



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0094589  
(43) 공개일자 2014년07월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/02 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7014863
- (22) 출원일자(국제) 2012년11월05일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년06월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/071832
- (87) 국제공개번호 WO 2013/064684  
국제공개일자 2013년05월10일
- (30) 우선권주장  
11306416.6 2011년11월03일  
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인  
피에르 파브르 메디카먼트  
프랑스, 에프-92100 불로뉴-빌랑꾸르, 벨라스 아  
벨-강스, 45
- (72) 발명자  
보-라르보르, 샤르로뜨  
프랑스, 에프-74520 종지에르 에파니위, 뒤 뒤 쌍  
프 아 라 트와느 156  
고뜨쉬, 릴리앙  
프랑스, 에프-74130 에이쥘, 루뜨 드 끌뤼쎈 15  
부뜨, 니폴라  
프랑스, 에프-74350 쓰르네, 벨라스 드 레글리스,  
14
- (74) 대리인  
한인열

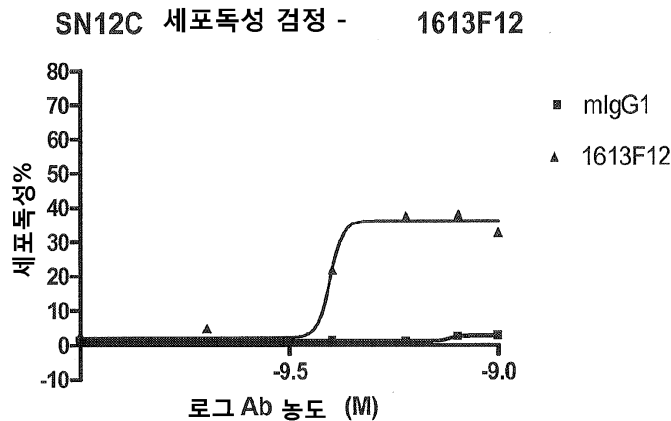
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 항원 결합 단백질 및 암의 치료를 위한 어드레싱 산물로서 그의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 항원 결합 단백질, 상세하게는 단백질 Ax1과 특이적으로 결합할 수 있는 단일클론 항체뿐만 아니라 상기 단백질을 코딩하는 아미노산 및 핵산 서열들에 관한 것이다. 한 가지 관점에서부터, 본 발명은 세포 내로 내재화되는 Ax1의 내재화 (internalization)를 유도하여, Ax1과 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단백질, 또는 항원 결합 단편들에 관한 것이다. 본 발명은 또한 독소들, 방사성-원소들 또는 약물들과 같은 다른 항암 화합물들과 결합하여 어드레싱 (addressing) 산물로서 상기 항원 결합 단백질의 용도, 및 소정의 암들의 치료를 위한 그의 용도를 포함한다.

**대표도 - 도1**



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

관심 있는 분자를 세포의 표면에서 Ax1 단백질을 발현하는 포유동물 세포들 내로 전달하거나 내재화할 수 있는 항원 결합 단백질, 또는 그의 결합 단편을 검색하는 시험관내 방법으로서, 상기 관심 있는 분자는 상기 항원 결합 단백질과 공유적으로 결합되고, 상기 방법은 다음의 단계들

- a) Ax1 단백질을 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단백질을 선별하는 단계;
- b) 상기 관심 있는 분자를 상기 단계 a) 단계에서 선별된 항원 결합 단백질과 공유적으로 결합하고 복합체를 형성하는 단계;
- c) 상기 단계 b)에서 획득된 복합체를 세포의 표면에서 Ax1 단백질을 발현하는 포유동물 세포와 접촉시키는 단계;
- d) 상기 복합체가 세포 표면에서 Ax1 단백질을 발현하는 상기 포유동물 세포 내로 세포 내로 전달되거나 내재화되었던 여부를 결정하는 단계; 및
- e) 상기 항원 결합 단백질을 관심 있는 분자를 세포의 표면에서 Ax1 단백질을 발현하는 포유동물 세포 내로 전달하거나 내재화할 수 있는 화합물로서 선별하는 단계:

를 포함하는, 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단계 a)에서 선별된 항원 결합 단백질은 인간 단백질 Ax1, 바람직하게는 서열번호 31 또는 32의 서열을 가지는 세포의 도메인 (ECD)을 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는, 방법.

### 청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 단계 a)에서 선별된 항원 결합 단백질은 인간 단백질 Ax1 세포의 도메인 (ECD)을  $EC_{50}$ 의 적어도  $10^{-9}$  M, 바람직하게는  $10^{-9}$  및  $10^{-12}$  M 사이의 범위로 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는, 방법.

### 청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단계 e)에서 선별은 FACS, 면역형광, 유동 세포측정법, 웨스턴-블롯 및 세포독성/세포증식억제 평가들 방법들의 그룹으로부터 선택되는 방법에 의해 실현되는 것을 특징으로 하는, 방법.

### 청구항 5

세포독성 화합물을 세포의 표면에서 Ax1 단백질을 발현하는 포유동물 세포 내로 전달할 수 있는 세포독성 또는 세포증식억제 복합체를 제조하는 시험관내 방법으로서, 상기 방법은

- i) Ax1 단백질, 바람직하게는 인간 Ax1 단백질을 특이적으로 결합할 수 있고,
- ii) 상기 Ax1 단백질이 포유동물 세포의 표면에서 발현될 때 상기 단백질 Ax1과 세포의 결합에 이어서 상기 포유동물 세포 내로 내재화되는 것을 특징으로 하는, 항원 결합 단백질과 세포독성 또는 세포증식억제 체제를 공유적으로 결합하는 단계:를 포함하는, 방법.

### 청구항 6

세포독성 화합물을 포유동물 세포 내로 전달할 수 있는 세포독성 또는 세포증식억제 복합체를 제조하는 시험관

내 방법으로서, 상기 방법은

- i) Ax1 단백질, 바람직하게는 인간 Ax1 단백질을 특이적으로 결합할 수 있고,
- ii) 상기 Ax1 단백질이 포유동물 세포의 표면에서 발현될 때 상기 단백질 Ax1과 세포의 결합에 이어서 상기 포유동물 세포 내로 내재화되는 화합물과 세포독성 제제를 공유적으로 결합하는 단계:를 포함하는, 방법.

**청구항 7**

세포독성 제제를 숙주 표적 부위에 전달하는 어드레싱 산물로서의 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 상기 숙주 표적 부위는 단백질 Ax1 세포의 도메인 내에 정착된 에피토프로 구성되고, 상기 항원 결합 단백질은

- i) 인간 단백질 Ax1 내에 정착된 에피토프와 특이적으로 결합하고;
- ii) 상기 인간 단백질 Ax1과 그의 결합에 이어서 내재화되는 것을 특징으로 하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 8**

제 7항에 있어서,

상기 단백질 Ax1 세포의 도메인은 서열번호 31 또는 32의 서열, 또는 그의 자연적 변이체 서열들을 가지는 인간 단백질 Ax1 세포의 도메인으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 9**

제 7항 또는 제 8항에 있어서,

상기 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 인간 단백질 Ax1 세포의 도메인 (ECD) 내에서 EC<sub>50</sub>의 적어도 10<sup>-9</sup> M, 바람직하게는 10<sup>-9</sup> 및 10<sup>-12</sup> M 사이의 범위로 그의 에피토프와 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 10**

제 7항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 MFI의 적어도 200의 감소를 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 11**

제 7항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 단일클론 항체로 구성되는 것을 특징으로 하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 12**

제 11항에 있어서,

상기 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은  $\Delta$  (MFI<sub>24h</sub> 미처리된 세포들 - MFI<sub>24h</sub> 처리된 세포들)의 적어도 200, 바람직하게는 적어도 300을 유도하는 단일클론 항체로 구성되는 것을 특징으로 하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편.

**청구항 13**

세포독성 제제와 결합된 제 7 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 면역결합체.

**청구항 14**

제 13항에 있어서,  
암의 치료에 사용하기 위한 면역결합체.

**청구항 15**

제 13항 또는 제 14항의 면역결합체 및 적어도 하나의 부형제 및/또는 약제학적 허용가능한 운반체를 포함하는 약제학적 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 새로운 항원 결합 단백질, 상세하게는 단백질 Ax1과 특이적으로 결합할 수 있는 단일클론 항체뿐만 아니라 상기 단백질을 코딩하는 아미노산 및 핵산 서열들에 관한 것이다. 한 가지 관점으로부터, 본 발명은 세포 내로 내재화되는 Ax1의 내재화 (internalization)를 유도하여, Ax1과 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단백질, 또는 항원 결합 단편들에 관한 것이다. 본 발명은 또한 독소들, 방사성-원소들 또는 약물들과 같은 다른 항암 화합물들과 결합하여 어드레싱 (addressing) 산물로서 상기 항원 결합 단백질의 용도, 및 소정의 암들의 치료를 위한 그의 용도를 포함한다.

**배경기술**

[0002] "Ax1" ("Ufo", "Ark" 또는 "Tyro7"이라고도 역시 말함)은 마우스 NIH3T3에 의해 과다-발현될 때 형질전환을 유발하는 종양원 유전자 (oncogene)로서 만성 골수성 백혈병을 가진 환자들로부터 클론되었다. 이것은 TAM (Tyro3, Ax1, Mer) 패밀이라고 불리는 수용체 타이로신 키나제들 (RTK들)의 패밀리에 속하고, 본 패밀리는 Tyro3 (Rse, Sky, Dtk, Etk, Brt, Tif), Ax1, 및 Mer (Eyk, Nyk, Tyro-12)를 포함한다 [Lemke G. Nat. Rev. Immunol. (2008), 8: 327-336].

[0003] 인간 단백질 Ax1은 서열이 서열목록에서 서열번호 29로서 개시된 894개의 아미노산들이다. 아미노산들 1 내지 25번은 신호 펩타이드에 해당하고, 상기 신호 펩타이드가 없는 인간 단백질 Ax1은 서열목록에서 서열번호 30로서 개시된다.

[0004] 원래 성장 정지 (growth arrest)-특이적 유전자로서 분리된 Gas6은 TAM 패밀리의 구성원들을 위한 공통적인 리간드이다 [Varnum B.C. et al. Nature (1995), 373: 623-626]. Gas6은 Ax1에 대한 가장 높은 친화도를 나타내고, 다음 순서로는 Tyro3이, 최종적으로는 Mer가 이어진다 [Nagata K. et al. J. Biol. Chem. (1996), 271: 30022-30027]. Gas6은 인지질 막들, 4개의 표피 성장인자-유사 도메인들 및 2개의 라미닌 G-유사 (LG) 도메인들과 결합을 매개하는  $\gamma$ -카복시글루탐아메이트 (Gla)-농축 도메인으로 구성된다 [Manfioletti G., Brancolini, C., Avanzi, G. & Schneider, C. Mol. Cell Biol. (1993), 13: 4976-4985]. 많은 다른 RTK들과 같이, 리간드 결합은 수용체 이중합 그리고 다양한 세포내 신호전달 분자들을 위한 도킹 부위들로서 작용하는 타이로신 잔기들 (수용체 Ax1의 경우 타이로신 잔기들 779번, 821번 및 866번)의 자가인산화를 유발한다 [Linger R.M. Adv. Cancer Res. (2008), 100: 35-83]. 또한, Ax1 수용체는 리간드-비의존성 과정을 통하여 활성화될 수 있다. 이러한 활성화는 Ax1 수용체가 과다발현될 때 일어날 수 있다.

[0005] Gas6/Ax1 신호전달은 매우 다양한 세포들에서 시험관내 세포 증식, 부착, 이동 및 생존을 포함하는 다양한 세포성 과정들을 조절하는 것으로 확인되어 왔다 [Hafizi S. & Dahlback, B. FEBS J. (2006), 273: 5231-5244]. 또한, TAM 수용체들은 선천적 면역성의 조절에 관여하고; 그들은 가지세포들 (DC들) 및 대식세포들에서 병원균들에 대한 염증성 반응들을 저해한다. 그들은 이들 면역 세포들에 의한 세포사멸 세포들의 포식작용 (phagocytosis)도 역시 추진하고 그들은 자연 킬러 (NK) 세포들의 성숙 및 살상 활성을 위해 요구된다 [Lemke G. Nat. Rev. Immunol. (2008), 8: 327-336].

[0006] 이것은 정상 세포들 상에서는 약하게 발현되지만, 주로 세포 생존을 지지하는 섬유모세포들, 골수성 전구 세포들, 대식세포들, 신경원 조직들, 심장 및 골격 근육에서는 우세하게 관찰된다. Gas6/Ax1 시스템은 혈관 평활근세포 항상성을 조절하여 혈관 생물학에서 중요한 역할을 담당한다 [Korshunov V.A., Mohan, A.M., Georger, M.A. & Berk, B.C. Circ. Res. (2006), 98: 1446-1452; Korshunov V.A., Daul, M., Massett, M.P. & Berk, B.C. Hypertension (2007), 50: 1057-1062].

[0007] 종양 세포들에서, Ax1은 세포성 침입 및 이동을 조절하는 데 중요한 역할을 담당한다. Ax1의 과다-발현은 유방

암, 결장암, 식도 암종, 간세포암, 위암, 교아종, 폐암, 흑색종, 골육종, 난소암, 전립선암, 횡문근육종, 신장 암, 갑상샘암 및 자궁내막암에 대해 보고된 바와 같이 다양한 인간 암들의 나쁜 예후뿐만 아니라 증가된 침습성 과도 연관되어 있다 [리뷰들을 위해, Linger R.M. Adv. Cancer Res. (2008), 100: 35-83 및 Verma A. Mol. Cancer Ther. (2011), 10: 1763-1773]. 유방암의 경우에, Ax1은 상피-대-중간엽 전이 (EMT)의 강한 효과기인 것으로 보이고; EMT 프로그램은 유기체에서 암 세포들의 이동 및 전파에 활발하게 기여한다 [Thiery J.P. Curr. Opin. Cell Biol. (2003), 15: 740-746].

[0008] Ax1은 혈관형성을 조절하는 것으로도 역시 확인되어 왔다. 따라서 자궁내막 세포들에서 Ax1의 녹다운 (knockdown)은 관 형성 및 이동을 손상시켰을 뿐만 아니라 [Holland S.J. et al. Cancer Res. (2005), 65: 9294-9303] 특이적 혈관형성 신호전달 경로들을 교란시켰다 [Li Y. et al. Oncogene (2009), 28: 3442-3455].

[0009] 보다 최근에는 광범위한 세포 모델들에 관한 여러 연구들이 약물 저항성 현상에서 Ax1 과다발현의 관여를 기술 하였다. 다음의 표 1은 이들 연구들을 요약하고 있다.

**표 1**

참고문헌	암 유형	치료제	세포 모델
Macleod et al., 2005	유방암	시스플라틴	PE01/PE01CDDP
Mahadevan et al., 2007	GIST	이마티닙 c-kit/PDGFR 저해제	GIST882 >GIST-R
Lay et al., 2007	NSCLC	독소루비신	CL-1 클론 CL1-5F4 클론
Hong et al., 2008	AML	독소루비신/시스플라틴	U937
Liu et al., 2009	유방암	라파티닙 (HER1 및 HER2 저해제)	HER2 (+) BT474 (J4)
Keating et al., 2010	별아교종	테모졸로마이드 카보플라틴, 빈크리스틴	G12 A172
Ye et al., 2010	NSCLC	에를로티닙	HCC827

[0010]

[0011] 표 1에서 인용된 완전한 참고문헌들은 다음과 같다:

[0012] - Macleod, K. et al. Cancer Res. (2005), 65: 6789-6800

[0013] - Mahadevan D. et al. Oncogene (2007), 26: 3909-3919

[0014] - Lay J.D. et al. Cancer Res. (2007), 67: 3878-3887

[0015] - Hong C.C. et al. Cancer Lett. (2008), 268: 314-324

[0016] - Liu L. et al. Cancer Res. (2009), 69: 6871-6878

[0017] - Keating A.K. et al. Mol. Cancer Ther. (2010), 9: 1298-1307

[0018] - Ye X. et al. Oncogene (2010), 29: 5254-5264

[0019] 이러한 맥락에서 Ax1 RTK는 종양학에서 흥미로운 표적으로서 고려된다. 여러 연구 그룹들이 이미 미가공 단일 클론 항체들 또는 표적화된 소분자들 둘 중 하나를 사용하여 gas6/Ax1 축을 표적하는 항-종양 전략들을 개발한 바 있었다 [Verma A. Mol. Cancer Ther. (2011), 10: 1763-1773].

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0020] 첫 번째 구현예에서, 본 발명은 i) 인간 단백질 Ax1과 특이적으로 결합하고, ii) 상기 인간 단백질 Ax1과 그의 결합에 이어서 내재화되는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0021] 보다 일반적으로, 본 발명은 상기 표적 Ax1과 그의 결합에 이어서 내재화될 수 있는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편의 선별을 위한 단백질 Ax1의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게, 상기 표적은 Ax1의 세포외 도메인이다.
- [0022] 본 상세한 관점에서, 본 발명은 따라서 관심 있는 분자를 포유동물 세포들 내로 전달하거나 내재화할 수 있는 화합물, 또는 그의 결합 단편을 검색하는 시험관내 방법으로서, 상기 관심 있는 분자는 상기 화합물과 공유적으로 결합되고, 상기 방법은 다음의 단계들
- [0023] a) Ax1 단백질, 또는 그의 세포외 도메인 (ECD), 또는 그의 에피토프를 특이적으로 결합할 수 있는 화합물을 선별하는 단계;
- [0024] b) 선택적으로, 상기 관심 있는 분자, 또는 대조군 분자를 상기 단계 a) 단계에서 선별된 화합물과 공유적으로 결합하고 복합체를 형성하는 단계;
- [0025] c) 상기 단계 a)에서 선택된 화합물, 또는 상기 단계 b)에서 획득된 복합체를 세포의 표면에서 Ax1 단백질, 또는 그의 기능적 단편을 발현하는 포유동물 세포, 바람직하게는 생존가능한 세포와 접촉시키는 단계;
- [0026] d) 상기 화합물, 또는 상기 관심 있는 분자 또는 상기 복합체가 상기 포유동물 세포 내에 세포내로 전달되거나 내재화되었던 여부를 결정하는 단계; 및
- [0027] e) 상기 화합물을 관심 있는 분자를 생존가능한 포유동물 세포 내로 전달하거나 내재화할 수 있는 화합물로서 선별하는 단계;
- [0028] 를 포함하는, 방법에 관한 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0029] 바람직한 구현예에서, 상기 관심 있는 분자를 생존가능한 포유동물 세포 내로 전달하거나 내재화할 수 있는 화합물은 단백질 (본 명세서에서 폴리펩타이드 또는 펩타이드라고도 역시 명명됨) 또는 펩타이드 구조, 상세하게는 적어도 5개, 10개, 15개 이상의 아미노산 잔기들의 아미노산 서열로서, 상기 아미노산 잔기(들)은 당화될 수 있는 아미노산 서열을 포함하는 단백질-유사 화합물이다.
- [0030] 상기 관심 있는 분자를 생존가능한 포유동물 세포 내로 전달하거나 내재화할 수 있는 화합물이 단백질 또는 단백질-유사 화합물일 때, 상기 화합물은 본 명세서에서 "항원 결합 단백질"이라고도 역시 불리고, 상기 항원 결합 단백질, 또는 그의 결합 단편은:
- [0031] - i) 단백질 Ax1, 바람직하게는 인간 단백질 Ax1과 특이적으로 결합하고,
- [0032] - ii) 상기 Ax1 단백질이 포유동물 세포의 표면에서 발현될 때 상기 단백질 Ax1과 그의 결합에 이어서 상기 포유동물 세포 내로 내재화될 수 있다.
- [0033] 바람직한 구현예에서, 상기 포유동물의 생존가능한 세포는 인간 세포, 바람직하게는 Ax1 단백질 수용체를 자연적으로 발현하는 세포이다.
- [0034] 상세한 구현예에서, 단계 a)에서 포유동물의 생존가능한 세포들은 그들의 표면에서 재조합 Ax1 단백질(들)을 발현하는 포유동물 세포들이다.
- [0035] 또한 바람직한 구현예에서, 상기 관심 있는 분자는 세포독성 분자 (본 명세서에서 세포독성 또는 세포증식억제제라고도 역시 명명됨)이다.
- [0036] 또한 바람직한 구현예에서, 상기 관심 있는 분자는 링커, 더욱 바람직하게는 펩타이드성 링커, 더욱 바람직하게는 절단가능한 펩타이드성 링커, 더욱 바람직하게는 포유동물 세포에, 상세하게는 상기 포유동물 세포의 세포질에 포함된 자연적인 세포내 화합물들에 의해 절단될 수 있는 링커를 사용하여 Ax1 단백질과 결합할 수 있는 상기 화합물과 공유적으로 결합된다.

- [0037] 또한 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 Ax1 단백질을 결합할 수 있는 화합물은 Ax1 단백질, 또는 Ax1 EDC 도메인 내에 정착된 그의 에피토프에게로 특이적으로 유도되는 항체, 또는 그의 기능적 결합 단편이다.
- [0038] 선별 단계 e)는 세포내 전달 또는 내재화의 평가를 위하여 당업자에게 알려져 있는 임의의 방법에 의해 실현될 수 있다. 상기 Ax1 단백질을 특이적으로 결합할 수 있는 화합물, 또는 상기 화합물 및 상기 관심 있는 분자에 의해 형성된 상기 복합체, 또는 상기 화합물과 공유적으로 결합된 상기 관심 있는 분자의 존재, 부재, 또는 활성을 나타내거나 평가할 수 있는 검정법 또는 테스트는 당업자라면 잘 숙지하고 있다 (이하 본 명세서에서 개시된 이러한 테스트 또는 검정법의 일정 실시예들을 참조하고, 이들 테스트들은 다음의 테스트 실시예들에 제한되지는 않는다).
- [0039] 보다 상세하게, 이들 테스트들 또는 검정법들은 FACS, 면역형광법, 유동 세포측정법, 웨스턴 블롯, 세포독성/세포증식억제 평가들 등에 의해 실현될 수 있다.
- [0040] 이러한 관점에서, 본 발명은 또한 세포독성 화합물을 포유동물 세포, 바람직하게는 생존가능한 세포 내로 전달할 수 있는 세포독성 또는 세포증식억제 복합체를 제조하는 시험관내 방법으로서, 상기 방법은
- [0041] i) Ax1 단백질, 바람직하게는 인간 Ax1 단백질을 특이적으로 결합할 수 있고,
- [0042] ii) 상기 Ax1 단백질이 포유동물 세포의 표면에서 발현될 때 상기 단백질 Ax1과 세포의 결합에 이어서 상기 포유동물 세포 내로 내재화되는:
- [0043] 화합물과 세포독성 제제를 공유적으로 결합하는 단계:를 포함하는, 방법에 관한 것이다.
- [0044] 바람직하게, 상기 화합물은 단백질-유사 단백질, 더욱 바람직하게는 Ax1 단백질에게로, 또는 Ax1 EDC 도메인 내에 정착된 그의 에피토프에게로 특이적으로 유도되는 항체, 또는 상기 항체의 기능적 결합 단편이다.
- [0045] 바람직한 구현예에서, 상기 세포독성 제제는 링커, 더욱 바람직하게는 펩타이드성 링커, 더욱 바람직하게는 절단가능한 펩타이드성 링커, 더욱 바람직하게는 비제한적인 예로서 자연적인 세포내 화합물들에 의해 절단될 수 있는 링커를 사용하여, 상기 항-Ax1 항체 또는 그의 기능적 단편과 공유적으로 결합된다.
- [0046] TAM 패밀리의 다른 구성원들과 같이, Ax1 세포의 도메인 (ECD)은 세포 부착 분자들의 구성원들에게는 닫혀있는 조직구성을 가진다. Ax1 ECD는 2개의 인접한 피브로넥틴 제 III형 도메인들로 이어지는 2개의 면역글로불린-유사 도메인들의 조합을 특징으로 한다 [O'Bryan J.P. et al. Mol. Cell Biol. (1991), 11: 5016-5031]. 2개의 N-말단 면역글로불린-유사 도메인들은 Gas6 리간드 결합을 하기에 충분하다 [Sasaki T. et al. EMBO J. (2006), 25: 80-87].
- [0047] 인간 단백질 Ax1의 ECD는 서열번호 29의 서열의 아미노산들 1번 내지 145번에 해당하는 451개의 아미노산들 단편이고, 그의 서열은 서열목록에서 서열번호 31로서 개시된다. 아미노산들 1번 내지 25번은 신호 펩타이드에 해당하고, 신호 펩타이드가 없는 인간 단백질 Ax1의 ECD는 서열번호 32의 서열에 의해 개시된, 서열번호 29의 서열의 아미노산들 26번 내지 451번에 해당한다.
- [0048] 현재 서로 다른 유형들의 내재화가 확인되었다. 그들은 세포에서 어울리는 내재화된 단백질들 또는 단백질 복합체로 방향을 정한다. 세포내입 (endocytosis) 이후에, 대부분의 막 단백질들 또는 지질들은 세포 표면으로 돌아오지만 (재순환), 일정 막 구성성분들은 이후의 엔도솜 또는 골기체로 전달된다 [Maxfield F.R. & McGraw, T.E. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2004), 5: 121-132].
- [0049] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 i) 인간 단백질 Ax1과 특이적으로 결합하고; ii) 상기 인간 단백질 Ax1과 그의 결합에 이어서 내재화되는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 상기 항원 결합 단백질은 서열번호들 1 내지 14로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열, 또는 서열번호들 1 내지 14와 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0050] 가장 바람직한 구현예에서, 본 발명은
- [0051] i) 바람직하게는 서열번호 29 또는 30의 서열 또는 그의 자연적 변이체 서열을 가지는 인간 단백질 Ax1과 특이적으로 결합하고;
- [0052] ii) 상기 인간 단백질 Ax1과 그의 결합에 이어서 내재화되는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

