



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0116546
(43) 공개일자 2014년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7023731(분할)

(22) 출원일자(국제) 2007년10월26일
심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2009-7010761
원출원일자(국제) 2007년10월26일
심사청구일자 2012년08월27일

(85) 번역문제출일자 2014년08월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/082726

(87) 국제공개번호 WO 2008/052187
국제공개일자 2008년05월02일

(30) 우선권주장
60/863,295 2006년10월27일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 별명자
데니스, 마크, 에스.
미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 플리머스
120
루빈펠드, 보니
미국 94506 캘리포니아주 덴빌 케일 런 드라이브
4186
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
이귀동, 양영준

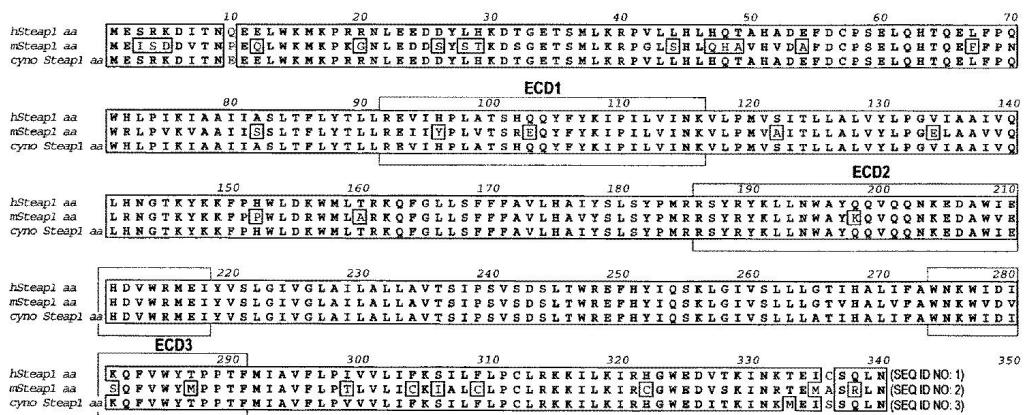
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 항체 및 면역접합체 및 이들의 용도

(57) 요약

본 발명은 항-STEAP-1 항체 및 이들의 면역접합체를 제공한다. 또한, 항-STEAP-1 항체 및 이들의 면역접합체의 사용 방법을 제공한다.

대 표 도



(72) 발명자

폴라키스, 폴

미국 94941 캘리포니아주 밀 벨리 웨스트 블라이드
데일 애비뉴 265

자코보비츠, 아야

미국 90210 캘리포니아주 비벌리 힐스 휴튼 드라이
브 3135

(30) 우선권주장

60/868,707 2006년12월05일 미국(US)

60/921,300 2007년03월30일 미국(US)

60/937,857 2007년06월29일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

세포독성제에 공유 결합에 의해 부착된 항체를 포함하는 면역접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 세포 증식성 장애의 치료 방법으로서,

상기 항체는

- (1) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (2) 서열 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및
- (3) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3로부터 선택된 1종 이상의 중쇄(HC) 초가변 영역(HVR)을 포함하고 STEAP-1에 결합하는 항체인, 치료 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 항-STEAP-1 항체 및 이들의 면역접합체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항-STEAP-1 항체 및 이들의 면역접합체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

인간에서, 전립선암은 남성에서 가장 흔하게 진단되는 악성 종양 중 하나이며, 남성 인구에서 암 관련 사망을 두번째로 많이 유발하는 원인이다. 미국 암 협회 (American Cancer Society)는 2000년 한 해 동안 180,400건의 새로운 전립선암 케이스가 진단되고, 이 질환으로부터 31,900명이 사망한 것으로 추정하고 있다. 질환이 악화된 단계에서, 전립선암은 뼈로 전이된다. 국부적으로 한정된 종양의 초기 진단 및 치료에 있어서는 진전이 있으나, 전립선암은 일단 전이되면 치료하기 어렵게 된다. 호르몬 요법을 받는 전이성 전립선암 환자는 결국 안드로겐-난치성 (안드로겐 독립적) 상태가 발생하여, 질환이 악화되고 사망에 이르게 될 것이다. 현재, 전립선-특이적 항원 (PSA)은 전립선암의 스크리닝, 진단 및 모니터링에 가장 널리 사용되는 종양 마커이다. 그러나, 스크리닝용 도구로서의 PSA의 광범위한 용도는 PSA가 양성 전립선 질환과 악성 전립선 질환을 정확하게 구별하는데 실패하였기 때문에 문제의 여지가 있다.

[0003]

암의 단계에 따라, 전립선암 및 방광암 치료는 다음과 같은 요법 중 어느 하나 또는 이들의 조합을 포함한다: 암 조직을 제거하는 수술, 방사선 요법, 화학요법, 안드로겐 고갈 (예를 들면, 호르몬 요법) (전립선암의 경우). 수술 또는 방사선 요법이 초기 단계의 질환을 갖는 환자의 생존을 유의하게 개선시키지만, 질환이 진전된 경우, 특히 호르몬 제거 후에 종양이 재발한 경우에는 치료법 선택 폭이 매우 제한적이다. 호르몬 요법을 받은 대부분의 환자는 증세가 악화되어 안드로겐-독립적 질환이 발생한다. 현재, 수술 또는 방사선 요법 이후에 질환이 재발한 20 내지 40%의 전립선암 환자, 또는 진단 시점에서 암이 전이된 환자를 위한 효과적인 치료법은 존재하지 않는다. 화학요법은, 특히 고령의 환자에서, 자신의 독성 부작용을 나타낸다. 특히 안드로겐 고갈에 난치성인 질환을 위한 새로운 형태의 요법을 개발하는 것이 전립선 암종의 관리에 시급히 요구되고 있다.

[0004]

신규한 세포 표면 항원 STEAP-1의 동정은 기재되어 있다 (미국 특허 6,329,503 참조). STEAP-1은 세포 표면 서펜틴(serpentine) 막횡단 항원의 구성원이다. 이는 전립선암에서 우세하게 발현되며, 따라서 이 부류의 구성원은 "STEAP" (전립선의 6개 막횡단 상피 항원)로 지칭된다. 인간 STEAP 단백질은 부류 내에서 고도의 구조적 보존성을 나타내었으나, 임의의 공지된 인간 단백질에 대해 유의한 구조적 상동성을 나타내지는 않았다. STEAP-1은 정상 인간 조직의 전립선 세포에서 우세하게 발현되는 제IIIa형 막 단백질인 것으로 나타났다. 구조적으로, STEAP-1은 6개의 막횡단 도메인 및 세포내 N-말단 및 C-말단의 분자 위상을 특징으로 하는 339개 아미노산 단백질로, 이는 "서펜틴" 방식으로 3개의 세포외 루프 및 2개의 세포내 루프로 폴딩됨을 시사한다. STEAP-1 단백질 발현은 다양한 상태의 전립선암에 걸쳐 높은 수준으로 유지된다. STEAP-1은 폐 및 결장과 같은 다른 인간암에서 고도로 과발현된다. 인간 STEAP-1 단편에 대한 쥐과동물 항체가 생성되었으며, 이 항체는 세포 표면에서 STEAP-1에 결합하는 것으로 밝혀졌다 (미국 특허 출원 제20040253232A1호 참조).

[0005]

항체-기반 요법은 다양한 암의 치료에 매우 효과적인 것으로 입증되었다. 예를 들면, 헤르셉틴(HERCEPTIN)®

및 리툭산(RITUXAN)® (둘 모두 제넨텍(Genentech, 미국 사우쓰 샌프란시스코 소재)으로부터 입수)은 각각 유방암 및 비-호지킨 림프종을 치료하는데 성공적으로 사용되어 왔다. 헤르셉틴®은 인간 상피 성장 인자 수용체 2 (HER2) 원시-종양유전자의 세포외 도메인에 선택적으로 결합하는 재조합 DNA-유래의 인간화 모노클로날 항체이다. HER2 단백질 과발현은 원발성 유방암의 25 내지 30%에서 관찰된다. 리툭산®은 정상 및 악성 B 림프구의 표면에서 발견되는 CD20 항원에 대해 지시된 유전자 조작된 키메라 쥐과동물/인간 모노클로날 항체이다. 이들 두 항체는 모두 CHO 세포에서 생성된다.

[0006]

암 치료에서 세포독성제 또는 세포증식 억제제, 즉 종양 세포를 사멸시키거나 억제하는 약물의 국소 전달을 위한 항체-약물 접합체의 사용 (문헌 [Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172]; 미국 특허 4,975,278)은 종양으로 약물 모이어티 (moiety)의 표적화된 전달, 및 그 내부의 세포내 축적을 허용하고, 여기서 상기 비-접합된 약물 물질의 전신 투여는 정상 세포뿐만 아니라 제거하고자 하는 종양 세포에 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 (문헌 [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 Antibody '84:Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475-506]). 그에 의해 최소 독성을 갖는 최대 효능이 추구된다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체는 모두 상기 전략에서 유용한 것으로 보고되었다 (문헌 [Rowland et al (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87]). 상기 방법에서 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (문헌 [Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87 (1986)]). 항체-독소 접합체에서 사용되는 독소는 박테리아 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 독소, 예를 들어 리신, 소분자 독소, 예를 들어 젤다나마이신 (문헌 [Kerr et al (1997) Bioconjugate Chem. 8(6):781-784]; [Mandler et al (2000) Journal 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; 문헌 [Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]), 및 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342])을 포함한다. 독소는 투불린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소미라제 억제를 포함한 메카니즘에 의해 그들의 세포독성 및 세포증식 억제 효과를 나타낼 수 있다 (문헌 [Meyer, D.L. and Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" in Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol 38 (2003) Chapter 23, 229-237]). 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합될 때 불활성이거나 활성을 작은 경향이 있다.

[0007]

제발린 (ZEVALIN)® (이브리투모맙 티옥세탄, 바이오젠 (Biogen)/이덱 (Idec))은 티오우레이 링커-킬레이터 (chelator)에 의해 결합된, 정상 및 악성 B 림프구의 표면에서 발견되는 CD20 항원에 대해 지시된 쥐과동물 IgG1 카파 모노클로날 항체 및 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성 동위원소로 이루어진 항체-방사성 동위원소 접합체이다 (문헌 [Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77]; [Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42]; [Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63]; [Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69]). 제발린은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 대해 활성을 갖지만, 투여는 대부분의 환자에서 중증 및 장기 혈구감소증을 일으킨다. 마일로타그 (MYLOTARG)™ (캡투주맙 오조가미신, 와이어쓰 파마슈티칼스 (Wyeth Pharmaceuticals)) (칼리케아미신에 연결된 hu CD33 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)는 2000년에 주사에 의한 급성 골수성 백혈병의 치료를 위해 승인되었다 (문헌 [Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특허 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,693,762; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). 칸투주맙 메르탄신 (이뮤노젠, 인크. (Immunogen, Inc.)) (디슬피드 링커 SPP를 통해 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 huC242 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)은 CanAg 항원을 발현하는 암, 예를 들어 결장암, 췌장암, 위암 등의 치료를 위해 개발되고 있다. MLN-2704 (밀레니엄 팜 (Millennium Pharm.), 비지엘 바이올로직스 (BZL Biologics), 이뮤노젠, 인크.) (메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)는 전립선 종양의 잠재적인 치료를 위해 개발되고 있다. 동일한 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1은 비-디슬피드 링커, SMCC를 통해 마우스 쥐과동물 모노클로날 항체인 TA.1에 연결되었다 (문헌 [Chari et al (1992) Cancer Research 52:127-131]). 상기 접합체는 상응하는 디슬피드 링커 접합체보다 200배 덜 강력한 것으로 보고되었다. SMCC 링커는 여기서 "절단불가능한" 것으로 간주되었다.

[0008]

몇몇 짧은 펩티드 화합물이 해양 연체동물인 돌라밸라 오리쿨라리아 (Dolabella auricularia, 원뿔군소)로부터 단리되었고, 생물학적 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Pettit et al (1993) Tetrahedron 49:9151];

[Nakamura et al (1995) Tetrahedron Letters 36:5059-5062]; [Sone et al (1995) Journal Org Chem. 60:4474]). 상기 화합물의 유사체가 또한 제조되었고, 일부는 생물학적 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (검토를 위해 문헌 [Pettit et al (1998) Anti-cancer Drug Design 13:243-277] 참조). 예를 들어, 아우리스타틴 E (US 5635483)는 해양 천연 산물 돌라스타틴 10 (튜불린 상에 항암 약물 빙크리스틴과 동일한 부위에 결합함으로써 튜불린 중합을 억제하는 물질)의 합성 유사체이다 (문헌 [G. R. Pettit, (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70:1-79]). 돌라스타틴 10, 아우리스타틴 PE 및 아우리스타틴 E는 4개의 아미노산 (이 중 3개는 돌라스타틴 부류의 화합물에 특유함) 및 C-말단 아미드를 갖는 선형 펩티드이다.

[0009] 아우리스타틴 펩티드, 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체)은 (i) 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 루이스(Lewis) Y에 특이적임); (ii) 혈액 종양 상의 CD30에 특이적인 cAC10 (문헌 [Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773]; [Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784]; ["Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"]); [Francisco et al (2003) Blood 102(4):1458-1465]; US 2004/0018194); (iii) CD20-발현 암 및 면역 장애의 치료를 위한 항-CD20 항체, 예를 들어 리툭산® (리툭시맙) (WO 04/032828); (iv) 결장직장암 치료를 위한 항-EphB2 항체 2H9 및 항-IL-8 (문헌 [Mao, et al (2004) Cancer Research 64(3):781-788]); (v) E-셀렉틴 항체 (문헌 [Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63:6387-6394]); 및 (vi) 다른 항-CD30 항체 (WO 03/043583)에 접합되었다. 모노메틸아우리스타틴 (MMAE)은 또한 2H9 (마우스와 인간 사이에 밀접한 상동성을 갖는 제1형 TM 티로신 키나제 수용체인 EphB2R에 대한 항체이고, 결장직장암 세포에서 과발현됨에 접합되었다 (문헌 [Mao et al (2004) Cancer Res. 64:781-788]).

[0010] 모노메틸아우리스타틴 MMAF (C-말단에서 폐닐알라닌을 갖는 아우리스타틴 E (MMAE)의 변이체) (US 5767237; US 6124431)는 MMAE보다 덜 강력하지만, 모노클로날 항체에 접합될 때 더 강력한 것으로 보고되었다 (문헌 [Senter et al, Proceedings fo the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004]). 아우리스타틴 F 폐닐렌 디아민 (AFP) (MMAE의 폐닐알라닌 변이체)은 폐닐렌 디아민 스페이서를 통해 1F6의 C-말단을 통해 항-CD70 mAb, 1F6에 연결되었다 (문헌 [Law et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 625, presented March 28, 2004]).

[0011] 당업계에서는 각종 암, 예를 들면 전립선, 폐 및 결장에서의 암 및 암의 전이암을 치료하기 위한 추가의 약물이 요망되고 있다. 상기 목적에 특히 유용한 약물은 독성이 유의하게 더 작지만, 유용한 치료 효율을 갖는 전립선, 폐 또는 결장 세포 표적화된 항-STEAP-1 항체-약물 접합체를 포함한다. 선행 기술의 상기 및 다른 제한 및 문제점을 본 발명에서 다룬다.

[0012] 본 출원에서 임의의 참조문을 인용한 경우에도, 그 참조문이 본원에 대한 선행 기술이라고 인정하는 것은 아니다. 특히, 특히 출원 및 공개공보를 포함하여 본원에 인용된 모든 참조문헌은 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0013] 본 발명은 항-STEAP-1 항체 및 이의 사용 방법을 제공한다.

[0014] 한 측면에서, 도 2A에 도시된 아미노산 서열 (서열 6)을 포함하는 경쇄 가변 도메인 또는 도 2B에 도시된 아미노산 서열 (서열 9)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, STEAP-1에 결합하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, 도 2A에 도시된 아미노산 서열 (서열 6)을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 도 2B에 도시된 아미노산 서열 (서열 9)을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, STEAP-1에 결합하는 항체를 제공한다.

[0015] 한 측면에서, 서열 9 또는 10의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, STEAP-1에 결합하는 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 9 또는 10의 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 25의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 1, 또는 서열 75 또는 76 또는 77의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 2, 또는 서열 78 또는 79의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역을 포함한다.

[0016] 한 측면에서, 항체는 서열 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 경

쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 6의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0017] 한 측면에서, 서열 9 또는 10의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, STEAP-1에 결합하는 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 9 또는 10의 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 25의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 1, 또는 서열 75 또는 76 또는 77의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 2, 또는 서열 78 또는 79의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 3을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 또한 서열 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 더 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 6의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0018] 특정 실시양태에서, 임의의 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 한 실시양태에서, 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 한 실시양태에서, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 적합한 조건하에서 숙주 세포를 배양하는 단계, 항체를 단리하는 단계를 포함하는, 항-STEAP-1 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0019] 한 측면에서, 세포의 표면에서 발현된 STEAP-1에 결합하는 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항체는 인간 또는 마우스 STEAP-1의 영역 내의 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 암 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 전립선, 폐 또는 결장 세포이다. 한 실시양태에서, 암 세포는 전립선암 세포이다. 다른 실시양태에서, 세포는 원발성 전립선암, 폐암 또는 결장암의 전이암으로부터의 세포이다.

[0020] 특정 실시양태에서, 임의의 상기 항체는 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 또는 (Fab')₂ 단편으로부터 선택된 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다.

[0021] 한 측면에서, 생물학적 샘플을 STEAP-1에 대한 항체의 결합을 허용하는 조건하에 임의의 상기 항체와 접촉시키는 단계, 항체와 STEAP-1 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플 중 STEAP-1의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 생물학적 샘플은 전립선 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 생물학적 샘플은 전립선 세포 장애 및/또는 세포 또는 조직의 세포 증식성 장애 (전립선암, 폐암, 결장암, 방광암, 난소암 및 유잉(Ewing) 육종 뿐만 아니라, 원발성 전립선암, 폐암, 결장암, 방광암, 난소암 및 유잉 육종의 전이암 등 포함)를 경험하였거나 또는 경험하였을 것으로 추정되는 포유동물로부터 수득한다. 예를 들면, 미국 특허 6,329,503; 및 문헌 [Rodeberg, D.A. et al., Clin. Cancer Res. 11(12):4545-4552 (2005)])을 참조한다.

[0022] 한 측면에서, 시험 세포를 임의의 상기 항체와 접촉시키는 단계; STEAP-1에 대한 항체의 결합을 검출함으로써 STEAP-1의 발현 수준을 결정하는 단계; 및 시험 세포에 의한 STEAP-1의 발현 수준을 대조군 세포에 의한 STEAP-1의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 세포에 비해 시험 세포에 의한 STEAP-1의 보다 높은 수준의 발현은 STEAP-1의 증가된 발현과 연관된 세포 증식성 장애의 존재를 나타내는 것인, STEAP-1의 증가된 발현과 연관된 세포 증식성 장애의 진단 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 시험 세포는 세포 증식성 장애, 예를 들어 전립선 증식성 장애에 걸린 것으로 추정되는 환자로부터의 세포이다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 전립선 암 등을 비롯한 전립선 세포 장애로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 방법은 시험 세포 (예를 들면, 전립선암 세포)의 표면에서의 STEAP-1의 발현 수준을 결정하는 단계, 시험 세포의 표면에서의 STEAP-1의 발현 수준을 대조군 세포 (예를 들면, 비정상적으로 증식하는 전립선 세포가 아닌 정상 전립선 세포)의 표면에서의 STEAP-1의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함한다.

[0023] 한 측면에서, 생물학적 샘플 내의 시험 세포를 임의의 상기 항체와 접촉시키는 단계; STEAP-1에 대한 항체의 결합을 검출함으로써 샘플 내의 시험 세포에 결합된 항체의 수준을 결정하는 단계; 대조군 샘플 내의 세포에 결합된 항체의 수준을 비교하는 단계를 포함하고, 이 때 결합된 항체의 수준은 시험 및 대조군 샘플 내의 STEAP-1-발현 세포의 수로 표준화하고, 여기서 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 보다 높은 수준으로 결합된 항체는 STEAP-1을 발현하는 세포와 연관된 세포 증식성 장애가 존재함을 나타내는 것인, STEAP-1을 발현하는 세포, 예를 들어 전립선 세포의 증가와 연관된 세포 증식성 장애를 진단하는 방법을 제공한다.

- [0024] 한 측면에서, 전립선 세포 증식성 장애를 경험하였을 것으로 추정되는 포유동물로부터의 혈액 또는 혈청의 시험 샘플을 본 발명의 항-STEAP-1 항체와 접촉시키는 단계, 정상 포유동물로부터의 혈액 또는 혈청의 대조군 샘플에 비해 시험 샘플 내의 가용형 STEAP-1의 증가를 검출하는 단계를 포함하는, 혈액 또는 혈청 내의 가용형 STEAP-1의 검출 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 검출 방법은 포유동물의 혈액 또는 혈청에서 가용형 STEAP-1의 증가와 연관된 전립선 세포 증식성 장애를 진단하는 방법으로서 유용하다.
- [0025] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 모 항체의 하나 이상의 아미노산이 WO 2006/034488 (그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨)에 개시된 유리 시스테인 아미노산으로 교체된, 시스테인 조작된 항체를 포함한다. 시스테인 조작된 항체는 티올 반응성 값이 0.6 내지 1.0인 하나 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함한다. 유리 시스테인 아미노산은 모 항체로 조작되고 디슬피드 브릿지의 일부가 아닌 시스테인 잔기이다. 시스테인 조작된 항체는, 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해 세포독성 및/또는 영상화 화합물의 조작된 시스테인의 부위로 부착시키는데 유용하다. 말레이미드기에 대한 Cys 잔기의 티올 관능기의 친핵 반응성은 단백질 내의 임의의 다른 아미노산 관능기, 예를 들어 리신 잔기의 아미노기 또는 N-말단 아미노기에 비해 약 1000배 더 크다. 요오도아세틸 및 말레이미드 시약의 티올 특이적 관능기는 아민기와 반응할 수 있지만, 보다 높은 pH (>9.0) 및 보다 긴 반응 시간이 필요하다 (문헌 [Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling:A Practical Approach, Academic Press, London]).
- [0026] 시스테인 조작된 항체는 암 치료에 유용할 수 있고, 세포 표면 및 막횡단 수용체, 및 종양 연관된 항원 (TAA)에 특이적인 항체를 포함한다. 상기 항체는 네이키드 (naked) 항체 (약물 또는 표지 모이어티에 접합되지 않은)로서 또는 항체-약물 접합체 (ADC)로서 사용될 수 있다. 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 티올-반응성 시약과 부위-특이적으로 및 효율적으로 커플링될 수 있다. 티올-반응성 시약은 다기능성 링커 시약, 포획 표지 시약, 형광단 시약, 또는 약물-링커 중간체일 수 있다. 시스테인 조작된 항체는 검출가능한 표지로 표지되고, 고상자지체에 고정되고/되거나 약물 모이어티와 접합될 수 있다. 티올 반응성은 반응성 시스테인 아미노산으로의 아미노산 치환이 L-10 내지 L-20, L-38 내지 L-48, L-105 내지 L-115, L-139 내지 L-149, L-163 내지 L-173의 아미노산 범위로부터 선택된 경쇄의 범위 내에서; H-35 내지 H-45, H-83 내지 H-93, H-114 내지 H-127, 및 H-170 내지 H-184의 아미노산 범위로부터 선택된 중쇄의 범위 내에서; 및 H-268 내지 H-291, H-319 내지 H-344, H-370 내지 H-380, 및 H-395 내지 H-405에서 선택된 범위 내의 Fc 영역에서 이루어질 수 있는 임의의 항체로 일 반화될 수 있고, 여기서 아미노산 위치의 넘버링은 카바트 넘버링 시스템 (문헌 [Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD])의 위치 1에서 시작되고 이후에 WO 2006034488에 개시된 바와 같이 순차적으로 계속된다. 또한, 티올 반응성은 항체의 특정 도메인, 예를 들어 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 일반화될 수도 있다. 0.6 이상의 티올 반응성 값을 나타내는 시스테인 치환은 무손상 항체 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM (IgG 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2 포함) 각각의 중쇄 불변 도메인 α , δ , ϵ , γ 및 μ 에서 만들어질 수 있다. 상기 항체 및 그의 용도는 WO 2006/034488에 개시되어 있다.
- [0027] 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 바람직하게는 그의 야생형 모 항체 대응물의 항원 결합 능력을 보유한다. 따라서, 시스테인 조작된 항체는 바람직하게는 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 항원은 예를 들어 종양-관련 항원 (TAA), 세포 표면 수용체 단백질 및 다른 세포 표면 분자, 막횡단 단백질, 신호전달 단백질, 세포 생존 조절 인자, 세포 증식 조절 인자, 조직 발달 또는 분화와 연관된 분자 (예를 들어, 조직 발달 또는 분화에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 추정되는 분자), 립포카인, 사이토kin, 세포 주기 조절에 관련된 분자, 혈관형성에 관련된 분자 및 혈관신생에 관련된 분자 (예를 들어, 혈관신생에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 추정되는 분자)를 포함한다.
- [0028] 본 발명의 항체는 그 내부의 반응성 기가 예를 들어 말레이미드, 요오도아세트아미드, 퍼리딜 디슬피드, 또는 다른 티올-반응성 접합 파트너인 다른 티올-반응 물질에 접합될 수 있다 (문헌 [Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2]; [Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling:A Practical Approach, Academic Press, London]; [Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2]; [Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]). 파트너는 세포독성제 (예를 들어, 독소, 예를 들어 독소루비신 또는 백일해 독소), 형광단, 예를 들어 플루오레세인 또는 로다민과 같은 형광 염료, 영상화 또는 방사성요법 금속에 대한 킬레이팅제, 웨티딜 또는 비-웨티딜 표지 또는 검출 태그, 또는 소실(clearance)-변형제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜의 다양한 이성질체, 제3 성분에 결합하는 웨티드, 또는 다른 탄수화물 또는 친지성 물질일 수 있다.

- [0029] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 반응성 모이어티, 활성화된 모이어티, 또는 반응성 시스테인 티올기를 통해 항체에 공유 결합에 의해 부착될 수 있는 임의의 표지 모이어티에 접합될 수 있다 (문헌 [Singh et al (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15]; [Harlow E. and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]; [Lundblad R.L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL]). 부착된 표지는 리간드 친화도, 항체/항원 결합, 또는 이온 복합체 형성을 조정하기 위해 (i) 검출가능한 신호를 제공하거나, (ii) 제2 표지와 상호작용하여 제1 또는 제2 표지에 의해 제공되는 검출가능한 신호를 변형시켜, 예를 들어 FRET (형광 공명 에너지 전달)를 생성시키거나; (iii) 항원 또는 리간드와의 상호작용을 안정화하거나 이들파의 결합 친화도를 증가시키거나, (iv) 이동성, 예를 들어 전기영동 이동성, 또는 세포-투과도에 전하, 소수성, 형태 또는 다른 물리적 파라미터로 인한 영향을 주거나, 또는 (v) 포획 모이어티를 제공하는 기능을 할 수 있다.
- [0030] 표지된 시스테인 조작된 항체는 예를 들어 특이적 세포, 조직, 또는 혈청에서 관심있는 항원의 발현을 검출하기 위한 진단 분석에서 유용할 수 있다. 진단 용도를 위해, 항체는 전형적으로 검출가능한 모이어티로 표지될 것이다. 일반적으로 하기 범주로 분류될 수 있는 수많은 표지를 이용할 수 있다:
- [0031] (a) 방사선 동위원소 (방사선핵종), 예를 들어 ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At 또는 ^{213}Bi . 방사선 동위원소 표지된 항체는 수용체 표적화된 영상화 실험에 유용하다. 항체는 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)]에 기재된 기술을 이용하여, 방사선 동위원소 금속에 결합하거나 칼레이팅되거나 또는 다른 방식으로 복합체를 형성하며 항체의 조작된 시스테인 티올과 반응성인 리간드 시약으로 표지될 수 있다. 금속 이온과 복합체를 형성할 수 있는 칼레이팅 리간드로는 DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA 및 TETA (마크로시클릭스 (Macrocyclics), 미국 텍사스주 달라스 소재) 등이 있다. 방사선핵종은 본 발명의 항체-약물 접합체와의 복합체 형성을 통해 표적화될 수 있다 (문헌 [Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146]).
- [0032] 링커 시약, 예를 들어 DOTA-말레이미드 (4-말레이미도부티르아미도벤질-DOTA)는 문헌 [Axworthy et al (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4):1802-1807]의 절차에 따라 아미노벤질-DOTA를 이소프로필클로로포르메이트 (알드리치 (Aldrich))로 활성화시킨 4-말레이미도부티르산 (플루카 (Fluka))과 반응시켜 제조할 수 있다. DOTA-말레이미드 시약은 시스테인 조작된 항체의 유리 시스테인 아미노산과 반응하여 항체 상에 금속 착물 형성 리간드를 제공한다 (문헌 [Lewis et al (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86]). 칼레이팅 링커 표지 시약, 예를 들어 DOTA-NHS (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노(N-히드록시숙신이미드 에스테르)는 시판되고 있다 (마크로시클릭스, 미국 텍사스주 달라스 소재). 방사선핵종 표지된 항체를 사용한 수용체 표적 영상화는 종양 조직 중 항체의 접근적인 축적을 검출 및 정량함으로써 경로 활성화의 마커를 제공할 수 있다 (문헌 [Albert et al (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210]). 접합된 방사성-금속은 리소좀 분해 후 세포 내에 남아 있을 수 있다.
- [0033] 영상화 실험을 위한 항체 표지로서 적합한 금속-칼레이트 복합체가 다음 문헌에 개시되어 있다: US 5342606; US 5,428,155; US 5,316,757; US 5,480,990; US 5,462,725; US 5,428,139; US 5,385,893; US 5,739,294; US 5,750,660; US 5,834,456; [Hnatowich et al (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157]; [Meares et al (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78]; [Mirzadeh et al (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65]; [Meares et al (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26]; [Izard et al (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350]; [Nikula et al (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90]; [Camera et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62]; [Kukis et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110]; [Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670]; [Camera et al (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646]; [Ruegg et al (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226]; [Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670]; [Lee et al (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482]; [Mitchell, et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112]; [Kobayashi et al (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111]; [Miederer et al (2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137]; [DeNardo et al (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90]; [Blend et al (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363]; [Nikula et al (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76]; [Kobayashi et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36]; [Mardirossian et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74]; [Roselli et al (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20].
- [0034] (b) 형광 표지, 예를 들어 희토류 칼레이트 (유로퓸 칼레이트), FITC, 5-카르복시플루오레세인, 6-카르복시플루오레세인을 비롯한 플루오레세인 유형, TAMRA를 비롯한 로다민 유형; 댄실; 리쓰아민 (Lissamine); 시아닌; 피

코에리트린; 텍사스 레드 (Texas Red) 및 이들의 유사체. 형광 표지는 예를 들어 [Current Protocols in Immunology, 상기 문헌]에 개시된 기술을 이용하여 항체에 접합될 수 있다. 형광 염료 및 형광 표지 시약은 인비트로겐 (Invitrogen)/몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes, 미국 오레곤주 유진 소재) 및 피어스 바이오테크놀로지, 잉크. (Pierce Biotechnology, Inc., 미국 일리노이주 록포드 소재)에서 시판하는 것을 포함한다.

[0035] (c) 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하거나 문헌에 개시되어 있다 (US 4275149). 효소는 일반적으로 다양한 기술을 이용하여 측정할 수 있는 발색 기질의 화학적 변경을 촉매한다. 예를 들어, 효소는 기질에서 색상 변화를 촉매할 수 있고, 이것은 분광학적으로 측정할 수 있다. 별법으로, 효소는 기질의 형광 또는 화학발광을 변경시킬 수 있다. 형광 변화를 정량하는 기술은 상기한 바와 같다. 화학발광 기질은 화학 반응에 의해 전자적으로 여기되고, 이후에는 (예를 들어, 화학발광 계측기를 사용하여) 측정될 수 있는 광을 방출하거나 형광 수용자에게 에너지를 공여할 수 있다. 효소 표지의 예로는 루시페라제 (예를 들면, 개똥벌레 루시페라제 및 박테리아 루시페라제, US 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 테하이드로제나제, 우레아제, 퍼옥시다제, 예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제 (AP), β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 당류 옥시다제 (예를 들면, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 테하이드로제나제), 헤테로시클릭 옥시다제 (예를 들어, 우리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로 퍼옥시다제 등이 있다. 효소를 항체에 접합시키는 기술은 문헌 [O'Sullivan et al (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166]에 기재되어 있다.

[0036] 효소-기질 조합의 예는, 예를 들어 다음을 포함한다:

[0037] (i) 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 기질로서의 수소 퍼옥시다제 - (여기서, 수소 퍼옥시다제는 염료 전구체 (예를 들면, 오르토페닐렌 디아민 (OPD) 또는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 염산염 (TMB))를 산화시킴),

[0038] (ii) 알칼리성 포스파타제 (AP)와 발색 기질로서의 파라-니트로페닐 포스페이트, 및

[0039] (iii) β -D-갈락토시다제 (β -D-Gal)와 발색 기질 (예를 들면, p-니트로페닐- β -D-갈락토시다제) 또는 형광 기질 4-메틸움벨리페릴- β -D-갈락토시다제.

[0040] 당업자는 많은 다른 효소-기질 조합을 이용할 수 있다. 일반적인 검토를 위해서 US 4275149 및 US 4318980을 참조한다.

[0041] 표지는 아미노산 측쇄, 활성화된 아미노산 측쇄, 시스테인 조작된 항체 등과 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체를 비오틴과 접합시키고, 상기 언급한 표지의 3가지 광범위한 범주 중 임의의 표지를 아비딘 또는 스트렙타비딘과 접합시킬 수도 있고, 또는 그 반대로 접합시킬 수도 있다. 비오틴은 스트렙타비딘에 선택적으로 결합하기 때문에, 표지가 이러한 간접적인 방식으로 항체와 접합될 수 있다. 별법으로, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시키기 위해서, 폴리펩티드 변이체는 작은 합텐 (예를 들면, 디그옥신)과 접합시키고 상기 언급한 여러 유형의 표지 중 하나를 항-합텐 폴리펩티드 변이체 (예를 들면, 항-디그옥신 항체)와 접합시킨다. 이에 따라, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시킬 수 있다 (문헌 [Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego]).

[0042] 본 발명의 항체는 임의의 공지된 분석 방법, 예를 들어 ELISA, 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석 및 면역침전 분석에 사용될 수 있다 (문헌 [Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.]).

[0043] 검출 표지는 결합 또는 인식 사건을 국소화하고 가시화하며 정량하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 표지된 항체는 세포-표면 수용체를 검출할 수 있다. 검출가능하게 표지된 항체의 또 다른 용도는 비드를 형광 표지된 항체와 접합시키고, 리간드의 결합시에 형광 신호를 검출하는 것을 포함하는, 비드-기재의 면역포획 (immunocapture) 방법이다. 유사한 결합 검출 방법은 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 효과를 이용하여 항체-항원 상호작용을 측정하고 검출한다.

[0044] 검출 표지, 예를 들어 형광 염료 및 화학발광 염료 (문헌 [Briggs et al (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino acids," J. Chem. Soc, Perkin-Trans. 1:1051-1058])는 검출가능한 신호를 제공하고, 일반적으로 다음 특성을 갖는 항체 표지에 적용가능한 것이 바람직하다:(i) 표지된 항체는 낮은 백그라운드로 매우 높은 신호를 생성하여 소량의 항체가 무-세포 분석 및 세포-기반 분석 둘 모두에서 민감하게 검출될 수 있도록 해야 하고, (ii) 표지된 항체는 광안정성이어서 형광 신호가 유의한 광표백(photo bleaching) 없이 관찰되고 모니터링되며 기록될 수 있어야 한다. 표지된 항체를 특히 살아있

는 세포의 막 또는 세포 표면에 세포 표면 결합시키는 것을 포함하는 적용을 위해서는, 상기 표지가 (iii) 효과적인 접합체 농도 및 검출 민감도 달성을 위해 양호한 수용성을 보유하고, (iv) 세포의 정상적인 대사 과정을 파괴하거나 조기 세포 사멸을 초래하지 않도록 살아있는 세포에 비-독성인 것이 바람직하다.

[0045] 세포 형광 강도의 직접 정량화 및 형광 표지 사건의 확인, 예를 들어 웨티드-염료 접합체의 세포 표면 결합은 살아있는 세포 또는 비드와의 혼합/해독 (mix-and-read), 비-방사성 분석을 자동화한 시스템 (FMAT® 8100 HTS 시스템, 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems, 미국 캘리포니아 포스터 시티 소재))에서 수행될 수 있다 (문헌 [Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. of Biomolecular screening* 4:193-204]). 표지된 항체의 용도에는, 세포 표면 수용체 결합 분석, 면역포획 분석, 형광 연결된 면역흡착 분석 (FLISA), 카스파제-절단 (문헌 [Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:618-23], US 6,372,907), 세포자멸 (문헌 [Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51]) 및 세포독성 분석도 포함된다. 형광측정 미세부피 분석 기술은, 세포 표면에 표적화된 분자에 의한 상향 또는 하향 조절을 확인하는데 이용될 수 있다 (문헌 [Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *Anal. Biochem.* 271:143-51]).

[0046] 본 발명의 표지된 항체는 생체의학적 영상화와 분자 영상화의 다양한 방법 및 기술, 예를 들어:(i) MRI (자기 공명 영상화), (ii) MicroCT (컴퓨터 단층촬영술), (iii) SPECT (단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영술), (iv) PET (양전자 방출 단층촬영술) (문헌 [Chen et al (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49]), (v) 생체발광, (vi) 형광, 및 (vii) 초음파에 의한 영상화 바이오마커 및 프로브로서 유용하다. 면역섬광조영술 (immunoscintigraphy)은 방사성 물질로 표지된 항체를 동물 또는 인간 환자에게 투여하고 항체가 위치하는 신체 부위의 사진을 찍는 영상화 절차이다 (US 6528624). 영상화 바이오마커는 객관적으로 측정되어 정상적인 생물학적 과정, 발병 과정 또는 치료 개입에 대한 약리학적 반응의 지시자로서 평가될 수 있다. 생물 마커는 여러 가지 유형일 수 있다: 제0형은 질환의 천연 병력 마커이며, 공지된 임상 지표, 예를 들어 류마티스성 관절염에서 활액 염증의 MRI 평가와 장기적으로 상관관계가 있고; 제I형 마커는 작용 메카니즘이 임상 결과와 관련되지 않을 수 있는 경우에도 이 메카니즘에 따른 개입 효과를 보여주며; 제II형 마커는 대리 종말점으로서 기능하여, 바이오마커의 변화 또는 바이오마커로부터의 신호가 표적화된 반응의 "유효성", 예를 들어 류마티스성 관절염에서 CT에 의한 골 침식 측정치에 대한 임상적 이점을 예측한다. 따라서, 영상화 바이오마커는 (i) 표적 단백질의 발현, (ii) 표적 단백질에 대한 치료제의 결합, 즉 선택성, 및 (iii) 소실율 및 반감기 약력학 데이터에 대한 약동학 (PD) 치료 정보를 제공할 수 있다. 실험에 기초한 바이오마커에 비한 생체내 영상화 바이오마커의 이점은 비-침해성 치료, 정량화 가능한 전신 평가, 반복적 투여 및 평가, 즉 여러 시점에서의 투여 및 평가, 및 전임상 결과 (작은 동물)로부터 임상 (인간) 결과로의 잠재적으로 전이 가능한 효과를 포함한다. 몇몇 용도의 경우, 생체영상화는 전임상 연구에서의 동물 실험을 대체하거나 그 횟수를 최소화한다.

[0047] 웨티드 표지 방법은 공지되어 있다. 문헌 [Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.], [Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2], [Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2], [Glazer et al (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York], [Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York], [Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York] 및 [Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.], [De Leon-Rodriguez et al (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155], [Lewis et al (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324], [Li et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115], [Mier et al (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237])을 참조한다.

[0048] 충분히 근접한 두 모이어티, 즉 형광 리포터 및 켄쳐(quencher)로 표지된 웨티드 및 단백질에서는 형광 공명 에너지 전달 (FRET)이 일어난다. 리포터 기는 대체로 특정 파장의 광에 의해 여기되고 최대 밝기에서 방출될 수 있는 적절한 스톡스 이동 (Stokes shift)으로 에너지를 수용자기 또는 켄쳐 기에게 전달하는 형광 염료이다. 형광 염료에는 연장된 방향성 (extended aromaticity)을 갖는 분자, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 이

들의 유도체 등이 있다. 형광 리포터는 무손상 펩티드 중의 켄처 모이어티에 의해 부분적으로 또는 유의하게 켄칭될 수 있다. 펩티다제 또는 프로테아제에 의한 펩티드의 절단시에, 검출가능한 형광 증가가 측정될 수 있다 (문헌 [Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34]).

[0049] 본 발명의 표지된 항체는 친화도 정제제로서 사용될 수도 있다. 이 과정에서, 표지된 항체는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 세파텍스 (Sephadex) 수지 또는 여과지와 같은 고체상에 고정된다. 고정된 항체를 정제될 항원을 함유하는 샘플과 접촉시킨 후, 지지체를 정제될 항원을 제외하고는 샘플 중에 존재하는 실질적으로 모든 물질을 제거할 적합한 용매로 세척하는데, 상기 항원은 고정된 폴리펩티드 변이체에 결합한다. 최종적으로, 상기 지지체를 폴리펩티드 변이체로부터 항원을 방출시킬 또 다른 적합한 용매, 예를 들어 글리신 완충액 (pH 5.0)으로 세척한다.

[0050] 표지 시약은 전형적으로 (i) 시스테인 조작된 항체의 시스테인 티올과 직접 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있거나, (ii) 링커 시약과 반응하여 링커-표지 중간체를 형성할 수 있거나, 또는 (iii) 링커 항체와 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있는 반응성 관능기를 보유한다. 표지 시약의 반응성 관능기로는, 말레이미드, 할로아세틸, 요오도아세트아미드 숙신이미딜 에스테르 (예를 들면, NHS, N-히드록시숙신이미드), 이소티오시아네이트, 술포닐 클로라이드, 2,6-디클로로트리아지닐, 웬타플루오로페닐 에스테르 및 포스포르아미다이트 등이 있으나, 다른 관능기도 사용될 수 있다.

[0051] 예시적인 반응성 관능기는 검출가능한 표지, 예를 들어 비오틴 또는 형광 염료의 카르복실기 치환기의 N-히드록시숙신이미딜 에스테르 (NHS)이다. 표지의 NHS 에스테르는 예비 형성, 단리, 정제 및/또는 특성화될 수 있거나, 또는 계내 형성되어 항체의 친핵성 기와 반응할 수 있다. 전형적으로, 표지의 카르복실 형태는 카르보디이미드 시약, 예를 들어 디시클로헥실카르보디이미드, 디이소프로필카르보디이미드, 또는 유로늄 시약, 예를 들어 TSTU (0-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 테트라플루오로보레이트, HBTU (0-벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트) 또는 HATU (0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트), 활성물질, 예를 들어 1-히드록시벤조트리아졸 (HOBt) 및 N-히드록시숙신이미드의 몇가지 조합과의 반응으로 활성화되어 표지의 NHS 에스테르를 형성한다. 몇몇 경우에는, 표지 및 항체가 표지의 계내 활성화 및 항체와의 반응으로 커플링되어 표지-항체 접합체를 1단계로 형성할 수 있다. 다른 활성화 및 커플링 시약으로는, TBTU (2-(1H-벤조트리아조-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트), TFFH (N,N',N",N'"-테트라메틸유로늄 2-플루오로-헥사플루오로포스페이트), PyBOP (벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트, EEDQ (2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로-퀴놀린), DCC (디시클로헥실카르보디이미드), DIPCDI (디이소프로필카르보디이미드), MSNT (1-(메시틸렌-2-술포닐)-3-니트로-1H-1,2,4-트리아졸 및 아릴 술포닐 할라이드, 예를 들어 트리이소프로필벤젠술포닐 클로라이드 등이 있다.

본 발명의 일부민 결합 펩티드-Fab 화합물:

[0053] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 일부민 결합 단백질에 융합된다. 혈장-단백질 결합은 수명이 짧은 분자의 약력학 특성을 개선시키는데 효과적인 수단일 수 있다. 일부민은 혈장에서 가장 풍부한 단백질이다. 혈청 일부민 결합 펩티드 (ABP)는 조직 흡수, 투과 및 확산의 변경 등을 비롯하여 융합된 활성 도메인 단백질의 약동학을 변경시킬 수 있다. 이들 약동학 파라미터는 적절한 혈청 일부민 결합 펩티드 서열의 특이적 선택을 통해 조정될 수 있다 (US 20040001827). 일련의 일부민 결합 펩티드가 과자 디스플레이 스크리닝을 통해 확인되었다 (문헌 [Dennis et al (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043], WO 01/45746]). 본 발명의 화합물은 (i) 문헌 [Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043]의 표 III 및 표 IV, 35038 페이지, (ii) US 20040001827의 [0076] 서열 9 내지 22, 및 (iii) WO 01/45746의 12 내지 13 페이지에 제시되어 있는 ABP 서열을 포함하며, 상기 문헌 모두가 본원에 참조로 포함된다. 일부민 결합 펩티드를 Fab 중쇄의 C-말단에 1:1의 화학양론적 비율 (1 ABP/1 Fab)로 융합시켜 일부민 결합 (ABP)-Fab를 조작한다. 이들 ABP-Fab와 일부민의 회합은 토끼 및 마우스에서 항체 반감기를 25배 초과로 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 상기 기재한 반응성 Cys 잔기는 이들 ABP-Fab에 도입되어 세포독성 약물과의 부위-특이적 접합 및 이후의 생체내 동물 연구에 사용될 수 있다.

[0054] 예시적인 일부민 결합 펩티드 서열은 서열 80-84에 나열된 아미노산 서열을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다:

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	서열:80
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	서열:81
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	서열:82
RLIEDICLPRWGCLWEDD	서열:83
DICLPRWGCLW	서열:84

[0055]

항체-약물 접합체

[0056]

다른 측면에서, 본 발명은 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체, 또는 항체-약물 접합체 (ADC)를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 추가로 면역접합체를 사용하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 면역접합체는 세포독성제 또는 검출가능한 물질에 공유 결합에 의해 부착된 임의의 상기 항-STEAP-1 항체를 포함한다.

[0058]

암 치료에서 세포독성제 또는 세포증식 억제제, 즉 종양 세포를 사멸시키거나 억제하는 약물의 국소 전달을 위한 항체-약물 접합체의 사용 (문헌 [Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172]; 미국 특허 4,975,278)은 종양으로 약물 모이어티의 표적화된 전달, 및 그 내부의 세포내 축적을 허용하고, 여기서 상기 비접합된 약물 물질의 전신 투여는 정상 세포뿐만 아니라 제거하고자 하는 종양 세포에 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 (문헌 [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]). 이에 따라 최소 독성을 가지면서 최대 효능을 보이는 것이 추구된다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체는 모두 상기 전략에서 유용한 것으로 보고되었다 (문헌 [Rowland et al (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87]). 상기 방법에서 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 베토트랙세이트, 및 빈데신을 포함한다 (Rowland et al (1986) 상기 문헌). 항체-독소 접합체에서 사용되는 독소는 박테리아 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 독소, 예를 들어 리신, 소분자 독소, 예를 들어 젤다나마이신 (문헌 [Mandler et al (2000) *Jour. 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 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928]; [Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342])을 포함한다. 독소는 튜뷸린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 억제를 포함한 메카니즘에 의해 그들의 세포독성 및 세포증식 억제 효과를 나타낼 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합될 때 불활성이거나 활성이 작은 경향이 있다.

[0059]

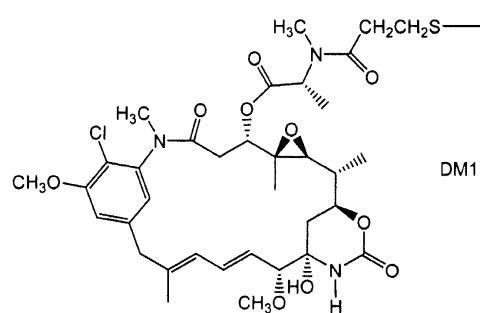
제발린® (이브리투모맙 티옥세탄, 바이오젠/이덱)은 티오우레아 링커-킬레이터에 의해 결합된, 정상 및 악성 B 림프구의 표면에서 발견된 CD20 항원에 대해 지시된 쥐과동물 IgG1 카파 모노클로날 항체 및 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성 동위원소로 이루어진 항체-방사성 동위원소 접합체이다 (문헌 [Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77]; [Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42]; [Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20 (10):2453-63]; [Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69]). 제발린은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 대해 활성을 갖지만, 투여는 대부분의 환자에서 종종 및 장기 혈구감소증을 일으킨다. 칼리케아미신에 연결된 hu CD33 항체로 이루어진 항체-약물 접합체인 마일로타그™ (켐투주맙 오조가미신; 와이어쓰 파마슈티칼스)는 2000년에 주사에 의한 급성 골수성 백혈병의 치료를 위해 승인되었다 (문헌 [Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특허 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,693,762; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). 디슬피드 링커 SPP를 통해 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 huC242 항체로 이루어진 항체-약물 접합체인 칸투주맙 메르탄신 (이뮤노젠, 인크.)을 대상으로 하여, CanAg를 발현하는 암, 예를 들어 결장암, 췌장암, 위암 등을 치료하기 위한 II상 시험이 진행되고 있다. 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 이루어진 항체-약물 접합체인 MLN-2704 (밀레니엄 팜., 비지엘 바이올로직스, 이뮤노젠, 인크.)는 현재 전립선 종양의 가능성 있는 치료를 위해 개발되고 있다. 아우리스타틴 웨티드인 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체)을 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 루이스 Y에 특이적임) 및 cAC10 (혈액 종양 상의 CD30에 특이적임)에 접합시켰고 (문헌 [Doronina et al (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784]), 이는 현재 치료제 개발 중에 있다.

- [0060] 면역접합체 생성에 유용한 화학요법제를 본원에서 기재한다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 애루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디아 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPI 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*sapaonaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다 (예를 들어, WO 93/21232 (1993년 10월 28일 공개) 참조). 다양한 방사선핵종이 방사성 접합된 항체의 생산에 이용될 수 있다. 그 예는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다. 항체 및 세포독성체의 접합체는 다양한 이관능성 단백질-커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디피미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌 디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디나트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al (1987) Science, 238:1098]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14 표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이 항체에 대한 방사선핵종의 접합을 위한 예시적인 퀼레이팅제이다 (WO 94/11026).
- [0061] 항체 및 1종 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우리스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 상기 독소의 유도체의 접합체도 본원에서 고려된다.
- [0062] 메이탄신 및 메이탄시노이드
- [0063] 몇몇 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 본 발명의 항체 (전장 또는 단편)를 포함한다.
- [0064] 메이탄시노이드는 튜불린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 3896111). 이후에, 특정 미생물도 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 밝혀졌다 (미국 특허 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.
- [0065] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의한 제조에 비교적 이용하기 쉽고, (ii) 비-디솔피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체 약물 접합체에서 흥미있는 약물 모이어티이다.
- [0066] 메이탄시노이드 약물 모이어티로서 사용하기 적합한 메이탄신 화합물을 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 방법에 따라 천연 공급원으로부터 단리되거나 유전자 조작 기술을 사용하여 생산할 수 있거나 (문헌 [Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973] 참조), 또는 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체는 공지된 방법에 의해 합성 방식으로 제조될 수 있다.
- [0067] 예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 C-19-데클로로 (미국 특허 4256746) (안사미토신 P2의 수소화알루미늄리튬 환원에 의해 제조); C-20-히드록시 (또는 C-20-데메틸) +/- C-19-데클로로 (미국 특허 4361650 및 4307016) (스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 또는 악티노마이세스 (*Actinomyces*)를 사용한 탈메틸화 또는 LAH를 사용한 탈염소화에 의해 제조)과 같은 변형된 방향족 고리를 갖는 것; 및 C-20-데메톡시, C-20-아실옥시 (-OCOR), +/- 데클로로 (미국 특허 4,294,757) (아실 클로라이드를 사용한 아실화에 의해 제조), 및 다른 위치에 변형을 갖는 것을 포함한다.
- [0068] 예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 또한 C-9-SH (미국 특허 4424219) (메이탄시놀과 H₂S 또는 P₂S₅의 반응에 의해 제조); C-14-알콕시메틸(데메톡시/CH₂OR) (US 4331598); C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH₂OH 또는 CH₂OAc) (미국 특허 4450254) (노카르디아 (*Nocardia*)로부터 제조됨); C-15-히드록시/아실옥시 (US

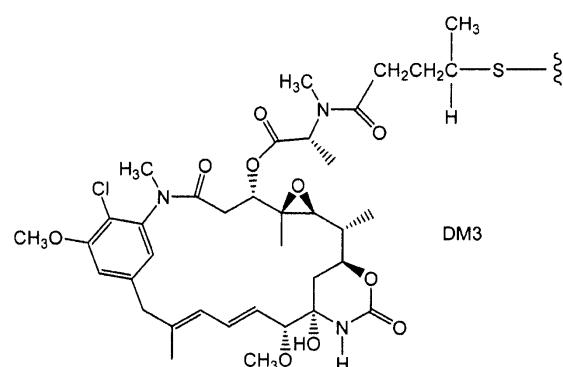
4,364,866) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 전환에 의해 제조); C-15-메톡시 (미국 특허 4,313,946 및 4,315,929) (트레위아 누들플로라 (*Trewia nudiflora*)로부터 단리됨); C-18-N-데메틸 (미국 특허 4,362,663 및 4,322,348) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조); 및 4,5-데옥시 (US 4371533) (메이탄시놀의 삼염화티탄/LAH 환원에 의해 제조)와 같은 변형을 갖는 것을 포함한다.

[0069]

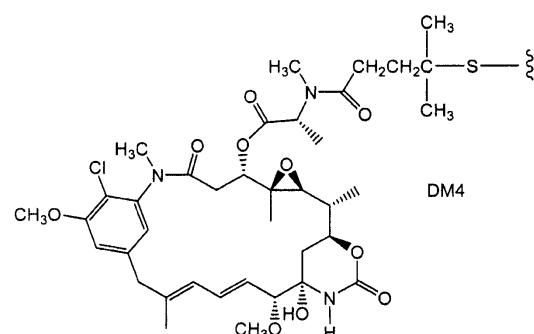
메이탄시노이드 약물 모이어티의 예시적인 실시양태는 하기 구조를 갖는 DM1; DM3; 및 DM4를 포함한다:



[0070]



[0071]

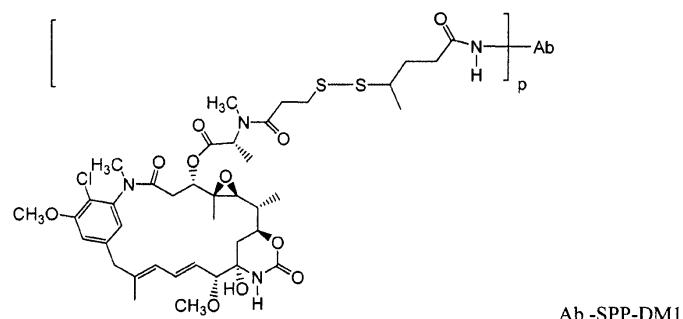


[0072]

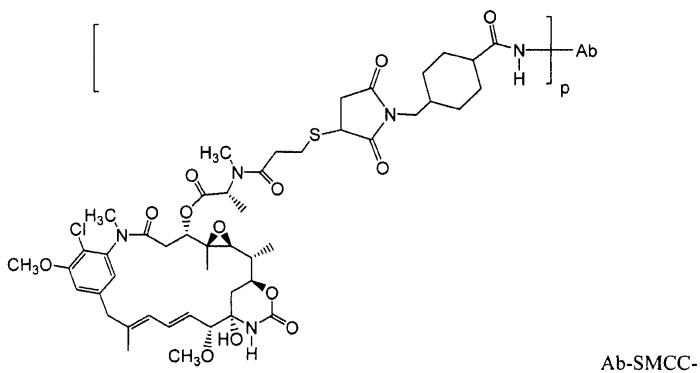
여기서, 파선은 항체 약물 접합체의 링커 (L)에 대한 약물의 황 원자의 공유 결합에 의해 부착을 나타낸다. SMCC에 의해 DM1에 연결된 헤르셉틴® (트라스투주맙)은 보고되어 있다 (그 전부가 명백하게 본원에 참고로 포함된 WO 2005/037992). 본 발명의 항체 약물 접합체는 본원에 개시된 절차에 따라 제조할 수 있다.

[0074]

다른 예시적인 메이탄시노이드 항체 약물 접합체는 하기 구조 및 약어를 갖는다 (여기서 Ab는 항체이고, p는 1 내지 약 8이다):



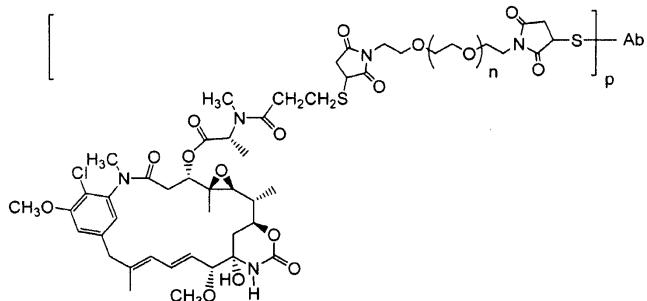
[0075]



DM1

[0076]

DM1이 BMPEO 링커를 통해 항체의 티울기에 연결된 예시적인 항체 약물 접합체는 하기 구조 및 약어를 갖는다.



[0078]

여기서, Ab는 항체이고; n은 0, 1 또는 2이고; p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0080]

메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 그의 제조 방법, 및 이들의 치료 용도는 예를 들어 그 개시내용이 본원에 참고로 명백하게 포함되는 미국 특허 5,208,020; 5,416,064; 6,441,163 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다. 문헌 [Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 지시된 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 높은 세포독성을 보이는 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 분석에서 항종양 활성을 나타냈다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에서는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 쥐과동물 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 다른 쥐과동물 모노클로날 항체 TA.1에 디술피드 링커를 통해 접합된 면역접합체를 기재하고 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당 3×10^5 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관내에서 시험하였다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물에 유사한 수준의 세포독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시켜 증가시킬 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타냈다.

[0081]

항-STEAP-1 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조한다 (예를 들어, 미국 특허 5,208,020 (그 개시 내용이 본원에 명백하게 참고로 포함됨) 참조). 1개의 항체 분자에 접합된 평균 3 내지 4 개의 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증대시키는 효능을 나타내지만, 심지어 하나의 독소/항체 분자도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증대시킬 것으로 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 기술에 의해 합성되거나 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 5,208,020, 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예를 들어 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0082]

예를 들어 그 개시 내용이 본원에 명백하게 참고로 포함된 미국 특허 5,208,020, 6,441,163, 또는 유럽 특허 0 425 235 B1, 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)] 및 US 2005/016993 A1에 개시된 것을 포함하여, 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 위한, 당업계에 공지된 많은 연결기가 있다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 미국 특허 출원 11/141344 (2005년 5월 31일 출원, "Antibody drug Conjugates and Methods")에 개시된 바와 같이 제조할 수 있다. 링커 기는 상기 확인된 특허에 개시된 바와 같

은 디술피드기, 티오에테르기, 산불안정기, 광불안정기, 펩티다제 불안정기, 또는 에스테라제 불안정기를 포함한다. 추가의 링커 기가 본원에서 기재되고 예시된다.

[0083] 항체와 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜티오)프로페오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디프이미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디나트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 술피드 연결을 제공하기 위한 특히 바람직한 커플링제는 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜티오)프로페오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)]) 또는 N-숙신이미딜-4-(2-페리딜티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.

[0084] 링커는 결합 유형에 따라서 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결은 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실기와 반응시킴으로써 형성될 수 있다. 이러한 반응은 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

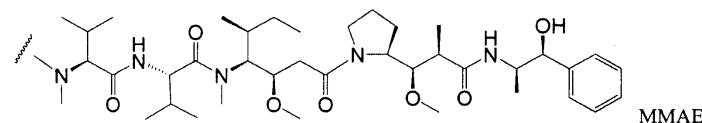
[0085] 한 실시양태에서, 본 발명의 임의의 항체 (전장 또는 단편)는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된다. 면역접합체의 한 실시양태에서, 세포독성제 D는 메이탄시노이드 DM1이다. 면역접합체의 한 실시양태에서, 링커는 SPDP, SMCC, IT, SPDP 및 SPP로 이루어진 군으로부터 선택된다.

아우리스타틴 및 돌로스타틴

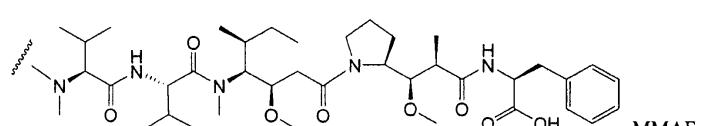
[0087] 몇몇 실시양태에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌로스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 즉 아우리스타틴에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국 특허 5,635,483; 5,780,588). 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584]), 항암 (미국 특허 5,663,149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0088] 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 그 개시내용의 전문을 명백하게 본원에 참고로 포함시킨 문헌 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004]에 개시된 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 D_E 및 D_F를 포함한다.

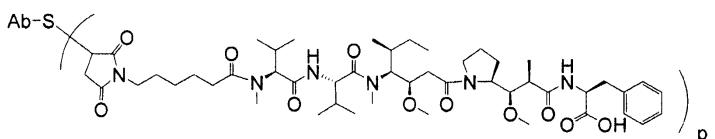
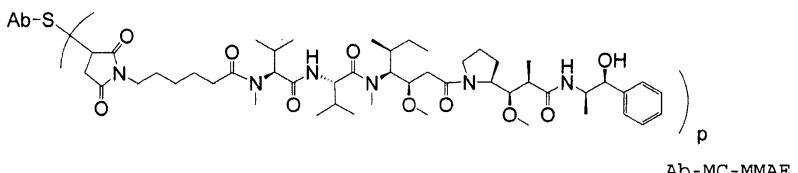
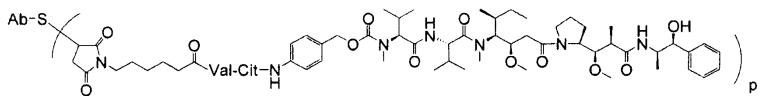
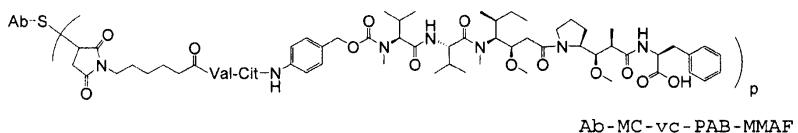
[0089] 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 MMAE이다 (여기서, 파선은 항체 약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 결합에 의해 부착을 나타낸다).



