



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월16일  
(11) 등록번호 10-1676887  
(24) 등록일자 2016년11월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/48 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 47/26 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7011516  
(22) 출원일자(국제) 2009년11월19일  
심사청구일자 2014년11월18일
- (85) 번역문제출일자 2011년05월20일  
(65) 공개번호 10-2011-0089141  
(43) 공개일자 2011년08월04일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/065084  
(87) 국제공개번호 WO 2010/059787  
국제공개일자 2010년05월27일
- (30) 우선권주장  
61/116,541 2008년11월20일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020070034471 A  
WO2008052187 A2
- (73) 특허권자  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우  
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자  
카바코프, 브루스  
미국 94044 캘리포니아주 퍼시픽카 그라나다 드라  
이브 1084  
넬슨, 다렌  
미국 94114 캘리포니아주 샌 프란시스코 카스트로  
스트리트 720  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 이귀동, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 치료 단백질 제형

(57) 요약

본 발명은 전반적으로 제형에 포함된 치료 단백질의 Asp-Asp 모티프에서 아스파르틸 이성체화를 억제하는 pH를 가지는 제형에 관한 것이다.

대표도



(72) 발명자

오우양, 준

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 카이만 레인  
707

스와츠, 트레보, 엘리

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 킬리 레인 6

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

Asp-Asp 모티프를 갖는 치료 단백질을 포함하는 제형으로서, 상기 치료 단백질은 항-STEAP-1 항체이고, 상기 항-STEAP-1 항체는 (a) 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하고, Asp-Asp 모티프는 HVR-H3에서 생기고, 상기 제형은 Asp-Asp 모티프에서 Asp 잔기의 아스파르틸 이성체화를 억제시키는 pH를 갖고, 상기 제형의 pH는 6.0 초과 9.0 미만인 제형.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, pH 는 6.25 내지 7.0인 제형.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서, pH는 6.5인 제형.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

청구항 1에 있어서, 항체는 서열 번호:8-10으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)를 포함하는 제형.

#### 청구항 12

청구항 11에 있어서, 항체는 서열 번호:5-6으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 추가로 포함하는 제형.

#### 청구항 13

청구항 1에 있어서, 항체는 세포독성 물질에 콘쥬게이트된 제형.

#### 청구항 14

청구항 13에 있어서, 세포독성 물질은 아우리스타틴인 제형.

#### 청구항 15

청구항 13에 있어서, 세포독성 물질은 메이탄시노이드 약물 모이어티인 제형.

#### 청구항 16

청구항 1, 3, 4 및 11 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체를 6 개월 동안 5℃에서 저장한 경우와 비교하였을 때, 40℃에서 4주간 저장된 항체는 항원 결합 손실이  $\leq 25\%$ 가 되는 제형.

#### 청구항 17

청구항 1, 3, 4 및 11 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 20 mM의 농도에서 히스티딘-아세트산염 완충액을 포함하는 제형.

#### 청구항 18

청구항 1, 3, 4 및 11 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 20 mM의 농도에서 히스티딘-클로라이드 완충액을 포함하는 제형.

#### 청구항 19

청구항 1, 3, 4 및 11 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 60mM 내지 250mM의 양으로 존재하는 트레할로즈 및 수크로오스로부터 선택된 사카라이드를 포함하는 제형.

#### 청구항 20

청구항 1, 3, 4 및 11 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 0.01 w/v% 내지 0.1 w/v%의 양으로 폴리소르베이트 20를 포함하는 제형.

#### 청구항 21

청구항 1, 3, 4 및 11 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 포유류에서 암을 치료하기 위한 제형.

#### 청구항 22

Asp-Asp 모티프를 포함하는 치료 단백질에서 아스파르틸 이성체화를 억제시키는 방법으로서, 상기 치료 단백질은 항-STEAP-1 항체이고, 상기 항-STEAP-1 항체는 (a) 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하고, 상기 치료 단백질은 제형 내에 포함되고, 상기 방법은 제형의 pH를 아스파르틸 이성체화를 억제시키는데 충분한 pH로 상승시키는 것을 포함하고, 아스파라틸 이성체화를 억제하는데 충분한 pH는 6.0 초과 9.0 미만인 방법.

#### 청구항 23

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2008년 11월 20일자 제출된 U.S. 가출원 No. 61/116,541의 잇점을 청구하며, 이 내용은 참고문헌에 통합된다.

