



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0107501
(43) 공개일자 2010년10월05일

(51) Int. Cl.

C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7018378

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년01월16일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년08월18일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/031294

(87) 국제공개번호 WO 2009/092011

국제공개일자 2009년07월23일

(30) 우선권주장

61/022,073 2008년01월18일 미국(US)

(71) 출원인

메디문 엘엘씨

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디문 웨이

(72) 발명자

디마시 나자레노

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스버그 #347 마켓 스트리트 이스트 311

가오 창서우

미국 20854 메릴랜드주 포토맥 메이플크레스트 레인 10822

우 헤렌

미국 20841 메릴랜드주 보이즈 하브스 문 로드 14405

(74) 대리인

김진희, 강승욱

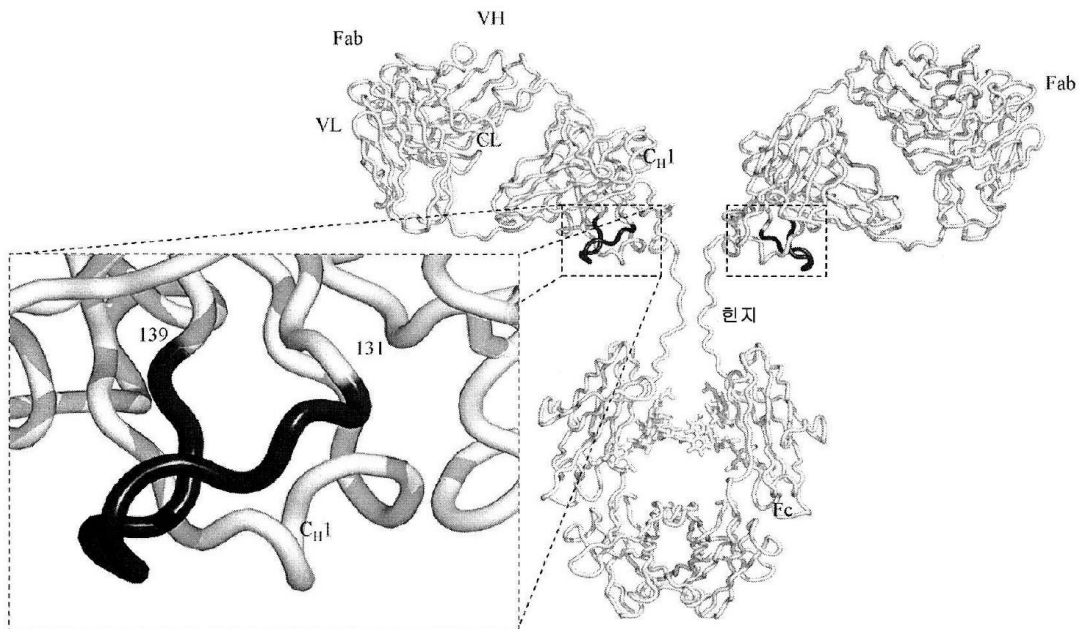
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 부위 특이적 접합을 위한 시스테인 조작 항체

(57) 요약

다양한 제제에 대한 부위 특이적 접합에 유용한 시스테인 조작 항체를 제공한다. 이러한 항체의 설계, 제조, 스크리닝, 선별 및 사용 방법도 제공한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

EU 인덱스 넘버링 시스템에 의해 정의되는, 항체 중쇄의 131~139번 영역 내의 시스템인 잔기에 대한 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 시스템인 조작 항체로서, 하나 이상의 유리 티올기를 포함하는 시스템인 조작 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 2개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 4개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 6개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 8개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 10개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 12개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 14개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 16개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 치환된 아미노산이, EU 인덱스 넘버링 시스템에 따라, 항체 중쇄의 131번, 132번, 134번, 135번, 136번 및 139번으로 구성된 군에서 선택되는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, Fab 또는 Fab₂ 포맷의 항체 단편인 시스템인 조작 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 비자연 발생 디설파이드 결합의 형성을 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 특정 표적에 대한 결합 친화력이 시스템인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 큰 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 특정 표적에 대한 친화력이 시스테인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 작은 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 친화력이 시스테인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 큰 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 시스테인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 높은 수준으로 유도하는 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 시스테인 조작 전의 항체에 비해 더 낮은 수준으로 유도하는 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 의존성 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 시스테인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 높은 수준으로 유도하는 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 의존성 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 시스테인 조작 전의 항체에 비해 더 낮은 수준으로 유도하는 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 단편화 및/또는 응집화 프로파일로 측정된 안정성이 시스테인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 높은 수준인 시스테인 조작 항체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단편화 및/또는 응집화 프로파일로 측정된 안정성이 시스테인 조작 전의 항체에 비해 더 낮은 수준인 시스테인 조작 항체.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 반감기가 시스테인 조작 전의 항체에 비해 감소된 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유리 티올기는 세포독성제, 화학요법제, 독소, 방사성 핵종, DNA, RNA, siRNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 비천연 아미노산, 펩티드, 효소, 형광 태그 또는 바이오틴에 대한 화학적 접합이 가능한 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 세포독성제가 항류불린제, DNA 소홈(minor groove) 결합제, 항-미트메이탄사노이드 및 아우리스타틴으로 구성된 군에서 선택되는 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 화학요법제가 탁솔, 파클리탁셀, 독소루비신, 메토티렉세이트, 돌라스타틴, 빈카 알칼로이드, 메토티렉세이트 및 듀오카마이신으로 구성된 군에서 선택되는 것인 시스테인 조작 항체.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 독소가 아브린, 브루신, 시큐톡신, 디프테리아 독소, 보툴리눔 독소, 시가 독소, 내독소, 파상풍 독소, 백일해 독소, 탄저병 독소, 콜레라 독소, 팔카리놀, 알파 독소, 겔다나마이신, 겔로닌, 로타우스트랄린, 리신, 스트리크닌 및 테트라도톡신으로 구성된 군에서 선택되는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 27

제23항에 있어서, 상기 방사성 핵종이 크롬(^{51}Cr), 코발트(^{57}Co), 불소(^{18}F), 가돌리늄(^{153}Gd , ^{159}Gd), 게르마늄(^{68}Ge), 홀름(^{166}Ho), 인듐(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), 요오드(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 란탄(^{140}La), 루테튬(^{177}Lu), 망간(^{54}Mn), 몰리브덴(^{99}Mo), 팔라듐(^{103}Pd), 인(^{32}P), 프라세오디뮴(^{142}Pr), 프로메튬(^{149}Pm), 레늄(^{186}Re , ^{188}Re), 로듐(^{105}Rh), 루테튬(^{97}Ru), 사마륨(^{153}Sm), 스칸듐(^{47}Sc), 셀레늄(^{75}Se), 스트론튬(^{85}Sr), 황(^{35}S), 테크네튬(^{99}Tc), 티탈륨(^{201}Ti), 주석(^{113}Sn , ^{117}Sn), 트리튬(^3H), 크세논(^{133}Xe), 이터븀(^{169}Yb , ^{175}Yb), 이트륨(^{90}Y) 및 아연(^{65}Zn)으로 구성된 군에서 선택되는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 28

제23항에 있어서, 내재화 항체인 시스템인 조작 항체.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 단일클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 이중 특이적 항체 또는 다중 특이적 항체인 시스템인 조작 항체.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 시스템인 조작 항체의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 31

제30항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 32

제31항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 33

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 시스템인 조작 항체의 항체 집합체.

청구항 34

제33항의 항체 집합체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 35

필요로 하는 피험체에서 암, 자가면역, 염증성 또는 감염성 질병 또는 질환을 검출하는 방법으로서, 제34항의 조성물을 상기 피험체에 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 질병 또는 질환은 상기 항체 집합체가 결합하는 세포 표면 항원을 과발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 37

표적 세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 상기 세포를 유효량의 제33항의 항체 집합체와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 38

시험체에서 표적 세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 유효량의 제34항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 상기 표적 세포는 상기 항체 접합체가 결합하는 세포 표면 항원을 과발현하는 것인 방법.

청구항 40

필요로 하는 시험체에서 암, 자가면역, 염증성 또는 감염성 질병 또는 질환을 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의 제34항의 조성물을 상기 시험체에 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 질병 또는 질환은 상기 항체 접합체가 결합하는 세포 표면 항원을 과발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 질병과 관련된 세포를 사멸시키거나 상기 세포의 증식 속도를 감소시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제40항에 있어서, B 세포 또는 T 세포를 고갈시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제40항에 있어서, 추가적인 치료를 실시하는 것을 포함하며, 상기 추가적인 치료는 화학 요법, 생물학적 요법, 면역 요법, 방사선 요법, 호르몬 요법 및 수술로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 45

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 시스템인 조작 항체에 이중성 분자를 효율적으로 접합시키는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 이중성 분자를 상기 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번 및 139번으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치에 접합시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 상기 이중성 분자가 세포독성제, 화학요법제, 독소, 방사성 핵종, DNA, RNA, siRNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 펩티드, 효소, 형광 태그 또는 바이오틴으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 세포독성제가 항류불린제, DNA 소효 결함제, 항-미트메이탄사노이드 및 아우리스타틴으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 49

제47항에 있어서, 상기 화학요법제가 탁솔, 파클리탁셀, 독소루비신, 메토틱세이트, 돌라스타틴, 빈카 알칼로이드 및 메토틱세이트로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 50

제47항에 있어서, 상기 독소가 아브린, 브루신, 시큐톡신, 디프테리아 독소, 보툴리눔 독소, 시가 독소, 내독소, 파상풍 독소, 백일해 독소, 탄저병 독소, 콜레라 독소, 팔카리놀, 알파 독소, 겔라나마이신, 겔로닌, 로타우스트랄린, 리신, 스트리크닌 및 테트라도톡신으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 51

제47항에 있어서, 상기 방사성 핵종이 크롬(^{51}Cr), 코발트(^{57}Co), 불소(^{18}F), 가돌리늄(^{153}Gd , ^{159}Gd), 게르마늄(^{68}Ge), 홀름(^{166}Ho), 인듐(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), 요오드(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 란탄(^{140}La), 루테튬(^{177}Lu), 망간(^{54}Mn), 몰리브덴(^{99}Mo), 팔라듐(^{103}Pd), 인(^{32}P), 프라세오디뮴(^{142}Pr), 프로메튬(^{149}Pm), 레늄(^{186}Re , ^{188}Re), 로듐(^{105}Rh), 루테튬(^{97}Ru), 사마륨(^{153}Sm), 스칸듐(^{47}Sc), 셀레늄(^{75}Se), 스트론튬(^{85}Sr), 황(^{35}S), 테크네튬(^{99}Tc), 티탈륨(^{201}Ti), 주석(^{113}Sn , ^{117}Sn), 트리튬(^3H), 크세논(^{133}Xe), 이터븀(^{169}Yb , ^{175}Yb), 이트륨(^{90}Y) 및 아연(^{65}Zn)으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 52

제45항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 효율이 접합 반응 후에 남아있는 잔류 유리 티올기로 측정할 때 적어도 5% 이상인 방법.

청구항 53

제45항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 효율이 접합 반응 후에 남아있는 잔류 유리 티올기로 측정할 때 적어도 25% 이상인 방법.

청구항 54

제45항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 효율이 접합 반응 후에 남아있는 잔류 유리 티올기로 측정할 때 적어도 75% 이상인 방법.

청구항 55

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 132번 및/또는 138번 위치의 시스템인에 대한 치환을 포함하지 않는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 56

제1항 내지 제29항 또는 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 132번 및/또는 138번 위치에서의 치환을 포함하며, 상기 치환은 시스템인이 아닌 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 57

제1항 내지 제29항, 제55항 또는 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 131~139번 루프 영역의 하나 이상의 확장을 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 58

제1항 내지 제29항 또는 제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 131~139번 루프 영역의 확장을 포함하고, 상기 확장이 적어도 1개 내지 적어도 15개 아미노산의 삽입을 포함하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 59

제1항 내지 제29항 또는 제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 131~139번 루프 영역의 확장을 포함하고, 상기 확장이 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 잔기로 구성된 군에서 선택되는 위치 다음에 발생하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 60

제1항 내지 제29항 또는 제55항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 131~139번 루프 영역의 확장을 포함하고, 상기 확장이 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 잔기로 구성된 군

에서 선택되는 위치 다음에 발생하는 것인 시스템인 조작 항체.

청구항 61

제1항 내지 제29항 또는 제55항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 131~139번 루프 영역의 적어도 제1 및 제2 확장을 포함하고, 상기 제1 확장은 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 잔기로 구성된 군에서 선택되는 위치 다음에 발생하고, 상기 제2 확장은 상기 제1 확장 다음에 발생하며, 상기 제2 확장은 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 잔기로 구성된 군에서 선택되는 위치 다음에 발생하는 것인 시스템인 조작 항체.

명세서

기술 분야

1. 관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2008년 1월 18일에 출원된 미국 가출원 제61/022,073호를 기초로 우선권의 이익을 주장하며, 상기 가출원은 그 전체가 본원에 참조 인용된다.

2. 발명의 분야

본 발명은 접합 반응을 위한 유리 티올기가 생성되도록 시스템인 조작된 CH1 도메인을 포함하는 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 항체의 설계, 변형, 제조 및 사용 방법을 제공한다.

배경 기술

3. 발명의 배경

3.1 암 및 암 치료법

매년 백이십만명 이상의 미국인이 암에 걸린다. 미국에서 암은 주요 사망 원인 중 2위를 차지하고 있으며, 현재의 추세가 계속된다면 2010년 경에는 암이 사망 원인 중 수위를 차지할 것으로 예상된다. 미국 남성의 경우 폐암과 전립선암이 암 사망 원인 1위이다. 미국 여성의 경우 폐암과 유방암이 암 사망 원인 1위이다. 미국 남성 2명 중 1명은 생애 중 어느 시점에 암으로 진단될 것이다. 또한, 미국 여성 3명 중 1명은 생애 중 어느 시점에 암으로 진단될 것이다. 수술, 화학 요법 및 방사선 치료 등의 현행 치료 요법은 종종 효과적이지 않거나 심각한 부작용을 야기하는 경우가 있다.

전이 억제제 개발의 장애 요인 중 하나는 이러한 약물의 설계와 평가에 사용되는 분석 시스템이었다. 가장 통상적인 암 치료는 빨리 증식하는 세포를 표적으로 한다. 그러나, 암 세포가 반드시 더 빨리 증식하는 것은 아니지만, 그 대신에 정상 세포에 허용되지 않는 조건 하에 생존하고 증식한다[Lawrence and Steeg, 1996, World J. Urol. 14:124-130]. 정상 세포의 거동과 악성 세포의 거동 간의 이같은 근본적 차이는 치료적 표적화를 위한 기회를 제공한다. 미세전이성 종양이 이미 신체 전반에 산재해 있다는 패러다임은 외부의 3차원적 미세환경에서 잠재적 화학 요법 약물을 평가해야 하는 필요성을 강조한다. 다수의 표준 암 약물 분석은 전형적인 세포 배양 조건(즉, 단층 증식) 하에 종양 세포 증식률 또는 생존율을 측정한다. 그러나, 2차원적 분석에서의 세포 거동은 종종 생체내에서의 종양 세포의 거동을 신뢰성 있게 예측하지 못한다.

현재, 암 치료법은 환자의 신생물 세포를 박멸하기 위해 수술, 화학 요법, 호르몬 요법 및/또는 방사선 치료를 포함할 수 있다(예를 들어, 문헌[Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", in Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Chapter 12, Section IV] 참조). 이러한 치료법은 모두 환자에게 중대한 약점을 부여한다. 예를 들어 수술은 환자의 건강으로 인해 금기로 되거나 환자에게 용인되지 않을 수 있다. 또한, 수술은 신생물 조직을 완전히 제거하지 못할 수 있다. 방사선 치료는 정상 조직보다 방사선에 더 큰 민감성을 나타낼 경우에만 유효하며, 또한 방사선 치료는 종종 심각한 부작용을 유발할 수 있다. 호르몬 요법은 단일 제제로서는 거의 투여되지 않으며, 유효하다고 할지라도, 대개 암을 예방하거나 다른 치료가 암 세포의 대부분을 제거한 후에 암의 재발을 지연시키는 데 사용된다.

화학 요법의 경우에는, 암 치료에 이용될 수 있는 다양한 화학요법제가 존재한다. 암 화학요법제의 상당수는 DNA 합성을 억제함으로써 작용한다(예를 들어, 문헌[Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eighth Ed. (Pergamon Press, New York, 1990)] 참조). 이와 같이,

화학요법제는 본래 비특이적이다. 게다가, 거의 모든 화학요법제가 독성이며, 화학 요법은 심각한 메스꺼움, 골수 기능 억제, 면역 억제 등을 비롯한 중대한, 종종 위험한 부작용을 유발한다(예를 들어, 문헌[Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" in Scientific American Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., ch. 12, sect. 10] 참조). 또한, 화학요법제의 조합을 투여하는 경우에도, 다수의 종양 세포가 화학요법제에 대해 내성이거나 내성을 발달시킨다.

[0011] 현재 암 치료법은 또한 생물학적 요법 또는 면역 요법을 포함할 수 있다. 생물학적 요법/면역 요법은 수적으로 한정되어 있으며, 화학요법제보다 더 특이적이라 할지라도 여전히 건강한 세포와 암성 세포 둘 다를 표적으로 할 수 있다. 또한, 이러한 치료법은 발진 또는 종창, 발열, 오한 및 피로를 비롯한 감기와 같은 증상, 소화관 문제 또는 알레르기 반응과 같은 부작용을 발생시킬 수 있다.

[0012] 3.2 암 치료를 위한 항체

[0013] 항체는 특정 항원에 결합하는 면역학적 단백질이다. 인간 및 마우스를 비롯한 대부분의 포유동물에서, 항체는 쌍을 이룬 중쇄 및 경쇄의 폴리펩티드 쇄로부터 형성된다. 각각의 쇄는 가변(Fv) 영역 및 불변(Fc) 영역으로 불리는 2개의 상이한 영역으로 이루어진다. 경쇄 및 중쇄 Fv 영역은 분자의 항원 결합 결정인자를 포함하고 표적 항원에 결합하는 역할을 담당한다. Fc 영역은 항체(예를 들어, IgG)의 클래스(또는 아이소타입)를 규정하고, 중요한 생화학적 사건을 유발할 수 있도록 다수의 천연 단백질에 결합하는 역할을 담당한다.

[0014] 항체의 Fc 영역은 Fc 수용체 및 다른 리간드를 비롯한 다수의 리간드와 상호작용하여 이펙터 기능이라고 불리는 일련의 중요한 기능상의 능력을 부여한다. IgG 클래스에 대한 Fc 수용체의 중요한 패밀리는 Fc 감마 수용체(Fc γ R)이다. 이들 수용체는 면역계의 항체와 세포 구성요소 간의 소통을 매개한다[Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290]. 인간의 경우, 이 단백질 패밀리는 동형체 Fc γ RIA, Fc γ RIB 및 Fc γ RIC를 비롯한 Fc γ RI(CID64); 동형체 Fc γ RIIA, Fc γ RIIB 및 Fc γ RIIC를 비롯한 Fc γ RII(CD23); 및 동형체 Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIB를 비롯한 Fc γ RIII(CD16)를 포함한다[Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65]. 이들 수용체는 일반적으로 Fc에 대한 결합을 매개하는 세포 외 도메인, 막 관통 영역 및 세포 내에서 일부 신호 전달 사건을 매개할 수 있는 세포내 도메인을 갖는다. 이러한 상이한 Fc γ R 서브타입은 상이한 세포 유형에서 발현된다[재검토 문헌: Ravetch et al., 1991, Annu Rev Immunol 9:457-492]. 예를 들어, 인간의 경우, Fc γ RIIB는 호중구에서만 발견되는 반면, Fc γ RIIA는 대식세포, 단핵구, 자연 킬러(NK) 세포 및 T 세포의 부분집단에서 발견된다.

[0015] Fc/Fc γ R 복합체의 형성은 이펙터 세포를 결합된 항원 부위로 동원하여, 일반적으로 세포 내의 신호 전달 사건과, 염증 매개인자의 분비, B 세포 활성화, 내포 작용, 식세포 작용 및 세포 독성 공격과 같은 중요한 후속 면역 반응을 유발한다. 세포 독성 및 식세포 작용 이펙터 기능을 매개하는 능력은, 항체가 표적화된 세포를 파괴하는 잠재적 메카니즘이다. Fc γ R을 발현하는 비특이적 세포 독성 세포가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 그 후 표적 세포의 용해를 유발하는 세포 매개성 반응은 항체 의존성 세포 매개성 세포 독성(ADCC)이라 불린다[Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-760; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290]. 주목할 만한 점은, ADCC를 매개하는 주요 세포, 즉 NK 세포는 Fc γ RIIIA만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다는 것이다[Ravetch et al., 1991, supra].

[0016] 또 다른 중요한 Fc 리간드는 보체 단백질 C1q이다. C1q에의 Fc 결합은 보체 의존성 세포 독성(CDC)이라 불리는 과정을 매개한다[재검토 문헌: Ward et al., 1995, Ther Immunol 2:77-94]. C1q는 16개의 항체에 결합할 수 있지만, 보체 캐스케이드를 활성화하는 데에는 2개 IgG에의 결합이면 충분하다. C1q는 C1r 및 C1s 세린 프로테아제와 복합체를 형성하여 보체 경로의 C1 복합체를 형성한다.

[0017] 표적에 대한 특이성, 면역 이펙터 메카니즘을 매개하는 능력 및 긴 혈청 반감기를 포함하나 이들에 한정되지 않는 항체의 중요한 몇 가지 특징들로 인해 항체 및 관련 면역글로불린 분자가 강력한 치료제가 된다. 암을 비롯한 각종 병증의 치료를 위해 다수의 단일클론 항체가 현재 개발 중에 있거나 치료적으로 사용되고 있다. 그 예로는 Vitaxin[®]

(MedImmune), 인간화 인테그린 α v β 3 항체(예를 들어, PCT 공개 공보 WO 2003/075957), Herceptin[®]

(Genentech), 유방암 치료를 위해 승인된 인간화 항-Her2/neu 항체(예를 들어, 미국 특허 제5,677,171호), CNT0 95(Gentocor), 인간 인테그린 α v 항체(PCT 공개 공보 WO 02/12501), Rituxan[®]

(IDEC/Genentech/Roche), 비호지킨 림프종 치료를 위해 승인된 키메라 항-CD20 항체(예를 들어, 미국 특허 제 5,736,137호) 및 Erbitux®

(ImClone), 키메라 항-EGFR 항체(예를 들어, 미국 특허 제 4,943,533호)를 들 수 있다.

[0018]

항체가 종양 세포를 파괴하는 가능성 있는 메카니즘으로는 필요한 증식 경로의 차단을 통한 증식 방지, 아폽토시스를 초래하는 세포내 신호 전달, 증대된 하향 조절 및/또는 수용체의 전환율(turnover), ADCC, CDC 및 후천성 면역 반응의 촉진을 비롯하여 다수가 있다[Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:541-547; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410]. 그러나, 광범위한 사용에도 불구하고, 항체는 아직 임상적 사용에 최적화되지 못하였고 다수가 최적에 못미치는 항암 효능을 갖고 있다. 따라서, 표적화된 암 세포를 파괴하는 항체의 능력을 향상시키는 것에 대한 필요성이 매우 크다.

[0019]

3.3 항체 접합체

[0020]

세포독성제 또는 세포 증식 억제제, 즉 암 치료에 있어서 종양 세포를 사멸 또는 억제하는 약물의 국소적 전달을 위한 항체 접합체, 즉 면역적합체의 사용[Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; 미국 특허 제 4,975,278호]은 이론적으로는 약물 부분의 종양으로의 표적화된 전달 및 세포 내로의 축적을 가능하게 하는데, 이때 이러한 비접합 약물 제제의 전신 투여는 제거하고자 하는 종양 세포뿐만 아니라 정상 세포에도 허용할 수 없는 수준의 독성을 유발할 수 있다[Baldwin et al. (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506]. 따라서 최소의 독성을 수반한 최고의 효능이 추구된다. 항체 접합체를 설계하고 정제하려는 노력은 약물 결합 및 약물 방출 특성뿐만 아니라 단일클론 항체(mAb)의 선택성에도 초점이 맞추어졌다[Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549]. 다클론 항체와 단일클론 항체 모두 이러한 전략에 유용한 것으로 보고되어 있다[Rowland et al. (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87]. 이러한 방법에 사용되는 약물로는 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트 및 빈데신을 들 수 있다[Rowland et al. (1986)]. 항체-독소 접합체에 사용되는 독소로는 디프테리아 독소와 같은 박테리아 독소, 리신 및 젤로닌과 같은 식물 독소, 겔다나마이신과 같은 소분자 독소[Mandler et al. (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791], 메이탄시노이드(EP 1391213; Liu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) 및 칼리키아마이신[Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342]을 들 수 있다. 이들 독소는 튜블린 결합, DNA 결합 또는 토포이소머라제 억제를 비롯한 메커니즘에 의해 세포 독성 및 세포 증식 억제 효과를 발휘할 수 있다. 일부 세포 독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합될 때 불활성 또는 저활성이 되는 경향이 있다.

[0021]

몇몇 항체 접합체는 FDA의 승인을 받았거나 임상 시험 중에 있다. 예를 들어, ZEVALIN®

(이브리투모맵 티옥세탄, Biogen/Idec)은 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에 존재하는 CD20 항원에 대해 유도된 쥐과 IgG1 카파 단일클론 항체 및 티오우레아 링커-킬레이터에 의해 결합된 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성 동위원소로 이루어진다[Wiseman et al. (2000) Eur. J. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69]. ZEVALIN®

은 B 세포 비호지킨 림프종(NHL)에 대해 활성을 나타내지만, 그 투여는 대부분의 환자에 있어서 심각한 장기적 혈구감소증을 초래한다. 칼리키아마이신에 연결된 인간 CD33 항체로 이루어진 항체-약물 접합체인 MYLOTARG®

(젬투주맵 오조가마이신, Wyeth Pharmaceuticals) 또한 감염에 의한 급성 골수성 백혈병의 치료에 대해 2000년에 승인을 받았다[Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 미국 특허 제 4,970,198호; 제 5,079,233호; 제 5,585,089호; 제 5,606,040호; 제 5,693,762호; 제 5,739,116호; 제 5,767,285호; 제 5,773,001호]. 메이탄시노이드 약물 부분 DM1에 디설파이드 링커 SPP를 통해 연결된 인간 C242 항체로 이루어진 항체-약물 접합체인 칸투주맵 메르탄신(Immunogen, Inc.)(Xie et al. (2004) J. of Pharma. and Exp. Ther. 308(3):1073-1082)은 결장, 췌장, 위 등과 같은 CanAg를 발현하는 암의 치료를 위해 임상 시험이 진행되고 있다. 메이탄시노이드 약물 부분

DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원(PSMA) 단일클론 항체로 이루어진 항체-약물 접합체인 MLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.)는 전립선 종양의 잠재적 치료를 위해 개발 중에 있다.

[0022] 아우리스타틴 펩티드인 아우리스타틴 E(AE) 및 도라스타틴의 합성 유사체인 모노메틸아우리스타틴(MMAE)(WO 02/088172)은 (i) 키메라 단일클론 항체 cBR96(암종 상의 루이스 Y에 특이적임); (ii) 혈액 악성 종양 상의 CD30에 특이적인 cAC10[Klussman et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al. (2003) Blood 102(4):1458-1465; US 2004/0018194]; (iii) CD20 발현 암 및 면역 질환의 치료를 위한 항-CD20 항체, 예컨대 RITUXAN®

(WO 04/032828); (iv) 대장암의 치료를 위한 항-EphB2R 항체 2H9 및 항-IL8[Mao et al. (2004) Cancer Research 64(3):781-788]; (v) E-셀렉틴 항체[Bhaskar et al. (2003) Cancer Res. 63:6387-6394]; 및 (vi) 다른 항-CD30 항체(WO 03/043583)에 접합되었다. 아우리스타틴 E의 변형체는 미국 특허 제5,767,237호 및 미국 특허 제6,124,431호에 개시되어 있다. 단일클론 항체에 접합된 모노메틸 아우리스타틴 E는 문헌[Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented Mar. 28, 2004]에 개시되어 있다. 아우리스타틴 유사체 MMAE 및 MMAF는 다양한 항체에 접합되었다(WO 2005/081711).

[0023] 약물 부분을 항체에 부착시키는 통상적인 방법, 즉 공유 결합에 의한 연결 방법에 의하면 일반적으로 약물 부분이 항체의 여러 부위에 부착되어 있는 분자의 불균질 혼합물이 형성된다. 예를 들어, 세포 독성 약물은 일반적으로 항체에 다수 존재하는 라이신 또는 시스테인 잔기를 통해 항체에 접합시켜 불균질 항체-약물 접합체 혼합물을 생성한다. 반응 조건에 따라, 상기 불균질 혼합물은 일반적으로 0~약 8, 또는 그 이상의 부착된 약물 부분을 갖는 항체 분포를 포함한다. 또한, 특정 정수의 약물 부분 대 항체 비를 갖는 접합체의 각각의 서브그룹 내에, 약물 부분이 항체의 다양한 부위에 부착된 잠재적으로 불균질한 혼합물이 있다. 분석용 및 분취용 방법은 접합 반응으로부터 얻어진 불균질 혼합물 내의 항체-약물 접합체 중 분자를 분리하고 특성을 규명하는 데 부적합하다. 항체는 크고 복잡하며 구조적으로 다양한 생물학적 분자로서, 대개 다수의 반응성 작용기를 갖고 있다. 링커 반응제와 약물-링커 중간체와의 그 반응성은 pH, 농도, 염 농도 및 공용매와 같은 인자에 따라 달라진다. 또한, 다단계 접합 공정이 반응 조건의 제어와 반응물 및 중간체의 특성 규명에 있어서의 곤란성으로 인해 재현성이 없을 수 있다.

[0024] 시스테인 티올은 pH 7 부근에서 양성자화되어 친핵성이 감소되는 대부분의 아민과는 달리 중성 pH에서 반응성이 있다. 유리 티올(R-SH, 설프하이드릴) 기는 비교적 반응성이 있기 때문에, 시스테인 잔기를 갖는 단백질은 종종 디설파이드 결합 올리고머로서 산화된 형태로 존재하거나 내부적으로 가교된 디설파이드 기를 갖는다. 세포의 단백질은 일반적으로 유리 티올을 갖지 않는다[Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, p. 55]. 단백질 내의 유리 티올의 양은 표준 Ellman 분석에 의해 추정할 수 있다. IgM은 디설파이드 결합 5량체의 예이며, IgG는 서브유닛을 서로 결합하는 내부 디설파이드 가교를 갖는 단백질의 예이다. 이와 같은 단백질에 있어서, 반응성 유리 티올을 생성시키는 데에는 디티오프레이톨(DTT) 또는 셀레놀[Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-156]와 같은 반응제에 의한 디설파이드의 환원이 요구된다. 이러한 접근법은 항체 3차 구조 및 항원 결합 특이성의 상실을 초래할 수 있다.

[0025] 항체 시스테인 티올기는 항체 아민 또는 하이드록실 기보다 친전자성 접합 반응제에 대해 일반적으로 반응성이 더 크며, 즉 친핵성이 더 크다. 시스테인 잔기는 리간드에 대해 공유 결합을 형성하거나 새로운 분자내 디설파이드 결합을 형성하기 위한 유전자 조작 기법에 의해 단백질 내로 도입되었다[Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 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, 76:207-234; Chmura et al. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; 미국 특허 제6,248,564호). 그러나, 단백질의 다양한 아미노산 잔기의 시스테인 아미노산으로의 돌연변이에 의한 시스테인 티올기에 있어서의 설계는, 특히 쌍을 이루지 않은(비쌍형)(유리 Cys) 잔기 또는 반응 또는 산화에 비교적 영향을 받기 쉬운 잔기의 경우에 잠재적으로 문제가 될 수 있다. 이. 콜라이의 주변세포질이든, 배양 상청액이든, 부분 또는 완전 정제된 단백질이든 간에 농축된 단백질 용액에서, 단백질 표면상의 비쌍 Cys 잔기는 쌍을 이루고 산화되어 분자간 디설파이드를 형성하고, 이로써 단백질 이량체 또는 다량체를 형성한다. 디설파이드 이량체 형성으로 인해 약물, 리간드 또는 다른 표지에의 접합에 대해 비반응성인 새로운 Cys이 생긴다. 게다가, 단백질이 새로 조작된 Cys과 기존의 Cys 잔기 사이에 분자내 디설파이드 결합을 산화

적으로 형성한다면, 두 Cys 기 모두 활성 부위 참여 및 상호작용에 이용될 수 없게 된다. 또한, 상기 단백질은 미스폴딩 또는 3차 구조의 상실에 의해 비활성 또는 비특이성이 될 수 있다[Zhang et al. (2002) Anal. Biochem. 311:1-9].

[0026] 항체에 접합 부위를 조작해 넣으려는 시도가 종래에 행해진 바 있다. 미국 특허 제5,219,916호는 Ser 156 또는 Thr 173과 같은 "표면 포켓" 잔기의 변형에 관해 기재한다(문헌[Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 4th ed., US Dept. of Health and Human Services, 1987]에 따름). 관련 연구에서, 연구자들은 접합 부위를 조작하려는 시도에서 "표면 포켓" 상의 잔기만이 시스테인의 치환을 지지할 수 있다는 것을 확인하였다 [Lyons et al. (1990) Protein Eng. 3:8, p. 703-708].

[0027] 따라서, 다양한 제제에의 접합이 가능한 유리 티올기를 제공하는 안전한 시스테인 조작 항체를 개발할 필요가 있다.

[0028] 본원에서의 참고 문헌의 인용 또는 언급은 이것들이 본 발명에 대한 선행 기술임을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

발명의 내용

[0029] 4. 발명의 개요

[0030] 본 발명은 각종 제제에 접합될 수 있는 유리 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 CH1 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 본 발명의 시스테인 조작 항체는 하나 이상의 비천연 시스테인 아미노산으로 치환된 항체 중쇄의 131~139번 영역으로부터의 하나 이상의 아미노산을 포함하며, 이때 상기 치환된 시스테인 아미노산은 접합이 가능한 유리 티올기를 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 시스테인 조작 항체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 그 이상의 치환된 시스테인 아미노산을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 항체의 CH1 도메인의 131~139번 영역은 세린 또는 트레오닌 잔기의 시스테인으로의 치환을 포함한다.

[0031] 본 발명의 시스테인 조작 항체는 변형된 CH1 도메인을 또 다른 항체 사슬과 연결하는 비자연 발생 디설파이드 결합을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 시스테인 조작 항체는, 변형된 CH1 도메인을 또 다른 항체 사슬과 연결하는 비자연 발생 디설파이드 결합의 형성으로 인해 형성되는 하나 이상의 유리 티올기를 포함한다.

[0032] 본 발명의 또 다른 양태는 시스테인 조작 항체의 생성을 위한 핵산, 벡터 및 숙주 세포를 제공한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 양태는 약물에 커플링된 본 발명의 시스테인 조작 항체를 포함하는 항체 접합체 및 이 접합체를 제조하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 약물은 세포독성제, 화학요법제, 펩티드, 펩티드 모방체, 단백질 골격, 효소, 독소, 방사성 핵종, DNA, KNA, siRNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 형광 태그 또는 바이오틴일 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 양태는 세포 표면 수용체에 결합될 경우 내재화될 수 있는 항체를 제공한다. 이러한 양태에서, 본 발명의 항체는 카고 분자 및/또는 제제의 세포질 전달에 유용하다.

[0035] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 항체 접합체를 사용하여 암, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환을 치료, 검출 및 진단하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0036] 5. 도면의 간단한 설명

도 1a는 IgG 구조의 모식도이다. 돌연변이된, CH1 도메인의 131번~139번 잔기의 영역이 진한 흑색으로 표시되어 있다. 삽입 부분은 CH1 도메인의 131번~139번 잔기의 IgG 영역의 확대도이다.

도 1b는 항체에 접합이 가능한 유리 티올을 생성하는 데 이용되는 131번 위치에 대한 시스테인 조작 전략을 도시한 것이다. 구체적으로, EphB4 특이적 항체 1C6의 카파 경쇄 및 중쇄가 볼드 서체로 표시된 시스테인 잔기와 함께 도시되어 있다. 또한, IgG1 항체 포맷에서 자연 발생하는 상대적 디설파이드 결합이 실선으로 표시되어 있다. 131번 위치의 세린에서 시스테인으로의 특이적 조작(도면에서 볼드체와 밑줄로 표시됨)은, 형성되어 경쇄 카복시 말단 시스테인을 중쇄의 220번 시스테인에 연결하는 정규형 쇠간 디설파이드 결합을 대체하는 잠재적 쇠간 디설파이드 결합을 나타낸다. 131Cys의 포함과 함께 형성될 수 있는 잠재적 디설파이드 결합이 표시되어 있다(점선). 여기에 제시된 디설파이드 결합은 실험 결과에 의해 확인되었다.

