



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0136652  
(43) 공개일자 2017년12월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/32* (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 47/42* (2017.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *A61K 49/14* (2006.01)  
*A61K 49/16* (2006.01) *C07K 14/435* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 16/32* (2013.01)  
*A61K 38/17* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7034613(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년11월04일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2012-7011607  
원출원일자(국제) 2010년11월04일  
심사청구일자 2015년11월03일
- (85) 번역문제출일자 2017년11월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/055465
- (87) 국제공개번호 WO 2011/056983  
국제공개일자 2011년05월12일
- (30) 우선권주장  
12/612,912 2009년11월05일 미국(US)

전체 청구항 수 : 총 1 항

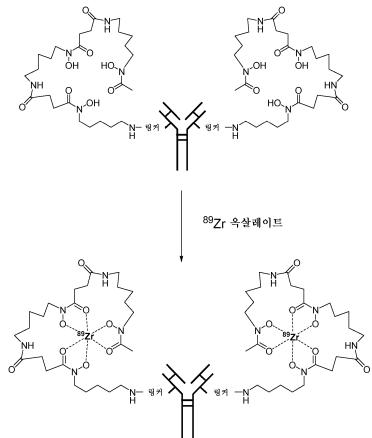
(54) 발명의 명칭 지르코늄-방사성표지된, 시스테인 조작된 항체 접합체

### (57) 요 약

항체는 모 항체의 하나 이상의 아미노산을 비가교된, 고도 반응성 시스테인 아미노산으로 대체하여 조작된다. 항체 단편은 또한 하나 이상의 시스테인 아미노산으로 조작되어 시스테인 조작된 항체 단편 (티오Fab)를 형성할 수 있다. 시스테인 조작된 항체의 설계, 제조, 스크리닝 및 선택의 방법이 제공된다. 시스테인 조작된 항체

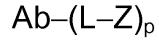
(뒷면에 계속)

**대 표 도** - 도22



(Ab)는 링커 (L)을 통해 하나 이상의 지르코늄 복합체 (Z) 표지와 접합되어 하기 화학식 I을 갖는 시스테인 조작된 지르코늄-표지된 항체 접합체를 형성한다.

<화학식 I>



(상기 식에서, p는 1 내지 4임)

지르코늄-방사성표지된, 시스테인 조작된 항체 접합체 조성물에 대한 영상화 방법 및 진단 용도가 개시된다.

(52) CPC특허분류

*A61K 39/395* (2013.01)

*A61K 47/42* (2013.01)

*A61K 48/00* (2013.01)

*A61K 49/14* (2013.01)

*A61K 49/16* (2013.01)

*C07K 14/435* (2013.01)

*C07K 16/18* (2013.01)

*C07K 16/28* (2013.01)

*C07K 19/00* (2013.01)

(72) 발명자

로우만, 헨리 비.

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔

에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

마리, 잔

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔

에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

티니아노우, 제프

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔

에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

윌리암스, 시몬

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔

에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 I을 갖는, 유리 시스테인 아미노산을 통해 링커 (L) 및 지르코늄 복합체 (Z)에 접합된 시스테인 조작된 항체 (Ab)이용한 치료 방법.

<화학식 I>

$\text{Ab}-(\text{L}-\text{Z})_p$

(상기 식에서, p는 1 내지 4임)

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 출원은 현재 2009년 4월 21일에 허여된 US 7,521,541호, 2005년 9월 22일에 출원된 US 출원 번호 11/233,258의 계속 출원인 2009년 3월 6일에 출원된 US 출원 번호 12/399,241의 부분-계속 출원인 2009년 11월 5일에 출원된 US 출원 번호 12/612,912를 우선권 주장하고, 또한 35 USC § 119(e)하에 2004년 9월 23일에 출원된 US 가출원 번호 60/612,468 및 2005년 6월 30일에 출원된 US 가출원 번호 60/696,353을 우선권 주장하고, 이들은 각각 그 전문이 참고로 포함된다.

[0002] <발명의 분야>

[0003] 본 발명은 일반적으로, 반응성 시스테인 잔기로 조작된 항체에 관한 것이고, 보다 구체적으로는 치료적 또는 진단적 적용을 수반한 항체에 관한 것이다. 시스테인 조작된 항체는 화학요법 약물, 독소, 친화성 리간드, 예컨대 비오틴, 및 검출 표지, 예컨대 방사성동위원소 및 형광단과 접합시킬 수 있다. 본 발명은 또한, 포유동물 세포, 또는 관련된 병적 상태를 시험판내, 계내 또는 생체내에서 진단 또는 치료하기 위해 항체 및 항체-약물 접합체 화합물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0004] 분자 영상화는 신규 제약의 개발 및 평가에서 중요한 도구이다. 면역-양전자 방출 단층촬영 (이뮤노PET)은 모노클로날 항체 (mAb)가 높은 감수성의 PET를 높은 특이성의 mAb와 효율적으로 조합하는지 모노클로날 항체 (mAb)를 추적 및 정량하기 위해 최근에 빠르게 대두되고 있는 방법이다. 이뮤노PET는 "생체내 포괄적 면역조직 화학 염색" (문헌 [van Dongen GA, et al. "Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications" Oncologist 2007;12:1379-89])을 제공하는 비-침습성 진단을 위한 선택의 임상적 방법일 것으로 기대된다. 이뮤노PET는 양전자-방출 방사성동위원소가 표적 특이적 분자에 커플링될 것을 요구하므로, 분자의 생물학적 반감기를 방사성핵종의 반감기와 맞추는 것이 필수적이다 (문헌 [Verel I, et al. "The promise of immuno-PET in radioimmunotherapy" J Nucl Med 2005;46 Suppl 1:164S-71S]). 항체 (약 150 kDa)는 수일 내지 수주 범위의 혈장 반감기를 갖지만, 영상화는 전형적으로 각각 3.3일 및 4.2일의 반감기를 갖는  $^{89}\text{Zr}$  및  $^{124}\text{I}$ 와 같은 방사성동위원소의 사용에 따라 항체-기재 트레이서의 투여 2 내지 6일 후에 최대 표적-대-백그라운드 비를 제공한다. 불행하게도, 용이하게 이용가능한  $^{64}\text{Cu}$ 의 반감기 (12.7 h)는 이러한 시간 프레임에서 우수한 대비를 제공하기에 너무 짧다.

[0005] Mab 주형 (이뮤노-PET)으로부터 양전자 방출 단층촬영 (PET) 영상화제의 개발은 분자 표적의 국소화 및 정량을 위한 도구로서 제안되고, 병적 상태의 비-침습성 임상적 진단을 향상시킬 수 있다 (문헌 [van Dongen et al. (2007) Oncologist 12;1379-89]; [Williams et al. (2001) Cancer Biother Radiopharm 16:25-35]; [Holliger et al. (2005) Nat Biotechnol 23:1126-36]). PET는 질환의 검출을 위해 사용이 증가하고 있는 분자 영상화 기술이다. PET 영상화 시스템은 환자의 조직에서 양전자-방출 동위원소의 분포에 기초하여 영상을 생성한다. 동위원소는 전형적으로 체내에서 용이하게 대사 또는 국소화되는 분자 (예를 들어, 글루코스)에 공유 결합에 의해

부착된 양전자-방출 동위원소, 예컨대 F-18, C-11, N-13, 또는 O-15를 포함하거나 또는 체내에서 수용체 부위에 화학적으로 결합하는 프로브 분자의 주사에 의해 환자에게 투여된다. 일부 경우에, 동위원소는 이온성 용액으로서 또는 흡입에 의해 환자에게 투여된다. 작은 이뮤노-PET 영상화제, 예컨대 Fab 항체 단편 (50 kDa) 또는 디아바디 (Mab의 공유 결합에 의해 연결된 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 영역의 쌍을 이루지 않은 이량체, 55 kDa) (문헌 [Shively et al. (2007) J Nucl Med 48:170-2])은 이들이 짧은 순환 반감기, 높은 조직 투과성을 나타내고, 널리 이용가능한 <sup>18</sup>F (109.8 min)와 같은 짧은 반감기 동위원소의 사용을 용이하게 하는 주사 2 내지 4시간 후에 최적의 종양 대백그라운드 비에 도달하므로 특히 유용하다.

[0006]

아이오딘 124 (<sup>124</sup>I)를 항체 3F9에 커플링시키고, 이를 사용하여 신경모세포종의 방사선 면역요법의 위한 선량측정을 추정하였다 (문헌 [Larson SM, et al. "PET scanning of iodine-124-3F9 as an approach to tumor dosimetry during treatment planning for radioimmunotherapy in a child with neuroblastoma" J Nucl Med 1992;33:2020-3]). 이후에, 보다 정교해진 PET 계기 및 새로 대두되는 방사성아이오딘화를 위한 개선된 기술로서, <sup>124</sup>I를 다수의 이뮤노PET 연구에 사용하였다 (문헌 [Verel I, et al. "High-quality <sup>124</sup>I-labelled monoclonal antibodies for use as PET scouting agents prior to <sup>131</sup>I-radioimmunotherapy" European journal of nuclear medicine and molecular imaging 2004;31:1645-52]; [Lee FT et al. "Immuno-PET of human colon xenograft-bearing BALB/c nude mice using <sup>124</sup>I-CDR-grafted humanized A33 monoclonal antibody" J Nucl Med 2001;42:764-9]; [Sundaresan G, et al. "124I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice" J Nucl Med 2003;44:1962-9]; [Jain M and Batra SK. "Genetically engineered antibody fragments and PET imaging: a new era of radioimmunodiagnosis" J Nucl Med 2003;44:1970-2]; [Gonzalez Trotter DE et al. "Quantitation of small-animal (<sup>124</sup>I) activity distributions using a clinical PET/CT scanner" J Nucl Med 2004;45:1237-44]; [Robinson MK, et al. "Quantitative immuno-positron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody" Cancer Res 2005;65:1471-8]; [Jayson GC et al. "Molecular imaging and biological evaluation of HuMV833 anti-VEGF antibody: implications for trial design of antiangiogenic antibodies" J Natl Cancer Inst 2002;94:1484-93]; [Divgi CR, et al. "Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (<sup>124</sup>I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial" Lancet Oncol 2007;8:304-10]). mAb로의 <sup>124</sup>I의 커플링을 위해 이용가능한 비교적 간단한 방사성아이오딘화 기술에도 불구하고, 중요한 제한이 이 방사성핵종의 광범위한 전임상적 용도를 지연시킨다. 주목할만하게, 복합체 붕괴 방식은 작은 동물 마이크로PET의 해상도에 부정적인 영향을 미치는 강력한 양전자 ( $\beta^+$  max. 1.5 및 2.1 MeV)와 관련된다. 또한, 내재화된 아이오딘화 단백질은 표적 세포로부터 빠르게 제거되는 유리 아이오다이드로의 효소적 탈아이오딘화를 경험하여 실제 mAb 흡수를 반영하지 않는 PET 영상을 제공한다 (문헌 ["Perera RM et al. "Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody" Neoplasia (New York, N.Y 2007;9:1099-110)]). <sup>89</sup>Zr 붕괴 ( $\beta^+$  max. 897 keV)에서 방출된 양전자가 <sup>18</sup>F 및 <sup>11</sup>C (대략 1 mm)와 대등한 마이크로PET 해상도를 제공하므로 <sup>89</sup>Zr의 사용은 이를 단점을 극복한다. 또한, 내재화된 <sup>89</sup>Zr-mAb의 대사물은 리소ーム에서 세포내 포획되어, 실제 mAb 흡수의 PET 영상화와의 보다 양호한 상관관계를 제공한다 (문헌 [van Dongen GA, et al. "Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications" Oncologist 2007;12:1379-89]).

[0007]

표지, 예컨대 방사성동위원소, 형광 염료 또는 약물 모이어티를 항체에 부착시키는, 즉 공유결합을 통해 연결시키는 통상적인 수단은 일반적으로 표지 모이어티가 항체 상의 많은 부위에 부착되는 분자의 불균질 혼합물을 생성시킨다. 예를 들어, 세포독성 약물은 전형적으로 항체의 종종 수많은 리신 잔기를 통해 항체에 접합되어, 불균질 항체-약물 접합체 혼합물을 생성한다. 반응 조건에 따라, 불균질 혼합물은 전형적으로 0 내지 약 8개 이상의 부착된 약물 모이어티를 갖는 항체의 분포를 포함한다. 추가로, 약물 모이어티 대 항체의 특정 정수비를 갖는 접합체의 각각의 하위군 내에 약물 모이어티가 항체 상의 다양한 부위에 부착되는 잠재적으로 불균질 혼합물이 존재한다. 분석 및 제조 방법은 접합 반응으로부터 생성되는 불균질 혼합물 내에서 항체-약물 접합체 종분자를 분리하고 특성화하기에 부적당할 수 있다. 항체는 종종 많은 반응성 관능기를 갖는 크고 복잡하고 구조상 다양한 생체분자이다. 그의 링커 시약 및 약물-링커 중간체와의 반응성은 pH, 농도, 염 농도, 및 보조-용매

와 같은 인자에 의존성이다. 또한, 다단계 접합 과정은 반응 조건을 제어하고 반응물 및 중간체를 특성화하는 어려움 때문에 재현가능하지 않을 수 있다.

[0008] pH 7 부근에서 양성자첨가되고 덜 친핵성인 대부분의 아민과는 달리, 시스테인 티올은 중성 pH에서 반응성이다. 유리 티올 (RSH, 술프히드릴)기는 비교적 반응성이므로, 시스테인 잔기를 갖는 단백질은 종종 디술피드-연결된 올리고머로서 산화된 형태로 존재하거나, 내부에 가교된 디술피드기를 갖는다. 세포외 단백질은 일반적으로 유리 티올을 갖지 않는다 (문헌 [Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, at page 55]). 단백질 내의 유리 티올의 양은 표준 엘만 (Ellman) 분석에 의해 추정할 수 있다. 이뮤노글로불린 M은 디술피드-연결 오량체의 예이고, 이뮤노글로불린 G는 함께 서브유닛을 연결하는 내부 디술피드 브릿지를 갖는 단백질의 예이다. 이와 같은 단백질에서, 반응성 유리 티올을 생성시키기 위해 시약, 예컨대 디티오토레이톨 (DTT) 또는 셀레놀을 사용한 환원 (문헌 [Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-156])이 필요하다. 상기 방법은 항체 3차 구조 및 항원 결합 특이성을 손실시킬 수 있다.

[0009] 항체 시스테인 티올 기는 일반적으로 항체 아민 또는 히드록실 기보다 친전자성 접합 시약에 대해 더 반응성이고, 즉, 더 친핵성이다. 시스테인 잔기는 유전자 조작 기술에 의해 단백질 내로 도입되어, 리간드에 공유결합에 의한 부착을 형성하거나 새로운 분자내 디술피드 결합을 형성한다 (문헌 [Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 269(13):9644-9650]; [Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132]; [Greenwood et al. (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255]; [Tu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867]; [Kanno et al. (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214]; [Chmura et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484]; US 6248564). 그러나, 시스테인 아미노산에 대한 단백질의 다양한 아미노산 잔기의 돌연변이에 의한 시스테인 티올 기에서의 설계는, 특히 쌍을 이루지 않은 (유리 Cys) 잔기 또는 반응 또는 산화반응을 위해 비교적 접근가능한 것의 경우에 잠재적으로 문제가 된다. 이. 콜라이 (*E. coli*)의 주변세포질, 배양 상청액, 또는 부분적으로 또는 완전히 정제된 단백질 내에서든 단백질의 농축 용액에서든, 단백질의 표면 상의 쌍을 이루지 않은 Cys 잔기는 쌍을 이루고 산화되어 분자내 디술피드를 형성할 수 있고, 따라서 단백질 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있다. 디술피드 이량체 형성은 새로운 Cys가 약물, 리간드, 또는 다른 표지에의 접합에 대해 비반응성이 되도록 한다. 또한, 단백질이 새롭게 조작된 Cys와 존재하는 Cys 잔기 사이에서 분자내 디술피드 결합을 산화에 의해 형성하면, 두 Cys 기는 활성 부위 참여 및 상호작용에 이용가능하지 않다. 또한, 단백질은 미스폴딩 또는 3차 구조의 손실에 의해 불활성 또는 비-특이적으로 될 수 있다 (문헌 [Zhang et al. (2002) Anal. Biochem. 311:1-9]).

[0010] 부위 특이적 접합은 이것이 생물학적 활성의 완전한 보유를 촉진하고 첨가된 보결분자단의 가능한 수에 대한 제어를 허용하는, 결합 부위로부터 멀리 떨어진 부위의 화학적 변형을 가능하게 하므로 무작위 아미노 변형보다 바람직하다. 시스테인 조작된 항체는 Fab 항체 단편 (티오Fab)으로 설계되고, 전장, IgG 모노클로날 (티오Mab) 항체로 발현된다. US 7521541; 문헌 [Junutula JR et al. "Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs" J Immunol Methods 2008;332:41-52]; [Junutula JR et al. "Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index" (2008) Nat Biotechnol. 26:925-32] (그의 내용이 참고로 포함됨)을 참조한다. 티오Fab 및 티오Mab 항체는 새로 도입된 시스테인 티올에서 링커를 통해 티올-반응성 링커 시약 및 약물-링커 시약과 접합되어 항암 특성을 갖는 시스테인 조작된 항체 약물 접합체 (티오 ADC), 예를 들어 항-MUC16 (US 2008/0311134), 항-CD22 (US 2008/0050310), 항-ROBO4 (US 2008/0247951), 항-TENB2 (US 2009/0117100), 항-CD79B (US 2009/0028856; US 2009/0068202) 티오 ADC를 제조한다.

## 발명의 내용

[0011] <개요>

[0012] 본 발명의 화합물에는 모 항체의 하나 이상의 아미노산을 유리 시스테인 아미노산으로 대체시킨 시스테인 조작된 항체가 포함된다. 시스테인 조작된 항체는 티올 반응성 값이 0.6 내지 1.0인 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함한다. 유리 시스테인 아미노산은 모 항체로 조작되고 디술피드 브릿지의 일부가 아닌 시스테인 잔기이다.

[0013] 시스테인 조작된 항체는 암의 진단 및 치료에 유용할 수 있고, 세포 표면 및 막횡단 수용체, 및 종양-관련 항원 (TAA)에 특이적인 항체를 포함한다. 이러한 항체는 네이키드 (naked) 항체 (약물 또는 표지 모이어티에 접합되지 않은)로서 또는 항체-지르코늄 접합체 (AZC)로서 사용될 수 있다.

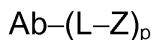
[0014] 시스테인 조작된 항체의 제조 및 스크리닝 방법의 실시양태는 모 항체가 항체 단편, 예를 들어 hu4D5Fabv8인 실시양태를 포함한다. 모 항체는 일부민 결합 펩티드 서열 (ABP)을 포함하는 융합 단백질일 수도 있다. 모 항체는 또한 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8 (트라스투주맙)로부터 선택된 인간화 항체일 수 있다.

[0015] 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 티올-반응성 시약과 부위-특이적으로 및 효율적으로 커플링될 수 있다. 티올-반응성 시약은 방사성동위원소 시약, 다관능성 링커 시약, 포획 표지 시약, 형광단 시약, 또는 약물-링커 중간체일 수 있다.

[0016] 시스테인 조작된 항체는 검출가능한 표지로 표지되고, 고상 지지체에 고정되고/되거나 약물 모이아티와 접합될 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 측면은 유리 시스테인 아미노산을 통해 링커 (L) 및 지르코늄 복합체 (Z)에 접합된 시스테인 조작된 항체 (Ab)를 포함하는, 하기 화학식 I을 갖는 지르코늄-표지된, 시스테인 조작된 항체이다.

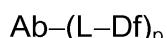
[0018] <화학식 I>



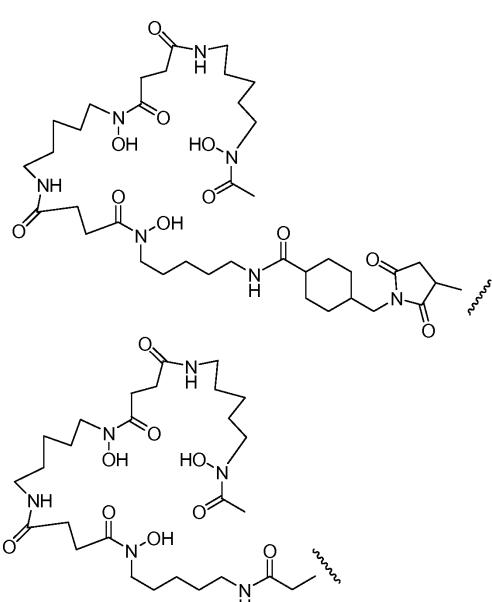
[0021] (상기 식에서, p는 1 내지 4임)

[0022] 본 발명의 또 다른 측면은 유리 시스테인 아미노산을 통해 링커 (L) 및 데스페리옥사민 모이아티 (Df)에 접합된 시스테인 조작된 항체 (Ab)를 포함하는, 하기 화학식 II를 갖는 데스페리옥사민-표지된, 시스테인 조작된 항체이다.

[0023] <화학식 II>



[0025] (상기 식에서, L-Df는



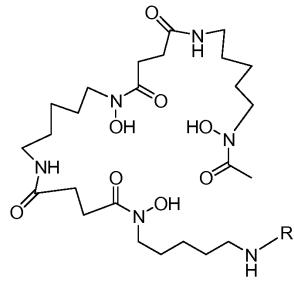
[0026]로부터 선택되고,

[0027] 여기서 파선은 항체 (Ab)에 대한 부착을 나타내고;

[0028] p는 1 내지 4임)

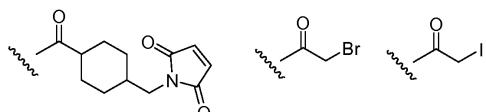
[0029]

본 발명의 또 다른 측면은 하기 구조로부터 선택된 테스페리옥사민-표지 시약이다.



[0030]

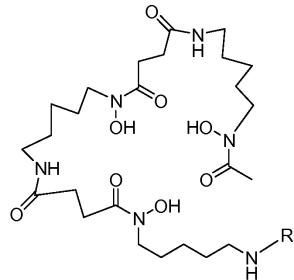
(상기 식에서, R은



로부터 선택됨)

[0032]

본 발명의 또 다른 측면은 하기 구조로부터 선택된 조성물을 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 갖는 시스테인 조작된 항체 (Ab)와 반응시켜 테스페리옥사민-표지된, 시스테인 조작된 항체를 형성하는 것을 포함하는,



[0034]

(상기 식에서, R은



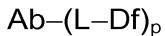
로부터 선택됨)

[0036]

유리 시스테인 아미노산을 통해 링커 (L) 및 테스페리옥사민 모이어티 (Df)에 접합된 시스테인 조작된 항체 (Ab)를 포함하는, 하기 화학식 II를 갖는 테스페리옥사민-표지된, 시스테인 조작된 항체의 제조 방법이다.

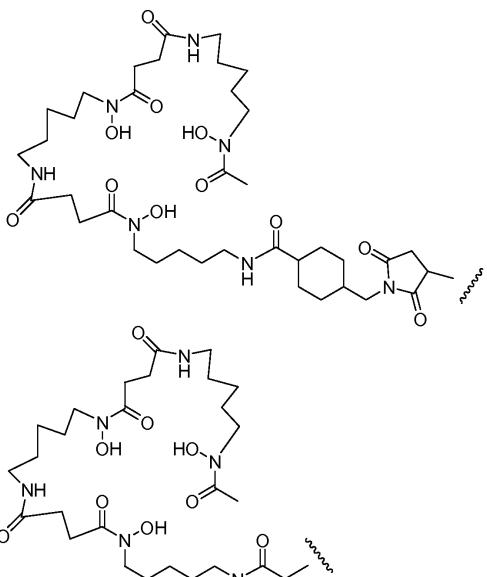
[0037]

<화학식 II>



[0039]

(상기 식에서, L-Df는



[0041]로부터 선택되고,

[0042] 여기서 파선은 항체 (Ab)에 대한 부착을 나타내고;

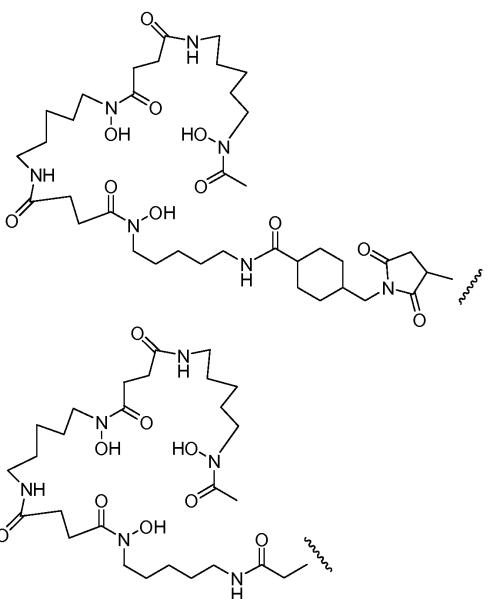
[0043] p는 1 내지 4임)

[0044] 본 발명의 또 다른 측면은 유리 시스테인 아미노산을 통해 링커 (L) 및 데스페리옥사민 모이어티 (Df)에 접합된 시스테인 조작된 항체 (Ab)를 포함하는, 하기 화학식 II를 갖는 데스페리옥사민-표지된, 시스테인 조작된 항체와 지르코늄 시약을 복합체화시켜 데스페리옥사민-표지된, 시스테인 조작된 항체를 형성하는 것을 포함하는,

[0045] <화학식 II>

[0046]  $\text{Ab}-(\text{L}-\text{Df})_p$

[0047] (상기 식에서, L-Df는



[0048]로부터 선택되고:

[0049] 여기서 파선은 항체 (Ab)에 대한 부착을 나타내고;

[0050] p는 1 내지 4임)

[0051] 유리 시스테인 아미노산을 통해 링커 (L) 및 지르코늄 복합체 (Z)에 접합된 시스테인 조작된 항체 (Ab)를 포함하는, 하기 화학식 I을 갖는 지르코늄-표지된, 시스테인 조작된 항체의 제조 방법이다.

[0052] <화학식 I>

$\text{Ab}-(\text{L}-\text{Z})_p$

[0053] (상기 식에서, p는 1 내지 4임)

[0055] 본 발명의 또 다른 측면은

[0056] 지르코늄-표지된, 시스테인 조작된 항체를 동물에게 투여하는 것; 및

[0057] 지르코늄-표지된, 시스테인 조작된 항체의 존재를 영상화에 의해 생체내에서 검출하는 것

[0058] 을 포함하며, 여기서 지르코늄-표지된, 시스테인 조작된 항체는 링커 (L)을 통해 하나 이상의 지르코늄 복합체 (Z)와 접합된 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 갖는 시스테인 조작된 항체 (Ab)를 포함하고 하기 화학식 I을 갖는 것인, 영상화 방법이다.

[0059] <화학식 I>

$\text{Ab}-(\text{L}-\text{Z})_p$

[0061] (여기서, p는 1 내지 4임)

[0062] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 개시된 화합물 및 조성물에 대한 진단 용도를 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

[0063] 도 1a는 X선 결정 좌표에 의해 유래된 hu4D5Fabv7 항체 단편의 3차원 표현을 보여준다. 중쇄 및 경쇄의 예시적인 조작된 Cys 잔기의 구조 위치가 넘버링된다 (순차적 넘버링 시스템에 따름).

도 1b는 4D5v7fabH에 대한 카바트 넘버링 방식 (하부 열)과 비교한 N-말단에서 시작하는 순차적 넘버링 방식 (상부 열)을 보여준다. 카바트 넘버링은 a, b, c에 의해 언급된다.

도 2a 및 2b는 hu4D5Fabv8 및 hu4D5Fabv8 Cys 돌연변이체 (티오Fab) 파지 변이체의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 결합 측정을 보여준다: (a) 비-비오티닐화된 파지-hu4D5Fabv8 및 (b) 비오티닐화된 파지-hu4D5Fabv8 (b) (BSA (개방 막대), HER2 (줄무늬 막대) 또는 스트렙타비딘 (충전된 막대)과의 상호작용에 대한 PHESELECTOR 검정에 의함).

도 3a 및 3b는 hu4D5Fabv8 (좌측) 및 hu4D5Fabv8 Cys 돌연변이체 (티오Fab) 변이체의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 결합 측정을 보여준다: (a) 비-비오티닐화된 파지-hu4D5Fabv8 및 (b) 비오티닐화된 파지-hu4D5Fabv8 (BSA (개방 막대), HER2 (줄무늬 막대) 및 스트렙타비딘 (충전된 막대)과의 상호작용에 대한 PHESELECTOR 검정에 의함). 경쇄 변이체는 좌측 상에 있고, 중쇄 변이체는 우측 상에 있다. 티올 반응성 = 스트렙타비딘 결합에 대한  $OD_{450 \text{ nm}} \div HER2$  (항체) 결합에 대한  $OD_{450 \text{ nm}}$ .

도 4a는 야생형 hu4D5Fabv8에 대한 잔기의 분획별 표면 접근성 값을 보여준다. 경쇄 부위는 좌측 상에 있고, 중쇄 부위는 우측 상에 있다.

도 4b는 HER2 (제2일), 스트렙타비딘 (SA) (제2일), HER2 (제4일), 및 SA (제4일)와의 상호작용에 대한, 비오티닐화된 hu4D5Fabv8 (좌측) 및 hu4D5Fabv8 Cys 돌연변이체 (티오Fab) 변이체의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 결합 측정을 보여준다. 파지-hu4D5Fabv8 Cys 변이체는 단리되고, 4°C에서 저장된다. 비오틴 접합은 실시예 2에 기재된 바와 같이 Her2 및 스트렙타비딘과의 이들의 상호작용을 모니터링하고, 조작된 티오Fab 변이체 상의 반응성 티올 기의 안정성을 프로빙하기 위해 PHESELECTOR 검정후 제2일 또는 제4일에 수행된다.

도 5는 스트렙타비딘 및 HER2에 대한 결합에 대한, 비오틴-말레이미드 접합된-hu4D5Fabv8 (A121C) 및 비-비오티닐화된 야생형 hu4D5Fabv8의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 결합 측정을 보여준다. 각각의 Fab을 2 ng 및 20 ng에서 시험하였다.

도 6은 토끼 알부민, 스트렙타비딘 (SA), 및 HER2와의 결합에 대한, 비오티닐화된 ABP-hu4D5Fabv8 야생형 (wt), 및 ABP-hu4D5Fabv8 시스테인 돌연변이체 V110C 및 A121C의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 ELISA 분석을 보여준다.

도 7은 토끼 알부민, HER2 및 스트렙타비딘 (SA)과의 결합, 및 Fab-HRP 또는 SA-HRP로의 프로빙에 대한, 비오티닐화된 ABP-hu4D5Fabv8 시스테인 돌연변이체 (티오Fab 변이체): (좌측으로부터 우측으로) 단일 Cys 변이체 ABP-V110C, ABP-A121C, 및 이중 Cys 변이체 ABP-V110C-A88C 및 ABP-V110C-A121C의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 ELISA 분석을 보여준다.

도 8은 HER2 (상부) 및 스트렙타비딘 (하부)에 대한 비오티닐화된 티오Fab 과지 및 항-과지 HRP 항체의 결합을 보여준다.

도 13a는 흡광도 검출을 위한 HRP 표지된 2차 항체의 결합으로 고정된 HER2에 대한 비오티닐화된 항체의 카툰 도면을 보여준다.

도 13b는 고정된 HER2에 대한 결합에서 비오틴-말레이미드 접합된 티오-트라스투주맙 변이체 및 비-비오티닐화된 야생형 트라스투주맙의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 결합 측정을 보여준다. 좌측으로부터 우측으로: V110C (단일 Cys), A121C (단일 Cys), V110C/A121C (이중 Cys), 및 트라스투주맙. 각각의 티오 IgG 변이체 및 트라스투주맙을 1, 10, 및 100 ng에서 시험하였다.

도 14a는 흡광도 검출을 위한 항-IgG-HRP에 대한 비오틴의 결합으로 고정된 HER2에 대한 비오티닐화된 항체 결합의 카툰 도면을 보여준다.

도 14b는 고정된 스트렙타비딘에 대한 결합에서 비오틴-말레이미드 접합된 티오 트라스투주맙 변이체 및 비-비오티닐화된 야생형 트라스투주맙의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 결합 측정을 보여준다. 좌측으로부터 우측으로: V110C (단일 Cys), A121C (단일 Cys), V110C/A121C (이중 Cys), 및 트라스투주맙. 각각의 티오 IgG 변이체 및 트라스투주맙을 1, 10, 및 100 ng에서 시험하였다.

도 15는 접합을 위한 세포 배양으로부터 발현된 시스테인 조작된 항체 (티오Mab)를 제조하기 위한 일반적인 방법을 보여준다.

도 16은 고정된 단백질 A 상에서의 정제 후에 2H9 티오Mab Fc 변이체 (좌측으로부터 우측으로, 레인 1-9): A339C; S337C; S324C; A287C; V284C; V282C; V279C; V273C, 및 2H9 야생형의 비-환원 (상부) 및 환원 (하부) 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 분석을 보여준다. 우측 상의 레인은 크기 마커 래더로, 무손상 단백질이 약 150 kDa이고, 중쇄 단편이 약 50 kDa이고, 경쇄 단편이 약 25 kDa임을 나타낸다.

도 17a는 고정된 단백질 A 상에서의 정제 후에 2H9 티오Mab 변이체 (좌측으로부터 우측으로, 레인 1-4): L-V15C; S179C; S375C; S400C의 비-환원 (좌측) 및 환원 (+DTT) (우측) 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 분석을 보여준다.

도 17b는 고정된 단백질 A 상에서의 정제 후에 2H9 및 3A5 티오Mab 변이체의 비-환원 (좌측) 및 환원 (+DTT) (우측) 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 분석을 보여준다.

도 18은 비오티닐화된 티오-IgG 변이체의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 2H9 및 3A5 티오Mab 변이체를 환원된 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 상에서 분석하고, 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 항체 및 접합된 비오틴의 존재는 각각 항-IgG-HRP (상부) 및 스트렙타비딘-HRP (하부)로 프로빙하였다. 레인 1: 3A5 H-A121C. 레인 2: 3A5 L-V110C. 레인 3: 2H9 H-A121C. 레인 4: 2H9 L-V110C. 레인 5: 2H9 야생형.

도 19는 항-IgG-HRP로의 프로빙 및 (상부 막대 다이아그램)의 450 nm에서의 흡광도의 측정에 의한 스트렙타비딘에 대한 비오티닐화된 2H9 변이체의 결합에 대한 ELISA 분석을 보여준다. 하부 개략적 다이아그램은 ELISA 분석에 사용된 실험 설계를 도시한다.

도 20은 아미노 반응성 링커, TFP-N-SucDf 및 Df-Bz-NCS (중앙) 및 티올 반응성 링커, Df-Chx-Mal, Df-Bac, 및 Df-Iac (하부)를 사용하는 <sup>89</sup>Zr 데스페리옥사민 B (Df, 상부)의 단백질과의 커플링 킬레이터를 위한 이관능성 시약을 보여준다.

도 21은 Df-Chx-Mal, Df-Bac, Df-Iac의 제조 및 Fab의 중쇄로 혼입된 Cys 잔기를 통한 티오-트라스투주맙에 대한 접합을 보여준다. 반응 조건: i. DIEA, DMF/H<sub>2</sub>O (10:1), RT, 0.5-1 h; ii. DIEA, DMF, 0°C, 4 h; iii. pH 7.5, RT, 1 h; iv. pH 9, RT, 5 h; v. pH 9, RT, 2 h.

도 22는 데스페리옥사민-표지된, 시스테인 조작된 항체, 예컨대 4개의 링커: N-Suc, Bz-SCN, Chx-말레이미드 (CHx-Mal), 또는 아세틸 (Ac)을 함유하는 Df-링커-트라스투주맙의 변이체를 사용한 지르코늄-89 옥살레이트의

킬레이트화를 보여준다.

도 23은 경쇄 및 중쇄로부터의 개별 신호를 보여주는 환원된 항체의 질량 분광측정 분석을 보여준다. A: 티오-트라스투주맙, B: Df-Ac-티오-트라스투주맙 (Df-Bac 사용), 및 C: Df-Ac-티오-트라스투주맙 (Df-Iac 사용), 및 D: Df-Chx-Mal-티오-트라스투주맙.

도 24는 37°C에서 마우스 혈청 ( $n = 3$ )에서의  $^{89}\text{Zr}$ -Chx-Mal-티오-트라스투주맙 (개방 원형) 및  $^{89}\text{Zr}$ -Df-Ac-티오-트라스투주맙 (충전된 원형)의 안정성을 보여준다.

도 25는 4개의 상이한 링커 (Bz-SCN, N-Suc, Chx-Mal, 및 Ac)를 사용하여 제조된 100  $\mu\text{Ci}$ 의  $^{89}\text{Zr}$ -트라스투주맙의 꼬리 정맥 볼루스 주사 96시간 후에 수득한 대표적인 플-바디 영상 (최대 강도 투사)을 보여준다.

도 26은 PET에 의해 측정된 주사 24, 96 및 144 h 후에 선택된 조직에서의 생체내 흡수를 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064]

<예시적인 실시양태의 상세한 설명>

[0065]

이하, 본 발명의 특정 실시양태를 상세하게 언급할 것이고, 그의 예를 첨부하는 구조식 및 화학식으로 예시한다. 본 발명이 열거된 실시양태와 관련하여 기재되지만, 본 발명을 이러한 실시양태로 제한하려는 의도가 아님을 이해할 것이다. 반대로, 본 발명은 청구항에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 등가물을 포함하는 것으로 의도된다.

[0067]

당업자는 본 발명의 실시에 사용될 수 있는, 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 여러 방법 및 재료를 인식 할 것이다. 본 발명은 어떠한 방식으로도 본원에 기재된 방법 및 재료로 제한되지 않는다.

[0068]

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술적 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야에서 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖고, 다음 문헌과 부합된다: 문헌 [Singleton et al. (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY]; 및 [Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York].

[0069]

정의

[0070]

달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 하기 용어 및 어구는 하기 의미를 갖는 것으로 의도된다.

[0071]

본원에서 상표명이 사용되는 경우, 본 출원인은 상표명의 시판 제제, 일반적 약물 및 상표명 제품의 활성 제약 성분(들)을 독립적으로 포함하고자 한다.

[0072]

본원에서의 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 이량체, 다량체, 다중특이적 항체 (예를 들어 이중특이적 항체), 및 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편이 포함된다 (문헌 [Miller et al. (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861]). 항체는 뮤린, 인간, 인간화, 키메라 항체일 수 있거나, 또는 다른 종으로부터 유래된 것일 수도 있다. 항체는 특정 항원을 인식하고 이와 결합할 수 있는, 면역계에 의해 생성되는 단백질이다 (문헌 [Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York]). 표적 항원은 일반적으로 여러 항체 상의 CDR에 의해 인식되는, 에피토프라 불리기도 하는 다수의 결합 부위를 갖는다. 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 각 항체는 상이한 구조를 갖는다. 따라서, 하나의 항원은 하나 초과의 상응하는 항체를 가질 수 있다. 항체는 전장 이뮤노글로불린 분자 또는 전장 이뮤노글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 관심 표적 항원 (이러한 표적은 암 세포, 또는 자가면역 질환과 관련이 있는 자가면역 항체를 생성하는 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않음) 또는 그의 일부와 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 본원에 개시된 이뮤노글로불린은 이뮤노글로불린 분자의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA), 클래스 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스 중 어느 것일 수 있다. 이뮤노글로불린은 임의의 종으로부터 유도될 수 있다. 그러나, 한 측면에서, 이뮤노글로불린은 인간, 뮤린 또는 토끼 기원의 이뮤노글로불린이다.

[0073]

"항체 단편"은 전장 항체의 일부, 일반적으로는 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 미니바디 (문헌 [Olaussen et al. (2004) Protein Eng.

Design & Sel. 17(4):315-323]), Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-이디오타입 (항-Id) 항체, CDR (상보성 결정 영역), 및 암 세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원에 면역특이적으로 결합하는 상기 중 임의의 것의 에피토프-결합 단편, 단일-쇄 항체 분자, 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0074] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉, 이러한 집단을 포함하는 개개의 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되며 고도로 특이적이다. 추가로, 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단결정자에 대해 지시된다. 이러한 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 이들이 다른 항체에 의해 오염되지 않는 상태로 합성될 수 있다는 점에서 유익하다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징을 실질적으로 동종인 항체들의 집단으로부터 수득하였다는 것으로 표시하고, 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생성이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용될 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al. (1975) Nature 256:495]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어: US 4816567; US 5807715 참조)에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한, 예를 들어 문헌 [Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628]; [Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597]에 기재된 기술을 사용하여 파아지 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0075] 본원에서의 모노클로날 항체에는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇄(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 뿐만 아니라 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 그의 단편이 포함된다 (US 4816567; 및 문헌 [Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855]). 본원에서 관심 키메라 항체에는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체가 포함된다.

[0076] 본원에서의 "무손상 항체"는 VL 및 VH 도메인 및 또한 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 무손상 항체는 항체의 Fc 불변 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에서 기인하는 생물학적 활성을 지칭하는 하나 이상의 "이펙터 기능"을 가질 수 있다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합; 보체-의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 및 세포 표면 수용체, 예컨대 B 세포 수용체 및 BCR의 하향 조절을 포함한다.

[0077] 무손상 항체는 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 상이한 "클래스"로 배정될 수 있다. 5가지 주요 클래스의 무손상 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이중 몇 가지는 "서브클래스" (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2로 추가로 나뉠 수 있다. 상이한 클래스의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 라고 불린다. 상이한 클래스의 이谬노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 잘 공지되어 있다. Ig 형태는 헌지-변형 또는 헌지없는 형태를 포함한다 (문헌 [Roux et al. (1998) J. Immunol. 161:4083-4090]; [Lund et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256]; US 2005/0048572; US 2004/0229310).