[0090] 다른 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 MMAF이고, 여기서 파선은 항체 약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 결합에 의해 부착을 나타낸다 (US 2005/0238649):



[0093] MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 성분 (본원에서 추가로 기재됨)을 포함하는 추가의 예시적인 실시양태는 하기 구조 및 약어를 갖는다 (여기서, Ab는 항체를 의미하고; p는 1 내지 약 8임):



[0094] 전형적으로, 웨티드-기재 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 웨티드 단편 사이의 웨티드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 이러한 웨티드 결합은 예를 들어 웨티드 화학 분야에 널리 공지된 액상 합성 방법(문헌 [E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조될 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 미국 특허 5,635,483; 미국 특허 5,780,588; 문헌 [Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465]; [Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277]; [Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725]; [Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863] 및 [Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784])의 방법에 따라 제조될 수 있다.

칼리케아미신

[0095] 다른 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다. 항생제 중 칼리케아미신 부류는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA를 절단할 수 있다. 칼리케아미신 부류의 접합체를 제조하는 것에 대해서는 미국 특허 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 및 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 컴퍼니 (American Cyanamid Company)의 특허)를 참조한다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체로는 γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-아세틸- γ_1^1 , PSAG 및 Θ_1^1 을 들 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)]; 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드사의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 항염산제인 QFA이다. 칼리케아미신과 QFA는 둘다 세포내 작용부위를 갖고, 항질막을 쉽게 통과하지 못한다. 따라서, 항체에 의해 매개되는 내재화를 통해 이들 물질을 세포내로 흡수시키면 이들의 세포독성 효과가 크게 향상된다.

다른 세포독성제

[0099] [0100] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양제는 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 5,053,394, 5,770,710에 기재된, 접합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 물질의 부류, 뿐만 아니라 에스페라미신 (미국 특허 5,877,296)을 포함한다.

[0101] 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편으로는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 애루기노사로부터 유래됨), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신,

페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 들 수 있다 (예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조).

[0102] 또한, 본 발명은 항체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예를 들어 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체도 고려한다.

[0103] 종양의 선택적인 파괴를 위해, 항체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 방사성 접합된 항체의 생산을 위해 다양한 방사성 동위원소가 이용가능하다. 그 예는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 접합체를 검출용으로 사용하는 경우에는, 접합체는 섬광조영 연구용 방사성 원자, 예를 들어 Tc^{99m} 또는 I¹²³을 포함할 수 있거나, 또는 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, MRI로도 공지됨)용 스핀 표지, 예를 들어 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0104] 방사성 표지 또는 다른 표지를 공지된 방식으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 웨티드는 생합성할 수 있거나, 또는 예를 들어 수소 대신에 불소-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 이용하는 화학적 아미노산 합성에 의해 합성할 수 있다. Tc^{99m} 또는 I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ 및 In¹¹¹과 같은 표지를 웨티드 내의 시스테인 잔기를 통해 부착시킬 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착시킬 수 있다. 요오도겐 (IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57])을 사용하여 요오드-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.

[0105] 항체와 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티오)프로페오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디프이미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14 표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이 항체에 대한 방사성핵종의 접합을 위한 예시적인 킬레이팅제이다 (WO 94/11026 참조). 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산불안정성 링커, 웨티다제 민감성 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디슬퍼드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0106] 본 발명의 화합물은 상업적으로 이용가능한 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(미국 일리노이주 록포드 소재)로부터의) 교차-링커 시약, 즉 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 사용하여 제조된 ADC를 포함하나, 이로 한정되지는 않는다 (문헌 [pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog] 참조).

항체 약물 접합체의 제조:

[0108] 본 발명의 항체 약물 접합체 (ADC)에서, 항체 (Ab)는 링커 (L)을 통해 항체 당 하나 이상의 약물 모이어티 (D), 예를 들어 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티에 접합된다. 한 실시양태에서, 항체 당 약물 모이어티 (D) 개수는 항체 당 약 1 내지 약 5개, 다르게는 약 2 내지 약 6개, 다르게는 약 2 내지 약 5개, 다르게는 약 3 및 4개 약물 모이어티이다. 항체 당 약물 모이어티의 개수는 통상적으로 항체 약물 접합체 집단 내의 모든 접합체에 대한 평균 개수이므로, 항체 당 약물 모이어티의 개수는 전체 개수가 아닐 수도 있다. 화학식 1의 ADC는 다음을 비롯한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 여러 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 항체의 친핵성 기를 2가의 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵성 기를 2가의 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 D-L을 형성시킨 다음, 이를 항체의 친핵성 기와 반응시키는 방법. ADC를 제조하기 위한 추가의 방법은 본원에 기재되어 있다.

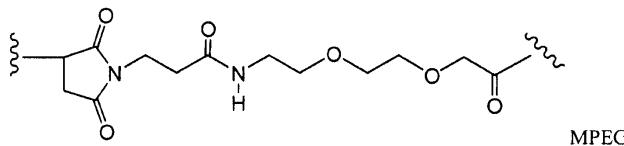
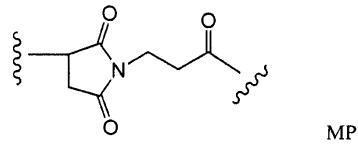
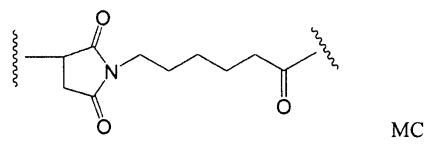
화학식 1

[0109] $\text{Ab}-(\text{L-D})_p$

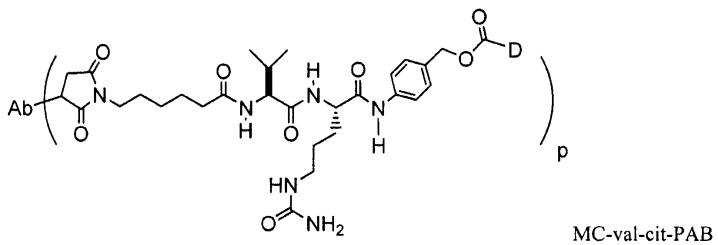
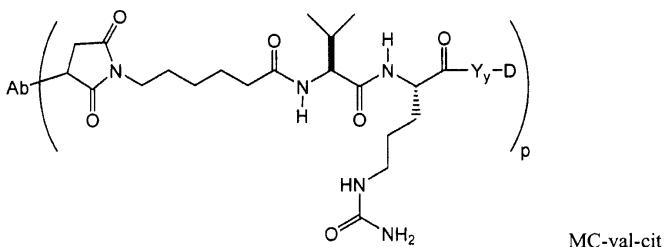
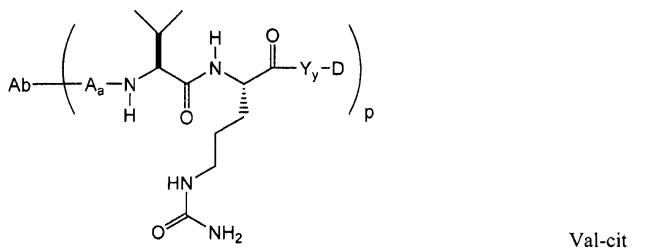
[0110] 링커는 1종 이상의 링커 성분으로 이루어질 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-페리딜티오)펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC") 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트 ("SIAB")를 포함한다. 한 실시양태에서, 링커는 발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카로닐 ("Vc-PAB")이다. 추가의 링커 성분은 당업계에 공지되어 있고, 일부가 본원에 기재되어 있다.

[0111] 몇몇 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 아미노산 링커 성분은 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드를 포함한다. 예시적인 디펩티드는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)을 포함한다. 예시적인 트리펩티드는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)을 포함한다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 천연 발생 아미노산 잔기 및 소수 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 종양 관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 그들의 선택도로 설계되고 최적화될 수 있다.

[0112] 예시적인 링커 성분 구조는 아래에 제시한다 (여기서, 파선은 ADC의 다른 성분에 대한 공유 결합에 의해 부착 부위를 나타낸다):



[0113] 추가의 예시적인 링커 성분 및 약어는 다음을 포함한다 (여기서, 항체 (Ab) 및 링커가 제시되고, p는 1 내지 약 8이다):



[0115]

항체 상의 친핵성 기는 (i) N-말단 아민기; (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 리신; (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인; 및 (iv) 당 히드록실 또는 아미노기 (여기서, 항체는 글리코실화된다)를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 아민, 티올 및 히드록실 기는 친핵성이고, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBT 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이이미드기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 사슬간 디술피드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 항체를 환원제, 예를 들어 DTT (디티오틴레이톨)로 처리함으로써 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 브릿지는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵성 기를 형성할 것이다. 아민을 티올로 전환시키는, 리신과 2-아미노티올란 (트라우트 (Traut) 시약)의 반응을 통해 추가의 친핵성 기를 항체 내로 도입할 수 있다. 반응성 티올기는 1, 2, 3, 4개, 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 돌연변이체 항체를 제조함으로써) 항체 (또는 그의 단편) 내로 도입될 수 있다.

[0117]

본 발명의 항체 약물 접합체는 또한 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하기 위한 항체의 변형에 의해 생산될 수 있다. 글리코실화된 항체의 당을, 예를 들어 퍼요오데이트 산화 시약으로 산화시켜 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 형성할 수 있다. 생성되는 이민 쉬프 (Schiff) 염기 기는 안정한 연결을 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어 수소화붕소 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 연결을 형성할 수 있다. 한 실시양태에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-퍼요오데이트와 반응시키면, 약물 상의 적절한 기와 반응 할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (헤르만손, 바이오컨쥬게이트 테크닉(Hermanson, Bioconjugate Techniques)). 다른 실시양태에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-퍼요오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 (문헌 [Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; US 5362852). 상기 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵성 기와 반응할 수 있다.

[0118]

유사하게, 약물 모이어티 상의 친핵성 기는 (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBT 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이이미드기를 포함하는, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을

형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드기를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

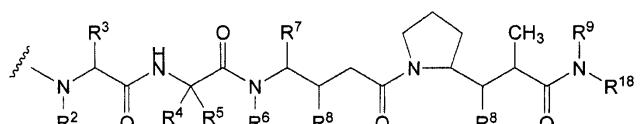
링커-약물 모이어티를 세포-표적화된 단백질, 예를 들어 항체, 이뮤노글로불린 또는 그의 단편에 접합시키기 위한 방법은 예를 들어 그 전문이 본원에 명백하게 참고로 포함된 US5,208,020; US6,441,163; WO 2005037992; WO 2005081711; 및 WO 2006/034488에서 찾아볼 수 있다.

별법으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 웨티드 합성에 의해 제조할 수 있다. DNA의 길이는 접합체의 목적하는 특성을 파괴하지 않는 링커 웨티드를 코딩하는 영역에 의해 분리되거나 또는 서로 인접해 있는 접합체의 두 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.

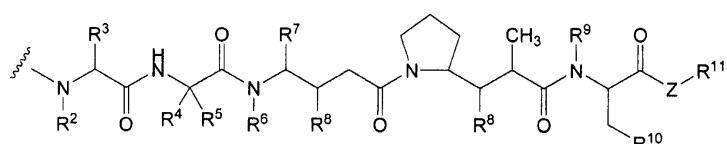
또 다른 실시양태에서, 항체를 종양 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (상기, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 소실제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

면역접합체의 한 실시양태에서, 세포독성제 D는 하기 화학식 D_E 또는 D_F 의 아우리스타틴이다:

<화학식 D_E>



<하하식 D_E>

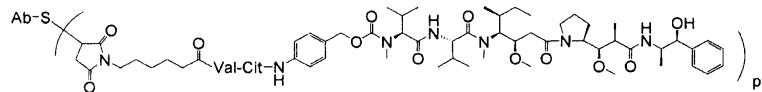


여기서, R^2 및 R^6 은 각각 메틸이고, R^3 및 R^4 는 각각 이소프로필이고, R^7 은 sec-부틸이고, R^8 은 각각 CH_3 , $O-CH_3$, OH , 및 H 로부터 독립적으로 선택되고; R^9 은 H 이고; R^{10} 은 아릴이고; Z 는 $-O-$ 또는 $-NH-$ 이고; R^{11} 은 H , C_1-C_8 알킬, 또는 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_3$ 이고; R^{18} 은 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$ 아릴이고;

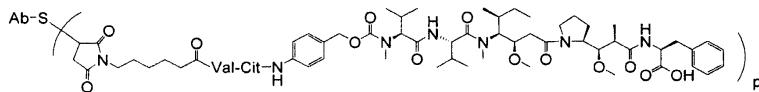
(d) p 는 약 1 내지 8이다.

다음 실시양태는 임의의 상기 면역접합체를 위해 추가로 제공된다. 한 실시양태에서, 면역접합체는 시험관내 또는 생체내 세포 사멸 활성을 갖는다. 한 실시양태에서, 링커는 항체 상의 티올기를 통해 항체에 부착된다. 한 실시양태에서, 링커는 프로테아제에 의해 절단가능하다. 한 실시양태에서, 링커는 val-cit 디펩티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 링커는 p-아미노벤질 유닛을 포함한다. 한 실시양태에서, p-아미노벤질 유닛은 약물과 링커 내의 프로테아제 절단 부위 사이에 배치된다. 한 실시양태에서, p-아미노벤질 유닛은 p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB)이다. 한 실시양태에서, 링커는 6-말레이미도카프로일을 포함한다. 한 실시양태에서, 6-말레이미도카프로일은 항체와 링커 내의 프로테아제 절단 부위 사이에 배치된다. 상기 실시양태는 단독으로 또는 실시양태의 임의의 조합으로 이루어질 수 있다.

한 실시양태에서, 약물은 MMAE 및 MMAF로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 면역접합체는 하기 화학식을 갖는다:



여기서, Ab는 임의의 상기 항-STEAP-1 항체이고, S는 황 원자이고, p는 약 2 내지 약 5이다. 한 실시양태에서, 면역접합체는 하기 화학식을 갖는다:



[0133]

[0134] 여기서, Ab는 임의의 상기 항-STEAP-1 항체이고, S는 황 원자이고, p는 약 1 내지 약 6, 약 2 내지 약 5, 약 2 내지 약 6, 약 2 내지 약 4, 약 2 및 약 3, 약 3 및 약 4, 약 3 내지 약 5, 약 3 내지 약 6, 또는 약 4 내지 약 6이다.

[0135]

표지된 항체 영상화 방법:

[0136]

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

[0137]

제품:

[0138]

본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 기재된 장애의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제품 또는 "키트"가 제공된다. 본 발명의 제품은 용기, 및 상기 용기 상의 또는 상기 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 또는 블리스터 팩 (blister pack) 등이 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들면, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 용기는 상기 증상을 치료하는데 효과적인 항체-약물 접합체 (ADC) 조성물을 보유하고, 멸균 주입구를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백(bag) 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 1종 이상의 활성제는 ADC이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 해당 조성물이 선택된 증상, 예를 들어 암을 치료하는데 사용됨을 나타낸다. 별법으로 또는 추가로, 제품은 제약상 허용되는 완충액, 예를 들어 주사용 정균수 (BWFI), 포스페이트 완충 식염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 더 포함할 수 있다. 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료, 예를 들면 기타 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 더 포함할 수 있다.

[0139]

제약 조성물:

[0140]

한 측면에서, 임의의 상기 면역접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 개체에게 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 전립선, 폐, 결장, 방광 또는 난소 세포 증식성 장애, 또는 유잉 육종의 치료 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 전립선암, 폐암, 결장암, 방광암, 난소암 및 유잉 육종 세포 증식성 장애는 원발성 전립선암, 폐암, 결장암, 방광암 또는 난소암, 또는 유잉 육종의 전이암이다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 세포의 표면에서 STEAP-1의 발현 증가와 관련된다.

[0141]

한 측면에서, 세포를 STEAP-1에 대한 면역접합체의 결합을 허용하는 조건하에 임의의 상기 면역접합체에 노출시키는 것을 포함하는, 세포 증식의 억제 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 전립선, 폐, 결장, 방광, 또는 난소 세포 또는 유잉 육종은 종양 세포이다. 한 실시양태에서, 종양 세포는 전립선, 폐, 결장, 방광 세포 또는 유잉 육종 증식성 장애 (원발성 전립선, 폐, 결장, 방광 세포 암 종양 또는 유잉 육종 종양의 전이암 등 포함)을 경험하였거나 또는 경험하였을 것으로 추정되는 포유동물의 전립선, 폐, 결장, 방광, 또는 난소 종양 세포 또는 유잉 육종 세포이다. 한 실시양태에서, 전립선, 폐, 결장, 방광 세포 또는 유잉 육종은 이종이식편이다. 한 실시양태에서, 노출은 시험관내에서 일어난다. 한 실시양태에서, 노출은 생체내에서 일어난다.

[0142]

한 측면에서, 전립선 폐 또는 결장 세포 증식성 장애 (이러한 장애의 일차 발생의 전이)를 경험한 포유동물에서, 질환의 임상적 진행 또는 퇴화를 측정하거나 또는 종양 적재량 또는 재발을 평가하여, 혈청 가용성 STEAP-1을 분석하기 위해 본 발명의 항-STEAP-1 항체를 사용하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0143]

본 특허 또는 출원은 1종 이상의 컬러 도면을 함유한다. 컬러 도면(들)이 포함된 본 특허 또는 특허 출원 공개 공보의 사본은 요청하고 필요한 비용 지불시 관청에서 제공할 것이다.

도 1은 마우스 및 사이노몰거스 원숭이 (cyno)로부터의 STEAP-1 (각각 서열 2 및 3)과 정렬된 인간 STEAP-1의

아미노산 서열 (서열 1)을 도시하고 있다. 세포외 도메인 1, 2 및 3은 표지되고, 어두운 상자로 표시되어 있다.

도 2A 및 2B: 도 2A는 키메라 항체 (120 키메라) 및 인간화 항체 (120 이식편)와 정렬되고, 인간 하위군 III 서열과 정렬된 쥐과동물 120.545 항-STEAP-1 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시하고 있다. CDR은 상자로 표시되어 있다 (CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3). CDR을 팔호로 묶은 서열이 프레임워크 서열이다 (FR-L1 내지 FR-L4). 서열은 카바트 넘버링에 따라 넘버링되어 있다. 카바트, 코티아 및 접촉 CDR은 상자로 표시한 CDR 주위에 표시되어 있다. **도 2B**는 키메라 항체 (120 키메라) 및 인간화 항체 (120 이식편)와 정렬되고, 인간 카파 I 서열과 정렬된 쥐과동물 항-STEAP-1 항체 (120.545)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시하고 있다. 인간화 변이체 24, 37, 48, 67, 및 37/48, 67, 71, 및 78은 다음과 같이 아미노산을 변화시켜 제조한다: 120 이식편 항체의 중쇄에서의 A24V, V37I, V48M, F67I 및 L78F. CDR은 상자로 표시되어 있다. FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4 서열은 CDR (CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)을 팔호로 묶고 있다. 서열은 카바트 넘버링에 따라 넘버링되어 있다. 카바트, 코티아 및 접촉 CDR은 상자로 표시한 CDR 주위에 표시되어 있다.

도 3A 및 3B는 하기와 같은 서열 확인 인자로 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적 수용자 인간 가변 중쇄(VH) 컨센서스 프레임워크 서열을 도시하고 있으며, 여기서 FR 서열은 FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4 순으로 열거되어 있다:

- 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 26, 27, 28, 29).
- 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 "B", "C" 및 "D" 마이너스 확장된 초가변 영역 (서열 30, 31, 28, 29; 서열 30, 31, 32, 29; 및 서열 30, 31, 33, 29).
- 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 34, 35, 36, 29).
- 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 "B", "C" 및 "D" 마이너스 확장된 초가변 영역 (서열 37, 38, 36, 29; 서열 37, 38, 39, 29; 및 서열 37, 38, 40, 29).
- 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 41, 42, 43, 29).
- 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 "B", "C" 및 "D" 마이너스 확장된 초가변 영역 (서열 44, 45, 43, 29; 서열 44, 45, 46, 29; 및 서열 44, 45, 46, 29).
- 인간 VH 수용자 1 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 48, 42, 49, 29).
- 인간 VH 수용자 2 프레임워크 "B" 및 "C" 마이너스 확장된 초가변 영역 (서열 44, 45, 49, 29; 및 서열 44, 45, 50, 29).
- 인간 VH 수용자 2 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 48, 42, 51, 29).
- 인간 VH 수용자 2 프레임워크 "B", "C" 및 "D" 마이너스 확장된 초가변 영역 (서열 44, 45, 51, 29; 서열 44, 45, 52, 29; 및 서열 44, 45, 53, 29).

도 4A 및 4B는 하기와 같은 서열 확인 인자로 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적 수용자 인간 가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크 서열을 도시하고 있다:

- 인간 VL 카파 하위군 I-1 컨센서스 프레임워크 (κv1-1): 서열 54, 55, 56, 57
- 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 (κv1): 서열 54, 58, 56, 57
- 인간 VL 카파 하위군 II 컨센서스 프레임워크 (κv2): 서열 58, 59, 60, 57
- 인간 VL 카파 하위군 III 컨센서스 프레임워크 (κv3): 서열 61, 62, 63, 57
- 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 (κv4): 서열 64, 65, 66, 57.

도 5는 본래의 서열 인간 IgG Fc 영역 서열, humIgG1 (비-A 알로타입, 서열 85; 및 A 알로타입, 여기서 서열 85 내의 아미노산 서열 SREEM이 SRDEL로 변화됨), humIgG2 (서열 86), humIgG3 (서열 87) 및 humIgG4 (서열 88) (별표로 표시한 서열 사이에 차이가 있음)를 정렬하여 도시하고 있다. 서열 상의 번호는 EU 넘버링 시스템을 나타낸다. 예시적 카파 불변 영역이 또한 도시되어 있다.

도 6A 내지 **6D**는 과지 상의 각각의 항체 또는 변이체의 디스플레이 수준에 대해 표준화된 FACS 분석을 도시하고

있다. 도 6A는 4개의 예시 항체에 대한 STEAP-1 발현 세포 (LB50) 상에서의 FACS 이동을 보여준다. 도 6B는 도 및 실시예 1에 나타낸 바와 같이 여러 항체에 대한 STEAP-1 비-발현 세포 (S408) 상에서의 FACS 이동을 보여준다. 도 6C 및 6D는 파지 디스플레이 수준에 대한 표준화 이후의 FACS 이동 정렬이다.

도 7A 내지 7F는 세포 표면에서 발현된 인간 STEAP-1에 대한 항-STEAP-1 쥐과동물, 키메라 및 인간화 형태 24 항체의 결합을 보여주는 FACS 분석을 그래프로 도시하고 있다. 도 7A 내지 7C는 항-STEAP-1 쥐과동물 120, 키메라 120 및 인간화 120v.24가 인간 및 사이노몰거스 원숭이 STEAP-1에 결합하지만, 마우스 STEAP-1에는 결합하지 않음을 나타낸다. 도 7D 내지 7F는 세포 표면에서 발현된 인간 STEAP-1에 대한 쥐과동물 120, 120 키메라 및 인간화 120v.24 (클론 67)의 결합을 보여주는 FACS 플롯이다. 외인성 STEAP-1은 293 세포 (LB50 세포로 명명됨) 및 PC3 세포 (PS5.4 세포로 명명됨)에서 안정하게 발현되고 (도 7D 및 7E), LNCaP BR 세포에서 내재적으로 발현된다 (도 7F).

도 8A 및 8B. 도 8A는 쥐과동물 항-STEAP-1 120-MC-vc-PAB-MMAE 3 mg/kg을 투여하는 것이 전립선 종양 (LNCaP-Ner 세포) 이종이식편 모델에서 효능이 있음을 보여주는 그래프이다. 실시예 4를 참조한다. 도 8B는 인간화 항-STEAP-1 항체 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (12 mg/kg) 및 항-STEAP-1 120 키메라-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg)의 단일 투여량을 투여하는 것이 LNCaP 세포 이종이식편 전립선 종양 모델에서 효능이 있는 것으로 나타났음을 보여주는 그래프이다. 실시예 4를 참조한다.

도 9는 항-STEAP-1 항체 120 키메라-MC-vc-PAB-MMAE (항-STEAP vcMMAE로 줄여서 지칭함) (3 mg/kg) 또는 항-STEAP-1 120 키메라-MC-MMAF (항-STEAP mcMMAF로 줄여서 지칭함) (6 mg/kg)을 투여하는 것이 LNCaP 세포를 이식한 거세된 SCID-베이지색 마우스의 전립선암 이종이식편 모델에서 효능이 있는 것으로 나타났음을 보여주는 그래프이다. 실시예 4를 참조한다.

도 10은 항-STEAP-1 항체 120 키메라-MC-vc-PAB-MMAE (항-STEAP vcMMAE로 줄여서 지칭함) (3 mg/kg)를 투여하는 것이 LuCap 77 세포를 이식한 SCID 베이지색 수컷 마우스 (안드로겐 의존적)의 전립선암 이종이식편 모델에서 효능이 있는 것으로 나타났음을 보여주는 그래프이다. 실시예 4를 참조한다.

도 11은 인간화 항-STEAP-1 항체 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 인간화 항-STEAP-1 항체 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg 및 12 mg/kg)을 LuCap35V 전립선 종양을 이식한 거세된 SCID-베이지색 마우스에게 투여하는 것이 대조군에 비해 효능이 있는 것으로 나타났음을 보여주는 그래프이다. 실시예 4를 참조한다.

도 12는 세포막 사이에 개재된 STEAP-1을 도시하는 도면이다. 항-STEAP-1 항체 120 결합은 형태 의존적이며, STEAP-1의 선형 애피토프 (서열 102에 개시된 바와 같은 웹티드)를 인지하지 않는다.

도 13A 내지 13D는 면역조직화학에 의해 검출된 세포의 표면에서 발현된 STEAP-1을 보여준다. 도 13A는 세포 표면에서 외인성 STEAP-1을 발현하는 293 세포의 면역조직화학적 종을 보여준다. 도 13B은 세포 표면에서 외인성 STEAP-1을 발현하는 PC3 세포의 면역조직화학적 종을 보여준다. 도 13C는 세포 표면에서 내인성 STEAP-1을 발현하는 LNCaP 세포의 면역조직화학적 종을 보여준다. 도 13D는 세포 표면에서 내인성 STEAP-1을 발현하는 LuCAP 77 세포의 면역조직화학적 종을 보여준다.

도 14A 내지 14E는 항-STEAP-1 항체 120v.24-MCMMAF 및 항-STEAP-1 항체 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE가 시험관내에서 STEAP-1 발현 세포를 사멸시키는데 비교적 효과적임을 보여주는 그래프이다. PS5.4 세포 (도 14A)는 STEAP-1을 코딩하는 벡터로 형질전환되어 STEAP-1이 세포 표면에서 발현되는 PC3 세포이다. LB50 세포 (도 14B)는 STEAP-1을 코딩하는 벡터로 형질전환되어 STEAP-1이 세포 표면에서 발현되는 293 세포이다. LNCaP 세포 (도 14C)는 STEAP-1을 내재적으로 발현시킨다. "PC3 vec" (도 14D) 및 "293 vec" (도 14E)는 각각 벡터 대조군으로 형질전환된 293 세포 및 PC3 세포를 나타낸다.

도 15는 약물 모이어티가 경쇄 (LC-ADC); 중쇄 (HC-ADC) 및 Fc 영역 (Fc-ADC)에서 조작된 시스테인 기에 부착된, 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 약물 접합체 (ADC)를 도시하고 있다.

도 16은 (i) 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 (ThioMab)에서 시스테인 디술피드 부가물 및 쇄간 및 쇄내 디술피드를 환원제 TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드)로 환원시키는 단계; (ii) dhAA (데히드로아스코르브산)로 부분적으로 산화 (즉, 산화환원)시켜 쇄간 및 쇄내 디술피드를 재생시키는 단계; 및 (iii) 산화환원된 항체를 약물-링커 중간체와 접합시켜 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 약물 접합체 (ADC)를 형성하는 단계를 도시하고 있다.

도 17A 내지 17C는 시스테인-조작된 항-STEAP-1 항체 (thio-mAb)를 생성하기 위해 아미노산 치환이 이루어지는

부위를 도시하고 있다. 도 17A는 상응하는 순차적 넘버링 및 카바트 시스템에 따른 표준화 넘버링에 따라 thio-LC 변이체 V205C를 도시하고 있다 (보이는 순서대로 각각 서열 103 내지 113). 도 17B는 상응하는 순차적 넘버링 및 EU 시스템에 따른 표준화 넘버링에 따라 thio-HC 변이체 A118C를 도시하고 있다 (보이는 순서대로 각각 서열 114 내지 124). 도 17C는 상응하는 순차적 넘버링 및 EU 시스템에 따른 표준화 넘버링에 따라 thio-Fc 변이체 S400C를 도시하고 있다 (보이는 순서대로 각각 서열 125 내지 135).

도 18A 내지 18F는 항-STEAP-1 thio 항체 약물 접합체 (TDC)가 세포 표면에서 발현되는 STEAP-1에 결합하는 능력을 보유함을 보여주는 FACS 분석을 도시하고 있다. 도 18A 내지 18C는 세포 표면에서 발현되는 인간 STEAP-1에 대한 항-STEAP-1 TDC thio-인간 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) (huStap1 TDC (L205C) vcE로 줄여서 지칭함) 및 thio-인간 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huStap1 TDC (HCA118C) vcE로 줄여서 지칭함)의 결합을 보여주는 FACS 플롯이다. 외인성 STEAP-1은 293 세포 (LB50 세포로 지칭함) 및 PC3 세포 (PS5.4 세포로 지칭함)에서 안정하게 발현되고 (도 18A 및 18B), LNCaP BR 세포에서 내재적으로 발현된다 (도 18C). 도 18D, 18E 및 18F는 도 7A, 7B 및 7C에 각각 도시된 FACS 이동의 정렬이다.

도 19A 내지 19C는 항-STEAP-1 thio 항체 약물 접합체 (TDC) thio-인간 120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) (huStap1 TDC (L205C) vcE로 줄여서 지칭함) 및 thio-인간 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huStap1 TDC (HCA118C) vcE로 줄여서 지칭함)가 시험관내에서 STEAP-1 발현 세포를 사멸시키는데 비교적 효과적임을 보여준다. LB50 세포 (도 19A)는 STEAP-1을 코딩하는 벡터로 형질전환되어 STEAP-1이 세포 표면에서 발현되는 293 세포이다. PS5.4 세포 (도 19B)는 STEAP-1을 코딩하는 벡터로 형질전환되어 STEAP-1이 세포 표면에서 발현되는 PC3 세포이다. LNCaP 세포 (도 19C)는 STEAP-1을 내재적으로 발현한다.

도 20은 항-STEAP-1 TDC thio-인간 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huStap1 HC TDC vcE로 줄여서 지칭함) (3 mg/kg)을 투여하는 것이 LNCaP 세포를 이식한 수컷 SCID-베이지색 마우스 (안드로겐-의존적)의 전립선암 이종이식편 모델에서 대조군에 비해 효능이 있는 것으로 나타났음을 보여주는 그래프이다. 실시예 8을 참조한다.

도 21은 항-STEAP-1 TDC thio-인간 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huStap1 HC TDC vcE로 줄여서 지칭함) (3 mg/kg) 또는 thio-인간 120-MC-MMAF (HCA118C) (huStap1 HC TDC mcF로 줄여서 지칭함) (1, 3 또는 6 mg/kg)을 투여하는 것이 LNCaP 세포를 이식한 수컷 SCID-베이지색 마우스 (안드로겐-의존적)의 전립선암 이종이식편 모델에서 대조군에 비해 효능이 있는 것으로 나타났음을 보여주는 그래프이다. 실시예 8을 참조한다.

도 22는 항-STEAP-1 TDC thio-인간 120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huStap1 HC TDC vcE로 줄여서 지칭함) (3 mg/kg) 또는 thio-인간 120-MC-MMAF (HCA125C) (huStap1 HC TDC mcF로 줄여서 지칭함) (3 또는 6 mg/kg)을 투여하는 것이 LuCaP 35V 전립선 종양을 이식한 거세된 SCID-베이지색 마우스의 전립선암 이종이식편 모델에서 대조군에 비해 효능이 있는 것으로 나타났음을 보여주는 그래프이다. 실시예 8을 참조한다.

도 23은 "심몬스 IV" 또는 간략하게 "SGIV"로 지칭되는 시스테인-조작된 항-STEAP-1 항체 (thio-mAb)를 생성하기 위해 이루어지는 아미노산 치환의 부위를 도시하고 있다. SGIV의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 90)은 mu 120 항체 (서열 5) 및 120.v24 항체 (서열 91)의 경쇄와 정렬되어 도시되어 있다. 상응하는 순차적 넘버링 및 카바트 시스템에 따른 표준화 넘버링에 따라 thio-LC 변이체 SGIV는 모 항체 mu 120 뿐만 아니라 thio-LC 변이체 120.v24 (상응하는 순차적 넘버링 및 카바트 시스템에 따른 표준화 넘버링에 따름)와 정렬되어 도시되어 있다. CDR은 상자로 표시되어 있다 (CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3). CDR을 괄호로 둘은 서열이 프레임워크 서열 (FR-L1 내지 FR-L4)이다. 서열은 카바트 넘버링에 따라 넘버링된다. 카바트, 코티아 및 접촉 CDR은 상자로 표시한 CDR 주변에 표시되어 있다. 실시예 9를 참조한다.

도 24는 SGIV 및 120v.24 항체의 다양한 시스테인-조작된 항-STEAP-1 항체 (thio-mAb) 변이체를 생성하기 위해 이루어지는 프레임워크 아미노산 치환의 부위를 보여준다. SGIV의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 136)은 변이체 LS.VLVH1 (서열 92); LS.VLVH2 (서열 93); LS.Q (서열 94) 및 LS.CH1 (서열 95)과 정렬되어, 카바트 시스템에 따른 표준화 넘버링에 따라 도시되어 있다. 카바트 시스템에 따른 표준화 넘버링에 따라 120.v24의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 137)은 변이체 ED.FW1 (서열 96); ED.FW2 (서열 97); ED.FW3 (서열 98); ED.a11 (서열 99); ED.Pro (서열 100); 및 ED.p1 (서열 101)과 정렬되어 도시되어 있다. CDR은 상자로 표시되어 있다. 서열은 카바트 넘버링에 따라 넘버링된다. 실시예 9를 참조한다.

도 25는 LNCaP.BR 세포의 표면에서 발현되는 STEAP-1에 대한 항체 결합의 스캐차드 플롯을 도시하고 있다. 2별의 샘플을 120.v24 항체 (도 25(A)-(D)) 및 SGIV 변이체 (도 25(E)-(H))를 사용하여 측정하였다. 실시예 9를 참조한다.

도 26은 293.LB50 세포의 표면에서 발현되는 STEAP-1에 대한 항체 결합의 스캐차드 플롯을 도시하고 있다. 2별의 샘플을 120.v24 항체 (도 26(A)-(D)) 및 SGIV 변이체 (도 26(E)-(H))를 사용하여 측정하였다. 실시예 9를 참조한다.

도 27은 PC-3-PS5.4, 293-LB50 및 LNCaP-BR 세포, 뿐만 아니라 STEAP-1을 일시적으로 발현하는 293 세포에서 mu 1789, mu 120, Fc 키메라, 인간화 120.v24, thio-120.v24 및 thio-SGIV 항체에 대한 평균 결합 친화도 (스캐차드 분석에 의해 측정된 바와 같음)를 비교한 표이다. 실시예 9를 참조한다.

도 28은 STEAP-1 (293 STEAP-1 LB48, 293 STEAP-1 LB50 및 293 STEAP-1 LB53)로 안정하게 형질감염된 세포에서 SGIV 및 120.v24 항체 샘플에 의한 FACS 이동을 보여주는 FACS 분석을 도시하고 있다. 실시예 9를 참조한다.

도 29는 SGIV 또는 120.v24 항체를 생성하는 세포로부터의 상이한 수확물에서 관찰되는 항체 타이터를 도시하고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0144]

STEAP-1에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 또한, 항-STEAP-1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다. 본 발명의 항체 및 면역접합체는, 예를 들면 STEAP-1의 발현 변화, 예를 들면 발현 증가와 관련된 장애의 진단 또는 치료에 유용하다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 세포 증식성 장애, 예를 들면 종양 또는 암의 진단 또는 치료에 유용하다. 몇몇 실시양태에서, STEAP-1은 전립선, 폐, 또는 결장 조직의 종양 또는 암에서 발현된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 STEAP-1, 예를 들면 세포 표면에서 발현된 STEAP-1의 검출에 유용하다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 전립선, 폐 또는 결장 조직의 정상 및/또는 종양 또는 암 세포의 표면에서 STEAP-1 발현을 검출하는데 유용하다.

[0145]

항-STEAP-1 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 항-STEAP-1 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하고, 이러한 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 임의의 하나 이상의 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 항-STEAP-1 항체 또는 면역접합체를 포함하는 조성물 (제약 제제 포함)이 또한 제공된다.

[0146]

항-STEAP-1 항체, 항체 약물 접합체 또는 면역접합체로 종양 또는 암 등을 비롯한 세포 증식성 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 포유동물의 전립선, 폐 또는 결장에서 종양 또는 암을 치료하는 것 등을 포함한다. 항-STEAP-1 항체, 항체 약물 접합체 또는 면역접합체를 사용하여 조직 세포에서 STEAP-1 발현을 검출하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은, 비-제한적 예로서, 전립선, 폐 또는 결장 세포의 정상 세포, 종양 세포 또는 암 세포에서 STEAP-1 발현을 검출하는 것 등을 포함한다.

[0147]

일반적인 기술

[0148]

본원에서 기재되고 언급되는 기술 및 절차는 일반적으로 당업자가 잘 이해하고 있고, 통상적인 방법, 예를 들어 다음 문헌에 기재된 바와 같은 널리 이용되는 방법에 의해 사용된다: [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.]; [Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003))]; [the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.):Pcr 2:A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1987))]; [Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984)]; [Methods in Molecular Biology, Humana Press]; [Cell Biology:A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press]; [Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987)]; [Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press]; [Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons]; [Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.)]; [Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987)]; [PCR:The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)]; [Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991)]; [Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)]; [Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)]; [Antibodies (P. Finch, 1997)]; [Andibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)]; [Monoclonal Andibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)]; [Using Andibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)]; [The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)] 및 [Cancer:Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds.,

J.B. Lippincott Company, 1993)].

[0149] **정의 및 약어**

[0150] 정의

[0151] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체의 연구, 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질 성 용질을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리 (Lowry) 방법에 의해 측정시에 항체의 95 중량% 초과, 몇몇 실시양태에서 99 중량% 초과 수준까지, (2) 스피닝 컵 (spinning cup) 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제된다. 단리된 항체는 항체의 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0152] "단리된" 핵산 분자는 예를 들어 그의 자연 환경에서 그와 통상적으로 회합되는 1종 이상의 다른 핵산 분자로부터 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 핵산 분자를 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 더 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외부에 존재하거나 또는 그의 천연 염색체 위치와 상이한 상이한 염색체 위치에 존재한다.

[0153] "정제된"은 분자가 함유된 샘플의 적어도 95 중량%, 또는 적어도 98 중량%의 농도로 분자가 샘플 내에 존재함을 의미한다.

[0154] 본원에서 사용될 때 용어 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 당업자가 특정 값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주하도록 2개의 수치값 (예를 들어, 하나는 본 발명의 항체와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 분자와 연관된) 사이에 충분히 높은 정도의 유사성을 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교값의 함수로서, 예를 들어 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 및/또는 약 10% 미만이다.

[0155] 본원에서 사용될 때 어구 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 당업자가 특정 값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하도록 2개의 수치값 (일반적으로 하나는 분자와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 분자와 연관된) 사이의 충분히 높은 정도의 차이를 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 분자에 대한 값의 함수로서, 예를 들어 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과, 및/또는 약 50% 초과이다.

[0156] 본원에서 사용될 때 용어 "벡터"는 그가 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 나타내도록 의도된다. 한 종류의 벡터는 그 내부에 추가의 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA를 의미하는 "플라스미드"이다. 다른 종류의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 종류의 벡터는 바이러스 벡터이고, 여기서 추가의 DNA 세그먼트는 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 그가 도입되는 숙주 세포 내에서 자동 복제할 수 있다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 그에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 그들이 자동적으로 연결되는 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터", 또는 단순히 "재조합 벡터"로서 칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태로 존재한다. 플라스미드는 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태이므로, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0157] "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 본원에서 상호교환가능하게 사용될 때 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 의미하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 포함될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형 뉴클레오티드, 예를 들어 메틸화 뉴클레오티드 및 그들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에는 비-뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 합성 후에 이루어진 변형(들), 예를 들어 표지에 대한 접합을 포함할 수 있다. 다른 종류의 변형은 예를 들어 1종 이상의 천연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 "캡 (cap)" 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예를 들어 하전되지 않은 연결기 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르,

포스포아미데이트, 카르바메이트 등)로 및 하전된 연결기 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형, 매달린(pendant) 모이어티, 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-라이신 등)을 함유하는 것, 인터칼레이터 (intercalator) (예를 들어, 아크리딘, 솔라렌 등)을 갖는 것, 킬레이터 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 봉소, 산화 금속 등)을 함유하는 것, 알킬레이터 (alkylator)를 함유하는 것, 변형 연결기 (예를 들어, 알파 아노머 (anomeric) 핵산 등)을 갖는 것과, 폴리뉴클레오티드(들)의 비변형 형태를 포함한다. 또한, 당 내에 보통 존재하는 임의의 히드록실기는 예를 들어 포스포네이트기, 포스페이트기에 의해 교체되거나, 표준 보호기로 보호되거나, 추가의 뉴클레오티드에 대해 추가의 연결기를 제조하기 위해 활성화될 수 있거나, 고체 또는 반-고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 아민 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑 (capping)기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 또한 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사형, 예를 들어 2'-0-메틸-, 2'-0-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, α -아노머 당, 에피머 당, 예를 들어 아라비노스, 자일로스 또는 라이속스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헵톨로스, 비환식 유사체 및 염기성 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어 메틸 리보시드를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결기는 대체 연결기로 교체될 수 있다. 상기 대체 연결기는 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H 또는 임의로 에테르 (-O-) 연결기를 함유하는 치환 또는 비치환 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알케닐, 시클로알케닐 또는 아르알딜임)로 교체되는 실시양태를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연결기가 동일할 필요는 없다. 상기 기재는 RNA 및 DNA를 포함하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[0158]

본원에서 사용될 때 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로, 반드시는 아니지만, 일반적으로 길이가 약 200개 뉴클레오티드 미만인 짧은, 일반적으로 단일가닥의, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 배제하는 의미가 아니다. 폴리뉴클레오티드에 대한 상기 기재는 올리고뉴클레오티드에 동등하고 충분히 적용가능하다.

[0159]

참조 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap)을 도입시킨 후, 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 본원에서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 비율을 결정하기 위한 정렬은 당업자에게 공지된 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 전장 서열에 걸친 최대 정렬의 달성을 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 동일성 비율값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 얻을 수 있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨텍, 인크. 소유로서, 미국 저작권 (U.S. Copyright Office, 미국 워싱턴 디. 씨. 20559)에 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 TXU510087하에 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제넨텍 (미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 소재)으로부터 공개적으로 입수가능하거나 소스 코드 (source code)로부터 수집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체제, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.

[0160]

아미노산 서열 비교를 위해 ALIGN-2가 사용되는 상황에서, 제시된 아미노산 서열 A의 제시된 아미노산 서열 B에 대한 아미노산 서열 동일성% (별법으로 제시된 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성%를 갖거나 포함하는 제시된 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0161]

100 \times X/Y

[0162]

상기 식에서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 것으로 평가된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성%는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성%와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않으면, 본원에서 사용된 모든 아미노산 서열 동일성% 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞의 문단에서 기재한 바와 같이 얻는다.

[0163]

본원에서 사용되는 용어 "STEAP-1"는 달리 나타내지 않으면 포유동물, 예를 들어 영장류 (예를 들어, 인간, 사이노몰거스 원숭이 (cyno)) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 STEAP-1을 의미한다. 이 용어는 비처리된 "전장" STEAP-1 및 세포 내에서의 처리에 의해 생

성된 임의의 형태의 STEAP-1을 포함한다. 또한, 상기 용어는 STEAP-1의 천연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체, 대립유전자 변이체, 및 이소형을 포함한다. 인간 STEAP-1의 아미노산 서열을 도 1에 도시되어 있다. 한 실시양태에서, STEAP-1은 세포 표면, 예를 들어 전립선, 폐 또는 결장 세포의 표면에서 발현되며, 이들 암 세포의 전립선, 폐 또는 결장 암 세포 또는 전이암에서 발현이 증가된다. 도 1은 마우스 및 사이노몰거스 원숭이로부터의 STEAP-1의 아미노산 서열을 도시한 것이다 (각각, 도 2 및 3).

[0164] "항체" (Ab) 및 "이뮤노글로불린" (Ig)은 유사한 구조적 특징을 갖는 당단백질이다. 항체는 특이적 항원에 결합 특이성을 나타내지만, 이뮤노글로불린은 항체, 및 일반적으로 항원 특이성이 결여된 다른 항체-유사 분자를 모두 포함한다. 후자의 종류의 폴리펩티드는 예를 들어 립프계에 의해 낮은 수준으로, 골수종에 의해 증가된 수준으로 생산된다.

[0165] 용어 "항체" 및 "이뮤노글로불린"은 가장 넓은 의미에서 상호교환가능하게 사용되고, 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 1가 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체)를 포함하고, 또한 특정 항체 단편 (본원에서 보다 상세히 기재된 바와 같이)을 포함할 수 있다. 항체는 키메라, 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙 항체일 수 있다.

[0166] 용어 "항-STEAP-1 항체" 또는 "STEAP-1에 결합하는 항체"는 STEAP-1을 표적화 할 때 항체가 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 STEAP-1에 결합할 수 있는 항체를 나타낸다. 바람직하게는, 관련되지 않는 비-STEAP-1 단백질에 대한 항-STEAP-1 항체의 결합 정도는 예를 들어 방사 면역 측정법 (RIA)으로 측정시에 STEAP-1에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, STEAP-1에 결합하는 항체의 해리 상수 (Kd)는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 nM$, $\leq 10 nM$, $\leq 1 nM$, 또는 $\leq 0.1 nM$ 이다. 특정 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 상이한 종으로부터의 STEAP-1 사이에서 보존된 STEAP-1의 에피토프에 결합한다.

[0167] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 나타낸다. 중쇄의 가변 도메인은 "VH"로 언급될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 "VL"로 언급될 수 있다. 상기 도메인은 일반적으로 항체의 최대 가변 부분이고, 항원 결합 부위를 함유한다.

[0168] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분의 서열이 항체들 사이에서 크게 상이함을 의미하고, 그의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역 (HVR)으로 불리는 3개의 세그먼트에 집중된다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은, 루프 연결부를 형성하고 일부 경우에 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 3개의 CDR에 의해 연결된, 주로 베타-시트 형태를 취하는 4개의 FR 영역을 각각 포함한다. 각 사슬 내의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체의 항원 결합에 직접 관여하지 않지만, 상이한 효과가 기능, 예를 들어 항체 의존성 세포 독성에서 항체의 참여를 나타낸다.

[0169] 임의의 척추동물종으로부터의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2개의 명백하게 구분되는 종류 중 하나에 분류될 수 있다.

[0170] 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체 (이뮤노글로불린)는 상이한 클래스로 분류될 수 있다. 이뮤노글로불린의 5가지 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브 클래스 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 불린다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 잘 알려져 있고, 예를 들어 문헌 [Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (2000)]에 일반적으로 기재되어 있다. 항체는 항체와 1종 이상의 다른 단백질 또는 펩티드의 공유 또는 비공유 회합에 의해 형성된 보다 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.

[0171] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 본원에서 상호 교환가능하게 사용되고, 아래에 정의된 항체 단편이 아닌, 그의 실질적으로 무손상 형태의 항체를 의미한다. 상기 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 의미한다.

[0172] "항체 단편"은 무손상 항체 내에 존재할 때 그 부분과 정상적으로 연관된 기능의 적어도 하나 및 대부분 또는 전부를 보유하는, 무손상 항체의 일부만을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체의 항원 결합

부위를 포함하고, 따라서 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 다른 실시양태에서, 항체 단편, 예를 들어 Fc 영역을 포함하는 항체 단편은 무손상 항체 내에 존재할 때 Fc 영역과 정상적으로 연관된 1종 이상의 생물학적 기능, 예를 들어 FcRn 결합, 항체 반감기 조정, ADCC 기능 및 보체 결합을 보유한다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체에 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 상기 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암 (arm)을 포함할 수 있다.

[0173] 항체를 파파인 분해시키면 각각 단일 항원 결합 부위를 갖는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (상기 명칭은 쉽게 결정화하는 그의 능력을 반영한다)을 생성시킨다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편을 생성시킨다.

[0174] "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 이중쇄 Fv종은 강하게 비공유 희합된 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 단일쇄 Fv (scFv) 종에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 이중쇄 Fv종에서와 유사한 "이량체" 구조로 희합할 수 있도록 가요성 펩티드 링커에 의해 공유 연결될 수 있다. 상기 형태에서, 각 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면 상에 항원 결합 부위를 규정한다. 통합적으로, 6개의 CDR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)도 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도이지만 항원을 인식하여 결합하는 능력을 갖는다.

[0175] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 포함한다. Fab' 단편은 항체 헌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가된다는 점에서 Fab 단편과 다르다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 갖는 Fab'에 대한 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 그들 사이에 헌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 결합이 또한 공지되어 있다.

[0176] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 여기서 상기 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬로 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합에 요구되는 구조를 형성할 수 있도록 하는, VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. scFv에 대한 검토를 위해, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0177] 용어 "디아바디 (diabody)"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타내고, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 (VH-VL) 내의 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이의 폐어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른 사슬의 상보성 도메인과 폐어링하여 2개의 항원 결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hudson et al (2003) Nat. Med. 9:129-134;] 및 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)])에 상세히 기재되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디도 문헌 [Hudson et al (2003) Nat. Med. 9:129-134]에 기재되어 있다.

[0178] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 나타내는데, 즉, 이 집단을 구성하는 개개의 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 돌연변이, 예를 들어 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 별개의 항체의 혼합물이 아닌 항체의 특성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 모노클로날 항체는 일반적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 표적-결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선별을 포함하는 방법에 의해 수득하였다. 예를 들어, 선별 방법은 복수의 클론, 예를 들어 하이브리도마 클론, 과지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 특유한 클론의 선택일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열은 예를 들어 표적에 대한 친화도를 개선시키고, 표적 결합 서열을 인간화하고, 세포 배양액에서 그의 생산을 개선시키고, 생체내에서 그의 면역원성을 감소시키고, 다중특이적 항체를 생성시키기 위해서 등을 위해 추가로 변경될 수 있고, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체도 본 발명의 모노클로날 항체임을 이해하여야 한다. 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 일반적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제제에 비해, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 작용한다. 그들의 특이성에 추가로, 모노클로날 항체 제제는 전형적으로 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않았다는 점에서 유리하다.

[0179] 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정 방

법에 의한 항체 제조를 필요로 하는 것으로서 생각하지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 다양한 기술, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]; [Harlow et al., *Antibody: 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)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 4,816,567 참조), 과자 디스플레이 기술 (예를 들어, [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]; [Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992)]; [Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004)]; [Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004)]; [Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004)] 및 [Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 로커스 또는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993)]); 미국 특허 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; 문헌 [Marks et al., *BioTechnology* 10:779-783 (1992)]; [Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994)]; [Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994)]; [Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996)]; [Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996)] 및 [Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)] 참조)에 의해 제조할 수 있다.

[0180]

본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 요구되는 생물학적 활성을 보이는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종에서 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고 사슬(들)의 나머지는 다른 종에서 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 및 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 4,816,567; 및 [Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)]).

[0181]

비인간 (예를 들면, 쥐과동물) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 이뮤노글로불린에서 유래한 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 수여자의 초가변 영역의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 능력을 갖는 비인간종 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 영역의 잔기로 치환된 인간 이뮤노글로불린 (수여 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수여 항체 또는 공여 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 보다 개선하기 위해 수행된다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR에 상응한다. 인간화 항체는 또한 임의로 적어도 일부의 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 일반적으로 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)] 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)])을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌 [Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998)]; [Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)] 및 여기에 인용된 참조문헌을 참조한다.

[0182]

"인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고/하거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체의 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 구체적으로 비-인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 제외한다.

[0183]

용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 본원에서 사용될 때 서열에서 초가변이고/이거나 구조상 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역; 즉 VH 내에 3개 (H1, H2, H3), 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3이 6개의 초가변 영역의 대부분의 다양성을 보이고, 특히 H3이 항체에 우수한 특이성을 부여할 때 특유한 역할을 수행하는 것으로 생각된다 (문헌 [Xu et al (2000) *Immunity* 13:37-45]; [Johnson and Wu (2003) in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ)]). 실제로, 중쇄만으로 이루어진 천연 발생 카멜리드 (camelid) 항체가 경쇄의 부재하에 기능을 보이고, 안정하다 (문헌 [Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature* 363:446-448]; [Sheriff et al. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736]).

[0184]

많은 초가변 영역 묘사가 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 변동성에 기초하고, 가장 흔히 사용된다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 코티아는 그 대신 구조 루프의 위치를 나타낸다 (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM 초가변 영역은 카바트 CDR과 코티아 구조 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라 (Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된다. "접촉" 초가변 영역은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석에 기초한다. 각각의 상기 초가변 영역의 잔기를 아래에 나타낸다.

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0185]

초가변 영역은 하기와 같은 "확장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 또는 26-35A (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 이를 각각의 정의에 대해 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다. 본 발명의 인간화 항-STEAP-1 120v.24 항체의 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 초가변 영역은 H26-H35A, H49-H6 및 H95-H102 (카바트 넘버링 이용)이다. 본 발명의 인간화 항-STEP-1 120v.24 항체의 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 초가변 영역은 L24-34, L50-56 및 L89-97 (카바트 넘버링 이용)이다. 본원에 사용된 용어 "HVR" 및 "CDR"은 상호교환적으로 사용된다.

[0187]

"프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 규정되는 초가변 영역 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기이다.

[0188]

용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 그의 변형은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서 항체 편집 (compilation)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 나타낸다. 상기 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 그 내부에 대한 삽입에 상응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬시킴으로써 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0189]

"친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 그의 하나 이상의 HVR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 한 실시양태에서, 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 갖는다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙을 기재하고 있다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발은 문헌 [Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al., Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)] 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)])에 기재되어 있다.

[0190]

"차단" 항체 또는 "길항체" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 특정 차단 항체 또는 길항체 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.

[0191]

본원에서 사용되는 "효능제 항체"는 목적하는 폴리펩티드의 기능적 활성의 적어도 하나를 모방하는 항체이다.

[0192]

항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인한 생물학적 활성을 의미하고, 항체 이소형에 따라 상이하다. 항체 효과기 기능의 예는 Clq 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를

들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0193] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 몇몇 실시양태에서, FcR은 천연 인간 FcR이다. 몇몇 실시양태에서, FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하고 상기 수용체의 대립 유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 (spliced) 형태를 포함하여 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함하는 것이다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 포함한다 (문헌 [Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)] 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에 개시되어 있다. 미래에 확인되는 것을 포함하여 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다.

[0194] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 또한 모체 IgG의 태아로의 전달 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]) 및 이뮤노글로불린의 항상성 조절에 작용하는 신생아의 수용체인 FcRn을 포함한다. FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, Ghetie 1997, Hinton 2004 참조). 생체내 인간 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 (transgenic) 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 Fc 변이체 폴리펩티드가 투여된 영장류에서 분석될 수 있다.

[0195] WO 00/42072 (Presta)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 특히 본원에 참고로 포함된다 (또한, 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)] 참조).

[0196] "인간 효과기 세포"는 1종 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 특정 실시양태에서, 세포는 적어도 Fc γ RIII을 발현하고 ADCC 효과기 기능(들)을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함한다. 효과기 세포는 천연 공급원, 혈액으로부터 단리할 수 있다.

[0197] "항체 의존성 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성의 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 상기 세포독성의 효과기 세포가 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 의미한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하고, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991)]의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337 또는 미국 특허 6,737,056 (Presta)에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석에 유용한 효과기 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 별법으로, 또는 추가로, 목적하는 분자의 ADCC 활성을 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0198] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적 세포의 용해를 의미한다. 전통적인 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 서브클래스의)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해서, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 CDC 분석을 수행할 수 있다.

[0199] 변경된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖고 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 예를 들어 미국 특허 6,194,551 B1 및 WO 1999/51642에 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 포함된다 (또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)] 참조).

[0200] 용어 "Fc 영역-포함 폴리펩티드"는 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어 항체 또는 이뮤노어드헤신을 의미한다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 폴리펩티드의 정제 동안 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 재조합 처리에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 K447을 갖는 폴리펩티드, 모든 K447 잔기가 제거된 폴리펩티드, 또는 K447 잔기가 존재하거나 존재하지 않는 폴리펩티드의 혼합물을 갖는 폴리펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0201] 본원의 목적을 위해 "수용자 인간 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워

크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이谬노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 이미 존재하는 아미노산 서열 변화를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이미 존재하는 아미노산 변화의 수는 10 이하, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하, 또는 2 이하이다. 이미 존재하는 아미노산 변화가 VH에 존재할 경우, 바람직하게는 상기 변화는 위치 71H, 73H 및 78H 중의 3개, 2개 또는 1개에서만 발생하고; 예를 들어, 상기 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A일 수 있다. 한 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크의 서열은 VL 인간 이谬노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 동일하다.

[0202] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이谬노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔하게 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이谬노글로불린 VL 또는 VH 서열은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 선택된다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL에 대해서, 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH에 대해서, 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 III이다.

[0203] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 얻은 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, 서열 21)-HVR-H1-
WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, 서열 22)-HVR-H2-
RFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (FR-H3, 서열 138)-HVR-H3-
WGQGTLVTVSS (FR-H4, 서열 24).

[0204]

[0205] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 얻은 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (FR-L1, 서열 17)-HVR-L1-
WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, 서열 18)-HVR-L2-
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (FR-L3, 서열 19)-HVR-L3-
FGQGTKVEIKR (FR-L4, 서열 20).

[0206]

[0207] "분비 신호 서열" 또는 "신호 서열"은 목적하는 새로 합성된 단백질을 원핵세포의 세포막, 대체로 내막 또는 내막과 외막 모두를 통해 유도하는데 사용될 수 있는 짧은 신호 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 의미한다. 따라서, 목적하는 단백질, 예를 들어 이谬노글로불린 경쇄 또는 중쇄 폴리펩티드가 원핵 숙주 세포의 원형질막 주위 공간 내로 또는 배양 배지 내로 분비된다. 발현되는 폴리펩티드에 천연 펩티드인 신호 펩티드를 포함하여 신호 서열에 의해 코딩되는 신호 펩티드는 숙주 세포에 내인성일 수 있거나, 또는 외인성일 수 있다. 분비 신호 서열은 일반적으로 발현되는 폴리펩티드의 아미노 말단에 존재하고, 일반적으로 세포질로부터 폴리펩티드의 생합성과 분비 사이에 효소에 의해 제거된다. 따라서, 신호 펩티드는 보통 성숙 단백질 산물 내에 존재하지 않는다.

[0208] "유리 시스테인 아미노산"은 모 항체로 조작되었고 티올 관능기 (-SH)를 갖고 분자내 또는 분자간 디숤피드 브릿지로서 폐어링되지 않거나 유리 상태가 아니라면 이 브릿지의 일부인 시스테인 아미노산 잔기를 의미한다.

[0209] 용어 "티올 반응성 값"은 유리 시스테인 아미노산의 반응성에 대한 정량적 특성이다. 티올 반응성 값은 티올-반응성 시약과 반응하는, 시스테인 조작된 항체 내의 유리 시스테인 아미노산의 비율이고, 최대 1의 값으로 전환된다. 예를 들어, 100% 수율로 티올-반응성 시약, 예를 들어 비오틴-말레이미드 시약과 반응하여 비오틴-표지된 항체를 형성하는, 시스테인 조작된 항체 상의 유리 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 1.0이다. 80% 수율로 티올-반응성 시약과 반응하는, 동일한 또는 상이한 모 항체로 조작된 다른 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0.8이다. 티올-반응성 시약과 전혀 반응하지 못하는, 동일한 또는 상이한 모 항체로 조작된 다른 시

스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0이다. 특정 시스테인의 티올 반응성 값 결정은 ELISA 분석, 질량 분광분석, 액체 크로마토그래피, 자가방사선촬영, 또는 다른 정량 분석적 시험에 의해 수행할 수 있다. 시스테인 조작된 항체의 포획 및 시스테인 반응성의 비교 및 정량을 가능하게 하는 티올-반응성 시약은 비오틴-PEO-말레이미드 ((+)-바이오틴-3-말레이미도프로피온아미딜-3,6-디옥사옥타인디아민, [Oda et al (2001) *Nature Biotechnology* 19:379-382], 피어스 바이오테크놀로지, 인크.), 비오틴-BMCC, PEO-요오도아세틸 비오틴, 요오도아세틸-LC-비오틴, 및 비오틴-HPDP (피어스 바이오테크놀로지, 인크.), 및 Na-(3-말레이미딜프로피오닐)비오틴 (MPB, 몰레큘라 프로브스)을 포함한다. 바이오틴화, 이관능성 및 다기능성 링커 시약의 다른 상업적인 공급처는 몰레큘라 프로브스 및 시그마 (Sigma, 미국 미주리주 세인트루이스)를 포함한다.

[0210] "모 항체"는 그로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 하나 이상의 시스테인 잔기로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 모 항체는 천연 또는 야생형 서열을 포함할 수 있다. 모 항체는 다른 천연, 야생형, 또는 변형된 형태의 항체에 비해 이미 존재하는 아미노산 서열 변형 (예를 들어, 부가, 결실 및/또는 치환)을 가질 수 있다. 모 항체는 목적하는 표적 항원, 예를 들어 생물학상 중요한 폴리펩티드에 대해 작용할 수 있다. 또한, 비폴리펩티드 항원 (예를 들어, 종양-결합 당지질 항원; US 5091178 참조)에 대해 작용하는 항체도 고려된다.

