/ml 농도로 1시간 동안 처리함으로써 EGFR 및 알렉사 플루오르<sup>®</sup> 750-표지된 A11 항체를 사용하였다. 도 23은 항-EGFR 활성화가능한 항체를 활성화시키고 이 항체에 결합하는 식도암 조직의 능력을 보여준다. 항-EGFR 활성화가능한 항체를 활성화시키고 이 항체에 결합하는 식도암 및 췌장암 환자의 조직 샘플의 능력에 대한 결과는 표 9에 요약되어 있다. 조직 샘플에 결합하는 세특시맵, EGFR 및 A11 항체의 양을 측정하는 IHC 염색을 0부터 3+까지 점수화하였다: 0, 염색 부재; 1+(즉, "+"), 약한 염색; 2+(즉, "++"), 중간 염색; 및 3+(즉, "+++"), 강한 염색. EGFR 염색으로 표준화된 세특시맵 항체 염색과의 비교를 기초로 항-EGFR 활성화가능한 항체 염색의 제자리 영상화를 정량하고, 전술된 수학적식으로 계산하였다.

표 9

식도암 및 췌장암 환자 종양 조직에서 EGFR 및 MT-SP1 발현에 대한 스크리닝 및 3954-1204-C225 활성화가능한 항체의 제자리 영상화

환자 #	IHC		제자리 영상화		질환 진단
	EGFR	MT-SP1	세특시맵	3954-1204-C225	
5586	++	++	++	~55%	식도암
5594	+++	++	+++	~90%	식도암
5595	++	++	+++	~80%	식도암
5606	+++	+++	+++	~100%	식도암
5641	+++	++	++	~90%	식도암
5587	++	+++	++	~100%	췌장암
5617	+	+	+	~80%	췌장암
5623	++	++	++	~75%	췌장암
13007	++	++	++	~100%	췌장암
13011	-	+	-	-	췌장암

\*항체 결합의 양을 측정하는 0 부터 3+ 까지 점수화된 IHC 및 세특시맵 염색: 0, 염색 부재; 1+, 약한 염색; 2+, 중간 염색; 및 3+, 강한 염색.

\*\* 3954-1204-C225 제자리 영상화 점수화는 EGFR IHC 염색으로 표준화된 모 항체 염색과의 비교에 기초하고 활성화 %로서 확인된다: 0, 활성화 부재; 모 항체의 염색과 유사한 염색을 발생시키는 100% 활성화

[0604]

[0605]

도 23은 제자리 영상화, EGFR IHC 및 A11 IHC의 삼중 염색을 보여주는 일련의 사진들이다. 상부 줄에 있는 영상들은 (좌측에서 우측으로) 제자리 영상화 조건 하에서의 EGFR 발현, 매트립타제(MT-SP1)의 활성화 및 세특시맵의 결합을 입증하는, 단일 조직 슬라이스에 대해 수행된 염색을 보여준다. 하부 줄에 있는 영상은 (좌측에서 우측으로) EGFR 발현, 매트립타제(MT-SP1)의 활성화 및 항-EGFR 활성화가능한 항체 3954-1204-C225v5의 제자리 영상화를 입증하는, 단일 조직 슬라이스에 대해 수행된 염색을 보여준다. 도 23의 우측 열의 영상은 제자리 영상화 조건 하에서 세특시맵의 결합(상부 영상)과 조직 유래 단백질용해성 절단에 의해 활성화된 항-EGFR 활성화가능한 항체의 결합(하부 영상)을 비교한다. 도 23의 좌측 열의 영상들에 나타낸 바와 같이, 상업적으로 입수가능한 항-EGFR 항체를 조직에 노출시킴으로써 조직 염색의 동일한 패턴을 검출하였다. 도 23의 중간 열의 영상들은 매트립타제(MT-SP1) 활성화와 EGFR 발현이 함께 위치한다는 것을 입증한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "함께 위치한다"는 EGFR 및/또는 A11 염색의 임의의 겹침 또는 다른 중첩을 내포하기 위한 것이 아니고, 용어 "함께 위치한다"는 EGFR 발현 환자 조직에서 MT-SP1 활성화의 존재를 표시하기 위해 사용된다. 종합하건대, 이들 데이터는 인간 식도암 조직 샘플에 의한 항-EGFR 항체 3954-1204-C225v5의 약 90% 활성화를 입증한다.

[0606]

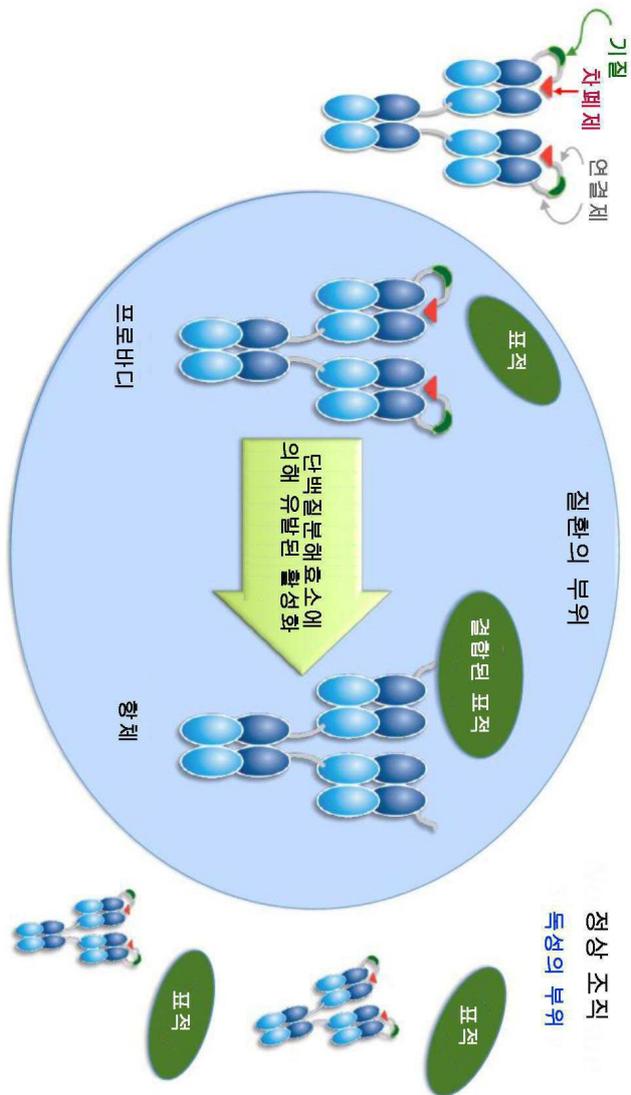
다른 실시양태

[0607]

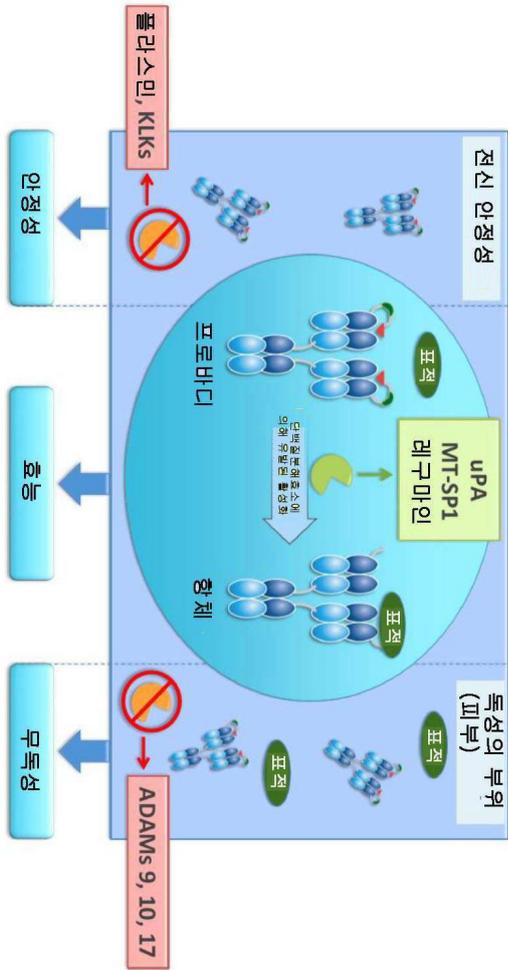
본 발명이 그의 상세한 설명과 함께 기재되어 있지만, 상기 설명은 첨부된 하기 특허청구범위에 의해 정의된 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것이고 한정하기 위한 것이 아니다. 다른 양태, 장점 및 변경은 하기 특허청구범위 내에 있다.