도 1c는 시스테인 조작을 위한 후보 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하는 동등한 영역을 개략적으로 보여주는 다양한 항체 포맷으로부터의 CH1 도메인의 정렬이다. 박스 영역은 다른 항체 포맷의 IgG1의 CH1 도메인의 동등한 영역을 나타낸다.

도 2a는 비환원(i) 및 환원(ii) 조건 하에서 러닝한 항체의 발현 및 정제를 보여주는 쿠마시 염색 PAGE 겔이다. 이 패널에 표시된 항체는 1C1(레인 1) 및 1C1로부터 유래된 각종 시스테인 조작 항체(레인 2~15)를 포함한다. 항체는 웰당 2 μ g의 농도로 로딩되었다.

도 2b는 IgG1 wt 및 Ser131→Cys 돌연변이체의 비환원 펩티드 맵핑을 비교한 것이다. 1C1은 IgG1 서브클래스의 EphA2 특이적 항체이다. A는 중쇄 힌지 영역과 경쇄 C 말단(H11-L15) 및 Ser131을 포함하는 펩티드(H5) 사이의 정규 디설파이드 결합 연결을 나타낸 1C1 WT 항체이다. B는 경쇄 및 중쇄(H11-L15)와 1C1 wt 펩티드 H5 사이의 정규 디설파이드 결합의 감소, 및 돌연변이된 시스테인과 경쇄 C 말단(H5m-L15) 및 힌지 영역(H5m-H11) 사이에 새로 형성된 디설파이드 결합 연결의 출현을 나타낸 1C1 Ser131Cys 돌연변이체이다. 돌연변이된 Cys131에 단지 미량의 돌연변이된 Cys131이 관찰되었다.

도 3은 정제된 1C6 WT(A) 및 1C6 Ser131Cys(B) 항체에 대해 수행된 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석의 결과를 제시한다. 이 항체는 발현 및 정제되어 SEC 크로마토그래피가 수행되었다. 점선의 기록선은 항체의 겔보기 분자량을 구하기 위해 사용된 일련의 규정된 분자량 마커를 나타낸다. (A)에 나타난 바와 같이, 1C6 WT 항체는 단량체 항체에 해당하는 분자량으로 SEC 컬럼으로부터 용리된다. 시스테인 조작된 1C6 항체(B)의 SEC 분석은 이 항체가 야생형 항체와 유사하게 단량체 형태로도 존재한다는 것을 입증한다.

도 4는 정제된 항체, 즉 1C1 WT(A), 1C1 Ser134Cys(B), 1C1 Ser132Cys(C), 및 1C1 Ser131-132-134-136Cys(D)에 대해 수행된 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석의 결과를 도시한다. 점선의 기록선은 항체의 겔보기 분자량을 구하기 위해 사용된 일련의 규정된 분자량 마커를 나타낸다. (A)에 나타난 바와 같이, 1C1 WT 항체는 단량체 항체에 해당하는 분자량으로 SEC 컬럼으로부터 용리된다. 시스테인 조작 항체 1C1 Ser134Cys(B), 1C1 Ser132Cys(C) 및 1C1 Ser131-132-134-136Cys(D)의 SEC 분석은 이들 항체가 야생형 항체와 유사하게 단량체 형태로도 존재한다는 것을 입증한다.

도 5는 정제된 항체, 즉 1C6 WT 및 1C6 Ser131Cys에 대해 수행된 ELISA에 기초한 항원 결합 분석의 결과를 도시한다. 이들 항체는 EphB4 수용체를 특이적으로 인식한다. 이 도면에서 입증되는 바와 같이, WT 항체 및 시스테인 조작된 Ser131Cys 항체의 ELISA 포맷으로 측정된 결합 친화력 프로파일은 매우 유사하다.

도 6은 정제된 항체, 즉 1C1 WT 및 1C1 Ser131Cys에 대해 수행된 ELISA에 기초한 항원 결합 분석의 결과를 도시한다. 이들 항체는 EphA2 수용체를 특이적으로 인식한다. 이 도면에서 입증되는 바와 같이, WT 항체 및 시스테인 조작된 Ser131Cys 항체의 ELISA 포맷으로 측정된 결합 친화력 프로파일은 매우 유사하다. 또한, 1 mM DTT를 포함시킨 것은 결합 프로파일에 측정 가능한 영향을 주지 않았다.

도 7은 1C6 WT 항체(A) 및 1C6 Ser131Cys 항체(B)의 시차 주사 열량 분석(DSC)의 온도기록도를 도시한다. 양쪽 항체 모두 각각 70°C 및 69°C에서 매우 유사한 용융 온도(T_m)를 나타낸다.

도 8은 1C1 WT(A), 1C1 Ser131Cys(B), 1C1 Ser134Cys(C), 1C1 Ser(131-132)Cys(D) 및 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys 항체의 시차 주사 열량 분석(DSC)의 온도기록도를 도시한다. 모든 항체가 매우 유사한 용융 온도(T_m)를 나타낸다.

도 9는 다양한 조건 하에서의 1C6(WT) 항체 및 1C6 Ser131Cys(Mut) 항체의 바이오틴 접합 연구의 결과를 도시한다. 패널 A에서는, 1C6 및 1C6 Ser131Cys 항체에 대해 다양한 온도(4°C, 37°C, 45°C 및 55°C)에서 EZ-링크 바이오틴-HPDP(Pierce)와의 접합 반응이 실시되었다. 얻어진 바이오틴 접합 효율을 측정하여 그래프를 작도하였다. 1C6 Ser131Cys 항체는 1C6 항체보다 더 큰 부위 특이적 바이오틴 접합 효율을 나타낸다. 패널 B에서는, 1C6 및 1C6 Ser131Cys 항체에 대해 다양한 온도(4°C, 37°C, 45°C 및 55°C)에서 EZ-링크 요오도아세틸-PEO2 바이오틴과의 접합 반응이 실시되었다. 얻어진 부위 특이적 바이오틴 접합 효율을 측정하여 그래프를 작도하였다. 1C6 Ser131Cys 항체는 1C6 항체보다 더 큰 부위 특이적 바이오틴 접합 효율을 나타낸다.

도 10은 다양한 Fc γ 수용체에 대한 1C1 WT 및 1C1 Ser131Cys 항체의 상대 친화력을 측정하는 BIACORE®

분석의 결과를 도시한다. 조사된 다양한 Fc γ 수용체는 Fc γ RI(A), Fc γ RIIB(B), Fc γ RIIA(C), Fc γ RIIB(D)였다. 1C1 WT 및 1C1 Ser131Cys 항체는 다양한 Fc γ 수용체에 대해 매우 유사한 결합 친화력을 나타낸다.

도 11은 pH 6.0 및 pH 7.4에서 FcRn 수용체에 대한 1C1 WT 및 1C1 Ser131Cys 항체의 상대 친화력을 측정하는 BIACORE®

분석의 결과를 도시한다. 1C1 Ser131Cys 항체는 pH 6.0 및 pH 7.4 둘 다에서 1C1 WT 항체에 대한 유사한 결합 프로파일로 FcRn 수용체에 결합한다.

도 12는 PC3 세포에 대해 수행된 항체 내재화 연구의 결과를 도시한다. 일련의 대조군이 첫 번째 패널에 도시되어 있다. (A)에는 비염색 세포가 DAPI로 대비 염색되어 있다. (B)에는 2차 항체 단독으로 염색된 세포가 DAPI로 대비 염색되어 있다. (C)에는 대조군 1차 항체 R347이 세포와 함께 항온처리되고 DAPI로 대비 염색되어 있다. (D)에는 세포가 1시간 동안 항온처리된 후 R347로 염색되어 있다. 대조군 (A)~(D) 어느 것도 항체 특이적 세포 염색을 보이지 않는다. (E)에는 세포가 0시간째와 1시간 동안 1C1 wt 항체와 함께 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 wt 항체의 내재화를 나타낸다. (F)에는 세포가 0시간째와 1시간 동안 1C1 Ser131Cys 항체와 함께 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 Ser131Cys 항체의 내재화를 나타낸다. (G)에는, 세포가 0시간째와 1시간 동안 1C1 Ser134Cys 항체와 함께 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 Ser134Cys 항체의 내재화를 나타낸다. (H)에는, 세포가 0시간째와 1시간 동안 1C1 Ser(131-132)Cys 항체와 함께 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 Ser(131-132)Cys 항체의 내재화를 나타낸다. (I)에는, 0시간째와 1시간 동안 세포가 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys 항체와 함께 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys 항체의 내재화를 나타낸다. 시스테인 조작 항체 모두가 야생형 항체와 비교할 때 유사한 정도로 내재화되었다.

도 13은 시스테인 조작 항체가 시스테인 조작 전의 야생형 1C1과 비교할 때 EphA2에 대해 동등한 결합 특이성을 나타낸 결합 특이성 실험의 결과를 도시한다. 2개의 비관련 항체(대조군 항체 1 및 2)의 사용은 EphA2에 대한 이 ELISA 실험의 특이성을 확인시켜 준다. 또한, 시스테인 잔기의 다중 치환은 동족 항원에 대한 항체의 결합 특이성을 변경하지 않는다. 이러한 결과는 항체의 시스테인 조작이 시스테인 조작 전의 항체와 비교할 때 결합 특이성을 변경하지 않는다는 것을 입증한다.

도 14는, 유리 시스테인을 사용한 처리 전(레인 1~8) 또는 처리 후(레인 9~16), 다양한 시스테인 조작 항체를 사용하여 PEG와의 접합 반응으로부터 얻은 결과를 도시한다. 시스테인 비처리 레인은 10 mM 유리 시스테인으로 시스테인 조작 항체를 처리하는 것과 비교할 때 감소된 수준의 PEG화(분자량이 더 큰 밴드)를 나타낸다. 시스테인 조작 전의 항체를 함유하는 대조군 웰은 어느 조건에서도 검출 가능한 수준의 PEG화를 나타내지 않는다(레인 1, 5, 9 및 13). PEG화 반응은 37°C에서 120분 동안 수행되었다. 샘플은 10% NuPage MOP 겔에서 러닝하였다.

도 15는 시스테인 조작 항체에 대해 탈캡핑 반응을 실시한 실험의 결과를 도시한다. 탈캡핑 반응은 전체 항체 구조를 파괴하지 않은 채 접합을 위한 조작된 시스테인을 유리시킨다. 항체 1C1(야생형)(레인 2, 8), 1C1 Ser134Cys(레인 3, 9), 1C1 Ser135Cys(레인 4, 10), 1C1 Ser136Cys(레인 5, 11), 1C1Thr139Cys(레인 6, 12)에 대해 탈캡핑 반응을 실시하고 비환원 PAGE로 분석하였다. 이 단백질 프로파일은, 탈캡핑 반응이 탈캡핑 반응 전의 항체(레인 2~6)와 비교할 때 전체 항체 구조를 불안정화시키지 않는다(레인 8~12)는 것을 입증한다.

도 16은 다양한 시스테인 조작 항체를 바이오틴에 접합시킨 실험의 결과를 도시한다. 요약하면, 시스테인 조작 항체 및 대조군에 대해 탈캡핑 반응을 실시한 후, 말레이미드-PEG2-바이오틴과의 접합 반응을 실시하였다. 그 후, 미반응 접합체를 제거하였다. 양성 대조군은 웨스턴 블롯 분석에 의해 강한 바이오틴 염색을 나타낸다(레인 1). 대조군 1C1 항체는 검출 가능한 접합된 바이오틴을 나타내지 않았다(레인 3). 시스테인 조작 항체 1C1 Ser134Cys(레인 4), 1C1 Phr135Cys(레인 5), 1C1 Ser136Cys(레인 6) 및 1C1 Thr139Cys(레인 7)은 접합된 바이오틴에 대해 강한 염색을 나타낸다. 또한, 시스테인 조작 항체의 경쇄는 어떠한 바이오틴 바이오틴 접합도 나타내지 않는다는 것이 도면으로부터 명백하다. 대조군 항체(레인 1)의 아랫쪽 밴드는 높은 염색도를 나타낸 반면, 시스테인 조작 항체 및 wt 대응물의 아랫쪽 밴드는 아랫쪽(경쇄) 밴드(레인 3~7)에 현저한 염색을 나타내지 않는다.

도 17은 시스테인 조작 항체가 이중성 제제에의 접합 후 그 동족 항원에 대한 결합 특이성을 유지한다는 것을 입증하는 실험 결과를 도시한다. 이 실험에서는, 바이오틴과 접합된 시스테인 조작 항체를, 시스테인 조작 전의 모 항체와 비교하여 항원 결합 특이성의 유지에 대해 분석하였다. ELISA에 기초한 분석은, 접합된 시스테인 조작 항체 1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys 및 1C1 Thr139Cys이, 시스테인 조작 및 접합 전의 모 항체와 매우 유사한, 동족 EphA2 항원에 대한 결합 프로파일을 나타낸다는 것을 입증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 6. 상세한 설명

- [0038] 본 발명은 항체의 CH1 도메인(도 1a 참조)의 표면 상에 존재하는 잔기가 다양한 제제에 접합 가능한 부위를 조작하기 위한 시도에서 시스템의 치환에 적합하다는 것을 발견한 것에 기초한다.
- [0039] 본 발명의 화합물은, 모 항체 또는 야생형 항체의 CH1 도메인의 131~139번 영역의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 그 이상의 아미노산(여기서 불변 영역의 넘버링 시스템은 Kabat 등의 문헌[1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA]에 기재된 EU 인덱스의 넘버링 시스템임)이 시스템인 아미노산으로 치환되는 시스템인 조작 항체를 포함한다. 시스템인 잔기의 단일 치환은 IgG 분자의 동종이량체 성질로 인해 생성된 항체 내에 2개 시스템인 잔기가 나타나는 것으로 이어진다는 점에 주목해야 한다. 생성된 본 발명의 시스템인 조작 항체는 약물 또는 화합물과의 접합을 위해 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개 이상의 유리 티올을 나타낼 수 있다.
- [0040] 일부 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 세린의 시스템인으로의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 트레오닌의 시스템인으로의 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 세린의 시스템인으로의 치환 및 트레오닌의 시스템인으로의 치환을 둘 다 포함한다.
- [0041] 일부 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번으로부터 선택되는 위치에 하나 이상의 치환을 포함하며, 여기서 불변 영역의 넘버링 시스템은 Kabat 등의 문헌(상동)에 기재된 EU 인덱스의 넘버링 시스템이다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 2개 이상의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 3개 이상의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 4개 이상의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 5개 이상의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 6개 이상의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 7개 이상의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 8개 이상의 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치의 치환을 포함한다.
- [0042] 일부 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 132번 및/또는 138번 위치에서 치환을 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 IgG1 분자의 CH1 도메인의 131~139번 영역에서 자연 발생하는 단독 트레오닌 및/또는 세린 아미노산에서의 치환 또는 그 등가물을 포함한다.
- [0043] 일 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번으로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 세린 및/또는 트레오닌이 시스템인으로 치환된 IgG1을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 포맷으로부터 유도된다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 IgA1, IgA2, IgM, IgD 또는 IgE와 같은 비IgG 포맷으로부터 유도된다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 IgG1의 CH1 영역의 131~139번 영역에 해당하는 잔기의 시스템인 조작을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 도 1c에 도시된 다양한 항체 포맷으로 개략적으로 표시된 잔기의 시스템인 조작을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 Fab 및 Fab2 분자 포맷을 포함하나 이들에 한정되지 않는 항체 단편을 포함한다.
- [0044] IgG1 분자의 CH1 도메인의 131~139번 영역은 도 1a에 예시된 바와 같이 용매에 노출된다. 따라서, 131~139번 루프를 확장시켜(즉, 추가의 아미노산을 포함시켜), 표면이 다양한 제제의 부위 특이적 접합에 용이하게 하는 것을 생각해 볼 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명 항체의 CH1 도메인의 131~139번 루프는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개

이상, 13개 이상, 14개 이상, 또는 15개 이상의 아미노산만큼 확장된다. 일부 실시형태에서, 본 발명 항체의 CH1 도메인의 131~139번 루프의 확장은 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번, 또는 139번 잔기 다음에 발생한다. 다른 실시형태에서, 본 발명 항체의 CH1 도메인의 131~139번 루프는 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 잔기 다음에 발생한다.

[0045] 다른 실시형태에서, IgG1 분자의 CH1 도메인의 131~139번 루프의 확장은 임의의 아미노산을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 확장은 하나 이상의 비천연 시스테인 아미노산을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 확장은 트레오닌 및/또는 세린 잔기를 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 확장은 또한 비시스테인 잔기의 천연 시스테인 잔기로의 치환과 연계된다.

[0046] 또 다른 실시형태에서, 시스테인 조작 항체는 하나 이상의 비자연 발생 디설파이드 결합의 형성을 포함한다. 상기 비자연 발생 디설파이드 결합은 쇠내 또는 쇠간 결합일 수 있다. 상기 비자연 발생 디설파이드 결합은 2개의 별개의 항체 분자를 서로 연결할 수 있다. 비자연 발생 디설파이드 결합의 형성은 다른 시스테인 잔기에 사전에 연결된 하나 이상의 유리 티올기를 유리시킬 수 있다.

[0047] 유리 티올기를 나타내도록 하는 시스테인 잔기의 조작은 디설파이드 결합 위치에 고도의 가변성을 나타내는 항체 종의 혼합물을 생성할 수 있다. 예를 들어, 자연 발생 "정규형(canonical)" 디설파이드 결합(도 1b에 예시됨)은 샘플 중에 존재하는 항체 중 일부에서만 나타날 수 있다. 다른 비천연 시스테인의 조작은 "정규형" 디설파이드 결합이 아닌 디설파이드 결합을 유도할 수 있음이 이해되어야 한다. 일부 실시형태에서, 디설파이드 결합은 경쇄와, 중쇄의 131~139번 영역에 존재하는 임의의 비천연 시스테인 잔기 사이에 형성된다. 다른 실시형태에서, 디설파이드 결합은 경쇄와, 중쇄의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및/또는 139번 위치에 존재하는 임의의 비천연 시스테인 잔기 사이에 형성된다.

[0048] 샘플 중 항체에 존재하는 디설파이드 위치의 가변성을 제한하기 위한 노력으로서, 시스테인 조작 항체는, 디설파이드 결합을 제거하기 위해, 천연 시스테인 잔기를 다른 잔기로 보상 치환하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 시스테인 조작 항체는 디설파이드 결합을 제거하기 위해 천연 시스테인 잔기, 예컨대 중쇄의 220번 위치에 존재하는 시스테인을 다른 아미노산 잔기로 치환하는 것을 포함한다.

[0049] 하나 이상의 비자연 발생 디설파이드 결합의 형성은 변형 전 항체와 비교하여 본 발명의 시스테인 조작 항체의 안정성에 영향을 줄 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 비자연 발생 디설파이드 결합은 시스테인 조작 전의 동일한 항체와 비교하여 시스테인 조작 항체의 안정성을 증가시킬 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 비자연 발생 디설파이드 결합은 시스테인 조작 전의 동일한 항체와 비교하여 시스테인 조작 항체의 안정성을 감소시킬 수 있다.

[0050] 본 발명의 시스테인 조작 항체는 그 야생형 대응물의 항원 결합 능력을 유지한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 시스테인 조작 항체는 시스테인 조작 전의 항체와 비교하여 실질적으로 동일한 친화력을 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스테인 조작 항체는 시스테인 조작 전의 항체와 비교하여 감소된 친화력을 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스테인 조작 항체는 시스테인 조작 전의 항체와 비교하여 증대된 친화력을 나타낸다.

[0051] 본 발명의 항체는 그 동족 항원 중 하나 이상에 대해 높은 결합 친화력을 가질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 항체는 $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 또는 $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상의 결합 속도 상수 또는 k_{on} 속도[항체(Ab)+항원→Ab-Ag]를 가질 수 있다.

[0052] 또 다른 실시형태에서, 항체는 $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-1} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-2} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-3} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만, 또는 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만의 k_{off} 속도(Ab-Ag→Ab+Ag)를 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-5} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-6} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-7} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 미만, $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-8} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-9} s^{-1} 미만, 또는 10^{-10} s^{-1} 미만의 k_{off} 속도(Ab-Ag→Ab+Ag)를 가질 수 있다.

[0053] 또 다른 실시형태에서, 항체는 10^2 M^{-1} 이상, $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^3 M^{-1} 이상, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^4 M^{-1} 이상, $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^5 M^{-1} 이상, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^6 M^{-1} 이상, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^7 M^{-1} 이상, $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^8

M^{-1} 이상, $5 \times 10^8 M^{-1}$ 이상, $10^9 M^{-1}$ 이상, $5 \times 10^9 M^{-1}$ 이상, $10^{10} M^{-1}$ 이상, $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 이상, $10^{11} M^{-1}$ 이상, $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 이상, $10^{12} M^{-1}$ 이상, $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 이상, $10^{13} M^{-1}$ 이상, $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 이상, $10^{14} M^{-1}$ 이상, $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 이상, $10^{15} M^{-1}$ 이상, 또는 $5 \times 10^{15} M^{-1}$ 이상의 친화력 상수 또는 $K_d(k_{on}/k_{off})$ 를 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 $5 \times 10^{-2} M$ 미만, $10^{-2} M$ 미만, $5 \times 10^{-3} M$ 미만, $10^{-3} M$ 미만, $5 \times 10^{-4} M$ 미만, $10^{-4} M$ 미만, $5 \times 10^{-5} M$ 미만, $10^{-5} M$ 미만, $5 \times 10^{-6} M$ 미만, $10^{-6} M$ 미만, $5 \times 10^{-7} M$ 미만, $10^{-7} M$ 미만, $5 \times 10^{-8} M$ 미만, $10^{-8} M$ 미만, $5 \times 10^{-9} M$ 미만, $10^{-9} M$ 미만, $5 \times 10^{-10} M$ 미만, $10^{-10} M$ 미만, $5 \times 10^{-11} M$ 미만, $10^{-11} M$ 미만, $5 \times 10^{-12} M$ 미만, $10^{-12} M$ 미만, $5 \times 10^{-13} M$ 미만, $10^{-13} M$ 미만, $5 \times 10^{-14} M$ 미만, $10^{-14} M$ 미만, $5 \times 10^{-15} M$ 미만, 또는 $10^{-15} M$ 미만의 해리 상수 또는 $K_d(k_{off}/k_{on})$ 를 가질 수 있다.

[0054] 본원에 기재된 방법에 따라 사용되는 항체는 본원에 기재되어 있거나 당업자에게 공지되어 있는 방법(예를 들어, BIAcore 분석, ELISA)(스웨덴 옘살라 소재의 Biacore International AB 제품)을 이용하여 측정할 때 3000 pM 미만, 2500 pM 미만, 2000 pM 미만, 1500 pM 미만, 1000 pM 미만, 750 pM 미만, 500 pM 미만, 250 pM 미만, 200 pM 미만, 150 pM 미만, 100 pM 미만, 75 pM 미만의 해리 상수(K_d)를 가질 수 있다.

[0055] Fc 영역의 조절

[0056] 본 발명은 또한 변경된 Fc 영역(본원에서 "변이체 Fc 영역"이라도 포함)을 갖는 시스템인 조작 항체를 제공한다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 변이체 Fc 영역(즉, 하기에 기술하는 바와 같이 변경된 Fc 영역)을 포함한다. 변이체 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 항체는 본원에서 "Fc 변이체 단백질(들)"이라고 칭하기도 한다.

[0057] 변이체 Fc 영역을 설명할 때, 본 발명 항체의 Fc 영역은 Kabat 등의 문헌[1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA]에 기재된 EU 인덱스에 따른 넘버링 시스템을 포함한다.

[0058] Fc 영역의 변이체(예를 들어, 아미노산 치환 및/또는 첨가 및/또는 결실)는 이펙터 기능을 향상 또는 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(문헌[Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490]; 미국 특허 제 5,624,821호, 제5,885,573호 및 PCT 공개 공보 WO 00/42072, WO 99/58572 및 WO 04/029207 참조). 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 변이체 Fc 영역을 포함한다. 일 실시형태에서, 항체의 변이체 Fc 영역은 천연 Fc와 비교하여 유사한 수준의 이펙터 기능 유도 수준을 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 상기 변이체 Fc 영역은 천연 Fc와 비교하여 더 높은 이펙터 기능 유도를 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 상기 변이체 Fc 영역은 천연 Fc와 비교하여 더 낮은 이펙터 기능 유도를 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 상기 변이체 Fc 영역은 천연 Fc와 비교하여 더 높은 ADCC 유도를 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 상기 변이체 Fc 영역은 천연 Fc와 비교하여 더 낮은 ADCC 유도를 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 상기 변이체 Fc 영역은 천연 Fc와 비교하여 더 높은 CDC 유도를 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 상기 변이체 Fc 영역은 천연 Fc와 비교하여 더 낮은 CDC 유도를 나타낸다. 변이체 Fc 영역의 특정 실시형태에 대해서는 이하에 상세히 설명한다.

[0059] 또한, 당업계에는 Fc 영역의 글리코실화가 이펙터 기능을 증가 또는 감소시키도록 변형될 수 있다는 것이 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Umana et al., 1999, Nat, Biotechnol 17:176-180]; 문헌[Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294]; 문헌[Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740]; 문헌[Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473]; 미국 특허 제6,602,684호; 미국 출원 제10/277,370호; 미국 출원 제10/113,929호; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1; Potillegent™ 기술(미국 뉴저지주 프린스턴 소재의 Biowa, Inc.); GlycoMab™ 글리코실화 조작 기술(스위스 취리히 소재의 GLYCART biotechnology AG) 참조).

[0060] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 아미노산 잔기의 변경된 글리코실화를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 아미노산 잔기의 변경된 글리코실화는 이펙터 기능을 감소로 이어진다. 또 다른 실시형태에서, 아미노산 잔기의 변경된 글리코실화는 이펙터 기능의 증가로 이어진다. 특정 실시형태에서, 상기 Fc 영역은 감소된 푸코실화를 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 상기 Fc 영역은 비푸코실화되어 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 공보 제2005/0226867호 참조).

[0061] 최근의 연구는, IgG 분자 상의 올리고사카라이드의 시알산의 첨가가 그 항염증 활성을 증대시키고 그 세포 독

성을 변경하다는 것을 시사한다[Keneko et al., Science 313, 670-673(2006), Scallion et al., Mol. Immuno 2007 Mar; 44(7): 1524-34]. 따라서, 항체 치료제의 효능은 의도된 용도에 가장 알맞은 당 형태의 선택에 의해 최적화할 수 있다. 항체의 2개의 CH2 도메인 사이에 개재된 2개의 올리고사카라이드 사슬은 Fc 영역의 그 수용체에의 결합에 관여한다. 상기에 인용된 연구들은, 시알화가 증가된 IgG 분자는 항염증 특성을 갖는 반면, 시알화가 감소된 IgG 분자는 증가된 면역 자극 특성을 갖는다는 것을 입증한다. 따라서, 항체 치료제는 특정 용도를 위한 적절한 시알화 프로파일을 갖는 "맞춤형"일 수 있다. 항체의 시알화 상태를 조절하는 방법은 WO 2007/005786(발명의 명칭: "Methods And Compositions With Enhanced Therapeutic Activity") 및 WO 2007/117505(발명의 명칭: "Polypeptides With Enhanced Anti-Inflammatory And Decreased Cytotoxic Properties And Related Methods")(이들 문헌은 각각 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조 인용됨)에 제시되어 있다.

[0062] 일 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 변경된 시알화 프로파일을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 증가된 시알화 프로파일을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 약 125%, 약 150% 또는 그 이상의 시알화 증가를 포함한다. 일부 실시형태에서 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 이상의 시알화 증가를 포함한다.

[0063] 또 다른 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 감소된 시알화 프로파일을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 약 125%, 약 150% 또는 그 이상의 시알화 감소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 비변경 참조 Fc 영역과 비교하여 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 이상의 시알화 감소를 포함한다.

[0064] 또한, Fc 영역은 단백질의 반감기를 증가시키기 위해 변형시킬 수 있다는 것이 알려져 있다. 반감기의 증가는 환자에게 제공되는 약물의 양을 감소시킬 뿐만 아니라 투여 빈도를 줄일 수 있다. 따라서, 증가된 반감기를 갖는 본 발명 항체는 Fc 수용체와 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관여하는 것으로 확인된 아미노산 잔기를 변형(예를 들어, 치환, 결실 또는 부가)함으로써 생성할 수 있다(예를 들어, PCT 공개 공보 97/34631 및 02/060919 참조, 이들 공보는 각각 본원에서 그 전체가 참조 인용됨). 또한, 본 발명 항체의 반감기는 당업계에서 널리 이용되는 기법을 이용하여 PEG 또는 알부민에 접합시킴으로써 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 약 125%, 약 150% 또는 그 이상의 반감기 증가를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 이상의 반감기 증가를 포함한다.

[0065] 또 다른 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 반감기 감소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 약 125%, 약 150% 또는 그 이상의 반감기 감소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명 항체의 Fc 영역은 참조 비변경 Fc 영역과 비교하여 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 또는 그 이상의 반감기 감소를 포함한다.

[0066] 본 발명은 유사한 분자(예를 들어, 야생형 Fc 영역을 갖는 것을 제외하고는 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질)에 비해 Fc 리간드(예를 들어, Fc 수용체, C1q)에 대해 변경된 결합 특성을 갖는 Fc 변이체 단백질을 포함한다. 결합 특성의 예로는 결합 특이성, 평형 해리 상수(K_D), 해리 및 결합 속도(각각 k_{off} 및 k_{on}), 결합 친화력 및/또는 결합력을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 낮은 K_D 를 갖는 결합 분자(예를 들어, 항체와 같은 Fc 변이체 단백질)가 높은 K_D 를 갖는 결합 분자에 비해 바람직할 수 있는 것으로 일반적으로 이해되고 있다. 그러나, 일부 경우, k_{on} 또는 k_{off} 의 값이 K_D 의 값보다 더 적절할 수 있다. 당업자라면 어떤 동력학적 파라미터가 특정 항체 용도에 가장 중요한지를 결정할 수 있다.

[0067] 리간드에 대한 Fc 영역의 친화력 및 결합 특성은, Fc-FcγR 상호작용, 즉 FcγR에 대한 Fc 영역의 특이적 결합

을 측정하기 위한 것으로 당업계에 알려진, 평형법(예를 들어, 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA), 또는 방사능 면역분석법(RIA)), 또는 동력학적 방법(예를 들어, BIAcore®

분석), 및 간접 결합 분석, 경쟁적 억제 분석, 형광 공명 에너지 전달법(FRET), 겔 전기영동 및 크로마토그래피(예를 들어, 겔 여과) 등의 다른 방법을 포함하나 이들에 한정되지 않는 각종 시험관내 분석법(생화학적 또는 면역학적 기반 분석)에 의해 측정할 수 있다. 이와 같은 방법들은 조사되는 1종 이상의 성분에 대해 표지를 이용할 수 있고/있거나, 발색, 형광, 발광 또는 동위원소 표지를 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 검출 방법을 이용할 수 있다. 결합 친화력 및 동력학적 특성에 관한 상세한 설명은 항체-면역원 상호작용에 초점을 맞춘 문헌[Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)]으로부터 참조할 수 있다.

[0068] 일 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 하나 이상의 Fc 리간드에 대해 증대된 결합력을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 유사한 분자의 친화력보다 2배 이상, 또는 3배 이상, 또는 5배 이상, 또는 7배 이상, 또는 10배 이상, 또는 20배 이상, 또는 30배 이상, 또는 40배 이상, 또는 50배 이상, 또는 60배 이상, 또는 70배 이상, 또는 80배 이상, 또는 90배 이상, 또는 100배 이상, 또는 200배 이상 더 큰 Fc 리간드에 대한 친화력을 갖는다. 특정 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체에 대한 증대된 결합력을 갖는다. 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대한 증대된 결합력을 갖는다. 추가적인 특정 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcγRIIB에 대한 증대된 결합력을 갖는다. 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcRn에 대한 증대된 결합력을 갖는다. 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 C1q에 대한 증대된 결합력을 갖는다.

[0069] ADCC에 의해 표적 세포의 용해를 매개할 수 있는 임의의 특정 Fc 변이체 단백질의 능력을 분석할 수 있다. ADCC 활성을 평가하기 위해, 관심있는 Fc 변이체 단백질을 면역 이펙터 세포와 함께 표적 세포에 첨가하며, 이것은 항원 항체 복합체에 의해 활성화되어 표적 세포의 세포 용해가 초래된다. 세포 용해는 일반적으로 용해된 세포로부터의 표지의 방출(예를 들어, 방사성 기질, 형광 염료 또는 천연 세포내 단백질)에 의해 검출된다. 이러한 분석에 유용한 이펙터 세포로는 말초혈 단핵구(PBMC) 및 자연 킬러(NK) 세포를 들 수 있다. 시험관내 ADCC 분석의 구체적 예가 문헌[Wisecarver et al., 1985 79:277-282]; 문헌[Bruggemann et al., 1987, J Exp Med 166:1351-1361]; 문헌[Wilkinson et al., 2001, J Immunol Methods 258:183-191]; 문헌[Patel et al., 1995 J Immunol Methods 184:29-38]에 기재되어 있다. 관심있는 Fc 변이체 단백질의 ADCC 활성은 또한, 예를 들어 문헌[Clynes et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656]에 개시된 것과 같은 동물 모델로 평가할 수도 있다.

[0070] 일 실시형태에서, Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 증대된 ADCC 활성을 갖는다. 특정 실시형태, Fc 변이체 단백질은 유사한 분자의 ADCC 활성보다 2배 이상, 또는 3배 이상, 또는 5배 이상, 또는 10배 이상, 또는 50배 이상, 또는 100배 이상 더 큰 ADCC 활성을 갖는다. 또 다른 특정 실시형태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대한 증대된 결합력을 가지며, 유사한 분자에 비해 증대된 ADCC 활성을 갖는다. 다른 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 증대된 ADCC 활성과 함께 증대된 혈청 반감기를 갖는다.

[0071] 일 실시형태에서, Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 감소된 ADCC 활성을 갖는다. 특정 실시형태에서, Fc 변이체 단백질은 유사한 분자의 ADCC 활성보다 2배 이상, 또는 3배 이상, 또는 5배 이상, 또는 10배 이상, 또는 50배 이상, 또는 100배 이상 더 낮은 ADCC 활성을 갖는다. 또 다른 특정 실시형태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대한 감소된 결합력을 가지며 유사한 분자에 비해 감소된 ADCC 활성을 갖는다. 다른 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 감소된 ADCC 활성과 함께 증대된 혈청 반감기를 갖는다.

[0072] 일 실시형태에서, Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 증대된 CDC 활성을 갖는다. 특정 실시형태에서, Fc 변이체 단백질은 유사한 분자의 CDC 활성보다 2배 이상, 또는 3배 이상, 또는 5배 이상, 또는 10배 이상, 또는 50배, 또는 100배 이상 더 큰 CDC 활성을 갖는다. 다른 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 증대된 CDC 활성과 함께 증대된 혈청 반감기를 갖는다. 일 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 하나 이상의 Fc 리간드에 대해 감소된 결합력을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 유사한 분자의 Fc 리간드에 대한 친화력보다 2배 이상, 또는 3배 이상, 또는 5배 이상, 또는 7배 이상, 또는 10배 이상, 또는 20배 이상, 또는 30배 이상, 또는 40배 이상, 또는 50배 이상, 또는 60배 이상, 또는 70배, 또는 80배 이상, 또는 90배 이상, 또는 100배 이상, 또는 200배 이상 더 낮은 Fc 리간드에 대한 친화력을 갖는다. 특정 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체에 대한 감소된 결합력을 갖는다. 또 다른 특정

실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대한 감소된 결합력을 갖는다. 추가적인 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 Fc 변이체는 유사한 분자의 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대한 친화력보다 약 5배 이상 더 낮은 Fc 수용체 FcγRIIIA에 대한 친화력을 가지며, 상기 Fc 변이체는 유사한 분자의 Fc 수용체 FcγRIIB에 대한 친화력의 약 2배 범위 내인 Fc 수용체 FcγRIIB에 대한 친화력을 갖는다. 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcRn에 대한 감소된 결합력을 갖는다. 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 Fc 변이체 단백질은 유사한 분자에 비해 C1q에 대한 감소된 결합력을 갖는다.

[0073] 일 실시형태에서, 본 발명은 Kabat의 문헌에 기재된 EU 인덱스로 넘버링할 때 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 및 443번으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치에 비천연 아미노산 잔기를 포함한다. 경우에 따라, 상기 Fc 영역은 당업자에게 공지된 추가적인 및/또는 대안적인 위치에 비천연 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,024,821호; 제6,277,375호; 제6,737,056호; PCT 특허 공개 공보 WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 및 WO 06/020114 참조).