- [0053] 상기 항원 결합 단백질은 서열번호들 1 내지 14로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0054] "결합 단백질" 또는 "항원 결합 단백질"은 또 다른 단백질 또는 분자 (일반적으로 항원이라고도 말함)와 특이적 또는 일반적 친화도를 가지는 펩타이드성 사슬이다. 단백질들은 결합이 가능할 때 접촉하게 되어 복합체를 형성한다. 본 발명의 항원 결합 단백질은 바람직하게, 제한되지 않고도 항체, 항체의 단편 또는 유도체, 단백질 또는 펩타이드일 수 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 항원 결합 단백질의 "항원 결합 단편"에 의하여, 항원 결합 단백질의 표적 (일반적으로 항원이라고도 역시 말함)과 특이적으로 결합하는 능력을 보유하고 항원 결합 단백질의 아미노산 서열의 적어도 5개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 10개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 15개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 20개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 25개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 40개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 50개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 60개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 70개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 80개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 90개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 100개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 125개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 150개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 175개 연속적 아미노산 잔기들, 적어도 200개 연속적 아미노산 잔기들, 또는 적어도 250개 연속적 아미노산 잔기들의 아미노산 서열을 포함하는, 임의의 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 가리키도록 의도된다.
- [0056] 항원 결합 단백질이 항체가 되는 바람직한 구현예에서, 이러한 "항원 결합 단편들"은 Fv, scFv (단일 사슬의 sc), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc 단편들 또는 다이아체들, 또는 폴리(에틸렌)글리콜 ("PEG화")(Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG 또는 Fab'-PEG라고 불리는 PEG화된 단편들) (폴리(에틸렌)글리콜의 "PEG")과 같은 폴리(알킬렌)글리콜의 부가와 같은 화학적 변형, 또는 리포솜 내의 도입에 의해 반감기가 증가되었던 임의의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 상기 단편들은 본 발명에 따른 항체의 특징적인 CDR들의 적어도 하나를 가진다. 바람직하게, 상기 "항원 결합 단편들"은 그들이 유래된 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 사슬의 부분적 서열로 구성되거나 이를 포함할 것이고, 상기 부분적 서열은 이것이 유래된 항체와 동일한 결합 특이도 및 충분한 친화도, 바람직하게는 이것이 유래된 항체의 친화도의 적어도 동등 내지 1/100, 더욱 바람직하게는 적어도 1/10까지의 친화도를 표적에 대하여 보유하기에 충분하다. 이러한 기능적 단편은 이것이 유래된 항체의 서열의 최소 5개 아미노산들, 바람직하게는 10개, 15개, 25개, 50개 및 100개의 보존적인 아미노산들을 포함할 것이다.
- [0057] 용어 "에피토프"는 항체들을 포함하는 항원 결합 단백질에 의해 결합된 항원의 부위이다. 에피토프들은 구조적 또는 기능적으로서 정의될 수 있다. 기능적 에피토프들은 일반적으로 구조적 에피토프들의 소집합이고 상호작용의 친화도에 직접적으로 기여하는 이들 잔기들을 포함한다. 에피토프들은 또한 입체형태를 가지고, 즉 비-선형의 아미노산들로 구성될 수 있다. 소정의 구현예들에서, 에피토프들은 아미노산들, 당 측쇄들, 포스포릴 기들, 또는 설프닐 기들과 같은 분자들의 화학적으로 활성을 가진 표면 그룹화된 결합기들을 포함할 수 있고, 소정의 구현예들에서, 특이적인 삼차원 구조적 특징들, 및/또는 특이적인 전하 특징들을 가질 수 있다.
- [0058] 본 출원에서, 에피토프는 인간 단백질 Ax1의 세포의 도메인 내에 정착된다.
- [0059] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 인간 단백질 Ax1 세포의 도메인 내에 정착된, 바람직하게는 서열번호 31 또는 32의 서열 또는 그의 자연적 변이체 서열을 가지는 에피토프와 특이적으로 결합한다.
- [0060] "특이적으로 결합", "특이적으로 결합하는" 등에 의하여, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원-결합 단편은 생리적 조건들 하에서 비교적 안정한 항원과 복합체를 형성한다. 특이적 결합은 적어도 약  $1 \times 10^{-6}$  M 미만의 평형 해리 상수를 특징으로 할 수 있다. 2개의 분자들이 특이적으로 결합하는지 여부를 결정하는 방법들은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있고, 예를 들면 평형 투석법, 표면 플라즈몬 공명법 등을 포함한다. 의심을 피하기 위해, 상기 항원 결합 단편은 낮은 수준에서 또 다른 항원과 결합하거나 이를 간섭할 수 없는 것을 의미하지 않는다. 그럼에도 불구하고, 바람직한 구현예로서, 상기 항원 결합 단편은 상기 항원과만 결합한다.
- [0061] 이러한 의미에서, "EC<sub>50</sub>"은 50% 효과 농도를 말한다. 보다 상세하게, 용어 중간의 최대 효과 농도 (EC<sub>50</sub>)는 일정 특정된 노출 시간 이후에 기저값 및 최대값 사이의 중간 반응을 유도하는 약물, 항체 또는 독물의 농도에 해당한다. 이것은 약물의 효능의 척도로서 보편적으로 사용된다. 따라서 등급화된 용량 반응 곡선의 EC<sub>50</sub>은 최대 효과의 50%가 관찰되는 화합물의 농도를 나타낸다. 양적 용량 반응 곡선의 EC<sub>50</sub>은 특정된 노출 지속 이후에 집



단의 50%가 반응을 나타내는 화합물의 농도를 나타낸다. 농도 측정들은 전형적으로 S자형 곡선을 따르고, 농도의 비교적 작은 변화를 거쳐서 신속하게 증가한다. 이것은 최상의-적용 선의 유도에 의해 수학적으로 결정될 수 있다.

[0062] 바람직한 구현예로서, 본 발명에서 결정된 EC<sub>50</sub>은 인간 종양 세포들 상에 노출된 Ax1 ECD 상의 항체 결합의 효능을 특징 분석하였다. EC<sub>50</sub> 매개변수는 FACS 분석을 사용하여 결정된다. EC<sub>50</sub> 매개변수는 인간 종양 세포들 상에서 발현된 인간 Ax1 상의 최대 결합의 50%가 획득되는 항체 농도를 반영한다. 각각의 EC<sub>50</sub> 수치는 4-매개변수 회귀 곡선 적용 프로그램 (프리즘 소프트웨어)을 사용하여 용량 반응 곡선의 중간점으로서 계산되었다. 이러한 매개변수는 생리학/병리학 적 병태들을 나타내도록 선택되어 왔다.

[0063] 본 발명의 구현예에서, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 그의 에피토프와 EC<sub>50</sub>의 적어도 10<sup>-9</sup> M, 바람직하게는 10<sup>-9</sup> 및 10<sup>-12</sup> M 사이의 범위로 결합한다.

[0064] 본 발명의 또 다른 구현예는 포유동물 세포들 내로, 바람직하게는 인간 세포, 바람직하게는 생존가능한 세포 내에 세포내 내재화할 수 있는 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편을 선별하는 공정 또는 방법으로서, 다음의 단계들:

[0065] i) Ax1, 바람직하게 그의 ECD 도메인, 또는 그의 에피토프와 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단백질을 선택하는 단계; 및

[0066] ii) 포유동물 세포의 표면에서 발현된 Ax1 단백질과 그의 결합에 이어서 포유동물 세포 내로 내재화되는 이전의 단계 i)로부터 얻은 상기 항원 결합 단백질을 선별하는 단계:를 포함하는, 방법이다.

[0067] 상세한 구현예에서, 상기 포유동물 세포는 그의 표면에서 Ax1 단백질 수용체를 자연적으로 발현하거나 그들의 표면에서 재조합 Ax1 단백질을 발현하는 포유동물 세포들, 바람직하게는 인간 세포들이다.

[0068] 이러한 방법 또는 공정은 i) Ax1과 EC<sub>50</sub>의 적어도 10<sup>-9</sup> M로 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단백질을 선별하는 단계; 및 ii) Ax1과 그들의 결합에 이어서 내재화되는 이전의 단계 i)로부터 항원 결합 단백질을 선별하는 단계:를 포함한다. 선별 단계 ii)는 내재화의 평가를 위해 당업자라면 숙지하고 있는 방법에 의해 실현될 수 있다. 보다 상세하게, 테스트들은 FACS, 면역형광법, 유동 세포측정법, 웨스턴 블롯, 세포독성/세포증식억제 평가들 등에 의해 실현될 수 있다.

[0069] 본 발명에 따른 항원 결합 단백질의 또 다른 특징은 이것이 종양 세포들의 증식에 미치는 임의의 유의한 효과를 가지지 않는 것이다. 보다 상세하게, 다음의 실시예들에서 설명된 바와 같이, 본 발명에 따른 항원 결합 단백질은 증식 SN12C 모델에 미치는 임의의 유의한 *시험관내* 활성을 가지지 않는다.

[0070] 종양학에서, mAb들이 치료적 효능을 나타낼 수 있는 다수의 기작들이 존재하지만, 종종 그들의 활성은 지속적인 유익을 주기에는 충분하지 않다. 따라서, 여러 전략들이 항체들을 특히 화학요법제들로서의 약물들과 조합하여 그들의 활성을 증진하도록 사용되어 왔다. 조합 프로토콜들에 대한 효율적인 대안으로서, 면역독소들 (immunotoxin)이 암을 치료하기 위한 새로운 치료적 옵션이 되고 있다 [Beck A. et al. Discov. Med. (2010), 10: 329-339; Alley S.C. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. (2009), 330: 932-938]. 항체-약물 결합체들 (ADC들)은 mAb들 특이도를 이용하고 종양으로 세포독성 제제의 전달을 표적하는 능력이 mAb들 및 약물 활성 둘 다를 유의하게 증진하는 하나의 접근법을 보여준다. 이상적으로 mAb들은 종양 세포들 상에서 실질적인 발현을 가지지만 정상 세포들 상에서는 제한된 발현을 가지는 항원과 특이적으로 결합할 것이다.

[0071] 본 발명은 Ax1 결합에 이어서 내재화되도록 높은 활성을 나타내는, 특이적 항-Ax1 결합 단백질, 보다 상세하게는 특이적 항-Ax1 항체에 중점을 둔다. 이러한 항원 결합 단백질은 결합된 세포독성을 표적화된 암 세포들 내로 어드레싱함으로써, 면역-약물-결합체 구성성분들의 하나로서 흥미롭다. 일단 내재화되면, 세포독성은 암세포 사망을 유발시킨다.

[0072] 면역결합체 요법으로서의 성공에 중요한 핵심들은 표적 항원 특이도 및 암 세포들 내로 항원-결합 단백질의 내재화인 것으로 생각된다. 명백하게, 비-내재화 항원들은 세포독성 제제들을 전달하는 데 내재화 항원들보다 덜 효과적이다. 내재화 공정들은 항원들 중에서 가변적이고 결합 단백질들에 의해 영향을 받을 수 있는 다수의 매개변수들에 의존한다. 세포-표면 RTK들은 이러한 접근법에 대해 조사하도록 흥미로운 항원들 패밀리리를 구성한

다.

- [0073] 생체분자에서, 세포독성제 (cytotoxic)는 세포독성 활성을 가져오고 사용된 항원 결합 단백질은 암 세포들에 대한 특이도, 뿐만 아니라 세포독성제를 정확하게 어드레싱하도록 세포들 내로 진입하기 위한 백터를 가져온다.
- [0074] 따라서 면역결합체 분자를 개선하도록, 운반체-결합 단백질은 표적화된 암 세포들 내로 내재화하는 높은 능력을 나타내어야 한다. 결합 단백질이 내재화를 매개하는 효율은 표적화된 에피토프에 의존하여 유의하게 달라진다. 강력한 내재화 항-Ax1 결합 단백질들의 선별은 Ax1 저하조절뿐만 아니라 이어지는 세포들에게 알맞은 항-Ax1 결합 단백질들을 연구하는 다양한 실험적 데이터를 요구한다.
- [0075] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 항원 결합 단백질의 내재화는 바람직하게 면역형광법 (이하 본 출원에서 예시된 바와 같음) 또는 내재화 기작에 특이적인 기술분야의 당업자라면 숙지하고 있는 방법 또는 공정에 의해 평가될 수 있다.
- [0076] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따라 복합체 Ax1-항원 결합 단백질은 상기 Ax1의 ECD와 본 발명의 결합 단백질의 결합 이후에 내재화되면서, 세포들의 표면에서 Ax1 양의 감소가 유도된다. 이러한 감소는 당업자라면 숙지하고 있는 방법 (웨스턴-블롯, FACS, 면역형광법 등)에 의해 정량될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 구현예에서, 이러한 내재화를 반영하는 감소는 바람직하게 FACS에 의해 측정되고, 미처리된 세포들 상에서 측정된 평균 형광 강도 (MFI) 및 본 발명에 따른 항원 결합 단백질로 처리된 세포들로 측정된 MFI 간의 차이 또는 델타값으로서 표현될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 비제한적인 예로서, 이러한 델타값은 미처리된 세포들 및 본 발명의 항원 결합 단백질로 처리된 세포들로 획득된 MFI들을 기초로 하여 실시예 9에서 기술된 바와 같이 i) 본 발명의 항원 결합 단백질로 24시간의 배양 기간 이후에 인간 신장 종양 SN12C 세포들 및 ii) 알렉사 488로 표지된 이차 항체를 사용하여 결정된다.

---

**$\Delta$  (MFI<sub>24h</sub> 미처리된 세포 - MFI<sub>24h</sub> 항원 결합 단백질 처리된 세포들)**

---

- [0079]
- [0080] MFI들 간의 이러한 차이는 MFI들이 세포-표면 상에서 발현된 Ax1과 비례하기 때문에 Ax1 저하조절을 반영한다.
- [0081] 더욱 바람직하고 유리한 관점에서, 본 발명의 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은  $\Delta$  (MFI<sub>24h</sub> 미처리된 세포들 - MFI<sub>24h</sub> 처리된 세포들)의 적어도 200, 바람직하게는 적어도 300을 유도하는, 단일클론 항체, 바람직하게는 분리된 Mab로 구성된다.
- [0082] 본 발명에 따른 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 적어도 200의 MFI의 감소를 유도한다.
- [0083] 보다 자세하게는, 상기 언급된 델타값은 다음의 공정에 따라 측정될 수 있고, 이는 설명적이고 비제한적인 예로서 고려되어야 한다:
- [0084] a) 관심 있는 종양성 세포들을 본 발명의 항원 결합 단백질과 함께 처리하고 배양하는 단계;
- [0085] b) 단계 a)의 처리된 세포들 및 동시에 미처리된 세포들을 본 발명의 항원 결합 단백질로 처리하는 단계;
- [0086] c) 처리 및 미처리된 세포들에 대한 MFI (표면에 존재하는 Ax1의 양을 나타냄)를 항원 결합 단백질과 결합할 수 있는 이차 표지된 항체로 측정하는 단계; 및
- [0087] d) 미처리된 세포들로 획득된 MFI로부터 처리된 세포들로 획득된 MFI의 차감으로서 델타값을 계산하는 단계.
- [0088] 용어들 "항체", "항체들" 또는 "면역글로불린"은 가장 넓은 의미에서 상호교환적으로 사용되고 단일클론 항체들, 바람직하게는 분리된 Mab (예로, 전장의 또는 미가공의 단일클론 항체들), 다중클론 항체들, 다가의 항체들 또는 다중특이적 항체들 (예로, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체들)을 포함한다.
- [0089] 보다 상세하게, 이러한 분자는 디설파이드 결합들에 의해 상호-연결된 적어도 2개의 중쇄들 (H) 및 2개의 경쇄들 (L)을 포함하는 당단백질로 구성된다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 부위 (또는 도메인) (본 명세서에서 HCVR 또는 VH라고 약칭됨) 및 중쇄 불변 부위를 포함한다. 중쇄 불변 부위는 3가지 도메인들, CH1, CH2 및 CH3를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 부위 (본 명세서에서 LCVR 또는 LH라고 약칭됨) 및 경쇄 불변 부위를 포함한다. 경쇄 불변 부위는 하나의 도메인, CL을 포함한다. VH 및 VL 부위들은 또한 구조를 부위들 (FR)이라고 명명되는 더욱 보존된 부위들과 함께 산재되어 있는 상보성 결정 부위들 (CDR)이라고 명명되는 과다가변성의 부위

들로 소분류될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단으로부터 카복시-말단까지 다음의 순서로 배열된 3가지 CDR들 및 4가지 FR들로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄들 및 경쇄들의 가변 부위들은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체들의 불변 부위들은 면역계의 다양한 세포들 (예로, 효과기 세포들) 및 고전적인 보체계의 첫 번째 구성성분 (C1q)을 포함하는 숙주 조직들 또는 인자들과 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

- [0090] 본 발명의 의미에서의 항체들은 또한 소정의 항체 단편들을 포함한다. 상기 항체 단편들은 출처 또는 면역글로불린 유형 (예로, IgG, IgE, IgM, IgA 등)과는 상관없이 원하는 결합 특이도 및 친화도를 나타내고, 예로 그들은 Ax1 단백질을 본 발명의 전장의 항체들과 비슷한 친화도로 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0091] 일반적으로, 특히 마우스 기원의 단일클론 항체들 또는 그들의 기능적 단편들의 제조를 위해, 상세하게는 매뉴얼 "항체들 (Antibodies)" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 콜드 스프링 하버 연구소, 콜드 스프링 하버 NY, pp. 726, 1988)에서 기술된 기법들 또는 코흘러 및 밀스타인 (Kohler and Milstein, Nature, 256: 495-497, 1975)에 의해 기술된 하이브리도마들로부터 제조의 기법을 참조하는 것이 가능하다.
- [0092] 용어 "단일클론 항체" 또는 "Mab"는 본 명세서에서 사용되는 바 특이적 항원에게로 유도되는 항체 분자를 말하고, 이는 B 세포들 또는 하이브리도마의 단일한 클론들에 의해 생산될 수 있다. 단일클론 항체들은 또한 재조합적이고, 예로 단백질 조각에 의해 생산될 수 있다. 또한, 전형적으로 다양한 결정기들, 또는 에피토프들에게로 유도되는 다양한 항체들을 포함하는 다중클론 항체들의 제조들과 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원의 단일한 에피토프에게로 유도된다. 본 발명은 자연적 출처들로부터의 정제에 의해 분리되거나 획득된 또는 유전적 재조합 또는 화학적 합성에 의해 획득된 항체들에 관한 것이다.
- [0093] 본 발명의 바람직한 구현에는 항체로서, 서열번호들 1, 2 및 3의 서열들, 또는 서열번호들 1, 2 및 3과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열을 포함하는 3가지 경쇄 CDR들; 및 서열번호들 4, 5 및 6의 서열들, 또는 서열번호들 4, 5 및 6과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열을 포함하는 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는, 항체를 포함하거나 이로 구성되는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편이다.
- [0094] 본 발명의 더욱 바람직한 구현에서, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 항체로서, 서열번호들 1, 2 및 3의 서열들을 포함하는 3가지 경쇄 CDR들; 및 서열번호들 4, 5 및 6의 서열들을 포함하는 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는, 항체로 구성된다.
- [0095] 바람직한 관점에서, CDR 부위들 또는 CDR(들)에 의하여, IMGT에 의해 정의되는 바와 같이 면역글로불린들의 중쇄들 및 경쇄들의 과다가변 부위들을 가리키도록 의도된다. 반대 의견이 없는 경우라면, CDR들은 IMGT 번호매김 체계에 따라 본 명세서에서 정의될 것이다.
- [0096] 독특한 IMGT 번호매김 (IMGT unique numbering)은 어떤 항원 수용체, 사슬 유형 또는 종이라도 가변 도메인들을 비교하도록 정의되어 왔다 [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M. P., Pommie C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. 독특한 IMGT 번호매김에서, 보존되는 아미노산들은 항상 동일한 위치들, 예를 들면 23번 시스테인 (1번째-CYS), 41번 트립토판 (보존된-TRP), 89번 소수성 아미노산, 104번 시스테인 (2번째-CYS), 118번 페닐알라닌 또는 트립토판 (J-PHE 또는 J-TRP)을 보유한다. 독특한 IMGT 번호매김은 구조를 부위들 (FR1-IMGT: 1 내지 26번 위치, FR2-IMGT: 39 내지 55번 위치, FR3-IMGT: 66 내지 104번 위치 및 FR4-IMGT: 118 내지 128번 위치) 및 상보성 결정 부위들 (CDR1-IMGT: 27 내지 38번 위치, CDR2-IMGT: 56 내지 65번 위치 및 CDR3-IMGT: 105 내지 117번 위치)의 표준화된 구획 (standardized delimitation)을 제공한다. "공간들 (gap)"은 채워지지 않은 위치를 나타내기 때문에, CDR-IMGT 길이들 (괄호들 사이에 나타나고 점들로 분리됨, 예로 [8.8.13])는 결정적인 정보가 된다. 독특한 IMGT 번호매김은 IMGT 진주목걸이라고 명명되는 [Ruiz, M. and Lefranc, M. P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. and Lefranc, M. P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] 2차원 그래픽 전시들 및 IMGT/3D 구조-DB의 3차원 구조들 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M. P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]에 사용된다.
- [0097] 본 명세서에서 반대의 특정이 없는 경우라면, 상보성-결정 부위들 또는 CDR들은 IMGT 번호매김 체계에 따라 정의된 바와 같이 면역글로불린의 중쇄들 및 경쇄들의 과다가변 부위들을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0098] 그럼에도 불구하고, CDR들은 또한 카밧 번호매김 체계에 따라 정의될 수 있다 (Kabat *et al.*, Sequences of

proteins of immunological interest, 제 5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 및 이후 개정판들). 3가지 중쇄 CDR들 및 3가지 경쇄 CDR들이 존재한다. 본 명세서에서, 용어들 "CRD" 및 "CDR들"은 경우에 따라서 그들이 인식하는 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 결합 친화도를 부여하는 대부분의 아미노산 잔기들을 포함하는 부위들의 하나 이상 또는 심지어 전부를 가리키는 데 사용된다.

[0099] 카뎀 번호매김 체계에 따르면, 본 발명은 항체로서, 카뎀 번호매김 체계에 따라 정의된 바와 같이 서열번호 9, 10 및 11의 서열들, 또는 서열번호 9, 10 및 11과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열을 포함하는 3가지 경쇄 CDR들; 및 서열번호들 12, 13 및 14의 서열들, 또는 서열번호들 12, 13 및 14와 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열을 포함하는 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는, 항체로 구성되는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0100] 본 발명의 의미에서, 두 개의 핵산들 또는 아미노산들의 서열들 간의 "일치도 백분율 (percentage identity)"는 최적의 정렬에 따라 획득되어 비교되는 두 개의 서열들 간에 일치하는 뉴클레오타이드들 또는 아미노산 잔기들의 백분율을 의미하고, 이러한 백분율은 순수하게 통계적이고 이 두 서열들 간의 차이들은 그들의 길이를 따라 무작위적으로 분포한다. 두 개의 핵산 또는 아미노산 서열들 간의 서열 비교는 통상적으로 그들을 최적으로 정렬시킨 이후 서열들을 비교하여 수행되고, 상기 비교는 분절마다 또는 "정렬창 (alignment window)"을 사용하여 수행될 수 있다. 비교를 위한 서열들의 최적의 정렬은 수동적인 비교와 더불어 스미스 및 워터만의 로칼 상동성 알고리즘 (local homology algorithm) [Smith and Waterman (1981) *Ad. App. Math.* 2:482]에 의해, 네들만 및 운쉬의 로칼 상동성 알고리즘 [Neddleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443]에 의해, 피어슨 및 립만의 유사도 탐색 방법 [Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444]에 의해, 또는 이들 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 소프트웨어에 의해 (위스콘신 유전학 소프트웨어 패키지, 유전학 컴퓨터 그룹, 575 Science Dr., Madison, WI에서의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 또는 비교 소프트웨어 BLAST N 또는 BLAST P에 의해) 수행될 수 있다.

[0101] 두 개의 핵산 또는 아미노산 서열들 간의 일치도 백분율은 비교되는 핵산 또는 아미노산 서열이 이들 두 서열들 간 최적의 정렬을 위한 기준 서열 (reference sequence)과 대비하여 부가들 (addition) 또는 결실들 (deletion)을 포함할 수 있는 두 개의 최적으로 정렬된 서열들을 비교하여 결정된다. 일치도 백분율은 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 두 개 서열들 간에 일치하는 위치의 수를 결정하고, 동일한 위치들의 수를 정렬창에서의 전체 위치들의 수로 나누고, 획득된 결과를 두 개 서열들 간의 일치도 백분율을 얻도록 100으로 곱하여 계산된다.

[0102] 예를 들면, 웹 사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> 상에서 입수가능한 BLAST 프로그램 "BLAST 2 서열들" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 서열- 단백질 및 뉴클레오타이드 서열들을 비교하기 위한 새로운 도구", *FEMS Microbiol.*, 1999, *Lett.* 174: 247-250)은 디폴트 매개변수 (명확하게, 매개변수 "오픈 갭 페널티 (open gap penalty)"의 경우: 5, 및 "연장 갭 페널티 (extension gap penalty)": 2; 선택된 매트릭스는 예를 들면 프로그램에 의해 제시되는 "BLOSUM 62" 매트릭스일 수 있음)와 함께 사용될 수 있고, 비교될 두 개 서열들 간의 일치도 백분율은 프로그램에 의해 직접 계산될 수도 있다.

[0103] 기준 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 가지는 아미노산 서열을 위해, 바람직한 예들은 기준 서열, 소정의 변형들 (modification), 명확하게는 적어도 하나의 아미노산의 결실 (deletion), 부가 (addition) 또는 치환 (substitution), 절단 (truncation) 또는 연장 (extension)을 포함한다. 하나 이상의 연속적 또는 비-연속적 아미노산(들)의 치환들 경우에서, 치환된 아미노산은 "동등한" 아미노산에 의해 대체되는 치환이 바람직하다. 본 명세서에서 용어 표현 "동등한 아미노산들"은 해당하는 항체들의 생물학적 활성들을 변형시키지 않고도 구조적 아미노산들 및 하기 정의된 특정한 예들의 하나로 치환될 수 있는 임의의 아미노산들을 가리키도록 의미한다.

[0104] 동등한 아미노산들은 치환된 아미노산들과의 그들의 구조적 상동성을 기초로 하거나 생성될 수 있는 다양한 항체들 간의 생물학적 활성의 비교 테스트들의 결과들을 기초로 하여 결정될 수 있다.