도면

도면1a

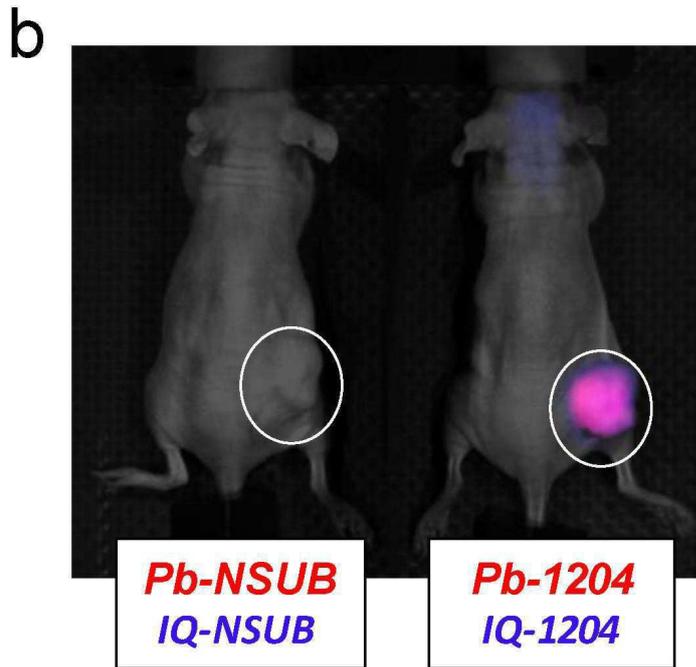


도면1b

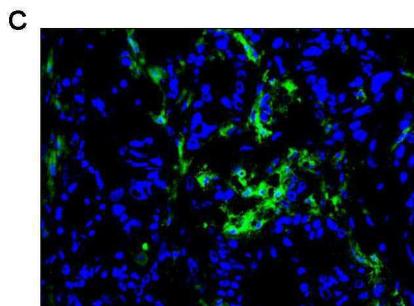




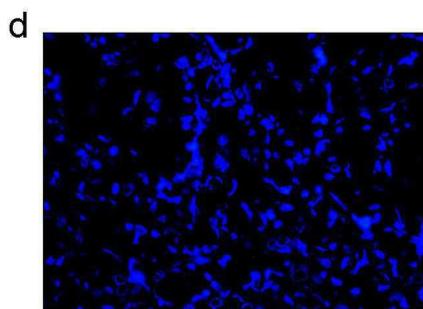
도면3b



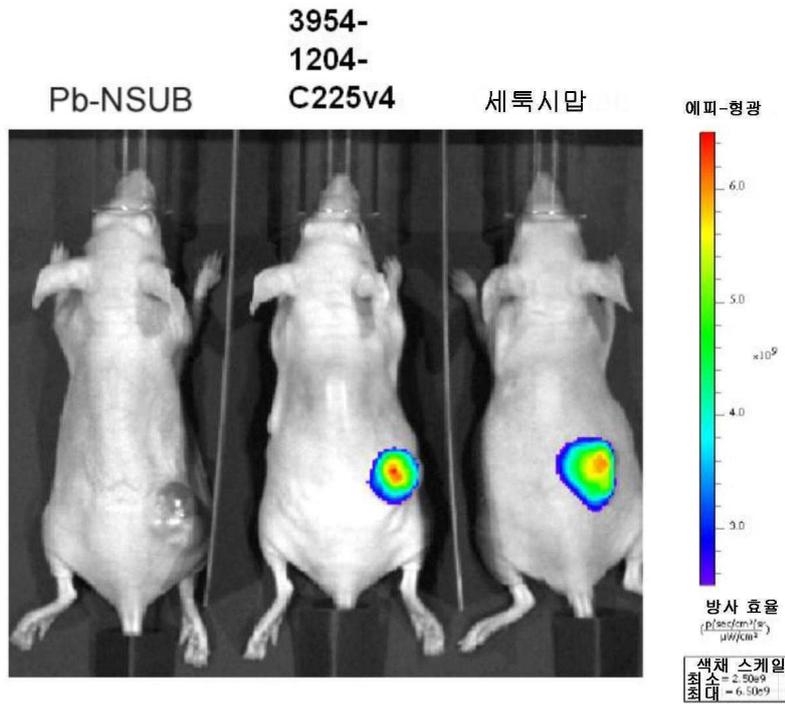
도면3c



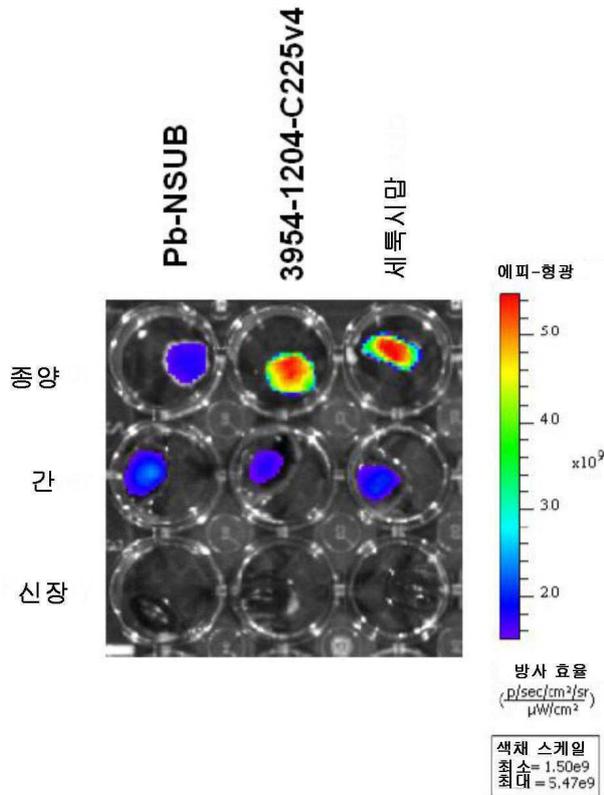
도면3d



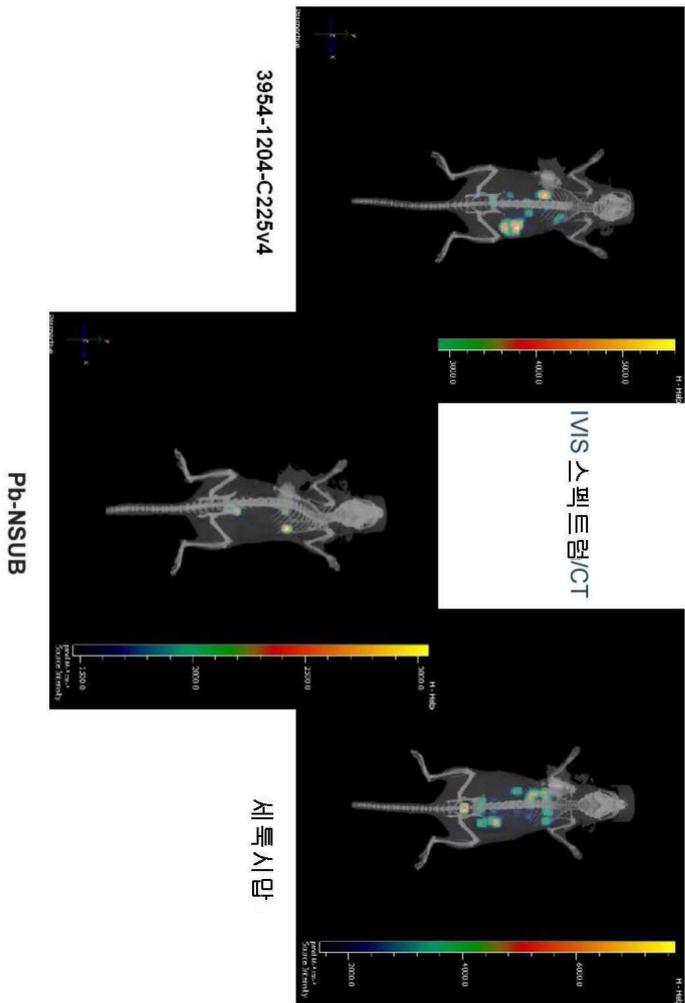