[0074] 특정 실시형태에서, 본 발명은 Kabat의 문헌에 기재된 EU 인덱스로 넘버링할 때 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y 및 434W로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 비천연 아미노산 잔기를 포함한다. 경우에 따라, 상기 Fc 영역은 당업자에게 공지된 추가적인 및/또는 대안적인 비천연 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호; 제6,277,375호; 제6,737,056호; PCT 특허 공개 공보 WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 및 WO 05/040217 참조).

[0075] 항체 제조 방법

[0076] 본 발명의 시스템인 조작 항체는, 특히 화학적 합성에 의해, 또는 바람직하게는 재조합 발현 기법에 의해, 항체의 합성에 대해 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0077] 단일클론 항체는 하이브리도마, 재조합 및 파지 디스플레이 기법 또는 이들의 조합을 이용하는 것을 비롯하여 당업계에 공지된 다종 다양한 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 단일클론 항체는, 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)](상기 참고 문헌은 본원에서 그 전체가 참조 인용됨)에 교시된 것을 비롯한 하이브리도마 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 본원에서 사용되는 "단일클론 항체"란 용어는 하이브리도마 기법을 통해 제조된 항체에만 한정되지 않는다. "단일클론 항체"란 용어는 이것이 생산된 방법이 아니라, 임의의 진행생물, 원핵생물, 또는 파지 클론을 비롯한 단일클론으로부터 유래된 항체를 의미한다.

[0078] 하이브리도마 기법을 이용한 특정 항체의 제조 및 스크리닝 방법은 통상적인 것으로 당업계에 잘 알려져 있다. 요약하면, 마우스를 표적 항원(전체 길이 단백질 또는 그 도메인, 예를 들어 세포의 도메인 또는 리간드 결합 도메인)으로 면역화할 수 있고, 면역 반응이 검출되면, 예를 들어 표적 항원에 특이적인 항체가 마우스 혈청에서 검출되면, 마우스 비장을 적출하여 비장 세포를 단리한다. 그 후, 비장 세포를 임의의 적절한 골수종 세포, 예를 들어 ATCC로부터 입수할 수 있는 세포주 SP20 유래의 세포에 잘 알려진 기법에 의해 융합시킨다. 하이브리

도마를 선별하여 한계 희석법으로 클로닝한다. 그 후, 하이브리도마 클론을, 본 발명의 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 세포에 대해 당업계에 공지된 방법으로 평가한다. 양성 하이브리도마 클론으로 마우스를 면역화하여, 일반적으로 고농도의 항체를 함유하고 있는 복수액을 생성할 수 있다.

[0079] 따라서, 본 발명의 항체를 분비하는 하이브리도마 세포를 배양함으로써 단일클론 항체를 생성할 수 있으며, 이때 바람직하게는 상기 하이브리도마는 표적 항원으로 면역화된 마우스로부터 단리된 비장 세포를 골수종 세포와 융합한 후, 융합으로부터 얻은 하이브리도마를 특정 표적 항원에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 하이브리도마 클론에 대해 스크리닝한다.

[0080] 특정 표적 항원 에피토프를 인식하는 항체 단편은 당업자에게 공지된 임의의 기법으로 생성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fab 및 F(ab')₂ 단편은, 파파인(Fab 단편을 생성함) 또는 펩신(F(ab')₂ 단편을 생성함)과 같은 효소를 사용한 면역글로불린의 단백질 분해 절단에 의해 생성할 수 있다. F(ab')₂ 단편은 가변 영역, 경쇄 불변 영역 및 중쇄 CH1 도메인을 포함한다. 또한, 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 다양한 파지 디스플레이 방법을 이용하여 생성할 수 있다.

[0081] 파지 디스플레이 방법의 경우, 기능성 항체 도메인을, 이것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 보유하는 파지 입자의 표면 상에 디스플레이한다. 특히, VH 및 VL 도메인을 코딩하는 DNA 서열을 동물 cDNA 라이브러리(예를 들어, 인간 또는 쥐와 동물의 림프구 조직의 cDNA 라이브러리)로부터 증폭시킨다. VH 및 VL 도메인을 코딩하는 DNA는 PCR에 의해 scFv 링커와 함께 재결합하여 파지미드 벡터(예를 들어, pCANTAB 6 또는 pComb 3 HSS)로 클로닝한다. 이 벡터를 이. 콜라이에 전기천공하고, 이 이. 콜라이를 헬퍼 파지로 감염시킨다. 이 방법에 사용되는 파지는 일반적으로 fd 및 M13을 비롯한 필라멘트형 파지이고, VH 및 VL 도메인은 통상적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII에 재조합적으로 융합시킨다. 관심있는 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는, 항원, 예를 들어 고체 표면 또는 비드에 결합 또는 포획된 항원 또는 표지된 항원을 사용하여 선별 또는 확인할 수 있다. 본 발명의 항체를 제조하는 데 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예로는 문헌 [Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50]; 문헌 [Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177]; 문헌 [Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol 24:952-958]; 문헌 [Persic et al., 1997, Gene 187:9]; 문헌 [Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280]; 국제 출원 PCT/GB91/01134; 국제 공개 공보 WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 및 WO 97/13844; 및 미국 특허 제5,698,426호, 제5,223,409호, 제5,403,484호, 제5,580,717호, 제5,427,908호, 제5,750,753호, 제5,821,047호, 제5,571,698호, 제5,427,908호, 제5,516,637호, 제5,780,225호, 제5,658,727호, 제5,733,743호 및 제5,969,108호(상기 문헌 각각은 그 전체가 본원에 참조 인용됨)에 개시된 방법들을 들 수 있다.

[0082] 상기 참고 문헌에 기재된 바와 같이, 파지 선별 후에, 이 파지 유래의 항체 코딩 영역을 단리하여 이것을 인간 항체를 비롯한 전체 항체, 또는 임의의 다른 원하는 항원 결합 단편을 생성하는 데 사용하고, 예를 들어 이하에 기재된 바와 같이 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 박테리아를 비롯한 임의의 숙주 세포에서 발현시킨다. 또한, 국제 공개 공보 WO 92/22324; 문헌 [Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12:864]; 문헌 [Sawai et al., 1995, AJRI 34:26]; 및 문헌 [Better et al., 1988, Science 240:1041](상기 참고 문헌은 그 전체가 참조 인용됨)에 개시된 방법과 같은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합적으로 제조하기 위한 기법이 이용될 수 있다.

[0083] 전체 항체를 생성하기 위해서는, VH 또는 VL 뉴클레오티드 서열, 제한 부위 및 제한 부위를 보호하기 위한 측면 서열을 포함하는 PCR 프라이머를 사용하여 scFv 클론에서 VH 또는 VL 서열을 증폭시킬 수 있다. 당업자에게 알려진 클로닝 기법을 이용하여, PCR 증폭 VH 도메인을 VH 불변 영역, 예를 들어, 인간 감마 4 불변 영역을 발현하는 벡터로 클로닝할 수 있고, PCR 증폭 VL 도메인을 VL 불변 영역, 예를 들어, 인간 카파 또는 람다 불변 영역을 발현하는 벡터로 클로닝할 수 있다. 바람직하게는, VH 또는 VL 도메인을 발현하기 위한 벡터는 EF-1 α 프로모터, 분비 서열, 가변 도메인, 불변 도메인 및 네오마이신과 같은 선별 마커를 위한 클로닝 사이트를 포함한다. VH 및 VL 도메인은 또한 필요한 불변 영역을 발현하는 벡터로 클로닝될 수 있다. 그 후, 중쇄 전환 벡터 및 경쇄 전환 벡터를, 당업자에게 공지된 기법을 이용하여, 전체 길이 항체, 예를 들어, IgG를 발현하는 안정한 또는 일시적 세포주를 생성하기 위해 세포주에 동시 형질감염시킨다.

[0084] 인간을 대상으로 한 항체의 생체내 사용 및 시험관내 검출 분석을 비롯한 일부 용도에 있어서는, 인간 또는 키메라 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 완전한 인간 항체가 인간 피험체의 치료적 처리에 특히 바람직하

다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하여 상기에 기재된 파지 디스플레이 방법을 비롯한 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조할 수 있다. 미국 특허 제4,444,887호 및 제4,716,111호; 및 국제 공개 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741(상기 문헌 각각은 그 전체가 본원에 참조 인용됨)도 참조할 수 있다.

[0085] 인간 항체는 또한 기능적 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없으나 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체를 마우스 배아 줄기 세포로 무작위적으로 또는 상동성 재조합에 의해 도입할 수 있다. 대안으로, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자 이외에도 인간 가변 영역, 불변 영역 및 다양성 영역을 마우스 배아 줄기 세포에 도입할 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동성 재조합에 의해 인간 면역글로불린 유전자좌의 도입과 동시에 또는 독립적으로 비기능성으로 될 수 있다. 특히, J_H 영역의 동형접합성 결실은 내인성 항체 생산을 막는다. 변형된 배아 줄기 세포를 증식시켜 배반포에 마이크로 주사하여 키메라 마우스를 생산한다. 그 후, 키메라 마우스를 번식시켜 인간 항체를 발현하는 동형접합성 새끼를 얻는다. 이 트랜스제닉 마우스를 선택된 항원, 예를 들어 본 발명 폴리펩티드 전부 또는 일부로 통상적인 방식에 의해 면역화시킨다. 이 항원에 대해 생성된 단일클론 항체를, 종래의 하이브리도마 기법을 이용하여, 면역화된 트랜스제닉 마우스로부터 얻을 수 있다. 트랜스제닉 마우스가 보유하는 인간 면역글로불린 이식 유전자는 B 세포 분화 과정에서 재배열되고, 그 후 클래스 스위칭 및 체세포 돌연변이를 겪는다. 따라서, 이러한 기법을 이용할 경우, 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 생산할 수 있다. 인간 항체를 생산하기 위한 이러한 기법의 재검토를 위해서는, 문헌[Lonberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)]을 참조할 수 있다. 인간 항체 및 인간 단일클론 항체의 제조 기법 및 이러한 항체의 제조를 위한 프로토콜에 관한 상세한 설명을 위해서는, 예를 들어 국제 공개 공보 WO 98/24893, WO 96/34096 및 WO 96/33735; 및 미국 특허 제5,413,923호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,569,825호, 제5,661,016호, 제5,545,806호, 제5,814,318호 및 제5,939,598호를 참조할 수 있으며, 이들 문헌은 그 전체가 본원에 참조 인용된다. 또한, 상기에 기재된 것과 유사한 기법을 이용하여, 선택된 항원에 대해 생성된 인간 항체를 제공하기 위해 Medarex(미국 뉴저지주 프린스턴 소재)와 같은 회사와 계약을 맺을 수 있다.

[0086] 키메라 항체는, 항체의 상이한 부분들이 비인간 항체 유래의 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 갖는 항체와 같은 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래되는 분자이다. 키메라 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Morrison, 1985, Science 229:1202]; 문헌[Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214]; 문헌[Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202]; 및 미국 특허 제6,311,415호, 제5,807,715호, 제4,816,567호 및 제4,816,397호(이들 문헌은 그 전체가 본원에 참조 인용됨)를 참조할 수 있다. 인간 이외의 종 유래의 하나 이상의 CDR 및 인간 면역글로불린 분자 유래의 골격구조 영역을 포함하는 키메라 항체는, 예를 들어 CDR 그래프팅(EP 239,400; 국제 공개 공보 WO 91/09967; 및 미국 특허 제5,225,539호, 제5,530,101호 및 제5,585,089호), 베니어링(veneering) 또는 리서페이싱(resurfacing)[EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7:805; 및 Roguska et al., 1994, PNAS 91:969], 및 사슬 서플링(미국 특허 제5,565,332호)을 비롯한 당업계에 공지된 다양한 기법을 이용하여 제조할 수 있다.

[0087] 종종, 항원 결합력을 개선하기 위해, 바람직하게는 변경하기 위해, 골격구조 영역의 골격구조 잔기를 CDR 도너 항체 유래의 상응하는 잔기로 치환한다. 이러한 골격구조 치환은 당업계에 잘 알려진 방법에 의해, 예를 들어 항원 결합에 중요한 골격구조 잔기를 확인하기 위한 CDR 및 골격구조 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치의 비일반적 골격구조 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인한다(예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호; 및 문헌[Riechmann et al., 1988, Nature 332:323] 참조, 이들 문헌은 그 전체가 본원에 참조 인용됨).

[0088] 인간화 항체는 실질적으로 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 골격구조 영역 및 실질적으로 비인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하고 소정의 항원에 결합할 수 있는 항체 또는 그 변이체 또는 그 단편이다. 인간화 항체는, CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 비인간 면역글로불린(즉, 도너 항체)의 것에 상응하고, 골격구조 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 면역글로불린 공통 서열의 것인 적어도 1개, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함한다. 바람직하게는, 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 일반적으로 인간 면역글로불린의 일부를 포함한다. 일반적으로, 항체는 경쇄뿐만 아니라 적어도 중쇄의 가변 도메인을 포함한다. 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 인간화 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 비롯한 임의의 면역글로불린 클래스 및 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄를 비롯한 임의의 아이소타입으로부터 선택될 수 있다. 일반적으로, 불변 도메인은 인간화 항

체가 세포 독성 활성을 나타내는 것이 필요한 경우의 보체 고정 불변 도메인이고, 클래스는 일반적으로 IgG₁이다. 이러한 세포 독성 활성이 바람직하지 않을 경우, 불변 도메인은 IgG₂ 클래스의 것일 수 있다. 인간화 항체는 하나보다 많은 클래스 또는 아이소타입 유래의 서열을 포함할 수 있으며, 원하는 이펙터 기능을 최적화 하기 위해 특정 불변 도메인을 선택하는 것은 당업계의 통상적인 기술 범위 내이다. 인간화 항체의 골격구조 및 CDR 영역은 모 서열에 정확히 상응하여야 할 필요는 없으며, 예를 들어, 도너 CDR 또는 공통 골격구조를, 그 부 위의 CDR 또는 골격구조 잔기가 공통 또는 이입 항체에 상응하지 않도록 하나 이상의 잔기의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 돌연변이시킬 수 있다. 그러나 이러한 돌연변이는 광범위하게 일어나지는 않는다. 일반적으로, 인간화 항체 잔기의 75% 이상, 더 흔하게는 90% 이상, 또는 심지어 95% 이상이 모 골격구조 영역(FR) 및 CDR 서열의 것에 상응한다.

[0089] 인간화 항체는 CDR-그래프팅[유럽 특허 EP 239,400; 국제 공개 공보 WO 91/09967; 및 미국 특허 제5,225,539호, 제5,530,101호 및 제5,585,089호], 베니어링 또는 리서페이싱[유럽 특허 EP 592,106 및 EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; 및 Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973], 사슬 서플링[미국 특허 제5,565,332호] 및 예를 들어, 미국 특허 제6,407,213호, 제5,766,886호, 제5,585,089호, 국제 공개 공보 WO 9317105, 문헌[Tan et al., 2002, J. Immunol 169:1119-25], 문헌[Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-60], 문헌[Morea et al., 2000, Methods 20:267-79], 문헌[Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84], 문헌[Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904], 문헌[Couto et al., 1995, Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s], 문헌[Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22], 문헌[Sandhu, 1994, Gene 150:409-10], 문헌[Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73], 문헌[Jones et al., 1986, Nature 321:522-525], 문헌[Riechmann et al., 1988, Nature 332:323] 및 문헌[Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol 2:593-596]에 개시된 기법들을 포함하나 이들에 한정되지 않는 당업계에 공지된 다양한 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 흔히, 골격구조 영역의 골격구조 잔기는, 항원 결합력을 변경하기 위해, 바람직하게는 개선하기 위해, CDR 도너 항체 유래의 상응하는 잔기로 치환한다. 이러한 골격구조 치환은, 당업계에 잘 알려진 방법에 의해, 예를 들어 항원 결합에 중요한 골격구조 잔기를 확인하기 위한 CDR 및 골격구조 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치의 비일반적 골격구조 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인한다(예를 들어, Queen 등의 미국 특허 제5,585,089호; 및 문헌[Riechmann et al., 1988, Nature 332:323] 참조, 이들 문헌은 그 전체가 본원에 참조 인용됨).

[0090] 또한, 본 발명의 항체는 당업계에 잘 알려진 기법을 이용하여 항이디오타입 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Greenspan & Bona, 1989, FASEB J. 7:437-444] 및 문헌[Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147:2429-2438] 참조). 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리 뉴클레오티드를 사용하는 것을 포함한다.

[0091] 다른 실시형태에서, 본 발명은 시스테인 조작된 잔기를 포함하는 단리된 CH1 도메인을 발현시키는 것을 포함한다. 이러한 단리된 CH1 도메인은 디스플레이 목적을 위한 스캐폴드로서 유용하게 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 단리된 CH1 도메인은 항체 경쇄 유래의 C카과 또는 C람다 서브유닛과 함께 사용될 수 있다.

[0092] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 시스테인 잔기가 결여된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 시스테인 잔기가 없는 힌지 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는, 모든 시스테인 잔기가 세린 또는 트레오닌으로 치환된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 이러한 항체는 증가된 접합 효율 및 감소된 디설파이드 스크램블링을 나타낼 수 있다.

[0093] 또한, 다양한 간행물이 분자 내로 FcRn 결합 폴리펩티드를 도입하는 것에 의해[WO 97/43316; 미국 특허 제 5,869,046호; 미국 특허 제5,747,035호; WO 96/32478; WO 91/14438], 또는 분자를 FcRn 결합 친화력은 보존되거나 다른 Fc 수용체에 대한 친화력은 크게 감소된 항체와 융합하는 것에 의해[WO 99/43713], 또는 항체의 FcRn 결합 도메인과의 융합에 의해[WO 00/09560; 미국 특허 제4,703,039호] 그 반감기가 변경된 생리학적 활성 분자를 얻는 방법을 개시한다. 생리학적 활성 분자의 반감기를 증가시키는 특정 기법 및 방법에 대해서는 미국 특허 제7,083,784호(2006년 8월 1일에 특허 허여됨, 발명의 명칭: "Antibodies with Increased Half-lives")(이 문헌은 모든 목적을 위해 본원에 참조 인용됨)로부터도 참조할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 항체는 아미노산 잔기 돌연변이(Kabat의 문헌에 기재된 EU 넘버링에 의해 넘버링될 때): M252Y/S254T/T256E 또는 H433K/N434F/Y436H를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 것으로 간주된다.

[0094] 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드

- [0095] 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 상기 폴리뉴클레오타이드를 얻을 수 있고, 이 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 결정할 수 있다. 항체의 아미노산 서열은 알고 있기 때문에, 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 당업계에 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 결정할 수 있으며, 즉, 특정 아미노산을 코딩하는 것으로 알려진 뉴클레오타이드 코돈이 본 발명의 항체 또는 그 단편을 코딩하는 핵산을 생성하도록 조립한다. 항체를 코딩하는 이러한 폴리뉴클레오타이드는 화학적 합성 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, 문헌[Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242]에 기재된 것)로부터 조립할 수 있는데, 이것은 요약하면 항체를 코딩하는 서열의 일부를 포함하는 중복 올리고뉴클레오타이드의 합성, 이러한 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 및 결합, 이에 이어 PCR에 의한 결합된 올리고뉴클레오타이드의 증폭을 포함한다.
- [0096] 대안으로, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 적절한 공급원 유래의 핵산으로부터 생성할 수 있다. 특정 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 클론은 이용 가능하지 않지만 항체의 서열을 알고 있다면, 면역글로불린을 코딩하는 핵산을, 적절한 공급원(예를 들어, 항체 cDNA 라이브러리, 또는 그로부터 생성된 cDNA 라이브러리)으로부터, 또는 항체를 발현하는 임의의 조직 또는 세포로부터 분리된 핵산, 바람직하게는 폴리 A+ RNA로부터, 서열의 3' 및 5' 말단에 하이브리드화할 수 있는 합성 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 행함으로써, 또는 예를 들어 항체를 코딩하는 cDNA 라이브러리 유래의 cDNA 클론을 확인하기 위해 특정 유전자 서열에 대해 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 클로닝함으로써 얻거나 화학적으로 합성할 수 있다. 그 후, PCR에 의해 생성된 증폭된 핵산을 당업계에 잘 알려져 있는 임의의 방법을 이용하여 복제 가능한 클로닝 벡터로 클로닝할 수 있다.
- [0097] 상기 항체의 뉴클레오타이드 서열이 결정되면, 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체를 생성하기 위해, 예를 들어 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입이 생성되도록, 항체의 뉴클레오타이드 서열을 뉴클레오타이드 서열의 조작을 위한 당업계에 잘 알려져 있는 방법, 예를 들어 재조합 DNA 기법, 위치 지정 돌연변이 유발, PCR 등(예를 들어, 본원에 그 전체가 참조 인용되는 문헌[Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY] 및 문헌[Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY]에 기재된 기법 참조)을 이용하여 조작할 수 있다.
- [0098] 특정 실시형태에서, CDR 중 하나 이상을 통상적인 재조합 DNA 기법을 이용하여 골격구조 영역 내에 삽입한다. 상기 골격구조 영역은 천연 또는 공통 골격구조, 바람직하게는 인간 골격구조 영역일 수 있다(예를 들어, 인간 골격구조 영역 리스트에 대해서는 문헌[Chothia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278:457-479] 참조). 바람직하게는, 골격구조 영역과 CDR의 조합에 의해 생성된 폴리뉴클레오타이드는 EphA2 또는 EphA4에 특이적으로 결합하는 항체를 코딩한다. 바람직하게는, 상기에 기재된 바와 같이, 골격구조 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어질 수 있고, 바람직하게는, 상기 아미노산 치환은 항체의 그 항원에의 결합을 개선시킨다. 또한, 이러한 방법은 하나 이상의쇄내 디설파이드 결합이 결여된 항체를 생성하기 위해쇄내 디설파이드 결합에 관여하는 하나 이상의 가변 영역 시스테인 잔기의 아미노산 치환 또는 결실을 만드는 데 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 다른 변경도 본 발명에 포함되며 당업계의 기술 범위에 포함된다.
- [0099] **항체의 재조합 발현**
- [0100] 본 발명 항체, 그 유도체, 유사체 또는 단편의 재조합 발현은 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터의 구축의 필요로 한다. 본 발명의 항체 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 그 일부분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 얻어지면, 당업계에 잘 알려져 있는 기법을 이용하여 재조합 DNA 기법으로 항체 제조용 벡터를 제조할 수 있다. 따라서, 항체 코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시킴으로써 단백질을 제조하는 방법을 본원에 기재한다. 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터를 구축하기 위해 당업자에게 잘 알려진 방법을 이용할 수 있다. 이들 방법은, 예를 들어 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다.
- [0101] 따라서, 본 발명은, 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 본 발명의 항체, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 또는 그 일부분, 또는 중쇄 또는 경쇄 CDR을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제 가능한 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 항체의 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있으며(예를 들어, 국제 공개 공보 WO 86/05807 및 WO 89/01036; 및 미국 특허 제5,122,464호 참조), 항체의 가변 도메인은 전체 중쇄, 전체 경쇄, 또는 전체 중쇄 및 경쇄 둘 다의 발현을 위한 벡터로 클로닝될 수 있다.
- [0102] 상기 발현 벡터는 종래의 기법에 의해 숙주 세포로 이전시키고, 그 후 형질감염된 세포를 종래의 기법에 의해 배양하여 본 발명 항체를 생산한다. 따라서, 본 발명은, 이중성 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 본 발명 항체 또는 그 단편, 또는 그 중쇄 또는 경쇄, 또는 그 일부분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포를 포함한다. 이중쇄 항체의 발현을 위한 특정 실시형태에서, 상기 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩하는 벡터를, 하

기에 상세히 설명하는 바와 같이, 전체 번역글로불린 분자의 발현을 위해 숙주 세포에서 동시에 발현시킬 수 있다.

[0103] 본 발명의 항체를 발현시키기 위해 다양한 숙주 발현 벡터 시스템이 이용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제 5,807,715호 참조). 이러한 숙주 발현 시스템은 관심있는 코딩 서열을 제조한 후 정제할 수 있는 수송체를 의미할 뿐만 아니라, 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열로 형질전환 또는 형질감염될 경우 계내에서 본 발명 항체를 발현할 수 있는 세포를 의미한다. 여기에는 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예를 들어, 이. 콜라이 및 비. 서브틸리스)와 같은 박테리아; 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모[예를 들어, 사카로마이세스 피키아(*Saccharomyces Pichia*)]; 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 배콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 항체 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 형질감염 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포 계놈 유래의 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스 유래의 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 포함하는 재조합 발현 구성체를 보유하는 포유동물 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, NSO 및 3T3 세포)가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 특히 전체 재조합 항체의 발현을 위해, 바람직하게는, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)와 같은 박테리아 세포, 더 바람직하게는 진핵생물 세포가 재조합 항체의 발현에 사용된다.

[0104] 예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스 유래의 주요 즉시 초기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 조합된 차이니스 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포가 항체의 효과적인 발현 시스템이다[Foecking et al., 1986, Gene 45:101; 및 Cockett et al., 1990, BioTechnology 8:2].

[0105] 박테리아 시스템의 경우, 발현되는 항체에 대해 의도된 용도에 따라 다수의 발현 벡터를 유익하게 선택할 수 있다. 예를 들어, 항체의 약학적 조성물의 생산을 위해, 이러한 단백질을 다량 제조하고자 할 경우, 정제가 용이한 융합 단백질 생성물의 고도 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터로는 이. 콜라이 발현 벡터 pUR278[Ruther et al., 1983, EMBO 12:1791](여기서, 항체 코딩 서열은 융합 단백질이 생성되도록 lacZ 코딩 영역과의 프레임 내에 벡터로 개별적으로 결합될 수 있다); pIN 벡터[Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509] 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. PGEX 벡터는 또한 글루타티온 5-트랜스퍼라제(GST)와의 융합 단백질로서 이중 폴리펩티드를 발현시키는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며, 매트릭스 글루타티온-아가로스 비드에의 흡착 및 결합에 이어, 유리 글루타티온 존재 하에서의 용리에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제할 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 부분으로부터 유리될 수 있도록 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 디자인된다.

[0106] 곤충 시스템의 경우, 이중 유전자를 발현시키기 위한 벡터로서 오토그라파 캘리포니카 핵 폴리헤드론 형성 바이러스(*Autographa californica nuclear polyhedrosis: AcNPV*)를 사용한다. 이 바이러스는 스포도테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 증식한다. 항체 코딩 서열은 바이러스의 비필수 영역으로 개별적으로 클로닝되어 AcNPV 프로모터 제어 하에 배치된다.

[0107] 포유동물 숙주 세포의 경우, 다수의 바이러스계 발현 시스템이 이용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심있는 항체 코딩 서열을 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어 후기 프로모터 및 3' 리더 서열에 결합시킬 수 있다. 그 후, 이 키메라 유전자를 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 계놈으로 삽입할 수 있다. 바이러스 계놈의 비필수 영역(예를 들어, 영역 E1 또는 E3)에의 삽입은 생존력이 있고 감염된 숙주에서 항체를 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 산출한다(예를 들어, 문헌[Logan & Shenk, 1984, PNAS 81:6355-6359] 참조). 삽입된 항체 코딩 서열의 효율적인 번역에는 특정한 개시 신호가 또한 요구될 수 있다. 이러한 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 또한, 개시 코돈은 전체 삽입체의 번역이 확보되도록 원하는 코딩 서열의 리딩 프레임과 상이 맞아야 한다. 이러한 이중성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 천연 유래의 것 과 합성 유래의 것 등 다양한 기원의 것일 수 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서 요소, 전사 종결 서열 등을 포함시켜 증대시킬 수 있다(예를 들어, 문헌[Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544] 참조).

[0108] 또한, 원하는 특정 방식으로, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 유전자 생성물을 변형 및 가공하는 숙주 세포 균주를 선택할 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예를 들어, 글리코실화) 및 가공(예를 들어, 절단)은 단

백질의 기능에 있어 중요할 수 있다. 다양한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역후 가공 및 변형을 위한 특징적이고 특이적인 메커니즘을 가지고 있다. 발현된 이중 단백질의 정확한 변형 및 가공을 확보할 수 있도록 적절한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 이를 위해, 1차 전사체의 적절한 가공, 유전자 생성물의 글리코실화 및 인산화를 위한 세포내 소기관을 보유하는 진핵생물 숙주 세포가 사용될 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포로는 CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, NS1 및 T47D, NS0(내생적으로는 어떠한 번역글로불린 쇄도 생산하지 않는 쥐과 동물 골수종 세포주), CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0109] 재조합 단백질을 장기간 고효율로 생산하기 위해서는 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 항체를 안정하게 발현하는 세포주를 조작할 수 있다. 바이러스 복제 기점을 포함하는 발현 벡터를 사용하는 것이 아니라, 적절한 발현 전사 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결 서열, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선별 마커에 의해 조절되는 DNA로 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA의 도입 후, 조작된 세포를 농축 배지에서 1~2일 동안 증식시킬 수 있고, 그 후 선택 배지로 교환한다. 재조합 플라스미드 내의 선별 마커는 선별에 대해 내성을 부여하여, 세포가 플라스미드를 그 염색체 내로 안정하게 통합시키고 성장하여 포커스를 형성하게 하며, 이것은 클로닝하여 세포주로 증식시킬 수 있다. 이 방법은 항체를 발현하는 세포주를 조작하는 데 유익하게 이용될 수 있다. 이러한 조작된 세포주는 항체와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 조성물의 스크리닝 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

[0110] 단순 허피스 바이러스 티미딘 키나제[Wigler et al., 1977, Cell 11 :223], 글루타민 신세타제, 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제[Szybańska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202] 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제[Lowy et al., 1980, Cell 22:8-17] 유전자를 포함하나 이들에 한정되지 않는 다수의 선별 시스템을 각각 tk-, gs-, hgprt- 또는 aprt- 세포에 이용할 수 있다. 또한, 하기 유전자, 즉, 메토폭세이트에 대한 내성을 부여하는 *dhfr*[Wigler et al., 1980, PNAS 77:357; O'Hare et al., 1981, PNAS 78:1527]; 마이코페놀산에 대한 내성을 부여하는 *gpt*[Mulligan & Berg, 1981, FJNAS 78:2072]; 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 부여하는 *neo*[Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573; Mulligan, 1993, Science 260:926; 및 Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191; May, 1993, 775 TECH 11:155-]; 및 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 *hygro*[Santerre et al., 1984, Gene 30:147]에 대한 선별의 기초로서 대사길항물질 내성을 이용할 수 있다. 재조합 DNA 기술 분야에 널리 알려진 방법을 원하는 재조합 클론을 선별하는 데 통상적으로 적용할 수 있으며, 이러한 방법은, 예를 들어 문헌[Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)]; 문헌[Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual Stockton Press, NY (1990)]; 및 문헌[Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994)]; 문헌[Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1]에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 그 전체가 본원에 참조 인용된다.

[0111] 항체의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가시킬 수 있다(재검토를 위해서는, 문헌[Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)] 참조). 항체를 발현하는 벡터 시스템의 마커가 증폭 가능할 경우, 숙주 세포 배양액 중에 함유된 억제제 수준의 증가가 마커 유전자의 카피수를 증가시킨다. 증폭된 영역이 항체 유전자와 연관되어 있기 때문에, 항체의 생산 역시 증가된다[Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257].

[0112] 숙주 세포는 본 발명의 2종의 발현 벡터, 즉, 중쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 제1 벡터와 경쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터로 동시에 형질감염시킬 수 있다. 이 2개의 벡터는 중쇄 폴리펩티드와 경쇄 폴리펩티드가 동등하게 발현될 수 있게 하는 동일한 선별 마커를 포함할 수 있다. 또는, 중쇄 폴리펩티드와 경쇄 폴리펩티드를 둘 다 코딩하고 발현시킬 수 있는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 이 경우, 과잉의 독성 유리 중쇄를 피하기 위해 경쇄가 중쇄 앞에 배치되어야 한다[Proudfoot, 1986, Nature 322:52; 및 Kohler, 1980, PNAS 77:2197]. 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

[0113] 본 발명의 시스템인 조작 항체가 재조합 발현에 의해 제조되면, 이것을 번역글로불린 분자의 정제에 대해 당업계에서 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 특히 단백질 A에 관한 특정 항원에 대한 친화성 크로마토그래피 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해도, 또는 임의의 다른 표준 단백질 정제 기법에 의해 정제할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 그 단편은 정제를 용이하게 하기 위해 본원에 기재되어 있거나 당업계에 공지된 이중성 폴리펩티

드 서열에 융합시킬 수 있다.

[0114] **시스테인 조작 항체의 확장 가능한 제조**

[0115] 본 발명의 시스테인 조작 항체를 다량으로 얻기 위해, 이 항체를 확장 가능한 공정(이하, "본 발명의 확장 가능한 공정"이라고 함)로 제조할 수 있다. 일부 실시형태에서, 시스테인 조작 항체는, 단백질의 기능적 활성을 유지한 채로 분석용 규모의 바이오리액터(예를 들어, 5 L, 10 L, 15 L, 30 L 또는 50 L 바이오리액터를 포함하나 이들에 한정되지 않음)에서 본 발명의 단백질을 제조할 수 있도록 확장시킬 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 본 발명의 확장 가능한 방법에 의해 제조된 단백질은, HPSEC 또는 rCGE로 측정시, 단백질 중량을 기준으로 낮은 수준 내지 검출 불가능한 수준, 즉, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 또는 0.5% 이하의 응집도를 나타내고/나타내거나, 낮은 수준 내지 검출 불가능한 수준의 단편화, 즉, 피크(들)에서 전체 피크 면적의 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상, 또는 99.5% 이상을 나타내며, 이것은 온전한 시스테인 조작 항체에 해당하는 것이다.

[0116] 다른 실시형태에서, 상기 시스테인 조작 항체는 연구실에서 본 발명의 확장 가능한 방법으로 제조될 수 있으며, 이는 생산 규모 바이오리액터(예를 들어, 75 L, 100 L, 150 L, 300 L 또는 500 L를 포함하나 이들에 한정되지 않음)에서 본 발명의 단백질을 제조할 수 있도록 확장될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 확장 가능 공정은 연구실에서 수행되는 생산 공정과 비교할 때 거의 또는 전혀 생산 효율이 감소되지 않는다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 확장 가능 공정은 약 10 mg/L, 약 20 mg/L, 약 30 mg/L, 약 50 mg/L, 약 75 mg/L, 약 100 mg/L, 약 125 mg/L, 약 150 mg/L, 약 175 mg/L, 약 200 mg/L, 약 250 mg/L, 약 300 mg/L 또는 그 이상의 생산 효율로 시스테인 조작 항체를 생산한다.

[0117] 다른 실시형태에서, 본 발명의 확장 가능 공정은 적어도 약 10 mg/L, 적어도 약 20 mg/L, 적어도 약 30 mg/L, 적어도 약 50 mg/L, 적어도 약 75 mg/L, 적어도 약 100 mg/L, 적어도 약 125 mg/L, 적어도 약 150 mg/L, 적어도 약 175 mg/L, 적어도 약 200 mg/L, 적어도 약 250 mg/L, 적어도 약 300 mg/L 또는 그보다 높은 생산 효율로 시스테인 조작 항체를 생산한다.

[0118] 다른 실시형태에서, 본 발명의 확장 가능 공정은 약 10 mg/L~약 300 mg/L, 약 10 mg/L~약 250 mg/L, 약 10 mg/L~약 200 mg/L, 약 10 mg/L~약 175 mg/L, 약 10 mg/L~약 150 mg/L, 약 10 mg/L~약 100 mg/L, 약 20 mg/L~약 300 mg/L, 약 20 mg/L~약 250 mg/L, 약 20 mg/L~약 200 mg/L, 약 20 mg/L~약 175 mg/L, 약 20 mg/L~약 150 mg/L, 약 20 mg/L~약 125 mg/L, 약 20 mg/L~약 100 mg/L, 약 30 mg/L~약 300 mg/L, 약 30 mg/L~약 250 mg/L, 약 30 mg/L~약 200 mg/L, 약 30 mg/L~약 175 mg/L, 약 30 mg/L~약 150 mg/L, 약 30 mg/L~약 125 mg/L, 약 30 mg/L~약 100 mg/L, 약 50 mg/L~약 300 mg/L, 약 50 mg/L~약 250 mg/L, 약 50 mg/L~약 200 mg/L, 약 50 mg/L~약 175 mg/L, 약 50 mg/L~약 150 mg/L, 약 50 mg/L~약 125 mg/L, 약 50 mg/L~약 100 mg/L의 생산 효율로 시스테인 조작 항체를 생산한다.