[0003] 본 발명은 제형에 포함된 치료 단백질내 Asp-Asp 모티프에서 아스파르트릴 이성체화(aspartyl isomerization)를 억제하는 pH를 가지는 제형에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0004] 단백질 제형(Protein Formulations)

[0005] 생물공학의 발전으로 재조합 DNA 기술을 이용하여 약학 분야에 다양한 단백질을 생산하는 것이 가능해졌다. 단백질은 통상의 유기 및 무기 약물보다 더 크고 더 복잡하기 때문에(예, 복잡한 3차원 구조에 추가하여 다중 기능을 보유하는), 이와 같은 단백질 제형은 특별한 사항들을 보유한다. 단백질은 분해에 민감하고, 이는 화학적 불안정성(결합 형성 또는 절단에 의한 단백질의 변형으로 새로운 화학적 존재를 만들) 또는 물리적 불안정성(단백질의 더 높은 차원의 구조적 변화)과 연관될 수 있다. 물리적 불안정성은 예를 들면, 변성(denaturation), 응집(aggregation), 침전(precipitation) 또는 흡착(adsorption) 때문일 수 있다. 화학적 불안정성은 탈아미드화(deamidation), 라섬화(racemization), 이성체화(isomerization), 가수분해(hydrolysis), 산화(oxidation), 베타 제거(beta elimination) 또는 이황화물 교환(disulfide) 때문일 수 있다.

[0006] 탈아미드화, 응집, 및 단편화(fragmentation)를 최소화시키기 위하여 단백질 분자를 포함하여 약한 산성 완충액을 포함하는 제형들이 치료 단백질로 사용되어 왔다. 예, US 특허 No. 6,171,586 (*Lam et al.*,) (pH 5.0에서 아세트산염 완충액을 포함하는 안정적인 수용성 항체 제형을 설명); WO2004/019861 (*Johnson et al.*,) (아세트산염 완충액, pH 5.5에서 제조된 폐결핵화된 항-TNF  $\alpha$  Fab 단편을 설명); WO2004/004639 (*Nesta*)(pH 6.0, 50mM 숙신산 완충액에서 제조된 중양-활성화된 면역독소 huC242-DM1를 설명); WO03/039485 (*Kaisheva et al.*,). (다클리주마브[Daclizumab], 인간화된 IL-2 수용체 항체는 pH 6.0의 숙신산나트륨 완충액에서 최고의 안정성을 가진다고 보고함); 및 WO03/015894 (*Oliver et al.*,) (pH 6.0에서 히스티딘 완충액에서 100mg/mL SYNAGIS®의 수용성 제형을 설명한다).

[0007] pH 4-6의 조건하에, 단백질에서 아스파르트산 (Asp) 잔기들은 이성체화를 겪으면서 분해될 수 있다. Asp 이성체화는 고리 이미드 중간체(석신이미드)를 통하여 진행되며, 이 중간체는 신속하게 가수분해 절단되어 약 3:1의 몰 비율로 이소아스파르트산염(isoAsp) 또는 Asp를 형성한다. *Wakanar et al. Biochemistry 46:1534-1544 (2007)* 참고. Asp의 C-말단 측쇄상의 잔기는 이성체화에 Asp의 감응도(susceptibility)에 영향을 주며, Asp-Gly에 있는 Asp는 이성체화에 있어서 특히 민감하다. *Id.* 치료 항체에서 Asp 이성체화는 항체-결합 활성의 실질적인 손실로 이어질 수 있으며, 상보적 결정 영역(CDR)와 같은 항체의 항원-결합 영역에 Asp가 있는 경우, 특히 항체-결합 활성의 실질적인 손실로 이어질 수 있다. 따라서, 이와 같은 제형에 포함된 치료 단백질내 Asp-Asp 모티프에서 아스파르트릴 이성체화(aspartyl isomerization)를 억제하는 제형이 본 기술분야에서 요구된다.

[0008] 항-STEAP-1 항체

[0009] STEAP-1은 6개의 막통과 도메인과 세포내 N- 및 C-말단의 분자 지체학으로, 3개의 세포외 루프와 두 개의 세포내 루프가 형성되는 “뱀과 같은 S자 곡선(serpentine)” 형태로 폴딩되는 특징을 가진 세포 표면 항원이다. STEAP-1은 정상적인 인간 조직의 전립선 세포에서 주로 발현된다. 또한 전립선 암의 다양한 상태 및 폐, 결장, 난소, 방광 및 췌장 암 및 Ewing 육종과 같은 기타 인간의 암에서 높은 수준으로 발현된다. *Hubert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14523-14528 (1999); WO 99/62941; Challita-Eid et al. Cancer Res. 67:5798-5805; 및 WO2008/052187* 참고)

[0010] STEAP-1에 결합하는 특정 항체에 대해 설명되었다(WO2008/052187 참고, 참고문헌에 통합됨). 더욱이, 이들 항체로부터 유도된 면역공유제이트는 전립선 종양 이중이식편 모델에서 종양 용적을 감소시켰다. *Id.* 따라서, 항-STEAP-1 항체 또는 면역공유제이트는 암 치료, 예, 전립선 암 치료에 유용하다. 따라서, 항-STEAP-1 항체 또는 면역공유제이트를 투여하는데 적합한 제형은 암 치료에 유용할 것이다.