도면3e



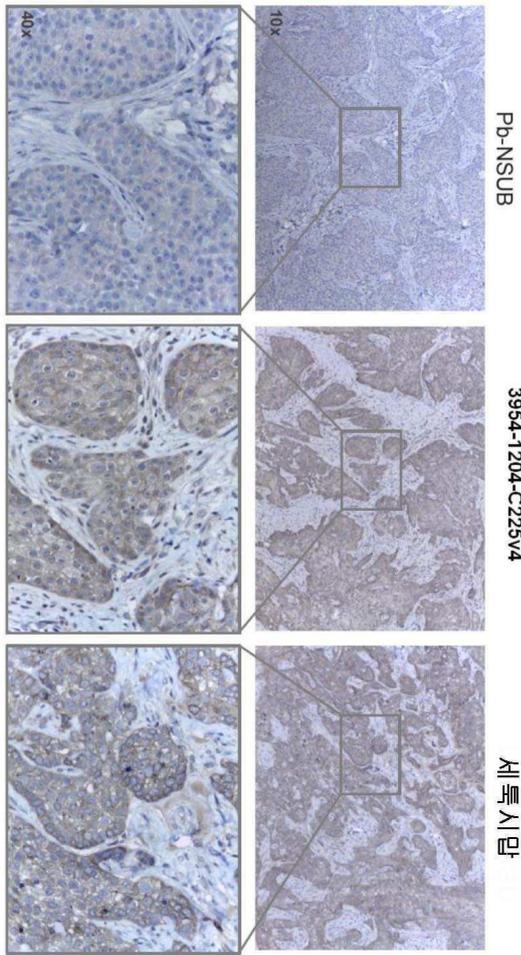
도면3f



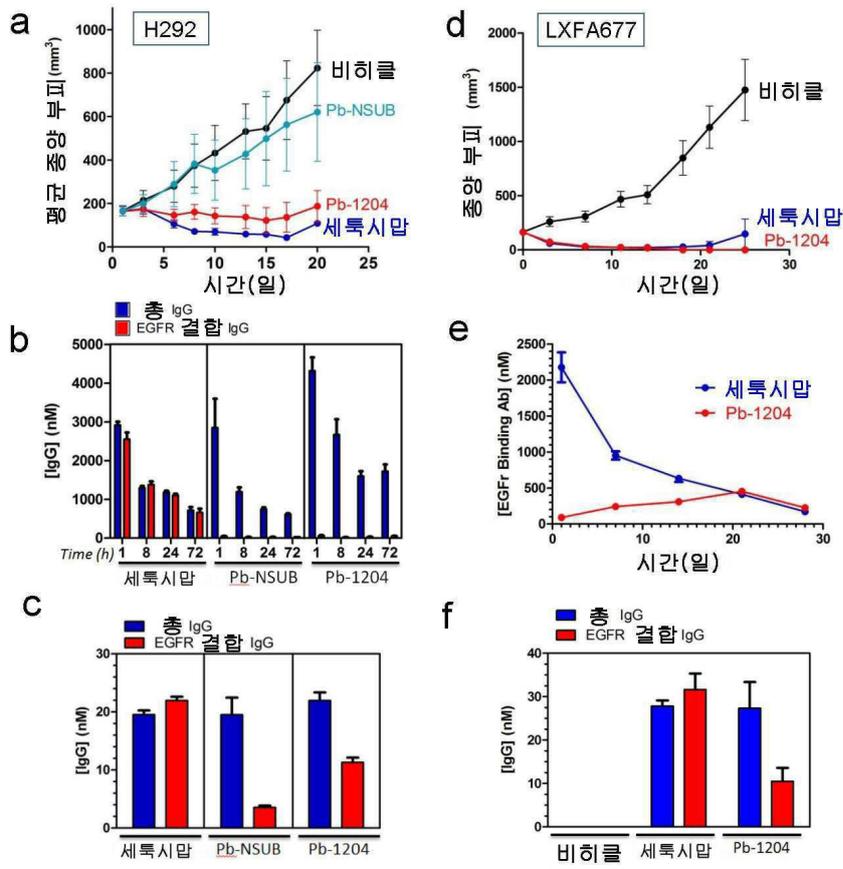
도면3g



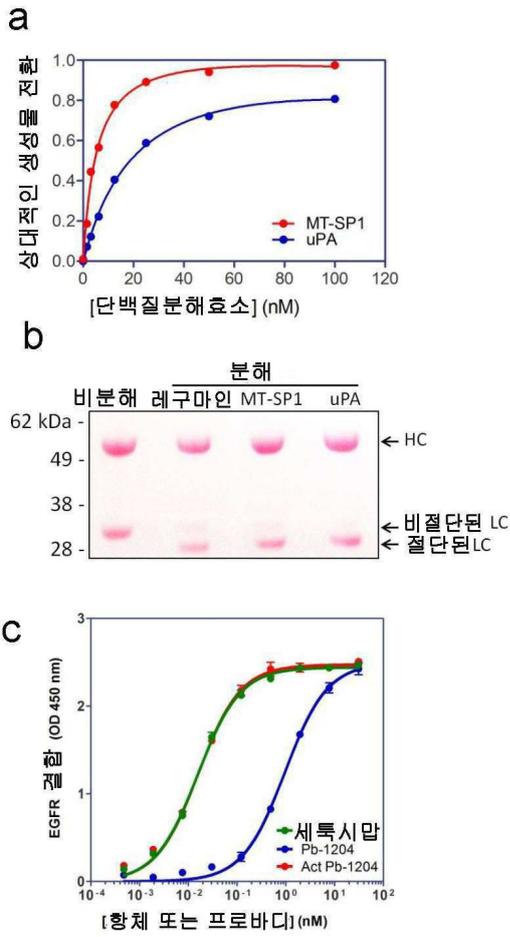
도면3h



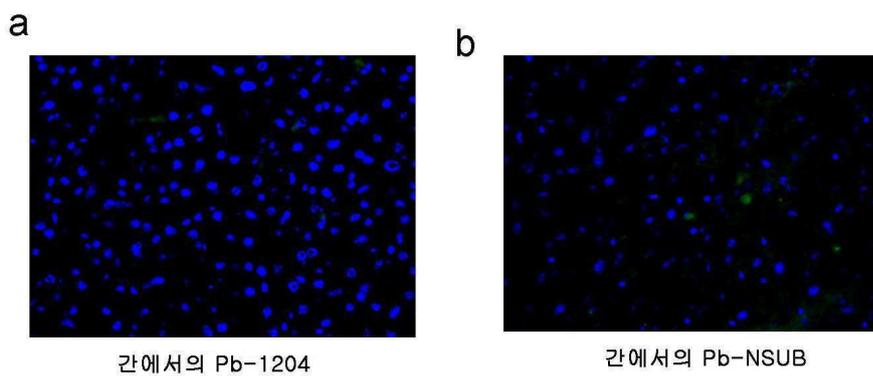
도면4



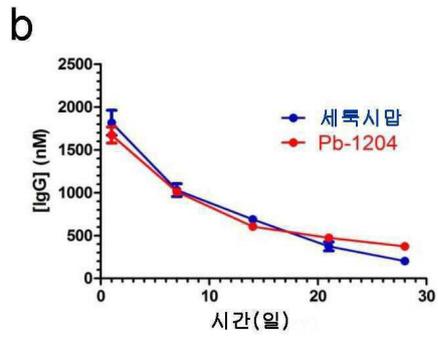
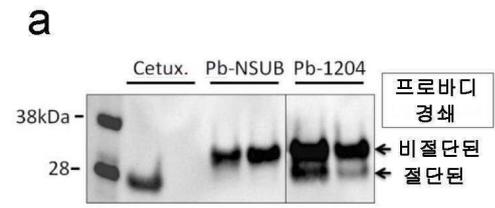
도면5