[0211] "결합 친화도"는 일반적으로 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 나타낸다. 달리 나타내지 않으면, 본원에서 사용될 때 "결합 친화도"는 결합쌍의 멤버 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 나타낸다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)에 의해 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 포함한 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 측정할 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하고 쉽게 해리하는 경향이 있는 반면, 고-친화도 항체는 일반적으로 항원에 보다 빠르게 결합하고 보다 오래 결합된 상태로 유지되는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 임의의 방법이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 실시양태를 아래에 기재한다.

[0212] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 하기 분석에서 기재되는 바와 같이 목적하는 항체의 Fab 형태 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 분석 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재하에 (^{125}I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정한다 (문헌 [Chen, et al (1999) *J. Mol. Biol.* 293 :865-881]). 분석 조건을 확립하기 위해, 미세적정 플레이트 (다이넥스 (Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스 (Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (약 23°C)에서 차단하였다. 비흡착 플레이트 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 목적하는 Fab의 연속 희석액과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599])의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 목적하는 Fab를 밤새 인큐베이션하지만, 평형이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65 시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물은 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션을 위해 포획 플레이트로 옮긴다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% Tween-20으로 8회 세척한다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μl /웰의 섬광제 (scintillant) (MicroScint-20; 팩커드 (Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(Topcount) 감마 계수기 (팩커드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각각의 Fab의 농도를 경쟁적 결합 분석에서 사용하기 위해 선택한다.

[0213] 다른 실시양태에 따르면, Kd 또는 Kd 값은 10 이하의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 BIAcore™-2000 또는 BIAcore™-3000 (비아코아, 인크. (BIAcore, Inc., 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재))를 사용하는 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용함으로써 측정한다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코아®, 인크.)을 공급업체의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 염산염 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~0.2 μM)으로 희석한 후, 커플링된 단백질의 약 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후에, 미반응기를 차단하기 위해 1M 에탄올아민을 주입한다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 약 25 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 25°C에서 0.05% Tween 20을 갖는 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 회합 및 해리 센소그램을 동시 피팅함으로써 단순 일대일 랭그뤼어 (Langmuir) 결합 모델 (BIAcore® 평가 소프트웨어 형태 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 비 k_{off}/k_{on} 으로서 계산한다 (예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al (1999) *J. Mol.*

Biol 293:865-881] 참조). 온-레이트 (on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 분광계, 예를 들어 정지 유동 설치 분광분석기 (아비브 인스트루먼츠 (Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도계 (씨모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0214] 본 발명에 따른 "온-레이트" 또는 "회합율" 또는 "회합 속도" 또는 "k_{on}"은 또한 BIACoreTM-2000 또는 BIACoreTM-3000 시스템 (비아코아®, 인크. 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 사용하여 상기한 바와 같이 결정할 수 있다.

[0215] "장애"는 본 발명의 물질/분자 또는 방법을 사용한 치료로부터 이익을 얻는 임의의 증상 또는 질환이다. 이것은 포유동물이 문제의 질환에 걸리기 쉽게 하는 증상을 포함하는 만성 및 급성 장애를 포함한다. 본원에서 치료하고자 하는 장애의 비제한적인 예는 암성 증상, 예를 들어 전립선, 폐 및 결장의 암 또는 전이암을 포함한다.

[0216] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 일정 정도의 비정상적인 세포 증식과 연관된 장애를 나타낸다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0217] 본원에서 사용될 때 "종양"은 악성이든 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에 언급된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.

[0218] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리적 상태를 나타내거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병 또는 림프성 악성 종양을 포함하나 이로 한정되지는 않는다. 상기 암의 보다 특정한 예는 편평세포암 (예를 들면, 상피 편평세포암), 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종을 비롯한 폐암, 복막암, 간세포암, 위장관암을 비롯한 위장 또는 위암, 췌장암, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간암종, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암 또는 신암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종, 항문암종, 음경암종, 흑색종, 다발성 흑색종 및 B-세포 림프종, 뇌암 및 두경부암, 및 관련 전이암을 포함하나 이로 한정되지는 않는다.

[0219] "STEAP-1-발현 세포"는 세포 표면에서 내인성 또는 형질감염된 STEAP-1을 발현하는 세포이다. "STEAP-1-발현 암"은 세포 표면에 존재하는 STEAP-1 단백질을 갖는 세포를 포함하는 암이다. "STEAP-1-발현 암"은 그의 세포 표면에서 충분한 수준의 STEAP-1을 생성하여 항-STEAP-1 항체가 이에 결합하여 암에 대한 치료 효과를 갖도록 할 수 있다. STEAP-1을 "파발현"시키는 암은 동일한 조직 유형의 비암성 세포에 비해, 그의 세포 표면에서 유의하게 더 높은 수준의 STEAP-1을 갖는 것이다. 이러한 파발현은 유전자 증폭 또는 전사 또는 번역의 증가에 의해 유발될 수 있다. STEAP-1 파발현은 세포의 표면에 존재하는 STEAP-1 단백질의 증가된 수준을 (예를 들면, 면역조직화학 분석; FACS 분석에 의해) 평가하여 진단적 또는 예방적 분석에서 결정될 수 있다. 다르게는 또는 추가로, 예를 들면 형광 계내 혼성화 (FISH; WO98/45479 (1998년 10월 공개) 참조), 서던 블랏팅, 노던 블랏팅, 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예를 들면 실시간 정량적 PCR (RT-PCR)을 통해, 세포에서 STEAP-1-코딩 핵산 또는 mRNA의 수준을 측정할 수 있다. 또한, 생물학적 유체, 예를 들면 혈청에서, 예를 들면 항체-기재의 분석을 이용하여 shed 항원을 측정하여 STEAP-1 파발현을 연구할 수 있다 (또한, 예를 들면, 미국 특허 4,933,294 (1990년 6월 12일 허여); WO91/05264 (1991년 4월 18일 공개); 미국 특허 5,401,638 (1995년 3월 28일 허여); 및 문헌 [Sias et al. J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)] 참조). 상기 분석 이외에도, 당업자라면 다양한 생체내 분석을 이용할 수 있다. 예를 들면, 환자의 신체 내에서 검출가능한 표지, 예를 들면 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항체에 세포를 노출시킬 수 있고, 환자에서 세포에 대한 항체의 결합은, 예를 들어 방사선용 스캐닝 또는 이전에 항체에 노출된 환자로부터 수득한 생검의 분석에 의해 평가할 수 있다. STEAP-1-발현 암을 전립선, 폐 및 결장 암을 포함한다.

[0220] 본원에서 사용되는 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 변형 표현)는 치료되는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키려는 임상 시술을 나타내고, 임상 질환의 예방을 위해 또는 그 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 억제, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 억제, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 호전, 및 완화 또는 개선된 예후를 포

함한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환 또는 장애의 발생을 지연시키거나 질환 또는 장애의 진행을 지연시키는데 사용된다.

[0221] 질환의 성공적인 치료 및 개선을 평가하는데 사용되는 상기 파라미터는 의사에게 익숙한 일반 절차에 의해 쉽게 측정가능한 것이다. 암 요법의 경우, 예를 들면 시간 대 질환 진전 (TTP) 평가 및/또는 반응률 (RR) 결정에 의해 효능을 측정할 수 있다. 전립선암의 경우, 요법 진행 과정은 일반적으로 혈청 PSA (전립선 특이적 항원) 수준을 측정하는 일반적 방법으로 평가할 수 있으며; 혈중 PSA의 수준이 높을수록 암은 보다 진행되어 있다. PSA 검출을 위한 상업적인 분석법, 예를 들면 하이비텍 텐덤-E (Hybitech Tandem-E) 및 텐덤-R PSA 분석 키트, 양 프로스체(Yang ProstCheck) 폴리클로날 분석 (양 랩스(Yang Labs), 미국 위싱턴주 벨레뷰 소재), 애보트 임스 (Abbott Imx) (애보트 랩스(Abbott Labs), 미국 일리노이주 애보트 파크 소재) 등이 이용될 수 있다. 전이는 스태깅(staging) 시험 및 뼈로의 확산을 결정하기 위한 칼슘 수준 및 다른 효소에 대한 뼈 스캔 및 시험으로 결정할 수 있다. CT 스캔은 또한 영역 내에서 골반 및 림프절로의 활성을 조사하기 위해 수행할 수 있다. 흉부 X-선 및 공지된 방법에 의한 간 효소 수준의 측정을 이용하여 폐 및 간 각각으로의 전이를 조사할 수 있다. 질환을 모니터링하는데 이용되는 다른 일반적 방법은 경직장초음파검사 (TRUS) 및 경직장 침생검법 (TRNB)을 포함한다.

[0222] "개체"는 척추동물이다. 특정 실시양태에서, 척추동물은 포유동물이다. 포유동물은 농장 동물 (예를 들어, 소), 스포츠 동물, 애완동물 (예를 들어, 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 래트를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0223] "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 목적하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기 위해 효과적인 양을 의미한다. 본 발명의 물질/분자의 "치료 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 물질/분자의 능력과 같은 요인에 따라 변할 수 있다. 또한, 치료 유효량은 물질/분자의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 치료상 유익한 효과가 능가하는 양이다. "예방상 유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 목적하는 예방 결과를 달성하기 위해 효과적인 양을 나타낸다. 반드시는 아니지만 대개, 예방 용량은 질환의 보다 초기 단계 전에, 또는 보다 초기 단계에서 대상에서 사용되기 때문에, 예방상 유효량은 치료 유효량보다 적을 것이다. 암의 경우, 약물의 치료 유효량은 암 세포의 개수를 감소시키고/거나; 종양 크기를 감소시키고/거나; 말단 기관으로의 암 세포 침윤을 억제하고/거나 (즉, 어느 정도 지연시키고, 바람직하게는 중단시킴); 종양 전이를 억제하고/거나 (즉, 어느 정도 지연시키고, 바람직하게는 중단시킴); 종양 성장을 어느 정도 억제하고/거나, 암과 관련된 하나 이상의 징후를 어느 정도 완화시킬 수 있다. 상기 "치료"의 정의를 참조한다. 약물이 기존의 암 세포의 성장을 방지하고/거나 사멸시킬 수 있다는 점에서, 이는 세포 증식 억제성이고/거나 세포독성일 수 있다.

[0224] "장기" 투여는 단기적 방식과는 반대로 지속적인 방식으로 제제(들)을 투여하여 연장된 기간 동안 처음 치료 효과 (활성)을 유지하도록 하는 투여를 나타낸다. "간헐적" 투여는 중단없이 연속하여 수행되는 치료가 아니라, 오히려 사실상 주기적인 치료이다.

[0225] 하나 이상의 추가의 치료제와 "함께" 투여하는 것은 동시 (공동) 투여 및 임의의 순서로 연속하여 투여하는 것을 포함한다.

[0226] 본원에 사용된 "담체"는 사용되는 투여량 및 농도에서 이에 노출된 세포 또는 포유동물에게 독성을 나타내지 않는, 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 생리학상 허용되는 담체는 종종 pH 완충된 수용액이다. 생리학상 허용되는 담체는 완충액, 예를 들면 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들면 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들면 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예를 들면 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들면 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 예를 들면 글루코스, 만노스 또는 엑스트린; 칼레이팅제, 예를 들면 EDTA; 당 알콜, 예를 들면 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예를 들면 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들면 TWEENTM 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 PLURONICSTM을 포함한다.

[0227] 본원에 사용된 "표지"는 항체에 직접 또는 간접적으로 접합되어 "표지된" 항체를 생성하는, 검출가능한 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 표지는 그 자체로 검출가능할 수 있거나 (예를 들면, 방사선 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소 표지의 경우에는, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉매할 수 있다.

[0228] 본원에 사용된 용어 "에피토프 태그가 부착된"은 "태그 폴리펩티드"에 융합된 항-PSCA 항체 폴리펩티드를 포함

하는 키메라 폴리펩티드를 나타낸다. 태그 폴리펩티드는 항체를 생성할 수는 있으나, 그에 융합된 Ig 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧은 에피토프를 제공하기에 충분한 잔기를 갖는다. 태그 폴리펩티드는 또한 바람직하게는 사실상 유일한 것이어서, 항체가 다른 에피토프와 실질적으로 교차-반응하지 않는다. 적합한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 적어도 6개의 아미노산 잔기를 갖고, 보통 약 8 내지 50개의 아미노산 잔기 (바람직하게는, 약 10 내지 20개의 아미노산 잔기)를 갖는다.

[0229] "소분자"는 본원에서 약 500 달톤 미단의 분자량을 갖는 것으로 정의한다.

[0230] 용어 "포장 삽입물"은 치료 생성물의 상업적인 포장 안에 관례상 포함되는 설명서를 나타내는데 사용되는 것으로, 이는 지침, 용도, 투여량, 투약법, 금지 사항 및/또는 상기 치료 생성물의 사용과 관련된 주의 사항에 대한 정보를 함유한다.

[0231] "단리된 핵산"은 본래 천연 서열을 수반하는, 다른 계놈 DNA 서열 및 단백질 또는 복합체, 예를 들면 리보솜 및 폴리미라제로부터 실질적으로 분리된, 핵산, 예를 들면 RNA, DNA 또는 혼합된 중합체이다. 이 용어는 본래의 발생 환경으로부터 분리된 핵산 서열을 포함하고, 재조합 또는 클로닝 DNA 단리물 및 화학적으로 합성된 유사체 또는 이종 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사체를 포함한다. 실질적으로 순수한 분자는 분자의 단리된 형태를 포함한다.

[0232] "벡터"는 셔틀 및 발현 벡터를 포함한다. 통상적으로, 플라스미드 구축물은 또한 박테리아에서 각각 플라스미드의 복제 및 선별에 사용되는 복제 기점 (예를 들면, CoIE1 복제 기점) 및 선별가능한 마커 (예를 들면, 암피실린 또는 테트라사이클린 내성)을 포함할 것이다. "발현 벡터"는 박테리아 또는 진핵 세포에서 본 발명의 항체 (항체 단편 포함)의 발현에 필요한 제어 서열 또는 조절 요소를 함유하는 벡터를 나타낸다. 적합한 벡터가 아래 개시되어 있다.

[0233] 본 발명의 항-STEAP-1 항체를 생성하는 세포는 모 하이브리도마 세포, 예를 들면 ATCC에 기탁된 하이브리도마뿐만 아니라, 항체를 코딩하는 핵산이 도입된 박테리아 및 진핵생물 속주 세포를 포함할 것이다. 적합한 속주 세포가 아래 개시되어 있다.

[0234] 본원에서 사용되는 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포 (예를 들어, STEAP-1을 발현하는 세포)의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포 (예를 들어, STEAP-1을 발현하는 세포)의 비율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 시기에) 차단하는 물질, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 물질을 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소미라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 물질, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지로까지 이어질 수 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al (WB Saunders:Philadelphia, 1995), 특히 p.13]에서 볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 주목에서 유도된 항암약이다. 유럽 주목에서 유도된 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®, 롱-프랑로러(Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®, 브리스톨-마이어스 스퀴브 (Bristol-Myers Squibb))의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터 미세관의 회합을 촉진시키고, 세포의 유사분열을 억제하는 탈중합을 억제함으로써 미세관을 안정화시킨다.

[0235] 본원에서 사용되는 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 제한하고/하거나 세포의 사멸 또는 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제 (예를 들어, 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 인터칼레이팅제, 효소 및 그의 단편, 예를 들어 핵산분해 효소, 항생제, 및 독소, 예를 들어 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체, 독소, 성장 억제제, 약물 모이어티 및 아래에 개시된 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함한다. 다른 세포독성제는 아래에 기재된다. 살종양제는 종양 세포를 파괴한다.

[0236] "독소"는 세포의 성장 또는 증식에 유해한 효과를 보일 수 있는 임의의 물질이다.

[0237] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들어 티오텐과 및

시톡산(CYTOXAN)®, 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 엘타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히친; 부틸린산; 캄포테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN)® 포함); CPT-11 (이로노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도제레신, 카르제레신 및 비제레신 합성 유사체 포함); 포도필로토신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 에류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디타이인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민 옥시드 염산염, 멜파란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디와인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 발색단 (chromophore) 및 관련 발색단백질 에네디와인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우쓰라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캥티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 테토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포르피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜버시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신, 항대사제, 예를 들어 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 염산 유사체, 예를 들어 테노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플로스우리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-아드레날, 예를 들어 아미노글루테치미드, 미토탄, 트리로스탄; 염산 보충제, 예를 들어 프로리닌산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트伦; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄신 및 암사미토신; 미토구아존; 미토잔트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 폐나메트; 피라루비신; 로소잔트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 다당체 복합체 (제이에이치에스 내처럴 프로덕츠 (JHS Natural Products, 미국 오래곤주 유진)); 로죽산; 리죽신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 암귀딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔® 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology, 미국 뉴저지주 프린스턴)), 아브락산(ABRAXANE)® 크레모포르-프리 (Cremophor-free), 파클리탁셀의 알부민-처리된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스 (American Pharmaceutical Partners, 미국 일리노이주 샤作品内容), 및 탁소테레® 독세탁셀 (롱-프랑 로라 (Rhone-Poulenc Rorer, 프랑스 안토니)); 클로람부실; 캔시타빈 (겔자르(GEMZAR)®); 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라빈; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토잔트론; 빙크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 카페시타빈 (젤로다(XELODA)®); 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체 및 2개 이상의 상기 물질의 조합물, 예를 들어 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빙크리스틴, 및 플레드니솔론의 조합 요법의 약어) 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보빈과 조합한 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)™)을 사용한 치료의 약어)를 포함한다.

[0238] 또한, 상기 정의에는 암의 성장을 촉진시킬 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하고, 종종 전신 또는 신체 전체 치료 형태로 사용되는 항호르몬제가 포함된다. 이들은 호르몬 자체일 수 있다. 그 예는 항에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절인자 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (예를 들어,

놀바덱스(NOLVADEX)® 타목시펜), 에비스타(EVISTA)® 랄록시펜, 드로록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 파레스톤(FARESTON)® 토레미펜; 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향조절인자 (ERD); 난소를 억제하거나 기능을 차단하는 물질, 예를 들어 황체화 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 작용제, 예를 들어 루프론(LUPRON)® 및 엘리가드(ELIGARD)® 류프롤리드 아세테이트, 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트립테렐린; 다른 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신선에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-아미다졸, 아미노글루테치미드, 메가세(MEGASE)® 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)® 엑세메스탄, 포르메스탄, 파드로졸, 리비조르(RIVISOR)® 보로졸, 페마라(FEMARA)® 레트로졸, 및 아리미덱스(ARIMIDEX)® 아나스트로졸을 포함한다. 또한, 상기 화학요법제의 정의에는 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스탁(OSTAC)®), 디드로칼(DIDROCAL)® 에티드로네이트, NE-58095, 조메타(ZOMETA)® 졸레드론산/졸레드로네이트, 포사막스(FOSAMAX)® 알렌드로네이트, 아레디아(AREDIA)® 팔미드로네이트, 스켈리드(SKELID)® 텔루드로네이트, 또는 악토넬(ACTONEL)® 리세드로네이트; 및 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 부착성 세포 증식과 연관된 신호 전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); 백신, 예를 들어 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신, 및 백시드(VAXID)® 백신; 루르토테칸(LURTOTECAN)® 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH; 라파티닙 디토실레이트 (ErbB-2 및 GW572016으로도 알려진 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0239]

본원에서 사용되는 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포 (예를 들어, STEAP-1을 발현하는 세포)의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포 (예를 들어, STEAP-1을 발현하는 세포)의 비율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 시기에) 차단하는 물질, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 물질을 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 물질, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지로까지 이어질 수 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al (WB Saunders:Philadelphia, 1995), 특히 p.13]에서 볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 주목에서 유도된 항암약이다. 유럽 주목에서 유도된 도세탁셀 (탁소테레®, 통-프랑 로리)은 파클리탁셀 (탁솔®, 브리스톨-마이어스 스퀴브)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터 미세관의 회합을 촉진시키고, 세포의 유사분열을 억제하는 탈중합을 억제함으로써 미세관을 안정화시킨다.

[0240]

용어 "세포내 대사물질"은 항체-약물 접합체 (ADC)에 대한 세포 내부의 대사 과정 또는 반응으로부터 생성되는 화합물이다. 대사 과정 또는 반응은 효소 과정, 예를 들어 ADC의 펩티드 링커의 단백질 분해 절단, 또는 관능기, 예를 들어 히드라존, 에스테르, 또는 아미드의 가수분해일 수 있다. 세포내 대사물질은 세포 내로의 도입, 확산, 섭취 또는 수송 후에 세포내 절단을 겪는 항체 및 유리 약물을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0241]

용어 "세포 내에서 절단된" 및 "세포내 절단"은 약물 모이어티 (D)와 항체 (Ab) 사이의 공유 결합에 의해 부착, 즉 링커가 파괴되어 유리 약물을 세포 내에서 항체로부터 해리시키는, 항체-약물 접합체 (ADC)에 대한 세포 내의 대사 과정 또는 반응을 의미한다. 따라서, ADC의 절단된 모이어티는 세포내 대사물질이다.

[0242]

용어 "생체이용률"은 환자에게 투여된 약물의 소정량의 전신 이용률 (즉, 혈액/혈장 수준)을 의미한다. 생체이용률은 투여된 투여형으로부터 전신 순환계에 도달하는 약물의 시간 (속도) 및 총량 (정도)의 측정치를 나타내는 절대적인 용어이다.

[0243]

용어 "세포독성 활성"은 항체-약물 접합체 또는 항체-약물 접합체의 세포내 대사물질의 세포-사멸, 세포증식 억제 또는 성장 억제 효과를 의미한다. 세포독성 활성은 1/2의 세포가 생존하는 단위 부피당 농도 (몰 또는 질량)인 IC₅₀ 값으로서 표현될 수 있다.

[0244]

"알킬"은 n, 2차, 3차 또는 시클릭 탄소 원자를 포함하는 C₁-C₁₈ 탄화수소이다. 그 예는 메틸 (Me, -CH₃), 에틸 (Et, -CH₂CH₃), 1-프로필 (n-Pr, n-프로필, -CH₂CH₂CH₃), 2-프로필 (i-Pr, i-프로필, -CH(CH₃)₂), 1-부틸 (n-Bu,

n-부틸, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-메틸-1-프로필 (i-Bu, i-부틸, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-부틸 (s-Bu, s-부틸, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-메틸-2-프로필 (t-Bu, t-부틸, -C(CH₃)₃), 1-펜틸 (n-펜틸, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-펜틸 (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-펜틸 (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-메틸-2-부틸 (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-메틸-2-부틸 (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-메틸-1-부틸 (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-메틸-1-부틸 (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-헥실 (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-헥실 (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-헥실 (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-메틸-2-펜틸 (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-메틸-2-펜틸 (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-메틸-2-펜틸 (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-메틸-3-펜틸 (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-메틸-3-펜틸 (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-디메틸-2-부틸 (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-디메틸-2-부틸 (-CH(CH₃)C(CH₃)₃)이다.

[0245] 본원에서 사용되는 용어 "C₁-C₈ 알킬"은 1 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄, 포화 또는 불포화 탄화수소를 의미한다. 대표적인 "C₁-C₈ 알킬"기는 -메틸, -에틸, -n-프로필, -n-부틸, -n-펜틸, -n-헥틸, -n-옥틸, -n-노닐 및 -n-데실을 포함하지만 이로 한정되지 않으며; 분지쇄 C₁-C₈ 알킬은 -이소프로필, -sec-부틸, -이소부틸, -t-부틸, -이소펜틸, 2-메틸부틸을 포함하지만 이로 한정되지 않으며, 불포화 C₁-C₈ 알킬은 -비닐, -알릴, -1-부테닐, -2-부테닐, -이소부틸레닐, -1-펜테닐, -2-펜테닐, -3-메틸-1-부테닐, -2-메틸-2-부테닐, -2,3-디메틸-2-부테닐, 1-헥실, 2-헥실, 3-헥실, -아세틸레닐, -프로파닐, -1-부티닐, -2-부티닐, -1-펜티닐, -2-펜티닐, -3-메틸-1-부티닐, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, t-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, n-헥실, 이소헥실, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 2,2-디메틸부틸, 2,3-디메틸부틸, 2,2-디메틸펜틸, 2,3-디메틸펜틸, 3,3-디메틸펜틸, 2,3,4-트리메틸펜틸, 3-메틸헥실, 2,2-디메틸헥실, 2,4-디메틸헥실, 2,5-디메틸헥실, 3,5-디메틸헥실, 2,4-디메틸펜틸, 2-메틸헵틸, 3-메틸헵틸, n-헵틸, 이소헵틸, n-옥틸, 및 이소옥틸을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. C₁-C₈ 알킬기는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂-NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -할로겐, -N₃, -NH₂, -NH(R')₂ 및 -CN (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, -C₁-C₈ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이로 한정되지 않는 하나 이상의 기로 비치환되거나 치환될 수 있다.

[0246] "알케닐"은 1종 이상의 불포화 부위, 즉 탄소-탄소, sp² 이중 결합을 갖는, n, 2차, 3차 또는 시클릭 탄소 원자를 포함하는 C₂-C₁₈ 탄화수소이다. 그 예는 에틸렌 또는 비닐 (-CH=CH₂), 알릴 (-CH₂CH=CH₂), 시클로펜테닐 (-C₅H₇), 및 5-헥세닐 (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH=CH₂)을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0247] "알키닐"은 1종 이상의 불포화 부위, 즉 탄소-탄소, sp 삼중 결합을 갖는, n, 2차, 3차 또는 시클릭 탄소 원자를 포함하는 C₂-C₁₈ 탄화수소이다. 그 예는 아세틸렌 (-C≡CH) 및 프로파르길 (-CH₂C≡CH)을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0248] "알킬렌"은 1-18개 탄소 원자의 포화, 분지쇄 또는 직쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미하고, 모 알칸의 동일한 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 1가 라디칼 중심을 갖는다. 대표적인 알킬렌 라디칼은 메틸렌 (-CH₂-), 1,2-에틸 (-CH₂CH₂-), 1,3-프로필 (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-부틸 (-CH₂CH₂CH₂CH₂-) 등을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0249] "C₁-C₁₀ 알킬렌"은 화학식 -(CH₂)₁₋₁₀-의 직쇄, 포화 탄화수소기이다. C₁-C₁₀ 알킬렌의 예는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌, 펜틸렌, 헥실렌, 헵틸렌, 옥틸렌, 노닐렌 및 데칼렌을 포함한다.

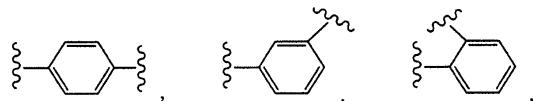
[0250] "알케닐렌"은 2-18개 탄소 원자의 불포화, 분지쇄 또는 직쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미하고, 모 알켄의 동일한 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 1가 라디칼 중심을 갖는다. 대표적인 알케닐렌 라디칼은 1,2-에틸렌 (-CH=CH-)을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0251] "알키닐렌"은 2-18개 탄소 원자의 불포화, 분지쇄 또는 직쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미하고, 모 알칸의 동일한 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 1가 라디칼 중심을 갖는다. 대표적인 알키닐렌 라디칼은 아세틸렌 (-C≡C-), 프로파르길 (-CH₂C≡C-), 및 4-펜티닐 (-CH₂CH₂CH₂C≡C-)을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0252] "아릴"은 카르보시클릭 방향족기를 나타낸다. 아릴기의 예는 폐닐, 나프틸 및 안트라세닐을 포함하지만 이로

한정되지는 않는다. 카르보시클릭 방향족기 또는 헤테로시클릭 방향족기는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), $-아릴$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$, $-SO_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-할로겐$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ 및 $-CN$ (여기서, 각각의 R' 는 독립적으로 H , $-C_1-C_8$ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이로 한정되지 않는 하나 이상의 기로 비치환되거나 치환될 수 있다.

[0253] "아릴렌"은 하기 구조로 제시되는 바와 같이 두개의 공유 결합은 가지며 오르쏘, 메타, 또는 파라 배위로 존재할 수 있는 아릴 기이며, 여기서, 폐닐 기는 비치환되거나, 또는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), $-아릴$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-할로겐$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ 및 $-CN$ (여기서, 각각의 R' 는 독립적으로 H , $-C_1-C_8$ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이로 한정되지 않는 4개 이하의 기로 치환될 수 있다:



[0254]

"아릴알킬"은 탄소 원자 (통상적으로 말단 또는 sp^3 탄소 원자)에 결합한 수소 원자 중의 하나가 아릴 라디칼로 대체된 비환식 알킬 라디칼을 의미한다. 대표적인 아릴알킬기는 벤질, 2-페닐에탄-1-일, 2-페닐에텐-1-일, 나프틸메틸, 2-나프틸에탄-1-일, 2-나프틸에텐-1-일, 나프토벤질, 2-나프토페닐에탄-1-일 등을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 아릴알킬기는 6 내지 20개의 탄소 원자를 포함하고, 예를 들어 알카닐, 알케닐 또는 알ки닐기를 포함하는, 아릴알킬기의 알킬 모이어티는 탄소 원자 1 내지 6개이고, 아릴 모이어티는 탄소 원자 5 내지 14개이다.

[0255]

"헤테로아릴알킬"은 탄소 원자, 통상적으로 말단 또는 sp^3 탄소 원자에 결합한 수소 원자 중의 하나가 헤테로아릴 라디칼로 대체된 비환식 알킬 라디칼을 의미한다. 통상적인 헤테로아릴알킬기는 2-벤즈이미다졸릴메틸, 2-푸릴에틸 등을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 헤테로아릴알킬기는 탄소 원자 6 내지 20개를 포함하며, 예를 들어 알카닐, 알케닐 또는 알ки닐기를 포함하는, 헤테로아릴알킬기의 알킬 모이어티는 탄소 원자 1 내지 6개이고 헤테로아릴 모이어티는 탄소 원자 5 내지 14개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개이다. 헤테로아릴알킬기의 헤테로아릴 모이어티는 3 내지 7원의 모노사이클 (탄소 원자 2 내지 6개) 또는 7 내지 10원의 비사이클 (탄소 원자 4 내지 9개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개), 예를 들어 비시클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템일 수 있다.

[0257]

"치환된 알킬", "치환된 아릴" 및 "치환된 아릴알킬"은 하나 이상의 수소 원자가 각각 독립적으로 치환기로 대체된 알킬, 아릴, 및 아릴알킬을 각각 의미한다. 통상적인 치환기는 $-X$, $-R$, $-O-$, $-OR$, $-SR$, $-S-$, $-NR_2$, $-NR_3$, $=NR$, $-CX_3$, $-CN$, $-OCN$, $-SCN$, $-N=C=O$, $-NCS$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $NC(=O)R$, $-C(=O)R$, $-C(=O)NR_2$, $-SO_3-$, $-SO_3H$, $-S(=O)R$, $-OS(=O)_2R$, $-S(=O)NR$, $-S(=O)R$, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO_3-$, $-PO_3H_2$, $-C(=O)R$, $-C(=O)X$, $-C(=S)R$, $-CO_2R$, $-CO_2-$, $-C(=S)OR$, $-C(=O)SR$, $-C(=S)SR$, $-C(=O)NR_2$, $-C(=S)NR_2$, $-C(=NR)NR_2$ 를 포함하지만 이로 한정되지 않으며, 여기서 각각의 X는 독립적으로 할로겐:F, Cl, Br 또는 I이고; 각각의 R은 독립적으로 $-H$, C_2-C_{18} 알킬, C_6-C_{20} 아릴, C_3-C_{14} 헤테로사이클, 보호 기 또는 전구약물 모이어티이다. 상기 언급된 바와 같은 알킬렌, 알케닐렌, 및 알ки닐렌기는 또한 유사하게 치환될 수 있다.

[0258]

"헤테로아릴" 및 "헤테로사이클"은 하나 이상의 고리 원자가 헤테로원자, 예를 들어 질소, 산소, 및 황인 고리계를 의미한다. 헤테로사이클 라디칼은 탄소 원자 1 내지 20개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개를 포함한다. 헤테로사이클은 3 내지 7원의 모노사이클 (탄소 원자 2 내지 6개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개)일 수 있거나, 또는 7 내지 10원의 비사이클 (탄소 원자 4 내지 9개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개), 예를 들어:비시클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템일 수 있다.

[0259]

헤테로사이클은 문헌 [Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)], 특히 제1장, 제3장, 제4장, 제6장, 제7장, 및 제9장; 문헌 ["The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)], 특히

제13권, 제14권, 제16권, 제19권, 및 제28권; 및 문헌 [J. Am. Chem. Soc. (1960)82 :5566]에 기재되어 있다.

[0260] 헤테로사이클의 예는 피리딜, 디히드로피리딜, 테트라히드로피리딜 (피페리딜), 티아졸릴, 테트라히드로티오페닐, 황 산화 테트라히드로티오페닐, 피리미디닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 테트라졸릴, 벤조푸라닐, 티아나프탈레닐, 인돌릴, 인돌레닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 피페라디닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 2-피롤리도닐, 피롤리닐, 테트라히드로푸라닐, 비스-테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 비스-테트라히드로피라닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 데카히드로퀴놀리닐, 옥타히드로이소퀴놀리닐, 아조시닐, 트리아지닐, 6H-1,2,5-티아디아지닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐릴, 티에닐, 티안트레닐, 피라닐, 이소벤조푸라닐, 크로메닐, 크산테닐, 페녹사티닐, 2H-피롤릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 1H-인다졸릴, 푸리닐, 4H-퀴놀리지닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 시놀리닐, 프테리디닐, 4aH-카르바졸릴, 카르바졸릴, β -카르볼리닐, 페난트리디닐, 아크리디닐, 피리미디닐, 페난트롤리닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 푸라자닐, 페녹사지닐, 이소크로마닐, 크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피페라지닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 퀴누클리디닐, 모르폴리닐, 옥사졸리디닐, 벤조트리아졸릴, 벤즈이속사졸릴, 옥신돌릴, 벤족사졸리닐, 및 이사티노일을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0261] 헤테로사이클에 결합하는 탄소는 예를 들어, 피리딘의 2, 3, 4, 5, 또는 6번 위치, 피리다진의 3, 4, 5, 또는 6번 위치, 피리미딘의 2, 4, 5, 또는 6번 위치, 피라진의 2, 3, 5, 또는 6번 위치, 푸란, 테트라히드로푸란, 티오푸란, 티오펜, 피롤 또는 테트라히드로피롤의 2, 3, 4, 또는 5번 위치, 옥사졸, 이미다졸 또는 티아졸의 2, 4, 또는 5번 위치, 이속사졸, 피라졸, 또는 이소티아졸의 3, 4, 또는 5번 위치, 아지리딘의 2 또는 3번 위치, 아제티딘의 2, 3, 또는 4번 위치, 퀴놀린의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8번 위치, 이소퀴놀린의 1, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8번 위치에 결합하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 보다 통상적으로는, 헤테로사이클에 결합하는 탄소는 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 5-피리딜, 6-피리딜, 3-피리다지닐, 4-피리다지닐, 5-피리다지닐, 6-피리다지닐, 2-피리미디닐, 4-피리미디닐, 5-피리미디닐, 6-피리미디닐, 2-피라지닐, 3-피라지닐, 5-피라지닐, 6-피라지닐, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 또는 5-티아졸릴을 포함한다.

[0262] 헤테로사이클에 결합하는 질소는 예를 들어, 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린, 1H-인다졸의 1번 위치, 이소인돌, 또는 이소인돌린의 2번 위치, 모르폴린의 4번 위치, 및 카르바졸 또는 β -카르볼린의 9번 위치에 결합하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 보다 통상적으로, 헤테로사이클에 결합하는 질소는 1-아지리딜, 1-아제테딜, 1-피롤릴, 1-이미다졸릴, 1-피라졸릴, 및 1-피페라디닐을 포함한다.

[0263] "C₃-C₈ 헤테로사이클"은 고리 탄소 원자 1개 내지 4개가 O, S, 및 N으로 이루어지는 군의 헤테로원자로 독립적으로 대체된 방향족 또는 비방향족 C₃-C₈ 카르보사이클을 의미한다. C₃-C₈ 헤테로사이클의 대표적인 예는 벤조푸라닐, 벤조티오펜, 인돌릴, 벤조피라졸릴, 쿠마리닐, 이소퀴놀리닐, 피롤릴, 티오페닐, 푸라닐, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 퀴놀리닐, 피리미디닐, 피리디닐, 피리도닐, 피라지닐, 피리다지닐, 이소티아졸릴, 이속사졸릴 및 테트라졸릴을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. C₃-C₈ 헤테로사이클은 비치환되거나, 또는 -C₁-C₈ 알킬, -0-(C₁-C₈ 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂-NHC(O)R', -S(O)R', -S(O)R', -OH, -할로겐, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ 및 -CN (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, -C₁-C₈ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이로 한정되지 않는 7개 이하의 기로 치환될 수 있다.

[0264] "C₃-C₈ 헤테로시클로"는 헤테로사이클 기의 수소 원자 중의 하나가 결합으로 대체된 상기 정의된 C₃-C₈ 헤테로사이클 기를 의미한다. C₃-C₈ 헤테로시클로는 비치환되거나, 또는 -C₁-C₈ 알킬, -0-(C₁-C₈ 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂-NHC(O)R', -S(O)R', -S(O)R', -OH, -할로겐, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ 및 -CN (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, -C₁-C₈ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이로 한정되지 않는 6개 이하의 기로 치환될 수 있다.

[0265] "카르보사이클"은 모노사이클로서 탄소 원자 3 내지 7개 또는 비사이클로서 탄소 원자 7 내지 12개를 갖는 포화 또는 불포화 고리를 의미한다. 모노시클릭 카르보사이클은 고리 원자 3 내지 6개, 보다 통상적으로는 고리 원자 5 또는 6개를 갖는다. 비시클릭 카르보사이클은 예를 들어 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배

열된 고리 원자 7 내지 12개, 비시클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 고리 원자 9 또는 10개를 갖는다. 모노시클릭 카르보사이클의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 1-시클로펜트-1-에닐, 1-시클로펜트-2-에닐, 1-시클로펜트-3-에닐, 시클로헥실, 1-시클로헥스-1-에닐, 1-시클로헥스-2-에닐, 1-시클로헥스-3-에닐, 시클로헵틸, 및 시클로옥틸을 포함한다.

[0266] " C_3-C_8 카르보사이클"은 3-, 4-, 5-, 6-, 7- 또는 8원의 포화 또는 불포화 비-방향족 카르보시클릭 고리이다. 대표적인 C_3-C_8 카르보사이클은 -시클로프로필, -시클로부틸, -시클로펜틸, -시클로펜타디에닐, -시클로헥실, -시클로헥세닐, -1,3-시클로헥사디에닐, -1,4-시클로헥사디에닐, -시클로헵틸, -1,3-시클로헵타디에닐, -1,3,5-시클로헵타트리에닐, -시클로옥틸, 및 -시클로옥타디에닐을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. C_3-C_8 카르보사이클기는 비치환되거나, 또는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -아릴, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -할로겐, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ 및 $-CN$ (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, $-C_1-C_8$ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이로 한정되지 않는 하나 이상의 기로 치환될 수 있다.

[0267] " C_3-C_8 카르보시클로"는 카르보사이클 기의 수소 원자 중의 하나가 결합으로 대체된 상기 정의된 C_3-C_8 카르보사이클기를 의미한다.

[0268] "링커"는 공유 결합을 포함하는 화학적 모이어티 또는 항체를 약물 모이어티에 공유 결합에 의해 부착시키는 원자의 사슬을 의미한다. 다양한 실시양태에서, 링커는 알킬디일, 아릴디일, 헤테로아릴디일과 같은 2가 라디칼, 알킬옥시의 반복 유닛 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ (예를 들어, 폴리에틸레녹시, PEG, 폴리메틸레녹시), 및 알킬아미노 (예를 들어, 폴리에틸렌아미노, 제프아민™ (Jeffamine™))와 같은 모이어티; 및 숙시네이트, 숙신아미드, 디글리콜레이트, 말로네이트, 및 카프로아미드를 포함하는 이산 에스테르 및 아미드를 포함한다.

[0269] 용어 "키랄"은 거울상 파트너에 겹쳐질 수 없는 특성을 갖는 분자를 의미하고, 용어 "아키랄"은 그의 거울상 파트너에 겹쳐질 수 있는 분자를 의미한다.

[0270] 용어 "입체 이성질체"는 동일한 화학적 구성을 가지나, 공간의 원자 또는 기의 배열에서 상이한 화합물을 의미한다.

[0271] "부분 입체 이성질체"는 2 이상의 키랄 중심이 있고 이들 분자가 서로 거울상이 아닌 입체 이성질체를 의미한다. 부분 입체 이성질체는 상이한 물리적 특성, 예를 들어 융점, 비점, 스펙트럼 성질, 및 반응성을 갖는다. 부분 입체 이성질체의 혼합물은 전기영동 및 크로마토그래피과 같은 고 분해능 분석 과정하에 분리될 수 있다.

[0272] "거울상 이성질체"는 서로 겹쳐질 수 없는 거울상인 두개의 입체 이성질체 화합물을 의미한다.

[0273] 본원에서 사용된 입체화학 정의 및 규약은 일반적으로 문헌 [S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York] 및 [Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc. New York])을 따른다. 많은 유기 화합물은 광학 활성 형태로 존재한다. 즉, 이들은 평면 편광의 평면을 회전하는 능력을 가진다. 광학 활성 화합물을 기재함에 있어서, 접두사 D 및 L, 또는 R 및 S는 그의 키랄 중심(들)에 대해 분자의 절대적 배위를 표시하는데 사용된다. 접두사 d 및 l 또는 (+) 및 (-)은 화합물에 의한 평면 편광 회전 표시를 나타내는데 사용되는데, (-) 또는 l은 화합물이 좌선성임을 의미한다. 접두사 (+) 또는 d로 표시된 화합물은 우선성이다. 주어진 화학적 구조에서, 이 입체 이성질체는 이들이 서로 거울상이라는 것만 제외하고는 동일하다. 특정 입체 이성질체는 또한 거울상 이성질체로 불릴 수 있고, 이러한 이성질체의 혼합물은 종종 거울상 이성질체 혼합물로 불린다. 거울상 이성질체의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체로 불리는데, 이들은 화학적 반응 또는 과정에 있어, 임의의 입체선택성 또는 입체특이성도 존재하지 않은 경우가 있을 수 있다. 용어 "라세미 혼합물" 및 "라세미체"는 광학 활성이 없는, 두개의 거울상 이성질체 종의 등몰 혼합물을 의미한다.

[0274] "이탈기"는 또 다른 관능기에 의해 치환될 수 있는 관능기를 의미한다. 이러한 이탈기는 당업계에 잘 알려져 있으며, 그 예는 할라이드 (예를 들면, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드), 메탄술포닐 (메실), p-톨루엔술포닐 (토실), 트리플루오로메틸술포닐 (트리플레이트), 및 트리플루오로메틸술포네이트를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0275] 약어

[0276] 링커 성분:

[0277] MC = 6-말레이미도카프로일

[0278] Val-Cit 또는 "vc" = 발린-시트룰린 (프로테아제 절단가능 링커 내의 예시적인 디펩티드)

[0279] 시트룰린 = 2-아미노-5-우레이도 펜탄산

[0280] PAB = p-아미노벤질옥시카르보닐 ("자가 희생적 (self immolative)" 링커 성분의 예)

[0281] Me-Val-Cit = N-메틸-발린-시트룰린 (여기서, 링커 웨პ티드 결합은 카텝신 B에 의한 그의 절단을 방지하기 위해 변형됨)

[0282] MC(PEG)6-OH = 말레이미도카프로일-폴리에틸렌 글리콜 (항체 시스테인에 부착될 수 있음)

[0283] SPP = N-숙신이미딜-4-(2-페리딜티오)펜타노에이트

[0284] SPDP = N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티오) 프로페오네이트

[0285] SMCC = 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트

[0286] IT = 이미노티올란

[0287] 세포독성 약물:

[0288] MMAE = 모노-메틸 아우리스타틴 (아우리스타틴) E (MW 718)

[0289] MMAF = 약물의 C-말단에 폐닐알라닌이 존재하는 아우리스타틴 E의 변이체 (MMAE) (MW 731.5)

[0290] MMAF-DMAEA = DMAEA (디메틸아미노에틸아민)가 C-말단 폐닐알라닌에 아미드 연결된 MMAF (MW 801.5)

[0291] MMAF-TEG = 테트라에틸렌 글리콜이 폐닐알라닌에 에스테르화된 MMAF

[0292] MMAF-NtBu = MMAF의 C-말단에 아미드로서 부착된 N-t-부틸

[0293] DM1 = N(2')-데아세틸-N(2')-(3-머캅토-1-옥소프로필)-메이탄신

[0294] DM3 = N(2')-데아세틸-N2-(4-머캅토-1-옥소펜틸)-메이탄신

[0295] DM4 = N(2')-데아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신

추가의 약어는 다음과 같다: AE는 아우리스타틴 E, Boc는 N-(t-부톡시카르보닐), cit는 시트룰린, dap는 돌라프로인, DCC는 1,3-디시클로헥실카르보디이미드, DCM은 디클로로메탄, DEA는 디에틸아민, DEAD는 디에틸아조디카르복실레이트, DEPC는 디에틸포스포릴시아니데이트, DIAD는 디이소프로필아조디카르복실레이트, DIEA는 N,N-디이소프로필에틸아민, di1는 돌라이소류신, DMA는 디메틸아세트아미드, DMAP는 4-디메틸아미노페리딘, DME는 에틸렌글리콜 디메틸 에테르 (또는 1,2-디메톡시에탄), DMF는 N,N-디메틸포름아미드, DMSO는 디메틸су록시드, doe는 돌라페닌, dov는 N,N-디메틸발린, DTNB는 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산), DTPA는 디에틸렌트리아민펜타아세트산, DTT는 디티오티레이틀, EDCI는 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염, EEDQ는 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린, ES-MS는 전자 분사 질량분석법, EtOAc는 에틸 아세테이트, Fmoc는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐), gly는 글리신, HATU는 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트, HOBt는 1-히드록시벤조트리아졸, HPLC는 고압 액체 크로마토그래피, i1e는 이소류신, lys는 리신, MeCN(CH₃CN)는 아세토니트릴, MeOH는 메탄올, Mtr는 4-아니실디페닐메틸 (또는 4-메톡시트리틸), nor는 (1S,2R)-(+)-노르에페드린, PBS는 포스페이트 완충 염수 (pH 7.4), PEG는 폴리에틸렌 글리콜, Ph는 폐닐, Pnp는 p-니트로페닐, MC는 6-말레이미드카프로일, phe는 L-페닐알라닌, PyBrop는 브로모 트리스-피롤리디노 포스포늄 헥사플루오로포스페이트, SEC는 크기 배제 크로마토그래피, Su는 숙신이미드, TFA는 트리플루오로아세트산, TLC는 박막 크로마토그래피, UV는 자외선, 및 val는 발린이다.

[0297] 조성물 및 그의 제조 방법

STEAP-1에 결합하는 항체를 제공한다. 항-STEAP-1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다. 본 발명의 항체 및 면역접합체는 예를 들어 STEAP-1의 변경된 발현, 예를 들어 발현 증가와 연관된 장애의 진단 또는 치료를 위해 유용하다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 세포 증식성 장애, 예를 들어 암의 진단

또는 치료를 위해 유용하다.

[0299] 항-STEAP-1 항체

한 측면에서, 본 발명은 STEAP-1에 결합하는 항체를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 인간 및 사이노몰거스 원숭이 (cyno) STEAP-1의 성숙 형태에 결합하는 항체를 제공한다. 상기 하나의 실시양태에서, 인간 STEAP-1의 성숙 형태는 서열 1의 아미노산 서열을 갖는다 (도 1). cyno STEAP-1은 서열 3의 아미노산 서열을 갖는다 (도 1). 몇몇 실시양태에서, STEAP-1에 대한 항체는 세포 표면에서 발현된 STEAP-1의 성숙 형태에 결합한다. 몇몇 실시양태에서, 세포 표면에서 발현된 STEAP-1의 성숙 형태에 결합하는 항체는 세포의 성장을 억제한다. 몇몇 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 세포 표면에서 발현된 STEAP-1의 성숙 형태에 결합하고, 세포 증식을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 세포 표면에서 발현된 STEAP-1의 성숙 형태에 결합하고, 세포 사멸을 유도한다. 몇몇 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 암 세포의 표면에서 발현된 STEAP-1의 성숙 형태에 결합한다. 몇몇 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 암 세포의 표면 상에 과발현된 STEAP-1의 성숙 형태에 결합한다. 몇몇 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 세포독소 또는 검출가능한 표지에 접합되고, 세포 표면에서의 STEAP-1에 결합한다. 몇몇 실시양태에서, 항체-독소 접합체는 세포의 성장을 억제한다. 몇몇 실시양태에서, 항체-검출가능한 표지 접합체는 그의 표면 상에 STEAP-1을 발현하는 세포를 시험관내 또는 생체내에서 검출가능하도록 만든다.

[0301] 한 측면에서, 항-STEAP-1 항체는 모노클로날 항체이다. 한 측면에서, 항-STEAP-1 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 또는 (Fab')₂ 단편이다. 한 측면에서, 항-STEAP-1 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다. 한 측면에서, 본원에 기재된 임의의 항-STEAP-1 항체는 정제된 것이다.

[0302] 과거 라이브러리로부터 유래된 예시적인 모노클로날 항체가 본원에서 제공된다. 라이브러리 스크리닝에 사용되는 항원은 STEAP-1 베타 및 알파의 세포외 도메인 (ECD)에 상응하는 서열 28 또는 서열 30의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이었다. 라이브러리 스크리닝으로부터 생성된 항체는 친화도 성숙 항체이다.

[0303] 한 측면에서, STEAP-1에 결합하기 위해 쥐과동물 120.545, 120 이식편, 및 STEAP-1에 결합하는 인간화 120v.24 와 경쟁하는 모노클로날 항체를 제공한다. 쥐과동물 120.545, 120 이식편, 및 인간화 120v.24과 동일한 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체도 제공된다.

[0304] 본 발명의 한 측면에서, 항-STEAP-1 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 다른 측면에서, 항-STEAP-1 항체, 또는 항-STEAP-1 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 본원에 열거된 것과 같은 세포 증식성 장애의 치료를 위한 제약 제제이다.

[0305] 예시적인 항-STEAP-1 항체는 아래에서 상세히 기재된다.

[0306] 1. 항-STEAP-1 항체의 구체적인 실시양태

[0307] 한 측면에서, 본 발명은 도 2B의 서열 9 또는 10을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 도 2A의 서열 6을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다.

[0308] 한 측면에서, 본 발명은 지시된 카바트 위치에서 다음과 같은 변화를 하나 이상 갖는, 서열 9를 포함하는 중쇄를 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다: A24V, V37I, V48M, F67I 및 L78F. 한 실시양태에서, 중쇄는 서열 25, 75, 76, 77, 78, 및 79로부터 선택된 중쇄 프레임워크 영역을 포함한다. 본원에 사용된, 중쇄 프레임워크 영역은 "FR-H1-H4" 또는 "HC-FR1-FR4"로 지칭되고, 경쇄 프레임워크 영역은 "FR-L1-L4" 또는 "LC-FR1-FR4"로 지칭된다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 6을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다.

[0309] 한 측면에서, 본 발명은 도 2A 및 2B에 도시된 항체 120.v24의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HVR 서열을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다.

[0310] 항-STEAP-1 항체는 임의의 적합한 프레임워크 가변 도메인 서열을 포함할 수 있으며, 단 항체는 STEAP-1에 결합하는 능력을 보유해야 한다. 예를 들면, 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항-STEAP-1 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 24, 37, 48, 67 및/또는 78에서의 치환(들)을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 위치 24는 A 또는 V

이고/거나, 위치 37은 I 또는 V이고/거나, 위치 48은 M 또는 V이고/거나, 위치 67은 I 또는 F이고/거나, 위치 78은 F 또는 L이다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열, 예를 들면 서열 21, 22, 49 및 24 (각각 FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4)을 포함한다. huMAb4D5-8은 헤르셉틴® 항-HER2 항체 (제넨텍, 인크. 미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 소재)으로 상업적으로 알려져 있으며; 또한 미국 특허 6,407,213 및 5,821,337, 및 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93]에 언급되어 있다. 상기 한 실시양태에서, 이들 항체는 인간 κI 경쇄 가변 도메인 프레임워크 컨센서스 서열을 더 포함한다. 상기 한 실시양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8의 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열, 예를 들면 서열 17, 18, 139 및 20 (각각 FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4)을 포함한다.

[0311] 한 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 프레임워크 서열 및 초가변 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 프레임워크 서열은 즉 각각 서열 21 또는 25 (FR-H1), 22 (FR-H2), 23 (FR-H3) 및 24 (FR-H4)의 FR-H1-FR-H4 서열을 포함하고; HVR H1은 서열 14의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-H2는 서열 15의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-H3은 서열 16의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 프레임워크 서열 및 초가변 영역을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 프레임워크 서열은 각각 서열 17, 18, 19 및 20의 FR-L1-FR-L4 서열을 포함하고; HVR-L1은 서열 11, 12 및 13으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 9 또는 10을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열 6을 포함한다.

[0312] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 서열 9 또는 10의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열은 참조 서열에 대해 치환, 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이 아미노산 서열을 포함하는 항체는 STEAP-1에 결합하는 능력을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 서열 9, 10, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 75, 76, 77, 78 및/또는 79의 서열에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실된다. 몇몇 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 외부 영역 (즉, FR)에서 일어난다. 몇몇 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 서열 9 또는 10으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0313] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 도 2B에 도시된 중쇄 가변 도메인 (서열 9 또는 10)을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다.

[0314] 몇몇 실시양태에서, 중쇄 HVR 및 FR 서열은 이하를 포함한다:

[0315] HVR-H1 (GYSITSDYAWN, 서열 14)

[0316] HVR-H2 (GYISNSGSTSYNPSLKS, 서열 15)

[0317] HVR-H3 (ERNYDYDDYYYAMDY, 서열 16)

[0318] FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS, 서열 21)

[0319] FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS, 서열 25)

[0320] FR-H2 (WVRQAPGKGLEWV, 서열 22)

[0321] FR-H2 (WIRQAPGKGLEWV, 서열 75)

[0322] FR-H2 (WVRQAPGKGLEWM, 서열 76)

[0323] FR-H2 (WIRQAPGKGLEWM, 서열 77)

[0324] FR-H3 (RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, 서열 23)

[0325] FR-H3 (RITISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, 서열 78)

[0326] FR-H3 (RFTISRDNSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, 서열 79)

[0327] FR-H4 (WGQGTLTVSS, 서열 24)

[0328] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 도 2A에 도시된 경쇄 가변 도메인 (서열 6)을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다.

- [0329] 몇몇 실시양태에서, 경쇄 HVR 서열은 이하를 포함한다:
- [0330] HVR-L1(KSSQSLLYRSNQKNYLA, 서열 11)
- [0331] HVR-L2 (WASTRES, 서열 12)
- [0332] HVR-L3 (QQYYNYPRT, 서열 13).
- [0333] 몇몇 실시양태에서, 경쇄 FR 서열은 이하를 포함한다:
- [0334] FR-L1 (DIQMTQSPSSLASAVGDRVTITC, 서열 17);
- [0335] FR-L2 (WYQQKPGKAPKLLIY, 서열 18);
- [0336] FR-L3 (GVPSRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC, 서열 19)
- [0337] FR-L4 (FGQGTTKVEIKR, 서열 20).
- [0338] 한 측면에서, 본 발명은 서열 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열은 참조 서열에 대해 치환, 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이 아미노산 서열을 포함하는 항체는 STEAP-1에 결합하는 능력을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 서열 6, 11, 12, 13, 17, 18, 19 및 20의 서열에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실된다. 몇몇 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 외부 영역 (즉, FR)에서 일어난다. 몇몇 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0339] 한 측면에서, (a) 서열 9 및 10으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 (b) 서열 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열은 참조 서열에 대해 치환, 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이 아미노산 서열을 포함하는 항체는 STEAP-1에 결합하는 능력을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 서열 9, 10, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 75, 76, 77, 78, 79로부터 선택된 서열 등을 포함하는 참조 서열에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실된다. 몇몇 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 외부 영역 (즉, FR)에서 일어난다. 몇몇 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 서열 9 또는 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 6으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0340] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 도 2B에 도시된 것으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 VH HVR 및/또는 (b) 도 2A에 도시된 것으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개 VL HVR을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 도 2B에 도시된 것으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 및 도 2A에 도시된 것으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다.
- [0341] 2. 항체 단편
- [0342] 본 발명은 항체 단편을 포함한다. 항체 단편은 전통적인 수단, 예를 들어 효소 분해, 또는 재조합 기술에 의해 생성할 수 있다. 특정 상황에서는, 온전한 항체보다 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 보다 작은 크기의 단편은 신속한 소실을 가능하게 하고, 충실성 종양에 대한 접근성을 개선시킬 수 있다. 특정 항체 단편의 검토에 대해서는 문헌 [Hudson et al (2003) Nat. Med. 9:129-134]을 참조한다.
- [0343] 항체 단편 생산을 위해 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 상기 단편은 무순상 항체의 단백질 분해 소화를 통해 유도되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)]) 참조). 그러나, 상기 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되고 이로부터 분비되어 다양한의 상기 단편을 쉽게 생산하게 할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의한 바와 같이 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]. 다른 방법에 따르

면, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접 단리될 수 있다. 살비지 (salvage) 수용체 결합에 피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편이 미국 특허 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 특정 실시양태에서, 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다 (WO 93/16185; 미국 특허 5,571,894; 및 미국 특허 5,587,458 참조). Fv 및 sFv는 불변 영역이 결여된 무순상 결합 부위를 갖는 유일한 종이고, 따라서 생체내 사용 동안 비특이적 결합의 감소에 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에 효과기 단백질의 융합체를 생성시키도록 제조될 수 있다. 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 문헌]을 참조한다. 또한, 항체 단편은 예를 들어 미국 특허 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

3. 인간화 항체

본 발명은 인간화 항체를 포함한다. 비-인간 항체를 인간화하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 그에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이를 비-인간 아미노산 잔기는 일반적으로 "도입 (import)" 가변 도메인으로부터 취한 "도입" 잔기로서 종종 언급된다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 상응하는 서열을 초가변 영역 서열로 대체함으로써 원터 (Winter) 및 공동연구자의 방법 (문헌 [Jones et al (1986) Nature, 321:522-525], [Riechmann et al (1988) Nature, 332:323-327]; [Verhoeyen et al (1988) Science, 239:1534-1536])을 따라 수행할 수 있다. 따라서, 상기 "인간화" 항체는 무순상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 작은 도메인이 비-인간종의 상응하는 서열로 대체된 키메라 항체 (미국 특허 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 일반적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 항체이다.

인간화 항체 제조에 사용되는 경쇄 및 중쇄 모두의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성 감소를 위해 중요할 수 있다. 소위 "최적 맞춤 (best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인 서열은 공지의 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 것과 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체의 인간 프레임워크로서 허용된다 (문헌 [Sims et al (1993) J. Immunol., 151:2296]; [Chothia et al (1987) J. Mol. Biol., 196:901]). 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위집단의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래한 특정 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 복수개의 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (문헌 [Carter et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285]; [Presta et al (1993) J. Immunol., 151:2623]).

항체가 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것이 일반적으로 더욱 바람직하다. 이를 달성하기 위해서, 한 방법에 따르면, 인간화 항체는 모서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하여 모서열 및 상이한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 입수 가능하고, 당업자에게 잘 알려져 있다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 입체 형태적 구조를 그려 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다. 상기 디스플레이의 조사를 통해 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 끼치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 목적하는 항체 특성, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합에 대한 영향에 직접적으로 가장 실질적으로 관련이 있다.

4. 인간 항체

본 발명의 인간 항-STEAP-1 항체는 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 상기한 바와 같이 공지의 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합함으로써 제조할 수 있다. 별법으로, 본 발명의 인간 모노클로날 항-STEAP-1 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 제조를 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 예를 들어 문헌 [Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984)], [Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)] 및 [Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991)])에 기재되어 있다.

면역화시에, 내인성 이뮤노글로불린 생산의 부재하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스체닉 동물 (예를 들어, 마우스)를 생산하는 것이 또한 가능해졌다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포 돌연변이체 마우스의 항체 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자의 동종접합성 결실이 내인성 항체 생성을 완전히 억제한다고 기재되었

[0344]

[0345]

[0346]

[0347]

[0348]

[0349]

[0350]

다. 상기 생식세포 돌연변이체 마우스에서 인간 생식세포 이뮤노글로불린 유전자 어레이의 전이는 항원 시험 접종시에 인간 항체를 생성시킬 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature 362:255 (1993)] 및 [Bruggermann et al., Year in Immunol, 7:33 (1993)])을 참조한다.

[0351] 또한, 유전자 셔플링을 사용하여 비-인간, 예를 들어 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도할 수 있고, 여기서 인간 항체는 출발 비-인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅 (imprinting)"으로도 불리는 상기 방법에 따라, 상기한 바와 같은 파지 디스플레이 기술에 의해 얻은 비-인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역이 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어 비-인간 사슬/인간 사슬 scFv 또는 Fab 키메라의 접단을 생성시킨다. 항원으로 선택하면, 비-인간 사슬/인간 사슬 키메라 scFv 또는 Fab가 단리되는데, 이때 인간 사슬이 1차 파지 디스플레이 클론에서 상응하는 비-인간 사슬의 제거시에 파괴되는 항원 결합 부위를 복구한다 - 즉, 에피토프가 인간 사슬 파트너 선택을 좌우 (임프린팅)한다. 나머지 비-인간 사슬을 대체하기 위해 상기 과정을 반복하면 인간 항체를 얻게 된다 (1993년 4월 1일 공개된 PCT WO 93/06213 참조). CDR 이식에 의한 비-인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 상기 기술은 비-인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기가 없는 완전한 인간 항체를 제공한다.

5. 이중특이적 항체

[0353] 이중특이적 항체는 적어도 2종의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 STEAP-1에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 STEAP-1의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 STEAP-1을 발현하는 세포에 세포독성체를 국소화시키는데 사용될 수도 있다. 이들 항체는 STEAP-1-결합 아암, 및 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토트렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐과 같은 세포독성체에 결합하는 아암을 보유한다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로서 제조될 수 있다.

