



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0037719
(43) 공개일자 2007년04월06일

(21) 출원번호 10-2006-7027834
(22) 출원일자 2006년12월29일
심사청구일자 없음
번역문 제출일자 2006년12월29일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2005/007007
국제출원일자 2005년06월29일

(87) 국제공개번호 WO 2006/002895
국제공개일자 2006년01월12일

(30) 우선권주장 60/584,226 2004년06월30일 미국(US)

(71) 출원인 노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
더 스크립스 리서치 인스티튜트
미국 캘리포니아주 92037 라 졸라 노스 토리 파인 로드 10550

(72) 발명자 잔다, 김, 디.
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 라 졸라 카로나 드라이브 5787
워싱, 피터
미국 92122 캘리포니아주 델 마 피.오. 박스 2228
보거, 데일, 엘.
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 비아 포사다 2819

(74) 대리인 장수길
김영

전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 항중양제로서의 항체와 듀오카르마이신 유도체의컨쥬게이트

(57) 요약

항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 사용하여 신생물 질병을 치료하는 방법, 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 합성하는 방법이 제공된다. 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자로서 유용하거나 상기 분자의 합성에 유용한 화합물이 또한 제공된다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

항체-세포독소 컨쥬게이트에 항체 및 세포독소 사이의 산-안정성 공유 결합을 제공하고,

상기 항체-세포독소 컨쥬게이트를 포유동물에게 투여하여 상기 컨쥬게이트를 포유동물의 세포내로 내재화시킴으로써 신 생물 질병을 치료하는 것

을 포함하는, 포유동물에서의 신 생물 질병의 치료 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 세포독소가 항종양 항생제, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 A, 듀오카르마이신 SA, 또는 그의 유사체인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 산-안정성 결합이 아미드 결합인 방법.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 아미드 결합이 N-치환된 아미드 결합인 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 컨쥬게이트의 항체 부분이 활성화된 인테그린 수용체에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 활성화된 인테그린 수용체가 유사한 비-전이 세포와 비교시 전이 상태의 세포상에서 차별적으로 생산되는 것인 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 활성화된 인테그린 수용체가 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체 또는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 수용체인 방법.

청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 컨쥬게이트의 항체 부분이 단쇄 Fv 항체인 방법.

청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 신생물 질병이 고형 종양, 혈액암, 백혈병, 결장직장암, 양성 또는 악성 유방암, 자궁암, 자궁근종, 난소암, 자궁내막암, 다낭성 난소 증후군, 자궁내막 폴립, 편평세포 암종, 머리 및 목의 편평세포 암종, 간세포 암종, 간세포 암종의 간내 전이, 전립선암, 전립선비대증, 뇌하수체암, 샘근육증, 샘암종, 췌장 샘암종, 수막종, 흑색종, 뼈암, 다발골수종, CNS 암, 신경아교종, 또는 별아세포종으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10.

항체-세포독소 컨쥬게이트에 항체 및 세포독소 사이의 산-불안정성 공유 결합을 제공하고,

상기 항체-세포독소 컨쥬게이트를 포유동물에게 투여하여 상기 컨쥬게이트를 포유동물의 세포내로 내재화시킴으로써 신생물 질병을 치료하는 것

을 포함하는, 포유동물에서의 신생물 질병의 치료 방법.

청구항 11.

제10항에 있어서, 상기 세포독소가 항종양 항생제, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 A, 듀오카르마이신 SA, 또는 그의 유사체인 방법.

청구항 12.

제10항에 있어서, 상기 산-불안정성 공유 결합이 히드라존 결합인 방법.

청구항 13.

제12항에 있어서, 상기 항체-항종양 항생제 컨쥬게이트를 투여하여 산-불안정성 히드라존 결합의 절단에 의해 상기 컨쥬게이트를 포유동물의 세포내로 내재화시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 14.

제10항에 있어서, 상기 항체가 활성화된 인테그린 수용체에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 15.

제14항에 있어서, 상기 활성화된 인테그린 수용체가 유사한 비-전이 세포와 비교시 전이 상태의 세포상에서 차별적으로 생산되는 것인 방법.

청구항 16.

제15항에 있어서, 상기 활성화된 인테그린 수용체가 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체 또는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 수용체인 방법.

청구항 17.

제10항에 있어서, 상기 컨쥬게이트의 항체 부분이 단쇄 Fv 항체인 방법.

청구항 18.

제10항에 있어서, 상기 신생물 질병이 고형 종양, 혈액암, 백혈병, 결장직장암, 양성 또는 악성 유방암, 자궁암, 자궁근종, 난소암, 자궁내막암, 다낭성 난소 증후군, 자궁내막 폴립, 편평세포 암종, 머리 및 목의 편평세포 암종, 간세포 암종, 간세포 암종의 간내 전이, 전립선암, 전립선비대증, 뇌하수체암, 샘근육종, 샘암종, 췌장 샘암종, 수막종, 흑색종, 뼈암, 다발골수종, CNS 암, 신경아교종, 또는 별아세포종으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 19.

단일 용기내로 항체, 티올화제, 및 말레이미드-유도화된 세포독소를 도입하고;

상기 항체와 상기 티올화제를 접촉시켜 티올화된 항체를 형성하고;

상기 티올화된 항체를 상기 말레이미드-유도화된 세포독소와 접촉시켜 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 형성하는 것을 포함하는, 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자의 합성 방법.

청구항 20.

제19항에 있어서, 상기 말레이미드-유도화된 세포독소가 말레이미드 및 세포독소 사이의 산-불안정성 히드라존 결합을 포함하는 것인 방법.

청구항 21.

제19항에 있어서, 상기 말레이미드-유도화된 세포독소가 말레이미드 및 세포독소 사이의 아미드 결합 연결(amide bond linkage)을 포함하는 것인 방법.

청구항 22.

제19항에 있어서, 상기 세포독소가 항종양 항생제, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 A, 듀오카르마이신 SA, 또는 그의 유사체인 방법.

청구항 23.

제22항에 있어서, 상기 항종양 항생제가 듀오카르마이신 SA의 카르보닐-치환된 CBI-인돌 유사체인 방법.

청구항 24.

제22항에 있어서, 상기 항종양 항생제가 듀오카르마이신 SA의 아미드-치환된 CBI-인돌 유사체인 방법.

청구항 25.

제23항에 있어서, 상기 말레이미드-유도화된 세포독소가 1-[3-(N'-(1-[2-(1-클로로메틸-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌-3-카르보닐)-1H-인돌-5-일]-에틸리텐)-히드라지노)-3-옥소-1-프로필]말레이미드인 방법.

청구항 26.

제24항에 있어서, 상기 말레이미드-유도화된 세포독소가 3-[5-[1-{3-[3-(2,5-디옥소-2,5-디히드로피롤-1-일)프로피오닐아미노]프로필}인돌-2-카르보닐]아미노인돌-2-카르보닐]-(1-클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌인 방법.

청구항 27.

제19항에 있어서, 상기 티올화제가 2-이미노티올란인 방법.

청구항 28.

제19항에 있어서, 상기 항체가 단쇄 Fv 항체인 방법.

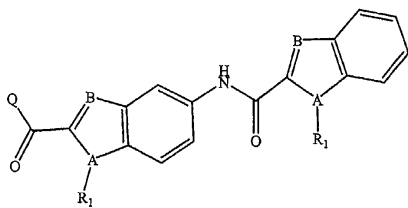
청구항 29.

3-[5-(1-(3-아미노프로필)인돌-2-카르보닐)아미노인돌-2-카르보닐]-1-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌 화합물.

청구항 30.

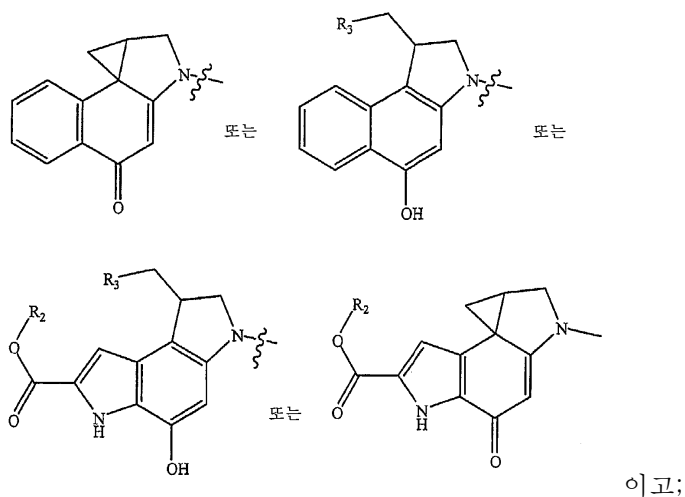
하기 화학식 I의 화합물, 또는 그의 입체이성체, 프로드럭, 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 산염 수화물, N-옥시드 또는 동형(isomorphic) 결정질 형태.

<화학식 I>



상기 식에서,

Q는



각각의 A는 독립적으로 NR_1 , O 또는 S이되, 단, 적어도 하나의 A는 NR_1 이고;

각각의 B는 독립적으로 C 또는 N이고;

R_1 은 독립적으로 H 또는 $-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{H})\text{R}_4$ 이되, 단, 하나의 R_1 은 H이고 나머지 하나는 $-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{H})\text{R}_5$ 이고;

R_2 는 알킬이고;

R_3 은 할로젠이고;

R_4 는 H 또는 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{N}$ -말레이미드이고;

m은 2, 3, 4, 5 또는 6이고;

n은 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

청구항 31.

제30항에 있어서, R_2 가 C_1 내지 C_6 알킬인 화합물.

청구항 32.

제30항에 있어서, 할로젠이 Cl, Br, 또는 F인 화합물.

청구항 33.

3-[5-(1-(3-아미노프로필)인돌-2-카르보닐)아미노인돌-2-카르보닐]-1-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤즈[e]인돌 화합물.

청구항 34.

3-[5-[1-(3-[3-(2,5-디옥소-2,5-디히드로피롤-1-일)프로피오닐아미노]프로필)인돌-2-카르보닐]아미노인돌-2-카르보닐]-(1-클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌 화합물.

청구항 35.

1종 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 부형제, 및 말레이미드 부위가 단쇄 Fv 항체에 컨쥬게이션되어 있는 제30항의 화합물 유효량을 포함하는 제약 조성물.

청구항 36.

제35항에 있어서, 상기 단쇄 Fv 항체가 인테그린 수용체와 결합할 수 있는 것인 조성물.

청구항 37.

제36항에 있어서, 상기 인테그린 수용체가 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체 또는 $\alpha\nu\beta_3$ 인테그린 수용체인 조성물.

청구항 38.

제36항의 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 39.

치료량의 제36항의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 듀오카르마이신 SA의 아미드-치환된 CBI-인돌 유사체와 컨쥬게이션된 항체를 사용하는 치료에 대하여 반응하는 것으로 판단되는 포유동물에서의 질환 상태의 완화 방법.

청구항 40.

제36항에 있어서, 상기 화합물이 3-[5-(1-(3-아미노프로필)인돌-2-카르보닐)아미노인돌-2-카르보닐]-1-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌인 방법.

청구항 41.

제39항에 있어서, 상기 질환 상태가 신생물 질병인 방법.

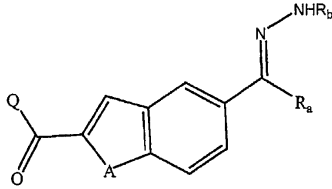
청구항 42.

제40항에 있어서, 상기 신생물 질병이 고형 종양, 혈액암, 백혈병, 결장직장암, 양성 또는 악성 유방암, 자궁암, 자궁근종, 난소암, 자궁내막암, 다낭성 난소 증후군, 자궁내막 폴립, 편평세포 암종, 머리 및 목의 편평세포 암종, 간세포 암종, 간세포 암종의 간내 전이, 전립선암, 전립선비대증, 뇌하수체암, 샘근육증, 샘암종, 췌장 샘암종, 수막종, 흑색종, 뼈암, 다발골수종, CNS 암, 신경아교종, 또는 별아세포종으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 43.

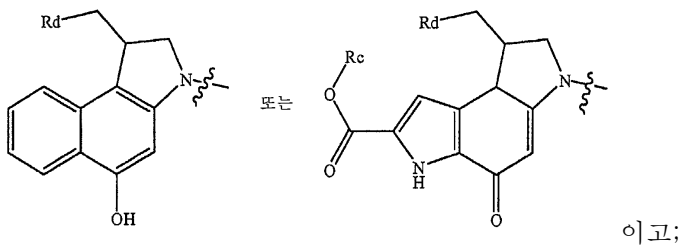
하기 화학식 II의 화합물, 또는 그의 입체이성체, 프로드럭, 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 산염 수화물, N-옥시드 또는 동형 결정질 형태:

<화학식 II>



상기 식에서,

Q는



A는 NH, O 또는 S이고;

R_a는 H 또는 알킬이고;

R_b는 H, 알킬 또는 -C(=O)-(CH₂)_r-N-말레이미드이고;

R_c는 알킬이고;

R_d는 할로젠이고;

r이 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

청구항 44.

1-[3-(N'-(1-[2-(1-클로로메틸-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌-3-카르보닐)-1H-인돌-5-일]-에틸리덴)-히드라지노)-3-옥소-1-프로필]말레이미드 화합물.

청구항 45.

1종 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 부형제, 및 말레이미드 부위가 단쇄 Fv 항체에 컨쥬게이션되어 있는 제43항의 화합물 유효량을 포함하는 제약 조성물.

청구항 46.

제45항에 있어서, 상기 단쇄 Fv 항체가 인테그린 수용체에 대한 항체인 조성물.

청구항 47.

제46항에 있어서, 상기 인테그린 수용체가 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체 또는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 수용체인 조성물.

청구항 48.

제46항의 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 49.

치료량의 제46항의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 듀오카르마이신 SA의 카르보닐-치환된 CBI-인돌 유사체와 컨쥬게이션된 항체를 사용하는 치료에 대하여 반응하는 것으로 판단되는 포유동물에서의 질환 상태의 완화 방법.

청구항 50.

제49항에 있어서, 상기 질환 상태가 신생물 질병인 방법.

청구항 51.

제50항에 있어서, 상기 신생물 질병이 고형 종양, 혈액암, 백혈병, 결장직장암, 양성 또는 악성 유방암, 자궁암, 자궁근종, 난소암, 자궁내막암, 다낭성 난소 증후군, 자궁내막 폴립, 편평세포 암종, 머리 및 목의 편평세포 암종, 간세포 암종, 간세포 암종의 간내 전이, 전립선암, 전립선비대증, 뇌하수체암, 샘근육종, 샘암종, 췌장 샘암종, 수막종, 흑색종, 뼈암, 다발골수종, CNS 암, 신경아교종, 또는 별아세포종으로부터 선택되는 것인 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 사용하여 신생물 질병을 치료하는 방법, 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 합성하는 방법, 및 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자로서 유용하거나 상기 분자의 합성에 유용한 화합물에 관한 것이다.

배경기술

종양의 표적 치료법은 주로 모노클로날 항체 (mAb) 기술 확립에 기인하여 지난 20년간 상당 수준 진보하였다 [Kohler et al., *Nature*, **256**: 495-497, 1975]. 초기의 기본적 적용은 방사선 표지된 mAbs의 개발이었고, 이중 일부는 영상화 및 암 치료법을 위한 임상적인 용도로 달성되었다 ([Kousparou et al., *J Int Soc Tumor Target*, **1**: 55-69, 2000]; [Buchsbaum et al. *Antibody Immunoconjugate Radiopharm*, 4: 245-272, 1991]). 두드러지게, mAb-약물 컨쥬게이트는 광범위하게 연구되어 온 또다른 부류의 효능이 있는 항암제이다 ([Safavy et al., *In Drug Targeting in Cancer Therapy*, M. Page, ed., 257-275, 2002]; [Stan et al., *Cancer Res*, **59**:115-121, 1999]; [Florent et al., *J Med Chem*, **41**: 3572-3581, 1998]). 그러나, 개별적인 성공 사례들이 보고된 바 있지만, 암 치료에 대한 복잡한 이슈를 설명하기 위해서는 더욱더 진보되어야 할 필요가 있다.

주된 목적은 과다발현된 세포-표면 수용체 또는 리간드와의 결합시 종양 세포에 의해 특이적으로 내재화될 수 있는 인간 mAbs 또는 펩티드에 대하여 연구하는 것이었다 ([Nielsen et al., *Pharm. Sci. Technol. Today*, 3: 282-291, 2000]; [Trail et al., *Cancer Immunol Immunother*, 52: 328-337, 2003]; [Gao et al., *J Immunol Methods*, 274: 185-197, 2003]; [Gao et al., *Bioorg Med Chem*, 10: 4057-4065, 2002]). 본 연구 방침은 단백질 벡터를 사용하는 기회를 제시하여 적재량(payload)의 약물을 전달함으로써 암 화학요법의 효능은 증가시키고 부작용은 감소시킬 수 있도록 하는 것이다. 상기 전략법에 대한 임상적 효능의 입증으로 급성 골수성 백혈병에 대하여 사용하는 칼리케아미신에 컨주게이션되고, FDA로부터 승인받은 약물 마이로타그(MyloTag)TM로서 형성된 항-CD33 항체 P67.6을 세포 내재화하는 것이 야기되었다 [Hamann et al., *Bioconjug Chem*, 13: 40-46, 2002].

인테그린 ($\alpha_3\beta_1$, VLA-3 막 수용체로서도 공지되어 있음)은 부착성, 유주성 및 침윤성 세포와 세포외 기질과의 상호작용을 매개하는 태아 및 성인의 조직 둘 모두에서 발현된다 [Elices et al., *J Cell Biol*, 112: 169-181, 1991]. $\alpha_3\beta_1$ 발현의 증가는 여러 타입의 전이암 종류에서 관찰되었고 이는 유주 및 침윤 증가와도 관련성을 갖는다. 특히, 상기 인테그린의 발현은 악성 흑색종에서 상향조절되어 있고 유주 및 전이의 침윤 정도와도 서로 잘 관련이 되어 있다 [(Melchiori et al., *Exp Cell Res*, 219: 233-242, 1995); [Laidler et al., *Acta Biochim Pol* 47: 1159-1170, 2000]; [Elshaw et al., *Br J Ophthalmol*, 85: 732-738, 2001]; [Yoshinaga et al., *melanoma Res*, 3:435-441, 1993]). $\alpha_3\beta_1$ 인테그린은 인간 PC-3 전립선 암종 세포의 침윤성 클론, 및 비침윤성 모 세포 군집에 의해서도 발현된다 ([Dedhar et al., *Clin Exp Metastasis*, 11: 391-400, 1993]; [Romanov et al., *Prostate*, 39: 108-118, 1999]). 유사하게, 상이한 편평 세포 암의 침윤성 성질은 $\alpha_3\beta_1$ 을 비롯한 수개의 인테그린의 과다발현과 관련된다 ([Dyce et al., *Laryngoscope*, 112: 2025-2032, 2002]; [Ghosh et al., *Cancer*, 95: 2524-2533, 2002]). 악성 신경아교종 세포에서 $\alpha_3\beta_1$ 의 작용상의 억제제가 그의 침윤 능력을 차단시킬 수 있다는 것도 나타났다 [Fukushima et al., *Int J Cancer*, 76: 63-72, 1998]. $\alpha_3\beta_1$ 은 유방 암종 세포 전이, 침윤 및 콜라겐 분해 활성과도 관련이 있다 [Morini et al., *Int J Cancer*, 87: 336-342, 2000]. 마지막으로 무린 간 세포 암종 (HCC)에서 $\alpha_3\beta_1$ 의 발현은 간내 전이의 출현과 관련이 있으며, 이는 재발시 주요 양식인 것으로 판단된다 [Tsuchiya et al., *Int J Oncol*, 20: 319-324, 2002]. 악성 암 세포 및 정상 세포 사이의 발현 수준이 종종 현저히 상이할 경우, $\alpha_3\beta_1$ 이 암 세포를 사멸시키고 전이성 전파를 조절하도록 고안된 특이적인 항체-기초의 항신생물성 치료법에 대하여 실현가능한 표적으로서 판단되었다.

$\alpha_3\beta_1$ 의 표적화에 의한 전이의 선택적 조절이 RGD (아르기닌-글리신-아스파르테이트) 슈도펩티드를 사용하는 간세포 암종 (HCC)의 간내 전이 치료에서는 성공적인 것으로 나타났다 [Tsuchiya et al., *Int J Oncol*, 20: 319-324, 2002]. 또한, 머리 및 목의 편평세포 암종은 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린-표적화된 아데노바이러스 벡터를 통한 선택적 유전자 전달에 의해 치료된다 [Kasono et al., *Clin Cancer Res*, 5: 2571-2579, 1999]. 수개의 무린 mAbs가 $\alpha_3\beta_1$ 의 α_3 또는 β_1 서브유니트를 표적하는 것으로 공지되어 있지만, 종양 세포에 의해 내재화되는지에 대해서는 공지된 바 없고 항암 치료제로서도 사용된 바 없다 ([Morimoto et al., *J Immunol*, 134: 3762-3769, 1985]; [Wayner et al., *J Cell Biol*, 105: 1873-1884, 1987]; [Bartolazzi et al., *Anticancer Res*, 13: 1-11, 1993]). 두드러지게, 전형적인 무린 기원의 대부분의 mAb는 인간의 임상적인 적용을 위해서는 유해하다 ([Tjandra et al., *Immunol Cell Biol*, 68: 367-376, 1990]; [Schroff et al., *Cancer Res*, 45: 879-885, 1985]; [Goldman-Leikin et al., *Exp Hematol*, 16: 861-864, 1988]; [Herlyn et al., *J Immunol Methods*, 85: 27-38, 1985]). 또한, 일반적으로 고분자량을 특징으로 하는 전(whole) 면역글로불린 G (IgG)와 같은 mAb를 실제 사용하는 것은 고형 종양의 효율적인 침투를 방해할 수 있고, 이로써 이는 또다른 장애가 될 수 있다. 예를 들면, 1% 미만의 주입된 방사선 표지된 IgG는 그의 표적 종양 매스에 도달할 수 있다는 것이 연구를 통해 제시되었다 ([Jain, *Cancer Res*, 50: 814s-819s, 1990]; [Pimm et al., *In Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, V. S. Byers, ed., 97-128, 1985]). 본 문제점을 해소하기 위한 방법은 scFv 포맷으로 mAb를 사용하는 것이다. 전 IgG, 및 단편 Fab 및 F(ab')₂와 비교할 경우, scFvs는 더욱 신속하고 더욱 깊게 종양내로 침투하는 것으로 나타났다 뿐만 아니라, 매우 신속하게 (<30분) 혈장 및 체내에서 제거된다고 입증되었다 ([Chester et al., *Trends Biotechnol*, 13: 294-300, 1995]; [Hand et al., *Cancer*, 73: 1105-1113, 1994]; [Yokota et al., *Cancer Res*, 52: 3402-3408, 1992]; [Milenic et al., *Cancer Res*, 51: 6363-6371, 1991]; [Colcher et al., *J Natl Cancer Inst*, 82: 1191-1197, 1990]). 따라서, 다수의 경우에 있어, 바람직한 치료 전략법은 항암제와 컨주게이션된 인간 scFv를 사용하는 것이다.

CC-1065 및 듀오카르마이신은 서열 선택적 DNA 알킬화 성질을 갖는 2개의 항종양 항생제이다 ([Chidester et al., *J Am Chem Soc*, 103: 7629-7635, 1981]; [Takahashi et al., *J Antibiot (Tokyo)*, 41: 1915-1917, 1988]; [Ichimura et al., *J Antibiot (Tokyo)*, 43: 1037-1038, 1990]; [Yasuzawa et al., *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 43: 378-391, 1995];

[Boger et al., *Angew Chem, Int Ed Engl*, 35: 1439-1474, 1996)]. 단일-제제 요법을 위한 이들 항암 분자 개발은 치료를 위한 치료량 범위를 제한하는 장기간의 독성 때문에 추구되지 못했다. 예를 들면, CC-1065은 효능이 고도하고 스펙트럼이 광범위함에도 불구하고, 이는 실험 동물에서 자연 사망을 유발하는 것으로 나타났기 때문에 문제시된다 [Chidester et al., *J Am Chem Soc*, **103**: 7629-7635, 1981]. 그러나, 제한된 항원 발현을 통해 세포독성제의 효능을 증대시키고 표적화를 통해 몇몇 독성 효과를 피할 수 있는 항체-표적화된 화학요법을 위해 상기 약물들을 적합화시킬 수 있다 ([Liu et al., *Exp Opin Invest Drugs*, 6: 169-172, 1997]; [Chari et al., *Cancer Res*, 55: 4079-4084, 1995]). 정상의 건강한 세포를 보존하면서 상기 화합물들의 고도한 세포독성을 종양 매스로 특이적으로 표적화하기 위해 많은 노력을 기울였다. 연구는 TAP (종양-활성화된 프로드럭) 및 DEPT (항체-지정 효소 프로드럭 요법) 접근법을 포함하였다 ([Zhao et al., *Abstr Pap Am Chem Soc*, 224: 147-MEDI Part 142, 2002]; [Suzawa et al., *Bioorg Med Chem*, 8: 2175-2184, 2000]; [Wang et al., *BMC Chem Biol*, 1: 4, 2001]; [Tietze et al., *Chembiochem*, 2: 758-765, 2001]; [Tietze et al., *Bioorg Med Chem* 9: 1929-1939, 2001]). 상기 양 방법은 종양 부위에서 효소의 기질에 상기 분자들을 컨쥬게이션 시킴으로써 CC-1065 또는 듀오카르마이신 유사체의 세포독성을 저하시키는 것을 목적으로 한다. 첫번째 연구에서, 표적화된 효소는 종양 환경하에서 자연발생적으로 존재하는 반면, 두번째 연구에서, 효소는 종양-특이성 항체에 대한 컨쥬게이션시 종양 부위로 유도된다. 과학적으로 정밀함에도 불구하고, 상기 접근법에 대한 주요 결점은 프로드럭의 잔류하는 세포독성 및 종양 세포 밖으로의 유리 약물의 방출이다. 현재까지는, 약물을 항체 단편에 컨쥬게이션시킴으로써 듀오카르마이신 유사체를 종양 세포로 특이적으로 전달하려는 시도에 대해 보고된 바 없었다 [Duocarmycin, *J. Antibiotics*, 43:1037, 1990].

그러므로, 본 분야의 진보에도 불구하고, 예를 들면, 특히, 포유동물 및 인간의 암 및 종양과 같은 신생물 질병의 치료를 위한 개선된 치료제의 개발이 계속적으로 요구되고 있다. 더욱 특히, 치료제는 유사한 구조의 공지된 화합물과 비교하여 혈액내에서 안정성이 개선되고, 독성이 감소되며, 활성의 특이성이 고도한, 항체와 컨쥬게이션할 수 있는 세포독소 및 프로드럭일 수 있다.

요약

본 발명은 일반적으로 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 사용하여 신생물 질병을 치료하는 방법, 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 합성하는 방법, 및 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자로서 유용하거나 상기 분자의 합성에 유용한 화합물에 관한 것이다. 전형적으로 세포-표면 에피토프의 인식을 통해 화학요법제를 더욱 선택적으로 종양 세포에 전달하는 항체-약물 컨쥬게이트를 사용하여 본 발명의 잇점을 얻을 수 있다. 본 발명은 정상적인 세포와 비교하여 종양 세포상에서 상향조절된 수용체 또는 리간드를 표적하고, 가능하다면 내재화하는 인간 항체를 수득하기 위한 실행 가능한 항체-기초 치료법을 제공한다. 그러한 하나의 수용체는 몇몇 악성 암 세포상에서 과다발현되는 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 이다. Pan 10으로 언급되는, 인간 췌장암 세포에 의해 내재화된 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 에 대하여 특이적인 인간 단쇄 Fv 항체 (scFv)가 확인되었다. 본 발명의 방법은 항체를 이용하여 고도로 특이적인 방식으로 효능이 있는 세포독성 약물을 종양으로 직접 지정함으로써 무차별적인 세포 파괴를 감소시킨다. 이러한 방법은 화학요법제의 효능을 유효하게 증진시키면서, 화학요법제와 빈번하게 관련되어지는 부작용도 감소시킨다.

본 발명은 Pan 10상의 반응성 티올기의 화학적 도입, 효능이 있는 세포독성제 듀오카르마이신 SA의 말레이미드-유도화된 유사체와 개질된 scFv의 특이적인 컨쥬게이션, 및 생성된 컨쥬게이트의 특성을 제공한다. 본 발명은 Pan 10-약물 컨쥬게이트가 모 scFv의 내재화 능력을 유지시키고 나노몰 농도로 시험관내에서 세포독성 활성을 나타낸다는 증거를 제공한다. Pan 10-약물 컨쥬게이트가 흑색종, 전립선 암종, 신경아교종 및 인테그린 과다발현이 관여하는 다른 신생물을 포함하는 악성 질환의 표적화된 화학요법에 대한 유망한 후보물질이 될 수 있다.

하나의 실시태양에서, 포유동물의 신생물 질병을 치료하는 방법은 항체-세포독소 컨쥬게이트에 항체 및 세포독소 사이의 산-안정성 공유 결합을 제공하고, 항체-세포독소 컨쥬게이트를 포유동물에게 투여하고, 항체-세포독소 컨쥬게이트를 포유동물의 세포내로 내재화시켜 포유동물의 세포내의 신생물 질병을 치료하는 것을 포함한다.

상세한 실시태양에서, 세포독소는 항종양 항생제, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 A, 듀오카르마이신 SA, 또는 그의 유사체이다. 상세한 실시태양에서, 산-안정성 결합은 아마이드 결합이다. 추가의 상세한 실시태양에서, 아마이드 결합은 N-치환된 아마이드 결합이다. 상세한 실시태양에서, 항체는 활성화된 인테그린 수용체에 특이적으로 결합한다. 추가의 상세한 실시태양에서, 활성화된 인테그린 수용체는 유사한 비-전이 세포와 비교시 전이 상태의 세포상에서 차별적으로 생산된다. 추가의 상세한 실시태양에서, 활성화된 인테그린 수용체는 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체 또는 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체이다. 추가의 상세한 실시태양에서, 항체는 단쇄 Fv 항체이다.

추가 실시태양에서, 신생물 질병은 고형 종양, 혈액암, 백혈병, 결장직장암, 양성 또는 악성 유방암, 자궁암, 자궁근종, 난소암, 자궁내막암, 다낭성 난소 증후군, 자궁내막 폴립, 편평세포 암종, 머리 및 목의 편평세포 암종, 간세포 암종, 간세포 암종의 간내 전이, 전립선암, 전립선비대증, 뇌하수체암, 샘근육증, 샘암종, 췌장 샘암종, 수막종, 흑색종, 뼈암, 다발골수종, CNS 암, 신경아교종, 또는 별아세포종으로부터 선택된다.

또다른 실시태양에서, 포유동물의 신생물 질병을 치료하는 방법은 항체-세포독소 컨쥬게이트에 항체 및 세포독소 사이의 산-불안정성 공유 결합을 제공하고, 항체-세포독소 컨쥬게이트를 포유동물에게 투여하고, 항체-세포독소 컨쥬게이트를 포유동물의 세포내로 내재화시켜 포유동물의 세포내의 신생물 질병을 치료하는 것을 포함한다. 상세한 실시태양에서, 세포독소는 항종양 항생제, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 A, 듀오카르마이신 SA, 또는 그의 유사체이다. 상세한 실시태양에서, 산-불안정성 공유 결합은 히드라존 결합이다. 상세한 실시태양에서, 항체는 활성화된 인테그린 수용체에 특이적으로 결합한다. 추가의 상세한 실시태양에서, 활성화된 인테그린 수용체는 유사한 비-전이 세포와 비교시 전이 상태의 세포상에서 차별적으로 생산된다. 추가의 상세한 실시태양에서, 활성화된 인테그린 수용체는 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체 또는 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체이다. 추가의 상세한 실시태양에서, 항체는 단쇄 Fv 항체이다.

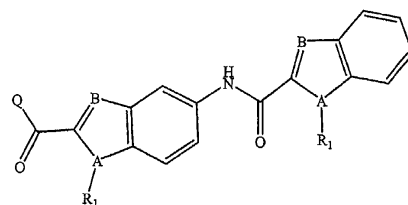
추가 실시태양에서, 포유동물의 신생물 질병을 치료하는 방법은 산-불안정성 히드라존 결합을 절단시키면서 포유동물의 세포내 항체-항종양 항생제 컨쥬게이트를 내재화하는 것을 포함한다.

또다른 실시태양에서, 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 합성하는 방법은 단일 용기내로 항체, 티올화제, 및 말레이미드-유도화된 세포독소를 도입하고, 항체를 티올화제와 접촉시켜 티올화된 항체를 형성하고, 티올화된 항체를 말레이미드-유도화된 세포독소와 접촉시켜 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 형성하는 것을 포함한다. 상세한 일면으로, 말레이미드-유도화된 세포독소는 말레이미드 및 세포독소 사이의 산-불안정성 히드라존 결합을 포함한다. 추가의 상세한 일면에서, 말레이미드-유도화된 세포독소는 말레이미드 및 세포독소 사이의 아마이드 결합 연결(amide bond linkage)을 포함한다. 추가의 상세한 일면에서, 세포독소는 항종양 항생제, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신 A, 듀오카르마이신 SA, 또는 그의 유사체이다. 추가의 상세한 실시태양에서, 항종양 항생제는 듀오카르마이신 SA의 카르보닐-치환된 CBI-인돌 유사체이다. 추가의 상세한 일면에서, 항종양 항생제는 듀오카르마이신 SA의 아마이드-치환된 CBI-인돌 유사체이다. 추가의 상세한 일면에서, 티올화제는 2-이미노티올란이다. 추가의 상세한 일면에서, 항체는 단쇄 Fv 항체이다.

추가 상세한 실시태양에서, 말레이미드-유도화된 세포독소는 1-[3-(N'-(1-[2-(1-클로로메틸-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌-3-카르보닐)-1H-인돌-5-일]-에틸리덴)-히드라지노)-3-옥소-1-프로필]말레이미드이다. 추가의 상세한 실시태양에서, 말레이미드-유도화된 세포독소는 3-[5-[1-{3-[3-(2,5-디옥소-2,5-디히드로피롤-1-일)프로피오닐아미노]프로필]인돌-2-카르보닐]아미노인돌-2-카르보닐]-(1-클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌이다.

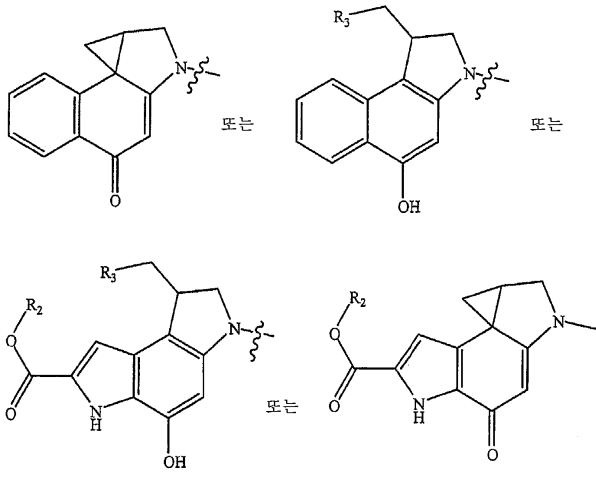
또다른 실시태양은 하기 화학식 I의 화합물, 또는 그의 입체이성체, 프로드럭, 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 산염 수화물, N-옥시드 또는 동형(isomorph) 결정질 형태이다:

화학식 I



상기 식에서,

Q는



각각의 A는 독립적으로 NR_1 , O 또는 S이되, 단, 적어도 하나의 A는 NR_1 이고;

각각의 B는 독립적으로 C 또는 N이고;

R_1 은 독립적으로 H 또는 $-(CH_2)_n-N(H)R_4$ 이되, 단, 하나의 R_1 은 H이고 나머지 하나는 $-(CH_2)_n-N(H)R_5$ 이고;

R_2 는 알킬이고;

R_3 은 할로젠이고;

R_4 는 H 또는 $-C(=O)-(CH_2)_m-N$ -말레이미드이고;

m은 2, 3, 4, 5 또는 6이고;

n은 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

상세한 실시태양에서, R_2 는 C_1 내지 C_6 알킬이다. 추가의 상세한 실시태양에서, 할로젠은 Cl, Br, 또는 F이다.

추가의 실시태양에서, 제약 조성물은 1종 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 부형제 및 유효량의 화학식 I의 화합물 (여기에서, 말레이미드 부위는 단쇄 Fv 항체와 컨주게이션되어 있다)을 포함한다. 상세한 일면으로, 단쇄 Fv 항체는 인테그린 수용체에 대한 항체이다. 추가의 상세한 일면에서, 인테그린 수용체는 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체 또는 $\alpha v\beta_3$ 인테그린 수용체이다. 추가의 상세한 실시태양에서, 방법은 화학식 I의 화합물을 포유동물에 투여하는 것을 포함한다.

추가의 상세한 실시태양에서, 듀오카르마이신 SA의 아미드-치환된 CBI-인돌 유사체와 컨주게이션된 항체를 사용하는 치료에 대하여 반응하는 것으로 판단되는 포유동물의 질환 상태를 완화시키는 방법은 포유동물에 치료량의 화학식 I의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 추가의 상세한 실시태양에서, 질환 상태는 신생물 질병이다.

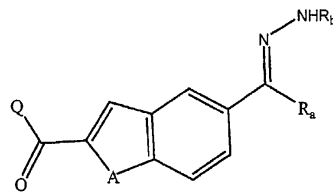
또다른 실시태양에서, 화합물은 3-[5-(1-(3-아미노프로필)인돌-2-카르보닐)아미노인돌-2-카르보닐]-1-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤즈[e]인돌이다.

또다른 실시태양에서, 화합물은 3-[5-(1-(3-아미노프로필)인돌-2-카르보닐)아미노인돌-2-카르보닐]-1-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤즈[e]인돌이다.

또다른 실시태양에서, 화합물은 3-[5-[1-{3-[3-(2,5-디옥소-2,5-디히드로피롤-1-일)프로피오닐아미노]프로필}인돌-2-카르보닐)아미노인돌-카르보닐]-(1-클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤즈[e]인돌이다.