[0078] "ErbB 수용체"는 그 구성원이 세포 성장, 분화 및 생존에 중요한 ErbB 수용체 부류에 속하는 수용체 단백질이다. ErbB 수용체 부류는 표피 성장 인자 수용체 (EGFR, ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 또는 p185neu), HER3 (ErbB3) 및 HER4 (ErbB4 또는 tyro2)를 포함하는 4가지 고유한 구성원을 포함한다. 항-ErbB2 항체의 패널은 인간 유방 종양 세포주 SKBR3을 사용하여 특성화된다 (문헌 [Hudziak et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172]). 최대 억제는 세포 증식을 56% 억제하는 4D5로 불리는 항체로 수득하였다. 패널 내의 다른 항체는 상기 검정보다 더 낮은 수준으로 세포 증식을 감소시켰다. 항체 4D5는 ErbB2 과다발현 유방 종양 세포주를 TNF- $\alpha$  (US 5677171)의 세포독성 효과에 대해 감수성으로 만드는 것으로 추가로 밝혀졌다. 문헌 [Hudziak et al.]에서 논의된 항-ErbB2 항체는 문헌 [Fendly et al. (1990) Cancer Research 50:1550-1558]; [Kottts et al. (1990) In Vitro 26(3):59A]; [Sarup et al. (1991) Growth Regulation 1:72-82]; [Shepard et al. J. (1991) Clin. Immunol. 11(3):117-127]; [Kumar et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986]; [Lewis et al. (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263]; [Pietras et al. (1994) Oncogene 9:1829-1838]; [Vitetta et al. (1994) Cancer Research 54:5301-5309]; [Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665]; [Scott et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:14300-5]; [D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:7202-7206]; [Lewis et al. (1996) Cancer Research 56:1457-1465]; 및 [Schaefer et

a1. (1997) Oncogene 15:1385-1394]에서 추가로 특성화된다.

[0079] ErbB 수용체는 일반적으로 ErbB 리간드와 결합할 수 있는 세포외 도메인, 친유성 막횡단 도메인, 보존된 세포내 티로신 키나제 도메인, 및 인산화될 수 있는 여러개의 티로신 잔기를 함유하는 카르복실-말단 신호전달 도메인을 포함할 것이다. ErbB 수용체는 "천연 서열" ErbB 수용체 또는 그의 "아미노산 서열 변이체"일 수 있다. 바람직하게는, ErbB 수용체는 천연 서열 인간 ErbB 수용체이다. 따라서, "ErbB 수용체 부류의 구성원"은 EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4, 또는 현재 공지되어 있거나 향후 확인될 임의의 다른 ErbB 수용체이다.

[0080] 용어 "ErbB1", "표피 성장 인자 수용체", "EGFR" 및 "HER1"은 본원에서 교환가능하게 사용되고, 예를 들어 문헌 [Carpenter et al. (1987) Ann. Rev. Biochem., 56:881-914]에 개시된 바와 같은 EGFR (그의 자연 발생 돌연변이체 형태 포함 (예를 들어, 문헌 [Humphrey et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:4207-4211]에서의 결실 돌연변이체 EGFR))을 나타낸다. 용어 erbB1은 EGFR 단백질 생성물을 코딩하는 유전자를 나타낸다. HER1에 대한 항체는 문헌 [Murthy et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 252:549-560] 및 WO 95/25167에 기재되어 있다.

[0081] 용어 "ERRP", "EGF-수용체 관련 단백질", "EGFR 관련 단백질" 및 "표피 성장 인자 수용체 관련 단백질"은 본원에서 교환가능하게 사용되고, 예를 들어 US 6399743 및 US 출원 번호 2003/0096373에 개시된 바와 같은 ERRP를 나타낸다.

[0082] 표현 "ErbB2" 및 "HER2"는 본원에서 교환가능하게 사용되고, 예를 들어 문헌 [Semba et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:6497-6501] 및 [Yamamoto et al. (1986) Nature, 319:230-234]에 기재된 바와 같은 인간 HER2 단백질 (진뱅크(Genbank) 등록 번호 X03363)을 나타낸다. 용어 "erbB2"는 인간 ErbB2를 코딩하는 유전자를 나타내고, "neu"는 래트 p185neu를 코딩하는 유전자를 나타낸다. 바람직한 ErbB2는 천연 서열 인간 ErbB2이다.

[0083] "ErbB3" 및 "HER3"은 예를 들어 U.S. 특허 번호 5183884 및 5480968 뿐만 아니라 문헌 [Kraus et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:9193-9197]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드를 나타낸다. ErbB3에 대한 항체는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 U.S. 특허 번호 5183884, 5480968 및 WO 97/35885에 개시된다.

[0084] 본원에서 용어 "ErbB4" 및 "HER4"는 예를 들어 EP 특허 출원 번호 599,274; 문헌 [Plowman et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1746-1750]; 및 [Plowman et al. (1993) Nature 366:473-475]에 개시된 바와 같은 수용체 폴리펩티드 (예를 들어 WO 99/19488에 개시된 바와 같은 그의 이소형 포함)를 나타낸다. HER4에 대한 항체는 예를 들어 WO 02/18444에 기재된다.

[0085] ErbB 수용체에 대한 항체는 예를 들어 산타 크루즈 바이오테크놀로지, 인크.(Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (미국 캘리포니아주)를 포함하는 다수의 공급원으로부터 상업적으로 입수가능하다.

[0086] 용어 "아미노산 서열 변이체"는 천연 서열 폴리펩티드와 어느 정도 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 나타낸다. 통상적으로, 아미노산 서열 변이체는 천연 ErbB 리간드의 적어도 하나의 수용체 결합 도메인 또는 천연 ErbB 수용체의 적어도 하나의 리간드 결합 도메인과의 서열 동일성이 적어도 약 70%일 것이고, 바람직하게는 이들은 상기 수용체 또는 리간드 결합 도메인과의 서열 상동성이 적어도 약 80%이며, 보다 바람직하게는 적어도 약 90%일 것이다. 아미노산 서열 변이체는 천연 아미노산 서열의 아미노산 서열내의 특정 위치에서 치환, 결실, 및/또는 삽입을 보유한다. 아미노산은 통상의 명칭, 1-문자 코드 및 3-문자 코드에 의해 표시된다.

[0087] "서열 동일성"은 아미노산 서열 변이체에서 최대 퍼센트의 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬시키고 필요하다면 갱을 도입한 후 동일한 잔기의 백분율로서 정의된다. 이러한 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이러한 컴퓨터 프로그램의 하나는 "Align 2" (저자: 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.), 1991년 12월 10일 미국 저작권청(United States Copyright Office; 미국 DC 20559 워싱턴주)에 사용자 문서와 함께 제출됨)이다.

[0088] "항체-의존성 세포-매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구, 및 대식 세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식한 다음, 연속해서 이러한 표적 세포의 용해를 유발시키는 세포-매개성 반응을 나타낸다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γRII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γRI, Fc γRII 및 Fc γRIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, (1991) "Annu. Rev. Immunol." 9:457-92]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, US 5500362 및 US 5821337에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이팩터 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포

함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성을 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. (1998) PROC. NAT. ACAD. SCI. (USA) (USA) 95:652-656]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0089] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 불변 영역 수용체 (FcR)를 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γRIII을 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 자연 살해 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 그의 천연 공급원, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 혈액 또는 PBMC로부터 단리할 수 있다.

[0090] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 불변 영역에 결합하는 수용체를 기술하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 추가로, 바람직한 FcR은 IgG 항체에 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, Fc γRI, Fc γRII 및 Fc γRIII 서브클래스의 수용체를 포함하며, 이들은 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γRII 수용체는 Fc γRIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γRIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 주로 세포질 도메인에서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γRIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γRIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (문헌 [M. in Daeron, "Annu. Rev. Immunol." 15:203-234 (1997)]의 검토 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, "Annu. Rev. Immunol.", 9:457-92 (1991)]; [Capel et al. (1994) Immunomethods 4:25-34]; 및 [de Haas et al. (1995) J. Lab. Clin. Med. 126:330-41]에서 검토된다. 추후로 확인될 것을 포함하는 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 또한, 모 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체, FcRn을 포함한다 (문헌 [Guyer et al. (1976) J. Immunol., 117:587] 및 [Kim et al. (1994) J. Immunol. 24:249]).

[0091] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적을 용해시키는 분자의 능력을 나타낸다. 보체 활성화 경로는 동족 항원과 복합체화한 분자 (예를 들어, 항체)에 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)이 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al. J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0092] "천연 항체"는 일반적으로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 디슬피드 공유 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디슬피드 연결부의 수는 상이한 이谬노글로불린 이소형의 중쇄마다 달라진다. 또한, 각각의 중쇄 및 경쇄는 일정하게 이격된 쇄내 디슬피드 브릿지를 갖는다. 각각의 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 ( $V_H$ )을 갖고, 그 뒤에는 수많은 불변 도메인이 존재한다. 각 경쇄는 한 말단에 가변 도메인 ( $V_L$ )을 갖고, 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인에 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인에 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 인터페이스를 형성한다고 여겨진다.

[0093] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체마다 서열에서 광범위하게 상이하고 각각의 특정 항체의 그의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성과 관련하여 사용된다는 사실을 나타낸다. 그러나, 가변성이 항체 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 이는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 둘 다 내에 초가변 영역이라 불리우는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 3개의 초가변 영역에 의해 연결되고 주로 β-시트 형태를 취하는 4개의 FR을 각각 포함하며, 이를 초가변 영역은 상기 β-시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 쇄 내의 초가변 영역은 이러한 FR에 의해 아주 근접하게 룩여 있고, 다른 쇄로부터의 초가변 영역은 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존적 세포 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체의 참여를 나타낸다.

[0094] 용어 "초가변 영역"이 본원에서 사용되는 경우, 이것은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 나타낸다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보적 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); [Kabat et al. 상기 문헌]) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); 문헌 [Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917])를 포함한다. "프레임워크 영역"

또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0095] 항체를 파파인으로 소화시키면 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편 (각각 단일 항원-결합 부위를 가짐) 및 나머지 "Fc" 단편 (이러한 명칭은 쉽게 결정화되는 능력을 반영함)이 생성된다. 파파인 처리를 통해 2개의 항원-결합 부위를 갖는  $F(ab')_2$  단편을 얻을 수 있고, 또한, 항원을 가교결합시킬 수 있다.

[0096] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 긴밀하게 비-공유 결합에 의해 관련된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 이러한 형태에서는 각 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여  $V_H-V_L$  이량체 표면상의 항원-결합 부위를 한정한다. 짐합적으로, 6 개의 초가변 영역은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 초가변 영역을 단지 3개만 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮긴 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖고 있다.

[0097] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 헌자 영 역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 적어도 하나의 유리 티올 기를 갖는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다.  $F(ab')_2$  항체 단편은 원래 Fab' 단편들 사이에 헌자 시스테인을 갖는, Fab' 단편들의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0098] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 2가지 명백한 별개 유형 (카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ )로 지칭됨) 중의 하나로 지정될 수 있다.

[0099] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 쇄 내에 존재하는, 항체의  $V_H$  및  $V_L$  도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 하는, VH 및 VL 도 메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다. 항-ErbB2 항체 scFv 단편은 WO 93/16185; US 특허 번호 5571894; 및 5587458에 기재된다.

[0100] 용어 "디아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 지칭하는데, 이를 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄 내에 가변 경쇄 도메인 (VL)과 연결된 가변 중쇄 도메인 (VH)을 포함한다 (VH - VL). 동일 쇄 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 또 다른 쇄의 상 보적 도메인과 쌍을 이루게 되어 2개의 항원-결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는, 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448]에 보다 상세히 기재된다.

[0101] 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함 유하는 키메라 항체이다. 인간화는 뮤린 항원 결합 정보를 비-면역발생 인간 항체 수용체에 전달하는 방법이고, 다수의 치료상 유용한 약물을 생성한다. 인간화 방법은 일반적으로 모든 6개의 뮤린 상보성 결정 영 역 (CDR)을 인간 항체 프레임워크로 전달하여 시작된다 (문헌 [Jones et al., (1986) Nature 321:522-525]). 이를 CDR-그래프팅된 항체는 일반적으로 항원 결합에 대한 이들의 본래 친화도를 유지하지 않고, 실제로 친화도는 종종 심각하게 손상되기도 한다. CDR 이외에, 선택 비-인간 항체 프레임워크 잔기가 또한 적절한 CDR 형태를 유지하기 위해 혼입되어야 한다 (문헌 [Chothia et al. (1989) Nature 342:877]). 그래프팅된 CDR의 구조 적 형태를 지지하기 위한 핵심적인 마우스 프레임워크 잔기의 인간 수용자로의 전달이 항원 결합 및 친화도를 회복시키는 것으로 나타났다 (문헌 [Riechmann et al. (1992) J. Mol. Biol. 224, 487-499]; [Foote and Winter, (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499]; [Presta et al. (1993) J. Immunol. 151, 2623-2632]; [Werther et al. (1996) J. Immunol. Methods 157:4986-4995]; 및 [Presta et al. (2001) Thromb. Haemost. 85:379-389]). 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 바람직한 특이성, 친화성 및 능력을 보 유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 치 환된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔 기를 상응하는 비인간 잔기로 대체한다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되게 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간

이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세한 내용은 US 6407213; 문헌 [Jones et al. (1986) Nature, 321:522-525]; [Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329]; 및 [Presta, (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596]을 참조한다.

[0102] "유리 시스테인 아미노산"은 모 항체 대로 조작되고, 티올 관능기 (-SH)를 갖고, 분자내 또는 분자간 디솔피드 다리로서 쌍을 이루지 않는 시스테인 아미노산 잔기를 의미한다.

[0103] 용어 "티올 반응성 값"은 유리 시스테인 아미노산의 반응성에 대한 정량적 특성이다. 티올 반응성 값은 티올-반응성 시약과 반응하는, 시스테인 조작된 항체 내의 유리 시스테인 아미노산의 비율이고, 최대 1의 값으로 전환된다. 예를 들어, 100% 수율로 티올-반응성 시약, 예를 들어 비오틴-말레이미드 시약과 반응하여 비오틴-표지된 항체를 형성하는, 시스테인 조작된 항체 상의 유리 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 1.0이다. 80% 수율로 티올-반응성 시약과 반응하는, 동일한 또는 상이한 모 항체로 조작된 다른 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0.8이다. 티올-반응성 시약과 전혀 반응하지 못하는, 동일한 또는 상이한 모 항체로 조작된 다른 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0이다. 특정 시스테인의 티올 반응성 값 결정은 ELISA 검정, 질량 분광분석법, 액체 크로마토그래피, 오토라디오그래피, 또는 다른 정량적 분석 시험에 의해 수행할 수 있다.

[0104] "모 항체"는 그로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 하나 이상의 시스테인 잔기로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 모 항체는 천연 또는 야생형 서열을 포함할 수 있다. 모 항체는 다른 천연, 야생형, 또는 변형된 형태의 항체에 비해 이미 존재하는 아미노산 서열 변형 (예를 들어, 부가, 결실 및/또는 치환)을 가질 수 있다. 모 항체는 관심 표적 항원, 예를 들어 생물학상 중요한 폴리펩티드에 대해 작용할 수 있다. 또한, 비폴리펩티드 항원 (예를 들어, 종양-관련 당지질 항원; US 5091178 참조)에 대해 작용하는 항체도 고려된다.

[0105] 예시적인 모 항체는 세포 표면 및 막횡단 수용체에 대한 친화도 및 선택성을 갖는 항체 및 종양-관련 항원 (TAA)을 포함한다.

[0106] 다른 예시적인 모 항체는 비제한적으로 항-에스트로겐 수용체 항체, 항-프로게스테론 수용체 항체, 항-p53 항체, 항-HER-2/neu 항체, 항-EGFR 항체, 항-카텝신 D 항체, 항-Bcl-2 항체, 항-E-카드헤린 항체, 항-CA125 항체, 항-CA15-3 항체, 항-CA19-9 항체, 항-c-erbB-2 항체, 항-P-당단백질 항체, 항-CEA 항체, 항-망막모세포종 단백질 항체, 항-ras 종양단백질 항체, 항-루이스 X 항체, 항-Ki-67 항체, 항-PCNA 항체, 항-CD3 항체, 항-CD4 항체, 항-CD5 항체, 항-CD7 항체, 항-CD8 항체, 항-CD9/p24 항체, 항-CD10 항체, 항-CD11c 항체, 항-CD13 항체, 항-CD14 항체, 항-CD15 항체, 항-CD19 항체, 항-CD20 항체, 항-CD22 항체, 항-CD23 항체, 항-CD30 항체, 항-CD31 항체, 항-CD33 항체, 항-CD34 항체, 항-CD35 항체, 항-CD38 항체, 항-CD41 항체, 항-LCA/CD45 항체, 항-CD45RO 항체, 항-CD45RA 항체, 항-CD39 항체, 항-CD100 항체, 항-CD95/Fas 항체, 항-CD99 항체, 항-CD106 항체, 항-유비퀴틴 항체, 항-CD71 항체, 항-c-myc 항체, 항-시토케라틴 항체, 항-비멘틴 항체, 항-HPV 단백질 항체, 항-카파 경쇄 항체, 항-람다 경쇄 항체, 항-멜라노솜 항체, 항-전립선 특이적 항원 항체, 항-S-100 항체, 항-tau 항원 항체, 항피브린 항체, 항-케라틴 항체 및 항-Tn-항원 항체로부터 선택된 항체를 포함한다.

[0107] "단리된" 항체는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 항체이다. 항체의 천연 환경의 오염 성분은 상기 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법으로 측정시에 항체의 95 중량%를 초과하는 정도, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하는 정도로, (2) 스피닝 컵 시큐네이터를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 1회의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.

[0108] 관심 분자 표적 또는 항원, 예를 들어 ErbB2 항원에 "결합하는" 항체는 항체가 항원을 발현하는 세포를 표적화하는데 유용하도록 충분한 친화도로 그 항원에 결합할 수 있는 것이다. 항체가 ErbB2에 결합하는 것일 경우, 이는 일반적으로 다른 ErbB 수용체와 대조적으로 ErbB2에 우선적으로 결합할 것이고, 다른 단백질, 예컨대 EGFR, ErbB3 또는 ErbB4와 유의하게 교차반응하지 않는 것일 수 있다. 이러한 실시양태에서, 이를 비-ErbB2 단백질에 대한 항체의 결합 (예를 들어, 내인성 수용체에 대한 세포 표면 결합)의 정도는 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석 또는 방사성면역침전법 (RIA)에 의해 결정된 바와 같이 10% 미만일 것이다. 때때로, 항-ErbB2 항체는 예를 들어 문헌 [Schecter et al. (1984) Nature 312:513] 및 [Drebin et al. (1984) Nature 312:545-

548]에 기재된 바와 같이 래트 neu 단백질과 유의하게 교차반응하지 않을 것이다.

- [0110] 본 발명에 포함되는 항체에 대한 분자 표적은 CD 단백질 및 이들의 리간드, 예컨대 (i) CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD40, CD79 $\alpha$  (CD79a), 및 CD79 $\beta$  (CD79b); (ii) ErbB 수용체 부류의 구성원, 예컨대 EGF 수용체, HER2, HER3 또는 HER4 수용체; (iii) 세포 부착 분자, 예컨대 LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM 및  $\alpha$ v/ $\beta$ 3 인테그린 (그의 알파 또는 베타 서브유닛 포함) (예를 들어, 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); (iv) 성장 인자, 예컨대 VEGF; IgE; 혈액형 항원; f1k2/f1t3 수용체; 비만 (OB) 수용체; mp1 수용체; CTLA-4; 단백질 C, BR3, c-met, 조직 인자,  $\beta$ 7 등; 및 (v) 세포 표면 및 막횡단 종양-관련 항원 (TAA)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0111] 달리 나타내지 않는 한, 용어 "모노클로날 항체 4D5"는 뮤린 4D5 항체 (ATCC CRL 10463)의 항원 결합 잔기 또는 이로부터 유래된 항원 결합 잔기를 갖는 항체를 나타낸다. 예를 들어, 모노클로날 항체 4D5는 뮤린 모노클로날 항체 4D5 또는 그의 변이체, 예컨대 인간화 4D5일 수 있다. 예시적인 인간화 4D5 항체는 US 특허 번호 5821337에서와 같은 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8 (트라스투주맙, 헤르셉틴(HERCEPTIN)<sup>®</sup>)을 포함한다.
- [0112] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 필라멘트형 파지, 입자의 표면 상의 외피 단백질에 대한 융합 단백질로서 디스플레이하는 기술이다. 파지 디스플레이의 한 가지 유용성은 무작위 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 표적 분자에 높은 친화도로 결합하는 서열에 대해 빠르고 효율적으로 분류할 수 있다는 사실에 있다. 파지 상의 웨프티드 및 단백질 라이브러리의 디스플레이는 특이적 결합 특성을 갖는 것에 대해 수백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 다가 파지 디스플레이 방법은 전형적으로 필라멘트형 파지의 pIII 또는 pVIII에 대한 융합을 통해 작은 무작위 웨프티드 및 작은 단백질을 디스플레이하는데 사용된다 (문헌 [Wells and Lowman, (1992) Curr. Opin. Struct. Biol., 3:355-362], 및 여기에 인용된 참고문헌). 1가 파지 디스플레이에서, 단백질 또는 웨프티드 라이브러리는 파지 외피 단백질 또는 그의 일부에 융합되고, 야생형 단백질의 존재하에 낮은 수준에서 발현된다. 결합력 효과는 다가 파지에 비해 감소되어, 분류가 내인성 리간드 친화도에 기초하고, DNA 조작을 간소화시키는 파지미드 벡터가 사용된다. 문헌 [Lowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3:205-0216 (1991)]. 파지 디스플레이는 항체-유사 분자를 생성하기 위한 기술을 포함한다 (문헌 [Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, p627-628]; [Lee et al.]).
- [0113] "파지미드"는 박테리아 복제 기점, 예를 들어 ColE1, 및 박테리오파지의 유전자간 영역의 카페를 갖는 플라스미드 벡터이다. 파지미드는 필라멘트형 박테리오파지 및 람다형 박테리오파지를 비롯한 임의의 공지된 박테리오파지에서 사용될 수 있다. 이러한 플라스미드는 또한 일반적으로 항생제 내성에 대한 선택 마커를 함유할 것이다. 이들 벡터 내로 클로닝된 DNA 절편은 플라스미드로서 증식될 수 있다. 이들 벡터를 보유하는 세포에 파지 입자의 생성에 필요한 모든 유전자가 제공되는 경우, 플라스미드의 복제 방식이 롤링 셔틀(rolling circle) 복제로 변화되어 플라스미드 DNA 및 패키지 파지 입자의 1개 가닥 카페를 생성시킨다. 파지미드는 감염성 또는 비-감염성 파지 입자를 형성할 수 있다. 상기 용어는, 유전자 융합체로서 이종 폴리펩티드 유전자에 연결된 파지 외피 단백질 유전자 또는 그의 단편을 함유하여 상기 이종 폴리펩티드가 파지 입자의 표면상에 디스플레이 되도록 하는 파지미드를 포함한다.
- [0114] "링커", "링커", "링커 단위", 또는 "연결하다"는 항체를 약물 모이어티에 공유결합에 의해 부착시키는 공유결합 또는 원자의 쇄를 포함하는 화학적 모이어티를 의미한다. 다양한 실시양태에서, 링커는 L로 표시된다. 링커는 알킬디일, 아릴렌, 헤테로아릴렌과 같은 이가 라디칼, 알킬옥시의 반복 단위 -(CR<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(CR<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- (예를 들어, 폴리에틸레녹시, PEG, 폴리메틸레녹시), 및 알킬아미노 (예를 들어, 폴리에틸렌아미노, 제파민(Jeffamine)<sup>TM</sup>)과 같은 모이어티; 및 숙시네이트, 숙신아미드, 디글리콜레이트, 말로네이트, 및 카프로아미드를 포함하는 이산 에스테르 및 아미드를 포함한다.
- [0115] 용어 "표지"는 항체에 공유 결합에 의해 부착될 수 있고, 하기 기능을 하는 임의의 모이어티를 의미한다: (i) 검출 가능한 신호를 제공하거나; (ii) 제2 표지와 상호작용하여 제1 또는 제2 표지에 의해 제공되는 검출 가능한 신호, 예를 들어 FRET (형광 공명 에너지 전이)를 변형시키거나; (iii) 항원 또는 리간드와의 상호 작용을 안정화시키거나 또는 결합 친화성을 증가시키거나; (iv) 전하, 소수성, 외형 또는 다른 물리적 파라미터에 의해 이동성, 예를 들어 전기영동 이동성 또는 세포 투과성에 영향을 미치거나; 또는 (v) 포획 모이어티를 제공하여 리

간드 친화성, 항체/항원 결합, 또는 이온 치환을 조정.

[0116]

본원에서 사용된 입체화학적 정의 및 규정은 일반적으로 문헌 [S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York]; 및 [Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York]에 따른다. 많은 유기 화합물들은 광학 활성 형태로 존재하며, 즉, 이들은 평면-편광의 평면을 회전시키는 능력을 갖는다. 광학 활성 화합물을 기재하는데 있어서, 접두어 D 및 L, 또는 R 및 S는 키랄 중심(들)에 대한 분자의 절대 배위를 나타내는데 사용된다. 접두어 d 및 l, 또는 (+) 및 (-)는 화합물에 의한 평면-편광 회전의 표시를 나타내는데 사용되며, (-) 또는 1은 화합물이 좌선성임을 의미한다. (+) 또는 d의 접두어가 사용되는 화합물은 우선성이다. 주어진 화학 구조에 있어서, 이러한 입체이성질체는 이들이 서로의 거울상이라는 점을 제외하고는 동일하다. 특정 입체이성질체가 거울상이성질체라 지칭될 수도 있으며, 이러한 이성질체들의 혼합물은 종종 거울상이성질체 혼합물이라 불린다. 거울상이성질체들의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체라고 지칭되며, 이것은 화학 반응 또는 방법에서 입체선택성 또는 입체특이성이 없는 경우에 생성될 수 있다. 용어 "라세미 혼합물" 및 "라세미체"는 광학 활성이 없는, 2개의 거울상이성질체 종의 등몰 혼합물을 나타낸다.

[0117]

본원에 사용된 어구 "제약상 허용되는 염"은 AZC의 제약상 허용되는 유기 또는 무기 염을 나타낸다. 예시적인 염은 술페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 니트레이트, 비술페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레이트, 탄네이트, 판토테네이트, 비타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄술포네이트, 에탄술포네이트, 벤젠술포네이트, p-톨루엔술포네이트 및 파모에이트 (즉 1,1'-메틸렌-비스-(2-히드록시-3-나프토에이트)) 염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 제약상 허용되는 염은 또 다른 문자, 예컨대 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 다른 반대이온의 내포를 포함할 수 있다. 반대이온은 모 화합물상의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 부분일 수 있다. 추가로, 제약상 허용되는 염은 그의 구조 내에 1개 초과의 하전된 원자를 가질 수 있다. 여러 개의 하전된 원자가 제약상 허용되는 염의 일부인 경우에는 여러 개의 반대이온을 가질 수 있다. 따라서, 제약상 허용되는 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 반대이온을 가질 수 있다.

[0118]

"제약상 허용되는 용매화물"은 하나 이상의 용매 분자 및 AZC의 결합체를 나타낸다. 제약상 허용되는 용매화물을 형성하는 용매의 예는 물, 이소프로판올, 에탄올, 메탄올, DMSO, 에틸 아세테이트, 아세트산 및 에탄올아민을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0119]

하기 약어가 본원에서 사용되고, 나타낸 정의를 갖는다: BME는 베타-메르캅토에탄올이고, Boc는 N-(t-부톡시카르보닐)이고, cit는 시트룰린 (2-아미노-5-우레이도 펜탄산)이고, dap는 돌라프로인이고, DCC는 1,3-디시클로헥실카르보디이미드이고, DCM은 디클로로메탄이고, DEA는 디에틸아민이고, DEAD는 디에틸아조디카르복실레이트이고, DEPC는 디에틸포스포릴시아니데이트이고, DIAD는 디이소프로필아조디카르복실레이트이고, DIEA는 N,N-디이소프로필에틸아민이고, dil은 돌라이소류신이고, DMA는 디메틸아세트아미드이고, DMAP는 4-디메틸아미노피리딘이고, DME는 에틸렌글리콜 디메틸 에테르 (또는 1,2-디메톡시에탄)이고, DMF는 N,N-디메틸포름아미드이고, DMSO는 디메틸솔포시드이고, doe는 돌라페닌이고, dov는 N,N-디메틸발린이고, DTNB는 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)이고, DTPA는 디에틸렌트리아민펜타아세트산이고, DTT는 디티오토레이톨이고, EDCI는 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 히드로클로라이드이고, EEDQ는 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린이고, ES-MS는 전기분무 질량 분광측정법이고, EtOAc는 에틸 아세테이트이고, Fmoc는 N-(9-플루오로에틸메톡시카르보닐)이고, gly는 글리신이고, HATU는 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 핵사플루오로포스페이트이고, HOBt는 1-히드록시벤조트리아졸이고, HPLC는 고압 액체 크로마토그래피이고, ile는 이소류신이고, lys는 리신이고, MeCN(CH<sub>3</sub>CN)은 아세토니트릴이고, MeOH는 메탄올이고, Mtr은 4-아니실디페닐메틸 (또는 4-메톡시트리틸)이고, nor은 (1S,2R)-(+)-노르에페드린이고, PAB는 p-아미노벤질카르바모일이고, PBS는 포스페이트-완충 염수 (pH 7)이고, PEG는 폴리에틸렌 글리콜이고, Ph는 페닐이고, Pnp는 p-니트로페닐이고, MC는 6-말레이미도카프로일이고, phe는 L-페닐알라닌이고, PyBrop는 브로모 트리스-파롤리디노 포스포늄 핵사플루오로포스페이트이고, SEC는 크기-배제 크로마토그래피이고, Su는 숙신이미드이고, TFA는 트리플루오로아세트산이고, TLC는 박층 크로마토그래피이고, UV는 자외선이고, val은 발린이다.

[0120]

시스테인 조작된 항체

[0121]

본 발명의 화합물에는 야생형 또는 모 항체의 하나 이상의 아미노산을 시스테인 아미노산으로 대체시킨 시스테

인 조작된 항체가 포함된다. 어떠한 형태의 항체도 상기와 같이 조작, 즉 돌연변이시킬 수 있다. 예를 들어, 모 Fab 항체 단편을 조작하여 본원에서 "티오Fab"라 지칭되는 시스테인 조작된 Fab을 형성할 수 있다. 유사하게, 모 모노클로날 항체를 조작하여 "티오Mab"를 형성할 수 있다. 티오Fab에서는 단일 부위 돌연변이가 단일 조작된 시스테인 잔기를 생성하는 반면, 티오Mab에서는 단일 부위 돌연변이가 2개의 조작된 시스테인 잔기를 생성하는데, 이는 IgG 항체의 이량체성 특징 때문이라는 것을 인지해야 한다. 대체된 ("조작시킨") 시스테인 (Cys) 잔기를 수반한 돌연변이체를 대상으로 하여, 새로이 도입되고 조작시킨 시스테인 티올 기의 반응성을 평가한다. 티올 반응성 값은 0 내지 1.0 범위의 수치 측면에서 상대적이고, 모든 시스테인 조작된 항체에 대해 측정할 수 있다. 본 발명의 시스테인 조작된 항체의 티올 반응성 값은 0.6 내지 1.0; 0.7 내지 1.0; 또는 0.8 내지 1.0의 범위 내이다.

[0122] 본 발명의 설계, 선별 및 제조 방법을 이용하여, 친전자성 관능기와 반응성인 시스테인 조작된 항체로 만들 수 있다. 상기 방법을 통해, 지정 및 설계된 선택적인 부위에 지르코늄 분자를 갖는 항체 접합체 화합물, 예를 들어 항체-지르코늄 접합체 (AZC) 화합물을 추가로 얻을 수 있다. 항체 표면에서의 반응성 시스테인 잔기는 티올 반응성 기, 예컨대 말레이미드 또는 할로아세틸을 통한 지르코늄 모이어티의 특이적인 접합을 허용한다. Cys 잔기의 티올 관능기의 말레이미드기에 대한 친핵 반응성은 단백질 내의 임의의 다른 아미노산 관능기, 예를 들어 리신 잔기의 아미노기 또는 N-말단 아미노기에 비해 약 1000배 더 크다. 아이오도아세틸 및 말레이미드 시약 내의 티올 특이적 관능기는 아민 기와 반응할 수 있지만, 보다 높은 pH (>9.0) 및 보다 긴 반응 시간이 필요하다 (문헌 [Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London]).

[0123] 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 바람직하게는 그의 야생형 모 항체 대응물의 항원 결합 능력을 보유한다. 따라서, 시스테인 조작된 항체는 바람직하게는 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 항원은 예를 들어 종양-관련 항원 (TAA), 세포 표면 수용체 단백질 및 다른 세포 표면 분자, 막횡단 단백질, 신호전달 단백질, 세포 생존 조절 인자, 세포 증식 조절 인자, 조직 발달 또는 분화와 연관된 분자 (예를 들어, 조직 발달 또는 분화에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 추정되는 분자), 림포카인, 시토카인, 세포 주기 조절에 관련된 분자, 혈관형성에 관련된 분자 및 혈관신생에 관련된 분자 (예를 들어, 혈관신생에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 추정되는 분자)를 포함한다. 종양-관련 항원은 클러스터 분화 인자 (즉, CD 단백질)일 수 있다. 시스테인 조작된 항체와 결합할 수 있는 항원은 상기 언급된 범주 중의 하나의 서브셋트의 구성원일 수 있는데, 상기 범주의 다른 서브셋트(들)은 (관심 항원과 관련하여) 고유한 특징을 갖는 다른 분자/항원을 포함한다.

[0124] 모 항체는 또한 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 및 huMAb4D5-8 (트拉斯투주맙, 헤르셉틴<sup>®</sup>) (명백하게 본원에 참고로 포함된 US 5821337의 표 3에 기재된 바와 같음); 인간화 520C9 (WO 93/21319) 및 본원에 기재된 바와 같은 인간화 2C4 항체로부터 선택된 인간화 항체일 수 있다.

[0125] 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 티올-반응성 시약과 부위-특이적으로 및 효율적으로 커플링될 수 있다. 티올-반응성 시약은 다관능성 링커 시약, 포획, 즉 친화도, 표지 시약 (예를 들어, 비오틴-링커 시약), 검출 표지 (예를 들어, 형광단 시약), 고체상 고정 시약 (예를 들어, 세파로스(SEPHAROSE)<sup>TM</sup> 폴리스티렌, 또는 유리), 또는 지르코늄-링커 중간체일 수 있다. 티올-반응성 시약의 한예는 N-에틸 말레이미드 (NEM)이다. 예시적인 실시양태에서, 티오Fab과 비오틴-링커 시약의 반응은 조작된 시스테인 잔기의 존재 및 반응성이 그에 의해 검출 및 측정될 수 있는 바이오틴화 티오Fab을 제공한다. 티오Fab을 다관능성 링커 시약과 반응시키면 관능화 링커를 수반한 티오Fab이 제공되는데, 이를 지르코늄 모이어티 시약 또는 다른 표지와 추가로 반응시킬 수 있다. 티오Fab와 지르코늄-링커 중간체의 반응은 티오Fab 지르코늄 접합체를 제공한다.

[0126] 본원에 기재된 예시적인 방법은 일반적으로 항체의 확인 및 생성에, 및 보다 일반적으로는 본원에서 기재한 설계 및 스크리닝 단계의 적용을 통해 다른 단백질에 적용될 수 있다.

[0127] 이러한 접근법은 반응성 기가, 예를 들어 말레이미드, 아이오도아세트아미드, 피리딜 디슬피드, 또는 다른 티올-반응성 접합 상대인 다른 티올-반응성 작용제의 접합에 적용할 수 있다 (문헌 [Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2]; [Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London]; [Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2]; [Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]). 상대는 세포독성제 (예를 들어, 독소, 예를 들어 독소루비신 또는 백일해 독소), 형광단, 예를 들어 폴루오레세인 또는 로다민과 같은 형광 염료, 영상화 또는 방사성요법 금속에 대한 킬레이트화제, 펩티딜 또는 비-펩티딜 표지 또는 검출 태그, 또는 제거-변형

제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜의 다양한 이성질체, 제3 성분에 결합하는 웨티드, 또는 다른 탄수화물 또는 친지성 물질일 수 있다.

[0128] 본원에서 예시적인 항체 단편, hu4D5Fabv8 상에서 확인된 부위는 주로, 모든 종의 항체 전반에 걸쳐 잘 보존되는 항체의 불변 도메인 내에 있다. 이들 부위는 특이적 항체 구조에 관한 구조적 설계 또는 지식을 추가로 필요로 하지 않으면서, 및 항체의 가변 도메인에 대한 고유의 항원 결합 특성을 간접하지 않으면서도 다른 항체에 광범위하게 적용가능해야 한다.

[0129] 암을 치료하는 데에 유용할 수 있는 시스테인 조작된 항체에는 세포 표면 수용체 및 종양 관련 항원 (TAA)에 대항한 항체가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 상기 항체는 네이키드 항체 (표지 모이어티에 접합되지 않은)로서 또는 화학식 I 항체-지르코늄 접합체 (AZC)로서 사용될 수 있다. 종양 관련 항원은 당업계에 공지되어 있고, 당업계에 널리 공지되어 있는 방법 및 정보를 이용하여 항체를 생성시키는 데에 사용하기 위해 제조할 수 있다. 암 진단 및 요법을 위한 효과적인 세포 표적을 발견하기 위한 시도에서, 연구자들은 하나 이상의 정상적인 비-암성 세포(들)에 비해 하나 이상의 특정 유형(들)의 암 세포의 표면에서 특이적으로 발현되는 막횡단 또는 다른 종양-관련 폴리펩티드를 확인하고자 하였다. 종종, 이러한 종양-관련 폴리펩티드는 비-암성 세포의 표면에서와 비교하여 암 세포의 표면에서 더 풍부하게 발현된다. 이러한 종양-관련 세포 표면 항원 폴리펩티드의 확인을 통해, 항체-기재의 요법을 통해 파괴시킬 암 세포를 특이적으로 표적화하는 능력이 생성되었다.

[0130] TAA의 예는 하기 열거된 TAA (1) 내지 (36)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 편의상, 이러한 항원에 관한 정보 (모두가 당업계에 공지되어 있음)를 아래에 기재하였고, 이것은 미국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information) (NCBI)의 핵산 및 단백질 서열 확인 규정에 따른 명칭, 대안적인 명칭, 진뱅크 등록 번호 및 주요 참고문헌(들)을 포함한다. TAA (1) 내지 (36)에 상응하는 핵산 및 단백질 서열은 공공 데이터베이스, 예컨대 진뱅크에서 입수 가능하다. 항체가 표적으로 하는 종양-관련 항원은 언급된 참고문헌에서 확인되는 서열과 비교하여 적어도 약 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 서열 동일성을 갖거나 언급된 참고문헌에서 확인되는 서열을 갖는 TAA와 실질적으로 동일한 생물학적 특성 또는 특징을 나타내는 모든 아미노산 서열 변이체 및 이소형을 포함한다. 예를 들어, 일반적으로, 변이체 서열을 갖는 TAA는 열거된 상응하는 서열을 갖는 TAA에 특이적으로 결합하는 항체에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에서 구체적으로 언급된 참고문헌에서의 서열 및 개시내용은 명백하게 참고로 포함된다.