[0354] 이중특이적 항체를 제조하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 생산은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 [Millstein and Cuello, Nature, 305:537 (1983)]. 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류 때문에, 이들 하이브리도마 (쿠아드로마 (quadroma))는 10종의 상이한 항체 분자의 가능한 혼합물을 생산하는데, 이 중에서 하나만 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 보통 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 1993년 5월 13일 공개된 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655 (1991)]에 개시되어 있다.

[0355] 상이한 방법에 따라, 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인을 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 융합은 예를 들어 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 특정 실시양태에서, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체의 적어도 하나에 존재한다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및, 필요한 경우 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내에 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 동시형질감염시킨다. 이는 제작에 사용된 3종의 폴리펩티드 사슬의 불균등한 비율이 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 높은 융통성을 제공한다. 그러나, 동일 비율의 2종 이상의 폴리펩티드 사슬의 발현이 고수율로 일어나거나 상기 비율이 특별한 유의성을 갖지 않는 경우에는 하나의 발현 벡터 내에 2종 또는 3종의 모든 폴리펩티드 사슬의 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0356] 상기 접근법의 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄쌍 (제2 결합 특이성 제공)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 순수운 분리 방법을 제공하므로, 상기 비대칭 구조는 원치 않는 이뮤노글로불린 사슬 조합물로부터 목적하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이 방법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생성하는 추가의 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0357] 다른 방법에 따르면, 한쌍의 항체 분자들 사이의 계면은 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 비율을 최대화하도록 처리될 수 있다. 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 상기 방

법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들면, 티로신 또는 트립토판)으로 교체된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들면, 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체함으로써 큰 측쇄(들)에 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "캐비티 (cavity)"가 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 다른 원치않는 최종 생성물, 예를 들어 동종이량체 (homodimer)에 비해 이종이량체 (heterodimer)의 수율을 증가시키기 위한 메카니즘을 제공한다.

[0358] 이종특이적 항체는 가교결합된 또는 "이종접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 상기 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키기 위해 (미국 특허 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료를 위해 (WO 91/00360, WO 92/00373 및 EP 03089) 제안되었다. 이종접합체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 적합한 가교결합체는 당업계에 잘 알려져 있고, 많은 가교결합 기술과 함께 미국 특허 4,676,980에 개시되어 있다.

[0359] 항체 단편으로부터 이종특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 또한 문헌에서 기재되었다. 예를 들어, 이종특이적 항체는 화학적 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)]에서는 무손상 항체가 단백질 분해 방식으로 절단되어 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 절차를 기술하고 있다. 이를 단편은 인접 디티올을 안정화시키고 분자간 디슬피드 형성을 방지하기 위해 디티올 치환제인 아비소산나트륨의 존재하에 환원된다. 이어서, 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. 이어서, Fab' -TNB 유도체 중 하나는 머캅토에틸아민으로 환원시켜 Fab' -티올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab' -TNB 유도체와 혼합되어 이종특이적 항체를 형성한다. 생산된 이종특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 물질로서 사용될 수 있다.

[0360] 최근의 진보는 이종특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab' -SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)]에서는 완전 인간화 이종특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 생산을 기술하고 있다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비되었고, 이종특이적 항체를 형성하도록 시험관내에서 유도 화학 커플링 반응에 적용되었다. 이렇게 형성된 이종특이적 항체는 HER2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 뿐만 아니라 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 립프구의 용해 활성을 촉발시킬 수 있었다.

[0361] 이종특이적 항체 단편을 제조한 세포 배양액으로부터 직접 제조하고 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 이종특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다 (문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 웨이퍼드가 유전자 융합에 의해 2종의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 헌지 영역에서 환원되어 단량체를 형성한 다음, 재산화되어 항체 이종이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동종이량체의 생산에 이용될 수도 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이종특이적 항체 단편 제조를 위한 다른 메카니즘을 제공하였다. 이 단편은 동일한 사슬 상의 두개의 도메인 사이에 폐어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인은 다른 단편의 상보성 VL 및 VH 도메인과 강제로 폐어링되고, 이에 의해 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일체 Fv (sFv) 이량체를 사용한 이종특이적 항체 단편의 다른 제조 전략도 보고된 바 있다 (문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조).

[0362] 2가 초과의 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다 (문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991)]).

6. 다가 항체

[0364] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 빠르게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 발명의 항체는 항원 결합 부위가 3개 이상인 (예를 들어, 4가 항체) 다가 항체 (IgM 클래스 이외의 것)일 수 있고, 항체의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 쉽게 생산될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 헌지 영역을 포함한다 (또는 이루어진다). 상기 시나리오에서, 항체는 Fc 영역 및 Fc 영역의 아미노 말단에 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 특정 실시양태에서, 다가 항체는 3 내지 약 8개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이루어진다). 이러한 한 실시양태에서, 다가 항체는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이루어진다). 다가 항체는 1종 이상의 폴리펩티드 사슬 (예를 들어, 2개의 폴리펩티드 사슬)을

포함하고, 여기서 폴리펩티드 사슬(들)은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_m-Fc$ (여기서, $VD1$ 은 제1 가변 도메인이고, $VD2$ 는 제2 가변 도메인이고, Fc 는 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이고, $X1$ 및 $X2$ 는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n 은 0 또는 1이다)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은 $VH-CH1$ -가요성 링커- $VH-CH1-Fc$ 영역 사슬; 또는 $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 영역 사슬을 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 적어도 2개 (바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 더 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 예를 들어 약 2 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 더 포함한다.

[0365] 7. 단일-도메인 항체

몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체는 단일-도메인 항체이다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크. (Domantis, Inc., 미국 매사추세츠주 월타姆 소재); 예를 들어, 미국 특허 6,248,516 B1 참조). 한 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진다.

[0367] 8. 항체 변이체

몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변경을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 상기 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구조물이 요구되는 특성을 갖는다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 최종 구조물에 가해지게 할 수 있다. 아미노산 변경은 서열이 제조될 때 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

돌연변이 유발을 위해 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하기 위한 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"로 불린다. 여기서, 표적 잔기들의 잔기 또는 기가 확인되고 (예를 들면, arg, asp, his, lys 및 glu과 같은 대전된 잔기), 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 주도록 중성 또는 음으로 대전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 교체된다. 이어서, 치환에 대한 기능적 감수성을 나타내는 이들 아미노산 위치는 치환 부위에서 또는 치환 부위에 대해 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써 개량된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 자체의 성질은 미리 결정할 필요가 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서 돌연변이의 성능을 분석하기 위해 ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 유발이 표적 코돈 또는 영역에서 수행되고, 발현된 이뮤노글로불린은 목적하는 활성에 대해 스크리닝된다.

아미노산 서열 삽입은 길이가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합체 및 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소 (예를 들어, ADEPT) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 대한 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합체를 포함한다.

특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 폴리펩티드의 글리코실화는 대개 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 모이어티의 부착을 의미한다. 트리펩티드 서열, 즉 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄로의 탄수화물 모이어티의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내의 상기 트리펩티드 서열의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성시킨다. O-연결 글리코실화는 당 N-아세일갈락토스아민, 갈락토스, 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 의미하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신도 사용될 수 있다.

항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 상기 트리펩티드 서열 (N-연결 글리코실화 부위에 대해)이 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성된다. 또한, 변형은 본래 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가, 결실 또는 치환에 의해 수행될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 여기에 부착된 탄수화물은 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부

착된 푸코스가 결핍된 성숙 탄수화물 구조를 갖는 항체는 미국 특허 출원 공개 2003/0157108 A1 (Presta, L.)에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 (교와 하코 고교사(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물에 이등분 (bisecting) N-아세틸글루코스아민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 WO 2003/011878 (진-메이렛(Jean-Mairet) 등)과 미국 특허 6,602,684 (우마나(Umana) 등)에 언급되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당 내에 1종 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체는 WO 1997/30087 (파텔(Patel) 등)에 보고되어 있다. 또한, Fc 영역에 부착된 변경된 탄수화물을 갖는 항체에 관하여는 WO 1998/58964 (라주, 에스.(Raju, S.))와 WO 1999/22764 (라주, 에스.)를 참조한다. 또한, 변경된 글리코실화가 존재하는 항원 결합 분자에 대해서는 US 2005/0123546 (Umana et al.)을 참조한다.

[0374] 특정 실시양태에서, 글리코실화 변이체는 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에 푸코스가 결핍되어 있는 Fc 영역을 포함한다. 상기 변이체는 개선된 ADCC 기능을 갖는다. 임의로, Fc 영역은 ADCC를 추가로 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링)의 치환을 더 포함한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체에 연관된 간행물의 예는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)])을 포함한다. 탈푸코실화 항체를 생산하는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 공개 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al.), 특히 Example 11), 및 넉아웃 (knockout) 세포주, 예를 들어 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 넉아웃 CHO 세포 (문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)])를 포함한다.

[0375] 한 실시양태에서, 항체는 그의 혈청 반감기가 개선되도록 변형된다. 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해서, 미국 특허 5739277에 기재된 바와 같이 셀비지 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히 항체 단편)에 삽입할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "셀비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 일을 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다 (미국 2003/0190311, 미국 6821505, 미국 6165745, 미국 5624821, 미국 5648260, 미국 6165745, 미국 5834597).

[0376] 다른 종류의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이를 변이체는 항체 분자의 1종 이상의 아미노산 잔기 대신에 상이한 잔기가 삽입된다. 치환 돌연변이 유발을 위한 가장 흥미로운 부위는 초가변 영역을 포함하지만, FR 변형도 고려된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제하에 표 1에 나타낸다. 상기 치환이 생물학적 활성의 목적하는 변경을 유도하면, 하기 표 1에 "예시적인 치환"으로 명명된 또는 아미노산 종류에 대해 아래에서 상세히 기재하는 보다 큰 실질적 변화가 도입되고, 생성물을 스크리닝할 수 있다.

표 1

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

[0377]

항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은, (a) 치환 영역 내 폴리펩티드 백본의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선 형태, (b) 표적 부위의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크성 (bulk)을 유지하는 것에 미치는 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성한다. 아미노산은 그의 측쇄 특성의 유사성에 따라 다음 군으로 분류할 수 있다 (문헌 [A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]):

[0379]

(1) 비극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0380]

(2) 비대전극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0381]

(3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0382]

(4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H).

[0383]

별법으로, 천연 발생 잔기는 통상적인 측쇄 특성을 기초로 하여 다음 군으로 분류할 수 있다:

[0384]

(1) 소수성: 노르뉴신, Met, Ala, Val, Leu, Ile,

[0385]

(2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,

[0386]

(3) 산성: Asp, Glu,

[0387]

(4) 염기성: His, Lys, Arg,

[0388]

(5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro, 및

[0389]

(6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0390]

비보존적 치환은 상기 종류의 하나의 멤버를 다른 종류와 교환하는 것을 수반할 것이다. 상기 치환되는 잔기는 또한 보존적 치환 부위 내로, 또는 나머지 (비-보존된) 부위 내로 도입될 수 있다.

[0391]

한 종류의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 개발을 위해 선택된 생성되는 변이체(들)은 이들이 생성되는 모 항체에 비해 변형된 (예를 들어, 개선된) 생물학적 특성을 가질 것이다. 그러한 치환 변이체를 생성하기 위한 간편한 방법은 파지 디스플레이를 사용하는 친화도 성숙이다. 간단히 설명하면, 몇몇 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6-7개의 부위)가 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성하도록 돌연변이된다. 이렇게 생성된 항체는 각 입자 내에 패키징된 파지 외피 단백질의 적어도 일부 (예를 들어, M13의 유전자 III 산물)에 대한 융합체로서 필라멘트상 파지 입자로부터 디스플레이된다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 그들의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인하는 스캐닝 돌연변이 유발 (예를 들어, 알라닌 스캐닝)을 수행할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 상기 접촉 잔기 및 이웃 잔기가, 본원에서 기재된 기술을 포함하여 당업계에 공지된 기술에 따른 치환에 대한 후보이다. 일단 그러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에서 기재된 기술을 포함하여 당업계에 공지된 기술을 사용하여 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 분석에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가 개발을 위해 선택할 수 있다.

[0392]

항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조한다. 상기 방법은 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 항체의 초기 제조된 변이체 또는 비-변이체 형태의 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위 지정) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발, 및 카세트 돌연변이 유발에 의한 제조를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0393]

본 발명의 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입하여 Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 바람직 할 수 있다. Fc 영역 변이체는 힌지 시스테인의 위치를 포함하여 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0394]

본원 명세서 및 선행기술의 교시 내용에 따르면, 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체는 야생형 상응 항체에 비해, 예를 들어 Fc 영역에 하나 이상의 변형을 포함할 수 있음이 고려된다. 그럼에도 불구하고, 상기 항체는 야생형 상응 항체에 비교할 때 치료 유용성에 필요한 실질적으로 동일한 특성을 보유할 것이다. 예를 들어, WO 99/51642에 기재된 바와 같이 변경된 (즉, 개선되거나 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 야기하는 특정 변형이 Fc 영역에서 형성될 수 있다고 생각된다. 또한, Fc 영역 변이체의 다른 예에 대해서는 문헌 [Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 5,648,260; 미국 특허 5,624,821; 및 WO 94/29351]을 참고한다. WO 00/42072 (Presta) 및 WO 2004/056312 (Lowman)에는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다 (또한, 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)] 참조). 모체 IgG의 태아로의 전달을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 개선된 결합 및 증가된 반감기를 갖는 항체는 US2005/0014934A1 (Hinton 등)에 기재되어 있다. 상기 항체는 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 그 내부에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열 및 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 6,194,551 B1 및 WO 99/51642에 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다. 또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)]도 참조한다.

[0395]

한 측면에서, 본 발명은 이종이량체화를 용이하게 하고/하거나 촉진시키는, Fc 영역을 포함하는 Fc 폴리펩티드의 계면에 변형을 포함하는 항체를 제공한다. 상기 변형은 제1 Fc 폴리펩티드 내에 돌출부를, 제2 Fc 폴리펩티드 내에 "캐비티"를 도입하는 것을 포함하고, 여기서 돌출부는 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 복합체화를 촉진시키기 위해 캐비티 내에 위치할 수 있다. 상기 변형을 갖는 항체를 생성시키는 방법은 예를 들어 미국 특허 5,731,168에 기재되어 있는 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.

[0396]

9. 항체 유도체

[0397]

본 발명의 항체는 당업계에 공지되고 용이하게 이용가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비-제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 엑스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 엑스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리

에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이들의 혼합물을 들 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 그의 물에서의 안정성 때문에 제조상의 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있으며, 분지되거나 비분지될 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 1개 초과의 중합체가 부착될 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 종류는 개선될 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 한정된 조건하에서 요법에 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이로 한정되지 않는 고려사항을 기초로 하여 결정될 수 있다.

[0398] 다른 실시양태에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (문헌 [Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 102:11600-11605 (2005)]). 방사선은 임의의 파장을 가질 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

항체의 특정 제조 방법

1. 특정 하이브리도마-기반 방법

[0401] 본 발명의 항-STEAP-1 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 4,816,567)에 의해 제조할 수 있다.

[0402] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예를 들어 햄스터는 면역화를 위해 사용되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도하기 위해 면역화된다. STEAP-1에 대한 항체는 일반적으로 STEAP-1 및 아주반트를 피하 (sc) 또는 복강 내로 (ip) 다수회 주사하여 동물에서 유도된다. STEAP-1은 그 일부가 본원에서 추가로 기재되는, 당엽계에 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, STEAP-1은 재조합 방식으로 생성시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 동물을 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 부분에 융합된 STEAP-1의 세포의 부분을 함유하는 STEAP-1의 유도체로 면역화시킨다. 한 실시양태에서, 동물을 STEAP-1-IgG1 융합 단백질로 면역화시킨다. 한 실시양태에서, 동물을 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노미콜레이트 (TDM) (리비 이뮤노켐 리서치, 인크. (Ribi Immunochem. Research, Inc., 미국 몬타나주 해밀턴 소재)) 용액 중의 STEAP-1의 면역원성 유도체로 면역화시키고, 용액을 여러 부위에서 피내 주사한다. 2 주 후, 동물을 부스팅시킨다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하고, 혈청을 항-STEAP-1 역가에 대해 분석한다. 동물을 역가가 안정한 수준에 도달할 때까지 부스팅한다.

[0403] 별법으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 이어서, 림프구는 하이브리도마 세포를 형성하는데 적합한 융합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합된다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibody:Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0404] 이와 같이 제조한 하이브리도마 세포는 적합한 배지, 예를 들어 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 히포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우, 하이브리도마의 배양 배지는 일반적으로 히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이고, 이를 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 저해한다.

[0405] 특정 실시양태에서, 골수종 세포는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체 생성 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준 생성을 지지하고, 배지, 예를 들어 HAT 배지에 민감한 세포이다. 예시적인 골수종 세포는 쥐과동물 골수종 세포주, 예를 들어 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center)) 및 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포 (미국 메릴랜드 주 로크빌 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (American Type Culture Collection))에서 유도된 것을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주도 인간 모노클로날 항체 생성을 위해 기재된 바 있다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol, 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Productivity Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

[0406] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 STEAP-1에 결합하는 모노클로날 항체의 생성에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어 방사성 면역 측정법 (RIA) 또는 효소-결합 면역 측정법 (ELISA)으로 결정할 수 있다. 모노

클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐챠드 (스캐챠드) 분석에 의해 결정될 수 있다.

[0407] 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 클론은 제한 회색 절차에 의해 서브클로닝하고 표준 방법 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibody:Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)])으로 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다. 서브클론에 의해 분비되는 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.

2. 특정 라이브러리 스크리닝 방법

[0409] 본 발명의 항-STEAP-1 항체는 목적하는 활성(들)을 갖는 항체를 스크리닝하기 위해 조합 라이브러리를 사용함으로써 제조할 수 있다. 예를 들어, 과자 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 원하는 결합 특징을 갖는 항체에 대하여 상기 라이브러리를 스크리닝하는 각종 방법이 당업계에 공지되어 있다. 그러한 방법은 일반적으로 문헌 [Hoogenboom et al (2001) in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ)]에 기재되어 있고, 특정 실시양태에서는 문헌 [Lee et al (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093]에 기재되어 있다.

[0410] 원칙적으로, 합성 항체 클론은 과자 외피 단백질에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 디스플레이하는 과자를 함유하는 과자 라이브러리를 스크리닝함으로써 선택된다. 이러한 과자 라이브러리는 관심 항원에 대하여 친화도 크로마토그래피에 의해 선택된다. 목적하는 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론은 항원에 흡착되어, 라이브러리 내의 비-결합 클론으로부터 분리된다. 이어서, 결합 클론은 항원으로부터 용출되고, 추가의 사이클의 항원 흡착/용출에 의해 더욱 풍부해질 수 있다. 본 발명의 임의의 항-STEAP-1 항체는 관심 과자 클론에 대해 선택하는데 적합한 항원 스크리닝 과정을 설계한 후, 관심 과자 클론으로부터 Fv 서열 및 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에 기재된 적합한 불변 영역 (Fc) 서열을 사용하여 전장 항-STEAP-1 항체 클론을 구성함으로써 얻을 수 있다.

[0411] 특정 실시양태에서, 항체의 항원 결합 도메인은 3개의 초가변 루프 (HVR) 또는 상보성 결정 영역 (CDR)을 제공하는 약 110개 아미노산의 2개의 가변 (V) 영역 (각각 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)에 하나씩)으로부터 형성된다. 가변 도메인은 문헌 [Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 단일쇄 Fv (scFv) 단편으로서 (여기서, VH 및 VL은 짧은 가요성 웹티드를 통해 공유 연결된다), 또는 Fab 단편으로서 (여기서, 이들을 각각 불변 도메인에 융합되고, 비공유 상호작용한다) 과자 상에 기능적으로 디스플레이될 수 있다. 본원에서 사용될 때, scFv 코딩 과자 클론 및 Fab 코딩 과자 클론은 통칭하여 "Fv 과자 클론" 또는 "Fv 클론"으로서 불린다.

[0412] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 문헌 [Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 따로 클로닝되고, 과자 라이브러리 내에서 무작위로 재조합될 수 있고, 이어서 이는 항원 결합 클론에 대해 탐색될 수 있다. 면역화 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 제작할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 별법으로, 문헌 [Griffiths et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이, 임의의 면역화 없이 광범위한 비-자가 및 또한 자가 항원에 대한 인간 항체의 단일 공급원을 제공하기 위해, 나이브 (naive) 레퍼토리가 클로닝될 수 있다. 마지막으로, 나이브 라이브러리는 또한 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 세그먼트를 클로닝하고, 고도 가변 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열을 달성하기 위해 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써 합성적으로 제조될 수 있다.

[0413] 특정 실시양태에서, 필라멘트상 과자는 부 (minor) 외피 단백질 pIII에 대한 융합으로 항체 단편을 디스플레이하는데 사용된다. 항체 단편은 단일쇄 Fv 단편으로서 (여기서, VH 및 VL 도메인은 예를 들어 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 가요성 폴리웹티드 스페이서에 의해 동일한 폴리 웹티드 사슬 상에서 연결된다), 또는 Fab 단편으로서 (여기서, 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991)]에 기재된 바와 같이 하나의 사슬은 pIII에 융합되고, 다른 사슬은 박테리아 숙주 세포 원형질막 공간 내로 분비되고, 여기서 Fab-외피 단백질 구조의 조립체가 야생형 외피 단백질의 일부를 치환함으로써 과자 표면 상에 디스플레이된다) 디스플레이될 수 있다.

- [0414] 일반적으로, 항체 유전자 단편을 코딩하는 핵산은 인간 또는 동물로부터 수집한 면역 세포로부터 얻어진다. 항-STEAP-1 클론에 유리하게 편향된 라이브러리가 요망되는 경우, 대상을 항체 반응을 생성하도록 STEAP-1로 면역화시키고, 비장 세포 및/또는 순환 B 세포 또는 다른 말초혈 림프구 (PBL)를 라이브러리 제작을 위해 회수한다. 바람직한 실시양태에서, 항-STEAP-1 클론에 유리하게 편향된 인간 항체 유전자 단편 라이브러리는 STEAP-1 면역화가 STEAP-1에 대한 인간 항체를 생산하는 B 세포를 유도하도록 기능적 인간 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 갖는 (또한 기능적 내인성 항체 생산 시스템이 결핍된) 트랜스제닉 마우스에서 항-STEAP-1 항체 반응을 생성함으로써 얻어진다. 인간 항체-생산 트랜스제닉 마우스의 생성은 아래에서 기재된다.
- [0415] 항-STEAP-1 반응성 세포 집단에 대한 추가의 농축은 예를 들어 STEAP-1 친화도 크로마토그래피 또는 플루오로크롬-표지된 STEAP-1에 대한 세포의 흡착 후 유동-활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하는 세포 분리에 의해 STEAP-1-특이적 막 결합 항체를 발현하는 B 세포를 단리하는 적합한 스크리닝 절차를 이용하여 얻을 수 있다.
- [0416] 별법으로, 비면역화 공여체로부터의 비장 세포 및/또는 B 세포 또는 다른 PBL의 사용은 가능한 항체 레퍼토리의 보다 우수한 예시를 제공하고, 또한 STEAP-1가 항원성이 아닌 임의의 동물 (인간 또는 비-인간) 종을 사용한 항체 라이브러리의 제작을 허용한다. 시험관내 항체 유전자 제조를 포함하는 라이브러리를 위해, 재배열되지 않은 항체 유전자 세그먼트를 코딩하는 핵산을 제공하기 위해 줄기 세포를 대상으로부터 수집한다. 관심 면역 세포는 다양한 동물 종, 예를 들어 인간, 마우스, 래트, 토끼, 늑대, 개, 고양이, 돼지, 소, 말, 및 새 종 등으로부터 얻을 수 있다.
- [0417] 항체 가변 유전자 세그먼트 (예를 들어, VH 및 VL 세그먼트)를 코딩하는 핵산을 관심 세포로부터 회수하고 증폭시킨다. 재배열된 VH 및 VL 유전자 라이브러리의 경우에, 목적하는 DNA는 림프구로부터 게놈 DNA 또는 mRNA를 단리한 후, 문헌 [Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837 (1989)]에 기재된 바와 같이 재배열된 VH 및 VL 유전자의 5' 및 3' 말단을 매칭시키는 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 수행하여 발현을 위한 다양한 V 유전자 레퍼토리를 제조함으로써 얻을 수 있다. V 유전자는 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 및 [Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989)]에 기재된 바와 같이, 성숙 V-도메인을 코딩하는 엑손의 5' 말단에서 역방향 프라이머 및 J-세그먼트 내에 기반한 정방향 프라이머를 사용하여 cDNA 및 게놈 DNA로부터 증폭될 수 있다. 그러나, cDNA로부터 증폭시키기 위해서는, 역방향 프라이머가 또한 문헌 [Jones et al., Biotechnol, 9:88-89 (1991)]에 기재된 바와 같이 리더 (leader) 엑손에 기반할 수 있고, 정방향 프라이머는 문헌 [Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732 (1989)]에 기재된 바와 같이 불변 영역 내에 기반할 수 있다. 상보성을 최대화하기 위해, 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 또는 [Sastry et al. (1989)])에 기재된 바와 같이 프라이머 내에 다의성을 혼입시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 라이브러리 다양성은 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]의 방법 또는 문헌 [Orum et al., Nucleic Acids Res., 21:4491-4498 (1993)]의 방법에 기재된 바와 같이 면역 세포 핵산 샘플 내에 존재하는 모든 이용가능한 VH 및 VL 배열을 증폭하기 위해 각각의 V-유전자 패밀리에 표적화된 PCR 프라이머를 사용함으로써 최대화된다. 증폭된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해, 희귀 (rare) 제한 부위가 문헌 [Orlandi et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 한 단부에서 태그로서, 또는 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 태깅된 프라이머를 사용하는 추가의 PCR 증폭에 의해 PCR 프라이머 내에 도입될 수 있다.
- [0418] 합성적으로 재배열된 V 유전자의 레퍼토리는 V 유전자 세그먼트로부터 시험관내에서 유도될 수 있다. 대부분의 인간 VH-유전자 세그먼트는 클로닝되고 서열결정되고 (문헌 [Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227:776-798 (1992)]에 보고됨), 맵핑되었고 (문헌 [Matsuda et al., Nature Genet., 3:88-94 (1993)]에 보고됨); 상기 클로닝된 세그먼트 (H1 및 H2 루프의 주요 형태를 모두 포함함)는 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이 다양한 서열 및 길이의 H3 루프를 코딩하는 PCR 프라이머를 사용하여 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 생성하는데 사용될 수 있다. VH 레퍼토리는 또한 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992)]에 기재된 바와 같이 단일 길이의 긴 H3 루프에 집중된 모든 서열 다양성을 갖도록 제조될 수 있다. 인간 V_κ 및 V_λ 세그먼트가 클로닝되어 서열결정되었고 (문헌 [Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993)]에 보고됨), 합성 경쇄 레퍼토리를 제조하는데 사용될 수 있다. 합성 V 유전자 레퍼토리 (VH 및 VL 폴드 (fold)의 범위, 및 L3 및 H3 길이에 기반하는)는 상당히 구조적으로 다양한 항체를 코딩할 것이다. V-유전자 코딩 DNA의 증폭 후, 생식세포 V-유전자 세그먼트는 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)]의 방법에 따라 시험관내에서 재배열될 수 있다.
- [0419] 항체 단편의 레퍼토리는 VH 및 VL 유전자 레퍼토리를 몇 가지 방식으로 함께 결합함으로써 제작될 수 있다. 각각의 레퍼토리는 상이한 벡터 내에 생성될 수 있고, 벡터는 예를 들어 문헌 [Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993)]에 기재된 바와 같이 시험관내에서, 또는 조합 감염, 예를 들어 문헌 [Waterhouse et al., Nucl.

Acids Res., 21:2265-2266 (1993)]에 기재된 loxP 시스템에 의해 생체내에서 재조합될 수 있다. 생체내 재조합 방안은 이. 콜라이 형질전환 효율에 의해 부과된 라이브러리 크기의 제한을 극복하기 위해 Fab 단편의 2-사슬 특성을 활용한다. 나이브 VH 및 VL 레퍼토리는 하나는 파지미드 내로, 다른 하나는 파지 벡터 내로 따로 클로닝된다. 이어서, 2개의 라이브러리는 파지미드-함유 박테리아의 파지 감염에 의해 조합되어, 각각의 세포가 상이한 조합을 함유하고, 라이브러리 크기는 존재하는 세포의 수에 의해서만 제한된다 (약 10^{12} 개 클론). 두 벡터 모두는 생체내 재조합 신호를 함유하여, VH 및 VL 유전자가 단일 레플리콘 상으로 재조합되고, 파지 비리온 내로 함께 패키징된다. 상기 큰 라이브러리는 우수한 친화도 (약 10^{-8} M의 K_d^{-1})의 다수의 다양한 항체를 제공한다.

[0420]

별법으로, 레퍼토리들은 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 동일한 벡터 내로 순차적으로 클로닝되거나, 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 함께 조립된 후 클로닝될 수 있다. PCR 조립은 또한 VH 및 VL DNA를 가요성 웨비드 스페이서를 코딩하는 DNA와 연결시켜 단일쇄 Fv (scFv) 레퍼토리를 형성하는데 사용될 수 있다. 다른 기술에서, 문헌 [Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992)]에 기재된 바와 같이 "세포내 PCR 조립"은 VH 및 VL 유전자를 림프구 내에서 PCR로 결합시킨 후, 연결된 유전자의 레퍼토리를 클로닝하는데 사용된다.

[0421]

나이브 라이브러리 (천연 또는 합성)에 의해 생산된 항체는 중등도 친화도 (약 10^6 내지 10^7 M $^{-1}$ 의 K_d^{-1})의 것일 수 있지만, 친화도 성숙은 또한 문헌 [Winter et al (1994), 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 2차 라이브러리를 제작하고 그로부터 재선택함으로써 시험관내 모방될 수도 있다. 예를 들어, 돌연변이는 문헌 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)]의 방법 또는 문헌 [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:3576-3580 (1992)]의 방법에서 오류-허용 (error-prone) 중합효소 (문헌 [Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)]에 보고된 것)를 사용함으로써 시험관내에서 무작위로 도입될 수 있다. 추가로, 친화도 성숙은 예를 들어 선택된 개별 Fv 클론에서 관심 CDR에 이르는 무작위 서열을 갖는 프라이머를 사용한 PCR을 이용하여 하나 이상의 CDR을 무작위 돌연변이시키고, 보다 고친화도의 클론을 스크리닝함으로써 수행될 수 있다. WO 9607754 (1996년 3월 14일 공개)에서는 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성하기 위해 이뮤노글로불린 경쇄의 상보성 결정 영역에서 돌연변이를 유발하는 방법을 기재한 바 있다. 다른 효과적인 방안은 비면역화 공여체로부터 얻은 천연 발생 V 도메인 변이체의 레퍼토리를 사용하는 파지 디스플레이에 의해 선택된 VH 또는 VL 도메인을 재조합하고, 문헌 [Marks et al., Biotechnol, 10:779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 수회의 사슬 재셔플링으로 보다 고친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 상기 기술을 통해 친화도가 10^{-9} M 이하인 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다.

[0422]

라이브러리의 스크리닝은 당업계에 공지된 임의의 기술로 달성할 수 있다. 예를 들어, STEAP-1은 흡착 플레이트의 웨일을 코팅하는데 사용되거나, 흡착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에서 발현되거나, 세포 분류에 사용되거나, 스트렙타비딘-코팅된 비드로 포획하기 위해 비오틴에 접합되거나, 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝 (panning)하기 위한 임의의 다른 당업계에 공지된 방법에서 사용될 수 있다.

[0423]

파지 라이브러리 샘플을 파지 입자의 적어도 일부를 흡착제와 결합시키는데 적합한 조건하에 고정된 STEAP-1과 접촉시킨다. 보통, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함하는 조건은 생리적 조건을 모방하도록 선택된다. 고체상에 결합된 파지를 세척한 후, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 산으로, 또는 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 알칼리로, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]의 항원 경쟁 방법과 유사한 절차에 따른 STEAP-1 항원 경쟁으로 용출시킨다. 파지는 단일 선별 라운드에서 20-1,000배 농축될 수 있다. 또한, 농축된 파지를 박테리아 배양액에서 성장시키고, 추가의 선별 라운드를 실행시킬 수 있다.

[0424]

선별의 효율은 세척 동안의 해리 역학, 및 단일 파지 상의 다수 항체 단편이 항원과 동시에 결합할 수 있는지 여부를 포함하는 많은 요인에 따라 달라진다. 신속한 해리 역학 (및 약한 결합 친화도)을 갖는 항체는 짧은 세척, 다가 파지 디스플레이 및 고체상 중 높은 코팅 밀도의 항원을 사용하여 보유될 수 있다. 높은 밀도는 다가 상호작용을 통해 파지를 안정화시킬 뿐만 아니라, 해리된 파지의 재결합에 유리하다. 느린 해리 역학 (및 우수한 결합 친화도)을 갖는 항체의 선별은 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]과 WO 92/09690에 기재된 바와 같이 오랜 세척 및 1가 파지 디스플레이, 및 문헌 [Marks et al., Biotechnol, 10:779-783 (1992)]

에 기재된 바와 같이 낮은 코팅 밀도의 항원을 사용하여 촉진될 수 있다.

[0425] STEAP-1에 상이한 친화도, 심지어는 근소하게 상이한 친화도를 갖는 파지 항체를 선별하는 것이 가능하다. 그러나, 선별된 항체의 무작위 돌연변이 (예를 들어, 일부 친화도 성숙 기술에서 수행된 바와 같음)는 항원에 가장 강하게 결합하고, 몇몇은 보다 고친화도를 갖는 많은 돌연변이체를 초래하는 경향이 있다. STEAP-1을 제한하면, 드문 고친화도의 파지가 경쟁에 의해 제거될 수 있다. 보다 고친화도의 돌연변이체를 모두 보유하기 위해, 파지는 과량의 바이오티닐화 STEAP-1과 함께 인큐베이션될 수 있지만, 바이오티닐화 STEAP-1은 STEAP-1에 대한 표적 몰 친화도 상수보다 더 낮은 몰농도의 농도로 사용된다. 이어서, 고친화도-결합 파지는 스트렙타비딘-코팅된 상자성 (paramagnetic) 비드에 의해 포획될 수 있다. 이러한 "평형 포획"으로 항체는 그들의 결합 친화도에 따라 선별될 수 있고, 그의 민감도는 친화도가 보다 낮은 매우 과량의 파지로부터 2배 더 높은 수준의 낮은 친화도를 갖는 돌연변이체 클론의 단리를 허용한다. 고체상에 결합된 파지를 세척하는데 사용되는 조건은 또한 해리 역학을 기초로 하여 식별하기 위해 조작될 수 있다.

[0426] 항-STEAP-1 클론은 활성에 기초하여 선별될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 본래 STEAP-1을 발현하는 살아있는 세포에 결합하는 항-STEAP-1 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 STEAP-1 리간드와 STEAP-1 사이의 결합을 차단하지만, STEAP-1 리간드와 제2 단백질 사이의 결합은 차단하지 않는 항-STEAP-1 항체를 제공한다. 상기 항-STEAP-1 항체에 상응하는 Fv 클론은 (1) 상기 기재된 파지 라이브리리로부터 항-STEAP-1 클론을 단리하고, 임의로 파지 클론의 단리된 집단을 적합한 박테리아 숙주에서 집단을 성장시킴으로써 증폭시키고; (2) STEAP-1, 차단 및 비-차단 활성 각각이 요망되는 및 제2 단백질을 선택하고; (3) 항-STEAP-1 파지 클론을 고정된 STEAP-1에 흡착시키고; (4) 과량의 제2 단백질을 사용하여 제2 단백질의 결합 결정자와 중복되고/되거나 공유하는 STEAP-1-결합 결정자를 인식하는 임의의 바람직하지 않은 클론을 용출시키고; (5) 단계 (4) 이후에 흡착되어 남아있는 클론을 용출시킴으로써 선택될 수 있다. 임의로, 목적하는 차단/비-차단 특성을 갖는 클론은 본원에 기재된 선별 절차를 1회 이상 반복함으로써 추가로 농축될 수 있다.

[0427] 본 발명의 하이브리도마-유래된 모노클로날 항체 또는 파지 디스플레이 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 DNA 주형으로부터 목적하는 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용함으로써) 쉽게 단리되고 서열결정된다. 일단 단리된 후, DNA는 발현 벡터 내로 도입될 수 있고, 이어서 이는 재조합 숙주 세포에서 목적하는 모노클로날 항체의 합성을 달성하기 위해 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 이뮤노글로불린 단백질을 달리 생산하지 않는 골수종 세포 내로 형질감염된다. 박테리아에서 항체-코딩 DNA의 재조합 발현에 관한 문헌은 문헌 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256 (1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs, 130:151 (1992)])을 포함한다.

[0428] 본 발명의 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 공지의 DNA 서열 (예를 들어, 적절한 DNA 서열은 문헌 [Kabat et al. 상기 문헌]으로부터 얻을 수 있다)과 조합되어, 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 클론을 형성할 수 있다. 임의의 이소형의 불변 영역, 예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있고, 상기 불변 영역은 임의의 인간 또는 동물종으로부터 얻을 수 있음이 이해될 것이다. 하나의 동물 (예를 들어, 인간) 종의 가변 도메인 DNA로부터 유래된 후, 다른 동물 종의 불변 영역 DNA에 융합되어 "하이브리드" 전장 중쇄 및/또는 경쇄를 위한 코딩 서열(들)을 형성하는 Fv 클론은 본원에 기재된 "키메라" 및 "하이브리드" 항체의 정의에 포함된다. 특정 실시양태에서, 인간 가변 DNA로부터 유래된 Fv 클론은 인간 불변 영역 DNA에 융합되어 모든 인간 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)을 형성한다.

[0429] 본 발명의 하이브리도마로부터 유래된 항-STEAP-1 항체를 코딩하는 DNA는 또한 예를 들어 하이브리도마 클론에서 유래된 상동성 쥐과동물 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 코딩 서열로 치환함으로써 (예를 들어, 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]의 방법에서와 같이) 변형될 수도 있다. 하이브리도마- 또는 Fv 클론-유래 항체 또는 단편을 코딩하는 DNA는 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드 코딩 서열의 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유 연결시켜 추가로 변형될 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명의 Fv 클론 또는 하이브리도마 클론-유래된 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.

3. 벡터, 숙주 세포, 및 재조합 방법

[0430] 본 발명의 항체의 재조합 생산을 위해, 그를 코딩하는 핵산을 단리하고 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능 벡터 내로 삽입시킨다. 항체를 코딩하는 DNA를 통상의 방법을 사용하여 (예를 들어, 항체의

중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 용이하게 단리하고 서열결정한다. 다수의 벡터가 이용될 수 있다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 의해 결정된다. 일반적으로, 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 (일반적으로 포유동물)에서 기원한다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형의 불변 영역이 이러한 목적을 위해 사용될 수 있고, 상기 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 얻을 수 있음이 이해될 것이다.

[0432] 원핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0433] 벡터 제조

본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오티드 서열은 항체 생산 세포, 예를 들어 하이브리도마 세포로부터 단리되어 서열 결정될 수 있다. 별법으로, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 얻은 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵 숙주에서 이종 폴리뉴클레오티드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적에 이용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따라 결정될 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이종 폴리뉴클레오티드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 포함한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 선별 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이종 핵산 삽입체 및 전사 종결 서열을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0435] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 조절 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 상기 숙주와 함께 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 및 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공할 수 있는 마킹 (marking) 서열을 포함한다. 예를 들어, 이. 콜라이는 일반적으로 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 암페실린 (Amp) 및 테트라사이클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지도 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 상기 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 카터 (Carter) 등의 미국 특허 5,648,237에 상세하게 기재되어 있다.

[0436] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 조절 서열을 함유하는 파지 벡터를 상기 숙주에 대한 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예를 들어 λ GEM.TM.-11이 이. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포의 형질전환에 사용될 수 있는 재조합 벡터 제조에 사용될 수 있다.

[0437] 본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 그의 발현을 조정하는 시스트론에 대해 상류 (5')에 위치하는 비번역 조절 서열이다. 원핵 생물 프로모터는 전형적으로 두 종류의 프로모터, 즉 유도가능 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도가능 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 반응하여 그의 제어하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.

[0438] 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 매우 많은 프로모터가 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급된 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이종 프로모터를 둘다 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이종 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.

[0439] 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, β -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 tac 또는 trc 프로모터를 포함한다. 그러나, 박테리아 (예를 들어, 다른 공지의 박테리아 또는 파지 프로모터)에서 기능적인 다른 프로모터도 적합하다. 이들의 뉴클레오티드 서열은 공개되어 있고, 따라서 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하기 위한 링커 또는 어댑터 (adaptor)를 사용하여 이를 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이션 시킬 수 있다 [Siebenlist et al (1980) Cell 20:269].

[0440] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위 (translocation)를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수

있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택되는 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 웹티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이 종 폴리펩티드에 천연인 신호 서열을 인식하여 프로세싱하지 않는 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은 예를 들어 알칼린 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어지는 군으로부터 선택되는 원핵 신호 서열에 의해 치환된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 발현 시스템의 두 시스템 모두에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.

[0441] 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이뮤노글로불린의 생산은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으며, 따라서 각 시스템 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고 조립되어 세포질 내에서 기능적 이뮤노글로불린을 형성한다. 특정 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이 *trxB*- 균주)는 디슬피드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 적절한 폴딩 및 조립을 허용한다 [Proba and Pluckthun, Gene, 159:203 (1995)].

[0442] 본 발명의 항체는 또한 발현된 폴리펩티드 성분의 정량적인 비율을 본 발명의 분비되고 적절하게 조립된 항체의 수율을 최대화하기 위해 조정할 수 있는 발현 시스템을 이용하여 생산될 수 있다. 이러한 조정은 적어도 부분적으로는 폴리펩티드 성분에 대한 번역 강도의 동시 조정에 의해 달성된다.

[0443] 번역 강도의 조정을 위한 한 가지 기술은 미국 특허 5,840,523 (심몬스 등)에 개시되어 있다. 이는 시스템 내의 번역 개시 영역 (TIR)의 변이체를 이용한다. 주어진 TIR에 대해, 일련의 아미노산 또는 핵산 서열 변이체는 일정 범위의 번역 강도로 생성됨으로써, 상기 인자를 특정 사슬의 목적하는 발현 수준을 위해 조정하는 편리한 수단을 제공할 수 있다. TIR 변이체는 아미노산 서열을 변경시킬 수 있는 코돈 변화를 유발하는 통상적인 돌연변이 유발 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레오티드 서열의 변경은 침묵 변경이다. TIR의 변경은 예를 들어 신호 서열의 변경과 함께 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열의 수 또는 간격의 변경을 포함할 수 있다. 돌연변이체 신호 서열을 생성하는 한 가지 방법은 신호 서열의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 (즉, 변화가 침묵인) 코딩 서열의 시작점에서의 "코돈 뱅크 (codon bank)"의 생성이다. 이는 각각의 코돈의 제3 뉴클레오티드 위치의 변화에 의해 달성될 수 있으며, 또한 류신, 세린 및 아르기닌과 같은 일부 아미노산은 상기 뱅크를 제조하는데 있어서 복잡성을 추가할 수 있는 다수의 제1 및 제2 위치를 갖는다. 상기 돌연변이 유발 방법은 문헌 [Yansura et al (1992) MethodS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158]에 상세히 기재되어 있다.

[0444] 한 실시양태에서, 각각의 시스템에 대한 일정 범위의 TIR 강도를 갖는 벡터의 세트가 생성된다. 상기 제한된 세트는 각각의 사슬의 발현 수준뿐만 아니라 다양한 TIR 강도 조합 하에서 목적하는 항체 생성물의 수율의 비교를 제공한다. TIR 강도는 미국 특허 5,840,523 (심몬스 등)에 상세히 기재된 바와 같이 리포터 유전자의 발현 수준을 정량화함으로써 측정될 수 있다. 번역 강도 비교를 기초로 하여, 본 발명의 발현 벡터 구조물에 조합되도록 목적하는 개별 TIR을 선택한다.

[0445] 본 발명의 항체 발현에 적합한 원핵 숙주 세포는 원시세균 및 진정세균, 예를 들어 그람-음성 또는 그람-양성 유기체를 포함한다. 유용한 박테리아의 예는 에스케리치아 (Escherichia) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실러스 (Bacilli) (예를 들어, 비. 섭틸리스 (*B. subtilis*)), 장내세균 (Enterobacteria), 슈도모나스 (Pseudomonas) 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사 (*P. aeruginosa*)), 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스 (*Serratia marcescans*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 프로테우스 (*Proteus*), 시겔라 (*Shigella*), 리조비아 (*Rhizobia*), 비트레오실라 (*Vitreoscilla*), 또는 파라코커스 (*Paracoccus*)를 포함한다. 한 실시양태에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예로는 유전자형 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpC-fepE) degP41 kanR (미국 특허 5,639,635)을 갖는 균주 33D3를 비롯한 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.:American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체를 들 수 있다. 다른 균주 및 그의 유도체, 예를 들어 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 비, 이. 콜라이 λ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 상기 예는 제한적이 아니라 예시적이다. 한정된 유전자형을 갖는 임의의 상기 언급된 박테리아의 유도체를 제작하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내의 레플리콘의 복제능을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종은 pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKNA10과 같은 널리 공지된 플라스미드가 레플리콘을 공급하는데 사용될 경우 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제는 바

람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.

[0446] 항체 생산

[0447] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키는데 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.

[0448] 형질전환은 DNA가 염색체외 요소로서 또는 염색체 통합체에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 또다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 이용되는 또다른 기술은 전기천공이다.

[0449] 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는데 사용되는 원핵 세포를 당업계에 공지되고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예는 필수 영양 보충물이 부가된 루리아 브로쓰 (luria broth) (LB)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵 세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구조를 기초로 하여 선택된 선별제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.

[0450] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로 또는 복합 질소 공급원과 같은 또다른 보충물 또는 배지와의 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오클리콜레이트, 디티오에리트리톨 및 디티오프레이톨로 이루어지는 군으로부터 선택된 1종 이상의 환원제를 함유할 수 있다.

[0451] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 특정 실시양태에서, 이. 콜라이의 성장 온도는 예를 들어 약 20 °C 내지 약 39°C, 약 25°C 내지 약 37°C, 및 약 30°C이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 특정 실시양태에서, 이. 콜라이에 대해, pH는 약 6.8 내지 약 7.4, 또는 약 7.0이다.

[0452] 유도가능 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용될 경우, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도용의 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 한 실시양태에서, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 다른 인듀서가 사용될 수 있다.

[0453] 한 실시양태에서, 본 발명의 발현된 폴리펩티드는 숙주 세포의 원형질막 공간 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 단백질 회수는 전형적으로, 일반적으로 삼투압 충격, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물을 분쇄하는 것을 포함한다. 세포가 분쇄되면, 세포 파쇄물 또는 온전한 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질은 예를 들어 친화도 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 별법으로, 단백질을 배양 배지 내로 옮기고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상등액을 여과하고 농축하여 생성된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 추가로 단리하고, 폴리아크릴아미드 젤 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블로트 분석과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.

[0454] 본 발명의 한 측면에서, 항체 생산은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 (fed-batch) 발효 절차는 재조합 단백질의 생산에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 특정 실시양태에서 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 상기 발효기는 산소 및 영양물, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키는 교반기 추진기를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로 부피 용량으로 대략 100 리터 이하인 발효기에서의 발효를 지칭하며, 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.

[0455] 발효 과정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건하에서 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD550으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 정지상이다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 인듀서를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.

[0456] 본 발명의 폴리펩티드의 생산 수율 및 품질을 개선시키기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적절한 조립 및 폴딩을 개선시키기 위해, Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD

및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 (chaperone) 활성을 갖는 웨티딜프롤릴 시스, 트랜스-이소머라제)와 같은 샤페론 단백질을 과발현하는 추가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵 세포를 동시에 형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생산된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다 (문헌 [Chen et al (1999) J Bio Chem 274:19601-19605]; 조지오 (Georgiou) 등의 미국 특허 6,083,715; 조지오 등의 미국 특허 6,027,888; [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210]).

[0457] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질 분해에 감수성인 단백질)의 단백질 분해를 최소화하기 위해, 단백질 분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주는 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 이들의 조합물과 같은 공지된 박테리아 프로테아제를 코딩하는 유전자에서 유전자 돌연변이(들)를 수행하도록 변형될 수 있다. 일부 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하며, 예를 들어 문헌 [Joly et al (1998), 상기 문헌]; 조지오 등의 미국 특허 5,264,365; 조지오 등의 미국 특허 5,508,192; 문헌 [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)])에 기재되어 있다.

[0458] 한 실시양태에서, 단백질 분해 효소가 결핍되고 1종 이상의 샤페론 단백질을 과발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로 사용된다.

항체 정제

[0460] 한 실시양태에서, 본원에서 생산된 항체 단백질을 추가의 분석 및 사용을 위해 추가로 정제하여 실질적으로 균질한 제제를 수득한다. 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 다음 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 면역친화도 또는 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱 (chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전법, 및 예를 들어 세파덱스 (Sephadex) G-75를 이용한 겔 여과.

[0461] 한 측면에서, 고체상 상에 고정된 단백질 A가 본 발명의 항체 생성물의 면역친화도 정제에 사용된다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역에 고 친화도로 결합하는 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)로부터의 41 kD 세포벽 단백질이다 (문헌 [Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]). 단백질 A가 고정되는 고체상은 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 컬럼 또는 제어된 공극 유리 컬럼 또는 규산 컬럼일 수 있다. 일부 용도에서, 컬럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅하여 가능하게는 오염물의 비특이적 부착을 방지한다.

[0462] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양액으로부터 유래된 제제를 단백질 A가 고정된 고체상에 적용하여 관심 항체가 단백질 A에 특이적으로 결합하게 할 수 있다. 그 후, 고체상을 세척하여 고체상에 비-특이적 결합된 오염물을 제거한다. 최종적으로, 목적하는 항체를 용출에 의해 고체상으로부터 회수한다.

진핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0464] 진핵 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 일반적으로 다음 중 하나 이상의 비제한적인 성분을 포함한다: 신호 서열, 복제 기점, 1종 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

신호 서열 성분

[0466] 진핵 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열, 또는 관심 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 선택된 이종 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱된 (즉, 신호 웨티디제에 의해 절단된) 것일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다. 이러한 전구체 영역을 위한 DNA는 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임 (reading frame)으로 라이게이션된다.

복제 기점

[0468] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 대해서는 필요하지 않다. 예를 들어, SV40 기점이 전형적으로 사용될 수 있는데, 그 이유는 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.

선별 유전자 성분

[0470] 발현 및 클로닝 벡터는 선별가능한 마커로도 지정되는 선별 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선별 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암페실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 연관된 경우에는 영양요구성 결핍을 보충하거나, (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은

중요한 영양물을 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0471] 선별 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이종 유전자로 성공적으로 형질전환된 상기 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생성하고, 따라서 선별 처리시에도 생존한다. 이러한 우세한 선별의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 이용한다.

[0472] 포유동물 세포에 적합한 선별가능 마커의 다른 예는 항체 핵산, 예를 들어 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등을 섭취하는데 감응성이 있는 세포의 확인을 가능하게 하는 것이다.

[0473] 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, DHFR 선별 유전자로 형질전환된 세포는 우선 메토트렉세이트 (Mtx), DHFR의 경쟁적 길항제를 함유하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 야생형 DHFR을 사용할 때 적합한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.

[0474] 별법으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질 및 다른 선별가능 마커, 예를 들어 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환되거나 이것으로 함께 형질전환된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 선별가능 마커에 대한 선별제, 예를 들어 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신, 또는 G418를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선별될 수 있다. 미국 특허 4,965,199를 참조한다.

프로모터 성분

[0475] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 숙주 유기체에 의해 인식되고 관심 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 진핵 세포에 대한 프로모터 서열이 공지되어 있다. 예를 들어, 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 약 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT 풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 출발부로부터 70 내지 80개 염기 상류에 존재하는 다른 서열은 N이 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 CNCAAT 영역이다. 대부분의 진핵 유전자의 3' 말단에는 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 특정 실시양태에서, 임의의 또는 모든 상기 서열이 진핵 발현 벡터 내에 적합하게 삽입될 수 있다.

[0476] 포유동물 숙주 세포 내의 벡터로부터의 전사는 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성일 경우 바이러스, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 조류폭스 바이러스, 아데노바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 계놈으로부터, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터로부터, 열 충격 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 조절될 수 있다.

[0477] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 또한 SV40 바이러스 복제 기점을 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 얻는다. 인간 사이토메갈로바이러스의 극초기 (immediate early) 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 얻는다. 소 유두종 바이러스를 벡터로서 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 시스템은 미국 특허 4,419,446에 기재되어 있다. 이 시스템의 변형은 미국 특허 4,601,978에 기재되어 있다. 또한, 단순 포진 바이러스로부터 티미딘 키나제 프로모터의 조절하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA를 발현시키는 것에 대해 기재한 문헌 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 별법으로, 라우스 육종 바이러스의 장쇄 말단 반복부가 프로모터로서 사용될 수도 있다.

인핸서 요소 성분

[0478] 고등 진핵 세포에 의한 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA의 전사는 종종 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -페토단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 일반적으로 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 그 예는 복제 기점의 하류 (bp 100-270) 쪽의 SV40 인핸서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인핸서 요소를 기재한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 벡터에서 위치 5' 또는 3'에서 항체 폴리펩티드 코딩 서열로 스플라이싱될 수 있지만, 일반적으로 프로모터부터 부위 5'에 위치한다.

전사 종결 성분

[0479] 진핵 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열을 함유할 수도 있다. 상기

서열은 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상 얻을 수 있다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 세그먼트를 포함한다. 한 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO 94/11026 및 그에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0483] 숙주 세포의 선택 및 형질전환

본원의 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 척추동물 숙주 세포를 비롯하여 본원에 기재된 보다 고등한 진핵 세포를 포함한다. 배양 (조직 배양)시 척추동물 세포의 증식은 일상적인 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인 (현탁 배양으로 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1997)]; 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 경부 암세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 간세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐세포 (W138, ATCC CCL 75), 인간 간세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암세포주 (Hep G2)이다.

[0485] 숙주 세포는 항체 생산을 위해 상기한 발현 또는 클로닝 벡터를 사용하여 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키는데 적절하게 변형된 통상의 영양 배지에서 배양한다.

[0486] 숙주 세포의 배양

본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양할 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예를 들어 햄 (Ham) F10 (시그마 (Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 (Dulbecco) 개질 이글 (Eagle) 배지 (DMEM, 시그마)가 숙주 세포를 배양하기에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:225 (1980)], 미국 특허 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985)에 기재된 임의의 배지를 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예를 들어, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예를 들어, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충액 (예를 들어, HEPES), 뉴클레오티드 (예를 들어, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예를 들어, 젠타마이신(GENTAMYCIN)™ 약물), 미량 원소 (보통 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수 보충물이 또한 당업자에게 잘 알려진 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이며, 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0488] 항체의 정제

[0489] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내에서 생산되거나 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산되면, 제1 단계로서, 입자형 파쇄물, 숙주 세포 또는 용해된 단편은 예를 들어 원심분리 또는 한외여파에 의해 제거된다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 상기 발현 시스템으로부터의 상등액을 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여파 유닛을 사용하여 농축할 수 있다. 단백질 분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF가 임의의 선행 단계에서 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.

[0490] 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들어, 히드록실아파티트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화도 크로마토그래피가 편리한 기술이다. 친화도 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 인간 γ 1, γ 2 또는 γ 4 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al. J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 γ 3에 대해 추천된다 (문헌 [Guss et al. EMBO J. 5:1567-1575 (1986)]). 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 아가로스일 수 있지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를 들어 제어된 공극 유리 또는 폴리

(스티렌디비닐)벤젠이 아가로스를 사용하여 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유동 속도와 더 짧은 처리 시간을 허용한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이.티. 베이커 (J.T. Baker), 미국 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들어 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전도 회수되는 항체에 따라 사용될 수 있다.

[0491] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 예를 들어 바람직하게는 낮은 염농도 (예를 들어, 약 0-0.25M 염)에서 수행되는, 약 2.5-4.5의 pH의 용출 완충액을 사용하는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 추가의 정제 단계에 적용될 수 있다.

[0492] 일반적으로, 연구, 시험 및 임상 용도로 사용하기 위한 항체의 제조를 위한 다양한 방법은 당업계에 널리 확립되어 있으며, 상기한 방법과 일치하고/하거나 특정 관심 항체에 대해 당업자에 의해 적절한 것으로 간주된다.

[0493] 면역접합체

[0494] 또한, 본 발명은 1종 이상의 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 본 발명의 임의의 항-STEAP-1 항체를 포함하는 면역접합체 (상호교환가능하게 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"로 언급됨)를 제공한다.

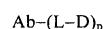
[0495] 특정 실시양태에서, 면역접합체는 항-STEAP-1 항체 및 화학요법제 또는 다른 독소를 포함한다. 면역접합체 생성에 유용한 화학요법제는 본원에 기재되어 있다 (예를 들어, 상기 참조). 효소 활성 독소 및 그의 단편도 사용될 수 있고, 본원에서 기재된다.

[0496] 특정 실시양태에서, 면역접합체는 항-STEAP-1 항체, 및 소분자 약물, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우리스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 세포독성 활성을 갖는 상기 약물의 유도체를 포함하지만 이로 한정되지 않는 1종 이상의 소분자 독소를 포함한다. 상기 면역접합체의 예를 아래에서 보다 상세하게 기재한다.

[0497] 1. 예시적인 면역접합체- 항체-약물 접합체

[0498] 본 발명의 면역접합체 (또는 "항체-약물 접합체" ("ADC"))는 항-STEAP-1 항체가 임의의 링커 (L)를 통해 하나 이상의 약물 모이어티 (D)에 접합된 (즉, 공유 결합에 의해 부착된) 하기 화학식 1의 것일 수 있다:

[0499] <화학식 1>



[0501] 따라서, 항-STEAP-1 항체는 약물에 직접 또는 링커를 통해 접합될 수 있다. 화학식 1에서, p는 항체 당 약물 모이어티의 평균 수이고, 예를 들어 항체 당 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티, 특정 실시양태에서는 항체 당 1 내지 약 8개의 약물 모이어티일 수 있다.

[0502] 예시적인 링커

[0503] 예시적인 링커 및 약물 모이어티가 본원에 개시된다. 링커는 하나 이상의 링커 성분을 포함할 수 있다. 예시적인 링커 성분으로는 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-페리딜티오)펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC"), N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트 ("SIAB") 및 에틸렌옥시-CH₂CH₂O- (하나 이상의 반복 유닛으로서) ("EO" 또는 PEO")를 들 수 있다. 다양한 링커 성분이 당업계에 공지되어 있으며, 그 일부를 아래에서 기재한다.

[0504] 링커는 세포에서 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커 (예를 들어, 히드라존), 프로테아제-감수성 (예를 들어, 웨티다제-감수성) 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디술퍼드 함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 5,208,020)를 사용할 수 있다.

- [0505] 한 실시양태에서, ADC의 링커 L은 하기 식으로 표시된다:

[0506] $-A_a-W_w-Y_y-$

[0507] 상기 식에서,

[0508] $-A-$ 는 항체 (Ab)의 시스테인 티올에 공유 결합에 의해 부착된 스트레처 유닛이고;

[0509] a 는 0 또는 1이고;

[0510] 각각의 W 는 독립적으로 아미노산 유닛이고;

[0511] w 는 독립적으로 0 내지 12의 정수이고;

[0512] $-Y-$ 는 약물 모이어티에 공유 결합에 의해 부착된 스페이서 유닛이고,

[0513] y 는 0, 1, 또는 2이다.

[0514] 스트레처 유닛

[0515] 스트레처 유닛 ($-A-$)은 존재하는 경우, 항체 유닛을 아미노산 유닛 ($-W-$)에 연결시킬 수 있다. 이와 관련하여, 항체 (Ab)는 스트레처 유닛의 친전자성 관능기와 결합을 형성할 수 있는 유리 시스테인 티올기를 갖는다. 화학식 1 접합체에서 예시적인 스트레처 유닛은 화학식 2 및 3에 도시하였으며, 여기서 $Ab-$, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w 및 y 는 상기에서 정의된 바와 같고, R^{17} 은 $(CH_2)_r$, $-C_3-C_8$ 카르보시클릴, $-O-(CH_2)_r$, 아릴렌, $(CH_2)_r$ -아릴렌-, -아릴렌- $(CH_2)_r$ - $(CH_2)_r$ - $(C_3-C_8$ 카르보시클릴), $-(C_3-C_8$ 카르보시클릴)- $(CH_2)_r$, $-C_3-C_8$ 헤테로시클릴, $(CH_2)_r$ - $(C_3-C_8$ 헤테로시클릴), $-(C_3-C_8$ 헤테로시클릴)- $(CH_2)_r$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ - $(CH_2)_r$, $-(CH_2CH_2O)_r$ - $(CH_2)_r$, $-(CH_2CH_2O)_r$ - CH_2- , $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ - $(CH_2)_r$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ - CH_2- , $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ - $(CH_2)_r$ -로부터 선택되는 2가 라디칼이고; 여기서 R^b 는 H , C_1-C_6 알킬, 페닐, 또는 벤질이고; r 은 독립적으로 1-10 범위의 정수이다.

[0516] 아릴렌은 방향족 고리계로부터 2개의 수소 원자를 제거함으로써 유도된 6-20개 탄소 원자의 2가 방향족 탄화수소 라디칼이 포함한다. 전형적 아릴렌기에는 벤젠, 치환된 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 비페닐 등으로부터 유래된 라디칼이 포함되고, 이로 제한되지 않는다.

[0517] 헤테로시클릴기는 하나 이상의 고리 원자가 헤테로원자, 예를 들어 질소, 산소, 및 황인 고리계를 포함한다. 헤테로사이클 라디칼은 탄소 원자 1 내지 20개 및 N , O , P , 및 S 로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개를 포함한다. 헤테로사이클은 3 내지 7원의 모노사이클 (탄소 원자 2 내지 6개 및 N , O , P , 및 S 로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개)일 수 있거나, 또는 7 내지 10원의 비사이클 (탄소 원자 4 내지 9개 및 N , O , P , 및 S 로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개), 예를 들어 비사이클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템일 수 있다. 헤테로사이클은 문헌 [Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), 특히 제1장, 제3장, 제4장, 제6장, 제7장, 및 제9장]; ["The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), 특히 제13권, 제14권, 제16권, 제19권, 및 제28권] 및 [J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566]에 기재되어 있다.