[0119] 본 발명 항체의 안정성을 확보하기 위해, 적절한 분석법을 개발하였다. 일 실시형태에서, 본 발명 단백질의 안정성은 당업계에 공지된 기법으로 분석한다. 다른 실시형태에서, 본 발명 단백질의 안정성은 응집화 및/또는 단편화 속도 또는 프로파일로 평가할 수 있다. 응집화 또는 단편화 정도를 측정하기 위해, 다수의 기법이 이용될 수 있다. 일 실시형태에서, 응집화 및/또는 단편화 프로파일은 분석용 원심분리(AUC), 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 고성능 크기 배제 크로마토그래피(HPSEC), 용융 온도(T_m), 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE), 모세관 겔 전기영동(CGE), 광산란(SLS), 푸리에 변환 적외선 분광분석(FTIR), 원편광 이색성 분광분석(CD), 우레아 유도 단백질 언폴딩 기법, 고유 트립토판 형광, 시차 주사 열량분석, 또는 1-아닐리노-8-나프탈렌설폰산(ANS) 단백질 결합 기법을 이용하여 평가할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명 단백질의 안정성은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE) 분석에 의해 평가할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명 단백질의 안정성은 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 프로파일 분석으로 평가한다.

[0120] **항체 접합체**

[0121] 본 발명은 표적화 부분으로서 융합 단백질(이하, "항체 접합체"라 함)을 생성하기 위해 이중성 체제에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합된(공유 접합과 비공유 접합을 둘 다 포함함) 시스테인 조작 항체를 사용하는 것을 포함한다. 상기 이중성 체제는 폴리펩티드(또는 그 일부분, 바람직하게는 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상, 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개 이상 또는 100개 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드), 핵산, 소분자(1000 달톤 미만), 또는 무기 또는 유기 화합물일 수 있다. 융합은 반드시 직접적이어야 하는 것은 아니나, 링커 서열을 통해 이루어질 수 있다. 이중성 체제에 융합 또는 접합된 항체는 당업

계에 공지된 방법을 이용하여 질환의 진행을 검출, 치료, 관리 또는 모니터링하기 위해 생체내에서 이용될 수 있다. 예를 들어, 국제 공개 공보 WO 93/21232; EP 439,095; 문헌[Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99]; 미국 특허 제5,474,981호; 문헌[Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432]; 및 문헌[Fell et al., 1991, J. Immunol 146:2446-2452]을 참조할 수 있으며, 이들 문헌은 본원에 그 전체가 참조 인용된다. 일부 실시형태에서, 검출, 치료, 관리 또는 모니터링하고자 하는 질환은 자가면역 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 또는 암 관련 질환이다. 항체 부분에 폴리펩티드를 융합 또는 접합시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,336,603호, 제5,622,929호, 제5,359,046호, 제5,349,053호, 제5,447,851호 및 제5,112,946호; EP 307,434; EP 367,166; 국제 공개 공보 WO 96/04388 및 WO 91/06570; 문헌[Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88:10535-10539]; 문헌[Zheng et al., 1995, J Immunol 154:5590-5600]; 및 문헌[Vil et al., 1992, PNAS 89:11337-11341](이들 문헌은 본원에 그 전체가 참조 인용됨)을 참조할 수 있다.

[0122] 유전자 서플링, 모티프 서플링, 엑손 서플링 및/또는 코돈 서플링(총칭하여 "DNA 서플링"이라 함) 기법을 통해 추가적인 융합 단백질을 생성할 수 있다. DNA 서플링은 본 발명의 시스템인 조작 항체의 활성을 변경하기 위해 (예를 들어, 높은 친화력과 낮은 용해 속도를 갖는 항체) 이용될 수 있다. 일반적으로 미국 특허 제5,605,793호; 제5,811,238호; 제5,830,721호; 제5,834,252호; 및 제5,837,458호 및 문헌[Patten et al., 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33]; 문헌[Harayama, 1998, Trends Biotechnol 16:76]; 문헌[Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol 287:265]; 및 문헌[Lorenzo and Blasco, 1998, BioTechniques 24:308](상기 특허 문헌 및 간행물은 각각 본원에 그 전체가 참조 인용됨)을 참조할 수 있다. 항체 또는 그 단편, 또는 코딩된 항체 또는 그 단편은, 재조합 전에 오류 빈발 PCR, 무작위 뉴클레오타이드 삽입 또는 다른 방법에 의한 무작위 돌연변이 유발을 실시함으로써 변경할 수 있다. 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 하나 이상을 부분을 하나 이상의 이중성 제제의 하나 이상의 성분, 모티프, 섹션, 파트, 도메인, 단편 등과 재조합할 수 있다.

[0123] 일 실시형태에서, 정제를 용이하게 하기 위해, 본 발명의 시스템인 조작 항체 또는 그 단편 또는 변이체를 펩티드와 같은 마커 서열에 접합시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 마커 아미노산 서열은 헥사-히스티딘 펩티드, 예컨대 상업적으로 입수할 수 있는 것들 중에서도 특히 pQE 벡터(QIAGEN, Inc., 미국 91311 캘리포니아주 챗스워스 에톤 애비뉴 9259 소재)에 제공된 태그이다. 문헌[Gentz et al., 1989, PNAS 86:821]에 기재된 바와 같이, 예를 들어, 헥사히스티딘은 융합 단백질의 편리하게 정제할 수 있게 한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그로는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 해당하는 헤마글루티닌 "HA" 태그[Wilson et al., 1984, Cell 37:767] 및 "플래그" 태그를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0124] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 진단 제제 및 검출 가능한 제제에 접합된다. 이러한 항체는 특정 치료의 효능을 측정하는 것과 같은 임상 시험 절차의 일부로서 질환(암을 포함하나, 이에 한정되지 않음)의 발병 또는 진행을 모니터링하거나 예후를 판단하는 데 유용할 수 있다.

[0125] 이러한 진단 및 검출은 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 효소; 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴을 포함하나 이들에 한정되지 않는 보결 분자단; 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 또는 파이크에리트린을 포함하나 이들에 한정되지 않는 형광 물질; 루시페라제, 루시페린 및 아쿠오린을 포함하나 이들에 한정되지 않는 생물 발광 물질을 포함하나 이에 한정되지 않는 발광 물질; 비스무트(^{213}Bi), 탄소(^{14}C), 크롬(^{51}Cr), 코발트(^{57}Co), 불소(^{18}F), 가돌리늄(^{153}Gd , ^{159}Gd), 갈륨(^{68}Ga , ^{67}Ga), 게르마늄(^{68}Ge), 홀름(^{166}Ho), 인듐(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), 요오드(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 란탄(^{140}La), 루테튬(^{177}Lu), 망간(^{54}Mn), 몰리브덴(^{99}Mo), 팔라듐(^{103}Pd), 인(^{32}P), 프라세오디뮴(^{142}Pr), 프로메튬(^{149}Pm), 레늄(^{186}Re , ^{188}Re), 로듐(^{105}Rh), 루테튬(^{97}Ru), 사마륨(^{153}Sm), 스칸듐(^{47}Sc), 셀레늄(^{75}Se), 스트론튬(^{85}Sr), 황(^{35}S), 테크네튬(^{99}Tc), 티타늄(^{201}Ti), 주석(^{113}Sn , ^{117}Sn), 트리튬(^3H), 크세논(^{133}Xe), 이터븀(^{169}Yb , ^{175}Yb), 이트륨(^{90}Y), 아연(^{65}Zn)을 포함하나 이들에 한정되지 않는 방사성 물질; 다양한 양전자 방출 단층 촬영을 이용한 양전자 방출 금속 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함하나 이들에 한정되지 않는 검출 가능한 물질에 항체를 커플링함으로써 수행할 수 있다.

[0126] 다른 실시형태에서, 본 발명의 시스템인 조작 항체는 세포 독소, 예를 들어 세포 증식 억제제 또는 살세포제와 같은 치료제, 치료제 또는 방사성 금속, 예를 들어 알파 에미터에 접합시킨다. 세포 독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 임의의 물질을 포함한다. 그 예로는 파클리탁셀, 사이토칼라신 B, 그램미시딘 D, 에티뮴 브로마이드

드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미토크산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코티코이드, 프로케인, 테트라케인, 리도케인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 에피루비신 및 사이클로포스파미드 및 이들의 유사체 또는 동족체를 들 수 있다. 치료제로는 대사 길항 물질(예를 들어, 메토타렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로르에타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카무스틴(BCNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스디클로로디아민 백금(II)(DDP)(시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전 명칭: 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 닥티토마이신(이전 명칭: 액티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)), 및 항유사분열제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

[0127] 일 실시형태에서, 세포독성제는 에네디인, 렉시트롭신, 듀오카마이신, 탁산, 퓨로마이신, 돌라스타틴, 메이탄시노이드 및 빈카 알칼로이드로 구성된 군에서 선택된다. 다른 실시형태에서, 세포독성제는 파클리탁셀, 도세탁셀, CC-1065, SN-38, 토포테칸, 모르폴리노-독소루비신, 리족신, 사이노모르폴리노-독소루비신, 돌라스타틴-10, 에키노마이신, 콤브레타스타틴, 칼리키아미신, 메이탄신, DM-1, 아우리스타틴 또는 다른 돌라스타틴 유사체, 예컨대 아우리스타틴 E 또는 아우리스타틴 F, AEB, AEVB, AEF, MMAE(모노메틸아우리스타틴 E), MMAF(모노메틸아우리스타틴 F), 엘레우테로빈 또는 네트로프신이다. 당업계에 돌라스타틴-10으로도 알려져 있는 아우리스타틴 E의 합성 및 구조와 그 유도체는 미국 특허 출원 공개 공보 제2003/0083263 A1호 및 제2005/0009751 A1호; 국제 특허 출원 번호 PCT/US02/13435, 미국 특허 제6,323,315호; 제6,239,104호; 제6,034,065호; 제5,780,588호; 제5,665,860호; 제5,663,149호; 제5,635,483호; 제5,599,902호; 제5,554,725호; 제5,530,097호; 제5,521,284호; 제5,504,191호; 제5,410,024호; 제5,138,036호; 제5,076,973호; 제4,986,988호; 제4,978,744호; 제4,879,278호; 제4,816,444호; 및 제4,486,414호에 기재되어 있으며, 모든 문헌은 그 전체가 본원에 참조 인용된다.

[0128] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 접합체의 세포독성제는 항류블린제이다. 항류블린제는 잘 확립된 암 치료 화합물류이다. 항류블린제의 예로는 탁산(예를 들어, Taxol®

(파클리탁셀), 도세탁셀), T67(톨라릭), 빈카 및 아우리스타틴(예를 들어, 아우리스타틴 E, AEB, AEVB, MMAE, MMAF, AEF)을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 이 부류에 포함된 항류블린제로는 또한 빈크리스틴 및 빈블라스틴, 빈데신 및 비노렐빈을 비롯한 빈카 알칼로이드; 탁산, 예컨대 파클리탁셀 및 도세탁셀 및 바카틴 유도체, 에피틸론 A 및 B, 노코다졸, 5-플루오로우라실 및 콜키미드, 에스트라무스틴, 크립토피신, 세마도틴, 메이탄시노이드, 콤브레타스타틴, 돌라스타틴, 디스코더모라이드 및 엘레우테로빈이 있다. 더 구체적인 실시형태에서, 상기 세포독성제는 빈카 알칼로이드, 포도필로톡신, 탁산, 바카틴 유도체, 크립토피신, 메이탄시노이드, 콤브레타스타틴 및 돌라스타틴으로 구성된 군에서 선택된다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 세포독성제는 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 비노렐빈, VP-16, 캄프토테신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 에피틸론 A, 에피틸론 B, 노코다졸, 콜히친, 콜시미드, 에스트라무스틴, 세마도틴, 디스코더모라이드, 메이탄신, DM-1, 아우리스타틴 또는 다른 돌라스타틴 유도체, 예컨대 아우리스타틴 E 또는 아우리스타틴 F, AEB, AEVB, AEF, MMAE(모노메틸아우리스타틴 E), MMAF(모노메틸아우리스타틴 F), 엘레우테로빈 또는 네트로프신이다.

[0129] 구체적인 실시형태에서, 상기 약물은 항류블린제 그룹인 메이탄시노이드이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 약물은 메이탄신이다. 또한, 특정 실시형태에서, 상기 세포독성제 또는 세포 증식 억제제는 DM-1(ImmunoGen, Inc.; 문헌[Chan et al. 1992, Cancer Res 52:127-131]도 참조)이다. 천연 제품인 메이탄신은 튜블린 중합을 억제하여 유사분열 차단 및 세포사를 초래한다. 따라서, 메이탄신의 작용 메커니즘은 빈크리스틴 및 빈블라스틴의 작용 메커니즘과 유사하다. 그러나 메이탄신은 시험관내에서 이러한 빈카 알칼로이드보다 약 200배~1,000배 더 세포 독성이 크다. 또 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 약물은 AEF이다.

[0130] 일부 실시형태에서, 상기 항체는 아브린, 브루신, 시큐톡신, 디프테리아 독소, 바트라코톡신, 보툴리눔 독소, 시가 독소, 내독소, 과산화물 독소, 백일해 독소, 탄저병 독소, 콜레라 독소, 팔카리놀, 푸모니신 B1, 푸모니신 B2, 아플라톡신, 마우로톡신, 아지톡신, 카립도톡신, 마가톡신, 슬로톡신, 스킨라톡신, 헤푸톡신, 칼시셉틴, 타리카톡신, 칼시클루딘, 겔다나마이신, 겔로닌, 로타우스트랄린, 오크라톡신 A, 파툴린, 리신, 스트리크닌, 트리코테센, 제아를레논 및 테트라도톡신을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다른 소분자 또는 단백질 독소에 접합될 수 있다.

[0131] 독소, 스페이서, 링커, 스트레처 등의 추가적인 예와 그 구조는 미국 특허 출원 공개 공보 제2006/0074008

A1호, 제2005/0238649 A1호, 제2005/0123536 A1호, 제2005/0180972 A1호, 제2005/0113308 A1호, 제2004/0157782 A1호, 미국 특허 제6,884,869 B2호, 미국 특허 제5,635,483호에서 찾아볼 수 있으며, 상기 특허 문헌들은 그 전체가 본원에 참조 인용된다.

[0132] 본원에서 설명하는 바와 같이, 본 발명의 항체 접합체에 접합하는 데 사용되는 화합물은 독소루비신, 파클리탁셀, 카보플라틴, 멜팔란, 빈카 알칼로이드, 메토크세이트, 미토마이신 C, 에토포사이드 등과 같은 종래의 화학 치료제를 포함할 수 있다. 또한, CC-1065 유사체, 칼리키아마이신, 메이탄신, 돌라스타틴 10의 유사체, 리족신 및 팔리톡신과 같은 강력한 제제도 조건부로 안정한 링커를 사용하여 항체에 연결하여 강력한 면역 접합체를 형성할 수 있다.

[0133] 특정 실시형태에서, 상기 세포독성제 또는 세포 증식 억제제는 돌라스타틴이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 돌라스타틴은 아우리스타틴류이다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 상기 세포독성제 또는 세포 증식 억제제는 MMAE이다. 본 발명의 또 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 세포독성제 또는 세포 증식 억제제는 AEFP이다. 본 발명의 또 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 세포독성제 또는 세포 증식 억제제는 MMAF이다.

[0134] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체를 특정 생물학적 반응을 변경하는 치료제 또는 약물 부분에 접합시킨다. 치료제 또는 약물 부분은 전통적인 화학적 치료제에 한정되는 것으로 간주되어서는 안 된다. 예를 들어, 약물 부분은 원하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 콜레라 독소 또는 디프테리아 독소와 같은 독소; 종양 괴사 인자, α -인터페론, β -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화 인자, 아포토시스 유발제, 예를 들어, TNF- α , TNF- β , AIM I(국제 공개 공보 WO 97/33899 참조), AIM II(국제 공개 공보 WO 97/34911 참조), Fas 리간드[Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6:1567] 및 VEGf(국제 공개 공보 WO 99/23105 참조), 혈전제 또는 항혈관신생제, 예를 들어, 안지오테라틴 또는 엔도스타틴과 같은 단백질; 또는 생물학적 반응 조절제, 예를 들어, 림포카인(예를 들어, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨("IL-2"), 인터루킨-4("IL-4"), 인터루킨-6("IL-6"), 인터루킨-7("IL-7"), 인터루킨-9("IL-9"), 인터루킨-15("IL-15"), 인터루킨-12("IL-12"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF") 및 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF")), 또는 성장 인자(예를 들어, 성장 호르몬("GH"))를 포함할 수 있다.

[0135] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체를 폴리아르기닌 또는 폴리라이신 잔기를 포함하는 폴리펩티드에 접합시킨다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩티드는 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리아르기닌 폴리펩티드는 적어도 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 그 이상의 아르기닌 잔기를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 폴리라이신 폴리펩티드는 적어도 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 그 이상의 라이신 잔기를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 폴리펩티드는 아르기닌 잔기와 라이신 잔기의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0136] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체를 방사성 금속 이온을 접합시키는 데 유용한 방사성 물질 또는 거대한 킬레이터와 같은 치료제에 접합시킨다(방사성 물질의 예에 대해서는 상기 참조). 특정 실시형태에서, 상기 거대한 킬레이터는 링커 분자를 통해 항체에 부착될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)이다. 본원에서 이하에 추가로 설명하는 이러한 링커 분자는 당업계에 널리 알려져 있고, 문헌[Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90]; 문헌[Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553]; 및 문헌[Zimmerman et al., 1999, Nud. Med. Biol. 26:943-50]에 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 각각 그 전체가 본원에 참조 인용된다.

[0137] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체를 핵산에 접합시킨다. 상기 핵산은 DNA, RNA, 단쇄 간섭 RNA(siRNA), 마이크로RNA, 헤어핀 또는 핵산 모방체, 예컨대 펩티드 핵산으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 접합된 핵산은 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 100개, 적어도 200개, 적어도 500개, 적어도 1000개, 적어도 5000개 또는 그 이상의 염기쌍이다. 일부 실시형태에서, 상기 접합된 핵산은 단일 가닥이다. 다른 실시형태에서, 상기 접합된 핵산은 이중 가닥이다.

[0138] 일부 실시형태에서, 상기 접합된 핵산은 오픈 리딩 프레임에 코딩한다. 일부 실시형태에서, 상기 접합된 핵산에 의해 코딩되는 오픈 리딩 프레임은 아포토시스 유발 단백질, 바이러스 단백질, 효소 또는 종양 저해제 단백질에 해당한다. 이러한 핵산을 세포에 전달하는 기법은 문헌[Song et al., Nature Biotechnology, 2005, Vol 23:6, p.709-717] 및 미국 특허 제6,333,396호로부터 참조할 수 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 참조 인용된다.

- [0139] 치료성 부분을 항체에 접합시키는 기법은 잘 알려져 있다. 치료성 부분은 알데하이드/쉬프 결합, 설프하이드릴 결합, 산 불안정 결합, 시스-아코니틸 결합, 하이드라존 결합, 효소에 의해 분해될 수 있는 결합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 항체에 접합시킬 수 있다(일반적으로 문헌[Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216] 참조). 치료성 부분을 항체에 접합시키는 또 다른 기법도 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[Anion et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. IS)ISS]; 문헌[Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; 문헌[Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review." in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)]; 문헌["Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibodies In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)] 및 문헌[Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58]을 참조할 수 있다. 폴리펩티드 부분에 항체를 융합 또는 접합시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,336,603호, 제5,622,929호, 제5,359,046호, 제5,349,053호, 제5,447,851호 및 제5,132,946호; EP 307,434; EP 367,166; 국제 공개 공보 WO 96/04388 및 WO 91/06570; 문헌[Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88: 10535-10539]; 문헌[Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600]; 및 문헌[Vil et al., 1992, PNAS 89:11337-11341]을 참조할 수 있다. 치료성 부분의 항체의 융합이 반드시 직접적일 필요는 없으며, 링커 서열을 통해 이루어질 수 있다. 이러한 링커 분자는 당업계에 널리 알려져 있고, 문헌[Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90]; 문헌[Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553]; 문헌[Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol 26:943-50]; 문헌[Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216]에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 각각 그 전체가 본원에 참조 인용된다.
- [0140] 본 발명의 항체 접합체가 표적으로 하는 세포 외부에서의 약물 활성을 최소화하기 위해 2 가지의 접근법이 이용될 수 있는데, 그 첫번째 방법은 세포막 수용체에는 결합하나 가용성 수용체에는 결합하지 않는 항체를 이용하는 방법으로서, 이로써 프로드럭 전환 효소의 작용에 의해 생성된 약물을 비롯한 약물이 활성화된 림프구의 세포 표면에 농축된다. 본 발명의 항체에 결합된 약물의 활성을 최소화하기 위한 또 다른 접근법은 가수분해되거나 항체가 절단되지 않는다면 그 활성을 감소시키는 방식으로 약물을 접합시키는 방법이다. 이 방법은 활성화된 림프구의 세포 표면의 환경(예를 들어, 활성화된 림프구의 세포 표면에 존재하는 프로테아제의 활성) 또는 활성화된 림프구에 의해 흡수될 때 접합체가 접하는 활성화된 림프구 내부의 환경(예를 들어, 엔도솜 내에서, 예를 들어 리소솜 환경 내에서 pH 민감성 또는 프로테아제 민감성에 의해)에 민감한 링커를 사용하여 약물을 항체에 부착시키는 방식을 이용한다. 본 발명에 이용될 수 있는 링커의 예는 미국 특허 출원 공개 제2005/0123536 A1호, 제2005/0180972 A1호, 제2005/0113308 A1호, 제2004/0157782 A1호 및 미국 특허 제6,884,869 B2호에 개시되어 있으며, 이들 문헌은 모두 그 전체가 본원에 참조 인용된다.
- [0141] 일 실시형태에서, 상기 링커는 리소솜에서 가수분해되는 산 불안정 하이드라존 또는 하이드라지드 기이다(예를 들어, 미국 특허 제5,622,929호 참조). 다른 실시형태에서, 약물은 시스-아코니틱 아마이드, 오르토에스테르, 아세탈 및 케탈과 같은 다른 산 불안정 링커를 통해 항체에 부착될 수 있다[Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661]. 이러한 링커는 혈액의 pH와 같은 중성 pH 조건에서 비교적 안정하지만, 리소솜의 pH 부근인 pH 5 이하에서는 불안정하다.
- [0142] 다른 실시형태에서, 약물을 세포내 프로테아제에 의해 절단되는 펩티드 스페이서를 사용하여 본 발명의 항체에 부착시킨다. 표적 효소로는 카텡신 B 및 D 및 플라스민을 포함하며, 이들 모두는 디펩티드 약물 유도체를 가수분해하여 표적 세포 내부로 활성 약물을 방출시키는 것으로 알려져 있다[Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123]. 세포내 단백질 분해 약물 방출을 이용하는 것의 장점은 접합될 경우 약물이 매우 약독화되어 접합체의 혈청 안정성이 극도로 높아질 수 있다는 것이다.
- [0143] 또 다른 실시형태에서, 상기 링커는 말로네이트 링커[Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93], 말레이미도벤조일 링커[Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304] 또는 3'-N-아미드 유사체[Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12]이다.
- [0144] 상기에 기재한 바와 같이, 항체 접합체는 일반적으로 링커를 통해 화합물 또는 약물을 항체에 접합시킴으로써 제조된다. 당업계에 공지되어 있는 임의의 링커, 예를 들어 이중 기능성 제제(예컨대 디알데하이드 또는 이미도

에스테르) 또는 분지형 하이드라존 링커(예를 들어, 본원에서 그 전체가 참조 인용되는 미국 특허 제5,824,805호 참조)가 본 발명의 접합체에 사용될 수 있다.

- [0145] 본 발명의 비한정적인 특정 실시형태에서, 접합체 부분과 항체 부분 사이의 링커 영역은 특정 조건 하에 절단될 수 있으며, 이때 링커의 절단 또는 가수분해는 항체 부분으로부터 약물 부분을 유리시킨다. 일부 실시형태에서, 상기 링커는 세포내 조건 하에서의 절단 또는 가수분해에 대해 민감성이다.
- [0146] 일 실시형태에서, 접합체 부분과 항체 부분 사이의 링커 영역은 pH가 특정 값만큼 변화하거나 특정 값을 초과할 경우 절단될 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 상기 링커는 리소솜의 환경에서, 예를 들어, 산성 조건(즉, pH 약 5~5.5 또는 그 미만)에서 절단될 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 링커는 리소솜 프로테아제 효소, 막 결합형 프로테아제, 세포내 프로테아제 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하나 이들에 한정되지 않는 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티드 링커이다. 일반적으로, 링커는 2개 이상의 아미노산 길이며, 더 일반적으로 3개 이상의 아미노산 길이다. 예를 들어, 암 조직에서 고도로 발현되는 티올 의존성 프로테아제인 카텝신-B에 의해 절단될 수 있는 펩티드 링커(예를 들어, Gly-Phe-Leu-Gly 링커)가 사용될 수 있다. 그 밖의 링커는, 예를 들어 본원에서 그 전체가 참조 인용되는 미국 특허 제6,214,345호에 기재되어 있다.
- [0147] 본 발명의 서로 배타적이지 않은 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 접합체의 항체와 화합물을 접합시키는 데 사용되는 링커는 세포내 내재화를 촉진한다. 특정 실시형태에서, 링커-약물 부분은 세포내 내재화를 촉진한다. 특정 실시형태에서, 링커는 전체 항체 접합체의 구조가 세포내 내재화를 촉진하도록 선택된다. 일 실시형태에서, 링커는 티오에테르 링커이다(예를 들어, 본원에서 그 전체가 참조 인용되는 미국 특허 제5,622,929호(Willner et al.) 참조). 또 다른 실시형태에서, 링커는 하이드라존 링커이다(예를 들어, 본원에서 그 전체가 참조 인용되는 미국 특허 제5,122,368호(Greenfield et al.) 및 제5,824,805호(King et al.) 참조).
- [0148] 또 다른 실시형태에서, 링커는 디설파이드 링커이다. SATA(N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트), SPDP(N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트), SPDB(N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)부티레이트) 및 SMPT(N-숙신이미딜-옥시카보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)톨루엔)을 사용하여 형성할 수 있는 것을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 디설파이드 링커가 당업계에 공지되어 있다. SPDB 및 SMPT(예를 들어, 문헌[Thorpe et al., 1987, Cancer Res., 47:5924-5931]; 문헌[Wawrzynczak et al., 1987, In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer, ed. C. W. Vogel, Oxford U. Press, pp. 28-55] 참조; 또한, 미국 특허 제4,880,935호(Thorpe et al.) 참조, 이들은 본원에서 그 전체가 참조 인용됨).
- [0149] 본 발명의 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있는 다양한 링커가 미국 특허 미국 특허 출원 공개 공보 US 2004/0018194 A1에 기재되어 있으며, 이 특허 문헌은 본원에서 그 전체가 참조 인용된다.
- [0150] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 항체 접합체의 링커 단위는 세포독성제 또는 세포 증식 억제제(약물 단위: -D)와 항체 단위(-A)를 연결한다. 특정 실시형태에서, 상기 링커 단위는 일반식:
- [0151] i. -Ta-Ww-Yy-의 구조를 가지며, 여기서
- [0152] ii. -T-는 스트레처 단위이고;
- [0153] iii. a는 0 또는 1이고;
- [0154] iv. 각각의 -W-는 독립적으로 아미노산 단위이고;
- [0155] v. w는 독립적으로 2~12의 정수이고;
- [0156] vi. -Y-는 스페이서 단위이고;
- [0157] vii. y는 0, 1 또는 2이다.
- [0158] 스트레처 단위(-T-)는, 존재할 경우, 항체 단위를 아미노산 단위(-W-)에 연결한다. 자연적으로 또는 화학적 조작에 의해 항체 상에 존재할 수 있는 유용한 작용기로는 설프하이드릴, 아미노, 하이드록실, 탄수화물의 아노머 하이드록실기 및 카복실을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 시스템인 조작 항체는 접합을 위해 1개 이상의 유리 설프하이드릴기를 제시한다. 유리 설프하이드릴기를 도입하는 다른 방법은 항체의 분자내 디설파이드 결합을 환원시키는 것을 포함한다. 대안으로, 설프하이드릴기는 항체의 라이신 부분의 아미노기와 2-이미노티올란[트라우트(Traut) 반응제] 또는 다른 설프하이드릴 생성 반응제와의 반응에 의해 생성될 수 있다.
- [0159] 스페이서 단위(-Y-)가 존재할 경우, 상기 아미노산 단위(-W-)는 스트레처 단위(-T-)를 스페이서 단위(-Y-)에 연

결하고, 스페이스 단위가 부재일 경우, 상기 스트레처 단위를 세포독성제 또는 세포 증식 억제제(약물 단위; D)를 연결한다.

[0160] 일부 실시형태에서, -Ww-는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 펜타펩티드, 헥사펩티드, 헵타펩티드, 옥타펩티드, 노나펩티드, 데카펩티드, 운데카펩티드 또는 도데카펩티드 단위이다. 상기 링커 단위의 아미노산 단위는 유리될 때 생체내에서 양성자화되어 세포 독성 약물(D)을 제공하는 약물 단위(-D)를 유리시키는 중양 관련 프로테아제를 포함하나 이들에 한정되지 않는 효소에 의해 효소적으로 절단될 수 있다.

[0161] 일 실시형태에서, 상기 아미노산 단위는 페닐알라닌-라이신 디펩티드(phe-lys 또는 FK 링커)이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 아미노산 단위는 발린-시트룰린 디펩티드(val-cit 또는 VC 링커)이다.

[0162] 상기 스페이스 단위(-Y-)는, 존재할 경우, 아미노산 단위를 상기 약물 단위에 연결한다. 스페이스 단위는 2 가지의 일반 유형, 즉 자가 희생성 및 비자가 희생성이 있다. 비자가 희생성 스페이스 단위는 스페이스 단위의 일부 또는 전부가 항체-링커-약물 접합체 또는 약물-링커 화합물로부터 아미노산 단위가 효소적으로 절단된 후 약물 단위에 결합된 상태로 남는 것이다. 비자가 희생성 스페이스 단위의 예로는 (글리신-글리신) 스페이스 단위 및 글리신 스페이스 단위를 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 글리신-글리신 스페이스 단위 또는 글리신 스페이스 단위를 포함하는 본 발명의 항체-링커-약물 접합체가 종양 세포 관련 프로테아제, 암 세포 관련 프로테아제 또는 림프구 관련 프로테아제를 통해 효소적 절단을 겪게 될 경우, 글리신-글리신-약물 부분 또는 글리신-약물 부분이 A-T-Ww-로부터 절단된다. 약물을 유리시키기 위해, 독립적 가수분해 반응이 표적 세포 내에서 일어나서 글리신-약물 단위 결합이 절단되어야 한다.

[0163] 자가 희생성 스페이스의 다른 예로는 PAB 기, 예컨대 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체(예를 들어, 문헌[Hay et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, 9, 2237] 참조) 및 오르토 또는 파라-아미노벤질아세탈과 전자적으로 동등한 방향족 화합물을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 아마이드 결합이 가수분해될 때 용이한 환형화를 겪게 되는 스페이스, 예컨대 치환 및 비치환 4-아미노부티르산 아마이드[Rodrigues et al., Chemistry, Biology, 1995, 2, 223], 적절히 치환된 고리계[Storm et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815] 및 2-아미노페닐 프로피온산 아마이드[Amsberry et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867]가 사용될 수 있다. 글리신의 α-위치에서 치환되는 아민 함유 약물의 제거[Kingsbury et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447]도 또한 본 발명의 항체-링커-약물 접합체에 적용될 수 있는 자가 희생성 스페이스 수단의 예이다.

[0164] **항체에 이중성 분자를 접합시키는 방법**

[0165] 본원에 기재된 것과 같은 이중성 분자를, 조작된 시스템인 잔기가 제공하는 유리 티올기를 통해 본 발명의 항체에 효율적으로 접합시킬 수 있다. 일 양태에서, 본 발명은 이중성 분자를 시스템인 조작 항체에 효율적으로 접합시키는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 이중성 분자의 접합은 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 하나 이상의 조작된 시스템인 잔기에 의해 제공되는 유리 티올기에서 발생할 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법은 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상 또는 8개 이상의 조작된 시스템인 잔기에 의해 제공되는 유리 티올기에서 이중성 분자를 효율적으로 접합시키는 것을 포함한다.

[0166] 천연 시스템인 잔기를 항체로 도입하는 조작은, 디설파이드 결합의 일부였던 천연 시스템인 잔기가 유리되어 접합이 가능한 유리 티올기를 제시하도록 중쇄와 경쇄의 디설파이드 쌍을 변경할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 이 방법은 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 위치로부터 선택되는 1개 이상의 조작된 시스템인 잔기에 의해 제공되지 않는 유리 티올기에서 시스템인 조작 항체에 이중성 분자를 효율적으로 접합시키는 것을 포함한다.

[0167] 항체 내 유리 티올기의 존재는 실시예 1에 기재된 것과 같은 당업계에서 인정되는 다양한 기법에 의해 측정할 수 있다. 항체의 이중성 분자의 접합의 효율은 접합 반응 후에 남아있는 유리 티올의 존재를 평가함으로써 측정할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명은 시스템인 조작 항체에 이중성 분자를 효율적으로 접합시키는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 접합 반응 후에 남아있는 유리 티올기 수준으로 측정할 때 접합 효율은 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 그 이상이다.

[0168] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 2개 이상의 유리 티올기가 형성되도록 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는

항체에 이중성 분자를 접합시키는 방법을 제공한다. 또 다른 실시형태에서, 이 방법은 적어도 2개, 적어도 4개, 적어도 6개, 적어도 8개, 적어도 10개, 적어도 12개, 적어도 14개, 적어도 16개 또는 그 이상의 유리 티올기가 형성되도록 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 항체를 포함한다.

[0169] 접합이 가능한 본 발명의 항체는 차단 또는 캡핑된 설프하이드릴기를 포함하는 유리 시스테인 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 캡으로는 단백질, 펩티드, 이온, 및 설프하이드릴기와 상호작용하여 접합체 형성을 방지 또는 억제하는 다른 물질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 접합 반응 전에 탈캡핑을 요할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 본 발명의 항체에 대해 탈캡핑이 이루어져 접합이 가능한 유리 설프하이드릴기가 디스플레이된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 본 발명의 항체에 대해 자연 발생 디설파이드 결합을 파괴 또는 재배열하지 않는 탈캡핑 반응을 수행한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체에 대해 실시예 9 또는 10에 제시된 것과 같은 탈캡핑 반응을 수행한다.

[0170] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체에 대해, 접합하고자 하는 항체가 적어도 1 mg/ml, 적어도 2 mg/ml, 적어도 3 mg/ml, 적어도 4 mg/ml, 적어도 5 mg/ml 또는 그 이상의 농도로 존재하는 접합 반응을 수행할 수 있다.