[0011] 여기에서 본 발명은 상기 필요성을 충족시키고, 추가 장점들을 제공한다.

[0012] 발명의 요약

[0013] 본 발명은 Asp-Asp 모티프를 가지는 치료 단백질을 포함하는 제형에 적어도 부분적으로 관련되는데, 이때 제형은 Asp-Asp 모티프의 Asp 잔기에서 아스파르트릴 이성체화를 억제시킴으로써 단백질의 안정성을 개선시킨다. 하나

의 측면에서, 제형은 Asp-Asp 모티프에서 Asp 잔기의 아스파르트산 이성체화를 억제하는 pH를 가진다.

- [0014] 하나의 측면에서, Asp-Asp 모티프를 가지는 치료 단백질을 포함하는 제형이 제공되며, 제형의 pH는 6.0이상 및 9.0 미만이다. 하나의 구체예에서, pH는 6.25 내지 7.0이다. 또 다른 구체예에서, pH는 약 6.5이다. 또 다른 구체예에서, 치료 단백질은 항체다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 항체는 Asp-Asp 모티프를 포함하는 초가변 영역(HVR)을 포함한다. 이와 같은 하나의 구체예에서, Asp-Asp 모티프는 HVR-H3에 생긴다.
- [0015] 추가 구체예에서, 항체는 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항-STEAP-1 항체다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 항-STEAP-1 항체는 (a) 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (d) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (e) 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3로부터 선택된 하나 이상의 HVR을 추가로 포함한다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 항체는 (a) 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3로부터 선택된 하나 이상의 HVR을 추가로 포함한다.
- [0016] 추가 구체예에서, 항체는 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3를 포함하고, 서열 번호: 8-10으로부터 선택된 아미노산에 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항-STEAP-1 항체다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 항체는 경쇄 가변 영역(VL)을 더 포함하며, 이때, VL은 서열 번호: 5-6으로부터 선택된 아미노산에 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0017] 추가 구체예에서, 항체는 세포독성 물질에 콘쥬게이트된다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 세포독성 물질은 아우리스타틴(auristatin)이다. 또 다른 이와 같은 구체예에서, 세포독성 물질은 메이탄시노이드(maytansinoid) 약물 모이어티다.
- [0018] 추가 구체예에서, 항체는 6개월간 5℃에서 보관된 경우와 비교하였을 때, 4주간 40℃에서 보관될 때, 항원 결합이 ≤ 25% 손실되는 것으로 나타났다.
- [0019] 추가 구체예에서, 제형은 20 mM 농도로 히스티딘-아세트산염 완충액을 포함한다. 추가 구체예에서, 제형은 20mM 농도로 히스티딘-클로라이드 완충액을 포함한다. 추가 구체예에서, 제형은 60mM 내지 250mM의 양으로 존재하는 트레할로즈 및 수크로오스로부터 선택된 사카라이드를 포함한다. 추가 구체예에서, 제형은 0.01% 내지 0.1% 양의 폴리솔베이트 20을 포함한다.
- [0020] 상기 설명된 구체예들 중 임의의 것은 단독으로 또는 조합하여 존재할 수 있다.
- [0021] 또 다른 측면에서 암을 치료하는 방법이 제공되는데, 이 방법은 상기 제공된 구체예들중 하나로써 항-STEAP-1 항체를 포함하는 제형을 포유류에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0022] 추가 측면에서, Asp-Asp 모티프를 포함하는 치료 단백질에서 아스파르트산 이성체화를 억제하는 방법이 제공되는데, 이때 치료 단백질은 제형내에 포함되며, 이 방법은 아스파르트산 이성체화를 억제시키는데 충분한 pH로 제형의 pH를 상승시키는 것을 포함한다. 하나의 구체예에서, 치료 단백질은 상기 제공된 구체예들중 임의의 것과 같이 항체가 된다.

## 도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 인간, 마우스, 및 필리핀 원숭이(cynomolgus monkey)의 STEAP-1의 아미노산 서열을 배열한 것이다.
- 도 2a 및 2b는 특정 항-STEAP-1 항체의 VL 및 VH 도메인의 아미노산 서열을 차례로 나타낸 것이다.
- 도 3는 실시예 A에서 설명된 것과 같이 40℃에서 다양한 시간동안 저장 후에, pH 5.5에서 항-STEAP-1 항체 제형의 이온 교환 크로마토그래피의 용리 프로파일을 나타낸 것이다.
- 도 4는 실시예 B에서 설명된 것과 같이 iso-Asp의 존재를 나타내는 트립신에 의해 생성된 펩티드 지도를 나타낸다..
- 도 5는 실시예 B에서 설명된 것과 같이, 이온 전달 해리 질량 분석(ETD-MS)의 결과를 나타내는 것으로, 이성체

화를 겪는 특정 Asp 잔기를 확인하였다.