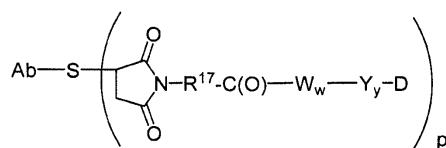
[0518] 헤테로사이클의 예는 피리딜, 디히드로피리딜, 테트라히드로피리딜 (피페리딜), 티아졸릴, 테트라히드로티오페닐, 황 산화 테트라히드로티오페닐, 피리미디닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 테트라졸릴, 벤조푸라닐, 티아나프탈레닐, 인돌릴, 인돌레닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 2-피롤리도닐, 피롤리닐, 테트라히드로푸라닐, 비스-테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 비스-테트라히드로피라닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 데카히드로퀴놀리닐, 옥타히드로이소퀴놀리닐, 아조시닐, 트리아지닐, 6H-1,2,5-티아디아지닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐, 티에닐, 티안트레닐, 피라닐, 이소벤조푸라닐, 크로메닐, 크산테닐, 페녹사티닐, 2H-피롤릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 1H-인다졸릴, 푸리닐, 4H-퀴놀리지닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 시놀리닐, 프테리디닐, 4Ah-카르바졸릴, 카르바졸릴, β -카르볼리닐, 페난트리디닐, 아크리디닐, 피리미디닐, 페난트롤리닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 푸라자닐, 페녹사지닐, 이소크로마닐, 크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피페라지닐, 인돌리닐, 이소인돌리

닐, 퀴누클리디닐, 모르폴리닐, 옥사졸리디닐, 벤조트리아졸릴, 벤즈이속사졸릴, 옥신돌릴, 벤족사졸리닐, 및 이사티노일을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

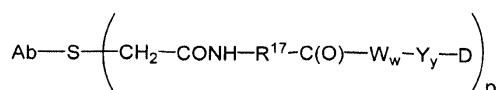
[0519] 카르보시클릴기는 모노사이클로서 탄소 원자 3 내지 7개 또는 비사이클로서 탄소 원자 7 내지 12개를 갖는 포화 또는 불포화 고리를 포함한다. 모노시클릭 카르보사이클은 고리 원자 3 내지 6개, 보다 통상적으로는 고리 원자 5 또는 6개를 갖는다. 비시클릭 카르보사이클은 예를 들어 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 고리 원자 7 내지 12개, 비시클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 고리 원자 9 또는 10개를 갖는다. 모노시클릭 카르보사이클의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 1-시클로펜트-1-에닐, 1-시클로펜트-2-에닐, 1-시클로펜트-3-에닐, 시클로헥실, 1-시클로헥스-1-에닐, 1-시클로헥스-2-에닐, 1-시클로헥스-3-에닐, 시클로헵틸, 및 시클로옥틸을 포함한다.

[0520] 명확하게 도시되지 않은 경우에도 조작된 시스테인 잔기의 수에 따라 1 내지 4개의 약물 모이어티가 항체 ($p = 1-4$)에 연결됨을, 화학식 1 ADC, 예를 들어 2-6의 모든 예시적인 실시양태로부터 이해하여야 한다.

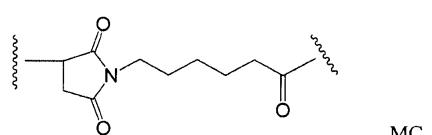
화학식 2



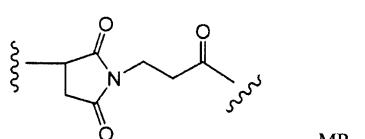
화학식 3



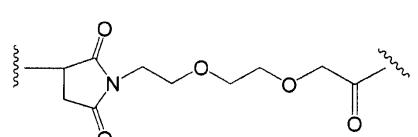
[0523] 화학식 2의 예시적인 스트레처 유닛은 $R^{17}\text{O}[-(\text{CH}_2)_5-]$ 인 말레이이미도-카프로일 (MC)로부터 유도된다:



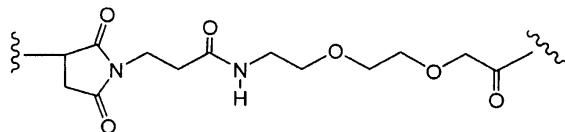
[0525] 화학식 2의 예시적인 스트레처 유닛은 $R^{17}\text{O}[-(\text{CH}_2)_2-]$ 인 말레이이미도-프로파노일 (MP)로부터 유도된다:



[0527] 화학식 2의 예시적인 다른 스트레처 유닛은 $R^{17}\text{O}[-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-]$ 이고 r 이 2인 화학식 2의 유닛이다:



[0529] 화학식 2의 예시적인 다른 스트레처 유닛은 $R^{17}\text{O}[-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-]$ 이고 R^b 가 H이고 각각의 r 이 2인 화학식 2의 유닛이다:

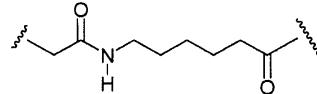


[0530]

MPEG

[0531]

화학식 3의 예시적인 스트레처 유닛은 R^{17} 이 $-(CH_2)_5-$ 인 화학식 3의 유닛이다:

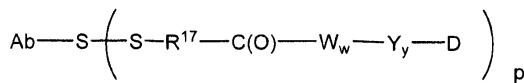


[0532]

[0533]

다른 실시양태에서, 스트레처 유닛은 항체의 조작된 시스테인 황 원자와 스트레처 유닛의 황 원자 간의 디솔피드 결합을 통해 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체에 연결된다. 이 실시양태의 대표적인 스트레처 유닛은 하기 화학식 4에 도시하였으며, 여기서 R^{17} , $Ab-$, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w 및 y 는 상기 정의된 바와 같다:

화학식 4



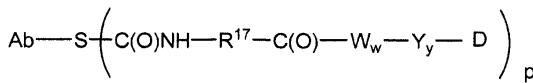
[0534]

[0535]

또다른 실시양태에서, 스트레처의 반응기는 항체의 유리 시스테인 티올과 결합을 형성할 수 있는 티올-반응성 관능기를 함유한다. 티올-반응성 관능기의 예에는 말레이미드, α -할로아세틸, 활성화된 에스테르, 예를 들어 숙신이미드 에스테르, 4-나트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 무수 물, 산 클로라이드, 술포닐 클로라이드, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트가 포함되고, 이로 제한되지 않는다. 이 실시양태의 대표적인 스트레처 유닛은 하기 화학식 5a 및 5b에 도시하였으며, 여기서 $-R^{17}-$, $Ab-$, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w 및 y 는 상기 정의된 바와 같다:

[0536]

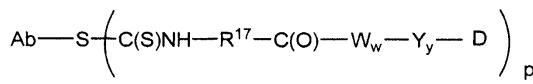
<화학식 5a>



[0537]

[0538]

<화학식 5b>



[0539]

[0540]

또다른 실시양태에서, 링커는 1개 초파의 약물 모이어티를 분자화 다기능성 링커 모이어티를 통해 항체에 공유 결합에 의해 부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 (문헌 [Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]; [King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990]). 수지상 링커는 ADC의 효능과 관계가 있는 약물 대 항체의 몰비, 즉 로드를 증가시킬 수 있다. 따라서, 시스테인 조작된 항체가 단지 1개의 반응성 시스테인 티올기를 보유하고 있는 경우에는, 다수의 약물 모이어티를 수지상 링커를 통해 부착시킬 수 있다.

[0541]

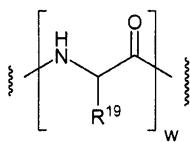
아미노산 유닛

[0542]

링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 아미노산 유닛 ($-W_w-$)은 존재하는 경우에 본 발명의 시스테인 조작된 항체-약물 접합체 (ADC)의 약물 모이어티 (D)에 항체 (Ab)를 연결시킨다.

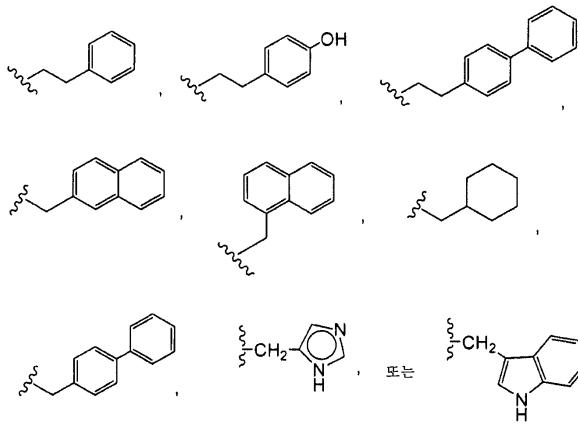
[0543]

$-W_w-$ 는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 펜타펩티드, 헥사펩티드, 헵타펩티드, 옥타펩티드, 노나펩티드, 데카펩티드, 운데카펩티드 또는 도데카펩티드 유닛이다. 아미노산 유닛을 포함하는 아미노산 잔기에는 자연 발생 아미노산, 및 또한 소수의 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린이 포함된다. 각각의 $-W-$ 유닛은 독립적으로 하기 꺽쇠 팔호 내에 표시된 화학식을 갖고, w 는 0 내지 12의 정수이다.



[0544]

상기 식에서, R^{19} 는 수소, 메틸, 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸, 벤질, p-히드록시벤질, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-페리딜메틸-, 3-페리딜메틸-, 4-페리딜메틸-, 페닐, 시클로헥실,



이다.

[0546]

R^{19} 가 수소 이외의 다른 기인 경우에, R^{19} 가 부착되는 탄소 원자는 키랄이다. R^{19} 가 부착되는 각각의 탄소 원자는 독립적으로 (S) 또는 (R) 배위, 또는 라세미 혼합물로 존재한다. 따라서, 아미노산 유닛은 거울상 이성질체적으로 순수하거나, 라세미체, 또는 부분 입체 이성질체일 수 있다.

[0547]

예시적인 $-\text{W}_w-$ 아미노산 유닛에는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드가 포함된다. 예시적인 디펩티드에는 발린-시트롤린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)이 포함된다. 예시적인 트리펩티드에는 글리신-발린-시트롤린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)이 포함된다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 천연 발생 아미노산 잔기 및 소수의 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트롤린을 포함한다.

[0548]

아미노산 유닛은 종양-관련 프로테아제를 포함하는 1종 이상의 효소에 의해 효소적으로 절단되어 약물 모이어티 (-D)를 유리시킬 수 있으며, 한 실시양태에서, 약물 모이어티 방출시에 생체내에서 양성자화되어 약물 (D)를 제공한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 종양-관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단을 위한 그의 선택성을 고려하여 설계되고 최적화될 수 있다.

[0549]

스페이서 유닛

[0550]

존재하는 경우 ($y = 1$ 또는 2) 스페이서 유닛 ($-\text{Y}_y-$)은 아미노산 유닛이 존재할 때 ($w = 1-12$) 아미노산 유닛 ($-\text{W}_w-$)을 약물 모이어티 (D)에 연결시킨다. 별법으로, 스페이서 유닛은 아미노산 유닛이 존재하지 않을 때 스트레처 유닛을 약물 모이어티에 연결시킨다. 아미노산 유닛과 스트레처 유닛이 모두 존재하지 않을 때 ($w, y = 0$), 스페이서 유닛도 약물 모이어티를 항체 유닛에 연결시킨다. 스페이서 유닛은 자가 희생적 (self-immolative) 및 비-자가 희생적의 두 종류가 존재한다. 비-자가 희생적 스페이서 유닛은 항체-약물 접합체 또는 약물 모이어티-링커로부터 아미노산 유닛의 절단, 특히 효소적 절단 후에 일부 또는 모든 스페이서 유닛이 약물 모이어티에 결합된 상태로 유지되는 유닛이다. 글리신-글리신 스페이서 유닛 또는 글리신 스페이서 유닛을 포함하는 ADC가 종양 세포 관련 프로테아제, 암 세포 관련 프로테아제 또는 림프구 관련 프로테아제를 통한 효소적 절단을 거칠 경우, 글리신-글리신-약물 모이어티 또는 글리신-약물 모이어티는 $\text{Ab}-\text{A}_a-\text{W}_w$ -로부터 절단된다. 한 실시양태에서, 독립적인 가수분해 반응은 표적 세포 내에서 발생하고, 글리신-약물 모이어티 결합을 절단하여 약물을 방출시킨다.

[0551]

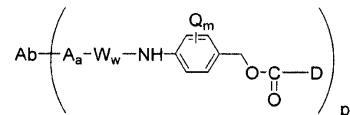
다른 실시양태에서, $-\text{Y}_y-$ 는 그의 페닐렌 부분이 Q_m 으로 치환된 p-아미노벤질카르바모일 (PAB) 유닛이고, 여기서

Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이다.

[0552] 비-자가 희생적 스페이서 유닛 ($-Y-$)의 예시적인 실시양태는 $-Gly-Gly-$; $-Gly-$; $-Ala-Phe-$; $-Val-Cit-$ 이다.

[0553] 한 실시양태에서, 스페이서 유닛이 존재하지 않는 ($y=0$) 약물 모이어티-링커 또는 ADC 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물이 제공된다.

[0554] 별법으로, 자가 희생적 스페이서 유닛을 포함하는 ADC는 -D를 방출할 수 있다. 한 실시양태에서, $-Y-$ 는 PAB기의 아미노 질소 원자를 통해 $-W_w-$ 에 연결되고 카르보네이트, 카르바메이트 또는 에테르기를 통해 -D에 직접 연결된 PAB기이고, 여기서 ADC는 다음과 같은 예시적인 구조를 갖는다:

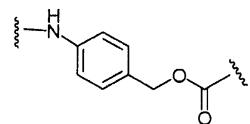


[0555] 여기서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이고, p는 1 내지 4이다.

[0556] 자가 희생적 스페이서의 다른 예는 PAB기에 전기적으로 유사한 방향족 화합물, 예를 들어 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (문헌 [Hay et al (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237]), 헤테로시클릭 PAB 유사체 (US 2005/0256030), 베타-글루쿠로나이드 (WO 2007/011968), 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세탈을 더 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 아미드 결합 가수분해시에 고리화를 겪는 스페이서, 예를 들어 치환 및 비치환된 4-아미노부티르산 아미드 (문헌 [Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223]); 적절하게 치환된 비시클로[2.2.1] 및 비시클로[2.2.2] 고리계 (문헌 [Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815]); 및 2-아미노페닐프로피온산 아미드 (문헌 [Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867])가 사용될 수 있다. 글리신에서 치환된 아민-함유 약물의 제거 (문헌 [Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447])도 ADC에 유용한 자가 희생적 스페이서의 예이다.

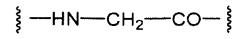
[0557] 예시적인 스페이서 유닛 ($-Y_y-$)은 하기 화학식 10-12에 제시한다.

[0559] <화학식 10>



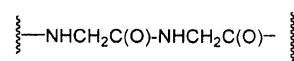
[0560]

[0561] <화학식 11>



[0562]

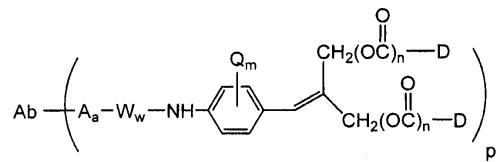
[0563] <화학식 12>



[0564] 수지상 링커

[0565] 다른 실시양태에서, 링커 L은 1개 초과의 약물 모이어티를 분지화 다기능성 링커 모이어티를 통해 항체에 공유 결합에 의해 부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 (문헌 [Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]). 수지상 링커는 ADC의 효능과 관계가 있는 약물 대 항체의 몰비, 즉 로드를 증가시킬 수 있다. 따라서, 시스테인 조작된 항체가 단지 1개의 반응성 시스테인 티올기를 보유하고 있는 경우에는, 다수의 약물 모이어티를 수지상 링커를 통해 부착시킬 수 있다. 분지형 수지상 링커의 예시적인 실시양태는 2,6-비스(히드록시메틸)-p-크레졸 및 2,4,6-트리스(히드록시메틸)-페놀 텐드리며 유닛을 포함한다 (WO 2004/01993; 문헌 [Szalai et al (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689]; [Shamis et al (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731]; [Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499]).

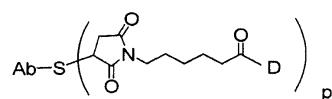
[0567] 한 실시양태에서, 스페이서 유닛은 2-(4-아미노벤질리덴)프로판-1,3-디올 텐드리머 유닛 (WO 2004/043493; 문헌 [de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494])을 포함하는, 아래에 제시된 구조의 분자체 비스(히드록시메틸)스티렌 (BHMS)이고, 이것은 다수의 약물을 도입하고 방출시키는데 사용될 수 있다.



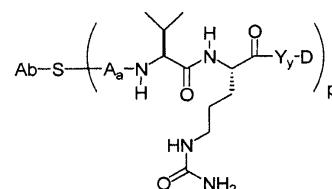
[0568] 여기서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), $- 할로겐$, $-니트로$ 또는 $-시아노$ 이고; m은 0-4의 정수이고, n은 0 또는 1이고; p는 1 내지 4이다.

[0570] 화학식 1의 항체-약물 접합체 화합물의 예시적인 실시양태는 화학식 13a (MC), 13b (val-cit), 13c (MC-val-cit), 및 13d (MC-val-cit-PAB)의 화합물을 포함한다:

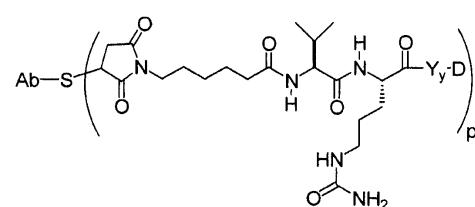
[0571] <화학식 13a>



[0572] <화학식 13b>

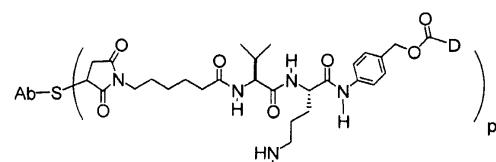


[0573] <화학식 13c>



[0574]

[0575] <화학식 13d>

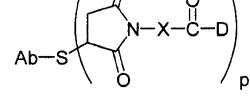


[0576]

[0577] 화학식 1a의 항체-약물 접합체 화합물의 다른 예시적인 실시양태는 화학식 14a-e의 화합물을 포함한다:

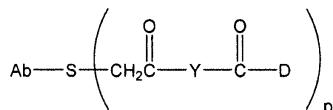
[0578]

<화학식 14a>

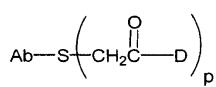


[0581]

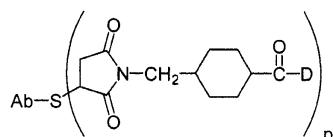
[0582] <화학식 14b>



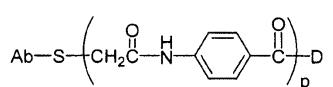
[0583] <화학식 14b>



[0584] <화학식 14c>

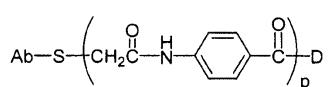


[0585] <화학식 14d>

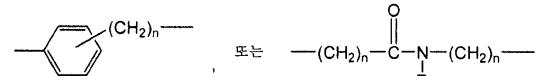
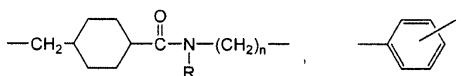
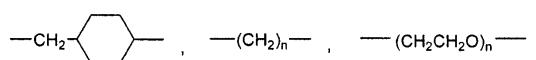


[0587]

[0588] <화학식 14e>



[0589]

[0590] 여기서, X는 $\text{---C}_6\text{H}_4\text{---}$ 또는 $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---C}(=\text{O})\text{---N}(\text{CH}_2)_n\text{---}$ 이고,[0591] Y는 $\text{---N}(\text{CH}_2)_n\text{---C}_6\text{H}_4\text{---}$ 또는 $\text{---N}(\text{CH}_2)_n\text{---}$ 이고,[0592] R은 독립적으로 H 또는 $\text{C}_1\text{---C}_6$ 알킬이고; n은 1 내지 12이다.

[0593] 또 다른 실시양태에서, 링커는 항체 상에 존재하는 친전자성 기에 반응성인 친핵성 기를 갖는 반응성 관능기를 갖는다. 항체 상의 유용한 친전자성 기는 알데하이드 및 케톤 카르보닐기를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 링커의 친핵성 기의 혜택으로 원자는 항체 상의 친전자성 기와 반응하여 항체 유닛에 공유 결합을 형성할 수 있다. 링커 상의 유용한 친핵성 기는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 항체 상의 친전자성 기는 링커에 대한 편리한 부착 부위를 제시한다.

[0594] 전형적으로, 웨이드-타입 링커는 2개 이상의 아미노산 및/또는 웨이드 단편 사이에 웨이드 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 상기 웨이드 결합은 예를 들어 웨이드 화학 분야에 공지된 액상 합성 방법 (문헌 [E. Schroeder and K. Luebke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press])에 따라 제조할 수 있다. 링커 중간체는 스페이서, 스트레처 및 아미노산 유닛을 포함하여 임의의 조합물 또는 반응 서열과 회합될 수 있다. 스페이서, 스트레처 및 아미노산 유닛은 특성상 친전자성, 친핵성, 또는 유리 라디칼인 반응성 관능기를 이용할 수 있다. 반응성 관능기는 카르복실, 히드록실, 파라-니트로페닐카르보네이트, 이소티오시아네이트, 및 이탈기, 예를 들어 $\text{O}-\text{메실}$, $\text{O}-\text{토실}$, ---Cl , ---Br , ---I ; 또는 말레이미드를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.[0595] 또 다른 실시양태에서, 링커는 용해도 또는 반응성을 조정하는 기로 치환될 수 있다. 예를 들어, 하전된 치환기, 예를 들어 술포네이트 (---SO_3^-) 또는 암모늄은 시약의 수용성을 증가시키고, 링커 시약과 항체 또는 약물

모이어티의 커플링 반응을 용이하게 하거나, 또는 ADC 제조에 사용되는 합성 경로에 따라 Ab-L (항체-링커 중간체)과 D, 또는 D-L (약물-링커 중간체)과 Ab의 커플링 반응을 용이하게 할 수 있다.

[0596] 예시적 약물 모이어티

[0597] 메이탄신 및 메이탄시노이드

몇몇 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다. 메이탄시노이드는 튜불린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 3,896,111). 뒤이어, 특정 미생물도 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 밝혀졌다 (미국 특허 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0599] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의해 제조하기 위해 비교적 이용가능하고, (ii) 비-디슬피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체 약물 접합체에서 흥미있는 약물 모이어티이다.

[0600] 메이탄시노이드 약물 모이어티로서 사용하기 적합한 메이탄신 화합물은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 방법에 따라 천연 공급원으로부터 단리되거나 유전자 조작 기술을 사용하여 생산할 수 있다 (문헌 [Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973] 참조). 또한, 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체는 공지된 방법에 의해 합성 방식으로 제조될 수 있다.

[0601] 메이탄시노이드 약물 모이어티의 예시적 실시양태는 본원에 개시된 바와 같은 DM1; DM3; 및 DM4를 포함한다.

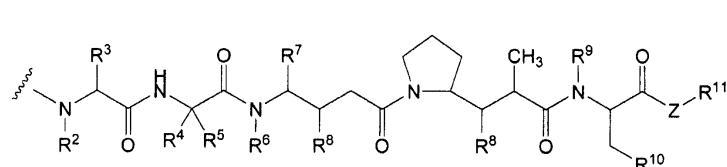
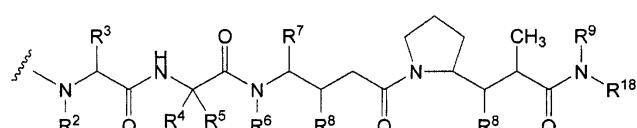
[0602] 아우리스타틴 및 돌라스타틴

몇몇 실시양태에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 팹티드 유사체 및 유도체, 즉 아우리스타틴에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국 특허 5635483; 5780588). 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584]), 항암 (미국 특허 5663149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 팹티드성 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0604] 예시적인 아우리스타틴 실시태양은 그 개시내용의 전문을 명백하게 본원에 참고로 포함시킨 문헌 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004]에 개시된 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 D_E 및 D_F를 포함한다.

[0605] 팹티드 약물 모이어티는 아래 화학식 D_E 및 D_F로부터 선택될 수 있다.

[0606] <화학식 D_E>



[0609]

- [0610] 상기 식에서, D_E 및 D_F 의 파선은 독립적으로 각각의 위치에서 항체 또는 항체-링커 성분에 대한 공유 결합에 의해 부착 부위를 나타내고;
- [0611] R^2 는 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;
- [0612] R^3 은 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카르보사이클), C_3-C_8 헤테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤테로사이클)로부터 선택되고;
- [0613] R^4 는 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카르보사이클), C_3-C_8 헤�테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤�테로사이클)로부터 선택되고;
- [0614] R^5 는 H 및 메틸로부터 선택되거나;
- [0615] 또는 R^4 및 R^5 는 함께 화학식 $-(CR^aR^b)_n$ -의 카르보시클릭 고리를 형성하고, 여기서 R^a 및 R^b 는 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬 및 C_3-C_8 카르보사이클로부터 선택되고, n은 2, 3, 4, 5 및 6으로부터 선택되고;
- [0616] R^6 은 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;
- [0617] R^7 은 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카르보사이클), C_3-C_8 헤�테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤�테로사이클)로부터 선택되고;
- [0618] 각각의 R^8 은 독립적으로 H, OH, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클 및 O-(C_1-C_8 알킬)로부터 선택되고;
- [0619] R^9 는 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;
- [0620] R^{10} 은 아릴 또는 C_3-C_8 헤�테로사이클로부터 선택되고;
- [0621] Z는 O, S, NH, 또는 NR¹²이고, 여기서 R¹²는 C_1-C_8 알킬이고;
- [0622] R^{11} 은 H, C_1-C_{20} 알킬, 아릴, C_3-C_8 헤�테로사이클, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ 로부터 선택되고;
- [0623] m은 1-1000의 정수이고;
- [0624] R¹³은 C_2-C_8 알킬이고;
- [0625] R¹⁴는 H 또는 C_1-C_8 알킬이고;
- [0626] 각각의 R¹⁵은 독립적으로 H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, 또는 $-(CH_2)_nSO_3-C_1-C_8$ 알킬이고;
- [0627] 각각의 R¹⁶은 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬, 또는 $-(CH_2)_n-COOH$ 이고;
- [0628] R¹⁸은 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -아릴, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 헤테로사이클), 및 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 카르보사이클)로부터 선택되고;
- [0629] n은 0 내지 6의 정수이다.
- [0630] 한 실시태양에서, R³, R⁴ 및 R⁷은 독립적으로 이소프로필 또는 sec-부틸이고, R⁵는 -H 또는 메틸이다. 예시적인 실시태양에서, R³ 및 R⁴는 각각 이소프로필이고, R⁵는 -H이고, R⁷은 sec-부틸이다.
- [0631] 또다른 실시태양에서, R² 및 R⁶은 각각 메틸이고, R⁹는 -H이다.

[0632] 또 다른 실시태양에서, 각각의 R⁸은 -OCH₃이다.

[0633] 예시적인 실시태양에서, R³ 및 R⁴은 각각 이소프로필이고, R² 및 R⁶은 각각 메틸이고, R⁵는 -H이고, R⁷은 sec-부틸이고, 각각의 R⁸은 -OCH₃이고, R⁹는 -H이다.

[0634] 한 실시태양에서, Z는 -O- 또는 -NH-이다.

[0635] 한 실시태양에서, R¹⁰은 아릴이다.

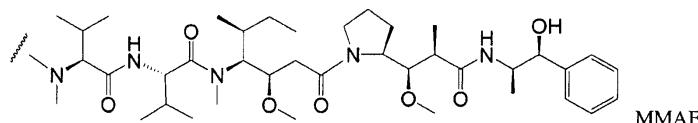
[0636] 예시적인 실시태양에서, R¹⁰은 -페닐이다.

[0637] 예시적인 실시태양에서, Z가 -O-일 때, R¹¹은 -H, 메틸 또는 t-부틸이다.

[0638] 한 실시태양에서, Z가 -NH일 때, R¹¹은 -CH(R¹⁵)₂이고, 여기서 R¹⁵는 -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂이고, R¹⁶은 -C₁-C₈ 알킬 또는 -(CH₂)_n-COOH이다.

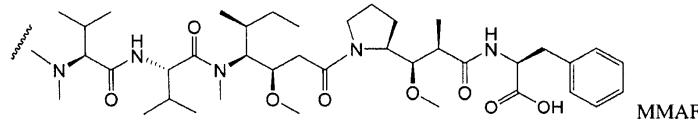
[0639] 다른 실시태양에서, Z가 -NH일 때, R¹¹은 -CH(R¹⁵)₂이고, 여기서 R¹⁵는 -(CH₂)_n-SO₃H이다.

[0640] 화학식 D_E의 예시적인 아우리스타틴 실시태양은 MMAE이고, 파선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 결합에 의해 부착을 나타낸다:



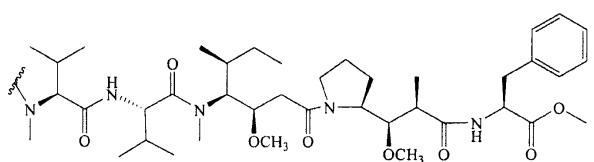
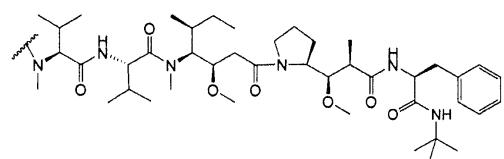
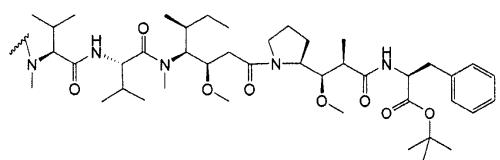
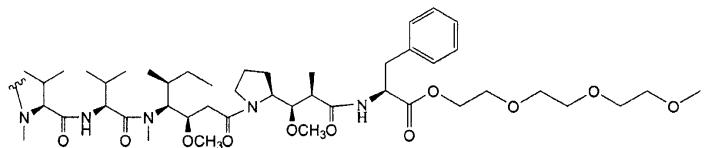
[0641]

[0642] 화학식 D_F의 예시적인 아우리스타틴 실시태양은 MMAF이고, 파선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 결합에 의해 부착을 나타낸다 (US 2005/0238649 및 문헌 [Doronina et al (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124] 참조):

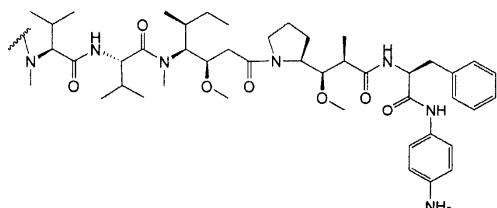
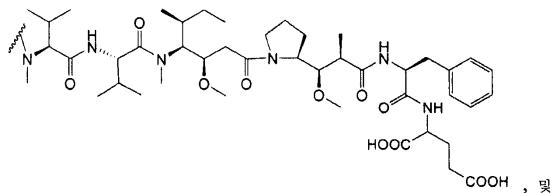
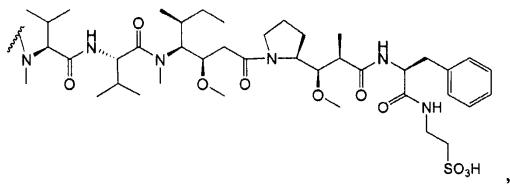
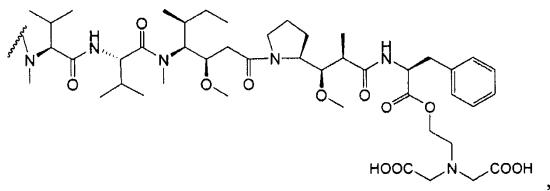
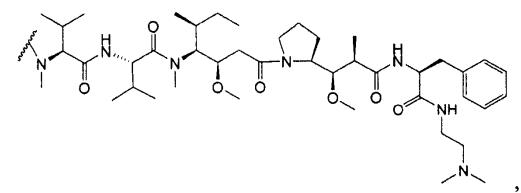


[0643]

[0644] 다른 약물 모이어티는 하기 MMAF 유도체를 포함하고, 파선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 결합에 의해 부착을 나타낸다:



[0645]



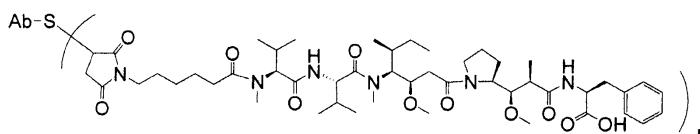
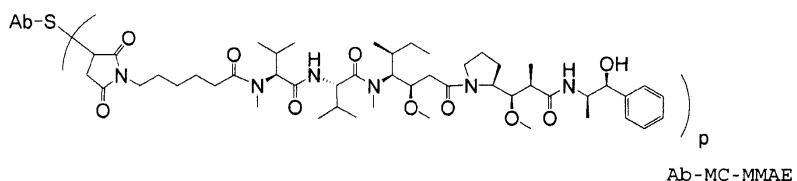
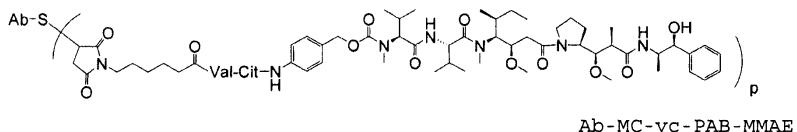
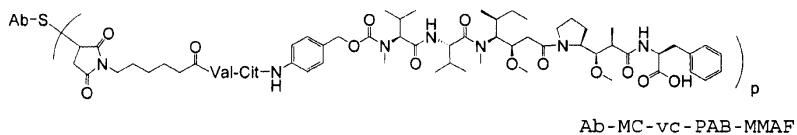
[0646]

[0647]

한 측면에서, 상기 제시한 바와 같은 트리에틸렌 글리콜 에스테르 (TEG)를 포함하지만 이로 한정되지 않는 친수 성기가 R^{11} 에서 약물 모이어티에 부착될 수 있다. 임의의 특정 이론에 매이지 않지만, 친수성기는 약물 모이어티의 내재화 및 응집 방지를 돋는다.

[0648]

아우리스타틴/돌라스타틴 또는 그의 유도체를 포함하는 화학식 1의 ADC의 예시적인 실시태양은 본원에 참고로 명백하게 포함되는 US 2005-0238649 A1 및 문헌 [Doronina et al (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124]에 기재되어 있다. MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 화학식 1의 ADC의 예시적인 실시태양은 하기 구조 및 약어를 갖는다 (여기서, "Ab"는 항체이고; p는 1 내지 약 8이고, "Val-Cit"는 발린-시트룰린 디펩티드이고; "S"는 황 원자이다):



[0649]

[0650]

MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 화학식 1의 ADC의 예시적인 실시태양은 Ab-MC-PAB-MMAF 및 Ab-PAB-MMAF를 더 포함한다. 흥미롭게도, 단백질 분해에 의해 절단가능하지 않은 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체는 단백질 분해에 의해 절단가능한 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체에 상응하는 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Doronina et al (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124]을 참조한다. 이 경우에, 약물 방출은 세포 내에서 항체 분해에 의해 이루어지는 것으로 생각된다 (상기 문헌 참조).

[0651]

전형적으로, 펩티드-기반 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 널리 공지된 액체상 합성 방법 (문헌 [E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조될 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 US 2005-0238649 A1; 미국 특허 5635483; 미국 특허 5780588; 문헌 [Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465]; [Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277]; [Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725]; [Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863] 및 [Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784])의 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0652]

특히, 화학식 D_F의 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티, 예를 들어 MMAF 및 그의 유도체는 US 2005-0238649 A1 및 문헌 [Doronina et al (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. D_E의 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티, 예를 들어 MMAE 및 그의 유도체는 문헌 [Doronina et al (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 약물-링커 모이어티 MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, 및 MC-vc-PAB-MMAE는 예를 들어 문헌 [Doronina et al (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784], 및 미국 특허 출원 공개 US 2005/0238649 A1에 기재된 바와 같은 통상적인 방법으로 편리하게 합성한 후, 관심 항체에 접합될 수 있다.

[0653]

약물 로딩은 화학식 1의 분자에서 항체 당 약물 모이어티의 평균 수인 p 에 의해 제시된다. 약물 로딩은 항체 당 1 내지 20개의 약물 모이어티 (D)일 수 있다. 화학식 1의 ADC는 1 내지 20개의 약물 모이어티로 접합된 항체의 접합체를 포함한다. 접합 반응에 의한 ADC의 제조에서 항체 당 약물 모이어티의 평균 수는 통상적인 수단, 예를 들어 질량 분광분석, ELISA 분석, 및 HPLC에 의해 특성화될 수 있다. 또한, ADC의 정량적 분포는 p 의 측면에서 결정될 수도 있다. 일부 경우에, p 가 다른 약물 로딩을 사용한 ADC로부터의 특정 값인 균질한 ADC의 분리, 정제 및 특성화는 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성할 수 있다.

[0655]

일부 항체-약물 접합체에서, p는 항체 상의 부착 부위의 수에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 상기 예시적인 실시태양에서와 같이 부착이 시스테인 티올인 경우, 항체는 단지 한개 또는 수개의 시스테인 티올기를 가질 수 있거나, 또는 링커가 부착될 수 있는, 충분히 반응성인 티올기를 단지 한개 또는 수개 보유할 수 있다. 특정 실시태양에서, 보다 큰 약물 로딩, 예를 들어 $p>5$ 는 특정 항체-약물 접합체의 응집, 불용성, 독성, 또는 세포 투과성 상실을 야기할 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 ADC에 대한 약물 로딩은 1 내지 약 8; 약 2 내지 약 6, 약 3 내지 약 5, 약 3 내지 약 4, 약 3.1 내지 약 3.9, 약 3.2 내지 약 3.8, 약 3.2 내지 약 3.7, 약 3.2 내지 약 3.6, 약 3.3 내지 약 3.8 또는 약 3.3 내지 약 3.7이다. 실제로, 특정 ADC에서, 항체 당 약물 모이어티의 최적 비는 8 미만일 수 있고, 약 2 내지 약 5일 수 있음이 밝혀졌다. US 2005-0238649 A1을 참조한다 (상기 문헌은 본원에 그 전문이 참고로 포함됨).

[0656]

특정 실시태양에서, 이론적 최대치 미만의 약물 모이어티가 접합 반응 동안 항체에 접합된다. 항체는 예를 들어 아래에서 논의되는 바와 같이 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하지 않는 리신 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 항체는 약물 모이어티에 연결될 수 있는 많은 유리 및 반응성 시스테인 티올기를 함유하지 않고, 실제로 항체 내의 대부분의 시스테인 티올 잔기가 디슬피드 브릿지로 존재한다. 특정 실시태양에서, 항체는 부분 또는 완전한 환원 조건하에서 환원체, 예를 들어 디티오프레이톨 (DTT) 또는 트리카르보닐에틸포스핀 (TCEP)으로 환원시켜 반응성 시스테인 티올기를 생성시킬 수 있다. 특정 실시태양에서, 항체는 변성 조건에 적용되어 반응성 친핵성 기, 예를 들어 리신 또는 시스테인을 드러내게 된다.

[0657]

ADC의 로딩 (약물/항체 비)은 여러가지 방식, 예를 들어 (i) 항체에 비해 몰 과량의 약물-링커 중간체 또는 링커 시약의 제한, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도의 제한, 및 (iii) 시스테인 티올 변형에 대한 부분 또는 제한 환원 조건, (iv) 시스테인 잔기의 수와 위치가 링커-약물 부착의 수 및/또는 위치의 조절을 위해 변형되도록 하는, 재조합 기술에 의한 항체의 아미노산 서열의 조작 (예를 들어, 본원 및 WO 2006/034488 (본원에서 그 전문이 참고로 포함됨)에 개시한 바와 같이 제조된 thioMab 또는 thioFab)에 의해 조절될 수 있다.

[0658]

1개 초과의 친핵성 기가 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과, 이어서 약물 모이어티 시약과 반응할 경우, 생성되는 산물은 항체에 하나 이상의 약물 모이어티가 부착된 분포를 갖는 ADC 혼합물의 혼합물임을 이해하여야 한다. 항체 당 약물의 평균 수는 항체에 특이적이고 약물에 특이적인 이중 ELISA 항체 분석에 의해 혼합물로부터 계산될 수 있다. 개개의 ADC 분자는 질량 분광분석에 의해 혼합물에서 확인되고, 예를 들어 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 HPLC로 분리될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Hamblett, K. J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004]; [Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004] 참조). 특정 실시태양에서, 단일 로딩 값을 갖는 균질 ADC는 전기영동 또는 크로마토그래피에 의해 접합 혼합물로부터 단리될 수 있다.

[0659]

면역접합체를 제조하는 특정 방법

[0660]

화학식 1의 ADC는 다음을 포함하는, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 여러 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 항체의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 D-L을 형성시킨 다음, 이를 항체의 친핵성 기와 반응시키는 방법. 두번째 경로를 통해 화학식 1의 ADC를 제조하는 예시적인 방법은 본원에 참고로 명백하게 포함되는 US 20050238649 A1에 기재되어 있다.

[0661]

항체 상의 친핵성 기는 (i) N-말단 아민기; (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 리신; (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인; 및 (iv) 당 히드록실 또는 아미노기 (여기서, 항체는 글리코실화된다)를 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 사슬간 디슬피드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 항체가 완전히 또는 부분적으로 환원되도록, 항체를 환원제, 예를 들어 DTT (디티오프레이톨) 또는 트리카르보닐에틸포스핀 (TCEP)로 처리함으로써 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 브릿지는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 별법으로, 리신 잔기의 변형을 통해, 예를 들어 아

민을 티올로 전환시키는, 리신 잔기와 2-이미노티올란 (트라우트 (Traut) 시약)의 반응에 의해 술피드릴기를 항체 내로 도입할 수 있다. 반응성 티올기는 1, 2, 3, 4개, 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 변이체 항체를 제조함으로써) 항체 내로 도입될 수 있다.

[0662] 본 발명의 항체-약물 접합체는 또한 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 기와 항체 상의 친전자기, 예를 들어 알데히드 또는 케톤 카르보닐기 사이의 반응에 의해 생성할 수 있다. 링커 시약 상의 유용한 친핵성 기는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드를 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 한 실시태양에서, 항체를 변형시켜 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입한다. 다른 실시태양에서, 글리코실화된 항체의 당을, 예를 들어 페요오데이트 산화 시약으로 산화시켜 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤기를 형성할 수 있다. 생성되는 이민 쉬프 (Schiff) 염기 기는 안정한 결합을 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어 수소화붕소 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 결합을 형성할 수 있다. 한 실시태양에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-페요오데이트와 반응시키면, 약물 상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 항체 내에 생성될 수 있다 (헤르만손 (Hermanson), 바이오컨쥬게이트 테크닉 (Bioconjugate Techniques)). 다른 실시태양에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 항체를 나트륨 메타-페요오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 (문헌 [Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; US 5362852). 이러한 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

[0663] 약물 모이어티 상의 친핵성 기는, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBT 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성하는 반응이 일어날 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드기를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0664] 본 발명의 화합물은 하기하는 시판 가교결합체 시약 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크. (Pierce Biotechnology, Inc.), 미국 일리노이주 록포드 소재) (문헌 [pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog] 참조)을 사용하여 제조된 ADC를 충분히 고려하지만 이로 한정되지 않는다: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트).

[0665] 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티오)프로파오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디프이미레이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체가 또한 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소를 문헌 [Vitetta et al., Science. 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 퀄레이팅제이다. WO 94/11026을 참조한다.

[0666] 별법으로, 항체와 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 웨პ티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 재조합 DNA 분자는 접합체의 목적하는 특성을 파괴하지 않는 링커 웨პ티드를 코딩하는 영역에 의해 분리되거나 또는 서로 인접해 있는 접합체의 항체 및 세포독성 부분을 코딩하는 영역을 포함할 수 있다.

[0667] 또 다른 실시태양에서, 항체를 종양 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (예를 들어, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 이러한 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 소실체를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

[0668] 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체의 제조

[0669] 본 발명의 설계, 선택 및 제조 방법에 의해 친전자성 관능기와 반응성인 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체를 얻

을 수 있다. 상기 방법을 통해, 지정 및 설계된 선택적인 부위에 약물 분자를 갖는 항체 접합체 화합물, 예를 들어 항체-약물 접합체 (ADC) 화합물을 추가로 얻을 수 있다. 항체 표면에서의 반응성 시스테인 잔기는 티올 반응기, 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통한 약물 모이어티의 특이적인 접합을 허용한다. Cys 잔기의 티올 관능기의 말레이미드기에 대한 친핵 반응성은 단백질 내의 임의의 다른 아미노산 관능기, 예를 들어 리신 잔기의 아미노기 또는 N-말단 아미노기에 비해 약 1000배 더 크다. 요오도아세틸 및 말레이미드 시약 내의 티올 특이적 관능기는 아민기와 반응할 수 있지만, 보다 높은 pH (>9.0) 및 보다 긴 반응 시간이 필요하다 (문헌 [Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London]). 단백질 내의 유리 티올의 양은 표준 엘만 (Ellman) 분석에 의해 추정할 수 있다. 이뮤노글로불린 M은 디슬피드-연결 펜타머의 예이고, 이뮤노글로불린 G는 함께 서브유닛을 연결하는 내부 디슬피드 브릿지를 갖는 단백질의 예이다. 이와 같은 단백질에서, 반응성 유리 티올을 생성시키기 위해 시약, 예를 들어 디티오토레이톨 (DTT) 또는 셀레놀을 사용한 환원 (문헌 [Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147-156])이 필요하다. 상기 방법은 항체 3차 구조 및 항원 결합 특이성을 상실시킬 수 있다.

[0670]

페셀렉터 (Pheselector) (반응성 티올의 선택을 위한 파지 ELISA) 분석을 통해 ELISA 파지 포맷으로 항체 내의 반응성 시스테인기를 검출하고, 이에 의해 시스테인 조작된 항체의 설계를 도울 수 있다 (WO 2006/034488). 시스테인 조작된 항체를 웰 표면에 코팅한 후, 파지 입자와 함께 인큐베이션하고, HRP 표지된 2차 항체를 부가하고, 흡광도를 검출한다. 파지 상에 디스플레이된 돌연변이체 단백질은 신속하고 강력한 고효율 방식으로 스크리닝될 수 있다. 시스테인 조작된 항체의 라이브러리를 제조하여, 항체 또는 다른 단백질의 무작위 단백질-파지 라이브러리로부터 유리 Cys 통합을 위한 적절하게 반응성인 부위를 확인하기 위한 것과 동일한 방법을 사용하여 결합에 대해 선택할 수 있다. 상기 기술은 파지 상에 디스플레이된 시스테인 돌연변이체 단백질을 또한 티올-반응성인 친화도 시약 또는 리포터기와 반응시키는 것을 포함한다.

[0671]

페셀렉터 분석은 항체 내의 반응성 티올기의 스크리닝을 허용한다. 이 방법에 의한 A121C 변이체의 확인은 예시적인 것이다. 전체 Fab 분자는 반응성 티올기를 갖는 보다 많은 ThioFab 변이체를 확인하기 위해 효과적으로 검색될 수 있다. 분획별 표면 접근성 (fractional surface accessibility) 파라미터를 사용하여 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기에 대한 용매의 접근성을 확인 및 정량하였다. 표면 접근성은 용매 분자, 예를 들어 물에 의해 접촉될 수 있는 표면적 (Å^2)으로서 표현될 수 있다. 물의 점유 공간은 1.4 Å^2 반경 구체와 비슷하다. 소프트웨어는 x-선 결정학으로 유도된 공자의 좌표를 사용하여 단백질의 각각의 아미노산의 표면 접근성을 계산하기 위한 알고리즘을 이용하는 결정학 프로그램의 CCP4 Suite로서 무료로 이용할 수 있거나 허가를 받아 사용할 수 있다 (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, 또는 인터넷 웹 사이트 www ccp4 ac uk/dist/html/INDEX html) (문헌 ["The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763]). 표면 접근성 계산을 수행하는 두개의 예시적인 소프트웨어 모듈은 문헌 [B. Lee and F. M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400]의 알고리즘을 기초로 한 "AREAIMOL" 및 "SURFACE"이다. AREAIMOL은 단백질의 용매 접근가능한 표면을 프로브 구 (용매 분자를 나타냄) 중심의 궤적으로서 정의하는데, 이것이 단백질의 판 데르 발스 (Van der Waals) 표면을 굴러다니기 때문이다. AREAIMOL은 (원자 반경과 프로브 반경의 합과 동일한, 원자 중심에서의 거리에서) 각 원자 주위의 연장된 구 상에 표면 지점을 생성하고 이웃하는 원자들과 회합된 동등한 구 내에 있는 것들을 제거하여 용매 접근가능한 표면적을 계산한다. AREAIMOL은 PDB 좌표 파일에서 원자의 용매 접근가능한 면적을 찾아내고, 상기 접근가능한 면적을 잔기, 사슬에 의해 전체 분자에 대해 총괄한다. 개개의 원자에 대하여 접근가능한 면적 (또는 면적 차이)은 슈도-PDB 아웃풋 (pseudo-PDB output) 파일에 기록될 수 있다. AREAIMOL은 각 원소에 대한 단일 반경을 추정하고, 오직 제한된 수의 상이한 원소들만을 인식한다.

[0672]

AREAIMOL 및 SURFACE는 절대적 접근성, 즉 평방 옹스트롬 (\AA)의 수를 보고한다. 분획별 표면 접근성은 폴리펩티드 내 아미노산과 연관된 표준 상태를 참조하여 계산된다. 참조 상태는 트리펩티드 Gly-X-Gly이며, 여기서 X는 목적하는 아미노산이고, 참조 상태는 '연장된' 형상, 즉, 베타-가닥으로 존재하는 것과 같아야 한다. 연장된 형상은 X의 접근성을 최대화한다. 접근가능한 면적의 계산치를 Gly-X-Gly 트리펩티드 참조 상태 내의 접근 가능한 면적으로 나누고 그 몫을 보고하는데, 이것이 분획별 접근성이다. 접근성(%)은 분획별 접근용이성 \times 100의 값이다. 표면 접근성 계산을 위한 또 다른 예시적 알고리즘은, 물 구체에 대한 아미노산 잔기의 분획별 접근용이성을 그 폴리펩티드의 X선 좌표를 기초로 하여 계산하는 프로그램 xsae의 SOLV 모듈을 기초로 한다 (문헌 [Broger, C, F. Hoffman-LaRoche, Basel]). 항체 내의 모든 아미노산에 대한 분획별 표면 접근성은 이용 가능한 결정 구조 정보 (문헌 [Eigenbrot et al (1993) J Mol Biol. 229:969-995])를 이용하여 계산할 수 있다.

[0673]

시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 쥐과동물 항체의 중쇄와 경쇄를

코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리하여 서열을 결정할 수 있다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 공급원으로 작용한다. DNA가 일단 단리되면, 이것을 발현벡터에 위치시킬 수 있고, 이후에는 이것을 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 항체 단백질을 달리 생성하지는 않는 다른 포유동물 숙주 세포, 예를 들어 골수종 세포 [US 5807715, US 2005/0048572, US2004/0229310] 등에 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성물을 얻을 수 있다.

[0674] 설계 및 선택 후에, 조작된, 고도로 반응성이고 쌍을 이루지 않은 Cys 잔기를 갖는 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 ThioFab는, (i) 박테리아, 예를 들어 이. 콜라이 시스템 (문헌 [Skerra et al (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262]; [Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188]) 또는 포유동물 세포 배양 시스템 (WO 01/00245), 예를 들어 차이니스 햄스터 난소 세포 (CHO)에서의 발현, 및 (ii) 통상의 단백질 정제 기술을 이용한 정제 (문헌 [Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988])를 통해 생성할 수 있다.

[0675] 조작된 Cys 티올기는 친전자성 링커 시약 및 약물-링커 중간체와 반응하여 시스테인 조작된 항체 약물 접합체 및 다른 표지된 시스테인 조작된 항체를 형성한다. 쌍을 이루어 사슬간 및 사슬내 디슬퍼드 결합을 형성하는 시스테인 조작된 항체의 Cys 잔기 (모 항체에 존재함)는 임의의 반응성 티올기를 갖지 않고 (환원제로 처리되지 않으면), 친전자성 링커 시약 또는 약물-링커 중간체와 반응하지 않는다. 새로이 조작된 Cys 잔기는 쌍을 이루지 않은 채로 유지되어 친전자성 링커 시약 또는 약물-링커 중간체, 예를 들어 약물-말레이미드와 반응, 즉 접합할 수 있다. 예시적인 약물-링커 중간체는 MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE, 및 MC-vc-PAB-MMAF를 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 조작된 Cys 잔기의 구조적 위치는 순차적 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다. 이 순차적 넘버링 시스템은 N-말단에서 출발하는 카바트 넘버링 시스템 (문헌 [Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD])과 상관관계가 있으며, a, b, c로 표시한 삽입이 카바트 넘버링 방식 (아래쪽 열)과 다르다. 카바트 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 이 내부로의 삽입에 상응하는 더 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 시스테인 조작된 중쇄 변이체 부위는 순차적인 넘버링 및 카바트 넘버링 방식에 의해 확인된다.

[0676] 한 실시태양에서, 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체는

[0677] (a) 모 항-STEAP-1 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 치환하고;

[0678] (b) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 시약과 반응시켜 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체의 티올 반응성을 결정하는 것

[0679] 을 포함하는 방법에 의해 제조된다.

[0680] 시스테인 조작된 항체는 모 항체보다 티올-반응성 시약에 대한 반응성이 더 클 수 있다.

[0681] 유리 시스테인 아미노산 잔기는 중쇄 또는 경쇄에, 또는 불변 또는 가변 도메인에 위치할 수 있다. 항체 단편, 예를 들어 Fab도 항체 단편의 아미노산을 치환하는 하나 이상의 시스테인 아미노산으로 조작되어 시스테인 조작된 항체 단편을 형성할 수 있다.

[0682] 본 발명의 다른 실시태양에서는

[0683] (a) 하나 이상의 시스테인 아미노산을 모 항-STEAP-1 항체 내에 도입하여 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체를 생성시키고;

[0684] (b) 시스테인 조작된 항체의 티올-반응성 시약에 대한 티올 반응성을 결정하는 것을 포함하고;

[0685] 여기서, 시스테인 조작된 항체가 모 항체보다 티올-반응성 시약에 대한 반응성이 더 큰 것인, 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체를 제조하는 (만드는) 방법을 제공한다.

[0686] 시스테인 조작된 항체를 제조하는 방법의 단계 (a)는

[0687] (i) 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 핵산 서열의 돌연변이를 유발하고;

[0688] (ii) 시스테인 조작된 항체를 발현시키고;

[0689] (iii) 시스테인 조작된 항체를 단리하고 정제하는 것

- [0690] 을 포함할 수 있다.
- [0691] 시스테인 조작된 항체를 제조하는 방법의 단계 (b)는 과지 또는 과지미드 입자로부터 선택되는 바이러스 입자 상에 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0692] 시스테인 조작된 항체를 제조하는 방법의 단계 (b)는 또한
- [0693] (i) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성시키고;
- [0694] (ii) 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 포획 매질 (capture media)에 대한 결합을 측정하는 것
- [0695] 을 포함할 수 있다.
- [0696] 본 발명의 다른 실시태양은
- [0697] (a) 하나 이상의 시스테인 아미노산을 모 항체 내로 도입하여 시스테인 조작된 항체를 생성시키고;
- [0698] (b) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성시키고;
- [0699] (c) 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 포획 매질에 대한 결합을 측정하고;
- [0700] (d) 티올-반응성 시약에 대한 시스테인 조작된 항체의 티올 반응성을 결정하는 것
- [0701] 을 포함하는, 고도로 반응성이고 쌍을 이루지 않은 시스테인 아미노산을 갖는, 시스테인 조작된 항체를 티올 반응성에 대해 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0702] 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (a)는
- [0703] (i) 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 핵산 서열의 돌연변이를 유발하고;
- [0704] (ii) 시스테인 조작된 항체를 발현시키고;
- [0705] (iii) 시스테인 조작된 항체를 단리하고 정제하는 것
- [0706] 을 포함할 수 있다.
- [0707] 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (b)는 과지 또는 과지미드 입자로부터 선택되는 바이러스 입자 상에 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0708] 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (b)는 또한
- [0709] (i) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성시키고;
- [0710] (ii) 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 포획 매질에 대한 결합을 측정하는 것
- [0711] 을 포함할 수 있다.
- [0712] 표지된 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체
- [0713] 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체는 부위-특이적으로 및 효율적으로 티올-반응성 시약과 커플링될 수 있다. 티올-반응성 시약은 다기능성 링커 시약, 포획, 즉 친화도, 표지 시약 (예를 들어, 비오틴-링커 시약), 겸출 표지 (예를 들어, 형광단 시약), 고체상 고정 시약 (예를 들어, SEPHAROSE™, 폴리스티렌, 또는 유리), 또는 약물-링커 중간체일 수 있다. 티올-반응성 시약의 한예는 N-에틸 말레이미드 (NEM)이다. 예시적인 실시태양에서, ThioFab과 비오틴-링커 시약의 반응은 조작된 시스테인 잔기의 존재 및 반응성이 그에 의해 겸출 및 측정될 수 있는 바이오틴화 ThioFab을 제공한다. ThioFab과 다기능성 링커 시약의 반응은 약물 모이어티 시약 또는 다른 표지와 추가로 반응할 수 있는 관능성 링커를 갖는 ThioFab을 제공한다. ThioFab과 약물-링커 중간체의 반응은 ThioFab 약물 접합체를 제공한다.
- [0714] 본원에 기재된 예시적인 방법은 일반적으로 항체의 확인 및 생산에, 및 보다 일반적으로는 본원에서 기재한 설계 및 스크리닝 단계의 적용을 통해 다른 단백질에 적용될 수 있다.
- [0715] 상기 접근법은 반응성기가 예를 들어 말레이미드, 요오도아세트아미드, 피리딜 디술퍼드, 또는 다른 티올-반응

성 접합 파트너인 다른 티올-반응성 시약의 접합에 적용될 수 있다 (문헌 [Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2]; [Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London]; [Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2]; [Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]). 티올-반응성 시약은 약물 모이어티, 형광단, 예를 들어 플루오레세인 또는 로다민과 같은 형광 염료, 영상화 또는 방사성치료 금속에 대한 킬레이팅제, 웨티딜 또는 비-웨티딜 표지 또는 검출 태그, 또는 소실-변형제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜의 다양한 이성질체, 제3성분에 결합하는 웨티드, 또는 다른 탄수화물 또는 친지성 물질일 수 있다.

[0716] 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체의 용도

시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 및 이들의 접합체는 치료제 및/또는 진단제로서의 용도를 발견할 수 있다. 본 발명은 STEAP-1 관련 장애와 연관된 하나 이상의 징후를 예방, 관리, 치료 또는 경감시키는 방법을 더 제공한다. 특히, 본 발명은 세포 증식성 장애, 예를 들면 암, 예를 들면, 전립선암, 폐암, 결장암, 방광암, 난소암, 및 유잉 육종과 연관된 하나 이상의 징후를 예방, 관리, 치료 또는 경감시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 STEAP-1 관련 장애 또는 이러한 장애가 발생하는 경향을 진단하는 방법 뿐만 아니라 이러한 장애의 발생을 예측하는 방법 및 항체의 항원-결합 단편 (세포-연관 STEAP-1 폴리웨티드에 우선적으로 결합)을 확인하는 방법을 더 제공할 것이다.

본 발명의 다른 실시양태는 STEAP-1 관련 장애에 반응하는 증상의 치료에 유용한 의약의 제조를 위한 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체의 용도에 관한 것이다.

[0719] 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체-약물 접합체의 제조

화학식 1의 ADC는 다음을 포함한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 여러 경로에 의해 제조할 수 있다:(1) 시스테인 조작된 항체의 시스테인기를 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 항체-링커 중간체 Ab-L을 형성시킨 다음, 이를 활성화된 약물 모이어티 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵성 기를 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 약물-링커 중간체 D-L을 형성시킨 다음, 이를 시스테인 조작된 항체의 시스테인기와 반응시키는 방법. 접합 방법 (1) 및 (2)는 각종 시스테인 조작된 항체, 약물 모이어티 및 링커를 사용하여 화학식 1의 항체-약물 접합체를 제조할 수 있다.

항체 시스테인 티올기는 친핵성이고, (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOEt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기; 및 (iv) 디술피드, 예를 들어 피리딜 디술피드 (술피드 교환을 통한)를 포함하는, 링커 시약 및 약물-링커 중간체 상의 친전자성 기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 약물 모이어티 상의 친핵성 기에는 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드기가 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다.

시스테인 조작된 항체는 환원제, 예를 들면 DTT (클레란드 (Cleland) 시약, 디티오틴레이톨) 또는 TCEP (트리스 (2-카르복시에틸)포스핀 염산염; (문헌 [Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80]); 솔텍 벤처스 (Soltex Ventures, 미국 메릴랜드주 베벌리))로 처리한 후, 재산화에 의해 사슬간 및 사슬내 디술피드 결합을 재형성시킴으로써, 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 할 수 있다. 예를 들어, CHO 세포에서 발현되는 전장 시스테인 조작된 모노클로날 항체 (ThioMab)는 약 50배 과량의 TCEP로 3시간 동안 37 °C에서 환원시켜 새롭게 도입된 시스테인 잔기와 배양 배지에 존재하는 시스테인 사이에 형성될 수 있는 시스테인 부가물 내의 디술피드 결합을 환원시켰다. 환원된 ThioMab을 희석하고, 10 mM 아세트산나트륨 (pH 5) 중의 HiTrap S 칼럼 상에 로딩하고, 0.3M 염화나트륨을 함유한 PBS로 용리하였다. 디술피드 결합은 모 Mab에 존재하는 시스테인 잔기와 희석한 (200 nM) 수성 황산구리 ($CuSO_4$) 간에 실온에서 밤새 재획립될 수 있다. 별법으로, 데히드로아스코르브산 (DHAA)이 시스테인 부가물의 환원 절단 후에 시스테인 조작된 항체의 사슬내 디술피드기를 재획립하는데 효과적인 산화제이다. 당업계에 공지된 기타 산화제, 즉 산화 제제, 및 산화 조건이 사용될 수 있다. 주위 공기 산화도 효과적이다. 이 약한 부분 재산화 단계는 높은 정확도로 사슬내 디술피드를 효율적으로 형성하고, 새로 도입된 시스테인 잔기의 티올기를 유지시킨다. 대략 10배 과량의 약물-링커 중간체, 예를 들어 MC-vc-PAB-MMAE를 첨가하고, 혼합하고, 약 1시간 동안 실온에서 정치하여 접합시키고 항체-약물 접합체를 형성하였다. 접합체 혼합물을 젤 여과하고, 로딩하고, HiTrap S 칼럼을 통해 용리하여 과량의 약물-링커 중간체 및 다른 불

순물을 제거하였다.