[0171] 항체 접합체를 사용하는 방법

[0172] 본 발명의 항체 접합체는, 예를 들어 종양 항원의 과발현을 특징으로 하는 각종 질병 또는 질환을 치료하는 데 사용될 수 있는 것으로 생각된다. 예시적인 병증 또는 과증식성 질환으로는 양성 또는 악성 종양, 백혈병 및 림프구 악성 종양을 포함한다. 다른 예로는 뉴런, 신경교 세포, 성상 세포, 시상하부, 선세포, 대식세포, 표피세포, 내피세포 및 기질 악성 종양을 들 수 있다. 다른 암 또는 과증식성 질환으로는 두부암, 경부암, 안암, 구강암, 후두암, 식도암, 흉부암, 피부암, 골암, 폐암, 결장암, 직장암, 대장암, 위암, 비장암, 신장암, 골격근암, 피하조직암, 전이성 흑색종, 자궁내막암, 전립선암, 유방암, 난소암, 고환암, 갑상선암, 혈액암, 림프절암, 신장암, 간암, 췌장암, 뇌암 또는 중추신경계암을 들 수 있다. 본 발명의 방법에 따라 예방, 관리, 치료 또는 개선할 수 있는 암의 예로는 두부암, 경부암, 안암, 구강암, 후두암, 식도암, 흉부암, 골암, 폐암, 결장암, 직장암, 위암, 전립선암, 유방암, 난소암, 신장암, 간암, 췌장암 및 뇌암을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 추가적인 암으로는 이하의 것들을 포함하나 이들에 한정되지 않는다: 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 예컨대 골수아세포, 전골수세포, 골수단핵구, 단핵구 백혈병, 적백혈병 및 골수이형성증후군, 만성 백혈병, 예컨대 만성 골수성(과립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 털세포 백혈병을 포함하나 이들에 한정되지 않는 백혈병; 진성 적혈구 증가증; 호지킨병, 비호지킨병을 포함하나 이들에 한정되지 않는 림프종; 아급성 다발성 골수종, 비분비성 골수종, 골경화성 골수종, 형질세포 백혈병, 고립성 형질세포종 및 수질의 형질세포종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다발성 골수종; 발덴스트림 매크로글로불린혈증; 의미 불명 단클론 감마병증; 양성 단클론 감마병증; 중쇄 질환; 골육종, 골수종 골 질환, 다발성 골수종, 진주종 유발성 골육종, 골 파궤병, 골육종, 연골육종, 유방 육종, 악성 거대세포종, 골 섬유육종, 척색종, 골막성 육종, 연조직 육종, 혈관육종(angiosarcoma; hemangiosarcoma), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근 육종, 지방육종, 림프관 육종, 신경초종, 횡문근 육종 및 활막 육종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 골암 및 결합 조직 육종; 신경교종, 성상세포종, 뇌간신경교종, 상의세포종, 희돌기교종, 비신경교종, 청신경종, 두개인두종, 수질아세포종, 뇌수막종, 송과체종, 송과체아세포종 및 원발성 뇌 림프종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 뇌 종양; 선암, 소엽(소세포) 암종, 관상피내암, 수질성 유방암, 점액성 유방암, 관상 유방암, 유두성 유방암, 파궤병(소아 파궤병을 포함함) 및 염증성 유방암을 포함하나 이들에 한정되지 않는 유방암; 크롬 친화성 세포종 및 부신피질 암종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 부신암; 유두성 또는 여포성 갑상선암, 수질성 갑상선암 및 역형성 갑상선암을 포함하나 이들에 한정되지 않는 갑상선암; 인슐린종, 가스트린종, 글루카곤종, VIP종, 소마토스타틴 분비종 및 유암종 또는 섬세포종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 췌장암; 쿠싱병, 프로락틴 분비종, 말단비대증 및 요붕증을 포함하나 이들에 한정되지 않는 뇌하수체 암; 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종 및 모양체 흑색종과 같은 안흑색종, 및 망막아세포종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 안암; 편평상피세포암종, 선종 및 흑색종과 같은 질암; 편평상피세포암종, 흑색종, 선암, 기저 세포 암종, 육종 및 파궤병과 같은 외음부암; 편평상피세포암종 및 선암을 포함하나 이들에 한정되지 않는 자궁경부암; 자궁내막암종 및 자궁 육종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 자궁암; 난소 상피세포 암종, 경계성 종양, 생식세포종 및 간질 종양을 포함하나 이들에 한정되지 않는 난소암; 편평상피세포 암, 선종, 선양 낭성 암종, 점액표피양 암종, 편평상피 선암, 육종, 흑색종, 형질세포종, 우체상 암종 및 귀리 세포(소세포) 암종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 식도암; 선암, 종괴형(용종형), 궤양형, 표재 확장성, 미만 확장성, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종 및 암육종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 위암; 결장암; 직장암; 간세포암종 및 간아세포종, 선암과 같은 담낭암을 포함하나 이들에 한정되지 않는 간암; 유두성, 결절성 및 미만성 담관암종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 담관암종; 비소세포 폐암, 편평세포암종

(표피암), 선암, 대세포암종 및 소세포 폐암과 같은 폐암; 생식세포종, 정상피종, 역형성, 전통적(전형적) 정모 세포성 비정상피종, 태생암, 기형종, 용모암종(난황낭 종양)을 포함하나 이들에 한정되지 않는 고환암; 선암, 평활근육종 및 횡문근육종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 전립선암; 음경암; 편평세포암종을 포함하나 이에 한정되지 않는 구강암; 기저세포암; 선암, 점액표피양 암종 및 선양낭포암을 포함하나 이들에 한정되지 않는 타액선암; 편평상피세포암 및 우축성암을 포함하나 이들에 한정되지 않는 인두암; 기저세포암종, 편평세포암종 및 흑색종, 표재 확장성 흑색종, 결절성 흑색종, 악성 흑색점 흑색종, 선단 흑자성 흑색종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 피부암; 신세포암, 선암, 부신종, 섬유육종, 이행성 세포암(신우 및/또는 수뇨관)을 포함하나 이들에 한정되지 않는 신장암; 율름 종양; 이행성 세포 암종, 편평세포암, 선암, 암육종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 방광암을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 그 밖에도, 암은 점액육종, 골원성 육종, 내피육종, 림프관내피육종, 중피종, 활막종, 혈관아세포종, 표피세포종, 낭선암, 기관지원성 암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두성 암종 및 유두성 선암을 포함한다(이러한 질환의 재검토를 위해서는, 문헌[Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America] 참조). 또한, 아토피시스에 있어서의 이상에 의해 유발되는 암도 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료될 수 있는 것으로 생각된다. 이러한 암으로는 여포성 림프종, p53 돌연변이를 갖는 암종, 유방, 전립선 및 난소의 호르몬 의존성 종양, 및 가족성 선종성 용종증 및 골수이형성 증후군과 같은 전암성 병변을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0173] 본 발명의 단백질 및 이것을 포함하는 조성물은 많은 목적에, 예를 들어 쇼그렌 증후군, 류마티스 관절염, 루푸스, 건선, 죽상동맥경화증, 당뇨병성 망막병증 및 다른 망막병증, 후수정체 섬유증식증, 노인성 황반 변성, 신생혈관성 녹내장, 혈관종, 갑상선 증식증(그레이브병을 포함함), 각막 및 기타 조직 이식 및 만성 염증, 패혈증(sepsis), 류마티스 관절염, 복막염, 크론병, 재관류 손상, 패혈증(septicemia), 내독소 쇼크, 낭포성 섬유증, 심내막염, 건선, 관절염(예를 들어, 건선성 관절염), 과민성 쇼크, 장기 허혈, 재관류 손상, 척수 손상 및 동종 이식 거부반응을 포함하는 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환을 포함하나 이들에 한정되지 않는 광범위한 만성 및 급성 질병 및 질환에 대한 치료제로서 유용하다. 자가면역 및/또는 염증성 질환의 다른 예로는 원형탈모증, 강직성 척추염, 항인지질항체 증후군, 자가면역 에디슨병, 부신의 자가면역성 질환, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 자가면역성 난소염 및 고환염, 쇼그렌 증후군, 건선, 죽상동맥경화증, 당뇨병성 망막병증 및 다른 망막병증, 후수정체 섬유증식증, 노인성 황반 변성, 신생혈관성 녹내장, 혈관종, 갑상선 증식증(그레이브병을 포함함), 각막 및 기타 조직 이식, 및 만성 염증, 패혈증(sepsis), 류마티스 관절염, 복막염, 크론병, 재관류 손상, 패혈증(septicemia), 내독소 쇼크, 낭포성 섬유증, 심내막염, 건선, 관절염(예를 들어, 건선성 관절염), 과민성 쇼크, 장기 허혈, 재관류 손상, 척수 손상 및 동종이식 거부반응, 자가면역성 혈소판 감소증, 바체트병, 수포성 천포창, 심근증, 셀리악 스프루-피부염, 만성 피로 면역 장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 척-스트라우스 증후군, 반흔성 유천포창, CREST 증후군, 한랭 응집소병, 크론병, 원판상 루푸스, 본태성 복합 한랭글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르 증후군, 복합 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 1형 또는 면역 관련성 당뇨병, 중증 근無力증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발 동맥염, 다발 연골염, 다선 증후군, 류마티스성 다발성 근육통, 다발성 근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 경화증, 건선, 건선성 관절염, 레이노드 현상, 레이터 증후군, 류마티스 관절염, 유육종증, 경피증, 쇼그렌 증후군, 강직 인간 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 다카야스 혈관염, 측두동맥염/거대세포 동맥염, 켈양성 대장염, 포도막염, 맥관염, 예컨대 포진성 피부염, 혈관염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 염증성 질환의 예로는 천식, 너염, 염증성 장 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 알레르기 질환, 패혈 쇼크, 폐 섬유증, 비분류성 척추관절증, 비분류성 관절증, 관절염, 염증성 골융해, 및 만성 바이러스 또는 박테리아 감염에 기인하는 만성 염증을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 조성물 및 방법은 전술한 질병을 예방, 관리 또는 치료하는 데 사용되는 1종 이상의 통상적인 치료법과 함께 사용될 수 있다.

[0174] 본 발명은 또한 바이러스, 진균, 진핵 미생물 및 박테리아와 같은 다양한 감염원을 불활화시키기 위해 항체 및/또는 항체 접합체를 사용하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 접합체는 RSV, hMPV, PIV 또는 인플루엔자 바이러스를 불활화시키는 데 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 및/또는 항체 접합체는 나에글레리아(*Naegleria*), 아스페질러스(*Aspergillus*), 블라스토마이세스(*Blastomyces*), 히스토플라즈마(*Histoplasma*), 캔디다(*Candida*) 또는 티네아(*Tinea*) 속의 구성원을 포함하나 이들에 한정되지 않는 진균 병원체를 불활화시키는 데 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 및/

또는 항체 접합체는 지아디아(*Giardia*), 톡소플라즈마(*Toxoplasma*), 플라스모듐(*Plasmodium*), 트리파노소마(*Trypanosoma*) 및 엔타모에바(*Entamoeba*) 속의 구성원을 포함하나 이들에 한정되지 않는 진핵 미생물을 불활화시키는 데 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 및/또는 항체 접합체는 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 보렐리아(*Borrelia*), 비브리오(*Vibrio*) 및 네이세리아(*Neisseria*) 속의 구성원을 포함하나 이들에 한정되지 않는 박테리아 병원체를 불활화시키는 데 사용될 수 있다.

[0175]

본 발명의 항체 및/또는 항체 접합체 및 이를 포함하는 조성물은 많은 목적에, 예를 들어 바이러스 질환, 박테리아 질환 및 진균 질환을 포함하는 감염성 질환을 포함하나 이들에 한정되지 않는 광범위한 만성 및 급성 질병 및 질환에 대한 치료제로서 유용하다. 바이러스 병원체의 예로는 아데노바이러스과(예를 들어, 마스트아데노바이러스 및 아비아데노바이러스), 허피스바이러스과(예를 들어, 단순 허피스 바이러스 1, 단순 허피스 바이러스 2, 단순 허피스 바이러스 5 및 단순 허피스 바이러스 6), 레비바이러스과(예를 들어, 레비바이러스, 엔테로박테리아 MS2기, 알로레바이러스), 폭스바이러스과(예를 들어, 코도폭스비리나, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루시폭스바이러스 및 엔토모폭스비리나), 파포바바이러스과(예를 들어, 폴리오마바이러스 및 파필로마바이러스), 과라믹소바이러스과(예를 들어, 과라믹소바이러스, 과라인플루엔자 바이러스 1, 모빌리바이러스(예를 들어, 홍역 바이러스), 루벨라바이러스(예를 들어, 볼거리 바이러스), 뉴모노바이러스과(예를 들어, 뉴모바이러스, 인간 호흡기 합포체 바이러스) 및 메타뉴모바이러스(예를 들어, 조류 뉴모바이러스 및 인간 메타뉴모바이러스), 피코나바이러스과(예를 들어, 엔테로바이러스, 리노바이러스, 헤파토바이러스(예를 들어, 인간 A형 간염 바이러스), 카디오바이러스 및 아프토바이러스), 레오바이러스과(예를 들어, 오르토레오바이러스, 오르비바이러스, 로타바이러스, 사이포바이러스, 피지바이러스, 파이토레오바이러스 및 오리자바이러스), 레트로바이러스과(예를 들어, 포유동물 B형 레트로바이러스, 포유동물 C형 레트로바이러스, 조류 C형 레트로바이러스, D형 레트로바이러스 그룹, BLV-HTLV 레트로바이러스, 렌티바이러스(예를 들어, 인간 면역결핍증 바이러스 1 및 인간 면역결핍증 바이러스 2), 스푸마바이러스), 플라비바이러스과(예를 들어, C형 간염 바이러스), 헤파드나바이러스과(예를 들어, B형 간염 바이러스), 토가바이러스과(예를 들어, 알파바이러스(예를 들어, 신드비스 바이러스) 및 루비바이러스(예를 들어, 루벨라 바이러스)), 람도바이러스과(예를 들어, 베시쿨로바이러스, 리사바이러스, 에페메로바이러스, 사이토람도바이러스 및 네클레오합도바이러스), 아레나바이러스과(예를 들어, 아레나바이러스, 림프구성 맥락 수막염 바이러스, 이피 바이러스 및 라사 바이러스) 및 코로나바이러스과(예를 들어, 코로나바이러스 및 토로바이러스)를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 박테리아 병원체의 예로는 아쿠아스피릴럼(*Aquaspirillum*) 과, 아조스피릴럼(*Azospirillum*) 과, 아조토박테라세아(*Azotobacteraceae*) 과, 박테로이다세아(*Bacteroidaceae*) 과, 바토넬라(*Bartonella*) 종, 브델로브리오(*Bdellovibrio*) 과, 캄필로박터(*Campylobacter*) 종, 클라미디아(*Chlamydia*) 종(예를 들어, 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*)), 클로스트리듐, 엔테로박테리아세아(*Enterobacteriaceae*) 과(예를 들어, 시트로박터(*Citrobacter*) 종, 에드워드시엘라, 엔테로박터 에어로진(*Enterobacter aerogenes*), 에르위니아(*Erwinia*) 종, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 하프니아(*Hafnia*) 종, 클렙시엘라(*Klebsiella*) 종, 모르가넬라(*Morganella*) 종, 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로비덴시아(*Providencia*), 살모넬라(*Salmonella*) 종, 세라티아 마르세신스(*Serratia marcescens*) 및 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*)), 가르디넬라(*Gardinerella*) 과, 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 할로박테리아세아(*Halobacteriaceae*) 과, 헬리코박터(*Helicobacter*) 과, 레지오날라세아(*Legionellaceae*) 과, 리스테리아(*Listeria*) 종, 메틸로코카세아(*Methylococcaceae*) 과, 마이코박테리아(예를 들어, 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)), 네이세리아세아(*Neisseriaceae*) 과, 오션노스피릴럼(*Oceanospirillum*) 과, 파스투렐라세아(*Pasteurellaceae*) 과, 뉴모코커스(*Pneumococcus*) 종, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 리조비아세아(*Rhizobiaceae*) 과, 스피릴럼(*Spirillum*) 과, 스피로소마세아(*Spirosomaceae*) 과, 스태필로코커스(*Staphylococcus*)(예를 들어, 메티실린 내성 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 스태필로코커스 파이로진스(*Staphylococcus pyrogenes*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*)(예를 들어, 스트렙토코커스 엔테리티디스(*Streptococcus enteritidis*), 스트렙토코커스 파스시아(*Streptococcus fasciae*) 및 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)), 밤피로비브리오 헬리코박터(*Vampirovibr Helicobacter*) 과 및 밤피로비브리오(*Vampirovibrio*) 과를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 진균 병원체의 예로는 압시디아(*Absidia*) 종(예를 들어, 압시디아 코림비페라(*Absidia corymbifera*) 및 압시디아 라모사(*Absidia ramosa*)), 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 종(예를 들어, 아스퍼질러스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*) 및 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*)), 바시디오볼루스 라나룸(*Basidiobolus ranarum*), 블

라스토마이세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 칸디다(*Candida*) 종(예를 들어, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 케르(*Candida kerr*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 칸디다 슈도트로피칼리스(*Candida pseudotropicalis*), 칸디다 퀴렘몬디이(*Candida quillermontii*), 칸디다 루고사(*Candida rugosa*), 칸디다 스텔라토이데아(*Candida stellatoidea*) 및 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*)), 코시디오테스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 콘니디오볼러스(*Conidiobolus*) 종, 크립토크커스 네오포름스(*Cryptococcus neoforms*), 쿠닝하멜라(*Cunninghamella*) 종, 피부진균, 히스토플라즈마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 마이크로스포룸 집세움(*Microsporum gypseum*), 뮤코 푸실러스(*Mucor pusillus*), 파라코시디오이테스 브라실리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 슈달레체리아 보이디이(*Pseudallescheria boydii*), 리노스포리둠 세베리(*Rhinosporidium seeberi*), 뉴모시스티스 카리니이(*Pneumocystis carinii*), 리조푸스(*Rhizopus*) 종(예를 들어, 리조푸스 아히주스(*Rhizopus arrhizus*), 리조푸스 오리자(*Rhizopus oryzae*) 및 리조푸스 마이크로포러스(*Rhizopus microsporus*)), 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 종, 스포로트릭스 쉐키이(*Sporoihris schenckii*), 자이고마이세트(*zygomycetes*) 및 자이고마이세트(*Zygomycetes*), 아스코마이세트(*Ascomycetes*) 및 바시디오마이세트(*Basidiomycetes*), 듀테로마이세트(*Deuteromycetes*) 및 오오마이세트(*Oomycetes*)를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0176] 본 발명은 또한 세포 집단을 고갈시키기 위해 항체를 사용하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 방법은 하기 세포 유형, 즉 호산구, 호염구, 호중구, T 세포, B 세포, 비만 세포, 단핵구, 내피 세포 및 종양 세포의 고갈에 유용하다.

[0177] 본 발명의 항체 및 그 접합체는 또한 질병 또는 그 증상의 진단 및 검출에 유용하게 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 질병의 진행을 모니터링하는 데 유용하게 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 치료 계획을 모니터링하는 데 유용하게 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 진단 키트와 같은 생체의 적용에 있어서 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

[0178] 본 발명의 조성물은 표적 항원의 가시화에 유용하게 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 항원은 내재화되는 세포 표면 수용체이다. 다른 실시형태에서, 상기 표적 항원은 세포내 항원이다. 다른 실시형태에서, 상기 표적은 핵내 항원이다.

[0179] 일 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 항체-약물 접합체는 결합되면 세포로 내재화되며, 이때 내재화율은 본원에 기재된 대조군 항체보다 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%, 적어도 약 100%, 적어도 약 110%, 적어도 약 130%, 적어도 약 140%, 적어도 약 150%, 적어도 약 160%, 또는 적어도 약 170% 더 크다.

[0180] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 결합되면 세포 내로 내재화되며, 이때 내재화율은 본원에 기재된 대조군 항체보다 1~10%, 10~20%, 20~30%, 30~40%, 40~50%, 50~60%, 60~70%, 70~80%, 80~90%, 90~100%, 100~110%, 110~120%, 120~130%, 130~140%, 140~150%, 150~160%, 160~170% 더 크다.

[0181] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 결합되면 세포 내로 내재화되며, 이때 내재화율은 2차 항체를 사용한 내재화 분석으로 측정할 때 본원에 기재된 대조군 항체보다 1~10%, 10~20%, 20~30%, 30~40%, 40~50%, 50~60%, 60~70%, 70~80%, 80~90%, 90~100%, 100~110%, 110~120%, 120~130%, 130~140%, 140~150%, 150~160%, 160~170% 더 크다.

[0182] 약학적 조성물

[0183] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 예를 들어, 약학적으로 허용되는 담체와 함께 제제화된, 본 발명의 항체 또는 항체 접합체 중 하나 또는 조합을 포함하는 약학적 조성물을 포함하나 이에 한정되지 않는 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은, 예를 들어 비한정적으로 본 발명의 2종 이상의 상이한 항체 중 하나 또는 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 표적 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하거나 상보 활성을 갖는 항체의 조합을 포함할 수 있다.

[0184] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 예를 들어 다른 제제와 병용되는 병용 치료법으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 병용 치료법은 하나 이상의 다른 치료법과 병용되는 본 발명의 항체를 포함할 수 있으며, 이때 상기 치료법은 수술, 면역요법, 화학요법, 방사선 치료, 또는 약물 치료일 수 있다.

[0185] 본 발명의 약학적 화합물은 1종 이상의 약학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. 이러한 염의 예로는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 비독성 무기산, 예컨대 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요

오드화수소산, 인산 등으로부터 유도되는 것뿐만 아니라, 비독성 유기산, 예컨대 지방족 모노- 및 디카복실산, 페닐 치환 알칸산, 하이드록시 알칸산, 방향족산, 지방족 및 방향족 설폰산 등으로부터 유도되는 것을 포함한다. 염기 부가염은 알칼리 토금속, 예컨대 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등으로부터 유도되는 것뿐만 아니라, 비독성 유기 아민, 예컨대 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로케인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로케인 등으로부터 유도되는 것을 포함한다.

[0186] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 약학적으로 허용되는 항산화제를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 항산화제의 예로는 (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 염산염, 이황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 지용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 솔비톨, 타르타르산, 인산 등을 들 수 있다.

[0187] 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적절한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트를 들 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅제를 사용함으로써, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 또, 계면활성제를 사용함으로써 유지할 수 있다.

[0188] 이러한 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재는 멸균 작업에 의해, 또, 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등을 포함시키는 것에 의해 방지할 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 등장화제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 포함시킴으로써 주사용 약제 형태의 흡수를 연장시킬 수 있다.

[0189] 약학적 조성물은 일반적으로 제조 및 저장 조건 하에서 멸균 상태이고 안정해야 한다. 이 조성물은 용액, 마이크로에밀션, 리포솜 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 정연한 구조체로서 제제화될 수 있다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅제를 사용함으로써, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 또, 계면활성제를 사용함으로써 유지할 수 있다. 많은 경우, 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 솔비톨 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 적절하다. 흡수 지연제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 주사용 조성물의 흡수를 연장시킬 수 있다.

[0190] 멸균 주사용 용액은 상기에 열거된 성분들 중 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에 필요량의 활성 화합물을 혼입시킨 후 멸균 마이크로여과를 수행함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산매 및 상기에 열거된 것 중 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 비이클로 활성 화합물을 혼입함으로써 제조한다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은, 미리 멸균 여과한 그 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 산출하는 진공 건조 및 동결 건조(냉동 건조)이다.

[0191] 일 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 내독소 및/또는 관련 발열성 물질을 실질적으로 포함하지 않는 발열원 무함유 제제이다. 내독소는 미생물 내부에 갇혀 있다가 미생물이 파괴되거나 사멸되면 방출되는 독소를 포함한다. 발열성 물질은 또한, 박테리아 및 기타 미생물의 외막으로부터 유래되는, 열을 유발하는 열안정성 물질(당단백질)을 포함한다. 이러한 물질 둘 다 인간에게 투여될 경우 열, 저혈압 및 쇼크를 유발할 수 있다. 잠재적 유해 효과로 인해, 정맥내로 투여된 약물 용액으로부터 소량의 내독소라도 제거하는 것이 유익하다. 식품의약국("FDA")은 정맥내 약물 사용을 위해 1회 1시간 동안 체중 kg당 용량당 5 내독소 단위(EU)의 상한을 정하였다 [The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeia Forum 26 (1):223 (2000)]. 치료용 단백질이 체중 kg당 수백 또는 수천 mg의 양으로 투여될 경우, 미량의 내독소라도 제거하는 것이 유익하다. 일 실시형태에서, 조성물 중의 내독소 및 발열원 수준은 10 EU/mg 미만, 또는 5 EU/mg 미만, 또는 1 EU/mg 미만, 또는 0.1 EU/mg 미만, 또는 0.01 EU/mg 미만, 또는 0.001 EU/mg 미만이다. 또 다른 실시형태에서, 조성물 중의 내독소 및 발열원 수준은 약 10 EU/mg 미만, 또는 약 5 EU/mg 미만, 또는 약 1 EU/mg 미만, 또는 약 0.1 EU/mg 미만, 또는 약 0.01 EU/mg 미만, 또는 약 0.001 EU/mg 미만이다.

[0192] 일 실시형태에서, 본 발명은 조성물을 투여하는 것을 포함하며, 이때 상기 투여는 경구, 비경구, 근육내, 비내, 질내, 직장내, 혀, 설하, 협측, 구협내, 정맥내, 피부, 피하 또는 경피 투여이다.

- [0193] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 또한 수술, 화학요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역요법 또는 방사선 요법과 같은 다른 치료법과 함께 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0194] **투약/투여**
- [0195] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체를 포함하는 약학적 또는 멸균 조성물을 제조하기 위해, 항체/항체 접합체를 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 혼합한다. 치료용 또는 진단용 물질의 제제는 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제와 함께, 예를 들어, 동결 건조 분말, 슬러리, 수용액, 로션 또는 현탁액의 형태로 제조할 수 있다(예를 들어, 문헌[Hardman et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.]; 문헌[Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.]; 문헌[Avis et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY]; 문헌[Lieberman et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY]; 문헌[Lieberman et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY]; 문헌[Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.] 참조).
- [0196] 치료제를 위한 투여 계획의 선택은 물질의 혈청 또는 조직 전환율, 증상의 수준, 물질의 면역원성 및 생물학적 매트릭스 내에서의 표적 세포의 접근 가능성을 비롯한 몇 가지 요인에 따라 달라진다. 특정 실시형태에서, 투여 계획은, 허용 가능한 부작용 수준에 모순이 없도록, 환자에게 전달되는 치료제의 양이 최대가 되도록 한다. 따라서, 전달되는 생물학적 제제의 양은 부분적으로 특정 물질 및 치료 대상 병증의 중증도에 따라 달라진다. 항체, 사이토카인 및 소분자의 적정 용량을 선택하는 것에 관한 지침은 입수 가능하다(예를 들어, 문헌[Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK]; 문헌[Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y.]; 문헌[Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y.]; 문헌[Baert et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608]; 문헌[Milgrom et al. (1999) New Engl J. Med, 341:1966-1973]; 문헌[Slamon et al. (2001) New Engl J. Med. 344:783-792]; 문헌[Benjaminovitz et al. (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619]; 문헌[Ghosh et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32]; 문헌[Lipsky et al. (2000) New Engl J. Med. 343:1594-1602] 참조).
- [0197] 적정 용량은, 예를 들어 치료에 영향을 주거나 치료에 영향을 줄 것으로 예상되는 당업계에 알려져 있거나 그럴 것으로 추측되는 파라미터 또는 인자를 이용하여, 임상의가 결정한다. 일반적으로, 투약은 최적 용량보다 다소 적은 양부터 시작하여, 임의의 부정적 부작용에 비해 원하는 또는 최적의 효과가 얻어질 때까지 소량씩 양을 증가시킨다. 중요한 진단적 척도로는, 예를 들어 염증의 증상 또는 생성된 염증성 사이토카인 수치를 들 수 있다.
- [0198] 본 발명의 약학적 조성물 중의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 되지 않도록 하면서 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 얻기에 효과적인 활성 성분의 양을 얻을 수 있도록 변경할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 이용되는 본 발명의 특정 조성물, 또는 그 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 이용되는 특정 화합물의 분비 속도, 치료 기간, 이용되는 특정 조성물과 병용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료 대상 환자의 나이, 성별, 체중, 상태, 전신 건강 및 과거 병력 및 의료 분야에 잘 알려진 유사한 인자를 비롯한 다양한 약동학적 인자에 따라 달라진다.
- [0199] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체를 포함하는 조성물은 연속 주입에 의해, 또는 예를 들어, 1일, 1주의 간격으로, 또는 주당 1~7회 투여될 수 있다. 투여는 정맥내, 피하, 국소, 경구, 비내, 직장내, 근육내, 뇌내로, 또는 흡입에 의해 이루어질 수 있다. 구체적인 투여 프로토콜은 바람직하지 않은 유의적인 부작용을 피하는 최대 용량 또는 투여 빈도를 이용하는 것이다. 주당 총 투여량은 체중을 기준으로 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 이상, 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 이상, 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 이상, 1 $\mu\text{g/kg}$ 이상, 10 $\mu\text{g/kg}$ 이상, 100 $\mu\text{g/kg}$ 이상, 0.2 mg/kg 이상, 1.0 mg/kg 이상, 2.0 mg/kg 이상, 10 mg/kg 이상, 25 mg/kg 이상, 또는 50 mg/kg 이상일 수 있다(예를 들어, 문헌[Yang et al. (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434]; 문헌[Herold et al. (2002) New Engl. J. Med, 346:1692-1698]; 문헌[Liu et al. (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych, 67:451-456]; 문헌[Portielji et al. (20003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144] 참조). 용량은 15 μg 이상, 20 μg 이상, 25 μg 이상, 30 μg 이상, 35 μg 이상, 40 μg 이상, 45 μg 이상, 50 μg 이상, 55 μg 이상, 60 μg 이상, 65 μg 이상, 70 μg 이상, 75 μg 이상, 80 μg 이상, 85 μg 이상, 90 μg 이상, 95 μg 이상, 또는 100 μg 이상일 수 있다. 피험체에 투여되는 투여 횟수는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회 또는 12회 또는 그 이상일 수 있다.
- [0200] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체의 경우, 환자에게 투여되는 투여량이 환자 체중을 기준으로 0.0001 mg/kg~

100 mg/kg일 수 있다. 투여량은 환자 체중을 기준으로 0.0001 mg/kg~20 mg/kg, 0.0001 mg/kg~10 mg/kg, 0.0001 mg/kg~5 mg/kg, 0.0001~2 mg/kg, 0.0001~1 mg/kg, 0.0001 mg/kg~0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg~0.5 mg/kg, 0.0001 mg/kg~0.25 mg/kg, 0.0001~0.15 mg/kg, 0.0001~0.10 mg/kg, 0.001~0.5 mg/kg, 0.01~0.25 mg/kg 또는 0.01~0.10 mg/kg일 수 있다.

[0201] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체의 투여량은 킬로그램(kg) 단위의 환자의 체중에 투여량(mg/kg)을 곱한 것을 이용하여 계산할 수 있다. 본 발명 항체의 투여량은 환자 체중을 기준으로 150 μ g/kg 이하, 125 μ g/kg 이하, 100 μ g/kg 이하, 95 μ g/kg 이하, 90 μ g/kg 이하, 85 μ g/kg 이하, 80 μ g/kg 이하, 75 μ g/kg 이하, 70 μ g/kg 이하, 65 μ g/kg 이하, 60 μ g/kg 이하, 55 μ g/kg 이하, 50 μ g/kg 이하, 45 μ g/kg 이하, 40 μ g/kg 이하, 35 μ g/kg 이하, 30 μ g/kg 이하, 25 μ g/kg 이하, 20 μ g/kg 이하, 15 μ g/kg 이하, 10 μ g/kg 이하, 5 μ g/kg 이하, 2.5 μ g/kg 이하, 2 μ g/kg 이하, 1.5 μ g/kg 이하, 1 μ g/kg 이하, 0.5 μ g/kg 이하, 또는 0.5 μ g/kg 이하일 수 있다.

[0202] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체의 단위 용량은 0.1 mg~20 mg, 0.1 mg~15 mg, 0.1 mg~12 mg, 0.1 mg~10 mg, 0.1 mg~8 mg, 0.1 mg~7 mg, 0.1 mg~5 mg, 0.1~2.5 mg, 0.25 mg~20 mg, 0.25~15 mg, 0.25~12 mg, 0.25~10 mg, 0.25~8 mg, 0.25 mg~7 mg, 0.25 mg~5 mg, 0.5 mg~2.5 mg, 1 mg~20 mg, 1 mg~15 mg, 1 mg~12 mg, 1 mg~10 mg, 1 mg~8 mg, 1 mg~7 mg, 1 mg~5 mg, 또는 1 mg~2.5 mg일 수 있다.

[0203] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체의 투여량은 피험체에서의 혈청 역가가 0.1 μ g/ml 이상, 0.5 μ g/ml 이상, 1 μ g/ml 이상, 2 μ g/ml 이상, 5 μ g/ml 이상, 6 μ g/ml 이상, 10 μ g/ml 이상, 15 μ g/ml 이상, 20 μ g/ml 이상, 25 μ g/ml 이상, 50 μ g/ml 이상, 100 μ g/ml 이상, 125 μ g/ml 이상, 150 μ g/ml, 175 μ g/ml 이상, 200 μ g/ml 이상, 225 μ g/ml 이상, 250 μ g/ml 이상, 275 μ g/ml 이상, 300 μ g/ml 이상, 325 μ g/ml 이상, 350 μ g/ml 이상, 375 μ g/ml 이상, 또는 400 μ g/ml 이상이 되게 할 수 있다. 대안으로, 본 발명 항체의 투여량은 피험체에서의 혈청 역가가 0.1 μ g/ml 이상, 0.5 μ g/ml 이상, 1 μ g/ml 이상, 2 μ g/ml 이상, 5 μ g/ml 이상, 6 μ g/ml 이상, 10 μ g/ml 이상, 15 μ g/ml 이상, 20 μ g/ml 이상, 25 μ g/ml 이상, 50 μ g/ml 이상, 100 μ g/ml 이상, 125 μ g/ml 이상, 150 μ g/ml 이상, 175 μ g/ml 이상, 200 μ g/ml 이상, 225 μ g/ml 이상, 250 μ g/ml 이상, 275 μ g/ml 이상, 300 μ g/ml 이상, 325 μ g/ml 이상, 350 μ g/ml 이상, 375 μ g/ml 이상, 또는 400 μ g/ml 이상이 되게 할 수 있다.

[0204] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체의 투여는 반복할 수 있으며, 투여는 적어도 1일, 2일, 3일, 5일, 10일, 15일, 30일, 45일, 2개월, 75일, 3개월, 또는 적어도 6개월의 간격을 두고 실시할 수 있다.

[0205] 특정 환자에 대한 유효량은 치료 대상 병증, 환자의 전체적인 건강, 투여 경로 및 투여량 및 부작용의 심각도와 같은 인자에 따라 달라질 수 있다(예를 들어, 문헌[Maynard et al., A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK] 참조).

[0206] 투여 경로는, 예를 들어 국소 또는 피부 도포에 의해, 정맥내, 복강내, 뇌내, 근육내, 안내, 관절내, 뇌척수내, 병변내 주사 또는 주입에 의해, 또는 서방형 시스템 또는 임플란트에 의한 것일 수 있다(예를 들어, 문헌[Sidman et al. (1983) Biopolymers 22:547-556]; 문헌[Langer et al. (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277]; 문헌[Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105]; 문헌[Epstein et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692]; 문헌[Hwang et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034]; 미국 특허 제6,350,466호 및 제6,316,024호 참조). 필요하다면, 이 조성물은 주사 부위에서의 통증을 완화시키기 위해 리도케인과 같은 국소 마취제 및 가용화제를 포함할 수 있다. 또한, 폐내 투여는, 예를 들어 흡입기 또는 네블라이저, 및 에어로졸화제를 함유한 제제와 함께 이용할 수도 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,019,968호, 제5,985,320호, 제5,985,309호, 제5,934,272호, 제5,874,064호, 제5,855,913호, 제5,290,540호 및 제4,880,078호; 및 PCT 공개 공보 WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 및 WO 99/66903을 참조할 수 있으며, 상기 문헌은 각각 그 전체가 본원에서 참조 인용된다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항체, 병용요법 또는 조성물은 Alkermes AIR™ 폐내 약물 전달 기법(미국 매사추세츠 캠브리지 소재의 Alkermes, Inc.)을 이용하여 투여한다.

[0207] 본 발명의 조성물은 또한 당업계에 공지되어 있는 다양한 방법 중 하나 이상을 이용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라진다. 본 발명의 항체를 위해 선택된 투여 경로는, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한, 정맥내, 근육내, 폐내, 복강내, 피하, 척추 또는 다른 비경구 투여 경로를 포함한다. 비경구 투여는, 일반적으로 주사에 의한, 장내 및 국소 투여 이외의 투여 방식에 해당할 수 있으며, 정맥내, 근육내, 관절내, 척추강내, 낭내, 안와내, 심장내, 폐내, 복강내, 경기관, 피하, 표피밑, 관절내, 낭하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함

한다. 대안으로, 본 발명의 조성물은 국소, 표피 또는 점막 투여 경로와 같은 비경구 경로를 통해, 예를 들어 비내, 구강, 질내, 직장내, 설하 또는 국소 투여될 수 있다.

[0208] 본 발명의 항체 또는 그 접합체가 제어 방출형 또는 지속 방출형 시스템으로 투여된다면, 제어 방출 또는 지속 방출을 얻기 위해 펌프가 사용될 수 있다(예를 들어, Langer의 상기 문헌; 문헌[Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20]; 문헌[Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507]; 문헌[Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574] 참조). 본 발명 치료제의 제어 방출 또는 지속 방출을 얻기 위해서 중합체 물질이 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974)]; 문헌[Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)]; 문헌[Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61]; 문헌[Levy et al., 1985, Science 225:190]; 문헌[During et al., 1989, Ann. Neurol 25:351]; 문헌[Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105]; 미국 특허 제5,679,377호; 미국 특허 제5,916,597호; 미국 특허 제5,912,015호; 미국 특허 제5,989,463호; 미국 특허 제5,128,326호; PCT 공개 공보 WO 99/15154; 및 PCT 공개 공보 WO 99/20253 참조). 지속 방출형 제제에 사용되는 중합체의 예로는 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜라이드(PLG), 폴리안하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜라이드)(PLGA) 및 폴리오르토 에스테르를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 일 실시형태에서, 지속 방출형 제제에 사용되는 중합체는 비활성이고 침출될 수 있는 불순물이 없으며 저장 안정성이 있고 무균이고 생분해성이다. 제어 방출형 또는 지속 방출형 시스템은 예방제 또는 치료제 가까이에 배치될 수 있기 때문에, 전신 투여량의 일부만이 요구된다(예를 들어, 문헌[Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)] 참조).