도 6은 40℃에서 4주간 보관된 항-STEAP-1 항체 제형은 항원 결합을 손실하였다는 것을 보여준다. 증가된 pH를 가지는 제형은 40℃에서 감소된 결합 손실을 보여주었다. 제형을 5℃에서 6개월간 보관하였을 때 테스트된 임의의 pH에서 결합 손실이 관찰되지 않았다.

도 7은 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 탐지하였을 때 다양한 시간대로 40℃에 보관한 후, iso-Asp 및 석신이미드를 포함하는 항체의 존재를 나타낸다.

도 8은 실시예 D에서 설명된 것과 같이, 다양한 시간동안 다양한 온도에서 보관한 후, 항-STEAP-1 항체 준비물 내에 iso-Asp 및 석신이미드의 양(비율로 표현)을 나타낸다.

도 9는 Asp가 iso-Asp로의 반응에 대한 1차 동역학을 추정하는 것이다.

도 10은 실시예 E에서 설명된 것과 같이 다양한 온도에서 결정된 Asp와 iso-Asp 이성화 비율을 나타낸다.

도 11은 도 10의 비율을 이용하여 Arrhenius 플롯을 나타낸다. 이 플롯에서 Asp-Asp 이성체화의 활성화 에너지는 약 25-30Kcal/mol로 예측된다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### I. 정의

"제형(formulation)"은 활성 성분을 포함하고, 제형이 투여되는 개체에 허용될 수 없는 독성이 있는 추가 성분을 포함하지 않는 제조물을 말한다. 이와 같은 제형은 일반적으로 멸균된 것이다.

"살균(sterile)" 제형은 무균이거나 또는 모든 살아있는 미생물 및 이들의 포자가 없다.

여기에서, "냉동(frozen)" 제형은 0℃ 이하의 온도에 있는 제형을 말한다. 일반적으로, 냉동 제형은 냉동-건조한 것이거나 사전 또는 이후에 동결건조(lyophilization)된 것은 아니다. 바람직하게는 냉동 제형은 저장용(예, 스테인레스 강 탱크, PETG 병, 및 Bioprocess Container™ 저장 시스템(Hyclone, Logan, UT)) 또는 냉동 약물 산물(최종 바이알 형태) 냉동 약물 물질을 포함한다.

"안정적(stable)" 제형은 보관시에 제형내 단백질이 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 기본적으로 유지하는 제형을 말한다. 바람직하게는, 단백질은 저장시에 물리적 및 화학적 안정성, 뿐만 아니라 생물학적 활성을 기본적으로 보유한다. 저장 기간은 일반적으로 제형의 바람직한 반감기에 근거하여 선택된다. 단백질 안정성을 측정하는 다양한 분석 기술들이 본 기술분야에서 이용가능하며, 예를 들면, *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) and Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)을 참고한다. 선택된 시간동안 선택된 온도에서 안정성이 평가될 수 있다. 바람직하게는, 제형은 약 40℃에서 적어도 약 2-4 주간 안정하고; 및/또는 약 5℃ 및/또는 15℃에서 적어도 3 개월 안정하며, 바람직하게는 1-2 년 안정하고; 및/또는 약 -20℃에서 적어도 3 개월, 바람직하게는 적어도 1-2년간 안정하다. 더욱이, 제형은 냉동(예, -70℃로) 및 제형의 해동후, 예를 들면 냉동과 해동을 1회, 2회 또는 3회 반복 후 안정적인 것이 바람직하다. 안정성은 다양한 상이한 방식으로 정량적으로 및/또는 정성적으로 평가될 수 있는데, 이들 방식은 응집 형성의 평가(예, 크기 압출 크로마토그래피를 이용하여, 탁도 측정에 의해, 및/또는 시각적 검사에 의해); 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관 지역 전기영동을 이용하여 이중 전하(charge heterogeneity) 평가; 아미노-말단 또는 카르복시-말단 서열 분석; 질량 분석적(mass spectrometric) 분석 ; 환원된 항체와 고유 항체를 비교하기 위한 SDS-PAGE 분석; 펩티드 지도(트립신에 의한 또는 Lys-C) 분석; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능의 평가; 등을 포함한다. 불안정성은 하나 이상의 응집, 탈아미드화 (예, Asn 탈아미드화), 산화(예, Met 산화), 이성체화 (예, Asp 이성체화), 클리핑/가수분해/단편화 (예, 힌지 부분 단편화), 석신이미드 형성, 짝을 이루지 못한 시스테인, N-말단 연장, C-말단 프로세싱, 글리코실화 차이 등에서 하나 이상이 관련될 것이다. "개선된 안정성"을 가진 제형은 제형내에 포함된 단백질이 상이한 제형내에 있는 단백질과 비교하여 저장시에 더 큰 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 유지하는 것을 의미한다.