도면6

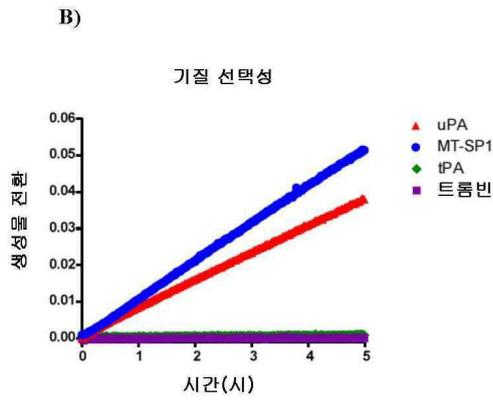


도면7

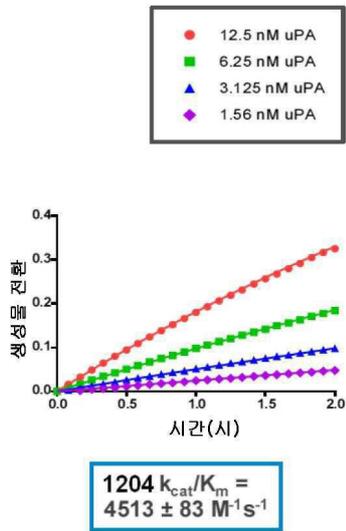




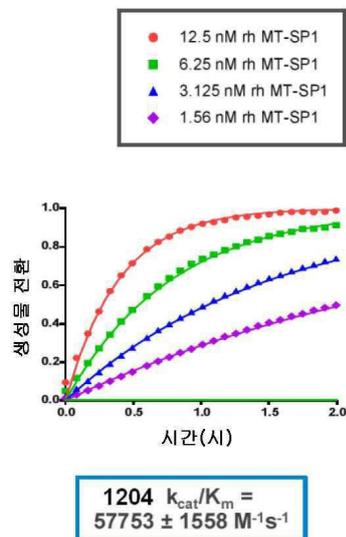
도면9b



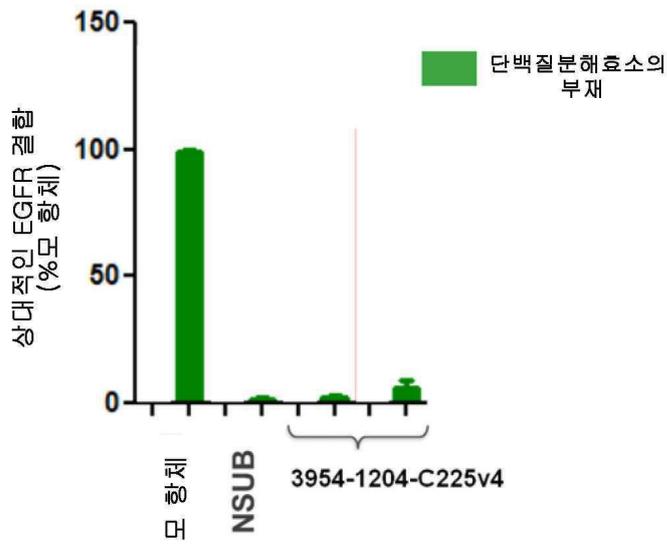
도면9c



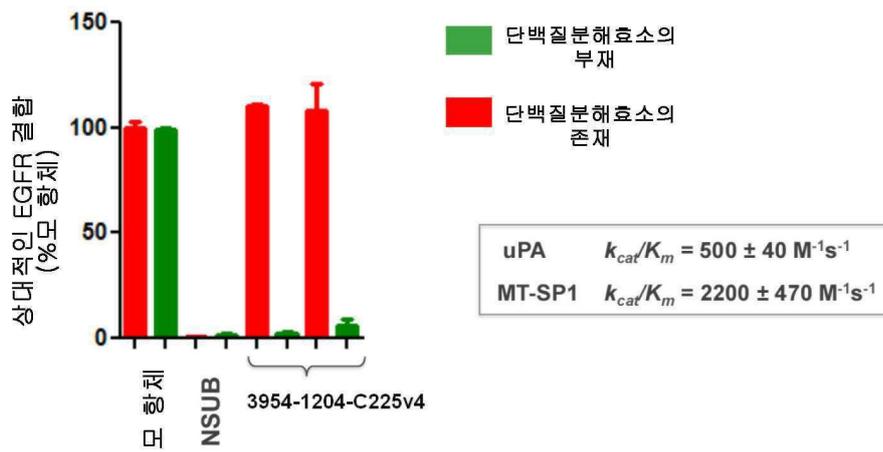
도면9d



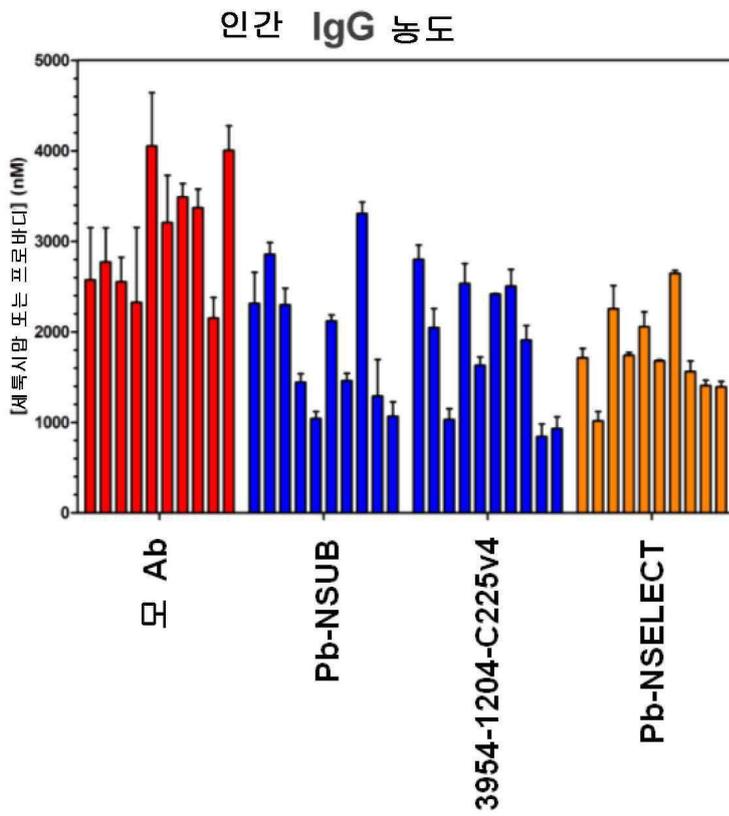
도면10a



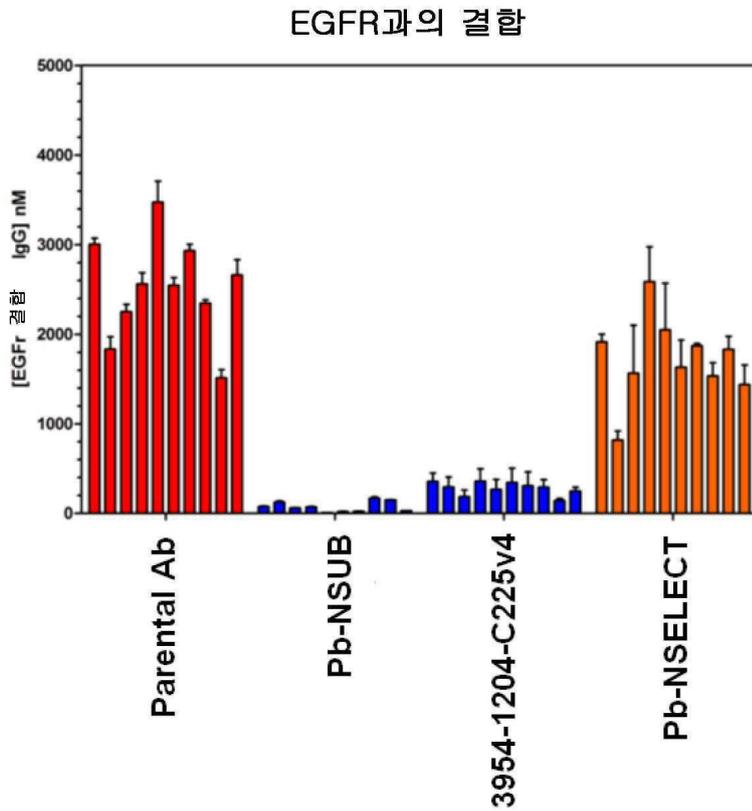
도면10b