[0131] 종양-관련 항원 (1) 내지 (36):

[0132] (1) BMPR1B (골 형태발생 단백질 수용체-유형 IB, 진뱅크 등록 번호 NM\_001203)

[0133] ten Dijke,P., et al. Science 264 (5155):101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997); WO2004063362 (청구항 2); WO2003042661 (청구항 12); US2003134790-A1 (페이지 38-39); WO2002102235 (청구항 13; 페이지 296); WO2003055443 (페이지 91-92); WO200299122 (실시예 2; 페이지 528-530); WO2003029421 (청구항 6); WO2003024392 (청구항 2; 도 112); WO200298358 (청구항 1; 페이지 183); WO200254940 (페이지 100-101); WO200259377(페이지 349-350); WO200230268 (청구항 27; 페이지 376); WO200148204 (실시예; 도 4)

[0134] NP\_001194 골 형태발생 단백질 수용체, 유형 IB /pid=NP\_001194.1 -

[0135] 상호-참조: MIM:603248; NP\_001194.1; AY065994

[0136] (2) E16 (LAT1, SLC7A5, 진뱅크 등록 번호 NM\_003486)

[0137] Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273); WO2004048938 (실시예 2); WO2004032842 (실시예 IV); WO2003042661 (청구항 12); WO2003016475 (청구항 1); WO200278524 (실시예 2); WO200299074 (청구항 19; 페이지 127-129); WO200286443 (청구항 27; 페이지 222, 393); WO2003003906 (청구항 10; 페이지 293); WO200264798 (청구항 33; 페이지 93-95); WO200014228 (청구항 5; 페이지 133-136); US2003224454 (도 3); WO2003025138 (청구항 12; 페이지 150);

[0138] NP\_003477 용질 캐리어 부류 7 (양이온성 아미노산 수송체, y+ 시스템), 구성원 5 /pid=NP\_003477.3 - 호모 사피엔스

[0139] 상호-참조: MIM:600182; NP\_003477.3; NM\_015923; NM\_003486\_1

[0140] (3) STEAP1 (전립선의 6개 막횡단 상피 항원, 진뱅크 등록 번호 NM\_012449)

- [0141] Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528); WO2004065577 (청구항 6); WO2004027049 (도 1L); EP1394274 (실시예 11); WO2004016225 (청구항 2); WO2003042661 (청구항 12); US2003157089 (실시예 5); US2003185830 (실시예 5); US2003064397 (도 2); WO200289747 (실시예 5; 페이지 618-619); WO2003022995 (실시예 9; 도 13A, 실시예 53; 페이지 173, 실시예 2; 도 2A);
- [0142] NP\_036581 전립선의 6개 막횡단 상피 항원
- [0143] 상호-참조: MIM:604415; NP\_036581.1; NM\_012449\_1
- [0144] (4) 0772P (CA125, MUC16, 진뱅크 등록 번호 AF361486)
- [0145] J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); WO2004045553 (청구항 14); WO200292836 (청구항 6; 도 12); WO200283866 (청구항 15; 페이지 116-121); US2003124140 (실시예 16); 상호-참조: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486\_1
- [0146] (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, 거핵구 증강 인자, 매소텔린, 진뱅크 등록 번호 NM\_005823) Yamaguchi, N., et al. Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)); WO2003101283 (청구항 14); (WO2002102235 (청구항 13; 페이지 287-288); WO2002101075 (청구항 4; 페이지 308-309); WO200271928 (페이지 320-321); WO9410312 (페이지 52-57); 상호-참조: MIM:601051; NP\_005814.2; NM\_005823\_1
- [0147] (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, 용질 캐리어 부류 34 (인산나트륨), 구성원 2, 유형 II 나트륨-의존성 포스페이트 수송체 3b, 진뱅크 등록 번호 NM\_006424)
- [0148] J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582); WO2004022778 (청구항 2); EP1394274 (실시예 11); WO2002102235 (청구항 13; 페이지 326); EP875569 (청구항 1; 페이지 17-19); WO200157188 (청구항 20; 페이지 329); WO2004032842 (실시예 IV); WO200175177 (청구항 24; 페이지 139-140);
- [0149] 상호-참조: MIM:604217; NP\_006415.1; NM\_006424\_1
- [0150] (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, 세마포린 5b Hlog, sema 도메인, 7개 트롭보스폰 단 반복부 (유형 1 및 유형 1-유사), 막횡단 도메인 (TM) 및 짧은 세포질 도메인, (세마포린) 5B, 진뱅크 등록 번호 AB040878)
- [0151] Nagase T., et al. (2000) DNA Res. 7 (2):143-150); WO2004000997 (청구항 1); WO2003003984 (청구항 1); WO200206339 (청구항 1; 페이지 50); WO200188133 (청구항 1; 페이지 41-43, 48-58); WO2003054152 (청구항 20); WO2003101400 (청구항 11);
- [0152] 등록: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;
- [0153] (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 유전자, 진뱅크 등록 번호 AY358628); Ross et al. (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; US2003129192 (청구항 2); US2004044180 (청구항 12); US2004044179 (청구항 11); US2003096961 (청구항 11); US2003232056 (실시예 5); WO2003105758 (청구항 12); US2003206918 (실시예 5); EP1347046 (청구항 1); WO2003025148 (청구항 20);
- [0154] 상호-참조: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628\_1
- [0155] (9) ETBR (엔도텔린 유형 B 수용체, 진뱅크 등록 번호 AY275463);
- [0156] Nakamura M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et al. Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al. J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al. J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al. J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al. Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al. Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997;

Verheij J.B., et al. Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et al. Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., et al. Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al., Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al. Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., et al. Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al. Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al. Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al. Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al. (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; WO2004045516 (청구항 1); WO2004048938 (실시예 2); WO2004040000 (청구항 151); WO2003087768 (청구항 1); WO2003016475 (청구항 1); WO2003016475 (청구항 1); WO200261087 (도 1); WO2003016494 (도 6); WO2003025138 (청구항 12; 페이지 144); WO200198351 (청구항 1; 페이지 124-125); EP522868 (청구항 8; 도 2); WO200177172 (청구항 1; 페이지 297-299); US2003109676; US6518404 (도 3); US5773223 (청구항 1a; Col 31-34); WO2004001004;

- [0157] (10) MSG783 (RNF124, 가설 단백질 FLJ20315, 진뱅크 등록 번호 NM\_017763);
- [0158] WO2003104275 (청구항 1); WO2004046342 (실시예 2); WO2003042661 (청구항 12); WO2003083074 (청구항 14; 페이지 61); WO2003018621 (청구항 1); WO2003024392 (청구항 2; 도 93); WO200166689 (실시예 6);
- [0159] 상호-참조: LocusID:54894; NP\_060233.2; NM\_017763\_1
- [0160] (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, 전립선암 관련 유전자 1, 전립선암 관련 단백질 1, 전립선의 6개 막횡단 상피 항원 2, 6개 막횡단 전립선 단백질, 진뱅크 등록 번호 AF455138)
- [0161] Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)); WO2003087306; US2003064397 (청구항 1; 도 1); WO200272596 (청구항 13; 페이지 54-55); WO200172962 (청구항 1; 도 4B); WO2003104270 (청구항 11); WO2003104270 (청구항 16); US2004005598 (청구항 22); WO2003042661 (청구항 12); US2003060612 (청구항 12; 도 10); WO200226822 (청구항 23; 도 2); WO200216429 (청구항 12; 도 10);
- [0162] 상호-참조: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138\_1
- [0163] (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 일시적 수용체 잠재성 양이온 채널, 하위부류 M, 구성원 4, 진뱅크 등록 번호 NM\_017636)
- [0164] Xu, X.Z., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003)); US2003143557 (청구항 4); WO200040614 (청구항 14; 페이지 100-103); WO200210382 (청구항 1; 도 9A); WO2003042661 (청구항 12); WO200230268 (청구항 27; 페이지 391); US2003219806 (청구항 4); WO200162794 (청구항 14; 도 1A-D);
- [0165] 상호-참조: MIM:606936; NP\_060106.2; NM\_017636\_1
- [0166] (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, 기형암종-유래된 성장 인자, 진뱅크 등록 번호 NP\_003203 또는 NM\_003212)
- [0167] Ciccodicola, A., et al. EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)); US2003224411 (청구항 1); WO2003083041 (실시예 1); WO2003034984 (청구항 12); WO200288170 (청구항 2; 페이지 52-53); WO2003024392 (청구항 2; 도 58); WO200216413 (청구항 1; 페이지 94-95, 105); WO200222808 (청구항 2; 도 1); US5854399 (실시예 2; Col 17-18); US5792616 (도 2);
- [0168] 상호-참조: MIM:187395; NP\_003203.1; NM\_003212\_1
- [0169] (14) CD21 (CR2 (보체 수용체 2) 또는 C3DR (C3d/엡스타인 바르(Epstein Barr) 바이러스 수용체) 또는 Hs.73792 진뱅크 등록 번호 M26004)
- [0170] Fujisaku et al. (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125); Weis J.J., et al. J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al. Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al. (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; WO2004045520 (실시예 4); US2004005538 (실시예 1); WO2003062401 (청구항 9); WO2004045520 (실시예 4); WO9102536 (도 9.1-9.9); WO2004020595 (청구항 1);
- [0171] 등록: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.
- [0172] (15) CD79b (CD79B, CD79b, IgB (이뮤노글로불린-관련 베타), B29, 진뱅크 등록 번호 NM\_000626 또는

11038674)

- [0173] Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625); WO2004016225 (청구항 2, 도 140); WO2003087768, US2004101874 (청구항 1, 페이지 102); WO2003062401 (청구항 9); WO200278524 (실시예 2); US2002150573 (청구항 5, 페이지 15); US5644033; WO2003048202 (청구항 1, 페이지 306 및 309); WO 99/558658, US6534482 (청구항 13, 도 17A/B); WO200055351 (청구항 11, 페이지 1145-1146);
- [0174] 상호-참조: MIM:147245; NP\_000617.1; NM\_000626\_1
- [0176] (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2 도메인 함유 포스파타제 엔카 단백질 1a), SPAP1B, SPAP1C, 진뱅크 등록 번호 NM\_030764, AY358130)
- [0177] Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; WO2004016225 (청구항 2); WO2003077836; WO200138490 (청구항 5; 도 18D-1-18D-2); WO2003097803 (청구항 12); WO2003089624 (청구항 25);
- [0178] 상호-참조: MIM:606509; NP\_110391.2; NM\_030764\_1
- [0179] (17) HER2 (ErbB2, 진뱅크 등록 번호 M11730)
- [0180] Coussens L., et al. Science (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., et al. Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al. J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al. J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al. Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al. (1993) Genomics 15, 426-429; WO2004048938 (실시예 2); WO2004027049 (도 11); WO2004009622; WO2003081210; WO2003089904 (청구항 9); WO2003016475 (청구항 1); US2003118592; WO2003008537 (청구항 1); WO2003055439 (청구항 29; 도 1A-B); WO2003025228 (청구항 37; 도 5C); WO200222636 (실시예 13; 페이지 95-107); WO200212341 (청구항 68; 도 7); WO200213847 (페이지 71-74); WO200214503 (페이지 114-117); WO200153463 (청구항 2; 페이지 41-46); WO200141787 (페이지 15); WO200044899 (청구항 52; 도 7); WO200020579 (청구항 3; 도 2); US5869445 (청구항 3; Col 31-38); WO9630514 (청구항 2; 페이지 56-61); EP1439393 (청구항 7); WO2004043361 (청구항 7); WO2004022709; WO200100244 (실시예 3; 도 4);
- [0181] 등록: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.
- [0182] (18) NCA (CEACAM6, 진뱅크 등록 번호 M18728);
- [0183] Barnett T., et al. Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002; WO2004063709; EP1439393 (청구항 7); WO2004044178 (실시예 4); WO2004031238; WO2003042661 (청구항 12); WO200278524 (실시예 2); WO200286443 (청구항 27; 페이지 427); WO200260317 (청구항 2);
- [0184] 등록: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;
- [0185] (19) MDP (DPEP1, 진뱅크 등록 번호 BC017023)
- [0186] Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002)); WO2003016475 (청구항 1); WO200264798 (청구항 33; 페이지 85-87); JP05003790 (도 6-8); WO9946284 (도 9);
- [0187] 상호-참조: MIM:179780; AAH17023.1; BC017023\_1
- [0188] (20) IL20R $\alpha$  (IL20Ra, ZCYTOR7, 진뱅크 등록 번호 AF184971);
- [0189] Clark H.F., et al. Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., et al. Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al. Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et al. J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al. J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al. (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et al. (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; EP1394274 (실시예 11); US2004005320 (실시예 5); WO2003029262 (페이지 74-75); WO2003002717 (청구항 2; 페이지 63); WO200222153

(페이지 45-47); US2002042366 (페이지 20-21); WO200146261 (페이지 57-59); WO200146232 (페이지 63-65); WO9837193 (청구항 1; 페이지 55-59);

[0190] 등록: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

[0191] (21) 브레비칸 (BCAN, BEHAB, 진뱅크 등록 번호 AF229053)

[0192] Gary S.C., et al. Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al. Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; US2003186372 (청구항 11); US2003186373 (청구항 11); US2003119131 (청구항 1; 도 52); US2003119122 (청구항 1; 도 52); US2003119126 (청구항 1); US2003119121 (청구항 1; 도 52); US2003119129 (청구항 1); US2003119130 (청구항 1); US2003119128 (청구항 1; 도 52); US2003119125 (청구항 1); WO2003016475 (청구항 1); WO200202634 (청구항 1);

[0193] (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, 진뱅크 등록 번호 NM\_004442)

[0194] Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); WO2003042661 (청구항 12); WO200053216 (청구항 1; 페이지 41); WO2004065576 (청구항 1); WO2004020583 (청구항 9); WO2003004529 (페이지 128-132); WO200053216 (청구항 1; 페이지 42);

[0195] 상호-참조: MIM:600997; NP\_004433.2; NM\_004442\_1

[0196] (23) ASLG659 (B7h, 진뱅크 등록 번호 AX092328)

[0197] US20040101899 (청구항 2); WO2003104399 (청구항 11); WO2004000221 (도 3); US2003165504 (청구항 1); US2003124140 (실시예 2); US2003065143 (도 60); WO2002102235 (청구항 13; 페이지 299); US2003091580 (실시예 2); WO200210187 (청구항 6; 도 10); WO200194641 (청구항 12; 도 7b); WO200202624 (청구항 13; 도 1A-1B); US2002034749 (청구항 54; 페이지 45-46); WO200206317 (실시예 2; 페이지 320-321, 청구항 34; 페이지 321-322); WO200271928 (페이지 468-469); WO200202587 (실시예 1; 도 1); WO200140269 (실시예 3; 페이지 190-192); WO200036107 (실시예 2; 페이지 205-207); WO2004053079 (청구항 12); WO2003004989 (청구항 1); WO200271928 (페이지 233-234, 452-453); WO 0116318;

[0198] (24) PSCA (전립선 줄기 세포 항원 전구체, 진뱅크 등록 번호 AJ297436)

[0199] Reiter R.E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al. Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; WO2004022709; EP1394274 (실시예 11); US2004018553 (청구항 17); WO2003008537 (청구항 1); WO200281646 (청구항 1; 페이지 164); WO2003003906 (청구항 10; 페이지 288); WO200140309 (실시예 1; 도 17); US2001055751 (실시예 1; 도 1b); WO200032752 (청구항 18; 도 1); WO9851805 (청구항 17; 페이지 97); WO9851824 (청구항 10; 페이지 94); WO9840403 (청구항 2; 도 1B);

[0200] 등록: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

[0201] (25) GEDA (진뱅크 등록 번호 AY260763);

[0202] AAP14954 지방종 HMGIC 융합-상대-유사 단백질 /pid=AAP14954.1 - 호모 사파엔스

[0203] 종: 호모 사파엔스 (인간)

[0204] WO2003054152 (청구항 20); WO2003000842 (청구항 1); WO2003023013 (실시예 3, 청구항 20); US2003194704 (청구항 45);

[0205] 상호-참조: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763\_1

[0206] (26) BAFF-R (B 세포 -활성화 인자 수용체, BLyS 수용체 3, BR3, 진뱅크 등록 번호 AF116456); BAFF 수용체 /pid=NP\_443177.1 - 호모 사파엔스

[0207] Thompson, J.S., et al. Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004058309; WO2004011611; WO2003045422 (실시예; 페이지 32-33); WO2003014294 (청구항 35; 도 6B); WO2003035846 (청구항 70; 페이지 615-616); WO200294852 (Col 136-137); WO200238766 (청구항 3; 페이지 133); WO200224909 (실시예 3; 도 3);

- [0208] 상호-참조: MIM:606269; NP\_443177.1; NM\_052945\_1; AF132600
- [0209] (27) CD22 (B-세포 수용체 CD22-B 이소형, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, 진뱅크 등록 번호 AK026467);
- [0210] Wilson et al. (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; WO2003072036 (청구항 1; 도 1);
- [0211] 상호-참조: MIM:107266; NP\_001762.1; NM\_001771\_1
- [0212] (28) CD79a (CD79A, CD79 a, 이뮤노글로불린-관련 알파, B 세포-특이적 단백질 (Ig 베타 (CD79B)와 공유 결합에 의해 상호작용하고, 표면 상에서 IgM 분자와 복합체화하여, B-세포 분화에 관련된 신호를 변환시킴)), pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] 유전자 염색체: 19q13.2, 진뱅크 등록 번호 NP\_001774.10)
- [0213] WO2003088808, US20030228319; WO2003062401 (청구항 9); US2002150573 (청구항 4, 페이지 13-14); WO9958658 (청구항 13, 도 16); WO9207574 (도 1); US5644033; Ha et al. (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Mueller et al. (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625; Hashimoto et al. (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al. (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al. (1992) J. Immunol. 148(2):633-637; Sakaguchi et al. (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;
- [0214] (29) CXCR5 (버킷 림프종 수용체 1, G 단백질-커플링된 수용체 (CXCL13 캐모카인에 의해 활성화되고, 림프구 이동 및 체액 방어에서 기능하고, HIV-2 감염 및 아마도 AIDS, 림프종, 골수종, 및 백혈병의 발생에서 소정의 역할을 함)); 372 aa, pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] 유전자 염색체: 11q23.3, 진뱅크 등록 번호 NP\_001707.1)
- [0215] WO2004040000; WO2004015426; US2003105292 (실시예 2); US6555339 (실시예 2); WO200261087 (도 1); WO200157188 (청구항 20, 페이지 269); WO200172830 (페이지 12-13); WO200022129 (실시예 1, 페이지 152-153, 실시예 2, 페이지 254-256); WO9928468 (청구항 1, 페이지 38); US5440021 (실시예 2, col 49-52); WO9428931 (페이지 56-58); WO9217497 (청구항 7, 도 5); Dobner et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al. (1995) Biochem. J. 309:773-779;
- [0216] (30) HLA-DOB (MHC 클래스 II 분자 (Ia 항원)의 베타 서브유닛 (펩티드에 결합하고, 이들을 CD4+ T 림프구에 제시함)); 273 aa, pI: 6.56 MW: 30820 TM: 1 [P] 유전자 염색체: 6p21.3, 진뱅크 등록 번호 NP\_002111.1)
- [0217] Tonnelle et al. (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al. (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al. (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Servenius et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al. (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al. (2002) Tissue Antigens 59:512-519; WO9958658 (청구항 13, 도 15); US6153408 (Col 35-38); US5976551 (col 168-170); US6011146 (col 145-146); Kasahara et al. (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al. (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;
- [0218] (31) P2X5 (퓨린성 수용체 P2X 리간드-게이팅 이온 채널 5, 세포외 ATP에 의해 게이팅된 이온 채널 (시냅스 전달 및 신경발생에 관련될 수 있고, 결핍은 특발성 배뇨근 불안정의 병태생리에 기여할 수 있음)); 422 aa, pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] 유전자 염색체: 17p13.3, 진뱅크 등록 번호 NP\_002552.2)
- [0219] Le et al. (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; WO2004047749; WO2003072035 (청구항 10); Touchman et al. (2000) Genome Res. 10:165-173; WO200222660 (청구항 20); WO2003093444 (청구항 1); WO2003087768 (청구항 1); WO2003029277 (페이지 82);
- [0220] (32) CD72 (B-세포 분화 항원 CD72, Lyb-2) 단백질 서열 전체 maeaity...tafrfpd (1..359; 359 aa), pI: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] 유전자 염색체: 9p13.3, 진뱅크 등록 번호 NP\_001773.1)
- [0221] WO2004042346 (청구항 65); WO2003026493 (페이지 51-52, 57-58); WO200075655 (페이지 105-106); Von Hoegen et al. (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903;
- [0222] (33) LY64 (림프구 항원 64 (RP105), 류신 풍부 반복부 (LRR) 부류의 유형 I 막 단백질 (B-세포 활성화 및 아폽토시스를 조절하고, 기능의 손실은 전신 홍반성 루푸스를 갖는 환자에서 증가된 질환 활성과 관련됨)); 661 aa, pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] 유전자 염색체: 5q12, 진뱅크 등록 번호 NP\_005573.1)
- [0223] US2002193567; WO9707198 (청구항 11, 페이지 39-42); Miura et al. (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura

et al. (1998) Blood 92:2815-2822; WO2003083047; WO9744452 (청구항 8, 페이지 57-61); WO200012130 (페이지 24-26);

[0224] (34) FcRH1 (Fc 수용체-유사 단백질 1, C2 유형 Ig-유사 및 ITAM 도메인을 함유하는 이뮤노글로불린 Fc 도메인에 대한 추정 수용체 (B-림프구 분화에서 소정의 역할을 할 수 있음)); 429 aa, pI: 5.28, MW: 46925 TM: 1 [P] 유전자 염색체: 1q21-1q22, 진뱅크 등록 번호 NP\_443170.1)

[0225] WO2003077836; WO200138490 (청구항 6, 도 18E-1-18-E-2); Davis et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; WO2003089624 (청구항 8); EP1347046 (청구항 1); WO2003089624 (청구항 7);

[0226] (35) IRTA2 (이뮤노글로불린 상위부류 수용체 전위 관련 2, B 세포 발생 및 림프종발생에서 가능한 역할을 갖는 추정 면역수용체; 전위에 의한 유전자의 탈조절이 일부 B 세포 악성종양에서 일어남); 977 aa, pI: 6.88 MW: 106468 TM: 1 [P] 유전자 염색체: 1q21, 진뱅크 등록 번호 인간:AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; 마우스:AK089756, AY158090, AY506558; NP\_112571.1

[0227] WO2003024392 (청구항 2, 도 97); Nakayama et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; WO2003077836; WO200138490 (청구항 3, 도 18B-1-18B-2);

[0228] (36) TENB2 (TMEFF2, 토모레귤린, TPEF, HPP1, TR, 추정 막횡단 프로테오글리칸 (성장 인자의 EGF/헤襁귤린 부류 및 폴리스타틴과 관련됨)); 374 aa, NCBI 등록: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP\_057276; NCBI 유전자: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; 진뱅크 등록 번호 AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436

[0229] WO2004074320 (서열 810); JP2004113151 (서열 2, 4, 8); WO2003042661 (서열 580); WO2003009814 (서열 411); EP1295944 (페이지 69-70); WO200230268 (페이지 329); WO200190304 (서열 2706); US2004249130; US2004022727; WO2004063355; US2004197325; US2003232350; US2004005563; US2003124579; Horie et al. (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang et al. (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynne-Jones et al. (2001) Int J Cancer. Oct 15;94(2):178-84;

[0230] (37) PMEL17 (은 상동체; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100) BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM\_006928; McGlinchey,R.P. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (33), 13731-13736; Kummer,M.P. et al. (2009) J. Biol. Chem. 284 (4), 2296-2306;

[0231] (38) TMEFF1 (EGF-유사 및 2개의 폴리스타틴-유사 도메인을 갖는 막횡단 단백질 1; 토모레귤린-1; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961) NM\_080655; NM\_003692; Harms, P.W. (2003) Genes Dev. 17 (21), 2624-2629; Gery, S. et al. (2003) Oncogene 22 (18):2723-2727;

[0232] (39) GDNF-Ra1 (GDNF 부류 수용체 알파 1; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-알파1; GFR-알파-1; U95847; BC014962; NM\_145793) NM\_005264; Kim,M.H. et al. (2009) Mol. Cell. Biol. 29 (8), 2264-2277; Treanor, J.J. et al. (1996) Nature 382 (6586):80-83;

[0233] (40) Ly6E (림프구 항원 6 복합체, 로커스 E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1) NP\_002337.1; NM\_002346.2; de Nooij-van Dalen,A.G. et al. (2003) Int. J. Cancer 103 (6), 768-774; Zammit,D.J. et al. (2002) Mol. Cell. Biol. 22 (3):946-952;

[0234] (41) TMEM46 (shisa 상동체 2 (크세노포스 라에비스(Xenopus laevis)); SHISA2) NP\_001007539.1; NM\_001007538.1; Furushima,K. et al. (2007) Dev. Biol. 306 (2), 480-492; Clark,H.F. et al. (2003) Genome Res. 13 (10):2265-2270;

[0235] (42) Ly6G6D (림프구 항원 6 복합체, 로커스 G6D; Ly6-D, MEGT1) NP\_067079.2; NM\_021246.2; Mallya, M. et al. (2002) Genomics 80 (1):113-123; Ribas,G. et al. (1999) J. Immunol. 163 (1):278-287;

[0236] (43) LGR5 (류신-풍부 반복부-함유 G 단백질-커플링된 수용체 5; GPR49, GPR67) NP\_003658.1; NM\_003667.2; Salanti,G. et al. (2009) Am. J. Epidemiol. 170 (5):537-545; Yamamoto,Y. et al. (2003) Hepatology 37 (3):528-533;

[0237] (44) RET (ret 원종양유전자; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; (PTC); CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE1) NP\_066124.1; NM\_020975.4; Tsukamoto,H. et al. (2009) Cancer Sci. 100 (10):1895-1901; Narita,N. et al.

(2009) Oncogene 28 (34):3058-3068;

[0238] (45) LY6K (램프구 항원 6 복합체, 로커스 K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226) NP\_059997.3; NM\_017527.3; Ishikawa,N. et al. (2007) Cancer Res. 67 (24):11601-11611; de Nooij-van Dalen,A.G. et al. (2003) Int. J. Cancer 103 (6):768-774;

[0239] (46) GPR19 (G 단백질-커플링된 수용체 19; Mm.4787) NP\_006134.1; NM\_006143.2; Montpetit, A. 및 Sinnott,D. (1999) Hum. Genet. 105 (1-2):162-164; O'Dowd, B.F. et al. (1996) FEBS Lett. 394 (3):325-329;

[0240] (47) GPR54 (KISS1 수용체; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12) NP\_115940.2; NM\_032551.4; Navenot, J.M. et al. (2009) Mol. Pharmacol. 75 (6):1300-1306; Hata, K. et al. (2009) Anticancer Res. 29 (2):617-623;

[0241] (48) ASPHD1 (아스파르테이트 베타-히드록실라제 도메인 함유 1; LOC253982) NP\_859069.2; NM\_181718.3; Gerhard, D.S. et al. (2004) Genome Res. 14 (10B):2121-2127;

[0242] (49) 티로시나제 (TYR; OCAIA; OCA1A; 티로시나제; SHEP3) NP\_000363.1; NM\_000372.4; Bishop,D.T. et al. (2009) Nat. Genet. 41 (8):920-925; Nan, H. et al. (2009) Int. J. Cancer 125 (4):909-917;

[0243] (50) TMEM118 (고리 평거 단백질, 막횡단 2; RNFT2; FLJ14627) NP\_001103373.1; NM\_001109903.1; Clark, H.F. et al. (2003) Genome Res. 13 (10):2265-2270; Scherer,S.E. et al. (2006) Nature 440 (7082):346-351

[0244] (51) GPR172A (G 단백질-커플링된 수용체 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e) NP\_078807.1; NM\_024531.3; Ericsson, T.A. et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (11):6759-6764; Takeda, S. et al. (2002) FEBS Lett. 520 (1-3):97-101.

[0245] 모 항체는 또한 일부민-결합 웨티드 (ABP) 서열을 포함하는 융합 단백질일 수 있다 (문헌 [Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043]; WO 01/45746). 본 발명의 항체는 (i) 문헌 [Dennis et al. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043] (표 III 및 IV, 페이지 35038); (ii) US 20040001827 ([0076]의 서열 9-22); 및 (iii) WO 01/45746 (페이지 12-13, 서열 z1-z14) (이들은 모두 본원에 참고로 포함됨)에 의해 교시된 ABP 서열을 갖는 융합 단백질을 `` 포함한다.

[0246] 돌연변이유발

[0247] 출발 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 DNA는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법은 폴리펩티드를 코딩하는 앞서 제조된 DNA의 부위-지정 (또는 올리고뉴클레오티드-매개) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 재조합 항체의 변이체는 제한 단편 조작에 의해 또는 합성 올리고뉴클레오티드를 사용한 중복 신장 PCR에 의해서도 또한 제조할 수 있다. 돌연변이유발 프라이머는 시스테인 코돈 대체물(들)을 코딩한다. 표준 돌연변이유발 기술은 이러한 돌연변이체 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 일반적인 안내는 문헌 [Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]; 및 [Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993]에서 찾아볼 수 있다.

[0248] 부위-지정 돌연변이유발은 치환 변이체, 즉 돌연변이체 단백질을 제조하기 위한 한 가지 방법이다. 상기 기술은 당업계에 주지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Carter (1985) et al. Nucleic Acids Res. 13:4431-4443]; [Ho et al. (1989) Gene (Amst.) 77:51-59]; 및 [Kunkel et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488] 참조). 간략하게, DNA의 부위-지정 돌연변이유발을 수행하는데 있어서, 출발 DNA는 먼저 원하는 돌연변이를 코딩하는 올리고뉴클레오티드를 이러한 출발 DNA의 단일 가닥에 혼성화시킴으로써 변경된다. 혼성화 후에, 혼성화된 올리고뉴클레오티드를 프라이머로서 사용하고 출발 DNA의 단일 가닥을 주형으로서 사용하면서 DNA 중합효소를 사용하여 전체 제2 가닥을 합성한다. 따라서, 바람직한 돌연변이를 코딩하는 올리고뉴클레오티드는 생성된 이중 가닥 DNA 내에 도입된다. 부위-지정 돌연변이유발은 발현 플라스미드에서 돌연변이유발될 단백질을 발현하는 유전자 내에서 수행될 수 있고, 생성된 플라스미드는 바람직한 시스테인 대체 돌연변이의 도입을 확인하기 위해 서열분석될 수 있다 (문헌 [Liu et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260]). 상업적으로 이용 가능한 것, 예를 들어 퀵체인저(QuikChange)<sup>®</sup> 다중 부위 지정 돌연변이유발 키트 (스트라타젠 (Stratagene), 미국 캘리포니아주 라 졸라)를 포함한 부위-지정 돌연변이유발 프로토콜 및 포맷이 존재한다.

- [0249] PCR 돌연변이유발은 또한 출발 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체를 만드는데 적합한다. 문헌 [Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press]; [Ito et al. (1991) Gene 102:67-70]; [Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132]; 및 [Vallette et al. (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733]을 참조한다. 간략하게, 소량의 주형 DNA를 PCR에서 출발 물질로 사용하였을 때, 주형 DNA에서 상응하는 영역으로부터의 서열이 약간 상이한 프라이머를 사용하여, 프라이머가 주형과 상이한 위치에서만 주형 서열과 상이한 특이적 DNA 단편을 비교적 대량으로 생성할 수 있다.
- [0250] 변이체를 제조하기 위한 다른 방법인 카세트 돌연변이유발은 문헌 [Wells et al. (1985) Gene 34:315-323]에 기재된 기술을 기초로 한다. 출발 물질은 돌연변이시킬 출발 폴리펩티드 DNA를 포함하는 플라스미드 (또는 다른 벡터)이다. 돌연변이시킬 출발 DNA 내의 코돈(들)이 확인된다. 확인된 돌연변이 부위(들)의 각각의 측면상에 특유한 제한 엔도뉴클레아제 부위가 존재해야 한다. 그러한 제한 부위가 존재하지 않으면, 이들을 출발 폴리펩티드 DNA 내의 적절한 위치에 도입하기 위해 상기 기재된 올리고뉴클레오티드-매개 돌연변이유발 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 플라스미드 DNA는 선형화를 위해 상기 부위에서 절단된다. 제한 부위 사이의 DNA의 서열을 코딩하지만 바람직한 돌연변이(들)을 함유하는 이중 가닥의 올리고뉴클레오티드는 표준 절차를 이용하여 합성되고, 여기서 올리고뉴클레오티드의 2개의 가닥은 따로 합성된 후, 표준 기술을 이용하여 함께 혼성화된다. 상기 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 카세트로서 지칭된다. 상기 카세트는 플라스미드에 직접 라이게이션될 수 있도록 선형화된 플라스미드의 단부들과 적합성인 5' 및 3' 말단을 갖도록 설계된다. 상기 플라스미드는 이제 돌연변이된 DNA 서열을 함유한다. 코딩된 시스테인 대체를 포함하는 돌연변이체 DNA는 DNA 서열분석에서 확인될 수 있다.
- [0251] 단일 돌연변이는 또한 PCR 기반 돌연변이유발에 의해 주형으로서 이중 가닥 플라스미드 DNA를 사용하는 올리고뉴클레오티드 지정 돌연변이유발에 의해 생성된다 (문헌 [Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition]; [Zoller et al. (1983) Methods Enzymol. 100:468-500]; [Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500]).
- [0252] 본 발명에서, M13 파지 상에 디스플레이된 hu4D5Fabv8 (문헌 [Gerstner et al. (2002) "Sequence Plasticity In The Antigen-Binding Site Of A Therapeutic Anti-HER2 Antibody", J Mol Biol. 321:851-62])을 실험에서 모델 시스템으로 사용하였다. 시스테인 돌연변이는 hu4D5Fabv8-파지, hu4D5Fabv8, 및 ABP-hu4D5Fabv8 구축물에 도입된다. hu4D5-티오Fab-파지 프렙을 앞서 기재된 바와 같은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 침전 방법을 이용하여 수행하였다 (문헌 [Lowman, Henry B. (1998) Methods in Molecular Biology (Totowa, New Jersey) 87 (Combinatorial Peptide Library Protocols) 249-264]).
- [0253] 올리고뉴클레오티드는 포스포르아미다이트 합성 방법에 의해 제조된다 (US 4415732; US 4458066; 문헌 [Beaucage, S. and Iyer, R. (1992) "Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach", Tetrahedron 48:2223-2311]). 포스포르아미다이트 방법은 반응성 3' 포스포르아미다이트 모이어티를 갖는 뉴클레오티드 단량체를 제어된-공극 유리 또는 고도로 가교된 폴리스티렌으로 구성된 고체-지지체 상에서 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄에, 가장 통상적으로는 3' 말단 뉴클레오시드가 합성 시작시에 고체-지지체 상에 부착되는 3' → 5' 방향으로 주기적으로 부가하는 것을 수반한다 (US 5047524; US 5262530). 이 방법은 일반적으로 자동화된, 시판 합성기 (애플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 미국 캘리포니아주 포스터 시티)를 사용하여 시행된다. 올리고뉴클레오티드는 검출, 포획, 안정화 또는 다른 목적을 위해 비-동위원소 모이어티로 화학적으로 표지될 수 있다 (문헌 [Andrus, A. "Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers" (1995) in PCR 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp. 39-54]; [Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]; [Keller, G. and Manak, M. in DNA Probes Second Edition (1993), Stockton Press, New York, pp. 121-23]).
- [0254] PHESELECTOR 검정
- [0255] PHESELECTOR (반응성 티올의 선택을 위한 파지 ELISA) 검정은 ELISA 파지 포맷으로 항체 내의 반응성 시스테인 기의 검출을 허용한다 (US 7521541; 문헌 [Junutula JR et al. "Rapid identification of reactive cystein residues for site-specific labeling of antibody-Fabs" J Immunol Methods 2008;332:41-52]). 관심 단백질 (예를 들어, 항체)을 웰 표면 상에 코팅하고, 이어서 파지 입자와 인큐베이션한 후에 흡광도를 검출하면서 HRP 표지된 2차 항체와 인큐베이션하는 방법이 실시에 2에 상세하게 기재되어 있다. 파지 상에 디스플레이된 돌연변이체 단백질은 신속하고 강력한 고효율 방식으로 스크리닝될 수 있다. 시스테인 조작된 항체의 라이브러리를

제조하여, 항체 또는 다른 단백질의 무작위 단백질-파지 라이브리리로부터 유리 Cys 혼입을 위한 적절하게 반응 성인 부위를 확인하기 위한 것과 동일한 방법을 사용하여 결합에 대해 선택할 수 있다. 상기 기술은 파지 상에 디스플레이된 시스테인 돌연변이체 단백질을 또한 티올-반응성인 친화도 시약 또는 리포터 기와 반응시키는 것을 포함한다. 도 8은 HER2에 대한 Fab 또는 티오Fab의 결합(상부) 및 스트렙타비딘에 대한 비오티닐화된 티오Fab 결합(하부)을 묘사하는 도식적 표현에 의해 PHESELECTOR 검정을 설명한다.

#### [0256] 단백질 발현 및 정제

시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리하여 서열을 결정할 수 있다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 공급원으로서 기능한다. DNA가 일단 단리되면, 이것을 발현 벡터에 위치시킬 수 있고, 이후에는 이것을 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 항체 단백질을 달리 생성하지는 않는 다른 포유동물 숙주 세포, 예를 들어 골수 종 세포 (US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) 등에 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성물을 얻을 수 있다. hu4D5Fabv8 시스테인 조작된 항체의 수율은 야생형 hu4D5Fabv8과 유사하였다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 검토 문헌을 문헌 [Skerra et al. (1993) *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262] 및 [Pluckthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151-188]을 포함한다.

[0258] 설계 및 선택 후에, 고도로 반응성인 쌍을 이루지 않은 Cys 잔기를 갖는 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 티오Fab은 (i) 박테리아, 예를 들어 이. 콜라이, 시스템 또는 포유동물 세포 배양 시스템 (WO 01/00245), 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO)에서의 발현; 및 (ii) 통상적인 단백질 정제 기술을 사용한 정제 (문헌 [Lowman et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(17):10982-10988])에 의해 생성될 수 있다.

[0259] 티오Fab은 34B8, 비-저해제 이. 콜라이 균주에서 유도시에 발현되었다 (문헌 [Baca et al. (1997) *Journal Biological Chemistry* 272(16):10678-84]). 실시예 3a를 참조한다. 수확된 세포 펠릿을 PBS (포스페이트 완충 염수)에 재현탁시키고, 전체 세포 용해를 마이크로플루이다이저를 통해 통과시켜 수행하고, 티오Fab을 단백질 G 세파로스<sup>TM</sup> (아머샴(Amersham))를 사용하는 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 티오Fab을 상기 기재된 바와 같이 비오틴-PEO-말레이미드와 접합시키고, 비오티닐화된 티오Fab을 유리 비오틴-PEO-말레이미드 및 티오Fab의 올리고머 분획을 제거하는 슈퍼덱스(Superdex)-200<sup>TM</sup> (아머샴) 젤 여과 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

#### [0260] 질량 분광법 분석

[0261] 액체 크로마토그래피 전기분무 이온화 질량 분광측정 (LC-ESI-MS) 분석은 비오틴 접합된 Fab의 정확한 분자량 결정을 위해 사용하였다 (문헌 [Cole, R.B. *Electro Spray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation And Applications.* (1997) Wiley, New York]). 비오티닐화된 hu4D5Fabv8 (A121C) 펩티드의 아미노산 서열은 트립신 소화에 이어 LC-ESI-랜덤 MS 분석에 의해 결정하였다 (표 4, 실시예 3b).

[0262] 항체 Fab 단편 hu4D5Fabv8은 10개의 Cys 잔기 (5개는 경쇄 상에 있고, 5개는 중쇄 상에 있음)를 포함하는 약 445개 아미노산 잔기를 함유한다. 인간화 4D5 가변 단편 (Fv4D5)의 고해상도 구조가 확립되었다 (문헌 [Eigenbrot et al. "X-Ray Structures Of The Antigen-Binding Domains From Three Variants Of Humanized Anti-P185her2 Antibody 4D5 And Comparison With Molecular Modeling" (1993) *J Mol Biol.* 229:969-995] 참조). 모든 Cys 잔기는 디솔피드 결합의 형태로 존재하고, 이에 따라 이들 잔기는 (환원제로 처리되지 않는 한) 지르코늄-말레이미드와의 접합체에 대한 임의의 반응성 티올 기를 갖지 않는다. 따라서, 새롭게 조작된 Cys 잔기는 쌍을 이루지 않고 유지될 수 있고, 친전자성 링커 시약 또는 지르코늄-링커 중간체, 예컨대 지르코늄-말레이미드와 반응할 수 있다 (즉, 이에 접합될 수 있다). 도 1a는 X선 결정 좌표에 의해 유래된 hu4D5Fabv8 항체 단편의 3차원 표현을 보여준다. 중쇄 및 경쇄의 조작된 Cys 잔기의 구조 위치는 순차적 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다. 이 순차적 넘버링 시스템은 도 1b에 따른 트라스투주맙의 4d5v7fabH 변이체에 대한 카바트 넘버링 시스템 (문헌 [Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD])과 상관관계가 있으며, a, b, c에 의해 언급되는 삽입에 의한 카바트 넘버링 방식 (하부 열)과 상이한 N-말단에서 출발하는 순차적 넘버링 방식 (상부 열)을 보여준다. 카바트 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 이에 대한 삽입에 상응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 시스테인 조작된 중쇄 변이체 부위는 하기 차트에서 순차적 넘버링 및 카바트 넘버링 방식에 의해 확인된다.

| 4D5Fab 중쇄 변이체 | 순차적 넘버링 | 카바트 넘버링 |
|---------------|---------|---------|
| A40C          | Ala-40  | Ala-40  |
| A88C          | Ala-88  | Ala-84  |
| S119C         | Ser-119 | Ser-112 |
| S120C         | Ser-120 | Ser-113 |
| A121C         | Ala-121 | Ala-114 |
| S122C         | Ser-122 | Ser-115 |
| A175C         | Ala-175 | Ala-168 |

[0263]

M13 파지미드-Cys 돌연변이체 Fab (도 3a 및 3b)은 Fab 단백질과 비교하여 빠르게 스크리닝될 수 있다. 항원 및 스트렙타비딘에 대한 파지미드-티오Fab 결합은 실시예 2에 기재되고 도 8에 도시된 바와 같이 각각 HER2 및 스트렙타비딘을 ELISA 플레이트 상에 코팅한 후에 항-Fab-HRP (양고추냉이 페옥시다제)로 프로빙하여 시험할 수 있다. 이 방법은 조작된 Cys 잔기/접합된 비오틴 분자에 의한 티올 기의 반응성 및 항원 결합에 대한 효과의 동시 모니터링을 허용한다. 또한, 이 방법은 M13 파지 상에 디스플레이된 임의의 단백질에 대해 반응성 티올 기를 스크리닝하는데 적용할 수 있다. 접합된 또는 접합되지 않은 파지미드-티오Fab은 간단한 PEG 침전에 의해 정제된다.

[0264]

인간화 4D5의 항원-결합 단편 (hu4D5Fab)은 이. 콜라이에서 잘 발현되고, 박테리오파지 상에 디스플레이된다 (문헌 [Garrard et al. (1993) Gene 128:103-109]). 항체 Fab 단편 hu4D5Fabv8은 티올 반응성을 프로빙하기 위한 ELISA 기반 검정에서 모델 시스템으로서 M13 파지 상에 디스플레이된다. 도 8은 비오틴화된 티오Fab 파지 및 항-파지 HRP 항체의 HER2 (상부) 및 스트렙타비딘 (하부)에 대한 결합을 묘사하는, PHESELECTOR 검정의 그래프 표현이다. 5개 아미노산 잔기 (L-Ala43, H-Ala40, H-Ser119, H-Ala121 및 H-Ser122)를 처음에 항원 결합 표면으로부터 멀리 떨어진 것으로 결정 구조 정보로부터 선택하였다 (문헌 [Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995]). 단백질 데이터베이스 X선 결정 구조를 1FVC로 지칭하였다. Cys 잔기를 부위 지정 돌연변이유발에 의해 이들 위치에서 조작하였다. 티오Fab-파지 제제를 단리하고, 비오틴화 시약과 반응시켰다.

[0265]

비오틴 접합된 및 접합되지 않은 변이체를 HRP (양고추냉이 페옥시다제)-접합된 항-파지 항체를 사용하는 ELISA 기반 PHESELECTOR 검정 (도 8, 실시예 2)을 이용하여 HER2 및 스트렙타비딘 결합에 대해 시험하였다. 비-비오틴화된 파지-hu4D5Fabv8 (도 2a) 및 비오틴화된 파지-hu4D5Fabv8 (도 2b)의 BSA (개방 박스), HER2 (회색 박스) 또는 스트렙타비딘 (충전된 박스)과의 상호작용을 항-M13-양고추냉이 페옥시다제 (HRP) 항체를 통해 표준 HRP 반응의 발생 및 450 nm에서의 흡광도 측정에 의해 모니터링하였다. 비색계 기질의 텐오버에 의해 생성된 흡광도를 450 nm에서 측정하였다. 티오Fab의 HER2와의 반응성은 항원 결합을 측정한다. 티오Fab의 스트렙타비딘과의 반응성은 비오틴화 정도를 측정한다. 티오Fab의 BSA와의 반응성은 비특이적 상호작용에 대한 음성 대조군이다. 도 2a에서 나타난 바와 같이, 모든 티오Fab-파지 변이체는 야생형 hu4D5Fabv8-파지와 비교하여 HER2에 대해 유사한 결합을 나타낸다. 또한, 비오틴과의 접합은 HER2에 대한 티오Fab 결합을 방해하지 않는다 (도 2b).

[0266]

놀랍고도 예상치 못하게, 티오Fab-파지 샘플은 다양한 수준의 스트렙타비딘 결합 활성을 나타내었다. 모든 시험된 파지-티오Fab으로부터, A121C 시스테인 조작된 항체는 최대 티올 반응성을 나타내었다. 야생형 hu4D5Fabv8-파지를 동일한 양의 비오틴-말레이미드와 인큐베이션하더라도, 이들 파지는 거의 스트렙타비딘 결합을 나타내지 않으며, 이는 hu4D5Fabv8 및 M13 파지 외피 단백질로부터의 기존의 시스테인 잔기 (디술피드 결합 형성에 관여함)가 비오틴-말레이미드의 부위 특이적 접합을 방해하지 않는다는 것을 나타낸다. 이들 결과는 파지 ELISA 검정이 Fab 표면 상의 반응성 티올 기를 성공적으로 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다는 것을 입증한다.