[0723] 도 16은 접합을 위한 세포 배양물로부터 발현된 시스테인 조작된 항체를 제조하는 일반적 방법을 나타낸다. 세포 배양 배지가 시스테인을 포함할 때 시스테인 부가물이 새로 도입된 시스테인 아미노산과 배지로부터의 시스테인 사이에 형성될 수 있다. 도 12에서 예시적인 ThioMab (좌측) 내의 원으로 도시된 상기 시스테인 부가물은 환원되어 접합에 반응성인 시스테인 조작된 항체를 생성시켜야 한다. 시스테인 부가물은 환원제, 예를 들어 TCEP를 사용하여, 아마도 다양한 사슬간 디슬피드 결합과 함께 환원적으로 절단되어 항체의 환원 형태를 제공한다. 쌍을 이룬 시스테인 잔기 사이의 사슬간 디슬피드 결합은 부분 산화 조건하에, 예를 들면 황산구리, DHAA를 사용하거나 또는 주위 산소에 노출시켜 재형성된다. 새롭게 도입된 조작된, 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기는 링커 시약 또는 약물-링커 중간체와의 반응에 이용가능한 상태로 남아 본 발명의 항체 접합체를 형성한다. 포유동물 세포주에서 발현된 ThioMab은 -S-S- 결합 형성을 통해 조작된 Cys에 대해 외부적으로 접합된 Cys 부가물을 생성시킨다. 따라서, 정제된 ThioMab은 실시예 5에 기재하는 바와 같이 환원 및 산화 과정으로 처리되어 반응성 ThioMab을 생산하여야 한다. 이들 ThioMab은 세포독성 약물, 형광단, 및 다른 표지를 함유한 말레이미드와 접합시키는데 사용된다.

[0724] 도 15는 아우리스타틴 약물 모이어티가 경쇄 (LC-ADC), 중쇄 (HC-ADC) 및 Fc 영역 (Fc-ADC)에서 조작된 시스테인 기에 부착된 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 약물 접합체 (ADC)의 실시양태를 보여준다.

제약 제제

항체-약물 접합체의 투여

[0727] 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)는 치료될 증상에 적절한 임의의 경로로 투여될 수 있다. ADC는 통상적으로 비경구 경로로, 즉 주입, 피하, 근육내, 정맥내, 피내, 경막내 및 경막외 경로로 투여될 것이다.

[0728] 상기 암, 예를 들면 전립선암, 폐암 및/또는 결장암을 치료하기 위해, 한 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 정맥내 주입을 통해 투여된다. 주입을 통해 투여되는 투여량은 용량당 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $10,000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 이고, 일반적으로 총 1, 2, 3 또는 4회 용량을 위해 1주당 1회 투여한다. 별법으로, 투여량 범위는 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 및 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다. 용량은 1일 1회, 1주 1회, 1주 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1주 1회 미만, 1개월 1회 투여되거나, 또는 질환의 증상을 경감 또는 완화시키기 위해 간헐적으로 투여될 수 있다. 투여는 치료되는 림프종, 백혈병의 종양 또는 증상의 완화시까지 개시된 임의의 간격으로 계속될 수 있다. 투여는 증상의 완화 또는 경감이 계속된 투여에 의해 연장되는 경우 증상의 완화 또는 경감이 달성된 후에도 계속될 수 있다.

[0729] 본 발명은 또한 전립선암, 폐암 또는 결장암을 앓고 있는 환자에게 치료 유효량의 상기 실시양태 중 어느 하나의 인간화 120v.24 항체를 투여하는 것을 포함하며, 이 때 항체는 세포독성 분자 또는 검출가능한 분자에 접합되지 않은 것인, 전립선암, 폐암 및/또는 결장암, 및/또는 이러한 암의 전이암의 치료 방법을 제공한다. 항체는 통상적으로 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $1000 \text{mg}/\text{m}^2$ 범위의 투여량으로 투여될 것이다.

[0730] 본 발명은 또한 전립선암, 폐암 또는 결장암을 앓고 있는 환자에게 치료 유효량의 상기 실시양태 중 어느 하나의 인간화 120v.24 항체를 투여하는 것을 포함하며, 이 때 항체는 세포독성 분자 또는 검출가능한 분자에 접합된 것인, 전립선암, 폐암 및/또는 결장암, 및/또는 이러한 암의 전이암의 치료 방법을 제공한다. 항체는 통상적으로 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $1000 \text{mg}/\text{m}^2$ 범위의 투여량으로 투여될 것이다.

[0731] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 1종 이상의 항-STEAP-1 항체 및/또는 그의 1종 이상의 면역접합체 및/또는 본 발명의 1종 이상의 항-STEAP-1 항체-약물 접합체를 포함하는 제약 제제를 추가로 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 제약 제제는 1) 항-STEAP-1 항체 및/또는 항-STEAP-1 항체-약물 접합체 및/또는 그의 면역접합체, 및 2) 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 제약 제제는 1) 항-STEAP-1 항체 및/또는 그의 면역접합체, 및 임의로, 2) 1종 이상의 추가의 치료제를 포함한다.

[0732] 본 발명의 항체 또는 면역접합체 또는 본 발명의 항체-약물 접합체를 포함하는 제약 제제는 목적하는 순도를 갖는 항체 또는 항체-약물 접합체를 임의의 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합하여 수용액 또

는 동결건조 또는 다른 건조된 제제 형태로 보관을 위해 제조한다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]). 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 이에는 완충액, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트, 히스티딘 및 기타 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예를 들면, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐파롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 퀼레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착물 (예를 들면, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 포함된다. 생체내 투여를 위해 사용되는 제약 제제는 일반적으로 멸균처리된다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

[0733] 활성 성분은 또한 예를 들어 액적 형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달계 (예를 들어, 리포좀, 알부민 미세구, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에 또는 마크로에멀젼에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0734] 지속 방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예는 본 발명의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 소수성 고체 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919), L-글루탐산과 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능 미세구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 중합체, 예를 들어 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일 이상 동안 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 봉입된 항체 또는 면역접합체가 장기간 동안 신체에서 유지될 때, 이들은 37°C에서 습기에 노출될 때 변성 또는 응집되어 생물학적 활성 및 가능하게는 면역원성의 변경을 야기할 수 있다. 관련되는 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략을 설계할 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디슬퍼드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 안정화는 슬프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성할 수 있다.

항체-약물 접합체 치료

[0735] 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)를 사용하여 예를 들어 종양 항원의 과발현을 특징으로 하는 다양한 질환 또는 장애를 치료할 수 있음이 고려된다. 예시적인 증상 또는 과다증식성 장애는 양성 또는 악성 종양; 백혈병 및 림프계 종양을 포함한다. 다른 것들로는 신경, 신경교, 성상세포, 시상하부, 선상, 포식세포, 상피, 기질성, 포배강, 염증, 혈관신생 및 면역 (자가면역 장애 포함) 장애 등이 있다. 또 다른 것들로는 전립선암, 폐암 및 결장암이 있다.

[0736] 동물 모델 및 세포-기재의 분석에서 확인된 ADC 화합물은 또한 종양-보유 고차원 영장류 및 인간 임상 시험에서 시험할 수 있다. 인간 임상 시험은 전립선암, 폐암 및 결장암 및 이들 암의 전이암 등을 비롯한 전립선, 폐 또는 결장 세포 증식성 장애를 경험한 환자에서 본 발명의 항-STEAP-1 모노클로날 항체 또는 면역접합체의 효능을 시험하도록 설계될 수 있다. 임상 시험은 공지된 치료 처방, 예를 들면 공지의 화학요법제 및/또는 세포독성제가 관련된 방사선 요법 및/또는 화학요법과 ADC의 조합 요법의 효능을 평가하도록 설계될 수 있다.

[0737] 암은 본 발명의 ADC가 암 세포에 결합할 수 있도록 STEAP-1-발현 세포를 포함할 수 있다. 암에서 STEAP-1 발현을 결정하기 위해, 다양한 진단/예후 분석을 이용할 수 있다. 한 실시양태에서, STEAP-1 과발현은 IHC에 의해 분석할 수 있다. 종양 생검으로부터의 파라핀 포매 조직 절편을 IHC 분석에 적용하고, 조사되는 종양 세포의 염색 정도에 대해 및 조사되는 비율에서 STEAP-1 단백질 염색 강도 기준을 부여할 수 있다.

[0738] 질환을 예방 또는 치료하는데 적절한 ADC 투여량은 상기 규정된 바와 같은 치료하고자 하는 질환의 종류, 질환의 심도 및 과정, 분자가 예방 목적으로 투여되는지 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 기시행된 요법, 환자의

임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의해 좌우될 것이다. 분자는 환자에게 1회 투여하거나 일련의 치료 기간에 걸쳐 투여하는 것이 적합하다. 질환의 종류 및 심도에 따라서, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서는 아니면 연속식 주입에 의해서는 상관없이, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 15 mg/kg (예를 들면, 0.1 내지 20 mg/kg)의 분자가 환자에게 투여하기 위한 초기 투여량 후보이다. 전형적인 1일 투여량 범위는 상기 언급된 요인들에 따라서 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg 이상일 수 있다. 환자에게 투여될 ADC의 예시 투여량은 약 0.1 내지 약 10 $\text{mg}/\text{환자 체중 kg}$ 의 범위이다.

[0740] 증상에 따라서 수일 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우에, 치료는 질환 증상이 목적하는 수준으로 억제될 때까지 지속한다. 예시되는 투여 방법은 항-STEAP-1 항체 약 4 mg/kg 의 초기 로드 용량을 투여한 다음, 매주 약 2 mg/kg 의 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 기타 투여 용법도 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링한다.

조합 요법

[0742] 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)는 제약 조합 제제 또는 조합 요법으로서의 투여 방법에서 항암 특성을 지닌 1종 이상의 부가 화합물과 조합할 수 있다. 제약 조합 제제 또는 투여 방법의 1종 이상의 부가 화합물은 조합물의 ADC에 대한 상보적 활성을 지녀, 이들이 서로 불리한 영향을 미치지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0743] 1종 이상의 부가 화합물은 화학요법제, 세포독성제, 사이토킨, 성장 억제제, 항-호르몬제, 및/또는 심장보호제일 수 있다. 이러한 분자는 의도하는 목적에 대해 유효한 양으로 함께 존재하는 것이 적합하다. 본 발명의 ADC를 함유하는 제약 조성물은 또한, 치료 유효량의 화학요법제, 예를 들어 투불린-형성 억제제, 토포이소마라제 억제제 또는 DNA 결합제일 수 있다.

[0744] 한 측면에서, 제1 화합물은 본 발명의 항-STEAP-1 ADC이고, 1종 이상의 추가의 화합물은 항-STEAP-1 (네이키드 항체 또는 ADC)을 제외한 치료 항체이다. 한 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 화합물은 항-PSCA 항체이다. 한 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 화합물은 항-HER2 항체, 트라스투주맙 (예를 들면, 헤르셉틴®, 제넥텍, 인크. 미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 소재)이다. 한 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 화합물은 항-HER2 항체, 퍼투주맙 (옴니타그, 제넥텍, 인크. 미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 소재, US6949245 참조)이다. 한 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 화합물은 항-VEGF 항체 (예를 들면, 아바스틴®, 제넨텍, 인크.). 각각의 경우에, 1종 이상의 화합물은 네이키드 항체 또는 ADC이다. 한 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 화합물은 항체 (네이키드 항체 또는 ADC)이고, 추가의 항체는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 또는 그 이상의 항체로, 이러한 (네이키드 또는 ADC로서의) 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 또는 그 이상의 항체의 조합은 STEAP-1을 발현하는 조직에서 세포 증식성 질환을 치료하는데 효능이 있다.

[0745] 방사선 요법 및/또는 골수 및 말초 혈액 이식, 및/또는 세포독성제, 화학요법제, 또는 성장 억제제를 포함하지만 이로 한정되지 않는 다른 치료 요법을 본 발명에 따라서 확인된 항암제의 투여와 조합할 수 있다. 상기 하나의 실시양태에서, 화학요법제는 1개의 물질 또는 물질의 조합물, 예를 들어 시클로포스파미드, 히드록시다우노루비신, 아드리아마이신, 독소루비신, 빙크리스틴 (OncovinTM), 프레드니솔론, CHOP, CVP, 또는 COP, 또는 면역치료제, 예를 들어 항-PSCA, 항-HERS (예를 들어, 헤르셉틴®, 옴니타그TM) 또는 항-VEGF (예를 들어, 아바스틴®)이다. 이러한 조합 요법은 동시 또는 순차적 요법으로서 투여할 수 있다. 순차적으로 투여되는 경우에는, 조합물을 2회 이상의 투여로 투여할 수 있다. 조합 투여에는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하여 동시 투여하는 것과, 어느 한 순서로 순차적으로 투여하는 것 (여기서, 바람직하게는 2개 (또는 모든) 활성제가 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 데에는 일정 시간이 소요됨)이 포함된다.

[0746] 한 실시양태에서, ADC를 이용한 치료가 본원에서 확인된 항암제와, 1종 이상의 화학요법제 또는 성장 억제제의 조합 투여 (이에는 상이한 화학요법제의 각테일을 동시 투여하는 것이 포함됨)를 포함한다. 화학요법제에는 탁산 (예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀) 및/또는 안트라사이클린 항생제가 포함된다. 상기 화학요법제의 제제 및 투여 계획은 제조사의 지시에 따라 또는 숙련의에 의해 경험적으로 결정되는 바와 같이 사용될 수 있다. 상기 화학요법제의 제제 및 투여 계획은 또한 문헌 ["Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD]에 기재되어 있다.

[0747] 상기 동시 투여되는 임의의 물질에 대한 적합한 투여량은 현재 사용되고 있는 양이며, 이는 새로이 확인된 물질과 기타 화학요법제 또는 치료의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 낮아질 수 있다.

[0748] 조합 요법은 "상승작용"을 제공해줄 수 있고, "상승적"인 것으로 입증되었는데, 즉 활성 성분들을 함께 사용한 경우에 달성된 효과는 화합물을 개별적으로 사용하여 얻은 효과들의 합보다 크다. 상승적 효과는 활성 성분들

을 (1) 조합된 단위 투여 제제로 동시에 제제화하고 투여하거나 동시에 전달하거나; (2) 별개의 제제로서 교대로 또는 병행하여 전달하거나; 또는 (3) 몇몇 기타 요법에 의한 경우에 획득할 수 있다. 상승적 효과는 교대 요법으로 전달한 경우에는, 화합물을, 예를 들어 별개의 주사기로 상이한 주사제에 의해 순차적으로 투여 또는 전달할 경우에는 획득될 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 동안 각 활성 성분의 유효 투여량을 순차적으로, 즉 연속적으로 투여하는 반면, 조합 요법에서는 2가지 이상 활성 성분의 유효 투여량을 함께 투여한다.

[0749] 항체-약물 접합체의 대사물질

선행 기술에 비해 신규하고 진보성을 갖는 한도 내에서, 본원에 기재된 ADC 화합물의 생체내 대사산물이 본 발명의 범위 내에 또한 포함된다. 이러한 생성물은, 예를 들어 투여된 화합물의 산화, 환원, 가수분해, 아미드화, 에스테르화, 효소적 절단 등으로부터 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물을 그의 대사산물 생성에 충분한 시간 동안 포유동물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 의해 제조된 신규하고 진보성을 갖는 화합물을 포함한다.

대사산물은 일반적으로 방사성 표지된 (예를 들면, ^{14}C 또는 ^3H) ADC를 제조하고; 이를 래트, 마우스, 기니아 피그, 원숭이 등의 동물 또는 인간에게 검출 가능한 용량 (예를 들면, 약 0.5 mg/kg 초과의 용량)으로 비경구 투여하며; 대사가 일어나기에 충분한 시간(전형적으로 약 30초 내지 30시간)이 경과한 후; 그의 전환 생성물을 뇨, 혈액 또는 기타 생물학적 샘플로부터 단리시킴으로써 확인된다. 이들 생성물은 표지되었기 때문에 용이하게 단리된다 (다른 것들은 대사물질 내에 계속 존재하는 에피토프와 결합할 수 있는 항체를 사용함으로써 단리됨). 대사물질 구조는 통상적인 방식, 예를 들어 MS, LC/MS 또는 NMR 분석에 의해 결정한다. 일반적으로, 대사물질 분석은 당업자에게 널리 공지된 통상적인 약물 대사 연구와 동일한 방식으로 수행한다. 전환 생성물은 생체내에서 발견되지 않는 한, 본 발명의 ADC 화합물의 치료 투여를 위한 진단 분석에 유용하다.

[0752] 항-STEAP-1 항체 및 면역접합체를 사용하는 추가의 방법

[0753] 진단 방법 및 검출 방법

한 측면에서, 본 발명의 항-STEAP-1 항체 및 면역접합체는 생물학적 샘플 중 STEAP-1의 존재를 검출하기 위해 유용하다. 용어 "검출하는"은 본원에서 사용될 때 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 조직은 다른 조직에 비해 더 높은 수준으로 STEAP-1을 발현하는 정상 및/또는 암성 조직, 예를 들어 전립선, 폐 및 결장을 포함한다.

한 측면에서, 본 발명은 생물학적 샘플 중 STEAP-1의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 이 방법은 생물학적 샘플을 STEAP-1에 대한 항-STEAP-1 항체의 결합을 허용하는 조건하에 항-STEAP-1 항체와 접촉시키고, 항-STEAP-1 항체와 STEAP-1 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 것을 포함한다.

한 측면에서, 본 발명은 STEAP-1의 발현 증가와 연관된 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 이 방법은 시험 세포를 항-STEAP-1 항체와 접촉시키고; STEAP-1에 대한 항-STEAP-1 항체의 결합을 검출함으로써 시험 세포에 의한 STEAP-1의 발현 수준을 (정량적으로 또는 정성적으로) 결정하고; 시험 세포에 의한 STEAP-1의 발현 수준을 대조군 세포 (예를 들어, 시험 세포와 동일한 조직에서 기원하는 정상 세포 또는 상기 정상 세포와 대등한 수준으로 STEAP-1을 발현하는 세포)에 의한 STEAP-1의 발현 수준과 비교하는 것을 포함하고, 여기서 대조군 세포에 비해 시험 세포에 의한 STEAP-1의 더 높은 발현 수준은 STEAP-1의 발현 증가와 연관된 장애의 존재를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 시험 세포는 STEAP-1의 발현 증가와 연관된 장애에 걸린 것으로 추정되는 개체로부터 얻어진다. 특정 실시양태에서, 장애는 세포 증식성 장애, 예를 들어 암 또는 종양이다.

본 발명의 항체를 사용하여 진단될 수 있는 예시적인 세포 증식성 장애는 전립선암, 폐암 및 결장암, 또는 상기 암들의 전이암을 포함한다.

특정 실시양태에서, 상기한 바와 같은 진단 또는 검출 방법은 세포 표면에서 발현되는 STEAP-1에 대한 항-STEAP-1 항체의 결합을 그의 표면 상에 STEAP-1을 발현하는 세포로부터 얻은 막 제제에서 검출하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이 방법은 세포를 STEAP-1에 대한 항-STEAP-1 항체의 결합을 허용하는 조건하에서 항-STEAP-1 항체와 접촉시키고, 항-STEAP-1 항체와 세포 표면에서의 STEAP-1 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 결정하는 것을 포함한다. 세포의 표면에서 발현된 STEAP-1에 대한 항-STEAP-1 항체의 결합을 검출하기 위한 예시적인 분석은 "FACS" 분석이다.

STEAP-1에 대한 항-STEAP-1 항체의 결합을 검출하기 위해 특정한 다른 방법이 사용될 수 있다. 상기 방법은 당업계에 공지된 항원 결합 분석, 예를 들어 웨스턴 븍트 (western blot), 방사 면역 측정법, ELISA (효소 결합

면역흡착 분석), "샌드위치 (sandwich)" 면역분석, 면역침전 분석, 형광 면역분석, 단백질 A 면역분석, 및 면역 조직화학 (IHC)을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0760] 특정 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 표지된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예를 들어, 형광, 발색, 전자 밀집 (electron-dense), 화학발광, 및 방사성 표지), 및 간접적으로, 예를 들어 효소적 반응 또는 분자 상호작용을 통해 검출되는 모이어티, 예를 들어 효소 또는 리간드를 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 예시적인 표지는 방사성 동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , 형광단, 예를 들어 히토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 덴실, 웜벨리페론, 또는 루시퍼라제, 예를 들어 개똥벌레 루시퍼라제 및 박테리아 루시퍼라제 (미국 특허 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로제나제, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소, 예를 들어 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링된 헤테로시클릭 옥시다제, 예를 들어 유리카제 및 잔틴 옥시다제, 비오틴/아비딘, 스피노제, 박테리오파지 표지, 안정한 유리 라디칼 등을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0761] 특정 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체는 불용성 매트릭스 상에 고정된다. 고정은 용액에 유리된 상태로 남아있는 임의의 STEAP-1로부터 항-STEAP-1 항체를 분리하는 것을 수반한다. 이것은 통상적으로 분석 절차 전에 항-STEAP-1 항체의 불용화에 의해, 수불용성 매트릭스 또는 표면에 대한 흡착에 의해 (Bennich 등, U.S. 3,720,760), 또는 공유 커플링 (예를 들어, 글루타르알데히드 가교결합 사용)에 의해, 또는 예를 들어 면역침전에 의해 항-STEAP-1 항체와 STEAP-1 사이의 복합체 형성 후에 항-STEAP-1 항체의 불용화에 의해 달성된다.

[0762] 상기 진단 또는 검출을 위한 임의의 실시양태는 항-STEAP-1 항체 대신에 또는 항-STEAP-1 항체에 추가하여 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행할 수 있다.

치료 방법

[0764] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 예를 들어 시험관내, 생체 외 및 생체내 치료 방법에 사용될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명은 생체내 또는 시험관내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 방법을 제공하고, 이 방법은 세포를 STEAP-1에 대한 면역접합체의 결합을 허용하는 조건하에 항-STEAP-1 항체 또는 그의 면역접합체에 노출시키는 것을 포함한다. "세포 성장 또는 증식을 억제하는"은 세포의 성장 또는 증식을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100% 감소시키는 것을 의미하고, 세포 사멸의 유도를 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포는 종양 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 전립선, 폐, 결장, 방광 또는 난소 세포, 또는 유잉 육종 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 예를 들어 본원에서 예시되는 바와 같은 이종이식편이다.

[0765] 한 측면에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 전립선, 폐, 결장, 방광, 또는 난소 세포 또는 유잉 육종 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는데 사용된다. 특정 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 STEAP-1의 증가된 발현 및/또는 활성화에 관련된다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 전립선, 폐, 결장, 방광, 또는 난소 세포 또는 유잉 육종 세포 증식성 장애는 전립선, 폐, 결장, 방광, 또는 난소 세포 또는 유잉 육종 세포의 표면에서 STEAP-1의 증가된 발현과 관련된다. 특정 실시양태에서, 전립선, 폐, 결장, 방광, 또는 난소 세포 또는 유잉 육종 세포 증식성 장애는 종양 또는 암 또는 이러한 암의 전이암이다.

[0766] 한 측면에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-STEAP-1 항체 또는 이들의 면역접합체를 투여하는 것을 포함하는, 전립선, 폐 또는 결장 세포 증식성 장애의 치료 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 전립선, 폐 또는 결장 세포 증식성 장애의 치료 방법은 개체에게 항-STEAP-1 항체 또는 항-STEAP-1 면역접합체, 임의로는 본원에 제공된 바와 같은 1종 이상의 추가의 치료제를 포함하는 제약 제제를 유효량으로 투여하는 것을 포함한다.

[0767] 한 측면에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 적어도 일부는 인간 이외의 다른 종으로부터 유래한 STEAP-1에 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 예를 들어 STEAP-1을 함유하는 세포 배양액에서, 인간에서, 또는 본 발명의 항체 또는 면역접합체가 교차-반응하는 STEAP-1을 갖는 다른 포유동물 (예를 들어, 침팬지, 비비 (baboon), 마모셋, 사이노몰거스 원숭이 및 붉은털 원숭이, 개 돼지, 래트 또는 마우스)에서 STEAP-1에 결합하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체 또는 면역접합체는, 면역접합체의 접합된 세포독소가 세포 내부에 접근하도록 항체 또는 면역접합체를 STEAP-1과 접촉시켜 항체 또는 면역접합체-항원 복합체를 형성시킴으로써 전립선, 폐 또는 결장 세포 상의 STEAP-1을 표적화하는데 사용될 수 있다. 한

실시양태에서, 항-STEAP-1 항체가 결합하는 STEAP-1은 인간 STEAP-1이다. 한 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체가 결합하는 STEAP-1은 사이노몰거스 원숭이 STEAP-1이다. 한 실시양태에서, 인간화 항-STEAP-1 항체는 인간 및/또는 사이노몰거스 원숭이 STEAP-1에 결합한다.

[0768] 한 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체 또는 면역접합체는 증가된 STEAP-1 발현 및/또는 활성과 연관된 장애로 고통 받는 개체에서 STEAP-1을 결합시키는 방법에 사용될 수 있고, 이 방법은 개체에 존재하는 STEAP-1가 결합되도록 개체에게 항체 또는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 결합된 항체 또는 면역접합체는 STEAP-1을 발현하는 전립선, 폐, 결장, 방광 또는 난소 세포 또는 유잉 육종 세포 내로 내재화된다. 한 실시양태에서, STEAP-1은 인간 STEAP-1이고, 개체는 인간이다. 별법으로, 개체는 항-STEAP-1 항체가 결합하는 STEAP-1을 발현하는 포유동물일 수 있다. 또한, 개체는 STEAP-1가 도입된 (예를 들어, STEAP-1의 투여에 의해 또는 STEAP-1을 코딩하는 트랜스젠 (transgene)의 발현에 의해) 포유동물일 수 있다.

[0769] 항-STEAP-1 항체 또는 면역접합체는 치료 목적으로 인간에게 투여될 수 있다. 또한, 항-STEAP-1 항체 또는 면역접합체는 수의용으로 또는 인간 질환의 동물 모델로서, 항체가 교차-반응하는 STEAP-1을 발현하는 비인간 포유동물 (예를 들어, 영장류, 돼지, 래트 또는 마우스)에게 투여될 수 있다. 인간 질환의 동물 모델의 경우에, 상기 동물 모델은 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 치료 효능을 평가하는데 (예를 들어, 투여량 및 투여의 시간 경로를 시험하는데) 유용할 수 있다.

[0770] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 요법에서 단독으로 또는 다른 조성물과 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 1종 이상의 추가의 치료제 및/또는 아주반트와 동시에 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 세포독성제, 화학요법제, 또는 성장 억제제이다. 상기 하나의 실시양태에서, 화학요법제는 1개의 물질 또는 물질의 조합물, 예를 들어 시클로포스파미드, 히드록시다우노루비신, 아드리아마이신, 독소루비신, 빙크리스틴 (Oncovin™), 프레드니솔론, CHOP, CVP, 또는 COP, 또는 면역치료제, 예를 들어 항-PSCA (예를 들면 US6824780 참조), 항-VEGF (예를 들면, 아바스틴®, 제넥텍, 인크.), 항-HER2 (예를 들면, 헤르셉틴®, 옴니타그™, 제넥텍, 인크.), 또는 탁솔®과 조합된 항-HER2 (예를 들면, 문현 [BioWorld Today, November 17, 1999, page 1] 참조)를 포함하며, 이 때 조합 요법은 전립선, 폐 및/또는 결장의 세포 증식성 장애, 암 및/또는 암의 전이암을 치료하는데 유용하다.

[0771] 상기 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2 이상의 치료제가 동일한 또는 별개의 제제에 포함된다), 및 개별 투여를 포함하고, 개별 투여시에, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 수행될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 방사선 요법과 조합될 수도 있다.

[0772] 본 발명의 항체 또는 면역접합체 (및 임의의 추가의 치료제 또는 아주반트)는 비경구, 폐하, 복강내, 폐내 및 비내, 및 국소 치료용으로 필요할 경우의 병변내 투여를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 폐하 투여를 포함한다. 또한, 항체 또는 면역접합체는 적합하게는 특히 항체 또는 면역접합체의 감소하는 투여량으로 펄스 주입에 의해 투여된다. 용량은 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 간단한지 또는 만성인지에 따라 정맥내 또는 폐하 주사와 같은 주사에 의해서 수행될 수 있다.

[0773] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 우수한 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화, 투여량화 및 투여될 것이다. 이러한 측면에서 고려되는 인자는 치료될 특정 장애, 치료될 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 물질의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료인에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체 또는 면역접합체는 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로 해당 장애를 예방하거나 치료하는데 통상적으로 사용되는 1종 이상의 물질과 함께 제제화된다. 이러한 다른 물질의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체 또는 면역접합체의 양, 장애 또는 치료의 종류, 및 상기 논의된 다른 인자에 따라 결정된다. 이는 일반적으로 상기 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 1 내지 99%로, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 경로에 의해 사용된다.

[0774] 장애의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 적절한 투여량 (단독으로 또는 화학요법제와 같은 1종 이상의 다른 추가의 치료제와 조합으로 사용될 경우)은 치료될 질환의 종류, 항체 또는 면역접합체의 종류, 질환의 심도 및 과정, 항체 또는 면역접합체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 이전의 치료법, 환자의 임상 병력 및 항체 또는 면역접합체에 대한 반응, 및 담당 의사의 결정에 의존할 것이다. 항체 또는 면역접합체는 적합하게는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질환의 종류 및 심도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여로든 연속 주입으로든, 약 1 μ g/kg 내지 100 mg/kg (예를 들어, 0.1

mg/kg 내지 20 mg/kg)의 항체 또는 면역접합체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 한 가지 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 μ g/kg 내지 100 mg/kg 또는 그보다 큰 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 상태에 따라 치료는 일반적으로 질환 증상의 목적하는 억제가 일어날 때까지 지속될 것이다. 한 가지 예시적인 항체 또는 면역접합체의 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 (예를 들어, 환자가 약 2 내지 20회, 예를 들어 약 6회 용량의 항체 또는 면역접합체를 투여받도록) 투여될 수 있다. 보다 높은 초기 로드 용량, 이어서 1회 이상의 보다 낮은 용량이 투여될 수 있다. 예시적인 투여 용법은 약 4 mg/kg의 항체의 초기 로드 용량 후에 약 2 mg/kg의 항체를 매주 유지 용량으로 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 다른 투여 용법도 유용할 수 있다. 상기 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링 된다.

[0775] 분석

[0776] 본 발명의 항-STEAP-1 항체 및 면역접합체는 당업계에 공지된 상이한 분석에 의해 그들의 물리/화학적 특성 및/ 또는 생물학적 활성을 대해 특성화될 수 있다.

[0777] 활성 분석

[0778] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 항-STEAP-1 항체 또는 그의 면역접합체를 확인하기 위한 분석이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 세포 성장 또는 증식을 억제하는 활성 (예를 들어, "세포 사멸" 활성), 또는 프로그래밍된 세포 사멸 (세포자멸)을 포함하는 세포 사멸을 유도하는 활성을 포함할 수 있다. 또한, 생체내에서 및/ 또는 시험관내에서 상기 생물학적 활성을 갖는 항체 또는 면역접합체도 제공된다.

[0779] 특정 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체 또는 그의 면역접합체를 시험관내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험한다. 세포 성장 또는 증식 억제에 대한 분석은 당업계에 잘 공지되어 있다. 본원에서 기재된 "세포 사멸" 분석에 의해 예시된, 세포 증식에 대한 특정 분석은 세포 생활력을 측정한다. 하나의 상기 분석은 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)TM 발광 세포 생활력 분석 (Luminescent Cell Viability Assay)이고, 이는 프로메가 (Promega, 미국 위스콘신주 매디슨)로부터 상업적으로 입수 가능하다. 상기 분석은 대사적 활성 세포를 나타내는 존재하는 ATP의 정량에 기초하여 배양액 내의 생활성 세포의 수를 결정한다 (문헌 [Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88], 미국 특히 6602677 참조). 분석은 분석을 자동 고효율 스크리닝 (HTS)에 적용하도록 하는 96- 또는 384-웰 포맷으로 수행될 수 있다 (문헌 [Cree et al (1995) Anticancer Drugs 6:398-404] 참조). 분석 과정은 단일 시약 (셀타이터-글로[®] 시약)을 배양된 세포에 직접 첨가하는 것을 수반한다. 이에 의해, 세포가 용해되고, 루시퍼라제 반응에 의한 발광 신호가 생성된다. 발광 신호는 배양 액 내에 존재하는 생활성 세포의 수에 정비례하는, 존재하는 ATP의 양에 비례한다. 데이타는 발광광도계 또는 CCD 카메라 영상 장치에 의해 기록될 수 있다. 발광 정도는 상대 광 단위 (RLU)로서 표현된다.

[0780] 세포 증식에 대한 다른 분석은 미토콘드리아 리덕타제에 의한 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드의 포르마잔으로의 산화를 측정하는 비색 분석인 "MTT" 분석이다. 셀타이터-글로TM 분석과 마찬가지로, 상기 분석은 세포 배양액 내에 존재하는 대사적 활성 세포의 수를 나타낸다 (예를 들어, 문헌 [Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63], 및 [Zhang et al (2005) Cancer Res. 65:3877-3882] 참조).

[0781] 한 측면에서, 항-STEAP-1 항체는 시험관내에서 세포 사멸을 유도하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포 사멸 유도에 대한 분석은 당업계에 공지되어 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 분석은 예를 들어 요오드화프로파碇 (PI), 트리판 블루 (문헌 [Moore et al (1995) Cytotechnology 17:1-11] 참조) 또는 7AAD의 흡수에 의해 평가되는 막 통합성의 상실을 측정한다. 예시적인 PI 섭취 분석에서, 세포는 10% 열-불활성화 FBS (하이클론 (Hyclone)) 및 2 mM L-글루타민이 보충된 둘베코 (Dulbecco) 개질 이글 배지 (D-MEM):햄 F-12 (50:50)에서 배양된다. 따라서, 분석은 보체 및 면역 효과기 세포의 부재하에 수행된다. 세포를 100 x 20 mm 디쉬 내에 디쉬 당 3x10⁶의 밀도로 접종하고, 철야 부착시킨다. 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독으로 또는 다양한 농도의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배지로 교체한다. 세포를 3일 동안 인큐베이션한다. 처리 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신화에 의해 털착시킨다. 이어서, 세포를 1200 rpm에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하고, 펠렛을 3 ml의 차가운 Ca²⁺ 결합 완충액 (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂)에 재현탁시키고, 세포 덩어리를 제거하기 위해 35 ml의 스트레이너 마개가 있는 12 x 75 mm 투브 (1 ml/투브, 처리군당 3개의 투브) 내로 분취한다. 이어서, 투브에 PI (10 μ g/ml)를 넣는다. FACSCANTM 유동 세포 측정기 및 FACS CONVERTTM

CellQuest 소프트웨어 (벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson))를 사용하여 샘플을 분석한다. PI 흡수에 의해 측정되는, 통계상 유의한 수준의 세포 사멸을 유도하는 항체 또는 면역접합체가 이와 같이 확인된다.

[0782] 한 측면에서, 항-STEAP-1 항체 또는 면역접합체가 시험관내에서 세포자멸 (프로그래밍된 세포 사멸)을 유도하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포자멸을 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 예시적인 분석은 아넥신 결합 분석이다. 예시적인 아넥신 결합 분석에서, 상기 문단에서 기재한 바와 같이 세포를 배양하고 디쉬 내에 접종 한다. 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독으로 또는 0.001 내지 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배지로 교체한다. 3일의 인큐베이션 기간 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신화에 의해 탈착시킨다. 이어서, 세포를 원심분리하고, Ca^{2+} 결합 완충액에 재현탁시키고, 상기 문단에서 기재한 바와 같이 퓨브 내로 분취한다. 이어서, 퓨브에 표지된 아넥신 (예를 들어, 아넥신 V-FITC) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 넣는다. FACSCAN™ 유동 세포 측정기 및 FACS CONVERT™ CellQuest 소프트웨어 (비디 바이오사이언스 (BD Biosciences))를 사용하여 샘플을 분석한다. 대조군에 비해 통계상 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체 또는 면역접합체가 이와 같이 확인된다. 세포자멸을 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 다른 예시적인 분석은 게놈 DNA의 뉴클레오좀내 (internucleosomal) 분해를 검출하기 위한 히스톤 DNA ELISA 비색 분석이다. 상기 분석은 예를 들어, 세포 사멸 검출 ELISA 키트 (로슈 (Roche, 미국 캘리포니아주 팔로 알토))를 사용하여 수행할 수 있다.

[0783] 임의의 상기 시험관내 분석에 사용하기 위한 세포는 자연적으로 STEAP-1을 발현하거나 STEAP-1을 발현하도록 조작된 세포 또는 세포주를 포함한다. 상기 세포는 동일한 조직에서 기원하는 정상 세포에 비해 STEAP-1을 과발현하는 종양 세포를 포함한다. 상기 세포는 또한 STEAP-1을 발현하는 세포주 (종양 세포주 포함), 및 정상적으로 STEAP-1을 발현하지 않지만 STEAP-1을 코딩하는 핵산으로 형질감염된 세포주를 포함한다.

[0784] 한 측면에서, 항-STEAP-1 항체 또는 그의 면역접합체는 생체내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체 또는 그의 면역접합체는 생체내에서 종양 성장을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 생체내 모델 시스템, 예를 들어 이종이식 모델이 상기 시험을 위해 사용될 수 있다. 예시적인 이종이식 시스템에서, 인간 종양 세포를 적합하게 면역손상시킨 비인간 동물, 예를 들어 SCID 마우스에 도입한다. 본 발명의 항체 또는 면역접합체를 동물에게 투여한다. 종양 성장을 억제하거나 감소시키는 항체 또는 면역접합체의 능력을 측정한다. 상기 이종이식 시스템의 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 인간 환자로부터의 종양 세포이다. 이종이식편 모델의 제조에 유용한 세포는 외인성 STEAP-1을 발현하는 PC3 세포, 및 STEAP-1을 자연적으로 발현하는 세포 (LnCAP 세포 (서던 리서치 인스티튜트 (Southern Research Institute), 미국 알라배마주 버밍햄 소재), LuCAP 77 세포, 및 LuCAP35V 세포 (위싱턴 대학, 미국 위싱턴주 시애틀 소재) 등 포함) 등을 포함하는 인간 전립선, 폐, 또는 결장 종양 세포주이다. 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 피하 주사에 의해 적합하게 면역손상시킨 비인간 동물 내로 또는 이식에 의해 적합한 부위, 예를 들어 유지방체 (mammary fat pad) 내로 도입된다.

결합 분석 및 다른 분석

[0785] 한 측면에서, 항-STEAP-1 항체를 그의 항원 결합 활성에 대해 시험한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 항-STEAP-1 항체를 세포 표면에서 발현되는 외인성 또는 내인성 STEAP-1에 결합하는 그의 능력에 대해 시험한다. FACS 분석을 상기 시험을 위해 사용할 수 있다.

[0786] 한 측면에서, 경쟁 분석은 STEAP-1에 대한 결합을 위해 120 이식편 또는 그의 인간화 변이체 (120v.24 항체 등 포함)와 경쟁하는 모노클로날 항체를 확인하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 경쟁 항체는 120 이식편 항체 또는 인간화 120 이식편 항체 (변이체 120v.24 인간화 항-STEAP-1 항체 포함)에 의해 결합되는 동일한 에피토프 (예를 들어, 세포 표면에서 STEAP-1의 발현에 의해 형성된 선형 에피토프 펩티드 또는 임체형태적 에피토프)에 결합한다. 예시적인 경쟁 분석은 문헌 [Harlow and Lane (1988) *Antibody: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]에 제시된 것과 같은 통상적인 분석을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 항체가 결합하는 에피토프를 매핑하기 위한 상세한 예시적인 방법은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제시되어 있다. 두 항체가 각각 서로 다른 항체의 결합을 50% 이상 차단할 경우 두 항체는 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 언급된다.

[0787] 예시적인 경쟁 분석에서, STEAP-1에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, 쥐과동물 120.545 항체, 120 이식편 항체 또는 인간화 120v.24 항체) 및 STEAP-1에 대한 결합을 위해 제1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 시험되는 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 고정된 STEAP-1을 인큐베이션한다. 제2 항체는 하이브리도마 상등액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 제1 표지된 항체만을 포함하고 제2 비표지된 항체가 존재하지 않는 용

액 중에서 고정된 STEAP-1을 인큐베이션한다. STEAP-1에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건하에서 인큐베이션한 후, 과량의 비결합 항체를 제거하고, 고정된 STEAP-1과 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정된 STEAP-1과 회합된 표지의 양이 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소할 경우, 이것은 제2 항체가 STEAP-1에 대한 결합을 위해 제1 항체와 경쟁함을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 고정된 STEAP-1은 세포의 표면에 또는 그의 표면에 STEAP-1을 발현하는 세포로부터 수득한 막 제제에 존재한다.

[0789] 한 측면에서, 정제된 항-STEAP-1 항체는 N-말단 서열 결정, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파파인 소화를 포함하지만 이로 한정되지 않는 일련의 분석에 의해 추가로 특성화될 수 있다.

[0790] 한 실시양태에서, 본 발명은 항체를, 생체내에서 항체의 반감기가 중요하지만 특정 효과기 기능 (예를 들어, 보체 및 ADCC)에는 불필요하거나 유해한 많은 용도에 대한 바람직한 후보가 되게 하는, 모든 효과기 기능이 아니라 일부의 효과기 기능만을 보유하는 변경된 항체를 고려한다. 특정 실시양태에서, 목적하는 특성만이 유지되는 것을 보장하기 위해 항체의 Fc 활성이 측정된다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석을 수행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석은 항체에 Fc γ R 결합이 결여되어 있지만 (따라서 ADCC 활성이 결여될 수 있음), 항체가 FcRn 결합능을 보유하는 것을 보장하기 위해 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하지만, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 464페이지의 표 3에 요약되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 예는 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337에 기재되어 있다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포로는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 들 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 목적하는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다. 또한, C1q 결합 분석을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성이 없는지를 확인할 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다. 또한, FcRn 결합 및 생체내 청소율/반감기 측정을 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0791] <실시예>

[0792] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제시된 일반적인 기재가 주어지면, 다양한 다른 실시양태이 실시될 수 있는 것으로 이해된다.

실시예 1: 인간화 항-STEAP-1 항체의 제조

[0794] 항체, 항체 단편, VL 도메인 또는 VH 도메인의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 제조한다. 상기 방법은 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이 유발에 의한 제조, PCR 돌연변이 유발, 및 항체, 항체 단편, VL 도메인 또는 VH 도메인의 미리 제조된 변이체 또는 비-변이체 형태의 카세트 돌연변이 유발을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 예를 들어, 라이브러리는 쿤켈 방법을 이용하는 변이체 아미노산으로의 아미노산 치환을 위해 VH 및 임의로 하나 이상의 CDR에서 VL 접근가능한 아미노산 위치를 표적화함으로써 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Kunkel et al., Methods Enzymol. (1987), 154:367-382] 및 본원의 실시예를 참조한다. 무작위 서열의 생성을 또한 하기 실시예에 기재한다.

[0795] 올리고뉴클레오티드의 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 CDR (HVR) 또는 FR 영역 내에 특정 위치에 대한 하나 이상의 설계된 코돈 세트를 포함한다. 코돈 세트는 목적하는 변이체 아미노산을 코딩하도록 사용된 상이한 뉴클레오티드 삼중체 서열의 세트이다. 코돈 세트는 IUB 코드에 따라 아래 나타낸 바와 같이 특정 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드의 등물 혼합물을 지정하기 위해 기호를 사용하여 나타낼 수 있다.

[0796] IUB 코드

[0797] G 구아닌

[0798] A 아데닌

[0799] T 티민

[0800] C 시토신

- [0801] R (A 또는 G)
- [0802] Y (C 또는 T)
- [0803] M (A 또는 C)
- [0804] K (G 또는 T)
- [0805] S (C 또는 G)
- [0806] W (A 또는 T)
- [0807] H (A 또는 C 또는 T)
- [0808] B (C 또는 G 또는 T)
- [0809] V (A 또는 C 또는 G)
- [0810] D (A 또는 G 또는 T)
- [0811] N (A 또는 C 또는 G 또는 T)
- [0812] 예를 들어, 코돈 세트 DVK에서, D는 뉴클레오티드 A 또는 G 또는 T일 수 있고; V는 A 또는 G 또는 C일 수 있고; K는 G 또는 T일 수 있다. 상기 코돈 세트는 18가지 상이한 코돈을 제시할 수 있고, 아미노산 Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, 및 Cys를 코딩할 수 있다.
- [0813] 올리고뉴클레오티드 또는 프라이머 세트는 표준 방법을 이용하여 합성할 수 있다. 코돈 세트에 의해 제공되는 뉴클레오티드 삼중체의 모든 가능한 조합을 나타내고, 목적하는 군의 아미노산을 코딩하는 서열을 함유하는 올리고뉴클레오티드의 세트는 예를 들어 고체상 합성에 의해 합성할 수 있다. 특정 위치에서 선택된 뉴클레오티드 "다의성 (degeneracy)"을 갖는 올리고뉴클레오티드의 합성은 당업계에 잘 공지되어 있다. 특정 코돈 세트를 갖는 상기 뉴클레오티드 세트는 시판 핵산 합성기 (예를 들어, 어플라이드 바이오시스템즈(미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)로부터 입수 가능함)를 사용하여 합성할 수 있거나, 상업적으로 입수할 수 있다 (예를 들어, 라이프 테크놀로지스 (Life Technologies, 미국 매릴랜드주 록빌)로부터). 따라서, 특정 코돈 세트를 갖는 합성된 올리고뉴클레오티드의 세트는 대개 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함할 것이고, 상기 차이는 전체 서열 내에서 코돈 세트에 의해 확립된다. 본 발명에 따라 사용될 때 올리고뉴클레오티드는 가변 도메인 핵산 주형에 혼성화를 허용하는 서열을 갖고, 또한 클로닝 목적을 위한 제한 효소 부위를 포함할 수 있다.
- [0814] 한 방법에서, 변이체 아미노산을 코딩하는 핵산 서열은 올리고뉴클레오티드-매개된 돌연변이 유발에 의해 생성될 수 있다. 상기 기술은 문헌 [Zoller et al, 1987, Nucleic Acids Res. 10:6487-6504]에 기재된 바와 같이 당업계에 잘 공지되어 있다. 간단히 설명하면, 변이체 아미노산을 코딩하는 핵산 서열은 목적하는 코돈 세트를 코딩하는 올리고뉴클레오티드 세트를 DNA 주형에 혼성화함으로써 생성되고, 여기서 주형은 가변 영역 핵산 주형 서열을 함유하는 단일 가닥 형태의 플라스미드이다. 혼성화 후, DNA 중합효소를 사용하여 주형의 전체 제2 상보성 가닥을 합성하고, 이는 따라서 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 것이고, 올리고뉴클레오티드 세트에 의해 제공되는 바와 같은 코돈 세트를 함유할 것이다.
- [0815] 일반적으로, 길이가 적어도 25개 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드가 사용된다. 최적 올리고뉴클레오티드는 돌연변이(들)을 코딩하는 뉴클레오티드(들)의 양 측면 상에서 주형에 완전히 상보성인 12 내지 15개의 뉴클레오티드를 가질 것이다. 이는 뉴클레오티드가 단일 가닥 DNA 주형 분자에 적절하게 혼성화할 것을 보장한다. 올리고뉴클레오티드는 문헌 [Crea et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978)]에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 기술을 사용하여 쉽게 합성된다.
- [0816] DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터로부터 유래된 벡터 (상업적으로 이용 가능한 M13mp18 및 M13mp19 벡터가 적합함), 또는 문헌 [Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987)]에 기재된 바와 같이 단일 가닥 파지 복제 기점 을 함유하는 벡터에 의해 생성된다. 따라서, 돌연변이시킬 DNA를 단일 가닥 주형을 생성하기 위해 상기 벡터 중 하나에 삽입시킬 수 있다. 단일 가닥 주형의 생산은 상기 문헌 [Sambrook et al.]의 섹션 4.21-4.41에 기재되어 있다.
- [0817] 천연 DNA 서열을 변경시키기 위해, 올리고뉴클레오티드를 적합한 혼성화 조건하에 단일 가닥 주형에 혼성화시킨다. 이어서, DNA 중합 효소, 보통 T7 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I의 Klenow 단편을 첨가하여, 합성을 위

한 프라이머로서 올리고뉴클레오티드를 사용하여 주형의 상보성 가닥을 합성한다. 따라서, DNA의 하나의 가닥이 유전자 1의 돌연변이형을 코딩하고, 다른 가닥 (원래의 주형)이 유전자 1의 천연의 비변경된 서열을 코딩하도록 이중이중체 분자가 형성된다. 이어서, 상기 이중이중체 분자를 적합한 숙주 세포, 보통 원핵세포, 예를 들어 이. 콜라이 JM101 내로 형질전환시킨다. 세포를 성장시킨 후 아가로스 플레이트 상에 플레이팅하고, 돌연변이된 DNA를 함유하는 박테리아 콜로니를 확인하기 위해 32-포스페이트로 방사성 표지된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 스크리닝한다.

[0818] 바로 앞에 기재된 방법은 플라스미드의 두 가닥이 모두 돌연변이(들)을 함유하는 동종이중체 분자가 생성되도록 변형될 수 있다. 변형은 다음과 같다: 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 상기 기재된 바와 같이 단일 가닥 주형에 어닐링시킨다. 3가지 데옥시리보뉴클레오티드, 즉, 데옥시리보아데노신 (dATP), 데옥시리보구아노신 (dGTP), 및 데옥시리보티미딘 (dT)의 혼합물을 dCTP-(aS)로 불리는 변형된 티오데옥시리보시토신 (아머샴 (Amersham)으로부터 입수가능함)과 합한다. 상기 혼합물을 주형-올리고뉴클레오티드 복합체에 첨가한다. DNA 중합효소를 상기 혼합물에 첨가하면, 돌연변이된 염기를 제외하고 주형에 동일한 DNA의 가닥이 생성된다. 또한, 상기 새로운 DNA 가닥은 dCTP 대신에 dCTP-(aS)를 함유할 것이고, 이는 제한 엔도뉴클레아제 소화로부터 보호하는 기능을 한다. 이중가닥 이중이중체의 주형 가닥을 적절한 제한 효소로 절단한 후, 주형 가닥을 ExoIII 뉴클레아제 또는 다른 적절한 뉴클레아제로 돌연변이를 유발시킬 부위(들)을 함유하는 영역을 지나서 소화시킬 수 있다. 이어서, 반응을 중지시켜 단지 부분적으로 단일 가닥인 분자를 남긴다. 이어서, 4가지 모든 데옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트, ATP, 및 DNA 리가제의 존재하에 DNA 중합효소를 사용하여 완전 이중가닥 DNA 동종이중체를 형성한다. 이어서, 상기 동종이중체 분자를 적합한 숙주 세포 내로 형질전환시킬 수 있다.

[0819] 앞서 나타낸 바와 같이, 올리고뉴클레오티드 세트의 서열은 주형 핵산에 혼성화하기에 충분한 길이이고, 또한 반드시는 아니지만 제한 부위를 함유할 수 있다. DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터로부터 유래된 벡터, 또는 문헌 [Viera et al (1987) Meth. Enzymol., 153:3]에 기재된 바와 같이 단일 가닥 파지 복제 기점을 함유하는 벡터에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 돌연변이시킬 DNA를 단일 가닥 주형을 생성하기 위해 상기 벡터 중 하나에 삽입되어야 한다. 단일 가닥 주형의 생산은 상기 문헌 [Sambrook et al.]의 섹션 4.21-4.41에 기재되어 있다.

[0820] 다른 방법에 따르면, 각각의 세트가 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오티드를 갖는 상류 및 하류 올리고뉴클레오티드 세트를 제공함으로써 라이브러리를 생성시킬 수 있고, 상기 상이한 서열은 올리고뉴클레오티드의 서열 내에 제공된 코돈 세트에 의해 확립된다. 상류 및 하류 올리고뉴클레오티드 세트는 가변 도메인 주형 핵산 서열과 함께 중합효소 연쇄 반응에서 사용되어 PCR 산물의 "라이브러리"를 생성할 수 있다. PCR 산물은 확립된 문자 생물학 기술을 이용하여 다른 관련 또는 비관련 핵산 서열, 예를 들어 바이러스 외피 단백질 및 이량체화 도메인과 융합될 수 있으므로 "핵산 카세트"로서 언급될 수 있다.

[0821] 올리고뉴클레오티드 세트는 주형으로서 가변 도메인 핵산 주형 서열을 사용하는 중합효소 연쇄 반응에서 사용되어 핵산 카세트를 생성할 수 있다. 가변 도메인 핵산 주형 서열은 표적 핵산 서열 (즉, 치환을 위해 표적화되는 아미노산을 코딩하는 핵산 서열)을 함유하는 중쇄 이뮤노글로불린 사슬의 임의의 부분일 수 있다. 가변 영역 핵산 주형 서열은 제1 핵산 가닥 및 상보성 제2 핵산 가닥을 갖는 이중 가닥 DNA 분자의 부분이다. 가변 도메인 핵산 주형 서열은 가변 도메인의 적어도 일부를 함유하고, 1종 이상의 CDR을 갖는다. 일부 경우에, 가변 도메인 핵산 주형 서열은 1개 초과의 CDR을 함유한다. 가변 도메인 핵산 주형 서열의 상류 부분 및 하류 부분은 상류 올리고뉴클레오티드 세트 및 하류 올리고뉴클레오티드 세트의 멤버와의 혼성화를 위해 표적화될 수 있다.

[0822] 상류 프라이머 세트의 제1 올리고뉴클레오티드는 제1 핵산 가닥에 혼성화할 수 있고, 하류 프라이머 세트의 제2 올리고뉴클레오티드는 제2 핵산 가닥에 혼성화할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 프라이머는 하나 이상의 코돈 세트를 포함하고, 가변 영역 핵산 주형 서열의 일부에 혼성화하도록 설계될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드를 사용하면 PCR 후에 2개 이상의 코돈 세트를 PCR 산물 (즉, 핵산 카세트) 내로 도입할 수 있다. 항체 가변 도메인을 코딩하는 핵산 서열의 영역에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프라이머는 아미노산 치환을 위해 표적화되는 CDR 잔기를 코딩하는 부분을 포함한다.

[0823] 상류 및 하류 올리고뉴클레오티드 세트는 또한 올리고뉴클레오티드 서열 내에 제한 부위를 포함하도록 합성될 수 있다. 상기 제한 부위는 추가의 항체 서열을 갖는 발현 벡터 내로 핵산 카세트 (즉, PCR 반응 산물)의 삽입을 용이하게 할 수 있다. 한 실시양태에서, 제한 부위는 외래 핵산 서열을 도입하거나 원래의 CDR 또는 프레임

워크 핵산 서열을 제거하지 않으면서 핵산 카세트의 클로닝을 용이하게 하도록 설계된다.

- [0824] 핵산 카세트는 PCR 반응을 통해 생성된 표적화된 아미노산 치환을 함유하는 일부 또는 전체 경쇄 또는 중쇄 서열의 발현을 위해 임의의 적합한 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 본 발명에 상세히 기재된 방법에 따라, 핵산 카세트를 전체 또는 일부의 바이러스 외피 단백질에 융합되고 (즉, 융합 단백질을 생성하는) 입자 또는 세포의 표면 상에 디스플레이되는 일부 또는 전체 경쇄 또는 중쇄 서열의 생산을 허용하는 벡터 내로 클로닝한다. 몇몇 종류의 벡터가 이용가능하고 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있지만, 파지미드 벡터가 비교적 쉽게 제작될 수 있고 쉽게 증폭될 수 있으므로 본원에서 사용하기 위해 바람직한 벡터이다. 파지미드 벡터는 일반적으로 프로모터, 신호 서열, 표현형 선별 유전자, 복제 기점 부위, 및 당업자에게 공지된 바와 같은 다른 필요한 성분을 포함한 다양한 성분을 함유한다.
- [0825] 특정 변이체 아미노산 조합이 발현되어야 할 때, 핵산 카세트는 전체 또는 일부의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 코딩할 수 있고 변이체 아미노산 조합을 코딩할 수 있는 서열을 함유한다. 라이브러리에서와 같이 상기 변이체 아미노산 또는 변이체 아미노산의 조합을 함유하는 항체의 생산을 위해, 핵산 카세트는 추가의 항체 서열, 예를 들어 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 가변 또는 불변 도메인의 전부 또는 일부를 함유하는 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 상기 추가의 항체 서열은 또한 다른 핵산 서열, 예를 들어 바이러스 외피 단백질을 코딩하는 서열에 융합될 수 있고, 따라서 융합 단백질의 생산을 허용한다.
- [0826] 쥐과동물 항-인간 STEAP-1 항체의 인간화를 본원에 기재하였다.
- [0827] 재료 및 방법
- [0828] 상기 번호는 카바트 규정에 따른다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]). 단일 문자 아미노산 약어를 사용하였다. DNA 다의성은 IUB 코드로 나타내었다 (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).
- [0829] 쥐과동물 120 가변 도메인의 클로닝 및 키메라 120 항체의 생성 - 표준 방법을 이용하여 M2-120.545를 생성하는 하이브리도마 세포 (본원에서 "쥐과동물 120" 또는 "mu120"으로 지칭됨)로부터 전체 RNA를 추출하였다. 가변 경쇄 (VL) 및 가변 중쇄 (VH) 도메인을 변성 프라이머를 사용하는 중쇄 및 경쇄로의 RT-PCR을 이용하여 증폭시켰다. 정방향 프라이머는 VL 및 VH 영역의 N-말단 아미노산 서열에 특이적이었다. 각각, 종간 보존성이 높은 불변 경쇄 (CL) 및 불변 중쇄 도메인 1 (CH1) 내의 영역에 어닐링되도록 LC 및 HC 역방향 프라이머를 설계하였다. 증폭된 VL 및 VH를 포유동물 발현 벡터에 클로닝하였다. 삽입체의 폴리뉴클레오티드 서열은 통상적인 서열분석 방법을 이용하여 결정하였다. M2-120.545 ("mu 120") VL 및 VH 아미노산 서열을 각각 도 2A 및 2B에 도시하였다.
- [0830] 쥐과동물 120 키메라 제조 - 쥐과동물 120 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL) 영역을 인간 IgG의 불변 도메인에 융합시켜 키메라 항-STEAP-1 항체를 제조하였다. 생성된 항체는 본원에서 "120 키메라", "키메라 120", "키메라 120 IgG" 또는 "Fc 키메라"로 지칭된다.
- [0831] 수용자 인간 컨센서스 프레임워크로의 직접적인 초가변 영역 이식 - 쥐과동물 120의 인간화 동안 구축된 변이체는 IgG 형태의 단백질 또는 파지 상에 디스플레이된 Fab 둘 모두로서 평가하였다.
- [0832] 상기 작업에 사용되는 파지미드는 1가의 Fab-g3 디스플레이 벡터로, phoA 프로모터 제어하의 2개의 오픈 리딩 프레임으로 이루어진다. 첫번째 오픈 리딩 프레임은 수용자 경쇄의 VL 및 CH1 도메인에 융합된 stII 신호 서열로 구성되고, 두번째는 소수의 파지 외피 단백질 P3이 뒤에 존재하는 수용자 중쇄의 VH 및 CH1 도메인에 융합된 stII 신호 서열로 이루어진다.
- [0833] 쥐과동물 120으로부터의 VL 및 VH 도메인을 인간 VL 카파 I (huKI) 및 인간 VH 하위군 III (huIII) 컨센서스 서열과 정렬하였다. CDR 이식편을 만들기 위해, 쥐과동물 120 항체로부터의 초가변 영역을 huKI 및 huIII 수용자 프레임워크로 이식하였다.
- [0834] 쥐과동물 120 항체 (mu120)로부터의 초가변 영역을 수용자 인간 컨센서스 프레임워크에 직접적인 CDR-이식편 (본원에서 "120 이식편" 또는 "이식편 120"으로 지칭됨)이 생성되도록 조작하였다. VL 도메인에서, 하기 영역이 인간 컨센서스 수용자에 이식되었다: 위치 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3). VH 도메인에서, 위치 26-35a (H1), 49-65 (H2) 및 95-102 (H3)가 이식되었다. 120 이식편의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 서열을 도 2A 및 2B에 도시하였다. CDR (또한, 여기서 HVR로 지칭됨)은 박스에 표시하였다 (도 2A 및 2B). 이들 CDR 정

의는 이들의 서열 초가변성 (카바트 참조), 이들의 구조적 위치 (코티아 참조) 및 항원-항체 접촉에서의 이들의 관계 (문헌 [MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)])에 의해 정의된 위치를 포함한다.

[0835] 각각의 초가변 영역에 대해 별도의 올리고뉴클레오티드를 이용하여 쿤켈 돌연변이유발에 의해 파지 상에 디스플레이된 Fab 또는 IgG로서 발현된 직접적인-이식편 변이체를 제조하였다. 올바른 클론을 DNA 서열분석으로 평가하였다.

[0836] 인간화 120 파지 변이체의 생성 - 인간화 120 변이체를 쿤켈 돌연변이유발에 의해 파지 상에 디스플레이된 Fab로 생성하였다. 인산화된 올리고뉴클레오티드를 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂ 중 쿤켈 주형 300 ng에 최종 부피 10 μ l로 첨가하였다. 혼합물을 90 °C에서 2 분 동안, 50 °C에서 5 분 동안 어닐링시킨 후에 얼음 상에서 냉각시켰다. 이어서, 어닐링된 주형을 10 mM ATP 0.5 μ l, 10 mM dNTP (각각 10 mM dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 0.5 μ l, 100 mM DTT 1 μ l, 10X TM 완충액 (0.5 M Tris pH 7.5, 0.1 M MgCl₂) 1 μ l, 80 U T4 리가제 및 4 U T7 폴리머라제를 20 μ l의 최종 부피로 2 시간 동안 실온에서 첨가하여 충전하였다. 이어서, 충전 및 라이게이션된 생성물을 XL1-블루 세포 (스트라타진)에 형질전환시켰다. 올바른 클론을 DNA 서열분석에 의해 확인하였다.