[0209] 제어 방출형 시스템에 대해서는 Langer의 문헌[1990, Science 249:1527-1533]에서 재검토되었다. 당업자에게 공지된 임의의 기법이 본 발명의 1종 이상의 항체 또는 그 접합체를 포함하는 지속 방출형 제제를 제조하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제4,526,938호, PCT 공개 공보 WO 91/05548, PCT 공개 공보 WO 96/20698, 문헌[Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189], 문헌[Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397], 문헌[Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854] 및 문헌[Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760]를 참조할 수 있으며, 이들 문헌은 각각 그 전체가 본원에 참조 인용된다.

[0210] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체가 국소 투여될 경우, 이것은 연고, 크림, 경피 패치, 로션, 젤, 샴푸, 스프레이, 에어로졸, 용액, 에멀션의 형태 또는 당업자에게 잘 알려져 있는 다른 형태로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)]을 참조할 수 있다. 비분무성 국소 제형의 경우, 국소 도포에 상용성인 담체 또는 1종 이상의 부형제를 포함하고 동적 점도(일부 경우 물보다 큰 점도)를 갖는 점성 내지 반고체 또는 고체 형태가 일반적으로 사용된다. 적절한 제제로는 용액제, 현탁제, 에멀션제, 크림제, 연고제, 분말제, 도찰제, 살브(salve) 등을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않으며, 이 제제는 필요에 따라 멸균 처리되거나, 예를 들어 삼투압과 같은 다양한 특성에 영향을 주기 위한 보조제(예를 들어, 보존제, 안정제, 습윤제, 완충제 또는 염)와 함께 혼합된다. 다른 적절한 국소 제형으로는 분무성 에어로졸제를 들 수 있으며, 이때 일부 경우 활성 성분이 고체 또는 액체 비활성 담체와 함께 가압 휘발물(예를 들어, 프레온과 같은 기체상 추진제)과의 혼합물로 또는 스퀴즈 보틀(squeeze bottle)에 포장된다. 또한, 보습제 또는 습윤제가 필요에 따라 약학적 조성물 및 제형에 첨가될 수 있다. 이러한 추가적인 성분의 예는 당업계에 잘 알려져 있다.

[0211] 항체 또는 항체 접합체를 포함하는 조성물이 비내 투여될 경우, 이것은 에어로졸 형태, 스프레이, 미스트 또는 점적제의 형태로 제제화될 수 있다. 특히, 본 발명에 따라 사용되는 예방제 또는 치료제는 편리하게는, 적절한 추진제(예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소 또는 다른 적절한 기체)의 사용과 함께, 가압 팩 또는 네블라이저로부터 에어로졸 스프레이 형태로 투여될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 계량된 양을 전달할 수 있도록 밸브를 마련함으로써 투여량 단위를 결정할 수 있

다. 락토스 또는 전분과 같은 적절한 분말 베이스 및 화합물의 분말 혼합물을 함유하는, 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 캡슐 및 카트리지(예를 들어, 젤라틴으로 이루어짐)가 제제화될 수 있다.

[0212] 제2 치료제, 예를 들어 사이토카인, 스테로이드, 화학요법제, 항생제 또는 방사선과 함께 동시 투여 또는 치료하기 위한 방법은 당업계에 주지되어 있다(예를 들어, 문헌[Hardman et al. (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.]; 문헌[Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilikms, Phila., Pa.]; 문헌[Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wiikins, Phila., Pa.] 참조). 유효량의 치료제는 증상을 10% 이상, 20% 이상, 약 30% 이상, 40% 이상, 또는 50% 이상 감소시킬 수 있다.

[0213] 본 발명의 항체 또는 그 접합체와 함께 투여될 수 있는 추가적인 치료제(예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 본 발명의 항체와 5분 미만의 간격, 30분 미만의 간격, 1시간의 간격, 약 1시간의 간격, 약 1시간~약 2시간의 간격, 약 2시간~약 3시간의 간격, 약 3시간~약 4시간의 간격, 약 4시간~약 5시간의 간격, 약 5시간~약 6시간의 간격, 약 6시간~약 7시간의 간격, 약 7시간~약 8시간의 간격, 약 8시간~약 9시간의 간격, 약 9시간~약 10시간의 간격, 약 10시간~약 11시간의 간격, 약 11시간~약 12시간의 간격, 약 12시간~18시간의 간격, 18시간~24시간의 간격, 24시간~36시간의 간격, 36시간~48시간의 간격, 48시간~52시간의 간격, 52시간~60시간의 간격, 60시간~72시간의 간격, 72시간~84시간의 간격, 84시간~96시간의 간격, 또는 96시간~120시간의 간격을 두고 투여될 수 있다. 한 번의 동일 환자 내원으로 2종 이상의 치료제가 투여될 수 있다.

[0214] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체 및 다른 치료제는 주기적으로 투여될 수 있다. 주기적 요법은 일정 기간 동안 제1 치료제(예를 들어, 제1 예방제 또는 치료제)를 투여하고, 그 후 일정기간 동안 제2 치료제(예를 들어, 제2 예방제 또는 치료제)를 투여한 후, 경우에 따라 일정 기간 동안 제3 치료제(예를 들어, 예방제 또는 치료제) 및 추가의 치료제를 투여하는 것을 포함하며, 치료제 중 하나에 대한 내성의 발생을 감소시키고/시키거나 치료제 중 하나의 부작용을 방지 또는 감소시키고/시키거나 치료제의 효능을 개선하기 위해 이 순차 투여, 즉 주기를 반복하는 것을 포함한다.

[0215] 특정 실시형태에서, 본 발명의 항체 및 항체 접합체는 생체내에서의 적절한 분포를 확보할 수 있도록 제제화될 수 있다. 예를 들어, 혈뇌 장벽(BBB)은 다수의 고친수성 화합물을 배척한다. 본 발명의 치료성 화합물이 (필요할 경우) BBB를 관통할 수 있도록 하기 위해서는, 이들을 예를 들어 리포솜으로 제제화할 수 있다. 리포솜 제조 방법에 대해서는, 미국 특허 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조할 수 있다. 이 리포솜은 특정 세포 또는 장기로 선택적으로 이송되는 하나 이상의 부분을 포함함으로써 표적화된 약물 전달을 향상시킬 수 있다(예를 들어, 문헌[V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685] 참조). 예시적인 표적화 부분으로는 폴레이트 또는 바이오틴(예를 들어, 미국 특허 제5,416,016호(Low et al.) 참조); 만노사이드[Umezawa et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038]; 항체[P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140]; 문헌[M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180]; 계면활성제 단백질 A 수용체[Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134]; p120[Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090]; 및 문헌[K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123]; 문헌[J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273]을 참조할 수 있다.

[0216] 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항체 접합체를 포함하는 약학적 조성물을 단독으로 또는 다른 치료제와 함께 이를 필요로 하는 피험체에 투여하기 위한 프로토콜을 제공한다. 본 발명의 병용 요법의 치료제(예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 피험체에 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 병용 요법의 치료제(예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 또한 주기적으로 투여될 수 있다. 주기적 요법은 일정 기간 동안 제1 치료제(예를 들어, 제1 예방제 또는 치료제)를 투여하고, 그 후 일정 기간 동안 제2 치료제(예를 들어, 제2 예방제 또는 치료제)를 투여하는 것을 포함하며, 치료제(예를 들어, 작용제) 중 하나에 대한 내성의 발생을 감소시키고/시키거나 치료제(예를 들어, 작용제) 중 하나의 부작용을 방지 또는 감소시키고/시키거나 치료제의 효능을 개선하기 위해 이 순차 투여, 즉 주기를 반복하는 것을 포함한다.

[0217] 본 발명의 병용 요법의 치료제(예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 피험체에 동시에 투여될 수 있다. "동시에"란 용어는 치료제(예를 들어, 예방제 또는 치료제)를 정확히 동시에 투여하는 것에 한정되지 않으며, 본 발명의 항체는 또는 그 접합체가 다른 치료제(들)와 공동 작용하여 다른 방식으로 투여되는 경우보다 증가된 이익을 제공할하도록 하는 시간 간격내에 또는 순서대로 본 발명의 항체 또는 그 접합체를 포함하는 약학적 조성물을 피험체에 투여하는 것을 의미한다. 예를 들어, 각각의 치료제는 동시에 또는 상이한 시점에 임의의 순서로 순차적으로

시험체에 투여될 수 있지만, 동시에 투여되지 않는 경우, 이들은 원하는 치료 또는 예방 효과를 제공하도록 시간상 충분히 가까이 투여되어야 한다. 각각의 치료제는 임의의 적절한 형태로 임의의 경로로 개별적으로 시험체에 투여될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 치료제(예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 15분 미만의 간격, 30분 미만의 간격, 1시간 미만의 간격, 약 1시간의 간격, 약 1시간~약 2시간의 간격, 약 2시간~약 3시간의 간격, 약 3시간~약 4시간의 간격, 약 4시간~약 5시간의 간격, 약 5시간~약 6시간의 간격, 약 6시간~약 7시간의 간격, 약 7시간~약 8시간의 간격, 약 8시간~약 9시간의 간격, 약 9시간~약 10시간의 간격, 약 10시간~약 11시간의 간격, 약 11시간~약 12시간의 간격, 24시간의 간격, 48시간의 간격, 72시간의 간격, 또는 1주의 간격을 두고 시험체에 투여된다. 다른 실시형태에서, 한 번의 동일 환자 내원으로 2종 이상의 치료제(예를 들어, 예방제 또는 치료제)가 투여된다.

[0218] 상기 병용 요법의 예방제 또는 치료제는 동일한 약학적 조성물로 시험체에 투여될 수 있다. 대안으로, 병용 요법의 예방제 또는 치료제는 별개의 약학적 조성물로 시험체에 동시에 투여될 수 있다. 상기 예방제 또는 치료제는 동일한 또는 상이한 투여 경로를 통해 시험체에 투여될 수 있다.

[0219] 구체적 실시형태

[0220] 1. EU 인덱스 넘버링 시스템에 의해 정의되는, 항체 중쇄의 131~139번 영역 내의 시스템인 잔기에 대한 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 시스템인 조작 항체로서, 하나 이상의 유리 티올기를 포함하는 시스템인 조작 항체.

[0221] 2. 2개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 실시형태 1의 시스템인 조작 항체.

[0222] 3. 4개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 실시형태 1의 시스템인 조작 항체.

[0223] 4. 6개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 실시형태 1의 시스템인 조작 항체.

[0224] 5. 8개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 실시형태 1의 시스템인 조작 항체.

[0225] 6. 10개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 실시형태 1의 시스템인 조작 항체.

[0226] 7. 12개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 실시형태 1의 시스템인 조작 항체.

[0227] 8. 14개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 실시형태 1의 시스템인 조작 항체.

[0228] 9. 16개 이상의 유리 티올기를 포함하는 것인 실시형태 1의 시스템인 조작 항체.

[0229] 10. 치환된 아미노산이, EU 인덱스 넘버링 시스템에 따라, 항체 중쇄의 131번, 132번, 134번, 135번, 136번 및 139번으로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 1의 시스템인 조작 항체.

[0230] 11. Fab 또는 Fab₂ 포맷의 항체 단편인 실시형태 1 내지 10 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0231] 12. 하나 이상의 비자연 발생 디설파이드 결합의 형성을 포함하는 것인 실시형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0232] 13. 특정 표적에 대한 결합 친화력이 시스템인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 큰 것인 실시형태 1 내지 12 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0233] 14. 특정 표적에 대한 친화력이 시스템인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 작은 것인 실시형태 1 내지 13 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0234] 15. 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 친화력이 시스템인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 큰 것인 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0235] 16. 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 시스템인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 높은 수준으로 유도하는 것인 실시형태 1 내지 15 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0236] 17. 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 시스템인 조작 전의 항체에 비해 더 낮은 수준으로 유도하는 것인 실시형태 1 내지 15 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0237] 18. 항체 의존성 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 시스템인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 높은 수준으로 유도하는 것인 실시형태 1 내지 17 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0238] 19. 항체 의존성 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 시스템인 조작 전의 항체에 비해 더 낮은 수준으로 유도하는 것

인 실시형태 1 내지 17 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

- [0239] 20. 단편화 및/또는 응집화 프로파일로 측정된 안정성이 시스템인 조작 전의 항체와 동일하거나 더 높은 수준인 실시형태 1 내지 19 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.
- [0240] 21. 단편화 및/또는 응집화 프로파일로 측정된 안정성이 시스템인 조작 전의 항체에 비해 더 낮은 수준인 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.
- [0241] 22. 반감기가 시스템인 조작 전의 항체에 비해 감소된 것인 실시형태 1 내지 21 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.
- [0242] 23. 상기 유리 티올기는 세포독성제, 화학요법제, 독소, 방사성 핵종, DNA, RNA, siRNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 비천연 아미노산, 펩티드, 효소, 형광 태그 또는 바이오틴에 대한 화학적 접합이 가능한 것인 실시형태 1 내지 22 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.
- [0243] 24. 상기 세포독성제가 항류불린제, DNA 소홈(minor groove) 결합제, 항-미트메이탄사노이드 및 아우리스타틴으로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 23의 시스템인 조작 항체.
- [0244] 25. 상기 화학요법제가 탁솔, 파클리탁셀, 독소루비신, 메토크렉세이트, 돌라스타틴, 빈카 알칼로이드, 메토크렉세이트 및 듀오카마이신으로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 23의 시스템인 조작 항체.
- [0245] 26. 상기 독소가 아브린, 브루신, 시큐톡신, 디프테리아 독소, 보툴리눔 독소, 시가 독소, 내독소, 파상풍 독소, 백일해 독소, 탄저병 독소, 콜레라 독소, 팔카리놀, 알파 독소, 겔다나마이신, 겔로닌, 로타우스트랄린, 리신, 스트리크닌 및 테트라도톡신으로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 23의 시스템인 조작 항체.
- [0246] 27. 상기 방사성 핵종이 크롬(^{51}Cr), 코발트(^{57}Co), 불소(^{18}F), 가돌리늄(^{153}Gd , ^{159}Gd), 게르마늄(^{68}Ge), 홀름(^{166}Ho), 인듐(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), 요오드(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 란탄(^{140}La), 루테튬(^{177}Lu), 망간(^{54}Mn), 몰리브덴(^{99}Mo), 팔라듐(^{103}Pd), 인(^{32}P), 프라세오디뮴(^{142}Pr), 프로메튬(^{149}Pm), 레늄(^{186}Re , ^{188}Re), 로듐(^{105}Rh), 루테튬(^{97}Ru), 사마륨(^{153}Sm), 스칸듐(^{47}Sc), 셀레늄(^{75}Se), 스트론튬(^{85}Sr), 황(^{35}S), 테크네튬(^{99}Tc), 티튬(^{201}Ti), 주석(^{113}Sn , ^{117}Sn), 트리튬(^3H), 크세논(^{133}Xe), 이터븀(^{169}Yb , ^{175}Yb), 이트륨(^{90}Y) 및 아연(^{65}Zn)으로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 23의 시스템인 조작 항체.
- [0247] 28. 내재화 항체인 실시형태 23의 시스템인 조작 항체.
- [0248] 29. 단일클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 이중 특이적 항체 또는 다중 특이적 항체인 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.
- [0249] 30. 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산.
- [0250] 31. 실시형태 30의 핵산을 포함하는 벡터.
- [0251] 32. 실시형태 31의 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0252] 33. 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체의 항체 접합체.
- [0253] 34. 실시형태 33의 항체 접합체를 포함하는 약학적 조성물.
- [0254] 35. 필요로 하는 피험체에서 암, 자가면역, 염증성 또는 감염성 질병 또는 질환을 검출하는 방법으로서, 실시형태 34의 조성물을 상기 피험체에 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0255] 36. 상기 질병 또는 질환은 상기 항체 접합체가 결합하는 세포 표면 항원을 과발현하는 세포를 포함하는 것인 실시형태 35의 방법.
- [0256] 37. 표적 세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 상기 세포를 유효량의 실시형태 33의 항체 접합체와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.
- [0257] 38. 피험체에서 표적 세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 유효량의 실시형태 34의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0258] 39. 상기 표적 세포는 상기 항체 접합체가 결합하는 세포 표면 항원을 과발현하는 것인 실시형태 37 또는 38의

방법.

- [0259] 40. 필요로 하는 피험체에서 암, 자가면역, 염증성 또는 감염성 질병 또는 질환을 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의 실시형태 34의 조성물을 상기 피험체에 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0260] 41. 상기 질병 또는 질환은 상기 항체 접합체가 결합하는 세포 표면 항원을 과발현하는 세포를 포함하는 것인 실시형태 40의 방법.
- [0261] 42. 상기 질병과 관련된 세포를 사멸시키거나 상기 세포의 증식 속도를 감소시키는 것을 포함하는 것인 실시형태 40의 방법.
- [0262] 43. B 세포 또는 T 세포를 고갈시키는 것을 포함하는 것인 실시형태 40의 방법.
- [0263] 44. 추가적인 치료를 실시하는 것을 포함하며, 상기 추가적인 치료는 화학요법, 생물학적 요법, 면역요법, 방사선 요법, 호르몬 요법 및 수술로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 40의 방법.
- [0264] 45. 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체에 이중성 분자를 효율적으로 접합시키는 방법.
- [0265] 46. 상기 이중성 분자를 상기 항체의 CH1 도메인의 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번 및 139번으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치에 접합시키는 것을 포함하는 것인 실시형태 45의 방법.
- [0266] 47. 상기 이중성 분자가 세포독성제, 화학요법제, 독소, 방사성 핵종, DNA, RNA, siRNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 펩티드, 효소, 형광 태그 또는 바이오틴으로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 45 또는 46의 방법.
- [0267] 48. 상기 세포독성제가 항류불린제, DNA 소름 결합제, 항-미트메이탄사노이드 및 아우리스타틴으로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 47의 방법.
- [0268] 49. 상기 화학요법제가 탁솔, 파클리탁셀, 독소루비신, 메토트렉세이트, 돌라스타틴, 빈카 알칼로이드 및 메토트렉세이트로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 47의 방법.
- [0269] 50. 상기 독소가 아브린, 브루신, 시큐톡신, 디프테리아 독소, 보툴리눔 독소, 시가 독소, 내독소, 과상풍 독소, 백일해 독소, 탄저병 독소, 콜레라 독소, 팔카리놀, 알파 독소, 겔다나마이신, 겔로닌, 로타우스트랄린, 리신, 스트리크닌 및 테트라도톡신으로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 47의 방법.
- [0270] 51. 상기 방사성 핵종이 크롬(^{51}Cr), 코발트(^{57}Co), 불소(^{18}F), 가돌리늄(^{153}Gd , ^{159}Gd), 게르마늄(^{68}Ge), 홀뮴(^{166}Ho), 인듐(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), 요오드(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 란탄(^{140}La), 루테튬(^{177}Lu), 망간(^{54}Mn), 몰리브덴(^{99}Mo), 팔라듐(^{103}Pd), 인(^{32}P), 프라세오디뮴(^{142}Pr), 프로메튬(^{149}Pm), 레늄(^{186}Re , ^{188}Re), 로듐(^{105}Rh), 루테튬(^{97}Ru), 사마륨(^{153}Sm), 스칸듐(^{47}Sc), 셀레늄(^{75}Se), 스트론튬(^{85}Sr), 황(^{35}S), 테크네튬(^{99}Tc), 티타늄(^{201}Ti), 주석(^{113}Sn , ^{117}Sn), 트리튬(^3H), 크세논(^{133}Xe), 이터븀(^{169}Yb , ^{175}Yb), 이트륨(^{90}Y) 및 아연(^{65}Zn)으로 구성된 군에서 선택되는 것인 실시형태 47의 방법.
- [0271] 52. 상기 효율이 접합 반응 후에 남아있는 잔류 유리 티올기로 측정할 때 적어도 5% 이상인 실시형태 45 내지 51 중 어느 하나의 방법.
- [0272] 53. 상기 효율이 접합 반응 후에 남아있는 잔류 유리 티올기로 측정할 때 적어도 25% 이상인 실시형태 45 내지 52 중 어느 하나의 방법.
- [0273] 54. 상기 효율이 접합 반응 후에 남아있는 잔류 유리 티올기로 측정할 때 적어도 75% 이상인 실시형태 45 내지 53 중 어느 하나의 방법.
- [0274] 55. 132번 및/또는 138번 위치의 시스템에 대한 치환을 포함하지 않는 것인 실시형태 1 내지 29 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.
- [0275] 56. 132번 및/또는 138번 위치에서의 치환을 포함하며, 상기 치환은 시스템이 아닌 것인 실시형태 1 내지 29 또는 55 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.
- [0276] 57. 131~139번 루프 영역의 하나 이상의 확장을 포함하는 것인 실시형태 1 내지 29, 55 또는 56 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.
- [0277] 58. 131~139번 루프 영역의 확장을 포함하고, 상기 확장이 적어도 1개 내지 적어도 15개 아미노산의 삽입을 포

함하는 것인 실시형태 1 내지 29 또는 55 내지 57 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0278] 59. 131~139번 루프 영역의 확장을 포함하고, 상기 확장이 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 잔기로 구성된 군에서 선택되는 위치 다음에 발생하는 것인 실시형태 1 내지 29 또는 55 내지 58 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0279] 60. 131~139번 루프 영역의 확장을 포함하고, 상기 확장이 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 잔기로 구성된 군에서 선택되는 위치 다음에 발생하는 것인 실시형태 1 내지 29 또는 55 내지 59 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0280] 61. 131~139번 루프 영역의 적어도 제1 및 제2 확장을 포함하고, 상기 제1 확장은 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 잔기로 구성된 군에서 선택되는 위치 다음에 발생하고, 상기 제2 확장은 상기 제1 확장 다음에 발생하며, 상기 제2 확장은 131번, 132번, 133번, 134번, 135번, 136번, 137번, 138번 및 139번 잔기로 구성된 군에서 선택되는 위치 다음에 발생하는 것인 실시형태 1 내지 29 또는 55 내지 69 중 어느 하나의 시스템인 조작 항체.

[0281] 균등물

[0282] 상기에 기재된 명세서에는 당업자가 본 발명을 실시하기에 충분한 것으로 생각된다. 전술한 상세한 설명 및 실시예에는 본 발명의 바람직한 특정 실시형태를 상세히 기재하며 발명자들이 생각하는 최적의 형태를 기술한다. 그러나, 전술한 발명이 텍스트로 상세히 기재되어 있다 하더라도, 본 발명은 다수의 방식으로 실시될 수 있으며, 본 발명은 첨부된 특허청구범위 및 임의의 그 균등물에 따라 해석되어야 한다.

[0283] 특허, 특허 출원, 논문, 서적 등과 여기에 인용된 참고문헌을 비롯한 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 이들이 개별적으로 본원에 개시되어 있는 것과 같은 정도로 그 전체가 본원에 참조 인용된다.

[0284] 또한, 하기 미국 가특허 출원, 즉 제61/022,073호(2008년 1월 18일 출원)는 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조 인용된다.

[0285] 7. 실시예

[0286] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 참조하여 설명하고자 한다. 이들 실시예는 단지 예시를 위해 제시된 것으로, 본 발명이 이들 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본원에 제시된 교시로부터 명백해지는 임의의 모든 변형예를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0287] 7.1 실시예 1. 시스템인 조작 항체의 발현 및 특성 규명

[0288] IgG1 분자의 CH1 도메인의 131~139번 영역에 세린 또는 트레오닌의 시스템인으로의 일련의 치환을 행하였다. 시스템인 조작된 IgG1 분자는 생물학 분야의 당업자에게 공지된 표준 DNA 재조합 기법을 이용하여 생성하였다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, December 2000, Cold Spring Harbor Lab Press] 참조). IgG1 분자 내에 존재하는 CH1 도메인의 131~139번 영역은 용매에 노출되는 유연성 있는 영역에 해당한다(도 1a 참조). 이 영역이 나타내는 용매에의 노출은, 반응제가 특정 잔기에 접합될 수 있도록 접근을 허용한다. IgG1의 CH1 도메인의 131~139번의 동등한 위치에 해당하는 다른 각종 항체 포맷의 서열 정렬이 도 1c에 제시되어 있다. 이 영역에 포함된 세린 및/또는 트레오닌 잔기가 시스템인 잔기로 치환되는 특정 후보 아미노산이다.

[0289] 시스템인 조작 항체 기법의 일례가 도 1b에 제시된다. 예상 디설파이드 결합쌍 패턴(실선)과 함께 이 서열 내의 천연 시스템인 잔기가 볼드체로 표시되어 있다. 131번 위치의 세린 잔기의 시스템인 치환 위치는 밑줄로 표시하였다. 이러한 도입된 시스템인을 포함하는 잠재적 디설파이드 결합은 점선으로 표시되어 있다.

[0290] 도 2a에는, 1C1 야생형 및 시스템인 조작된 이의 유도체를 발현시키고 정제하여 PAGE 분석을 실시한 결과가 도시된다. 1C1 야생형(레인 1) 항체 및 다양한 시스템인 조작된 이의 유도체(레인 2~15)는 비환원(i) 및 환원(ii) 조건 하에 매우 유사한 분자량 프로파일을 나타내었다.

[0291] 도 2b에는, 1C1 wt와 1C1 Ser131Cys 돌연변이체의 비환원 펩티드 맵핑을 비교한 것이다. 이 실시예에서는, 야생형 및 시스템인 조작된 1C1 및 1C6 항체에서의 디설파이드 결합 패턴 및 유리 시스템인 잔기를 규명하기 위해, 제한된 단백질 분해 및 역상 크로마토그래피(RP-LC/MS)가 이용되었다.

[0292] 재료 및 방법: 비환원 펩티드 맵핑. MAbs를 실온에서 산성 완충액 중 5 mM N-에틸말레이미드(NEM)로 20분 동안

캡핑한 후, 37°C에서 10 mM 인산염 완충액, 250 mM NaCl, 6 M 구아니딘(pH 7.0) 중에서 30분 동안 변성시켰다. 그 후, 변성된 Mab 용액을 100 mM 인산염 완충액, 0.1 mM EDTA(pH 7.0)로 6배 희석시켰다. 엔도캡티다제 Lys-C를 효소 대 단백질 비가 1:10이 되도록 첨가하였다. 반응 혼합물을 37°C에서 16~24 시간 동안 항온처리하였다. 이 반응 혼합물 절반을, 5~10 μ l의 500 mM DTT를 첨가하여 환원시키고 37°C에서 15분 동안 항온처리하였다. 비환원 분해물과 환원 분해물 둘 다 LC/MS로 분석하였다. HPLC 분리는 역상 HPLC(Phenomenex Jupiter 5m C18 컬럼; 250 x 2 mm)를 이용하여 수행하였고, UV 검출기 및 온라인 LTQ 이온 트랩 질량 분광광도계(Thermo Fisher)로 검출하였다. RP-HPLC 이동상 A는 H₂O 중 0.1% TFA였고, 이동상 B는 아세토니트릴 중 0.1% TFA였다. 유량은 0.2 mL/min이고, 구배는 150분 동안 0%→60% B였다. 전기분무 간섭을 갖는 LTQ 이온 트랩 질량 분광광도계를 300~2000의 m/z 범위로 양이온 모드로 작동시켰다. 펩티드 맵의 각각의 피크는 MS 풀 스캔 및 줌 스캔 분석으로 확인하였다. 또한, 펩티드 서열을 확인하기 위해 MS/MS 스펙트럼을 수집하였다. 디설파이드 결합 연결은 LC-MS 실험으로부터의 펩티드 질량에 의해 결정하고, 환원 분해물과 비환원 분해물의 펩티드 맵을 비교함으로써 검증하였다. 유리 티올 함유 펩티드는 NEM 부가물을 갖는 펩티드 질량을 검색함으로써 확인하였다.

[0293] 결과: 1C1은 IgG1 서브클래스의 EphA2 특이적 항체이다. 도 2b의 A는 중쇄 힌지 영역과 경쇄 C 말단(H11-L15)과 Ser131을 포함하는 펩티드(H5) 사이의 정규형 디설파이드 결합 연결을 보여주는 1C1 WT 항체이다. 도 2b의 B는, 경쇄 및 중쇄 (H11-L15)와 1C1 wt 펩티드 H5 사이의 정규형 디설파이드 결합의 감소와, 경쇄 C 말단(H5m-L15)에 대한 돌연변이된 시스테인과 힌지 영역(H5m-H11)에 대한 돌연변이된 시스테인 사이의 새로 형성된 디설파이드 결합 연결의 출현을 보여주는 1C1 Ser131Cys 돌연변이체이다. 상기에 기재된 방법을 이용하여, 본 발명자들은 1C1, 1C1 Ser131Cys 및 다른 돌연변이체에 대한 디설파이드 결합 연결을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 1C1 Ser131Cys 항체가 경쇄와 중쇄 사이에 새로운 쇠간 디설파이드 가교를 형성하며, 중쇄의 220번 위치의 시스테인은 부위 특이적 약물 접합에 자유롭다는 것을 확인하였다. 상기 방법을 이용하여 유리 티올도 확인하였다. 다른 시스테인 조작 항체에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 제시되지 않음).

[0294] 도 3에는, 1C6(EphB4 특이적 항체) 야생형(A) 및 1C6 Ser131Cys 항체의 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석의 결과를 보여주는 플롯이 도시되어 있다. 크기 배제 크로마토그래피는 그 본래의 상태로 분자(예를 들어, 단백질)의 겔보기 분자량을 측정하기 위한 당업계에 잘 알려져 있는 방법이다. 이 실시예에서는, 정제된 항체 1C6 야생형(A) 또는 1C6 Ser131Cys(B)를 100 mM 황산나트륨, 100 mM 인산나트륨을 함유하는 완충액(pH 6.8) 중에서 SEC 컬럼(TSK-GEL G3000SWXL)에 로딩하였다. 이 컬럼을 1 ml/min의 유량으로 러닝시켰다. 겔보기 분자량의 측정을 위해 포함된 보정 표준은 하기를 포함하였다: 티로글로불린(670 kDa), 소 감마-글로불린(158 kDa), 닭 난알부민(44 kDa), 말 마이오글로빈(17 kDa) 및 비타민 B12(1.35 kDa). 패널(A 및 B)에 제시된 매우 유사한 기록선에 의해 입증되는 바와 같이, 1C6 야생형 및 1C6 1Ser131Cys은 단량체 상태로 존재한다. 다른 시스테인 조작 항체에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 제시되지 않음).

[0295] 도 4에는, 1C1 야생형(A) 1C1 Ser134Cys(B), 1C1 Ser131-132Cys(C) 및 1C1 Ser131-132-134-136Cys(D) 항체의 크기 배제 크로마토그래피(SEC)의 결과를 보여주는 플롯이 도시되어 있다. 크기 배제 크로마토그래피는 상기한 바와 같이 수행하였다. 패널(A~D)에 제시된 매우 유사한 기록선에 의해 입증되는 바와 같이, 1C1 야생형 및 이들의 각종 시스테인 조작된 돌연변이체는 단량체 상태로 존재한다. 다른 시스테인 조작 항체에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 제시되지 않음).

[0296] 7.2 실시예 2. 시스테인 조작 항체의 에피토프 결합 특성 규명

[0297] 이 실시예에서는, 시스테인 조작 항체의 결합 특성을 모 야생형 항체와 비교하였다.

[0298] 재료 및 방법: 결합 분석은 1× PBS 중 1% BSA에서 수행하였다. 모든 항온처리 단계는 실온에서 6.5의 진탕 속도로 Lab-Line 장치 역가 플레이트 진탕기를 사용하여 수행하였다. 바이오틴화 EphB4 또는 EphA2 및 루테튬 표지(BV 태그) 항인간 카파를 각각 스트렙타비딘 M280 비드 및 각각 1C6, 1C6 Ser131Cys 및 1C1 및 1C1 Ser131Cys의 계열 희석액과 함께 항온처리하였다. 수용체 및 항인간 카파 농도는 1 μ g/ml였고, 항체 농도는 1 μ g/ml~7.8 ng/ml였다. 특이적 결합은 Bioveris M 시리즈 분석기를 사용하여 표출시켰다. 기계는 플레이트로부터 혼합물을 흡출하여 전자석 위로 흘러 보낸다. M280 비드는 플레이트에 부착하고, 그 후 세척액은 비드 위로 흘러 임의의 비결합 항체 또는 수용체를 제거한다. 샌드위치로 루테튬 표지까지 이동하는 플랫폼에 정전하를 인가하여, 상기 표지가 빛을 발산하게 한다. 판독액은 최종 전자 역셉터로서 작용하여, 전하가 인가되는 동안 루테튬이 연속적으로 빛을 발산하게 된다. 그 후, 전자석을 탈착하고, 샘플을 세척하였다. 세척 및 판독은 기계로 자동적으로 수행하였으며, 웰 간에 일관성이 있었다.

[0299] 결과: 이 실시예에서는, 정제된 항체, 즉 1C6 WT 및 1C6 Ser131Cys에 대해 ELISA(용액 포맷)에 기초한 항원 결

합 분석을 수행하였다. 이들 항체는 EphB4 수용체를 특이적으로 인식한다. 도 5에서 입증되는 바와 같이, WT 항체 및 시스테인 조작된 Ser131Cys 항체의 ELISA 포맷에서 측정된 결합 친화력 프로파일은 매우 유사하였다. 마찬가지로, 1C1 기반 시스테인 조작 항체의 경우, 1C1 야생형 및 1C1 Ser131Cys 항체에 대해 ELISA 포맷에서 측정된 결합 친화력 프로파일은 매우 유사하였다(도 6 참조). 1 mM DTT와 같은 환원제를 포함시킨 것은 시스테인 조작 항체 1C1 Ser131Cys에 의해 나타나는 결합 프로파일에 영향을 주지 않았다. 다른 시스테인 조작 항체에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 제시되지 않음). 이러한 결과는 CH1 도메인으로의 시스테인 잔기의 도입 조작이 모 항체에 비해 얻어진 항체의 에피토프 결합 특성을 변경하지 않음을 입증한다.

7.3 실시예 3. 시스테인 조작 항체의 안정성 특성 규명

이 실시예에서는, 모(야생형) 항체의 용융 온도(T_m)를 시스테인 조작 항체와 비교한다.

재료 및 방법: 야생형 항체와 시스테인 조작 항체의 용융 온도(T_m)를 측정하기 위해 시차 주사 열량분석(DSC)을 이용하였다. T_m은 항체의 안정성을 나타내는 것으로서, 높은 T_m은 높은 안정성과 관련이 있고 항체를 응집시키지 않는다. DSC 실험은 10~110°C 범위의 온도의 함수로서 본 발명에서 조사된 항체(야생형 항체 및 시스테인 조작 항체)의 열 용량을 측정하였다. DSC 측정은 Microcal VP-DSC 초민감 주사 미세열량계를 사용하여 수행하였다. DSC 실험은 25 mM 히스티딘-HCl(pH 6), 5 mM EDTA 중에서 수행하였다. DSC에 사용되는 모든 용액과 샘플을 0.22 마이크론 필터를 사용하여 여과하고 열량계에 로딩하기 직전에 탈기하였다. 각각의 측정 세트를 위해, 먼저 완충액 대 베이스라인 런을 얻었다. 그 직후, 샘플 셀로부터 완충액을 제거하였다. 샘플 셀에 0.5~1 mg/ml 농도의 항체(야생형 항체 및 시스테인 조작 항체) 용액 0.5 ml를 로딩하였다. 측정 중에, 참조 셀에 샘플 완충액을 충전하였다. 각각의 샘플 대 완충액 실험으로부터, 상응하는 완충액 대 완충액 베이스라인 런을 뺐다. 미가공 데이터를 농도 및 주사 속도에 대해 정규화하였다. 이 데이터를 Microcal이 제공하는 Origin DSC 소프트웨어를 사용하여 피팅하였다. DSC 실험은 (EZ-링크 바이오틴-HPDP(Pierce)) 및 Z-링크 요오도아세틸-PEO2 바이오틴과) 접합된 항체에 대해서도 수행하였으며, 야생형 항체와 시스테인 조작 항체에 대해 유사한 온도기록도가 얻어졌다.

결과: 이 실시예에서는, 각종 야생형 항체 및 시스테인 조작 항체의 용융 곡선을 결정하기 위해 시차 주사 열량분석(DSC)을 이용하였다. 도 7에는, 1C6 WT 항체(A) 및 1C6 Ser131Cys 항체(B)의 시차 주사 열량분석(DSC) 온도기록도가 도시된다. 두 항체 모두 각각 70°C 및 69°C의 매우 유사한 용융 온도(T_m)를 나타낸다. 도 8에는, 1C1 WT(A), 1C1 Ser131Cys(B), 1C1 Ser134Cys(C), 1C1 Ser(131-132)Cys(D), 및 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys 항체의 시차 주사 열량분석(DSC) 온도기록도가 도시된다. 모든 항체가 매우 유사한 용융 온도(T_m)를 나타낸다. 다른 시스테인 조작 항체에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 제시되지 않음). 이러한 결과는 CH1 도메인으로의 시스테인 잔기의 도입 조작이 얻어진 항체의 안정성을 변경하지 않음을 입증한다.