[0267]

PHESELECTOR 분석은 항체 내의 반응성 티올 기의 스크리닝을 허용한다. 이 방법에 의한 A121C 변이체의 확인은 예시적인 것이다. 전체 Fab 분자는 반응성 티올 기를 갖는 보다 많은 티오Fab 변이체를 확인하기 위해 효과적으로 조사될 수 있다. 분획별 표면 접근성 파라미터를 사용하여 폴리펩ти드 내의 아미노산 잔기에 대한 용매의 접근성을 확인 및 정량하였다. 표면 접근성은 용매 분자, 예를 들어 물이 접촉할 수 있는 표면적 ( $\text{Å}^2$ )으로 표현할 수 있다. 물의 접유 공간은  $1.4\text{\AA}$  반경 구체와 비슷하다. 소프트웨어는 공자의 x-선 결정학 유래된 좌표를 사용하여 단백질의 각각의 아미노산의 표면 접근성을 계산하기 위한 알고리즘을 이용하는 결정학 프로그램의 CCP4 Suite (문헌 ["The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763])로서 무료로 이용가능하거나 허가를 받아 사용할 수 있다 (CCP4에 대한 대용, 다레버리 레보러토리 (Daresbury Laboratory), 영국, WA4 4AD, 워링تون, Fax: (+44) 1925 603825, 또는 internet: [www ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html](http://www ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)). 표면 접근성 계산을 수행하는 2개의 예시적인 소프트웨어 모듈은 문

현 [B.Lee and F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400]의 알고리즘을 기초로 한 "AREAIMOL" 및 "SURFACE"이다. AREAIMOL은 단백질의 용매 접근가능한 표면을 프로브 구 (용매 분자를 나타냄) 중심의 궤적으로서 정의하는데, 이것이 단백질의 반 데르 발스 (Van der Waals) 표면을 굴러다니기 때문이다. AREAIMOL은 (원자 반경과 프로브 반경의 합과 동일한, 원자 중심에서의 거리에서) 각 원자 주위의 연장된 구 상에 표면 지점을 생성하고 이웃하는 원자들과 관련된 등등한 구 내에 있는 것들을 제거하여 용매 접근가능한 표면적을 계산한다. AREAIMOL은 PDB 좌표 파일에서 원자의 용매 접근가능한 면적을 찾아내고, 상기 접근가능한 면적을 잰기, 쇄에 의해 전체 분자에 대해 총괄한다. 개개의 원자에 대하여 접근가능한 면적 (또는 면적 차이)은 슈도-PDB 아웃풋 (pseudo-PDB output) 파일에 기록될 수 있다. AREAIMOL은 각 원소에 대한 단일 반경을 추정하고, 오직 제한된 수의 상이한 원소들만을 인식한다. 알려지지 않은 원자 유형 (즉, AREAIMOL의 내부 데이터베이스에 없음)은 1.8 Å의 디폴트 반경을 할당받을 것이다. 인정된 원자의 목록은 다음과 같다.

| 원자 | 원자번호 | 반 데르 발스 반경 (Å) |
|----|------|----------------|
| C  | 6    | 1.80           |
| N  | 7    | 1.65           |
| O  | 8    | 1.60           |
| Mg | 12   | 1.60           |
| S  | 16   | 1.85           |
| P  | 15   | 1.90           |
| Cl | 17   | 1.80           |
| Co | 27   | 1.80           |

[0269]

[0270] AREAIMOL 및 SURFACE는 절대적 접근성, 즉 평방 옹스트롬(Å)의 수를 보고한다. 분획별 표면 접근성은 폴리펩티드 내 아미노산과 연관된 표준 상태를 참조하여 계산된다. 참조 상태는 트리펩티드 Gly-X-Gly이며, 여기서 X는 바람직한 아미노산이고, 참조 상태는 '연장된' 형상, 즉, 베타-가닥으로 존재하는 것과 같아야 한다. 연장된 형상은 X의 접근성을 최대화한다. 접근가능한 면적의 계산치를 Gly-X-Gly 트리펩티드 참조 상태 내의 접근 가능한 면적으로 나누고 그 몫을 보고하는데, 이것이 분획별 접근성이다. 접근성(%)은 분획별 접근용이성 x 100의 값이다.

[0271]

표면 접근성을 계산하기 위한 또 다른 예시적인 알고리즘은 폴리펩티드의 X선 좌표에 기초하여 물 구체에 대한 아미노산 잔기의 분획별 접근성을 계산하는 프로그램 xsae (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)의 SOLV 모듈을 기초로 한다.

[0272]

hu4D5Fabv7의 모든 아미노산에 대한 분획별 표면 접근성을 결정 구조 정보를 사용하여 계산하였다 (문헌 [Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995]). hu4D5Fabv7의 경쇄 및 중쇄의 아미노산에 대한 분획별 표면 접근성을 표 1에 내림 차순으로 나타내었다.

**표 1****hu4D5Fabv7- 경쇄**

|                             |                            |
|-----------------------------|----------------------------|
| SER A 202 frac acc= 101.236 | ASP A 151 frac acc= 41.586 |
| GLY A 41 frac acc= 90.775   | SER A 12 frac acc= 40.633  |
| GLY A 157 frac acc= 88.186  | ASN A 210 frac acc= 40.158 |
| ASP A 1 frac acc= 87.743    | SER A 63 frac acc= 39.872  |
| SER A 156 frac acc= 83.742  | ARG A 66 frac acc= 39.669  |
| GLY A 57 frac acc= 81.611   | PRO A 8 frac acc= 39.297   |
| SER A 168 frac acc= 79.680  | SER A 65 frac acc= 39.219  |
| SER A 56 frac acc= 79.181   | SER A 77 frac acc= 38.820  |
| LYS A 169 frac acc= 77.591  | THR A 180 frac acc= 38.296 |
| SER A 60 frac acc= 75.291   | ASP A 185 frac acc= 38.234 |
| THR A 109 frac acc= 74.603  | THR A 31 frac acc= 38.106  |
| CYS A 214 frac acc= 72.021  | THR A 94 frac acc= 37.452  |
| LYS A 126 frac acc= 71.002  | THR A 93 frac acc= 37.213  |
| SER A 67 frac acc= 66.694   | THR A 197 frac acc= 36.709 |
| ARG A 18 frac acc= 66.126   | SER A 182 frac acc= 36.424 |
| ASN A 152 frac acc= 65.415  | GLY A 128 frac acc= 35.779 |
| SER A 127 frac acc= 65.345  | LYS A 207 frac acc= 35.638 |
| LYS A 190 frac acc= 65.189  | ASP A 17 frac acc= 35.413  |
| LYS A 145 frac acc= 63.342  | GLY A 200 frac acc= 35.274 |
| GLN A 199 frac acc= 62.470  | GLU A 165 frac acc= 35.067 |
| GLU A 143 frac acc= 61.681  | ALA A 112 frac acc= 34.912 |
| GLN A 3 frac acc= 59.976    | GLN A 79 frac acc= 34.601  |
| LYS A 188 frac acc= 59.680  | VAL A 191 frac acc= 33.935 |
| ARG A 24 frac acc= 59.458   | SER A 208 frac acc= 33.525 |
| PHE A 53 frac acc= 58.705   | LYS A 39 frac acc= 33.446  |
| SER A 9 frac acc= 58.446    | GLU A 123 frac acc= 32.486 |
| GLN A 27 frac acc= 57.247   | THR A 69 frac acc= 32.276  |
| ALA A 153 frac acc= 56.538  | SER A 76 frac acc= 32.108  |
| SER A 203 frac acc= 55.864  | HIS A 189 frac acc= 31.984 |
| LYS A 42 frac acc= 54.730   | ARG A 108 frac acc= 31.915 |
| GLY A 16 frac acc= 54.612   | ASN A 158 frac acc= 31.447 |
| LYS A 45 frac acc= 54.464   | VAL A 205 frac acc= 31.305 |
| PRO A 204 frac acc= 53.172  | SER A 14 frac acc= 31.094  |
| GLU A 213 frac acc= 53.084  | GLN A 155 frac acc= 30.630 |
| ALA A 184 frac acc= 52.556  | GLU A 187 frac acc= 30.328 |
| VAL A 15 frac acc= 52.460   | ARG A 211 frac acc= 30.027 |
| SER A 7 frac acc= 51.936    | LYS A 183 frac acc= 29.751 |
| LEU A 154 frac acc= 51.525  | ASN A 138 frac acc= 29.306 |
| GLN A 100 frac acc= 51.195  | ASP A 170 frac acc= 29.041 |
| SER A 10 frac acc= 49.907   | SER A 159 frac acc= 27.705 |
| THR A 5 frac acc= 48.879    | GLN A 147 frac acc= 27.485 |
| THR A 206 frac acc= 48.853  | THR A 22 frac acc= 27.121  |
| ASP A 28 frac acc= 48.758   | ALA A 43 frac acc= 26.801  |
| GLY A 68 frac acc= 48.690   | ARG A 142 frac acc= 26.447 |
| THR A 20 frac acc= 48.675   | LEU A 54 frac acc= 25.882  |
| ASP A 122 frac acc= 47.359  | ASP A 167 frac acc= 25.785 |
| PRO A 80 frac acc= 46.984   | THR A 129 frac acc= 23.880 |
| SER A 52 frac acc= 46.917   | ALA A 144 frac acc= 23.652 |
| SER A 26 frac acc= 46.712   | VAL A 163 frac acc= 22.261 |
| TYR A 92 frac acc= 46.218   | PRO A 95 frac acc= 20.607  |
| LYS A 107 frac acc= 45.912  | ALA A 111 frac acc= 19.942 |
| GLU A 161 frac acc= 45.100  | LYS A 103 frac acc= 18.647 |
| VAL A 110 frac acc= 44.844  | LEU A 181 frac acc= 18.312 |
| GLU A 81 frac acc= 44.578   | THR A 72 frac acc= 18.226  |
| PRO A 59 frac acc= 44.290   | GLU A 195 frac acc= 18.006 |
| ASN A 30 frac acc= 42.721   | THR A 178 frac acc= 17.499 |
| GLN A 160 frac acc= 42.692  | THR A 85 frac acc= 17.343  |

|       |     |           |        |       |     |           |        |
|-------|-----|-----------|--------|-------|-----|-----------|--------|
| SER A | 114 | frac acc= | 42.374 | ASP A | 70  | frac acc= | 17.194 |
| PRO A | 40  | frac acc= | 41.928 | LEU A | 11  | frac acc= | 16.568 |
| PHE A | 116 | frac acc= | 16.406 | LEU A | 125 | frac acc= | 2.398  |
| THR A | 97  | frac acc= | 16.204 | PRO A | 96  | frac acc= | 2.387  |
| ARG A | 61  | frac acc= | 16.192 | LEU A | 47  | frac acc= | 2.180  |
| TYR A | 49  | frac acc= | 16.076 | ALA A | 51  | frac acc= | 1.837  |
| SER A | 50  | frac acc= | 15.746 | PHE A | 118 | frac acc= | 1.779  |
| LYS A | 149 | frac acc= | 15.510 | PHE A | 62  | frac acc= | 1.581  |
| GLU A | 55  | frac acc= | 14.927 | ALA A | 25  | frac acc= | 1.538  |
| LEU A | 201 | frac acc= | 14.012 | VAL A | 133 | frac acc= | 1.315  |
| GLY A | 64  | frac acc= | 13.735 | ASP A | 82  | frac acc= | 1.141  |
| GLY A | 212 | frac acc= | 13.396 | LEU A | 179 | frac acc= | 0.872  |
| PHE A | 98  | frac acc= | 12.852 | GLN A | 124 | frac acc= | 0.787  |
| THR A | 74  | frac acc= | 12.169 | MET A | 4   | frac acc= | 0.778  |
| SER A | 171 | frac acc= | 11.536 | SER A | 177 | frac acc= | 0.693  |
| PRO A | 141 | frac acc= | 11.073 | SER A | 131 | frac acc= | 0.693  |
| PHE A | 83  | frac acc= | 10.871 | LEU A | 135 | frac acc= | 0.654  |
| THR A | 164 | frac acc= | 10.325 | PHE A | 71  | frac acc= | 0.593  |
| ALA A | 32  | frac acc= | 9.971  | TRP A | 35  | frac acc= | 0.448  |
| HIS A | 198 | frac acc= | 9.958  | PHE A | 209 | frac acc= | 0.395  |
| VAL A | 146 | frac acc= | 9.861  | TYR A | 186 | frac acc= | 0.259  |
| SER A | 121 | frac acc= | 9.833  | LEU A | 78  | frac acc= | 0.157  |
| ALA A | 13  | frac acc= | 9.615  | VAL A | 196 | frac acc= | 0.000  |
| GLU A | 105 | frac acc= | 9.416  | VAL A | 132 | frac acc= | 0.000  |
| SER A | 162 | frac acc= | 9.304  | VAL A | 104 | frac acc= | 0.000  |
| ILE A | 117 | frac acc= | 8.780  | VAL A | 33  | frac acc= | 0.000  |
| HIS A | 91  | frac acc= | 8.557  | VAL A | 29  | frac acc= | 0.000  |
| ALA A | 193 | frac acc= | 8.547  | TYR A | 192 | frac acc= | 0.000  |
| GLN A | 37  | frac acc= | 8.442  | TYR A | 86  | frac acc= | 0.000  |
| VAL A | 58  | frac acc= | 8.281  | TYR A | 36  | frac acc= | 0.000  |
| PRO A | 120 | frac acc= | 8.095  | THR A | 102 | frac acc= | 0.000  |
| GLN A | 38  | frac acc= | 6.643  | SER A | 174 | frac acc= | 0.000  |
| PRO A | 113 | frac acc= | 6.594  | PHE A | 139 | frac acc= | 0.000  |
| GLY A | 101 | frac acc= | 6.558  | LEU A | 136 | frac acc= | 0.000  |
| TYR A | 140 | frac acc= | 5.894  | LEU A | 73  | frac acc= | 0.000  |
| VAL A | 115 | frac acc= | 5.712  | ILE A | 75  | frac acc= | 0.000  |
| TYR A | 87  | frac acc= | 4.539  | ILE A | 48  | frac acc= | 0.000  |
| SER A | 176 | frac acc= | 4.106  | ILE A | 21  | frac acc= | 0.000  |
| ILE A | 2   | frac acc= | 4.080  | GLN A | 90  | frac acc= | 0.000  |
| ASN A | 137 | frac acc= | 3.906  | GLN A | 89  | frac acc= | 0.000  |
| TRP A | 148 | frac acc= | 3.676  | CYS A | 194 | frac acc= | 0.000  |
| GLY A | 99  | frac acc= | 3.550  | CYS A | 134 | frac acc= | 0.000  |
| PRO A | 44  | frac acc= | 3.543  | CYS A | 88  | frac acc= | 0.000  |
| LEU A | 175 | frac acc= | 3.488  | CYS A | 23  | frac acc= | 0.000  |
| VAL A | 19  | frac acc= | 3.420  | ALA A | 130 | frac acc= | 0.000  |
| ILE A | 106 | frac acc= | 3.337  | ALA A | 84  | frac acc= | 0.000  |
| PRO A | 119 | frac acc= | 2.953  | ALA A | 34  | frac acc= | 0.000  |
| LEU A | 46  | frac acc= | 2.887  |       |     |           |        |
| GLN A | 6   | frac acc= | 2.860  |       |     |           |        |
| TYR A | 173 | frac acc= | 2.825  |       |     |           |        |
| VAL A | 150 | frac acc= | 2.525  |       |     |           |        |
| GLN A | 166 | frac acc= | 2.525  |       |     |           |        |
| THR A | 172 | frac acc= | 2.436  |       |     |           |        |

[0274]

## hu4D5Fabv7- 중쇄

|       |     |           |        |       |     |           |        |
|-------|-----|-----------|--------|-------|-----|-----------|--------|
| SER B | 179 | frac acc= | 99.479 | PRO B | 14  | frac acc= | 45.729 |
| GLY B | 42  | frac acc= | 95.850 | THR B | 54  | frac acc= | 45.503 |
| GLU B | 1   | frac acc= | 87.276 | THR B | 200 | frac acc= | 45.369 |
| GLY B | 66  | frac acc= | 84.541 | LEU B | 177 | frac acc= | 45.337 |
| ASP B | 102 | frac acc= | 83.794 | GLY B | 8   | frac acc= | 44.898 |
| SER B | 75  | frac acc= | 80.567 | SER B | 7   | frac acc= | 43.530 |
| GLY B | 140 | frac acc= | 80.344 | THR B | 69  | frac acc= | 43.503 |
| ASN B | 211 | frac acc= | 79.588 | PRO B | 220 | frac acc= | 43.378 |
| GLY B | 197 | frac acc= | 78.676 | LYS B | 208 | frac acc= | 43.138 |
| ASP B | 62  | frac acc= | 77.716 | LYS B | 30  | frac acc= | 42.380 |
| GLY B | 103 | frac acc= | 77.176 | ALA B | 23  | frac acc= | 41.952 |
| SER B | 163 | frac acc= | 76.664 | GLU B | 46  | frac acc= | 41.430 |
| SER B | 139 | frac acc= | 74.946 | SER B | 25  | frac acc= | 41.323 |
| LYS B | 213 | frac acc= | 74.442 | ARG B | 87  | frac acc= | 41.282 |
| ALA B | 165 | frac acc= | 74.339 | LYS B | 124 | frac acc= | 40.888 |
| THR B | 167 | frac acc= | 73.934 | ASN B | 28  | frac acc= | 40.529 |
| SER B | 122 | frac acc= | 72.870 | GLN B | 3   | frac acc= | 39.824 |
| SER B | 194 | frac acc= | 71.959 | THR B | 123 | frac acc= | 39.306 |
| PRO B | 41  | frac acc= | 71.540 | SER B | 63  | frac acc= | 38.867 |
| THR B | 198 | frac acc= | 68.668 | GLY B | 56  | frac acc= | 38.582 |
| SER B | 222 | frac acc= | 68.128 | GLY B | 169 | frac acc= | 38.469 |
| LYS B | 43  | frac acc= | 67.782 | THR B | 172 | frac acc= | 38.421 |
| GLY B | 26  | frac acc= | 67.782 | PRO B | 209 | frac acc= | 38.309 |
| THR B | 138 | frac acc= | 65.826 | GLY B | 101 | frac acc= | 38.040 |
| ASP B | 31  | frac acc= | 64.222 | TYR B | 109 | frac acc= | 36.829 |
| GLY B | 15  | frac acc= | 64.172 | LYS B | 221 | frac acc= | 36.520 |
| SER B | 168 | frac acc= | 62.100 | GLY B | 44  | frac acc= | 35.147 |
| SER B | 120 | frac acc= | 61.332 | GLY B | 181 | frac acc= | 34.735 |
| LYS B | 76  | frac acc= | 61.092 | THR B | 58  | frac acc= | 34.457 |
| GLY B | 141 | frac acc= | 59.419 | GLY B | 9   | frac acc= | 34.254 |
| SER B | 137 | frac acc= | 59.179 | VAL B | 5   | frac acc= | 34.198 |
| TYR B | 57  | frac acc= | 58.916 | ALA B | 121 | frac acc= | 33.049 |
| GLU B | 89  | frac acc= | 58.483 | SER B | 127 | frac acc= | 32.390 |
| SER B | 180 | frac acc= | 56.289 | GLY B | 10  | frac acc= | 32.230 |
| LYS B | 65  | frac acc= | 55.044 | SER B | 71  | frac acc= | 30.659 |
| ASP B | 215 | frac acc= | 54.656 | ASP B | 73  | frac acc= | 30.245 |
| GLN B | 13  | frac acc= | 53.719 | LEU B | 115 | frac acc= | 29.867 |
| GLN B | 112 | frac acc= | 53.215 | LEU B | 11  | frac acc= | 29.825 |
| TYR B | 105 | frac acc= | 51.940 | ASN B | 84  | frac acc= | 29.765 |
| ALA B | 88  | frac acc= | 51.602 | SER B | 210 | frac acc= | 28.656 |
| GLY B | 164 | frac acc= | 50.259 | GLU B | 155 | frac acc= | 28.162 |
| PRO B | 192 | frac acc= | 49.826 | SER B | 160 | frac acc= | 26.526 |
| THR B | 158 | frac acc= | 49.694 | CYS B | 223 | frac acc= | 26.270 |
| THR B | 142 | frac acc= | 48.896 | GLY B | 16  | frac acc= | 26.158 |
| ASN B | 55  | frac acc= | 48.344 | ILE B | 202 | frac acc= | 26.068 |
| LYS B | 136 | frac acc= | 48.312 | GLN B | 82  | frac acc= | 25.836 |
| ARG B | 19  | frac acc= | 48.082 | SER B | 193 | frac acc= | 25.550 |
| PRO B | 156 | frac acc= | 47.366 | ASN B | 77  | frac acc= | 25.418 |
| PRO B | 174 | frac acc= | 47.157 | ARG B | 59  | frac acc= | 25.301 |
| LYS B | 217 | frac acc= | 47.102 | VAL B | 93  | frac acc= | 25.254 |
| GLN B | 199 | frac acc= | 46.650 | THR B | 74  | frac acc= | 24.902 |
| SER B | 17  | frac acc= | 45.980 | GLU B | 219 | frac acc= | 24.778 |
| SER B | 85  | frac acc= | 45.824 | ASN B | 206 | frac acc= | 24.647 |

[0276]

|           |           |        |           |           |       |
|-----------|-----------|--------|-----------|-----------|-------|
| VAL B 170 | frac acc= | 24.549 | PRO B 154 | frac acc= | 6.767 |
| TYR B 52  | frac acc= | 24.298 | PRO B 133 | frac acc= | 6.767 |
| ALA B 175 | frac acc= | 23.804 | TRP B 99  | frac acc= | 6.502 |
| LYS B 216 | frac acc= | 23.277 | THR B 32  | frac acc= | 6.291 |
| VAL B 214 | frac acc= | 23.150 | LEU B 45  | frac acc= | 4.649 |
| GLY B 125 | frac acc= | 22.802 | VAL B 128 | frac acc= | 4.515 |
| ASN B 162 | frac acc= | 22.245 | ILE B 51  | frac acc= | 4.307 |
| ALA B 72  | frac acc= | 22.166 | SER B 186 | frac acc= | 4.084 |
| ALA B 40  | frac acc= | 21.974 | PHE B 173 | frac acc= | 3.969 |
| LEU B 18  | frac acc= | 20.273 | ARG B 38  | frac acc= | 3.734 |
| THR B 212 | frac acc= | 20.170 | TRP B 47  | frac acc= | 3.561 |
| LEU B 182 | frac acc= | 19.619 | VAL B 118 | frac acc= | 3.409 |
| TYR B 33  | frac acc= | 19.398 | ALA B 24  | frac acc= | 3.376 |
| THR B 190 | frac acc= | 19.365 | TYR B 95  | frac acc= | 3.242 |
| VAL B 176 | frac acc= | 18.941 | GLU B 6   | frac acc= | 3.216 |
| SER B 21  | frac acc= | 18.929 | ALA B 144 | frac acc= | 3.167 |
| SER B 119 | frac acc= | 18.877 | ILE B 70  | frac acc= | 1.958 |
| THR B 91  | frac acc= | 18.237 | GLY B 111 | frac acc= | 1.868 |
| ASP B 151 | frac acc= | 17.849 | LEU B 4   | frac acc= | 1.808 |
| THR B 114 | frac acc= | 17.601 | TYR B 201 | frac acc= | 1.758 |
| SER B 134 | frac acc= | 17.571 | LEU B 148 | frac acc= | 1.744 |
| LEU B 196 | frac acc= | 17.090 | PHE B 68  | frac acc= | 1.708 |
| TYR B 60  | frac acc= | 16.575 | VAL B 188 | frac acc= | 1.315 |
| TYR B 183 | frac acc= | 15.968 | CYS B 22  | frac acc= | 0.935 |
| VAL B 2   | frac acc= | 15.901 | TRP B 161 | frac acc= | 0.876 |
| PRO B 130 | frac acc= | 15.342 | LEU B 131 | frac acc= | 0.654 |
| LEU B 166 | frac acc= | 15.268 | VAL B 205 | frac acc= | 0.495 |
| GLY B 100 | frac acc= | 15.003 | ALA B 92  | frac acc= | 0.356 |
| PHE B 27  | frac acc= | 14.383 | ALA B 79  | frac acc= | 0.356 |
| ASN B 204 | frac acc= | 13.873 | VAL B 64  | frac acc= | 0.263 |
| PHE B 104 | frac acc= | 13.836 | ILE B 29  | frac acc= | 0.227 |
| TYR B 80  | frac acc= | 13.490 | VAL B 218 | frac acc= | 0.000 |
| VAL B 159 | frac acc= | 12.782 | VAL B 189 | frac acc= | 0.000 |
| ARG B 67  | frac acc= | 12.362 | VAL B 149 | frac acc= | 0.000 |
| GLN B 178 | frac acc= | 12.131 | VAL B 116 | frac acc= | 0.000 |
| HIS B 171 | frac acc= | 11.412 | VAL B 48  | frac acc= | 0.000 |
| SER B 184 | frac acc= | 11.255 | VAL B 37  | frac acc= | 0.000 |
| ARG B 98  | frac acc= | 11.115 | TYR B 152 | frac acc= | 0.000 |
| PRO B 53  | frac acc= | 11.071 | TYR B 94  | frac acc= | 0.000 |
| GLN B 39  | frac acc= | 11.037 | TRP B 36  | frac acc= | 0.000 |
| SER B 195 | frac acc= | 10.909 | SER B 187 | frac acc= | 0.000 |
| ASP B 108 | frac acc= | 10.525 | SER B 97  | frac acc= | 0.000 |
| LEU B 185 | frac acc= | 10.464 | MET B 107 | frac acc= | 0.000 |
| GLY B 113 | frac acc= | 10.406 | MET B 83  | frac acc= | 0.000 |
| THR B 78  | frac acc= | 10.213 | LEU B 145 | frac acc= | 0.000 |
| THR B 117 | frac acc= | 9.990  | LEU B 86  | frac acc= | 0.000 |
| LYS B 150 | frac acc= | 9.447  | LEU B 81  | frac acc= | 0.000 |
| VAL B 157 | frac acc= | 9.323  | LEU B 20  | frac acc= | 0.000 |
| VAL B 12  | frac acc= | 9.207  | ILE B 34  | frac acc= | 0.000 |
| TRP B 110 | frac acc= | 9.069  | HIS B 207 | frac acc= | 0.000 |
| ALA B 143 | frac acc= | 8.903  | HIS B 35  | frac acc= | 0.000 |
| SER B 135 | frac acc= | 8.897  | GLY B 146 | frac acc= | 0.000 |
| PHE B 129 | frac acc= | 8.895  | CYS B 203 | frac acc= | 0.000 |
| ARG B 50  | frac acc= | 8.639  | CYS B 147 | frac acc= | 0.000 |
| ALA B 61  | frac acc= | 8.547  | CYS B 96  | frac acc= | 0.000 |
| ALA B 132 | frac acc= | 7.882  | ASP B 90  | frac acc= | 0.000 |
| VAL B 191 | frac acc= | 7.366  | ALA B 106 | frac acc= | 0.000 |
| PRO B 126 | frac acc= | 7.258  | ALA B 49  | frac acc= | 0.000 |
| PHE B 153 | frac acc= | 6.918  |           |           |       |

[0278]

하기 2가지 기준은 Cys 잔기로 대체되도록 조작될 수 있는 hu4D5Fabv8의 잔기를 확인하기 위해 적용하였다.

[0280]

1. 완전히 매립된 아미노산 잔기, 즉 10% 미만의 분획별 표면 접근성 잔기를 제거하였다. 표 1은 10% 초과 접근가능한 (분획별 표면 접근성)인 hu4D5Fabv8의 134개 (경쇄) 및 151개 (중쇄) 잔기가 있다는 것을 보여준다. 상위 10개의 가장 접근가능한 Ser, Ala 및 Val 잔기는 다른 아미노산에 비해 Cys에 대한 이들의 밀접한 구조적 유사성으로 인해, 새롭게 조작된 Cys에 의해 항체에 최소의 구조적 구속을 도입하기 때문에 선택되었다. 다른 시스테인 대체 부위는 또한 스크리닝될 수 있고, 접합에 유용할 수 있다.

[0281]

2. 잔기는 Fab의 기능적 및 구조적 상호작용에서의 이들의 역할에 기초하여 분류된다. 항원 상호작용에 관여하지 않고, 기존 디슬피드 결합로부터 멀리 떨어져 있는 잔기를 추가로 선택하였다. 새롭게 조작된 Cys 잔기는 고유한 형태이어야 하고, 항원 결합을 방해하지 않고 또한 디슬피드 결합 형성에 관여하는 시스테인과의 미스페어를 방해하지 않는다.

[0282]

hu4D5Fabv8의 하기 잔기는 상기 기준을 보유하고, Cys로 대체되도록 선택되었다: L-V15, L-A43, L-V110, L-A144, L-S168, H-A88, H-A121, H-S122, H-A175 및 H-S179 (도 1에 나타냄).

[0283]

티올 반응성은 아미노산의 반응성 시스테인 아미노산으로의 치환이 L-10 내지 L-20; L-38 내지 L-48; L-105 내지 L-115; L-139 내지 L-149; L-163 내지 L-173로부터 선택된 경쇄의 범위 내에서; 및 H-35 내지 H-45; H-83

내지 H-93; H-114 내지 H-127; 및 H-170 내지 H-184로부터 선택된 중쇄의 범위 내에서, 및 H-268 내지 H-291; H-319 내지 H-344; H-370 내지 H-380; 및 H-395 내지 H-405로부터 선택된 범위 내의 Fc 영역에서 일어날 수 있는 임의의 항체에 대해 일반화될 수 있다.

[0284] 또한, 티올 반응성은 항체의 특정 도메인, 예를 들어 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 일반화될 수도 있다. 0.6 및 그보다 높은 티올 반응성 값을 나타내는 시스테인 대체는 무순상 항체: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM (IgG 서브클래스: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2 포함) 각각의 중쇄 불변 도메인  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 에서 만들어질 수 있다.

[0285] 결정 구조 데이터로부터 선택된 10개 Cys 돌연변이체가 항원-조합 부위, 예컨대 이 경우에는 HER2와의 인터페이스로부터 멀리 떨어져 있다는 것이 입증되었다. 이들 돌연변이체는 기능적 상호작용에 대한 간접적인 영향에 대해 실험적으로 시험될 수 있다. 모든 Cys Fab 변이체의 티올 반응성을 실시해 1 및 2에 기재된 바와 같이 측정하고, 계산하여, 표 2에 나타내었다. 잔기 L-V15C, L-V110C, H-A88C 및 H-A121C는 반응성 및 안정한 티올 기를 갖는다 (도 3a 및 3b). 돌연변이체 V15C, V110C, A144C, S168C는 경쇄 Cys 변이체이다. 돌연변이체 A88C, A121C, A175C, S179C는 중쇄 Cys 변이체이다. 높은 분획별 표면 접근성을 갖는 부위가 PHESEPARATOR 검정에 의해 계산시 최고 티올 반응성을 갖지 않는다는 것은 놀랍고 예상치 못한 것이었다 (표 2). 대안적으로, 분획별 표면 접근성 (표 1, 2)은 티올 반응성과 상관관계가 없었다 (표 2). 실제로, 20% 내지 80%의 중간 표면 접근성을 갖는 부위 (도 4a, 표 1), 또는 부분적으로 노출된 부위에서 조작된 Cys 잔기, 예컨대 Ala 또는 Val 잔기는 Ser 잔기에서 도입된 Cys보다 우수한 티올 반응성, 즉  $> 0.6$ 을 나타내었으며 (도 3b, 표 2), 이에 따라 결정 구조 정보만으로는 티올 반응성 부위를 선택하기에 충분하지 않기 때문에 티올 반응성 부위의 스크리닝에 PHESEPARATOR 검정을 사용하는 것이 필요하게 되었다 (도 3b 및 4a).

[0286] 티올 반응성 데이터는 4D5 티오Fab Cys 돌연변이체: (3a) 비-비오티닐화된 (대조군) 및 (3b) 비오티닐화된 파지-티오Fab의 아미노산 잔기에 대해 도 3a 및 3b에 나타내었다. 항체/Fab 표면 상의 반응성 티올 기를 비-비오티닐화된 파지-hu4D5Fabv8 (3a) 및 비오티닐화된 파지-hu4D5Fabv8 (3b)의 BSA (개방 박스), HER2 (회색 박스) 또는 스트렙타비딘 (충전된 박스)와의 상호작용에 대한 PHESEPARATOR 검정 분석에 의해 확인하였다. 검정은 실시 예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 경쇄 변이체는 좌측 상에 있고, 중쇄 변이체는 우측 상에 있다. 비-비오티닐화된 4D5 티오Fab Cys 돌연변이체의 결합은 예상된 바와 같이 낮았으나, HER2에 대한 강한 결합이 유지되었다. 비오티닐화된 4D5 티오Fab Cys 돌연변이체의 스트렙타비딘 및 HER2에 대한 결합의 비는 표 2에서 티올 반응성 값을 제공한다. 450 nm에서의 백그라운드 흡광도 또는 BSA에 대한 비오티닐화된 4D5 티오Fab Cys 돌연변이체의 소량의 비-특이적 단백질 결합이 또한 도 3b에서 입증되었다. Cys 잔기로 대체된 선택된 아미노산 잔기의 분획별 표면 접근성을 도 4a에 나타내었다. 분획별 표면 접근성을 이용 가능한 hu4D5Fabv7 구조로부터 계산하고, 표 1에 나타내었다 (문헌 [Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995]). hu4D5Fabv7 및 hu4D5Fabv8 구조의 형태적 파라미터는 매우 일관적이고, hu4D5Fabv7의 분획별 표면 접근성 계산과 hu4D5Fabv8 시스테인 돌연변이체의 티올 반응성 사이의 임의의 상관관계의 결정을 허용한다. 부분적으로 노출된 잔기 (Ala 또는 Val)에서 도입된 파지 티오Fab Cys 잔기의 측정된 티올 반응성은 Ser 잔기에서 도입된 것과 비교하여 보다 우수한 티올 반응성을 나타내었다 (표 2). 표 2의 티오Fab Cys 돌연변이체로부터 티오 반응성 값과 분획별 표면 접근성 사이에 거의 또는 전혀 상관관계가 없다는 것을 알 수 있었다.

[0287] 항체의 위치 L-15, L-43, L-110, L-144, L-168, H-40, H-88, H-119, H-121, H-122, H-175, 및 H-179에서의 아미노산을 일반적으로 유리 시스테인 아미노산으로 돌연변이 (대체)될 수 있다. 이들 위치의 각각의 측면 상에서 약 5개 아미노산 잔기 내의 범위, 즉 L-10 내지 L-20; L-38 내지 L-48; L-105 내지 L-115; L-139 내지 L-149; L-163 내지 L-173; H-35 내지 H-45; H-83 내지 H-93; H-114 내지 H-127; 및 H-170 내지 H-184 뿐만 아니라 H-268 내지 H-291; H-319 내지 H-344; H-370 내지 H-380; 및 H-395 내지 H-405로부터 선택된 Fc 영역의 범위는 또한 유리 시스테인산으로 대체되어, 본 발명의 시스테인 조작된 항체를 생성할 수 있다.

## 표 2

파지-티오Fab의 티올 반응성

| 파지-티오Fab<br>구축물 | 티올 반응성* | 분획별 표면<br>접근성 (%)<br>(표 1로부터) |
|-----------------|---------|-------------------------------|
| hu4D5Fabv8-wt   | 0.125   | -                             |
| L-V15C          | 0.934   | 52.46                         |
| L-A43C          | 0.385   | 26.80                         |
| L-V110C         | 0.850   | 44.84                         |
| L-A144C         | 0.373   | 23.65                         |
| L-S168C         | 0.514   | 79.68                         |
| H-A40C          | 0.450   | 21.97                         |
| H-A88C          | 0.914   | 51.60                         |
| H-S119C         | 0.680   | 18.88                         |
| H-A121C         | 0.925   | 33.05                         |
| H-S122C         | 0.720   | 72.87                         |
| H-A175C         | 0.19    | 23.80                         |
| H-S179C         | 0.446   | 99.48                         |

[0288]

L = 경쇄, H = 중쇄, A = 알라닌, S = 세린, V = 발린, C = 시스테인

[0290]

\* 티올 반응성은 HER2 (항체) 결합에 대한 OD<sub>450 nm</sub>에 대한 스트렙타비딘 결합에 대한 OD<sub>450 nm</sub>의 비로 측정한다 (실시예 2). 1의 티올 반응성 값은 시스테인 티올의 완전한 비오티닐화를 나타낸다.

[0291]

경쇄로부터의 2개의 Cys 변이체 (L-V15C 및 L-V110C) 및 중쇄로부터의 2개의 Cys 변이체 (H-A88C 및 H-A121C)가 최고 티올 반응성을 나타내므로 이를 변이체를 추가의 분석을 위해 선택하였다 (표 2).

[0292]

파지 정제와 달리, Fab 제조는 생성 규모에 따라 2 내지 3일이 필요할 수 있다. 이 시간 동안, 티올 기는 산화에 의해 반응성이 손실될 수 있다. hu4D5Fabv8-파지 상의 티올 기의 안정성을 프로빙하기 위해, 파지-티오Fab의 티올 반응성의 안정성을 측정하였다 (도 4b). 티오Fab-파지 정제 후, 제1일, 제2일 및 제4일에, 모든 샘플을 비오틴-PEO-말레이미드와 접합시키고, 파지 ELISA 검정 (PHESELECTOR)으로 프로빙하여 HER2 및 스트렙타비딘 결합을 시험하였다. L-V15C, L-V110C, H-A88C 및 H-A121C는 다른 티오Fab 변이체와 비교하여 유의한 양의 티올 반응성을 유지하였다 (도 4b).

[0293]

시스테인 조작된 항체의 제조 방법

[0294]

본 발명의 화합물에는 모 항체의 하나 이상의 아미노산을 유리 시스테인 아미노산으로 대체시킨 시스테인 조작된 항체가 포함된다. 시스테인 조작된 항체는 티올 반응성 값이 0.6 내지 1.0인 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함한다. 유리 시스테인 아미노산은 모 항체로 조작되고 디슬퍼드 브릿지의 일부가 아닌 시스테인 잔기이다.

[0295]

한 측면에서, 시스테인 조작된 항체는

[0296]

(a) 모 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 대체시키는 단계; 및

[0297]

(b) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 시약과 반응시킴으로써 시스테인 조작된 항체의 티올 반응성을 결정하는 단계

[0298]

를 포함하는 방법에 의해 제조한다.

[0299]

시스테인 조작된 항체는 모 항체보다 티올-반응성 시약에 대한 반응성이 더 클 수 있다.

[0300]

유리 시스테인 아미노산 잔기는 중쇄 또는 경쇄에, 또는 불변 또는 가변 도메인에 위치할 수 있다. 항체 단편, 예를 들어 Fab도 항체 단편의 아미노산을 대체하는 하나 이상의 시스테인 아미노산으로 조작되어 시스테인 조작된 항체 단편을 형성할 수 있다.