"아스파르트산 이성체화"는 단백질내에 Asp 잔기가 이소아스파르트산으로 전환하는 것을 말한다.

"Asp-Asp" 또는 "DD" 모티프는 단백질에서 두 개의 연속 아스파르트산 잔기를 말한다.

"아스파르트산 이성체화 억제" 또는 이의 문법적 변이는 더 낮은 pH(예, 5.5)에서 동일한 제형내에 포함된 단백질



의 Asp-Asp에서 아스파르트릴 이성체화 수준과 비교하여, 주어진 pH(예, 6.5)에서 주어진 제형의 단백질내 Asp-Asp에서 아스파르트릴 이성체화가 부분적으로 또는 완전하게 억제되는 것을 말한다. 아스파르트릴 이성체화의 억제는 예, iso-Asp를 정량화하기 위하여 HIC를 이용하여 직접적으로 측정되거나, 또는 단백질의 생물학적 활성을 정량화함으로써 간접적으로 측정될 수 있다. 하나의 구체예에서, Asp-Asp에서 아스파르트릴 이성체화는 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 억제된다.

[0032] "치료 단백질"은 질병 또는 병리적 상태를 가진 포유류를 치료하는데 이용되는 단백질이다. 여기에서 설명된 치료 항체는 항-STEAP-1 항체다.

[0033] 용어 "STEAP-1"는 다른 명시가 없는 한, 영장류 (예, 인간 및 원숭이) 및 설치류 (예, 마우스 및 쥐)와 같은 포유류를 포함하여 임의의 척추동물로부터 기인된 임의의 고유 STEAP-1을 말한다. 이 용어는 "전장"의 프로세스 안된 STEAP-1 뿐만 아니라 세포에서 프로세싱에 의해 생성된 임의의 형태의 STEAP-1을 포함한다. 이 용어는 또한 STEAP-1의 자연적으로 생성되는 변이체, 예, 접합(splice) 변이체 또는 대립형질 변이체를 포함한다. 인간, 마우스, 및 필리핀 원숭이에서 얻은 예시적인 STEAP-1은 도 1에 나타낸다.

[0034] 항체의 "생물학적 활성"은 항체가 항원에 결합하는 능력을 말한다.

[0035] "등장성(isotonic)"은 인간 혈액과 기본적으로 동일한 삼투압을 가지는 관심 제형을 말한다. 등장성 제형은 약 250 내지 350 mOsm의 삼투압을 일반적으로 가질 것이다. 등장성은 예를 들면, 증기압 또는 결빙형(ice-freezing type) 삼투압계를 이용하여 측정할 수 있다.

[0036] 여기에서 사용된 바와 같이, "완충액"은 산-염기 콘주게이트 성분의 작용에 의해 pH의 변화에 저항하는 완충된 용액을 말한다. 이와 같은 완충액의 예로는 아세트산염, 숙신산염, 글루코네이트, 히스티딘, 구연산염, 글리실 글리신 및 기타 유기산 완충액을 포함한다.

[0037] "히스티딘 완충액"은 히스티딘 이온을 포함하는 완충액이다. 히스티딘 완충액의 예로는 히스티딘 클로라이드, 히스티딘 아세테이트, 히스티딘 포스페이트 및 히스티딘 설페이트를 포함한다. 히스티딘 아세트산염 완충액은 L-히스티딘 (자유 염기, 고형)을 아세트산(액체)로 적정하여 준비할 수 있다.

[0038] 여기에서 "사카라이드"는 일반적인 조성물  $(CH_2O)_n$  및 이의 유도체, 예, 모노사카라이드, 디사카라이드, 트리사카라이드, 폴리사카라이드, 당 알코올, 환원 당, 비환원당 등을 포함한다. 사카라이드의 예로는 글루코즈, 수크로오스, 트레할로즈, 락토즈, 푸락토즈, 말토즈, 텍스트란, 글리세린, 텍스트란, 에리트리톨, 글리세롤, 아라비톨, 실리톨, 솔비톨, 만니톨, 멜리비오스, 멜레지토즈, 라피노즈, 만노트리오스, 스타키오스, 말토즈, 락툴로즈, 말톨로즈, 글루시톨, 말티톨, 락티톨, 이소-말톨로즈 등을 포함한다. 여기에서 사카라이드는 트레할로즈 또는 수크로오스와 같은 비환원 디사카라이드가 될 수 있다.