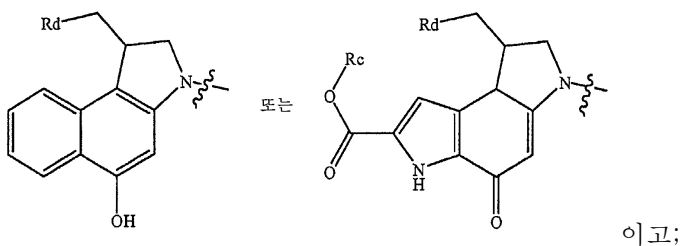
또다른 실시태양은 하기 화학식 II의 화합물, 또는 그의 입체이성체, 프로드럭, 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 산염 수화물, N-옥시드 또는 동형 결정질 형태이다:

화학식 II



상기 식에서,

Q는



A는 NH, O 또는 S이고;

R_a는 H 또는 알킬이고;

R_b는 H, 알킬 또는 -C(=O)-(CH₂)_r-N-말레이미드이고;

R_c는 알킬이고;

R_d는 할로젠이고;

r이 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

또다른 실시태양에서, 화합물은 1-[3-(N'-(1-[2-(1-클로로메틸-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌-3-카르보닐)-1H-인돌-5-일]-에틸리텐)-히드라지노)-3-옥소-1-프로필]말레이미드이다.

추가 실시태양에서, 제약 조성물은 1종 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 부형제 및 유효량의 화학식 II의 화합물 (여기에서, 말레이미드 부위는 단쇄 Fv 항체와 컨쥬게이션되어 있다)을 포함한다. 상세한 일면으로, 단쇄 Fv 항체는 인테그린 수용체에 대한 항체이다. 추가 상세한 일면에서, 인테그린 수용체는 α₃β₁ 인테그린 수용체 또는 αvβ₃ 인테그린 수용체이다.

추가 실시태양에서, 방법은 화학식 II의 화합물을 포유동물에 투여하는 것을 포함한다.

추가 실시태양에서, 듀오카르마이신 SA의 아미드-치환된 CBI-인돌 유사체와 컨쥬게이션된 항체를 사용하는 치료에 대하여 반응하는 것으로 판단되는 포유동물의 질환 상태를 완화시키는 방법은 포유동물에 치료량의 화학식 II의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 추가 상세한 실시태양에서, 질환 상태는 신생물 질병이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 일반적으로 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 사용하여 신생물 질병을 치료하는 방법, 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 합성하는 방법, 및 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자로서 유용하거나 상기 분자의 합성에 유용한 화합물에 관한 것이다. 유리 티올을 포함하는, 화학적으로 개질된 항-인테그린 $\alpha_3\beta_1$ scFv Pan 10은 효능이 있는 세포독성제 듀오카르마이신 SA의 말레이미드-유도화된 유사체와 컨쥬게이션될 수 있다. 항체 Pan 10 컨쥬게이트는 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 을 발현시키는 세포를 침투하는 능력을 유지한다. 특히, Pan 10-약물 컨쥬게이트는 시험관내에서 췌장 암종 세포에 대하여 우수한 세포독성 효과를 나타낸다. 효능은 우수하지만 임상적으로 실현불가능한 항암제인 본원에 기술된 유리 약물과 비교시 scFv 컨쥬게이트의 우수한 잇점을 고려하면 상기 첫번째 단계는 중요하다. 컨쥬게이트는 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 을 과다발현시키는 세포의 내부로 상기 약물 분자를 더욱 특이적으로 전달할 수 있고, 항체 약물 컨쥬게이트의 유효한 전달은 치료적 약물 노출을 감소시키고 효능은 증진시킬 수 있어야 한다. 상기 전략법의 사용으로 실험을 통해 암 치료에서 scFv-약물 고안에 대한 효능이 추가로 설명될 것이다.

SW1990 인간 췌장 샘암종 세포주에 의한 내재화의 선택적 요건에 기초한 인간 scFv-과지 디스플레이 라이브러리의 바이오패닝(biopanning)이 기술되어 있다 [Gao et al., *J Immunol Methods*, **274**: 185-197, 2003]. 면역침전, 질량분광 분석법 및 데이터 조사시, 막 수용체 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 을 표적하는 것으로 밝혀진, Pan 10으로 언급되는 단쇄 Fv 항체 (scFv)가 생산되었다. Pan 10의 $\alpha_3\beta_1$ 과의 특이적인 상호작용 및 내재화 능력 때문에 Pan 10 scFv는 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 을 과다발현시키는 악성 종양 세포의 파괴를 촉진시키는, 효능이 있는 듀오카르마이신-SA 유사체 3-(5-아세틸인돌-2-카르보닐)-1-(S)-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤즈[e]인돌 (화합물 1, 도 1) 및 3-[5-(1-(3-아미노프로필)인돌-2-카르보닐)아미노인돌-2-카르보닐]-1-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤즈[e]인돌 (화합물 2, 도 1)과의 컨쥬게이션을 위한 벡터일 수 있다 [Parrish et al., *Bioorg Med Chem*, **11**: 3815-3838, 2003]. 말레이미드-유도화된 세포독소는 제한하는 것은 아니지만, 1-[3-(N'-(1-[2-(1-클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌-3-카르보닐)-1H-인돌-5-일]-에틸렌)-히드라지노)-3-옥소-1-프로필]말레이미드 (화합물 3, 도 1), 또는 3-[5-[1-(3-[3-(2,5-디옥소-2,5-디히드로피롤-1-일)프로피오닐아미노]프로필)인돌-2-카르보닐]아미노인돌-2-카르보닐)-(1-클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤조[e]인돌 (화합물 4, 도 1)을 포함한다. 이에, (a) 표적 친화성 및 내재화 특성을 손상시키지 않으면서 항종양 약물(들)을 scFv Pan 10과 컨쥬게이션시키는 것, (b) 약물(들)의 세포독성 활성을 손상시키지 않으면서 scFv와 약물(들)의 효과적인 부착을 촉진시키는 링커의 고안, (c) Pan 10-약물 컨쥬게이트의 생물학적 활성을 평가하기 위하여 고안된 신뢰할 수 있는 세포-기초 측정법에 대한 연구를 포함하는 과제에 초점을 맞추기 위하여 노력하였다. 본 발명의 화합물 및 방법은 항암 화합물의 scFv-매개되고 종양-표적화된 전달의 치료적 적용을 제공한다.

본 발명은 특정 방법, 시약, 화합물, 조성물 또는 생물학적 시스템으로 제한되는 것은 아니며, 물론 상기는 다양화될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시태양을 기술하기 위한 것이며, 제한하고자 하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바, 단수 형태 ("하나"("a"), "하나"("an") 및 "그"("the"))는 문맥상 달리 정확하게 명시되지 않는 한 복수의 것도 포함한다. 따라서, 예를 들면, "하나의 세포"에 대한 언급은 2개 이상의 세포 조합 등을 포함한다.

달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 과학적 용어는 일반적으로 본 발명이 속하는 분야의 기술자들에 의해 보편적으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다. 일반적으로, 본원에서 사용되는 명칭 및 세포 배양, 분자 유전학, 유기 화학 및 핵산 화학에서의 실험 방법 및 하기 기술하는 혼성화는 본 분야에 잘 공지되어 있고 보편적으로 사용되는 것이다. 핵산 및 펩티드 합성을 위해 표준 기술이 사용된다. 일반적으로, 효소 반응 및 정제 공정은 제조사의 설명에 따라 실시한다. 기술 및 방법은 일반적으로 본 분야의 통상적인 방법 및 다양한 일반 참고문헌 (참조, 일반적으로, [Sambrook et al. 분자 CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.] (본원에서 참조로 인용된다))에 따라 실시하고, 이는 상기 문헌 전체에 통해 제공된다. 본원에서 사용되는 명칭 및 분석 화학에서의 실험 방법, 및 하기 기술하는 유기 합성은 본 분야에 잘 공지되어 있고 보편적으로 사용되는 것이다. 표준 기술, 또는 그의 개질은 화학 합성 및 화학 분석을 위해 사용된다. 용어 "치료제"는 치료학적 유효량으로 제시되었을 때 포유동물에 대하여 바람직한 치료 효과를 가져오는 화합물을 의미하고자 한다. 암종 치료를 위해 치료제는 또한 표적 세포로 이입할 수 있는 것이 바람직할 수 있다. 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 기술자들에 의해 보편적으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 교시를 위해 실제 사용될 수 있지만, 바람직한 물질 및 방법은 본원에 기술되어 있다. 본 발명을 기술하고 주장할 때, 하기 용어를 사용할 것이다.

"신생물 질병"은 조절되지 않는 세포의 성장으로부터 유발된 질환을 언급한다. 악성 신생물 질병의 타입은 제한하는 것은 아니지만, 암종, 육종, 백혈병, 및 림프종을 포함한다.

"신생물 세포" 및 "신생물"은 상대적으로 자율 성장을 나타냄으로써 세포 증식에 대한 조절이 현저하게 상실되었음을 특징으로 하는, 비정상적인 성장 표현형을 나타내는 세포를 언급한다. 신생물 세포는 활발하게는 복제 상태 또는 일시적으로는 비복제성 휴지 상태 (G1 또는 GO)일 수 있는 세포를 포함하고; 유사하게, 신생물 세포는 잘-분화된 표현형, 불충분하게 (poorly)-분화된 표현형을 갖는 세포, 또는 양 세포 타입의 혼합물을 포함한다. 따라서, 모든 신생물 세포가 필수적으로 주어진 시점에서 복제성 세포는 아니다. 신생물 세포로서 정의된 한 세트는 양성 신생물중 세포 및 악성 (또는 임상적으로 확실한(frunk)) 신생물중의 세포로 구성된다. 솔직하게, 신생물 세포는 주로 암 (상기 논의된다)으로서 언급되고, 전형적으로는, 내배엽 또는 외배엽성의 조직학적 기원의 세포로부터 기원할 경우에는 암종으로, 또는 중배엽으로부터 유도된 세포 타입으로부터 기원할 경우에는 육종으로서 명명된다.

여러 타입의 전이성 신생물 질병, 예를 들면, 악성 흑색종, 방광암, 눈 멜라닌세포 및 포도막 흑색종, 및 전립선 암종에서 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 발현이 증가된 것으로 관찰되었다. 신생물 질병, 예를 들면, 악성 유방암종에서 인테그린 $\alpha v\beta 1$ 발현이 증가된 것으로 관찰되었다. 본 발명의 조성물에 의해 치료될 수 있는 신생물 질병에 대한 추가적이 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 고형 종양, 혈액암, 백혈병, 결장직장암, 양성 또는 악성 유방암, 자궁암, 자궁근종, 난소암, 자궁내막암, 다낭성 난소 증후군, 자궁내막 폴립, 편평세포 암종, 머리 및 목의 편평세포 암종, 간세포 암종, 간세포 암종의 간내 전이, 전립선암, 전립선비대증, 뇌하수체암, 샘근육종, 샘암종, 췌장 샘암종, 수막종, 흑색종, 뼈암, 다발골수종, CNS 암, 신경아교종, 또는 별아세포종을 포함한다.

용어 "세포독소"는 암 세포에 대한 세포독성인 바람직한 효능을 갖는 치료제를 의미하고자 한다. 예시적인 세포독소는, 예로서 제한하는 것은 아니지만, 캄프레타스타틴, 듀오카르마이신, CC-1065 항종양 항생제, 안트라사이클린, 및 관련 화합물을 포함한다. 다른 세포독소는 마이코톡신, 리신 및 그의 유사체, 칼리케아마이신, 독시루비신 및 메이텐시노이드를 포함한다.

"산 안정성 공유 결합"은 항체-세포독소 컨쥬게이트가 예를 들면, 수용체 매개되는 세포내이입에 의해 세포로 이입할 때 세포내 환경에서 안정성인 항체 및 세포독소 사이의 공유 결합을 언급한다. 산 안정성 공유 결합은 일반적으로 항체-세포독소 컨쥬게이트가 세포로 이입할 때 절단되지 않는다. 항체 및 세포독소 사이의 아마이드 결합은 산 안정성 공유 결합의 일례이다.

"산-불안정성 공유 결합"은 항체-세포독소 컨쥬게이트가 예를 들면, 수용체 매개되는 세포내이입에 의해 세포로 이입할 때 세포내 환경에서 불안정한 항체 및 세포독소 사이의 공유 결합을 언급한다. 항체 및 세포독소 사이의 히드라존 결합이 산-불안정성 공유 결합의 일례이다.

용어 "마커"는 종양 또는 다른 의료적 증상의 특징화, 예를 들면, 종양 진단, 진행, 및 종양 세포에 의해 분비되는 요소 측정법에서 유용한 화합물을 의미하고자 한다. 마커는 "진단제"의 서브세트로서 인지되고 있다.

전이 세포상의 활성화된 인테그린 수용체의 "억제제," "활성제," 및 "조절제"는 각각 인테그린 수용체 결합 또는 신호화를 위한 시험관내 및 생체내 측정법에서 사용하는 것으로 확인된 억제제, 활성, 또는 조절성 분자, 예로서, 리간드, 작용제, 길항제, 및 그의 동족체 및 모사체(mimetic)를 언급하지 위하여 사용된다.

용어 "조절제"는 억제제 및 활성화제를 포함한다. 억제제는 예로서, 결합하거나, 부분적으로 또는 전체적으로 자극을 차단하거나, 활성화를 감소시키거나, 방해하거나, 지연시키거나, 활성화된 인테그린 수용체의 활성을 비활성화시키거나, 탈감작시키거나 하향조절하는 제제, 예로서, 길항제이다. 활성화제는 예로서, 결합하거나, 자극시키거나, 활성화를 증가시키거나, 개시하거나, 활성화시키거나, 촉진시키거나, 증진시키거나, 활성화된 인테그린 수용체의 활성을 감작시키거나 상향 조절하는 제제, 예로서, 작용제이다. 조절제는 단백질, 펩티드, 지질, 탄수화물, 다당류, 또는 상기의 조합물, 예로서, 지질단백질, 당단백질 등을 포함하여, 활성제 또는 억제제와 결합하는 단백질, 수용체와 활성화된 인테그린 수용체의 상호작용을 변화시키는 제제를 포함한다. 조절제는 예로서, 활성이 변화된 자연발생의 활성화된 인테그린 수용체 리간드의 유전적으로 개질된 버전, 및 자연발생 및 합성의 리간드, 길항제, 작용제, 화학적 소분자 등을 포함한다.

억제제 및 활성화제에 대한 상기의 측정법은 본원에 기술된 바와 같이, 예로서, 활성화된 인테그린 수용체를 발현시키는 세포에 추정적(putative) 조절제 화합물을 적용시킨 후, 인테그린 수용체 신호화에 대한 작용상의 효능을 측정하는 것을

포함한다. 효능이 있는 활성화제, 억제제, 또는 조절제로 처리된 활성화된 인테그린 수용체를 포함하는 샘플 또는 측정법을 억제제, 활성화제, 또는 조절제를 포함하지 않는 대조군 샘플과 비교하여 억제 범위를 조사한다. 대조군 샘플 (억제제로 처리하지 않음)을 100%의 상대 인테그린 수용체 활성값으로 지정할 수 있다. 활성화된 인테그린 수용체의 억제는 대조군에 대한 인테그린 수용체의 활성값이 약 80%, 임의로 50% 또는 25-0%일 때 달성된다. 인테그린 수용체의 활성화는 대조군에 대한 인테그린 수용체의 활성값이 110%, 임의로 150%, 임의로 200-500%, 또는 1000-3000% 초과일 때 달성된다.

용어 "표적화 기(targeting group)"는 (1) 표적 세포, 예를 들면, 특정 타입의 종양 세포에 부착되는 엔티티(entity) (예로서, 치료제 또는 마커)를 지정(direct)할 수 있거나 (2) 표적 조직, 예를 들면, 종양에서 우선적으로 활성화되는 부위를 의미하고자 한다. 표적화 기는 소분자일 수 있고, 이는 비-펩티드 및 펩티드 둘 모두를 포함하고자 한다. 표적화 기는 또한 거대분자일 수 있고, 이는 당류, 렉틴, 수용체, 수용체에 대한 리간드, 단백질, 예로서, BSA, 항체 등을 포함한다.

용어 "절단가능한 기" 또는 "절단가능한 결합"은 생체내에서 불안정한 부위를 의미하고자 한다. 바람직하게, "절단가능한 기" 또는 "절단가능한 결합"은 컨주게이트의 잔여 부분으로부터 마커 또는 제제를 절단하여 마커 또는 치료제를 활성화시킬 수 있다. 유효하게 정의되는 바, 링커는 바람직하게 생물학적 환경에 의해 생체내에서 절단된다. 절단은 제한없이 예로서, 효소적, 환원적, pH 등과 같은 임의의 프로세스로부터 발생할 수 있다. 바람직하게, 절단가능한 기는 치료 작용 부위 또는 마커 활성화 부위와 같이 표적 세포 (예로서, 암종 세포) 또는 조직내 또는 그에 근접한 부위일 수 있는 바람직한 작용 부위에서 활성화가 될 수 있도록 선택된다. 상기 절단은 효소적인 것이고, 예시적인 효소적으로 절단가능한 기는 천연 아미노산, 또는 천연 아미노산으로 종결되고, 그의 카르복실 말단에서 링커에 결합되어 있는 펩티드 서열을 포함한다. 절단 속도 증가 정도는 본 발명에 있어 중요하지 않고, 절단가능한 링커의 바람직한 예는 적어도 약 10%, 가장 바람직하게, 적어도 약 35%의 절단가능한 기가 투여 24시간 이내에 혈류내에서 절단되는 것이다. 바람직한 절단가능한 기는 펩티드 결합, 에스테르 결합, 및 디설파이드 결합이다.

결합으로서 사용되거나 결합에 대하여 수직으로 표시된 부호,

page 17

는 표시된 부위가 분자의 잔여 부분, 고체 지지체 등에 결합하는 지점을 나타낸다.

용어 "알킬"은 그 자체 또는 또다른 치환체의 일부로서, 달리 언급하지 않는 한, 전체적으로 포화되거나, 단일- 또는 다불포화될 수 있고 2가 및 다가 라디칼을 포함할 수 있고, 지정된 갯수의 탄소 원자를 갖는 (즉, C₁-C₁₀은 1 내지 10개의 탄소를 의미한다), 직쇄 또는 분지쇄, 또는 사이클릭 탄화수소 라디칼, 또는 그의 조합물일 수 있다. 포화된 탄화수소 라디칼의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 동족체 및 이성체, 예를 들면, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등과 같은 기를 포함한다. 불포화된 알킬기는 하나 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 갖는 것이다. 불포화된 알킬기의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 비닐, 2-프로페닐, 크로틸, 2-이소펜테닐, 2-(부타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에틸닐, 1- 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 및 고급 동족체 및 이성체를 포함한다. 용어 "알킬"은 달리 언급하지 않는 한, 하기에 더욱 상세히 정의되는 알킬 유도체, 예로서, "헤테로알킬"을 포함하는 것으로 의미된다. 탄화수소기로 제한되는 알킬기는 "호모알킬"이다.

용어 "알킬렌"은 그 자체 또는 또다른 치환체의 일부로서 알칸으로부터 유도된 2가 라디칼을 의미하고, 그의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, CH₂CH₂CH₂CH₂이고 추가로, "헤테로알킬렌"과 같은 하기 기술되는 기를 포함한다. 전형적으로, 알킬 (또는 알킬렌) 기는 1 내지 24개의 탄소 원자를 가질 것이고, 본 발명에서 바람직한 것은 10개 이하의 탄소 원자를 갖는 기를 포함한다. "저급 알킬" 또는 "저급 알킬렌"은 일반적으로 8개 이하의 탄소 원자를 갖는 단쇄의 알킬 또는 알킬렌기이다.

용어 "헤테로알킬"은 지정된 갯수의 탄소 원자 및 O, N, Si 및 S로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자로 구성되며, 여기에서, 질소, 탄소 및 황 원자는 임의로 산화될 수 있고 질소 헤테로원자는 임의로 4급화될 수 있는, 그 자체 또는 또다른 용어와의 조합으로, 달리 언급하지 않는 한, 안정적인 직쇄 또는 분지쇄, 또는 사이클릭 탄화수소 라디칼, 또는 그의 조합물을 의미한다. 헤테로원자(들) O, N 및 S 및 Si은 알킬기는 분자의 잔여 부분에 부착되어진 위치 또는 헤테로알킬기의 임의의 내부 위치에 위치할 수 있다. 예로서, 제한하는 것은 아니지만, CH₂CH₂OCH₃, CH₂CH₂NHCH₃, CH₂CH₂N(CH₃)CH₃, -CH₂SCH₂-CH₃, CH₂CH₂, S(O)CH₃, CH₂CH₂S(O)₂CH₃, CH=CHOCH₃, Si(CH₃)₃, -

$\text{CH}_2\text{CH}=\text{NOCH}_3$, 및 $\text{CH}=\text{CHN}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ 을 포함한다. 예를 들면, $\text{CH}_2\text{NHOCH}_3$ 및 $\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ 과 같이 2개 이상의 헤테로원자가 연속될 수 있다. 유사하게, 용어 "헤테로알킬렌"은 그 자체 또는 또다른 치환체의 일부로서 헤테로알킬로부터 유도된 2가 라디칼을 의미하고, 예로서, 제한하는 것은 아니지만, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2$ 및 $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2$ 이다. 헤테로알킬렌기의 경우, 헤테로원자는 또한쇄 말단중 하나 또는 둘 모두를 차지할 수 있다(예로서, 알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노 등). 용어 "헤테로알킬" 및 "헤테로알킬렌"은 폴리(에틸렌 글리콜) 및 그의 유도체를 포함한다(참조, 예를 들면, [Shearwater Polymers Catalog, 2001]). 추가로, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결기의 경우, 연결기의 방향성은 기록된 연결기 식의 방향성을 암시하지는 않는다. 예를 들면, 식 $\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 은 $\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 및 $\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$ 둘 모두를 나타낸다.

용어 "알킬" 또는 "헤테로알킬"과 조합된 용어 "저급"은 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 부위를 언급한다.

용어 "알콕시", "알킬아미노" 및 "알킬티오" (또는 티오알콕시)는 그의 종래의 의미대로 사용되고, 각각 산소 원자, 아미노기, 또는 황 원자를 통해 분자의 잔여 부분에 부착된 알킬기를 언급한다.

일반적으로, "아실 치환체"는 또한 상기 기술된 기로부터 선택된다. 본원에서 사용되는 방, 용어 "아실 치환체"는 본 발명의 화합물의 폴리사이클릭 핵에 직접 또는 간접적으로 부착된 카르보닐 탄소의 원자기를 만족시키면서 부착된 기를 언급한다.

용어 "시클로알킬" 및 "헤테로시클로알킬"은 그 자체로 또는 다른 용어와 조합하여, 달리 언급하지 않는 한, 각각 치환되거나 치환되지 않은 "알킬" 및 치환되거나 치환되지 않은 "헤테로알킬"의 사이클릭 버전을 나타낸다. 추가로, 헤테로시클로알킬의 경우, 헤테로원자는 헤테로사이클이 분자의 잔여 부분에 부착된 위치를 차지할 수 있다. 시클로알킬의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 시클로펜틸, 시클로헥실, 1-시클로헥세닐, 3-시클로헥세닐, 시클로헵틸 등을 포함한다. 헤테로시클로알킬의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 1-(1,2,5,6-테트라히드로피리딜), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모르폴리닐, 3-모르폴리닐, 테트라히드로푸란-2-일, 테트라히드로푸란-3-일, 테트라히드로티엔-2-일, 테트라히드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐 등을 포함한다. 사이클릭 구조의 헤테로원자 및 탄소 원자는 임의로 산화된다.

용어 "할로" 또는 "할로겐"은 그 자체 또는 또다른 치환체의 부분으로서, 달리 언급하지 않는 한, 불소, 염소, 브롬, 또는 요오드 원자를 의미한다. 추가로, "할로알킬"과 같은 용어는 모노할로알킬 및 폴리할로알킬을 포함하는 것으로 의미된다. 예를 들면, 용어 "할로($\text{C}_1\text{-C}_4$)알킬"은 제한하는 것은 아니지만, 트리플루오로메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 4-클로로부틸, 3-브로모프로필 등을 포함한다.

용어 "아릴"은, 달리 언급하지 않는 한, 함께 융합되거나 공유결합된 단일 환 또는 다중 환 ((바람직하게, 1 내지 3개의 환) 일 수 있는 치환되거나 치환되지 않은 다불포화된, 방향족 탄화수소 치환체를 의미한다. 용어 "헤테로아릴"은 N, O, 및 S로부터 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하되, 여기에서, 질소, 탄소 및 황 원자는 임의로 산화되고, 질소 원자(들)은 임의로 4급화된 아릴기 (또는 환)을 언급한다. 헤테로아릴기는 헤테로원자를 통해 분자의 잔여 부분에 부착될 수 있다. 아릴 및 헤테로아릴기의 비제한적인 예로서, 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-bi페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-이속사졸릴, 4-이속사졸릴, 5-이속사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 2-피리미딜, 4-피리미딜, 5-벤조티아졸릴, 피리닐, 2-벤즈이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-이소퀴놀릴, 5-이소퀴놀릴, 2-퀴녹살리닐, 5-퀴녹살리닐, 3-퀴놀릴, 및 6-퀴놀릴을 포함한다. 상기 언급된 아릴 및 헤테로아릴 환 시스템의 각각에 대한 치환체는 하기 기술하는 허용되는 치환체 군으로부터 선택된다. "아릴" 및 "헤테로아릴"은 또한 하나 이상의 비방향족 환 시스템이 아릴 또는 헤테로아릴 시스템에 융합되거나, 다르게는 결합된 환 시스템을 포함한다.

간단하게, 용어 "아릴"은 다른 용어와 조합되어 사용될 때 (예로서, 아릴옥시, 아릴티옥시, 및 아릴알킬) 상기 정의된 바와 같은 아릴 및 헤테로아릴 환을 포함한다. 따라서, 용어 "아릴알킬"은 탄소 원자 (예로서, 메틸렌기)가 예를 들면, 산소 원자 (예로서, 페녹시메틸, 2-피리딜옥시 메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필 등)로 대체된 알킬기를 포함하는, 아릴기가 알킬기 (예로서, 벤질, 페네틸, 피리딜메틸 등)에 부착된 라디칼을 포함하는 것으로 의미된다.

각각의 상기 용어 (예로서, "알킬", "헤테로알킬", "아릴" 및 "헤테로아릴")는 치환 및 치환되지 않은 형태의 지정된 라디칼을 포함한다. 각 타입의 라디칼에 대한 바람직한 치환체를 하기에 제공한다.

알킬, 및 헤테로알킬 라디칼에 대한 치환체 (주로 알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 시클로알케닐, 및 헤테로시클로알케닐로서 언급된 기를 포함)는 일반적으로 각각 "알킬 치환체" 및 "헤테로알킬 치환체"로서 언급되고, 제한하는 것은 아니지만, 0 내지 ($2m+1$) (여기에서, m '은 상기 라디칼중 탄소 원자의 총 개수이다)의 숫자 범위로 OR' , $=O$, $=NR'$, $=NOR'$, $NR'R''$, SR' , -할로젠, $SiR'R''R'''$, $OC(O)R'$, $C(O)R'$, CO_2R' , $-CONR'R''$, $OC(O)NR'R''$, $NR'C(O)R'$, $NR'-C(O)NR'R''$, $NR'C(O)_2R'$, $NR-C(NR'R''R''')=NR'''$, $NRC(NR'R'')=NR'''$, $S(O)R'$, $S(O)_2R'$, $S(O)_2NR'R''$, $NRSO_2R'$, CN 및 NO_2 를 포함한다. R' , R'' , R''' 및 R'''' 은 각각 바람직하게, 독립적으로 수소, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 예로서, 1-3개의 할로젠으로 치환된 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기, 또는 아릴알킬기를 언급한다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함할 때, 예를 들면, 각각의 R기는 하나 이상의 기가 존재할 때 각각의 R' , R'' , R''' 및 R'''' 기와 같이 독립적으로 선택된다. R' 및 R'' 은 동일한 질소 원자에 부착되고, 이는 질소 원자와 함께 결합하여 5-, 6-, 또는 7-원 환을 형성한다. 예를 들면, $-NR'R''$ 는 제한하는 것은 아니지만, 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하는 것으로 의미된다. 치환체에 대하여 상기 논의된 바로부터 본 분야의 기술자는 수소기 이외의 기에 결합한 탄소 원자를 포함하는 기, 예로서, 할로알킬 (예로서, CF_3 및 CH_2CF_3) 및 아실 (예로서, $C(O)CH_3$, $C(O)CF_3$, $C(O)CH_2OCH_3$ 등)를 포함하는 것으로 의미된다.

알킬 라디칼에 대하여 기술된 치환체와 유사하게, 아릴 치환체 및 헤테로아릴 치환체는 각각 "아릴 치환체" 및 "헤테로아릴 치환체"로서 언급되고 다양화되고 방향족 환 시스템상에서 0개 내지 오픈 원자가 개수 범위의 수로 예를 들면: 할로젠, OR' , $=O$, $=NRR'$, $=NOR'$, $NR'R''$, SR' , -할로젠, $SiR'R''R'''$, $OC(O)R'$, $C(O)R'$, $-CO_2R'$, $CONR'R''$, $OC(O)NR'R''$, $NR'C(O)R'$, $NR'C(O)NR'R''$, $NR'C(O)_2R'$, $NR-C(NR'R'')=NR'''$, $S(O)R'$, $S(O)_2R'$, $S(O)_2NR'R''$, $NRSO_2R'$, CN 및 NO_2 , R' , N_3 , $-CH(Ph)_2$, 플루오로(C_1-C_4)알콕시, 및 플루오로(C_1-C_4)알킬로부터 선택되며, 여기에서, R' , R'' , R''' 및 R'''' 은 바람직하게, 독립적으로 수소, (C_1-C_8)알킬 및 헤테로알킬, 치환되지 않은 아릴 및 헤테로아릴, (치환되지 않은 아릴)-(C_1-C_4)알킬, 및 (치환되지 않은 아릴)옥시-(C_1-C_4)알킬로부터 선택된다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함할 때, 예를 들면, 하나 이상의 각각의 R' , R'' , R''' 및 R'''' 기가 존재할 때의 각각의 R' , R'' , R''' 및 R'''' 기와 같이 독립적으로 선택된다.

아릴 또는 헤테로아릴 환중 인접한 원자상의 2개의 아릴 치환체는 임의로 식 $-T-C(O)(CRR')_qU$ 의 치환체로 대체될 수 있고, 여기에서, T 및 U 는 독립적으로 NR , O , CRR' 또는 단일 결합이고, q 는 0 내지 3의 정수이다. 다르게는, 아릴 또는 헤테로아릴 환중 인접한 원자상의 2개의 치환체는 임의로 식 $-A-(CH_2)_r-B$ 의 치환체로 대체될 수 있고, 여기에서, A 및 B 는 독립적으로 CRR' , O , NR , S , $S(O)$, $S(O)_2$, $S(O)_2NR'$ 또는 단일 결합이고, r 은 0 내지 4의 정수이다. 그에 따라 형성된 새로운 환중 단일 결합중 하나는 이중 결합으로 대체될 수 있다. 다르게는, 아릴 또는 헤테로아릴 환중 인접한 원자상의 2개의 치환체는 임의로 식 $(CRR')_sX(CR'R''')_d$ 의 치환체로 대체될 수 있고, 여기에서, s 및 d 는 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, X 는 O , NR' , S , $S(O)$, $S(O)_2$, 또는 $S(O)_2NR'$ 이다. 치환체 R , R' , R'' 및 R''' 은 바람직하게, 독립적으로 수소 또는 치환되거나 치환되지 않은 (C_1-C_6)알킬로부터 선택된다.

본원에서 사용되는 방, 용어 "헤테로원자"는 산소 (O), 질소 (N), 황 (들) 및 실리콘 (Si)을 포함한다.

중성 형태의 화합물은 바람직하게 염을 염기 또는 산과 접촉시키고 통상의 방식으로 모 화합물을 분리하여 재생된다. 모 형태의 화합물은 예로서, 극성 용매중의 용해도와 같은 특성의 물리적 성질면에서 다양한 염 형태와 상이하지만, 염은 본 발명의 목적을 위한 모 형태의 화합물과는 동등하다.

염 형태외에도, 본 발명은 프로드럭 형태의 화합물을 제공한다. 본원에 기술된 화합물의 프로드럭은 본 발명의 화합물을 제공하는 생리학적 조건하에서 용이하게 화학적으로 변화하는 화합물이다. 추가로, 프로드럭은 생체외의 환경하에서 화학적 또는 생화학적 방법에 의해 본 발명의 화합물로 전환될 수 있다. 예를 들면, 프로드럭은 적절한 효소 또는 화학제와 함께 경피용 패취 저장소에 위치할 때 본 발명의 화합물로 서서히 전환될 수 있다.

본 발명의 특정 화합물은 수화된 형태를 포함하는 용매화된 형태 및 비용매화된 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로, 용매화된 형태는 비용매화된 형태와 동등하고 본 발명의 범주내에 포함된다. 본 발명의 특정 화합물은 다중 결정질 또는 무정형 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로, 모든 물리적 형태는 본 발명에 의해 주시되는 용도에 대하여 동등하고 본 발명의 범주내에 포함된다.

본 발명의 화합물은 또한 상기 화합물을 구성하는 하나 또는 그 이상의 원자에서 원자성 동위원소를 비자연적 비율로 포함한다. 예를 들면, 화합물은 방사성 동위원소, 예를 들면, 삼중수소(^3H), 요오드-125(^{125}I) 또는 탄소-14(^{14}C)로 방사선표지될 수 있다. 방사성인지와는 상관없이 본 발명의 화합물의 모든 동위원소 변이는 본 발명의 범주내에 포함시키고자 한다.

용어 "부착 부위" 또는 "표적화 기를 부착시키기 위한 부위"는 표적화 기를 링커에 부착시킬 수 있는 부위를 언급한다. 전형적인 부착기(attachng group)는 예로서 제한하는 것은 아니지만, 알킬, 아미노알킬, 아미노카르보닐알킬, 카복시알킬, 히드록시알킬, 아킬-말레이미드, 알킬-N-하이드록실숙신이미드, 폴리(에틸렌 글리콜)-말레이미드 및 폴리(에틸렌 글리콜)-N-하이드록실숙신이미드를 포함하고, 이들 모두는 추가로 치환될 수 있다. 링커는 또한 실제로 표적화 기에 부착 부위가 부가(append)될 수 있도록 할 수 있다.

본원에서 사용되는 바, 용어 "이탈기"는 반응에서 기질로부터 절단된 기질의 부분을 언급한다.

본원에서 사용되는 바, "고체 지지체"는 선택된 용매 시스템에서 실질적으로 불용성이거나, 가용성인 선택된 용매 시스템으로부터 용이하게 분리 (예로서, 침전에 의해)될 수 있는 물질을 언급한다. 본 발명의 실시예에 유용한 고체 지지체는 선택된 종이 고체 지지체에 결합할 수 있도록 활성화되거나 활성화될 수 있는 군을 포함한다. 고체 지지체는 또한 칩, 와퍼, 또는 웰과 같이 개개의, 또는 하나 이상의 본 발명의 화합물이 결합되는 기질일 수 있다.

본원에서 사용되는 바, "반응성 작용기"는 제한하는 것은 아니지만, 올레핀, 아세틸렌, 알코올, 페놀, 에테르, 옥시드, 할라이드, 알데히드, 케톤, 카르복실산, 에스테르, 아미드, 시아네이트, 이소시아네이트, 티오시아네이트, 이소티오시아네이트, 아민, 하이드라진, 히드라존, 하이드라지드, 디아조, 디아조늄, 니트로, 니트릴, 머캅토, 설파이드, 디설파이드, 설펍사이드, 설펍, 설펍산, 설펍산, 아세탈, 케탈, 안하이드리드, 설펍사이드, 설펍산 이소니트릴, 아미딘, 이미드, 이미데이트, 니트론, 하이드록실아민, 옥심, 히드록삼 산 티오히드록삼 산, 알렌, 오르토 에스테르, 설파이트, 에나민, 이나민, 우레아, 슈도우레아, 세미카바미드, 카보디이미드, 카바메이트, 이민, 아지드, 아조 화합물, 아족시 화합물, 및 니트로조 화합물을 포함한다. 반응성 작용기는 또한 바이오컨쥬게이트를 제조하기 위하여 사용되는 것, 예로서, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 말레이미드 등을 포함한다 (참조, 예를 들면, [Hermanson, BIOCONJUGATE Technology, Academic press, San Diego, 1996]). 이들 작용기를 제조하는 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있고 특정 목적을 위한 그에 대한 적용 또는 개질은 본 분야의 기술자의 능력내에 있다 (참조, 예를 들면, [Sandler and Kara, eds. ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS, Academic Press, San Diego, 1989]).

본 발명의 특정 화합물은 비대칭 탄소 원자 (광학 중심) 또는 이중 결합을 포함하고; 라세메이트, 디아스테레오머, 기하 이성체 및 각각의 이성체는 본 발명의 범주내 포함된다. 본 발명의 화합물은 단일 이성체 (예로서, 에난티오머, 시스-트랜스, 위치, 디아스테레오머) 또는 이성체의 혼합물로서 제조된다. 바람직한 실시태양에서, 화합물은 실질적으로 단일 이성체로서 제조된다. 실질적으로 이성체인 순수 화합물을 제조하는 방법은 본 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 에난티오머적으로 풍부한 혼합물 및 순수한 에난티오머 화합물은 변치않는 키랄 중심에서 입체화학을 이탈하거나 그의 완전한 전회 (invert)를 일으키는, 반응물과 배합된 에난티오머적으로 순수한 합성 중간체를 사용함으로써 제조될 수 있다. 다르게는, 합성 경로를 따라 최종 산물 또는 중간체는 단일 입체이성체로 분할될 수 있다. 변치않는 특징의 입체중심을 전회시키거나 이탈시키는 기술, 및 입체이성체의 혼합물을 분할하는 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있고 특정 상태를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있는 본 분야의 기술자의 능력내에 있다 (참조, 일반적으로, [Fumiss et al. (eds.), VOGEL'S

ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY 5th ED., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, pp. 809-816]; 및 [Heller, Ace. Chem. Res. 23: 128 (1990)]).