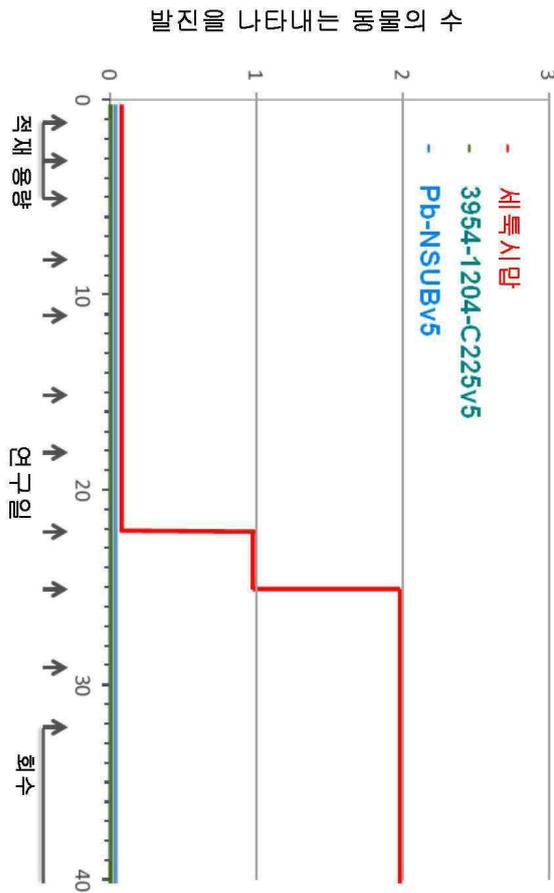
도면11a



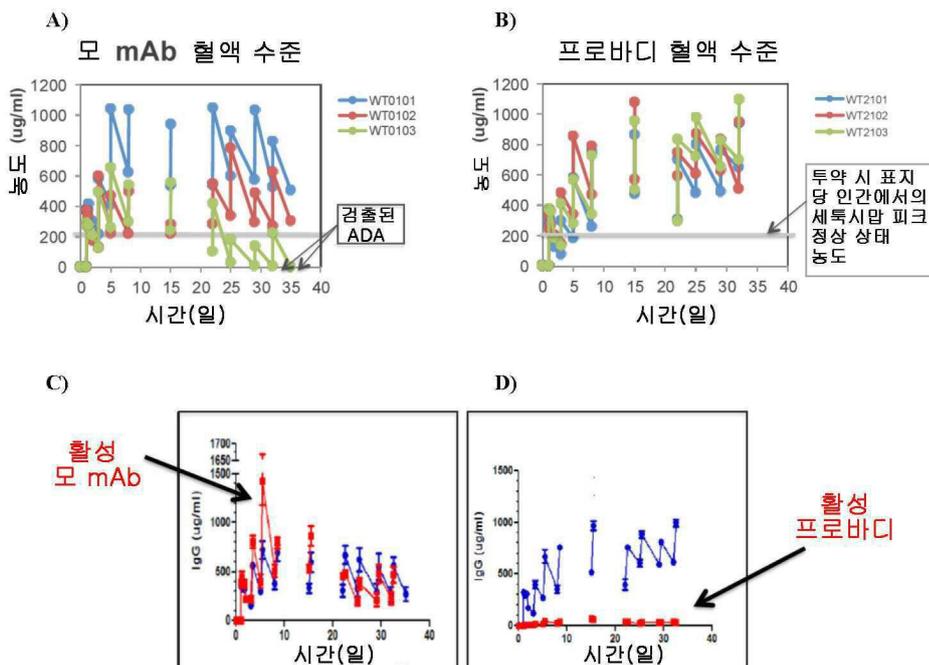
도면11b



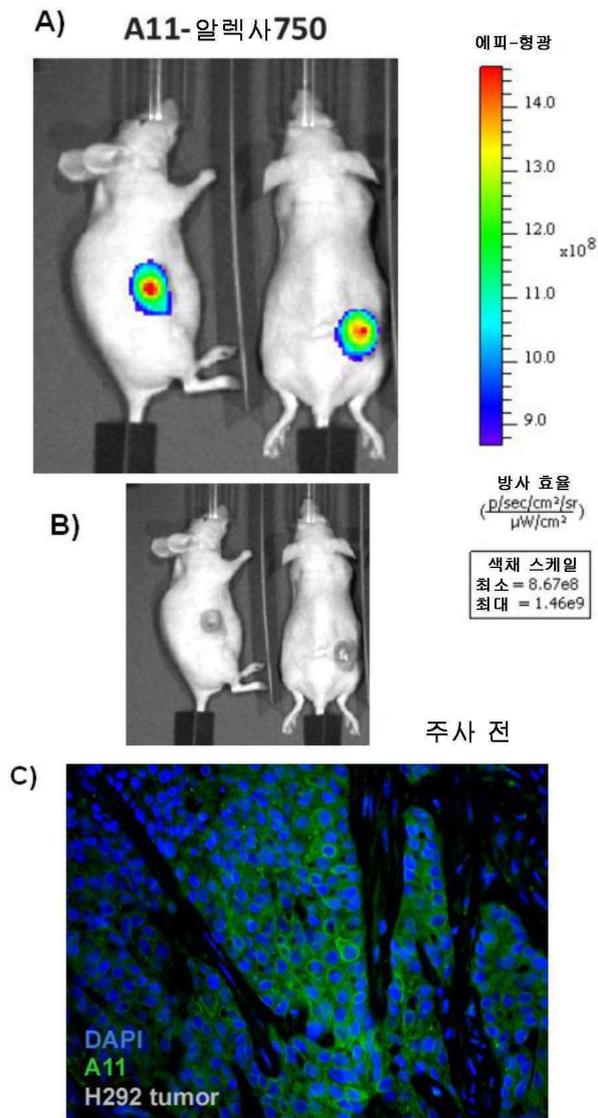
도면12



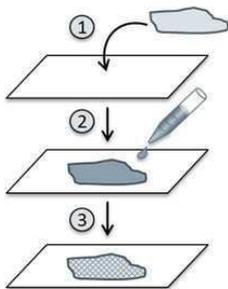
도면13

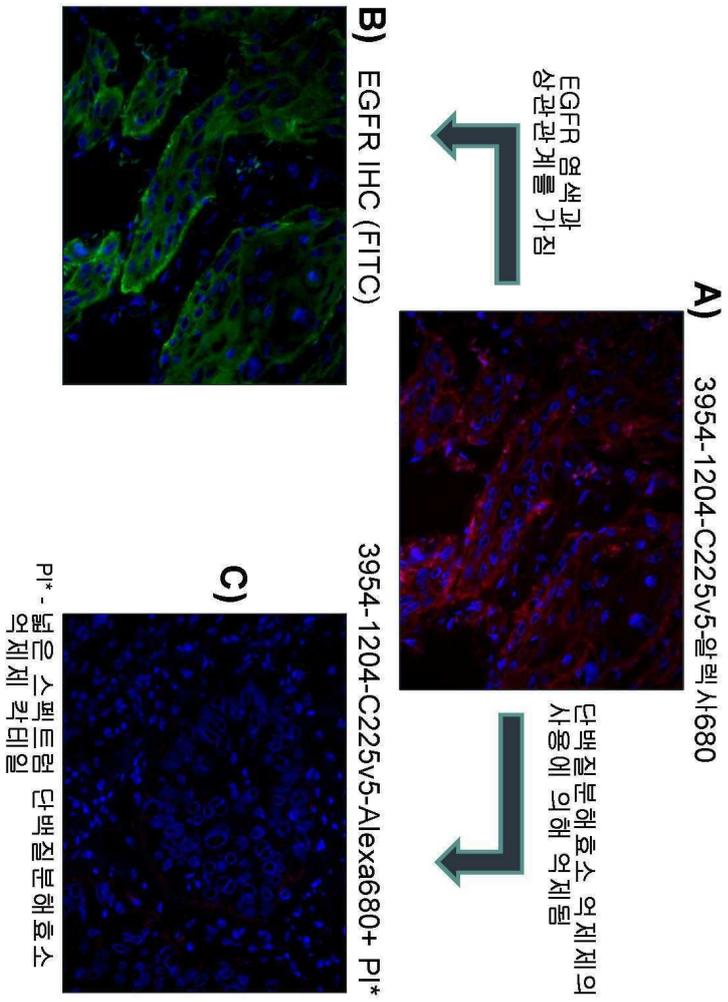


도면14



도면15





도면16

도면17

폐 종양

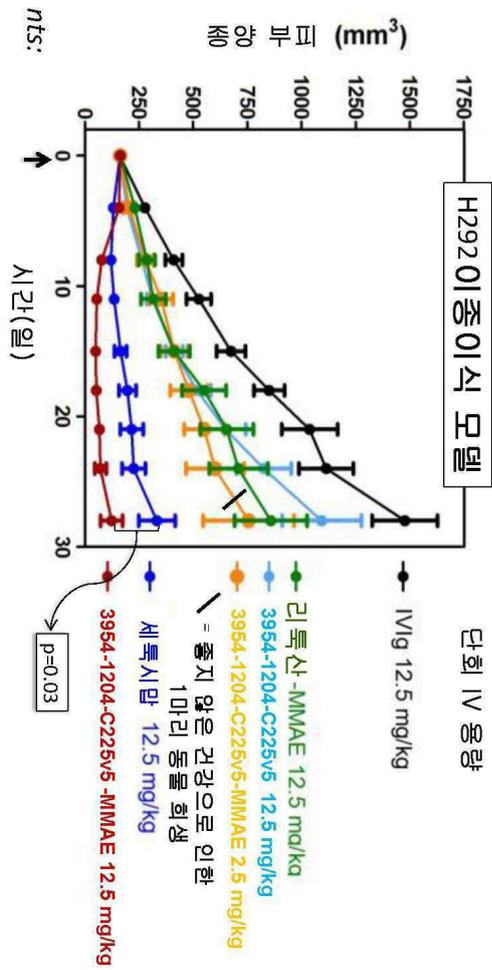
환자 #	EGFR	MT-SP1	Cetux	3954-1204-C225v5
5608	-	+++		
5610	-	-		