- [0301] 본 발명의 또 다른 측면은
- [0302] (a) 시스테인 조작된 항체를 생성하기 위해 하나 이상의 시스테인 아미노산을 모 항체에 도입하는 단계; 및
- [0304] (b) 티올-반응성 시약으로 시스테인 조작된 항체의 티올 반응성을 결정하는 단계
- [0305] 를 포함하는, 시스테인 조작된 항체의 제조 (제작) 방법을 제공하고,
- [0306] 여기서 시스테인 조작된 항체는 티올-반응성 시약을 갖는 모 항체보다 더 반응성이다.
- [0307] 시스테인 조작된 항체의 제조 방법의 단계 (a)는
- [0308] (i) 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 핵산 서열을 돌연변이유발시키는 것;
- [0309] (ii) 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것; 및
- [0310] (iii) 시스테인 조작된 항체를 단리 및 정제하는 것
- [0311] 을 포함할 수 있다.
- [0312] 시스테인 조작된 항체의 제조 방법의 단계 (b)는 파지 또는 파지미드 입자로부터 선택된 바이러스 입자 상에서 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0313] 시스테인 조작된 항체의 제조 방법의 단계 (b)는 또한
- [0314] (i) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성하는 것;
- [0315] (ii) 포획 매질에 대한 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 결합도를 측정하는 것
- [0316] 을 포함할 수 있다.
- [0317] 본 발명의 또 다른 측면은
- [0318] (a) 시스테인 조작된 항체를 생성하기 위해 하나 이상의 시스테인 아미노산을 모 항체 내로 도입하는 단계;
- [0319] (b) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성하는 단계; 및
- [0320] (c) 포획 매질에 대한 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 결합을 측정하는 단계; 및
- [0321] (d) 티올-반응성 시약으로 시스테인 조작된 항체의 티올 반응성을 결정하는 단계
- [0322] 를 포함하는, 티올 반응성을 알아보기 위하여 고도로 반응성이이고 쌍을 이루지 않은 시스테인 아미노산을 수반한 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법이다.
- [0323] 시스테인 조작된 항체의 스크리닝 방법의 단계 (a)는
- [0324] (i) 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 핵산 서열의 돌연변이유발시키는 것;
- [0325] (ii) 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것; 및
- [0326] (iii) 시스테인 조작된 항체를 단리 및 정제하는 것
- [0327] 을 포함할 수 있다.
- [0328] 시스테인 조작된 항체의 스크리닝 방법의 단계 (b)는 파지 또는 파지미드 입자로부터 선택되는 바이러스 입자 상에 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0329] 시스테인 조작된 항체의 스크리닝 방법의 단계 (b)는 또한
- [0330] (i) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성시키는 것; 및
- [0331] (ii) 포획 매질에 대한 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 결합을 측정하는 것

- [0332] 을 포함할 수 있다.
- [0333] 표지된 시스테인 조작된 항체
- [0334] 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 반응성 시스테인 티올 기를 통해 항체에 공유결합에 의해 부착될 수 있는 임의의 표지 모이어티와 접합될 수 있다 (문헌 [Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-15]; [Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]; [Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL]). 부착된 표지는 리간드 친화도, 항체/항원 결합, 또는 이온 복합체 형성을 조정하기 위해 (i) 검출가능한 신호를 제공하거나, (ii) 제2 표지와 상호작용하여 제1 또는 제2 표지에 의해 제공되는 검출가능한 신호를 변형시켜, 예를 들어 FRET (형광 공명 에너지 전달)를 생성시키거나; (iii) 항원 또는 리간드 와의 상호작용을 안정화하거나 이들과의 결합 친화도를 증가시키거나, (iv) 이동성, 예를 들어 전기영동 이동성, 또는 세포-투과도에 전하, 소수성, 형태 또는 다른 물리적 파라미터로 인한 영향을 주거나, 또는 (v) 포획 모이어티를 제공하는 기능을 할 수 있다.
- [0335] 표지된 시스테인 조작된 항체는 예를 들어 특이적 세포, 조직, 또는 혈청에서 관심 항원의 발현을 검출하기 위한 진단 분석에서 유용할 수 있다. 진단 용도를 위해, 항체는 전형적으로 검출가능한 모이어티로 표지될 것이다. 수많은 표지가 이용가능하고, 이들은 일반적으로 하기 카테고리로 분류될 수 있다.
- [0336] (a) 방사성동위원소 (방사성핵종), 예컨대  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$ , 또는  $^{213}\text{Bi}$ . 방사성동위원소 표지된 항체는 수용체 표적화된 영상화 실험에 유용하다. 항체는 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligan et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)]에 기재된 기술을 이용하여, 방사성동위원소 금속에 결합하거나 킬레이트화되거나 또는 다른 방식으로 복합체화하며 항체의 조작된 시스테인 티올과 반응성인 리간드 시약으로 표지될 수 있다. 금속 이온과 복합체화할 수 있는 킬레이트화 리간드로는 DOTA, DOPA, DOTP, DOTMA, DTPA 및 TETA (매크로시클릭스 (Macrocyclics), 미국 텍사스주 달라스) 등이 있다. 방사성핵종은 본 발명의 항체-지르코늄 접합체로서 시스테인 조작된 항체와의 복합체화를 통해 표적화될 수 있다 (문헌 [Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146]).
- [0337] 영상화 실험을 위한 항체 표지로서 적합한 금속-킬레이트 복합체가 다음 문헌에 개시되어 있다: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; 문헌 [Hnatowich et al. (1983) J. Immunol. Methods 65:147-157]; [Meares et al. (1984) Anal. Biochem. 142:68-78]; [Mirzadeh et al. (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65]; [Meares et al. (1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10:21-26]; [Izard et al. (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350]; [Nikula et al. (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90]; [Camera et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62]; [Kukis et al. (1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110]; [Verel et al. (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670]; [Camera et al. (1994) J. Nucl. Med. 21:640-646]; [Ruegg et al. (1990) Cancer Res. 50:4221-4226]; [Verel et al. (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670]; [Lee et al. (2001) Cancer Res. 61:4474-4482]; [Mitchell, et al. (2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112]; [Kobayashi et al. (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111]; [Miederer et al. (2004) J. Nucl. Med. 45:129-137]; [DeNardo et al. (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90]; [Blend et al. (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363]; [Nikula et al. (1999) J. Nucl. Med. 40:166-76]; [Kobayashi et al. (1998) J. Nucl. Med. 39:829-36]; [Mardirossian et al. (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74]; [Roselli et al. (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20].
- [0338] (b) 형광 표지, 예컨대 희토류 킬레이트 (유로퓸 킬레이트), FITC, 5-카르복시플루오레세인, 6-카르복시플루오레세인 등을 비롯한 플루오레세인 유형, TAMRA 등을 비롯한 로다민 유형; 단실; 리사민 (Lissamine); 시아닌; 피코에리트린; 텍사스 레드 (Texas Red) 및 이들의 유사체. 형광 표지는 예를 들어 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌]에 개시된 기술을 이용하여 항체에 접합될 수 있다. 형광 염료 및 형광 표지 시약은 인비트로겐 (Invitrogen)/몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes, 미국 오레곤주 유진 소재) 및 피어스 바이오테크놀로지, 잉크. (Pierce Biotechnology, Inc., 미국 일리노이주 록포드 소재)에서 시판하는 것을 포함한다.
- [0340] (c) 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하거나 문헌에 개시되어 있다 (US 4275149). 효소는 일반적으로 다양한 기술을 이용하여 측정할 수 있는 발색 기질의 화학적 변경을 촉매한다. 예를 들어, 효소는 기질에서의 색상 변

화를 촉매할 수 있고, 이는 분광학적으로 측정할 수 있다. 대안적으로, 효소는 기질의 형광 또는 화학발광을 변경시킬 수 있다. 형광의 변화를 정량하는 기술은 상기 기재되어 있다. 화학발광 기질은 화학적 반응에 의해 전자적으로 여기된 후에 측정 (예를 들어, 화학발광계 사용)할 수 있는 광을 방출하거나 에너지를 형광 수용자에게 제공할 수 있다. 효소 표지의 예는 루시퍼라제 (예를 들어, 반딧불이 루시퍼라제 및 박테리아 루시퍼라제, US 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 데히드로게나제, 우레아제, 퍼옥시다제, 예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제 (AP),  $\beta$ -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 당류 옥시다제 (예를 들어, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제), 헤테로시클릭 옥시다제 (예를 들어, 우리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등을 포함한다. 효소를 항체에 접합시키는 기술은 문헌 [O'Sullivan et al. (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166]에 기재되어 있다.

[0341] 효소-기질 조합의 예는 예를 들어 다음을 포함한다:

[0342] (i) 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 기질로서의 수소 퍼옥시다제 (여기서, 수소 퍼옥시다제는 염료 전구체 (예를 들어, 오르토페닐렌 디아민 (OPD) 또는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 히드로클로라이드 (TMB))를 산화시킴),

[0343] (ii) 알칼리성 포스파타제 (AP)와 발색 기질로서의 파라-니트로페닐 포스페이트, 및

[0344] (iii)  $\beta$ -D-갈락토시다제 ( $\beta$ -D-Gal)와 발색 기질 (예를 들어, p-니트로페닐- $\beta$ -D-갈락토시다제) 또는 형광발생 기질 4-메틸움벨리페릴- $\beta$ -D-갈락토시다제.

[0345] 수많은 다른 효소-기질 조합이 당업자에게 이용가능하다. 일반적인 검토를 위해서 US 4275149 및 US 4318980을 참조한다.

[0346] 표지는 간접적으로 시스테인 조작된 항체와 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체를 비오틴과 접합시키고, 상기 언급한 표지의 3가지 광범위한 범주 중 임의의 표지를 아비딘 또는 스트렙타비딘과 접합시킬 수도 있고, 또는 그 반대로 접합시킬 수도 있다. 비오틴은 스트렙타비딘에 선택적으로 결합하기 때문에, 표지가 이러한 간접적인 방식으로 항체와 접합될 수 있다. 대안적으로, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시키기 위해서, 폴리펩티드 변이체는 작은 합텐 (예를 들어, 디옥신)과 접합시키고 상기 언급한 여러 유형의 표지 중 하나를 항-합텐 폴리펩티드 변이체 (예를 들어, 항-디옥신 항체)와 접합시킨다. 이에 따라, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시킬 수 있다 (문헌 [Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego]).

[0347] 본 발명의 폴리펩티드 변이체는 임의의 공지된 검정 방법, 예컨대 ELISA, 경쟁적 결합 검정, 직접 및 간접 샌드 위치 검정 및 면역침전 검정에 사용될 수 있다 (문헌 [Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.]).

[0348] 검출 표지는 결합 또는 인식 사건을 국소화하고 시작화하며 정량하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 표지된 항체는 세포-표면 수용체를 검출할 수 있다. 검출가능하게 표지된 항체의 또 다른 용도는 비드를 형광 표지된 항체와 접합시키고, 리간드의 결합시에 형광 신호를 검출하는 것을 포함하는, 비드-기재의 면역포획 방법이다. 유사한 결합 검출 방법은 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 효과를 이용하여 항체-항원 상호작용을 측정하고 검출한다.

[0349] 검출 표지, 예컨대 형광 염료 및 화학발광 염료 (문헌 [Briggs et al. (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058])는 검출가능한 신호를 제공하고, 일반적으로 바람직하게는 다음 특성을 갖는 항체 표지에 적용가능하다: (i) 표지된 항체는 낮은 백그라운드로 매우 높은 신호를 생성하여 소량의 항체가 무-세포 검정 및 세포-기반 검정 둘 모두에서 민감하게 검출될 수 있도록 해야 하고, (ii) 표지된 항체는 광안정성이어서 형광 신호가 유의한 광표백 없이 관찰되고 모니터링되며 기록될 수 있어야 한다. 표지된 항체를 특히 살아있는 세포의 막 또는 세포 표면에 세포 표면 결합시키는 것을 포함하는 적용을 위해서는, 상기 표지가 (iii) 효과적인 접합체 농도 및 검출 민감도 달성을 위해 양호한 수용성을 보유하고, (iv) 세포의 정상적인 대사 과정을 파괴하거나 조기 세포 사멸을 초래하지 않도록 살아있는 세포에 비-독성인 것이 바람직하다.

[0350] 세포 형광 강도의 직접 정량 및 형광 표지 사건의 확인, 예를 들어 펩티드-염료 접합체의 세포 표면 결합은 살아있는 세포 또는 비드와의 혼합/해독 (mix-and-read), 비-방사성 분석을 자동화한 시스템 (FMAT<sup>®</sup> 8100 HTS 시스템, 어플라이드 바이오시스템즈 (미국 캘리포니아 포스터 시티))에서 수행될 수 있다 (문헌 [Miraglia,

"Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204]. 표지된 항체의 용도에는, 세포 표면 수용체 결합 분석, 면역포획 분석, 형광 연결된 면역흡착 분석 (FLISA), 카스파제-절단 (문헌 [Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23]; US 6372907), 아폽토시스 (문헌 [Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51]) 및 세포독성 분석도 포함된다. 형광 마이크로부피 분석 기술은, 세포 표면에 표적화된 분자에 의한 상향 또는 하향 조절을 확인하는데 이용될 수 있다 (문헌 [Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51]).

[0351]

본 발명의 표지된 시스테인 조작된 항체는 생체의학적 영상화와 분자 영상화의 다양한 방법 및 기술, 예컨대 (i) MRI (자기 공명 영상화), (ii) 마이크로CT (컴퓨터 단층촬영), (iii) SPECT (단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영), (iv) PET (양전자 방출 단층촬영) (문헌 [Chen et al. (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49]), (v) 생체 발광, (vi) 형광, 및 (vii) 초음파에 의한 영상화 바이오마커 및 프로브로서 유용하다. 면역섬광조영술은 방사성 물질로 표지된 항체를 동물 또는 인간 환자에게 투여하고 항체가 위치하는 신체 부위의 사진을 찍는 영상화 절차이다 (US 6528624). 영상화 바이오마커는 객관적으로 측정되어 정상적인 생물학적 과정, 발병 과정 또는 치료 개입에 대한 약리학적 반응의 지시자로서 평가될 수 있다. 생물마커는 여러가지 유형일 수 있다: 유형 0은 질환의 본래 병력 마커이며, 공지된 임상 지표, 예컨대 류마티스성 관절염에서 활액 염증의 MRI 평가와 장기적으로 상관관계가 있고; 유형 I 마커는 작용 메카니즘이 임상 결과와 관련되지 않을 수 있는 경우에도 이 메카니즘에 따른 개입 효과를 보여주며; 유형 II 마커는 대리 종말점으로서 기능하여, 바이오마커의 변화 또는 바이오마커로부터의 신호가 표적화된 반응의 "유효성", 예를 들어 류마티스성 관절염에서 CT에 의한 골 침식 측정치에 대한 임상적 이점을 예측한다. 따라서, 영상화 바이오마커는 (i) 표적 단백질의 발현, (ii) 표적 단백질에 대한 치료제의 결합, 즉 선택성, 및 (iii) 제거율 및 반감기 약력학 데이터에 대한 약동학 (PD) 치료 정보를 제공할 수 있다. 실험에 기초한 바이오마커에 비한 생체내 영상화 바이오마커의 이점은 비-침습성 치료, 정량이 가능한 전신 평가, 반복적 투여 및 평가, 즉 여러 시점에서의 투여 및 평가, 및 전임상 결과 (작은 동물)로부터 임상 (인간) 결과로의 잠재적으로 전이 가능한 효과를 포함한다. 몇몇 용도의 경우, 생체영상화는 전임상 연구에서의 동물 실험을 대체하거나 그 횟수를 최소화한다.

[0352]

방사성핵종 영상화 표지는 방사성핵종, 예컨대  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$ , 또는  $^{213}\text{Bi}$ 를 포함한다. 방사성핵종 금속 이온은 킬레이트화 링커, 예컨대 DOTA와 복합체화될 수 있다. 링커 시약, 예컨대 DOTA-말레이미드 (4-말레이미도부티르아미도벤질-DOTA)는 문헌 [Axworthy et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807]의 절차에 따라 아미노벤질-DOTA를 이소프로필클로로포르메이트 (알드리치 (Aldrich))로 활성화시킨 4-말레이미도부티르산 (플루카(Fluka))과 반응시켜 제조할 수 있다. DOTA-말레이미드 시약은 시스테인 조작된 항체의 유리 시스테인 아미노산과 반응하여 항체 상에 금속 복합체화 리간드를 제공한다 (문헌 [Lewis et al. (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86]). 킬레이트화 링커 표지 시약, 예를 들어 DOTA-NHS (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노 (N-히드록시숙신아미드 에스테르)는 시판중이다 (마이크로시클릭스, 미국 텍사스주 달拉斯). 방사성핵종 표지된 항체를 사용한 수용체 표적 영상화는 종양 조직 중 항체의 점진적인 축적을 검출 및 정량함으로써 경로 활성화의 마커를 제공할 수 있다 (문헌 [Albert et al. (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210]). 접합된 방사성-금속은 리소솜 분해 후 세포 내에 남아 있을 수 있다.

[0353]

펩티드 표지 방법이 주지되어 있다. 문헌 [Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2]; [Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2]; [Glazer et al. (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York]; [Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York]; [Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York]; 및 [Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, CRC Press, Boca Raton, Fla.]; [De Leon-Rodriguez et al. (2004) Chem. Eur. J. 10:1149-1155]; [Lewis et al. (2001) Bioconjugate

Chem. 12:320-324]; [Li et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115]; [Mier et al. (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237]을 참조한다.

[0354] 충분히 근접한 두 모이어티, 즉 형광 리포터 및 켄처로 표지된 웨პ티드 및 단백질에서는 형광 공명 에너지 전달 (FRET)이 일어난다. 리포터 기는 대체로 특정 파장의 광에 의해 여기되고 최대 밝기에서 방출될 수 있는 적절한 스톡스 이동 (Stokes shift)으로 에너지를 수용하기 또는 켄처 기에게 전달하는 형광 엔료이다. 형광 엔료에는 연장된 방향성 (확장된 방향족성)을 갖는 분자, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 이들의 유도체 등이 있다. 형광 리포터는 무손상 웨პ티드 중의 켄처 모이어티에 의해 부분적으로 또는 유의하게 켄칭될 수 있다. 웨პ티드를 웨პ티다제 또는 프로테아제에 의해 절단시키면, 검출가능한 수준으로 형광 상의 증가가 측정될 수 있다 (문헌 [Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34]).

[0355] 본 발명의 표지된 항체는 친화도 정제제로서 사용될 수도 있다. 이 과정에서, 표지된 항체는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 세파텍스 (Sephadex) 수지 또는 여과지와 같은 고체상에 고정된다. 고정된 항체를 정제될 항원을 함유하는 샘플과 접촉시킨 후, 지지체를 정제될 항원을 제외하고는 샘플 중에 존재하는 실질적으로 모든 물질을 제거할 적합한 용매로 세척하는데, 상기 항원은 고정된 폴리웨პ티드 변이체에 결합한다. 최종적으로, 상기 지지체를 폴리웨პ티드 변이체로부터 항원을 방출시킬 또 다른 적합한 용매, 예를 들어 글리신 완충액 (pH 5.0)으로 세척하였다.

[0356] 표지 시약은 전형적으로 (i) 시스테인 조작된 항체의 시스테인 티올과 직접 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있거나, (ii) 링커 시약과 반응하여 링커-표지 중간체를 형성할 수 있거나, 또는 (iii) 링커 항체와 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있는 반응성 관능기를 보유한다. 표지 시약의 반응성 관능기로는, 말레이미드, 할로아세틸, 아이오도아세트아미드 숙신이미딜 에스테르 (예를 들어, NHS, N-히드록시숙신이미드), 이소티오시아네이트, 술포닐 클로라이드, 2,6-디클로로트리아지닐, 펜타플루오로페닐 에스테르 및 포스포르아미다이트 등이 있으나, 다른 관능기도 사용될 수 있다.

[0357] 예시적인 반응성 관능기는 검출가능한 표지, 예를 들어 비오틴 또는 형광 엔료의 카르복실기 치환기의 N-히드록시숙신이미딜 에스테르 (NHS)이다. 표지의 NHS 에스테르는 예비 형성, 단리, 정제 및/또는 특성화될 수 있거나, 또는 계내 형성되어 항체의 친핵성 기와 반응할 수 있다. 전형적으로, 카르복실 형태의 표지는 카보디이미드 시약, 예를 들어 디시클로헥실카보디이미드, 디이소프로필카보디이미드, 또는 우로늄 시약, 예를 들어 TSTU (O-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트, HBTU (O-벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 혼사플루오로포스페이트), 또는 HATU (O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 혼사플루오로포스페이트, 활성화제, 예컨대 1-히드록시벤조트리아졸 (HOBT), 및 표지의 NHS 에스테를 제공하기 위한 N-히드록시숙신이미드의 몇몇 조합물과 반응시킴으로써 활성화시킨다. 몇몇 경우에는, 표지 및 항체가 표지의 계내 활성화 및 항체와의 반응으로 커플링되어 표지-항체 접합체를 1 단계로 형성할 수 있다. 다른 활성화 및 커플링 시약은 TBTU (2-(1H-벤조트리아조-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 혼사플루오로포스페이트), TFFH (N,N',N",N"-테트라메틸우로늄 2-플루오로-헥사플루오로포스페이트), PyBOP (벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄 혼사플루오로포스페이트), EEDQ (2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린), DCC (디시클로헥실카보디이미드); DIPCDI (디이소프로필카보디이미드), MSNT (1-(메시틸렌-2-술포닐)-3-니트로-1H-1,2,4-트리아졸, 및 아릴 술포닐 할라이드, 예를 들어 트리이소프로필벤젠 술포닐 클로라이드를 포함한다.

[0358] 티오Fab에 대한 비오틴-말레이미드의 접합

[0359] 상기 기재된 티오Fab 특성은 파지 외피 단백질에 대한 Fab의 융합이 잠재적으로 Cys 티올 접근성 또는 반응성을 변경시킬 수 있기 때문에 파지의 존재하에 확립하였다. 따라서, 티오Fab 구축물을 알칼리성 포스파타제 프로모터 하에 발현 벡터로 클로닝하고 (문헌 [Chang et al. (1987) Gene 55:189-196]), 티오Fab 발현을 포스페이트-비함유 배지에서 이. 콜라이 세포를 성장시켜 유도하였다. 티오Fab을 단백질 G 세파로스™ 칼럼 상에서 정제하고, 환원 및 비-환원 SDS-PAGE 겔 상에서 분석하였다. 이들 분석은 티오Fab이 이들의 반응성 티올 기를 유지하는지 또는 분자내 또는 분자간 디설피드 결합 형성에 의해 불활성이 되는지 여부를 평가하는 것을 허용한다. 티오Fab L-V15C, L-V110C, H-A88C, 및 H-A121C를 발현시키고, 단백질-G 세파로스™ 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (상세한 내용은 방법 섹션 참조). 정제된 단백질을 환원 (DTT 사용) 및 비-환원 (DTT 없음) 조건에서 SDS-PAGE 겔 상에서 분석하였다. 다른 환원제, 예컨대 BME (베타-메르캅토에탄올)을 겔에서 사용하여 쇄간 디설피드 기를 제거할 수 있다. SDS-PAGE 겔 분석으로부터 티오Fab의 주요 (약 90%) 분획이 단량체 형태로 있

는 한편, 야생형 hu4D5Fabv8은 본질적으로 단량체 형태 (47 kDa)라는 것을 입증하였다.

[0360] 티오Fab (A121C) 및 야생형 hu4D5Fabv8을 100배 과량의 비오틴-말레이미드와 3시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 비오틴화된 Fab을 슈퍼텍스-S200™ 겔 여과 칼럼 상에 로딩하였다. 이 정제 단계는 단량체 Fab을 올리고며 Fab 및 또한 잉여량의 유리 비오틴-말레이미드 (또는 유리 지르코늄 시약)으로부터 분리하는데 유용하였다.

[0361] 도 5는 과지 내용물의 부재하에 티오Fab 변이체의 특성의 검증을 보여준다. 과지 융합이 없는 단백질, hu4D5Fabv8 및 hu4D5Fabv8-A121C (티오Fab-A121C)을 발현시키고, 단백질-G 아가로스 비드를 사용하여 정제한 후에 100배 몰 과량의 비오틴-말레이미드와 인큐베이션하였다. 비오틴화된 Cys 조작된 티오Fab 및 비-비오틴화된 야생형 Fab의 스트렙타비딘 및 HER2 결합을 비교하였다. 비오틴 접합 (스트렙타비딘과의 상호작용)의 정도 및 이들의 HER2에 대한 결합 능력을 ELISA 분석에 의해 모니터링하였다. 각각의 Fab을 2 ng 및 20 ng에서 시험하였다.

[0362] 비오틴화된 A121C 티오Fab은 야생형 hu4D5Fabv8와 대등한 HER2 결합을 유지하였다 (도 5). 야생형 Fab 및 A121C-티오Fab을 겔 여과 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 2개의 샘플을 염소 항-Fab-HRP를 2차 항체로 사용하는 ELISA에 의해 HER2 및 스트렙타비딘 결합에 대해 시험하였다. 두 야생형 (개방 박스) 및 티오Fab (점선 박스)은 HER2에 대해 유사한 결합을 나타내었으나, 오직 티오Fab이 스트렙타비딘 결합을 유지하였다. 오직 백그라운드 수준의 스트렙타비딘과의 상호작용이 비-비오틴화된 야생형 hu4D5Fabv8에서 관찰되었다 (도 5). 비오틴화된-티오Fab (A121C)의 질량 스펙트럼 (LC-ESI-MS) 분석은 야생형 hu4D5Fabv8 (47737 달톤)과 비교하여 48294.5 달톤에서 주요 피크가 생성되었다. 두 문자 사이의 537.5 달톤 차이는 정확하게 티오Fab에 접합된 단일 비오틴-말레이미드에 상응한다. 질량 스펙트럼 단백질 서열분석 (LC-ESI-텐덤 질량 스펙트럼 분석) 결과는 또한 접합된 비오틴 분자가 새롭게 조작된 Cys 잔기에 있다는 것을 확인하였다 (표 4, 실시예 3).

[0363] 알부민 결합 웨티드 (ABP)-티오Fab에 대한 비오틴-말레이미드의 부위 특이적 접합

[0364] 혈장-단백질 결합은 단기 생존 분자의 약동학 특성을 개선시키는 효과적인 수단일 수 있다. 알부민은 혈장에서 가장 풍부한 단백질이다. 혈장 알부민 결합 웨티드 (ABP)는 조직 흡수, 침투 및 확산의 변경을 포함하여, 융합된 활성 도메인 단백질의 약동학을 변경시킬 수 있다. 이들 약동학적 파라미터는 적절한 혈청 알부민 결합 웨티드 서열의 특이적 선택에 의해 조정될 수 있다 (US 20040001827). 일련의 알부민 결합 웨티드를 과지 디스플레이 스크리닝에 의해 확인하였다 (문헌 [Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043]; WO 01/45746). 본 발명의 화합물은 (i) 문헌 [Dennis et al. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043] (표 III 및 IV, 페이지 35038); (ii) US 20040001827 ([0076]의 서열 9-22); 및 (iii) WO 01/45746 (페이지 12-13, 서열 z1-z14) (이들은 모두 본원에 참고로 포함됨)에 교시된 ABP 서열을 포함한다.

[0365] 알부민 결합 웨티드를 Fab 중쇄의 C-말단에 1:1의 화학량론적 비율 (1 ABP/1 Fab)로 융합시켜 알부민 결합 (ABP)-Fab을 조작한다. 이들 ABP-Fab와 알부민의 결합은 토끼 및 마우스에서 이들의 반감기를 25배 초과로 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 상기 기재한 반응성 Cys 잔기는 이들 ABP-Fab에 도입되고, 지르코늄 시약과의 부위-특이적 접합 및 이후의 생체내 동물 연구에 사용될 수 있다.

[0366] 예시적인 알부민 결합 웨티드 서열은 서열 1-5에 열거된 아미노산 서열을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF

서열 1

QRLMEDICLPRWGCLWEDDF

서열 2

QRLIEDICLPRWGCLWEDDF

서열 3

RLIEDICLPRWGCLWEDDF

서열 4

DICLPRWGCLW

서열 5

[0367] 알부민 결합 웨티드 (ABP) 서열은 다수의 종 (마우스, 래트, 토끼, 소, 래서스, 개코원숭이 및 인간)으로부터의 알부민에  $K_d$  (토끼) =  $0.3 \mu M$ 으로 결합한다. 알부민 결합 웨티드는 알부민에 결합하는 것으로 공지된 리간드와 경쟁하지 않고, 토끼에서 2.3hr의 반감기 ( $T_{1/2}$ )를 갖는다. ABP-티오Fab 단백질을 BSA-세파로스™ 상에서 정제한 후에 이전 셙션에 기재된 바와 같이 비오틴-말레이미드 접합 및 슈퍼텍스-S200 칼럼 크로마토그래피 상에서의 정제를 수행하였다. 정제된 비오틴화된 단백질은 균질하였고, 어떠한 올리고머 형태도 없었다 (실시예

4).

[0369] 도 6은 알부민 결합 웨티드 (ABP)-티오Fab 변이체의 특성을 보여준다. ELISA 분석을 수행하여 ABP-hu4D5Fabv8-wt, ABP-hu4D5Fabv8-V110C 및 ABP-hu4D5Fabv8-A121C의 토끼 알부민, 스트렙타비딘 및 HER2와의 결합 능력을 시험하였다. 비오티닐화된 ABP-티오Fab은 ELISA (도 6) 및 비아코어 결합 동역학 분석 (표 3)에 의해 확인된 바와 같이 알부민 및 HER2에 야생형 ABP-hu4D5Fabv8과 유사한 친화도로 결합할 수 있다. ELISA 플레이트를 기재된 바와 같이 알부민, HER2 및 SA로 코팅하였다. 알부민, HER2 및 SA에 대한 비오티닐화된 ABP-티오Fab의 결합을 항-Fab HRP로 프로빙하였다. 비오티닐화된 ABP-티오Fab은 비-비오티닐화된 대조군 ABP-hu4D5Fabv8-wt와 비교하여 스트렙타비딘에 결합할 수 있었으며, 이는 동일한 Cys 돌연변이체가 두 변이체에 대해 사용되므로 ABP-티오Fab이 비오틴 말레이미드 유사 티오Fab와 부위 특이적 방식으로 접합된다는 것을 나타낸다 (도 6).

### 표 3

비오티닐화된 ABP- hu4D5Fabv8 야생형 및 티오Fab로의 HER2 및 토끼 알부민 결합에 대한 비아코어 동역학적 분석

| 항체        | $k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_{off}$ ( $s^{-1}$ ) | $K_d$ (nM) |
|-----------|-----------------------------|------------------------|------------|
| HER2 결합   |                             |                        |            |
| 야생형       | $4.57 \times 10^5$          | $4.19 \times 10^{-5}$  | 0.0917     |
| V110C     | $4.18 \times 10^5$          | $4.05 \times 10^{-5}$  | 0.097      |
| A121C     | $3.91 \times 10^5$          | $4.15 \times 10^{-5}$  | 0.106      |
| 토끼 알부민 결합 |                             |                        |            |
| 야생형       | $1.66 \times 10^5$          | 0.0206                 | 124        |
| V110C     | $2.43 \times 10^5$          | 0.0331                 | 136        |
| A121C     | $1.70 \times 10^5$          | 0.0238                 | 140        |

ABP = 알부민 결합 웨티드

[0370] 대안적으로, 알부민-결합 웨티드는 링커 모이어티를 통해 공유 결합을 통한 부착에 의해 항체에 연결될 수 있다.

[0371] Fab당 2개의 유리 티올 기를 갖는 ABP-티오Fab의 조작

[0372] 상기 결과는 모든 4개의 (L-V15C, L-V110C, H-A88C 및 H-A121C) 티오Fab (시스테인 조작된 Fab 항체) 변이체가 표지 시약, 링커 시약, 또는 지르코늄-링커 중간체와의 부위 특이적 접합에 사용될 수 있는 반응성 티올 기를 갖는다는 것을 나타낸다. L-V15C는 발현될 수 있고, 정제될 수 있으나 비교적 낮을 수율을 갖는다. 그러나, L-V110C, H-A88C 및 H-A121C 변이체의 발현 및 정제 수율은 hu4D5Fabv8과 유사하였다. 따라서, 이들 돌연변이체는 추가의 분석에 사용될 수 있고, Fab당 하나 초과의 티올 기를 얻기 위해 재조합될 수 있다. 이 목적을 위해, 경쇄 상에 하나의 티올 기 및 중쇄 상에 하나의 티올 기를 구축하여 Fab 분자당 2개의 티올 기를 수득하였다 (L-V110C/H-A88C 및 L-V110C/H-A121C). 이들 2가지 이중 Cys 변이체를 이. 콜라이 발현 시스템에서 발현시키고, 정제하였다. 정제된 비오티닐화된 ABP-티오Fab의 균질성은 단일 Cys 변이체와 유사한 것으로 밝혀졌다.

[0373] [0374] Fab당 2개의 반응성 Cys 잔기의 조작 효과를 조사하였다 (도 7). 제2 비오틴의 존재를 스트렙타비딘-HRP를 사용하여 SA에 대한 비오티닐화된 ABP-티오Fab의 결합을 프로빙함으로써 시험하였다 (도 7). HER2/Fab 분석을 위해, ELISA 플레이트를 HER2로 코팅하고, 항-Fab HRP로 프로빙하였다. SA/Fab 분석을 위해, ELISA 플레이트를 SA로 코팅하고, 항-Fab HRP로 프로빙하였다. 도 7. 비오티닐화된 ABP-hu4D5Fabv8 Cys 변이체의 HER2, 스트렙타비딘 (SA)과의 상호작용에 대한 ELISA 분석. HER2/Fab, SA/Fab 및 SA/SA는 이들의 상호작용이 각각 항-Fab-HRP, SA-HRP에 의해 모니터링되었다는 것을 나타낸다. SA/Fab은 Fab당 단일 비오틴의 존재를 모니터링하고, Fab당 1개 초과의 비오틴이 SA/SA 분석에 의해 모니터링되었다. HER2의 이중 Cys 돌연변이체와의 결합은 단일 Cys 변이체와 유사하다 (도 7). 그러나, 이중 Cys 돌연변이체에 대한 비오티닐화의 정도는 Fab 분자당 1개 초과의 유리 티올 기로 인해 단일 Cys 변이체와 비교하여 더 높았다 (도 7).

[0375] 트라스투주맙의 티오 IgG 변이체의 조작

[0376] 시스테인을 특정 잔기에서 전장 모노클로날 항체, 트라스투주맙 (헤르셉틴®, 제넨테크 인크.)에 도입하였다. 트라스투주맙의 단일 Cys 돌연변이체 H-A88C, H-A121C 및 L-V110C, 및 트라스투주맙의 이중 Cys 돌연변이체

V110C-A121C 및 V110C-A121C를 CHO (차이니즈 햄스터 난소) 세포에서 1 mM 시스테인을 함유하는 배지에서의 일시적 발효에 의해 발현시켰다. A88C 돌연변이체 중쇄 서열 (450 aa)은 서열 6이다. A121C 돌연변이체 중쇄 서열 (450 aa)은 서열 7이다. V110C 돌연변이체 경쇄 서열 (214 aa)은 서열 8이다.

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRCEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPABLQSS
GLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

서열 6

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSS
CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPABLQSS
GLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

서열 7

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTCAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

서열 8

[0377] 한 실시양태에 따라, 시스테인 조작된 티오-트라스투주맙 항체는 유리 시스테인 아미노산을 갖는 하기 가변 영역 중쇄 서열 (서열 9-16) 중 하나 이상을 포함한다.

| 돌연변이체 | 서열             | 서열 번호 |
|-------|----------------|-------|
| A40C  | WVRQCPGKGL     | 서열 9  |
| A88C  | NSLRCEDTAV     | 서열 10 |
| S119C | LTVVCSASTKGPS  | 서열 11 |
| S120C | LTVVSCASTKGPS  | 서열 12 |
| A121C | LTVVSSCSTKGPS  | 서열 13 |
| S122C | LTVVSSACTKGPS  | 서열 14 |
| A175C | HTFPCVLQSSGLYS | 서열 15 |
| S179C | HTFPAPLQCSGLYS | 서열 16 |

[0378] 또 다른 실시양태에 따라, 시스테인 조작된 티오-트라스투주맙 항체는 유리 시스테인 아미노산을 갖는 하기 가변 영역 경쇄 서열 (서열 17-27) 중 하나 이상을 포함한다.

| 돌연변이체 | 서열           | 서열 번호 |
|-------|--------------|-------|
| V15C  | SLSASCGDRVTT | 서열 17 |
| A43C  | QKPGKCPKLLI  | 서열 18 |
| V110C | EIKRTCAAPSV  | 서열 19 |
| S114C | TCAAPCVFIFPP | 서열 20 |
| S121C | FIFPPCDEQELK | 서열 21 |
| S127C | DEQLKCGTASV  | 서열 22 |
| A144C | FYPRECKVQWK  | 서열 23 |
| A153C | WKVDNCLQSGN  | 서열 24 |
| N158C | ALQSGCSQESV  | 서열 25 |
| S168C | VTEQDCKDSTY  | 서열 26 |
| V205C | GLSSPCTKSFN  | 서열 27 |

[0381]

[0382] 생성된 전장, 티오-트라스투주맙 IgG 변이체를 티올 반응성 및 HER2 결합 활성에 대해 검정하였다. 도 13a는 흡광도 검출을 위한 고정된 HER2 및 HRP 표지된 2차 항체에 대한 비오티닐화된 항체 결합의 카툰 도면을 보여준다. 도 13b는 (좌측으로부터 우측으로): 비-비오티닐화된 야생형 트라스투주맙 (Wt), 비오틴-말레이미드 접합된 티오-트라스투주맙 변이체 V110C (단일 Cys), A121C (단일 Cys), 및 V110C-A121C (이중 Cys)의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 고정된 HER2에 대한 결합 측정을 보여준다. 각각의 티오 IgG 변이체 및 트라스투주맙을 1, 10, 및 100 ng에서 시험하였다. 측정은 비오티닐화된 항-HER2 티오Mab이 HER2 결합 활성을 유지한다는 것을 나타낸다.

[0383] 도 14a는 흡광도 검출을 위한 항-IgG-HRP에 대한 비오틴의 결합을 사용하는 고정된 HER2에 대한 비오티닐화된 항체 결합의 카툰 도면을 보여준다. 도 14b는 스트렙타비딘에 대한 결합에서 비오틴-말레이미드 접합된 티오-트라스투주맙 변이체 및 비-비오티닐화된 야생형 트라스투주맙의 450 nm에서의 흡광도의 검출을 이용하는 결합 측정을 보여준다. 좌측으로부터 우측으로: V110C (단일 Cys), A121C (단일 Cys), V110C/A121C (이중 Cys), 및 트라스투주맙. 각각의 티오 IgG 트라스투주맙 변이체 및 모 트라스투주맙을 1, 10, 및 100 ng에서 시험하였다. 측정은 HER2 티오Mab이 높은 티올 반응성을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0384] 시스테인을 특정 잔기에서 전장 2H9 항-EphB2R 항체에 도입하였다. 2H9의 단일 Cys 돌연변이체 H-A121C를 CHO (차이니즈 햄스터 난소) 세포에서 1 mM 시스테인을 함유하는 배지에서의 일시적 발효에 의해 발현시켰다. A121C 2H9 돌연변이체 중쇄 서열 (450 aa)은 서열 28이다.

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGKLEWVGFINPSTGYTDY
NQKFKDRFTISADTSKNAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRPKI PRHANFWGQGTIVTVSS
CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFPAPLQSS
GLYSLSVVTVPSLSSLGQTYYICNVNHNKPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREGQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGVFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

서열 28

[0385]

[0386] 시스테인 조작된 티오-2H9 항체는 유리 시스테인 아미노산을 갖는 하기 Fc 불변 영역 중쇄 서열 (서열 29-38)을 포함한다.

| 돌연변이체 | 서열                         | 서열 번호 |
|-------|----------------------------|-------|
| V273C | HEDPECKFNWYVDGVEVHNNAKTKPR | 서열 29 |
| V279C | HEDPEVKFNWYCDGVEVHNNAKTKPR | 서열 30 |
| V282C | HEDPEVKFNWYVDGCEVHNNAKTKPR | 서열 31 |
| V284C | HEDPEVKFNWYVDGVECHNAKTKPR  | 서열 32 |
| A287C | HEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTKPR  | 서열 33 |
| S324C | YKCKVVCNKALP               | 서열 34 |
| S337C | IEKTICKAKGQPR              | 서열 35 |
| A339C | IEKTISKCKGQPR              | 서열 36 |
| S375C | KGFYPCDIAVE                | 서열 37 |
| S400C | PPVLDLCDGSFF               | 서열 38 |

[0387]

[0388] 도 16은 고정된 단백질 A 상에서의 정제 후에 2H9 야생형과 함께 2H9 티오Mab 변이체 (좌측으로부터 우측으로, 레인 1-9): A339C; S337C; S324C; A287C; V284C; V282C; V279C; 및 V273C의 비-환원 (상부) 및 환원 (하부) 변성 SDS-PAGE (폴리아크릴아미드 겔 전기영동) 분석을 보여준다. 우측 상의 레인은 크기 마커 래더로, 무손상 단백질이 약 150 kDa이고, 중쇄 단편이 약 50 kDa이고, 경쇄 단편이 약 25 kDa이라는 것을 나타낸다. 도 17a는 고정된 단백질 A 상에서의 정제 후에 2H9 티오Mab 변이체 (좌측으로부터 우측으로, 레인 1-4): L-V15C; S179C; S375C; S400C의 비-환원 (좌측) 및 환원 (우측) 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 분석을 보여준다. 도 17b는 고정된 단백질 A 상에서의 정제 후에 추가의 2H9 및 3A5 티오Mab 변이체의 비-환원 (좌측) 및 환원 (+DTT) (우측) 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 분석을 보여준다. 2H9 티오Mab 변이체 (Fab 뿐만 아니라 Fc 영역내)를 기재된 바와 같이 발현시키고, 정제하였다. 도 16, 17a 및 17b에 나타난 바와 같이, 모든 단백질은 SDS-PAGE에 이어 접합을 위한 반응성 티오Mab을 제조하기 위한 실시예 11의 환원 및 산화 절차 상에서 균질하였다 (실시예 12).

[0389] 시스테인을 특정 잔기에서 전장 3A5 항-MUC16 항체에 도입하였다. 3A5의 단일 Cys 돌연변이체 H-A121C를 CHO

(차이니즈 햄스터 난소) 세포에서 1 mM 시스테인을 함유하는 배지에서의 일시적 발효에 의해 발현시켰다. A121C 3A5 돌연변이체 중쇄 서열 (446 aa)은 서열 39를 포함한다.

DVQLQESGPGLVNPSQSLSLTCTVTGYSITNDYAWNWIROQFPGNKLEWMGYINYSGYTTY  
 NPSLKSRSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARWDGGLTYWGQGTLTVSACSTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  
 LFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDEPKFNWYDGVHNAKTKPREEQYNSTYR  
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

## 서열 39

[0390]

[0391] 시스테인 조작된 티오-3A5 항-MUC16 항체는 유리 시스테인 아미노산을 갖는 하기 가변 영역 중쇄 서열 (서열 40-44)을 포함한다.

| 돌연변이체 | 서열                    | 서열 번호 |
|-------|-----------------------|-------|
| F45C  | NWIRQCPGNK            | 서열 40 |
| A90C  | LNSCTTEDTAT           | 서열 41 |
| A121C | GQGTLVTVSACSTKGPSVFPL | 서열 42 |
| A175C | HTFPCVLCQSSGLYS       | 서열 43 |
| V176C | HTFPACLQSSGLYS        | 서열 44 |

[0392]

[0393] 시스테인 조작된 티오-3A5 항-MUC16 항체는 유리 시스테인 아미노산을 갖는 하기 가변 영역 경쇄 서열 (서열 45-49)을 포함한다.

| 돌연변이체 | 서열          | 서열 번호 |
|-------|-------------|-------|
| L15C  | FLSVSCGGRVT | 서열 45 |
| A43C  | QKPGNCPRLLI | 서열 46 |
| V110C | EIKRTCAAPSV | 서열 47 |
| A144C | FYPRECKVQWK | 서열 48 |
| S168C | VTEQDCKDSTY | 서열 49 |

[0394]

[0395] 티오Mab의 티올 반응성

[0396]

전장, IgG 시스테인 조작된 항체 (티오Mab)의 티올 반응성을 비오티닐화 및 스트렙타비딘 결합에 의해 측정하였다. 비오틴-말레이미드와 특이적으로 접합된 티오Mab을 스크리닝하기 위해 웨스턴 블로트 검정을 설정하였다. 이 검정에서, 항체를 환원 SDS-PAGE 상에서 분석하고, 비오틴의 존재를 스트렙타비딘-HRP와의 인큐베이션에 의해 특이적으로 프로빙하였다. 도 18에 나타난 바와 같이, 스트렙타비딘-HRP 상호작용은 어느 조작된 Cys 변이체가 사용되는지에 따라 중쇄 또는 경쇄에서 관찰되고, 야생형에서는 상호작용이 나타나지 않으며, 이는 티오Mab 변이체가 조작된 Cys 잔기에서 비오틴을 특이적으로 접합시킨다는 것을 나타낸다. 도 18은 고정된 항-IgG-HRP (상부 겔) 및 스트렙타비딘-HRP (하부 겔) 상에서의 포획 후에 환원된, 비오티닐화된 티오-IgG 변이체의 변성 겔 분석을 보여준다. 레인 1: 3A5 H-A121C. 레인 2: 3A5 L-V110C. 레인 3: 2H9 H-A121C. 레인 4: 2H9 L-V110C. 레인 5: 항-EphB2R 2H9 모, 야생형. 각각의 돌연변이체 (레인 1-4)를 HRP 검출과 함께 항-IgG에 의해 포획하였고 (상부), 이는 선택성 및 친화도가 유지되었다는 것을 나타낸다. HRP 검출과 함께 고정된 스트렙타비딘에 의한 포획 (하부)은 중쇄 및 경쇄 상의 비오틴의 위치를 확인하였다. 레인 1 및 3에서 시스테인 조작된 항체 상의 시스테인 돌연변이의 위치는 중쇄이다. 레인 2 및 4에서 시스테인 조작된 항체 상의 시스테인 돌연변이의 위치는 경쇄이다. 시스테인 돌연변이 부위는 비오틴-말레이미드 시약과 접합된다.