면역독소

본 발명은 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 합성하는 방법, 및 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자, 또는 면역독소로서 유용하거나, 상기 분자들의 합성에 유용한 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 면역독소와 같은, 항체의 면역화학적 유도체에 관한 것이다. 예로서, 그의 불변 영역과 함께 적절한 효과기의 작용을 수반하는 항체도 사용하여 자연발생적인 완전한 프로세스를 통해 용해(lysis)를 유도하고, 정상적으로 존재하는 항체 의존적 세포독성 세포와 상호작용한다. 예를 들면, 정제된, 멸균의 여과된 항체는 임의로 암 요법에서 사용하기 위한 듀오카르마이신과 같은 세포독소에 컨쥬게이션된다. 예를 들면, 본 발명의 방법은 암 요법에서 사용하기 위한 면역독소로서의 용도를 위한 인간화된 항체를 획득하기에 적절하다.

본 발명의 방법은 항체를 사용하여 고도로 선택적인 방식으로 효능이 있는 세포독성 약물을 종양으로 직접 유도하여 무차별적인 세포 파괴를 감소시키는 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 제공한다. 본 방법은 화학요법제의 효능은 증진시키고, 빈번하게 그와 관련된 부작용 또한 저하시킬 것이다.

면역독소의 세포독성 부위는 세포독성 약물 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독성, 또는 상기 독소의 효소적으로 활성인 독성일 수 있다. 효소적으로 활성인 독성 및 그의 단편은 제한하는 것은 아니지만, 듀오카르마이신 및 그의 유사체를 포함한다. 효소적으로 활성인 독성 및 그의 단편은 추가로 제한하는 것은 아니지만, 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래), 리신 A쇄, 아르빈 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르시나, 알류리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 피토락카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리시스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토켈린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다.

항체가 소분자의 항암 약물, 예로서, 시스-플라틴 또는 5-플루오로우라실에 컨쥬게이션될 때 "항체-세포독소 컨쥬게이트"가 형성된다. 모노클로날 항체 및 세포독성 부위의 컨쥬게이트는 다양한 이작용성 단백질 커플링제를 사용하여 제조할 수 있다. 상기 시약의 예는 SPDP, IT, 이미도에스테르의 이작용성 유도체, 예로서, 디메틸 아디피미데이트 HCl, 활성 에스테르 예로서, 디숙신이미딜 수베레이트, 알데히드 예로서, 글루타르알데히드, 비스-아지도 화합물, 예로서, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민, 비스-디아조늄 유도체 예로서, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민, 디이소시아네이트 예로서, 토일렌 2,6-디이소시아네이트, 및 비스-활성 불소 화합물, 예로서, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠이다. 독소중 분해 부분은 항체의 Fab 단편에 연결될 수 있다.

면역독소는 본원에 기술된 다양한 방식으로 제조될 수 있다. 종래 공지되어 있는 가교결합제를 사용하여 안정적인 컨쥬게이트를 수득할 수 있다.

유리하게, 감염된 세포 표면에 노출된 항원 영역과 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체는 리신 A쇄와 결합한다. 가장 유리하게, 리신 A쇄는 탈글리코실화되고 제조할 수단을 통해 생산된다. 리신 면역독소를 제조하는 유리한 방법은 [Vitetta et al., *Science* **238**:1098 (1987)]에 기술되어 있다.

진단용으로 시험관내에서 감염된 인간 세포를 사멸시키기 위하여 사용할 경우, 컨쥬게이트를 전형적으로 적어도 약 10nM의 농도로 세포 배양 배지에 첨가할 것이다. 시험관내에서 사용하기 투여 방식 및 제제는 중요하지 않다. 배양액 또는 관류 배지와 적합성인 수성 제제를 사용할 것이다. 세포독성은 종래 기술에 의해 판독될 수 있다.

감염된 세포를 치료하기 위한 세포독성 방사능약제는 방사성 동위원소 (예로서, I, Y, Pr)를 항체와 컨쥬게이션시켜 제조할 수 있다. 유리하게, 알파 입자-방출 동위원소를 사용한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "세포독성 부위"는 상기 동위원소를 포함하고자 한다.

추가 실시태양에서, 독소-컨쥬게이트는 Fab 또는 F(ab')₂ 단편으로 제조된다. 상기 단편의 크기는 상대적으로 작기 때문에, 이는 조직을 더욱 잘 침투하여 감염된 세포로 도달할 수 있다.

또다른 실시태양에서, 융합성 리포솜은 세포독성 약물로 가득 차있고 리포솜은 특정 항원과 특이적으로 결합하는 항체로 피복된다.

항체 및 그의 용도

"항체"는 항체와 특이적으로 결합하고 인식하는 면역글로불린 유전자 또는 그의 단편으로부터 프레임워크 부위를 포함하는 폴리펩티드를 언급한다. 인식된 면역글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론, 및 뮤 불변 부위 유전자, 및 미리아드 면역글로불린 가변 부위 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로서 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되고, 각각 면역글로불린 부류, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 정의한다. 전형적으로, 항체의 항원-결합 부위가 결합의 특이성 및 친화성에 가장 중요할 것이다.

본 발명은 추가로 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 및 T-세포 항원 수용체 (TCR)에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, 및 IgG₄를 포함), IgA (IgA₁ 및 IgA₂를 포함), IgD, IgE, 또는 IgM, 및 IgY를 포함한다.

본원에서 사용되는 바, 용어 "항체" (Ab)는 단쇄 전 항체, 및 그의 단편 항원-결합을 포함하는 전 항체를 포함하는 것으로 의미된다. 가장 바람직하게, 항체는 본 발명의 인간 항원 결합 항체 단편이고 제한하는 것은 아니지만, Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, 단쇄 Fvs (scFv), 단쇄 항체, 디설파이드-결합된 Fvs (sdFv) 및 V_L 또는 V_H를 포함하는 단편을 포함한다. 항체는 조류 및 포유동물을 포함하는 임의의 동물로부터 기원할 수 있다. 바람직하게, 항체는 인간, 무린, 래빗, 염소, 기니 피그, 낙타, 말, 또는 닭이다.

단쇄 항체를 포함하는 항원-결합 항체 단편은 가변 부위(들)만을 또는 힌지 부위, CH₁, CH₂, 및 CH₃ 영역을 전체 또는 부분적으로 배합된 가변 부위(들)을 포함한다. 가변 부위(들) 및 힌지 부위, CH₁, CH₂, 및 CH₃ 영역의 임의의 배합물 또한 본 발명에 포함된다. 본 발명은 추가로 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는, 모노클로날, 폴리클로날, 키메라, 인간화된, 및 인간 모노클로날 및 인간 폴리클로날 항체를 포함한다. 본 발명은 추가로 본 발명의 항체에 대하여 항-이디오타 입인 항체를 포함한다.

본 발명의 항체는 단일특이성, 이중특이성, 삼중특이성 또는 그 이상의 다중특이성일 수 있다. 다중특이 항체는 본 발명의 폴리펩티드의 상이한 에피토프에 대하여 특이성일 수 있거나 본 발명의 폴리펩티드뿐만 아니라 이중 조성물, 예로서, 이중 폴리펩티드 또는 고체 지지체 물질 둘 모두에 대하여 특이성일 수 있다 (참조, 예로서, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; [Tutt et al., *J. Immunol.* **147**: 60-69, 1991]; 미국특허 번호 제 5,573,920호, 제 4,474,893호, 제 5,601,819호, 제 4,714,681호, 제 4,925,648호 (각각은 모든 목적을 위해 전체적으로 참고문헌으로서 본원에서 인용된다); [Kostelny et al., *J. Immunol.* **148**: 1547-1553, 1992]).

완전한 "항체"는 디설파이드 결합에 의해 상호결합된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)을 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 부위 (본원에서 HCVR 또는 V_H로 약칭된다) 및 중쇄 불변 부위로 구성된다. 중쇄 불변 부위는 3개의 영역, CH₁, CH₂ 및 CH₃으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 부위 (본원에서 LCVR 또는 V_L로 약칭된다) 및 경쇄 불변 부위로 구성된다. 경쇄 불변 부위는 하나의 영역, C_L로 구성된다. V_H 및 V_L 부위는 소위 프레임워크 부위 (FR)로 명명되는, 더욱 보존적인 부위와 함께 산재되어 있는, 소위 상보성 결정 부위 (CDR)로 명명되는 과다가변 부위로 추가로 하위분류될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 하기의 순서: FR₁, CDR₁, FR₂, CDR₂, FR₃, CDR₃, FR₄로 아미노-말단으로부터 카르복실-말단으로 배열되어 있는 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되어 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 부위는 항원과 상호작용하는 결합 영역을 포함한다. 항체의 불변 부위는 면역계의 다양한 세포 (예로서, 효과기 세포) 및 표준 보체계의 제 1 성분 (C1q)를 포함하는 숙주 조직 또는 인자와 면역글루블린의 결합을 매개할 수 있다. 용어 항체는 활성화된 인테그린 수용체와 결합하는 능력을 보유하는 완전한 항체의 항원-결합 부분을 포함한다. 결합의 예로서 (i) V_L, V_H, C_L 및 CH₁ 영역으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 부위에서의 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) V_H 및 CH₁ 영역으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 V_L 및 V_H 영역으로 구성된 Fv 단편, (v) V_H 영역으로 구성된 dAb 단편 [Ward et al., *Nature* **341**: 544-546, 1989]; 및 (vi) 분리된 상보성 결정 부위 (CDR)를 포함한다.

"분리된" 항체는 그의 자연발생적 환경의 성분으로부터 확인되고 분리되고 회수된 것이다. 그의 자연발생적 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료적 용도를 방해하는 물질로서, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정되는 바, 95중량% 초과, 및 가장 바람직하게 99중량% 이상의 항체로, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열중 적어도 15개의 잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원성 조건하의 SDS-PAGE에 의해 동질성으로 정제될 것이다. 항체의 자연발생적 환경의 적어도 하나의 성분은 존재하지 않기 때문에 분리된 항체는 제조할 15개의 세포내 동소의 항체를 포함한다. 그러나, 일반적으로 분리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 정제된다.

"단쇄 항체" 또는 "단쇄 Fv (scFv)"는 Fv 단편의 두개의 영역, V_L 및 V_H의 항체 융합 분자를 언급한다. Fv 단편의 두개의 영역, V_L 및 V_H는 분리된 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 V_L 및 V_H 부위가 쌍을 이루어 1가 분자 (단쇄 Fv (scFv)로서 공지)를 형성한 단일 단백질 쇄로서 제조할 수 있는 합성 링커에 의해 제조할 방법을 사용하여 연결될 수 있다 (참조, 예로서, [Bird et al., *Science* **242**: 423-426, 1988]; 및 [Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5879-5883, 1988]). 상기 단쇄 항체는 용어 "항체" 단편에 대한 언급을 포함하고, 제조할 기술 또는 완전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 제조할 수 있다.

"인간 서열 항체"는 인간 생식세포주 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 부위 (존재하는 경우)를 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 인간 서열 항체는 인간 생식세포주 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다 (예로서, 시험관내 무작위 또는 지정-특이성 돌연변이 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이). 상기 항체는 예로서, PCT 공개번호 제 WO 01/14424호 및 제 WO 00/37504호에 기술된 것과 같은 인간이 아닌 트랜스제닉 동물에서 생성될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "인간 서열 항체"는 또다른 포유동물 중, 예로서, 마우스의 생식세포주로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열상에 이식되어진 항체 (예로서, 인간화된 항체)는 포함하지 않고자 한다.

또한, 재조합 면역글로불린을 생산할 수 있다 (참조, 본원에서 모든 목적을 위해 그의 전체 내용이 참조로서 인용된 [Cabilly, 미국 특허번호 4,816,567]; 및 [Queen et al., *Proc. Natl Acad. Sci USA* **86**: 10029-10033, 1989]).

"모노클로날 항체"는 단일 분자 조성물중 항체 분자 시료를 언급한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대하여 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타낸다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 생식세포주 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 부위 (존재하는 경우)를 갖는 단일 결합 특이성을 갖는 항체를 언급한다. 하나의 실시태양에서, 인간 모노클로날 항체는 인간이 아닌 트랜스제닉 동물, 예로서, 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하고, 무한 증식 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 계능을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된다.

용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체로만 제한하지 않는다. 용어 "모노클로날 항체"는 임의의 진핵, 원핵 클론을 포함하는 단일 클론, 또는 파지 클론, 및 그를 생산하는 방법으로부터 유래된 항체를 언급한다. 모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합, 및 파지 디스플레이 기술의 사용을 포함하는, 본 분야의 공지되어 있는 광범위하게 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다.

"폴리클로날 항체"는 세포 표면 수용체, 예로서, 인간 활성화된 인테그린 수용체에 대한 하나 이상 (2개 이상)의 상이한 항체 시료를 언급한다. 상기 시료는 광범위한 상이한 에피토프와의 항체 결합을 포함한다.

"키메라 항체"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 하나의 종 (전형적으로, 마우스)로부터의 모노클로날 항체의 Fc 불변 부위가 또다른 종 (전형적으로, 인간)의 항체로부터의 Fc 부위로 대체된 것이다. 예를 들면, 무린 모노클로날 항체를 코딩하는 cDNA는 Fc 불변 부위를 코딩하는 서열을 특이적으로 제거하도록 선택되어진 제한 효소로 분해되고, 인간 Fc 불변 부위를 코딩하는 cDNA의 동등한 부분은 치환된다 (참조, [Robinson et al., PCT/US86/02269]; [Akira et al., 유럽 특허 출원 184,187]; [Taniguchi, 유럽 특허 출원 171,496]; [Morrison et al., 유럽 특허 출원 173,494]; [Neuberger et al., WO 86/01533]; [Cabilly et al. 미국 특허번호 제 4,816,567호]; [Cabilly et al., 유럽 특허 출원 125,023]; [Better et al. (1988) *Science* **240**:1041-1043]; [Liu et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:3439-3443]; Liu et al. (1987) *J Immunol* **139**:3521-3526]; [Sun et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:214-218]; [Nishimura et al. (1987) *Cancer Res* **47**:999-1005]; [Wood et al. (1985) *Nature* **314**:446-449]; 및 [Shaw et al. (1988) *J Natl Cancer Inst* **80**:1553-1559]).

CDR-이식된 항체는 소위 "수령체(acceptor)" 항체의 적어도 하나의 CDR이 바람직한 항원 특이성을 갖는 소위 "공여체" 항체로부터의 CDR "이식편"에 의해 대체된 항체이다. 일반적으로, 공여체 및 수령체 항체는 상이한 종으로부터의 모노클로날 항체이고; 전형적으로, 수령체 항체는 인간 항체 (인간에서 그의 항원성을 최소화함)로서, 이 경우 생성된 CDR-이식된 항체는 "인간화된" 항체로 명명된다. 이식편은 수령체 항체의 단일 V_H 또는 V_L 내 단일 CDR (또는 단일 CDR의 부분)일 수 있거나, V_H 및 V_L 중 하나 또는 둘 모두내의 다중 CDR (또는 그의 부분)일 수 있다. 생성된 CDR-이식된 항체와 MetAp3의 적합한 결합을 허용하는데 필요한만큼만 하나가 대체되지만, 빈번하게는, 수령체 항체의 모든 가변 영역내 3개의 CDR 모두는 상응하는 공체 CDR로 대체될 수 있다. CDR-이식된 및 인간화된 항체를 생산하는 방법은 ([Queen et al. US 5,585,089, US 5,693,761 및 US 5,693,762]; 및 [Winter US 5,225,539] (상기 모두의 전체 내용은 본원에서 참조로 인용된다))에 의해 교시되어 있다.

상기 방법은 전형적으로 이식된 CDR 일면에 위치하는 수령체 항체의 FR를 변경시키지 않는다. 그러나, 주어진 FR의 특정 잔기를 대체하여 공여체 항체의 상응하는 FR에 더욱 유사한 FR을 생성함으로써 때때로 생성된 CDR 이식된 항체의 항원 결합 친화성을 개선시킬 수 있다. 치환체의 바람직한 위치는 CDR에 인접하거나, CDR과 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기를 포함한다 (참조, 예로서, US 5,585,089, 특히, 칼럼 12-16). 또는 공여체 FR을 사용하여 개시하고, 그를 수령체 FR 또는 인간 공통 FR에 더욱 유사한 것으로 개질시킬 수 있다. 개질시키는 기술은 본 분야에 공지되어 있다. 특히, 생성된 FR이 상기 위치에 대한 인간 공통 FR에 적합하거나, 상기 공통 FR과 적어도 90% 이상 일치하는 경우, 상기와 같이 하는 것

은 동일한 항체를 전체적으로 인간 FR과 비교시 생성된 개질된 항체의 항원성을 현저히 증가시키지는 못할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "공통 서열"은 관련 서열 패밀리에서 가장 빈번하게 출현하는 아미노산 (또는 뉴클레오티드)으로 부터 형성되는 서열을 언급한다 (참조, 예로서, [Winnaker, From Gene to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)]. 공통 서열내 각 위치의 단백질은 패밀리내 상기 위치에서 가장 빈번하게 출현하는 아미노산에 의해 차지된다. 2개의 아미노산이 동일하게 빈번하도록 출현하는 경우에는 이중 어는 것도 공통 서열에 포함될 수 있다. "공통 FR"은 공통 면역글로불린 서열내의 FR을 언급한다.

활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체는 카운터수용체 또는 공-수용체와의 상호작용으로부터 활성화된 인테그린 수용체를 억제하기 위하여 인간의 활성화된 인테그린 수용체상이 에피토프에 결합할 수 있다. 본 발명의 사용에 적절한 이들 및 다른 항체는 본 분야에 잘 공지되어 있고/거나 본원에서 인용하고 있는 참고문헌에 기술된 방법에 따라 제조할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명에서 사용되는 항-활성화된 인테그린 수령체 항체는 "인간 항체"- 예로서, 인간으로부터 분리된 항체이거나 -- "인간 서열 항체" (상기 정의된다)이다.

본 발명의 항체는 항체에 의해 인식되거나 특이적으로 결합되는 본 발명의 폴리펩티드의 에피토프(들) 또는 부분(들)에 의해 설명되거나 구체화될 수 있다. 에피토프(들) 또는 폴리펩티드 부분(들)은 예로서, N-말단 및 C-말단 위치에 의해, 인접한 아미노산 잔기의 크기에 의해 본원에 기술된 바와 같이 구체화될 수 있다. 본 발명의 임의의 에피토프 또는 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 항체 또한 제외시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드와 특이적으로 결합하고, 동일한 것을 제외시킬 수 있는 항체를 포함한다.

"에피토프"는 항체와 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정기를 언급한다. 에피토프는 일반적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같이 화학적으로 활성인 표면 그룹화 분자로 구성되고 일반적으로 특이적인 3차 구조 특징, 및 특이적인 전하 특징을 갖는다. 입체형태적 및 비입체형태적 에피토프는 변성 용매의 존재하에 후자의 경우를 제외한 전자와의 결합이 손실된다는 점에서 식별된다.

$\alpha_3\beta_1$ 의 바람직한 에피토프는 폴딩 단백질의 표면, 예로서, 친수성 부위, 및 고도의 항원성을 갖는 부위상에 위치한다. 예를 들면, 인간 $\alpha_3\beta_1$ 서열에 대한 에미니(Emini)의 표면 개연성 분석을 사용하여 단백질 표면에 위치화될 수 있는 매우 고도한 개연성을 갖는 부위를 나타낼 수 있고, 이로써, 항체 생산을 표적화함에 유용한 에피토프를 구성할 수 있다.

본 발명의 항체는 또한 그의 교차-반응성에 의해 설명되거나 구체화될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 임의의 다른 유사체, 오솔로그(ortholog), 또는 동족체와 결합하지 않는 항체가 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드에 대하여 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만의 일치도 (본 분야에 공지되고 본원에 기술된 방법을 사용하여 산출된다)로 결합하는 항체는 본 발명에 포함된다. 추가로 본 발명에는 엄격한 혼성화 조건 (본원에 기술된다)하에 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 혼성화하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 결합만을 하는 항체이다. 본 발명의 항체는 그의 결합 친화성에 의해 설명되거나 구체화될 수 있다. 바람직한 결합 친화성은 $5 \times 10^{-6}M$, $10^{-6}M$, $5 \times 10^{-7}M$, $10^{-7}M$, $5 \times 10^{-8}M$, $10^{-8}M$, $5 \times 10^{-9}M$, $10^{-9}M$, $5 \times 10^{-10}M$, $10^{-10}M$, $5 \times 10^{-11}M$, $10^{-11}M$, $5 \times 10^{-12}M$, $10^{-12}M$, $5 \times 10^{-13}M$, $10^{-13}M$, $5 \times 10^{-14}M$, $10^{-14}M$, $5 \times 10^{-15}M$, 및 $10^{-15}M$ 미만의 해리 상수 또는 Kd를 갖는 것을 포함한다.

본 발명의 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체는 제한하는 것은 아니지만, 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 진단 및 치료하는 방법을 포함하는 본 분야에 공지되어 있는 본 발명의 폴리펩티드를 정제, 검출, 및 표적화하는 방법을 포함하는 용도를 갖는다. 예를 들면, 항체는 생물학적 샘플중 본 발명의 폴리펩티드의 수준을 질적 및 양적으로 측정하기 위한 면역측정법에서의 용도를 갖는다 (참조, 예로서, [Harlow & Lane, 상기와 동일] (모든 목적을 위해 본원에서 전체내용이 참조로서 인용된다)).

본 발명의 항체는 단독으로 사용되거나 다른 조성물과 배합되어 사용될 수 있다. 항체는 추가로 N- 또는 C-말단에서 이중 폴리펩티드에 재조합적으로 융합될 수 있거나 폴리펩티드 또는 다른 조성물에 화학적으로 컨쥬게이션 (공유 및 비공유 컨쥬게이션 포함) 될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체는 검출 측정법에서 표지로서 유용한 분자 및 효과기 분자, 예로서, 이중 폴리펩티드, 약물, 또는 독소에 컨쥬게이션되거나 재조합적으로 융합될 수 있다 (참조, 예로서, WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 미국 특허번호 제 5,314,995호; 및 EP O 396 387 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다)).

본 발명은 추가로 가변 부위의 항체 영역에 융합되거나 컨주게이션된 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드는 항체 Fc 부위, 또는 그의 부분에 융합되거나 컨주게이션될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 융합된 항체 부분은 힌지 부위, CH₁ 영역, CH₂ 영역, 및 CH₃ 영역 또는 전 영역 또는 그의 부분의 임의의 조합물을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 폴리펩티드의 생체내 반감기를 증가시키거나 본 분야에 공지된 방법을 사용하는 면역측정법에 사용하기 위하여 상기 항체 부분에 융합되거나 컨주게이션될 수 있다. 폴리펩티드는 다중체(multimer) 형성하기 위하여 상기 항체 부분에 융합되거나 컨주게이션될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드에 융합된 Fc 부분은 Fc 부분 사이의 디설파이드 결합을 통해 이량체를 형성할 수 있다. 고급 다중체 형태는 IgA 및 IgM의 부분에 폴리펩티드를 융합시켜 제조할 수 있다. 항체 부분에 본 발명의 폴리펩티드를 융합시키거나 컨주게이션시키는 방법은 본 분야에 공지되어 있다 (참조, 예로서, 미국특허 번호 제 5,336,603호, 제 5,622,929호, 제 5,359,046호, 제 5,349,053호, 제 5,447,851호, 제 5,112,946호; EP 0 307 434, EP 0 367 166; WO 96/04388, WO 91/06570 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다); [Ashkenazi et al., *PNAS*, **88**: 10535-10539, 1991]; [Zheng et al., *J. Immunol.*, **154**: 5590-5600, 1995]; 및 [Viil et al., *PNAS*, **89**: 11337-1 1341, 1992]).

본 발명은 추가로 본 발명의 폴리펩티드의 작용제 또는 길항제로서 작용하는 항체에 관한 것이다. 예를 들면, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드와 수용체/리간드의 상호작용을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하는 항체를 포함한다. 수용체-특이 항체 및 리간드-특이 항체 둘 모두 포함된다. 리간드 결합은 방지하지 못하지만 수용체 활성화는 방지하는 수용체-특이 항체가 포함된다. 수용체 활성화 (즉, 신호화)는 본원에 기술되거나, 다르게는, 본 분야에 공지되어 있는 기술에 의해 측정될 수 있다. 리간드 결합 및 수용체 활성화 둘 모두를 방지하는 수용체-특이 항체도 포함된다.

또한, 리간드와 결합하고, 리간드가 수용체와 결합하지 못하도록 하는 중화 항체 뿐만 아니라, 리간드와 결합하여 수용체 활성화를 방지하지만, 리간드가 수용체와 결합하는 것은 방지하지 못하는 항체도 포함한다. "중화 항체"는 그에 결합하는 표적 항원의 효과기 작용을 제거하거나 현저히 감소시킬 수 있는 항체 분자를 의미한다. 따라서, "중화" 항-표적 항체는 효소 활성, 리간드 결합, 또는 세포내 신호화와 같은 효과 작용을 제거하거나 현저하게 감소시킬 수 있다.

추가로, 수용체를 활성화시키는 항체가 포함된다. 이들 항체는 리간드-매개되는 수용체 활성화에 의해 영향을 받은 모든 생물학적 활성 또는 그보다 적은 생물학적 활성에 대한 작용제로서 작용할 수 있다. 상기 항체는 본원에 기술된 특정 활성을 포함하는 생물학적 활성에 대한 작용제 또는 길항제로서 상술될 수 있다. 상기 항체 작용제는 본 분야에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (참조, 예로서, WO 96/40281; 미국 특허번호 제 5,811,097호 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다); [Deng et al., *Blood* **92**: 1981-1988, 1998]; [Chen et al., *Cancer Res.*, **58**: 3668-3678, 1998]; [Harrop et al., *J. Immunol.* **161**: 1786-1794, 1998]; [Zhu et al., *Cancer Res.*, **58**: 3209-3214, 1998]; [Yoon et al., *J. Immunol.*, **160**: 3170-3179, 1998]; [Prat et al., *J. Cell. Sci.*, **111**: 237-247, 1998]; [Pitard et al., *J. Immunol. Methods*, **205**: 177-190, 1997]; [Liautard et al., *Cytokine*, **9**: 233-241, 1997]; [Carlson et al., *J. Biol. Chem.*, **272**: 11295-11301, 1997]; [Taryman et al., *Neuron*, **14**: 755-762, 1995]; [Muller et al., *Structure*, **6**: 1153-1167, 1998]; [Bartunek et al., *Cytokine*, **8**: 14-20, 1996]). 상기 논의된 바와 같이, 전이 세포상의 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체를 사용함으로써 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있는 기술을 사용하여 본 발명의 폴리펩티드를 "모사"하는 항-이디오타입 항체를 생산할 수 있다. (참조, 예로서, [Greenspan et al., *FASEB J.* **7**: 437-444, 1989] 및 [Nissinoff, *J. Immunol.* **147**: 2429-2438, 1991]). 예를 들면, 결합하여 경쟁적으로 폴리펩티드 다중체화를 억제하고/거나 본 발명의 폴리펩티드가 리간드에 결합하는 것을 억제하는 항체를 사용하여 폴리펩티드 다중체화를 "모사"하는 항-이디오타입 및/또는 결합 영역을 생성시킴으로써, 결과적으로는 폴리펩티드 및 그의 리간드에 결합하고 그를 중화시킬 수 있다. 상기 중화 항-이디오타입 또는 상기 항-이디오타입의 Fab 단편을 치료 요법에 사용하여 폴리펩티드 리간드를 중화시킬 수 있다. 예를 들면, 상기 항-이디오타입 항체를 사용하여 본 발명의 폴리펩티드에 결합시키고/거나 그의 리간드/수용체에 결합시킴으로써 그의 생물학적 활성을 차단시킬 수 있다.

항체 제조 및 생성

본 발명의 항체 또는 항체 단편을 생성하는 방법은 전형적으로 정제된 $\alpha_3\beta_1$ 또는 $\alpha_3\beta_1$ 를 발현시키는 세포를 사용하여 대상자 (일반적으로, 인간이 아닌 대상자, 예로서, 마우스 또는 래빗)를 면역화시키는 것을 포함한다. 본 폴리펩티드의 임의의 면역적 부위는 면역원으로 사용될 수 있다.

전형적으로, 면역원의 길이는 적어도 8개, 및 바람직하게, 적어도 10개의 아미노 아실 잔기일 것이다. 주어진 에피토프의 다중체가 때때로 단량체보다 더욱 효능이 있다. 필요한 경우, 폴리펩티드의 면역원성은 키홀 림펫 헤모시아닌(Keyhole

limpet hemocyanin) (KLH)와 같은 합텐과의 컨쥬게이션 또는 융합에 의해 증가될 수 있다. 상기와 같은 다수의 합텐이 본 분야에 공지되어 있다. 다르게는 또는 추가로, 폴리펩티드를 종래의 애주번트, 예로서, 프로인트 완전 또는 불완전 애주번트와 조합하여 폴리펩티드에 대한 대상자의 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 상기 기술은 본 분야에서는 표준이다.

적절한 면역화에 따라, $\alpha_3\beta_1$ 에 결합하는 폴리클로날 항체를 대상자의 혈청으로부터 제조할 수 있거나, 모노클로날 항체를 발현시키는 하이브리도마를 대상자의 지라로부터 통상의 방법을 사용하여 제조할 수 있다 (참조, 예로서, [Milstein et al. (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* (1981) 73:3-46)]. 표준 방법을 사용하여 하이브리도마를 스크리닝 (screening)함으로써 다양한 특이성 (즉, 상이한 에피토프에 대하여) 및 친화성을 갖는 모노클로날 항체를 생산할 것이다. 원하는 특성을 갖는 선별된 모노클로날 항체는 하이브리도마에 의해 발현되는 것으로서 사용될 수 있거나, 상기는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 분자에 결합하여 그의 특성을 변화시킬 수 있거나, 그를 코딩하는 cDNA는 다양한 방식으로 분리되고, 서열화되고 조작될 수 있다. 상기 조작법에 대한 예는 CDR 이식 및 FR 개질과 관련하여 상기 논의된 바 있다. 다른 조작법으로서 저장시 또는 환자에 투여한 후 항체의 불안정성에 원인이 되는 특정 아미노산 아실 잔기를 치환하거나 결실시키는 것, 및 MetAp3에 대한 항체의 친화성을 개선시키는 친화성 조작 기술을 포함한다.

모노클로날 항체 또한 본 분야에 공지되어 있는 재조합 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 예를 들면, 항체 부위를 코딩하는 핵산 군집을 분리할 수 있다. 항체의 보존 부위를 코딩하는 서열로부터 유도된 프라이머를 사용하는 PCR을 사용하여 군집으로부터 항체의 부분을 코딩하는 서열을 증폭시킨 후, 증폭된 서열로부터 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 DNA, 예로서, 가변 영역을 재구성한다. 상기의 증폭된 서열은 파지 또는 박테리아상의 융합 폴리펩티드의 발현 및 디스플레이를 위한 다른 단백질--예를 들면, 박테리오파지 코트, 또는 박테리아 세포 표면 단백을 코딩하는 DNA와 융합될 수 있다. 이어서, 증폭된 서열은 발현될 수 있고, 추가로, 예를 들면, 항원 또는 에피토프에 대하여 발현된 항체 또는 그의 단편의 친화성에 기초하여 선별되거나 분리될 수 있다. 하이브리도마 및 모노클로날 항체를 생산하는 또다른 방법은 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있다.

하이브리도마 기술은 본 분야에 잘 공지되어 있는 것을 포함하고, ([Harlow & Lane, 상기 동일]; [Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-681, 1981] (본원에 그의 전체 내용이 참조로서 인용되어 있다))에 교시되어 있다. Fab 및 F(ab')₂ 단편은 파파인 (Fab 단편 생산) 또는 펩신 (F(ab')₂ 단편 생산)과 같은 효소를 사용하여 단백질분해성 절단에 의해 생산될 수 있다.

다르게는, 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체는 재조합 DNA 및 파지 디스플레이 기술의 적용을 통해 또는 본 분야에 공지된 사용을 사용하는 합성 화학법을 통해 생산할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체는 본 분야에 공지된 다양한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 작용성 항체 영역은 그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 수반하는 파지 입자의 표면에 디스플레이된다. 원하는 결합 특성을 갖는 파지는 항원, 전형적으로, 고체 표면 또는 비드에 결합하거나 그에 포획되는 항원을 사용하여 직접 선별함으로써 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리 (예로서, 인간 또는 무린)로부터 선별된다. 상기 방법에서 사용되는 파지는 전형적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질 중 어느 것에 재조합적으로 융합된 Fab, Fv 또는 디스플레이 안정화된 Fv 항체 영역을 갖는 fd 및 M13을 포함하는 선형 (filamentous) 파지이다. 본 발명의 항체를 제조하기 위하여 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예로서 ([Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* **182**: 41-50, 1995]; [Ames et al., *J. Immunol. Methods* **184**: 177-186, 1995]; [Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* **24**: 952-958, 1994]; [Persic et al., *Gene* **187**: 9-18, 1997]; [Burton et al., *Advances in Immunology* **57**: 191-280, 1994]; PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 및 미국특허 번호 제 5,698,426호, 제 5,223,409호, 제 5,403,484호, 제 5,580,717호, 제 5,427,908호, 제 5,750,753호, 제 5,821,047호, 제 5,571,698호, 제 5,427,908호, 제 5,516,637호, 제 5,780,225호, 제 5,658,727호 및 제 5,733,743호 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다))에 기술되어 있는 것을 포함한다.

상기 참고문헌에 기술되어 있는 바와 같이, 파지 선별 후, 파지로부터 부위를 코딩하는 항체를 분리하고 사용하여 인간 항체, 또는 임의의 다른 원하는 항원 결합 단편을 포함하는 전 항체를 생성할 수 있고, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모, 및 박테리아를 포함하는 임의의 원하는 숙주에서 발현시킬 수 있다. 예를 들면, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합적으로 생산하는 기술 또한 (WO 92/22324; [Mullinax et al., *Biotechnology* **12**: 864-869, 1992]; 및 [Sawai et al., *AJRI* **34**: 26-34, 1995]; 및 [Better et al., *Science* **240**: 1041-1043, 1988])에 기술되어 있는 것과 같이 본 분야에 공지되어 있는 방법을 사용함으로써 사용할 수 있다.

단쇄 Fvs 및 항체를 생산하기 위하여 사용할 수 있는 기술의 예로서는 (미국특허 번호 제 4,946,778호 및 제 5,258,498호 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다); [Huston et al., *Methods in Enzymology*, **203**:

46-88, 1991]; [Shu, L et al., *PNAS* **90**: 7995-7999, 1993]; 및 [Skerra et al., *Science* **240**: 1038-1040, 1988])에 기술되어 있는 것을 포함한다. 일부 용도로써 인간 생체내에서의 항체 사용 및 시험관내 검출 측정법을 포함하여, 키메라, 인간화된, 또는 인간 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 키메라 항체를 생산하는 방법은 본 분야에 공지되어 있다 (참조, 예로서, [Morrison, *Science* **229**: 1202, 1985]; [Oi et al., *Biotechnology* **4**: 214, 1986]; [Gillies et al., *J. Immunol. Methods*, **125**: 191-202, 1989]; 및 미국 특허번호 제 5,807,715호). CDR-이식 (EP 0 239 400; WO 91/09967; 미국 특허번호 제 5,530,101호; 및 제 5,585,089호), 베니어링(veneeding) 또는 리설페이싱(resurfacing) (EP 0 592 106; EP 0 519 596; [Padlan E. A., *Molecular Immunology*, **28**: 489-498, 1991]; [Studnicka et al., *Protein Engineering* **7**: 805-814, 1994]; [Roguska et al., *PNAS* **91**: 969-973, 1994), 및 체 셔플링(chain shuffling) (미국 특허번호 제 5,565,332호)을 포함하는 다양한 기술을 사용하여 항체를 인간화할 수 있다. 인간 항체는 상기 기술된 파지 디스플레이 방법을 포함하는, 본 분야에 공지되어 있는 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다 (참조, 예로서, 미국특허 번호 제 4,444,887호, 제 4,716,111호, 제 5,545,806호, 및 제 5,814,318호; 및 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, 및 WO 91/10741 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다)).

본 발명의 폴리펩티드에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 컨쥬게이션된 (공유 및 비공유 컨쥬게이션 둘 모두를 포함) 항체가 추가로 본 발명에 포함된다. 항체는 본 발명의 폴리펩티드와의 항원에 특이성일 수 있다. 예를 들면, 특정 세포 표면 수용체에 대하여 특이성인 항체에 본 발명의 폴리펩티드를 융합하거나 컨쥬게이션시킴으로써 시험관내 또는 생체내에서 항체를 사용하여 본 발명의 폴리펩티드를 특정 세포 타입에 표적화될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 융합되거나 컨쥬게이션된 항체는 또한 본 분야에 공지된 방법을 사용하는 정제 방법 및 시험관내 면역측정법에서 사용될 수 있다 (참조, 예로서, [Harbor et al. 상기 동일] 및 WO 93/21232; EP 0 439 095; Naramura et al., *Immunol. Lett.* **39**: 91-99, 1994]; 미국 특허번호 제 5,474,981호 (본원에서 모든 목적을 위해 그의 전체 내용이 참조로서 인용된다); [Gillies et al., *PNAS* **89**: 1428-1432, 1992]; [Fell et al., *J. Immunol.* **146**: 2446-2452, 1991]).

scFv 파지 라이브러리

파지 디스플레이 라이브러리에 대한 하나의 접근법은 전이 세포상의 세포 표면 수용체, 예를 들면, 활성화된 인테그린 수용체에 특이적으로 결합하는, 신생물 질병 치료용의 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자로서 유용한 항체 조성물을 동정하는 것이다. scFv 파지-라이브러리를 사용하였다 (참조, 예로서, [Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, **85**: 5879-5883, 1988]; [Chaudhary et al., *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, **87**: 1066-1070, 1990]). 박테리오파지 코트 단백질상에 디스플레이된 scFv 라이브러리의 다양한 실시태양이 기술되어 있다. 개선된 파지 디스플레이 접근법 또한 공지되어 있고, 예를 들면, WO96/06213 및 WO92/01047 (메디컬 리서치 카운실(Medical Research Council) 등) 및 WO97/08320 (모포시스(Morphosys)) (본원에서 참조로서 인용된다)에 기술되어 있는 것이다. Fab 라이브러리의 디스플레이 또한 공지되어 있고, 예를 들면, WO92/01047 (CAT/MRC) 및 WO91/17271 (아피맥스(Affymax))에 기술되어 있는 것이다.