[0837] 올바른 파지 클론을 50 μ g/ml 카르베나실린 및 M13/KO7 헬퍼 파지 (MOI 10)를 함유하는 2YT 25 ml 중에서 밤새 37 °C에서 성장시켰다.

[0838] 인간화 120 변이체의 평가 - IgG로 발현된 인간화 변이체를 Steap1 양성 (293 Steap1 NT LB50) 및 음성 (293 벡터 S408) 세포주를 사용하여 FACS 분석으로 평가하였다.

[0839] 파지 상에 디스플레이된 Fab로서 발현된 인간화 변이체를 또한 FACS 분석으로 평가하였다. 파지 발현 Fab 변이체를 우선 Fab의 경쇄에 융합된 플래그-태그를 검출하는데 이용되는 파지 ELISA를 이용하여 이들의 Fab 디스플레이 수준에 대해 평가하였다. MaxiSorp 마이크로타이터 플레이트를 PBS 중 10 μ g/ml에서 밤새 항-gD 1766을 코팅한 후에, 카세인 차단제로 차단시켰다. 배양 상층액으로부터의 파지를 조직 배양 마이크로타이터 플레이트에서 0.5% BSA를 함유하는 PBST로 연속 희석하고, 1 시간 동안 코팅된 웰에 전달하여 Fab 디스플레이 파지를 포획하였다. 플레이트를 PBST로 세척하고, HRP 접합된 항-M13 (아미 sham 파마시아 바이오텍)을 40 분 동안 첨가하였다 (0.5% BSA를 함유하는 PBST 중 1:5000). 플레이트를 PBST로 세척하고, 테트라메틸벤지딘 기질 (키르케가드 앤드 페리 레보리토리즈(Kirkegaard and Perry Laboratories), 미국 매릴랜드주 게이더스버그 소재)을 첨가하여 현상하였다. 405 nm에서의 흡광도를 파지의 표면에서의 Fab 디스플레이 수준의 추정치로 사용하였다. 파지 제제를 희석하여 디스플레이를 위해 표준화시켰다. 낮은 디스플레이 파지 (예를 들면, 키메라)를 그대로 FACS 분석에 사용하였다.

[0840] 파지 결합의 FACS 분석의 경우, 2 mM EDTA를 사용하여 세포를 플레이트로부터 분리시키고, 15 mL 원추형 바닥 튜브에 수집하고, 원심분리에 의해 펠렛을 생성시켰다. 세포 (5×10^5 개 세포/샘플)을 다시 FACS 완충액 (1% FBS, 2 mM EDTA가 포함된 PBS) 중 파지 (디스플레이 수준에 의해 표준화됨) 100 mL에 혼탁시키고, 얼음 상에서 1 내지 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 원심분리에 의해 FACS 완충액으로 2회 세척하였다. 항-M13 5G7 대조군 항체 (제넨텍, 인크., 미국 캘리포니아주 샤우쓰 샌 프란시스코 소재)를 2 μ g/mL로 첨가하고, 얼음 상에서 적어도 45 분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 원심분리에 의해 FACS 완충액으로 2회 세척하였다. 항-마우스 PE (R-피코에리트린 염소 항-마우스 IgG Fcγ 단편, 잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch))의 1:200 희석액을 첨가하고, 얼음 상에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 다시 원심분리에 의해 FACS 완충액으로 2회 세척하고, FACS로 분석하였다.

[0841] FACS에 의한 IgG의 분석의 경우, 세포를 파지 FACS에서와 같이 준비하였다. 각각의 IgG를 얼음 상에서 1 시간 동안 5 μ g/mL로 첨가하였다. 샘플을 원심분리에 의해 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 항-인간 PE 접합체 (R-피코에리트린 염소 항-인간 IgG Fcγ 단편, 잭슨 이뮤노리서치)의 1:200 희석액을 30 분 동안 첨가하였다. 샘플을 다시 원심분리에 의해 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 샘플을 FACS로 분석하였다.

[0842] IgG 생산성 및 친화도 결정 - IgG를 단백질 G 친화도 크로마토그래피로 정제하였다. 친화도 결정은 293 STEAP-1 NT LB50 세포 상에서 스캐차드 분석에 의해 수행하였다.

결과 및 논의

[0844] 쥐과동물 120 가변 도메인 서열 및 CDR 배정 이식편 설계 - M2-120.545의 인간화에 사용되는 인간 수용자 프레임워크는 컨센서스 인간 카파 I VL 도메인 및 인간 하위군 IIII 컨센서스 VH 도메인을 기재로 한다. 쥐과동물

M2-120.545의 VL 및 VH 도메인을 각각 인간 카파 I 및 하위군 III 도메인과 정렬시키고, 각각의 상보성 영역 (CDR)을 확인하여 인간 수용자 프레임워크에 이식시켜, 파지 상에 Fab로서 디스플레이될 수 있고 IgG로 발현될 수 있는 CDR 이식편을 생성하였다. 인간화 항-STEAP-1 항체 형태 24 가변 영역의 서열을 도 2A 및 2B에 도시하였다. 파지 상에 디스플레이된 120-이식편 Fab 및 120-이식편 IgG를 FACS 분석에 의해 외인성 STEAP-1 발현 세포 (293 STEAP-1 NT LB50)에 대한 결합에 대해 시험하였다. 120-이식편 IgG는 STEAP-1 발현 세포에 특이적으로 결합하였으나, 120-이식편 IgG에 대해 관찰된 FACS 신호는 키메라 120 IgG에 대해 관찰된 것보다 작았으며, 이는 결합 친화도가 손실되었음을 나타낸다. 120-이식편 Fab를 디스플레이하는 파지는 또한 STEAP-1 발현 세포에서만 관찰되는 FACS 신호를 생성하였다. 이러한 이동은 키메라 120 IgG에 대해 관찰된 것보다 적었다. 120-이식편 IgG의 스캐차드 분석은 또한 결합 친화도 (120v.78의 경우 $KD = 36 \text{ nM}$; 120 이식편의 경우 $KD = 260 \text{ nM}$)가 유의하게 (대략 50-배) 손실되었음을 나타내었다.

[0845]

M2-120.545의 인간화 - CDR 형태 및 VL:VH 도메인 패킹에 영향을 미치는 대략 30개의 베니어 위치가 확인되었으며, 항체가 인간화되었을 때 이들 위치에서의 공여자 및 인간 프레임워크 사이의 변화가 고려되어야 한다 (문헌 [Foote, J. and Winter, G., J. Mol. Biol. 224(2):487-499 (1992)]). 쥐과동물 M2-120.545를 컨센서스 인간 카파 I VL 도메인 및 인간 하위군 III 컨센서스 VH 도메인과 정렬시켜 평가한 결과, VH 도메인의 6개의 핵심적인 베니어 위치:24, 37, 48, 67, 73, 78 (도 2B 참조)에서 서열 상이성이 나타났다. 이들 위치의 영향을 평가하기 위해, 쥐과동물 잔기를 개별적으로 파지 상의 Fab의 인간 컨센서스 하위군 III VH 도메인에 도입시켰다. 이는 개별적으로 파지 상에 디스플레이된 120-이식편 Fab에 대한 다음과 같은 돌연변이 제작과 관련된다: A24V (120.v24), V37I (120.v37), V48M (120.v48), F67I (120.v67) 및 L78F (120.v78). N73T는 시험하지 않았다. 각각의 파지 변이체는 파지 상에 디스플레이된 경쇄에 융합된 에피토프 태그의 적정에 의해 결정된 등가의 Fab 디스플레이 수준으로 희석시켜 표준화시킨 후에, STEAP-1-발현 세포 (293 STEAP-1 NT LB50) 및 비-발현 (293 벡터 S408) 세포 상에서의 FACS 분석으로 STEAP-1에 대한 결합에 대해 평가하였다. 용어 "2°"는 FACS 분석에서 2차 항체를 나타낸다. 용어 "α-120"은 쥐과동물 120 항-STEAP-1 항체를 나타낸다. 용어 "α-10H1"은 대조군 항체를 나타낸다. 용어 "24 파지", "37 파지" 등은 파지 상에 디스플레이된 본원에 개시된 바와 같은 인간화 항-STEAP-1 변이체를 나타낸다. "Ch 120 파지"는 파지 상에 디스플레이된 120 키메라를 나타내고, "120-이식편 파지"는 파지 상에 디스플레이된 120 이식편을 나타낸다 (도 6). Fab 디스플레이 수준에 의한 파지 클론의 표준화의 중요성은 상이한 파지 타이터: 7×10^{12} 파지/ml (도 6) 및 2×10^{11} 파지/ml (도 6)에서 120-이식편의 FACS 분석으로 설명한다. 보다 낮은 파지 농도로 희석되면, 120-이식편 파지는 관찰가능한 FACS 이동을 더 이상 생성하지 않는다. 따라서, 디스플레이 수준이 상이한 파지 클론의 표준화는 Steap1에 대한 이들의 친화도 차이를 평가하는데 중요한 단계이다.

[0846]

Fab 디스플레이 수준에 대한 표준화에 이어, 추가의 돌연변이 A24V (120.v24)를 함유하는 120-이식편의 변이체는 다른 변이체 보다 우수한 FACS 이동을 생성하였다 (도 6). IgG로 발현되었을 때, 120.v24는 시험된 모든 농도에서 키메라 120 항체와 유사한 FACS 이동을 생성하였다. 이후의 120.v24의 스캐차드 분석은 293 STEAP-1 NT LB50 세포에 대한 결합에 대해 2.2 nM의 Kd 를 나타내었으며, 이는 120 키메라 및 본래 쥐과동물 M2-120.545에 비해 2-배 향상된 것이다 (표 2).

표 2

세포 표면 STEAP-1에 대한 항-STEAP-1 항체 결합 친화도 (Kd (nM))			
세포주	쥐과동물 항-STEAP-1 Mab 120.545 nM	120 키메라	인간화 항-STEAP-1 120v.24
PC3-PS5.4 (외인성 STEAP-1)	17.5 nM 187,256개 부위/셀	9.9 nM 103,204개 부위/셀	---
293.LB50 (외인성 STEAP-1)	4.7 nM 301,100개 부위/셀	4.9 nM 252,892개 부위/셀	2.2 nM 264,172개 부위/셀
LNCaP-BR (내인성 STEAP-1)	1.5 nM 32,207개 부위/셀	0.9 nM 22,021개 부위/셀	---

[0848]

항-STEAP-1 네이키드 항체, 쥐과동물 120 및 키메라 120의 결합 활성을 또한 FACS 분석을 이용하여 시험하였다. 결합을 LNCaP 세포내 293 안정한 STEAP-1 NT LB50, PC3 안정한 STEAP-1 PS5.4, 및 내인성 STEAP-1에서 외인성 STEAP-1에 대해 비교하였다. 그 결과를 또한 도 7D 내지 7F에 도시하였다. 세포 표면에서 외인성 인간 STEAP-1을 발현시키는 NT LB50 세포는 293 세포 (ATCC CRL-1573)를 인간 STEAP-1 DNA로 안정하게 형질전환시켜 제조

하였다. 세포 표면에서 외인성 인간 STEAP-1을 발현시키는 PS5.4 세포는 PC3 (ATCC CLL-1435)을 인간 STEAP-1 DNA로 안정하게 형질전환시켜 제조하였다. LNCaP 세포 (ATCC CRL-1740)는 STEAP-1을 내재적으로 발현시킨다.

[0849] 실시예 2: 항-STEAP-1 항체의 특성화

항-STEAP-1 항체 (네이키드 항체 및 항체 약물 접합체, 본원에 개시되어 있음)를 표준 방법에 따라 특성화하거나 또는 특성화할 수 있다.

[0851] ELISA-기재 분석: ELISA에 의한 항-STEAP-1 항체 스크리닝은 다음과 같이 수행하였으며, 이 때 모든 인큐베이션을 실온에서 수행하였다. 시험 플레이트 (넌크(Nunc) 이뮤노플레이트)를 50 mM 탄산나트륨 완충액 (pH 9.6) 중에서 2 시간 동안 정제된 STEAP-1로 코팅한 후에, 인산염 완충 염수 (PBS) 중에서 30 분 동안 0.5% 소 혈청 알부민으로 차단한 다음 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS (PBST)로 4회 세척하였다. 시험 항체 상층액을 첨가하고, 진탕시키면서 2 시간 동안 인큐베이션한 후에 PBST로 4회 세척하였다. o-페닐렌디아민 디히드로클로라이드 (시그마, #P8287) 10 mg 및 시트르산 인산염 완충액 (pH 5.0) 25 ml 중 30% 과산화수소 용액 10 μ l를 함유하는 용액 100 μ l/웰을 첨가하여 플레이트를 현상하고, 15 분 동안 인큐베이션하였다. 2.5 M 황산 100 μ l/웰을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 490 nm의 흡광도에서 자동 ELISA 플레이트 판독기로 플레이트를 판독하여 데이터를 수득하였다.

[0852] 스캐차드 분석에 의한 항-STEAP-1 결합의 특성화:

모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들면 관련 분야에 잘 알려져 있는 표준 기술을 이용하여 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]에 기재된 스캐차드 분석으로 결정할 수 있다. 또한, [Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 (1947)]을 참조한다.

[0854] 실시예 3: 항-STEAP-1 항체 약물 접합체의 생산성

항-STEAP-1 아우리스타틴 ADC의 생산성 - 항-STEAP-1 ADC는 항-STEAP-1 항체 쥐과동물 120.545, 120 키메라, 120 이식편 및 인간화 120 프레임워크 변이체를 다음과 같은 약물-링커 잔기:spp-DM1, smcc-DM1, MC-vc-PAB-MMAE; MC-vc-PAB-MMAF; MC-MMAE, MC-MMAF, vc-MMAE, 및 vc-MMAF에 접합시켜 생성하였으며, 이 약물 및 링커 잔기 및 부착 방법은 본원에 뿐만 아니라, WO 2004/010957 (2004년 2월 5일 공개), WO2006/034488 (2005년 9월 9일 공개), 및 문헌 [Doronina, S.O. et al., Nature Biotechnol. 21:778-784 (2003)] (이들 참조문헌은 각각 그 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 개시되어 있다. 접합시키기 전에, WO 2004/010957에 기재된 방법에 따른 표준 방법을 이용하여 항체를 TCEP로 부분적으로 환원시켰다. 부분적으로 환원된 항체는 문헌 [Doronina et al (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784] 및 US 2005/0238649 A1에 기재된 방법에 따른 표준 방법을 이용하여 상기 약물-링커 잔기에 접합시킨다. 요컨대, 부분적으로 환원된 항체를 약물 링커와 합하여 시스테인 잔기에 대한 잔기의 접합을 허용한다. 접합 반응을 켄칭하고, ADC를 정제하였다. 각각의 ADC에 대한 약물 로딩 (항체 당 약물 잔기의 평균 개수)을 HPLC로 결정하였다. 본원에 사용된 ADC의 링커-약물 성분, "-MC-vc-PAB-MMAE" 또는 "-MC-vc-PAB-MMAF"는 "-vcMMAE" 또는 "-vcMMAF"로 줄여서 지칭하기도 하고, 성분 "-MC-MMAF"는 "MCMMAF" 또는 "mcMMAF"로 줄여서 지칭하기도 한다.

항-STEAP-1 메이탄신노이드 ADC의 생산성 - 항-STEAP-1 ADC는 항-STEAP-1 항체, 쥐과동물 120, 120 키메라, 120 이식편 및 인간화 120 프레임워크 변이체를 링커 약물 모이어티 -smcc-DM1에 접합시켜 생성하였다. 이러한 접합은 헤르셉틴® 항-HER2 항체의 접합에 대해 WO 2005/037992에 개시된 방법에 따라 수행할 수 있다.

[0857] 실시예 4: 생체내 종양 부피 감소 분석

독소-접합된 또는 접합되지 않은 항-STEAP-1 모노클로날 항체를 생체내 및 시험관내에서 종양 부피를 감소시키는 능력에 대한 효능에 대해 시험하기 위해, 다음과 같은 프로토콜이 이용된다.

포유동물 세포주 및 인간 종양 이종이식편: 293은 인간 영구화 배아 신장 세포주 (ATCC 참조번호 CRL1573)이고, PC-3은 인간 전립선 선암종 세포주 (ATCC 참조번호 CRL1435)이고, LNCaP는 전립선암종 세포주 (ATCC CRL1740)이다. 모든 세포는 50/50 둘베코 변형된 이글 고글루코스 배지, 10% 태아 소 혈청 (FBS)이 보충된 Ham의 F12, 2 mM 글루타민, 1% 페니실린-스트렙토마이신 중에서 성장시키고, 5% CO₂ 중에서 37 °C에서 배양하였다. 293 및 PC-3 안정한 세포주를 전장 STEAP1 (각각 LB50 및 PS5.4) 또는 공백터를 코딩하는 사이토메갈로바이러스-유래의 벡터로 형질감염 (퓨젠(Fugene), 로슈)시켜 생성하고, 400 μ g/ml G418에서 선별하였다 (제네티신 (Geneticin), 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)). 인간 전립선 외식편 모델, LuCAP 77 및 LuCAP 35V를 시애틀 대학 (University of Seattle)으로부터 입수하였다.

[0860]

세포 표면에서의 외인성 및 내인성 STEAP-1의 발현을 다음과 같이 면역조직화학 (IHC) 및 FACS 분석으로 입증하였다. 양 및 마우스 항-STEAP-1 항체 (아젠시스, 인크. (Agensys, Inc.), 미국 캘리포니아주 산타 모니카 소재)를 STEAP-1의 세포내 아미노-말단 웹티드에 대해 생성하였다 (문헌 [Hubert, R.S., Vivanco, I. et al., PNAS 25:14523-14528 (1999)] 참조). STEAP-1의 세포외 도메인에 대한 모노클로날 항체 (아젠시스, 인크.)는 마우스를 STEAP-1로 일시적으로 형질감염된 293T 세포로 면역화시켜 생성하였다. IHC 분석의 경우, 1차 양 항-STEAP-1 항체를 검출에 사용하였다. FACS 분석의 경우, 세포를 90% 전면성장률로 성장시키고, PBS 중 2 mM EDTA를 사용하여 플레이트로부터 분리하였다. 세포를 세척하고, FACS 완충액 (1% BSA를 갖는 PBS)에 다시 혼탁시키고, 실온에서 60 분 동안 항-STEAP1 항체와 인큐베이션한 후에, 피코에리트린에 접합된 적절한 2차 항체와 60 분 동안 인큐베이션하였다. 분석은 FACS스캔 (BD 바이오사이언스(BD Biosciences)) 상에서 수행하였다. 면역형광법의 경우, 세포를 밤새 캠버 슬라이드에서 성장시킨 후에, 37 °C에서 60 분 동안 1차 항체와 인큐베이션하였다. 세포를 파라포름알데히드로 고정시키고, 1% BSA로 차단하고, 플로우레신에 접합된 적절한 2차 항체와 인큐베이션하였다.

[0861]

생체내 전립선암 이종이식편 모델을 사용하여 항-STEAP-1 ADC의 효능을 시험하였다. 이들 모델은 인간 세포주 LNCaP (ATCC CRL-1740 또는 서던 리서치 인스티튜트(Southern Research Institute), 미국 앤더래마주 베밍엄 소재)를 포함하였다. 전립선 외식편 모델은 LuCaP 77 및 LuCaP35V (워싱턴 대학(University of Washington), 미국 워싱턴주 시애틀 소재)를 포함하였다. 각각의 전립선 외식편 모델은 거세되거나 (안드로겐 독립적 모델, LuCAP 35V) 또는 거세되지 않은 (안드로겐 의존적 모델, LuCAP 77) 수컷 SCID-베이지색 마우스 (찰스 리버 레보러토리(Charles River Lab.)로부터 입수)에 연속적으로 이식하여 유지시켰다. 거세되지 않은 마우스에게는 테스토스테론 펠렛을 투여한 후에 이식한 반면, 거세는 적어도 종양 이식 2 주 전에 수행하여 테스토스테론 수준이 최저점에 있도록 하였다. 공여자 마우스가 800 내지 1000 mm³의 종양을 갖는 경우, 종양 조직을 무균 분리하여, 연구 동물용인 작은 이식가능한 크기의 조각으로 절개하였다 (대략 20 mm³). 종양을 이식 부위에서 포켓에 넣고, 창상 클립을 사용하여 피부를 덮었다. LNCaP 세포주 모델의 경우, 시험관내에서 성장한 LNCaP 세포를 50% 마트리겔 중에서 마우스 당 8 내지 10×10⁶개 세포로, 테스토스페론 펠렛을 투여한 수컷 SCID-베이지색 마우스에게 주사하였다. 평균 종양 크기가 100-200 mm³에 도달하였을 때, 동물을 무작위적으로 각각 10 마리씩 10개의 군으로 분류하고, 시험 항체 ADC 또는 대조군 항체 (네이키드 또는 대조군 항체)를 단일 IV 투여하였다. 일부 경우에는, 시험 또는 대조군 항체의 다중 투여량을 투여하였다 (도 8A, 9 및 10 참조). 일부 경우에는, 시험 및 대조군 항체의 단일 투여량을 투여하였다 (도 8B 및 11 참조). 전립선 외식편 모델이 LuCap 77인 경우, 테스토스테론 펠렛은 외인성 종양을 이식하기 대략 3 내지 7일 전에 마우스에 이식하였다. 종양을 4 주 동안 일주일에 2회 측정한 후에, 나머지 연구 기간 동안 일주일에 1회 또는 2회 측정하거나 또는 전체 연구 기간 동안 일주일에 1회 측정하였다. 시간이 경과함에 따라 시험 동물에서 종양 부피가 유의하게 감소되는 것을 효능의 지표로 간주한다. 몇몇 경우에, 종양 부피는 처음 부피에서 유의하게 감소하여 전체 연구 기간 동안 낮은 수준으로 유지되었다. 그 결과를 도 8 내지 11에 도시하였다.

[0862]

항-STEAP-1 아우리스타틴 약물 접합체는 생체내에서 전립선 종양 부피를 감소시킨다.

[0863]

쥐과동물 항-STEAP-1 120-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg)의 투여는 전립선 종양 (LNCaP-Ner 세포) 이종이식편 모델에서 효능이 있는 것으로 나타났다. PBS 및 항-gp120-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg)는 대조군으로 사용하였다. 투여량은 제0일, 제7일 및 제14일에 투여하였다. 도 8A를 참조한다.

[0864]

인간화 항-STEAP-1 항체 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg), 120v.24-MC-MMAF (12 mg/kg) 및 항-STEAP-1 120 키메라-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg)를 LNCap-Ner 종양을 이식한 SCID 베이지색 마우스 (본원에 기재된 바와 같이 테스토스테론 펠렛으로 쳐치됨)에게 투여하는 것이 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. 비히클, 항-두드러기쑥-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) 및 항-두드러기쑥-MC-MMAF (12 mg/kg)를 대조군으로 사용하였다. 투여량은 도 8에 표시된 날에 투여하였다. 그 결과를 도 8B에 도시하였다.

[0865]

항-STEAP-1 항체 120 키메라-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) 및 항-STEAP-1 120 키메라-MC-MMAF (6 mg/kg)는 LNCaP 세포를 이식한 SCID-베이지색 마우스의 전립선암 이종이식편 모델에서 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. 마우스에게 대략 제15일, 제25일 및 제30일에 3 mg/kg (항-STEAP-vcMMAE) 또는 6 mg/kg (항-STEAP-mcMMAF)을 3회 투여하였다. 대조군 항-두드러기쑥-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg) 및 항-두드러기쑥-MC-MMAF (6 mg/kg)를 사용하였다. 도 9를 참조한다.

[0866]

인간화 항-STEAP-1 항체 120 키메라-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg)를 투여하는 것이 LuCap 77 세포를 이식한 SCID

베이지색 수컷 마우스 (안드로겐 의존적)의 전립선암 이종이식편 모델에서 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. 대조군은 비히를 및 항-두드러기쑥-MC-vc-PAB-MMAE이었다. 시험 및 대조군 항체 (3 mg/kg)를 3회 투여하였다. 도 10을 참조한다.

[0867] 인간화 항-STEAP-1 항체 120v.24-MC-vc-PAB-MMAE (3 mg/kg), 항-STEAP-1 항체 120v.24-MC-MMAF (6 mg/kg 및 12 mg/kg)을 LuCap35V 전립선 종양을 이식한 거세된 SCID-베이지색 마우스에 투여하는 것인 대조군에 비해 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. 약물 로딩은 항체 당 3.1이었다. 대조군 항체는 항-두드러기쑥-MC-MMAF (12 mg/kg으로 투여됨) 및 항-gp120-MC-vc-PAB-MMAE (6 mg/kg으로 투여됨)이었다. 도 11을 참조한다.

[0868] 항-STEAP-1 아우리스타틴 약물 접합체는 시험관내에서 전립선 종양 부피를 감소시킨다.

[0869] 시험관내 세포 사멸 분석을 수행하여 항-STEAP-1 약물 접합체가 STEAP-1을 발현하는 세포의 성장을 억제하고/거나 사멸시키는 효과를 평가하였다. 요컨대, STEAP-1을 발현하는 세포를 96웰 플레이트에서 대략 2,000개 세포/웰로 플레이팅하고, 24 시간 후에 항체 약물 접합체로 2회 반복하여 처리하였다. 플레이트를 37 °C에서 5 내지 7일 동안 인큐베이션하고, 셀타이터-글로® 발광 세포 생존능력 분석 키트 (프로메가, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)로 현상하였다. 시험 세포는 PS5.4 (외인성 STEAP-1을 발현하는 PC3 세포), LB50 (외인성 STEAP-1을 발현하는 293 세포), 벡터만으로 형질감염된 PC3 세포, 벡터만으로 형질감염된 293 세포, 및 내인성 STEAP-1을 발현하는 LNCaP 세포를 포함한다. 시험된 항체 약물 접합체를 대조군 항체-MC-MMAF, 대조군 항체-vc-MMAE, 항-STEAP-1 항체 120 키메라-vc-MMAE, 항-STEAP-1 항체 120 키메라-MC-MMAF (2개의 상이한 양의 물질) 및 항-STEAP-1 항체 키메라-vc-MMAF를 포함한다. 그 결과를 도 14A-E에 도시하였다.

[0870] 실시예 5: 환원 및 산화환원에 의한 접합용 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체의 제조

[0871] 전장 시스테인 조작된 항-STEAP-1 모노클로날 항체 (ThioMab)를 CHO 세포에서 발현시키고, 500 mM 보론산나트륨 및 500 mM 염화나트륨에 약 pH 8.0에서 용해시키고, 약 50 내지 100 배 과량의 1 mM TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드, 문헌 [Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA])로 약 1 내지 2 시간 동안 37 °C에서 환원시켰다. 환원된 ThioMab를 희석하고, 10 mM 아세트산나트륨 (pH 5) 중에서 HiTrap S 컬럼에 로딩하고, 0.3M 염화나트륨을 함유하는 PBS로 용리하였다. 용출된 환원 ThioMab를 2 mM 데히드로아스코르브산 (dHAA)으로 pH 7에서 3 시간 동안 처리하거나, 또는 2 mM 수성 황산구리 (CuSO₄)로 실온에서 밤새 처리하였다. 주변 공기 산화가 또한 효과적일 수 있다. 세파텍스(Sephadex) G25 수지 상에서 용리하여 완충액을 교환하고, 1 mM DTPA를 포함하는 PBS로 용리하였다. 티올/Ab 값은 용액의 280 nm에서의 흡광도로부터 환원된 항체 농도를 결정하고, DTNB (알드리치(Aldrich), 미국 위스콘신주 밀워키 소재)와의 반응 및 412 nm에서의 흡광도 결정에 의해 티올 농도를 결정하여 확인하였다.

[0872] 실시예 6: 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 및 약물-링커 중간체의 접합에 의한 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 약물 접합체의 제조

[0873] 실시예 5의 환원 및 산화환원 절차 이후에, 시스테인 조작된 항-STEAP 항체를 PBS (인산염 완충 염수) 완충액에 용해시키고, 열음 상에서 냉각시켰다. 항체 당 조작된 시스테인에 비해 약 1.5 몰당량의 아우리스타틴 약물 링커 중간체 (예를 들면, MC-MMAE (말레이미도카프로일-모노메틸 아우리스타틴 E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE 또는 MC-val-cit-PAB-MMAF)를 티올-반응성 관능기 (예를 들면, 말레이미드)와 DMSO에 용해시키고, 아세토니트릴 및 물로 희석하고, PBS에서 냉각시킨 후에 환원, 산화환원된 항체에 첨가하였다. 약 1 시간 후에, 과량의 말레이미드를 첨가하여 반응을 켄칭하고, 임의의 반응하지 않은 항체 티올기를 캡핑(cap)하였다. 반응 혼합물을 원심분리 초여과에 의해 농축하고, 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 약물 접합체를 정제하여 PBS 중 G25 수지를 통한 희석에 의해 탈염시키고, 멸균 조건하에 0.2 μ m 필터를 통해 여과하고, 동결시켜 보관하였다.

[0874] 상기 절차에 의해, 아래 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 약물 접합체를 제조하였다 (여기서, 변이체에 대한 넘버링 (경쇄의 경우 카바트 넘버링 및 중쇄의 경우 EU 넘버링)은 본원 및 도 17에 제공된 바와 같이 표준화시켰다):

[0875] 경쇄 V205C thio hu 120 및 MC-MMAF의 접합에 의한 thio 인간120-MC-MMAF;

[0876] 중쇄 A118C thio hu 120 및 MC-MMAF의 접합에 의한 thio 인간120-MC-MMAF;

[0877] 경쇄 V205C thio hu 120 및 MC-val-cit-PAB-MMAE의 접합에 의한 thio 인간120-MC-val-cit-PAB-MMAE; 및

[0878] 중쇄 A118C thio hu 120 및 MC-val-cit-PAB-MMAE의 접합에 의한 thio 인간 120-MC-val-cit-PAB-MMAE.

[0879] 실시예 7: 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체의 특성화

상기 기재된 바와 같이 제조된 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 약물 접합체 (TDC)를 분석하여 이들이 시험관내에서 모 항체의 활성을 보유하는지 확인하였다. 항-STEAP-1 TDC thio-인간120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) (huSteap1 TDC (L205C) vcE로 줄여서 지칭함) 및 thio-인간120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huSteap1 TDC (HCA118C) vcE로 줄여서 지칭함)를 STEAP-1-발현 세포 (293 STEAP-1 NT LB50) 및 비-발현 (293 벡터 S408) 세포 상에서 FACS 분석에 의해 STEAP-1에 대한 결합에 대해 평가하였다. 용어 "2nd 단독"은 FACS 분석에서 2차 항체를 나타낸다. TDC 대조군 (vcE) 및 ADC std 대조군 (vcE)은 각각 대조군 항체 thio 및 비-thio vc-PAB-MMAE 약물 접합체이다. huSteap1 ADC (std)는 모 인간 항-STEAP-1 항체로부터 유래된 vc-PAB-MMAE 약물 접합체이다. 도시한 바와 같이, TDC는 모 huSteap1 ADC의 것과 유사한 FACS 이동을 생성하였다.

[0881] 시험관내 세포 사멸 분석을 수행하여 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 약물 접합체가 STEAP-1을 발현하는 세포의 성장을 억제하고/거나 사멸시키는 효과를 평가하였다. 요컨대, STEAP-1을 발현하는 세포를 96-웰 플레이트에 대략 2,000개 세포/웰로 플레이팅하고, 24 시간 후에 항체 약물 접합체로 2회 반복하여 처리하였다. 플레이트를 37 °C에서 5 내지 7일 동안 인큐베이션하고, 셀타이터-글로® 발광 세포 생존능력 분석 키트 (프로메가, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)로 현상하였다. 시험 세포는 PS5.4 (외인성 STEAP-1을 발현하는 PC3 세포), LB50 (외인성 STEAP-1을 발현하는 293 세포) 및 내인성 STEAP-1을 발현하는 LNcaP 세포를 포함한다. 시험된 항체 약물 접합체는 대조군 항체-vc-MMAE (ADC std 대조군 (vcE)), 대조군 thio 항체-vc-MMAE (TDC 대조군 (vcE)), 항-STEAP-1 TDC thio-인간120-vc-PAB-MMAE (LCV205C) (huSteap1 TDC (L205C) vcE로 줄여서 지칭함) 및 thio-인간120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huSteap1 TDC (HCA118C) vcE로 줄여서 지칭함), 및 huSteap1 ADC (std), vc-PAB-MMAE 약물 접합체 (모 인간 항-STEAP-1 항체로부터 유래됨)를 포함한다. 도 19A-C에 도시한 바와 같이, 항-STEAP-1 TCD는 시험관내에서 모 ADC의 활성을 보유하였다.

[0882] 실시예 8: 시스테인 조작된 항-STEAP-1 항체 약물 접합체에 대한 생체내 종양 부피 감소 분석

[0883] 생체내 전립선암 이종이식편 모델을 사용하여 시스테인-조작된 항-STEAP-1 ADC의 효능을 시험하였다. 이들 모델 및 이용되는 시험 프로토콜은 실시예 4에 기재된 바와 상응한다.

[0884] 항-STEAP-1 TDC thio-인간120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huSteap1 HC TDC vcE로 줄여서 지칭함) (3 mg/kg)를 LNCap-Ner 종양을 이식한 SCID 베이지색 마우스 (본원에 기재된 바와 같이 테스토스테론 펠렛으로 처리함)에 투여하는 것은 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. 비히클 (PBS), 대조군 항체-vc-MMAE (ADC std ctrl vcE) 및 대조군 thio 항체-vc-MMAE (TDC HC ctrl vcE)를 대조군으로 사용하였다. 항-STEAP-1 TDC의 효과를 또한 양성 대조군으로서의 인간 항-STEAP-1 항체 120-MC-vc-PAB-MMAE (hu Steap1 std ADC vcE)와 비교하였다. 단일 투여량을 제0일에 투여하였다. 모든 항체는 3 mg/kg으로 투여하였다. 그 결과를 도 20에 도시하였다.

[0885] 도 21은 항-STEAP-1 TDC thio-인간120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huSteap1 HC TDC vcE로 줄여서 지칭함) 3 mg/kg 및 항-STEAP-1 TDC thio-인간120-MC-MMAF (HCA118C) (huSteap1 HC TDC mcF로 줄여서 지칭함) 1, 3 또는 6 mg/kg을 투여하는 것이 LNCaP 세포를 이식한 SCID-베이지색 마우스의 전립선암 이종이식편 모델에서 효능이 있는 것으로 나타났음을 보여준다. 마우스에게 제0일에 0.3, 1 또는 3 mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE) 또는 1, 3 또는 6 mg/kg (huSteap1 HC TDC mcF)을 단일 투여하였다. 비히클 (PBS), 대조군 항체-vc-MMAE (ADC std ctrl vcE) 및 대조군 thio 항체-vc-MMAE (TDC HC ctrl vcE)를 대조군으로 사용하였다.

[0886] 도 22는 항-STEAP-1 TDC thio-인간120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huSteap1 HC TDC vcE로 줄여서 지칭함) 3 mg/kg 및 항-STEAP-1 TDC thio-인간120-MC-MMAF (HCA118C) (huSteap1 HC TDC mcF로 줄여서 지칭함) 3 또는 6 mg/kg을 투여하는 것이 LuCap 35V 세포를 이식한 SCID 베이지색 수컷 마우스 (안드로겐 의존적)의 전립선암 이종이식편 모델에서 효능이 있는 것으로 나타났음을 보여준다. 마우스에게 제0일에 0.3, 1 또는 3 mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE) 또는 1, 3 또는 6 mg/kg (huSteap1 HC TDC mcF)을 단일 투여하였다. 비히클 (PBS), 대조군 항체-vc-MMAE (ADC std ctrl vcE) 및 대조군 thio 항체-vc-MMAE (TDC HC ctrl vcE)를 대조군으로 사용하였다.

[0887] 실시예 9: 항체 120 변이체 24로부터의 항-STEAP-1 항체 SGIV의 제조 및 특성화

[0888] 경쇄 및 프레임워크 영역을 추가로 변형시켜 향상된 항체 발현 수준을 달성한 다른 LC 항-STEAP-1 항체 변이체를 제조하였다.

[0889] 재료 및 방법

[0890] 잔기 번호는 카바트에 따른다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th

Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). 단일 문자 아미노산 약어를 사용하였다. DNA 다의성은 IUB 코드를 사용하여 나타내었다 (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

[0891] 변경된 경쇄 변이체의 제조: "심몬스 IV" 또는 간략하게 "SGIV"로 지칭되는 120.v24 항체의 변이체를 제조하여 특성화하였다. SGIV 경쇄의 아미노산 서열은 서열 90에 제공되어 있다. 이 서열을 (mu 120 항체 (서열 5) 및 120.v24 항체 (서열 91)의 상응하는 영역과 정렬됨) 도 23에 도시하였다.

[0892] 변이체 120.v24와 비교한 변이체 SGIV의 평가 - IgG로 발현된 SGIV 및 120.v24 항체를, 안정하게 형질전환된 Steap1 양성 세포주 293 Steap1 NT LB48, 293 Steap1 NT LB50, 및 293 Steap1 NT LB53를 이용할 뿐만 아니라 내인성 STEAP-1을 발현하는 LNCaP 세포에서, FACS 분석에 의해 평가하였다 (도 28). 세포를 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다. 각각의 IgG를 열음 상에 1 시간 동안 5 μ g/mL로 첨가하였다. 샘플을 원심분리에 의해 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 항-인간 PE 접합체 (R-피코에리트린 염소 항-인간 IgG Fc'y 단편, 잭슨 이뮤노리서치)의 1:200 희석액을 30 분 동안 첨가하였다. 샘플을 다시 원심분리에 의해 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 샘플을 FACS로 분석하였다.

[0893] STEAP-1에 대한 SGIV 및 120.v24 결합의 스캐차드-기재의 친화도 결정 - STEAP-1에 대한 120.v24 및 심몬스 IV ("SGIV") 항체의 결합 친화도를 표준 방법에 따라 스캐차드 분석을 이용하여 결정하였다. IgG를 단백질 G 친화도 크로마토그래피로 정제하였다. 친화도 결정은 PC-3-PS5.4, 293-LB50 및 LNCaP-BR 세포에서 스캐차드 분석에 의해 2회 반복 수행하였다. LNCaP BR 세포 및 293.LB50 세포에서의 120.v24 및 SGIV의 스캐차드 플롯을 각각 25 및 26에 도시하였다. PC-3-PS5.4, 293-LB50 및 LNCaP-BR 세포 뿐만 아니라, STEAP-1을 일시적으로 발현하는 293 세포에서의 mu 1789, mu 120, Fc 키메라, 인간화 120.v24, thio-120.v24 및 thio-SGIV에 대한 평균 결합 친화도를 비교한 표를 도 27에 도시하였다.

[0894] SGIV 및 120.v24의 부위 지정 돌연변이유발: SGIV 및 120.v24 항체의 변이체를 상기 기재된 바와 같은 표준 돌연변이유발 프로토콜을 이용하여 제조하였다. 제1 부류의 변이체는 부위-지정 돌연변이유발로부터 생성되며, 이 때 심몬스 IV ("SGIV")의 특정 잔기는 결합 친화도를 더 향상시키기 위해 120.v24의 상응하는 잔기로 치환하였다. 생성된 특이적 변이체는, 도 24에 도시한 바와 같이, 다음과 같다:

[0895] (1) LS.VLVH1 (여기서, 잔기 42 ("Q") 및 43 ("P")은 각각 "K" 및 "A"로 변형됨 (서열 92)),

[0896] (2) LS.VLVH2 (여기서, 잔기 3 ("V")은 "Q"로 변형되고, 잔기 42 ("Q") 및 43 ("P")은 각각 "K" 및 "A"로 변형되고, 잔기 85 ("V")는 "T"로 변형됨 (서열 93)),

[0897] (3) LS.Q (여기서, 잔기 3 ("V")은 "Q"로 변형됨 (서열 94)),

[0898] (4) LS.CH1 (여기서, 잔기 15 ("L")은 "V"로 변형되고, 잔기 83 ("V")은 "F"로 변형됨 (서열 95)).

[0899] 제2 부류의 변이체를 부위-지정 돌연변이유발을 통해 제조하였으며, 여기서 120.v24의 특정 잔기는 항체 발현 수준을 향상시키기 위한 노력으로 심몬스 IV (SGIV)의 상응하는 잔기로 치환하였다. 특이적 변이체는, 도 24에 도시한 바와 같이, 다음과 같다:

[0900] (1) ED.FW1 (여기서, 잔기 3 ("Q")은 "V"로 변형되고; 잔기 9 ("S")는 "D"로 변형되고; 잔기 12 ("S")는 "A"로 변형되고; 잔기 13 ("A")은 "V"로 변형되고; 잔기 15 ("V")는 "L"로 변형되고; 잔기 17 ("D")은 "E"로 변형되고; 잔기 19 ("V")는 "A"로 변형되고; 잔기 22 ("T")는 "N"으로 변형됨 (서열 96)),

[0901] (2) ED.FW2 (여기서, 120.v24의 잔기 42 ("K") 및 43 ("A")은 각각 "Q" 및 "P"로 변형됨 (서열 97)),

[0902] (3) ED.FW3 (여기서, 잔기 60 ("S")은 "D"로 변형되고; 잔기 80 ("P")은 "A"로 변형되고; 잔기 83 ("F")은 "V"로 변형되고; 잔기 85 ("T")는 "V"로 변형됨 (서열 98)),

[0903] (4) ED.a11 (여기서, 잔기 3 ("Q")은 "V"로 변형되고; 잔기 9 ("S")는 "D"로 변형되고; 잔기 12 ("S")는 "A"로 변형되고; 잔기 13 ("A")은 "V"로 변형되고; 잔기 15 ("V")는 "L"로 변형되고; 잔기 17 ("D")은 "E"로 변형되고; 잔기 19 ("V")는 "A"로 변형되고; 잔기 22 ("T")는 "N"으로 변형되고; 120.v24의 잔기 42 ("K") 및 43 ("A")은 "Q" 및 "P"로 변형되고; 잔기 60 ("S")은 "D"로 변형되고; 잔기 80 ("P")은 "A"로 변형되고; 잔기 83 ("F")은 "V"로 변형되고; 잔기 85 ("T")는 "V"로 변형됨 (서열 99)),

[0904] (5) ED.Pro (여기서, 잔기 43 ("A")은 "P"로 변형되고, 잔기 80 ("P")은 "A"로 변형됨 (서열 100)),

- [0905] (6) ED.p1 (여기서, 잔기 9 ("S")는 "D"로 변형되고; 잔기 42 ("K")는 "Q"로 변형되고, 잔기 60 ("S")은 "D"로 변형됨 (서열 101)).
- [0906] 결과 및 논의
- [0907] SGIV 항체의 제조 - 항-STEAP-1 항체 형태 24 (120.v24) 가변 영역의 서열을 도 23 및 24에 도시하였다 (서열 91). 부위-지정 돌연변이유발을 이용하여, "심몬스 IV" 또는 간략하게 "SGIV"로 지칭되는 다른 변이체를 상기 기재된 바와 같은 표준 돌연변이유발 프로토콜을 이용하여 제조하였다. 도 23 및 24는 mu 120 항체 및 120.v24의 것과 정렬된 SGIV 경쇄의 서열을 도시하고 있다. SGIV 항체의 다양한 수학물의 타이터를 도 29에 도시하였다.
- [0908] FAC를 사용하는 STEAP-1에 대한 SGIV 및 120.v24의 결합 비교 - 2개의 항체 120.v24 및 SGIV가 세포 표면에서 발현된 STEAP-1에 결합하는 능력을 FAC을 이용하여 측정하였다. 외인성 STEAP-1 (293 STEAP-1 LB48, 293 STEAP-1 LB50 및 293 STEAP-1 LB53) 또는 내인성 STEAP-1 (LNCaP.Br)을 발현하는 세포주에 대한 항체 결합을 2회 반복 측정하고, 그 결과를 도 28에 요약하였다. 도 28에 도시한 바와 같이, 2개의 항체는 4개의 모든 세포 주에서 STEAP-1에 결합할 수 있었다.
- [0909] STEAP-1에 대한 SGIV 항체의 결합 친화도 및 120.v24와의 비교 - STEAP-1에 대한 SGIV 및 120.v24의 결합 친화도를 스캐차드 분석을 이용하여 조사하였다. LNCaP BR 세포 및 293.LB 50 세포에서의 120.v24 및 SGIV의 스캐차드 플롯을 각각 도 25 및 26에 도시하였다. PC-3-PS5.4, 293-LB50 및 LNCaP-BR 세포 뿐만 아니라, STEAP-1을 일시적으로 발현하는 293 세포에서의 mu 1789, mu 120, Fc 키메라, 인간화 120.v24, thio-120.v24 및 thio-SGIV 항체에 대한 평균 결합 친화도를 비교한 표를 도 27에 도시하였다. 그 결과, 293-LB50 및 LNCaP.BR 세포에서의 120.v24 항체의 결합 친화도가 SGIV 변이체의 대략 1.5-배인 것으로 나타났다.
- [0910] 상기한 본 발명은 발명의 명확한 이해를 위해 예시와 실시예에 의해 일부 상세하게 기재되었지만, 상세한 설명과 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 학술 문헌의 개시내용은 그 전문을 명백하게 본원에 참고로 포함시킨다.

도면

도면1

도면2a

장체 서열의 정렬		
카바트 #	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37	
hukI		카바트-CDR L1
mul20	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N Y L A W Y Q	교타이-CDR L1
120x24	D I V N M S Q S P S S L A V S V G E K V T M S C K S S Q S L L Y R S N Q K N Y L A W Y Q	접촉-CDR L1
	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N Y L A W Y Q	
*	*	*
카바트 #	38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80	
hukI		카바트-CDR L2
mul20	Q K P G K A P K L L I Y A A S S L E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P	교타이-CDR L2
120x24	Q K P G Q S P K L L I Y A A S S L E S G V P D R F T G S G T D F T L T I S S L Q P	접촉-CDR L2
*	*	*
카바트 #	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108	
hukI		카바트-CDR L3
mul20	E D F A T Y Y C Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E I K R (서열4)	교타이-CDR L3
120x24	E D F A T Y Y C Q Q Y N Y P R T F G Q G T K V E I K R (서열5)	접촉-CDR L3
*	*	*

장체 서열의 정렬		
카바트 #	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37	
hukI		카바트-CDR L1
mul20	E D F A T Y Y C Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E I K R (서열4)	교타이-CDR L1
120x24	E D F A T Y Y C Q Q Y N Y P R T F G Q G T K V E I K R (서열5)	접촉-CDR L1
*	*	*

도면2b

정체 서술의
장

도면3a

I	
A	QVOLVOSGAEVKKPGASVVKVUSCKASGYTFT
B	QVOLVQSGAEVVKPGASVVKVUSCKAS
C	QVOLVQSGAEVVKPGASVVKVUSCKAS
D	QVOLVQSGAEVVKPGASVVKVUSCKAS
II	
A	QVOLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS
B	QVOLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS
C	QVOLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS
D	QVOLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS
III	
A	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
B	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
C	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
D	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
△-8-자-1	
A	EVOLIVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
B	EVOLIVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
C	EVOLIVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
△-8-자-2	
A	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
B	EVOLIVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
C	EVOLIVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
D	EVOLIVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

도면3b

서열:

RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	26, 27, 28, 29
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	30, 31, 28, 29
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	30, 31, 32, 29
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	30, 31, 33, 29
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	34, 35, 36, 29
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	37, 38, 36, 29
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	37, 38, 39, 29
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	37, 38, 40, 29
RFTISRDNSKNLYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	41, 42, 43, 29
RFTISRDNSKNLYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	44, 45, 43, 29
RFTISRDNSKNLYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	44, 45, 46, 29
RFTISRDNSKNLYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	44, 45, 47, 29
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	48, 49, 49, 29
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	44, 45, 49, 29
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	44, 45, 50, 29
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	48, 42, 51, 29
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	44, 45, 51, 29
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	44, 45, 52, 29
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCAR	-H3-	WGQGTLVTVS	44, 45, 53, 29

도면4a

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
 kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
 kv2 DIVMTQSPSLPVTPEGPASISC -L1- WYLOKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
 kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
 kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ

도면4b

EDFATYYC -L3- FGQGTTKVEIK	서열: 54, 55, 56, 57
EDFATYYC -L3- FGQGTTKVEIK	서열: 54, 58, 56, 57
EDVGVYYC -L3- FGQGTTKVEIK	서열: 58, 59, 60, 57
EDFAVYYC -L3- FGQGTTKVEIK	서열: 61, 62, 63, 57
EDVAVYYC -L3- FGQGTTKVEIK	서열: 64, 65, 66, 57

도면5

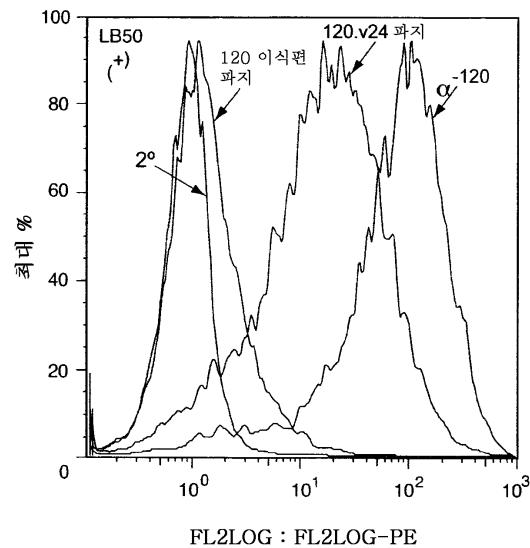
humlgG1	230	240	250	260	270				
	PAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV								
humlgG2		PAP-PVAGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV							
humlgG3		PAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKWYV							
humlgG4		PAPEFLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV				*	*	*	*

humlgG1	280	290	300	310	320				
	DGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP								
humlgG2		DGVEVHNNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP							
humlgG3		DGVEVHNNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP							
humlgG4		DGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP		*	*	*	*	*	*
humlgG1	330	340	350	360	370				
	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV								
	D L								
humlgG2		APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV							
humlgG3		APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV							
humlgG4		SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV		*	*	*	*	*	*
humlgG1	380	390	400	410	420				
	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH								
humlgG2		EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH							
humlgG3		EWESSNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH		*	*	*	*	*	*
humlgG4		EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVVDKSRWQEGNVFSCSVMH		*	*	*	*	*	*
humlgG1	430	440							
	EALHNHYTQKSLSLSPGK (서열:85)								
humlgG2		EALHNHYTQKSLSLSPGK (서열:86)							
humlgG3		EALHNRFQTQKSLSLSPGK (서열:87)							
humlgG4		EALHNHYTQKSLSLSLGK (서열:88)		*	*				
	**								

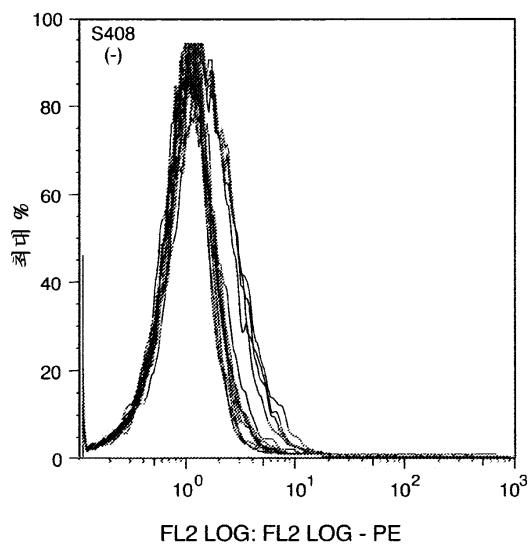
카파 경쇄 불변 영역 컨센서스 서열 :

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열:89)