7.4 실시예 4. 시스테인 조작 항체의 바이오틴 접합

이 실시예에서는, 증가된 바이오틴 도입에 의해, 시스테인 조작 항체 상의 유리 접합 부위를 입증한다.

재료 및 방법: Pierce로부터 EZ-링크 바이오틴-HPDP(접합 반응제 1 = CR1) 및 EZ-링크 요오도아세틸-PEO2 바이오틴(접합 반응제 2 = CR2)을 얻었다. 야생형 항체와 시스테인 조작 항체를 질소 하에 100 mM 인산염 완충액, 100 mM NaCl(pH 8.0), 0.02 mM DTT, 5 mM EDTA 중에서 37°C에서 3시간 동안 항온처리하였다. 이러한 항온처리 후, 질소 하에 1PBS 1×, 1 mM EDTA에서의 투석을 이용하여 항체 샘플을 완충액 교환하였다. CR1을 100% DMSO 중 2 mg/ml로 용해시키고, CR2를 증류수에 용해시켰다. 7 µg/ml의 접합 반응제 및 0.5 mg/ml의 야생형 및 ser131Cys 항체를 개별적으로 혼합하고 볼텍스로 진탕시킨 후 40°C, 37°C, 45°C 및 55°C에서 90분 동안 항온처리하였다. SEC(크기 배제 크로마토그래피) 또는 탈염 컬럼(ZEBA, Pierce로부터 입수한 탈염 스핀 컬럼)을 이용하여 비결합 CR1 및 CR2를 제거하였다. 바이오틴 도입물은 스트렙타비딘 결합 분석을 이용하여 측정하였다. 이 결합 분석은 1× PBS 중 1% BSA에서 수행하였으며, 모든 항온처리 단계는 실온에서 6.5의 진탕 속도로 Lab-Line 장치 역가 플레이트 진탕기를 사용하여 수행하였다. 스트렙타비딘 M280 비드 및 루테륨(BV 태그) 표지 항인간 카파를 각각 바이오틴화 Ser131Cys 및 야생형 항체의 계열 희석액과 혼합하였다. 모든 인간 카파 농도는 1 µg/ml였고, 항체 농도는 1 µg/ml~7.8 ng/ml였다. 특이적 결합은 Bioveris M-시리즈 분석기를 사용하여 평가하였다.

결과: 도 9에는, 다양한 조건 하에서의 1C6(WT) 항체 및 1C6 Ser131Cys(Mut) 항체의 바이오틴 접합 연구로부터 얻은 결과가 도시된다. 패널 A에서는, 1C6 및 1C6 Ser131Cys 항체에 대해 다양한 온도(4°C, 37°C, 45°C 및 55°C)에서 EZ-링크 바이오틴-HPDP(Pierce)과의 접합 반응을 수행하였다. 얻어진 잠재적 부위 특이적 바이오틴

접합 효율을 측정하고, 그래프를 작도하였다. 1C6 Ser131Cys 항체는 1C6 항체보다 부위 특이적 바이오틴 접합 효율이 더 컸다. 패널 B에서는, 1C6 및 1C6Ser131 Cys 항체에 대해 다양한 온도(4℃, 37℃, 45℃ 및 55℃)에서 EZ-링크 요오도아세틸-PEO2 바이오틴와의 접합 반응을 수행하였다. 얻어진 바이오틴 접합 효율을 측정하고, 그래프를 작도하였다. 1C6 Ser131Cys 항체는 1C6 항체보다 부위 특이적 바이오틴 접합 효율이 더 컸다. 이러한 결과는 1C3 Ser131Cys 항체와 같은 시스테인 조작 항체가 다양한 제제에 접합(예를 들어, 바이오틴에의 접합)이 가능함을 입증한다.

[0308] **7.5 실시예 5. 시스테인 조작 항체에 의해 나타나는 Fc γ 수용체에 대한 결합 친화력 특성 규명**

[0309] 이 실시예에서는, 시스테인 조작 항체에 의해 나타나는 Fc γ 수용체에 특이적인 결합 특성을 야생형 항체와 비교하였다.

[0310] 재료 및 방법: BIAcore®

3000 장치(Biacore International) 및 표준 프로토콜을 이용하여 BIAcore®

실험을 수행하였다. 요약하면, 7444 RU(공명 단위)의 1C1-wt 및 7781 RU의 1C1 Ser131Cys를 표준 아민 커플링 키트를 사용하여 CM5 센서 칩(Pharmacia Biosensor)의 텍스트란 매트릭스에 커플링하였다. 1.0 M 에탄올아민 염산염(pH 8.5) 70 μ l를 주입하여 과잉 반응성 에스테르를 쉐킹하였다. Fc γ R(I, IIA, IIIA, IIB)를 5 μ l/min의 유량으로 500 nM로 주입하였다. Fc γ R의 결합 수준은 1C1 야생형 및 1C1 Ser131Cys과 유사하다. 난알부민을 음성 대조군으로 사용하였다. 결합 실험 후, 1C1 야생형 및 1C1 Ser131Cys 돌연변이체에 대한 센서 칩 표면을 1 M NaCl/50 mM NaOH을 사용하여 재생하였다. 재생된 표면 칩을 이용하여, 0.05% Tween 20을 함유하는 50 mM 완충액(pH 6.0) 또는 0.05% Tween 20을 함유하는 50 mM 완충액(pH 7.4)에서 인간 FcRn에의 결합을 측정하였다. 인간 FcRn을 함유하는 용액을 5 μ l/min으로 센서 칩에 흘려 보냈다. 야생형과 돌연변이체 둘 다의 결합 수준은 유사하였다. 난알부민을 음성 대조군으로 사용하였다.

[0311] 결과: 도 10에는, 다양한 Fc γ 수용체에 대한 1C1 WT 및 1C1 Ser131Cys 항체의 상대 친화력을 측정하는 BIAcore®

분석으로부터 얻은 결과가 도시된다. 조사된 다양한 Fc γ 수용체는 Fc γ RI(A), Fc γ RIIA(B), Fc γ RIIA(C), Fc γ RIIB(D)였다. 1C1 WT 및 1C1 Ser131Cys 항체는 다양한 Fc γ 수용체에 대해 매우 유사한 결합 친화력을 나타낸다. 또한, 도 11에는, pH 6.0 및 pH 7.4에서 FcRn 수용체에 대한 1C1 WT 및 1C1 Ser131Cys 항체의 상대 친화력을 측정하는 BIAcore®

분석으로부터 얻은 결과가 도시된다. 1C1 Ser131Cys 항체는 pH 6.0 및 pH 7.4 둘 다에서 1C1 WT 항체와 유사한 결합 프로파일로 FcRn 수용체에 결합한다. 테스트된 다른 시스테인 조작 항체에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다. 이러한 결과는 항체의 CH1 도메인으로의 시스테인 잔기의 도입 조작이 Fc γ 수용체에 대한 결합 친화력에 영향을 주지 않으며, 따라서 이펙터 기능을 제어하는 능력에도 영향을 주지 않음을 입증한다.

[0312] **7.6 실시예 6. 시스테인 조작 항체의 내재화**

[0313] 이 실시예에서는, 시스테인 조작 항체를, 세포 표면 항원에 결합할 때 내재화되는 능력에 대해 테스트하였다.

[0314] 재료 및 방법: 내재화 분석은 96웰 U자형 바닥 플레이트를 사용하여 수행하였다. 10⁶ 개 세포/ml 농도의 PC3 세포(본질적으로 EphA2를 고도로 발현하는 PC3 세포)를 대조군 항체(R347), 1C1 야생형 항체 및 1C1 시스테인 조작 항체(모두 1 mg/ml)와 함께 얼음 속에서 30분 동안 항온처리하였다. 이러한 항온처리 후, 세포를 1× PBS로 2회 세척하였다. 그 후, 세포를 실온에서 3.7% 파라포름알데하이드로 20분 동안 고정하고, 1× PBS로 2회 세척하였다. 실온에서 세포를 1× PBS 중 0.5% Triton X-100으로 5분 동안 투과화 처리하고, 1× PBS로 2회 세척하였다. 1× PBS, 2% FBS 중 2차 항체(Alexa-Fluor 488 염소 항-인간 IgG(H-L) Molecular Probes #A 11013) 1 μ g을 세포에 첨가하고, 실온의 암소에서 30분 동안 항온처리하였다. 이러한 항온처리 후, 세포를 1× PBS로 2회 세척하고, 현미경 처리 슬라이드에 바로 코팅하였다. 그 후, DAPI 함유 마운팅 매질(DAPI를 함유한 VectaShield HardSet 마운팅 매질, Vector Laboratories #H-1500)을 사용하여, 세포를 현미경 커버슬립(커버슬립 VWR#48382-138) 아래에 마운팅하였다. 그 후, 슬라이드를 4℃에서 밤새 항온처리하고, 계속해서 Kikon Eclipse 55i 형광 현미경을 사용하여 가시화하였다.

[0315] 결과: 도 12에는, PC3 세포에 대해 수행된 항체 내재화 연구로부터 얻은 결과가 도시된다. 첫번째 패널에는 일

련의 대조군이 제시된다. (A)에서는, 비염색 세포가 DAPI로 대비염색된다. (B)에서는, 2차 항체로 염색된 세포가 DAPI로 대비염색된다. (C)에서는, 대조군 1차 항체 R347이 세포와 함께 항온처리되고 DAPI로 대비염색된다. (D)에서는, 세포가 1시간 동안 항온처리된 후, R347로 염색된다. 대조군 (A)~(D) 중 어느 것도 임의의 항체 특이적 세포 염색을 나타내지 않는다. (E)에서는, 세포가 0시간째와 1시간 동안 1C1 wt 항체와 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 WT 항체의 내재화를 나타낸다. (F)에서는, 세포가 0시간째와 1시간 동안 1C1 Ser131Cys 항체와 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 Ser131Cys 항체의 내재화를 나타낸다. (G)에서는, 세포가 0시간째와 1시간 동안 1C1 Ser134Cys 항체와 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 Ser134Cys 항체의 내재화를 나타낸다. (H)에서는, 세포가 0시간째와 1시간 동안 1C1 Ser(131-132)Cys 항체와 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 Ser(131-132)Cys 항체의 내재화를 나타낸다. (I)에서는, 세포가 0시간째와 1시간 동안 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys 항체와 항온처리된다. 1시간째의 2개의 대표 이미지는 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys 항체의 내재화를 나타낸다. 시스테인 조작 항체 모두가 야생형 항체와 비교할 때 유사한 정도로 내재화되었다. 이러한 결과는 항체의 내재화가 CH1 도메인으로의 시스테인 잔기의 도입 조작에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 입증한다.

7.7 실시예 7. 시스테인 조작 항체 내 유리 티올의 정량

이 실시예에서는, 시스테인 조작 항체 내 유리 티올을 측정하였다.

재료 및 방법: Ellman's DNTB 시약(DNTB: 5,5'-디티오-비스-(2-니트로벤조산)을 사용하여 항체 유리 설프하이드릴(-SH)기의 정량적 측정을 실시하였다. DNTB를 DMF에 25 mM로 용해시켰다. 이 화합물의 용액은, pH 8.0에서, 방출될 때, DNTB가 유리 설프하이드릴에 결합되면 412 nm의 가시광 범위에서 흡수하는, 측정 가능한 황색의 생성물(TNB; 흡광 계수 $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)을 생성한다. 접합에 이용된 방법과 동일한 방법을 이용하여 항체 샘플을 제조하였다. 야생형 항체와 시스테인 조작 항체 내의 설프하이드릴기는, 알고 있는 농도의, 시스테인과 같은 설프하이드릴 함유 화합물로 이루어진 표준 곡선에의 단순한 비교에 의해 추정하였다. 대안으로, 설프하이드릴기는 TNB의 흡광 계수를 이용하여 정량할 수 있는데, TNB는, DNTB가 유리 티올기에 결합할 때 방출되고, 그 양은 총 유리 설프하이드릴기와 직접적인 연관성이 있다. 25 mM 농도의 DNTB 사용 용액 20 μl 를 1 mg/ml 농도의 샘플 990 μl 에 희석시켰다. 블랭크 테스트 튜브용으로, 또, 시스테인 표준용으로(사용될 경우) 표준 농도 10 μM 로 동일 부피의 DNTB를 990 μl 의 샘플 완충액에 희석시켰다. DNTB와 샘플을 격렬히 혼합하고 37°C에서(실온에서) 15분 동안 항온처리하였다. 412 nm 및 280 nm에서의 흡광도는 Agilent 8453 UV-가시광선 분광광도계 및 50 μl 석영 큐벳을 사용하여 측정하였다. 항체 내에 존재하는 유리 티올을 산출하기 위해, 412 nm에서의 2회의 독립된 측정의 평균 흡광도를 $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (TNB의 흡광 계수)로 나누어 분석에서의 몰 농도를 구하고, 또한 항체의 몰 농도를 결정하였다. 유리 설프하이드릴은 TNB의 몰 농도를 용액 중의 항체 몰 농도로 나누어 산출하였다.

결과: 상기에 기재된 방법을 이용하여, 1C6 및 1C1 야생형 항체 및 1C6 및 1C1 Ser131Cys 항체에 대해 유리 티올 수 측정을 행하였다. Ellman's 시약 결합 결과에 대해 제시된 유리 티올 수를 나타내는 정수로 흡광도를 적분하여 얻은 데이터를 표 1에 제시하였다. 이 데이터는, 얻어진 시스테인 조작 항체가 예상대로 2개의 유리 티올(항체 이량체 내의 각각의 변형된 CH1 도메인마다 1개씩)을 나타낸다는 것을 입증한다. 다른 시스테인 조작 항체에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 제시되지 않음). 이러한 결과는 시스테인 조작 항체가 예상대로 유리 티올을 나타냄을 입증한다.

표 1

야생형 항체 및 시스테인 조작 항체 내 유리 티올기의 측정	
항체	유리 티올의 수
1C6 야생형	0
1C6 Ser131Cys	2
1C1 야생형	0
1C1 Ser131Cys	2

7.8 실시예 8. 시스테인 조작 항체 결합 특이성

이 실시예에서는, 다양한 시스테인 조작 항체의 결합 특이성을 시스테인 조작 전의 항체와 비교하여

측정하였다.

- [0323] 재료 및 방법: 이 실시예에서는, 1C1 유래의 다양한 시스테인 조작 항체의 EphA2에 대한 상대적 결합 특이성을 측정하기 위해 ELISA에 기초한 분석을 수행하였다. 재조합 마우스 EphA2-Fc를 ELISA 플레이트 상에 코팅하였다. 각각의 항체를 2 $\mu\text{g/ml}$ 로 제제화하여 HRP에 접합된 항카파 항체와의 결합에 대해 분석하였다. 이 데이터는 3회의 독립된 실험의 평균이다.
- [0324] 결과: 이 실험으로부터 얻은 결과가 도 13에 도시되어 있는데, 여기서 시스테인 조작 항체는 시스테인 조작 전의 야생형 1C1와 비교하여 EphA2에 대해 동등한 결합 특이성을 나타내었다. 2개의 비관련 항체(대조군 항체 1 및 2)의 사용은, EphA2에 대한 이러한 ELISA 실험의 특이성을 확인시켜 준다. 또한, 복수의 시스테인 잔기 치환은 그 동족 항원에 대한 항체의 결합 특이성을 변경하지 않는다. 이러한 결과는 항체의 시스테인 조작이 시스테인 조작 전의 항체와 비교하여 결합 특이성을 변경하지 않음을 입증한다.
- [0325] **7.9 실시예 9. 시스테인 조작 항체는 PEG에 접합될 수 있음**
- [0326] 이 실시예에서는, 다양한 시스테인 조작 항체를 말레이미드 링커를 통해 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 접합시켰다. 항체 상에 존재하는 조작된 유리 시스테인은 접합을 위한 유리 설프하이드릴기를 노출시키기 위해 탈캡핑을 요한다.
- [0327] 재료 및 방법: 전통적인 포유동물 일시적 발현을 이용하여 시스테인 항체 돌연변이체(1C1 WT, 1C1 Ser134Cys, 1C1 Ser131Cys 및 1C1 Ser132Cys-Ser134Cys 등)를 제조하였다. 정제 과정에서, 공기(산소)에 의한 시스테인 산화를 최소화하기 위해 샘플을 지속적으로 질소 기체류 하에 두었다. 모든 항체 정제 완충액은 유리 시스테인을 차단하거나 이에 결합할 수 있는 임의의 물질을 킬레이트할 수 있도록 25 mM 이상의 EDTA를 함유하였다. 모든 조작은 0.1 M 인산나트륨, 0.15 M NaCl, 0.025 M EDTA를 함유하는 접합 완충액(CB)(pH 7.2) 중에서 수행하였다. pH 7.2는 말레이미드-시스테인 접합의 특이성을 최대화하기에 최적이다. 접합 부분(말레이미드-PEG2000)은 매회 CB 중에서 새로 제조한다. 항체 돌연변이체를 10 mM 시스테인-HCl을 함유한 CB에서 일정한 회전 속도 하에 37°C로 30분 동안 항온처리하였다. 시스테인 처리 후, 상업적으로 입수할 수 있는 탈염 컬럼(Pierce로부터 구입한 Zeba 컬럼)을 이용하여, CB 중에서 단백질 탈염을 실시하여 유리 시스테인을 제거하였다. 탈염 후, 시스테인 항체 돌연변이체를 약 3 몰 과량의 접합 시약(이 경우 말레이미드-PEG2000, NOF North America Corporation으로부터 구입)과 함께 항온처리하였다. 접합은 37°C에서 2시간 동안 수행하였다. 접합 후, 과잉 말레이미드-PEG2000을 단백질 탈염으로 제거한다. 샘플을, SDS-PAGE에서 보이는 것과 같은 접합 중쇄 밴드/비접합 중쇄 밴드의 비를 밀도 측정으로 분석하여 모니터링하였다.
- [0328] 결과: 탈캡핑 및 시스테인 조작 항체의 말레이미드-PEG2000에의 접합을 SDS-PAGE로 분석한 결과가 도 14에 도시되어 있다. 접합은, PEG(레인 1~4, 9~12) 부재시의 항체에 해당하는 레인에서 관찰되는 밴딩 프로파일과 비교하여 PEG가 접합된 항체(레인 5~8, 13~16)에 해당하는 레인에서 관찰되는 바와 같와 분자량이 더 큰 것으로서 가시화되었다. 탈캡핑 반응 전의 시스테인 조작 항체(1C1 Ser134Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Ser132-134Cys)는 적지만 검출 가능한 수준의 PEG와의 접합을 나타낸다(레인 2~4, 6~8). 유리 시스테인에 의한 처리 후의 시스테인 조작 항체는 탈캡핑 반응 전의 시스테인 조작 항체(레인 2~4, 6~8)에 비해 더 높은 접합 수준(레인 10~12, 14~16)을 나타낸다. 비시스테인 처리 레인은 10 mM 유리 시스테인에 의한 시스테인 조작 항체의 처리와 비교하여 더 낮은 수준의 PEG화(더 큰 분자량의 밴드)를 나타낸다. 시스테인 조작 전의 항체를 함유하는 대조군 웰은 어느 조건에서도 검출 가능한 수준의 PEG화를 나타내지 않는다(레인 1, 5, 9 및 13). 이러한 결과는, 시스테인 조작 항체(1C1 Ser134Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Ser132-134Cys)가 부분적으로 캡핑된 유리 시스테인을 나타낸다는 것을 제시한다. 설프하이드릴기의 캡은 탈캡핑 반응에 의해 효율적으로 제거되어, 설프하이드릴기가 접합체에 대해 반응성이 되도록 유리시킨다.
- [0329] **7.10 실시예 10. 시스테인 조작 항체의 탈캡핑은 전체 항체 구조를 파괴하지 않음**
- [0330] 이 실시예에서는, 항체 구조의 전체적인 안정성을 측정할 목적으로 접합을 위한 유리 시스테인 잔기를 노출시키기 위해 다양한 시스테인 조작 항체를 탈캡핑하였다.
- [0331] 재료 및 방법: 이 실시예를 위한 탈캡핑 절차는 다음과 같았다: 모 항체 및 돌연변이체 항체를, PBS 1×(pH 7.4), 시스테인-HCl을 갖는 10 mM EDTA 중에서 일정한 회전 속도로 질소 기체 하에 75의 몰비(시스테인-HCl/항체)로 37°C에서 항온처리하였다. 완충액 교환 및 PBS 1×(pH 7.4), 10 mM EDTA 중에서의 하룻밤 투석 의해 과잉 시스테인-HCl을 제거하였다. 투석은 탈캡핑 시스테인의 산화가 최소화되도록 실온에서 질소 기체 하에 수행하였다. 항체 구조 온전성을 확인하기 위해 미처리 항체 및 탈캡핑 항체를 SDS-PAGE 전기영동으로 분석하였다.

- [0332] 결과: 시스테인 조작 항체 내의 비쌍형 시스테인을 유리시키기 위한 탈캡핑 프로토콜은 쇠간 디설파이드 결합을 파괴하지 않고, 따라서 전체 항체 구조를 파괴하지 않는다는 것을 입증하는, 이 실험으로부터의 결과가 도 15에 도시되어 있다. 미처리 레인 내지 동족체 처리 레인과 비교하여, 시스테인 조작 항체(1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Ser139Cys)는 SDS-PAGE 프로파일에서 어떠한 차이도 나타내지 않는데, 이는 항체가 시스테인 처리에 의해 환원되지 않았음을 제시한다. 또한, 대조군인 야생형 항체(레인 2, 8)도 SDS-PAGE 프로파일에서 어떠한 차이도 나타내지 않는데, 이는 탈캡핑 프로토콜 중과 후에 전체 항체 구조가 온전하게 유지됨을 제시하는 데이터를 추가로 보완한다.
- [0333] **7.11 실시예 11. 시스테인 조작 항체는 PEG-바이오틴에 접합될 수 있음**
- [0334] 이 실시예에서는, 다양한 시스테인 조작 항체를 말레이미드 링커를 통해 PEG-바이오틴에 접합시켰다.
- [0335] 재료 및 방법: 시스테인 조작 항체 및 야생형 대조군 항체를 상기에 제시된 바와 같이 제조하였다. 접합은, 말레이미드-PEG2-바이오틴을 사용하고 1:6의 몰비(말레이미드-PEG2-바이오틴/항체)를 이용하여 PBS 1×(pH 7.4), 10 mM EDTA 중에서 일정한 회전 속도로 37℃로 2시간 동안 수행하였다. 미반응 말레이미드-PEG2-바이오틴은 4℃로 PBS 1×(pH 7.4), 10 mM EDTA 중에서 광범위한 투석을 실시하여 제거하였다. 항체는 웨스턴 블롯 분석으로 분석하여 바이오틴에 대해 가시화하였다. 항체는 1 mg/ml의 농도로 존재하였다. 그러나, 5 mg/ml 이하의 항체 농도에서도 유사한 결과가 얻어졌다.
- [0336] 결과: 다양한 시스테인 조작 항체와의 바이오틴 접합 반응으로부터 얻은 결과가 도 16에 도시되어 있다. 레인 1은 유리 시스테인에 접합된 바이오틴과 함께 항체의 예상 크기를 가시화하기 위해 바이오틴으로 표지된 대조군 항체이다. 1C1 야생형 항체는 유리 시스테인의 부재로 인해 바이오틴 접합을 나타내지 않았다(레인 3). 다양한 시스테인 조작 항체(1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys 및 1C1 Thr139Cys)는 예상 분자량에서 바이오틴에 대해 효율적인 접합을 나타내었다(레인 4~7). 이러한 결과는 시스테인 조작 항체 1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys 및 1C1 Thr139Cys이 바이오틴에 접합 가능한 노출된 유리 시스테인을 나타낸다는 것을 입증한다.
- [0337] **7.12 실시예 12. 접합된 시스테인 조작 항체는 동족 항원에 대한 결합을 유지함**
- [0338] 이 실시예에서는, 바이오틴에 접합된 다양한 시스테인 조작 항체를, 대조군 비접합 항체에 비해 결합 특이성을 유지하는지에 대해 테스트하였다.
- [0339] 재료 및 방법: 시스테인 조작 항체를 실시예 11에 제시된 바와 같이 제조하였다. ELISA 플레이트를, 2 µg/ml로 코팅된 재조합에 의해 제조된 EphA2-FLAG로 준비하였다. 다양한 항체를 ELISA 플레이트와 함께 항온처리하고, 세척하고, HRP에 접합된 항스트렙타비딘으로 검출하였다.
- [0340] 결과: ELISA 플레이트 결합 실험으로부터 얻은 결과가 도 17에 도시되어 있는데, 여기에서는 바이오틴에 접합된 다양한 시스테인 조작 항체를 동족 항원 특이성의 유지에 대해 테스트하였다. 대조군 항체는 검출을 위한 접합된 바이오틴을 포함하고 있지 않기 때문에 플레이트 상에서 가시화될 수 없었다. 이 실험에서는, 바이오틴 접합 시스테인 조작 항체 1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys 및 1C1 Thr139Cys이 EphA2에 대한 결합을 유지하였다. 이러한 결과는 다양한 시스테인 조작 항체의 접합이 그 동족 항원에 대한 결합에 불리한 영향을 미치지 않는다는 것을 제시한다.
- [0341] **7.13 실시예 13. 시스테인 조작 항체에 대한 바이오틴 접합의 정량**
- [0342] 이 실시예에서는, 바이오틴에 접합된 다양한 시스테인 조작 항체에 대해 항체 분자당 바이오틴의 구체적 함량을 분석하였다.
- [0343] 재료 및 방법: 시스테인 조작 항체를 실시예 11에 제시된 바와 같이 제조하였다. 개개의 항체의 겔보기 질량을 측정하기 위해 표준 질량 분광분석 기법을 이용하였다. 비접합 항체와 접합 항체의 온전한 질량을 측정하였다. 비접합 질량과 접합 질량 간의 차이는 분광분석법으로 측정하였다. 2개의 바이오틴 분자의 예상 질량은 약 1051.24 Da이었으며, 비접합 질량과 접합 질량의 차이는 추가적인 바이오틴 분자를 반영할 수 있다.

표 2

[0344]

다양한 시스테인 조작 항체의 바이오틴 함량				
항체	비접합 질량(Da)	접합 질량(Da)	*D 질량(Da)	바이오틴 수
1C1 야생형 + 바이오틴	149440.7	149439.0	1.7	0
1C1 Ser134Cys + 바이오틴	149472.8	150527.0	1054.2	2
1C1 Thr135Cys + 바이오틴	149444.0	150497.0	1053.0	2
1C1 Ser136Cys + 바이오틴	149471.7	150533.0	1061.3	2
1C1 Thr139Cys + 바이오틴	149453.0	150511.0	1058.0	2

[0345]

결과: 바이오틴에 접합된 다양한 항체의 질량 분광분석으로부터 얻은 결과가 표 2에 제시된다. 1C1 야생형 항체 (바이오틴으로 처리되는 않은 경우에도)는 접합 질량과 비교한 비접합 질량에 유의적인 차이를 보이지 않아, 그 항체에 접합된 바이오틴 분자가 없음을 제시한다. 1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys 및 1C1 Thr139Cys은 모두 접합 질량과 비접합 질량 사이에 질량차를 나타낸다. 이러한 차이는 1051.24 Da의 2개의 바이오틴 분자의 예상 질량과 거의 같다. 따라서, 항체 중쇄의 동종이량체 성질로 인해, 각각의 항체의 중쇄에 있어서의 단일 시스테인 치환은, 생성된 항체 내에 2개 시스테인 잔기가 나타나는 것으로 이어진다는 점에 주목해야 한다.

[0346]

7.14 실시예 14. 시스테인 조작 항체와의 접합은 부위 특이적이며 매우 효율적임

[0347]

이 실시예에서는, 다양한 시스테인 조작 항체에 대한 바이오틴 접합의 효율 및 위치를 측정하였다.

[0348]

재료 및 방법: 시스테인 조작 항체를 실시예 11에 기재된 바와 같이 제조하였다. 바이오틴 접합 반응의 상대 위치 및 효율을 측정하기 위해 표준 펩티드 맵핑 기법을 이용하였다. 항체의 1차 서열에 기초하여, 이론 질량 및 펩티드 단편화 프로파일을 측정하였다. 이 이론 질량을 펩티드에 의해 나타나는 실측 질량과 비교하여 그 차이를 결정하였다. 특정 펩티드에 접합된 바이오틴 분자에 의해 나타나는 예상 질량 변화를 확인하였다. 또한, 바이오틴 함유 펩티드와 비접합 펩티드의 상대 강도를 접합 효율로서 결정하였다. 접합 효율 결과를 하기 표 3에 제시하였다.

표 3

[0349]

바이오틴과 접합된 다양한 시스테인 조작 항체의 접합 효율	
항체	접합 효율
1C1 야생형	0%
1C1 Ser134Cys	53%
1C1 Thr135Cys	48%
1C1 Ser136Cys	63%
1C1 Thr139Cys	70%

[0350]

결과: 바이오틴에 접합된 다양한 항체의 펩티드 맵핑 분석에서, 바이오틴이 접합된 특정 펩티드를 확인하였다. 구체적으로, 각각의 항체, 즉, 1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Thr139Cys에 대해, 바이오틴을 예상 비쌍형 시스테인에 접합시켰다. 또한, 접합 효율을 측정하기 위해 접합 바이오틴 및 비접합 바이오틴의 상대 비율을 분석하였다. 다양한 시스테인 조작 항체의 접합 효율을 표 3에 기재하였다. 야생형 항체는, 접합에 쉽게 이용될 수 있는 부위를 보유하고 있지 않기 때문에, 접합을 나타내지 않았다. 시스테인 조작 항체는 48%~70%의 바이오틴 접합 효율을 나타내었다. 이러한 데이터는 부위 특이적 접합이 다양한 시스테인 조작 항체에 있어 매우 높은 효율로 발생한다는 것을 입증한다.

[0351]

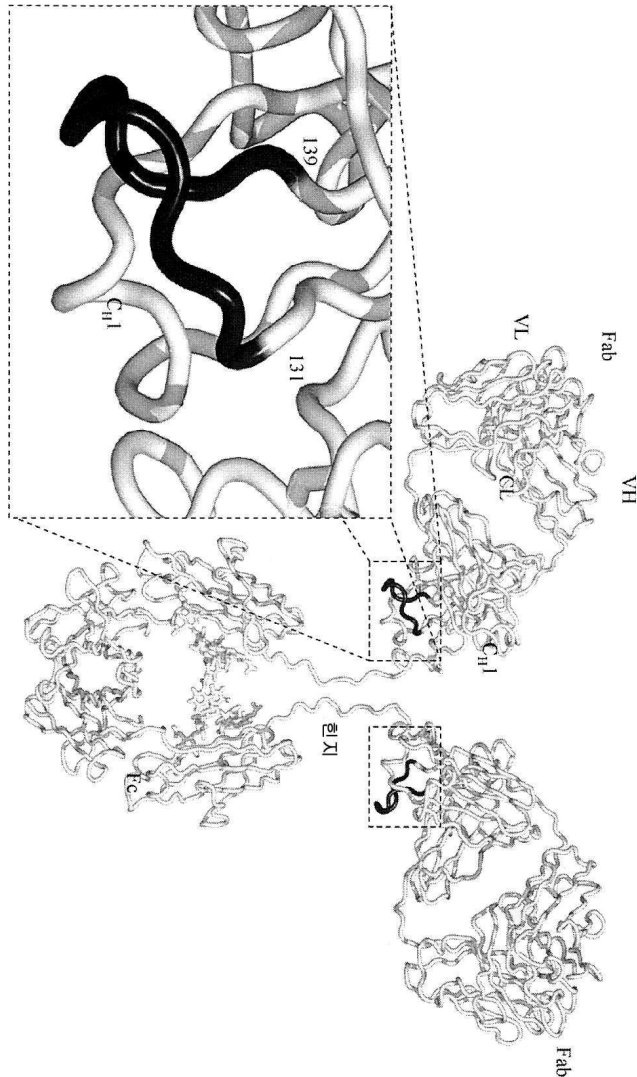
지금까지 본 발명을 명료성과 이해를 위해 어느 정도 상세히 기술하였지만, 당업자에게는 본 개시내용으로부터 본 발명의 진정한 범위를 벗어남이 없이 양태 및 세부사항에 있어서의 다양한 변경이 이루어질 수 있다는 것이 자명할 것이다. 예를 들어, 상기에 기재된 모든 기법 및 장치는 다양한 조합으로 이용될 수 있다. 본원에서 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 또는 기타 문헌은 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원 또는 기타 문헌이

모든 목적을 위해 개별적으로 참고 문헌으로 포함되는 것으로 기재된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참고 문헌으로 포함된다.

[0352] 본 출원은 2008년 1월 18일에 출원된 미국 가출원 제61/022,073호를 기초로 우선권의 이익을 주장하며, 상기 가출원은 그 전체가 본원에 참조 인용된다.