[0105] 비-제한적인 예로서, 하기 표 2는 해당하는 변형된 항체의 생물학적 활성의 유의한 변형을 유발하지 않고도 수행될 수 있는 가능한 치환들을 요약하고 있고; 역 치환들 (inverse substitution)도 동일한 조건들 하에서 자연적으로 가능하다.

표 2

원 잔기	치환(들)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0106]

[0107] 본 발명의 구현예는 서열번호들 1, 2 및 3의 서열들, 또는 서열번호들 1, 2 및 3과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열을 포함하는 3가지 경쇄 CDR들; 및 서열번호 8의 서열, 또는 서열번호 8과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0108] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호들 1, 2 및 3의 서열들을 포함하는 3가지 경쇄 CDR들; 및 서열번호 8의 서열, 또는 서열번호 8과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0109] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 8의 서열, 또는 서열번호 8과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0110] "서열번호 8과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 임의의 서열"에 의하여, 서열번호들 4, 5 및 6의 3가지 중쇄 CDR들을 나타내고, 또한 CDR들, 예로 서열번호들 4, 5 및 6에 해당하는 서열들 외부에 전장의 서열번호 8의 서열과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 서열을 명명하도록 의도된다.

[0111] 본 발명의 또 다른 구현예는 서열번호 7의 서열, 또는 서열번호 7과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인; 및 서열번호들 4, 5 및 6의 서열들, 또는 서열번호들 4, 5 및 6과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

- [0112] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 7의 서열, 또는 서열번호 7과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인; 및 서열번호들 4, 5 및 6의 서열들을 포함하는 3가지 중쇄 CDR들을 포함한다.
- [0113] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 7의 서열, 또는 서열번호 7과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0114] "서열번호 7과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 임의의 서열"에 의하여, 또한 서열번호들 1, 2 및 3의 3가지 경쇄 CDR들을 나타내고, 또한 CDR들, 예로 서열번호들 1, 2 및 3에 해당하는 서열들 외부에 전장의 서열번호 7의 서열과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 서열을 명명하도록 의도된다.
- [0115] 본 발명의 또 다른 구현예는 서열번호 7의 서열, 또는 서열번호 7과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인; 및 서열번호 8의 서열, 또는 서열번호 8과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0116] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 7의 서열, 또는 서열번호 7과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인; 및 서열번호 8의 서열, 또는 서열번호 8과 적어도 80%의 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0117] 명확하게 하자면, 하기 표 3은 본 발명의 항원 결합 단백질에 해당하는 다양한 아미노산 서열들을 요약하고 있다 (Mu = 마우스)

**표 3**

	CDR 번호매김	중쇄	경쇄	서열번호	
1613F12	IMGT		CDR-L1	1	
			CDR-L2	2	
			CDR-L3	3	
		CDR-H1		4	
		CDR-H2		5	
		CDR-H3		6	
	카뱃			CDR-L1	9
				CDR-L2	10
				CDR-L3	11
			CDR-H1		12
			CDR-H2		13
			CDR-H3		14
			Mu. 가변 도메인		7
		Mu. 가변 도메인			8

- [0118]
- [0119] 본 발명의 상세한 관점은 마우스 항체, 또는 그의 유래된 화합물들 또는 항원 결합 단편들로서, 상기 항체는 마우스와 이종유래의 중, 명확하게는 인간의 항체로부터 유래한 경쇄 및 중쇄 불변 부위들도 역시 포함하는 것을 특징으로 하는, 마우스 항체, 또는 그의 유래된 화합물들 또는 항원 결합 단편들에 관한 것이다.
- [0120] 본 발명의 또 다른 상세한 관점은 키메라 항체, 또는 그의 유래된 화합물들 또는 항원 결합 단편들로서, 상기 항체는 마우스와 이종유래의 중, 명확하게는 인간의 항체로부터 유래한 경쇄 및 중쇄 불변 부위들도 역시 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항체, 또는 그의 유래된 화합물들 또는 항원 결합 단편들에 관한 것이다.
- [0121] 본 발명의 보다 또 다른 상세한 관점은 인간화 항체, 또는 그의 유래된 화합물들 또는 항원 결합 단편들로서, 인간 항체로부터 유래한 경쇄 및 중쇄의 불변 부위들은 각각 람다 또는 카파 부위 및 감마-1, 감마-2 또는 감마-3인 것을 특징으로 하는, 인간화 항체, 또는 그의 유래된 화합물들 또는 항원 결합 단편들에 관한 것이다.

- [0122] 본 발명의 또 다른 관점은 프랑스 파스티르연구소, CNCM에 2011년 7월 28일자로 기탁된 하이브리도마 I-4505로부터 유래된 단일클론 항체 1613F12로 구성되는 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편이다.
- [0123] 또 다른 관점에 따르면, 본 발명은 본 발명에 따른 항원 결합 단백질을 분비할 수 있는 마우스 하이브리도마, 명확하게는 프랑스 미생물 배양 수집기관 (프랑스 파리 파스티르연구소, CNCM)에 2011년 7월 28일자로 기탁번호 제 I-4505호 하에 제출된 마우스 기원의 하이브리도마에 관한 것이다. 상기 하이브리도마는 Balb/C 면역결핍 마우스들 비장 세포들/림프 세포들 및 골수종 Sp 2/O-Ag 14 세포주의 세포들의 융합에 의해 획득되었다.
- [0124] 또 다른 관점에 따르면, 본 발명은 서열번호들 1, 2 및 3의 서열들을 포함하는 3가지 경쇄 CDR들; 및 서열번호들 4, 5 및 6의 서열들을 포함하는 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체를 분비할 수 있는 마우스 하이브리도마로서, 프랑스 파리 파스티르연구소, CNCM에 2011년 7월 28일자로 기탁번호 제 I-4505호 하에 제출된 마우스 하이브리도마에 관한 것이다. 상기 하이브리도마는 Balb/C 면역결핍 마우스들 비장 세포들/림프 세포들 및 골수종 Sp 2/O-Ag 14 세포주의 세포들의 융합에 의해 획득되었다.
- [0125] 본 발명의 목적은 프랑스 파리 파스티르연구소, CNCM에 2011년 7월 28일자로 기탁된 마우스 하이브리도마 I-4505이다.
- [0126] 본 발명의 항원 결합 단백질은 또한 키메라 또는 인간화 항체들을 포함한다.
- [0127] 키메라 항체는 주어진 종의 항체로부터 유래한 자연적 가변 부위 (경쇄 및 중쇄)를 상기 주어진 종과 이종유래의 종의 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 부위들과 조합으로 포함하는 것이다.
- [0128] 항체들, 또는 그의 키메라 단편들은 재조합 유전학의 기법들을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 키메라 항체는 프로모터 그리고 본 발명의 비인간, 명확하게는 마우스 단일클론 항체의 가변 부위를 코딩하는 서열, 및 인간 항체 불변 부위를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 DNA를 클로닝하여 생산될 수 있다. 하나의 이러한 재조합 유전자에 의해 코딩되는 본 발명에 따른 키메라 항체는, 예를 들면 마우스-인간 키메라로서, 이러한 항체의 특이도는 마우스 DNA로부터 유래한 가변 부위에 의해 결정되고 그의 이소형은 인간 DNA로부터 유래한 불변 부위에 의해 결정되는, 것일 수 있다. 키메라 항체들을 제조하는 방법들을 위해 버호옌 등을 참조하라 (Verhoeven *et al.*, BioEssays, 8: 74, 1988).
- [0129] 또 다른 관점에서, 본 발명은 키메라 항체로 구성되는 결합 단백질을 기술하고 있다.
- [0130] 상세한 바람직한 구현예에서, 본 발명의 키메라 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하고, 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0131] 또 다른 관점에서, 본 발명은 인간화 항체로 구성되는 결합 단백질을 기술하고 있다.
- [0132] "인간화 항체들"은 비인간 기원의 항체로부터 유래한 CDR 부위들을 포함하는 항체로서, 항체 분자의 다른 부분들은 하나의 (또는 여럿의) 인간 항체들로부터 유래하는, 항체를 의미한다. 또한, 골격 분절 잔기들 (FR이라고 불림)의 일부는 결합 친화도를 보존하도록 변형될 수 있다 (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525, 1986; Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327, 1988).
- [0133] 본 발명의 인간화 항체들 또는 그의 단편들은 당업자라면 숙지하고 있는 기법들 (예를 들면, Singer *et al.*, J. Immun., 150: 2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992; 및 Bebbington *et al.*, Bio/Technology, 10: 169-175, 1992 문헌들에서 기술된 것들과 같음)에 의해 제조될 수 있다. 이러한 인간화 항체들은 시험관내 진단들 또는 생체내 예방적 및/또는 진단적 치료를 포함하는 방법들에 사용하는 데 바람직하다. 다른 인간화 기법들도 또한, 예를 들면 유럽 특허들 제 EP 0 451 261호, 제 EP 0 682 040호, 제 EP 0 939 127호, 제 EP 0 566 647호 또는 미국 특허들 제 US 5,530,101호, 제 US 6,180,370호, 제 US 5,585,089호 및 제 US 5,693,761호에서 PDL에 의해 기술된 "CDR 접합 (CDR grafting)"과 같은 기술분야의 당업자라면 숙지하고 있다. 미국 특허들 제 5,639,641호 또는 제 6,054,297호, 제 5,886,152호 및 제 5,877,293호도 역시 인용될 수 있다.
- [0134] 또한, 본 발명은 상기 기술된 마우스 항체들로부터 나온 인간화 항체들에 관한 것이다.
- [0135] 바람직한 방식으로, 인간 항체로부터 유래한 경쇄 및 중쇄의 불변 부위들은 각각 램다 또는 카파 및 감마-1, 감마-2 또는 감마-4 부위이다.
- [0136] 본 발명의 새로운 관점은 분리된 핵산이 다음의 핵산들 (임의의 중복성 (degenerate) 유전암호를 포함함) 중에

서 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산에 관한 것이다:

- [0137] a) 본 발명에 따른 항원 결합 단편, 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산;
- [0138] b) 다음을 포함하는 핵산:
  - [0139] - 서열번호들 15 내지 28로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 핵산 서열, 또는
  - [0140] - 서열번호들 15 내지 20의 6개 핵산 서열들을 포함하는 핵산 서열, 또는
  - [0141] - 서열번호들 21, 22의 2개 핵산 서열들을 포함하는 핵산 서열;
- [0142] c) a) 또는 b)에서 정의된 바와 같은 핵산과 상보적인 핵산; 및
- [0143] d) a) 또는 b) 부분에서 정의된 바와 같은 핵산 서열들, 또는 최적의 정렬 이후에 a) 또는 b) 부분에서 정의된 바와 같은 핵산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 가진 서열과 높은 엄격도의 조건들 하에서 혼성화할 수 있는, 바람직하게는 적어도 18개 뉴클레오타이드들을 가지는 핵산.
- [0144] 하기 표 4는 본 발명의 결합 단백질에 대한 다양한 뉴클레오타이드 서열들을 요약하고 있다 (Mu. = 마우스)

**표 4**

	CDR 번호매김	중쇄	경쇄	서열번호	
1613F12	IMGT		CDR-L1	15	
			CDR-L2	16	
			CDR-L3	17	
		CDR-H1		18	
		CDR-H2		19	
		CDR-H3		20	
	카뱃			CDR-L1	23
				CDR-L2	24
				CDR-L3	25
		CDR-H1			26
		CDR-H2			27
		CDR-H3			28
			Mu. 가변 도메인		21
		Mu. 가변 도메인			22

- [0145]
- [0146] 발명의 상세한 설명에서 상호교환적으로 사용되는 용어들 "핵산 (nucleic acid)", "핵산 서열 (nucleic sequence)", "핵산 서열 (nucleic acid sequence)", "폴리뉴클레오타이드 (polynucleotide)", "올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide)", "폴리뉴클레오타이드 서열 (polynucleotide sequence)" 및 "뉴클레오타이드 서열 (nucleotide sequence)"은, 변형 여부와 상관없이 핵산의 단편 또는 부위를 정의하고, 비자연적 뉴클레오타이드를 포함하기도 하고, 이중가닥 DNA, 단일가닥 DNA 또는 상기 DNA들의 전사 산물들로 존재하는 뉴클레오타이드들의 정확한 서열을 의미한다.
- [0147] 본 발명의 서열들은 분리되었고/거나 정제되었고, 예로 그들은 예를 들면 그들의 환경이 적어도 부분적으로 변형되었던 사본에 의해 직접 또는 간접적으로 수집되었다. 재조합 유전자에 의해, 예를 들면 숙주 세포들의 수단에 의해 획득되거나, 화학적 합성에 의해 획득된 분리된 핵산들도 역시 본 명세서에서 언급되어야 한다.
- [0148] "바람직한 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도 백분율을 나타내는 핵산 서열들"은 기준 핵산 서열에 관하여, 상세하게 결실, 절단, 연장, 키메라 융합 및/또는 치환, 명확하게는 점 치환 (punctual)과 같은 소정의 변형들을 나타내는 핵산 서열들을 의미한다. 바람직하게, 이들은 유전 암호의 중복성 (degeneration)과 관련되는 기준 서열과 동일한 아미노산 서열들을 코딩하는 서열들, 또는 기준 서열과, 바람직하게는 높은 엄격도, 명확하게는 하기에 정의된 조건들 하에서 특이적으로 혼성화할 수 있는 상



보성 서열들이다.

- [0149] 높은 엄격도의 조건들 하에서 혼성화는 온도 및 이온 강도에 관한 조건들이 그들이 두 가지 상보적인 DNA 단편들 간에 혼성화를 유지하도록 허용하는 방식으로 선택되는 것을 의미한다. 자세하게 설명하면, 상기에 기술된 폴리뉴클레오타이드 단편들을 정의하려는 목적으로 혼성화 단계의 높은 엄격도 조건들은 유리하게 다음과 같다.
- [0150] DNA-DNA 또는 DNA-RNA 혼성화는 두 단계로 수행된다: (1) 5× SSC (1× SSC 는 0.15 M NaCl + 0.015 M 소듐 시트레이트 용액에 해당한다), 50% 포름아마이드, 7% 소듐 도데실 설페이트 (SDS), 10× 덴하르트 용액, 5% 텍스트란 설페이트, 1% 연어정자 DNA를 포함하는 포스페이트 완충용액 (20 mM, pH 7.5)에서 42°C로 3시간 동안 전-혼성화; (2) 탐침의 길이에 의존하는 온도에서 (예로, > 100개 뉴클레오타이드들 길이의 탐침의 경우 42°C) 20 시간 동안 일차적으로 혼성화에 이어서, 2× SSC + 2% SDS에서 20분 동안 20°C로 두 번 세척, 0.1× SSC + 0.1% SDS에서 20분 동안 20°C로 한 번 세척. 최종 세척은 > 100개 뉴클레오타이드들 길이의 탐침의 경우 0.1× SSC + 0.1% SDS에서 30분 동안 60°C로 수행된다. 정해진 크기의 폴리뉴클레오타이드에 대한 상기에서 기술된 높은 엄격도 혼성화 조건들은, 샘브룩 등에 기술된 절차들에 따라 (Sambrook *et al.*, 1989, 분자 클로닝: 실험실 매뉴얼, 콜드 스프링 하버 연구소, 제 3판, 2001) 더 길거나 더 짧은 길이의 올리고뉴클레오타이드들의 경우 당업자에 의해 적용될 수 있다.
- [0151] 본 발명은 또한 본 발명에서 기술된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0152] 본 발명은 명확하게 이러한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 클로닝 및/또는 발현 벡터들을 목표로 한다.
- [0153] 본 발명의 벡터들은 바람직하게 주어진 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열들의 발현 및/또는 분비를 허용하는 요소들을 포함한다. 벡터는 따라서 프로모터, 해독 개시 및 종결 신호들, 뿐만 아니라 적합한 전사 조절 부위들을 포함해야 한다. 이것은 숙주세포에서 안정한 방식으로 유지될 수 있어야 하고, 선택적으로 해독된 단백질의 분비를 특징하는 특이적 신호들을 가질 수 있다. 이들 다양한 요소들은 사용된 숙주 세포에 따라 당업자에 의해 선택되고 최적화된다. 이러한 목적으로, 뉴클레오타이드 서열들은 선택된 숙주 내의 자가-복제하는 벡터들 내에 삽입되거나 선택된 숙주의 통합 벡터들일 수 있다.
- [0154] 이러한 벡터들은 당업자에 의해 전형적으로 사용되는 방법들에 의해 제조되고, 결과로 얻은 클론들은 리포펙션, 전기천공법, 열 충격법 또는 화학적 방법들과 같은 표준 방법들에 의해 적합한 숙주 내로 도입될 수 있다.
- [0155] 본 벡터들은 예를 들면 플라스미드 또는 바이러스 기원의 벡터들이다. 그들은 본 발명의 뉴클레오타이드 서열들을 클론하거나 발현하기 위하여 숙주 세포들을 형질전환하는 데 사용된다.
- [0156] 본 발명은 또한 본 발명에서 기술된 바와 같은 벡터에 의해 형질전환되거나 이를 포함하는 분리된 숙주 세포들을 포함한다.
- [0157] 숙주 세포들은 박테리아 세포들, 뿐만 아니라 예를 들면 효모 세포들 또는 동물 세포들, 명확하게는 포유동물 세포들 (인간을 제외함)과 같은 원핵 또는 진핵 시스템들 중에서 선택될 수 있다. 곤충 또는 식물 세포들도 역시 사용될 수 있다.
- [0158] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형질전환된 세포를 가지는, 인간 이외의 동물들에 관한 것이다.
- [0159] 본 발명의 또 다른 관점은 본 발명에 따른 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편을 생산하는 방법으로서, 상기 방법은
- [0160] a) 본 발명에 따른 숙주 세포에 적합한 배양 조건들을 가진 배지에서 배양하는 단계; 및
- [0161] b) 이에 따라 배양 배지로부터 또는 상기 배양된 세포들로부터 생산된 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편들의 하나를 회수하는 단계;
- [0162] 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법에 관한 것이다.
- [0163] 본 발명에 따른 형질전환된 세포들은 본 발명에 따른 제조할 항원 결합 단백질을 제조하는 방법들에서 사용된다. 본 발명에 따른 항원 결합 단백질을 제조할 형태로 제조하는 방법들로서, 본 발명에 따라 벡터 및/또는 벡터에 의해 형질전환된 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 방법들도 역시 본 발명에 포함된다. 바람직하게, 본 발명에 따른 벡터에 의해 형질전환된 세포는 상기 항원 결합 단백질의 발현 및 상기 제조할 단백질의 회수를 허용하는 조건들 하에서 배양된다.
- [0164] 이미 언급된 바와 같이, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 시스템들 중에서 선택될 수 있다. 상세하게는, 이러한 원

핵 또는 진핵 시스템들에서 분비를 용이하게 하는 본 발명의 뉴클레오타이드 서열들을 확인하는 것이 가능하다. 이러한 서열을 보유하는 본 발명에 따른 벡터는 따라서 분비될 재조합 단백질들의 생산에 유리하게 사용될 수 있다. 이에 따라, 이들 관심 있는 재조합 단백질의 정제는 그들이 숙주 세포들 내부가 아닌 세포 배양의 상층액에 존재하는 사실에 의해 용이하게 될 것이다.

- [0165] 본 발명의 항원 결합 단백질은 또한 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 제조 방법도 또한 본 발명의 목적이다. 당업자라면 단편들의 농축에 의하거나 용액에서의 통상적인 합성에 의한 고체-상 기법들 (명확하게는 Steward *et al.*, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 제 2판, pp 71-95 참조) 또는 부분적 고체-상 기법들과 같은 화학적 합성의 방법들을 숙지하고 있다. 화학적 합성에 의해 획득되고 해당하는 비자연적 아미노산들을 포함할 수 있는 폴리펩타이드들도 역시 본 발명에 포함된다.
- [0166] 본 발명의 방법에 의해 획득될 수 있는 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편들도 역시 본 발명에 포함된다.
- [0167] 상세한 관점에 따르면, 본 발명은 숙주 표적 부위에서 세포독성 제제를 전달하기 위한 어드레싱 산물로서 사용하기 위한 상기에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편들로서, 상기 숙주 표적 부위는 단백질 Ax1 세포외 도메인, 바람직하게 인간 단백질 Ax1 세포외 도메인, 더욱 바람직하게는 서열번호 31 또는 32의 서열, 또는 그의 자연적 변이체 서열을 가지는 인간 단백질 Ax1 세포외 도메인 내에 정착된 에피토프로 구성되는, 항원 결합 단백질, 또는 그의 항원 결합 단편들에 관한 것이다.
- [0168] 바람직한 구현예에서, 상기 숙주 표적 부위는 포유동물 세포의, 더욱 바람직하게는 인간 세포의, 더욱 바람직하게는 자연적으로 또는 유전적 재조합에 의해 Ax1 단백질을 발현하는 세포들의 표적 부위이다.
- [0169] 본 발명은 세포독성 제제와 결합된 본 명세서에서 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질을 포함하는 면역결합체에 관한 것이다.
- [0170] 본 발명의 의미에서, 용어 표현 "면역결합체 (immunoconjugate)" 또는 "면역-결합체 (immuno-conjugate)"는 일반적으로 높게 표적화된 화합물을 제작하도록 하나 이상의 치료적 제제(들)과 물리적으로 결합된 적어도 하나의 어드레싱 산물을 포함하는 화합물을 말한다.
- [0171] 바람직한 구현예에서, 이러한 치료적 제제들은 세포독성 제제들로 구성된다.
- [0172] "세포독성 제제 (cytotoxic agent)" 또는 "세포독성제 (cytotoxic)"에 의하여, 개체에게 투여될 때 개체의 신체에서 세포 증식의 발생, 바람직하게는 암의 발생을, 세포성 기능을 저해 또는 방해하고/거나 세포 사멸을 유발하여 치료하거나 예방하는 제제가 의도된다.
- [0173] 많은 세포독성 제제들이 분리되거나 합성되어 왔고, 세포 증식을 저해하거나, 명확하지 않은 경우라도 적어도 유의하게 종양 세포들을 파괴하거나 감소시키는 것을 가능하게 한다. 그러나, 이들 제제들의 독성 활성은 종양 세포들에 제한되지 않고, 비-종양 세포들도 역시 영향을 받고 파괴될 수 있다. 보다 상세하게, 부작용들이 조혈 세포들 또는 상피 세포들, 상세하게는 점막성 막들의 세포들과 같이 신속하게 재생하는 세포들 상에서 관찰된다. 자세하게, 위장관의 세포들은 이러한 세포독성 제제들의 사용에 의해 많이 영향을 받는다.
- [0174] 본 발명의 목적들의 하나는 또한 정상 세포들에 미치는 부작용들을 제한하는 것을 가능하게 하면서 동시에 종양 세포들에 미치는 높은 세포독성을 보존하는 세포독성 제제를 제공할 수 있는 것이다.
- [0175] 보다 상세하게, 세포독성 제제는 바람직하게, 제한되지 않고도 약물 (예로, "항체-약물 결합체"), 독소 (예로, "면역독소" 또는 "항체-독소 결합체"), 방사성 동위원소 (예로, "방사성 면역결합체" 또는 "항체-방사성 동위원소 결합체") 등으로 구성될 수 있다.
- [0176] 본 발명의 첫 번째 바람직한 구현예에서, 면역결합체는 적어도 하나의 약물 또는 약제와 결합된 결합 단백질로 구성된다. 이러한 면역결합체는 결합 단백질이 항체, 또는 그의 항원 결합 단편일 때 항체-약물 결합체 (또는 "ADC")라고 말한다.
- [0177] 첫 번째 구현예에서, 이러한 약물들은 그들의 작용 방식에 관하여 기술될 수 있다. 비제한적인 예로서, 질소 머스타드, 알킬-설포네이트들, 니트로소우레아, 옥사조포린들, 아지리딘들 또는 이민-에틸렌들과 같은 알킬화제들, 항-대사물들, 항-종양 항생제들, 세포분열 저해제들, 크로마틴 기능 저해제들, 항-혈관형성제들, 항-에스트로겐들, 항-안드로겐들, 키레이팅제들, 철 흡수 촉진제, 사이클로옥시게나제 저해제들, 포스포디에스테라제 저해제들, DNA 저해제들, DNA 합성 저해제들, 세포사멸 촉진제들, 티몰레이트 저해제들, T 세포 저해제들, 인터페

론 작용제들, 리보뉴클레오사이드 트리포스페이트 환원효소 저해제들, 아로마타제 저해제들, 에스트로겐 수용체 길항제들, 타이로신 키나제 저해제들, 세포 주기 저해제들, 택산 (Taxane), 튜블린 저해제들, 혈관형성 저해제들, 대식세포 촉진제들, 뉴로키닌 수용체 길항제들, 카나비노이드 수용체 작용제들, 도파민 수용체 작용제들, 과립세포 촉진인자 작용제들, 에리트로포이에틴 수용체 작용제들, 소마토스타틴 수용체 작용제들, LHRH 작용제들, 칼슘 민감제들, VEGF 수용체 길항제들, 인터루킨 수용체 작용제들, 과골세포 저해제들, 라디칼 형성 촉진제들, 엔도텔린 수용체 길항제들, 빈카 알칼로이드, 항-호르몬 또는 면역조절제들 또는 세포독성 또는 독소의 활성 판정기준을 만족하는 기타 새로운 약물이 언급될 수 있다.

[0178] 이러한 약물들은, 예를 들면 VIDAL 2010에서 암종학 및 혈액학 부분 "세포독성제들 (Cytotoxics)"에 첨부된 화합물들에 할애된 페이지 상에서 인용되고, 이러한 참고문헌을 참조하여 인용된 이들 세포독성 화합물들은 본 명세서에서 바람직한 세포독성 제제들로서 인용된다.