5613	+	-	++	+
5615	-	-		
5621	+++	++	+++	++
5625	+++	++	+++	++
5627	-	-		
5646	+/-	+	+	+
5648	-	-		
5654	+/-	++		

결장암

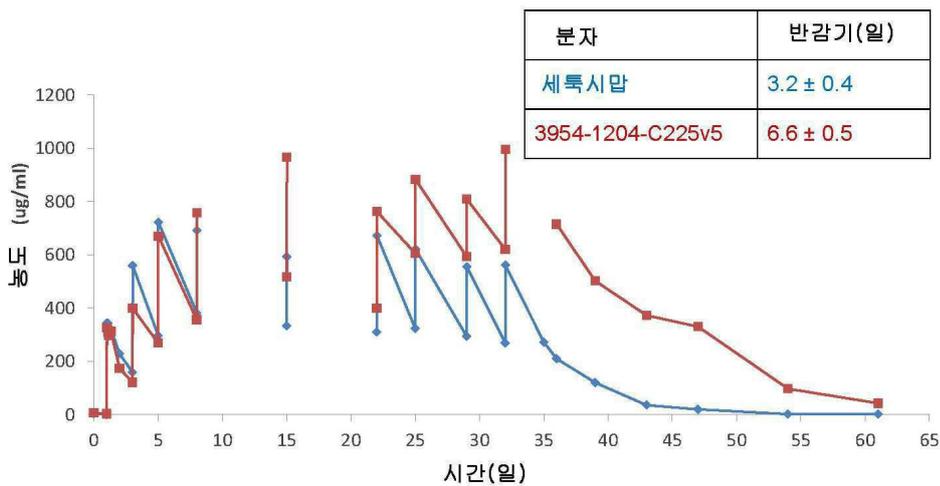
환자 #	EGFR	MT-SP1	Cetux	3954-1204-C225v5
5577	+++	+++		
5579	+++	-	++	++
5638	++	+	++	+
5642	+++	+++		
5650	++	+	+/+	+
5652	+++	+++	+++	+++
5656	+++	++		
5658	-	+++		
5660	++	+++		

\* 점수화는 세특시만 염색과의 비교에 기초한다.