항체 또는 항체 단편은 파지 또는 파지미드(phagemid) 입자의 표면에 존재할 것이기 때문에 우수한 결합 활성을 유지하는 변이체를 동정하기 위하여 전이 세포와 관련된 적절한 항원, 예로서, 전이 종양 세포상의 세포 표면 수용체 또는 활성화된 세포 표면 수용체에 대하여 디스플레이 벡터로 클로닝되는 하이브리드 항체 또는 하이브리드 항체 단편을 선별할 수 있다 (참조, 예를 들면, [Barbas III et al., *Phage Display, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001] (본원에서 그의 전체 내용은 참조로서 인용된다)). 예를 들면, Fab 단편의 경우, 경쇄 및 중쇄 Fd 산물은 lac 프로모터의 조절하에 있고, 각각이쇄는 박테리아 숙주의 원형질막 주위 공간으로 유도하기 위하여 그에 융합된 리더 시그널을 갖는다. 상기 공간에서 항체 단편은 적절하게 어셈블리할 것이다. 어셈블리된 항체 단편을 새로 제조된 파지 또는 파지미드 입자의 코트내로 혼입시킬 수 있는 파지 코트 단백질 영역과의 융합체로서 중쇄 단편은 발현된다. 새로운 파지미드 입자 생성은 모든 필요한 파지 유전자를 포함하는 헬퍼 파지의 첨가를 필요로 한다. 일단 항체 단편 라이브러리가 파지 또는 파지미드 표면에 출현하면, 소위 패닝으로 명명된 과정을 따른다. 이는 i) 파지 또는 파지미드 입자의 표면에 디스플레이된 항체를 원하는 항원에 결합시키고; ii) 비결합체(non-binder)를 세척하고; iii) 결합한 입자는 항원으로부터 용출시키고; iv) 추가된 회(round)의 선별을 위한 풍부한 풀을 증폭시키기 위해 용출된 입자를 새로운 박테리아 숙주에 노출시키는 것으로 하는 방법이다. 전형적으로, 특이적 결합에 대한 항체를 스크리닝하기 전에 3 또는 4회에 걸쳐 패닝을 실시한다. 이 방식에서, 파지/파지미드 입자는 당해 유전자형 (DNA)과 결합 표현형 (항체)와의 결합을 허용하여 항체 디스플레이 기술을 사용하는 것을 매우 성공적으로 만든다. 그러나, 이 인간화 프로세스를 위해 다른 벡터 포맷을 사용할 수 있고, 예를 들면, 선별 및/또는 스크리닝을 위한 용균성 파지 벡터 (개질된 T7 또는 람다 Zap 시스템)내로의 항체 단편 라이브러리이다.

원하는 하이브리드 항체 및/또는 하이브리드 항체 단편을 선별한 후, 본 분야의 기술자에게 공지되어 있는 임의의 기술, 예로서, 원핵 또는 진핵 세포 발현 등에 의해 대량으로 생산할 수 있다고 판단된다. 예를 들면, 하이브리드 항체 또는 단편은,

CDR 및, 필요한 경우, 원래의(original) 중 항체 결합 특이성을 보유하기 위하여 요구되는 가변 부위 프레임워크중 최소 부분 (본원에 기술된 기술에 따라 조작된다)은 원래의 중 항체로부터 유래되고, 항체중 잔여분은 본원에 기술된 바와 같이 조작될 수 있는 표적 중 면역글로불린으로부터 유래되어진 항체 중쇄를 코딩하는 발현 벡터를 작제하여, 하이브리드 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생산하는 종래의 기술을 사용하여 생산할 수 있다.

상세한 실시태양에서, 단쇄 Fv (scFv) 항체 라이브러리는 다양한 암 질환을 앓는 5, 10, 15, 또는 20명 이상의 환자의 말초 혈액 림프구로부터 제조할 수 있다. 이어서, 전체적으로 인간 고-친화성인 scFv 항체는 합성 시알릴 루이스(Lewis)^x 및 루이스^x BSA 컨쥬게이트를 사용하여 선별할 수 있다. 한 연구에서, 상기 인간 scFv 항체는 췌장 샘암종 세포의 세포 표면과의 결합에 대한 유식세포 측정, BIAcore 및 ELISA에 의해 증명된 바와 같이, 시알릴 루이스^x 및 루이스^x에 대하여 특이적이었다. 뉴클레오티드 서열화를 통해 유일한 scFv 유전자가 획득되었음이 밝혀졌다. Kd 값은 2차 면역 반응으로부터 유도된 mAbs의 친화성과 유사하게, 1.1 내지 6.2X10⁻⁷M 범위였다. 상기 항체는 인간 신생물 질병의 치료 및 탄수화물 항원의 작용 및 구조 검사에 매우 유용한 시약일 수 있다 [Mao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 6953-6958, 1999].

추가 상세한 실시태양에서, 파지 디스플레이된 조합 항체 라이브러리를 사용하여 전이 세포와 관련된 적절한 항원, 예로서, 전이 종양 세포상의 세포 표면 수용체 또는 활성화된 세포 표면 수용체에 대한 광범위한 항체를 생성하고 선별할 수 있다. 파지 코트 단백질 pVII 및 pIX를 사용하여 항체 Fv 부위의 이종이량체(heterodimer) 구조를 디스플레이할 수 있다. 선형 박테리오파지의 pIX상에 디스플레이된 4.5X10⁹개의 원의 큰 인간 단쇄 Fv (scFv) 라이브러리를 작제하기 위해서까지 본 기술의 일면은 확장되었다. 추가로, 라이브러리의 다양성, 질, 및 유용성은 6개의 상이한 단백질 항원에 대하여 scFv 클론을 선별함으로써 입증되었다. 특히, 90% 이상의 선별된 클론은 단지 3회에 걸쳐 패닝을 한 후에도 그의 각 항원에 대한 양성 결합을 나타내었다. 분석된 scFvs는 또한 고도로 친화성인 것으로 밝혀졌다. 예를 들면, 반응속도 분석 (BIAcore)을 통해 포도구균장(staphylococcal) 독소 B 및 콜레라 독소 B 서브유닛에 대한 scFvs는 각각 면역화로부터 획득된 mAbs의 것과 유사하거나, 그를 초과하는 친화성을 제공하는, 나노몰 및 서브나노몰의 해리 상수를 갖는 것으로 밝혀졌다. 고도의 특이성 또한 매우 상이한 단백질 사이에서 뿐만 아니라, 더욱 밀접하게 관련된 단백질, 예로서, 피마자 (*Ricinus communis*) 응집소 (RCA₆₀ 및 RCA₁₂₀)의 경우, 서열 상동성이 >80%에 불과하지만 상기 두개 사이에서 달성되었다. pIX-디스플레이 라이브러리의 성능은 필-디스플레이 포맷을 잠재적으로 초과할 수 있고, 광범위하게 다양한 표적 항원을 패닝하기에 적합하도록 만든다는 것이 상기 결과를 통해 제안되었다 [Gao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 12612-12616, 2001].

항체 또는 다른 결합제 및 항원 사이의 특이 결합은 적어도 10⁻⁶M의 결합 친화성을 의미한다. 바람직한 결합제는 적어도 약 10⁻⁷M, 및 바람직하게, 10⁻⁸M 내지 10⁻⁹M, 10⁻¹⁰M, 10⁻¹¹M, 또는 10⁻¹²M의 친화성을 결합한다.

면역 반응

"면역 세포 반응"은 면역 세포 유주, 표적 세포 사멸, 식균 작용, 항체, 면역 반응의 다른 가용성 효과기 생산 등을 유발하는 면역 세포의 생화학적 변화를 일으키는, 외부 또는 내부 자극 (예로서, 항원, 세포 표면 수용체, 활성화된 인테그린 수용체, 사이토카인, 케모카인, 및 다른 세포)에 대한 면역계 세포의 반응을 언급한다.

"면역 반응"은 인체의 암성 세포, 전이 종양 세포, 악성 흑색종, 침입성 병원체, 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 또는 자가 면역 또는 병적 염증의 경우, 정상 인간 세포 또는 조직을 선택적으로 손상시키거나, 파괴하거나 제거하는, 림프구, 항원 전달 세포, 식세포, 과립구, 및 상기 세포 또는 간에 의해 생산되는 가용성 거대분자 (항체, 사이토카인, 및 보체 포함)의 협동 작용을 언급한다.

본원에서 사용되는 바, "림프구"는 본 분야에서의 일반적인 의미를 갖고, 혈액, 림프, 및 림프구 조직에서 발견되는 임의의 단핵성, 비식균성 백혈구, 예로서, B 및 T 림프구를 언급한다.

"T 림프구 반응" 및 "T 림프구 활성화"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 이는 T 림프구에 의존하는 면역 반응(예로서, T 림프구의 증식 및/또는 헬퍼(helper), 세포독성 킬러, 또는 억제인자 T 림프구로의 분화, 항체 생산을 유발하거나 억제하는, 헬퍼 T 림프구에 의한 B 림프구로의 신호 제공, 세포독성 T 림프구에 의한 특이적인 표적 세포의 사멸, 및 가용성 인자 예로서, 다른 면역 세포의 작용을 조절하는 사이토카인의 방출)의 성분이다.

면역 반응의 성분은 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있는 다양한 방법에 의해 시험관내에서 검출될 수 있다. 예를 들면, (1) 세포독성 T 림프구를 방사선으로 표지된 표적 세포와 함께 인큐베이션시키고 상기 세포의 분해를 방사능 활성의 방출에 의해 검출할 수 있고, (2) 헬퍼 T 림프구를 항원 및 항원 전달 세포와 함께 인큐베이션시키고 사이토카인의 합성 및 분비를 표준 방법에 의해 측정할 수 있고 [Windhagen A; et al., *Immunity*, **2**: 373-80, 1995], (3) 항원 전달 세포를 전 단백질 항원과 함께 인큐베이션시키고 MHC상의 항원 전달을 T 림프구 활성화 측정법 또는 생물리학적 방법에 의해 검출할 수 있고 [Harding et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**: 4230-4, 1989], (4) 비만 세포를 Fc-엡실론 수용체와 가교시켜 합하는 시약과 함께 인큐베이션시키고 히스타민 방출을 효소면역측정법에 의해 측정할 수 있다 [Siraganian et al., *TIPS*, **4**: 432-437, 1983].

유사하게, 모델 유기체 (예로서, 마우스) 또는 인간 환자에서 면역 반응의 산물은 또한 본 분야의 당업자들에게 잘 공지되어 있는 다양한 방법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들면, (1) 백신화에 대한 반응에서 항체의 생산은 현재 임상 실험실에서 사용되고 있는 표준 방법, 예로서, ELISA에 의해 용이하게 검출될 수 있고; (2) 면역 부위로의 면역 세포의 유주는 피부 표면을 스크래치하고 멸균 용기에 놓고 스크래치 부위상의 유주 세포를 포착함으로써 검출될 수 있고 [Peters et al., *Blood*, **72**: 1310-5, 1988]; (3) 미토겐에 대한 반응 또는 혼합된 림프구 반응에서 말초 혈액 단핵구 세포의 증식은 ^3H -티미딘을 사용하여 측정될 수 있고; (4) 과립구, 대식세포, 및 PBMCs에서 다른 식세포의 식세포성 능력은 웰중 PMBCs를 표지된 입자와 함께 놓음으로써 측정될 수 있고 [Peters et al., *Blood*, **72**: 1310-5, 1988]; (5) CD 분자, 예로서, CD4 및 CD8에 대한 항체로 PBMCs를 표지화하고 이들 마커를 발현시키는 PBMCs의 분획을 측정하여 면역계 세포의 분화를 측정될 수 있다.

편의상, 면역 반응은 본 발명에서 주로 "1차" 또는 "2차" 면역 반응으로서 기술된다. "방어" 면역 반응으로서도 기술되고 있는 1차 면역 반응은 항원, 예로서, 세포 표면 수용체, 또는 활성화된 인테그린 수용체에 대한 일부의 초기 노출의 결과로서 개체에서 생성된 면역 반응 (예로서, 초기 "면역화")를 언급한다. 상기과 같은 면역화는 예를 들면, 항원에 대한 몇몇 자연발생적 노출의 결과로서 (예를 들면, 항원을 나타내거나 제시하는 일부 병원체에 의한 초기 감염으로부터), 또는 개체의 일부 종양의 암 (예를 들면, 악성 흑색종) 세포에 의해 제시되는 항원으로부터 발생할 수 있다. 다르게는, 항원을 포함하는 백신을 통한 개체의 백신화 결과로서 면역화는 발생할 수 있다. 예를 들면, 백신은 암 세포 예로서, 악성 흑색종으로부터 유래된 하나 이상의 항원을 포함하는 암 백신일 수 있다.

1차 면역 반응은 시간이 경과함에 따라 약화되거나 약독화될 수 있고 소실되기까지 할 수 있거나, 어쨌든, 약독화되어 검출되지 않을 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본원에서 "면역학적 기억 반응"으로도 기술되어 있는 "2차" 면역 반응에 관한 것이다. 용어 2차 면역 반응은 이미 1차 면역 반응이 생성된 후, 개체내에서 유도된 면역 반응을 언급한다. 따라서, 2차 또는 면역 반응은 예로서, 약화되거나 약독화된 현 면역 반응을 증진시키기 위해, 또는 소실되었거나 더 이상 검출될 수 없는 이전 면역 반응을 재현시키기 위해 유도될 수 있다. 2차 면역 반응을 유도하기 위하여 투여될 수 있는 제제는 1차 면역 반응을 "증강(boost)"시키는 것으로 언급된 바, 이후 "증강제(booster)"로서 언급한다.

일례로서, 제한하는 것은 아니지만, 2차 면역 반응은 1차 면역 반응을 유도하는 항원을 개체에 재도입하여 (예를 들면, 백신을 재투여하여) 유도할 수 있다. 그러나, 항원에 대한 2차 면역 반응은 실제 항원을 포함할 수 없는 다른 제제를 투여함으로써 유도될 수 있다. 예를 들면, 본 발명은 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체를 개체에 투여함으로써 2차 면역 반응을 증강시키는 방법을 제공한다. 상기 방법에서 실제 항원을 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체와 함께 필수적으로 투여할 필요는 없고 항체를 포함하는 조성물은 필수적으로 항원을 포함할 필요는 없다. 2차 또는 면역학적 기억 반응은 체액성 (항체) 반응 또는 세포성 반응일 수 있다. 2차 또는 체액성 기억 반응은 항원의 1차 전달시 생성된 기억 V 세포가 자극될 때 나타난다. 지연형 과민반응 (DTH)은 CD4^+ 세포에 의해 매개되는 세포성 2차 또는 면역학적 기억 반응 종류이다. 항원에 대한 1차 노출은 면역계를 초회감작시키고 추가의 노출(들)은 DTH를 초개한다.

"면역학적 교차 반응성" 또는 "면역학적 반응성"은 동일하거나 ("면역학적 반응성") 상이한 ("면역학적 교차 반응") 항원을 사용하여 생성된 항체와 특이적으로 반응성인 항원을 언급한다. 일반적으로, 항원은 활성화된 인테그린 수용체, 또는 더욱 전형적으로, $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체 또는 그의 서브서열이다.

"면역학적 반응 조건"은 항체가 실질적으로 모든 다른 에피토프에 결합하는 정도보다 검출가능하게 더욱 큰 정도로, 일반적으로, 배경 결합보다 적어도 2배, 바람직하게, 배경 결합보다 적어도 5배로 항원의 특정 에피토프에 대하여 생성된 항체가 결합할 수 있도록 하는 조건을 언급한다. 면역학적 반응 조건은 항체 결합 반응 포맷에 의존하고 전형적으로는 면역측정법 프로토콜에서 사용되는 것이다 (참조, 면역측정법 프로토콜 포맷 및 조건에 대하여 기술된 [Harlow & Lane, *Antibody, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988 (Harlow & Lane)]).

"세포 표면 수용체"는 신호를 받고, 세포의 형질막을 통해 상기 신호를 전달할 수 있는 분자 및 분자 킴플렉스를 언급한다. 본 발명의 "세포 표면 수용체"의 일례는 활성화된 인테그린 수용체, 예를 들면, 전이 세포상의 활성화된 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체이다.

"비특이성 T 세포 활성화"는 그의 항원 특이성과는 상관없이 T 세포를 자극시키는 것을 언급한다.

"효과기 세포"는 면역 반응의 인지 및 활성화 단계에 대립되는, 면역 반응에서 효과기 단계에 관여하는 면역 세포를 언급한다. 예시적인 면역 세포로서 골수성 또는 림프구 기원의 세포, 예로서, 림프구 (예로서, B 세포 및 T 세포 (세포용해성 T 세포 (CTL)), 살세포, 천연 살세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 중성구, 다형핵 세포, 과립구, 비만 세포, 및 호염기구를 포함한다. 효과기 세포는 특이성 Fe 수용체를 발현시키고 특이성 면역 작용을 수행한다. 효과기 세포는 항체-의존성의 세포-매개되는 세포독성 (ADCC)을 유도할 수 있고, 예를 들면, ADCC를 유도할 수 있는 중성구이다. 예를 들면, Fc γ R을 발현시키는 단핵구, 대식세포, 중성구, 호산구, 및 림프구는 표적 세포의 특이적인 사멸 및 면역계의 다른 성분들에 대한 항원 전달, 또는 항원을 전달하는 세포와의 결합에 관여한다. 효과기 세포는 또한 표적 항원, 표적 세포, 전이 암 세포, 또는 미생물에 대하여 식균작용을 할 수 있다.

"표적 세포"는 본 발명의 Ab 또는 Ab 조성물에 의해 표적화될 수 있는 대상자 (예로서, 인간 또는 동물)에서 임의의 바람직스럽지 못한 세포를 언급한다. 표적 세포는 인간 활성화된 인테그린 수용체를 발현시키거나 과다발현시키는 세포일 수 있다. 인간 활성화된 인테그린 수용체를 발현시키는 세포로는 종양 세포, 예로서, 악성 흑색종을 포함할 수 있다.

관심의 대상이 되는 항체 조성물 전이 암 세포, 예로서, 악성 흑색종에 대한 표적은 제한하는 것은 아니지만, 세포 표면 수용체, 성장 인자 수용체, 항체로서 암, 예로서, 전이 암 및 악성 흑색종에 존재하는 자가항체 및 항-이디오타입 항체를 포함한다. 다른 표적은 부착 단백질, 예로서, 인테그린, 세렉틴, 및 면역글로불린 수퍼패밀리 멤버이다 ([Springer, *Nature*, **346**: 425-433, 1990]; [Osborn, *Cell*, **62**: 3, 1990]; [Hynes, *Cell*, **69**: 11, 1992]). 관심의 대상이 되는 다른 표적은 성장 인자 수용체 (예로서, FGFR, PDGFR, EGF, her/neu, NGFR, 및 VEGF) 및 그의 리간드이다. 다른 표적은 G-단백질 수용체이고 물질 K 수용체, 엔지오텐신 수용체, 및 α - 및 β -아드레날린 수용체, 세로토닌 수용체, 및 PAF 수용체를 포함한다 (참조, 예로서, [Gilman, *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 625-649, 1987]). 다른 표적은 이온 채널 (예로서, 칼슘, 나트륨, 칼륨 채널, 다중약물 내성을 매개하는 채널 단백질), 무스카린 수용체, 아세틸콜린 수용체, GABA 수용체, 글루타메이트 수용체, 및 도파민 수용체를 포함한다 (참조, Harpold, 미국 특허번호 제 5,401,629호 및 미국 특허번호 제 5,436,128호). 다른 표적은 사이토카인, 예로서, 인터루킨 IL-1 내지 IL-13, 종양 괴사 인자 α - 및 β , 인터페론 α -, β - 및 γ , 종양 성장 인자 베타 (TGF- β), 집락 자극 인자 (CSF) 및 과립구 집락 자극 인자 (GM-CSF)이다 (참조, [Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research (Aggrawal et al. eds., Blackwell Scientific, Boston, Mass., 1991)]. 다른 표적은 호르몬, 효소, 및 세포내 및 세포간 메신저, 예로서, 아데닐 사이클라제, 구아닐 사이클라제, 및 포스포리파제 C이다. 약물 또한 관심이 대상이 되는 표적이다. 표적 분자는 인간, 포유동물 또는 박테리아성일 수 있다. 다른 표적은 바이러스성 및 박테리아성 둘 모두의 미생물 병원체, 및 종양로부터의 항원이다. 또다른 표적은 본원에서 모든 목적을 위해 그의 전체 내용이 참조로서 인용되는 미국 특허번호 제 4,366,241호에 기술되어 있다. 표적에 의해 스크리닝되는 몇몇 제제는 단지 표적에 결합할 뿐이다. 다른 제제는 표적을 작용화하거나 길항시킨다.

암 및 암 치료법

"암" 또는 "악성 종양"은 동의어로서 사용되고, 조절되지 않고 비정상적인 세포 증식, 국소적으로 또는 혈류계 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 확산되는 이환 세포의 능력 (즉, 전이성), 및 다수의 특징적인 구조상 및/또는 분자상의 성질을 특징으로 하는 임의의 다수의 질환을 언급한다. "암성" 또는 "악성 세포"는 특이적인 구조상의 성질을 갖고, 분화하지 못하고 침윤 및 전이할 수 있는 세포로서 이해된다. 암의 예로서 유방암, 폐암, 뇌암, 뼈암, 간암, 신장암, 결장암, 및 전립선암이다 (참조, [DeVita, V. et al. (eds.), 2001, *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 6th. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA] (상기 문헌은 본원에서 모든 목적을 위해 전체적으로 참조로서 인용된다)).

"암-관련"은 대상자 세포에서 핵산과 그의 발현, 또는 그의 결여, 또는 단백질 및 그의 수준 또는 활성, 또는 그의 결여와 악성 종양의 개시와의 관계를 언급한다. 예를 들면, 암은 정상의 건강한 세포에서는 발현되지 않거나, 낮은 수준으로 발현되는 특정 유전자의 발현과 관련될 수 있다. 역으로, 암-관련 유전자는 악성 세포 (또는 형질전화된 세포)에서 발현되지 않거나, 정상의 건강한 세포에서는 발현되는 것보다 낮은 수준으로 악성 세포에서 발현되는 것일 수 있다.

암과 관련하여, 용어 "형질전환"은 정상 세포가 악성이 되어감에 따라 경험하게 되는 변화를 언급한다. 진핵세포에서, 세포 배양액에서 정상 세포의 악성 세포로의 전환을 기술하기 위하여 용어 "형질전환"을 사용할 수 있다.

"증식 세포"는 기하급수적으로 활발히 세포 분열 및 성장을 경험하게 되는 것이다. "세포 증식 조절의 상실"은 일반적으로는 세포 분열을 적절하게 제한하고자 하는 세포 주기 조절을 상실한 세포의 특성을 언급한다. 상기 조절을 상실한 세포는 자극성 신호없이도 정상 속도보다 빠르게 증식하지만, 억제 신호에 대하여는 반응하지 않는다.

"진행성 암"은 더 이상 1차 종양 부위에 위치하지 않는 암, 아메리칸 조인트 코미트 온 캔설 (American Joint Committee on Cancer) (AJCC)에 따른 III기 또는 IV의 암을 의미한다.

"내성이 우수하다는 것(well tolerated)"은 치료 결과로서 나타나고 치료 결정에 영향을 주는 건강 상태의 역변화가 없는 것을 언급한다.

"전이" 또는 "전이 상태"는 예를 들면, 면역 결핍 마우스에서 유방 지방 패드로의 주입시 및 면역 결핍 마우스의 순환시 폐, 간, 뼈 또는 뇌에서 2차 종양 병변을 확립시킬 수 있는 종양 세포, 예로서, 인간 흑색종 세포를 언급한다.

"비-전이" 또는 "비-전이 상태"는 예를 들면, 면역 결핍 마우스에서 유방 지방 패드로의 주입시 및 면역 결핍 마우스의 순환시 폐, 간, 뼈 또는 뇌에서 2차 종양 병변을 확립시킬 수 없는 종양 세포, 예로서, 인간 흑색종 세포를 언급한다. 본원에서 비-전이로서 논의되고 본원에서 사용되는 인간 종양 세포는 면역 결핍 마우스에서 유방 지방 패드로의 주입시 1차 종양을 확립시킬 수 있지만, 상기 1차 종양으로부터 산재할 수는 없다.

"차별적으로 생산된다는 것"은 비-전이 세포와 비교시 전이 세포에서는 변화된 수준으로 생산된 세포에 의해 생산된 화합물, 예로서, 인테그린 수용체에 관한 것이다. 전이 세포를 비-전이 세포와 비교시 수준 변화는 높아지거나 낮아지는 것일 수 있다. 수준 변화는 검출할 수 있고 포유동물 대상자에서 신생물 질병의 치료학적 요법에 대한 기초가 될 수 있다.

"차별적으로 생산된다는 것"은 유전자 또는 단백질의 측두 및 조직 발현 패턴에서 양적뿐만 아니라 질적 차이 둘 모두에 관한 것이다. 예를 들면, 차별적으로 생산된 유전자는 정상 대 질환 증상에서 그의 발현을 활성화시키거나 완전하게 불활성화시킬 수 있다. 상기와 같이 질적으로 조절된 유전자는 대조군 또는 질환 증상중 어느 하나에서 검출될 수 있는, 주어진 조직 또는 세포 타입내에서 발현 패턴을 나타낼 수 있지만, 둘 모두에서 검출될 수는 없다. 차별적으로 생산된 유전자는 "프로파일 유전자," 또는 "표적 유전자" 등을 나타낼 수 있다.

유사하게, 차별적으로 생산된 단백질은 정상 대 질환 증상에서 그의 발현을 활성화시키거나 완전하게 불활성화시킬 수 있다. 상기와 같이 질적으로 조절된 단백질은 대조군 또는 질환 증상중 어느 하나에서 검출될 수 있는, 주어진 조직 또는 세포 타입내에서 발현 패턴을 나타낼 수 있지만, 둘 모두에서 검출될 수는 없다. 추가로, 차별적으로 생산된 유전자는 "프로파일 단백질", "표적 단백질" 등을 나타낼 수 있다.

신생물 질병을 치료하는 방법은 본 발명의 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자를 사용하는 치료법을 제공한다. 항체 조성물에 의한 활성화된 인테그린 수용체의 차단은 환자에서 암성 세포에 대한 기억 또는 2차 면역 반응을 증진시킴으로써, 암 치료를 촉진시킬 수 있다. 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자내의 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체는 면역원성 인자, 예로서, 암성 세포, 정제된 종양 항원 (재조합 단백질, 펩티드, 및 탄수화물 분자 포함), 세포, 및 면역 자극성 사이토카인을 코딩하는 유전자로 형질감염된 세포 및 세포 표면 항원과 함께 배합될 수 있거나, 단독으로 사용되어 면역을 자극시킬 수 있다.

항체-세포독소 컨쥬게이트 분자로 배합될 때 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체는 백신화 프로토콜에 따를 때 유효하다. 종양에 대한 백신화용으로서 다수의 실험 전략법이 고안되었다 (참조, [Rosenberg, S., *ASCO Educational Book Spring*: 60-62, 2000]; [Logothetis, C, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302, 2000]; [Khayat, D., *ASCO Educational Book Spring*: 414-428, 2000]; [Foon, K., *ASCO Educational Book Spring*: 730-738, 2000]; 추가 참조, [Restifo, N. et al., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, **61**: 3023-3043, 1997]). 상기 전략법중 하나에서는 자가 또는 동종 종양 세포를 사용하여 백신을 제조한다. 상기 세포성 백신은 종양 세포가 GM-CSF를 발현시키기 위하여 형질도입되었을 때 가장 유효한 것으로 나타났다. GM-CSF는 종양 백신화를 위한 항원 전달의 활성화제로서 효능이 있는 것으로 나타났다 [Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, **90**: 3539-43, 1993].

활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체는 GMCSF-개질된 종양 세포 백신을 증강시킬 수 있고, 다수의 실험상의 종양 모델, 예로서, 유방 암종 [Hurwitz et al., 1998, 상기 동일], 1차 전립선암 [Hurwitz et al., *Cancer Research*, **60**: 2444-8, 2000] 및 흑색종 [van Elsas et al., *J. Exp. Med.*, **190**: 355-66, 1999]에서 백신의 효능을 개선시켰다. 상기 경우들에서, 비면역성 종양, 예로서, B16 흑색종은 쉽게 면역계에 의해 쉽게 파괴되었다. 종양 세포 백신은 또한 다른 것들중 다른 면역 활성화제, 예로서, IL2, 및 공자극성 분자를 발현시키기 위해서 개질될 수 있다.

다양한 종양종에서 유전자 발현 및 대량의 유전자 발현 패턴에 대한 연구를 통해 소위 "종양 특이성 항원"이라는 것에 대한 정의를 내리게 되었다 [Rosenberg, *Immunity*, **10**: 281-7, 1999]. 다수의 경우에서, 상기 종양 특이성 항원은 종양 및 상기 종양으로부터의 세포에서 발현되는 분화 항원, 예를 들면, 멜라닌세포 항원 gp100, MAGE 항원, Trp-2이다. 더욱 중요하게, 다수의 상기 항원들은 숙주에서 발견되는 종양 특이성 T 세포의 표적으로 나타낼 수 있다. 상기 단백질들에 대한 2차 또는 면역학적 기억 반응의 효능을 증강시키기 위하여 종양에서 발현되는 것으로 밝혀진 단백질 및/또는 펩티드의 재조합 버전에 기초한 백신과 컨쥬게이션된 증강제로서 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체를 사용할 수 있다. 상기 단백질들은 일반적으로 면역계에서 자가 항원으로서 판단되는 바, 그에 대하여 내성을 띤다. 종양 항원은 또한 염색체의 텔로미어의 합성을 위해 필요하고 85% 이상의 인간 암에서 및 한정된 수의 체조직에서 발현되는 단백질 텔로머라제를 포함할 수 있다 [Kim et al., *Science*, **266**: 2011-2013, 1994]. 상기 체조직은 다양한 수단에 의해 면역적 발병으로부터 보호받을 수 있다. 단백질 서열을 변경하거나 관련없는 서열 사이에서 융합 단백질 (예로서, 필라델피아 염색체중 bcr-abl), 또는 B 세포 종양으로부터의 이디오타입을 생성하는 체세포 돌연변이 때문에 종양 항원은 또한 암 세포에서 발현되는 "신생-항원"일 수 있다. 다른 종양 백신은 인간 암과 관련된 바이러스, 예로서, 인간 유두종 바이러스 (HPV), 간염 바이러스 (HBV 및 HCV) 및 카포시 간염 육종 바이러스 (KHSV)로부터의 단백질을 포함할 수 있다. 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체와 컨쥬게이션되어 사용될 수 있는 또다른 형태의 종양 특이성 항원은 종양 조직 그 자체로부터 분리된 정제된 열 쇼크 단백질 (HSP)이다. 상기 열 쇼크 단백질은 종양 세포로부터의 단백질 단편을 포함하고, 이들 HSPs는 종양 면역성을 유도하기 위한 항원 전달 세포로의 전달시 고도로 유효하다 ([Suot et al., *Science*, **269**: 1585-1588, 1995]; [Tamura et al., *Science*, **278**: 117-120, 1997]).

가지돌기 세포 (DC)는 전이 종양 세포상의 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항원-특이 반응을 초회감작시키기 위하여 사용될 수 있는 효능이 있는 항원 전달 세포이다. DC는 생체외에서 생산될 수 있고, 다양한 단백질 및 펩티드 항원 및 종양 세포 추출물을 적재하고 있다 [Nestle et al., *Nature Medicine*, **4**: 328-332, 1998]. DC는 또한 종양 항원을 발현시키기 위하여 유전적 수단에 의해 형질도입될 수 있다. DC는 또한 면역화 목적으로 종양 세포에 직접 융합될 수 있다 [Kugler et al., *Nature Medicine*, **6**: 332-336, 2000]. 백신화 방법으로서, DC 면역화는 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체를 사용하여 효과적으로 증강됨으로써 더욱 효능이 있는 항-종양 반응을 활성화시킬 수 있다.

활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체와 배합될 수 있는 또다른 타입의 항-종양 백신은 면역학적 애주번트와 컨쥬게이션된 흑색종 세포주 분해물로부터 제조된 백신, 예로서, MELACINE™ 백신, 2개의 인간 흑색종 세포주로부터의 분해물의 혼합물 + DETOX™ 면역학적 애주번트로부터 제조된 백신이다. 백신 치료법은 추가의 화학치료학적 치료법을 사용하거나 사용하지 않고, 항-활성화된 인테그린 수용체 항체를 사용함으로써 증강될 수 있다.

또한, 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체를 포함하는 항체-세포독소 컨쥬게이트를 사용하여 표준 암 치료법을 통해 유도된 면역성을 증강시킬 수 있다. 이 경우, 투여하는 화학치료학적 시약의 투여량을 감소시킬 수 있다 [Mokyr et al., *Cancer Research*, **58**: 5301-5304, 1998]. 활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체와 화학요법과의 병존적 용도를 지지하는 화학적 이론은 대부분의 화학치료학적 화합물의 세포독성 작용에 대한 결과인 세포 사멸이 항원 전달 경로에서 종양 항원의 수준을 증가시켜야 한다는 것이다. 따라서, 인테그린 수용체에 대한 항체는 종양 세포의 화학요법적 면제에 대하여 초회감작된 면역 반응을 증강시킬 수 있다. 인테그린 수용체에 대한 항체를 사용하는 치료법과 병용되는 화학요법제의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 악티노마이세테스(*Actinomycetes*) 또는 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 항생제, 듀오카르마이신, 알테스류킨, 알트테타민, 아미포스틴, 아스파라기나제, 블레오마이신, 캐페시타빈, 카보플라틴, 카무스틴, 클라드리빈, 시사프라이드, 시스플라틴, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다카바진 (DTIC), 닥티노마이신, 도세탁셀, 독소루비신, 드로나비롤, 듀오카르마이신, 에포에틴 알파, 에토포사이드, 필그라스티, 플루다라빈, 플루오로우라실, 겐시타빈, 그라니세트론, 히드록시우레아, 아이다루비신, 이포스파미드, 인터페론 알파, 이리노테칸, 란소프라졸, 레바미솔, 류코보린, 메게스트롤, 메스나, 메토포렉사트, 메토프로프라마이드, 미토마이신, 마이토테인, 마이토탄트론, 오메프라졸, 온단세트론, 파클리탁셀 (택솔™), 필로카르핀, 프로클로로페라진, 리톡시맵, 사프로인, 타목시펜, 택솔, 토포테칸 히드로클로라이드, 트라스투주맵, 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈 타르트레이트를 포함할 수 있다. 전립선암 치료를 위해 항-활성화된 인테그린 수용체와 함께 배합될 수 있는 바람직한 화학치료제는 파클리탁셀 (택솔™)이다. 흑색종 암 치료를 위해 항-활성화된 인테그린 수용체와 함께 배합될 수 있는 바람직한 화학치료제는 다카바진 (DTIC)이다.

세포 사멸을 통해 초회감작시키는 면역계를 초래할 수 있는 다른 병용 요법은 방사선, 수술, 및 호르몬 제한이다 [Kwon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, **96**: 15074-9, 1999]. 각각의 상기 프로토콜은 숙주에서 종양 항원의 근원을 형성한다. 예를 들면, 수술시 종양의 임의적 조작은 혈액내 암 세포의 수를 현저하게 증가시킬 수 있다 [Schwartz et al., *Principles of Surgery* 1984, 4th ed. p.338].

혈관신생 억제제는 또한 인테그린 수용체에 대한 항체와 배합될 수 있다. 혈관신생의 억제는 숙주의 항원 전달 경로로 종양 항원을 제공할 수 있는 종양 세포 사멸을 일으킬 수 있다. 상기 모두는 종양을 면하게 하고 인테그린 수용체에 대한 항체가 증강시킬 수 있는 면역계 초회감작을 가능케 한다.

"치료" 또는 "치료법"은 질환의 증상, 합병증, 또는 생화학적 징후의 개시를 예방하거나 지연시키고, 증상을 완화시키거나 질환, 증상, 또는 질병 (예로서, 암 또는 전이 암)의 추가의 발전을 저지하거나 억제하기 위해 본 발명의 항체 조성물, 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자 화합물 또는 제제를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 방법을 사용한 암 또는 전이 암의 "치료" 또는 "치료법"은 객관적 또는 주관적 파라미터를 포함하여, 예를 들면, 증상 감소; 완화; 증상의 감소 또는 질환 증상을 환자에 대하여 더욱 내성가능하게 하는 것; 퇴행 또는 저하율의 저속화; 또는 퇴행의 최종점을 더욱 쇠약하게 하는 것을 포함하는, 암의 치료 또는 호전 또는 예방에서의 임의의 성공적 징후를 언급한다. 증상의 치료 또는 호전은 의사의 진찰 결과를 포함하는, 객관적 또는 주관적 파라미터에 기초할 수 있다. 따라서, 용어 "치료"는 신생물 질병과 관련된 증상 또는 증상의 발전을 예방하거나 지연시키거나, 완화시키거나, 저지 또는 억제시키기 위해 본 발명의 화합물 또는 약제를 투여하는 것을 포함한다. 용어 "치료학적 효과"는 대상자에서 질환, 질환의 증상, 또는 질환의 부작용의 저하, 제거, 또는 예방을 포함한다.

특정 실시태양에서, "배합된," "병용 요법" 및 "배합 산물"은 환자에게 본원에서 사용되는 제 1 치료제 및 화합물을 동시 투여하는 것을 의미한다. 배합하여 투여할 경우, 각각의 성분은 동시에 투여될 수 있거나 상이한 시점으로 순차적으로 투여될 수 있다. 따라서, 각각의 성분은 별개로 투여되지만 시간상 충분히 가깝게 투여되어 원하는 치료학적 효과를 제공할 수 있다.

"투여 단위"는 치료하고자 하는 특정 개체를 위해 단위 투여량으로서 적합화된, 물리적으로 분리된 단위를 언급한다. 각각의 단위는 필요한 제약 담체와 관련하여 원하는 치료학적 효과(들)를 형성하도록 산출된 소정량의 활성 화합물(들)을 포함할 수 있다. 단위 제형에 언급은 (a) 활성 화합물(들) 및 이루고자 하는 특별한 치료학적 효과(들)에 대한 독특한 특징, 및 (b) 상기 활성 화합물(들)을 합성하는 분야에서의 고유한 제한에 의해 지시될 수 있다.