[0179] 보다 상세하게는, 제한되지 않고도 다음의 약물들이 본 발명에 따라 바람직하다: 메클로르에타민 (mechlorethamine), 클로르암부콜 (chlorambucol), 멜팔란 (melphalen), 클로리드레이트 (chlorydrate), 피포브로멘 (pipobromen), 프레드니머스틴 (prednimustin), 디소딕-포스페이트, 에스트라머스틴 (estramustine), 사이클로포스파마이드, 알트레타민 (altretamine), 트로포스파마이드 (trofosfamide), 설포포스파마이드 (sulfofosfamide), 이포스파마이드 (ifosfamide), 티오테파 (thiotepa), 트리에틸렌아민, 알테트라아민, 카머스틴 (carmustine), 스트렙토조신 (streptozocin), 포테머스틴 (fotemustin), 로머스틴 (lomustine), 부설판 (busulfan), 트레오설판 (treosulfan), 임프로설판 (improsulfan), 다카바진 (dacarbazine), 시스-플라티늄 (cis-platinum), 옥살리플라틴 (oxaliplatin), 로바플라틴 (lobaplatin), 헵타플라틴 (heptaplatin), 미리플라틴 하이드레이트 (miriplatin hydrate), 카보플라틴 (carboplatin), 메토트렉세이트 (methotrexate), 페메트렉세드 (pemetrexed), 5-플루오르우라실 (5-fluoruracil), 플록스우리딘 (floxuridine), 5-플루오로데옥시우리딘 (5-fluorodeoxyuridine), 카페시타빈 (capecitabine), 사이타라빈 (cytarabine), 플루다라빈 (fludarabine), 사이토신 아리비노사이드 (cytosine arabinoside), 6-머캡토펜 (6-mercaptopyrimidine, 6-MP), 넬아라빈 (nelarabine), 6-티오구아닌 (6-TG), 클로로데소옥시아데노신 (chlorodesoxyadenosine), 5-아자사이티딘 (5-azacytidine), 겐시타빈 (gemcitabine), 클라드리빈 (cladribine), 데옥시코포르마이신 (deoxycoformycin), 테가퍼 (tegafur), 펜토스타틴 (pentostatin), 독소루비신 (doxorubicin), 다우노루비신 (daunorubicin), 이다루비신 (idarubicin), 발루비신 (valrubicin), 미톡산트론 (mitoxantrone), 닥티노마이신 (dactinomycin), 미트라마이신 (mithramycin), 플리카마이신 (plicamycin), 미토마이신 C (mitomycin C), 블레오마이신 (bleomycin), 프로카바진 (procarbazine), 파크리탁셀 (paclitaxel), 도세탁셀 (docetaxel), 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine), 빈데신 (vindesine), 비노렐빈 (vinorelbine), 토폠테칸 (topotecan), 이리노테칸 (irinotecan), 에토포사이드 (etoposide), 발루비신 (valrubicin), 앰루비신 염산 (amrubicin hydrochloride), 피라루비신 (pirarubicin), 엘립티늄 아세테이트 (elliptinium acetate), 조루비신 (zorubicin), 에피루비신 (epirubicin), 이다루비신 (idarubicin) 및 테노포사이드 (teniposide), 라족신 (razoxin), 마리마스탁트 (marimastat), 배티마스탁트 (batimastat), 프리노마스탁트 (prinomastat), 태노마스탁트 (tanomastat), 일로마스탁트 (ilomastat), CGS-27023A, 할로푸지논 (halofuginon), COL-3, 네오바스탁트 (neovastat), 탈리도마이드 (thalidomide), CDC 501, DMXAA, L-651582, 스쿠얼아민 (squalamine), 엔도스타틴 (endostatin), SU5416, SU6668, 인터페론-알파, EMD121974, 인터페론-12, IM862, 안지오스타틴 (angiostatin), 타목시펜 (tamoxifen), 토레미펜 (toremifene), 랄옥시펜 (raloxifene), 드롤로옥시펜 (droloxifene), 이오도옥시펜 (iodoxyfene), 아나스트로졸 (anastrozole), 레트로졸 (letrozole), 엑세메스탄 (exemestane), 플루타마이드 (flutamide), 닐루타마이드 (nilutamide), 스프리롤락톤 (sprironolactone), 사이프로테론 아세테이트 (cyproterone acetate), 피나스테라이드 (finasteride), 시미티딘 (cimitidine), 보르테조미드 (bortezomid), 벨카드 (Velcade), 비칼루타마이드 (bicalutamide), 사이프로테론 (cyproterone), 플루타마이드, 플베스트란 (fulvestran), 엑세메스탄 (exemestane), 다사티닙 (dasatinib), 에를로티닙 (erlotinib), 제피티닙 (gefitinib), 이마티닙 (imatinib), 라파티닙 (lapatinib), 닐로티닙 (nilotinib), 소라페닙 (sorafenib), 수니티닙 (sunitinib), 레티노이드 (retinoid), 렉시노이드 (rexinoid), 메톡사렌 (methoxsalene), 메틸아미노레블리네이트 (methylaminolevulinate), 알데스루킨 (aldesleukine), OCT-43, 데니루킨 디플리톡스 (denileukin diflitox), 인터루킨-2, 타소너민 (tasonermin), 렌티난 (lentinan), 시조필란 (sizofilan), 로퀸니멕스 (roquinimex), 피도티모드 (pidotimod), 페가데마제 (pegademase), 티모펜틴 (thymopentine), 폴리 I:C, 프로코다졸 (procodazol), 틱 BCG, 코리네박테리움 파븀 (corynebacterium parvum), NOV-002, 유크레인 (ukrain), 레바미졸 (levamisole), 1311-chTNT, H-101, 셀모루킨 (celmoleukin), 인터페론 알파2a, 인터페론 알파2b, 인터페론 감마1a, 인터페론-2, 모베나킨 (mobenakin), 렉신-G (Rexin-G),

테세루킨 (teceleukin), 아크라루비신 (aclarubicin), 액티노마이신 (actinomycin), 아르글라빈 (arglabin), 아스파라지나제 (asparaginase), 카르지노필린 (carzinophilin), 크로모마이신 (chromomycin), 다우노마이신 (daunomycin), 류코보린 (leucovorin), 마소프로콜 (masoprocol), 네오카지노스타틴 (neocarzinostatin), 페프로마이신 (peplomycin), 사코마이신 (sarkomycin), 솔라마르진 (solamargine), 트라벡테딘 (trabectedin), 스트렙토조신 (streptozocin), 테스토스테론 (testosterone), 쿠네카테킨들 (kunecatechins), 시네카테킨들 (sinecatechins), 알리트레티노인 (alitretinoin), 벨로테칸 염산 (belotecan hydrochloride), 칼루스테론 (calusterone), 드로모스타놀론 (dromostanolone), 엘립티늄 아세테이트, 에티닐 에스트라디올, 플루옥시메스테론 (fluoxymesterone), 포르메스탄 (formestane), 포스페트롤 (fosfetrol), 고세렐린 아세테이트 (goserelin acetate), 핵실 아미노레블리네이트, 히스트렐린 (histrelin), 하이드록시프로게스테론, 이자베필론 (ixabepilone), 류프로라이드 (leuprolide), 메드로옥시프로게스테론 아세테이트 (medroxyprogesterone acetate), 메게스테롤 아세테이트 (megesterol acetate), 메틸프레드니솔론 (methylprednisolone), 메틸테스토스테론, 밀테포신 (miltefosine), 미토브로니톨 (mitobronitol), 나드롤론 페닐프로피오네이트 (nadrolone phenylpropionate), 노르에틴드론 아세테이트 (norethindrone acetate), 프레드니솔론, 프레드니손 (prednisone), 템시롤리무스 (temsirrolimus), 테스토락톤 (testolactone), 트리아코놀론 (triamconolone), 트리프트렐린 (triptorelin), 바프레오타이드 아세테이트 (vapreotide acetate), 지노스타틴 (zinostatin), 스티말라머 (stimalamer), 아마크린 (amsacrine), 비소 트리옥사이드, 비산트렌 염산 (bisantrene hydrochloride), 클로르암부실 (chlorambucil), 클로르트리아니센 (chlortriani-sene), 시스-디아민디클로로백금, 사이클로포스파마이드, 디에틸stilbestrol (diethylstilbestrol), 헥사메틸멜라민 (hexamethylmelamine), 하이드록시우레아, 레나리도마이드 (lenalidomide), 로니다민 (lonidamine), 메클로르에타민 (mechlorethanamine), 미토탄 (mitotane), 네다프라틴 (nedaplatin), 니머스틴 염산 (nimustine hydrochloride), 파미드로네이트 (pamidronate), 피포브로만 (pipobroman), 소듐 포르피머 (porfimer sodium), 라니머스틴 (ranimustine), 라족산 (razoxane), 세머스틴 (semustine), 소부족산 (sobuzoxane), 메실레이트 (mesylate), 트리에틸렌멜라민, 졸레드론산 (zoledronic acid), 카모스타트 메실레이트 (camostat mesylate), 파드로졸 HCl (fadrozole HCl), 나폭시딘 (nafoxidine), 아미노글루테티마이드 (aminoglutethimide), 카르모퍼 (carmofur), 클로파라빈 (clofarabine), 사이토신 아라비노사이드, 데시타빈 (decitabine), 독시플루리딘 (doxifluridine), 에노시타빈 (enocitabine), 플루다라빈 포스페이트 (fludarabine phosphate), 플루오로우라실, 프로라퍼 (ftorafur), 우라실 머스타드, 아바렐릭스 (abarelix), 벅사로텐 (bexarotene), 란티터르세드 (raltitrexed), 타미바로텐 (tamibarotene), 테모졸로마이드 (temozolomide), 보리노스타트 (vorinostat), 메가스트롤 (megastrol), 디소듐 클로드로네이트 (clodronate disodium), 레바미졸 (levamisole), 페로목시톨 (ferumoxytol), 철 이소말토사이드 (iron isomaltoside), 셀레콕시브 (celecoxib), 이부디라스트 (ibudilast), 벤다머스틴 (bendamustine), 알트레타민 (altretamine), 미토락톨 (mitolactol), 템시롤리무스 (temsirrolimus), 프랄라트레세이트 (pralatrexate), TS-1, 데시타빈, 비칼루타마이드 (bicalutamide), 플루타마이드 (flutamide), 레트로졸 (letrozole), 디소듐 클로드로네이트, 데가렐릭스 (degarelix), 토레미펜 시트레이트 (toremifene citrate), 히스타민 이염산, DW-166HC, 니트라크린 (nitracrine), 데시타빈, 이리노테칸 염산 (irinotecan hydrochloride), 암사크린 (amsacrine), 로미렙신 (romidepsin), 트레티오닌 (tretinoin), 카바지탁셀 (cabazitaxel), 반데타니브 (vandetanib), 레나리도마이드 (lenalidomide), 이바드론산, 밀테포신, 비테스펜 (vitespen), 미파머타이드 (mifamurtide), 나드로파린 (nadroparin), 그라니세트론 (granisetron), 온단세트론 (ondansetron), 트로피세트론 (tropisetron), 알리자프라이드 (alizapride), 라모세트론 (ramosetron), 도라세트론 메실레이트 (dolasetron mesilate), 포사프레피탄트 디메글루민 (fosaprepitant dimeglumine), 나빌론 (nabilone), 아프레피탄트 (aprepitant), 드로나비놀 (dronabinol), TY-10721, 리수라이드 수소 말레이트 (lisuride hydrogen maleate), 에피세람 (epiceram), 데피브로타이드 (defibrotide), 다비가트란 에텍시레이트 (dabigatran etexilate), 필그라스탐 (filgrastim), 페그필그라스탐 (pegfilgrastim), 레드텍스 (reditux), 에포에틴 (epoetin), 몰그라모스탐 (molgramostim), 오프렐베킨 (oprelvekin), 시풀루셀-T (sipuleucel-T), M-Vax, 아세틸 L-카르니틴, 도네페질 염산 (donepezil hydrochloride), 5-아미노레블린산 (5-aminolevulinic acid), 메틸 아미노레블리네이트, 세트로렐릭스 아세테이트 (cetorelix acetate), 이코덱스트린 (icodextrin), 류프로렐린 (leuprorelin), 메트빌페니데이트 (metbylphenidate), 옥트레오타이드 (octreotide), 암렉사녹스 (amlexanox), 플레리자포 (plerixafor), 메나테트레논 (menatetrenone), 아네톨 (anethole) 디테오레티온 (dithiolethione), 독셀칼시페롤 (doxercalciferol), 시나칼셋 염산 (cinacalcet hydrochloride), 아레파셉트 (alefacept), 로미플로스트 (romiplostim), 티모글로불린 (thymoglobulin), 티말파신 (thymalfasin), 유베니맥스 (ubenimex), 이미퀴모드 (imiquimod), 에베롤리무스 (everolimus), 시롤리무스 (sirolimus), H-101, 라소폭시펜 (lasofoxi-fene), 트리로스탄 (trilostane), 인카드로네이트

(incadronate), 갱글리오사이드들 (ganglioside), 페가프티닙 옥타소듐 (pegaptanib octasodium), 버토포린 (vertoporphin), 미노드론산 (minodronic acid), 졸레드론산 (zoledronic acid), 갈륨 니트레이트, 소듐 알렌드로네이트 (alendronate sodium), 에티드로네이트 디소듐 (etidronate disodium), 디소듐 파미드로네이트 (disodium pamidronate), 듀타스테라이드 (dutasteride), 소듐 스티보글루코네이트 (sodium stibogluconate), 아르모다피닐 (armodafinil), 텍스라족산 (dexrazoxane), 아미포스틴 (amifostine), WF-10, 테모포르핀 (temoporfin), 다르베포에틴 알파 (darbepoetin alfa), 안세스티움 (ancestim), 사그라모스틴 (sargramostim), 팔리페민 (palifermin), R-744, 네피더민 (nepidermin), 오프렐베킨 (oprelvekin), 데니루킨 디프티톡스 (denileukin diftitox), 크리산타스파제 (crisantaspase), 부세렐린 (buserelin), 데스로렐린 (deslorelin), 란레오타이드 (lanreotide), 옥트레오타이드 (octreotide), 필로카르핀 (pilocarpine), 보센탄 (bosentan), 칼리체아미신 (calicheamicin), 메이탄시노이드들 (maytansinoid) 및 시클로니케이트 (cyclonicate).

- [0180] 보다 세부사항을 위해, 당업자라면 "프랑스 치료화학의 교육협회"에 의해 편집되고 "traite chimie therapeutique, vol. 6, Medicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edition TEC & DOC, 2003"라는 제목을 가진 매뉴얼을 참조할 수 있다.
- [0181] 본 발명의 두 번째 바람직한 구현예에서, 면역결합체는 적어도 하나의 방사성 동위원소와 결합된 결합 단백질로 구성된다. 이러한 면역결합체는 결합 단백질이 항체, 또는 그의 항원 결합 단편일 때 항체-방사성 동위원소 결합체 (또는 "ARC")라고 말한다.
- [0182] 종양의 선택적 파괴를 위해, 항체는 높은 방사성 원소를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소들이, 제한되지 않고도 At<sup>211</sup>, C<sup>13</sup>, N<sup>15</sup>, O<sup>17</sup>, Fl<sup>19</sup>, I<sup>123</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, In<sup>111</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, tc m, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup>, Lu, 가도리늄, 망간 또는 철의 방사성 동위원소들과 같이 ARC의 생산을 위해 사용가능하다.
- [0183] 당업자라면 숙지하고 있는 방법들 또는 공정들이 ARC에서 이러한 방사성 동위원소를 도입하는 데 사용될 수 있다 (예를 들면, "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" Chatal, CRC 출판사 1989 참조). 비제한적인 예로서, tc m 또는 I<sup>123</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup> 및 In<sup>111</sup>가 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. Y<sup>90</sup>가 라이신 잔기를 통해 부착될 수 있다. I<sup>123</sup>이 IODOGEN 방법을 사용하여 부착될 수 있다 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57).
- [0184] 여러 가지의 예들이 티오우레아 링커-킬레이팅 인자에 의해 결합된 항-CD20 단일클론 항체 및 In<sup>111</sup> 또는 Y<sup>90</sup> 방사성 동위원소로 구성되는 ARC인 제발린<sup>®</sup> (Zevalin<sup>®</sup>) (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7): 766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12): 4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10): 2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15): 3262-69); 또는 칼리체아미신과 연결된 항-CD33 항체로 구성되는 마이로타르그<sup>®</sup> (Mylotarg<sup>®</sup>)과 같은 ARC 분야에서 당업자의 지식을 설명하도록 언급될 수 있다 (미국 특허 제 4,970,198호; 제 5,079,233호; 제 5,585,089호; 제 5,606,040호; 제 5,693,762호; 제 5,739,116호; 제 5,767,285호; 제 5,773,001호). 더욱 최근에는, FDA에 의해 호지킨 림프종의 치료에 최근 승인되었던 아드세트리스 (Adcetris) (브렌투시마브 베도틴 (Brentuximab vedotin)에 해당함)라고 명명된 ADC가 또한 언급될 수 있다 (Nature, vol. 476, pp380-381, 2011년 8월 25일).
- [0185] 본 발명의 세 번째 바람직한 구현예에서, 면역결합체는 적어도 하나의 독소와 결합된 결합 단백질로 구성된다. 이러한 면역결합체는 결합 단백질이 항체, 또는 그의 항원 결합 단편일 때 항체-독소 결합체 (또는 "ATC")라고 말한다.
- [0186] 독소들은 살아있는 유기체들에 의해 생산된 효과적이고 특이적인 독물들이다. 그들은 보통 분자량 200 (펩타이드들) 및 100,000 (단백질들) 사이의 범위로 다양화할 수 있는 아미노산 사슬로 구성된다. 그들은 또한 낮은 분자량 유기 화합물들일 수 있다. 독소들은 수많은 유기체들, 예로 박테리아들, 곰팡이들, 조류 및 식물들에 의해 생산된다. 이들 중 많은 독소들이 신경 제제들보다 큰 정도들의 독성을 가지고 매우 유독하다.
- [0187] ATC에 사용된 독소들은 제한되지 않고, 튜블린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 저해를 포함하는 기작들에 의해 그들의 세포독성 효과들을 나타낼 수 있는 모든 종류의 독소들을 포함할 수 있다.
- [0188] 효소적으로 활성을 가진 사용될 수 있는 독소들 및 그들의 단편들은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성을 가진 단편들, 엑소톡신 A 사슬 (슈도모나스 에루기노사로부터 나옴), 라이신 (ricin) A 사슬, 아브린 (abrin) A 사슬, 모데신 (modeccin) A 사슬, 알파-사르신 (alpha-sarcin), 알류라이트 포르디 (Aleurites

fordii) 단백질들, 디안틴 (dianthin) 단백질들, 파이토라카 아메리카나 (Phytolaca americana) 단백질들 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 차란티아 (momordica charantia) 저해제, 쿠르신 (curcin), 크로틴 (crotin), 사파오나리아 오피시날리스 (sapaonaria officinalis) 저해제, 젤로닌 (gelonin), 미토젤린 (mitogellin), 레스트릭토신 (restrictocin), 페노마이신 (phenomycin), 에노마이신 (enomycin), 및 트리코테센들 (tricothecene)을 포함한다.

[0189] 돌라스타틴들 (dolastatin), 아우리스타틴들 (auristatin), 트리코테센, 및 CC1065과 같은 소분자 독소들, 및 독소 활성을 가지는 이들 독소들의 유도체들도 역시 본 명세서에서 고려된다. 돌라스타틴들 및 아우리스타틴들은 미세소관 (microtubule) 역학, GTP 가수분해, 그리고 핵 및 세포 분열을 방해하는 것으로 확인되어 왔고 항암 및 항균 활성을 가진다.

[0190] "링커 (linker)", "링커 단위 (linker unit)", 또는 "링크 (link)"는 결합 단백질을 적어도 하나의 세포독성 제제와 공유적으로 부착하는 공유 결합 또는 원자들의 사슬을 포함하는 화학적 분체를 의미한다.

[0191] 링커들은 N-숙시니미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP), 숙시니미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노티오레인 (IT), 이미노에스테르들의 이중기능적 유도체들 (디메틸 아디피미데이트 HCl와 같음), 활성을 가진 에스테르들 (디숙시니미딜 수베레이트와 같음), 알데하이드들 (글루타르알데하이드와 같음), 비스-아지도 화합물들 (비스 (p-아지도벤조일)핵산디아민과 같음), 비스-디아조니움 유도체들 (비스-(p-디아조니움벤조일)-에틸렌디아민과 같음), 디이소시아네이트들 (톨루엔 2,6-디이소시아네이트와 같음), 및 비-활성을 가진 불소 화합물들 (1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠과 같음)과 같은 다양한 이중기능적 단백질 결합 제제들을 사용하여 만들어질 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 테트라아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 어드레싱 시스템으로 세포독성 제제들의 결합을 위한 대표적인 킬레이팅 제제이다. 기타 교차-링커 시약들은 시판되고 있는 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 및 설폰-SMPB, 그SVSB (숙시니미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트) (예로, 미국 일리노이주 록포드시, 피어스 바이오테크놀로지사 (Pierce Biotechnology, Inc)로부터 나옴)일 수 있다.

[0192] 링커는 "절단 불가능" 또는 "절단가능"할 수 있다.

[0193] 바람직한 구현예에서, 이것은 세포에서 세포독성 제제의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"로 구성된다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 펩티다제-민감성 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드-포함 링커가 사용될 수 있다. 링커는, 바람직한 구현예에서, 링커의 절단이 세포내 환경에서 세포독성 제제를 결합 단백질로부터 방출하도록 세포내 조건들 하에서 절단가능하다.

[0194] 예를 들면, 일정 구현예들에서, 링커는 세포내 환경에 (예로, 리소좀 또는 엔도좀 또는 함몰 소포 (caveolea) 내에) 존재하는 절단화 제제에 의해 절단가능하다. 링커는 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만 리소좀 또는 엔도좀 프로테아제를 포함하는 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커일 수 있다. 전형적으로, 펩티딜 링커는 적어도 2개 아미노산들 길이 또는 적어도 3개 아미노산들의 길이이다. 절단 제제들은 카텝신 B 및 D 그리고 플라스민을 포함할 수 있고, 이들 모두는 디펩타이드 약물을 가수분해하여 표적 세포들 내부에 활성을 가진 약물의 방출을 유도하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, 암성 조직에서 높게 발현되는 티올-의존성 프로테아제 카텝신-B에 의해 절단가능한 펩티딜 링커가 사용될 수 있다 (예로, Phe-Leu 또는 Gly-Phe-Leu-Gly 링커). 상세한 구현예들에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 Val-Cit 링커 또는 Phe-Lys 링커이다. 세포독성 제제의 세포내 단백질분해성 방출을 사용하는 한 가지 장점은 제제가 전형적으로 결합될 때 약화되고 결합체의 혈청 안정성들이 전형적으로 높은 것이다.

[0195] 다른 구현예들에서, 절단가능한 링커는 pH-민감하고, 예로 소정의 pH 수치들에서 가수분해에 대해 민감하다. 전형적으로, pH-민감성 링커는 산성 조건들 하에서 가수분해가능하다. 예를 들면, 리소좀에서 가수분해가능한 산-불안정 링커 (예로, 하이드라존, 세미카바존, 티오세미카바존, 시스-아콘니틱 아마이드, 오소에스테르, 아세탈, 케탈 등)이 사용될 수 있다. 이러한 링커들은 혈액에서의 조건들과 같은 중성의 pH 조건들 하에서 비교적 안정하지만, pH 5.5 또는 5.0 미만인 대략적인 리소좀의 pH에서는 불안정하다. 소정의 구현예들에서, 가수분해 가능한 링커는 티오에테르 링커 (예로, 아실하이드라존 결합을 통해 치료제와 부착된 티오에테르와 같음)이다.

[0196] 보다 다른 구현예에서, 링커는 환원화 조건들 하에서 절단가능하다 (예로, 디설파이드 링커). 다양한 디설파이드 링커들이, 예를 들면 SATA (N-숙시니미딜-S-아세틸티오아세테이트), SPDP (N-숙시니미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트), SPDB (N-숙시니미딜-3-(2-피리딜디티오)부틸레이트), SMPT (N-숙시니미딜-옥시카르보닐-알

파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)톨루엔)-, SPDB 및 SMPT를 포함하여 당해 기술분야에 알려져 있다.

[0197] 비-절단가능하거나 "비환원가능한" 링커들의 비제한적인 예로서, 트라스투주마브를 연결된 화학요법제, 메이탄신 (maytansine)과 조합하는 면역결합체 트라스투주마브-DM1 (TDM1)이 언급될 수 있다 (Cancer Research 2008; 68: (22). 2008년 11월 15일).

[0198] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 면역결합체는 제한되지 않고, i) 세포독성 제제와의 반응으로 이어지는 이가의 링커 시약과 항원 결합 단백질의 핵친화성 기의 반응 또는 ii) 항원 결합 단백질의 핵친화성 기와의 반응으로 이어지는 이가의 링커 시약과 세포독성 제제의 핵친화성 기의 반응과 같이 당업자라면 숙지하고 있는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0199] 항원 결합 단백질 상의 핵친화성 기로는 제한되지 않고, N-말단 아민기들, 측쇄 아민기들 예로 라이신, 측쇄 티올기들, 및 항원 결합 단백질이 당화될 때 당 하이드록시 또는 아미노기들을 포함한다. 아민, 티올, 및 하이드록시 기들은 핵친화적이고, 제한되지 않고, NHS 에스테르들, HOBT 에스테르들, 할로포르메이트들, 및 산 할로겐화물과 같은 활성 에스테르들; 할로아세트아마이드들과 같은 알킬 및 벤질 할로겐화물들; 알데하이드들, 케톤들, 카르복실, 및 말레이미드 기들을 포함하는, 링커 분체들 및 링커 시약들 상의 핵친화성 기들과 공유 결합들을 형성하도록 반응할 수 있다. 항원 결합 단백질은 환원가능한 사슬간 디설파이드들, 예로 시스테인 연결들 (bridge)을 가질 수 있다. 항원 결합 단백질들은 DTT (디티오프레이트)과 같은 환원제로의 처리에 의해 링커 시약들과 결합을 위해 반응성이 될 수 있다. 각각의 시스테인 연결은 따라서 이론적으로는 2개의 반응성 티올 핵친화기들을 형성할 것이다. 추가적인 핵친화성 기들이 당업자라면 숙지하고 있는 반응을 통하여 항원 결합 단백질 내로 도입될 수 있다. 비제한적인 예로서, 반응성 티올기들은 하나 이상의 시스테인 잔기들을 도입하여 항원 결합 단백질 내로 도입될 수 있다.