[0039] "계면활성제"는 표면-활성 물질, 바람직하게는 비이온성 계면활성제다. 계면활성제의 예로는 폴리소르베이트(예를 들면, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80); 폴옥사머 (예, 폴옥사머 188); 트리톤; 도데실 설페이트 나트륨(SDS); 라우릴 설페이트 나트륨; 옥틸 글리코시드 나트륨; 라우릴-, 미리스틸-, 리노레일-, 또는 스테아릴-술포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리노레일- 또는 스테아릴-사르코신; 리노레일-, 미리스틸-, 또는 옥틸-베타인; 라우릴아미도프로필-, 코카아미도프로필-, 리노레아미도프로필-, 미리스타아미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아아미도프로필-베타인 (예, 라우로아미도프로필); 미리스타아미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아아미도프로필-디메틸아민; 메틸 코코일 타우레이트 나트륨 또는 메틸 올레일 타우레이트 이나트륨; 및 MONAQU AT™ 시리즈(Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey); 폴리에틸 글리콜, 폴리프로필 글리콜, 및 에틸렌 및 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체(예, Pluronic, PF68 etc); 등을 포함한다.

[0040] 수치와 관련하여 용어 "약"이란 수치 값에  $\pm 5\%$ 를 말한다.

[0041] 여기에서, 용어 "항체"는 광의적으로 이용되며, 특별히 전장의 단클론 항체, 다클론 항체, 다중 특이적 항체(예, 이중특이적 항체) 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편을 포함한다.

[0042] 여기에서 사용된 용어 "단클론 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 말하는데, 예를 들면, 집단을 구성하는 개별 항체가 동일하거나 및/또는 단클론 항체를 생산하는 동안 발생하는 가능한 변이체를 제외하고, 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 말하며, 이때 변이체들은 일반적으로 소량 존재한다. 상이한 결정영역(에피토프)에 대응하는 상이한 항체들을 일반적으로 포함하는 다클론 항체 준비물과는 달리, 각 단클론 항체는 항원상에 단일 결정영역에 대응한다. 이들의 특이성에 추가하여, 단클론 항체는 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 장점이 있다. 변경 "단클론"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득되며, 임의의 특정



방법에 의해 항체 생산을 요구하지 않는, 항체의 특징을 말한다. 예를 들면, 본 발명에 따라 이용될 수 있는 단클론 항체는 *Kohler et al, Nature, 256:495 (1975)*에서 처음으로 설명한 하이브리도마 방법에 의해 만들어지거나 또는 재조합 DNA 방법(예, U.S. 특허 4,816,567)에 의해 만들어질 수 있다. "단클론 항체"는 예를 들면, *Clackson et al, Nature, 352:624-628 (1991)* and *Marks et al, J. Mol Biol, 222:581-597 (1991)*에서 설명하고 있는 기술을 이용하여 파아지 항체 라이브러리로부터 분리시킬 수도 있다.