항체 치료제

치료용으로 생체내에서 사용할 경우, 본 발명의 항체는 치료학적 유효량 (즉, 원하는 치료학적 효과를 갖는 양)으로 환자에게 투여된다. 일반적으로 비경구적으로 투여될 것이다. 투여량 및 투여 요법은 감염 정도, 사용하는 특정 항체 또는 면역독소의 특징, 예로서, 그의 치료 지수, 환자, 및 환자의 병력에 의존할 것이다. 유리하게는, 항체 또는 면역독소는 1-2주간에 걸쳐 연속적으로 혈관구조내 세포 치료하기 위하여는 정맥내로 및 국소 림프절을 치료하기 위하여는 피하 및 복강내로 투여된다. 임의로, 보조 요법, 예로서, 방사선의 복합 사이클, 화학치료 요법 진행중, 또는 종양 괴사 인자, 인터페론 또는 다른 세포보호제 또는 면역 조절제 투여시 투여된다.

비경구 투여를 위해 항체는 제약상 허용되는 비경구용 비히클과 함께 주사가 가능한 단위 제형 (액제, 현탁제, 에멀전)으로 제형화될 것이다. 비히클은 본질적으로 비독성이고, 치료를 위한 것은 아니다. 상기 비히클의 예로서는 물, 염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민이다. 비수성 비히클, 예로서, 고정유 및 에틸 올레이트 또한 사용될 수 있다. 리포솜 또한 담체로서 사용될 수 있다. 비히클은 등장성 및 화학 안전성을 증진시키는 물질, 예로서, 완충액 및 방부제와 같은 첨가제를 최소량으로 포함할 수 있다. 전형적으로, 항체는 약 1 mg/ml 내지 10 mg/ml의 농도로 상기 비히클에서 제형화될 수 있다.

특정 적용을 위해 IgM 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있지만, IgM 분자보다는 더욱 소분자인 IgG 분자가 보다 잘 특정 타입의 감염된 세포로 국한할 수 있다.

생체내의 보체 활성화가 염증 반응의 유도 및 대식세포의 활성화를 포함하는 다양한 생물학적 효과를 유발한다는 것이 입증되었다 [Unanue and Benecerraf, *Textbook of Immunology*, 2nd Edition, Williams & Wilkins, p. 218 (1984)]. 염증을 수반하는 혈관확장의 증가는 감염된 세포에서 국한된 다양한 약제의 능력을 증가시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명에

의해 특정되는 타입의 항원-항체 결합을 다수의 방식으로 치료학적으로 사용할 수 있다. 추가로, 정제된 항원 [Hakomori, *Ann. Rev. Immunol.* **2**:103, 1984] 또는 상기 항원과 관련된 항-이디오타입 항체 ([Nepom et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2864, 1985]; [Koprowski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 216, 1984])을 사용하여 인간 환자에 서 활성 면역 반응을 유도할 수 있다. 상기 반응으로는 인간 보체를 활성화시키고 ADCC를 매개할 수 있는 항체의 형성을 포함하는 상기 메커니즘을 통해 감염된 세포 파괴를 일으킨다.

임의로, 신생물 질병의 치료를 위한 투여로서 예시되는 바, 본 발명의 항체는 항체-세포독소 컨쥬게이트 분자로서 유용하다.

요법에서 사용되는 항체 조성물은 제형화되고 치료하고자 하는 질환, 개체 환자의 증상, 조성물의 전달 부위, 투여 방법 및 의사들에게 공지되어 있는 다른 인자를 고려하는 우수한 의료학적 실시와 일치하는 양식으로 투여량은 확립된다. 항체 조성물은 하기의 투여를 위한 폴리펩티드 제제에 대한 설명에 따라 투여용으로 제조한다.

본 분야에서는 잘 이해되고 있는 바와 같이, 생체특이성 포획 시약은 항체, 전이 세포상의 활성화된 인테그린 수용체에 결합하는 항체의 결합 단편 (예로서, 단쇄 항체, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, 및 scFv 단백질 및 어피바디(Affibody) ([Affibody, Teknikringen 30, floor 6, Box 700 04, Stockholm SE-10044, Sweden]; 참조, 미국 특허번호 제 5,831,012호 (본원에서 모든 목적을 위해 그의 전체 내용이 참조로서 인용된다))를 포함한다. 사용하고자 하는 목적에 따라, 수용체 및 다른 생체 분자와 특이적으로 결합하는 다른 단백질 또한 포함할 수 있다.

하이브리드 항체 및 하이브리드 항체 단편은 전장 중쇄 및 경쇄를 갖는 완전한 항체 분자, 그의 임의의 단편, 예로서, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, scFv, 항체 경쇄 및 항체 중쇄를 포함한다. 본원에 기술된 가변 부위 및 다양한 종으로부터의 불변 부위를 갖는 키메라 항체 또한 적절하다. 참조, 예를 들면, 미국 출원번호 제 20030022244호.

초기에는, 소정의 표적 대상은 항체를 일으킬 수 있는 것으로 선택되었다. 표적 대상으로 지정된 모노클로날 항체를 생성하는 기술은 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있다. 상기 기술의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 디스플레이 라이브러리, 제노 또는 humab 마우스, 하이브리도마를 포함하는 것 등을 포함한다. 표적 대상은 항원성을 나타낼 수 있고 일반적으로 단백질 또는 단백질 폴리사카라이드인 임의의 물질을 포함한다. 예로서, 수용체, 효소, 호르몬, 성장 인자, 펩티드 등을 포함한다. 본원에 따라 사용하기 적절한 자연발생적으로 생성된 항체뿐만 아니라, 소정 목적을 위해 지정된, 조작된 항체 및 항체 단편 또한 적절하다는 것이 이해되어야 한다.

본원에 설명된 기술에 사용될 수 있는 항체 (Abs)로서 모노클로날 및 폴리클로날 Abs, 및 항체 단편, 예로서, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, scFv, 디아바디(diabodies), 항체 경쇄, 항체 중쇄 및 파지 또는 파지미드 디스플레이 기술로부터 유도된 항체 단편을 포함한다. 우선, 초기 항체는 기원이 되는 종으로부터 수득한다. 더욱 특히, 표적 항원에 대하여 특이성을 갖는 기원이 되는 종의 경쇄, 중쇄 또는 둘 모두의 가변 부위중의 핵산 또는 아미노산 서열이 요구된다. 기원이 되는 종은 항체 또는 항체 라이브러리를 생성하기 위하여 사용된 임의의 종, 예로서, 래트, 마우스, 래빗, 닭, 원숭이, 인간 등이다. 모노클로날 항체를 생성하고 클로닝하는 기술은 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있다. 원하는 항체를 수득한 후, 가변 부위 (V_H 및 V_L)는 CDRs에 대한 임의의 가능한 정의 (예로서, 카베트(Kabat)만, 콘티아(Chothia)만, 카베트 및 콘티아를 함께, 및 본 분야의 기술자에게 공지되어 있는 다른 것들)를 사용하여 성분 부분 (즉, 프레임워크 (FRs) 및 CDR)으로 분리하였다. 일단 수득하고 나면, 적절한 표적 중 프레임워크를 선별하는 것이 필요하다. 하나의 실시태양은 표적 종으로부터의 가변 아미노산 서열 또는 유전자 서열을 갖는 기원이 되는 종 항체 서열로부터 각각의 개체 프레임워크를 배열하는 것을 포함한다.

용어 "디아바디"는 동일한 폴리펩티드 쇄 (VH VL)중 경쇄 가변 영역(VL)에 연결된 중쇄 가변 영역 (VH)를 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 언급한다. 동일한 쇄상의 2개의 영역 사이는 쌍을 이루기에는 너무 짧은 링커를 사용하여 또다른 쇄의 상보적 영역과 쌍을 이루어 2개의 항원 결합 부위를 형성하도록 당해 영역은 강제적인 영향을 받는다. 디아바디는 더욱 전체적으로 예를 들면, (EP 404,097; WO 93/11161; 및 [30 Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)])에 기술되어 있다.

동일한 패밀리 및/또는 동일한 패밀리 구성원으로부터 적절한 프레임워크 부위 후보물질을 선별한 후, 기원이 되는 종으로부터의 CDRs를 하이브리드 프레임워크 부위로 이식시킴으로써 중쇄 및 경쇄 가변 부위중 하나 또는 둘 모두를 생산한다. 상기 일면중 어느 것과 관련하여 하이브리드 항체 또는 하이브리드 가변 쇄 부위를 갖는 하이브리드 항체 단편의 어셈블리는 본 분야의 기술자에게 공지되어 있는 통상의 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들면, 본원에 기술된 하이브리드 가

변 영역을 코딩하는 DNA 서열 (즉, 표적 중 및 기원이 되는 종으로부터의 CDRs에 기초한 프레임워크)은 올리고뉴클레오타이드 합성 및/또는 PCR에 의해 생산할 수 있다. CDR 부위를 코딩하는 핵산은 또한 적절한 제한 효소를 사용하여 기원이 되는 종 항체로부터 분리될 수 있고 적절한 절찰 효소를 사용하는 절찰에 의해 표적 중 프레임워크로 절찰될 수 있다. 다르게는, 기원이 되는 종 항체의 가변 쇄의 프레임워크 부위는 부위 지정 돌연변이화(site-directed mutagenesis)에 의해 변형될 수 있다.

각각의 프레임워크 부위에 상응하는 다중 후보물질중의 선택으로부터 하이브리드를 작제하기 때문에 본원에 기술된 원리에 따라 작제될 수 있는 서열에 대한 다수의 결합이 존재할 수 있다. 따라서, 개체의 프레임워크 부위의 상이한 결합을 포함하는 구성을 갖는 하이브리드 라이브러리를 어셈블리할 수 있다. 상기 라이브러리는 서열의 전자 데이터베이스 콜렉션 또는 하이브리드의 물리적 콜렉션일 수 있다.

물리적 항체 또는 항체 단편 라이브러리의 어셈블리는 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 바람직하게 수행된다. 일례로, 예를 들면, 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 사용하여 폴리머라제에 의해 어닐링될 수 있고 이행될 수 있도록 올리고뉴클레오타이드는 중첩 부위를 갖도록 디자인된다. V_L 및 V_H 유전자 인서트를 생성하기 위하여 다단계의 중첩 신장을 실시한다. 전장 경쇄 및 Fd 중쇄 단편을 생산하기 위하여 중첩 신장에 의해 융합될 수 있도록 하기 위하여 인간 불변 영역과의 중첩 부위를 갖는 단편을 디자인한다. 경쇄 및 중쇄 Fd 부위를 중첩 신장에 의해 함께 연결시켜 디스플레이 벡터로 클로닝되는 단일 Fab 라이브러리 인서트를 형성한다. 인간화된 라이브러리 유전자의 어셈블리에 대한 대체 방법 또한 사용할 수 있다. 리가제 연쇄 반응 (LCR) 접근법을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 중합시킴으로써 라이브러리를 어셈블리할 수 있다 [Chalmers et al., *Biotechnology*, **30-2**: 249-252, 2001].

다양한 형태의 항체 단편을 생성할 수 있고 적절한 벡터로 클로닝하여 하이브리드 항체 라이브러리 또는 하이브리드 항체 단편 라이브러리를 형성할 수 있다. 예를 들면, 필요한 불변 영역의 잔여 부분, 인프레임을 포함하는 벡터내로 가변 유전자를 클로닝할 수 있다. 클로닝할 수 있는 추가의 단편의 일례로 전체 경쇄, 중쇄의 Fd 부분, 또는 서열을 코딩하는 경쇄 및 중쇄 Fd 둘 모두를 포함하는 단편을 포함한다. 다르게는, 인간화를 위해 사용되는 항체 단편은 단쇄 항체 (scFv)일 수 있다. 임의의 선별 디스플레이 시스템을 본 발명에 따른 라이브러리와 함께 사용할 수 있다. 원하는 구성원의 거대 라이브러리를 분리하는 선별 프로토콜은 본 분야에 잘 공지되어 있고, 이는 파지 디스플레이 기술로서 대표된다. 다양한 펩티드 서열이 선형 박테리오파지의 표면상에 디스플레이되어 있는 상기 시스템은 표적 항원에 결합하는 특이 항체 단편의 시험관 내 선별 및 증식을 위한 항체 단편 (그를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열)의 라이브러리 형성에 유용하다고 입증되었다 [Scott et al., *Science*, **249**: 386, 1990]. V_H 및 V_L 부위를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 이. 콜라이(*E. coli*)의 원형질막 주위의 공간으로 유도하는 리더 신호를 코딩하는 유전자 단편에 연결되어 있고, 그 결과로서 생성된 항체 단편은 전형적으로 박테리오파지 코트 단백질과의 융합체 (예로서, pIII 또는 pVIII)로서 박테리오파지 표면상에 디스플레이된다. 다르게는, 항체 단편은 람다 파지 또는 T7 캡시드 (파지체)상에 외부적으로 디스플레이된다. 파지-기초 디스플레이 시스템의 잇점은 그들이 생물학적 시스템이기 때문에 박테리아 세포에서 선별된 라이브러리 구성원을 포함하는 파지를 배양함으로써 선별된 라이브러리 구성원은 간단하게 증폭시킬 수 있다는 점이다. 추가로, 폴리펩티드 라이브러리 구성원을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 파지 또는 파지미드 벡터상에 포함되기 때문에 서열화, 발현 및 이후 유전자 조작은 상대적으로 간단하다. 박테리오파지 항체 디스플레이 라이브러리 및 람다 파지 발현 라이브러리를 작제하는 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있다 [McCafferty et al., *Nature*, **348**: 552, 1990]; [Kang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**: 4363, 1991]].

핵산 및 폴리펩티드

2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 용어 "일치한다는 것" 또는 "일치도" (%)는 동일하거나, 하기 기술하는 디폴트 파라미터(default parameter)와 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 사용하여 측정된 바에 따라, 또는 수동 정렬 및 시각적 검사에 의해 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 특정 퍼센트 (즉, 비교 윈도우 또는 지정 부위에 대하여 비교하고 배열하였을 때 특정 부위 (예로서, 본원에 기술된 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 본원에 기술된 항체의 아미노산 서열)에 대하여 약 60% 일치도, 바람직하게, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 일치도)로 갖는 특정 퍼센트의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 갖는 2개 이상의 서열 또는 서브서열에 관한 것이다. 이어서 상기 서열은 "실질적으로 일치한다"고 언급된다. 본 용어는 또한 시험 서열의 킴플리먼트(compliment)를 언급하거나 그에 적용될 수 있다. 용어는 또한 결실 및/또는 부가를 갖는 서열뿐만 아니라, 치환을 갖는 것을 포함한다. 하기 기술하는 바와 같이, 바람직한 알고리즘이 겹 등을 설명할 수 있다. 바람직하게, 길이가 적어도 약 25개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드이거나, 더욱 바람직하게, 길이가 50-100개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 부위에 대하여 존재한다.

서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열과 비교되는 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 시험 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고 서브서열 코디네이트를 지정하고, 필요한 경우, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 바람직하게, 디폴트 프로그램 파라미터를 사용할 수 있거나, 대체 파라미터를 지정할 수 있다. 이어서, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터에 기초하여, 기준 서열에 대한 상대적인 시험 서열의 서열 일치도를 산출한다.

본원에서 사용되는 바, "비교 윈도우"는 2개의 서열이 최적으로 배열된 후, 당해 서열이 동일한 갯수의 인접한 위치의 기준 서열과 비교될 수 있는, 20 내지 600개, 일반적으로 약 50 내지 약 200개, 더욱 일반적으로 약 100 내지 약 150개로 구성된 군으로부터 선택되는 갯수중 어느 하나의 인접한 위치의 세그먼트에 대한 기준을 포함한다. 비교를 위한 서열의 배열 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 배열은 예로서, [Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 1981, 2:482]의 국소 상동성 알고리즘, [Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 1970, 48:443]의 상동성 배열 알고리즘, [Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1988, 85:2444]의 유사도 방법 조사, 상기 알고리즘의 전산 처리화 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 수동 배열 및 시각적 검사 (참조, 예로서, [Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. 1995 supplement])에 의해 수행될 수 있다.

배열 조사용 프로그램은 본 분야에 잘 공지되어 있고, 예로서, BLAST 등이다. 예를 들면, 표적 종이 인간인 경우, 아미노산 서열 또는 유전자 서열의 근원 (생식세포주 또는 재배열된 항체 서열)은 임의의 적절한 참고 데이터베이스 예로서, 진뱅크(Genbank), NCBI 단백질 데이터은행 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), VBASE, 인간 항체 유전자의 데이터베이스 (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/mt-doc>), 및 면역글로불린의 카바트(Kabat) 데이터베이스 (<http://www.immune.bme.nwu.edu>) 또는 그의 번역된 산물에서 찾아볼 수 있다. 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 배열을 수행할 경우, 서브세트중 어느 유전자가 기원이 되는 종 항체에 대해 가장 밀접한 아미노산 서열 상동성을 갖는지를 결정하기 위하여 선별된 유전자를 분석하여야 한다. 데이터베이스에서 다른 서열과 비교시 고도한 정도의 상동성에 도달한 아미노산 서열 또는 유전자 서열이 본원에 기술된 방법에 따라 사용될 수 있고 조작될 수 있다는 것에 주시하고 있다. 또한, 본원에 기술된 방법에 따라 조작되고 선별될 때 소정의 표적 항원에 대하여 특이성을 나타내는 산물을 코딩할 경우, 상동성이 다소 덜한 아미노산 서열 또는 유전자를 사용할 수 있다. 특정 실시태양에서, 허용되는 범위의 상동성은 약 50% 초과이다. 표적 종은 인간 이외의 종일 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

서열 일치도(%) 및 서열 유사도(%)를 측정하기 적절한 알고리즘의 바람직한 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이고, 이는 각각 [Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 1977, 25:3389-3402] 및 [Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215:403-410]에 기술되어 있다. 본 발명의 핵산 및 단백질에 대한 서열 일치도(%)를 측정하기 위하여 본원에 기술된 파라미터와 함께 BLAST 및 BLAST 2.0을 사용한다. BLAST 분석을 실시하기 위한 소프트웨어는 국립 생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 공식적으로 이용할 수 있다. 상기 알고리즘은 질의(query) 서열에서 길이가 W인 짧은 위드를 확인하여 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 위드와 함께 배열되었을 때 일부 양성-값 역치 점수 T와 일치하거나 이를 만족하는, 먼저 점수가 높은 서열쌍(HSP)을 확인하는 것을 포함한다. T는 이웃 위드의 점수 역치로서 언급된다. 상기 초기 이웃하는 위드 히트(hit)는 그를 포함하는 더욱 긴 HSP를 발견하기 위한 초기 조사용의 시드(seed)로서 작용한다. 누적 배열 점수가 증가할 수 있는 한, 위드 히트는 각 서열을 따라 양 방향으로 확장된다. 파라미터 M (일치하는 잔기쌍에 대한 보상 점수; 항상 > 0) 및 N (불일치하는 잔기에 대한 패널티 점수; 항상 < 0)을 사용하여 뉴클레오타이드 서열에 대한 누적 점수를 산출한다. 아미노산 서열에 대하여 점수화 행렬을 사용하여 누적 점수를 산출한다. 누적 배열 점수가 그의 최대 도달값으로부터 양(quantity) X까지 감소하였을 때; 하나 이상의 음성-점수 잔기 배열의 축적에 기인하여 누적 점수가 이하로 될 때; 또는 어느 서열의 말단에 도달하였을 때, 각 방향으로의 위드 히트 확장은 중지된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X는 배열의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오타이드 서열에 대해)은 디폴트로서 11의 위드길이(W), 10의 기대치(E), M=5, N=-4 및 양 스트랜드의 비교값을 사용한다. 아미노산 서열에 대하여 BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 위드길이, 10의 기대치(E), 50의 BLOSUM62 점수화 행렬 (참조, [Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 89:10915]) 배열 (B), 10의 기대치(E), M=5, N=-4 및 양 스트랜드의 비교값을 사용한다.

용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 아미노산 잔기의 중합체를 언급한다. 본 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 자연발생적으로 발생된 상응하는 아미노산의 인공적인 화학적 모사체인 아미노산 중합체뿐만 아니라, 자연발생적으로 발생된 아미노산 중합체 및 비자연발생적으로 발생된 아미노산 중합체에 적용된다.

용어 "아미노산"은 자연발생적으로 발생된 아미노산 및 합성 아미노산뿐만 아니라, 자연발생적으로 발생된 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모사체를 언급한다. 자연발생적으로 발생된 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩된 것뿐만 아니라, 이후 개질된 아미노산, 예로서, 히드록시프롤린, γ-카복시글루타메이트, 및 O-포스포세

린이다. 아미노산 유사체는 자연발생적으로 발생된 아미노산으로서 동일한 기본 화학적 구조를 갖는, 수소, 캘리포니아 주, 아미노기, 및 R 기에 결합된 α 탄소를 갖는 화합물, 예로서, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설펍사이드, 메티오닌 메틸 설펍소를 언급한다. 상기 유사체는 개질된 R 기 (예로서, 노르류신) 또는 개질된 펩티드 백본을 갖지만, 자연발생적으로 발생된 아미노산으로서 동일한 기본 화학적 구조를 갖는다. 아미노산 모사체는 아미노산의 일반적인 화학적 구조와 상이한 구조를 갖지만, 자연발생적으로 발생된 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 화학적 화합물을 언급한다.

아미노산은 본원에서 바이오케미컬 노먼클러처 커미션(Biochemical Nomenclature Commission)에 의해 제시되는 그에 대하여 보편적으로 공지되어 있는 3문자 표기 또는 1문자 표기로 언급될 수 있다. 유사하게, 뉴클레오티드는 그에 대하여 보편적으로 허용되는 단-문자 코드로 언급될 수 있다.

"보존적으로 개질된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 개질된 변이체는 일치하거나 본질적으로 일치하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 또는 그에서 핵산이 본질적으로 일치하는 서열에 대한 아미노산 서열을 코딩하지 않는 것을 언급한다. 유전자 코드의 축퇴 때문에 작용상 일치하는 다수의 핵산은 임의의 주어진 단백질을 코딩한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU 모두는 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 코돈에 의해 알라닌으로 지정된 모든 위치에서의 코돈은 코딩된 폴리펩티드를 변경하지 않는 것으로 기술된 상응하는 코돈 중 임의의 것으로 변경될 수 있다. 상기 핵산 변이는 보존적으로 개질된 변이 중 하나의 종인 "침묵 변이(silent variations)"이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기술한다. 어느 기술자도 핵산 중 각 코돈 (보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 보통 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG는 제외)은 개질됨으로써 작용상 일치하는 분자를 생성할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 발현 산물과 관련하여, 단, 실제 프로브 서열과는 무관하게 각 기술된 서열에 내재한다.

아미노산 서열에 관하여 어느 기술자는 단일 아미노산 또는 코딩된 서열에서 작은 퍼센트의 아미노산을 변경, 첨가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열에 대한 각각의 치환, 결실 또는 첨가는 변경을 통해 아미노산이 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환된 "보존적으로 개질된 변이체"임을 인지할 것이다. 작용상 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환표는 본 분야에 잘 공지되어 있다. 보존적으로 개질된 변이체는 본 발명의 다형성 변이체, 중간 동족체, 및 대립유전자외에도 존재하며, 상기를 제외시키지는 않는다.

하기 8개 군은 각각 서로서로에 대하여 보존적 치환인 아미노산을 포함한다: 1) 알라닌(A), 글리신(G); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 리신(K); 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W); 7) 세린(들), 트레오닌(T); 및 8) 시스테인(C), 메티오닌(M) (참조, 예로서, [Creighton, Protein (1984)]).

거대분자 구조, 예로서, 폴리펩티드 구조는 다양한 수준의 조직화에 의해 기술될 수 있다. 상기 조직화의 일반적인 기술에 대해서는 예를 들면, [Alberts et al., Molecular Biology of Cell (3rd ed., 1994) and Cantor and Schimmel, Bio물리적 Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecule (1980)]를 참조한다. "1차 구조"는 특정 펩티드의 아미노산 서열을 언급한다. "2차 구조"는 폴리펩티드내의 국소적으로 정돈된 3차 구조를 언급한다. 상기 구조는 통상 영역, 예로서, 효소 영역, 세포외 영역, 형질막 영역, 소공(pore) 영역, 및 세포질 테일 영역으로서 공지되어 있다. 영역은 폴리펩티드의 콤팩트 단위를 형성하고 전형적으로 길이가 15 내지 350개의 아미노산인 폴리펩티드의 부분이다. 예시적인 영역은 효소 활성을 갖는 영역, 예로서, 키나제 영역을 포함한다. 전형적인 영역은 덜 조직화된 절편, 예로서, β -시트형 및 α -나선형 스트레치로 구성된다. "3차 구조"는 폴리펩티드 단량체의 완전한 3차 구조를 언급한다. "4차 구조"는 독립적인 3차 단위의 비공유적 결합에 의해 형성된 3차 구조를 언급한다. 이방성 용어 또한 에너지 용어로서 공지되어 있다.

특정 핵산 서열은 또한 잠재적으로 "스플라이스 변이체"도 포함한다. 유사하게, 핵산에 의해 코딩되는 특정 단백질은 당해 핵산의 스플라이스 변이체에 의해 코딩되는 임의의 단백질을 잠재적으로 포함한다. 명칭에서 제시되는 바와 같이, "스플라이스 변이체"는 유전자 대체 스플라이싱의 산물이다. 전사 후, 초기 핵산 트랜스크립트(transcript)는 상이한 (대체) 핵산 스플라이스 산물은 상이한 폴리펩티드를 코딩할 수 있도록 스플라이싱될 수 있다. 스플라이스 변이체 생산에 대한 기작은 다양하지만, 엑손의 대체 스플라이싱을 포함한다. 판독 전사에 의해 동일한 핵산으로부터 유도된 대체 폴리펩티드 또한 본 정의에 포함된다. 스플라이스 산물의 재조합 형태를 포함하는, 스플라이싱 반응의 임의의 산물도 본 정의에 포함된다.

예로서, 세포, 또는 핵산, 단백질, 또는 벡터와 관련하여 사용되는 용어 "재조합"은 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래의(native) 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 개질되거나, 세포가 그렇게 개질된 세포로부터 유래된 것을 언급한다. 따라서, 예를 들면, 재조합 세포는 본래 (재조합되지 않은) 형태의 세포내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현시키거나, 다르게는 비정상적으로 발현되거나, 부족하게 발현되거나 전혀 발현되지 않는 본래의 유전자를 발현시킨다.

문구 "엄격한 혼성화 조건"은 프로브가 전형적으로 핵산의 복합 혼합물중 그의 표적 서브서열과는 혼성화를 이루지만, 다른 서열과는 혼성화하지 않는 조건을 언급한다. 엄격한 조건은 서열에 의존하고 상이한 환경하에서는 상이할 것이다. 장쇄의 서열은 보다 고온에서 특이적으로 혼성화한다. 핵산의 혼성화에 대한 광범위한 가이드는 [Tijssen, Technology in Biochemistry and Molecule Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of Hybridization 및 strategy of Nucleic acid Assays" (1993)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 엄격한 조건은 정의된 이온 강도, pH에서 특정 서열에 대하여 열적 융점(T_m)보다 약 5-10°C 낮은 것으로 선택된다. T_m 은 표적에 대하여 상보적인 프로브중 50%가 평형 (표적 서열이 과량으로 존재할 때, T_m 에서 50%의 프로브는 평형으로 존재한다)으로 표적 서열에 혼성화하는 온도 (정의된 이온 강도, pH, 및 핵산 농도하에서의)이다. 엄격한 조건은 또한 탈안정화제, 예로서, 포름아미드를 첨가함으로써 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화에 대해 양성 신호는 적어도 2배의 배경, 바람직하게, 10배의 배경 혼성화를 이룬다. 예시적인 엄격한 혼성화 조건은 하기와 같을 수 있다: 50% 포름아미드, 5xSSC, 및 1% SDS, 42°C에서 인큐베이션, 또는 5xSSC, 1% SDS, 65°C에서 인큐베이션, 65°C에서 0.2xSSC, 및 0.1% SDS중에서 세척.

엄격한 조건하에서 서로에 대하여 혼성화하지 않는 핵산 역시도, 그들이 코딩하는 폴리펩티드가 실질적으로 일치하는 경우에는, 실질적으로 일치한다. 예를 들면, 유전자 코드에 의해 허용되는 최대 코돈 축퇴를 사용하여 핵산 카피가 형성될 때 상기는 발생한다. 이 경우, 핵산은 전형적으로 보통의 엄격한 혼성화 조건하에서 혼성화한다. 예시적인 "보통의 엄격한 혼성화 조건"은 37°C의 40% 포름아미드, 1M NaCl, 1% SDS의 완충액, 45°C에서 1xSSC중의 세척에서의 혼성화를 포함한다. 양성 혼성화는 적어도 2개의 배경을 이룬다. 당업자는 다른 혼성화 및 세척 조건을 사용하여 유사한 엄격한 조건을 제공할 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 혼성화 파라미터를 결정하는 추가의 가이드라인은 다수의 참고문헌에서 제공한다 (예로서, [Ausubel et al, 상기 동일]).

PCR의 경우, 어닐링 온도는 약 32°C 내지 48°C로서 프라이머 길이에 따라 다르지만, 약 36°C의 온도가 엄격성인 낮은 증폭에 대하여는 전형적인 것이다. 엄격성이 고도한 PCR 증폭의 경우, 엄격성이 고도한 어닐링 온도는 약 50°C 내지 65°C로서 프라이머 길이 및 특이성에 따라 다르지만, 약 62°C의 온도가 전형적이다. 엄격성이 낮은 증폭 및 높은 증폭 둘 모두에 대한 전형적인 주기 조건은 30분-2분동안 90°C-95°C에서 변성기, 30초-2분간 지속되는 어닐링기, 및 1-2분동안 약 72°C의 신장기를 포함한다. 엄격성이 낮은 증폭 및 높은 증폭에 대한 프로토콜 및 가이드라인은 예로서, [Innis et al. PCR Protocols, A Guide to Methods and applications, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)]에서 제공한다.

융합 단백질

활성화된 인테그린 수용체에 대한 항체를 사용하여 융합 단백질을 형성할 수 있다. 예를 들면, 제 2 단백질에 융합될 때 본 발명의 항체는 항원성 태그로서 사용될 수 있다. 활성화된 인테그린 수용체에 대하여 유발된 항체를 사용하여 폴리펩티드과의 결합에 의한 2차 단백질을 간접적으로 검출할 수 있다. 또한, 분비된 단백질은 트래피킹(trafficking) 신호에 기초하여 세포 위치를 표적하기 때문에 인테그린 수용체는 일단 다른 단백질에 융합되면 표적 분자로서 사용될 수 있다.

폴리펩티드에 융합될 수 있는 영역의 예로서는 이중 신호 서열뿐만 아니라, 다른 이중 작용 부위를 포함한다. 융합은 반드시 직접적인 필요는 없지만, 링커 서열을 통해 이루어질 수 있다.

또한, 융합 단백질을 조작하여 폴리펩티드의 특징을 개선시킬 수 있다. 예를 들면, 추가의 아미노산, 특히, 전하를 띤 아미노산 부위를 폴리펩티드의 N-말단에 첨가하여 숙주 세포로부터의 정제 또는 이후 취급 및 저장시 안정성 및 지속성을 개선시킬 수 있다. 또한, 펩티드 부위를 폴리펩티드에 첨가하여 정제를 촉진시킬 수 있다. 최종적으로 폴리펩티드를 제조하기 전에 상기 부위를 제거할 수 있다. 폴리펩티드 취급을 촉진시키기 위해 펩티드 부위를 첨가하는 것은 본 분야에 있어 잘 알려져 있고 일반적인 기술이다.

또한, 단편, 및 특히 에피토프를 포함하여 항체 조성물 또는 세포 표면 수용체, 또는 인테그린 수용체는 키메라 폴리펩티드에서 생성된 면역글로불린(IgG)의 불변 영역 부분과 결합할 수 있다. 이들 융합 단백질은 정제를 촉진시키고 생체내에서 반감기를 증가시키는 것으로 나타났다. 보고된 일례에는 인간 CD4-폴리펩티드의 처음 2개의 영역 및 포유동물 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 불변 부위중 다양한 영역으로 구성된 키메라 단백질이 기술되어 있다 (EP A 394,827; [Traunecker et al., *Nature*, **331**: 84-86, 1988]). 디설파이드-결합된 이량체 구조를 갖는 융합 단백질 (IgG에 기인)은 또한 단량체의 분비된 단백질 또는 단백질 단편 단독으로서 보다는 다른 분자와 결합하고 중화시키는 데는 더욱 유효할 수 있다 [Fountoulakis et al., *J. Biochem.* 270: 3958-3964, 1995].

유사하게, EP-A-O 464 533 (캐나다의 대응특허 2045869)에는 또다른 인간 단백질 또는 그의 부분과 함께 면역글로불린 분자의 불변 부위중 다양한 부분을 포함하는 융합 단백질이 기술되어 있다. 다수 경우에서, 융합 단백질내 Fc 부분은 치료 및 진단에서 유익하고, 따라서, 약동학적 성질을 개선시킬 수 있다 (EP-A 0232 262). 다르게는, 융합 단백질을 발현시키고, 검출하고, 정제한 후, Fc 부분을 결실시키는 것이 바람직할 것이다. 예를 들면, 융합 단백질이 면역화를 위한 항원으로 사용되는데 경우 Fc 부분은 치료 및 진단을 방해할 수 있다. 약물 발견에서, 예를 들면, 인간 단백질, 예로서, hIL-5는 hIL-5의 길항제를 확인하기 위한 고속(high-throughput) 스크리닝 측정법 목적으로 Fc 부분과 융합될 수 있다 ([Bennett et al., *J. Molecular Recognition* **8**: 52-58, 1995]; [K. Johanson et al., *J. Biol. Chem.*, **270**: 9459-9471 1995]).

또한, 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드의 정제를 촉진시키는 마커 서열, 예로서, 펩티드에 융합할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 마커 아미노산 서열은 상업적으로 이용가능한 다수의 다른 것들중 핵사-히스티딘 펩티드, 예로서, pQE 벡터에 제공되는 태그 (캘리포니아주 캐츠윌트 에톤 에비뉴 9259에 소재하는 퀴아진, 인코포레이티드(QIAGEN, Inc.), 91311)이다. [Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 821-824, 1989]에 기술되어 있는 바와 같이, 예를 들면, 핵사-히스티딘은 융합 단백질의 정제를 용이하게 한다. 정제에 유용한 또다른 펩티드 태그인 "HA" 태그는 인플루엔자 적혈구응집소 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응한다 [Wilson et al., *Cell* **37**: 767, 1984].

따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드를 사용하여 상기 융합중 임의의 것을 조작할 수 있다.

제조합 항체의 발현

세포 표면 수용체, 예로서, 전이 세포상의 활성화된 인테그린 수용체에 대한 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체는 전형적으로 제조합 발현에 의해 생산된다. 제조합 폴리뉴클레오타이드 작제물은 전형적으로 자연적으로 관련되거나 이중의 프로모터 부위를 포함하는, 항체쇄의 코돈 서열에 작동가능하게 연결된 발현 조절 서열을 포함한다. 바람직하게, 발현 조절 서열은 진핵 숙주 세포를 형질전환시키거나 형질감염시킬 수 있는 벡터내 진핵 프로모터 시스템이다. 일단 벡터가 적절한 숙주내로 혼입되면, 숙주는 높은 수준의 뉴클레오타이드 서열 발현, 및 교차반응성 항체의 수집 및 정제에 적절한 조건하에 유지된다. 참조, 미국 출원번호 제 20020199213호 (본원에서 모든 목적을 위해 그의 전체 내용이 참조로서 인용된다).

상기 발현 벡터는 전형적으로 내부 부분으로서 숙주 유기체에서 복제가능하다. 통상, 원하는 DNA 서열로 형질전환 세포를 검출할 수 있도록 하기 위하여 발현 벡터는 선별 마커, 예로서, 앰피실린-내성 또는 하이그로마이신-내성인 것을 포함한다.

이. 콜라이는 본 발명의 DNA 클로닝에 특히 유용한 원핵 숙주이다. 미생물, 예로서, 효모 또한 발현에 유용하다. 사카로마이세스(*Saccharomyces*)는 원하는 바에 따라 발현 조절 서열, 복제 기원, 종결 서열 등을 갖는 적절한 벡터를 포함하는 바람직한 효모 숙주이다. 전형적인 프로모터는 3-포스포글리세레이트 키나제 및 다른 글리콜산 효소를 포함한다. 유도가능한 효모 프로모터는 다른 것들중에서 알코올 탈수소효소, 이소시토크롬 C 및 말토오스 및 갈락토오스 이용에 관여하는 효소로부터의 프로모터를 포함한다.

포유동물 세포는 면역글로불린 또는 단백을 코딩하는 뉴클레오타이드 세그먼트를 발현시키기에 바람직한 숙주이다 (참조, [Winnacker, *From Gene To Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)]). 본 분야에서 완전한 이중 단백질을 분비할 수 있는 다수의 적절한 숙주 세포주가 개발되었고, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주, 다양한 COS 세포주, HeLa 세포, L 세포 및 골수종 세포주를 포함한다. 바람직하게, 세포는 인간이 아닌 것으로부터의 것이다. 상기 세포에 대한 발현 벡터는 발현 조절 서열, 예로서, 복제 기원, 프로모터, 인핸서, 및 필요한 프로세싱 정보 부위, 필요한 프로세싱 인포메이션 부위, 예로서, 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위, 및 전사 종결자 서열을 포함할 수 있다 [Queen et al., *Immunol. Rev.* **89**: 49, 1986]. 바람직한 발현 조절 서열은 내인성 유전자, 거대세포바이러스, SV40, 아데노바이러스, 소 유두종 바이러스 등으로부터 유래된 프로모터이다 [Co et al., *J Immunol.* **148**: 1149, 1992].