[0200] 면역결합체들은 또한 핵친화성 분체들을 도입하도록 항원 결합 단백질의 변형에 의해 생산될 수 있고, 분체들은 링커 시약 또는 세포독성 제제 상의 핵친화성 치환기들과 반응할 수 있다. 당화된 항원 결합 단백질의 당들은 산화되어 링커 시약들 또는 세포독성 제제의 아민기와 반응할 수 있는 알데하이드 또는 케톤기들을 형성할 수 있다. 결과로 나온 이민 슈프 (Schiff) 염기 기들은 안정한 결합을 형성할 수 있거나, 안정한 이민 결합들을 형성하도록 환원될 수 있다. 한 가지 구현예에서, 갈락토스 옥시다제 또는 소듐 메타-페리odate 둘 중 하나와 당화된 항원 결합 단백질의 탄수화물 부분의 반응은 약물 상의 적당한 기들과 반응할 수 있는 단백질의 카르보닐 (알데하이드 및 케톤) 기들을 수득할 수 있다. 또 다른 구현예에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기들을 포함하는 단백질들은 소듐 메타-페리odate와 반응하여, 첫 번째 아미노산 대신에 알데하이드의 생산을 가져올 수 있다.

[0201] 소정의 바람직한 구현예들에서, 링커 단위는 다음의 일반 공식을 가질 수 있다:



[0202]

여기에서:

[0203]

- T-는 연장인자 (stretcher) 단위이고;

[0204]

a는 0 또는 1이고;

[0205]

- W-는 아미노산 단위이고;

[0206]

w는 독립적으로 1부터 12까지 범위의 정수이고;

[0207]

- Y-는 공간인자 (spacer) 단위이고;

[0208]

y는 0, 1 또는 2이다.

[0209]

[0210] 연장인자 단위 (-T-)는 존재 시 항원 결합 단백질을 아미노산 단위 (-W-)와 연결한다. 항원 결합 단백질 상에 존재할 수 있는 유용한 기능 기들은 자연적으로 또는 화학적 조작을 통해, 설프하이드릴, 아미노, 하이드록실, 탄수화물의 아노머 하이드록실 기, 및 카르복실을 포함한다. 적합한 기능 기들은 설프하이드릴 및 아미노이다. 설프하이드릴 기들은 존재 시 항원 결합 단백질의 분자내 디설파이드 결합들의 환원에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 설프하이드릴 기들은 2-이미노티올레인 또는 다른 설프하이드릴을 생성하는 시약들과 항원 결합 단

백질의 라이신 분체의 아미노기의 반응에 의해 생성될 수 있다. 상세한 구현예들에서, 항원 결합 단백질은 재조합 항체이고 하나 이상의 라이신들을 보유하도록 조작된다. 더욱 바람직하게, 항원 결합 단백질은 하나 이상의 시스테인들 (참고로 티오 Mab들)을 보유하도록 조작될 수 있다.

- [0211] 소정의 상세한 구현예들에서, 연장인자 단위는 항원 결합 단백질의 항원 원자와 결합을 형성한다. 항원 원자는 환원된 항원 결합 단백질의 설프하이드릴 (-SH) 기로부터 유래될 수 있다.
- [0212] 소정의 다른 상세한 구현예들에서, 연장인자 단위는 항원 결합 단백질의 항원 원자 및 연장인자 단위의 항원 원자 간의 디설파이드 결합을 통해 항원 결합 단백질과 결합된다.
- [0213] 다른 상세한 구현예들에서, 연장인자의 반응기는 항원 결합 단백질의 아미노기와 반응할 수 있는 반응성 부위를 포함한다. 아미노기는 아르기닌 또는 라이신의 아미노기일 수 있다. 적합한 아민 반응성 부위들은 이에 제한되는 것은 아니지만, 숙시니마이드 에스테르들, 4-니트로페닐 에스테르들, 펜타플루오로페닐 에스테르들, 무수물들, 산 염화물들, 설포닐 염화물들, 이소시아네이트들 및 이소티오시아네이트들과 같은 활성화된 에스테르들을 포함한다.
- [0214] 보다 또 다른 관점에서, 연장인자의 반응성 기능은 항원 결합 단백질 상에 존재할 수 있는 변형된 탄수화물기와 반응하는 반응성 부위를 포함한다. 상세한 구현예에서, 항원 결합 단백질은 탄수화물 분체를 제거하도록 효소적으로 당화된다 (항원 결합 단백질이 항체일 때, 상기 항체는 일반적으로 자연적으로 당화되는 것으로 알려져 있음). 탄수화물은 소듐 페리오데이트와 같은 시약으로 알맞게 산화될 수 있고 결과로 나온 산화된 탄수화물의 카르보닐 단위는 하이드라자이드, 옥심, 반응성 아민, 하이드라진, 티오세미카바자이드, 하이드라진 카르복실레이트, 또는 아릴하이드라자이드와 같은 기능성을 포함하는 연장인자와 응축될 수 있다.
- [0215] 아미노산 단위 (-W-)는 공간인자가 존재하는 경우라면 연장인자 단위 (-T-)를 공간인자 단위 (-Y-)와 결합하고, 공간인자가 부재하는 경우라면 연장인자를 세포독성 제제와 결합한다.
- [0216] 상기에 언급된 바와 같이, -Ww-는 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드, 펜타펩타이드, 헥사펩타이드, 헵타펩타이드, 옥타펩타이드, 노나펩타이드, 데카펩타이드, 운테카펩타이드 또는 도데카펩타이드 단위일 수 있다.
- [0217] 일정 구현예들에서, 아미노산 단위는 이에 제한되는 것은 아니지만, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 아세틸 또는 포르밀로 보호된 라이신, 아르기닌, 토실 또는 니트로기들로 보호된 아르기닌, 히스티딘, 오르니틴, 아세틸 또는 포르밀로 보호된 오르니틴 및 시트룰린과 같은 아미노산 잔기들을 포함할 수 있다. 대표적인 아미노산 링커 구성성분들은 바람직하게 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드 또는 펜타펩타이드를 포함한다.
- [0218] 대표적인 디펩타이드들은: Val-Cit, Ala-Val, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N<sup>9</sup>-토실-Arg, Phe-N<sup>9</sup>-니트로-Arg을 포함한다.
- [0219] 대표적인 트리펩타이드들은: Val-Ala-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Phe-Phe-Lys, Gly-Gly-Gly, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys을 포함한다.
- [0220] 대표적인 테트라펩타이드는: Gly-Phe-Leu-Gly (서열번호 33), Ala-Leu-Ala-Leu (서열번호 34)를 포함한다.
- [0221] 대표적인 펩타이드는: Pro-Val-Gly-Val-Val (서열번호 35)를 포함한다.
- [0222] 아미노산 링커 구성성분을 포함하는 아미노산 잔기들은 자연적으로 발생하는 것들, 뿐만 아니라 시트룰린과 같은 소수의 아미노산들 및 비-자연적으로 발생하는 아미노산 유사체들을 포함한다. 아미노산 링커 구성성분들은 특정한 효소, 예를 들면 종양-연관된 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단을 위한 그들의 선택도로 설계되고 최적화될 수 있다.
- [0223] 링커의 아미노산 단위는 세포독성 제제를 방출하도록, 이에 제한되는 것은 아니지만 종양-연관된 프로테아제를 포함하는 효소에 의해 효소적으로 절단될 수 있다.
- [0224] 아미노산 단위는 특정한 종양-연관된 프로테아제에 의한 효소적 절단을 위한 선택도에서 설계되고 최적화될 수 있다. 적합한 단위들은 절단이 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민에 의해 촉매화되는 것들이다.
- [0225] 공간인자 단위 (-Y-)는 존재 시 아미노산 단위를 세포독성 제제와 결합시킨다. 공간인자 단위들은 2가지 일반적인 유형을 가진다: 자가-희생 (self-immolative) 및 비자가-희생. 비자가-희생적 공간인자는 공간인자 단위의 일부 또는 전부가 면역결합체로부터 아미노산 단위의 효소적 절단 이후에도 세포독성 제제와 결합되어 남아



있는 것이다. 비자가-희생적 공간인자 단위의 예들로는 이에 제한되는 것은 아니지만, (글리신-글리신) 공간인자 단위 및 글리신 공간인자 단위를 포함한다. 세포독성 제제를 방출하기 위하여, 독립적인 가수분해 반응이 글리신-약물 단위 결합을 절단하도록 표적 세포 내에서 일어나야 한다.

- [0226] 또 다른 구현예에서, 비자가-희생적 공간인자 단위 (-Y-)는 -Gly-이다.
- [0227] 한 가지 구현예에서, 면역결합체는 공간인자 단위 ( $y = 0$ )가 결합된다. 대안적으로, 자가-희생적 공간인자 단위를 포함하는 면역결합체는 별도의 가수분해 단계를 필요로 하지 않고도 세포독성 제제를 방출할 수 있다. 이들 구현예들에서, -Y-는 PAB 기의 질소 원자를 통해 -W-와 결합되고 카보네이트, 카바메이트 또는 에테르 기를 통해 -D와 직접적으로 연결된 p-아미노벤질 알코올 (PAB)이다.
- [0228] 자가-희생적 공간인자들의 다른 예들로는 이에 제한되는 것은 아니지만, 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체들 및 오소 또는 파라-아미노벤질아세탈들과 같은 PAB 기와 전자적으로 동등한 방향족 화합물들을 포함한다. 아마이드 결합 가수분해 시 용이한 고리화를 거치는 공간인자들이 치환 및 미치환된 4-아미노부틸산 아마이드들, 적당하게 치환된 이중사이클로[2.2.1] 및 이중사이클로[2.2.2] 고리 시스템들 및 2-아미노페닐프로피온산 아마이드들과 같이 사용될 수 있다.
- [0229] 대안의 구현예에서, 공간인자 단위는 분지된 비스(하이드록시메틸)스티렌 (BHMS)이고, 이는 추가적인 세포독성 제제들을 도입하는 데 사용될 수 있다.
- [0230] 마지막으로, 본 발명은 암의 치료에 사용하기 위한 상기에 기술된 바와 같은 면역결합체에 관한 것이다.
- [0231] 암들은 바람직하게 단백질 Ax1의 전부 또는 일부를 세포들의 표면에서 발현하거나 과다-발현하는 종양성 세포들을 포함하는 Ax1-관련된 암들을 통하여 선택될 수 있다.
- [0232] 보다 상세하게, 상기 암들은 유방암, 결장암, 식도 암종, 간세포암, 위암, 교아종, 폐암, 흑색종, 골육종, 난소암, 전립선암, 횡단근육종, 신장암, 갑상샘암, 자궁내막암 및 임의의 약물 저항성 현상들이다. 본 발명의 또 다른 목적은 본 명세서에서 기술된 바와 같은 면역결합체를 포함하는 약제학적 조성물이다.
- [0233] 보다 상세하게, 본 발명은 적어도 하나의 부형제 및/또는 약제학적 허용가능한 운반체를 가진 본 발명의 면역결합체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0234] 본 상세한 설명에서, 용어 표현 "약제학적으로 허용가능한 운반체" 또는 "부형제"는 이차적인 반응들을 유발하지 않고, 예를 들면 활성을 가진 화합물(들)의 투여의 용이화, 신체에서 그의 수명에서 및/또는 효능에서 증가, 용액에서 그의 용해도의 증가 또는 그 밖에도 그의 보존에서 개선을 허용하는, 약제학적 조성물 내로 들어가는 화합물 또는 화합물들의 조합을 가리키도록 의도된다. 이들 약제학적으로 허용가능한 운반체들 및 부형제들은 잘 알려져 있고 선택된 활성을 가진 화합물(들)의 특성 및 투여의 방식의 함수로서 당업자에 의해 적응될 것이다.
- [0235] 바람직하게, 이들 면역결합체들은 전신적 경로에 의해, 상세하게는 정맥내 경로에 의해, 근육내, 피부내, 복강내 또는 피하 경로에 의해, 또는 경구적 경로에 의해 투여될 것이다. 더욱 바람직한 방식으로, 본 발명에 따른 면역결합체들을 포함하는 조성물은 연속적 방식으로 여러 번 투여될 것이다.
- [0236] 그들의 투여의 방식들, 용량들 및 최적의 약제학적 형태들은, 예를 들면 환자의 연령 또는 체중, 그/그녀의 일반 병태의 중증도, 치료에 대한 내성 및 주목된 이차적인 효과들과 같은 일반적으로 환자에게 적응된 치료의 확립에서 고려되는 판정기준들에 따라 결정될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0237] 본 발명의 다른 특징들 및 장점들은 실시예들 및 하기에 간단한 설명이 주어진 도면들과 함께 상세한 설명이 계속하여 기술된다.
- 도 1은 SN12C 세포들 상에서 Mab-zap 결합된 이차 항체를 사용한 시험관내 세포독성 검정법을 나타낸 것이다.
- 도 2A, 2B 및 2C는 고정된 rhAx1-Fc 단백질 (2A), rhDtk-Fc (2B) 또는 rhMer-Fc (2C) 단백질들 상에서 1613F12의 결합 특이도를 엘라이자에 의해 나타낸 것이다.
- 도 3은 인간 종양 세포들 상의 1613F12 결합의 FACS 분석을 나타낸 것이다.

도 4는 고정된 rmAx1-Fc 단백질 (마우스 재조합의 "rm") 상의 엘라이자를 나타낸 것이다.

도 5는 유동 세포측정 방법을 사용한 간접 표지화 프로토콜에 의해 결정된 바와 같은 COS7 세포들 상의 1613F12 결합을 나타낸 것이다.

도 6은 1613F12를 사용한 Gas6 결합의 경쟁 엘라이자를 나타낸 것이다.

도 7은 SN12C 세포 용출물을 사용한 웨스턴 블롯에 의한 에피토프 결합 분석을 나타낸 것이다. NH (가열 없음); NR (환원 없음); H (가열); R (환원). GAPDH 검출은 젤 상에서 정확한 시료 로딩을 입증한다.

도 8A 및 8B는 SN12C 세포들 상의 1613F12 결합 이후에 Ax1 저하조절의 연구를 웨스턴 블롯에 의해 나타낸 것이다. 도 8A는 수행된 3번의 독립적 실험들의 대표적인 웨스턴 블롯 영상을 나타내고 (웨스턴 블롯 분석은 SN12C 세포들 상에서 1613F12의 4시간 및 24시간 배양 이후에 수행되었다.); 도 8B는 "퀀티원 (QuantityOne)" 소프트웨어를 사용하여 표현된 필름의 광학 밀도 정량화를 나타낸다.

도 9A, 9B 및 9C는 1613F12와의 배양 이후에 SN12C 세포들의 면역형광 현미경 분석법을 나타낸 것이다. 도 9A는 막 및 세포내 염색 둘 다의 경우 mIgG1 이소형 대조군 조건들의 사진들을 나타낸다. 도 9B는 막 염색을 나타낸다. 도 9C는 1613F12를 사용한 Ax1 수용체 및 초기 엔도솜 마커 EEA1 둘 다의 세포내 염색을 나타낸다. 영상 중첩내용들은 하기에 표현되고 촬영된 공동-정착들은 화살표들에 의해 표시된다.

도 10은 mIgG1 이소형 대조군 항체의 효과와 비교하여 시험관내 SN12C 세포들 증식에 미치는 1613F12의 효과를 나타낸 것이다.

도 11A 내지 11K는 다양한 인간 종양 세포주들을 사용한 1613F12-사포린 면역결합체의 직접적인 세포독성 검정법들을 나타낸 것이다. A-SN12C, B-Calu-1, C-A172, D-A431, E-DU145, F-MDA-MB435S, G-MDA-MB231, H-PC3, I-NCI-H226, J-NCI-H125, K-Panc1.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**실시예들**

**실시예 1: Ax1 수용체 내재화**

표적화된 항원이 내재화 단백질일 때 면역결합체 접근법은 더욱 효율적이기 때문에, 인간 종양 세포주들 상의 Mab-Zap 세포독성 검정법을 사용한 Ax1 수용체 내재화가 연구되었다. 보다 상세하게, Mab-Zap 시약은 친화도 정제된 염소 항-마우스 IgG 및 리보솜-불활성화 단백질, 사포린 (saporin)을 포함하는 화학적 결합체이다. 면역 복합체의 내재화가 일어나는 경우라면, 사포린은 표적화 제제로부터 분리되어 나와 리보솜들을 불활성화하고, 단백질 합성 저해 및 궁극적으로는 세포 사망을 유도한다. Ax1-양성 세포들 상에서 항-Ax1 항체 또는 mIgG1 이소형 대조군 항체로의 72시간 배양 이후에 세포 생존도 (viability) 결정은 1613F12-유도성 Ax1 수용체 내재화에 관한 결론을 허용한다.

본 실시예를 위해, Qifikit 시약 (다코사 (Dako))을 사용하여 결정된 바와 같이, 높은 Ax1-양성 세포들이 사용되었다. 데이터는 다음의 표 5에 표현되어 있다.

**표 5**

인간 신장암 SN12C 세포들에 대해 결정된 MAB154 항-Ax1 시판되는 항체의 항원 결합 능력	
RTK	AXL
세포주	MAB154
SN12C	>100 000

다음의 실시예에서, SN12C 세포들이 비제한적인 예로서 사용되었다. 세포 표면 상에 적당한 수준의 Ax1 수용체

를 발현하는 기타 다른 세포주가 사용될 수 있다.

- [0244] 광범위한 농도들의 1613F12 또는 mIgG1 이소형 대조군 항체가 세포 배양 배지에 있는 100 ng의 Mab-Zap (진보된 표적화 시스템들) 이차 항체와 RT에서 30분 동안 전-배양되었다. 이들 혼합물들은 흰색 96-웰 플레이트 마이크로플레이트에 도말된 층만-이하의 SN12C 세포들 상에 로딩되었다. 플레이트들은 5% CO<sub>2</sub>의 존재 시 37°C에서 72 시간 동안 배양되었다. 세포 생존도는 제조사 (프로메가사)의 지침들에 따라 셀 타이터 Glo 세포 증식 방법을 사용하여 결정되었다. 여러 대조군들 i) 임의의 이차 면역결합체가 없이, 그리고 ii) 일차 항체가 없이 수행된다. 동시에, 검정법들은 mIgG1 이소형 대조군으로 수행된다.
- [0245] 획득된 결과들은 도 1에 나타나 있다.
- [0246] 1613F12는 36%까지의 SN12C 세포들에 미치는 최대의 세포독성 효과를 보여준다. 세포독성 효과는 실험에서 이소형 대조군으로서 고려된 mIgG1 9G4 항체의 존재 시 전혀 관찰되지 않았다. 세포독성은 일차 항체만을 포함하는 웰들에서 전혀 관찰되지 않았다. 따라서 Ax1-1613F12-MabZap을 포함하는 면역복합체가 표적화된 세포들의 효과적인 세포독성을 유도하기 때문에 Ax1 수용체는 면역결합체 접근법을 위해 표적화하는 편리한 항원인 것으로 보여진다.
- [0247] **실시예 2: rhAx1-ECD에 대한 항체의 생성**
- [0248] Ax1 수용체의 인간 세포의 도메인 (ECD)에 대한 마우스 단일클론 항체들 (Mab들)을 생성하기 위하여, 5 BALB/c 마우스들이 15 내지  $20 \times 10^6$  개 CHO-Ax1 세포들로 피하로 (s.c.) 5회 그리고 20 µg의 rh Ax1-ECD로 2회 면역 접종되었다. 첫 번째 면역접종은 완전한 프룬드 아주반트 (시그마사, 미국 MD 세인트루이스시)의 존재 시 수행되었다. 불완전한 프룬드 아주반트 (시그마사)는 다음의 면역접종들을 위해 첨가되었다.
- [0249] 융합 3일 이전에, 면역접종된 마우스들은  $20 \times 10^6$  개 CHO-Ax1 세포들 및 20 µg의 rh Ax1-ECD 둘 다로 추가자 극되었다.
- [0250] 하이브리도마들을 생성하기 위하여, 비장세포들 및 림프세포들이 각각 비장의 관류에 의해 그리고 말단 림프절들의 분쇄에 의해 제조되었고, 5마리의 면역접종된 마우스들 중 1마리로부터 (혈청들의 역가 측정 이후에 선택됨) 수확되었고 SP2/0-Ag14 골수종 세포 (ATCC사, 미국 MD 록빌시 (Rockville))와 융합되었다. 융합 프로토콜은 코홀러 및 밀스타인 (Kohler and Milstein, Nature, 256: 495-497, 1975)에 의해 기술되고 있다. 다음으로 융합된 세포들은 HAT 선택에 착수된다. 일반적으로, 특히 마우스 기원의 단일클론 항체들 또는 그들의 기능적 단편들의 제조를 위해, 상제하계는 매뉴얼 "항체들" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 콜드 스프링 하버 연구소, 콜드 스프링 하버 NY, pp. 726, 1988)에서 기술된 기법들을 참조하는 것이 가능하다.
- [0251] 융합 이후 대략 10일째, 하이브리드 세포들의 콜로니들이 검색되었다. 일차 검색을 위해, 하이브리도마의 상청액들이 엘라이자를 사용하여 Ax1 ECD 단백질에 대해 증가된 Mab들의 분비에 대해 평가되었다. 동시에, FACS 분석이 wt CHO 및 Ax1를 발현하는 CHO 세포들 (ATCC) 둘 다의 세포 표면 위에 존재하는 Ax1의 세포성 형태와 결합할 수 있는 Mab들을 선택하도록 수행되었다.
- [0252] 가능한 한 곧, 선택된 하이브리도마들은 제한 희석에 의해 클론되었고 연속하여 Ax1 ECD 단백질에 대한 그들의 반응성에 대해 검색되었다. 다음으로 클론된 Mab들은 이소타이핑 키트 (카탈로그 #5300.05, 서던 바이오테크사 (Southern Biotech), 미국 AL 버밍햄시)를 사용하여 이소형이 결정되었다. 각각의 하이브리도마로부터 획득된 하나의 클론이 선택되었고 증식되었다.
- [0253] 엘라이자 검정법들이 순수한 하이브리도마 상청액을 사용하거나 상청액들의 IgG 함량이 결정되었을 때 다음과 같이 수행되고, 역가 측정은 5 µg/mL에서 시작하여 시행되었다. 다음으로 1/2 일련의 희석이 다음의 11개 열들로 수행되었다. 간략하게, 96-웰 엘라이자 플레이트들 (Costar 3690, 미국 뉴욕 코닝시)이 PBS에 녹인 2 µg/mL에서 50 µg/웰mL의 rh Ax1-Fc 단백질 (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 154-AL) 또는 rhAx1-ECD로 4°C에서 밤샘 코팅되었다. 다음으로 플레이트들은 0.5% 젤라틴 (#22151, 세르바 전기영동사 (Serva Electrophoresis GmbH), 독일 하이델베르크)을 포함하는 PBS로 37°C에서 2시간 동안 차단되었다. 일단 포화 완충액이 플레이트를 털어서 버리고 나면, 50 µL의 순수한 하이브리도마 세포 상청액들 또는 50 µL의 5 µg/mL 용액이 엘라이자 플레이트들에 첨가되었고 37°C에서 1시간 동안 배양되었다. 3번의 세척들 이후에, 50 µL의 호스래디슈 퍼옥시 다제-결합된 다중클론 염소 항-마우스 IgG (#115-035-164, 잭슨 이뮤노-리서치사, 미국 PA 웨스트 그로브시)가

0.1% 젤라틴 및 0.005% 트윈 20 (w:w)를 포함하는 PBS에 넣은 1/5000 희석으로 37°C에서 1시간 동안 첨가되었다. 다음으로, 엘라이자 플레이트들이 3번 세척되었고 TMB (#UP664782, Uptima, Interchim, 프랑스) 기질이 첨가되었다. 실온에서 10분 배양 시간 이후에, 반응은 1 M 황산을 사용하여 정지되었고 450 nm에서 광학 밀도가 측정되었다.

[0254] 유동 세포측정법에 의한 선별을 위해,  $10^5$ 개 세포들 (CHO wt 또는 CHO-Ax1)이 1% BSA 및 0.01% 소듐 아자이드 (FACS 완충액)을 포함하는 PBS를 넣은 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 4°C에서 도말되었다. 2,000 rpm에서 2분 원심분리 이후에, 완충액은 제거되었고, 테스트될 하이브리도마 상청액들 또는 정제된 Mab들 (1  $\mu$ g/mL)이 첨가되었다. 4°C에서 20분의 배양 이후에, 세포들은 2번 세척되었고 FACS 완충액 (#A11017, 폴리콜라 프로브사, 미국 유진시)으로 희석된 알렉사 488-결합된 염소 항-마우스 항체 1/500가 첨가되었고 4°C에서 20분 동안 배양되었다. FACS 완충액으로 마지막 세척 이후에, 세포들은 각각의 튜브에 40  $\mu$ g/mL의 최종 농도로 프로피디움 요오드의 첨가 이후에 FACS (팩스칼리버 (Facsclibur), 벡튼-디킨슨사)에 의해 분석되었다. 세포들 단독 및 이차 알렉사 488-결합된 항체로 배양된 세포들을 포함하는 웰들이 음성 대조군들로서 포함되었다. 이소형 대조군들이 각각의 실험에서 사용되었다 (시그마사, 참조번호 M90351MG). 적어도 5,000개 세포들이 형광 강도 (MFI)의 평균 수치를 계산하도록 평가되었다.

[0255] 보다 명확하게, 용합이  $300 \times 10^6$ 개의 수확된 비장세포들 및  $300 \times 10^6$ 개 골수종 세포들 (1 : 1 비율)로 수행되었다. 다음으로 결과로 나온 세포 현탁액의 2백개 세포들이 30개의 96-웰 플레이트에서  $2 \times 10^6$ 개 세포들/mL로 도말되었다.

[0256] rhAx1-ECD 단백질 상의 엘라이자에 의한 그리고 wt CHO 및 Ax1를 발현하는 CHO 세포들 둘 다를 사용한 FACS 분석에 의한 첫 번째 검색 (용합 이후 대략 14일)은 rh Ax1-ECD 코팅 상에서 1 초과의 광학 밀도들 (OD) 그리고 wt CHO 세포들 상에서 50 미만 및 CHO-Ax1 세포들 상에서 200 초과하는 MFI를 나타내는 10개 하이브리도마들을 선별하도록 허용하였다.