[0397]

도 18의 티오Mab 시스테인 조작된 항체 및 2H9 V15C 변이체의 LC/MS에 의한 분석은 티올 반응성의 정량적 표시를 제공한다 (표 5).

표 5

티오Mab의 비오티닐화의 LC/MS 정량 - 티올 반응성

| 티오Mab 변이체   | 티오Mab 당 비오틴의 수 |
|-------------|----------------|
| 2H9 wt      | 0.0            |
| 2H9 L-V15C  | 0.6            |
| 2H9 L-V110C | 0.5            |
| 2H9 H-A121C | 2.0            |
| 3A5 L-V110C | 1.0            |
| 3A5 H-A121C | 2.0            |

[0398]

[0399] 시스테인 조작은 IgG 항체의 불변 도메인, 즉 Fc 영역에서 수행하였다. 다양한 아미노산 부위를 시스테인 부위로 전환시키고, 발현된 돌연변이체, 즉 시스테인 조작된 항체를 이들의 티올 반응성에 대해 평가하였다. 비오티닐화된 2H9 티오Mab Fc 변이체를 ELISA 검정에서 고정된 스트렙타비딘 상에서의 포획에 의한 HRP 정량에 의해 티올 반응성에 대해 평가하였다 (도 19). 반응성 티올 기를 Cys 잔기를 빠르게 스크리닝하기 위한 ELISA 검정을 확립하였다. 도 19 개략적 다이아그램에 도시된 바와 같이, 스트렙타비딘-비오틴 상호작용을 항-IgG-HRP로 프로빙한 후에 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 모니터링하였다. 이를 결과는 2H9-티오Fc 변이체 V282C, A287C, A339C, S375C 및 S400C가 중간 내지 최고의 티올 반응성을 갖는다는 것을 확인하였다. 2H9 티오Mab Fc 변이체의 비오틴 접합의 정도를 표 6에 보고된 바와 같이 LS/MS 분석에 의해 정량하였다. LS/MS 분석은 A282C, S375C 및 S400C 변이체가 100% 비오틴 접합을 갖고, V284C 및 A339C가 50% 접합을 갖는다는 것을 확인하였으며, 이는 반응성 시스테인 티올 기의 존재를 나타낸다. 다른 티오Fc 변이체, 및 보, 야생형 2H9는 매우 적은 비오티닐화를 갖거나 전혀 갖지 않는다.

표 6

2H9 Fc 티오Mab의 비오티닐화 LC/MS의 정량

| 2H9 티오Mab Fc 변이체 | 비오티닐화 % |
|------------------|---------|
| V273C            | 0       |
| V279C            | 31      |
| V282C            | 100     |
| V284C            | 50      |
| A287C            | 0       |
| S324C            | 71      |
| S337C            | 0       |
| A339C            | 54      |
| S375C            | 100     |
| S400C            | 100     |
| (야생형 2H9)        | 0       |

[0400]

[0401] 티오-4D5 Fab 경쇄 변이체의 티올 반응성

[0402] 항-ErbB2 항체 4D5의 다양한 시스테인 조작된 경쇄 변이체 Fab의 스크리닝은 도 8의 PHESELECTOR 검정에 의해 측정된 바와 같이 0.6 및 그보다 높은 티올 반응성 값을 갖는 다수의 변이체를 제공하였다 (표 7). 표 7의 티올 반응성 값을 HC-A121C 변이체의 완전한 비오티닐화로 추정되는 100%로 설정된 중쇄 4D5 티오Fab 변이체 (HC-A121C)에 대해 정상화하고, 백분율 값으로 표시하였다.

## 표 7

4D5 티오Fab 경쇄 변이체의 티올 반응성 백분율 값

| 4D5 티오Fab 변이체 | 티올 반응성 값 (%) |
|---------------|--------------|
| V15C          | 100          |
| V110C         | 95           |
| S114C         | 78           |
| S121C         | 75           |
| S127C         | 75           |
| A153C         | 82           |
| N158C         | 77           |
| V205C         | 78           |
| (HC-A121C)    | 100          |
| (4D5 야생형)     | 25           |

[0403]

## 지르코늄-표지 시약

[0404]

데스페리옥사민 B (Df)에 기초한 예시적인 이관능성 시약을 모노클로날 항체 (mAb)를 포함하는 항체에 대한 <sup>89</sup>Zr의 복합체화를 위해 사용하였다. 데스페리옥사민 B (N'-{5-[아세틸(히드록시)아미노]펜틸}-N-[5-(4-[5-아미노펜틸)(히드록시)아미노]-4-옥소부타노일)아미노]펜틸]-N-히드록시숙신아미드 (CAS 등록 번호 70-51-9); 또한 데페록사민, 데스페록사민 B, DFO-B, DFOA, DFB 또는 데스페랄로 공지됨)는 악티노박테리아 스트렙토미세스 필로수스(*Streptomyces pilosus*)에 의해 생성된 박테리아 시데로포어이다 (도 20 상부). 데스페리옥사민 B는 신체로부터 잉여량의 철을 제거하기 위해 사용되는 킬레이트화제로서의 의학적 적용을 갖는다 (문헌 [Miller, Marvin J. "Syntheses and therapeutic potential of hydroxamic acid based siderophores and analogs" (1989) Chemical Reviews 89 (7):1563-1579]). DFO-B의 메실레이트 염은 시판된다. 최초의 실험은 N-(S-아세틸)티오아세틸-Df (SATA-Df) 및 리신 측쇄에서 ε-아미노 기에 부착된 말레이미드 기, 4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트 (mAb-SMCC)로 데코레이션된 mAb를 사용하여 수행하였다 (문헌 [Meijs WE et al. "Zirconium-labeled monoclonal antibodies and their distribution in tumor-bearing nude mice" (1997) J. Nucl. Med. 38:112-8]; [Meijs WE et al. "A facile method for the labeling of proteins with zirconium isotopes" (1996) Nucl Med Biol. 23:439-48]). 그러나, 생성된 티오에테르 접합체 (mAb-SMCC-SATA-Df)는 37 °C의 인간 혈청에서 불안정하였다 (문헌 [Verel I et al. "89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies" (2003) J Nucl Med 44:1271-81]). 숙신산 무수물 (Suc)로 변형된 Df에 기초하여 또 다른 예시적인 아미노 반응성 이관능성 킬레이터를 사용하여 Df의 아미노 기를 카르복실산으로 전환시키고, 이후에 2,3,5,6-테트라플루오로페닐 에스테르 (TFP)로 활성화시켰다. TFP-N-Suc-Df (도 20 중앙)를 mAb의 리신 ε-아미노 기에 커플링시키고, 정제된 mAb-N-Suc-Df를 <sup>89</sup>Zr로 킬레이트화시켰다. 생성된 <sup>89</sup>Zr-mAb-N-Suc-Df는 생리학적 조건하에 안정하였고, 그의 생체분포를 마우스에서 mAb-SMCC-SATA-Df와 비교하였다 (문헌 [Verel I et al. "89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies" (2003) J Nucl Med. 44:1271-81]). 그러나, TFP-N-Suc-Df의 제조는 Fe(III) 복합체로서의 히드록스아미드 기의 보호를 필요로 한다. <sup>89</sup>Zr로의 킬레이트화 전에 EDTA로 처리하여 철을 제거하지만, 다단계 방법은 진부하고, 데스페리옥사민으로부터 철의 불완전한 제거 및/또는 <sup>89</sup>Zr-킬레이트화 수율에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 접합 완충제로부터 EDTA의 불완전한 제거의 위험을 갖는다. 따라서, 이종이관능성 아미노 반응성 시약, p-이소티오시아네이트벤질-데스페리옥사이민 (Df-Bz-NCS)을 Df의 티오우레아 연결을 통한 단백질로의 혼입을 위해 최근에 개발되었다 (도 20 중앙) (문헌 [Perk LR et al. "Facile radiolabeling of monoclonal antibodies and other proteins with zirconium-89 or gallium-68 for PET Imaging using p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine" (2008) Nature Protocols, published online:DOI:10.1038/nprot.2008.22]; [Perk LR et al. "p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new

bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging" (2009) European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging]). Df-Bz-NCS를 사용하여 제조된 항체 접합체는 TFP-N-Suc-Df를 사용하여 제조된 참조 접합체와 대등한 안정성 및 영상화 특성을 나타내었다. <sup>89</sup>Zr의 리신 ε-아미노 기를 통한 항체와의 커플링을 위한 신뢰할만한 방법이 개발되었으며, <sup>89</sup>Zr 표지된 항체를 사용하는 보고된 전임상적 및 임상적 이뮤노PET 연구의 수가 빠르게 증가하고 있다 (문헌 [Verel I, et al. "Long-lived positron emitters zirconium-89 and iodine-124 for scouting of therapeutic radioimmunoconjugate with PET" (2003) Cancer Biother Radiopharm. 18:655-61]; [Nagengast WB et al. "In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft" (2007) J Nucl Med. 48:1313-9]; [Perk LR, et al. "(89)Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals (90)Y and (177)Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab" (2005) J Nucl Med. 46:1898-906]; [Perk LR et al. "Quantitative PET imaging of Met-expressing human cancer xenografts with (89)Zr-labelled monoclonal antibody DN30" (2008) European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging 35:1857-67]; [Perk LR et al. "Preparation and evaluation of (89)Zr-Zevalin for monitoring of (90)Y-Zevalin biodistribution with positron emission tomography" (2006) European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging 33:1337-45]; [Borjesson PK et al. "Performance of immuno-positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients" (2006) Clin Cancer Res. 12:2133-40]; [Aerts HJ et al. "Disparity between in vivo EGFR expression and 89Zr-labeled cetuximab uptake assessed with PET" (2009) J Nucl Med. 50:123-31]; [Dijkers EC et al. "Development and Characterization of Clinical-Grade 89Zr-Trastuzumab for HER2/neu ImmunoPET Imaging" (2009) J Nucl Med 50(6):974-981]).

[0406] 지르코늄 복합체의 실시양태는 또한 지르코늄-결합 (킬레이트화) 리간드, 예컨대 DTPA (CAS 등록 번호 67-43-6), DOPA(1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산) (문헌 [Liu, Shuang (2008) Advanced Drug Delivery Reviews 60(12): 1347-1370]), 시클로펜타디에닐, 및 알릴 기 (문헌 [Erker, G. (1991) Pure and Applied Chemistry 63(6):797-806]; [Erker, G. (1990) Jour. of Organometallic Chem. 400(1-2):185-203]) (이들은 각각 본원에 참고로 포함됨)을 포함한다.

[0407] 지르코늄 복합체 (Z) 및 다른 방사성핵종은 리신 측쇄에서 ε-아미노 기를 통해 또는 시스테인의 티올 기를 통해 모노클로날 항체 (mAb)를 포함하는 항체 (Ab)에 접합될 수 있다. 대략 40개 리신 측쇄 (문헌 [Wang L et al. "Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry" (2005) Protein Sci. 14:2436-46]) 또는 8개 시스테인 (문헌 [Hamblett KJ et al. "Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate" (2004) Clin Cancer Res. 10:7063-70])이 mAb에서 접합에 이용가능하므로, 두 접근법은 mAb 접합체 비 및 접합 부위와 관련하여 불균질성을 제공한다. 결합 부위 내의 리신 잔기의 변형은 접합체의 생물학적 활성을 감소시킬 수 있는 한편 (문헌 [Cai W et al. "PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing mice by use of an 18F-labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen diabody" (2007) J Nucl Med. 48:304-10]; [Shively JE. "18F labeling for immuno-PET: where speed and contrast meet" (2007) J Nucl Med. 48:170-2]; [Tait JF et al. "Improved detection of cell death in vivo with annexin V radiolabeled by site-specific methods" (2006) J Nucl Med. 47:1546-53]; [Schellenberger EA et al. "Optical imaging of apoptosis as a biomarker of tumor response to chemotherapy" (2003) Neoplasia (New York, N.Y) 5:187-92]), 헌지 영역 내의 시스테인의 변형은 감소된 혈장 반감기를 제공한다 (문헌 [Hamblett KJ et al. "Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibodies drug conjugate" (2004) Clin Cancer Res. 10:7063-70]). 이러한 제한은 시스테인으로의 돌연변이를 위한 항체에서 바람직한 아미노산을 빠르게 확인하기 위한 생물학적 검정, PHESELECTOR을 이용한 부위 특이적 접합의 목적을 위해 선택적으로 배치된 시스테인을 함유하도록 조작된 mAb를 사용하여 귀할 수 있다 (US 7521541; 문헌 [Junutula JR et al. "Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs" J Immunol Methods 2008;332:41-52]). 생성된 항체 (티오Mab)는 이후에 임의의 결합 친화도의 순서 또는 항체 스캐폴드 안정성에 대한 유해한 효과 없이 세포독성 약물에 화학선택적으로 및 부위 특이적으로 접합된다 (문헌 [Junutula JR et al. "Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index" (2008) Nat Biotechnol. 26:925-32])).

[0408] 영상화 관점으로부터, 최적의 영상 품질을 위해 높은 표적 치환도 및 최소의 비-특이적 흡수가 요구된다. 따라서, 부위 특이적으로 방사성표지된 시스테인 조작된 항체 (티오Mab)는 변경되지 않은 결합 친화도 및 표적 조직의 외부에서 대사물의 비-특이적인 흡수를 최소화할 수 있는 스캐폴드 안정성을 갖는 트레이서를 제공할 수 있다. 본 발명이 한 측면은 신규 Df-기재의 티올 반응성 이관능성 시약 말레이미도시클로헥실-데스페리옥사민 (Df-Chx-Mal), 브로모아세틸-데스페리옥사민 (Df-Bac) 및 아이오도아세틸-데스페리옥사민 (Df-Iac)을 사용하는 티오Mab의 부위 특이적 방사성표지를 위한 방법이다 (도 20). 예시적인 실시양태는 이들 시약이 트라스투주맙 티오Mab (티오-트라스투주맙)에 부위 특이적으로 접합되고,  $^{89}\text{Zr}$ 로 킬레이트화되고, 시험관내 및 생체내에서 평가되는 것을 포함한다.

[0409] 지르코늄의 한 준안정성 이성질체는 베타 (전자 방출), 양전자 (베타 플러스), 및 감마 방사선의 붕괴 모드로 78.4시간의 반감기를 갖는  $^{89}\text{Zr}$ 이다.

[0410] 방사성동위원소 또는 다른 표지는 공지된 방식으로 접합체에 흔입될 수 있다 (문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57; "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" Chatal, CRC Press 1989]). 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성핵종의 접합을 위한 예시적인 킬레이트화제이다 (WO 94/11026).

[0411] 링커

[0412] "링커" (L)은 하나 이상의 지르코늄 복합체 모이어티 (Z) 및 항체 단위 (Ab)를 연결하여 화학식 I의 항체-지르코늄 접합체 (AZC)를 형성하는데 사용될 수 있는 2이관능성 또는 다관능성 모이어티이다. 항체-지르코늄 접합체 (AZC)는 지르코늄 및 항체에 결합하기 위한 반응성 관능기를 갖는 링커를 사용하여 편리하게 제조할 수 있다. 시스테인 조작된 항체 (Ab)의 시스테인 티올은 링커 시약, 지르코늄 표지 모이어티 또는 지르코늄-링커 중간체의 관능기와 결합을 형성할 수 있다.

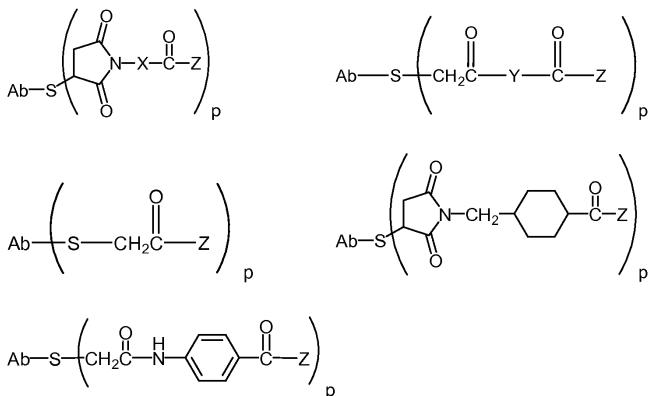
[0413] 한 측면에서, 링커는 항체 상에 존재하는 친핵 시스테인에 반응성인 친전자성 기를 갖는 반응성 부위를 갖는다. 항체의 시스테인 티올은 링커 상의 친전자성 기와 반응성이고, 링커에 대한 공유결합을 형성한다. 유용한 친전자성 기는 말레이미드 및 할로아세트아미드 기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0414] 시스테인 조작된 항체는 문헌 [Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773]의 페이지 766의 접합 방법, 및 실시예 17 내지 19의 프로토콜에 따라 친전자성 관능기, 예컨대 말레이미드 또는  $\alpha$ -할로카르보닐을 갖는 링커 시약 또는 지르코늄-링커 중간체와 반응할 수 있다.

[0415] 또 다른 실시양태에서, Z 모이어티는 동일한 것이다.

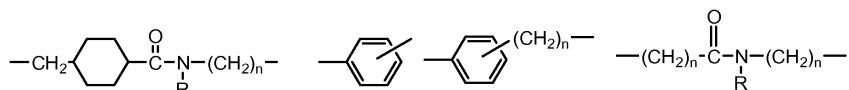
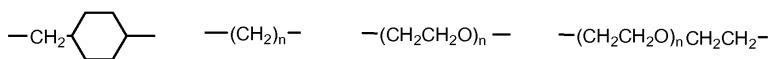
[0416] 또 다른 실시양태에서, Z 모이어티는 상이한 것이다.

[0417] 화학식 I 항체-지르코늄 접합체 (AZC) 화합물의 예시적인 실시양태는 다음을 포함한다.



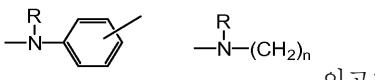
[0418]

[0419] (상기 식에서, X는



[0420]

이고;



[0421]

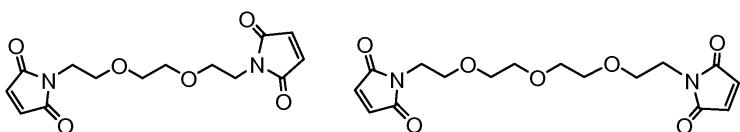
이고;

[0422] R은 독립적으로 H 또는  $\text{C}_1\text{-}\text{C}_6$  알킬이고; n은 1 내지 12임)

[0423] 또 다른 실시양태에서, 링커는 항체 상에 존재하는 친전자성 기에 반응성인 친핵성 기를 갖는 반응성 관능기를 갖는다. 항체 상의 유용한 친전자성 기는 알데히드 및 케톤 카르보닐 기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 링커의 친핵성 기의 혜테로원자는 항체상의 친전자성 기와 반응하여 항체 유닛에 공유 결합을 형성할 수 있다. 링커 상의 유용한 친핵성 기는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 항체상의 친전자성 기는 링커와의 부착에 편리한 부위를 제공한다.

[0424] 또 다른 실시양태에서, 링커는 용해도 또는 반응성을 조정한 기로 치환될 수 있다. 예를 들어, 하전된 치환기, 예컨대 술포네이트 ( $-\text{SO}_3^-$ ) 또는 암모늄은 시약의 수용해도를 증가시키고, 항체 또는 지르코늄 모이어티를 갖는 링커 시약의 커플링 반응을 용이하게 할 수 있거나, AZC를 제조하기 위해 사용되는 합성 경로에 따라서, Ab-L (항체-링커 중간체)의 Z와의 커플링 반응, 또는 Z-L (지르코늄-링커 중간체)의 Ab와의 커플링 반응을 용이하게 할 수 있다.

[0425] 본 발명의 화합물은 링커 시약: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (속신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)을 사용하고, 비스-말레이미드 시약: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)<sub>2</sub>, 및 BM(PEO)<sub>43</sub> (피어스 바이오테크놀로지, 인크., 미국 61105 일리노이주 록포드 페.오. 박스 117, 고객 서비스 부서)을 포함하여 제조된 AZC를 명백하게 고려하나 이에 제한되지는 않는다. 비스-말레이미드 시약은 순차적 또는 동시 방식으로 티올-함유 지르코늄 모이어티, 표지 또는 링커 중간체에 대한 시스테인 조작된 항체의 티올 기의 부착을 허용한다. 시스테인 조작된 항체, 지르코늄 모이어티, 표지 또는 링커 중간체의 티올 기와 반응성이 말레이미드 이외에 다른 관능기는 아이오도아세트아미드, 브로모아세트아미드, 비닐 피리딘, 디슬퍼드, 피리딜 디슬퍼드, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함한다.

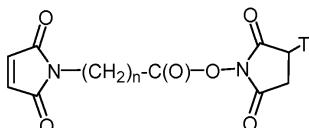


[0426]

BM(PEO)<sub>2</sub>BM(PEO)<sub>3</sub>

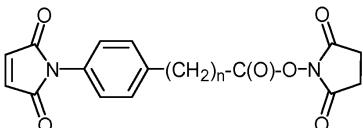
[0427] 유용한 링커 시약은 또한 다른 상업적 공급원, 예컨대 몰레클라 바이오사이언시즈 인크.(Molecular Biosciences Inc.) (미국 콜로라도주 볼더)를 통해 얻을 수 있거나, 또는 문헌 [Toki et al. (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872]; [Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355]; [Frisch et al. (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186]; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; 및 WO 04/032828에 기재된 절차에 따라 합성될 수 있다.

[0428] 예시적인 링커 시약은 다음을 포함한다:



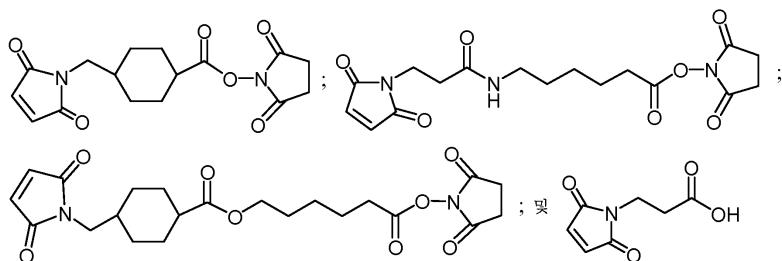
[0429]

[0430] (여기서, n은 1 내지 10 범위의 정수이고, T는 -H 또는 -SO3Na임);



[0431]

[0432] (여기서, n은 0 내지 3 범위의 정수임);

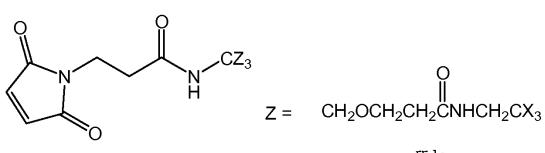
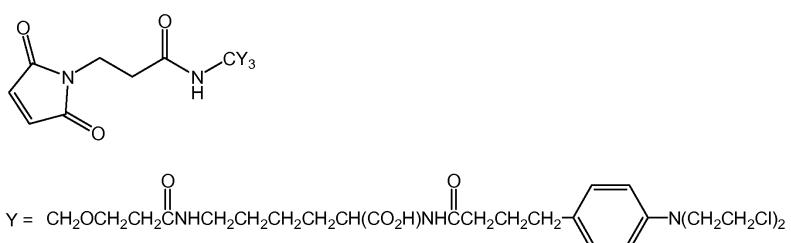
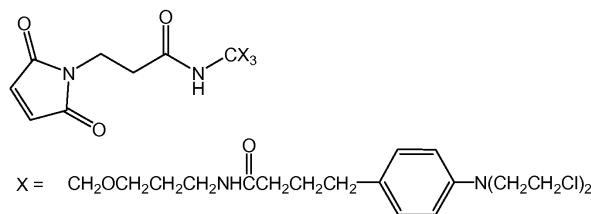


[0433]

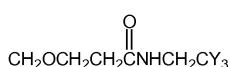
[0434] 또 다른 실시양태에서, 링커 L은 하나 초과의 지르코늄 모이어티를 분자화 다관능성 링커 모이어티를 통해 항체에 공유 결합에 의해 부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 (문헌 [Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]). 수지상 링커는 항체에 대한 지르코늄의 몰비, 즉 AZC의 로딩을 증가시킬 수 있다. 따라서, 시스테인 조작된 항체가 오직 하나의 반응성 시스테인 티올 기를 보유하는 경우에, 다수의 지르코늄 모이어티를 수지상 링커를 통해 부착시킬 수 있다.

[0435]

수지상 링커 시약의 하기 예시적인 실시양태는 클로로에틸 질소 머스타드 관능기와의 반응에 의해 9개까지의 친핵성 지르코늄 모이어티 시약이 접합되도록 허용한다:



또는



[0436]

[0437] 분지형, 수지상 링커의 다른 실시양태는 자기 회생적 2,6-비스(히드록시메틸)-p-크레졸 및 2,4,6-트리스(히드록시메틸)-페놀 텐드리며 단위를 갖는 것을 포함한다 (WO 2004/01993; 문헌 [Szalai et al. (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689]; [Shamis et al. (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731]; [Amir et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499]).

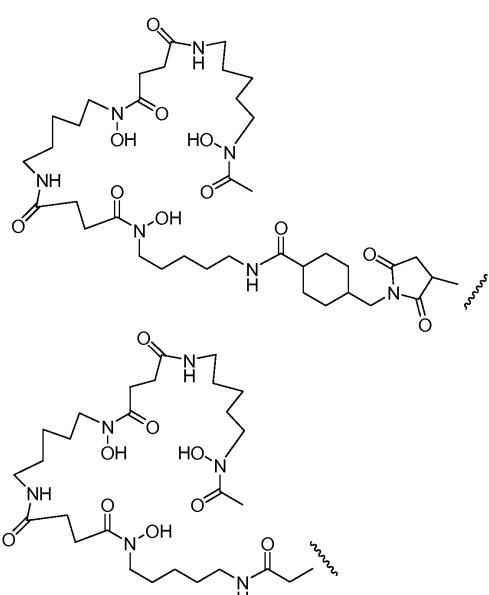
[0438] 데스페리옥사민-표지된, 시스테인 조작된 항체

[0439] 본 발명의 한 측면은 유리 시스테인 아미노산을 통해 링커 (L) 및 데스페리옥사민 모이어티 (Df)에 접합된 시스테인 조작된 항체 (Ab)를 포함하는, 하기 화학식 II를 갖는 데스페리옥사민-표지된, 시스테인 조작된 항체이다.

[0440] <화학식 II>

$\text{Ab}-(\text{L}-\text{Df})_p$

[0442] (상기 식에서, L-Df는



로부터 선택되고,

[0443] 여기서 파선은 항체 (Ab)에 대한 부착을 나타내고;

[0444] p는 1 내지 4임)

[0445] 항체-지르코늄 접합체의 제조

[0446] 화학식 I의 항체-지르코늄 접합체 (AZC)는 다음을 포함한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 몇몇 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 시스테인 조작된 항체의 시스테인 기를 링커 시약과 반응시켜, 공유결합을 통해 항체-링커 중간체 Ab-L을 형성한 후, 이를 활성화된 지르코늄 표지 모이어티 Z와 반응시키는 방법; 및 (2) 지르코늄 모이어티의 친핵성 기를 링커 시약과 반응시켜, 공유결합을 통해 지르코늄 표지-링커 중간체 Z-L을 형성한 후, 이를 시스테인 조작된 항체의 시스테인 기와 반응시키는 방법. 접합 방법 (1) 및 (2)는 다양한 시스테인 조작된 항체, 지르코늄 표지 모이어티 및 링커를 사용하여 화학식 I의 항체-지르코늄 접합체를 제조할 수 있다.

[0447] 항체 시스테인 티올 기는 친핵성이고, (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBT 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데하يد, 케톤, 카르복실 및 말레이미드; 및 (iv) 디슬피드, 예를 들어 피리딜 디슬피드 (슬피드 교환을 통한)를 포함하는, 링커 시약 및 지르코늄-링커 중간체 상의 친전자성 기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 지르코늄 표지 모이어티 상의 친핵성 기에는 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드기가 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다.

[0448] 특정 조건하에, 시스테인 조작된 항체를 환원제, 예컨대 DTT (클레란드(Cleland) 시약, 디티오프레이톨) 또는

TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드로 처리하여 링커 시약과의 접합에 반응성이 되도록 할 수 있다 (문헌 [Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80]; 솔테크 벤처스(Soltec Ventures), 미국 매사추세츠주 베벌리). CHO 세포에서 발현되는 전장, 시스테인 조작된 모노클로날 항체 (티오Mab)는 약 50배 과량의 TCEP로 3시간 동안 37°C에서 환원시켜 새롭게 도입된 시스테인 잔기와 배양 배지에 존재하는 시스테인 사이에 형성될 수 있는 디술퍼드 결합을 환원시켰다. 환원된 티오Mab을 희석하고, 10 mM 아세트산나트륨 (pH 5) 중에서 하이트랩(HiTrap) S 칼럼에 로딩하고, 0.3M 염화나트륨을 함유하는 PBS로 용리하였다. 디술퍼드 결합은 모 Mab에 존재하는 시스테인 잔기와 희석한 (200 nM) 수성 황산구리 ( $\text{CuSO}_4$ ) 간에 실온에서 밤새 재화립될 수 있다. 당엽계에 공지된 다른 산화제, 즉 산화 제제, 및 산화 조건이 사용될 수 있다. 주위 공기 산화도 효과적이다. 이 온화한 부분적 재산화 단계는 효율적으로 쇄내 디술퍼드를 고충실도로 형성시킨다. 대략 10배 과량의 지르코늄-링커 중간체를 첨가하고, 혼합하고, 약 1시간 동안 실온에서 정착시켜 접합을 수행하고, 티오Mab 항체-지르코늄 접합체를 형성시켰다. 접합체 혼합물을 젤 여과하고, 로딩하고, 하이트랩 S 칼럼을 통해 용리하여 과량의 지르코늄-링커 중간체 및 다른 불순물을 제거하였다.

[0450]

도 15는 접합을 위해 세포 배양물로부터 발현된 시스테인 조작된 항체를 제조하는 일반적인 방법을 나타낸다. 시스테인 부가물은 아마도 다양한 쇄간 디술퍼드 결합과 함께 환원적으로 절단되어 항체의 환원된 형태를 제공한다. 쌍을 이룬 시스테인 잔기 사이의 쇄간 디술퍼드 결합은 부분적 산화 조건하에, 예컨대 주위 산소에 노출시켜 재형성된다. 새롭게 도입된 조작된, 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기는 링커 시약 또는 지르코늄-링커 중간체와의 반응에 이용가능한 상태로 남아 본 발명의 항체 접합체를 형성한다. 포유동물 세포주에서 발현된 티오Mab은 -S-S- 결합 형성을 통해 조작된 Cys에 대해 외부적으로 접합된 Cys 부가물을 생성시킨다. 따라서, 정제된 티오Mab은 실시예 11에 기재된 바와 같이 환원 및 산화 절차로 처리되어 반응성 티오Mab을 생성하여야 한다. 이들 티오Mab은 방사성표지, 세포독성 약물, 형광단, 및 다른 표지를 함유한 말레이미드와 접합시키는데 사용된다.

[0451]

#### $^{89}\text{Zr}$ -Df-트라스투주맙 접합체의 제조 및 분석

[0452]

보호된 활성 에스테르 TFP-N-SucDf-Fe를 이전에 기재된 절차에 따라 제조하고 (문헌 [Verel I et al. "89Zr Immuno-PET: Comprehensive Procedures For The Production Of 89Zr-Labeled Monoclonal Antibodies" (2003) J Nucl Med 44:1271-81]), 5배 몰 과량의 TFP-N-SucDf-Fe를 사용하여 트라스투주맙에 접합시켜 N-SucDf-트라스투주맙 (데스페리옥사민의 1.6개 분자의 평균을 가짐)을 수득하였다 (표 8). Df-Bz-SCN-트라스투주맙은 8배 몰 과량의 Df-Bz-SCN를 pH 8.5에서 커플링시켜 수득하였다 (문헌 [Perk LR, et al. "Facile radiolabeling of monoclonal antibodies and other proteins with zirconium-89 or gallium-68 for PET Imaging using p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine" (2008) Nature Protocols; published online:DOI:10.1038/nprot.2008.22]). 반응은 데스페리옥사민의 2.4개 분자를 갖는 평균으로 데코레이션된 Df-Bz-SCN-트라스투주맙을 제공한다 (표 1).

[0453]

신규 말레이미드 기재의 티올 반응성 이관능성 링커 Df-Chx-Mal은 등몰량의 데스페리옥사민 메실레이트 및 SMCC로부터 제조하였다 (도 21, 실시예 13). 반응은 실온에서 30분 내에 완료하였고, 생성물을 물 첨가시 침전에 의해 45% 수율 및 95% 초파의 순도로 단리하였다. 8.5배 몰 과량의 Df-Chx-Mal의 새로 재조된 티오-트라스투주맙의 반응 (도 21 실시예 17)은 1 h 내에 정확하게 데스페리옥사민의 2개 분자를 갖는 Df-Chx-Mal-티오-트라스투주맙 접합체를 제공하였다 (표 1, 도 21). 브로모아세틸 데스페리옥사민 (BDf-Bac)을 0°C에서 등몰량의 데스페리옥사민 메실레이트 및 브로모아세틸 브로마이드의 반응에 의해 제조하였다 (실시예 14). 생성물을 HPLC 정제 후에 14% 수율로 수득하였다. 새로 재조된 티오-트라스투주맙 (도 21, 실시예 16)의 12배 몰 과량의 Df-Bac로의 알킬화는 5 h 내에 항체당 Df의 1.8개 분자를 갖는 접합체 (Df-Ac-티오-트라스투주맙)를 제공하였다 (표 8, 도 21, 실시예 18). 브로마이드의 낮은 반응성은 본 발명자들이 보다 반응성인 아이오도아세틸 유도체 (Df-Iac)를 고려하도록 하였다. Df-Iac는 데스페리옥사민 메실레이트의 약간 과량의 N-히드록시숙신이미딜 아이오도아세테이트와의 반응에 의해 53% 수율로 제조하였다 (도 21, 실시예 15). 생성물을 반응 혼합물로부터의 침전 후에 95% 초파의 순도로 수득하였다. 이후에 11배 과량의 Df-Iac의 반응은 2 h 내에 Df의 1.8개 분자로 데코레이션된 Df-Ac-티오-트라스투주맙을 제공하였다 (표 1, 도 21, 실시예 19). 본 발명자들의 경험에 기초하여, Df-Chx-Mal은 조사된 3가지 화합물 중 바람직한 시약이다. 주목할만하게, 티올 기의 Df-Bac 및 Df-Iac로의 알킬화에는 보다 높은 pH 및 보다 긴 반응 시간이 필요한 것과 대조적으로 Df-Chx-Mal의 반응이 1 h 내에 중간 정도의 pH에서 완료되었다. 또한, 할로아세트아미드의 보다 낮은 반응성은 티오-트라스투주맙의 두 이용 가능한 시스테인의 불완전한 로딩을 야기할 수도 있다.

표 8

다양한 시약을 사용하여 제조된 Df-링커-트拉斯투주맙 접합체의 반응 조건 및 수율

| 시약              | 온도<br>[°C] | pH  | 시약 과량 | 반응 시간<br>[hr] | 로딩<br>[Df/Mab] |
|-----------------|------------|-----|-------|---------------|----------------|
| Fe-Df-N-Suc-TFP | 37         | 8.5 | 5     | 1.5           | 1.6            |
| Df-Bz-SCN       | 37         | 9   | 8     | 0.5           | 2.4            |
| Df-Chx-Mal      | 25         | 7.5 | 8.5   | 1             | 2.0            |
| Df-Bac          | 25         | 9   | 12    | 5             | 1.8            |
| Df-Iac          | 25         | 9   | 11    | 2             | 1.8            |

[0454]

[0455]  $^{89}\text{Zr}$ 은 이전에 기재된 실험적 절차를 이용하여 Df-트拉斯투주맙의 모든 4가지 변이체로  $^{89}\text{-지르코늄 옥살레이트}$ 로 칠레이트화하였다 (문헌 [Verel I et al. "89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies" (2003) J Nucl Med. 44:1271-81]). 방사성표지된 단백질을 탈염 칼럼 상에서 정제하고, 최종 용액을 막 여과에 의해 요구되는 부피로 농축하였다.  $^{89}\text{Zr}$  접합체의 수율, 순도 및 최종 비활성을 표 9에 요약하였다. 일반적으로, 칠레이트화 수율은 80%를 초과하나, 예외로 Df-N-Suc 링커는 아마도 항체 분자당 보다 적은 양의 Df 및/또는 활성화 및 접합 동안 칠레이터를 보호하기 위해 사용된 Fe(II I)의 불완전한 제거로 인해 보다 낮은 수율을 얻었다. 탈염 칼럼을 사용하는 Df-트拉斯투주맙 변이체의 정제 후에, 생성물 순도는 90%를 초과하였으며, 소량 (1-6%)의 고분자량 응집체가 각각의 샘플에서 검출되었다. 대략 8%의 저분자량 불순물 및 2%의 고분자량 응집물로 오염된 Df-Ac 접합체와 대조적으로 Df-Chx-Mal-티오-트拉斯투주맙은  $^{89}\text{Zr}$  복합체를 99% 순도로 제공하였다 (표 9). 오염물은 NAP-10 칼럼을 사용하는 제거에 저항하였으나, 아미콘 필터 상에서의 반복된 완충제 교환을 이용하여 제거가 가능하였다.

표 9

방사성표지된  $^{89}\text{Zr}$ -Df-링커-트拉斯투주맙의 수율, 비활성 및 순도

| 링커      | 방사화학적<br>수율 [%] | 비활성<br>[mCi/mg] | 순도 [%] |
|---------|-----------------|-----------------|--------|
| N-Suc   | 60              | 2.2             | 98     |
| Bz-SCN  | 81              | 2.9             | 94     |
| Chx-Mal | 87              | 3.4             | 99     |
| Ac      | 84              | 3.2             | 90     |

[0456]

[0457]  $^{89}\text{Zr}$ -Df-트拉斯투주맙 접합체의 생물학적 활성

[0458] 새롭게 제조된 부위 특이적 Df-링커-티오-트拉斯투주맙 접합체의 생물학적 활성은 스캐차드 분석에 의해 BT474 유방암 세포주에 대한 결합 검정을 이용하여 결정하였다. 수득한  $K_D$  값을 비-변형된 트拉斯투주맙 ( $0.91 \pm 0.20$  nM)과 비교하였다. Chx-Mal 링커를 함유하는 티오-트拉斯투주맙 접합체에 대한  $K_D$ 는  $0.93 \pm 0.15$  nM이었고, Ac 링커를 함유하는 접합체에 대한 값은 Df-Bac를 사용하여 제조된 접합체의 경우  $1.22 \pm 0.22$  nM이었고, Df-Iac를 사용하여 제조된 접합체의 경우  $0.87 \pm 0.15$  nM이었다. 생물학적 활성 분석의 결과는 티오-트拉斯투주맙의 변형이 HER2에 대한 항체의 결합 친화도에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

[0459]

시험관내 혈청 안정성

[0460]

아미드 또는 티오우레아 연결을 함유하는 N-Suc 및 Bz-SCN 링커와의 이전에 보고된 Df-항체 접합체는 시험관내에서 6일 기간에 걸쳐  $37^\circ\text{C}$ 의 혈청에서 안정하였다 (문헌 [Verel I et al. "89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies" J Nucl Med 2003;44:1271-81]; [Perk LR et al., (2009) European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging 35(10):1857-1867]). Chx-Mal 및 Ac 링커와의  $^{89}\text{Zr}$ -티오-트拉斯투주맙 접합체의 안정성은  $37^\circ\text{C}$ 의 마우스 혈청에서 결정하였다. 항체 결합된  $^{89}\text{Zr}$ 의 유의한 손실은 5일 기간 내에 관찰되지 않았다. 두 티오 접합체는 안정하였으며,  $^{89}\text{Zr}$ -Df-Chx-

Mal-티오-트라스투주맙의 경우 하루당 1.8%의 항체 결합된  $^{89}\text{Zr}$ 의 평균 손실 및  $^{89}\text{Zr}$ -Df-Ac-티오-트라스투주맙의 경우 하루당 1.4%의 항체 결합된  $^{89}\text{Zr}$ 의 평균 손실을 나타내었다 (도 24). 고분자량 종의 느린 형성 (아마도 응집물)이 Df-Chx-Mal 및 Df-Ac 링커 둘 모두에서 관찰되었다.

#### [0461] 생체내 마이크로PET 영상화

[0462] 피하 BT474M1 이종이식편 (크기 약 200 mm<sup>3</sup>)을 보유한 20마리 동물 (군당 5마리 동물)에게  $^{89}\text{Zr}$ -트라스투주맙을 정맥내 주사하였다. 동물당 주사된 항체의 양은 1.4±0.29 mg/kg이었다. 대표적인 동물의 최대 강도 투사 영상 (96 h p.i.)은 도 3에 나타내었다. 선택된 조직에서의  $^{89}\text{Zr}$ -트라스투주맙 흡수는 도 4에 요약하였다. 1 h에서의 영상 (나타내지 않음)은 친지성 불순물의 빠른 간담즙 배출이 장에서 상승된 흡수를 야기하는 Df-Bac를 제외하고는 높은 혈액 풀 흡수가 우세하였다. 불순물을 처음 24 h 내에 전체적으로 제거하였고, 상승된 소장 및 대장 흡수가 트레이서 주사후 24 h 또는 그 이후에 검출되지 않았다. Df-Ac 접합체의 조직 흡수가 결과적으로 약간 (약 8%) 더 낮더라도, 종양 대 혈액 비 (표 10)는 주사된 방사능의 손실에 영향을 받지 않았다. 96h에서의 영상은 4가지 상이한  $^{89}\text{Zr}$ -트라스투주맙 변이체 사이에서 관찰된 약간의 차이를 갖는 높은 종양 흡수가 우세하였다 (도 25). 각각의 트레이서에 대해 종양 흡수는 동일하였으며, 주사후 24h에 최대값에 도달하고, 혈액 제거로 인한 144h에 최대 종양-대-혈액 비에 도달하였다 (표 10). 티올 기재의 접합체  $^{89}\text{Zr}$ -Df-Chx-Mal-티오-트라스투주맙은 96 및 144 h p.i에서 아민 기재의 접합체 (Df-Bz-SCN 및 Df-N-Suc)와 비교하여 상승된 골 흡수를 나타내었다 ( $P < 0.05$ ). Df-Ac-티오-트라스투주맙의 골 흡수는 Df-Bz-SCN 및 Df-N-Suc 링커와 비교하여 유의하게 상승하지 않았으나 ( $P = 0.20$ ), 처음 24 h 동안 방사능의 8% 손실에 대해 보정하였을 때 유의해질 수 있다. 각각의 트레이서의 신장 흡수는 항체 기재의 트레이서에 대해 예측된 바와 같이 낮았으나 (도 26),  $^{89}\text{Zr}$ -Df-Chx-Mal-티오-트라스투주맙은 24, 96 및 144h에서 다른 링커와 비교하여 약간 더 높았다 ( $P < 0.05$ ).