다르게는, 트랜스제닉 동물의 계능내로 도입된 후 트랜스제닉 동물의 젖에서 발현되도록 하기 위하여 항체 코딩 서열은 트랜스진에 혼입될 수 있다 (참조, 예로서, 미국특허 번호 제 5,741,957호, 제 5,304,489호, 및 제 5,849,992호 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다)). 적절한 트랜스진은 예로서, 카제인 또는 베타 락토글로불린같은 유전 특이 유전자로부터의 인핸서 및 프로모터와 작동가능하게 결합된 경쇄 및/또는 중쇄에 대한 코딩 서열을 포함한다.

관심의 대상이 되는 DNA 세그먼트를 포함하는 벡터는 세포 숙주의 타입에 따라 잘 공지된 방법에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다. 예를 들면, 염화칼슘 형질감염은 통상적으로 원핵 세포에 대하여 이용되는 반면, 다른 세포 숙주에 대하여는

인산칼슘 처리법, 전기천공, 리포펙션, 유전자총(biolistics) 또는 바이러스-기초 형질감염을 사용할 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환시키기 위하여 사용되는 다른 방법은 폴리브렌, 원형질체 융합, 리포솜, 전기 천공, 및 미세 주사의 사용을 포함한다 (참조, 일반적으로, [Sambrook et al., Molecular Cloning]). 트랜스제닉 동물의 생산을 위해서는 트랜스진을 수정된 난모세포에 미세주사할 수 있거나, 배아 줄기 세포의 계능, 및 핵제거된 난모세포로 전달된 상기 세포의 핵으로 혼입될 수 있다.

일단 발현되면 항체 수거물은 배양 배지 및 숙주 세포로부터 정제된다. HPLC 정제, 칼럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 본 분야의 표준 방법에 따라 항체를 정제할 수 있다. 일반적으로, 항체쇄는 신호 서열과 함께 발현되는데 따라 배양 배지로 유리된다. 그러나, 항체쇄가 자연발생적으로 숙주 세포에 의해 분비되지 않는다면, 항체쇄는 순한 세정제를 처리함으로써 유리될 수 있다. 이어서, 황산암모늄 침전, 고정된 표적에 대한 친화성 크로마토그래피, 칼럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 통상의 방법에 의해 항체쇄는 정제될 수 있다 (참조, 일반적으로 [Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)]).

상기 방법을 통해 선택된 표적에 대해 특이적인 친화성을 갖는 항체쇄를 코딩하는 핵산 서열의 라이브러리를 수득한다. 핵산의 라이브러리는 전형적으로 적어도 5, 10, 20, 50, 100, 1000, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 또는 10^9 개의 상이한 구성원을 갖는다. 일반적으로, 어떤 단일 구성원도 라이브러리에서 총 서열의 25 또는 50% 이상을 구성하지는 않는다. 전형적으로, 적어도 25, 50%, 75, 90, 95, 99 또는 99.9%의 라이브러리 구성원은 표적 분자에 대한 특이적인 친화성을 갖는 항체쇄를 코딩한다. 이중쇄 항체 라이브러리의 경우, 각각 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 핵산 세그먼트 쌍이 라이브러리 구성원으로서 간주된다. 핵산 라이브러리는 유리 형태로 임의의 벡터 성분으로서 존재하거나 숙주 세포내로의 벡터 성분으로서 형질감염될 수 있다.

핵산 라이브러리는 발현되어 표적에 대하여 특이적인 친화성을 갖는 항체의 폴리클로날 라이브러리를 생성할 수 있다. 상기 라이브러리의 조성물은 뉴클레오타이드 라이브러리의 조성물로부터 결정된다. 따라서, 상기 라이브러리는 전형적으로 상이한 아미노산 조성물과 함께 적어도 5, 10, 20, 50, 100, 1000, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 또는 10^9 개의 구성원을 갖는다. 어떤 단일 구성원도 라이브러리에서 총 폴리펩티드의 25 또는 50% 이상을 구성하지는 않는다. 표적 분자에 대한 특이적인 친화성을 갖는 항체쇄 라이브러리에서 항체쇄의 퍼센트는 전형적으로 항체쇄를 코딩하는 상응하는 핵산의 퍼센트보다 낮다. 그러한 차이는 적절한 폴딩을 지지하기 위해 적절한 1차 아미노산 서열을 가짐에도 불구하고 모든 폴리펩티드가 결합에 적절한 구조로 폴딩되지 않는다는 사실에 기인한다. 일부 라이브러리에서, 적어도 25, 50, 75, 90, 95, 99 또는 99.9%의 항체쇄는 표적 분자에 대한 특이적인 친화성을 갖는다. 다시, 다중-쇄 항체의 라이브러리에서, 각각의 항체 (예로서, Fab 또는 완전한 항체)는 라이브러리 구성원으로서 간주된다. 상이한 항체쇄는 표적에 대한 우수한 결합 특이성 및 친화성과 관련하여 서로 상이하다. 일부의 상기 라이브러리는 동일한 항원상의 상이한 에피토프와 결합하는 구성원을 포함한다. 일부의 상기 라이브러리는 서로 경쟁하지 않고 동일한 항원에 결합하는 적어도 2개 구성원을 포함한다.

상기 방법으로부터 생성된 인간 항체의 폴리클로날 라이브러리는 본 라이브러리중 고친화성 결합체의 퍼센트가 높다는 점, 및 본 라이브러리는 전형적으로 자연발생적 군집내 존재하는 항체에 대하여 동일한 다양성을 나타내지 않는다는 점에서 자연발생된 인간 항체 군집과 차별화된다. 본 라이브러리에서 다양성의 감소는 모든 인간 면역글로불린 유전자를 포함하지 않는 근원 물질을 제공하는 인간이 아닌 트랜스제닉 동물에 기인한다. 예를 들면, 일부 폴리클로날 항체 라이브러리에는 람다 경쇄를 갖는 항체가 존재하지 않는다. 본 발명의 폴리클로날 항체 라이브러리중 일부는 10, 20, 30 또는 40개 미만의 V_H 유전자에 의해 코딩되는 항체 중쇄를 갖는다. 본 발명의 폴리클로날 항체 라이브러리중 일부는 10, 20, 30 또는 40개 미만의 V_L 유전자에 의해 코딩되는 항체 경쇄를 갖는다.

개질된 항체

세포 표면 수용체, 예로서, 전이 세포상의 활성화된 인테그린 수용체에 대한 개질된 항체 또한 본 발명에 포함된다.

"개질된 항체"는 항체의 부분이 개질된, 예로서, 결실되거나 첨가되거나 치환된 항체, 예로서, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 및 인간화된 항체를 언급한다. 예를 들면, 불변 부위를 결실시키고 그를 항체의 반감기, 예로서, 혈청 반감기, 안정성 또는 친화성을 증가시키기 위한 것으로 의도된 불변 부위로 대체하여 항체를 개질시킬 수 있다.

본 발명의 항체 컨쥬게이트를 사용하여 주어진 생물학적 반응을 개질시키거나 생물학적 반응을 형성할 수 있다 (예로서, 효과기 세포 보충). 약물 부위는 종래의 화학 치료제로서 제한하고자 하지는 않는다. 예를 들면, 약물 부위는 원하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 상기 단백질의 예로서, 효소적으로 활성인 독소, 또는 그의 활성 단

편, 예로서, 아브린, 리신 A, 슈우도모나스 외독소(pseudomonas exotoxin), 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예로서, 종양 괴사 인자 또는 인터페론-알파; 또는 생물학적 반응 개질제, 예로서, 림포카인, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 과립구-대식 세포집락 자극 인자 ("GM-CSF"), 과립구 집락 자극 인자 ("G-CSF"), 또는 다른 성장 인자를 포함한다.

본 발명의 특징의 바람직한 실시태양에서, 예를 들면, 본 발명의 항체 및 항체 조성물은 하나 이상의 치료제 또는 세포독성 부위와 커플링되거나 컨주게이션될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "세포독성 부위"는 간단하게 세포와 인접하고 있거나 세포에 의해 흡수될 때 세포 성장을 억제하고 세포 사멸을 증진시키는 부위를 의미한다. 이와 관련하여 적절한 세포독성 부위는 방사능제 또는 동위원소 (방사선헌종), 화학독성 제제, 예로서, 분화 유도인자, 억제제 및 소분자 화학독소 약물, 독소 단백질 및 그의 유도체뿐만 아니라, 뉴클레오티드 서열 (또는 그의 안티센스 서열)을 포함한다. 그러므로, 세포독성 부위는 일례로서 제한하지 않고, 화학치료제, 광활성화된 독소 또는 방사능제일 수 있다.

일반적으로, 약동학적 안정성에 대한 필요성 및 환자에 대하여 전체적으로 감소된 독성을 적절하게 고려하여 예를 들면, 임의의 적절한 기술에 의해 본 발명의 항체 및 항체 조성물에 치료제를 컨주게이션시킬 수 있다. 치료제는 직접 또는 간접적으로 (예로서, 링커기를 통해) 적절한 항체 부위와 커플링될 수 있다. 제제 및 항체 사이의 적절한 반응은 각각 서로와 반응할 수 있는 작용기를 가질 때 가능하다. 예를 들면, 친핵성기, 예로서, 아미노 또는 설프하이드릴기는 카르보닐을 포함하는 기, 예로서, 안하이드라이드 또는 산 할라이드, 또는 우수한 이탈기(예로서, 할라이드)를 포함하는 알킬기와 반응할 수 있다. 다르게는, 적절한 화학 링커기를 사용할 수 있다. 링커기는 결합능이 손상되지 못하도록 항체가 제제로부터 거리를 두도록 하는 스페이서로서 작용할 수 있다. 링커기는 또한 부위 또는 항체상의 치환체의 화학적 반응성을 증가시켜 커플링 효율을 증가시키는 작용을 한다. 화학 반응성의 증가는 또한 부위, 또는 부위상의 작용기의 용도를 촉진시키고, 다르게는 가능하지 않을 수 있다.

적절한 연결(linkage) 화학물질은 말레이미딜 링커 및 알킬 할라이드 링커 (항체 부위상의 설프하이드릴과 반응) 및 숙신 이미딜 링커 (항체 부위상의 1차 아민과 반응)를 포함한다. 수개의 1차 아민 및 설프하이드릴기는 면역글로불린상에 존재하고, 추가의 기는 재조합 면역글로불린 분자내로 지정될 수 있다. 동중- 및 이중작용성 둘 모두의 다양한 이작용성 또는 다중작용성 시약 (예로서, 로크포드에 소재하는 피어스 케미칼 코포레이션(Pierce Chemical Co.)의 카탈로그에 기술되어 있는 것, III)을 링커기로서 사용할 수 있다는 것은 본 분야의 기술자에게 자명한 것이다. 커플링은 예를 들면, 아미노기, 캘리포니아주, 설프하이드릴기 또는 산화된 탄수화물 잔기를 통해 영향을 받을 수 있다 (참조, 예로서, 미국 특허번호 제 4,671,958호).

커플링에 대한 대체 방법으로서, 미국특허 번호 제 5,057,313호 및 제 5,156,840호에 기술된 바와 같이, 세포독성제는 예를 들면, 글리코실화 부위의 산화된 탄수화물기를 통해 본 발명의 항체 및 항체 조성물에 커플링될 수 있다. 세포독성 또는 조영 부위에 대하여 항체 및 항체 조성물을 커플링시키는 또다른 대체 방법은 비공유 결합쌍, 예로서, 스트렙타비딘/바이오틴, 또는 아비딘/바이오틴의 사용을 포함한다. 상기 실시태양에서, 쌍중 하나의 구성원은 항체 부위와 공유결합하고, 결합쌍중 나머지 하나의 구성원은 세포독성 또는 조영 부위와 공유결합한다.

세포독성 부위는 본 발명의 면역컨주게이트의 항체 부위로부터 유리될 때 더욱 효능이 있는 바, 세포내로 내재화하는 동안 또는 그 당시 절단가능하거나, 세포와 환경에서 시간에 걸쳐 점진적으로 절단가능하게 되는 링커기를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 다수의 상이한 절단가능한 링커기가 기술되어 있다. 링커기로부터 세포독성 부위 제제를 세포내로 유리시키는 기작은 디설파이드 결합의 환원 (예로서, 미국 특허번호 제 4,489,710호), 광불안정성(photolabile) 결합의 조사 (예로서, 미국 특허번호 제 4,625,014호), 유도화된 아미노산 측쇄의 가수분해 (예로서, 미국 특허번호 제 4,638,045호), 혈청 보체-매개된 가수분해 (예로서, 미국 특허번호 제 4,671,958호), 및 산-촉매화된 가수분해 (예로서, 미국 특허번호 제 4,569,789호)에 의한 절단을 포함한다.

하나 이상의 치료적, 세포독성 및/또는 조영 부위를 본 발명의 항체 또는 항체 조성물에 커플링시키는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 항체를 다중-유도화하여, 수개의 세포독성 전략법을 동시에 이행할 수 있고, 항체를 수개의 가시화 기술에 대한 조영제로서 유용하게 만들 수 있거나, 치료적 항체를 가시화 기술에 의해 추적하기 위해 표지화할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 세포독성 부위의 다중 분자는 하나의 항체 분자와 커플링한다. 또다른 실시태양에서, 하나 이상의 부위 타입은 하나의 항체 분자와 커플링할 수 있다. 예를 들면, 치료적 부위, 예로서, 폴리뉴클레오티드 또는 안티센스 서열은 화학독성 또는 방사능독성 부위와 결합하여 함께 항체에 컨주게이션됨으로써 화학독성 또는 방사능독성 요법의 효능을 증가시킬 수 있고 원하는 치료학적 효과를 얻기에 필수적인 필요 투여량을 저하시킬 수 있다. 특정 실시태양과는 무관하게, 하나 이상의 부위를 갖는 면역컨주게이트를 다양한 방식으로 제조할 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 부위를 항체 분자에 직접 커플링시킬 수 있거나, 부착을 위해 다중 부위를 제공하는 링커 (예로서, 덴드리머(dendrimers))를 사용할 수 있다. 다르게는, 하나 이상의 세포독성 부위를 유지하는 능력을 갖는 담체를 사용할 수 있다.

상기 설명된 바와 같이, 담체는 직접 또는 링커기를 통해 공유 결합하는 것, 및 비공유 결합을 포함하는 다양한 방식으로 제제를 포함할 수 있다. 적절한 공유결합 담체는 각각이 부착 부위에 대한 다중 부위를 갖는 단백질, 예로서, 알부민 (예로서, 미국 특허번호 제 4,507,234호), 펩티드, 및 폴리사카라이드 예로서, 아미노텍스트란 (예로서, 미국 특허번호 제 4,699,784호)를 포함한다. 담체는 비공유 결합, 예로서, 비공유 결합 또는 예로서, 리포좀 소포체내 캡슐화에 의한 제제를 포함할 수 있다 (예로서, 미국특허 번호 제 4,429,008호 및 제 4,873,088호). 캡슐화 담체는 치료적 조성물이 화학독성 부위를 시간이 경과에 따라 점진적으로 유리시킬 수 있도록 함과 동시에 표적 세포의 주변에 그를 농축시키기 때문에 화학독성의 치료적 실시태양에서 특히 유용하다.

세포독성 부위로서 사용하기에 바람직한 방사선헌종은 약물학적 투여에 적절한 방사선헌종이다. 상기 방사선헌종은 ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{211}At , ^{67}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{212}Pb , 및 ^{212}Bi 을 포함한다. 그의 용도와 관련하여 문헌의 주요부에 취득되어 있는 바와 같이, 요오드 및 아스타틴 동위원소가 본 발명의 치료학적 조성물에서 사용하기에는 더욱 바람직한 방사선헌종이다. 수 밀리미터의 유효범위를 갖는 ^{131}I 는 다른 베타-방사선 방출 핵종으로서 특히 바람직하다. 로도젠, N-숙신이미딜 3-[^{211}At]아스타노벤조에이트, N-숙신이미딜 3-[^{131}I]요오도벤조에이트 (SIB), 및 N-숙신이미딜 5-[^{131}I]요오도-3-피리딘카르복실레이트 (SIPC)을 포함하는 임의 수개의 공지된 컨쥬게이션 시약을 사용하는 방법 및 조성물에서 사용하기 위해 ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , 또는 ^{211}At 를 항체 부위와 컨쥬게이션시킬 수 있다. 임의의 요오드 동위원소가 인용된 요오도-시약에서 사용될 수 있다. 핵 의학 분야에서 당업자에게 공지되어 있는 적절한 킬레이트화제에 의해 다른 방사선헌종을 본 발명의 항체 또는 항체 조성물에 컨쥬게이션시킬 수 있다.

바람직한 화학독성제는 소분자 약물, 예로서, 메토타렉세이트, 및 피리미딘 및 퓨린 유도체를 포함한다. 바람직한 화학독성 분화 유도인자는 포르볼 에스테르 및 부티르산을 포함한다. 화학독성 부위는 화학적 링커를 통해 본 발명의 항체 또는 항체 조성물에 직접 컨쥬게이션될 수 있거나 담체내로 캡슐화됨으로써 본 발명의 항체 또는 항체 조성물에 커플링된다.

세포독성 부위로서 사용하기에 바람직한 독소 단백질은 악티노마이세테스(*Actinomycetes*) 또는 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 항생제, 예로서, 듀오카르마이신을 포함한다. 세포독성 부위로서 사용하기에 바람직한 독소 단백질은 추가로 리신, 아르빈, 디프테리아 독소, 콜레라 독소, 겔로닌(gelonin), 슈우도모나스 외독소, 시겔라(*Shigella*) 독소, 역새폴 항바이러스성 단백질, 및 의학적 생화학 분야에 공지되어 있는 다른 독소 단백질을 포함한다. 이들 독소는 특히 정맥내로 주사될 경우, 환자에서 원치않는 면역 반응을 유도할 수 있기 때문에 본 발명의 항체 또는 항체 조성물에 커플링하기 위한 담체내로 캡슐화시키는 것이 바람직하다.

면역독소의 세포독성 부위는 세포독성 약물 또는 박테리아 또는 식물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 상기 독서의 효소적으로 활성인 단편 ("A 쇠")일 수 있다. 사용되는 효소적으로 활성인 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇠, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇠 (슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래), 리신 A 쇠, 아르빈 A 쇠, 모데신 A 쇠, 알파-사르시나, 알류리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 피토락카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리시스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토켈린, 레스트릭토신, 페노마이신, 및 에노마이신을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 항체는 소분자 항암 약물에 컨쥬게이션된다. 모노클로날 항체 및 상기 세포독성 부위의 컨쥬게이트는 다양한 이작용성 단백질 커플링제를 사용하여 제조된다. 상기 시약의 예는 SPDP, IT, 이미도에스테르의 이작용성 유도체, 예로서, 디메틸 아디피미데이트 HCl, 활성 에스테르 예로서, 디숙신이미딜 수베레이트, 알데히드 예로서, 글루타르알데히드, 비스-아지도 화합물, 예로서, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민, 비스-디아조늄 유도체 예로서, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민, 디이소시아네이트 예로서, 토일렌 2,6-디이소시아네이트, 및 비스-활성 불소 화합물, 예로서, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠이다. 독소중 분해 부분은 항체의 Fab 단편에 연결될 수 있다.

유리하게는, 표적 수용체, 예로서, 활성화된 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체의 외부 영역과 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 및 항체 조성물은 리신 A 쇠에 컨쥬게이션될 수 있다. 가장 유리하게, 리신 A 쇠는 탈글리코실화되고 재조합 수단을 통해 생산된다. 유리한 리신 면역독소 제조 방법은 ([Vitetta et al., *Science* **238**: 1098 (1987)] (본원에서 그의 전체내용이 참조로 인용된다))에 기술되어 있다.

세포에 적용시 용어 "접촉"은 본원에서 항체, 항체 조성물, 세포독성제 또는 부위, 유전자, 단백질 및/또는 안티센스 서열을 표적 세포로 전달하거나 표적 세포와 직접적으로 근접하게 배치할 때의 방법을 설명하기 위하여 사용된다. 상기 전달은 시험관내 또는 생체내에서 사용될 수 있고 재조합 벡터 시스템을 사용하는 것을 포함할 수 있다.

또다른 일면에서, 본 발명은 치료 부위, 예로서, 세포독소, 약물 (예로서, 면역억제제) 또는 방사능독소에 컨쥬게이션되는, 본 발명의 항체 또는 항체 조성물, 또는 그의 단편을 특징으로 한다. 상기 컨쥬게이트는 본원에서 "면역컨쥬게이트"로서 언급된다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역컨쥬게이트는 "면역독소"로서 언급된다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 (예로서, 사멸) 임의의 제제를 포함한다. 예로서, 악티노마이세테스(*Actinomycetes*) 또는 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 항생제, 듀오카르마이신, 텍솔, 시토칼라신 B, 그래미시딘 D, 브롬산 에티디움, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 아트라신 디드, 미토잔트론, 미스라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 그의 유사체 또는 동족체를 포함한다.

본 발명의 면역컨쥬게이트를 형성하는 적절한 치료제는, 제한하는 것은 아니지만, 항대사물질 (예로서, 메토폭세이트, 6-머갑토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예로서, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로토스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 플래티늄 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린 (예로서, 다우노루비신 (이전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예로서, 악티노마이신 (이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 및 항유사분열제 (예로서, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 치료제는 세포독성제 또는 방사능독성제이다. 또다른 실시태양에서, 치료제는 면역억제제이다. 추가의 또다른 실시태양에서, 치료제는 GM-CSF이다. 바람직한 실시태양에서, 치료제는 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 셀페이트, 카르무스틴, 클로람부실, 시클로포스파미드 히드록시우레아 또는 리신 A이다.

본 발명의 항체 및 항체 조성물은 또한 방사능독소, 예로서, 방사성 요오드에 컨쥬게이션됨으로써 예를 들면, 암을 치료하기 위한 세포독성 방사능 약제를 생산할 수 있다.

항체에 상기 치료학적 부위를 컨쥬게이션시키는 기술은 잘 공지되어 있다 (참조, 예로서, [Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]; [Hellstrom et al., "Antibodies For Drugs Delivery", in Controlled Drugs Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; [Thorpe, "Antibodies Carriers Of Cytotoxic In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)]; ["Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibodies In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)], 및 [Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibodies-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, **62**: 119-58 (1982)]).

폴리펩티드 또는 항체 조성물의 용도

본원에서 확인된 각각의 폴리펩티드 또는 항체 조성물, 예로서, 세포 표면 수용체에 대한 항체, 항체 세포독소 컨쥬게이트, 세포 표면 수용체, 예로서, 전이 세포상의 활성화된 인테그린 수용체를 다수의 방식으로 사용할 수 있다. 하기 설명은 예시적임을 고려하여야 하고 이는 공지된 기술을 사용하여야 한다.

본 발명의 폴리펩티드 또는 항체 조성물을 사용함으로써 항체-기초 기술을 사용하여 생물학적 샘플중의 단백질 수준을 분석할 수 있다. 예를 들면, 조직내 단백질 발현은 종래의 면역조직학적 방법으로 연구될 수 있다 ([M. et al., *J. Cell. Biol.* **101**: 976-985, 1985]; [Jalkanen, M. et al., *J. Cell. Biol.* **105**: 3087-3096, 1987]). 단백질 유전자 발현을 검출하는데 유용한 다른 항체-기초 방법은 면역측정법, 예로서, 효소면역측정법 (ELISA) 및 방사면역측정법 (RIA)을 포함한다. 적절한 항체 측정법 표지는 본 분야에 잘 공지되어 있고 효소 표지, 예로서, 글루코오스 옥시다제, 및 방사능 동위원소 또는 다른 방사능제, 예로서, 요오드 (^{125}I , ^{121}I), 탄소 (^{14}C), 황 (^{35}S), 삼중수소 (^3H), 인듐 (^{112}In), 및 테크네튬 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 및 형광 표지, 예로서, 형광물질 및 로다민, 및 바이오틴을 포함한다.

생물학적 샘플중 분비된 단백질의 수준을 측정하는 것외에, 단백질 또는 항체 조성물은 영상화에 의해 생체내에서 검출할 수 있다. 생체내에서 단백질을 영상화하기 위한 항체 표지 또는 마커는 X-방사선촬영, NMR 또는 ESR에 의해 검출될 수 있는 것을 포함한다. X-방사선촬영의 경우, 적절한 표지는 검출가능한 방사선을 방출하지만 대상자에 대해서는 명백히 유해하지 않은 방사능 동위원소, 예로서, 바륨 또는 세슘을 포함한다. NMR 및 ESR에 대한 적절한 마커는 관련 scFv 클론을 위해 영양소로 표지함으로써 항체내로 혼입될 수 있는 중수소와 같은 검출가능한 특징적인 스핀을 갖는 것을 포함한다.

적절한 검출가능 조영 부위, 예로서, 방사선 동위원소 (예를 들면, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), 방사선 비투과 물질, 또는 핵자기 공명에 의해 검출가능한 물질로 표지된 단백질-특이 항체 또는 항체 단편을 포유동물 내로 도입한다 (예를 들면, 비경구적, 피하, 또는 복강내). 사용하는 영상 시스템 및 대상의 크기가 진단 영상을 형성하기 위해 요구되는 조영 부위의 양을 결정할 것이라는 것은 본 분야에서 이해될 것이다. 방사선 동위원소 부위에서 인간 대상자의 경우 주입되는 방사능의 양은 보통 약 5 내지 20밀리퀴리 범위의 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 일 것이다. 이어서, 표지된 항체 또는 항체 단편은 특정 단백질을 포함하는 세포의 위치에서 우선적으로 축적될 것이다. 생체내 중앙 영상화는 [S. W. Burchiel et al., *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer* **13**, 1982].

따라서, 본 발명은

(a) 개체의 세포 또는 체액에서 본 발명의 항체 조성물의 결합을 측정하고;

(b) 유전자 발현의 수준과 표준 유전자 발현 수준을 비교하여, 표준 발현 수준과 비교되는, 분석 폴리펩티드 유전자 발현의 수준에 대한 증가 또는 감소로서 질환을 암시하는 것을 포함하는, 질환을 진단하는 방법을 제공한다.

활성화된 인테그린 수용체에 결합하는 분자의 능력은 예를 들면, 측정 플레이트 상에 피복된 활성화된 인테그린 수용체 면역접합체에 결합하는 추정 리간드의 능력에 의해 측정할 수 있다. 결합 특이성은 비활성화된 인테그린 수용체와의 결합을 비교하여 측정할 수 있다.

하나의 실시태양에서, 활성화된 인테그린 수용체와의 항체 결합은 리간드 또는 수용체를 고정화시켜 분석할 수 있다. 예를 들면, 측정법은 Ni-활성화된 NTA 레진 비드상의 His 태그에 융합된 활성화된 인테그린 수용체를 고정화시키는 것을 포함할 수 있다. 주어진 온도에서 일정 시간동안 인큐베이션된 적절한 완충액 및 비드에 항체를 첨가할 수 있다. 결합하지 않은 물질을 제거하기 위하여 세척한 후, 결합한 단백질은 예를 들면, SDS, pH 등이 높은 완충액으로 유리시키고 분석할 수 있다.

또한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체 조성물을 사용하여 질환을 치료할 수 있다. 예를 들면, 결여되어 있거나 그의 수준이 저하된 폴리펩티드 (예로서, 인슐린)를 대체하기 위해, 결여되어 있거나 그의 수준이 저하된 상이한 폴리펩티드 (예로서, 헤모글로빈 B에 대해 헤모글로빈 S)를 보충하기 위해, 폴리펩티드 (예로서, 온코진)의 활성을 억제하기 위해, 폴리펩티드의 활성화를 활성화시키기 위해 (예로서, 수용체와의 결합에 의해), 유리 리간드 (예로서, 염증 완화제 사용되는 가용성 TNF 수용체)에 대하여 그와 경쟁시킴으로써 막에 결합한 수용체의 활성을 감소시키기 위해, 또는 원하는 반응 (예로서, 혈관 증식)을 유발시키기 위한 노력으로 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체 조성물을 환자에게 투여할 수 있다.

유사하게, 본 발명의 항체 조성물도 사용함으로써 질환을 치료할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드에 대하여 지정된 항체를 투여함으로써 폴리펩티드에 결합하고 그의 과다생산을 감소시킬 수 있다. 유사하게, 항체를 투여함으로써 막 수용체에 결합한 폴리펩티드와의 결합에 의해 폴리펩티드를 활성화시킬 수 있다.

진단학적 용도

전이 종양 세포, 예로서, 악성 흑색종을 확인하기 위한 진단학적 방법에 사용하기 위한 본 발명의 인간 항체 및 항체 조성물을 바람직하게 상기 기술된 방법을 사용하여 생산한다. 본 발명을 통해 임의의 원하는 항원에 대하여 임의의 에피토프 결합 특이성 및 매우 고도한 결합 친화성을 갖는 본 발명의 항체 및 항체 조성물을 실질적으로 무제한적인 수로 수득할 수 있다. 일반적으로, 그의 표적에 대한 항체의 결합 친화성이 높을수록 표적 항원을 제거하지 않고 비특이적으로 결합된 물질을 제거하기 위해 면역측정법에서 실시될 수 있는 세척 조건은 더욱더 엄격할 수 있다. 따라서, 상기 측정법에서 사용되는 본 발명의 항체 및 항체 조성물의 결합 친화성은 적어도 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} 또는 10^{12}M^{-1} 이다. 추가로, 진단제로서 사용되는 항체는 적어도 12시간, 바람직하게, 적어도 5시간 이상, 바람직하게, 적어도 하나 1시간 후 표준 조건하에서 평형에 도달하는 충분한 결합 속도(on-rate)를 갖는 것이 바람직할 수 있다.

주장하는 방법에서 사용되는 본 발명의 항체 및 항체 조성물은 바람직하게 고도한 면역반응성을 갖고, 즉, 그의 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있도록 정확하게 폴딩되는 항체 분자의 퍼센트가 높다. 상기 기술된 바와 같이 이. 콜라이에서 항체를 코딩하는 서열을 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 상기 발현을 통해 일반적으로 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99%의 면역반응성을 일으킨다.

본 발명의 방법중 일부는 본 발명의 항체 및 항체 조성물의 폴리클로날 시료를 진단제로서 사용하고, 그외의 방법은 모노클로날 분리물을 사용한다. 폴리클로날 혼합물을 사용하는 것은 하나의 모노클로날 항체로 구성된 조성물과 관련하여 수 개의 잇점을 갖는다. 표적상의 다중 부위에 결합시킴으로써, 폴리클로날 항체 또는 다른 폴리펩티드는 단일 부위에 결합하는 모노클로날보다 더욱 강력한 신호 (진단제에 대하여)를 형성할 수 있다. 추가로, 폴리클로날 시료는 원형 표적 서열의 다수의 변이체 (예로서, 대립 변이체, 중 변이체, 군주 변이체, 약물-유도성 이탈(escape) 변이체)에 결합할 수 있는 반면, 모노클로날 항체는 오직 당해 원형 서열에만 결합할 수 있거나 그보다 더욱 협범위의 그에 대한 변이체에 결합할 수 있다. 그러나, 모노클로날 항체는 밀접하게 관련된 항원의 존재하에 또는 잠정적 존재하에서 단일 항원을 검출하기에 이롭다.

상기 기술된 방법에 따라 제조된 폴리클로날 인간 항체를 사용하는 방법에서, 시료는 전형적으로 목적하는 표적 항원에 대하여 상이한 에피토프 특이성을 갖는, 갖가지의 항체를 포함한다. 모노클로날 항체를 사용하는 몇몇 방법에서는 상이한 에피토프 결합 특이성을 갖는 2개를 갖는 것이 바람직할 수 있다. 에피토프 결합 특이성에 대한 차이는 경쟁적 측정법에 의해 측정할 수 있다.

인간 항체는 임의 종류의 샘플에 대한 진단제로서 사용될 수 있지만, 인간 샘플에 대한 진단제로서가 가장 유용하다. 샘플은 환자의 임의 조직 또는 체액으로부터 수득할 수 있다. 샘플의 바람직한 근원으로서 전혈, 혈장, 정액, 침, 눈물, 뇨, 대변, 땀, 불, 피부 및 모발을 포함한다. 샘플은 또한 내장 기관의 생검 또는 암으로부터 수득할 수 있다. 샘플은 또한 진단 또는 연구를 위한 임상 환자로부터 수득할 수 있거나, 대조군으로서 또는 기초 연구를 위한 병에 걸리지 않는 개체로부터 수득할 수 있다.

본 방법을 사용하여 임의의 표적 항원 타입을 검출할 수 있다. 예시적인 표적 항원으로서 인간 질환을 유발하는 박테리아, 진균 및 바이러스 병원체, 예로서, HIV, 간염 (A, B, & C), 인플루엔자, 헤르페스, 지아르디아(*Giardia*), 말라리아, 리슈마니아(*Leishmania*), 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)를 포함한다. 다른 표적 항원은 그의 발현 수준 또는 조성물이 인간 질환 또는 다른 표현형과 서로 관련된 인간 단백질이다. 상기 항원의 예로서 부착 단백질, 호르몬, 성장 인자, 세포성 수용체, 자가항원, 자가항체, 및 아밀로이드 침착물을 포함한다. 관심의 대상이 되는 다른 표적은 종양 세포 항원, 예로서, 암배아 항원을 포함한다. 관심의 대상이 되는 다른 항원은 클래스 I 및 클래스 II MHC 항원이다.

인간 항체를 사용하여 다양한 표준 측정법 포맷으로 주어진 표적을 검출할 수 있다. 상기 포맷은 면역침전, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사능면역측정법, 및 면역계측법을 포함한다 (참조, [Harlow & Lane, 상기 동일]; 미국특허 번호 제 3,791,932호; 제 3,839,153호; 제 3,850,752호; 제 3,879,262호; 제 4,034,074호; 제 3,791,932호; 제 3,817,837호; 제 3,839,153호; 제 3,850,752호; 제 3,850,578호; 제 3,853,987호; 제 3,867,517호; 제 3,879,262호; 제 3,901,654호; 제 3,935,074호; 제 3,984,533호; 제 3,996,345호; 제 4,034,074호; 및 제 4,098,876호 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다)).

면역계측법 또는 샌드위치형 측정법이 바람직한 포맷이다 (참조, 미국 특허번호 제 4,376,110호, 제 4,486,530호, 제 5,914,241호, 및 제 5,965,375호 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다)). 상기 측정법은 고체상에 고정된 하나의 항체 또는 항체 군집, 및 용액내의 또다른 항체 또는 항체 군집을 사용한다. 전형적으로, 항체 용액 또는 항체 군집은 표지된다. 항체 군집을 사용할 경우, 상기 군집은 전형적으로 표적 항원내 상이한 에피토프 특이성으로 항체 결합을 포함한다. 따라서, 동일한 군집을 고체상 및 항체 용액 둘 모두에 대하여 사용할 수 있다. 모노클로날 항체를 사용할 경우, 상이한 결합 특이성을 갖는 제 1 및 제 2 모노클로날 항체를 고체 및 용액 상에 대하여 사용한다. 고체상 및 항체 용액을 순서대로 또는 동시에 표적 항원과 접촉시킬 수 있다. 고체상 항체를 먼저 접촉시킬 경우, 측정법은 전향(forward) 측정법으로서 언급된다. 반대로, 항체 용액을 먼저 접촉시킬 경우, 측정법은 역행(reverse) 측정법으로서 언급된다. 표적을 양 항체와 동시에 접촉시킬 경우, 측정법은 동시 측정법으로서 언급된다. 표적을 항체와 접촉시킨 후, 일반적으로 약 10분 내지 약 24시간으로서 다양한 기간 및 일반적으로는 약 1시간으로서의 기간동안 샘플을 인큐베이션시킨다. 이어서, 진단 시약으로서 사용되는 항체에 특이적으로 결합하지 못한 샘플 성분을 제거하기 위해 세척 단계를 실시한다. 고체상 및 항체 용액이 별개의 단계에서 결합한 경우, 결합 단계 어느 하나 또는 둘 모두의 결합 단계 후 세척을 실시할 수 있다. 세척 후, 전형적으로는 표지된 항체 용액의 결합을 통해 고체상에 연결된 표지를 검출하여 결합을 측량한다. 일반적으로, 주어진 항체쌍 또는 항체 군집 및 주어진 반응 조건에 대한 표준화 곡선(calibration curve)을 공지된 농도의 표적 항원을 포함하는 샘플로부터 작성한다. 이어서, 시험하고자 하는 샘플중의 항원 농도는 표준화 곡선으로부터의 보간법(interpolation)에 의해 판독한다. 평형시 결합된 표지 항체 용액으로부터, 또는 평형에 도달하기 전 일련의 시점에서 결합된 표지 항체 용액의 동역학적 측정에 의해 분석물을 측정할 수 있다. 상기 곡선의 기울기가 샘플중 표적의 농도에 대한 측정치이다.

상기 방법에서 사용하기 위한 적절한 지지체는 예를 들면, 니트로셀룰로오스막, 나일론 막, 및 유도된 나일론 막, 및 추가로 입자, 예로서, 아가로스, 텍스트란-기초 겔, 덤스틱(덤스틱s), 미립자, 미세구, 자기 입자, 시험관, 미량역가 웰, SEPHADEX™ (뉴저지주 피츠카타웨이에 소재하는 아마삼 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech)) 등을 포함한다. 흡착 또는 공유결합에 의해 고정화될 수 있다. 임의로, 항체는 링커 분자, 예로서, 표면에 결합시키기 위한 바이오틴, 결합 링커, 예로서, 아비딘에 결합될 수 있다.

표지

본 측정법에서 사용되는 특정 표지 또는 검출가능한 기는 본 측정법에서 사용되는 항체의 특이 결합을 현저하게 방해하지 않는 한, 본 발명의 중요한 일면이 되지 못한다. 검출가능한 기는 검출가능한 물리적 또는 화학적 성질을 갖는 임의의 물질일 수 있다. 상기 검출가능한 표지는 면역측정법 분야에서 잘 개발되었고, 일반적으로, 상기 방법에서 유용한 대부분의 임의 표지는 본 발명에 적용될 수 있다. 따라서, 표지는 분광, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 전기, 광학 또는 화학적 수단에 의해 검출가능한 임의의 조성물이다. 본 발명에서 유용한 표지는 자기 비드 (예로서, 디나비드(Dynabead)™), 형광염료 (예로서, 형광물질 이소티오시아네이트, 텍사스 레드(Texas red), 로다민 등), 방사능표지 (예로서, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{121}I , ^{112}In , ^{99}mTc), 다른 조영제, 예로서, 미세기포 (초음파 영상화용), ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O (양전자방출 단층촬영용), ^{99}mTc , ^{111}In (단일 양자 방출 전산화 단층촬영술), 효소 (예로서, 홍당무 과산화효소, 알칼리성 인산분해효소 및 ELISA에서 통상 사용되는 것), 및 열량 측정 표지, 예로서, 아교집열화 금 또는 착색 유리 또는 플라스틱 (예로서, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등) 비드를 포함한다. 상기 표지의 사용에 대하여 기술하고 있는 특허는 미국특허 번호 제 3,817,837호; 제 3,850,752호; 제 3,939,350호; 제 3,996,345호; 제 4,277,437호; 제 4,275,149호; 및 제 4,366,241호 (본원에서 각각은 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조로서 인용된다)를 포함한다 (참조, [Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR.)]).