[0257] 이들 10개 하이브리도마들이 증식되었고 제한 희석에 의해 클론되었다. 하나의 96-웰 플레이트가 각각의 코드를 위해 준비되었다. 도말 이후 9일째, 클로닝 플레이트들로부터 얻은 상청액들이 rh Ax1-ECD 단백질의 세포의 도메인에 대한 그들의 결합 특이도를 위해 엘라이자에 의해 먼저 검색되었다. 각각의 코드의 3개 클론들이 증식되었고 이소형이 결정되었다. 일단 생산되고 나면, 항-Ax1 항체들은 또한 세포-표면 상의 Ax1 결합에 있어서 내재화되는 그들의 능력에 대해 연구되었다.

[0258] **실시예 3: Ax1 결합 특이도**

[0259] 본 실시예에서는, rhAx1-Fc 단백질 상의 1613F12의 결합이 먼저 연구되었다. 다음으로, TAM 패밀리의 2가지 다른 구성원들, rhDtk-Fc 및 rhMer-Fc 상의 그의 결합이 연구되었다.

[0260] 간략하게, 재조합 인간 Ax1-Fc (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 154AL/CF), rhDtk (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 859-DK) 또는 rhMer-Fc (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 891-MR) 단백질들은 이뮤론 II 96-웰 플레이트들로 4°C에서 밤샘 코팅되었고, 0.5% 젤라틴 용액으로 1시간 차단 단계 이후에, 1613F12 정제된 항체가 5  $\mu$ g/mL ( $3.33 \times 10^{-8}$  M)의 시작 농도로 37°C에서 추가 1시간 동안 첨가되었다. 다음으로 1/2 일련의 희석들이 12개 열들 상에서 시행되었다. 플레이트들은 세척되었고 염소 항-마우스 (잭슨사) 특이적 IgG-HRP가 37°C에서 1시간 동안 첨가되었다. 반응 현상은 TMB 기질 용액을 사용하여 수행되었다. 시판되는 항-Ax1 Mab 154 항체가 또한 동시에 사용되었다 (데이타 미도시). 코팅 대조군들은 HRP (잭슨사, 참조번호 109-035-098)로 표지된 염소 항-인간 IgG Fc 다중클론 혈청의 존재 시 및/또는 HRP-결합된 항-히스티딘 항체 (R & D 시스템사, 참조번호 MAB050H)의 존재 시 수행되었다. 미특이적 결합은 일차 항체 (희석제)의 부재 시 전혀 관찰되지 않았다. 결과들은 도 2A, 2B 및 2C에 각각 나타나 있다.

[0261] 본 실시예는 1613F12 항체만이 rhAx1-Fc 단백질과 결합하고 TAM 패밀리의 2가지 다른 구성원들, rhDtk 또는 rhMer 상에서는 결합하지 않는 것을 보여준다. 1613F12 항체의 결합의 교차-특이도는 TAM 구성원들 간에는 전혀 관찰되지 않는다.

[0262] 실시예 4: 1613F12는 종양 세포들 상에서 발현된 Ax1의 세포성 형태를 인식하였다.

[0263] 인간 종양 세포들 상의 세포 표면 Ax1 발현 수준은 먼저 Ax1 발현 수준의 정량을 허용하도록 측정 (calibration) 비드들과 함께 Ax1 항체 (R & D 시스템사, 참조 번호 MAB154)를 사용하여 확립되었다. 다음으로, 세포-표면 Ax1의 결합이 Ax1 1613F12 항체를 사용하여 연구되었다. 둘 다의 경우들에서, 실험적 조건들은 하기에 간략하게 기술된 바와 같았다.

[0264] 세포 표면 결합 연구들을 위해, 10 µg/mL (6.66 10<sup>-8</sup> M) 일차 항체 용액 (1613F12, MAB154 Ax1 시판되는 항체 또는 mIgG1 이소형 대조군 9G4 Mab)의 2배 일련의 희석들이 10개 지점들 상에서 준비되었고 2 × 10<sup>5</sup>개 세포들 상에서 4°C로 20분 동안 적용되었다. 1% BSA 및 0.01% NaN<sub>3</sub>가 보충된 포스페이트-완충된 식염수 (PBS)로 3번 세척들 이후에, 세포들은 이차 염소 항-마우스 알렉사 488 항체 (1/500 희석)과 4°C에서 20분 동안 배양되었다. 1% BSA 및 0.1% NaN<sub>3</sub>가 보충된 PBS로 추가 3번의 세척들 이후에, 세포들은 FACS (팩스칼리버, 벡튼-디킨슨사)에 의해 분석되었다. 적어도 5,000개 세포들이 형광 강도의 평균 수치를 계산하도록 평가되었다.

[0265] MAB154 Ax1 항체를 사용한 정량적 ABC 결정을 위해, QIFIKIT® 측정 비드들이 사용된다. QIFIKIT® 비드들과 동시에, 세포들은 포화 농도에서 다중클론 염소 항-마우스 면역글로불린들/FITC (염소 F(ab')<sub>2</sub>)과 배양된다. 다음으로 연구된 세포들 상의 항원성 부위들의 수는 측정 곡선의 간섭에 의해 결정된다 (비드들 상의 Mab 분자들의 수에 대비한 개별적 비드 집단들의 형광 강도).

[0266] 4.1. 세포-표면 Ax1 발현 수준의 정량

[0267] 인간 종양 세포들의 표면 상의 Ax1 발현 수준은 간접 면역형광 검정법 (QIFIKIT®방법 (다코사, 덴마크)), 세포 표면 항원들에 대한 정량적 유동 세포측정법 키트를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 결정되었다. 측정 그래프를 통해 비드들의 기지의 항원 수준들의 평균 형광 강도 (MFI)의 비교는 세포주들의 항체 결합 능력 (ABC)의 결정을 허용한다.

[0268] 표 6은 Ax1 시판되는 항체 MAB154 (R & D 시스템사)를 사용한 QIFIKIT®를 사용하여 결정된 바와 같이 다양한 인간 종양 세포주들 (SN12C, Calu-1, A172, A431, DU145, MDA-MB435S, MDA-MB231, PC3, NCI-H226, NCI-H125, MCF7, Panc1) (ATCC, NCI) 상에서 검출된 Ax1 발현 수준을 나타낸다.

표 6

	MCF7	NCI-H125	MDA-MB-435S	Panc1	MDA-MB-231	Calu-1	SN12C
종양 유형/기관	유방	NSCLC	유방	췌장	유방	폐	신장
ABC (Qifikit)	71	5 540	17 814	36 809	61 186	>100 000	> 100 000

	A172	A431	DU-145	PC3	NCI-H226
종양 유형/기관	교모세포종	표피모양 암종	전립선	전립선	NSCLC
ABC (Qifikit)	52421	3953	55268	8421	32142

[0269]

[0270] 시판되는 Ax1 단일클론 항체 항체 (MAB154)로 획득된 결과들은 Ax1 수용체가 고려된 인간 종양 세포에 의존하여 다양한 수준들로 발현되는 것을 보여주었다.

- [0271] 4.2. 인간 종양 세포들 상에서 1613F12에 의한 Ax1 검출
- [0272] 보다 상세하게, Ax1 결합이 1613F12를 사용하여 연구되었다.
- [0273] 1613F12 용량 반응 곡선들이 전개되었다. 다음으로 다양한 인간 종양 세포들을 사용하여 획득된 MFI들이 프리즘 소프트웨어로 분석되었다. 데이터는 도 3에 나타나 있다.
- [0274] 데이터는 1613F12가 포화 곡선 프로파일들에 의해 입증된 바와 같이 막 Ax1 수용체와 특이적으로 결합하는 것을 가리킨다.
- [0275] **실시예 5: 1613F12 중간 교차특이도**
- [0276] 1613F12의 중 교차-특이도를 설명하기 위하여, 2개 종들이 고려되었다: 마우스 및 원숭이. 첫째 재조합 마우스 (rm) Ax1 수용체 상의 결합은 엘라이자에 의해 연구된다 (도 4). 다음으로 유동 세포측정법 실험들이 원숭이 COS7 세포들이 그들의 표면 상에서 Ax1 수용체를 발현하기 때문에 이들 세포들을 사용하여 수행되었다 (도 5). COS7 세포주는 큰 T 항원을 생산하지만 계놈 복제에는 결합을 가지는 SV40 계놈 버전을 가진 아프리카 녹색 원숭이의 신장 세포들로부터 유래한 CV-1 세포주를 불멸화하여 획득되었다.
- [0277] rmAx1-Fc 엘라이자
- [0278] 간략하게, 재조합 마우스 Ax1-Fc (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 854-AX /CF) 단백질들은 이뮤론 II 96-웰 플레이트들로 4°C에서 밤샘 코팅되었고, 0.5% 젤라틴 용액으로 1시간 차단 단계 이후에, 1613F12 정제된 항체가 5 µg/mL ( $3.33 \times 10^{-8}$  M)의 시작 농도로 37°C에서 추가 1시간 동안 첨가되었다. 다음으로 1/2 일련의 희석들이 12 웰들 위에서 시행되었다. 다음으로 플레이트들은 세척되었고 염소 항-마우스 (잭슨사) 특이적 IgG-HRP가 37°C에서 1시간 동안 첨가되었다. 반응 현상은 TMB 기질 용액을 사용하여 수행되었다. 시판되는 항-Ax1 Mab 154 항체가 또한 동시에 사용되었다. 코팅 대조군들은 HRP (잭슨사, 참조번호 109-035-098)와 결합된 염소 항-인간 IgG Fc 다중클론 혈청의 존재 시 및/또는 HRP-결합된 항-히스티딘 항체 (R & D 시스템사, 참조번호 MAB050H)의 존재 시 수행되었다. 특이적 결합은 일차 항체 (희석제)의 부재 시 전혀 관찰되지 않았다.
- [0279] 결과들은 도 4에 나타나 있다. 이러한 도면은 본 발명에서 기술된 1613F12 Mab가 마우스 Ax1 ECD 도메인과 결합하지 않는 것을 보여준다.
- [0280] FACS COS7
- [0281] COS7 세포들을 사용한 1613F12 세포성 결합 연구들을 위해,  $2 \times 10^5$  개 세포들이 1613F12 또는 m9G4 (mIgG1 이소형 대조군 Mab)의 10 µg/mL ( $6.66 \times 10^{-8}$  M) 항체 용액의 1/2배 일련의 희석 (12개 지점들)에 의해 준비된 항체 농도 범위와 4°C로 20분 동안 배양되었다. 1% BSA 및 0.01%  $\text{NaN}_3$ 가 보충된 포스페이트-완충된 식염수 (PBS)로 3번 세척들 이후에, 세포들은 이차 염소 항체 항-마우스 알렉사 488 (1/500 희석)과 4°C에서 20분 동안 배양되었다. 1% BSA 및 0.1%  $\text{NaN}_3$ 가 보충된 PBS로 추가 3번의 세척들 이후에, 세포들은 FACS (팩스칼리버, 벡트-디킨슨사)에 의해 분석되었다. 적어도 5,000개 세포들이 형광 강도의 평균 수치를 계산하도록 평가되었다. 데이터는 프리즘 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.
- [0282] 결과들은 도 5에 나타나 있다. 1613F12 또는 m9G4 이소형 대조군 둘 중 하나를 사용하여 COS7 세포들 상에서 확립된 역가 측정 곡선은 1613F12가 COS7 세포들의 표면 상에서 발현된 Ax1 수용체의 원숭이 세포성 형태를 인식할 수 있는 것을 검증한다. 0.625 µg/mL ( $4.2 \times 10^{-10}$  M) 초과 1613F12 농도들의 경우에 정체기에 도달된다. 예상된 바와 같이 결합은 mIgG1 이소형 대조군의 존재 시 관찰된다.
- [0283] 본 실시예는 1613F12가 마우스 Ax1 수용체와 교차-결합하지 않는 사실을 설명하고 있다. 대조적으로, 이것은 COS7 세포들의 표면 상에서 발현된 원숭이 Ax1 수용체와는 강하게 결합한다.

[0284] **실시예 6: 1613F12의 존재 시 수행된 Gas6 경쟁 실험들**

[0285] 또한 항-Ax1 Mab들을 특징 분석하기 위하여, Gas6 경쟁 검정법들이 수행되었다. 이러한 검정법에서, 자유 rhAx1-Fc 단백질 및 항-Ax1 항체는 항원-항체 복합체를 형성하도록 배양되고 다음으로 복합체들은 검정 플레이트에서 Gas6-코팅된 표면 상에 로딩된다. 미결합 항체-항원 복합체들은 rhAx1-Fc 단백질의 인간 Fc 부분에 대한 효소-결합된 이차 항체를 첨가하기 이전에 세척해 버린다. 다음으로 기질이 첨가되고 항원 농도가 효소-기질 반응에 의해 발현된 신호 강도에 의해 결정될 수 있다.

[0286] 간략하게 테스트될 항-Ax1 Mab들의 존재 여부와 상관없이 rhAx1-Fc 단백질을 포함하는 반응 혼합물은 개별적 포화된 (PBS 1×에 녹인 0.5% 젤라틴) 플레이트 상에서 준비된다. 마우스 항-Ax1 항체들의 일련의 1 : 2 희석들 (12개 열들 상에서 80 µg/mL로부터 시작함)이 수행된다. 다음으로 0.5 µg/mL의 rhAx1-Fc 단백질 (R & D 시스템사, 참조번호 154AL/CF)이 엘라이자 희석제 (PBS 1×에 녹인 0.1% 젤라틴, 0.05% 트윈 20)만을 포함하는 음성 대조군 열을 제외하고 첨가된다. 균질화 이후에, 경쟁 시료들이 PBS에 녹인 6 µg/mL rhGas6 용액 (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 885-GS-CS / CF)으로 Gas6-코팅된 플레이트들 상에 로딩된다. 배양 및 여러 번의 세척들 이후에, 결합된 rhAx1-Fc 단백질들은 염소 항-인간 IgG-HRP (잭슨사, 참조번호 109-035-098)를 사용하여 검출된다. 일단 결합되고 나면, TMB 기질이 플레이트들에 첨가된다. 반응은 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 산 용액의 첨가에 의해 정지되고 획득된 광학 밀도들은 450 nm에서 마이클로플레이트 리더 기기를 사용하여 해독된다.

[0287] 이러한 실험 (도 6)은 1613F12가 그의 고정된 리간드 상에서 rhAx1-Fc 결합과 경쟁할 수 있는 것을 보여준다. Gas6 결합과의 경쟁은 2.5 µg/mL (1.67 10<sup>-8</sup> M) 초과인 1613F12 항체 농도의 존재 시 일어난다. 고정된 Gas6 상의 rhAx1-Fc의 결합은 10 µg/mL (6.67 10<sup>-8</sup> M) 초과인 1613F12 농도의 존재 시 전혀 관찰되지 않는다. 1613F12는 rhAx1-Fc과의 Gas6 결합을 차단한다.

[0288] **실시예 7: 웨스턴 블롯에 의한 에피토프 인식**

[0289] 1613F12이 선형의 또는 입체형태의 에피토프를 인식하는지 여부를 결정하기 위하여, 웨스턴 블롯 분석이 SN12C 세포 용출물들을 사용하여 시행되었다. 시료들은 환원 또는 비환원 조건들에 있도록 서로 다르게 처리되었다. 밴드가 환원된 시료로 촬영되는 경우라면, 테스트된 항체는 ECD 도메인의 선형의 에피토프를 표적화하고; 그렇지 않은 경우라면, 이것은 Ax1 ECD의 입체형태 에피토프에 대해 증가된다.

[0290] SN12C 세포들은 RPMI + 10% 열 불활성화된 FBS + 2 mM L-글루타민으로 T162 cm<sup>2</sup> 플라스크들에 있는 5 × 10<sup>4</sup>개 세포들/cm<sup>2</sup>로 5% CO<sub>2</sub> 환경 하의 37°C에서 72시간 동안 접종되었다. 다음으로 세포들은 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)로 2번 세척되었고 1.5 mL의 얼음-냉각된 용출 완충액 [50 mM 트리스-HCl (pH 7.5); 150 mM NaCl; 1% 노니벳 P40; 0.5% 데옥시콜레이트; 및 1% 항포스포파타제들을 더한 1개 완전한 프로테아제 저해제 각테일 정제]으로 용출되었다. 세포 용출물들은 4°C에서 90분 동안 진탕되었고 15,000 rpm으로 10분 동안 원심분리되었다. 단백질 농도는 BCA를 사용하여 정량되었다. 다양한 시료들이 로딩되었다. 첫째 10 µg의 전체 세포 용출물 (20 µL에서 10 µg)은 환원 조건들 (1× 시료 완충액 (BIORAD) + 1× 환원제 (BIORAD))에서 준비되었고 96°C에서 2분 배양 이후에 SDS-PAGE 상에 로딩되었다. 둘째 10 µg의 전체 세포 용출물의 2개 다른 시료들이 비-환원 조건들에서 (단지 1× 시료 완충액 (BIORAD))에서 준비되었다. SDS-PAGE 젤 상에 로딩되기 이전에, 이들 2개 마지막 시료들의 하나는 96°C에서 2분 배양으로 가열되고; 다른 하나는 얼음 위에 보관된다. 전개 이후에, 단백질들은 니트로셀룰로스 막으로 이동된다. 막들은 TBS-트윈 20 0.1% (TBST), 5% 무지방 밀크로 RT에서 1시간 동안 포화되었고 10 µg/mL의 1613F12로 4°C에서 밤샘 탐색되었다. 항체들은 5% 무지방 건조 밀크를 가진 트리스 완충된 식염수 - 0.1% 트윈 20 (v/v) (TBST)로 희석되었다. 다음으로 막들은 TBST로 세척되었고 퍼옥시다제-결합된 이차 항체 (1/1,000 희석)와 RT에서 1시간 배양되었다. 면역반응성 단백질들은 ECL (피어스사, #32209)로 영상화되었다. Ax1 영상화 이후에, 막들은 다시 한 번 TBST로 세척되었고 마우스 항-GAPDH 항체 (1/200,000 희석)와 RT에서 1시간 동안 배양되었다. 다음으로 막들은 TBST로 세척되었고 퍼옥시다제-결합된 이차 항체들과 RT에서 1시간 동안 배양되었다. 막들은 세척되었고 GAPDH는 ECL을 사용하여 드러났다.

[0291] 결과들은 도 7에 나타나 있다.

- [0292] 특이적 밴드가 비-환원된 조건들에서 필수적으로 관찰되기 때문에 1613F12는 입체형태의 에피토프를 주로 인식한다. 그러나 희미한 신호가 SN12C 세포 용출물의 변성화 이동 조건에서 검출되고 1613F12가 선형의 에피토프와 약하게 결합할 수 있는 것을 가리킨다.
- [0293] **실시예 8: 웨스턴 블롯에 의한 1613F12에 의해 유도된 Ax1 저하-조절의 측정**
- [0294] 다음의 실시예에서, 인간 신장세포 암종 세포주 SN12C (ATCC)는 Ax1 수용체 발현에 미치는 Ax1 항체들의 활성을 설명하도록 선택되었다. SN12C 세포주는 Ax1 수용체를 과다발현한다. Ax1 저하-조절은 전체 세포 추출물들 상의 웨스턴 블롯에 의해 도 8A 내지 8B에서 연구되었다.
- [0295] SN12C 세포들은 RPMI + 10% 열 불활성화된 FBS + 2 mM L-글루타민으로 6-웰 플레이트들에 있는  $6 \times 10^4$  개 세포들/cm<sup>2</sup>로 5% CO<sub>2</sub> 환경 하의 37°C에서 48시간 동안 접종되었다. 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)로 2번 세척된 이후에, 세포들은 800 ng/mL 재조합 마우스 gas6 리간드 (R and D 시스템사, 참조번호 986-GS/CF) 또는 10 µg/mL의 mIgG1 이소형 대조군 항체 (9G4) 또는 10 µg/mL의 본 발명의 Ax1 항체의 어느 하나를 포함하는 배지에서 혈청-기아로 처리되었고 추가 4시간 또는 24시간 동안 배양되었다. 다음으로 배지는 가만히 제거되었고 세포들은 차가운 PBS로 2번 세척되었다. 세포들은 200 µL의 얼음-냉각된 용출 완충액 [50 mM 트리스-HCl (pH 7.5); 150 mM NaCl; 1% 노니벳 P40; 0.5% 테옥시콜레이트; 및 1% 항포스파타제들을 더한 1개 완전한 프로테아제 저해제 각테일 정제]으로 용출되었다. 세포 용출물들은 4°C에서 90분 동안 진탕되었고 1,5000 rpm으로 10분 동안 원심분리되었다. 단백질 농도는 BCA를 사용하여 정량되었다. 전체 세포 용출물 (20 µL에서 10 µg)은 SDS-PAGE에 의해 분리되었고 니트로셀룰로스 막으로 이동되었다. 막들은 TBS-트윈 20 0.1% (TBST), 5% 무지방 밀크로 RT에서 1시간 동안 포화되었고 시판되는 0.5 µg/mL의 시판되는 M02 Ax1 항체로 4°C에서 밤샘 탐색되었다. 항체들은 5% 무지방 건조 밀크를 가진 트리스 완충된 식염수 - 0.1% 트윈 20 (v/v) (TBST)로 희석되었다. 다음으로 막들은 TBST로 세척되었고 퍼옥시다제-결합된 이차 항체 (1/1,000 희석)와 RT에서 1시간 배양되었다. 면역반응성 단백질들은 ECL (피어스사, #32209)로 영상화되었다. Ax1 영상화 이후에, 막들은 다시 한 번 TBST로 세척되었고 마우스 항-GAPDH 항체 (1/200,000 희석)와 RT에서 1시간 동안 배양되었다. 다음으로 막들은 TBST로 세척되었고 퍼옥시다제-결합된 이차 항체들과 RT에서 1시간 동안 배양되었다. 막들은 세척되었고 GAPDH는 ECL을 사용하여 드러났다. 밴드 강도는 밀도측정법에 의해 정량되었다.
- [0296] 도 8A 및 8B에서 표현된 결과들은 3번의 독립적 실험들을 나타내고, 1613F12는 Ax1-과다발현하는 인간 종양 세포주에서 Ax1을 저하-조절할 수 있는 것을 보여준다. 4시간에서, 1613F12는 66% Ax1 저하-조절, 및 1613F12와 24시간 배양 이후에 87%까지 저하-조절을 유도한다.
- [0297] **실시예 9: 세포 표면 Ax1 발현에 미치는 1613F12 효과의 유동 세포측정법 연구**
- [0298] 유동 세포측정법은 세포-표면 Ax1 수용체의 표지화를 허용한다. 이러한 기법의 사용은 막 Ax1 발현에 미치는 항체의 효과를 강조할 수 있다. 높은 수준들의 Ax1을 발현하는 인간 신장 종양 SN12C 세포들이 본 실시예에서 사용되었다.
- [0299] SN12C 종양 세포주는 실험 이전에 1% L-글루타민 및 10%의 FCS를 가진 RPMI1640으로 배양되었다. 다음으로 세포들은 트립신을 사용하여 탈착되었고 1% L-글루타민 및 5%의 FCS를 가진 RPMI1640을 넣은 6-멀티웰에 도말되었다. 다음날, 관심 있는 항체들이 10 µg/mL로 첨가되었다. 미처리된 웰들도 또한 포함되었다. 세포들은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양된다. 24시간 이후에, 세포들은 PBS로 세척되었고, 탈착되었으며, FACS 완충액 (PBS, 1% BSA, 0.01% 소듐 아자이드)에서 동일한 관심 있는 항체들과 배양되었다. 미처리된 세포들은 또한 처리 및 미처리된 세포들 상에서 동일한 Mab로 획득된 신호 강도를 비교하기 위하여 동일한 항체로 염색되었다. 세포들은 4°C에서 20분 동안 배양되었고 FACS 완충액으로 3번 세척되었다. 알렉사 488-표지된 염소 항-마우스 IgG 항체가 20분 동안 배양되었고 세포들은 프로피디움 요오드 음성 세포 집단에 관한 FACS 분석 이전에 3번 세척되었다.
- [0300] 2가지 매개변수들이 결정되었다: (i) T24 시간에 Ab-처리된 세포들과 비교하여 미처리된 (Ab 없음) 세포들의 표면 상에서 검출된 형광 신호의 차이 및 (ii) 세포 표면 상에 남아있는 Ax1의 백분율. 남아있는 Ax1의 백분율은 다음과 같이 계산된다:



[0301] 남아있는 Ax1 % = (MFI<sub>Ab 24 h</sub> / MFI<sub>Ab 없음 24 h</sub>) × 100

[0302] 하나의 대표적인 실험 (3번 중)으로부터 나온 데이터는 표 7에 나타나 있다. 결과들은 3번의 독립적인 실험들에서 재생되었다.

[0303] 미처리된 세포 및 동일한 항체로의 처리된 조건에서 Mab 염색 간의 MFI의 차이는 고려된 Mab의 결합으로 인한 세포들의 세포 표면 상에서 Ax1 단백질의 저하-조절을 반영한다. 항체가 없는 조건들은 이소형 대조군 항체 (m9G4)의 존재 시 조건들과 유사한 결과들을 낸다.

표 7

표지화	처리	T24 시간의 MFI	$\Delta$ (MFI <sub>Ab 없음 24 h</sub> - MFI <sub>Ab 24 h</sub> )	남은 Ax1%
1613F12	Ab 없음	938	514	45.2
	1613F12	424		
9G4	No Ab	11	-2	117
	9G4	13		
MAB154	Ab 없음	950	ND	ND
	9G4	ND		

[0304]

[0305] 데이터는 1613F12으로 24시간 동안 처리된 세포들의 표면 상에서 검출된 평균 형광 강도가 1613F12로 표지된 미처리된 세포들로 획득된 MFI들과 비교하여 감소되는 (-514) 것을 보여준다. 1613F12 항체로 24시간 배양 이후에, 세포-표면 Ax1 수용체의 45.2%가 SN12C 세포-표면에 남아있다.

[0306] **실시예 10: 형광 면역화학 표지화를 사용한 1613F12 내재화 연구**

[0307] 상보적 내재화 결과들이 간접 형광 표지화 방법을 사용하는 공초점 현미경 분석에 의해 획득된다.