#### 표 10

| 혈액 비<br>링커 | 주사 후 24, 96 및 144 h에서의 평균 종양 대 |      |       |
|------------|--------------------------------|------|-------|
|            | 24 h                           | 96 h | 144 h |
| N-Suc      | 1.8                            | 3.8  | 6.0   |
| Bz-SCN     | 2.0                            | 4.0  | 5.7   |
| Chx-Mal    | 2.0                            | 4.9  | 7.1   |
| Ac (Bac)   | 2.0                            | 4.7  | 6.1   |

[0463]

[0464] BT474 (HER2의 3+ 발현 수준) 이종이식편은 SKOV3 (HER2의 3+ 발현 수준)에서 이전에 [Dijkers et al.]에 의해 측정된 것 (33.4±7.7%ID/g)보다 낮은 트레이서의 절대 흡수 (15%ID/g)를 나타내었다 (문헌 [Dijkers EC, et al. "Development and Characterization of Clinical-Grade 89Zr-Trastuzumab for HER2/neu ImmunoPET Imaging" (2009) J Nucl Med 50(6):974-981]). 그러나, 5.7 대지 7.1의 종양 대 혈액 비 (표 10)는 SKOV3 (7.6의 종양 대 혈액 비)을 사용하여 수득한 값과 대등하였다. 종양 흡수의 차이는 종양 모델 및 트라스투주맙의 전체 투여량에 기인할 수 있다. 따라서, 보다 높은 비활성을 갖는 물질을 사용하여 SKOV3 (100 µg, 4 mg/kg)를 사용하는 [Dijkers et al.] 연구에 비해 유의하게 적은 항체 (35 µg, 1.4 mg/kg)를 주사하였다. 비활성의 차이는 또한 SKOV3 모델 (5-10%ID/g)과 비교하여 2-3%ID/g의 본원의 실험에서의 유리  $^{89}\text{Zr}$ 의 보다 낮은 골 흡수에 기여할 수 있다. 불행하게도, 문헌 [Dijkers et al. Zirconium is known to bind plasma proteins (Mealey J, Jr. "Turn-over of carrier-free zirconium-89 in man" (1957) Nature 179:673-4)]에는 상승된 골 흡수에 대한 교시가 제공되지 않았으며, 이는 이후에 무기질 골에 침착된다 (문헌 [Fletcher CR. "The radiological hazards of zirconium-95 and niobium-95" (1969) Health Phys. 16:209-20]; [Shiraishi Y and Ichikawa R. "Absorption and retention of 144 Ce and 95 Zr- 95 Nb in newborn, juvenile and adult rats" (1972) Health Phys. 22:373-8]). 주사 물질이 유리  $^{89}\text{Zr}$ 을 함유하지 않으므로, 골 흡수는  $^{89}\text{Zr}$ -항체의 파괴 또는 항체와 비-특이적으로 관련된  $^{89}\text{Zr}$  (이후에 Df에 결합된  $^{89}\text{Zr}$ 와 비교하여 혈장 단백질에 트랜스-킬레이트화될 수 있음)로부터 기원할 수 있다.

[0465] 시스테인 조작된 항체의 시스테인의 티올 기를 통해 모노클로날 항체에 테스페리옥사민 (Df)을 화학선택적으로

접합시키기 위한 3가지 티올 특이적 시약이 본원에 예시된다. 티올-특이적 Df-시약을 데스페리옥사민 B의 아미노 기의 아실화에 의해 14% (Df-Bac), 53% (Df-Iac) 및 45% (Df-Chx-Mal) 수율로 수득하고, 티오-트拉斯투주맙에 접합시켜 1 내지 5 h 내에 두 조작된 시스테인 상에 부위 특이적 변형을 생성하였다. 부위 특이적 티오-트拉斯투주맙 접합체의 HER2에 대한 결합 활성은 비-변형된 트拉斯투주맙의 활성과 동일하였다. Df-변형된 티오-트拉斯투주맙 (Df-Ac-티오-트拉斯투주맙 및 Df-Chx-Mal-티오-트拉斯투주맙)을 이전에 기재된 Df-Bz-SCN 및 Df-N-Suc 링커를 사용하여 제조된 리신 접합체와 대등하게 1 h 이내에 80%를 초과하는 수율로 <sup>89</sup>Zr로 킬레이트화시켰다 (도 22). <sup>89</sup>Zr-Df-Ac-티오-트拉斯투주맙 및 <sup>89</sup>Zr-Df-Chx-Mal-티오-트拉斯투주맙 둘 모두는 마우스 혈청에서 대등한 안정성을 나타내었다. 두 화합물은 또한 6.1 내지 7.1 범위의 종양 대 혈액 비를 갖는 10-15%ID/g의 종양 흡수에 도달한 리신 접합체와 대등한 PET 영상화 능력을 BT474M1 유방암 모델에서 나타내었다. 전반적으로, 신규 시약이 용이하게 입수하능하고, 단백질의 티올 기와의 우수한 반응성을 입증하고, <sup>89</sup>Zr로의 매우 우수한 킬레이트화 특성을 나타내었다. <sup>89</sup>Zr-표지된 항체는 혈청에서 안정하고, 매우 우수한 PET 영상화 특성을 나타내었다. Df-Chx-Mal은 시스테인 측쇄를 통해 항체에 Df를 접합시키기에 유용한 시약이고, Df-Bac 및 Df-Iac보다 여러 이점을 나타내었다. 첫째, Df-Bac 및 Df-Iac의 경우 완전한 접합을 위해 pH 9 및 2 또는 5 h를 필요로 하는 것에 비해 1 h 이내의 Df-Chx-Mal의 완전한 접합을 위해 중간 pH 7.5를 필요로 하였다. 또한, 부위 특이적으로 <sup>89</sup>Zr 표지된 조작된 티오Fab 접합체를 생체의학 연구에서 PET 영상화 적용을 위해 유요한 도구로서 <sup>18</sup>F 표지된 티오Fab 접합체와 유사하게 사용할 수 있다 (문헌 [Gill HS, et al. "A modular platform for the rapid site-specific radiolabeling of proteins with <sup>18</sup>F exemplified by quantitative positron emission tomography of human epidermal growth factor receptor 2" (2009) Jour. of Med. Chem. 52:5816-25]).

[0466]

항체-지르코늄 접합체의 투여

[0467]

본 발명의 항체-지르코늄 접합체 (AZC)는 치료될 증상에 적절한 임의의 경로로 투여될 수 있다. AZC는 전형적으로 비경구로, 즉 주입, 피하, 근육내, 정맥내, 피부내, 경막내 및 경막외로 투여될 것이다.

[0468]

제약 제제

[0469]

본 발명의 진단상 항체-지르코늄 접합체 (AZC)의 제약 제제는 전형적으로, 제약상 허용되는 비경구 비히클과 함께 단위 투여량 주사가능한 형태로, 비경구 투여용, 즉 볼루스, 정맥내, 종양내 주사용으로 제조한다. 바람직한 정도의 순도를 갖는 항체-지르코늄 접합체 (AZC)를 동결건조된 제제 또는 수용액제의 형태로 제약상 허용되는 희석제, 담체, 부형제 또는 안정화제와 임의로 혼합한다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.]).

[0470]

허용되는 희석제, 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐파리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 엑스트린; 퀼레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN)<sup>TM</sup>, 플루로닉스(PLURONICS)<sup>TM</sup> 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 예를 들어, 동결건조된 항-ErbB2 항체 제제는 WO 97/04801에 기재되어 있고, 상기 문헌은 본원에 명백하게 참고로 포함된다.

[0471]

활성 제약 성분은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드 성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 매크로에멀젼에 포함될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0472]

서방성 제제를 제조할 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예는 AZC를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매

트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다. 서방성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드록시 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (US 3773919), L-글루탐산 및 감미-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 분해가능하지 않은 에틸렌-비닐아세테이트, 분해가능한 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)<sup>TM</sup> (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미소구) 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0473] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 하고, 이것은 멸균 여과 막을 통한 여과로 쉽게 수행된다.

[0474] 제제는 상기 기재된 투여 경로에 적합한 것들을 포함한다. 제제는 편리하게는 단위 투여 형태로 제공될 수 있으며 제약 업계에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 기술 및 제제에 대해서는 문현 [Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA)]에서 확인된다. 이러한 방법은 활성 성분을 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제제는 활성 성분을 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 다와 균일하고 치밀하게 결합시키고, 이어서 필요한 경우, 생성물을 성형함으로써 제조된다.

[0475] 본 발명의 수성 혼탁액은 활성 물질을 수성 혼탁액의 제조에 적합한 부형제와 혼합하여 함유한다. 이러한 부형제는 혼탁화제, 예컨대 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 크로스카르멜로스, 포비돈, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 알긴산나트륨, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸트 검 및 아카시아 검, 및 분산제 또는 습윤제, 예컨대 자연 발생 포스파티드 (예를 들어 레시틴), 알킬렌 옥시드와 지방산의 축합 생성물 (예를 들어 폴리옥시에틸렌 스테아레이트), 에틸렌 옥시드와 장쇄 지방족 알콜의 축합 생성물 (예를 들어 헵타데카에틸렌옥시세탄올), 에틸렌 옥시드와 지방산 및 헥시톨 무수물 유래의 부분 에스테르의 축합 생성물 (예를 들어 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트)을 포함한다. 수성 혼탁액은 또한 하나 이상의 보존제, 예컨대 에틸 또는 n-프로필 p-히드록시-벤조에이트, 하나 이상의 착색제, 하나 이상의 향미제 및 하나 이상의 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린을 함유할 수 있다.

[0476] AZC의 제약 조성물은 멸균성 주사용 제제, 예를 들어 멸균성 주사용 수성 또는 유성 혼탁제의 형태일 수 있다. 상기 혼탁액은 상기 언급된 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 바에 따라 제제화될 수 있다. 멸균 주사가능한 제제는 또한 비독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사가능한 용액 또는 혼탁액, 예컨대 1,3-부탄-디올 등의 용액일 수 있거나, 또는 동결건조된 분말로서 제조될 수 있다. 특히, 사용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매는 물, 릴거액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 추가로, 멸균 고정유가 용매 또는 혼탁 매질로서 통상적으로 사용될 수 있다. 상기 목적을 위해, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 비롯한 임의의 배합 고정유가 사용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산을 마찬가지로 주사제의 제조에 사용할 수 있다.

[0477] 담체 물질과 조합되어 단일 투여 형태를 생성할 수 있는 활성 성분의 양은 치료할 숙주 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 정맥내 주입을 위해 의도된 수용액은 용액 1 mL 당 활성 성분 약 3 내지 500 µg 을 함유하여, 약 30 mL/시간의 속도의 적합한 부피로 주입될 수 있다.

[0478] 비경구 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제제가 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되게 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사 용액, 및 혼탁화제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 혼탁액을 포함한다.

[0479] 단백질 치료제를 경구 투여하는 것이 소화관에서의 가수분해 또는 변성으로 인해 선호되지 않긴 하지만, 경구 투여용으로 적합한 AZC 제제는 별개의 단위, 예를 들어 예정량의 AZC를 각각 함유하는 캡슐, 샤ퟜ 또는 정제로서 제조할 수 있다.

[0480] 제제는 단위-투여 또는 다중-투여 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플 및 바이알에 포장될 수 있고, 사용 직전에 주사를 위한 멸균 액체 담체, 예를 들어 물을 첨가할 것만이 요구되는 냉동-건조 (동결건조) 상태로 저장될 수 있다. 즉시투여용 주사 용액 및 혼탁액은 앞서 기재한 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조된다. 바람직한 단위 투여 제제는 활성 성분을 본원에 상기 언급한 바와 같은 1일 용량 또는 단위 1일 분할-용량 또는 그의 적절한 분획으로 함유하는 것이다.

[0481] 추가로, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 하나 이상의 활성 성분을 이를 위한 수의학적 담체와 함께 포함하는 수의학 조성물을 제공한다. 수의학적 담체는 조성물 투여 목적에 유용한 물질이고, 불활성이거나 수의학 업계에서 허용되는 고체, 액체 또는 기체 물질일 수 있고, 활성 성분과 상용가능하다. 이러한 수의학 조성물은 비

경구, 경구 또는 임의의 다른 바람직한 경로로 투여될 수 있다.

[0482] 표지된 항체 영상화 방법

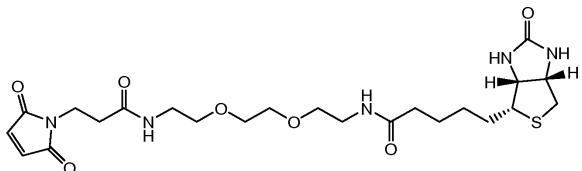
[0483] 본 발명의 다른 실시양태에서, 시스테인 조작된 항체는 방사성핵종, 형광 염료, 생체발광-촉발 기질 모이어티, 화학발광-촉발 기질 모이어티, 효소, 및 진단, 약동학 및 치료적 적용을 이용하는 영상화 실험에서 다른 검출 표지를 갖는 시스테인 티올을 통해 표지될 수 있다. 일반적으로, 표지된 시스테인 조작된 항체, 즉 "바이오마커" 또는 "프로브"는 살아있는 유기체, 예를 들어 인간, 설치류, 또는 다른 작은 동물, 관류된 기관, 또는 조직 샘플에 주사, 관류, 또는 경구 섭취에 의해 투여된다. 프로브의 분포를 시간 경로에 걸쳐 검출하고, 영상으로 나타낸다.

[0484] 실시예

[0485] 용매 및 화학물질의 준비는 달리 언급되지 않는 한 알드리치(Aldrich) (미국 위스콘신주 밀워키)로부터 구입하였다. 하기 역상 HPLC 시스템을 사용하여 생성물을 분석 및 정제하였다. 시스템 A: 폐노메넥스(Phenomenex) BioSep-SEC-S 3000 (300 x 4.60 mm, 5  $\mu$ m) 50 mM PBS 0.5 mL/min, UV 흡광도 및 방사능 검출기 (PMT)가 장착됨; 시스템 B 알티마(Altima) C-18 (100 x 22.0 mm, 5  $\mu$ m) 0.05% TFA + 10-50% 아세토니트릴, 0-30 min, 24 mL/min, UV 검출기가 장착됨. 저분자량 생성물의 질량 분광측정법 분석은 오닉스 모노리틱(Onyx Monolithic) C<sub>18</sub> 칼럼이 장착된 PE 사이엑스(Sciex) API 150EX LCMS 시스템 상에서 수행하였다. 단백질의 LCMS 분석은 확장된 질량 범위를 갖는 TSQ 퀸텀(Quantum) 트리플 사중극자 질량 분광측정계 (써모 일렉트론, 써모 피셔 사이언티픽 인크. (Thermo Electron, Thermo Fisher Scientific Inc.), USA) 상에서 수행하였다. LCMS 분석을 위한 단백질 샘플을 20 mM 디티오토레이톨 (DTT)로 37°C에서 1시간 동안 처리하여 환원시킴으로써 중쇄 및 경쇄를 분리하였다. 샘플을 75°C로 가열된 PRLP-S 1000Å 마이크로보어 칼럼 (50 mm x 2.1 mm, 폴리머 래보러토리즈, 배리안 인크.(Polymer Laboratories, Varian Inc.), USA) 상에서 크로마토그래피 처리하였다. 30-40% B (용매 A, 물 중 0.05% TFA; 용매 B, 아세토니트릴 중 0.04% TFA)의 선형 구배를 사용하고, 용리액은 전기분무 공급원을 사용하여 직접 이온화시켰다. 데이터를 엑스칼리버(Xcalibur) 데이터 시스템에 의해 수집하고, 디컨볼루션은 프로매스(ProMass) 소프트웨어 (노바티아(Novatia), 미국 뉴저지주 몬마우스 정선)를 사용하여 수행하였다. NMR 스펙트럼을 298K에서 브루커 아반스(Bruker Avance) II 400 분광측정계 상에서 기록하고, 화학적 이동을 TMS에 대해 보고하였다. 단백질 농도를 에펜도르프 바이오포토미터(Eppendorf BioPhotometer) (미국 뉴욕주 웨스트베리)를 사용하여 280 nm에서 측정하였다. <sup>89</sup>Zr를 메모리얼 슬론-케터링(Memorial Sloan-Kettering) 암센터 (미국 뉴욕주 뉴욕)로부터 470-1195 Ci/mmol의 비활성을 갖는 1 M 옥살산 용액 중 <sup>89</sup>Zr(IV) 옥살레이트로 수득하였다 (문헌 [Holland JP, et al. (2009) "Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89" Nucl Med Biol. 36:729-39]). 이종이관능성 링커 숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC)를 피어스 (미국 일리노이주 록포드)로부터 구입하고, N-히드록시숙신이미딜 아이오도아세테이트를 인도핀 케미칼 컴퍼니(Indofine Chemical Company) (미국 뉴저지주 힐스보로)로부터 수득하였다. NAP-10 칼럼을 (지이 헬스케어(GE Healthcare), USA)로부터 수득하고, 아미콘 울트라(Amicon Ultra)-4 원심분리 필터 (10,000 MWCO)를 밀리포어(Millipore) (미국 메사추세츠주 빌레리카)로부터 수득하였다. Df-Bz-SCN을 매크로시클릭스(Macrocyclics) (미국 텍사스주 달拉斯)로부터 수득하였다.

[0486] 실시예 1 비오티닐화된 티오Fab 과자의 제

[0487] 티오Fab-과자 ( $5 \times 10^{12}$  개 과자 입자)를 150배 과량의 비오틴-PEO-말레이미드 ((+)-비오티닐-3-말레이미도프로피온아미딜-3,6-디옥사옥타인디아민, 문헌 [Oda et al. (2001) Nature Biotechnology 19:379-382], 피어스 바이오테크놀로지, 인크.)과 3시간 동안 실온에서 반응시켰다. 과량의 비오틴-PEO-말레이미드를 반복된 PEG 침전 (3 내지 4회)에 의해 비오틴-접합된 과자로부터 제거하였다. 비오틴-BMCC, PEO-아이오도아세틸 비오틴, 아이오도아세틸-LC-비오틴, 및 비오틴-HPDP (피어스 바이오테크놀로지, 인크.), 및 N<sup>a</sup>-(3-말레이미딜프로피오닐)비오틴 (MPB, 몰레큘라 프로브스(Molecular Probes), 미국 오레곤주 유진)을 포함한, 시스테인 티올 기와 반응성 인 친전자성 기를 갖는 다른 시판되는 비오티닐화 시약을 사용할 수 있다. 비오티닐화, 이관능성 및 다관능성 링커 시약에 대한 다른 상업적 공급원은 몰레큘라 프로브스(미국 오레곤주 유진) 및 시그마(Sigma) (미국 미주리주 세인트 루이스)를 포함한다.



비오틴-PEO- 말레이미드

[0488]

## 실시예 2 PHESELECTOR 검정

[0489]

소 혈청 알부민 (BSA), erbB2 세포의 도메인 (HER2) 및 스트렙타비딘 ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의  $100 \mu\text{l}$ )을 맥시소르프 (Maxisorp) 96 웰 플레이트 상에 개별적으로 코팅하였다. 0.5% 트윈-20 (PBS 중)으로 차단한 후에, 비오티닐화된 및 비-비오티닐화된 hu4D5Fabv8-티오Fab-파지 ( $2 \times 10^{10}$  개 파지 입자)를 1시간 동안 실온에서 인큐베이션 다음 양고추냉이 페옥시다제 (HRP) 표지된 2차 항체 (항-M13 파지 외피 단백질, pVIII 단백질 항체)와 인큐베이션 하였다. 도 8은 HER2에 대한 Fab 또는 티오Fab의 결합 (상부) 및 스트렙타비딘에 대한 비오티닐화된 티오Fab의 결합 (하부)을 도시하는 도식적 표현에 의해 PHESELECTOR 검정을 설명한다.

[0490]

표준 HRP 반응을 수행하고, 흡광도를  $450 \text{ nm}$ 에서 측정하였다. 티올 반응성을 스트렙타비딘에 대한  $\text{OD}_{450}/\text{HER2}$ 에 대한  $\text{OD}_{450}$  사이의 비를 계산하여 측정하였다. 1의 티올 반응성 값은 시스테인 티올의 완전한 비오티닐화를 나타낸다. Fab 단백질 결합 측정의 경우에, hu4D5Fabv8 ( $2 \text{ ng}$  내지  $20 \text{ ng}$ )을 사용한 다음 HRP 표지된 염소 폴리클로날 항-Fab 항체와 인큐베이션하였다.

[0491]

## 실시예 3a 티오Fab의 발현 및 정제

[0492]

34B8, 비-저해제 이. 콜라이 균주에서 유도시에 티오Fab이 발현되었다 (문헌 [Baca et al. (1997) Journal Biological Chemistry 272(16):10678-84]). 수확된 세포 펠릿을 PBS (포스페이트 완충 염수)에 재현탁시키고, 전체 세포 용해를 마이크로플루이다이저를 통해 통과시켜 수행하고, 티오Fab을 단백질 G 세파로스™ (아머샵)를 사용하는 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0493]

티오Fab L-V15C, L-V110C, H-A88C, 및 H-A121C를 발현시키고, 단백질-G 세파로스™ 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 올리고머-Fab은 분획 26 내지 30에 존재하고, 대부분의 단량체 형태는 분획 31 내지 34에 존재하였다. 단량체 형태로 이루어진 분획을 모으고, 야생형 hu4D5Fabv8과 함께 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 환원 (DTT 또는 BME 존재) 및 비-환원 (DTT 또는 BME 부재) 조건에서 SDS-PAGE 젤 상에서 분석하였다. A121C-티오Fab의 젤 여과 분획을 비-환원 SDS-PAGE 상에서 분석하였다.

[0494]

티오Fab을 상기 기재된 바와 같이 비오틴-PEO-말레이미드와 접합시키고, 비오티닐화된 티오Fab을 또한 유리 비오틴-PEO-말레이미드 및 티오Fab의 올리고머 분획을 제거하는 슈퍼텍스-200™ (아머샵) 젤 여과 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 야생형 hu4D5Fabv8 및 hu4D5Fabv8 A121C-티오Fab ( $0.5 \text{ mg}$ ; 정량적)를 각각 및 개별적으로 100배 몰 과량의 비오틴-PEO-말레이미드와 3시간 동안 실온에서 인큐ベ이션하고, 슈퍼텍스-200 젤 여과 칼럼 상에 로딩하여 유리 비오틴 뿐만 아니라 단량체 형태로부터의 올리고머 Fab을 분리하였다.

[0495]

## 실시예 3b 티오Fab의 분석

[0496]

비오티닐화된 hu4D5Fabv8 (A121C) 티오Fab 및 야생형 hu4D5Fabv8의 효소 소화 단편을 액체 크로마토그래피 전기 분무 이온화 질량 분광분석법 (LS-ESI-MS)에 의해 분석하였다. 비오티닐화된 hu4D5Fabv8 (A121C)의 48294.5 일차 질량과 야생형 hu4D5Fabv8의 47737.0 일차 질량 사이의 차이는 557.5 질량 유닛이다. 이 단편은 단일 비오틴-PEO-말레이미드 모이어티 ( $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$ )의 존재를 나타낸다. 표 4는 서열을 확인하는 단편화 값의 할당을 보여준다.

## 표 4

트립신 소화 후 비오티닐화된 hu4D5Fabv8 티오Fab A121C의 LC-ESI-질량 스펙트럼 분석

| 아미노산                  | <b>b</b> 단편 | <b>y</b> 단편 |
|-----------------------|-------------|-------------|
| A (알라닌)               | 72          |             |
| M(메티오닌)               | 203         | 2505        |
| D (아스파르트산)            | 318         | 2374        |
| Y (티로신)               | 481         | 2259        |
| W(트립토판)               | 667         | 2096        |
| G (글리신)               | 724         | 1910        |
| Q (글루타민)              | 852         | 1853        |
| G (글리신)               | 909         | 1725        |
| T (트레오닌)              | 1010        | 1668        |
| L (류신)                | 1123        | 1567        |
| V (발린)                | 1222        | 1454        |
| T (트레오닌)              | 1323        | 1355        |
| V (발린)                | 1422        | 1254        |
| S (세린)                | 1509        | 1155        |
| S (세린)                | 1596        | 1068        |
| <b>C (시스테인) + 비오틴</b> | <b>2242</b> | <b>981</b>  |
| S (세린)                | 2329        | 335         |
| T (트레오닌)              | 2430        | 248         |
| K (리신)                |             | 175         |

[0498]

[0499] 슈퍼덱스-200 겔 여과 이전 또는 이후에, DTT 또는 BME에 의한 환원의 존재 및 부재하에, 비오티닐화된 ABP-hu4D5Fabv8-A121C, 비오티닐화된 ABP-hu4D5Fabv8-V110C, 비오티닐화된 이중 Cys ABP-hu4D5Fabv8-(V110C-A88C), 및 비오티닐화된 이중 Cys ABP-hu4D5Fabv8-(V110C-A121C)의 SDS-PAGE 겔 분석을 수행하였다.

[0500]

hu4D5Fabv8-(V110C)-BMPEO-DM1 (슈퍼덱스-200 겔 여과 정제 후)의 질량 분광법 분석 (MS/MS): Fab+1 51607.5, Fab 50515.5. 이 데이터는 91.2% 접합을 보여준다. hu4D5Fabv8-(V110C)-BMPEO-DM1 (환원됨)의 MS/MS 분석: LC 23447.2, LC+1 24537.3, HC (Fab) 27072.5. 이 데이터는 모든 DM1 접합이 Fab의 경쇄 상에 있다는 것을 보여준다.

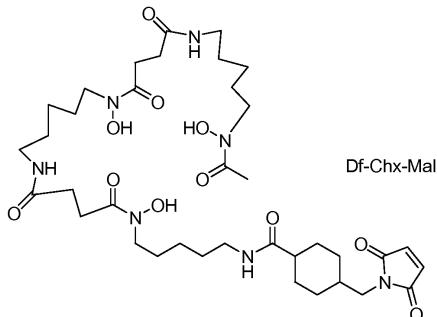
[0501]

실시예 11 접합을 위한 티오Mab의 환원/산화

[0502]

CHO 세포에서 발현된 전장, 시스테인 조작된 모노클로날 항체 (티오Mab)를 약 50배 과량의 TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 헤드로클로라이드; 문헌 [Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80]; 솔텍 벤쳐스 (Soltex Ventures), 미국 메사추세츠주 비벌리)로 3시간 동안 37°C에서 환원시켰다. 환원된 티오Mab (도 15)를 회석하고, 10 mM 아세트산나트륨 (pH 5) 중 하이트랩 S 칼럼 상에 로딩하고, 0.3 M 염화나트륨을 함유하는 PBS로 용리하였다. 용리된 환원된 티오Mab을 200 nM 수성 황산구리 ( $\text{CuSO}_4$ )로 실온에서 밤새 처리하였다. 주변 공기 산환가 또한 효과적이었다.

[0503] 실시예 13 N-[4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실]데스페리옥사민 (Df-Chx-Mal)



[0504]

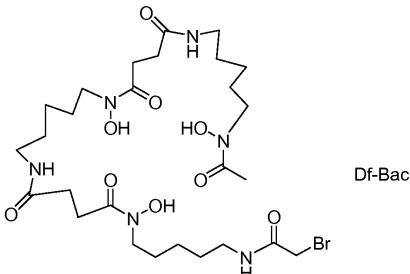
[0505] 4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC, 40 mg, 0.12 mmol), 테스페리옥사민 메실레이트 (78 mg, 0.12 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (22  $\mu\text{l}$ , 0.13 mmol)을 DMF (2.0 mL) 및 0.2 mL 물의 혼합물에 용해시켰다 (도 21). 생성된 혼탁액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 물 (8 mL)을 첨가하고, 침전된 생성물을 여과에 의해 단리하고, 물로 세척하고, 감압에서 건조시켜 42 mg (45%)의 N-[4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실]데스페리옥사민 (Df-Chx-Mal)을 백색 고체로 수득하였다 (도 20 하부).

<sup>1</sup>H NMR (400

MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)  $\delta$  0.87-0.90 (m, 2H), 1.20-1.26 (m, 8H), 1.35-1.41 (m, 6H), 1.45-1.55 (m, 8H), 1.60-1.70 (m, 4H), 1.97 (s, 3H, 아세틸), 2.26-2.29 (m, 4H), 2.56-2.60 (m, 4H), 2.95-3.05 (m, 6H), 3.24 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 3.44-3.48 (m, 6H), 7.00 (s, 2H, 말레이미드), 7.62 (t, J = 5.4 Hz, 1H, 아미드), 7.75 (m, 2H, 아미드), 9.59 (s, 2H, 히드록실), 9.64 (s, 1H, 히드록실). MS ESI (m/z): [M+H]<sup>+</sup> C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>에 대한 계산치 780.44 ; 실측치 780.6.

[0506]

[0507] 실시예 14 N-브로모아세틸데스페리옥사민 (Df-Bac)



[0508]

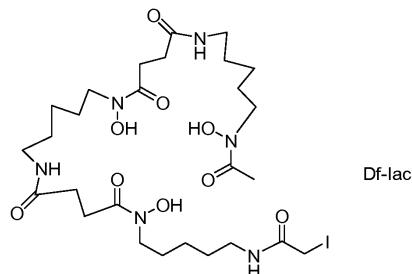
[0509] DMF (1 mL) 중 브로모아세틸 브로마이드 (27  $\mu\text{l}$ , 0.30 mmol)의 용액을 5분 내에 DMF (5 mL) 중 테스페리옥사민 메실레이트 (200 mg, 0.30 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (106  $\mu\text{l}$ , 0.60 mmol)의 냉각된 (0°C) 혼합물로 적가하고, 이후에 반응 혼합물을 0°C에서 4시간 동안 교반하였다 (도 21). 물 (10 mL)을 첨가하고, 생성물을 HPLC (시스템 B, 체류 시간 7.5 min)를 사용하여 단리하여 29 mg (14%)의 N-브로모아세틸데스페리옥사민 (Df-Bac)을 백색 고체로 수득하였다 (도 20 하부).

<sup>1</sup>H NMR (400

MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)  $\delta$  1.18-1.26 (m, 6H), 1.35-1.42 (m, 6H), 1.45-1.55 (m, 6H), 1.97 (s, 3H, 아세틸), 2.24-2.30 (m, 4H), 2.54-2.59 (m, 4H), 2.96-3.07 (m, 6H), 3.44-3.47 (m, 6H), 3.82 (s, 2H, 브로모아세틸), 7.74 (m, 2H, 아미드), 8.21 (t, 1H, 아미드), 9.59 (s, 2H, 히드록실), 9.63 (s, 1H, 히드록실). MS ESI (m/z): [M+H]<sup>+</sup> C<sub>27</sub>H<sub>50</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>9</sub>에 대한 계산치 681.27, 683.27; 실측치 681.1, 683.0.

[0510]

## [0511] 실시예 15 N-아이오도아세틸데스페리옥사민 (Df-Iac)



[0512]

[0513] 데스페리옥사민 메실레이트 (200 mg, 0.30 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (53  $\mu\ell$ , 0.30 mmol)을 DMF (4 mL) 및 물 (0.4 mL)에서 혼합하였다. N-히드록시숙신이미딜 아이오도아세테이트 (93 mg, 0.33 mmol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다 (도 21). 물 (8 mL)을 첨가하고, 침전된 생성물을 분리하고, 물로 세척하고, 김압에서 건조시켜 115 mg (53%)의 N-아이오도아세틸데스페리옥사민 (Df-Iac)을 백색 고체로 수득하였다 (도 20 하부).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,

$d_6$ -DMSO)  $\delta$  1.20-1.25 (m, 6H), 1.35-1.42 (m, 6H), 1.47-1.54 (m, 6H), 1.97 (s, 3H, 아세틸), 2.25-2.29 (m, 4H), 2.56-2.59 (m, 4H), 2.98-3.03 (m, 6H), 3.45 (m, 6H), 3.61 (s, 2H, 아이오도아세틸), 7.75 (m, 2H, 아미드), 8.17 (t, 1H, 아미드), 9.57 (s, 2H, 히드록실), 9.61 (s, 1H, 히드록실). MS ESI ( $m/z$ ): [M+H]<sup>+</sup> C<sub>27</sub>H<sub>50</sub>IN<sub>6</sub>O<sub>9</sub>에 대한 계산치 729.26; 실측치 729.1.

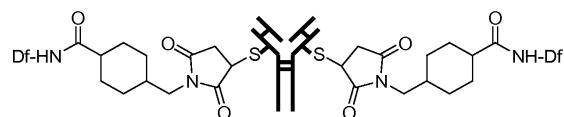
[0514]

## [0515] 실시예 16 티오-트라스투주맙

[0516] 중쇄의 Ala<sup>114</sup> (카바트 넘버링)에서 Cys 치환을 갖는 티오Mab의 구축, 발현 및 정제는 이전에 기재되어 있다 (문현 [Junutula JR, et al. "Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index" (2008) Nat Biotechnol 26:925-32]). 단리된 티오-트라스투주맙은 접합을 위해 환원 및 재산화 절차에 의해 Cys<sup>114</sup>에 결합된 디슬피드 부가물을 제거하여 제조하였다. 첫째, 단백질을 24 h 동안 88 mM 트리스 완충제 (pH 7.5) 중 40배 몰 과량의 DTT 및 2 mM EDTA로 처리하여 환원시켰다. 재산화 이전에 DTT를 제거하기 위해, 티오-트라스투주맙 용액은 10 mM 숙신산나트륨 완충제를 첨가하여 pH 5로 조정하였다. 이어서, 용액을 멸균 및 10 mM 숙신산나트륨 완충제 pH 5로 평형화된 이온 교환 칼럼 (하이트랩 SP FF, 지이 헬스케어) 상에 로딩하였다. 칼럼을 10 mM 숙신산나트륨 완충제 (10 mL)로 세척하고, 이어서 티오-트라스투주맙을 3 mL의 50 mM 트리스, 150 mM NaCl 완충제 (pH 7.5)로 용리하였다. 티오-트라스투주맙 재산화는 25°C에서 3.5 h 동안 75 mM 트리스, 150 mM NaCl (pH 7.5) 완충제 중 25배 몰 과량의 데히드로아스코르브산 (N,N-디메틸아세트아미드 (DMA) 중 100 mM)으로 처리하여 달성하였다. 재산화 후에, 티오-트라스투주맙을 추가로 정제하지 않고 데스페리옥사민에 접합시켰다. MS ESI ( $m/z$ ): 실측치 경쇄 23440.0, 중쇄 50627.3.

[0517]

## 실시예 17 Df-Chx-Mal-티오-트라스투주맙



Df-Chx-Mal- 티오 Mab

[0518]

[0519] 이관능성 퀼레이터의 2 mM 원액은 44°C로 30분 동안 가열하여 Df-Chx-Mal (1.5 mg, 2  $\mu\text{mol}$ )을 DMF 및 DMA의 1:1 혼합물 (1 mL)에 용해시킴으로써 제조하고, 이어서 원액을 분취하고, -80°C에 저장하였다 (도 21). 이어서, 원액의 분취액 (220  $\mu\ell$ , 0.440  $\mu\text{mol}$ )을 50 mM 트리스, 150 mM NaCl 완충제 (pH 7.5) (1.5 mL) 중 티오-트라스투주맙 (7.5 mg, 52 nmol)의 용액에 첨가하고, 실온에서 1 h 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 용액을 아미콘 울트라-4 필터 상에서 0.25 M 아세트산나트륨 완충제로 완충제 교환하여 1 mL의 Df-Chx-Mal-티오-트라스투주맙 접합체 용액을 6 mg/mL의 농도에서 수득하였다. MS ESI ( $m/z$ ): 실측치 경쇄 23440.2, 중쇄 51407.3 (도 23, D).

[0520] 실시예 18 Df-Bac를 사용한 Df-Ac-티오-트라스투주맙



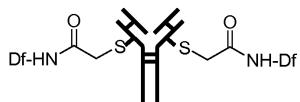
Df-Ac- 티오 Mab

[0521]

[0522] 이관능성 킬레이터의 12 mM 원액을 Df-Bac (8 mg, 12  $\mu\text{mol}$ )를 1 mL DMA에 용해시켜 제조하였다 (도 21). 이어서, 원액을 분취하고, -80°C에 저장하였다. 재산화된 티오-트라스투주맙을 아미콘 울트라-4 필터 상에서 0.05 M 보론산나트륨 완충제 (pH 9)로 완충제 교환하였다. Df-Bac 원액 (35  $\mu\text{l}$ , 0.410  $\mu\text{mol}$ )의 분취액을 0.05 M 보론산나트륨 완충제 (pH 9) (1 mL) 중 티오-트라스투주맙 (4.9 mg, 34 nmol)의 용액에 첨가하고, 실온에서 5 h 동안 인큐베이션하였다. 반응 혼합물을 NAP-10 칼럼 상에 로딩하고, Df-Ac-티오-트라스투주맙을 1.5 mL의 0.25 M 아세트산나트륨 완충제로 용리하여 생성물을 3.2 mg/mL의 농도에서 수득하였다. MS ESI ( $m/z$ ): 실측치 경쇄 23440.1, 중쇄 51228.1 (도 23, B).

[0523]

실시예 19 Df-Iac를 사용한 Df-Ac-티오-트라스투주맙



Df-Ac- 티오 Mab

[0524]

[0525] 이관능성 킬레이터의 11 mM 원액은 Df-Iac (8 mg, 11  $\mu\text{mol}$ )를 DMSO (1 mL)에 용해시켜 제조하고, 이어서 원액을 분취하고, -80°C에서 저장하였다 (도 21). 티오-트라스투주맙 용액 (3.2 mL)을 0.5 mL의 0.1 M 탄산나트륨을 첨가하여 pH 9로 조정하였다. 이어서, 원액의 분취액 (110  $\mu\text{l}$ , 1.20  $\mu\text{mol}$ )을 50 mM 트리스, 150 mM NaCl, 0.0125 M 탄산나트륨 완충제 (pH 9) (4 mL) 중 티오-트라스투주맙 (16 mg, 110 nmol)의 용액에 첨가하고, 실온에서 2 h 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 용액을 아미콘 울트라-4 필터 상에서 0.25 M 아세트산나트륨 완충제로 완충제 교환하여 1 mL의 Df-Ac-티오-트라스투주맙 접합체 용액을 8 mg/mL의 농도에서 수득하였다. MS ESI ( $m/z$ ): 실측치 경쇄 23440.1, 중쇄 51228.3 (도 23, C).

[0526]

실시예 20  $^{89}\text{Zr}$  킬레이터의 제조를 위한 일반적 절차

[0527]

1 M 옥살산 중  $^{89}\text{Zr}$ (IV) 옥살레이트 (2 내지 4 mCi, 100  $\mu\text{l}$ )의 용액을  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (45  $\mu\text{l}$ )의 2 M 용액과 혼합하고, 실온에서 3분 동안 인큐베이션한 후에 0.5 M HEPES 완충제 (0.15 mL)를 첨가하였다 (도 22). Df-티오-트라스투주맙 접합체 (1 mg, 7 nmol)를 0.25 M 아세트산나트륨/0.5% 젠티스산으로 0.356 mL의 최종 부피로 희석하고,  $^{89}\text{Zr}$  용액에 첨가하였다. 최종적으로, HEPES 완충제 (0.350 mL)의 제2 부분을 총 부피가 1 mL가 되도록 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1 h 동안 인큐베이션하였다. 유리  $^{89}\text{Zr}$ 를 제거하기 위해, 방사성표지된 단백질을 NAP-10 탈염 칼럼을 사용하여 정제하였다. NAP-10 칼럼을 20 mL의 0.25 M 아세트산나트륨/0.5% 젠티스산으로 평형화시켰다. 반응 혼합물을 NAP-10 칼럼 상에 로딩하고,  $^{89}\text{Zr}$ -Df-티오-트라스투주맙을 1.5 mL의 0.25 M 아세트산나트륨/0.5% 젠티스산 완충제 (1.5 mL)로 용리하였다. 필요한 경우,  $^{89}\text{Zr}$ -Df-티오-트라스투주맙을 아미콘 울트라-4 필터를 사용하여 바람직한 부피로 농축시켰다. 생성물을 SEC HPLC (시스템 A)에 의해 분석하였다.

[0528]

실시예 21 시험관내 혈청 안정성

[0529]

0.25 M 아세트산나트륨/0.5% 젠티스산 완충제 (0.1 mL) 중  $^{89}\text{Zr}$ -Df-티오-트라스투주맙 접합체 0.5 내지 1.5 mCi (1 mg)의 용액을 새로 제조된 마우스 혈청 (0.9 mL)에 첨가하고, 37°C에서 0 내지 96 h 동안 인큐베이션하였다. 혈청 용액의 샘플 (20  $\mu\text{l}$ )을 SEC HPLC (시스템 A)를 사용하여 분석하고, 그 결과를 도 24에 나타내었다.

[0530]

실시예 22 동물 모델

[0531]

6 내지 8주령의 베이지색 누드 XID 마우스를 하를란 스프라그 돌리(Harlan Sprague Dawley) (미국 캘리포니아주 리버모어)로부터 수득하였다. 세포 접종 3일 전에, 마우스에 0.36 mg 60-일 지속 방출  $^{17}\beta$ -에스트라디올 펠릿 (이노바티브 리서치 오브 아메리카(Innovative Research of America))을 이식 (피하, 왼쪽 옆구리)하여 혈청

에스트로겐 수준을 유지하였다. 50% 폐놀 레드-비합유 마트리겔 중  $5 \times 10^6$ 개 BT474M1 세포를 마우스의 유방 지방 패드에 접종하였다. BT474M1은 캘리포니아 퍼시픽 메디컬 센터(California Pacific Medical Center)로부터 수득한 인간 유방 종양 세포주 BT474의 서브클론이다. 동물 관리 및 처리는 실험 동물 관리 평가 인증 협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) (AAALAC)에 의해 인증된 제넨테크의 동물 실험 윤리 위원회에 의해 승인된 프로토콜에 따른다.