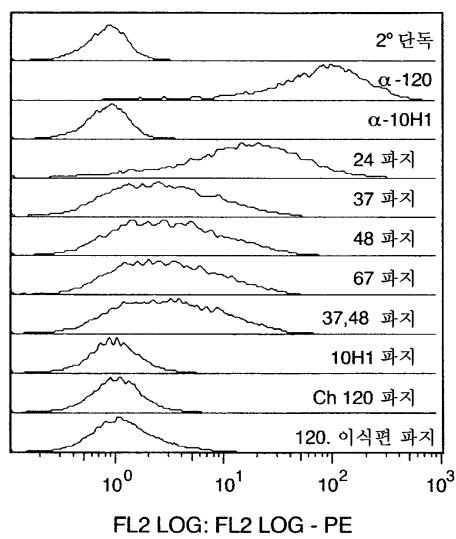
도면6a



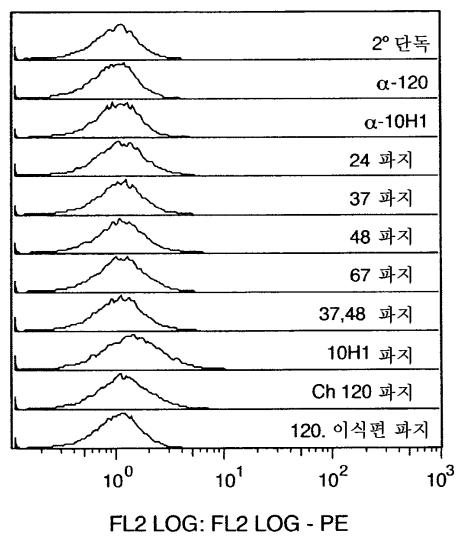
도면6b



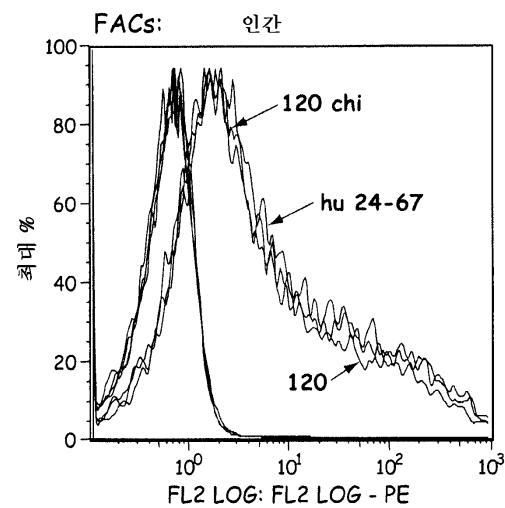
도면6c



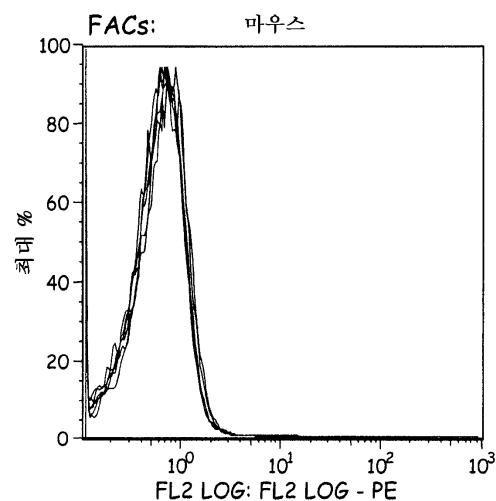
도면6d



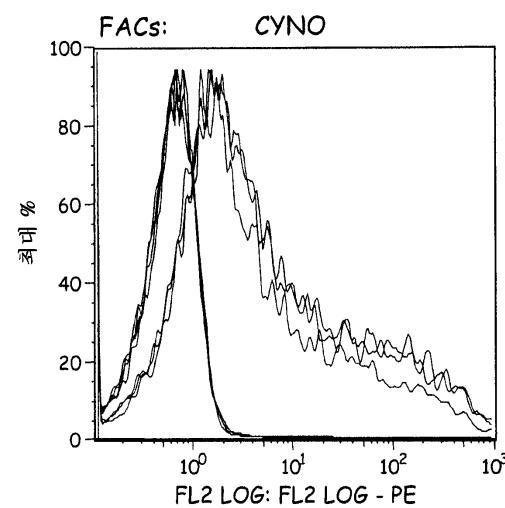
도면7a



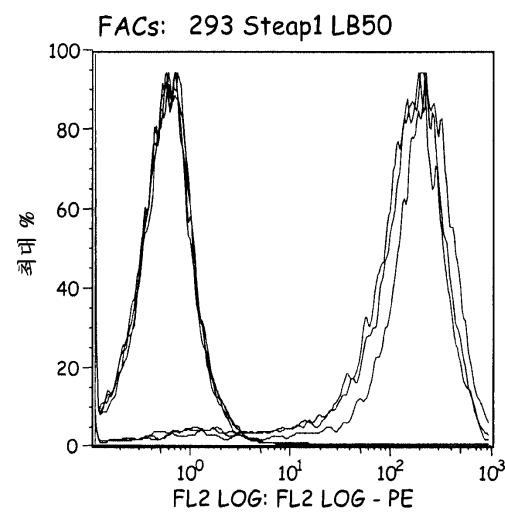
도면7b



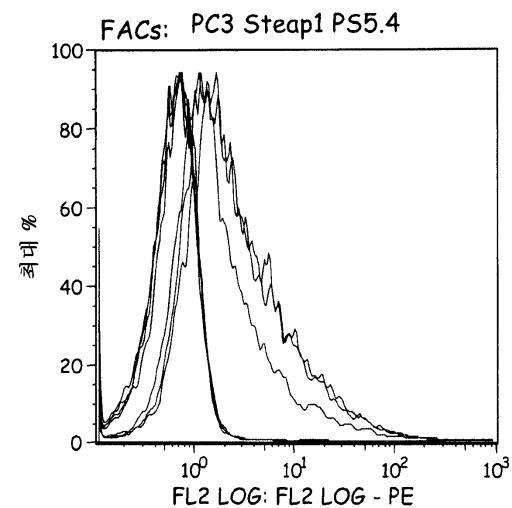
도면7c



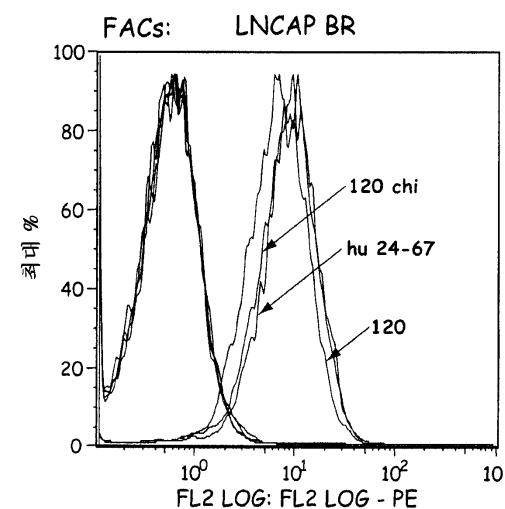
도면7d



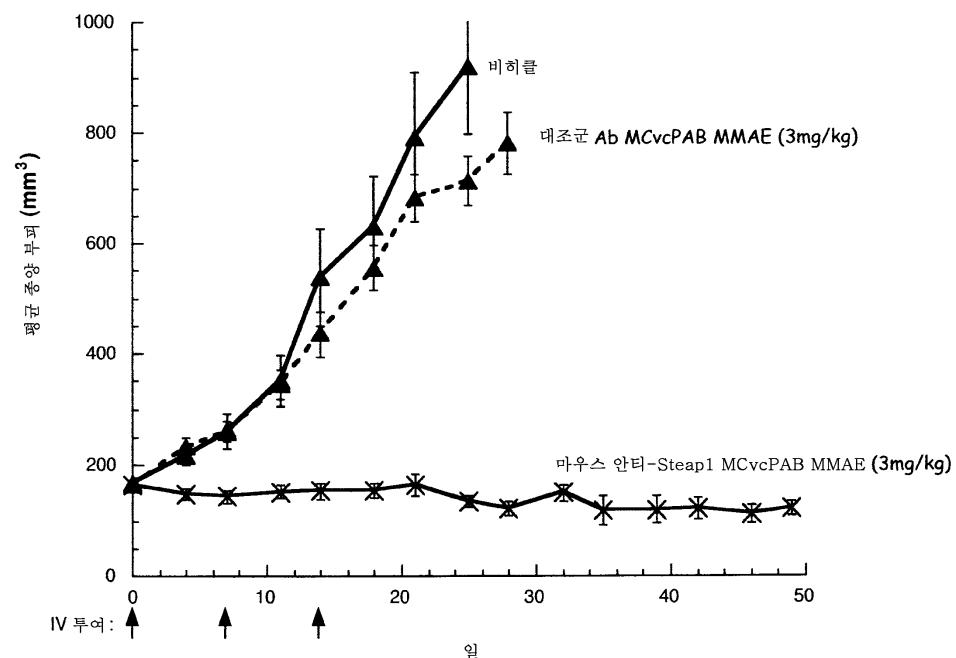
도면7e



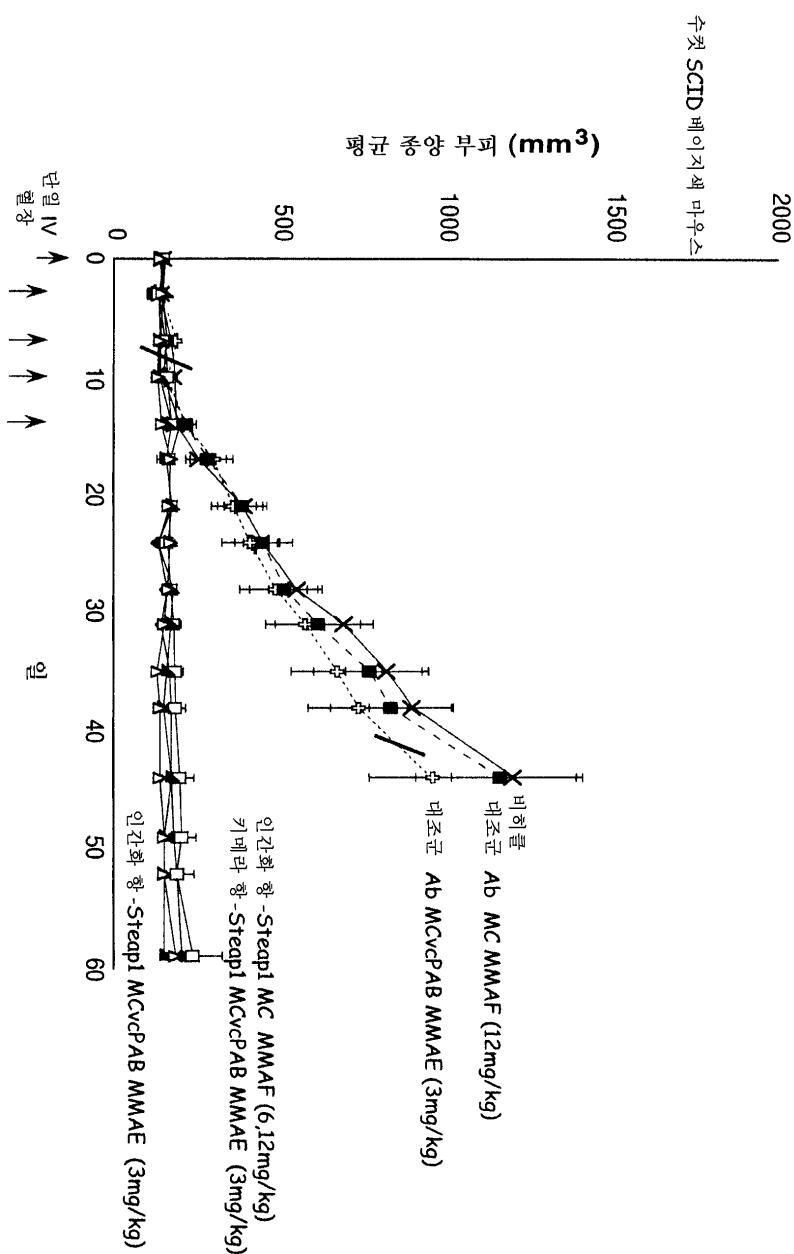
도면7f



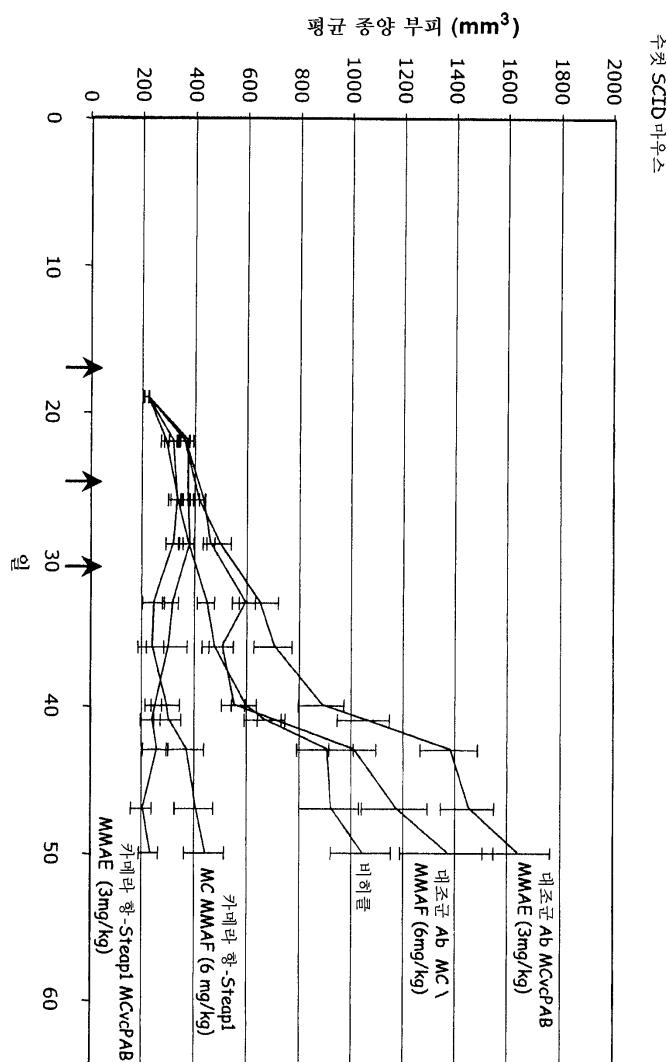
도면8a



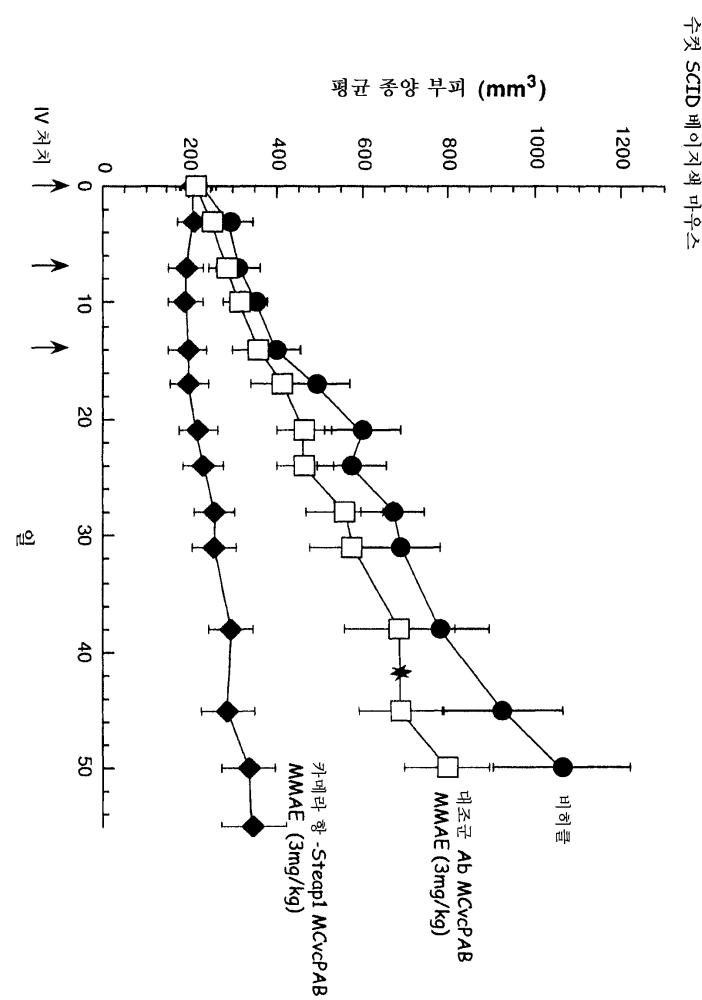
도면8b



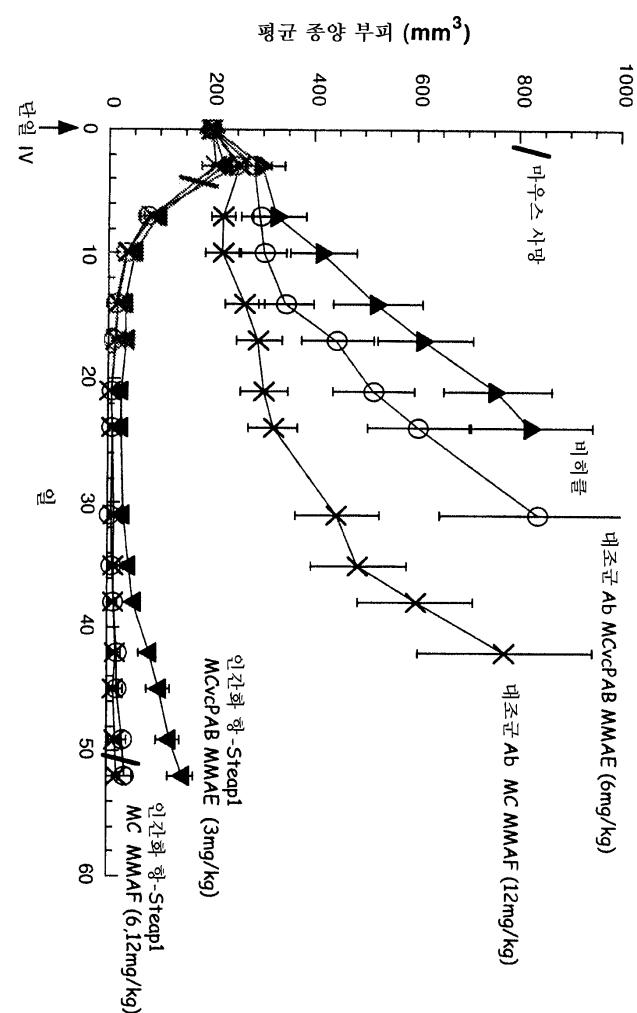
도면9



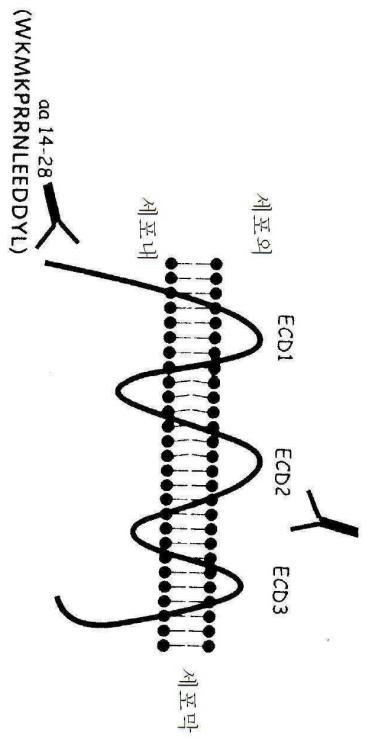
도면10



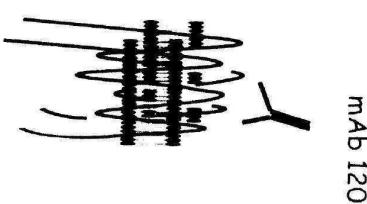
도면11



도면12

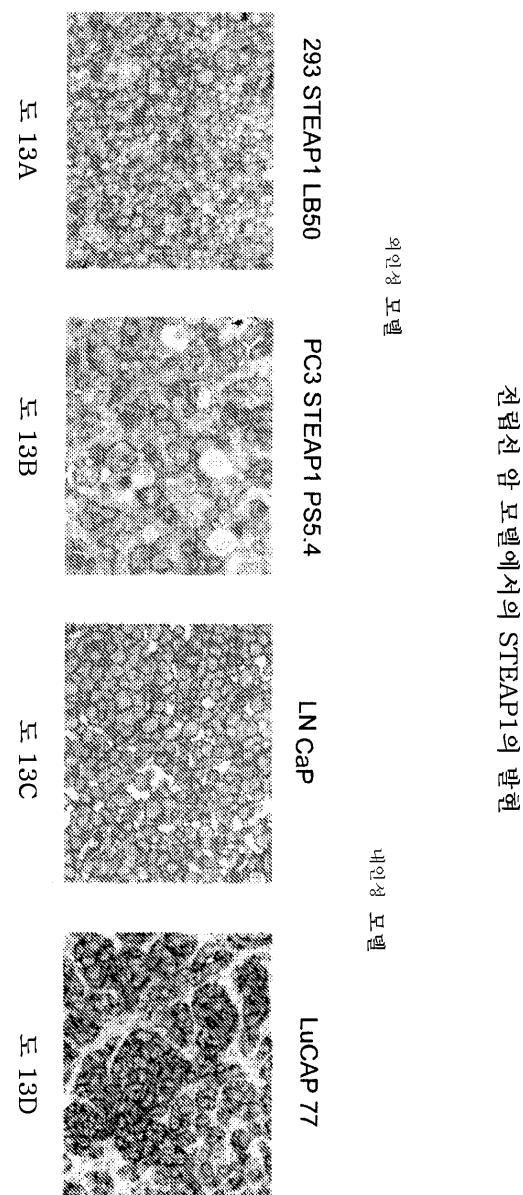


세포막에 서의 STEAP-1의 개략도



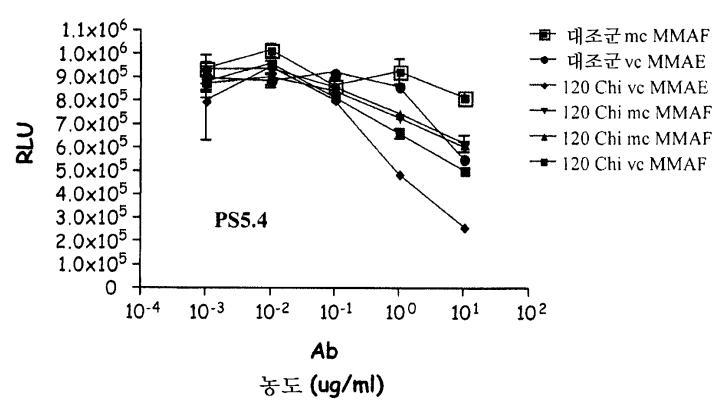
mAb 120

도면13

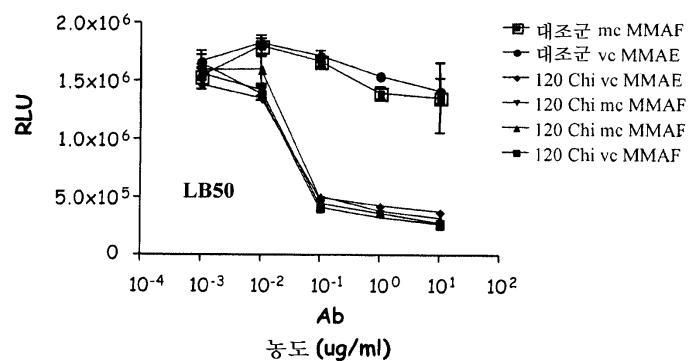


진법선 암 모델에서의 STEAP1의 발현

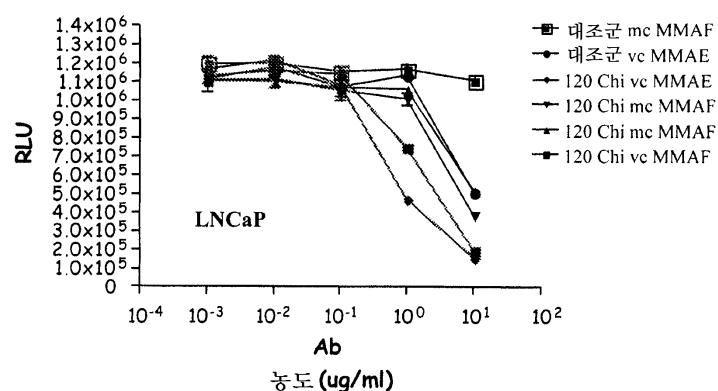
도면14a



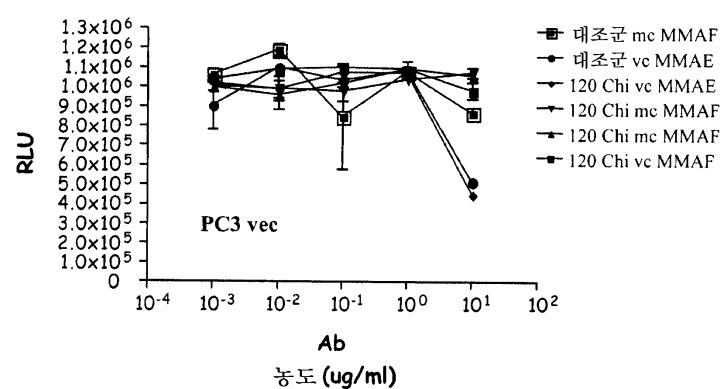
도면14b



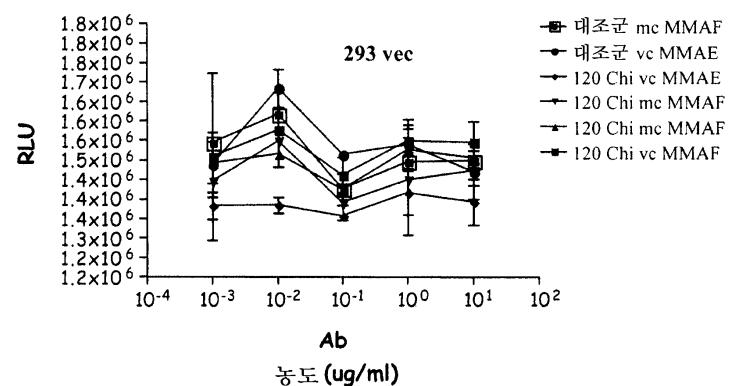
도면14c



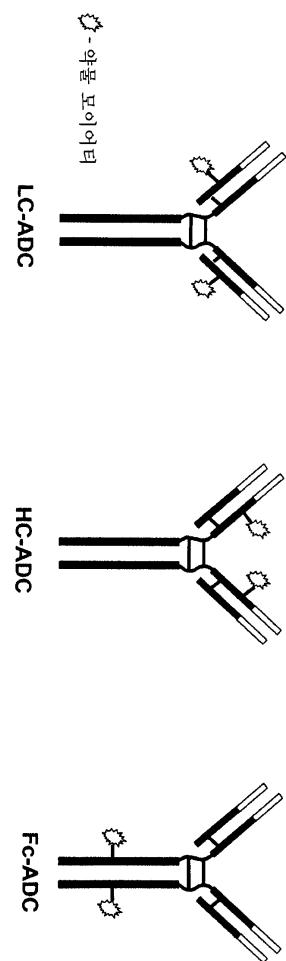
도면14d



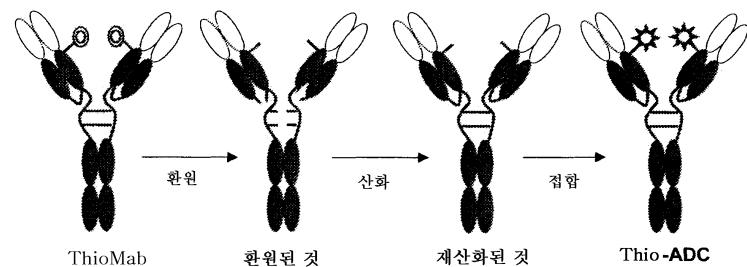
도면14e



도면15



도면16



도면17a

상응하는 연속적 넘버링을 갖는 Thio-LC 변이체 (V205C)

표준화 넘버링 >> **LC-V205C (카마트 넘버링)**

상대적 위치	LC-V210C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	219
	LC-V204C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	213
	LC-V211C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	220
	LC-V205C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	214
	LC-V205C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	214
	LC-V205C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	214
	LC-V205C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	214
	LC-V210C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	219
	LC-V209C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	218
	LC-V209C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	218
	LC-V205C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	214
	STEAP120-LC- V211C	E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	220

도면17b

상용하는 연속적 넘버링을 갖는 Thio-HC 변이체 (A121C)

표준화 넘버링 > **HC-A118C (EU 넘버링)**

상대적 위치	HC-A114C	-----LYLWGGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	138
	HC-A123C	---NSYWYFDWVGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	147
	HC-A121C	---PRHANVFWGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	145
	HC-A117C	---WTSGLDYWGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	141
	HC-A121C	---DGFYAMDYWGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	145
	HC-A121C	---SIAGMDYWGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	145
	HC-A121C	---SWDWYFDWVGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	145
	HC-A121C	---RSHVGYFDWVGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	148
	HC-A118C	---RLDYWGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	142
	HC-A121C	---RGDYSMDYWGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	145
	STEAP120-HC-A125C	YDDYYYAMDYWGAGTLVTVSSAS	TKGPSVFPLAPSSKISTSGGTAA	149

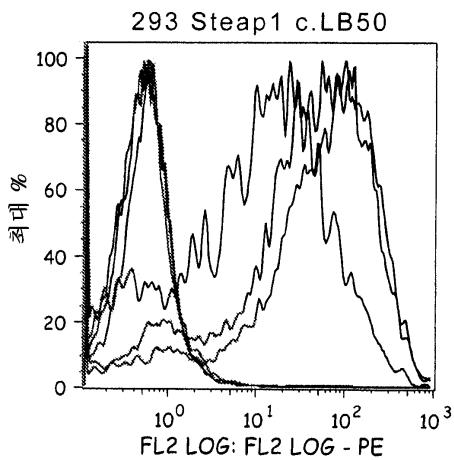
도면17c

상대적 넘버링	HC-S396C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	438
HC-S405C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	447	
HC-S403C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	445	
HC-S399C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	441	
HC-S403C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	445	
HC-S403C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	445	
HC-S403C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	445	
HC-S406C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	445	
HC-S400C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	442	
HC-S403C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	445	
HC-S407C	V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R M Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S	449	
STEAP120-HC-S407C			

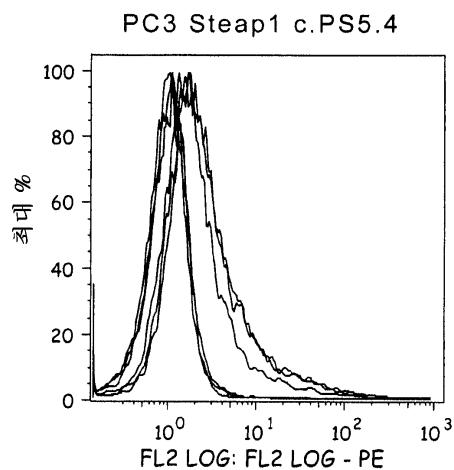
상응하는 연속적 넘버링을 갖는 Thio -Fc 변이체 (S400C)

표준화 넘버링 >> **Fc-S400C (EU 넘버링)**

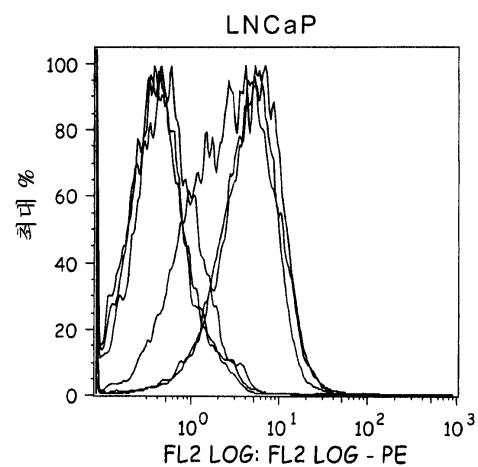
도면18a



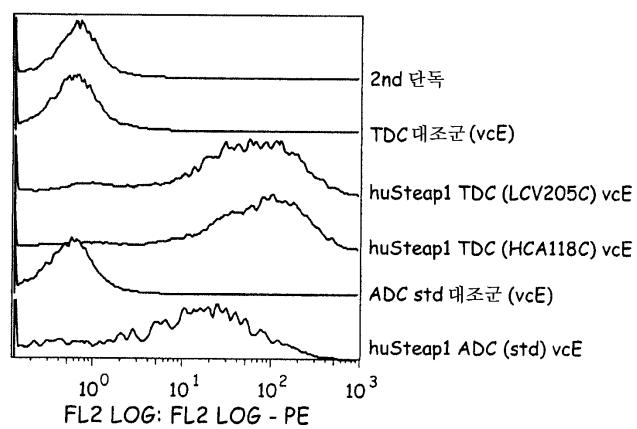
도면18b



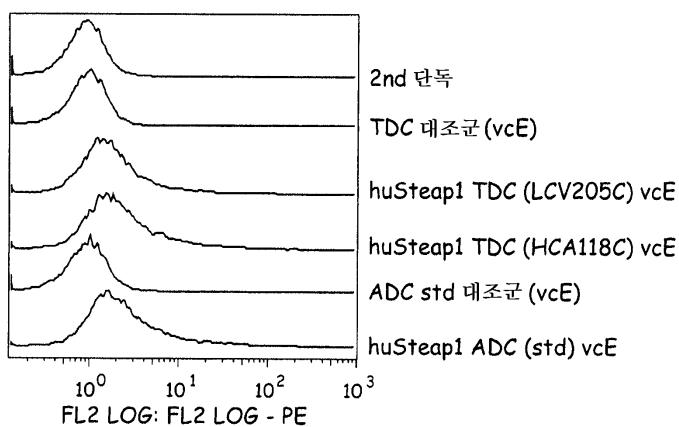
도면18c



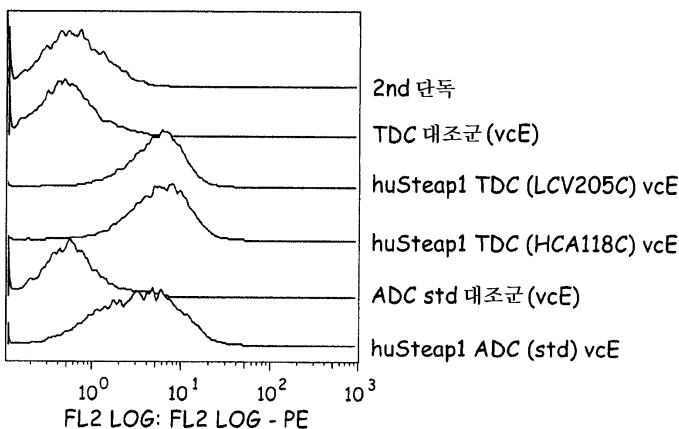
도면18d



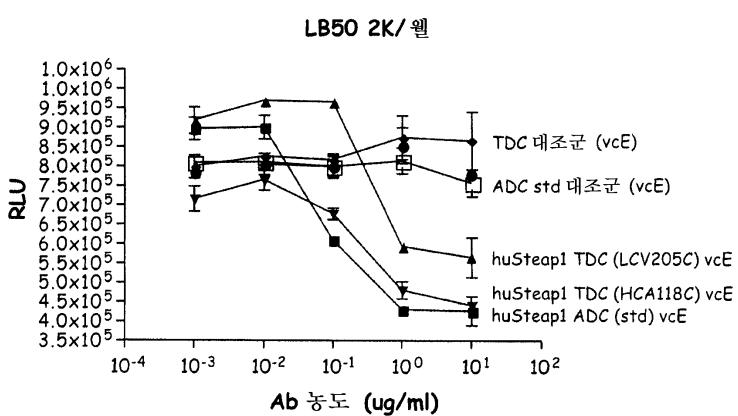
도면18e



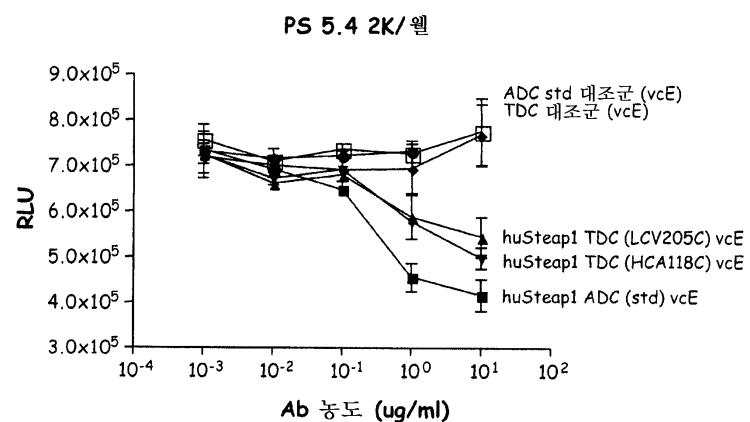
도면18f



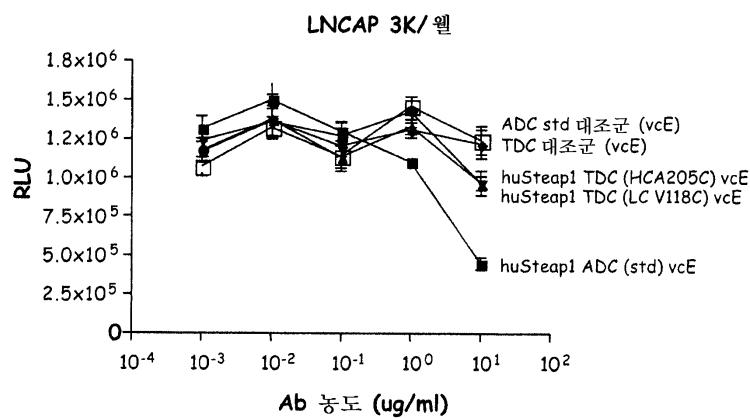
도면19a



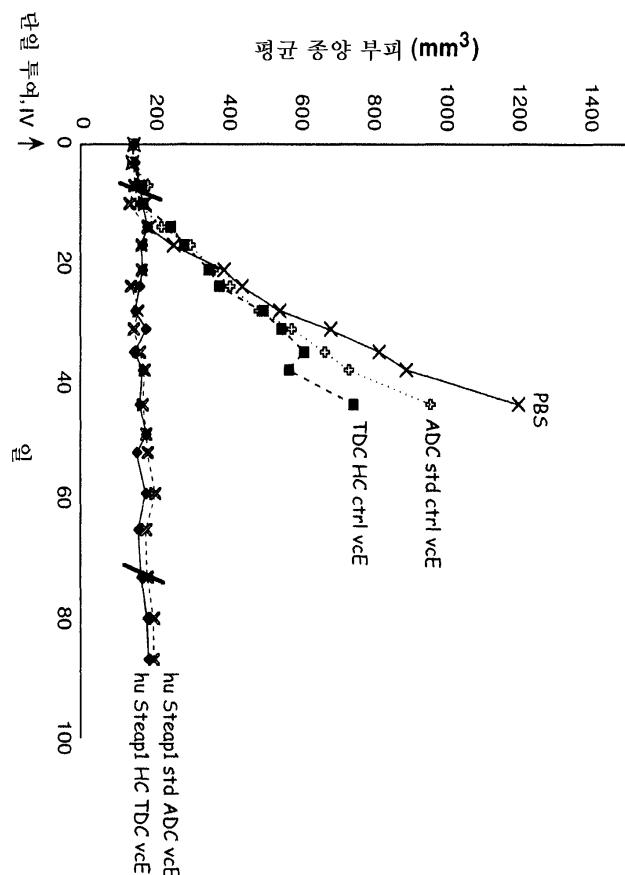
도면19b



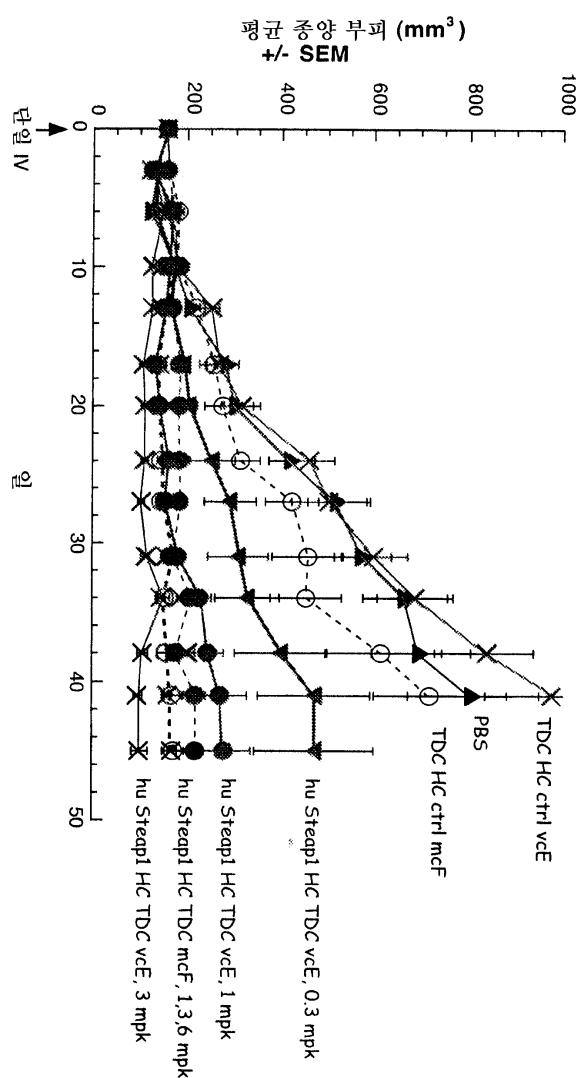
도면19c



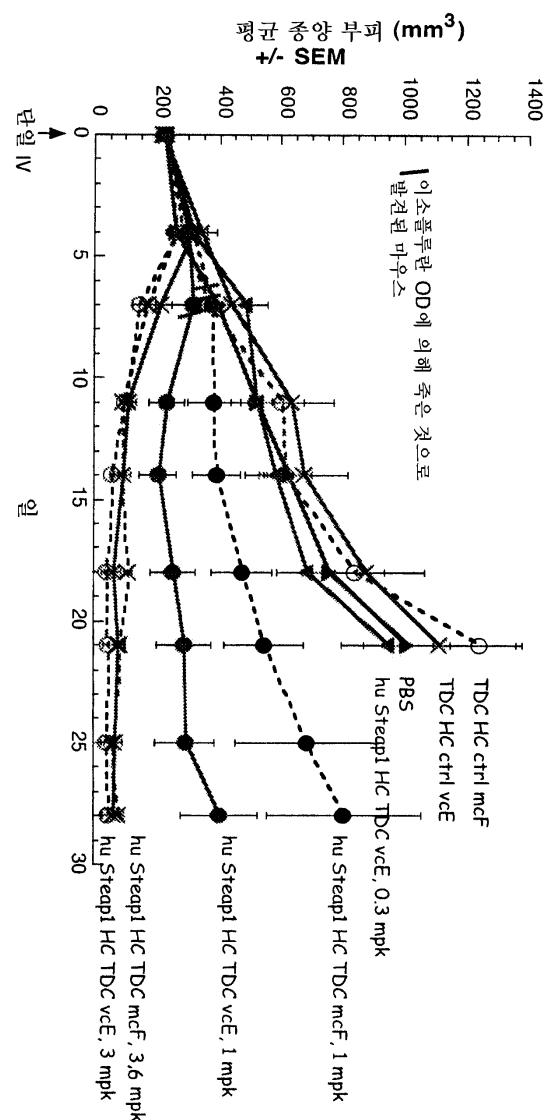
도면20



도면21



도면22



도면23a

120 VL 차이 - 카파 | 대 | IV

카바트 #

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

카바트 - CDR L1

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

* *

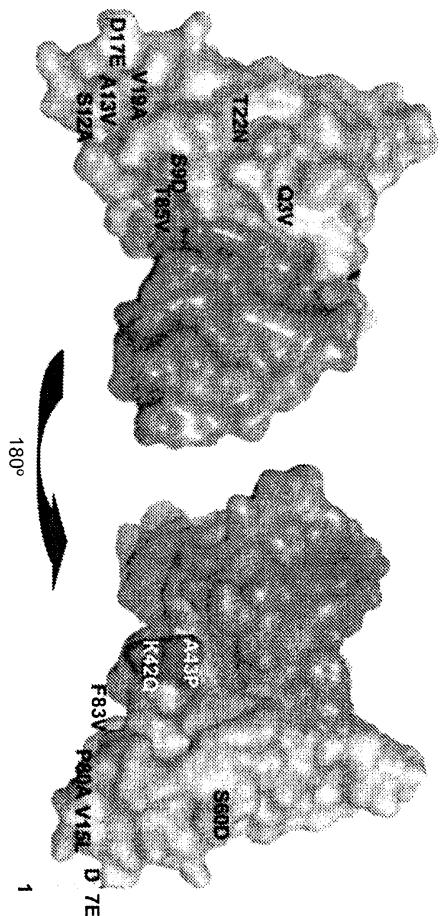
* *

* *

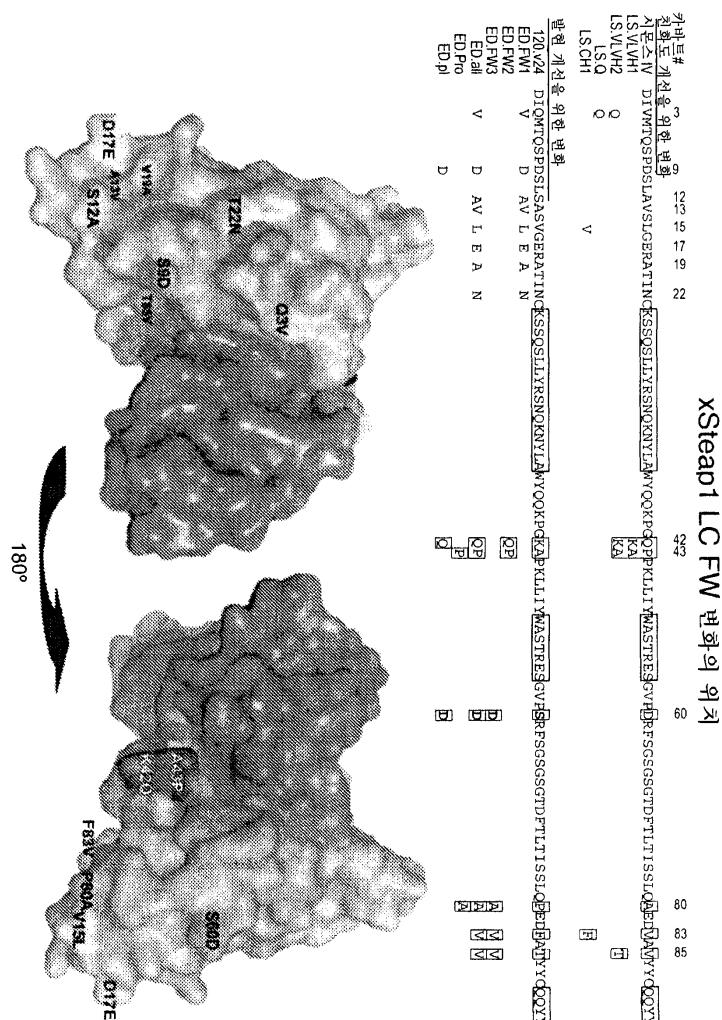
* *

* *

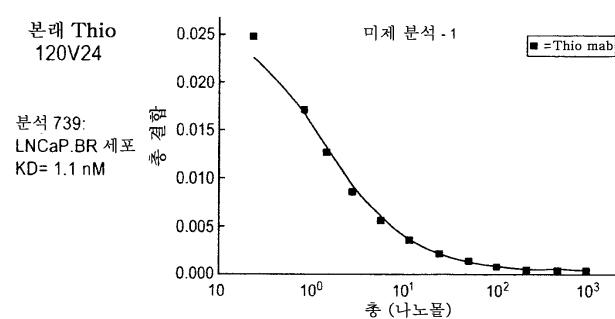
도면23b



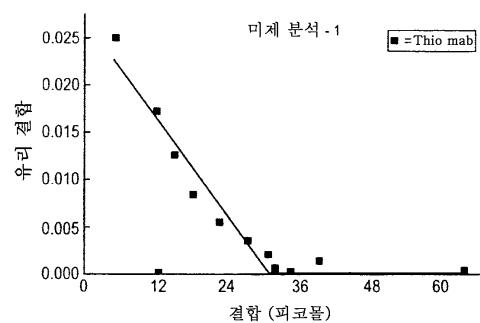
도면24



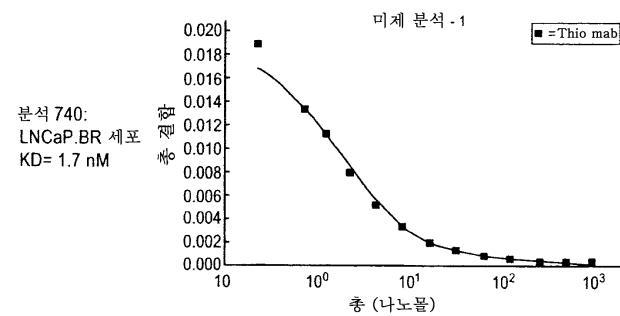
도면25a



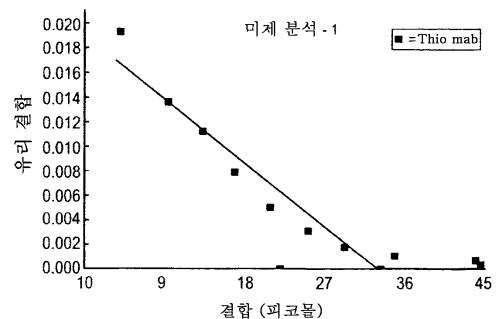
도면25b



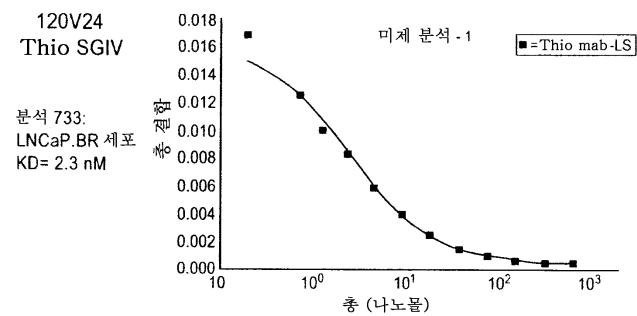
도면25c



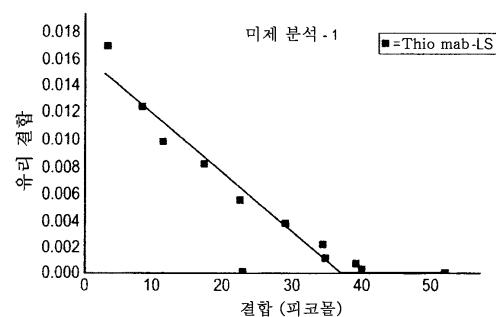
도면25d



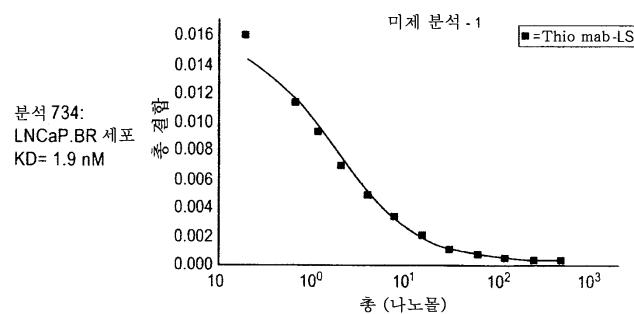
도면25e



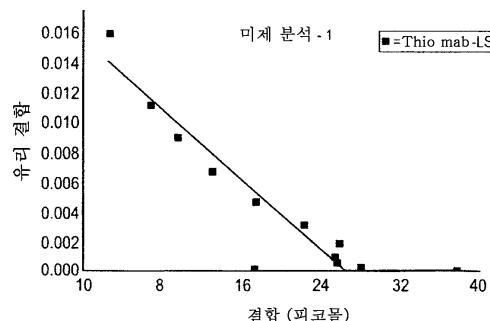
도면25f



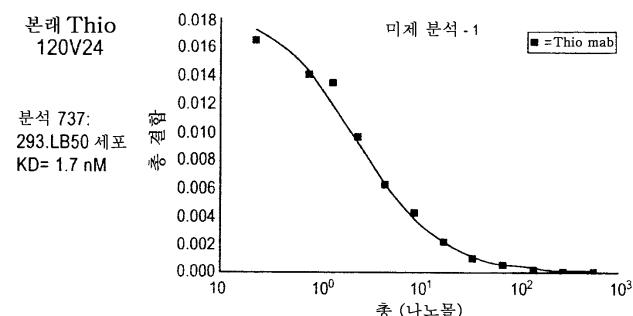
도면25g



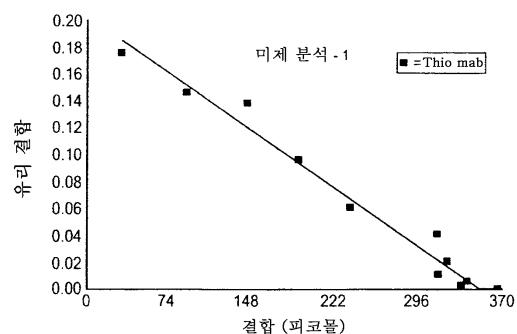
도면25h



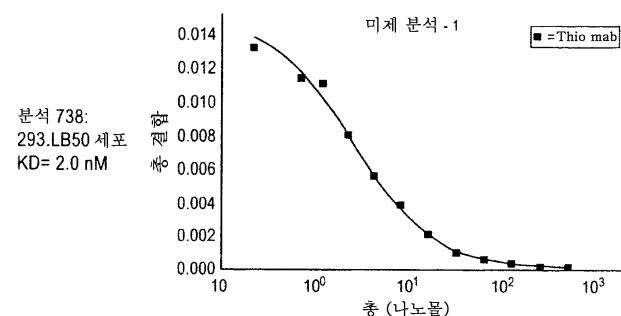
도면26a



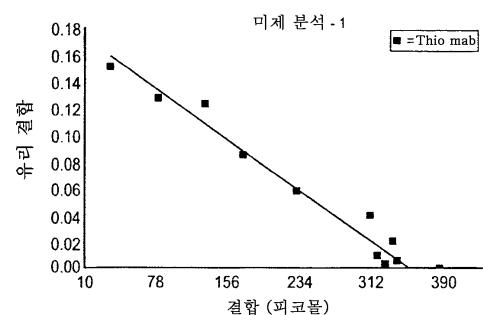
도면26b



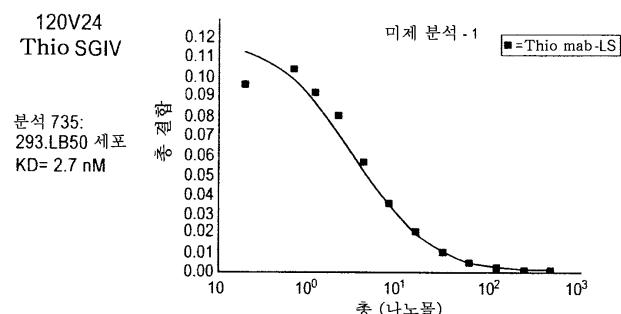
도면26c



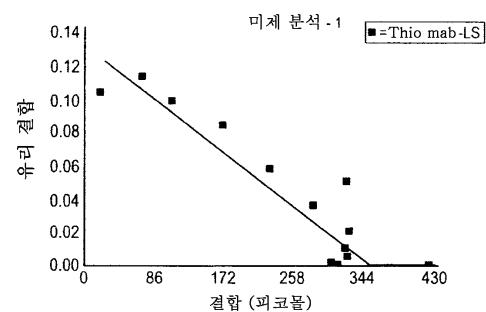
도면26d



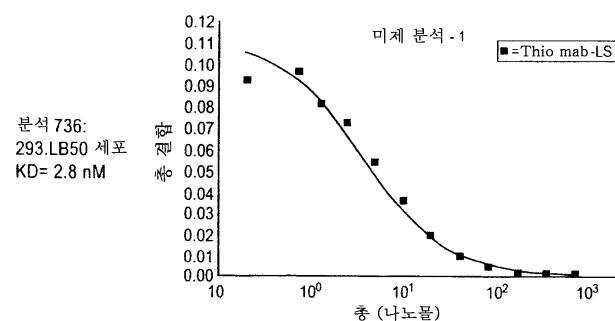
도면26e



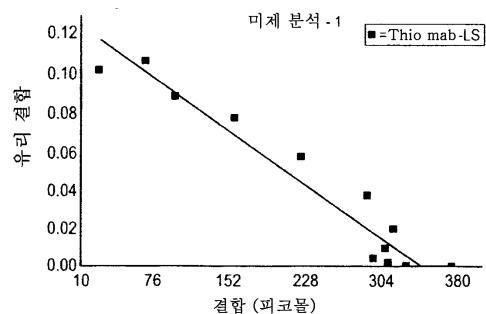
도면26f



도면26g



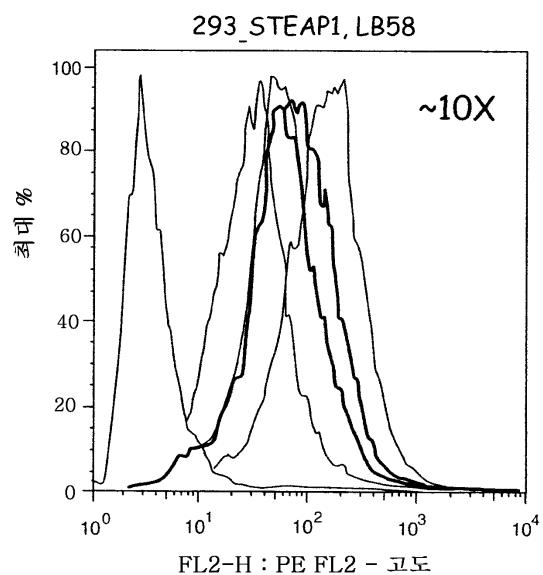
도면26h



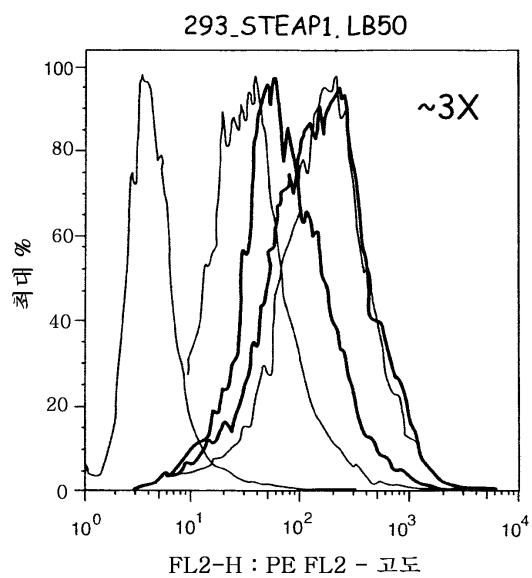
도면27

스케치드 분석						
주파동물	Fc 카메라	인간 120/24	분례 thio	thio SGV		
<u>α179</u>	<u>α120</u>	PUR 10162)	PUR 11712)	PUR 12813)	PUR 14951)	
PC3-PS5.4	~23.4 nM ~5,920	17.5 nM 187,256	9.9 nM 103,204			
293-LB50	4.7 nM 25,368	4.7 nM 301,100	4.9 nM 252,892	2.2 nM 264,172	1.9 nM 2.8 nM	1.5X
LNCaP-BR	3.3 nM 2,626	1.5 nM 37,207	0.9 nM 22,021		1.4 nM 2.1 nM	
293- 일시적 인간 Steap1		1.4 nM		인간 및 대체 동일한 친화도		
		1.1 nM				

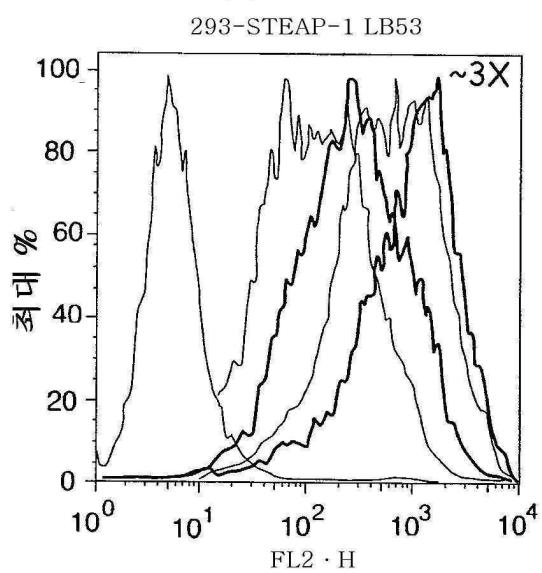
도면28a



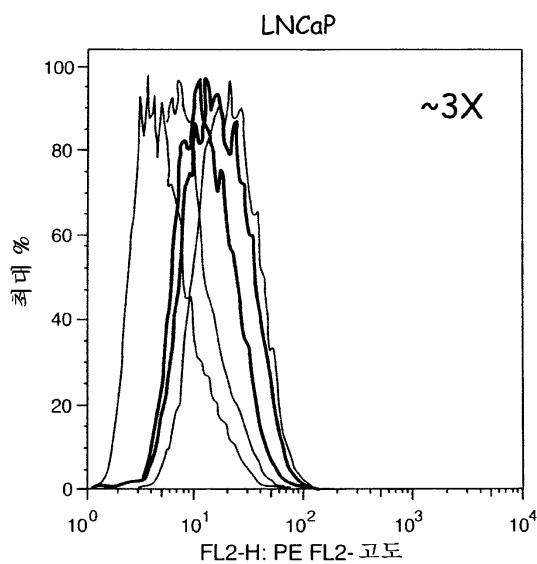
도면28b



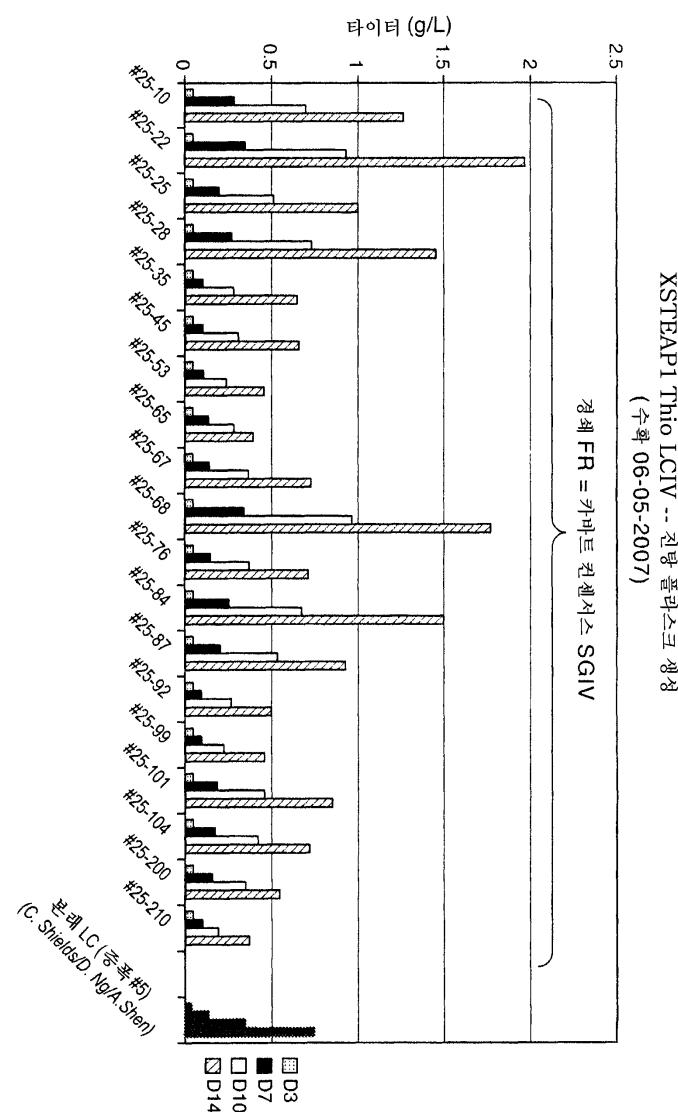
도면28c



도면28d



도면29



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Mark S. Dennis

Bonnee Rubinfeld

Paul Polakis

Aya Jacobovits

<120> ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

<150> PCT/US07/82726

<151> 2007-10-26

<150> 60/863,295

<151> 2006-10-27

<150> 60/868,707

<151> 2006-12-05

<150> 60/921,300

<151> 2007-03-30

<150> 60/937,857

<151> 2007-06-29

<160> 139

<170> PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 340

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met

1 5 10 15

Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr

50 55 60

Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile

65	70	75	80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His			
85	90	95	
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu			
100	105	110	
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu			
115	120	125	
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly			
130	135	140	
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr			
145	150	155	160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala			
165	170	175	
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu			
180	185	190	
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp			
195	200	205	
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile			
210	215	220	
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser			
225	230	235	240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys			
245	250	255	
Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe			
260	265	270	
Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro			
275	280	285	
Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe			
290	295	300	
Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile			
305	310	315	320

Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys

325 330 335

Ser Gln Leu Asn

340

<210> 2

<211> 340

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Ile Ser Asp Asp Val Thr Asn Pro Glu Gln Leu Trp Lys Met

1 5 10 15

Lys Pro Lys Gly Asn Leu Glu Asp Asp Ser Tyr Ser Thr Lys Asp Ser

20 25 30

Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Gly Leu Ser His Leu Gln His

35 40 45

Ala Val His Val Asp Ala Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr

50 55 60

Gln Glu Phe Phe Pro Asn Trp Arg Leu Pro Val Lys Val Ala Ala Ile

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Ile Ile Tyr

85 90 95

Pro Leu Val Thr Ser Arg Glu Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu

100 105 110

Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ala Ile Thr Leu Leu Ala Leu

115 120 125

Val Tyr Leu Pro Gly Glu Leu Ala Ala Val Val Gln Leu Arg Asn Gly

130 135 140

Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro Pro Trp Leu Asp Arg Trp Met Leu Ala

145 150 155 160

Lys Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala

165 170 175

Val Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu

180	185	190	
Leu Asn Trp Ala Tyr Lys Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp			
195	200	205	
Val Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile			
210	215	220	
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser			
225	230	235	240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys			
245	250	255	
Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Val His Ala Leu Val Phe			
260	265	270	
Ala Trp Asn Lys Trp Val Asp Val Ser Gln Phe Val Trp Tyr Met Pro			
275	280	285	
Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Thr Leu Val Leu Ile Cys			
290	295	300	
Lys Ile Ala Leu Cys Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile			
305	310	315	320
Arg Cys Gly Trp Glu Asp Val Ser Lys Ile Asn Arg Thr Glu Met Ala			
325	330	335	
Ser Arg Leu Asn			
340			
<210> 3			
<211> 340			
<212> PRT			
<213> Macaca fascicularis			
<400> 3			
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Glu Glu Glu Leu Trp Lys Met			
1	5	10	15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr			
20	25	30	
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln			
35	40	45	

Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
 50 55 60
 Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
 65 70 75 80

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

Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
 145 150 155 160
 Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
 165 170 175
 Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
 180 185 190
 Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
 195 200 205

Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
 210 215 220
 Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
 245 250 255
 Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe
 260 265 270

Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro
 275 280 285
 Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Val Val Val Leu Ile Phe

290	295	300	
Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile			
305	310	315	320
Arg His Gly Trp Glu Asp Ile Thr Lys Ile Asn Lys Met Glu Ile Ser			
325	330	335	
Ser Gln Leu Asn			
340			
<210> 4			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 4			
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 Ser Ile Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50 55 60			
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100	105		
<210> 5			
<211> 114			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 5			
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly			

1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg			
20	25	30	
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
35	40	45	
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
50	55	60	
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
85	90	95	
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile			
100	105	110	
Lys Arg			

<210> 6
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

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

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

85	90	95	
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg

<210> 7
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Ser Tyr

20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 8
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 8
 Asp Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp

100 105 110

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

115 120

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val 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 Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser 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 Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met Asp

100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 10		
<211> 124		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 10		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp		
20	25	30
Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp		
35	40	45
Val Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp		
100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 11		
<211> 17		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 11		
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu		
1	5	10
Ala		

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Arg Asn Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

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

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

20

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

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

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

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

1 5 10

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser

20 25

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

1 5 10

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10

<210> 32

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser

20 25 30

<210> 35

<211>

> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 36

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 37

<211

> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

20 25

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10

<210> 39

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210>

41

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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

20 25 30

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

1 5 10

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 44

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

1 5 10

<210> 46

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 48

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 50

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 52

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 53

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 54

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

20

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

1 5 10 15

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

1 5 10

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

1 5 10 15

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 61

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

1 5 10 15

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 64

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

1 5 10 15

<210> 66

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 67

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys

20

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

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

1 5 10 15

<210> 69

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 71

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr

20 25

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met

1 5 10

<210> 73

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

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

1 5 10

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

1 5 10

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

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

1 5 10

<210> 78

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 79

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 80

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 80

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

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

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

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

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 81

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

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

Glu Asp Asp Phe

20

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 82

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

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

Glu Asp Asp Phe

20

<210> 83

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 83

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

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 84

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 85

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

50 55 60

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

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 180 185 190
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 195 200 205
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 86
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 86

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50	55	60	
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His			
65	70	75	80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
85	90	95	
Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln			
100	105	110	
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
115	120	125	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
130	135	140	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
145	150	155	160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
165	170	175	
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
180	185	190	
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
195	200	205	
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
210	215		
<210> 87			
<211> 168			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 87			
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
1	5	10	15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
20	25	30	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp			

35 40 45

Tyr Val Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

85 90 95

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

100 105 110

Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

115 120 125

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe

130 135 140

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys

145 150 155 160

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

165

<210> 88

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

50 55 60

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

65	70	75	80
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
85	90	95	
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
100	105	110	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu			
115	120	125	
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
130	135	140	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
145	150	155	160
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
165	170	175	
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn			
180	185	190	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
195	200	205	
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
210	215		
<210> 89			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 89			
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu			
1	5	10	15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
20	25	30	
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
35	40	45	
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
50	55	60	

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 90

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Lys Arg

<210> 91

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg

<210> 92

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

<210> 93

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 93

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

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

100 105

<210> 94

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 94

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

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

35 40 45

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

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

100 105

<210> 95

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 95

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

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

100 105

<210> 96

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 97

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 97

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 98

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 98

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

100	105
<210> 99	
<211> 109	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide	
<400> 99	
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1	5
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg	
20	25
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	

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

<210> 100	100	105	
<211> 109			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic			
polypeptide			
<400> 100			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg			
20	25	30	
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys			
35	40	45	
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
50	55	60	
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
85	90	95	
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys			

100 105
<210> 101
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 101
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu

1 5 10 15

<210> 103

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

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

1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 104

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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

1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 105

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

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

1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 106

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

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

1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 107

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

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

1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 108

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

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

1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 109

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

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

1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

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

1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

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

1 5 10 15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 112

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

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

1

5

10

15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

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

1

5

10

15

Arg Gly Glu Cys

20

<210> 114

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

35

<210> 115

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

115

Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40

<210> 116

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Ile Pro Arg His Ala Asn Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40

<210> 117

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

35 40

<210> 118

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40

<210> 119

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Ile Ser Ile Ala Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40

<210> 120

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40

<210> 121

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Arg Ser His Val Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

<210>

122

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Ile Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

35 40

<210> 123

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40

<210> 124

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

<210> 125

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

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

1 5 10 15

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

35 40 45

<210> 126

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

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

1 5 10 15

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

35	40	45
<210> 127		
<211> 46		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 127		
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
1	5	10
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
20	25	30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		

35	40	45
<210> 128		
<211> 46		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 128		
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
1	5	10
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
20	25	30
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
35	40	45

35 40 45

<210> 130

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

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

1 5 10 15

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

35 40 45

<210> 131

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

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

1 5 10 15

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

35 40 45

<210> 132

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

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

1 5 10 15

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

35 40 45

<210> 133

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

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

1 5 10 15

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

35 40 45

<210> 134

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

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

1 5 10 15

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

35 40 45

<210> 135

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

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

1 5 10 15

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

20 25 30

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

35 40 45

<210> 136

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 137

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 138

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<

400> 138

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 139

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

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

1 5 10 15

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

20 25 30