[0308] 간략하게, SN12C 종양 세포들은 1% L-글루타민 및 10%의 FCS를 가진 RPMI 1640으로 실험 이전에 3일 동안 배양되었다. 다음으로 세포들은 트립신으로 탈착되었고 1% L-글루타민 및 5%의 FCS를 가진 RPMI 1640이 있는 커버슬라이드를 포함하는 6-멀티웰 플레이트에 도말되었다. 다음날, 1613F12가 10 μg/mL로 첨가되었다. 부적절한 항체로 처리된 세포들도 또한 포함되었다. 다음으로 세포들은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 및 2시간 동안 배양되었다. T 0시간 동안, 세포들은 세포 표면 상의 항체 결합을 결정하기 위하여 4°C에서 30분 동안 배양되었다. 세포들은 PBS로 세척되었고 포름알데하이드로 15분 동안 고정되었다. 세포들은 헹구졌고 세포 표면 상에 남아있는 항체를 확인하기 위하여 4°C에서 60분 동안 염소 항-마우스 IgG 알렉사 488 항체와 배양되었다. 세포들 내로 항체 침투를 추적하기 위하여, 세포들은 고정되었고 사포닌으로 투과 처리되었다. 염소 항-마우스 IgG 알렉사 488 (인비트로젠사)가 막 및 세포내 항체 들 다를 염색하는 데 사용되었다. 초기 엔도솜은 염소 항-토끼 IgG-알렉사 555 항체 (인비트로젠사)로 드러나는 EEA1에 대한 토끼 다중클론 항체를 사용하여 확인되었다. 세포들은 3번 세척되었고 핵들은 Draq5를 사용하여 염색되었다. 염색 이후에, 세포들은 프로롱 골드 마운팅 배지 (인비트로젠사)로 마운팅되었고 Zeiss LSM 510 공초점 현미경을 사용하여 분석되었다.

[0309] 사진들은 도 9A 내지 9C에 나타나 있다.

[0310] 영상들은 공초점 현미경 분석법에 의해 획득되었다. mIgG1 이소형 대조군 (9G4)의 존재 시, 막 염색 또는 세포 내 표지화는 전혀 관찰되지 않았다 (도 9A). 막 항-Ax1 표지화의 점진적인 소실이 1613F12로 SN12C 세포들의 1시간 배양 이후에 바로 관찰된다 (도 9B). 1613F12 Ax1 항체의 세포내 축적은 1시간 및 2시간에서 분명하게 관찰된다 (도 9C). 세포내 항체는 초기 엔도솜 마커인 EEA1와 공동-정착한다. 이들 사진들은 SN12C 세포들 내로 1613F12의 내재화를 검증하고 있다.

- [0311] **실시예 11: 시험관내 항-Ax1 매개된 항-종양성 활성화**
- [0312] SN12C 증식 검정법
- [0313] 웰 당 1만개의 SN12C 세포들이 5% CO<sub>2</sub> 환경 하의 37°C에서 96-웰 플레이트 상의 무-FCS 배지에 접종되었다. 다음날, 세포들은 10 μg/mL의 각각의 항체와 37°C에서 1시간 동안 전배양되었다. 세포들은 리간드를 웰에 직접적으로 첨가하여 rmGas6 (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 986-GS/CF)가 있거나 없이 처리되었고 다음으로 72시간 동안 성장하도록 남겨졌다. 증식은 <sup>3</sup>H 티미딘 도입에 이어서 측정되었다.
- [0314] 데이터는 도 10에 나타나 있다. SN12C 세포들에 첨가될 때 침묵하는 1613F12로의 효과는 전혀 관찰되지 않았다.
- [0315] **실시예 12: 다양한 인간 종양 세포주들에서 1613F12-사포린 면역결합체의 세포독성 효능**
- [0316] 본 실시예에서는, 사포린 결합된 1613F12의 세포독성 효능이 보고되었다. 이러한 목적으로, 큰 패널의 인간 종양 세포주들을 사용한 직접적인 시험관내 세포독성 검정법들이 수행되었다 (도 11A 내지 11K). 이러한 종양 세포주 패널은 다양한 Ax1 발현들을 제공한다.
- [0317] 간략하게, 5,000개 세포들이 100 μL의 5% FBS 적당한 배양 배지를 넣은 96 웰 배양 플레이트들에 접종되었다. 5% CO<sub>2</sub> 환경 하의 37°C에서 24시간 배양 이후에, 광범위한 농도의 면역결합체 (1613F12-사포린 또는 9G4-사포린 또는 미가공된 1613F12 또는 9G4)가 세포들에 적용된다. 다음으로 배양 플레이트들은 습윤화된 5% CO<sub>2</sub> 배양기로 37°C에서 72시간 동안 배양되었다.
- [0318] D4에서, 세포 생존도는 대사적으로 활성을 가진 세포들의 지시인자인 존재하는 ATP의 정량을 기초로 하여 생존하는 세포들의 수를 결정하도록 허용하는 셀타이터-글로 (CellTiter-Glo) 발광 세포 생존도 키트 (프로메가사 (Promega Corp.), 위스콘신주 매디슨시)를 사용하여 평가되었다. 발광 방출들은 발광측정기 장치에 의해 기록된다.
- [0319] 세포독성의 백분율은 발광 결과로부터 다음의 공식을 사용하여 계산된다:
- [0320] **% 세포독성 = 100 - [(RLU<sub>Ab-sap</sub> × 100) / RLU<sub>Ab없음</sub>]**
- [0321] 도 11A 내지 11K 상에서 광범위한 1613F12-사포린 면역결합체 농도들로 처리된 (A) SN12C, (B) Calu-1, (C) A172, (D) A431, (E) DU145, (F) MDA-MB-435S, (G) MDA-MB-231, (H) PC3, (I) NCI-H226, (J) NCI-H125 또는 (K) Panc1 종양 세포들을 가지고 구별되는 시험관내 세포 세포독성 검정법들에서 획득된 면역결합체 농도의 함수로 세포독성 백분율을 나타내는 그래프들이 다함께 배치되었다.
- [0322] 도 11A 내지 11K는 1613F12-사포린 면역결합체가 이들 서로 다른 인간 종양 세포주들에서 세포독성을 유도하는 것을 보여준다. 결과로 나온 세포독성 효과의 효능은 인간 종양 세포주에 의존한다.
- [0323] **실시예 13: 인간 Ax1 ECD와 Ax1 항체의 결합 동력학**
- [0324] 다음으로 1613F12의 친화도 측정이 비아코아 (Biacore)를 사용하여 결정되었다.
- [0325] 비아코아 X는 인간 Ax1 ECD 상의 Ax1 항체들의 결합 동력학을 측정하는 데 사용된다.
- [0326] 비아코아 시스템들에 의해 사용된 표면 플라즈몬 공명 (SPR)의 광학적 현상을 기초로 한 기기는 표지들의 사용이 없이도 실시간으로 단백질-단백질 상호작용들의 검출 및 측정을 가능하게 한다.
- [0327] 간략하게, 실험들은 바이오센서로서 센서 칩 CM5를 사용하여 실현되었다. 토끼 IgG들은 CM5 센서 칩의 유동 세포들 1 및 2 (FC1 및 FC2) 상에서 9,300 내지 10,000 반응 단위들 (RU)의 수준으로 항체들을 포획하도록 아민 커플링 화학을 사용하여 고정되었다.
- [0328] 결합은 다수의 순환들을 사용하여 평가된다. 측정의 각각의 순환은 HBS-EP 완충액에서 30 μL/분의 유동 속도를 사용하여 수행된다. 다음으로 테스트될 Ax1 항체는 칩 상에서 1분 동안 포획되었고 FC2 상에서만 1613F12 항체의 경우 311.8 RU (SD = 5.1 RU)의 평균 포획 수치에 도달한다. 분석물 (Ax1 ECD 항원)이 실시간으로 대략

적인  $k_a$  및  $k_d$ 를 측정하도록 200 nM에서 시작하여 2배의 일련의 희석들을 사용하여 주입된다.

[0329] 각각의 순환의 마지막에는, 표면들이 항체-항원 복합체들 및 포획 항체를 모두 제거하도록 10 mM 글리신 염산 pH 1.5 용액을 주입하여 재생된다. 고려된 신호는 FC1 및 FC2 (FC2-FC1) 간에 관찰된 신호들의 차이에 해당한다. 결합율들 ( $k_a$ ) 및 해리율들 ( $k_d$ )은 일-대-일 랑뮈르 (Langmuir) 결합 모델을 사용하여 계산되었다. 평형 해리 상수 (KD)는  $k_a/k_d$  비율로서 결정된다. 실험적 수치들은 비아 평가 (Biaevaluation) 소프트웨어 버전 3.0을 사용하여 분석되었다.  $\chi^2$  분석이 데이터의 정확성을 평가하도록 수행될 것이다.

[0330] 데이터는 다음의 표 8에 요약되어 있다. 표 8은 인간 Ax1 ECD와 1613F12의 결합 동력학 및 친화도를 나타낸다.

**표 8**

항체	$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
1613F12	$1.06 \cdot 10^5$	$2.42 \cdot 10^{-4}$	$2.29 \cdot 10^{-9}$	0.71 (0.6%)

[0331]

[0332] 인간 Ax1의 세포의 도메인 (ECD)을 생산하기 위하여, 인간 수용성 AXL 수용체를 코딩하는 인간 cDNA들이 먼저 PCR에 의해 pCEP4 발현 벡터 내로 클론되었다. 다음으로 정제된 산물은 제한효소 HindIII 및 BamHI으로 소화되었고 동일한 효소들로 미리 절단되었던 pCEP4 발현 벡터 내로 라이게이션되었다. 마지막으로, 확인된 재조합 플라스미드 pCEP[AXL]His<sub>6</sub>는 또한 DNA 서열결정에 의해 검증되었다.

[0333] 다음으로 현탁 적응된 세포 HEK293E가 4 mM 글루타민을 가진 Ex-cell 293 (SAFC 바이오사이언스사) 배지에서 배양되었다. 모든 형질전환들은 선형의 25 kDa 폴리에틸렌이민 (PEI)을 사용하여 수행되었다. 형질전환된 배양은 5% CO<sub>2</sub> 및 120 rpm에서의 교반을 가진 진탕 배양기로 37°C에서 6일 동안 유지되었다. 세포들은 원심분리에 의해 수집되었고, 재조합 His-태그를 가진 단백질을 포함하는 상청액은 Ni-NTA 아가로스 컬럼 상의 정제를 위해 처리되었다.

**수탁번호**

[0334]