표지는 본 분야에 잘 공지된 방법에 따라 측정법의 원하는 성분에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 광범위하게 다양한 표지가 사용될 수 있고, 요구되는 민감성, 화합물과의 컨쥬게이션의 용이성, 안정성 조건, 이용가능한 기기조작 및 처리 규정에 의존하여 표지를 선택할 수 있다.

비방사성 표지는 주로 간접적인 수단에 의해 부착된다. 일반적으로, 리간드 분자 (예로서, 바이오틴)는 분자에 공유결합한다. 이어서, 리간드는 본질적으로 검출가능하거나 신호계에 공유결합하는 항-리간드 (예로서, 스트렙타비딘) 분자, 예로서, 검출가능한 효소, 형광 화합물, 또는 화학발광 화합물에 결합한다. 다수의 리간드 및 항-리간드를 사용할 수 있다. 리간드가 자연발생적 항-리간드, 예를 들면, 바이오틴, 티록신, 및 코르티솔을 가질 경우, 표지되고 자연발생적으로 발생된 항-리간드와 함께 사용될 수 있다. 다르게는, 임의의 합텐 또는 항원 화합물을 항체와 함께 사용할 수 있다.

분자는 또한 예로서, 효소 또는 형광단과의 컨쥬게이션에 의해 신호 형성 화합물에 직접적으로 컨쥬게이션될 수 있다. 표지로서 관심의 대상이 되는 효소는 주로 가수분해효소, 특히, 인산분해효소, 에스테르분해효소 및 글리코시다아제, 또는 산화환원효소, 특히, 과산화효소일 것이다. 형광 화합물은 형광물질 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 댄실, 옴벨리페론 등을 포함한다. 화학발광 화합물은 루시페린, 및 2,3-디히드로프탈라진디온, 예로서, 루미놀을 포함한다. 사용할 수 있는 다양한 표지 또는 신호 형성 시스템에 대한 리뷰에서 대해서는 미국 특허번호 제 4,391,904호 (본원에서 모든 목적을 위해 그의 전체 내용이 참조로서 인용된다)를 참조한다.

표지를 검출하는 수단은 본 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있다. 따라서, 예를 들면, 표지가 방사성 표지인 경우, 검출 수단은 자가방사선술에서 사진 필름 및 섬광 카운터를 포함한다. 표지가 형광 표지인 경우, 적절한 파장의 빛으로 플루오로크롬을 여기시키고 생성된 형광을 검출함으로써 검출될 수 있다. 형광은 사진 필름의 수단에 의해, 전자 검출기, 예로서, 전하 결합 소자 (CCDs) 또는 광증폭기의 사용에 의해 가시적으로 검출할 수 있다. 유사하게, 효소 표지는 효소에 대한 적절한 기질을 제공하고 생성된 반응 산물을 검출시켜 검출할 수 있다. 최종적으로, 단순 열량 측정 표지는 표지와 관련된 색상을 단수 관찰함으로써 검출할 수 있다. 따라서, 다양한 덤스틱 측정법에서, 컨쥬게이션된 금은 주로 분홍색으로 나타나는 반면, 다양한 컨쥬게이션된 비드는 비드 색상으로 나타난다.

일부 측정법 포맷은 표지된 성분의 사용을 필요로 하지 않는다. 예를 들면, 응집 측정법을 사용하여 표적 항체의 존재를 검출할 수 있다. 이 경우, 항원-피복된 입자는 표적 항체를 포함하는 샘플에 의해 응집된다. 이 포맷에서, 어떤 성분도 표지될 필요는 없고 표적 항체의 존재는 시각적 단순 관찰에 의해 검출된다.

중중, 활성화된 인테그린 수용체 또는 $\alpha_3\beta_1$ 인테그린 수용체 단백질 및 인테그린 수용체에 대한 항체는 검출가능한 신호를 제공하는 물질을 공유 또는 비공유로 연결시킴으로써 표지할 것이다.

치료 요법

본 발명은 제약상 허용되는 담체와 함께 제형화되는 항체, 예로서, 인테그린 수용체에 대한 항체 (모노클로날, 폴리클로날 또는 단쇄 Fv; 그의 완전한 또는 결합 단편) 또는 항체 세포독소 컨쥬게이트 하나를 또는 그의 배합물을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 일부 조성물은 본 발명의 다중 (예로서, 2개 이상) 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 배합물을 포함한다. 일부 조성물에서 조성물중 항체 또는 그의 항원-결합 부분 각각은 항원의 독특하고 미리 선별된 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체 또는 인간 서열 항체이다.

예방학적 적용시, 항체 세포독소 컨쥬게이트의 제약 조성물 또는 약제를 질환 발생시 나타내는 질환, 그의 합병증 및 중간 병적 표현형의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동 증상을 포함하는, 위험을 제거하거나 저하시키거나, 중증도를 저하시키거나, 발병을 지연시키기에 충분한 양으로 질환 또는 증상 (즉, 면역 질환)에 걸리기 쉽거나, 다르게는, 그러한 위험에 놓인 환자에게 투여한다. 치료학적 적용시, 조성물 또는 약제를 질환 발생시 그의 합병증 및 중간 병적 표현형을 포함하는, 질환 증상 (생화학적, 조직학적 및/또는 행동)을 치유하거나, 적어도 부분적으로 정지시키기에 충분한 양으로 상기 질환에 걸린 것으로 의심되거나 이미 앓고 있는 환자에 투여한다. 치료학적 또는 예방학적 치료를 얻기에 적절한 양은 치료학적- 또는 예방학적 유효량으로 정의된다. 예방학적 및 치료학적 요법 둘 모두에서는 일반적으로 충분한 면역 반응을 얻을 때까지 약제를 수개의 투여량으로 투여한다. 전형적으로, 면역 반응을 모니터하고, 면역 반응이 약화되기 시작하면 반복적 투여량으로 제공한다.

본 발명의 조성물 및 방법에서 유용한 전이 종양 세포상의 활성화된 인테그린 수용체와 특이적으로 결합하는 항체 조성물, 그의 항체 세포독소 컨쥬게이트, 리간드 모사체, 유도체 및 유사체는 그의 입체이성체, 프로드럭, 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 산염 수화물, N-옥시드 또는 동형 결정질 형태의 형태로, 또는 화합물이 치료학적 유효량으로 적절한 담체 또는 부형제(들)과 혼합되어 있는 제약 조성물의 형태로 인간 환자, 그 자체로, 암 또는 전이 암에 투여될 수 있다. 제약상 허용되는 담체는 부분적으로 투여하고자 하는 특정 조성물뿐만 아니라, 조성물을 투여하기 위하여 사용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 따라서, 항체 조성물을 투여하기 위한 적절한 제약 조성물의 제형은 광범위하게 존재한다 (참조, 예로서, [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 18th ed., 1990] (본원에서 참조로서 인용된다)). 제약 조성물은 일반적으로 환자에 투여되기에 적절한 형태로 차별적으로 발현된 단백질, 작용제 또는 길항제를 포함한다. 미국 식품의약청의 모든 의약품제조 품질 관리기준(GMP) (Good Manufacturing Practice (GMP) regulations of the U.S. Food and Drug Administration)에 따라 제약 조성물은 일반적으로 멸균의 실질적으로 등장성인 것으로 제형화될 수 있다.

조성물, 담체, 희석제 및 시약에 관련하여 언급할 때, 용어 "제약상 허용되는", "생리학적으로 내성인" 및 그의 문법상의 파생어는 상호교환적으로 사용되고 물질이 조성물 투여를 방해하는 정도로는 원치않는 생리학적 효능을 형성하지 않으면서 인간에게 또는 인간으로 투여될 수 있다는 것을 나타낸다.

예를 들면, "제약상 허용되는 부형제"는 일반적으로 안전하고, 비독성이고 바람직한 조성물을 제조할 때 유용한 부형제를 의미하고, 수의적 용도뿐만 아니라 인간 제약 용도로서 허용되는 부형제를 포함한다. 상기 부형제는 고형, 액상, 반고형일 수 있거나, 에어로졸 조성물일 경우, 기체일 수 있다.

"제약상 허용되는 염 및 에스테르"는 제약으로 허용가능하고 원하는 약물학적 성질을 갖는 염 및 에스테르를 의미한다. 상기 염은 화합물중에 존재하는 산성 양성자가 무기 또는 유기 염기와 반응하여 형성할 수 있는 염을 포함한다. 적절한 무기 염은 알칼리 금속, 예로서, 나트륨 및 칼슘, 마그네슘, 칼슘, 및 알루미늄으로 형성된 것을 포함한다. 적절한 유기 염은 유기 염기, 예로서, 아민 염기, 예로서C에탄올 아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민, N 메틸글루카민 등으로 형성된 것을 포함한다. 상기 염은 또한 무기 산 (예로서, 염산 및 브롬화수소산) 및 유기 산 (예로서, 아세트산, 시트르산, 말레산, 및 알칸- 및 아렌-설폰산 예로서, 메탄설폰산 및 벤젠설폰산)으로 형성된 산 부가염을 포함한다. 제약상 허용되는 에스테르는 화합물에 존재하는 카복시, 설폰일옥시, 및 포스포닉시 기로부터 형성된 에스테르, 예로서, C₁₋₆ 알킬 에스테르를 포함한다. 2개의 산성기가 존재하는 경우, 제약상 허용되는 염 또는 에스테르는 모노-산-모노-염 또는 에스테르 또는 디-염 또는 에스테릴일 수 있고; 유사하게, 2개 이상의 산성기가 존재하는 경우, 상기 기중 일부 또는 모두가 염화되거나 에스테르화될 수 있다. 본 발명에서 언급되는 화합물은 염화되지 않거나 에스테르화되지 않은 형태, 염화되고/거나 에스테르화된 형태로 존재할 수 있고 상기 화합물을 언급하는 것은 본래의 (염화되지 않고 에스테르화되지 않음) 화합물 및 그의

제약상 허용되는 염 및 에스테르 둘 모두를 포함하고자 한다. 또한, 본 발명에서 언급되는 특정 화합물은 하나 이상의 입체 이성체 형태로 존재할 수 있고, 상기 화합물을 언급하는 것은 상기 입체이성체의 모든 단일 입체이성체 및 모든 혼합물(라세미 또는 다른 것)을 포함하고자 한다.

"치료학적 유효량"은 질환을 치료할 때 대상자에게 투여할 때 당해 질환을 치료함에 효능을 발휘하기에 충분한 양을 의미한다.

특히 언급할 때를 제외하고, 용어 "대상자", "환자" 또는 "포유동물"은 상호교환적으로 사용되고 포유동물, 예로서, 인간 환자 및 인간이 아닌 영장류뿐만 아니라 실험실상 동물, 예로서, 래빗, 래트, 및 마우스, 및 다른 동물을 포함한다. 동물은 모든 척추동물, 예로서, 포유동물 및 비-포유동물, 예로서, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 및 파충류를 포함한다. 따라서, 본원에서 사용되는 바, 용어 "대상자" 또는 "환자"는 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 임의의 포유동물 환자 또는 대상자를 의미한다. 본 발명의 몇몇 실시태양에서, 환자는 예로서, HIV와 같이 지환에 대하여 내성이 저하된 증상으로 고생할 것이다. 본 발명의 예시적인 실시태양에서, 본 발명의 방법에 따라 하나 이상의 항체-세포독소 컨주게이트 분자를 포함하는 제약 조성물을 사용하여 치료하기 위한 대상자 환자를 확인하기 위해 허용되는 스크리닝 방법은 대상자에 존재하는 질환 또는 증상의 상태 또는 표적화되거나 의심되는 질환 또는 증상과 관련된 위험 인자를 측정하기 위하여 사용한다. 상기 선별 방법은 대상자가 신생물 질병을 앓는지 여부를 결정하는 선별 검사를 포함한다. 이들 및 다른 일반적인 방법을 통해 의사들은 치료를 필요로 하는 대상자를 선별할 수 있다.

본 발명의 제약 조성물을 사용하여 공지된 암 치료 약물을 "동시 투여"하는 것은 본 발명의 공지된 약물 및 조성물 둘 모두가 치료학적 효과를 갖도록 하는 때에 항체-세포독소 컨주게이트 분자 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 상기의 동시 투여는 본 발명의 화합물 투여와 관련된 항균성 약물을 동시에 (즉, 동시간대), 그 이전에, 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 분야의 당업자는 본 발명의 특정 약물 및 조성물에 대한 적절한 투여 시간, 순서 및 투여법을 결정함에는 어려움이 없을 것이다.

유효 투여량

본원에 기술된, 면역-관련 증상 및 질환, 예로서, 전이 암의 치료를 위한, 본 발명의 항체 조성물, 예로서, 인테그린 수용체에 대한 항체 또는 항체 세포독소 컨주게이트의 유효량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 또는 동물인지 여부, 투여되는 다른 약제, 및 요법이 예방하기 위함인지 또는 치료하기 위함인지를 포함하는 다수의 상이한 인자에 따라 달라진다. 일반적으로, 환자는 인간이지만, 트랜스제닉 포유동물을 포함하는 인간이 아닌 포유동물도 치료할 수 있다. 치료를 위한 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 적정될 필요가 있다.

항체를 투여할 경우, 투여 범위는 숙주 체중당 약 0.0001 내지 100mg/kg, 및 더욱 일반적으로 0.01 내지 5mg/kg이다. 예를 들면, 투여량은 1mg/체중kg 또는 10mg/체중kg 또는 1-10mg/kg 범위일 수 있다. 일례의 치료 요법은 매 2주마다 한 번 또는 한달에 한번 또는 매 3 내지 6개월마다 한번 투여하는 것을 수반한다. 몇몇 방법에서 상이한 결합 특이성을 갖는 2개 이상 모노클로날 항체를 투여될 수 있고, 이 경우에 투여되는 각 항체의 투여량은 지정된 범위내 포함된다. 항체는 일반적으로 여러번에 걸쳐 투여된다. 단일 투여 사이의 간격은 주, 월 또는 년 일수 있다. 환자에서 혈액내 항체 수준을 측정함으로써 표시되는 바, 또한 간격은 불규칙할 수 있다. 몇몇 방법에서, 투여량은 1-1000 μ g/ml, 몇몇 방법에서는 25-300 μ g/ml의 혈장 항체 농도를 얻도록 조절된다. 다르게는, 항체는 지효성 방출 제형으로서 투여될 수 있고, 이 경우에는 투여하는 빈도를 줄이는 것이 필요하다. 투여량 및 빈도수는 환자에서 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간 항체가 가장 긴 반감기를 보이고, 이어서, 인간화된 항체, 키메라 항체, 및 인간이 아닌 항체이다. 투여량 및 투여 빈도수는 요법이 예방하기 위함인지 또는 치료하기 위함인지에 따라 달라질 수 있다. 예방학적 적용시에는 장기간에 걸쳐 상대적으로는 드물게 상대적으로 낮은 투여량을 투여한다. 일부 환자는 남은 여생동안 계속적으로 치료를 받게 된다. 치료학적 적용시에는 질환 진행이 감소하거나 종결될 때까지, 및 바람직하게는 환자에서 질환의 증상이 부분적으로 또는 완전하게 호전될 때까지 상대적으로 짧은 간격으로 상대적으로 높은 투여량이 자주 요구된다. 이후, 환자는 예방학적 요법에 따라 투여받을 수 있다.

면역원을 코딩하는 핵산에 대한 투여량은 환자당 약 10ng 내지 1g, 100ng 내지 100mg, 1 μ g 내지 10mg, 또는 30-300 μ g DNA 범위이다. 감염성 바이러스 벡터에 대한 투여량은 투여량당 10-100개 이상의 비리온으로 다양하다.

투여 경로

면역-관련 증상 및 질환, 예로서, 전이 암의 치료를 위해, 면역 반응을 유도하기 위한 항체 조성물, 예로서, 인테그린 수용체에 대한 항체 또는 항체 세포독소 컨주게이트는 비경구, 국소, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 복강내, 비강내 또는

근육내 수단에 의해, 예방용으로 뇌 병변을 표적하는 항체 제제용 흡입제로서, 및/또는 치료학적 치료법으로 투여될 수 있다. 다른 경로도 동등하게 유효할 수 있지만, 면역원성 제제를 투여하기에 가장 전형적인 투여 경로는 피하내 투여이다. 그 다음으로 가장 보편적인 경로는 근육내 주입이다. 이러한 타입의 주입은 팔 또는 다리 근육에 가장 전형적으로 실시된다. 일부 방법에서는 침적물이 축적되어 있는 특정 조직으로 제제를 직접 주입, 예를 들면 두개내 주입한다. 정맥내 주입시 근육내 주입은 항체 투여에 바람직하다. 일부 방법에서, 특정 치료용 항체를 직접 두개골에 주입한다. 일부 방법에서, 항체를 지효성 방출 조성물 또는 장치, 예로서, 메디패드(Medipad)TM 장치로서 투여한다.

본 발명의 제제는 임의로 다양한 면역-관련 질환을 포함하는 다양한 질환을 치료함에 적어도 부분적으로 유효한 다른 약제와 함께 투여될 수 있다. 뇌로의 중앙 전이의 경우, 본 발명의 약제는 또한 혈액뇌장벽 (BBB)를 가로지르는 본 발명의 약제의 투과성(passage)을 증가시키는 다른 약제와 함께 투여될 수 있다.

제법

면역-관련 증상 및 질환, 예로서, 전이 암, 치료를 위한 면역 반응을 유도하는 항체 조성물, 예로서, 인테그린 수용체에 대한 항체 또는 항체 세포독소 컨쥬게이트는 활성 치료제, 즉, 및 다양한 다른 제약상 허용되는 성분을 포함하는 제약 조성물로서 투여될 수 있다 (참조, [Remington's Pharmaceutical Science, 1990 상기 동일]). 바람직한 형태는 의도하는 투여 방식, 및 치료학적 적용에 의존한다. 또한, 조성물은 원하는 제법에 따라, 동물 또는 인간 투여용의 제약 조성물을 제법화하기 위해 통상적으로 사용되는 비히클로서 정의되는 제약으로 허용가능하고, 비독성인 담체 또는는 희석제를 포함할 수 있다. 배합물의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 희석제를 선택한다. 상기 희석제의 예로서, 증류수, 생리학적 인산-완충처리된 염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 및 헨크 용액이다. 추가로, 제약 조성물 및 제제는 또한 다른 담체, 애주번트, 또는 비독성, 비치료학적, 비면역원성 안정화 등을 포함한다.

제약 조성물은 또한 크고 대사속도가 느린 거대분자 예로서, 단백질, 폴리사카라이드, 예로서, 키토산, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 공중합체 (예로서, 라텍스 작용화된 세파로스(Sepharose)TM, 아가로스, 셀룰로오스 등), 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체, 및 지질 응집괴 (예로서, 오일 소적 또는 리포솜)을 포함한다. 추가로, 상기 담체는 면역자극제 (즉, 애주번트)로서 작용할 수 있다.

비경구 투여를 위해 본 발명의 조성물은 멸균액, 예로서, 수유, 염수, 글리세롤, 또는 에탄올일 수 있는 제약 담체와 함께 생리학적으로 허용되는 희석제중 물질의 용액 또는 현탁액의 주사가능한 제형으로 투여될 수 있다. 추가로, 보조제 물질, 예로서, 습윤화제 또는 유화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등이 조성물에 존재할 수 있다. 제약 조성물의 다른 성분은 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예를 들면, 땅콩유, 콩유, 및 광유이다. 일반적으로, 글리콜, 예로서, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜은 특히 주사액용으로서 바람직한 액상 담체이다. 항체는 활성 성분의 지효성 방출을 허용하는 방식으로 제형화될 수 있는 소적 주사제 또는 임플란트 제제의 형태로 투여될 수 있다. 일례의 조성물은 50mM L-히스티딘, 150mM NaCl로 구성되고, pH가 HCl로 조정되어 있는 수성 완충액으로 제형화된, 5mg/mL의 모노클로날 항체를 포함한다.

전형적으로, 조성물은 액상 용액 또는 현탁액으로서의 주사제; 그 안의 액상 비히클도 주사 전에 제조될 수 있는 용액 또는 현탁액에 적절한 고형 형태로서 제조될 수 있다. 상기에 언급된 바와 같이, 제제는 또한 리포솜 또는 미세 입자, 예로서, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 또는 애주번트 효과를 증진시키기 위한 공중합체중 캡슐화되거나 유화 수 있다 [Langer, *Science* **249**: 1527, 1990 and Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* **28**: 97-119, 1997]. 본 발명의 제제는 항체는 활성 성분의 지효성 또는 박동성 방출을 허용하는 방식으로 제형화될 수 있는 소적 주사제 또는 임플란트 제제의 형태로 투여될 수 있다.

다른 투여 방식에 적절한 추가의 제형으로서는 경구, 비강, 및 폐용 제형, 좌제, 및 경피용 적용을 포함한다.

좌제용으로 결합제 및 담체는 예를 들면, 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세리드를 포함하고; 상기 좌제는 0.5% 내지 10%, 바람직하게, 1%-2%의 범위로 활성 성분을 포함하는 혼합물로부터 제조될 수 있다. 경구용 제제는 부형제, 예로서, 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산 마그네슘, 소듐 사카린, 셀룰로오스, 및 탄산마그네슘을 포함한다. 상기 조성물은 액제, 현탁제, 좌제, 환제, 캡슐제, 지효성 방출 제제 또는 분제의 형태를 취하고, 10%-95%, 바람직하게, 25%-70%의 활성 성분을 포함한다.

국소 적용을 통해 경피 또는 진피내 전달할 수 있다. 국소 투여는 콜레라 독소 또는 독소가 제거된 그의 유도체 또는 서브유닛 또는 다른 유사한 박테리아 독소와 상기 제제를 공투여함으로써 촉진될 수 있다 [Glenn et al., *Nature* **391**: 851, 1998]. 화학적 가교결합 또는 융합 단백질로서 발현에 의해 수득된, 연결된 분자 또는 혼합물로서의 성분을 사용하여 공투여할 수 있다.

다르게는, 피부용 패취 또는 트랜스퍼로솜을 사용하여 경피용으로 전달할 수 있다 ([Paul et al., *Eur. J. Immunol.* **25**: 3521-24, 1995]; [Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* **1368**: 201-15, 1998]).

미국 식품의약청의 모든 의약품제조 품질 관리기준(GMP)에 따라 제약 조성물은 일반적으로 멸균의 실질적으로 등장성인 것으로 제형화될 수 있다.

독성

바람직하게, 본원에 기술된 치료학적 유효량의 항체 조성물 또는 항체 세포독소 컨쥬게이트는 실질적으로 독성은 유발하지 않으면서 치료학적 효과를 제공할 것이다.

본원에 기술된 단백질의 독성은 세포 배양액 또는 실험용 동물에서의 표준 제약 방법에, 예로서, LD₅₀ (군집 50%에 대한 치사량) 또는 LD₁₀₀ (군집 100%에 대한 치사량)에 의해 측정할 수 있다. 독성 및 치료학적 효과 사이의 용량비가 치료학적 지수이다. 세포 배양액 측정법 및 동물 연구로부터 수득된 데이터를 사용하여 인간에 인간용으로서 비독성인 용량 범위로 제조할 수 있다. 본원에 기술된 단백질 용량은 바람직하게 독성이 거의 없거나 전혀 없이 유효량으로 포함하는 순환 농도 범위내 포함된다. 사용하는 제형 및 사용하는 투여 경로에 따라 용량은 상기 범위내에서 달라질 수 있다. 환자의 증상과 관련하여 개개 의사는 정확한 제제, 투여 경로 및 용량을 선택할 수 있다 (참조, 예로서, [Fingl et al., 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1]).

키트

본 발명의 조성물 (예로서, 항체 세포독소 컨쥬게이트, 모노클로날 항체, 인간 서열 항체, 인간 항체, 다중특이성 및 비특이성 분자) 및 사용 설명서를 포함하는 키트도 본 발명이 범주내 포함된다. 키트는 추가로 적어도 하나의 추가의 시약, 또는 본 발명의 하나 이상의 추가의 인간 항체 (예로서, 제 1 인간 항체와 상이한 항원내 에피토프에 결합하는 상보적인 활성을 갖는 인간 항체)를 포함할 수 있다. 키트는 전형적으로 키트의 내용물에 대해 의도하는 용도를 설명하는 라벨을 포함한다. 용어 라벨은 키트상에 또는 키트와 함께, 또는 다르게는 키트를 수반하는 임의의 문서, 또는 기록된 자료를 포함한다.

실시예

예시적인 실시태양

본원에 기술된 실험은 또한 [Lilo et al. *Chemistry & Biology* **11**:897, 2004] (본원에서 전체 내용이 참조로 인용된다)에서도 찾아볼 수 있다.

실시예 1

Pan 10의 발현 및 정제. 이. 콜라이 B834(DE3) (위스콘신주 매디손에 소재하는 노바겐(Novagen))을 플라스미드 pETflag-Pan 10으로 형질전환된 발현 숙주로서 선택하였다 [Mao et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 6953-6958, 1999]. 이. 콜라이 B834(DE3)/pETflag-Pan 10을 37°C 하에 100μM 카르베니실린 (일리노이주 마운트 프로스펙트에 소재하는 RPI 코퍼레이션)으로 보충된 SB 배지 (30% 펩톤, 20% 효모 추출물, 10% MOPS)에서 중간-대수증식기(mid-log phase)(OD₆₀₀ 0.65)까지 증식시켰다. 0.5mM IPTG (RPI 코퍼레이션)을 첨가함으로써 단백질 발현을 유도하였다. 37°C에서 추가의 1시간동안 26°C에서 15시간동안 배양액을 인큐베이션시켰다. 원심분리에 의해 4L의 IPTG-유도된 이. 콜라이 B834/pETflag-Pan 10 배양액을 수거하였다. 판매자의 지시에 따라 버그부스터(BugBuster) 단백질 추출 시약 (노바겐)을 사용하여 생성된 세포 펠렛을 분해하면서 상등액을 ~200mL (이지로드(EasyLoad), 매사추세츠주 베드포드에 소재하는 밀리포어로부터의 마스터플렉스(Masterflex))로 농축시켰다. 0.2μM 필터 (뉴욕주 로체스터에 소재하는 날겐(Nalgene))로 여과할 때, PBS (인산-완충처리된 염수)로 미리 평형화된 안티-플래그(Anti-Flag) M2 친화성 칼럼 (1.7x5, 미주리주 세인트루이스에 소재하는 시그마)상에 세포-유리 분해물 (~100mL) 또는 진한 상등액을 1mL/분 유속

으로 로딩하였다. 100mL의 PBS로 세척한 후, 플래그-태그된 Pan 10을 3mL/분의 유속으로 ~20mL의 글리신 완충액 (0.1M 글리신 pH 2.5)을 사용하여 칼럼으로부터 용출시켰다. 용출액을 ~1mL 1M 트리 베이스로 중화시켰다. 순도 수준은 SDS-PAGE (10% 비스-투리스, 캘리포니아주 허큘레스에 소재하는 바이오-래드(Bio-Rad))에 의해 평가하였다. 4L의 IPTG-유도된 이. 콜라이 B834(DE3)/pETflag-Pan 10 배양액은 일반적으로 3.5-5mg의 정제된 단백질을 제공하였고, 이중 60%는 세포 펠렛으로부터 유도되었다.

세포주. 인간 채장 샘암종 세포주 SW1990 (버지니아주 마나사스에 소재하는 ATCC)를 10% FCS (우태아 혈청)로 보충된 Leibovitz's L-15 배지에서 배양하였다. 성인 피부 (오레곤 포트랜드에 소재하는 캐스캐이드 바이오러지)로부터의 정상 인간 진피 섬유아세포 (HdFa)를 저혈청 성장 보충물로 보충된 배지 106에서 배양하였다.

전(whole)-세포 ELISA에 의한 SW1990-결합 측정법. SW1990 세포를 트립신화하고 PBS에서 10^6 세포/mL의 농도로 재현탁시켰다. $150\mu\text{L}$ 의 분취량을 96-웰 ELISA 플레이트 웰 (처리된 조직 배양액, 뉴욕주 캔톤에 소재하는 코닝 인코포레이티드(Corning Incorporated)로부터의 평편한 바닥)에 붓고 37°C에서 인큐베이션시켜 완전히 증발시켰다 (배지만을 포함하는 2열의 웰을 주목한다). 이어서, 플레이트를 PBS중 0.025% 트윈 20 (미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마)으로 4회에 걸쳐 세척하고, PBS중 1% BSA (시그마(Sigma)로부터의 우혈청 알부민)로 차단하고, 탈이온수로 1회에 걸쳐 세척하고 패트-건조(pat-dry)시켰다. 1% BSA/PBS중 일련의 희석된 Pan 10(0.1-0mg/mL, 유리 또는 컨쥬게이션된)을 $100\mu\text{L}$ 의 분취량으로 하여 플레이트에 가하였다. 세포-유리 열중 하나는 Pan 10과 함께 인큐베이션된 반면, 나머지 하나에는 Pan 10이 결여되어 있었다. 이어서, 플레이트를 1시간동안 37°C에서 인큐베이션시킨 후, 증류수로 10회에 걸쳐 세척하였다. 1% BSA/PBS중 $30\mu\text{L}$ 의 분취량의 M2 안티-플래그/HRP($1.1\mu\text{g/mL}$, 시그마)를 모든 웰에 가하고 플레이트를 인큐베이션시켰다. 최종적으로, 증류수로 철저히 세척한 후, TMB 및 H_2O_2 (일리노이주 로크포드에 소재하는 피어스 (Pierce))의 존재하에 플레이트를 현상하고 스펙트라 맥스(Spectra Max) 250 플레이트 판독기 (캘리포니아주 서니베일에 소재하는 몰레큘라 디바이스(Molecular Devices))를 사용하여 450nm에서 판독하였다.

Pan 10 돌연변이. 표준 PCR 기술을 사용하여 주형 pETflag-Pan 10상에서 부위 지정 돌연변이화에 의해 돌연변이체 Pan 10S73C 및 Pan 10S131C를 생성하였다. 돌연변이를 도입하기 위하여 사용하는 PCR 조건은 하기와 같았다: 95°C에서 10분동안 변성; 30회(cycle)의 증폭; 72°C에서 2분동안 신장; 95°C에서 30초동안 변성; 60°C에서 1분동안 어닐링 및 72°C에서 7분동안 연마. 2차 단계에서 돌연변이화된 유전자의 2개의 절반부(two halves)를 중첩시켰다 (온도 프로그램: 95°C에서 10분동안 변성; 20회의 증폭; 72°C에서 2분동안 신장; 95°C에서 30초동안 변성; 50°C에서 1분동안 어닐링 및 72°C에서 7분동안 연마). 최종적으로, 3차 단계에서 중첩 PCR 산물을 2개의 말단 프라미어를 사용하여 증폭시켰다 (온도 프로그램: 95°C에서 10분동안 변성; 30회의 증폭; 72°C에서 2분동안 신장; 95°C에서 30초동안 변성; 55°C에서 1분동안 어닐링 및 72°C에서 7분동안 연마). 증폭된 산물을 PCR 정제 키트 (퀴아젠)을 사용하여 정제하고 Sfil (매사추세츠주 비벌리에 소재하는 뉴잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs))로 분해하고 정제하고 Sfil-분해된 것에 결합시키고 (T4 DNA 리가제, 뉴잉글랜드 바이오랩스) pETflag를 정제하였다. Pan 10 돌연변이체의 서열은 말단-프라이머를 사용하여 전장 DNA 서열화 (캘리포니아주 라 줄라에 소재하는 더 프로테인 앤드 뉴클레오 엑시드 코어 퍼실리티 앳 더 스크립스 리서치 인스티튜트)에 의해 확인하였다.

Pan 10 티올화. 50mM 트리에탄올아민, 1mM EDTA 및 150mM NaCl, (pH 8.7)중 Pan 10 (4mg/mL)을 일정하게 교반하면서, 5시간동안 4°C에서 10배 화학량론적 과량의 트라우트(Traut) 시약 (피어스)의 존재하에 인큐베이션시켰다. 생성된 혼합물은 PD-10 칼럼 (뉴저지주 피팩크에 소재하는 파마시아((Pharmacia))을 사용하여 탈염화하고, 50mM Hepes pH 8로 용출시키고 원심분리 한외여과 (YM 10,000 필터, 밀리포어)에 의해 농축시켰다. 탈염화된 scFv 용액중 유리 티올 농도는 엘만(Ellman) 측정법에 의해 측정하였다.

엘만 측정법. ~30 μM 티올화된 scFv 또는 표준 디티오프레이톨 (DTT, 캘리포니아주 코스타 메사에 소재하는 ICN) 및 600mM 5,5'-디티오-비스-(2-니트로벤조산) (엘만 시약, 시그마)의 75% 메탄올 용액을 5분동안 13000rpm에서 원심분리하였다. 상등액을 96-웰 ELISA 플레이트 (온타리오주 오타와에 소재하는 피셔(Fisher))로 이동시키고 스펙트라 맥스 25 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이스)에서 Abs_{412} 를 판독하였다. 공지된 DTT 농도 대 상응하는 Abs_{412} 를 플롯팅하여 수득한 표준 곡선으로부터 유리 티올의 농도는 외삽시켰다.

듀오카르마이신 SA의 유사체의 합성 (참조, 도 5 (하기 괄호내의 모든 번호는 도 5를 언급한다)). 사용하는 모든 화학물질은 알드리치(Aldrich) (미주리주 세인트 루이스에 소재)로부터 구입하였다. 3-(5-아세틸인돌-2-카르보닐)-1-(S)-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤즈[e]인돌 (1)의 합성은 앞서 보고된바 있다 [Parrish et al., *Bioorg Med Chem*, 11: 3815-3838, 2003]. Boc-보호된 3-[5-(1-(3-아미노프로필)인돌-2-카르보닐)아미노인돌-2-카르보닐]-1-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤즈[e]인돌 (10)의 합성은 하기와 같다:

메틸 1-(3-(프탈이미도프로필)인돌-2-카르복실레이트 (5). 디메틸포름아미드 (31mL)중 메틸 인돌-2-카르복실레이트 (550mg, 3.14mmol) 용액을 0℃에서 수소화나트륨(광유중 60% 현탁액, 167mg, 4.18mmol)으로 처리하고 30분에 걸쳐 25℃에서 가온시킬 수 있었다. 반응 혼합물을 0℃으로 냉각시키고 N-(3-브로모프로필)프탈이미드(1.26g, 4.71mmol)로 처리하였다. 냉각시키기 전에 혼합물을 30분에 걸쳐 25℃에서 가온시키고 30분동안 55℃에 가온시킬 수 있고, H₂O (30mL)를 첨가하여 종결시켰다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(2x40mL)로 추출하고, 혼합된 유기층을 물(40mL)로 세척하고 건조시키고(Na₂SO₄) 진공에서 농축시켰다. 플래쉬 크로마토그래피(실리카겔, 0-50% 에틸 아세테이트/헥산)를 통해 62% 수득율로 **5**를 수득하였다.

메틸 1-[3-(t-부틸옥시카르보닐)아미노프로필]인돌-2-카르복실레이트 (6). 에탄올(14mL)중 **5**(500mg, 1.39mmol)의 현탁액을 히드라진(200μL, 4.14mmol)으로 처리하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 1시간동안 교반한 후, 진공에서 농축시키기 전에 3시간에 걸쳐 25℃으로 가온시킬 수 있었다. 클로로포름(10mL)에 용해된 잔류물을 t-부톡시카르보닐 안하이드라이드(602mg, 2.76mmol) 및 포화된 수성 탄산나트륨(10mL)으로 처리하였다. 클로로포름(3x100mL)으로 추출하기 전에 반응 혼합물을 12시간동안 25℃에서 교반하였다. 혼합된 유기층을 건조시키고(Na₂SO₄), 진공하에 농축시켰다. 플래쉬 크로마토그래피(실리카겔, 10-30% 에틸 아세테이트/헥산)를 통해 91%의 수득율로 **6**를 수득하였다.

에틸 5-(1-(3-[N-(t-부틸옥시카르보닐)아미노]프로필)인돌-2-카르보닐)-아미노인돌-2-카르복실레이트 (8). 10mL의 디옥산/H₂(4:1)중 **6**(332mg, 1.0mmol) 용액을 4N LiOH(1mL)으로 처리하고 혼합물을 15시간동안 25℃에서 교반하였다. 1N 수성 HCl(10mL)을 가하고 혼합물을 에틸 아세테이트(3x50mL)로 추출하였다. 혼합된 유기층을 건조시키고(Na₂SO₄), 진공하에 농축시켜 92%의 수득율로 **7**를 수득하였다.

디메틸포름아미드(4mL)중 **7**(63.6mg, 0.2mmol) 및 에틸 5-아미노인돌-2-카르복실레이트(61.3mg, 0.3mmol) 용액을 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보다이미드 히드로클로라이드(115mg, 0.6mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 18시간동안 25℃에서 교반하고 15% 수성 시트르산(10mL)을 가하여 종결시켰다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(75mL 및 2x5mL)로 추출하고, 혼합된 유기층을 포화 수성 NaCl(3x10mL)로 세척하고, 건조시키고(Na₂SO₄), 진공하에 농축시켰다. 플래쉬 크로마토그래피(실리카겔, 33% 에틸 아세테이트/헥산)를 통해 52%의 수득율로 **8**를 수득하였다.