[0532] 실시예 23 마이크로PET 영상화

마우스를 영향을 미치기 위해 대략 3% 세보플루란으로 마취하고, 꼬리 정맥을 통해 등장성 용액 (100–130  $\mu\text{l}$ ) 중 대략 0.1 mCi의  $^{89}\text{Zr}$ -방사성표지된 트拉斯투주맙을 정맥내 주사하고, 회수를 위해 케이지로 돌려보냈다. PET 영상화 (도 25)를 다음과 같이 트레이서 주사후 1, 24, 96 및 144h에 인베온(Inveon) PET/CT 스캐너 상에서 수행하였다. 세보플루란으로 마취시킨 동물을 스캐너 베드 상에 머리부터 먼저 복와위 위치시키고, 정적 15 또는 30분 스캔을 수득하였다. 체온은 직장 프로브에 의해 측정하고, 따뜻한 공기로 유지시켰다. 폴-바디 반복적 영상 재구성은 최대 귀납적 알고리즘 (MAP, 하이퍼파라미터 베타 ( $\beta$ ) 0.05))을 사용하여 수득하고, CT로부터 수득한 조직 밀도를 사용하여 신호 감쇄에 대해 보정하였다. ASIPRO 소프트웨어 (시멘스 프리кли니컬 솔루션스(Siemens Preclinical Solutions))를 사용하여 투영을 만들고, 이를 사용하여 관심영역 분석을 사용하여 각각의 관심 기관에서 정량적 활성 수준을 수득하였다.

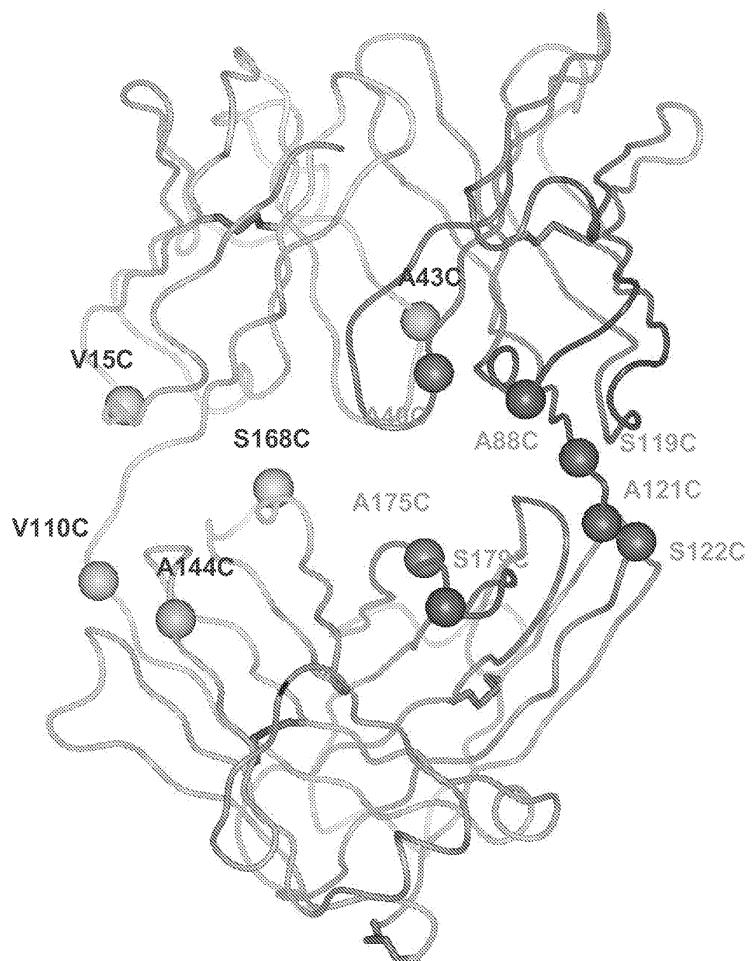
[0534] 통계적 분석: 도 26의 플롯은 R 소프트웨어 버전 2.4.1 (통계적 컴퓨팅을 위한 알 파운데이션(R Foundation for Statistical Computing), 오스트리아 비엔나)을 사용하여 구축하였다. 통계적 유의성은 2-테일드 스튜던츠 t-검정 또는 ANOVA를 사용하여 결정하고, 0.05 미만의 P 값을 유의한 것으로 간주하였으며; 데이터는 달리 언급되지 않는다면 평균±s.d.로 제시된다.

[0535] 본 발명은 본 발명의 몇몇 측면을 예시하기 위한 실시예에 개시된 특정 실시양태 및 본 발명의 범위 내에 포함되는 기능적 등가물인 임의의 실시양태에 의해 그 범위가 제한되지는 않는다. 실제로, 본원에 도시되고 기재된 것 이외의 본 발명의 다양한 변형이 당업자에게 명백할 것이고, 첨부된 특허청구범위의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

[0536] 명세서 전반에 걸쳐 인용된 모든 특허, 특히 출원 및 참고문헌은 명백하게 본원에 참고로 포함된다.

도면

도면 1a



### 도면1b

순차적 넘버링

|           |                                      |       |    |  |
|-----------|--------------------------------------|-------|----|--|
|           | 10                                   | 20    | 30 |  |
| 4d5v7fabH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW | ***** |    |  |

4d5v7fabH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW  
10 20 30

카바트 넘버링

|           |   |       |    |    |    |  |
|-----------|---|-------|----|----|----|--|
|           | 40  | 50    | 60 | 70 | 80 |  |
| 4d5v7fabH | VRQAPGKGLEWARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL | ***** |    |    |    |  |

4d5v7fabH VRQAPGKGLEWARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL  
40 50 a 60 70 80 abc

|           |  |       |     |     |     |  |
|-----------|--|-------|-----|-----|-----|--|
|           | 90   | 100   | 110 | 120 | 130 |  |
| 4d5v7fabH | RAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK | ***** |     |     |     |  |

4d5v7fabH RAEDTAVYYCSRGGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK  
90 100abc 110 120

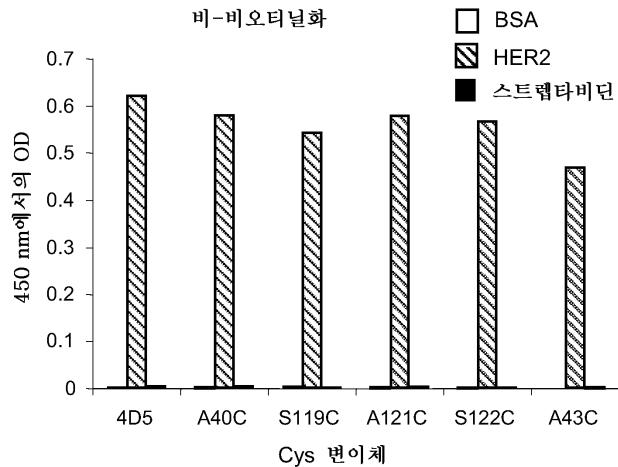
|           |  |       |     |     |     |  |
|-----------|--|-------|-----|-----|-----|--|
|           | 140  | 150   | 160 | 170 | 180 |  |
| 4d5v7fabH | STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLS | ***** |     |     |     |  |

4d5v7fabH STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLS  
130 140 150 160 170

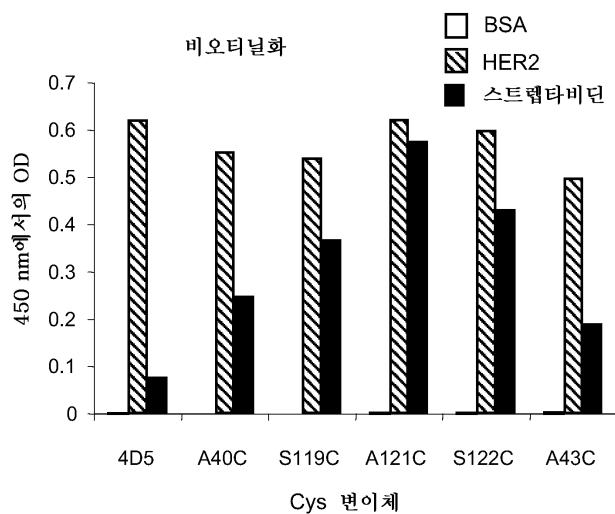
|           |                                       |       |     |     |  |  |
|-----------|---------------------------------------|-------|-----|-----|--|--|
|           | 190                                   | 200   | 210 | 220 |  |  |
| 4d5v7fabH | SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC | ***** |     |     |  |  |

4d5v7fabH SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC  
180 190 200 210

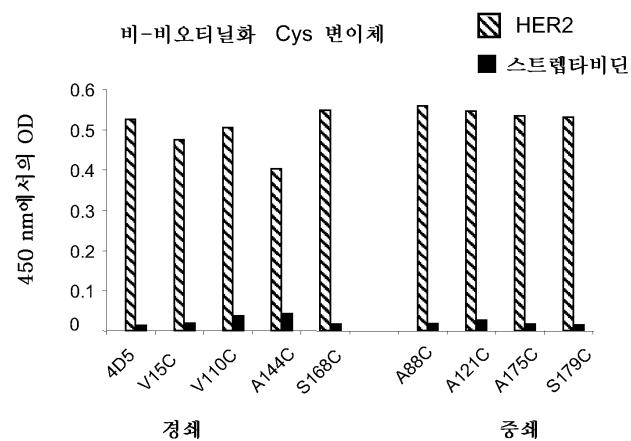
### 도면2a



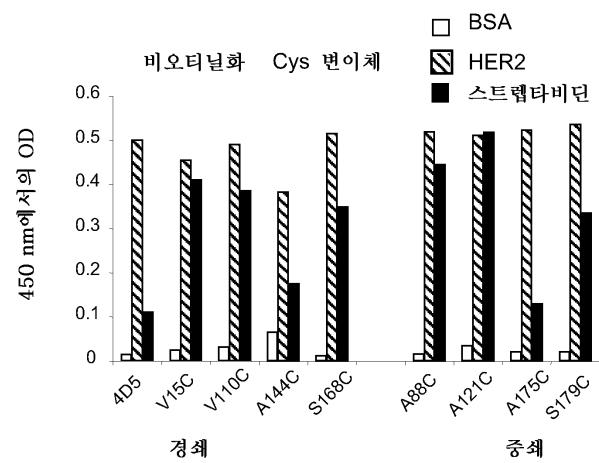
## 도면2b



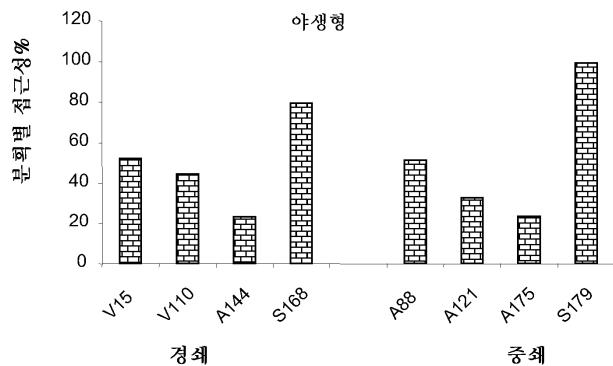
## 도면3a



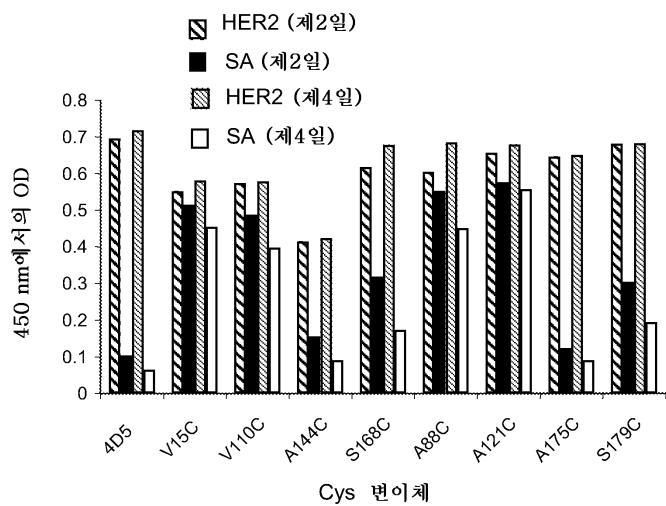
## 도면3b



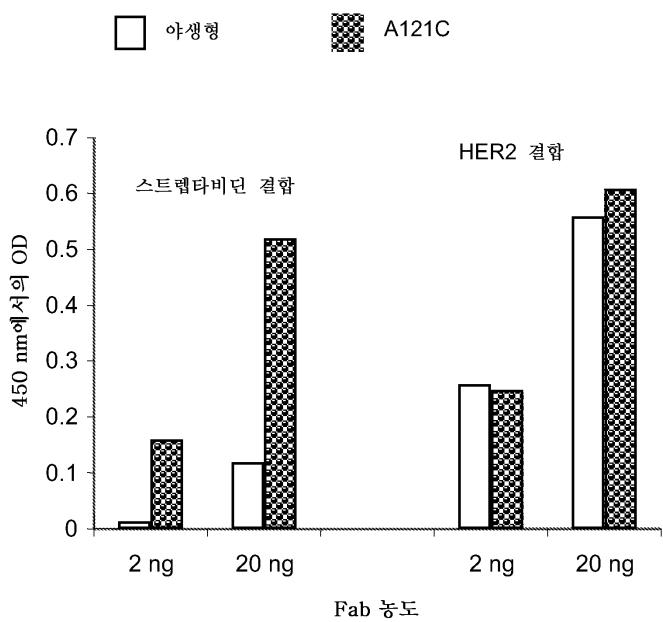
도면4a



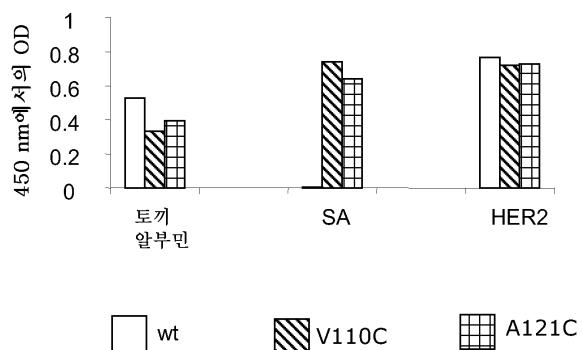
도면4b



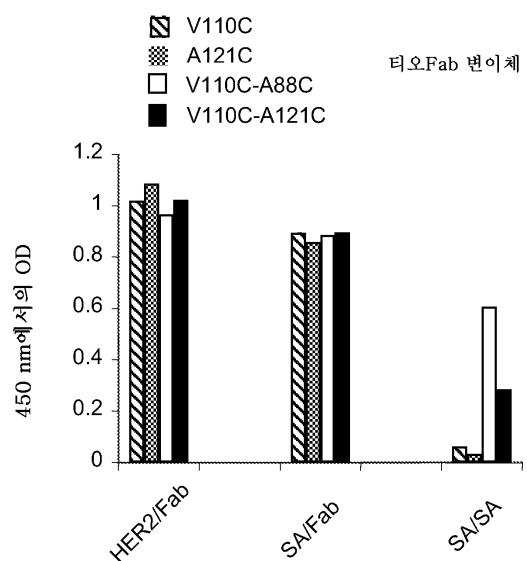
도면5



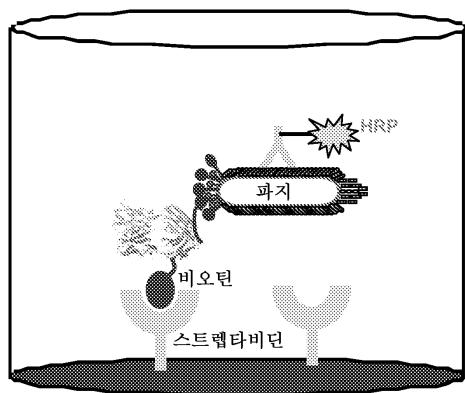
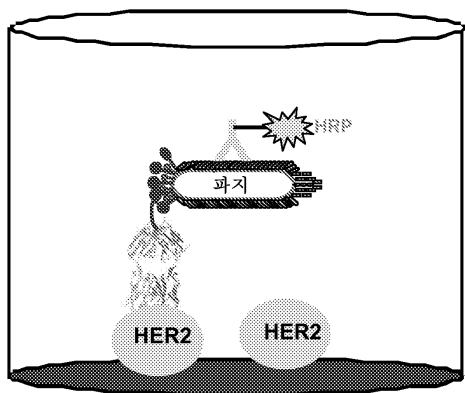
## 도면6



## 도면7



도면8



도면9

없음

도면10

없음

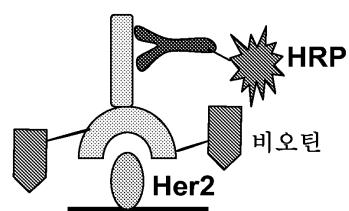
도면11

없음

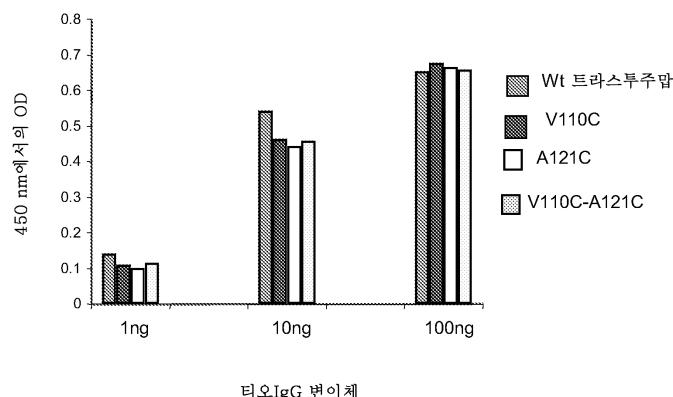
도면12

없음

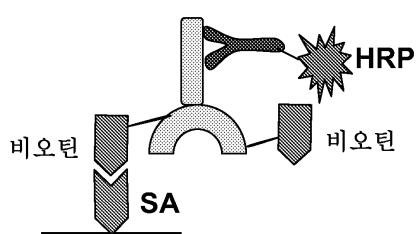
도면13a



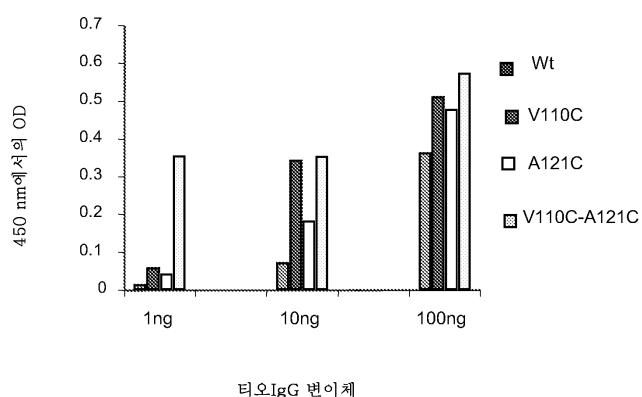
도면13b



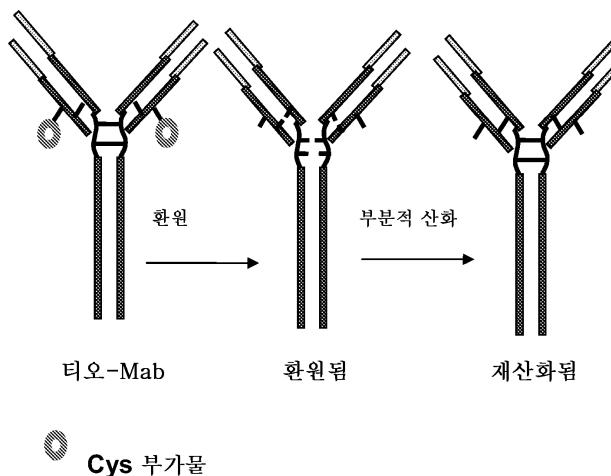
도면14a



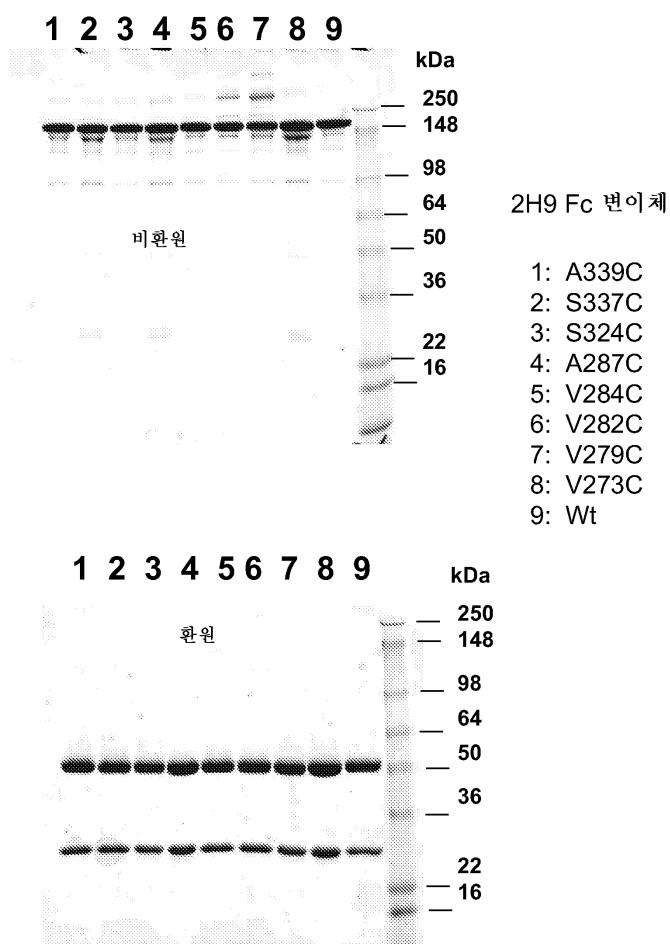
도면14b



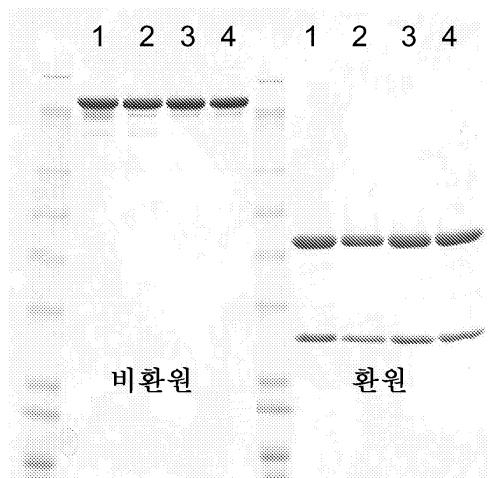
## 도면15



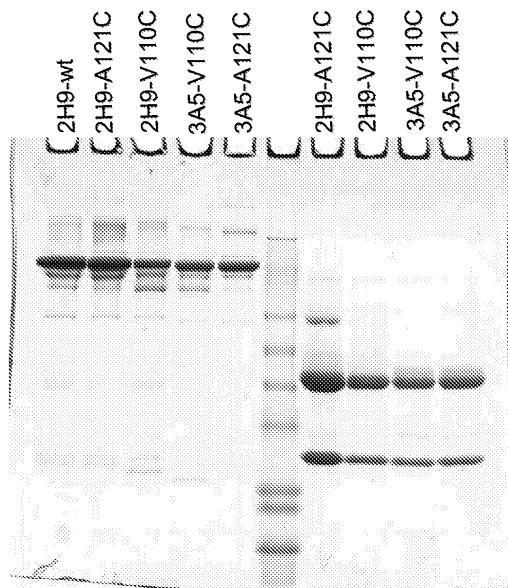
## 도면16



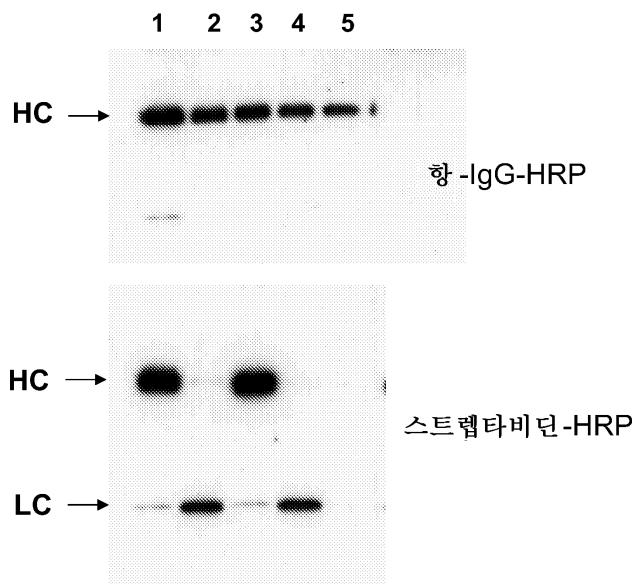
도면17a



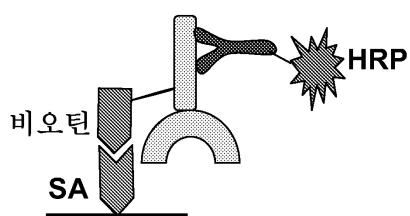
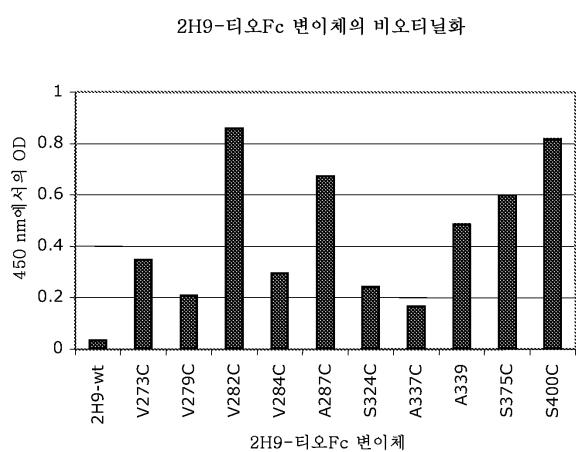
도면17b



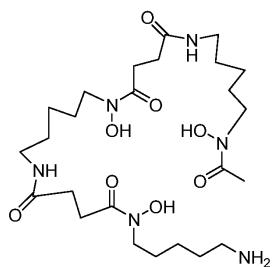
## 도면18



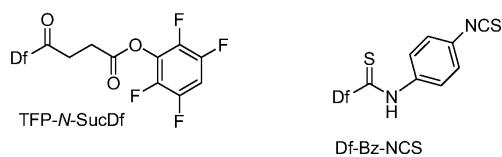
## 도면19



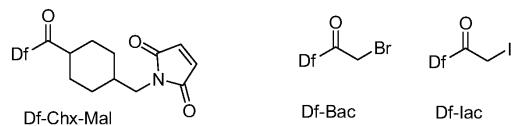
## 도면20



<sup>89</sup>Zr 페스페리옥사린 B (Df)  
에 대한 컬레이터

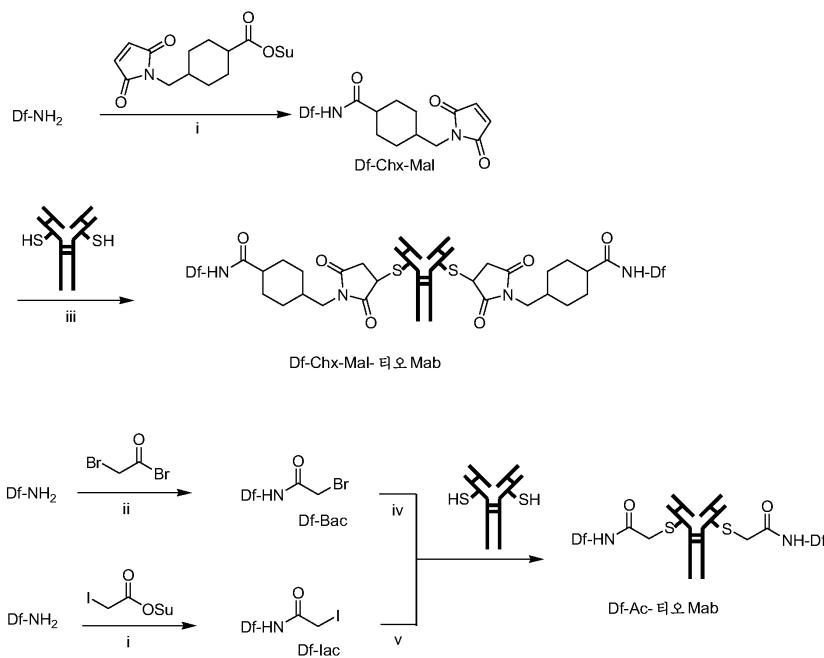


아미노 반응성 링커

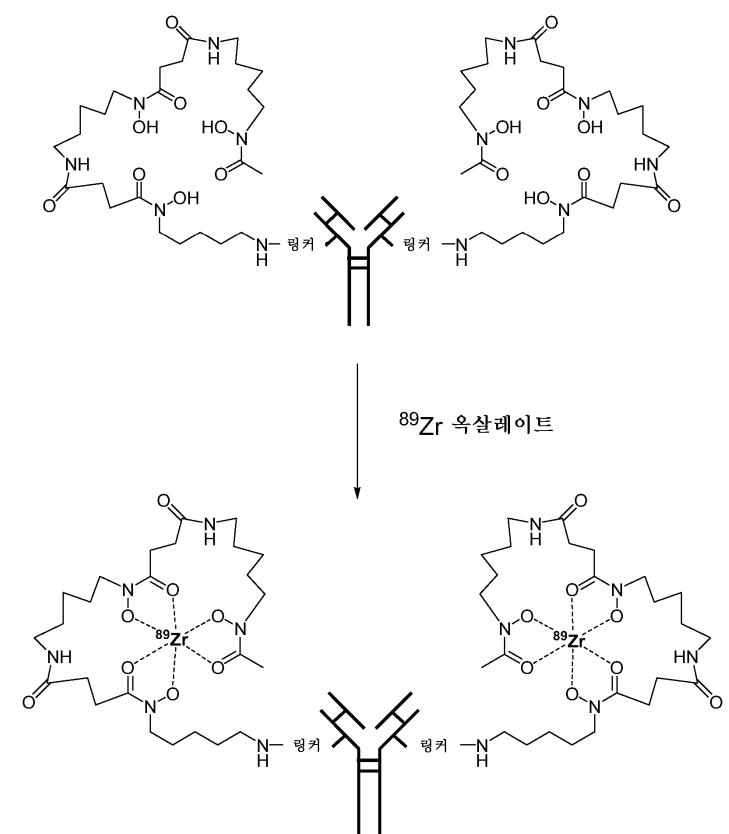


티올 반응성 링커

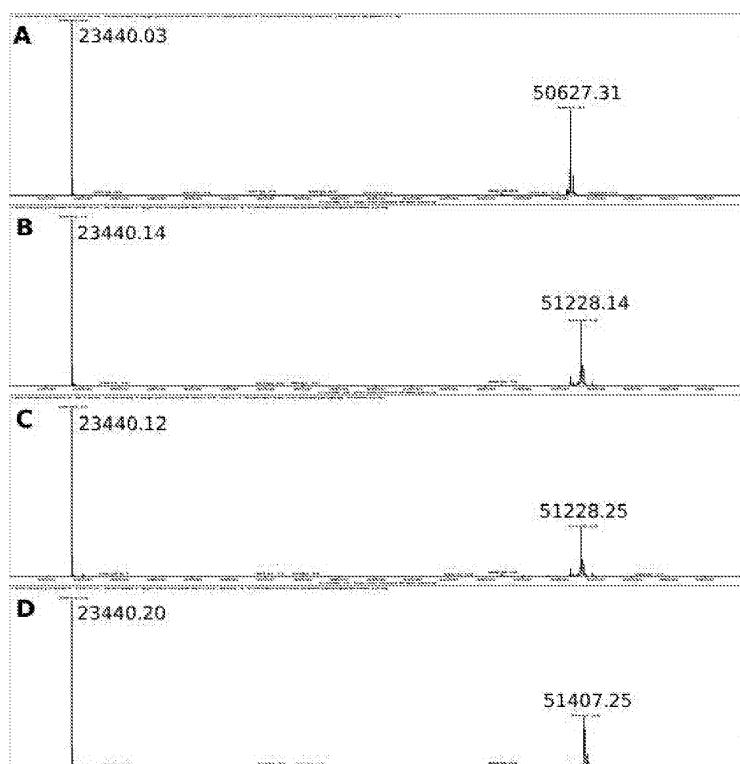
## 도면21



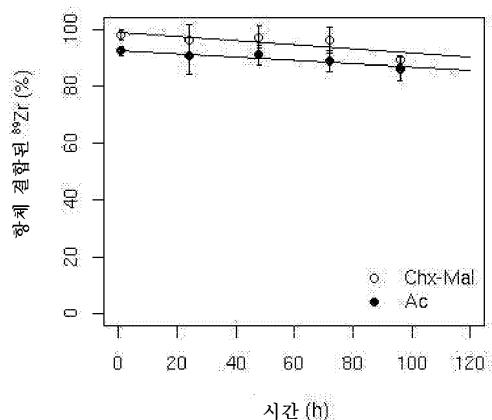
## 도면22



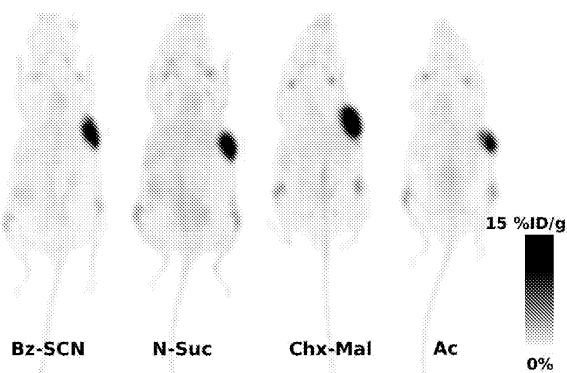
## 도면23



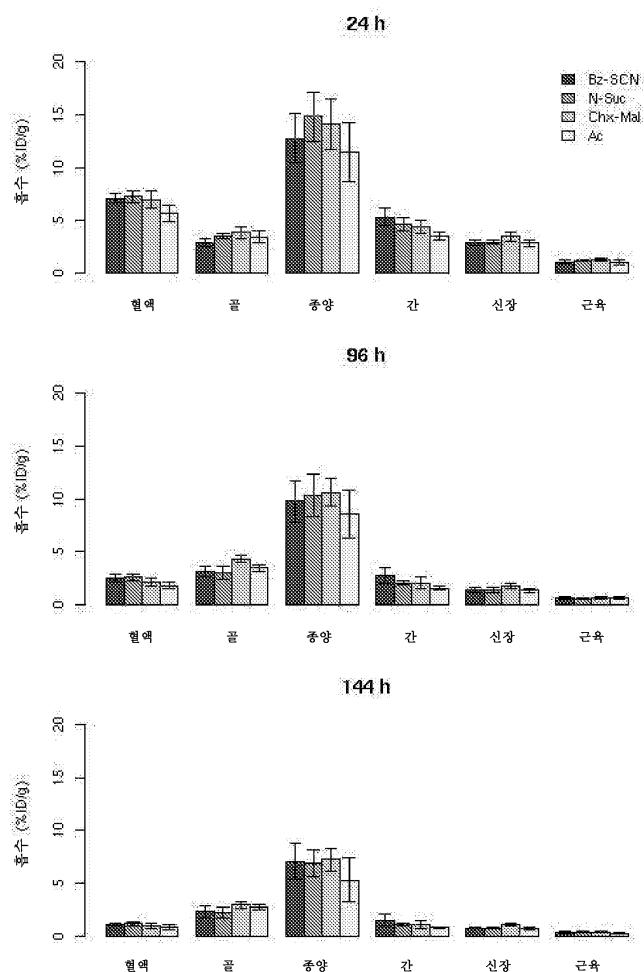
도면24



도면25



## 도면26



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; GENENTECH, INC. et al.

&lt;120&gt; ZIRCONIUM-RADIOLABELED, CYSTEINE ENGINEERED ANTIBODY CONJUGATES

&lt;130&gt; P2066R1C1P1-WO

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;&lt;150&gt; US 12/612,912

&lt;151&gt; 2009-11-05

&lt;150&gt; US 12/399,241

&lt;151&gt; 2009-03-06

&lt;150&gt; US 11/233,258

&lt;151&gt; 2005-09-22

&lt;150&gt; US 60/696,353

&lt;151&gt; 2005-06-30

<150> US 60/612,468

<151> 2004-09-23

<160> 49

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400>

> 1

Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe

|    |    |    |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 2

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Trp Glu Asp Asp Phe

|    |  |  |  |
|----|--|--|--|
| 20 |  |  |  |
|----|--|--|--|

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 3

Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Trp Glu Asp Asp Phe

|    |  |  |  |
|----|--|--|--|
| 20 |  |  |  |
|----|--|--|--|

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 4

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1

5

10

15

Glu Asp Asp

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 5

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

5

10

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; artificial protein

&lt;400&gt; 6

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

1

5

10

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys

20

25

30

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35

40

45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr

50

55

60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 65  | 70  | 75  |
| Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp |     |     |
| 80  | 85  | 90  |
| <br>  |     |     |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr |     |     |
| 95  | 100 | 105 |
| Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser |     |     |
| 110   | 115 | 120 |
| Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser |     |     |
| 125   | 130 | 135 |
| Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys |     |     |
| 140   | 145 | 150 |
| Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala |     |     |
| <br>  |     |     |
| 155   | 160 | 165 |
| Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser |     |     |
| 170   | 175 | 180 |
| Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser |     |     |
| 185   | 190 | 195 |
| Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser |     |     |
| 200   | 205 | 210 |
| Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys |     |     |
| 215   | 220 | 225 |
| <br>  |     |     |
| Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly |     |     |
| 230   | 235 | 240 |
| Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn |     |     |
| <br>  |     |     |
| 290   | 295 | 300 |

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
                          305                         310                 315  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
                          320                         325                 330  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
                          335                         340                 345  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
                          350                         355                 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
                          365                         370                 375  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
                          380                         385                 390  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
                          395                         400                 405  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
                          410                         415                 420  
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

                         425                         430                 435  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                          440                         445                 450

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
                          1                         5                         10                 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys  
                          20                         25                         30

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
                          35                         40                         45

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

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 440 445 450

<210> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 8

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn  
 20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

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

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 9

Trp Val Arg Gln Cys Pro Gly Lys Gly Leu

5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 10

Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val

5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 11

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

5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<

400> 12

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

5 10

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 13

Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser

5                    10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 14

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

5                    10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 15

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

5                    10

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 16

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

5                    10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 17

Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr

5                    10

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 18

Gln Lys Pro Gly Lys Cys Pro Lys Leu Leu Ile

5 10

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 19

Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val

5 10

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 20

Thr Cys Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro Pro

5 10

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 21

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys

5 10

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;

&lt;400&gt; 22

Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val

5

10

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 23

Phe Tyr Pro Arg Glu Cys Lys Val Gln Trp Lys

5

10

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 24

Trp Lys Val Asp Asn Cys Leu Gln Ser Gly Asn

5

10

&lt;210&gt;

&gt; 25

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 25

Ala Leu Gln Ser Gly Cys Ser Gln Glu Ser Val

5

10

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 26

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr

5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 27

Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn

5 10

<210> 28

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

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

50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

65 70 75

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

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Pro Lys Ile Pro Arg His

95 100 105

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

110 115 120

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

125 130 135

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

140 145 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

155 160 165

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

170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

185 190 195

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

200 205 210

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

215 220 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

230 235 240

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

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

320 325 330

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

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 335   | 340 | 345 |
| Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu |     |     |
| 350   | 355 | 360 |
| Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe |     |     |
| 365   | 370 | 375 |
| Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro |     |     |
|   |     |     |
| 380   | 385 | 390 |
| Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly |     |     |
| 395   | 400 | 405 |
| Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp |     |     |
| 410   | 415 | 420 |
| Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu |     |     |
| 425   | 430 | 435 |
| His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys |     |     |
| 440   | 445 | 450 |

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 29

His Glu Asp Pro Glu Cys Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

1                    5                    10                    15

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

20                    25

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 30

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Cys Asp Gly Val

1                    5                    10                    15

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

20                    25

<210> 31

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 31

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Cys

1                    5                    10                    15

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

20                    25

<210> 32

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 32

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

1                    5                    10                    15

Glu Cys His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

20                    25

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 33

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

1                    5                    10                    15

Glu Val His Asn Cys Lys Thr Lys Pro Arg

20

25

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 34

Tyr Lys Cys Lys Val Cys Asn Lys Ala Leu Pro

5

10

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; artificial protein

&lt;400&gt; 35

Ile Glu Lys Thr Ile Cys Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

5

10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 36

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Cys Lys Gly Gln Pro Arg

5

10

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 37

Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu

5

10

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 38

Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe

5 10

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 39

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser

1 5 10 15

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

20 25 30

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys

35 40 45

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr

50 55 60

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

65 70 75

Lys Asn Gln Phe Phe Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Gly Gly Leu Thr Tyr

95 100 105

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

110 115 120

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

125 130 135

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 140 145 150  
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 155 160 165  
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 170 175 180  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
 185 190 195  
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
 200 205 210  
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 215 220 225  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 230 235 240  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 320 325 330  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 335 340 345  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 350 355 360  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 365 370 375

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 380                    385                    390

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 395                    400                    405

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 410                    415                    420

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 425                    430                    435

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 440                    445

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 40

Asn Trp Ile Arg Gln Cys Pro Gly Asn Lys

5                    10

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 41

Leu Asn Ser Cys Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr

5                    10

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; chemically synthesized

&lt;400&gt; 42

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

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Pro Ser Val Phe Pro Leu

20

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 43

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

|   |    |  |
|---|----|--|
| 5 | 10 |  |
|---|----|--|

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 44

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

|   |    |  |
|---|----|--|
| 5 | 10 |  |
|---|----|--|

<210>

45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 45

Phe Leu Ser Val Ser Cys Gly Gly Arg Val Thr

|   |    |  |
|---|----|--|
| 5 | 10 |  |
|---|----|--|

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 46

Gln Lys Pro Gly Asn Cys Pro Arg Leu Leu Ile

5 10

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 47

Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val

5 10

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> artificial protein

<400> 48

Phe Tyr Pro Arg Glu Cys Lys Val Gln Trp Lys

5 10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> chemically synthesized

<400> 49

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr

5 10