기탁기관명 : COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES

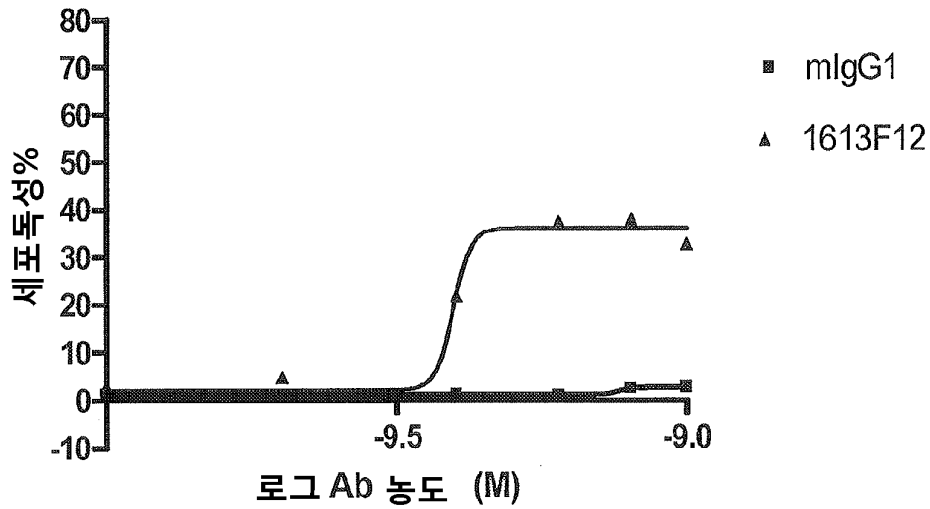
수탁번호 : CNCM04505

수탁일자 : 20110728

도면

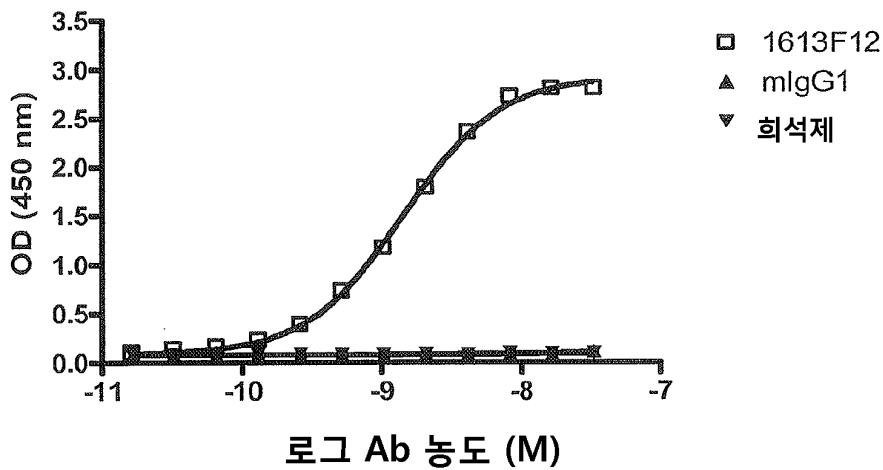
도면1

SN12C 세포독성 검정 - 1613F12

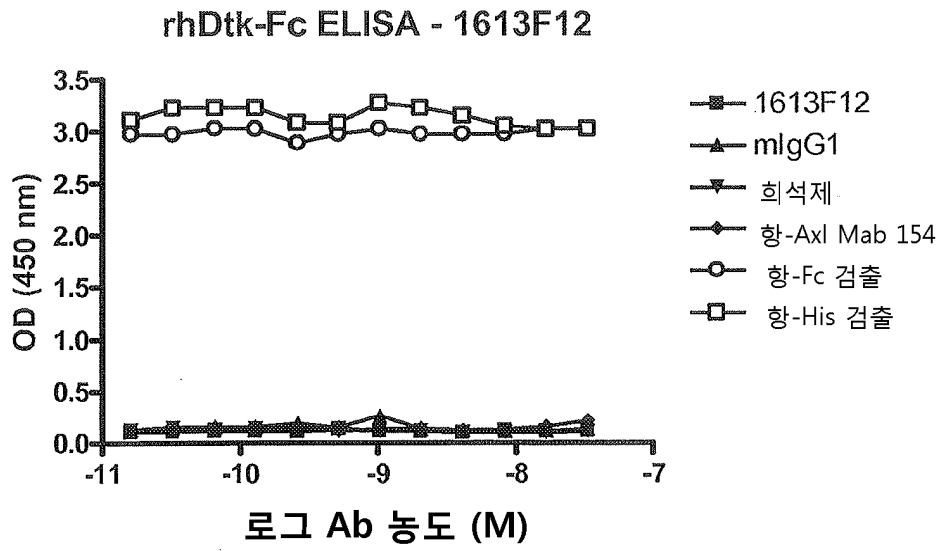


도면2a

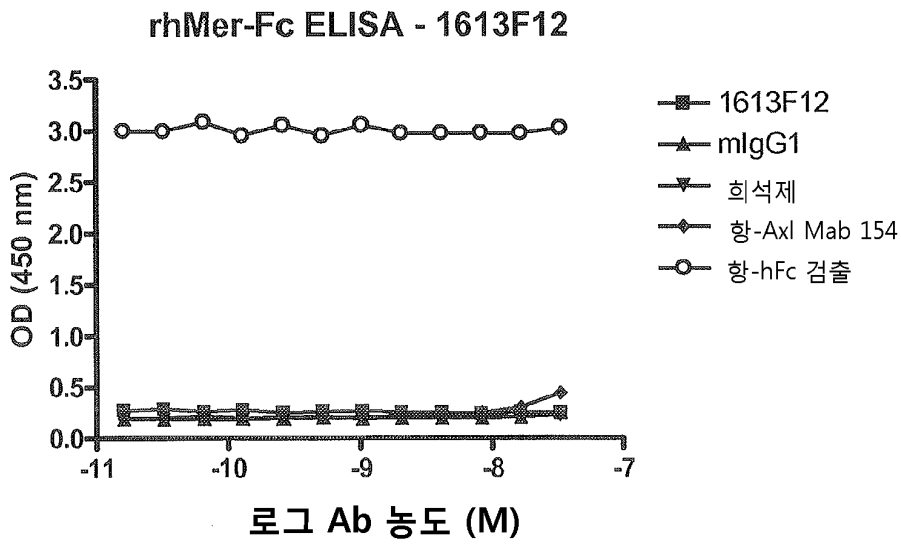
rhAxl-Fc ELISA - 1613F12



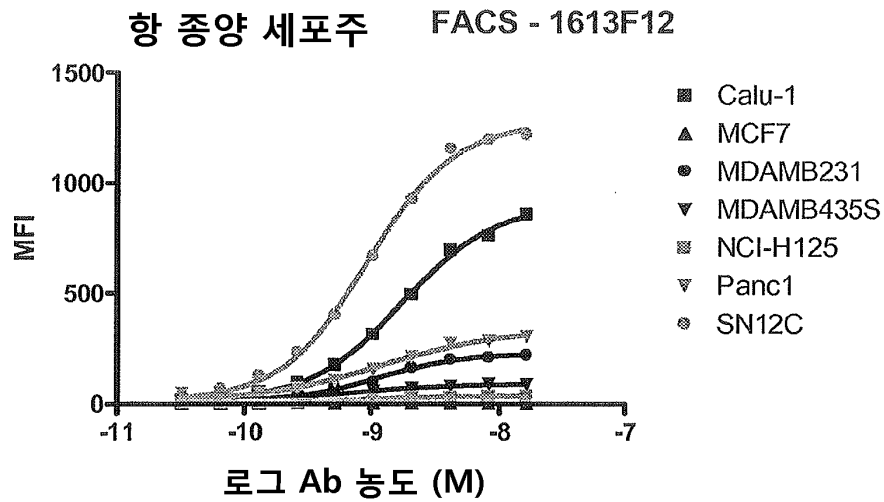
도면2b



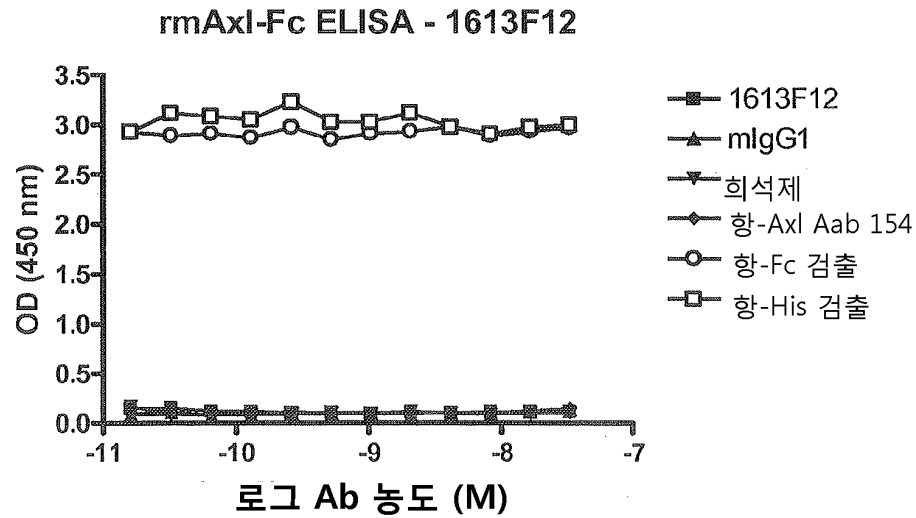
도면2c



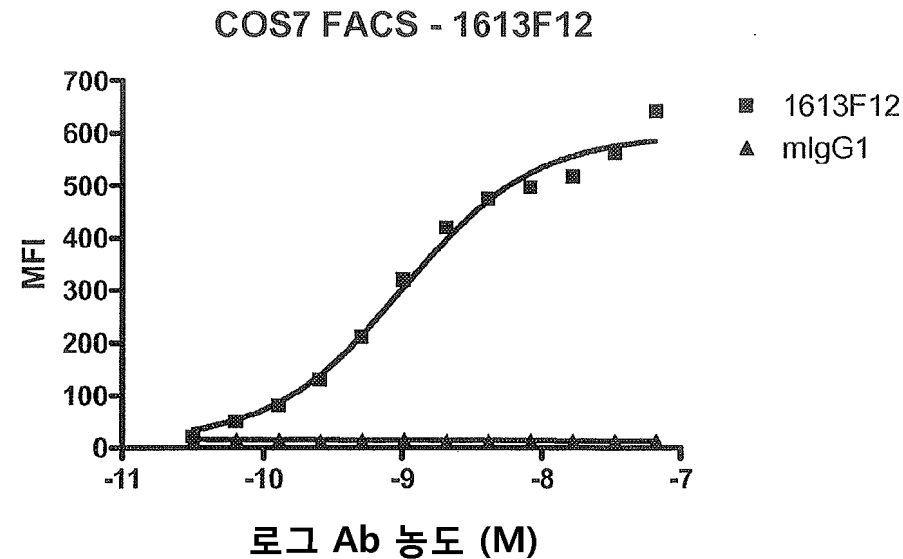
도면3



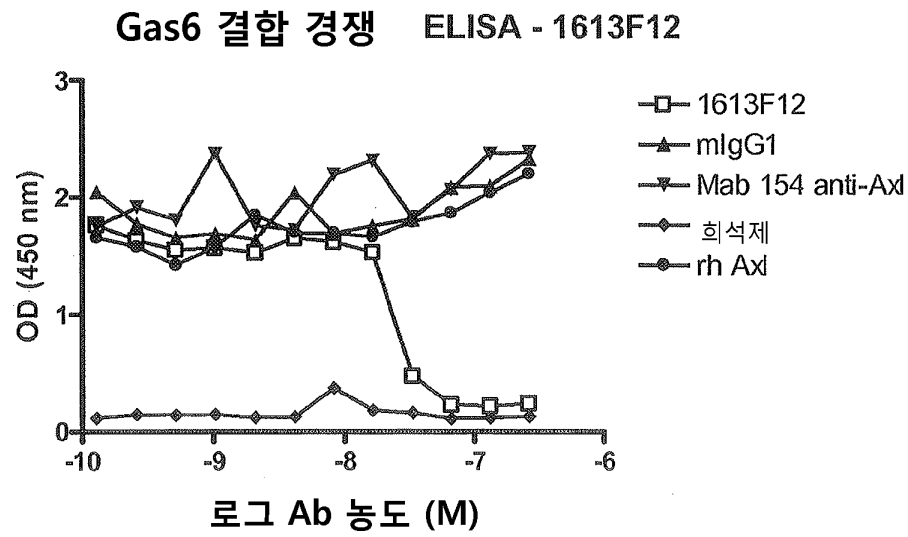
도면4



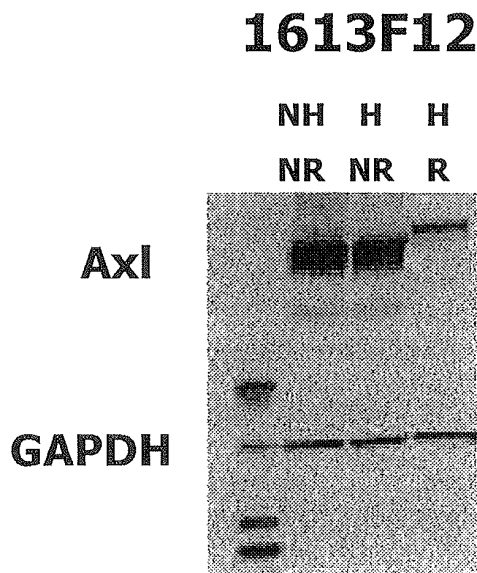
도면5



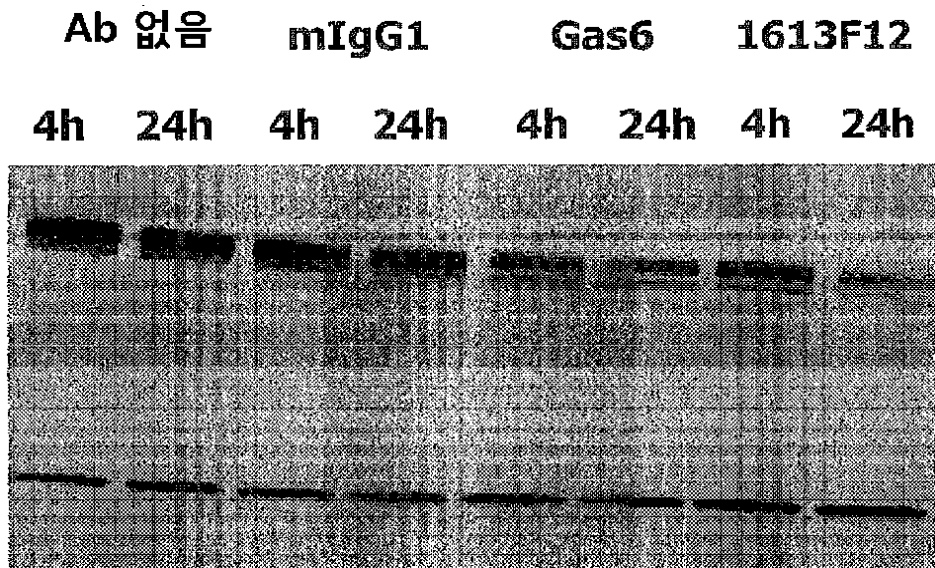
도면6



도면7

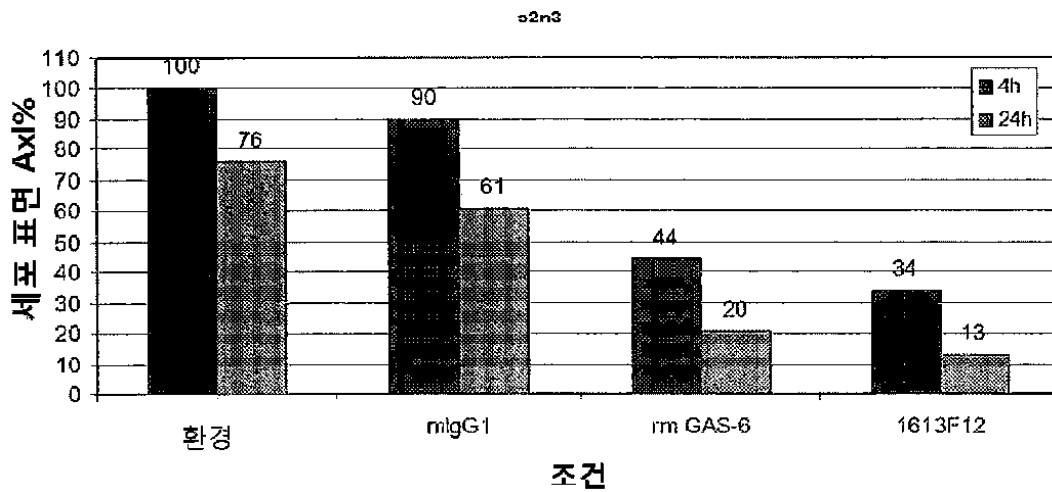


도면8a

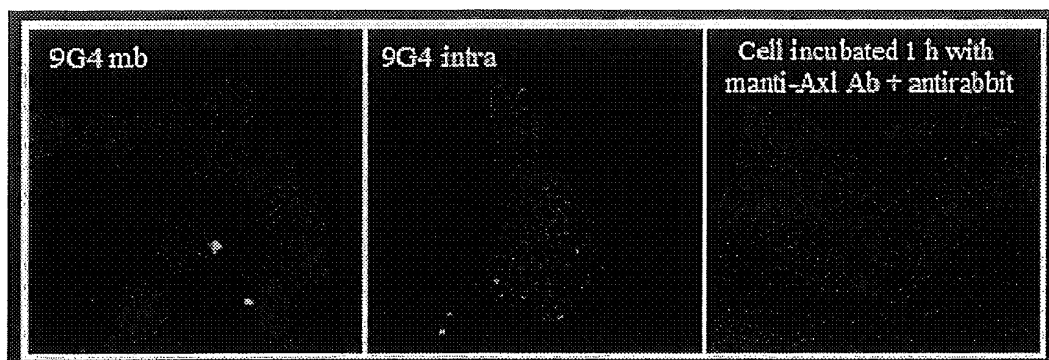


도면8b

1613F12 배양 이후 Axl 수용체의 SN12C 저하조절

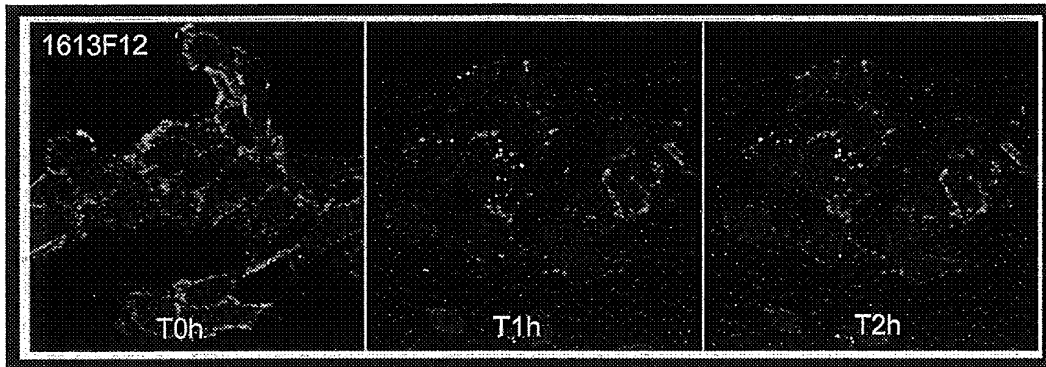


도면9a

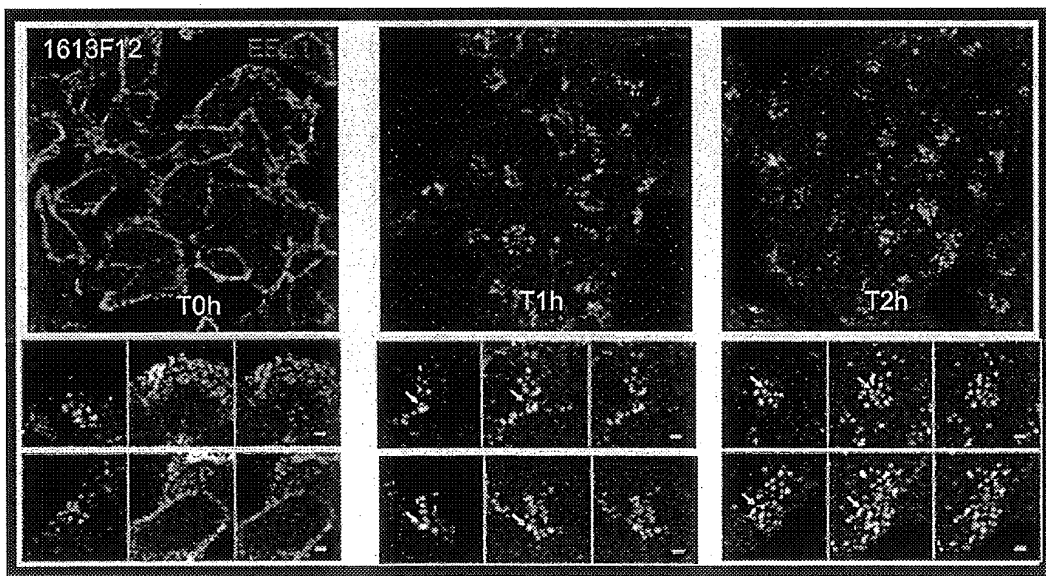




도면9b

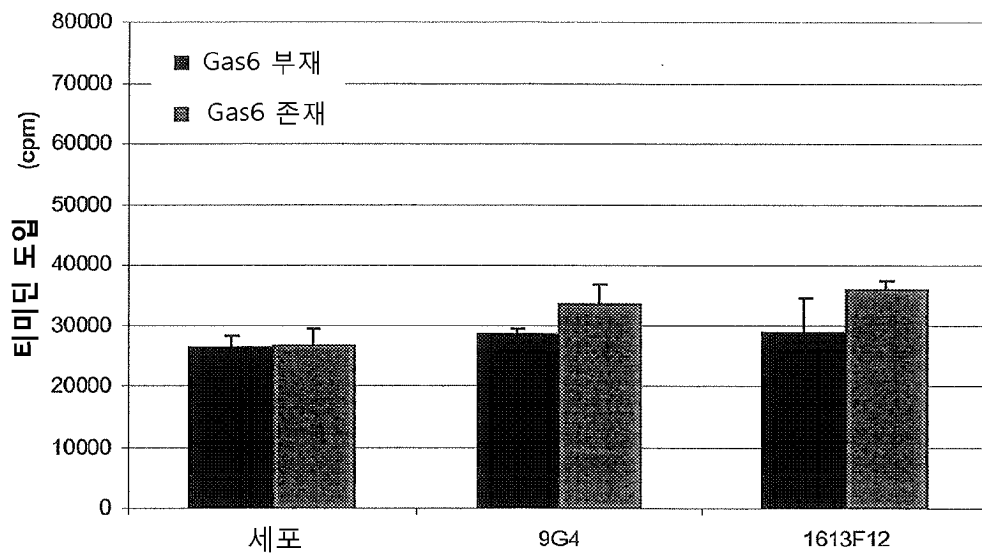


도면9c

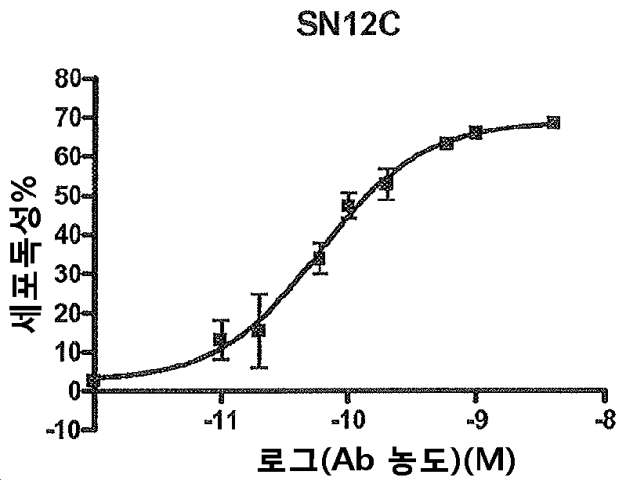


도면10

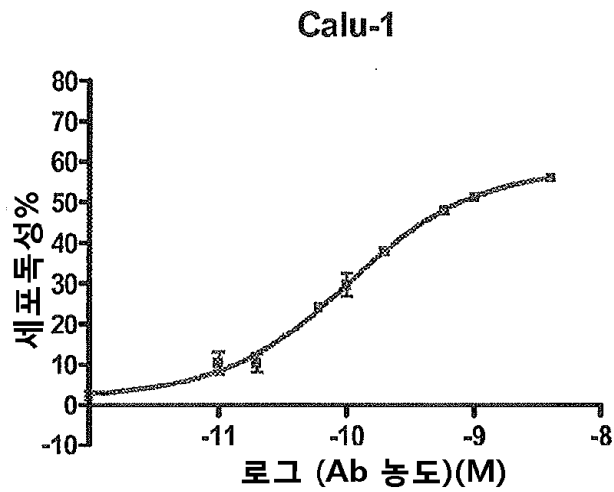
SN12C 증식 검정 - 1613F12



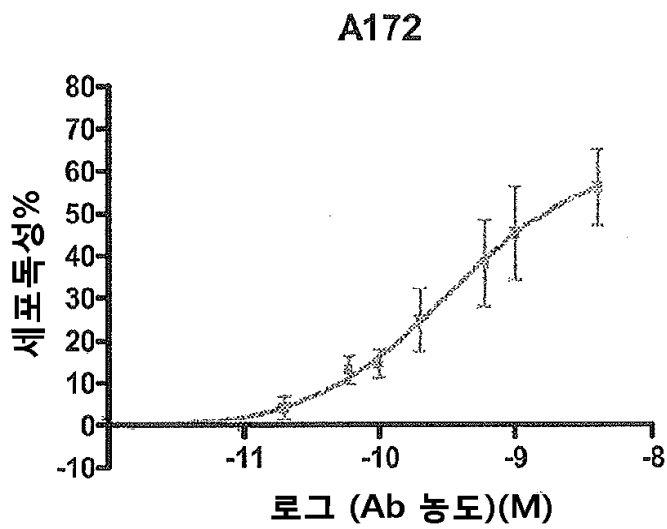
도면11a



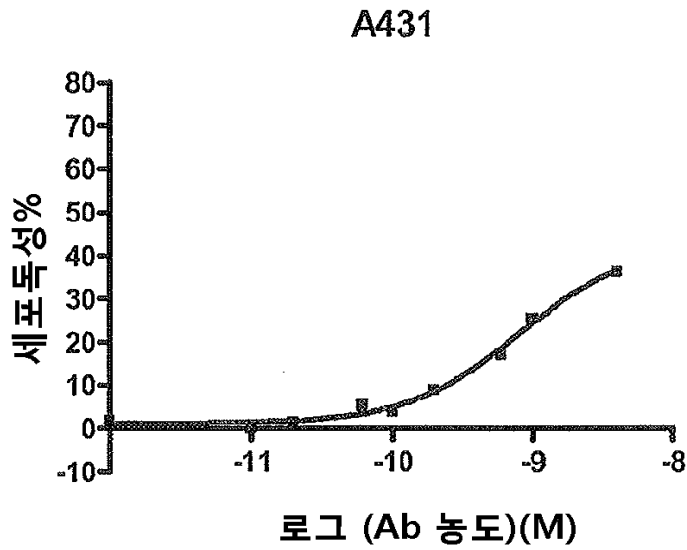
도면11b



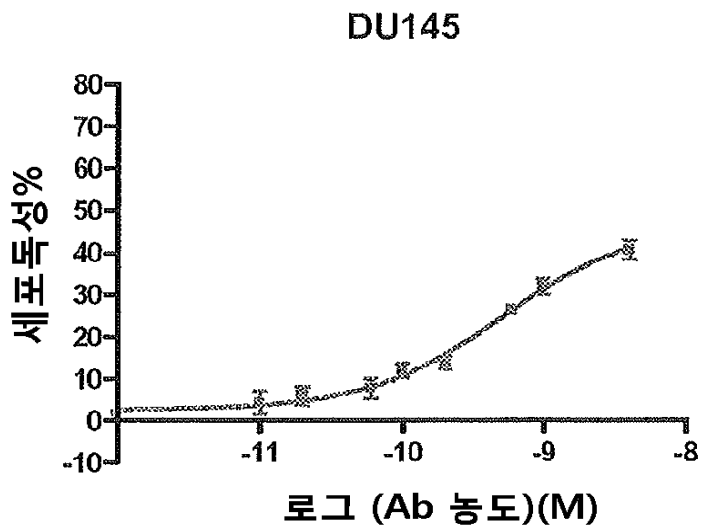
도면11c



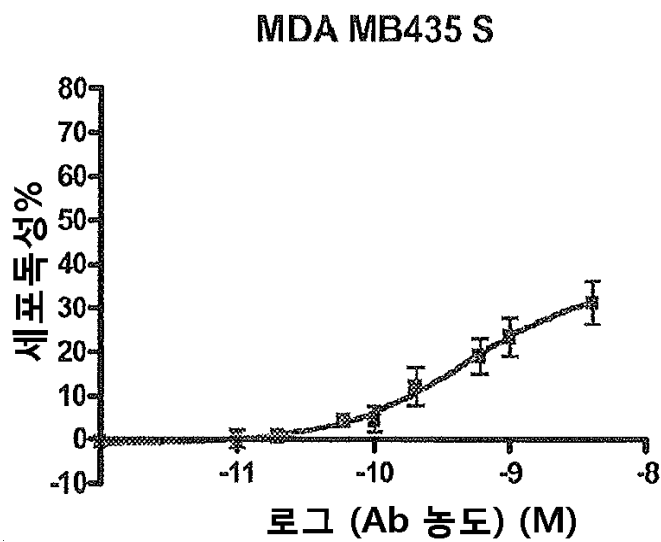
도면11d



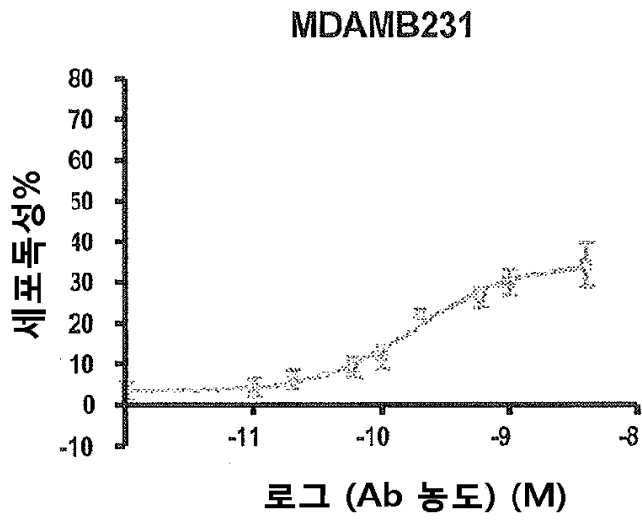
도면11e



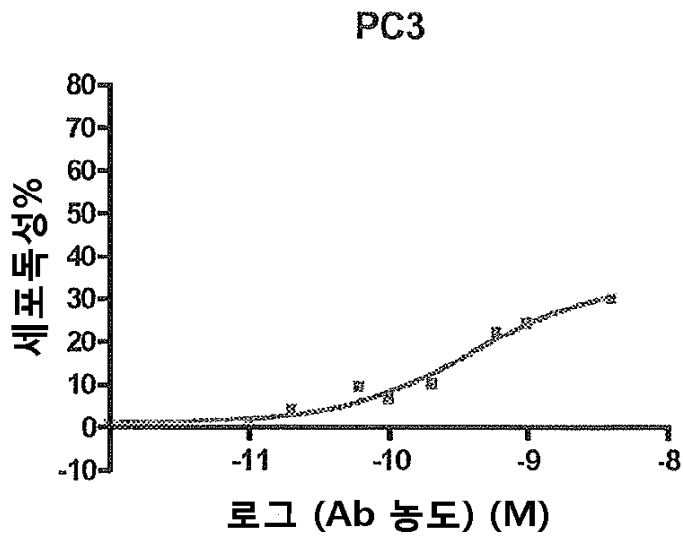
도면11f



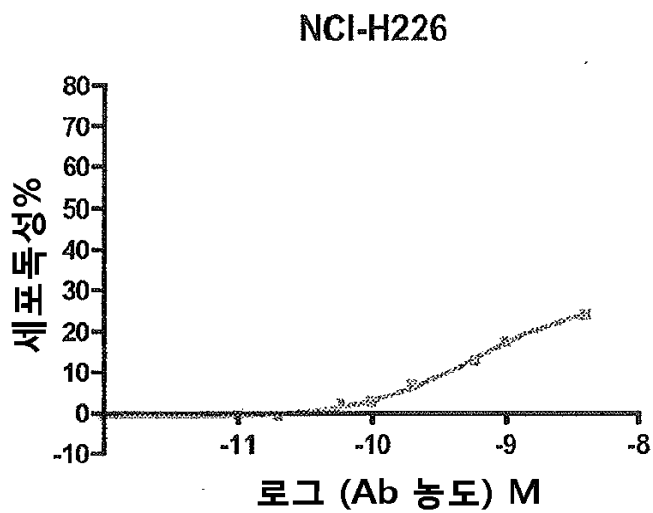
도면11g



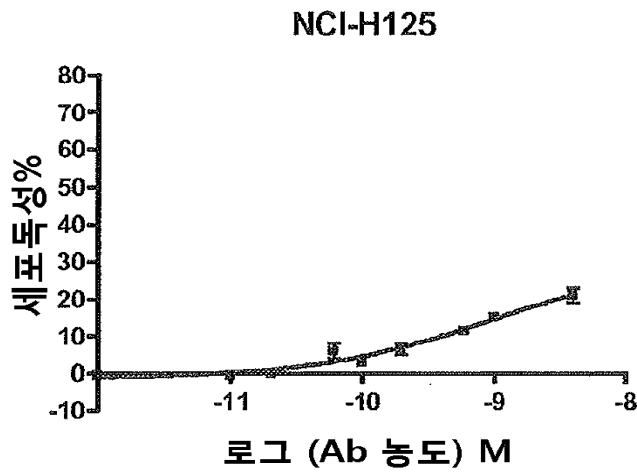
도면11h



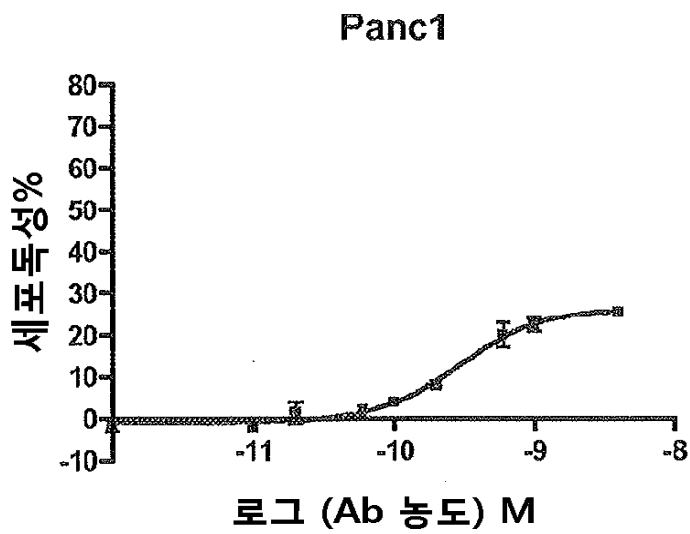
도면11i



도면11j



도면11k



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> NOVEL ANTIGEN BINDING PROTEIN AND ITS USE AS ADDRESSING PRODUCT  
FOR THE TREATMENT OF CANCER

<130> 361508D30354

<150> EP11306416.6

<151> 2011-11-03

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR-L1 from 1613F12 antibody (IMGT numbering)

<400> 1

Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

1                    5

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR-L2 from 1613F12 antibody (IMGT numbering)

<400> 2

Ser Gly Ser

1

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR-L3 from 1613F12 antibody (IMGT numbering)

<400> 3

Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu Thr

1                    5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR-H1 from 1613F12 antibody (IMGT numbering)

<400> 4

Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr Tyr

1                    5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR-H2 from 1613F12 antibody (IMGT numbering)

<400> 5

Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR-H3 from 1613F12 antibody (IMGT numbering)

<400> 6

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain Mu variable domain

<400> 7

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

1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain Mu variable domain

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Gly Pro Asn Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp

100 105 110

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

115 120

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR-L1 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)

<400> 9

Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala

1 5 10



<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR-L2 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)

<400> 10

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser

1                    5

<210> 11

<211> 9

<212>

> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR-L3 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)

<400> 11

Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu Thr

1                    5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR-H1 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)

<400> 12

Arg Asp Thr Tyr Ile His

1                    5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR-H2 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)

<400> 13

Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Gly Pro Asn Phe Gln

1                    5                    10                    15

Gly



<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR-H1 from 1613F12 antibody (IMGT numbering)

<400> 18

ggcttcaaca ttagagacac ctat 24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR-H2 from 1613F12 antibody (IMGT numbering)

<400> 19

cttgatcctg cgaatggcca tact 24

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR-H3 from 1613F12 antibody (IMGT numbering)

<400> 20

gctagagggg cctattacta cggtagtagt ggtctcttct actttgacta c 51

<210> 21

<211> 321

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Light chain Mu variable domain

<400> 21

gatgtccaga taaccagtc tccatcttat ctgctacat ctctggaga aaccattact 60

attaattgca gggcaagtaa gagcattagc aatatattag cctggatca agaaaaacct 120

gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg agttccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tggtagatc ttcactctca ccatcagtag cctggagcct 240

gaagattttg caatgtatct ctgtcaacag catcatgaat acccgctcac gttcgggtgct 300

gggaccgagc tggagctgaa a 321

<210> 22

<211> 372

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Heavy chain Mu variable domain

<400> 22

gaggttcacc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60

tcctgcacag ctcttggtt caacattaga gacacctata tcattgggt gaacagagg 120

cctgaacagg gctggagtg gattggaagg cttgatcctg cgaatggtca tactaaatat 180

ggcccgaact tccagggcag ggccactatg acatcagaca catcctcaa cacggcctac 240

ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagaggggcc 300

tattactag gtagtagtgg tctcttctac ttgactact ggggccaagg caccactctc 360

tcagtctcct ca 372

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR-L1 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)

<400> 23

agggcaagta agagcattag caaatattta gcc 33

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR-L2 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)

<400> 24

tctggatcca cttgcaatc t 21

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR-L3 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)

<400> 25

caacagcate atgaataccc gctcagc 27

<210> 26

<211> 18

<212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> Heavy chain CDR-H1 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)  
 <400> 26  
 agagacacct atatccat 18

<210> 27  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> Heavy chain CDR-H2 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)  
 <400> 27  
 aggcttgatc ctgcgaatgg tcatactaaa tatggcccga acttccaggg c 51

<210> 28  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> Heavy chain CDR-H3 from 1613F12 antibody (Kabat numbering)  
 <400> 28  
 ggggcctatt actacggtag tagtggcttc ttctactttg actac 45

<210> 29  
 <211> 894  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <220><221> misc\_feature

<223> Protein Axl (with peptide signal)  
 <400> 29  
 Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala  
 20 25 30  
 Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg  
 35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp  
 85 90 95  
 Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr  
 100 105 110  
 Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser  
 115 120 125  
 Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu  
 130 135 140  
 Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys  
 145 150 155 160  
 Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp  
 165 170 175  
 Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu  
 180 185 190  
 His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His  
 195 200 205  
 Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu  
 210 215 220  
 Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr  
 245 250 255  
 His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln  
 260 265 270  
 Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser  
 275 280 285  
 Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro



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



785                    790                    795                    800  
 Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro  
                                  805                    810                    815  
 Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu  
                                  820                    825                    830  
 Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro  
                                  835                    840                    845  
 Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly  
                                  850                    855                    860  
 Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala  
 865                    870                    875                    880  
 Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala

                                 885                    890  
 <210> 30  
 <211> 869  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> Protein Axl (without peptide signal)  
 <400> 30

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

Gly His Gln Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly  
 100 105 110  
 Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn  
 115 120 125  
 Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val  
 130 135 140  
 Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly  
 145 150 155 160  
 His Gly Pro Gln Arg Ser Leu His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser  
 165 170 175  
 Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg  
 180 185 190  
 Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu  
 195 200 205  
 Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu  
 210 215 220  
 Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu  
 245 250 255  
 Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly  
 260 265 270  
 Ser Leu His Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser  
 275 280 285  
 Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro  
 290 295 300  
 Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Ser Gln Ala Phe Val His Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln  
 325 330 335  
 Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro



Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu  
 595 600 605

Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu  
 610 615 620

Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr  
 625 630 635 640

Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn  
 645 650 655

Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile  
 660 665 670

Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val  
 675 680 685

Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys  
 690 695 700

Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg  
 705 710 715 720

Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr  
 725 730 735

Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly  
 740 745 750

Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg  
 755 760 765

Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala  
 770 775 780

Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp  
 785 790 795 800

Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp  
 805 810 815

Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala  
 820 825 830

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



Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp  
 165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu  
 180 185 190

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

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu  
 210 215 220

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu  
 225 230 235 240

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr  
 245 250 255

His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln  
 260 265 270

Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser  
 275 280 285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro  
 290 295 300

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp  
 305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro  
 325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His  
 340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg  
 355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly  
 370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser  
 385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro







Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala  
385                    390                    395                    400

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

                  405                    410                    415

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp

                  420                    425

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Tetrapeptide

<400> 33

Gly Phe Leu Gly

1

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Tetrapeptide

<400> 34

Ala Leu Ala Leu

1

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Pentapeptide

<400> 35

Pro Val Gly Val Val

1

5