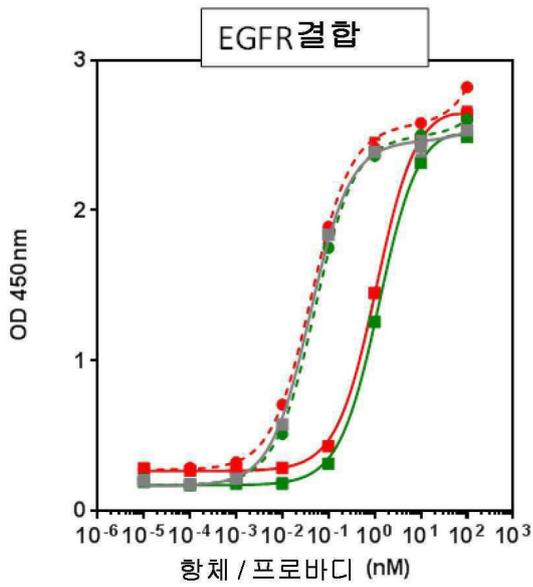
도면18



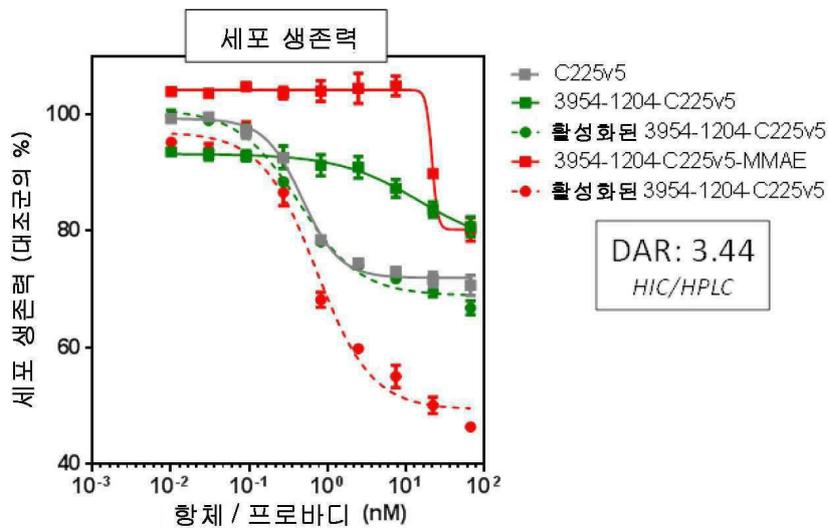
도면19



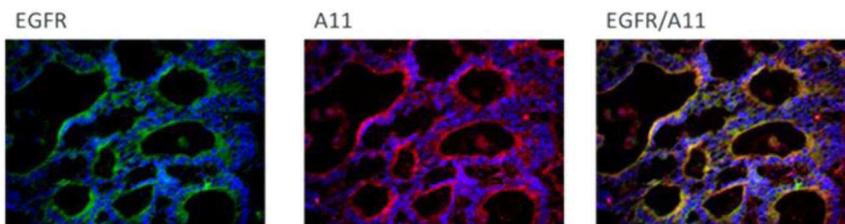
도면20a



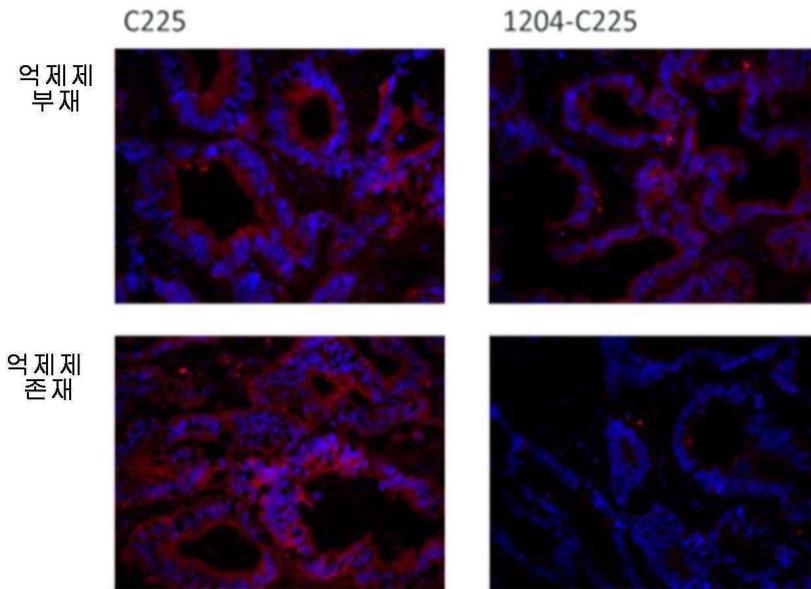
도면20b



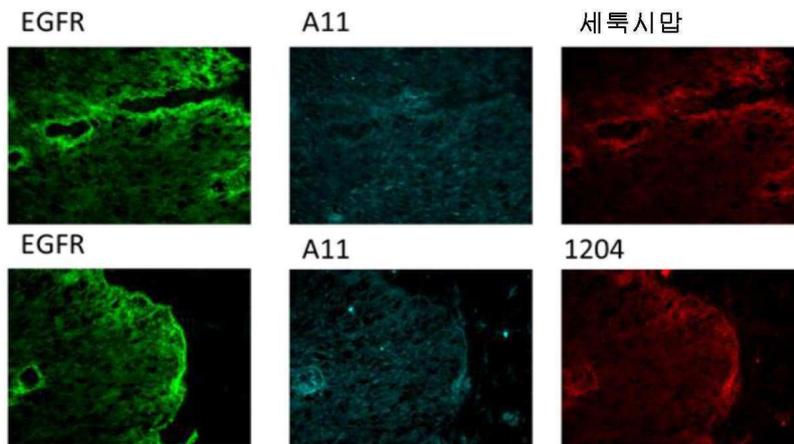
도면21



도면22



도면23



환자 #	EGFR	MT-SP1	Cetuximab	3954-1204-C225	암 유형
5594	+++	++	+++	~90%	식도암

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CytomX Therapeutics, Inc.

<120> Activatable Antibodies That Bind Epidermal Growth Factor Receptor  
And Methods Of Use Thereof

<130> 42652-517001W0

<140> PCT/US2013/038540  
 <141> 2013-04-26  
 <150> US 61/639796  
 <151> 2012-04-27  
 <150> US 61/662204  
 <151> 2012-06-20  
 <150> US 61/749220  
 <151> 2013-01-04  
 <150> US 61/749529  
 <151> 2013-01-07  
 <150> US 61/763237  
 <151> 2013-02-11  
 <160> 70  
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 1410  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> chemically synthesized  
 <400> 1

```

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcaatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg      60
cagggtgcagc tgaaacagag cggccccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt      120
acctgcaccg tgagcggctt tagcctgacc aactatggcg tgcaattgggt gcgccagagc      180
ccgggcaaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcgcaaacac cgattataac      240
accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt      300
aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc      360

tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcacc tgggtaccgt gagcgcggct      420
agcaccaagg gcccatcggc ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc      480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg      540
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga      600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac      660
atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa      720
    
```

tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780

tcagtcttcc ttttcccc aaacccaag gacacctca tgatctccg gaccttgag 840

gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 900

gtggacggcg tggaggtgca taatccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcccg ggatgaactg 1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggt tctatcccag cgacatcgcc 1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg 1260

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg 1380

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1410

<210> 2

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 2

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val

20 25 30

Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35 40 45

Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn

65 70 75 80

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser

85 90 95

Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gln Asp Thr Ala Ile



Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys

465

<210> 3

<211> 846

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 3

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg 60  
 caaggccagt ctggccagtg catctcacct cgtggttgtc cggacggccc atacgtcatg 120  
 tacggctcga gcggtggcag cgggtggctct ggtggatccg gtctgagcgg ccgttccgat 180  
 aatcatggca gtagcggtag ccagatcttg ctgaccaga gcccggatgat tctgagcgtg 240  
 agcccgggcg aacgtgtgag ctttagctgc cgcgcgagcc agagcattgg caccaacatt 300  
 cattgtatc agcagcgcac caacggcagc ccgcgcctgc tgattaaata tgcgagcgaa 360  
 agcattagcg gcattccgag ccgctttagc ggcagcggca gcggcaccga ttttacctg 420  
 agcattaaca gcgtggaag cgaagatatt gcggattatt attgccagca gaacaacaac 480  
 tggccacca cctttggcgc gggcaccaaa ctggaactga aacgtacggt ggctgcacca 540  
 tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg 600

tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggagggt ggataacgcc 660  
 ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 720  
  
 agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 780  
 tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag 840  
 tgttag 846  
  
 <210> 4  
 <211> 281  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> chemically synthesized  
 <400> 4  
  
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Val Thr Asn Ser Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly  
  
 20 25 30  
 Cys Pro Asp Gly Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45  
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Ser  
 50 55 60  
 Ser Gly Thr Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val  
 65 70 75 80  
 Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile  
  
 85 90 95  
 Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg  
 100 105 110  
 Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg  
 115 120 125  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser  
 130 135 140  
 Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn  
  
 145 150 155 160

Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr  
 165 170 175  
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 180 185 190  
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 195 200 205  
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 210 215 220  
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 245 250 255  
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 260 265 270  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 275 280