도면

도면1a



1C6 K 종재
서열 번호 1

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SALAWYQCKP GKAPELLID ASSLESQVPS RFSGSGSTD
 FILTISLQP EDFATYQCOQ FMSYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIERP SDEQLKSGTA SVVCLINNFY
 PREAKYQWKV DNALQSGNSQ ESVTEDQSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG ISSPYTKSFN
 RGEQC

1C6 중재
서열 번호 2

EVQLESGGG IVPQGGSLRL SCASGFTFS FYQGWWRQA PGKLEWVSY ISPSGGGTRKY ADSVKGRFTI
 SRDNRNTLY LQNNSLRAED TAVYGCARGG NLYSGYDPTL DYMGGGLVLT VSSASTKGPS VFPLAPCSKS
 TSGGTAALGC IWKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAYL QSSGLYSIST VVTVPSSSIG TOTYICNVNH
 KPSNTRVDKR VEPKSCDKTH TCEPCAPDEL LGSPSVFLFP EKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDEPVK
 FMWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLFVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAGQPR
 EFQVYTLFPS REEMTKQVS ITCLVKGFYP SDIAWEMSN GQENNYYKTT PVLDSDSGF FLYSKLTVDK
 SRWQGNVFS CSVMHEALHN HYLQKSLSTS PGK

정규화 1001 채간 디선파이드 결합

"새로운" 1001 채간 디선파이드 결합

도면1b

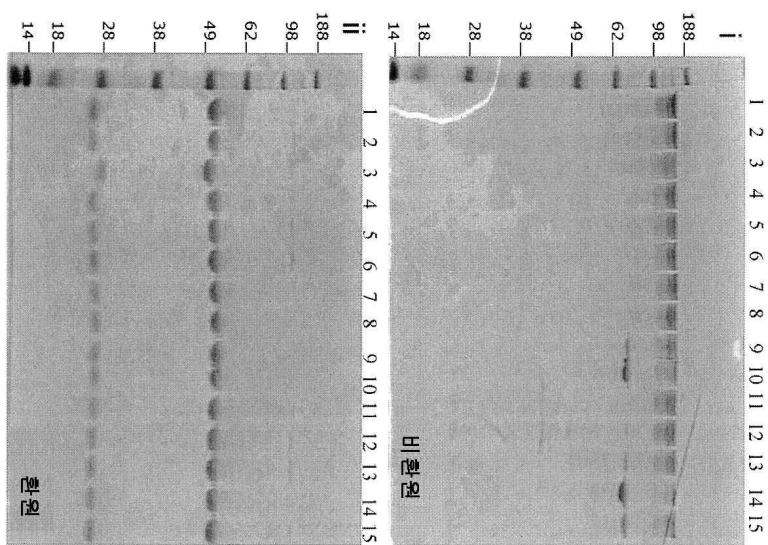
1g1에 대한 #131 (EU 인덱스)

서열 번호 3	J00230-1g62	STKGPVFFPLAPCSR--STSESTPALGCLVKDYFP-EPVTVSWN--SGALTSGVHTFPA- 54
서열 번호 4	K01316-1g64	STKGPVFFPLAPCSR--STSESTPALGCLVKDYFP-EPVTVSWN--SGALTSGVHTFPA- 54
서열 번호 5	J00228-1g61	STKGPVFFPLAPCSR--STSGTPALGCLVKDYFP-EPVTVSWN--SGALTSGVHTFPA- 54
서열 번호 6	M12958-1g63	STKGPVFFPLAPCSR--STSGTPALGCLVKDYFP-EPVTVSWN--SGALTSGVHTFPA- 54
서열 번호 7	J00222-1g6	STOSPVFFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYFP-EPVMTCD--TGSINGTMTLPAT 57
서열 번호 8	X57331-1gM	SASAPTLFPLVSCENS-PSDTSNAVGCLAQDFLP-DSITFSWKYKNSDISSTRGFPS- 57
서열 번호 9	J00220-1gA1	SPTSPKVFPLSLDSTQ-PDGN--VVIACLVQGFEPQEPPLSVTWS--ESGQVTVARNFPPS 55
서열 번호 10	J00221-1gA2	SPTSPKVFPLSLDSTQ-PDGN--VVIACLVQGFEPQEPPLSVTWS--ESGQVTVARNFPPS 55
서열 번호 11	K02875-1gD	PTKAPVFFPLISGCH-PKDNSPVVLACLITGYHP-TSVTVTWY--MGTQSQPQRTFPEI 56

J00230-1g62	VLQSSGLVSLSSVTVTPSSNFGTQT--YTCNVDHKPSNTK-VDKTV-- 97
K01316-1g64	VLQSSGLVSLSSVTVTPSSSLGTQT--YTCNVDHKPSNTK-VDKRV-- 97
J00228-1g61	VLQSSGLVSLSSVTVTPSSSLGTQT--YTCNVNHKPSNTK-VDKRV-- 97
M12958-1g63	VLQSSGLVSLSSVTVTPSSSLGTQT--YTCNVNHKPSNTK-VDKRV-- 97
J00222-1g6	TLTUSGHYATISLITVSG-AMAKOM--FTCRVAHTPSSIDWVDNKTFS 102
X57331-1gM	-VLRGKRYAATSOVLPSKDVMOGTDEHVCKVOHPNGNKE--KNVPLP 103
J00220-1gA1	QDASGDLVTTSSQULTPATQCLAGKS--VTCHVKHYTNPQ-DVTVPQ 101
J00221-1gA2	QDASGDLVTTSSQULTPATQCPDGKS--VTCHVKHYTNPQ-DVTVPQ 101
K02875-1gD	QRRD-SYMTSSQULTPLQWRQGE--YKCVQHTASKSK-KEIFRWP 100

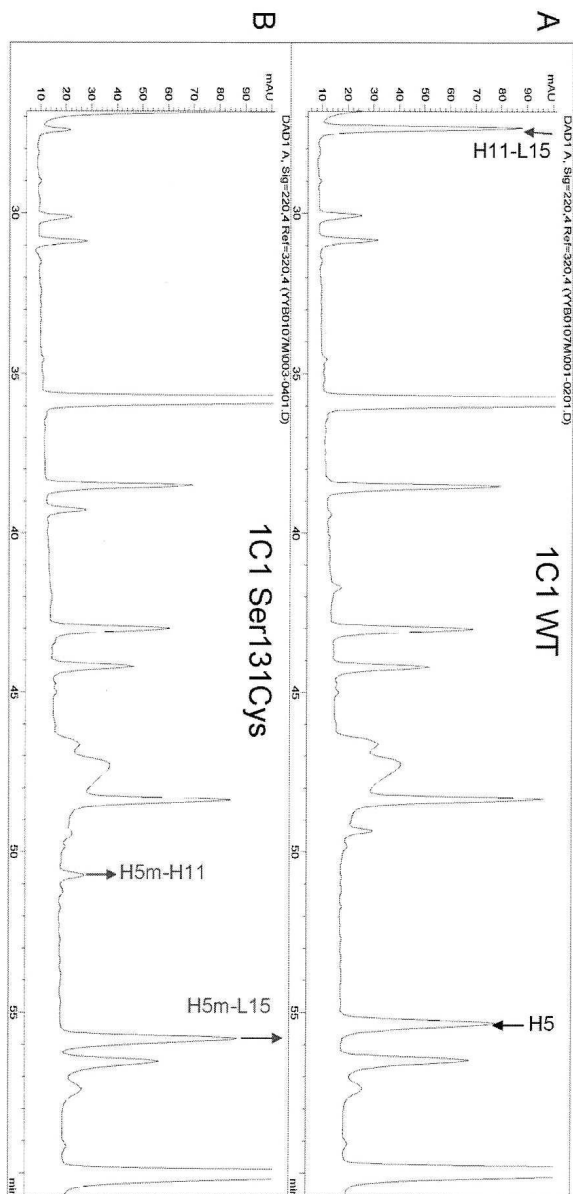
도면1c

도면2a

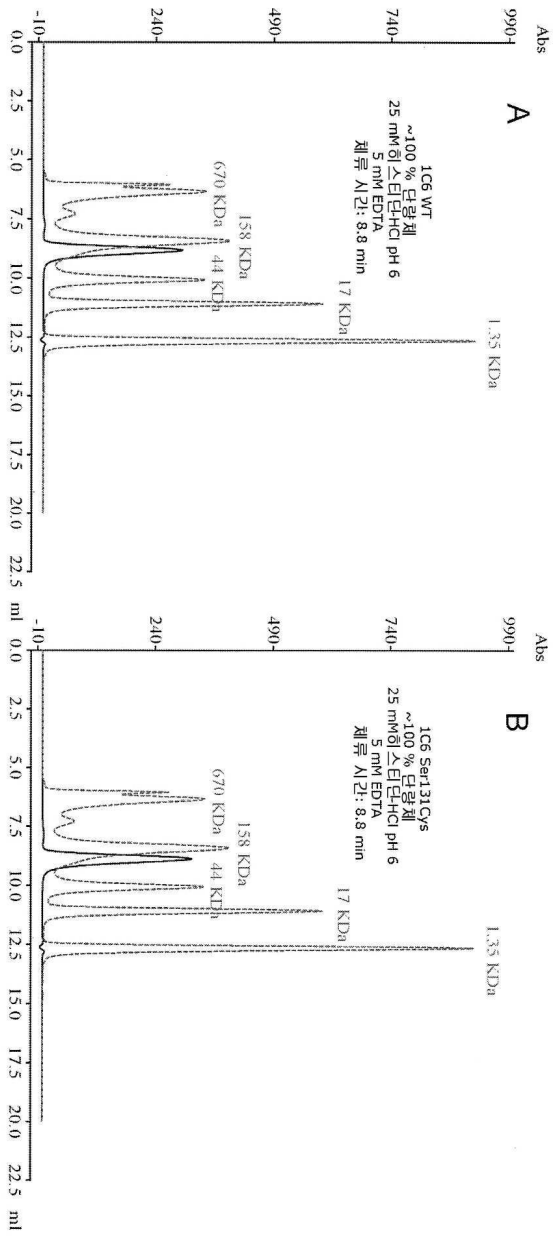


샘플 ID	레인
ICI 야생형	1
ICI Ser131Cys	2
ICI Ser132Cys	3
ICI Ser134Cys	4
ICI Thr135Cys	5
ICI Ser136Cys	6
ICI Thr139Cys	7
ICI Ser(131-132)Cys	8
ICI Ser(132-134)Cys	9
ICI Ser(134-136)Cys	10
ICI Ser(131-132-134)Cys	11
ICI Ser(132-134-136)Cys	12
ICI Ser:Thr(134-135-136)Cys	13
ICI Ser(131-132-134-136)Cys	14
ICI Ser/Thr(134-135-136-139)Cys	15

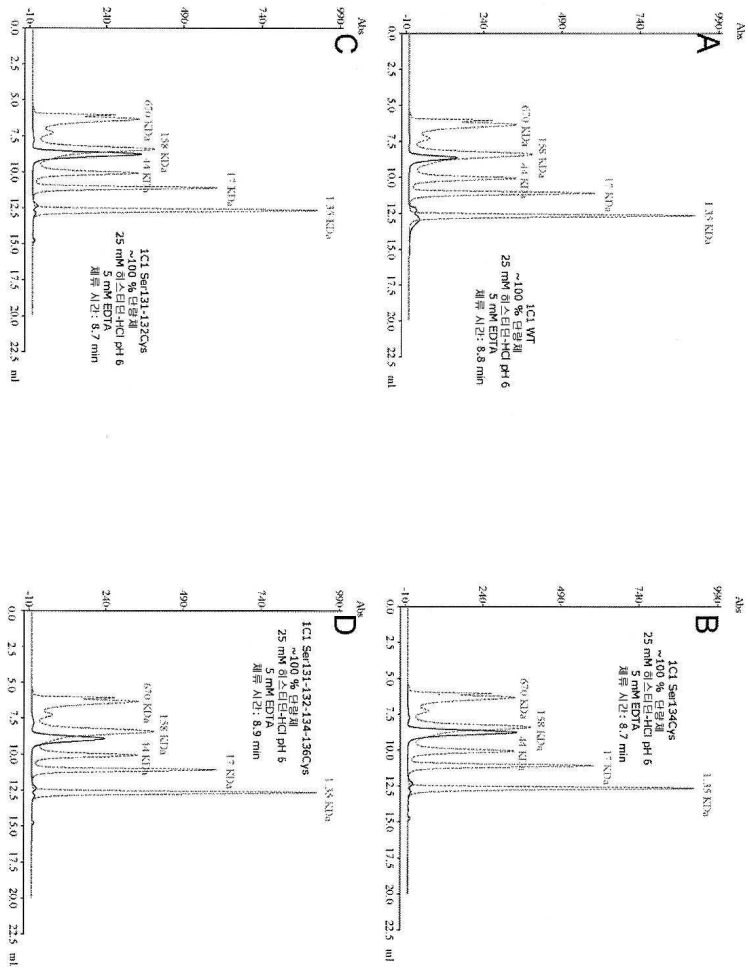
도면2b



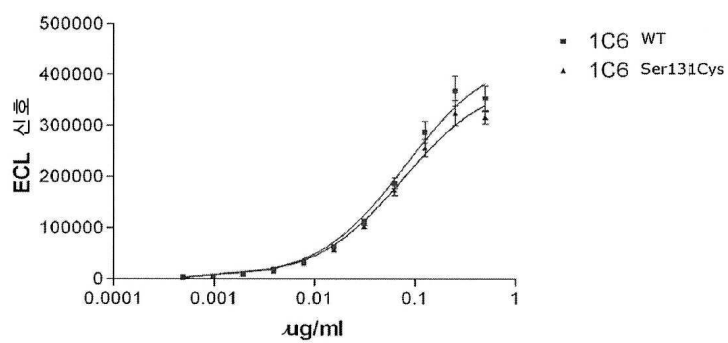
도면3



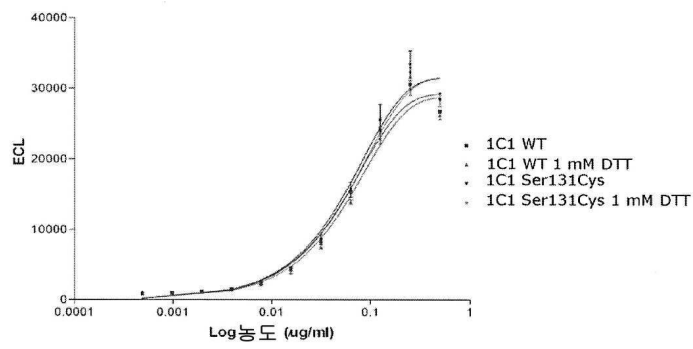
도면4



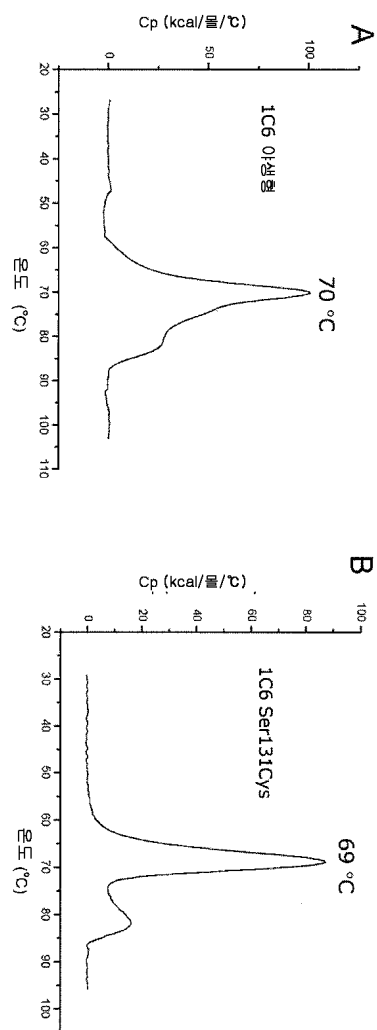
도면5



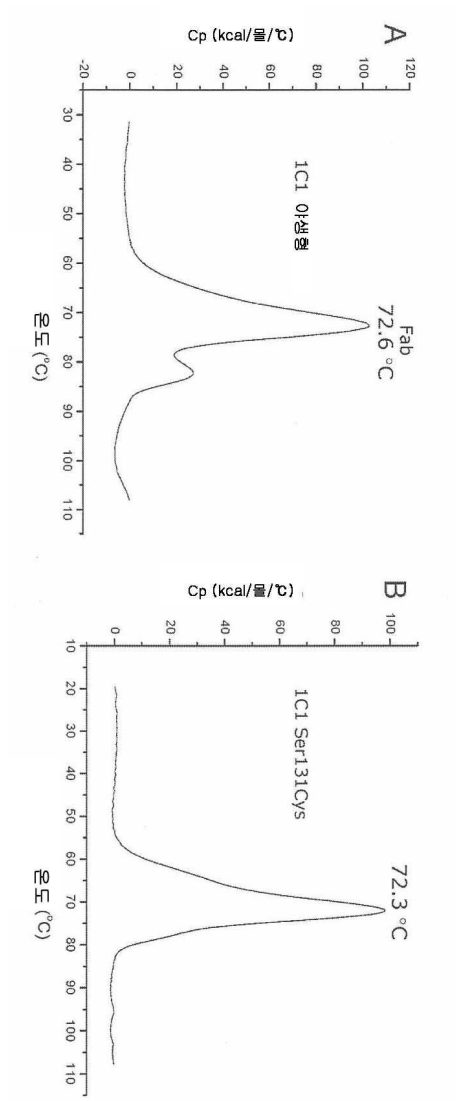
도면6



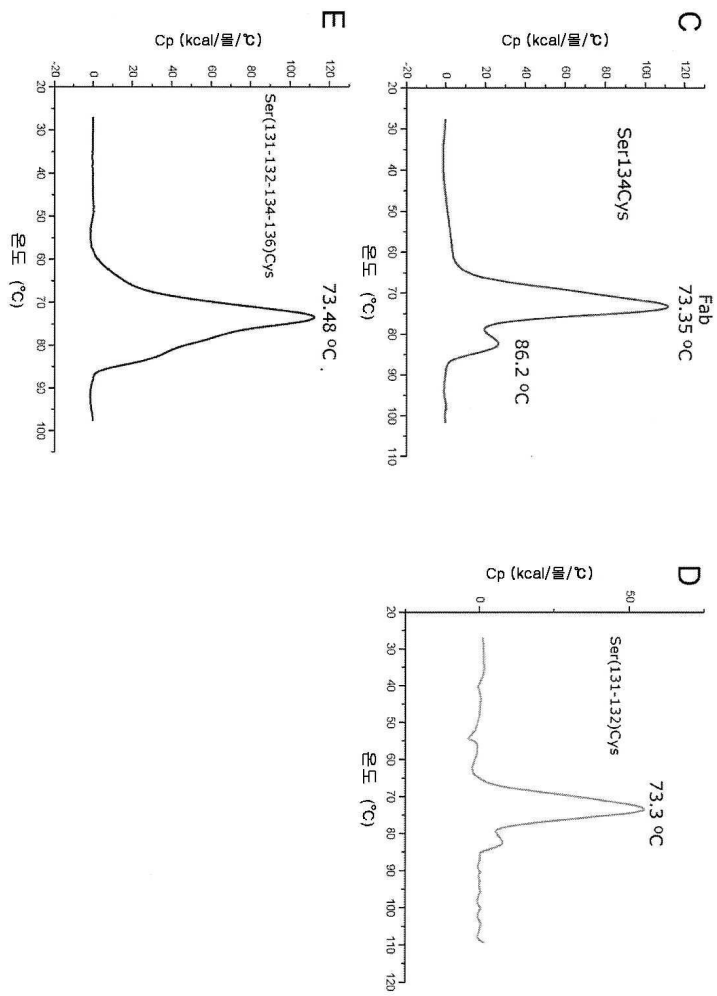
도면7



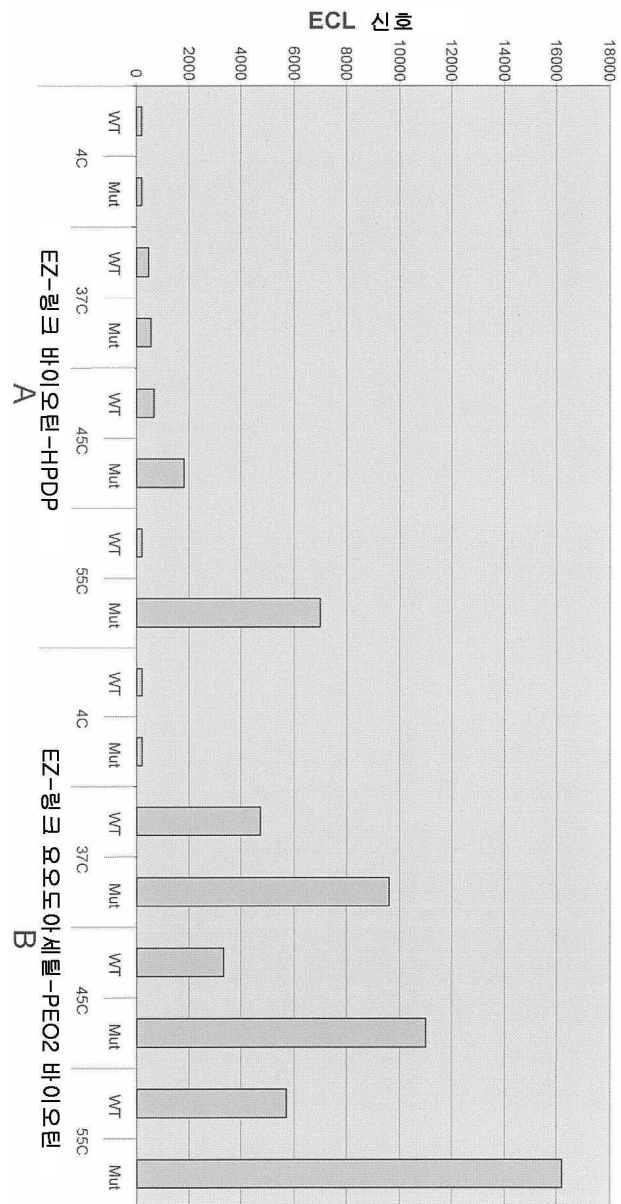
도면8a



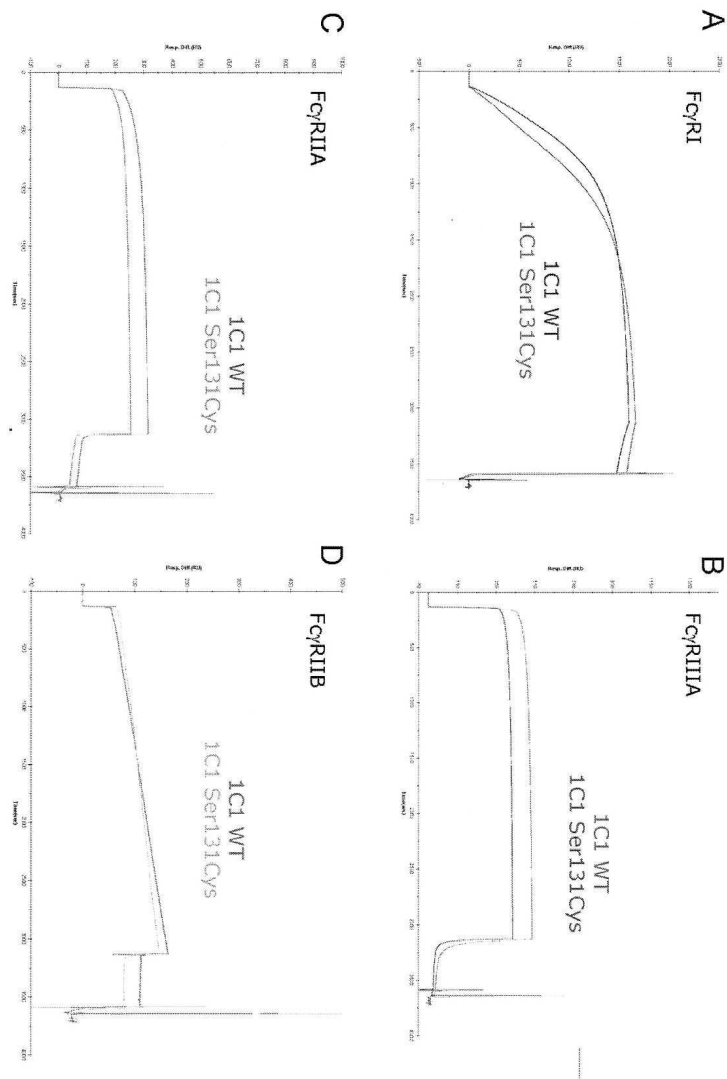
도면8b



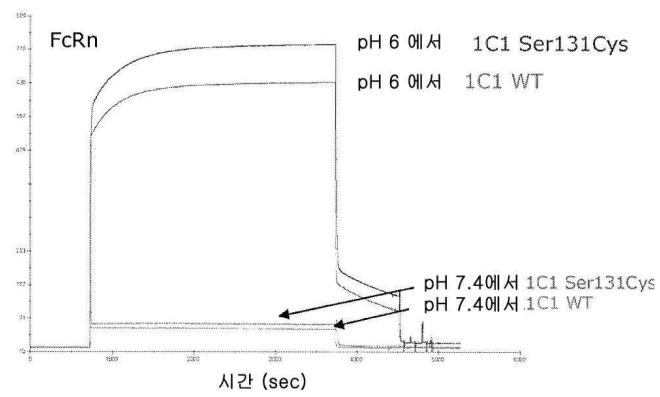
도면9



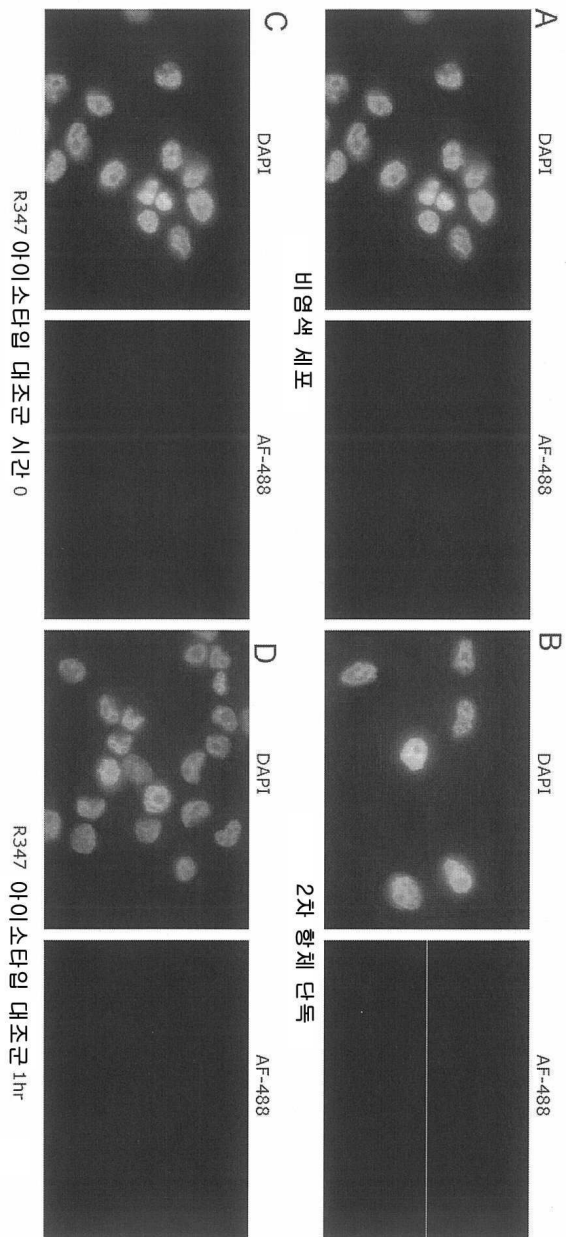
도면10



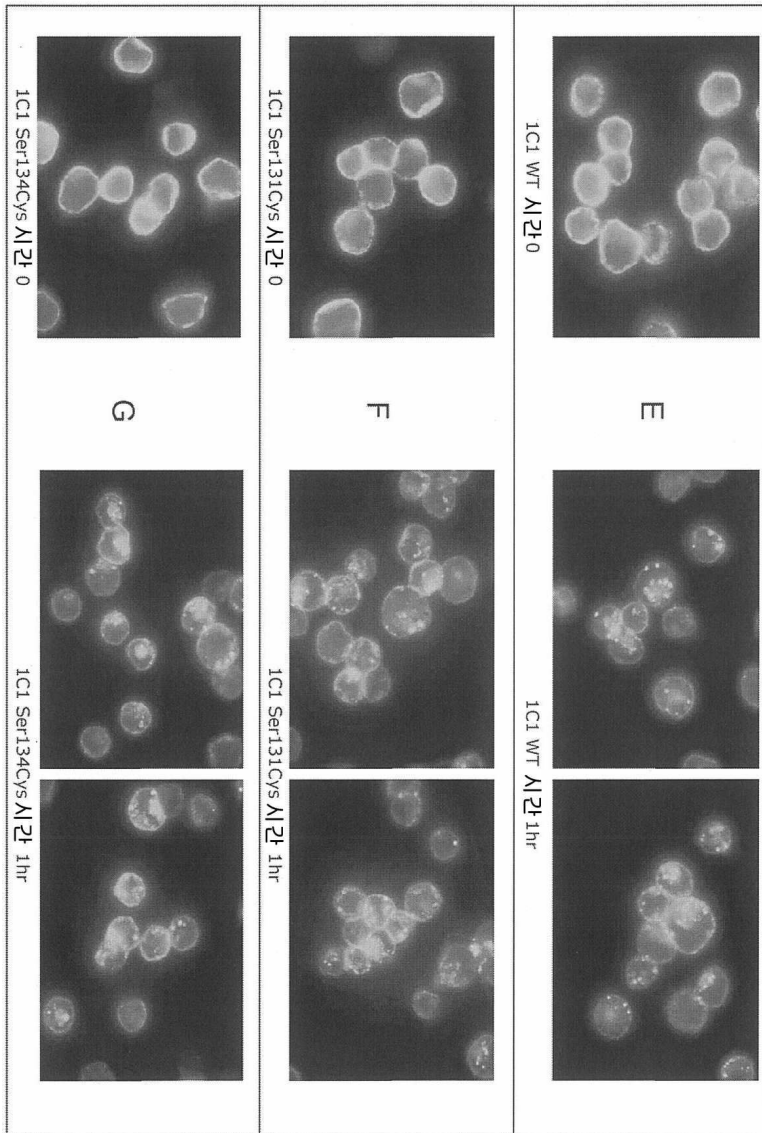
도면11



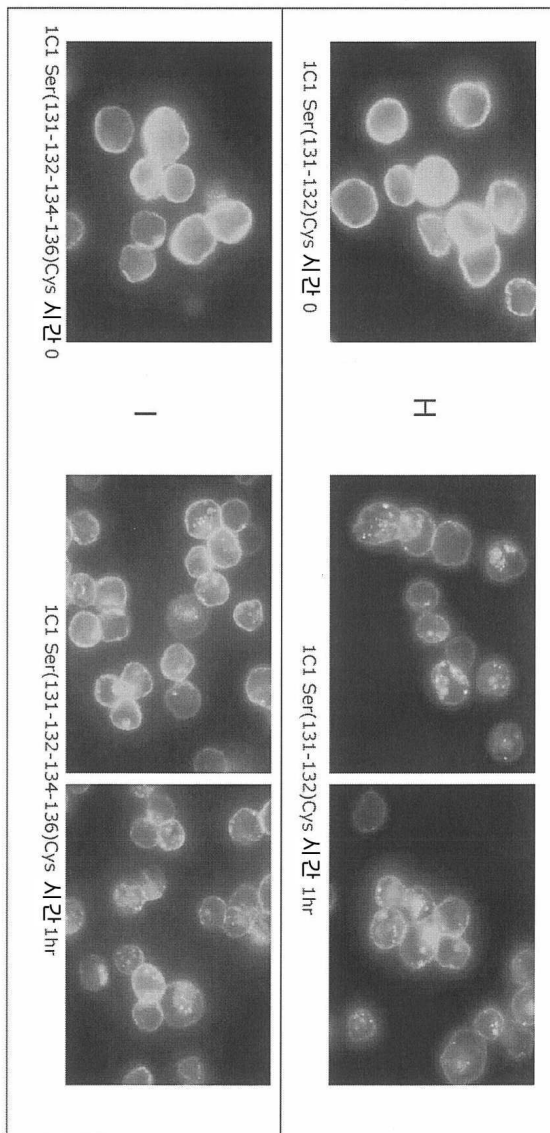
도면12a



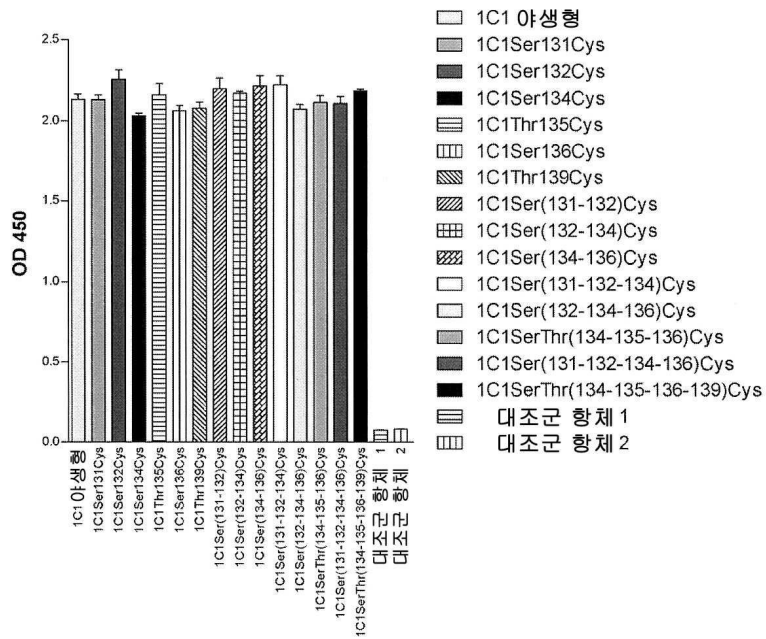
도면12b



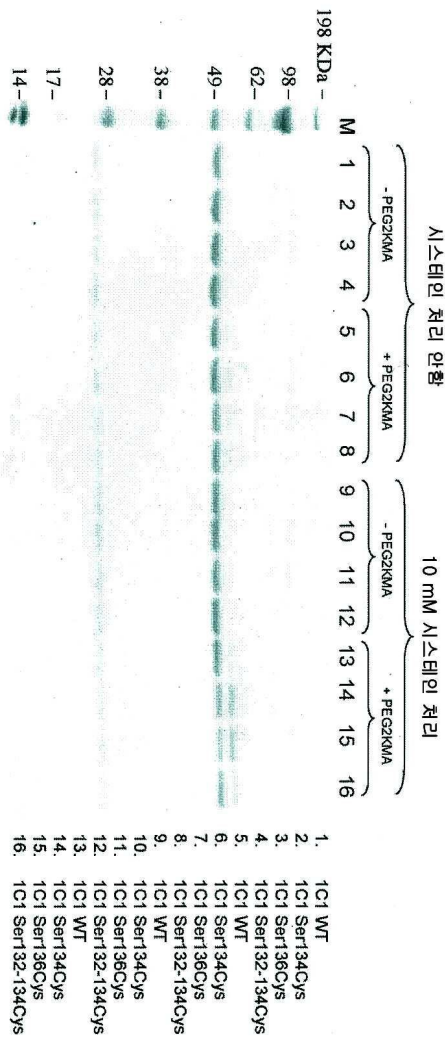
도면12c



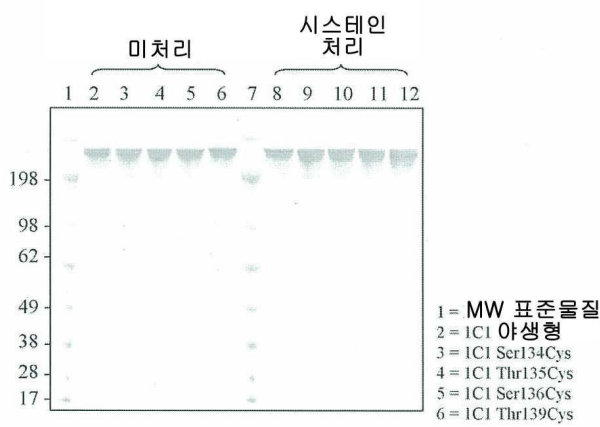
도면13



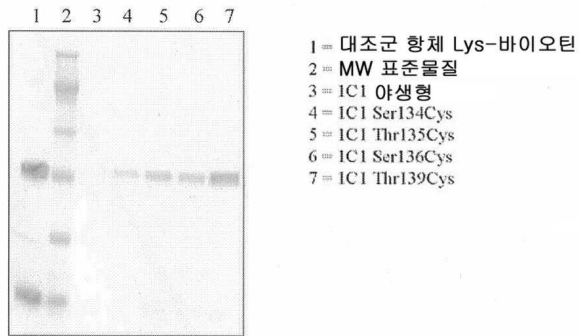
도면14



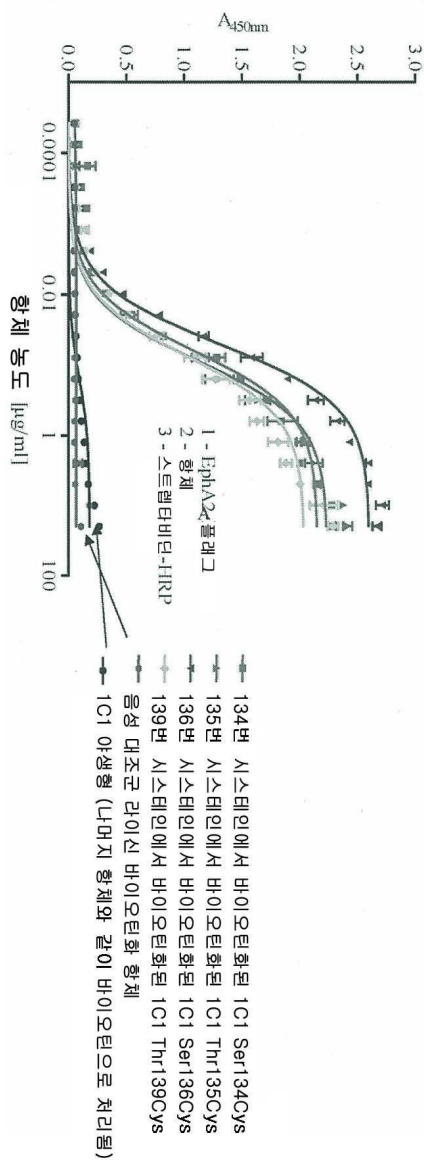
도면15



도면16



도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MedImmune LLC.

<120> Cysteine Engineered Antibodies for Site-Specific Conjugation

<130> AE714PCT

<140> PCT/US2009/031294

<141> 2009-01-21

<150> 61/022,073

<151> 2008-01-18

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 2

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser 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 Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

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

 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 3
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 3
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 1 5 10 15
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 20 25 30

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

Val

<210> 4

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg

85 90 95

Val

<210> 5

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400>

> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

35 40 45
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
50 55 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
65 70 75 80
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95
Val

<210> 6

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 6

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
1 5 10 15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
20 25 30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
50 55 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
65 70 75 80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95
Val

<210> 7

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 7

Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys Asn

1 5 10 15

Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr Gly

20 25 30

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Cys Asp Thr Gly Ser Leu Asn

35 40 45

Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly His

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp Val

85 90 95

Asp Asn Lys Thr Phe Ser

100

<210> 8

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic consrtruct

<400> 8

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

1 5 10 15

Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe

20 25 30

Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp

35 40 45

Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys

 85 90 95

Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro

 100

<210> 9

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 9

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

[illegible]

<210> 10

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ synthetic construct

<400> 10

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

1 5 10 15

Gln Asp Gly Asn Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro

20 25 30

Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Asn Val Thr

35 40 45

Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr

50 55 60

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Pro Asp Gly Lys

65 70 75 80

Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val

85 90 95

Thr Val Pro Cys Pro

100

<210> 11

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 11

Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg His

1 5 10 15

Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly Tyr

20 25 30

His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser Gln

35 40 45

Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr Met

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu Ile

85 90 95

Phe Arg Trp Pro

100