5-(1-(3-[N-(t-부틸옥시카르보닐)아미노]프로필)인돌-2-카르보닐)인돌-2-카르복실산 (9). 2mL 디옥산/H₂(4:1)중 **8** (50.5mg, 0.1mmol) 용액을 4N LiOH(200μL)으로 처리하고 혼합물을 18시간동안 25℃에서 교반하였다. 0.5N 수성 HCl (5mL)을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트(2x30mL)로 추출하였다. 혼합된 유기층을 건조시키고(Na₂SO₄) 진공하에 농축시켰다. 테트라히드로푸란/헥산으로부터 결정화하여 92%의 수득율로 **9**를 수득하였다.

3-[5-(1-(3-[N-(t-부틸옥시카르보닐)아미노]프로필)인돌-2-카르보닐)아미노인돌-2-카르보닐]-1-(클로로메틸)-5-히드록시-1,2-디히드로-3H-벤즈[e]인돌 (10). N₂의 기류하에 용매를 제거하기 앞서 10mL의 4N HCl(에틸 아세테이트)중 (-)-seco-N-Boc-CBI(25mg, 75μmol, 자연발생된 에난티오머) 용액을 교반하였다 [Boger et al., *J Org Chem*, **55**: 5823-5832, 1990]. 3시간동안 높은 진공하에서 잔류물을 건조시키고 **9**(39.5mg, 83μmol)를 가하였다. 디메틸포름아미드(2mL)중 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보다이미드 히드로클로라이드(43mg, 225μmol)의 용액을 가하고 반응 혼합물을 진공하에 농축시키기 전에 반응 혼합물을 14시간동안 25℃에서 교반하였다. 플래쉬 크로마토그래피(실리카겔, 20% 테트라히드로푸란/헥산)를 통해 44%의 수득율로 **10**를 수득하였다.

3의 합성. 0.2mL의 디메틸포름아미드중 **1**(3.0mg, 7.2μmol), 말레이미도프로피온산 하이드라이드 테트라히드로푸란 염 (6mg, 20μmol), 테트라히드로푸란(1μL) 및 파쇄된(crushed) 3Å 분자 시브 혼합물을 밤새도록 교반하였다. 용매를 증발시킬 때, 잔류물을 디클로로메탄에 용해시키고 실리카겔 박층 크로마토그래피에 의해 정제하였다. **3**을 47% 수득율로 수득하였다.

4의 합성. 화합물 **10**(5mg, 7.2μmol)을 30분동안 디클로로메탄중 50% 트리플루오로아세트산으로 처리하였다. 트리플루오로아세트산을 증발시킬 때, 조 유리 아민을 0.1mL 디메틸포름아미드에 용해시키고 말레이미도프로피온산(2.0mg, 12μmol), O-벤조트리아졸-1-일-N, N, N', N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로-포스페이트(4.2mg, 11mmol) 및 N-메틸모르폴린(3.2μL, 29μmol)을 포함하는 디메틸포름아미드 용액에 가하였다. 혼합물을 2시간동안 교반하고 용매를 증발시켰다. 잔류물을 실리카겔 박층 크로마토그래피에 의해 정제하였다. **4**를 57% 수득율로 수득하였다.

티올화된 Pan 10의 컨쥬게이션. DMSO중 3x1 μ l 분취량의 20mM 형광물질 말레이미드(오레곤주 유진에 소재하는 몰레큘라 프로브(Molecular Probes)), **3** 또는 **4**를 2분 간격으로 50 μ l의 Pan 10(50mM Hepes중 ~4mg/mL)에 가하였다. 생성된 반응 혼합물을 4℃에서 10시간동안 진탕기에서 인큐베이션시켰다. 유리 염료 또는 유리 약물을 크기 배제 크로마토그래피 (PD-10 칼럼, 파마시아)에 의해 컨쥬게이션된 Pan 10 및 유리 Pan 10의 혼합물로부터 분리하였다. 형광물질에 대한 Pan 10의 컨쥬게이션 수득율(%)은 탈염화된 혼합물의 Abs_{492nm} 및 Abs_{280nm}(울트라스펙 2000, 파마시아)을 하기 식 1으로 피팅함으로써 산출하였다:

$$((\text{Abs}_{492}/59880^a \times 100)/((\text{Abs}_{280} - (0.2 \times \text{Abs}_{492})/1.35^b)/\text{scFv-FM MW}))$$

^a: ϵ_{492} 는 형광물질-말레이미드에 대하여 실험적으로 결정되고,

^b: ϵ_{280} 은 전형적으로 IgG에 대하여 적용된다.

약물 컨쥬게이션 단계 후 잔류 유리 scFv의 양을 산출함으로써 scFv에 대한 **3** 또는 **4**의 비를 간접적으로 측정하였다. Pan 10-약물 컨쥬게이트 및 유리 Pan 10의 혼합물은 형광물질-말레이미드와 반응하였고 형광물질-Pan 10의 양 (상기 기술된 바와 같이 측정)은 약물에 결합하지 않는 Pan 10의 전체량과 일치하는 것으로 가정하였다. **3** 또는 **4**에 대한 Pan 10 컨쥬게이션의 수율(%)은 형광물질의 말레이미드 유도체에 scFv-약물 + 유리 scFv를 컨쥬게이션시킨 후 수득한 탈염 혼합물의 Abs_{492nm} 및 Abs_{280nm}을 식 2로 피팅하여 산출하였다:

$$100 - ((\text{Abs}_{492}/59000^a \times 100)/((\text{Abs}_{280} - (0.2 \times \text{Abs}_{492})/1.35^b)/\text{scFv-FM MW}))$$

질량 분광법. 매트릭스 보조된 레이저 탈착/이온화 질량 분광법 (MALDI-MS)을 보이저 DE 바이오스펙트로메트리 워크스테이션 (Voyager DE Biospectrometry Workstation) (매사추세츠주 프레이밍햄에 소재하는 퍼셉티브 바이오시스템 (PerSeptive Biosystems))상에서 매트릭스로서 시나핀산 (시그마) 및 질소 레이저(337nm)를 사용하여 선형 방식으로 실시하였다. 매트릭스 용액은 아세토니트릴 및 0.1% 수성 트리플루오로아세트산의 1:1 혼합물에서 포화 용액으로서 날마다 새롭게 제조하였다. 탈염화된 단백질 용액 1:10을 매트릭스로 희석하고 스테인리스 스틸 MALDI 표적 웰상에 직접 0.7 μ l의 생성된 현탁액을 증착시킴으로써 MALDI-MS 분석용으로서 샘플을 제조하였다. 말 시토크롬 C 및 래빗 근육 알도라제 (시그마)를 사용하여 2 지점 외부 보정을 통해 수득한 매스를 보정하였다. 모든 스펙트럼은 140-ns 지연 추출로 양이온 방식에 의해 수집하고 대략 50 레이저 샷에 대하여 요약하였다.

원-포트 항체 컨쥬게이션. 50mM 트리에탄올아민, 1mM EDTA 및 150mM NaCl, (pH 8.7)중 Pan 10(4mg/mL)을 일정하게 교반하면서, 8시간동안 4℃에서 10배 화학량론적 과량의 트라우트 시약 (피어스) 및 동량의 형광물질 말레이미드 (몰레큘라 프로브), **3** 또는 **4**의 존재하에 인큐베이션시켰다. 생성된 혼합물은 PD-10 칼럼을 사용하여 탈염화하고, PBS로 용출시키고 원심분리 한외여과(YM 10,000 필터, 밀리포어)에 의해 ~4mg/mL로 농축시켰다.

공초점 현미경법. SW1990 또는 HdFa 세포를 트립신화하고, PBS에 재현탁시키고 계수하였다. 10⁴-10⁵개의 세포를 챔버 슬라이드 (일리노이주 네이퍼빌에 소재하는 닌크(Nunc))의 웰에 시딩하고 37℃에서 24시간동안 부착시켰다. 배지(500 μ l/웰)를 교환할 때, 10 μ l의 ~3mg/mL 진한 Pan 10-형광물질 또는 92H2-형광물질 (음성 대조군)을 가하고 세포를 30분, 1, 2 또는 3시간동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 그의 각각의 배지로 10회에 걸쳐 세척하고 PBS로 1회 세척한 후, 고정시키고 5분동안 95% 에탄올로 투과시키고, PBS로 1회 세척한 후, 프로피디움 요오드 (시그마, PBS중 1:50으로 희석)를 사용하여 1분동안 염색하고, PBS로 5회에 걸쳐 세척하고 안티페이드 용액 (슬로우 페이드(Slow Fade), 몰레큘라 프로브) 첨가시 커버슬립으로 봉인하였다. 레이저 스캐닝 공초점 현미경 (MRC1024, 바이오-래드)을 사용하여 슬라이드를 관찰하였다.

FACS 분석. SW1990 또는 HdFa 세포를 트립신화하고, 냉 PBS로 세척하고 분취하였다 (~5x10⁵개 세포/튜브). 이어서, 1차 항체 (W6/32, 콜로라도주 리틀톤에 소재하는 노부스 바이오로지칼스(Novus Biologicals); P1B5, 캘리포니아주 테메큘라에 소재하는 케미콘(Chemicon); 또는 P5D2, 케미콘)를 가하고 (최종 농도 10 μ g/mL) 얼음상에서 45분동안 인큐베이션

선시켰다. 이어서, 세포를 냉 PBS로 세척하고 얼음상에서 45분동안 FITC-표지된 염소 항-마우스 Ab (일리노이주 로크포드에 소재하는 피어스)의 존재하에 인큐베이션시켰다. 최종적으로 냉 PBS로 세척한 후, PI 카운터 염색하고 분석하였다 (FACScan, 뉴저지주 플랭클린 레이트에 소재하는 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)).

도립 현미경법. SW1990 세포를 트립신화하고, PBS에 재현탁시키고 계수하였다. $500\mu\text{l}$ 의 성장 배지중 10^4 - 10^5 개의 세포를 챔버 슬라이드 (넉크)의 웰에 시딩하고 37°C 에서 24시간동안 부착시켰다. 400nM 의 Pan 10-3, Pan 10-4, Pan 10-FM 또는 wt-Pan 10를 포함하는 배지를 사용하여 오래된 배지를 대체하였다. 이어서, 세포를 7일동안 매일 도립 현미경 (뉴욕주 톰우드 소재하는 자이스 임(Zeiss Imm))을 사용하여 관찰하였다.

세포 증식 측정법. scFv-약물 또는 유리 약물의 세포독성은 비브란트(Vybrant) MTT 세포 증식 측정법 키트 (몰레cula 프로브)를 사용하여 측정하였다. $300\mu\text{l}$ 의 페놀-유리 성장 배지중 2×10^4 SW1990(HdFa) 세포/웰을 포함하는 48-웰 마이크로티터 플레이트를 사용하여 측정법을 실시하였다. 세포는 12시간동안 웰에 부착될 수 있었다. IC_{50} 측정을 위해 세포를 다양한 농도의 Pan 10-약물 컨쥬게이트, 말레이미드 유도체 또는 유리 약물과 함께 37°C 에서 3 또는 12시간동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 컨쥬게이트/약물-유리 배지에서 인큐베이션을 계속 실시하고 마지막 7일째되는 날 MTT 측정법을 실시하였다. 배지를 1.2mM MTT를 포함하는 $100\mu\text{l}$ 의 새로운 배지로 대체하고 계속하여 3시간 더 인큐베이션시켰다. 이어서, SDS(100mg/mL)를 포함하는 10mM 의 HCl 용액 $100\mu\text{l}$ 을 첨가하여 세포를 분해하였다. 세포 분해는 8시간동안 진행시켰고 상기 기간의 종결시 3분동안 3000rpm 에서 플레이트를 원심분리하고 상등액을 96-웰 플레이트로 이동시키고 570nm 에서 판독하였다. 각각의 측정법은 유리 Pan 10로 처리된 음성 대조군 세포 및 존재하지 않는 양성 대조군 세포를 포함한다. 모든 측정법은 적어도 2회에 걸쳐 실시하였다. 다양한 농도의 세포독성제를 사용하여 한 세트당 8개의 지점을 관찰하였다. IC_{50} 값을 얻기 위해 각 세트로부터의 데이터 지점을 Grafit5 (Leatherbarrow R. J. 2003. Grafit version 5.08, Erithieus Software Ltd, Staines, England)을 사용하여 식 3에 의해 정의된 S자형의 투여량-반응 곡선에 피팅하였다

$$y^a = \text{최소 } y + [(\text{최대 } y - \text{최소 } y) / (1 + (\text{IC}_{50}/x^b)^{\text{기울기}})]$$

$^a y$ = 간 세포의 %

$^b x$ = 약물 (약물-scF) 농도

이상점(outlier)인 데이터 지점 (전형적으로 실험당 1-2개)는 폐기하였다.

실시예 2

Pan 10 발현, 정제 및 부위 지정 돌연변이화

악성 암 세포로 듀오카르마이신 유사체를 전달하기 위한 도구로서의 Pan 10인 파지-유리 Pan 10은 $27,868\text{kDa}$ (표 1)의 scFv로서 발현되었고 동질로 정제되었다 (도 2, 라인 4). 전형적인 V_L 및 V_H 영역은 각각 매립형(buried) 단일 디설파이드 결합은 갖지만, 유리 시스템은 갖지 않기 때문에, 본 발명자는 Pan 10의 표면에 이용가능한 유리 티올기를 이용할 수 있도록 하고 말레이미드-유도화된 약물에 개질된 scFv를 컨쥬게이션시키기 위한 의도로 수개의 전략법을 연구하였다 [Padlan, *In Molecular Biology Intelligence Unit: Antibody-Antigen complexes* (Austin, TX, Landes, R. G.), 17-30, 1994].

[표 1]
질량 분광법 분석 결과

분석물	산출된 MW(g/mol)	실험상의 질량(m/z)	몰비 ^a (Pan 10:FM/약물-말레이미드)
Pan 10	27610	27868	-
Pan 10-FM	28216	28388	0.997
Pan 10-3	28297	28634	1.003

Pan 10-4	28456	28545	0.994
^a MR로부터의 측정치 = $MW_{\text{컨쥬게이트}} - MW_{\text{Pan 10}} / MW_{\text{FM/약물-말레이미드}}$ MALDI-MWs 측정치를 사용			

초기 접근법은 부위 지정 돌연변이화에 의해 야생형 Pan 10서열로 혼입된 시스테인을 사용하는 단일 부위-특이성 컨쥬게이션을 목적으로 하였다. scFv 결합 친화성을 보존하기 위한 시도로, 시스테인 잔기를 먼저 Pan 10의 링커 부위내로 도입하였다. 추가로, 상업적으로 이용가능한 말레이미드-유도화된 형광물질 (FM)을 컨쥬게이션 프로토콜을 최적화하고 측량화하는 민감성 시약으로서 사용하였다. 링커 잔기 S131, G130, G128 또는 G127중 임의의 어느 하나가 시스테인으로 돌연변이될 때 FM을 갖는 돌연변이체의 컨쥬게이션의 효능은 단지 야생형 Pan 10과 유사하고, 이는 Pan 10 구조내 격리되는 링커 부위 및 시스테인 잔기에 기인한다고 볼 수 있다. Pan 10의 WAM(Web Antibody Modeling c/o University of Bath At Swindon, Oakfield Campus, Marlowe Avenue, Walcot Swindon Wilts, LJK) 이론적인 구조에 따라 표면이 노출되어 있는 수개의 다른 잔기를 선택하였다. Pan 10의 중양 세포 결합 및 Pan 10의 내재화 능력을 보존하기 위하여 단지 프레임워크 잔기만을 고려하였다.

더 많은 노출 잔기 S73 또는 S197이 돌연변이화될수록 링커 잔기의 접근성에 기인한 가능성은 개선될 때 FM 컨쥬게이션은 개선되었다. 달성된 컨쥬게이션 효율은 최대 68%이었다.

scFv Pan 10의 화학적 개질. 부위 지정 돌연변이화에 의해 유리 시스테인의 삽입은 수개의 난점을 제시한다: 돌연변이된 잔기가 용매 접근성을 가질 경우, 산화되기 쉽거나 이량체화를 유도하기 쉽고, 추가의 환원-정제 단계, 이후 불활성 대기 하에서 수행되어야 하는 반응을 요구할 것이다. [Yang et al., *Protein Eng*, 16, 761-770, 2003]. Pan 10상의 티올기의 화학적 첨가가 대신 연구되었다.

초기에는, 말레이미드-유도화된 분자의 티올화 및 컨쥬게이션이 2개의 분리된 단계로 실시되었다: Pan 10을 리신 잔기와 반응하는 아민 소거제, 2-이미노티올란 (트라우트 시약)과 반응시켜 유리 티올기를 도입하였다. Pan 10 서열내 12개의 리신이 존재할 경우, 대용량의 잠재적 유해한 개질을 일으킬 수 있는 가능성을 갖는다. 그러나, 10개의 리신은 프레임워크 부위에 존재하기 때문에 이러한 개질은 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 에 대한 Pan 10 결합에 영향을 줄 가능성은 없을 것이다. 전-세포 ELISA (효소면역측정법)를 통해 야생형 Pan 10 및 티올화된 Pan 10의 결합은 실질적으로 구별할 수 없다는 것이 밝혀졌다. 티올화된 Pan 10의 비-환원성 SDS-PAGE (소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동) 분석 (도 2)을 통해 약물 컨쥬게이션에 이용가능한 유리 티올 갯수를 점진적으로 감소시키는 이량체 및 고급 중합체의 시간에 의존적인 형성이 밝혀졌다 (도 2A, 라인 2). 이러한 문제를 해소하기 위해, 커플링 효능을 개선시키고 이량체화는 감소시킴으로써, 티올화한 후 즉시, 이후의 약물 컨쥬게이션 단계를 실시하였다. 티올화 및 컨쥬게이션이 원-포트로 진행되는 1단계 방법을 사용할 때 추가로 개선된 점이 관찰되었다. 상기 방법을 사용하여 개질된 Pan 10의 SDS-PAGE 분석을 통해 단지 극소수의 이량체가 형성된 것이 밝혀졌다 (도 2A, 라인 3). 다른 scFvs도 상기 방법을 사용할 수 있다.

말레이미드-유도화된 약물. 말레이미드 부위를 산-불안정성 히드라존 결합을 통해 듀오카르마이신 SA 유사체 1에 결합시켜 말레이미드 유도체 3 (도 1)을 수득하였다. 히드라존 결합 방법은 pH 값이 세포질보다 약간 낮은 (pH = 5.0-5.5) 리포솜으로 내재화될 때 세포독성 약물의 방출을 조절하는 방식으로 항체-약물 컨쥬게이트에서 널리 이용되고 있다 [Kaneko et al., *Bioconjug Chem*, 2: 133-141, 1991]. 이 전략법은 브리스톨-마이어스 스쿼브(Bristol-Myers Squibb)에 의한 BR96-DOX의 개발 및 와이어스(Wyeth)에 의한 마이로타그(MyloTag) 디자인과 같은 다수의 경우에서 임상적으로 유효한 것으로 입증되었다. 비교로서, 본 발명자는 pH에 영향을 받지 않는 아미드 결합 연결을 통해 듀오카르마이신 유사체 2를 유도화시켜 말레이미드 유도체 4를 생산하였다 (도 1).

말레이미드-유도화된 분자와의 Pan 10 컨쥬게이션. 상기 언급한 바와 같이, 책장암 세포에 의한 내재화를 시험하고 직접 가시화하기 위하여 초기에 티올화된 Pan 10을 FM과 컨쥬게이션시켜 Pan 10-FM을 형성하였다. 이후, 티올화된 Pan 10을 말레이미드 유도체 3 및 4와 컨쥬게이션시켜 각각 컨쥬게이트 Pan 10-3 및 Pan 10-4를 수득하였다. Pan 10에 대한 형광물질 (UV/Vis 분광법 및 매트릭스 보조된 레이저 탈착/이온화 질량 분광법 (MALDI-MS)에 의해 측정된 컨쥬게이션 효율), 3 또는 4 (MALDI-MS에 의해 측정된 컨쥬게이션 효율)의 비는 본 발명자의 2 단계 커플링 방법을 사용하여 대략 1:1인 것으로 밝혀졌다 (표 1). 컨쥬게이션 및 티올화를 단일 단계로 실시할 때 형광물질 대 Pan 10의 비는 2:1 (단지 UV/Vis 분광법으로만 측정된 컨쥬게이션 효율)이었다. 컨쥬게이션 효율상의 차이는 가능하게는 티올-소광성 소분자의 부재 하에 티올화된 Pan 10의 중합체화에 기인한다. 실제로, 수개의 추가적인 고분자 종이 2개의 분리된 단계에서 수득된 Pan 10-약물 컨쥬게이트의 SDS-PAGE (도 2) 및 크기 배제 크로마토그래피에 의해 검출되었다.

원-포트 scFv 컨쥬게이션 방법을 다른 scFvs ($\alpha_v\beta_3$ 특이성 항체 Bc-12 및 Bc-15 [Felding-Habermann et al. 공개용으로 제출된 원고] 및 코카인-특이성 항체 92H2) (데이타는 나타내지 않음)에 대하여 시험하여 항원-결합 활성의 손실없이 형광물질:단백질의 최대비로서 3:1을 수득하였다 [Redwan et al., *Biotechnol Bioeng*, **82**: 612-618, 2003]. 상기 컨쥬게이션 방법은 scFv의 광범위한 어레이에 적용시킬 수 있다.

Pan 10 컨쥬게이트의 생물학적 활성. 본 Pan 10 컨쥬게이트의 생물학적 활성은 연구하기 위하여 수개의 방법을 사용하였다. 공초점 현미경 분석법을 사용하여 Pan 10-FM과 SW1990 세포 대 정상 인간 진피 섬유아세포주 (HdFa)의 상호작용에 대한 특이성을 조사하였다. 본 결과를 통해 Pan 10-FM은 시간에 의존하는 방식으로 SW1990 세포에 의해 내재화된다는 것이 밝혀졌다 (도 3). 또한, 2시간동안 인큐베이션시킨 후, 이들 양성 세포에서의 내재화는 비양성 HdFa에서보다 더욱 더 뚜렷하였다. 이러한 발견을 통해 Pan 10-FM 컨쥬게이트는 Pan 10의 야생형 활성을 보유한다는 것을 확인하게 되었고, 비양성 세포 타입에 대한 모델로서 사용되는 HdFa에 비해 췌장암 세포에서는 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 의 과다발현이 일부 특이성을 허용한다는 것이 입증되었다.

세포 생육성에 대한 약물 컨쥬게이트의 효과를 측정적으로 측정하기 위하여 Pan 10, Pan 10-FM, Pan 10-3 또는 Pan 10-4로 처리한 SW1990 세포를 도립 현미경으로 관찰하였다. 7일간의 배양 후, Pan 10 또는 Pan 10-FM으로 처리한 세포는 건강한 콜로니로 확장된 반면, Pan 10-약물 컨쥬게이트로 처리된 세포는 죽거나, 진행성 아포프토시스를 나타내는 과도한 공포 형성을 나타내었다 (도 4). 이어서, 유리 약물의 독성과의 비교에서 Pan 10-약물 컨쥬게이트의 세포독성 효능을 MTT (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 세포-증식 측정법에 의해 측정하였다 ([Liu et al., *J Neurochem*, **69**: 581-593, 1997]; [Berridge et al., *Arch Biochem Biophys*, **303**: 474-482, 1993]; [Vistica et al., *Cancer Res*, **51**: 2515-2520, 1991]). SW1990 췌장 암종 세포를 시딩하고 밤새도록 성장 배지에서 부착시켰다. 이어서, 유리 약물 또는 Pan 10-약물 컨쥬게이트의 농도를 증가시키면서 3 또는 12시간동안 배양액을 처리하였다.

7일 후, 특히, 12시간의 약물 노출시간 후에 생육성 세포의 갯수가 Pan 10-약물 컨쥬게이트의 뚜렷한 세포증식억제/세포독성 효과를 나타내었다 (표 2). 유리 약물에 대하여 측정된 IC_{50} (억제 농도 50%) 값은 앞서 수득한 값 (**2** = 30pM 및 **1** =

2pM [**2**에 대해 수득됨])보다 10^2 내지 10^3 배 (two to three orders of magnitude) 높았다 [Parrish et al., *Bioorg Med Chem*, **11**: 3815-3838, 2003]. 이러한 불일치는 사용하는 세포주의 차이, 약물 노출의 지속 시간, 및 선택된 세포독성 측정법에 기인한다고 볼 수 있다. 본 연구에서, 유리 약물은 특히 단시간동안의 노출 후, 상응하는 Pan 10-약물 컨쥬게이트에 비하여 더욱 효능이 있는 세포독성 효과를 나타내었다. 이러한 효과는 가능하게 혈장 및 핵막을 통한 융합시에 DNA가 작용하는 부위인 핵내에서 유리 약물의 이용성이 더욱 즉각적이기 때문일 것이다. 추가로, 이러한 증거는 유리 약물 및 Pan 10-약물 컨쥬게이트 사이의 효능의 차이는 인큐베이션 시간을 연장할 경우 현저히 감소된다는 관찰에서부터 유래한다. 12시간의 인큐베이션 기간 후에는 Pan 10-4 컨쥬게이트가 유리 화합물 **2**만큼 효능이 있었다.

【표 2】
SW1990에 대한 MTT 측정법 결과

세포		
세포독성제	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM) ^d
1	1.4 ± 0.2^b	0.43 ± 0.17
Pan 10-3 (1:1) ^a	94.3 ± 3.6^c	2.7 ± 0.3
Pan 10-3 (1:2) ^a	251.3 ± 75.8^b	22.6 ± 3.8
2	32.1 ± 13.1^b	4.3 ± 0.2
Pan 10-4 (1:1) ^a	97.9 ± 38.6^c	4.4 ± 0.7
Pan 10-4 (1:2) ^a	1528 ± 369.4^b	180.8 ± 30.6

^a scFv 대 약물 비
^b 3시간동안 약물과 함께 인큐베이션된 실험 4개의 평균
^c 3시간동안 약물과 함께 인큐베이션된 실험 2개의 평균
^d 12시간동안 약물과 함께 인큐베이션된 실험 2개의 평균

Pan 10-3 (scFv:약물 = 1:1)은 Pan 10-4 (scFv:약물 = 1:1)과 유사한 세포독성을 나타내었다. scFv 분자당 2개의 약물 분자를 수반하는 컨쥬게이트에 대하여 관찰되어진 낮은 세포독성과 함께, 상기의 결과는 히드라존 결합을 통해 약물을 유도화하는 것이 이롭지 않음을 제시한다. 또한, 상기 결과는 Pan 10 컨쥬게이트의 세포내이입의 기작은 낮은 pH 환경으로의 전달을 포함할 수 없다는 것과 세포 내재화시 약물은 완전한 Pan 10에 또는 Pan 10의 세포내 단백질분해로부터 유래된 펩티드에 연결된 상태로 남아있다는 것을 암시한다. scFv 및 약물 사이에 사용되는 사슬 (tether)은 DNA 표적과의 상호작용을 위해 세포독성의 보존을 위해 충분히 가능하게 길기 때문에 상기 가정적 컴플렉스의 잔여분의 활성은 놀라운 것이 아니다. 실제로, 특히, 세포 내재화 기작과 관련하여 세포독성 작용을 위해서 scFv/scFv-유도된 펩티드로부터의 약물 방출을 요구하지 않는 컨쥬게이트가 유리할 수 있다. 이러한 방식으로, 유리 약물과 비교되는 scFv/펩티드-약물은 저하된 수동 (확산) 및 능동 유입 과정을 통해 세포내로 더욱 효과적으로 포착될 수 있다. 전반적으로, 본 기작을 통해 고농도의 세포내 약물이 시간에 의존하여 축적될 것이며, 이로써, 유효한 암 세포 사멸, 우수한 치료 지수 및 수득한 약물 내성에 대한 가능성 감소와 같은 효능을 제공한다.

최종적으로, 정상 HdFa 세포에서 Pan 10-3 및 Pan 10-4 컨쥬게이트를 시험할 때 세포독성은 SW1990 암 세포에 대한 것보다 각각 IC_{50} 가 ~3 및 5-배 높게 관찰된 반면, 유리 1은 세포주 둘 모두에 대하여 대략적으로 동일한 IC_{50} 를 나타내었다. HdFa 세포와 비교되는 SW1990 세포상의 α_3 인테그린 발현 수준이 5배 높다는 것을 나타내는 FACS (형광-활성화된 세포 선별)에 의한 측정과 결과 사이에는 관련성을 가질 수 있다.

실시예 3

유리 티올을 포함하는 화학적으로 개질된 항-인테그린 $\alpha_3\beta_1$ scFv Pan 10은 효능이 있는 세포독성제 듀오카르마이신 SA의 말레이미드-유도화된 유사체와 컨쥬게이션될 수 있다. 항체 Pan 10 컨쥬게이트는 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 을 발현시키는 세포를 투과할 수 있는 능력을 보존한다. 특히, Pan 10-약물 컨쥬게이트는 시험관내에서 췌장 암종 세포에 대하여 우수한 세포독성 효능을 나타낸다. 극도로 효능이 있지만 임상적으로는 실현불가능한 항암제인 본원에 기술된 유리 약물과 비교시 scFv 컨쥬게이트의 독특한 잇점을 고려할 때, 본 1차 단계는 중요하다. 본 컨쥬게이트는 인테그린 $\alpha_3\beta_1$ 을 과다발현시키는 암 세포 내부로 더욱 특이적으로 본 약물 분자를 전달할 수 있고 항체 약물 컨쥬게이트의 유효한 전달을 통해 치료학적 약물의 노출을 감소시키고 효능을 증진시킬 수 있어야 한다. 본 전략법을 사용하여, 실험은 암 치료에서 scFv-약물 디자인에 대하여 효능이 있다는 것을 상세히 설명할 것이다.

각각의 개별 출원공개 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 모든 목적을 위해 참조로서 인용된다고 언급되는 바와 같이, 본 명세서에서 인용하고 있는 모든 출원공개 및 특허 출원은 본원에서 모든 목적을 위해 전체적으로 참조로서 인용된다.

본 발명은 분명한 이해를 목적으로 설명 및 예시를 통해 일부 상세히 기술되었지만, 본 발명의 교시와 관련하여 본 청구범위의 정신 또는 범주를 벗어하지 않으면서 특정하게 변형 및 개질될 수 있다는 것을 본 분야의 당업자는 용이하게 이해할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1 듀오카르마이신 SA, CBI 인돌 유사체 및 말레이미드 유도체.

도 2A-2B 정제된 Pan 10 및 Pan 10 컨쥬게이트의 SDS-PAGE. 라인 1: 인비트로젠(Invitrogen) 염색전 마커; 라인 2: 유리 티올화 및 컨쥬게이션 후의 Pan 10; 라인 3: 원 포트(one-pot) 티올화 및 컨쥬게이션 후의 Pan 10; 라인 4: 비개질된 Pan 10.

밴드 밀도 분석 (알파이지FC 스탠드얼론 소프트웨어(AlphaEaseFC StandAlone Software)). 음영 박스(shaded box)는 각 라인에서 단량체 scFv에 상응하는 밴드에 상대적인 데이터를 포함한다.

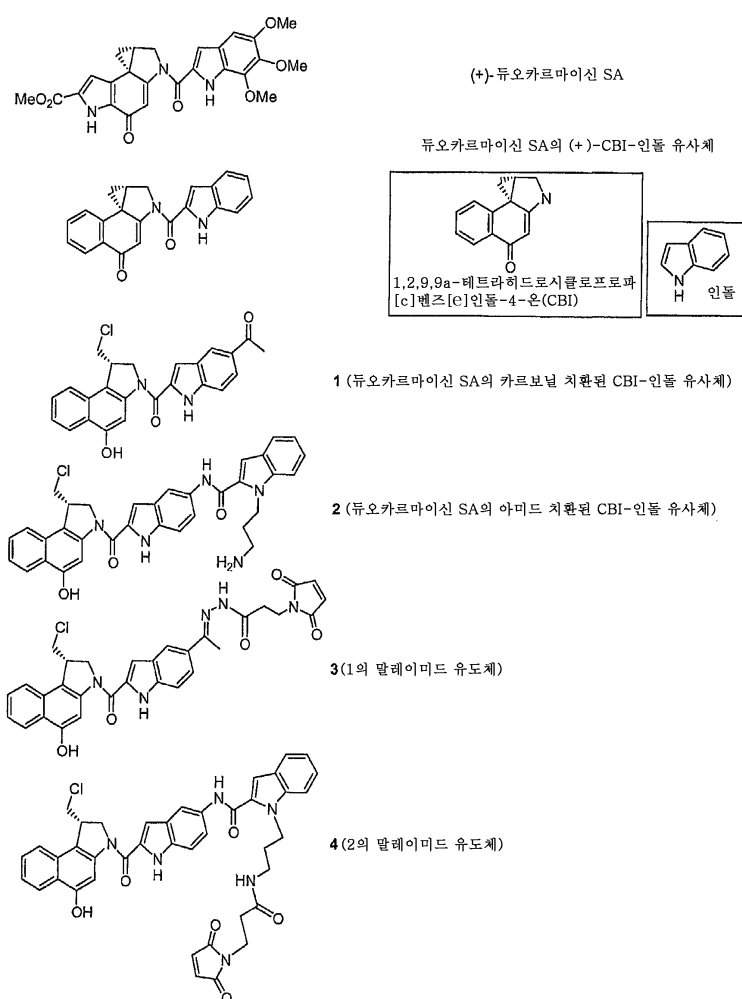
도 3 공초점 현미경에 의한, Pan 10-FM로 처리된 SW1990 및 HdFa 세포의 중첩된 488nm 및 568nm 영상. (A) 2시간 인큐베이션시킨 후의 SW1990 세포, (B) 2시간 후의 HdFa 세포, (C) 3시간 후의 SW1990 세포 및 (D) 3시간 후의 HdFa 세포.

도 4 SW1990의 도립 현미경 영상. (A) 처리되지 않은 세포. (B) Pan 10-FM로 처리된 세포 (C) Pan 10-4로 처리된 세포, (D) Pan 10-3으로 처리된 세포. scFv-약물 컨주게이트로 처리된 2개의 세포에 대한 확대된 영상은 확장성 공포형성 (extensive vacuolization)을 나타낸다.

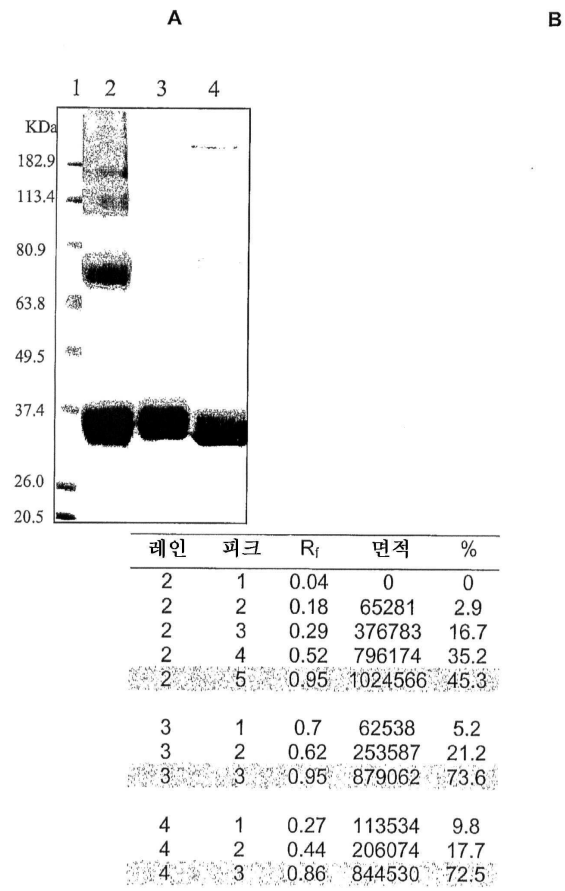
도 5 Boc-보호된 1의 합성에 대한 도식.

도면

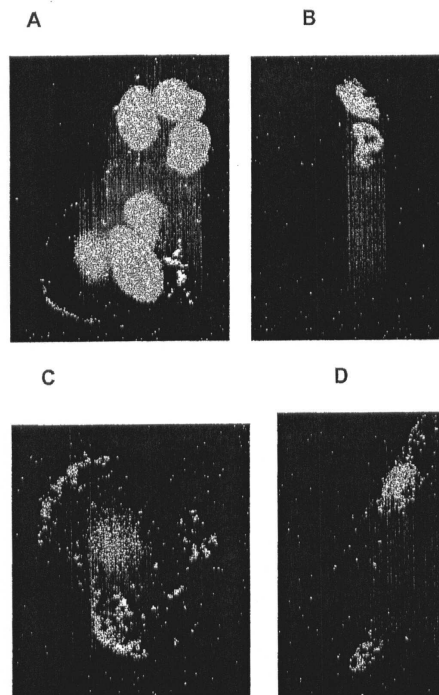
도면1



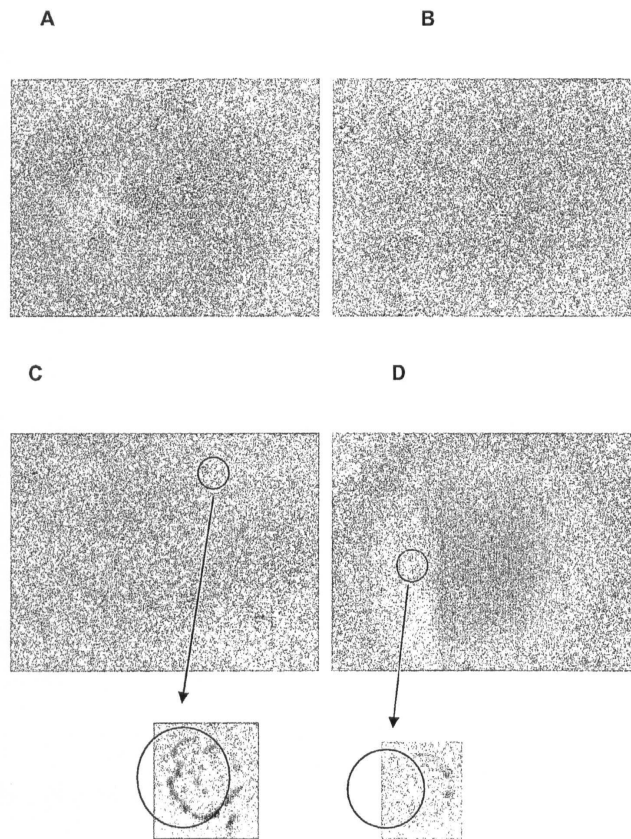
도면2



도면3



도면4



도면5