<210> 5

<211> 1410

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 5

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg 60  
 caggtgcagc tgaaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 120  
 acctgcaccg tgagcggctt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc 180  
 ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcgcaaacac cgattataac 240  
 acccgttta ccagccgctt gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt 300  
 aaaaatgaaca gctgcaaaag caacgatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 360  
  
 tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcacc tgggtaccgt gagcgcggct 420  
 agcaccaagg gcccatcggt cttcccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480  
 acagcggccc tgggctgect ggtcaaggac tacttcccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540  
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtccctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660  
 atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720  
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780

tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 840  
 gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 900  
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960  
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020  
 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080  
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggatgaactg 1140  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260  
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320  
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380  
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1410

<210> 6

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 6

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val

20 25 30

Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35 40 45

Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn

65 70 75 80

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser



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

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

Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 7

Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 8

Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly

1                    5

<210> 9

<211> 1410

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400

> 9

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcat gactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg            60

caggtgcagc tgaaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt            120

acctgcaccg tgagcggctt tagcctgacc aactatggcg tgcatgggt gcgccagagc            180

ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac            240

accccgttta ccagccgct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt            300

aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc            360

tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcacc tggtgaccgt gagcgcggct            420

agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc            480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg            540

aactcaggcg cctgaccag cggcgtgca accttcccgg ctgtcctaca gtctcagga            600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac            660

atctgcaacg tgaatcaaa gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa            720

tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg            780

tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccg gaccctgag            840

gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac            900

gtggacggcg tggaggtgca taatccaag acaaagccgc gggaggagca gtaccgagc            960

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag            1020

tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccaca tcgagaaaac catctcaaa            1080

gcaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcccg ggatgaactg            1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggt tctatcccag cgacatgcc            1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg            1260

gactccgagc gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag            1320

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgag            1380

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga            1410

<210> 10

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 10

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1                    5                    10                    15

Val Thr Asn Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val

20                    25                    30

Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35                    40                    45

Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly

50                    55                    60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn

65                    70                    75                    80

Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser

85                    90                    95

Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gln Asp Thr Ala Ile

100                    105                    110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr

115                    120                    125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

165                    170                    175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

180                    185                    190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

195                    200                    205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 245 250 255  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 260 265 270  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 275 280 285  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 290 295 300  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser



Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly Pro Tyr Val Met Tyr

1                    5                    10                    15

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 15

Gly Ser Gly Gly Ser

1                    5

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 16

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 17

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 18

Gly Gly Ser Gly Gly

1                    5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 19

Gly Ser Gly Ser Gly

1                    5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 20

Gly Ser Gly Gly Gly

1                    5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 21

Gly Gly Gly Ser Gly

1                    5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 22

Gly Ser Ser Ser Gly

1                    5

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 23

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

1                    5                    10

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 24

Gly Ser Ser Gly Thr

1                    5

<210> 25

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 25

caggtgcagc tgaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt                    60

acctgcaccg tgagcggtt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc                    120

ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttgagcg gcggcaacac cgattataac                    180

accccgttta ccagccgct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt                    240

aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc                    300

tattatgatt atgaatttc gtattggggc cagggcacc tggtgaccgt gagcgcggct                    360

agcaccaagg gcccatcgtt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc                    420

acagcggccc tgggctgctt ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg                    480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtccctcagga                    540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac                    600

atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa                    660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg                    720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag 780  
 gtcacatgcg tgggtgggga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 840  
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960  
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 1020  
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgaactg 1080  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc 1140  
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg 1200  
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260  
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggtc tgcacaacca ctacagcag 1320

aagagcctct cctgtctcc gggtaatga 1350

<210> 26

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 26

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

1                    5                    10                    15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr

20                    25                    30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35                    40                    45

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

50                    55                    60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe

65                    70                    75                    80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85                    90                    95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100                    105                    110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr



tgttag

786

<210> 28

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 28

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly

1                    5                    10                    15

Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile

65                    70                    75                    80

His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys

                  85                    90                    95

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

                  100                    105                    110

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu

                  115                    120                    125

Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr

                  130                    135                    140

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

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

                  180                    185                    190

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



tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020  
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgaactg 1080  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140  
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200  
 gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

cagggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg 1320  
 aagacctct ccctgtctcc gggtaaatga 1350

<210> 30

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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



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

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

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

Lys

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 31

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala  
 1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 32

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Arg Gly Asp Asp Ala  
 1 5 10 15

<210> 33

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 33

caggtgcagc tgaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60

acctgcaccg tgagcggctt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc 120

ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac 180

accccgttta ccagccgct gagcattaac aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttttt 240

aaaatgaaca gcctgcaaag ccaggatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300

tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcgcggct 360

agcaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag 780

gtcacatgcg tgggtgggga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacgccagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gcccaggggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgaactg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg 1320

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1350

<210> 34

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 34

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

1                    5                    10                    15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr

20                    25                    30

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

275                      280                      285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val  
 290                      295                      300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325                      330                      335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340                      345                      350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355                      360                      365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
  
 370                      375                      380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385                      390                      395                      400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405                      410                      415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420                      425                      430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435                      440                      445  
 Lys

<210> 35

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 35

Ile Glu Gly Arg

1

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 36

Ile Asp Gly Arg

1

<210> 37

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 37

Gly Ser Ser Gly

1

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 38

Gln Gly Gln Ser Gly Gln

1                    5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 39

Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg

1                    5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 40

Pro Leu Gly Leu Trp Ala

1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 41

Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 42

Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala

1 5

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 43

Gly Ile Ala Gly Gln

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 44

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile

1                    5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 45

Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly

1                    5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 46

Tyr Gly Ala Gly Leu Gly Val Val

1                    5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 47

Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg

1                    5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 48

Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr

1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 49

Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 50

Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 51

Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln

1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 52

Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser

1                    5  
 <210> 53  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> chemically synthesized  
 <400> 53  
 Glu Ser Leu Pro Val Val Ala Val

1                    5  
 <210> 54  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> chemically synthesized  
 <400> 54  
 Ser Ala Pro Ala Val Glu Ser Glu

1                    5  
 <210> 55  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <  
 220><223> chemically synthesized  
 <400> 55  
 Asp Val Ala Gln Phe Val Leu Thr

1                    5  
 <210> 56  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> chemically synthesized  
 <400> 56  
 Val Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu

1                    5  
 <210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 57

Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly

1                    5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 58

Pro Val Gln Pro Ile Gly Pro Gln

1                    5

<210> 59

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 59

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly

1                    5                    10                    15

Pro Tyr Val Met Tyr

20

<210> 60

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> chemically synthesized

<400> 60

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg 60

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 61

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1                    5                    10                    15

Val Thr Asn Ser

20

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 62

caaggccagt ctggccag

18

<210> 63

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 63

tgcattcac ctctggttg tccgacggc ccatacgtca tgtac

45

<210> 64

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 64

ggctcgagcg gtggcagcgg tggctctggt ggatccggt

39

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 65

ctgagcggcc gttccgataa tcat 24

<210> 66

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 66

ggcagtagcg gtacc 15

<210> 67

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 67

cagatcttgc tgaccagag cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggca acgtgtgagc 60

tttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc 120

aacggcagcc cgcgcctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc 180

cgctttagcg gcagcggcag cggcaccgat tttacctga gcattaacag cgtggaaagc 240

gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg 300

ggcaccaaac tggaactgaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggatg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 68

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 68

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile

                  35                    40                    45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

                  50                    55                    60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser

65                    70                    75                    80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

                  130                    135                    140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145                    150                    155                    160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

                  165                    170                    175

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

                  180                    185                    190

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

                  195                    200                    205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

                  210

<210> 69

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 69

Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Thr Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser  
1                   5                   10                   15

Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys  
                  20                   25                   30

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg  
                  35                   40                   45

Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile

50                   55                   60

Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
65                   70                   75                   80

Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr  
                  85                   90                   95

Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys  
                  100                   105                   110

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

115                   120                   125

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
130                   135                   140

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
145                   150                   155                   160

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
                  165                   170                   175

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

180                   185                   190

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
195                   200                   205

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



195

200

205

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

210

215

220