- [0043] 여기에서 단클론 항체는 특히 “키메라” 항체를 포함하는데, 이 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정 종으로부터 유도된 항체 또는 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서 대응하는 서열과 동일하거나 또는 상동성이며, 반면 이들 쇄의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유도된 항체 또는 또 다른 항체 부류 또는 하위 부류 뿐만 아니라 이와 같은 항체의 단편(원하는 생물학적 활성을 보유한다면)의 대응 서열과 동일하거나 또는 상동성을 가진다(U.S. 특허 4,816,567; 및 *Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 81 :6851-6855 (1984)*). 여기에서 관심의 키메라 항체는 “영장류화(primatized)” 항체를 포함하는데, 이들 항체는 인간이 아닌 영장류(예, 구세계 원숭이(Old World Monkey), 유인원, 등)으로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열과, 인간의 불변 영역 서열을 포함한다.
- [0044] "항체 단편"은 항체의 항원-결합 부분을 포함하는, 전장 항체의 일부분을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 디아바디(diabodies); 선형 항체; 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0045] "전장(full length) 항체"는 항원-결합 가변 영역 뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인 (C<sub>L</sub>) 및 중쇄 불변 도메인들, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3을 포함하는 항체다. 불변 도메인은 고유 서열 불변 도메인(예, 인간의 고유 서열 불변 도메인들) 또는 이의 아미노산 서열 변이체들이 될 수도 있다. 특정 구체예들에서, 전장 항체는 하나 이상의 효과물질 기능을 보유한다.
- [0046] 여기에서 설명된 "아미노산 서열 변이체" 항체는 기준 항체와는 상이한 아미노산 서열을 가지는 항체다. 보통, 아미노산 서열 변이체는 기준 항체와 적어도 약 70% 상동성(homology)을 보유하며, 바람직하게는, 적어도 약 80%, 좀더 바람직하게는 기준 항체와 적어도 약 90% 상동성을 보유한다. 아미노산 서열 변이체는 기준 항체와 비교하여 특정 위치들에서 치환, 결손, 및/또는 추가를 가진다. 여기에서 설명된 아미노산 서열 변이체의 예로는 산성 변이체 (예, 탈아미드화된 항체 변이체), 염기성 변이체, 항체의 하나 또는 두 개의 경쇄 상에 아미노-말단 리더 연장부(예, VHS-)를 가지는 항체, 항체의 하나 또는 두 개의 중쇄 상에 C-말단 리신 잔기를 가지는 항체 등을 포함하며, 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열의 변이체 조합들도 포함한다. 하나의 구체예에서, 항체 변이체는 하나 또는 두 개의 경쇄 상에 아미노-말단 리더 연장부를 포함하고, 선택적으로 기준 항체와 비교하여 기타 아미노산 서열 및/또는 상이한 글리코실화를 추가로 포함한다.
- [0047] 여기에서 설명된 "글리코실화 변이체" 항체는 기준 항체에 부착된 하나 이상의 탄수화물 모이어티와 상이하게 부착된 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 가지는 항체다. 여기에서 설명된 글리코실화 변이체의 예로는 Fc 부분에 부착된 G0 올리고사카라이드 구조 대신 G1 또는 G2 올리고사카라이드 구조를 가진 항체, 항체의 하나 또는 두 개의 경쇄에 부착된 하나 또는 두 개의 탄수화물 모이어티를 가진 항체, 항체의 하나 또는 두 개의 중쇄에 부착된 탄수화물이 없는 항체 등 및 글리코실화 변이의 조합들을 포함한다.
- [0048] 여기에서 설명된 "아미노-말단 리더 연장부"는 항체의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-단부에 존재하는 아미노-말단 리더 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기를 말한다. 예시적인 아미노-말단 리더 연장부는 항체 변이체의 하나 또는 두 개의 경쇄 상에 존재하는 세 가지 아미노산 잔기, VHS를 포함하거나 또는 이것으로 구성된다.
- [0049] "상동성(Homology)"은 서열을 배열하고, 최대 상동성 비율을 얻기 위하여 필요하다면 갭을 도입시킨 후, 아미노산 서열 변이체에서 동일한 잔기들의 비율로 정의된다. 배열 방법 및 컴퓨터 프로그램은 본 기술분야에 잘 공지되어 있다. 이와 같은 컴퓨터 프로그램중 하나는 "Align 2", Genentech, Inc.이며, 1991년 12월 10일자로 미국 저작권협회(United States Copyright Office, Washington, DC 20559)에 사용자 문서와 함께 제출되었다.
- [0050] 항체 "효과물질 기능(effector functions)"은 항체의 Fc 부분(고유 서열 Fc 부분 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 부분)에 기인되는 생물학적 활성을 말한다. 항체의 효과물질 기능의 예로는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개된 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체(예, B 세포 수용체; BCR) 등의 하향 조절 등을 포함한다.

- [0051] 항체의 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 전장 항체는 상이한 “부류(classes)”로 지정될 수 있다. 전장 항체는 5가지 주요 부류, IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM가 있고, 이들 중 일부는 추가로 “하위부류(subclass(이소타입))”로 추가 세분되는데, 예, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2이다. 항체의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 차례로  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ 가 된다. 면역글로불린의 상이한 부류의 서브유닛 구조 및 3차원 모양은 잘 공지되어 있다.
- [0052] “항체 의존성 세포 매개된 세포독성” 및 “ADCC”는 세포 매개된 반응으로, 여기서, Fc 수용체(FcRs) (예, 자연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)를 발현시키는 비-특이적 세포독성 세포는 표적 세포상의 결합된 항체를 인지하고, 결과적으로 표적 세포를 용혈시킨다. ADCC, NK 세포를 중개하는 1차 세포는 Fc $\gamma$ RIII 만을 발현시키지만, 반면, 단핵세포는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ R II 및 Fc $\gamma$ RIII를 발현시킨다. 조혈세포 상에 FcR 발현은 *Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)*의 464 쪽 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, US 특허 5,500,362 또는 5,821,337에서 설명된 것과 같은 시험관내 ADCC 분석을 실시할 수도 있다. 이와 같은 분석에 유용한 효과물질 세포는 말초혈액 단핵 세포(PBMC) 및 천연 킬러(NK) 세포를 포함한다. 대안으로, 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 *Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)*에서 설명된 것과 같이 생체내 예를 들면 동물 모델에서 평가될 수 있다.
- [0053] “인간 효과물질 세포”는 하나 이상의 FcRs를 발현시키고, 효과물질 기능을 수행하는 백혈구다. 바람직하게는, 이 세포는 적어도 Fc $\gamma$ RIII를 발현하고, ADCC 효과물질 기능을 수행한다. ADCC를 중개하는 인간 백혈구의 예로는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 천연 킬러(NK) 세포, 단핵세포, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하며; PBMCs 및 NK 세포가 바람직하다. 효과물질 세포는 이의 고유 소스 예, 여기에서 설명된 것과 같이, 혈액 또는 PBMCs으로부터 분리될 수도 있다.
- [0054] 용어 “Fc 수용체” 또는 “FcR”은 항체의 Fc 부분에 결합하는 수용체를 설명하기 위하여 이용된다. 하나의 구체예에서, FcR은 인간의 고유 서열 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것으로, 및 대립형질 변이체 및 이들 수용체의 대체 접합형을 포함하는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ R II, 및 Fc $\gamma$ RIII 하위부류의 수용체를 포함한다. Fc $\gamma$ R II 수용체는 Fc $\gamma$ RIIA (“활성화 수용체”) 및 Fc $\gamma$ RIIB (“억제 수용체”)를 포함하고, 이들은 세포질 도메인에서 주로 상이한, 유사 아미노산 서열을 보유한다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-계 활성화 모티프 (ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-계 저해 모티프 (ITIM)를 포함한다. (*M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)*). FcRs는 *Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)*; *Capel et al, Immunomethods 4:25-34 (1994)*; 및 *de Haas et al, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)*에서 살펴본다. 앞으로 확인될 수 있는 것들을 포함한, 기타 FcRs들도 여기에서 사용된 용어, “FcR”에 포함된다. 이 용어는 또한 신생 수용체, FcRn도 포함하는데, 이것은 모계IgGs를 태아로 전달하는 임무를 맡고 있다(*Guyer et al, J. Immunol. 117:587 (1976)* and *Kim et al, J. Immunol. 24:249 (1994)*).
- [0055] “보체 의존성 세포독성” 또는 “CDC”는 보체 존재하에 표적을 용해시킬 수 있는 분자의 능력을 말한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템 (Clq)의 제1 성분이 동족(cognate) 항원과 복합된 분자(예, 항체)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 가령 *Gazzano-Santoro et al, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)*에서 설명된 것과 같은 CDC 분석을 실시할 수 있다.
- [0056] “고유 항체”는 보통 두 개의 동일한 경쇄(L)와 두 개의 동일한 중쇄(H)로 구성된 약 150,000 달톤의 이형사량체 당단백질이다. 각 경쇄는 한 개의 공유결합에 의한 이황화결합에 의해 중쇄에 링크되어 있고, 이때 이황화결합 링크지 수는 상이한 면역글로블린 이소타입의 중쇄들에서 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 공간을 둔 사슬내 이황화결합 다리를 가진다. 각 중쇄는 한쪽 단부에 가변 도메인(VH)과 이어서 다수의 불변 도메인을 가진다. 각 경쇄는 한 단부에 가변 도메인(VL)과 또 다른 단부에 불변 도메인을 가진다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제 1 불변 도메인과 배열되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 배열된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인 사이에 경계면을 형성하는 것으로 본다.
- [0057] 용어 “가변(variable)”이란 가변 도메인의 특정 부분들은 항체들간에 서열에서 상당히 상이하며, 특정 항원에 대해 각 특정 항체의 결합 특이성을 담당하는 것을 지칭하다. 그러나, 항체들의 가변 도메인을 통하여 가변성이 고르게 분포되어 있지는 않다. 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변 영역라고 불리는 세 가지 단편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 매우 보존된 부분은 프레임워크 부분(FR)이라고 한다. 고유한 중쇄 및 경쇄의 각 가변 도메인은 4개의 FR 부분을 포함하는데, 대부분  $\beta$ -쉬트 형상을 취하며, 3개의 CDR에 의해 연결되어, 루프 연결을 형성하고, 일부 경우에는  $\beta$ -쉬트 구조의 일부분을 형성한다. 각 쇄의 초가변 부분은 FR 부분에 의해 근

접하게 함께 지탱되며, 다른 쇠의 초가변 부분들과 함께 항체의 항원-결합 영역을 형성하는데 기여한다. (Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). 불변 도메인들은 항원에 항체의 결합에 직접적으로 관여하지 않지만, 항체 의존성 세포 독성(ADCC)에서 항체 참여와 같은 다양한 작용체 기능들을 발휘한다.

[0058] 용어 "초가변 영역("hypervariable region")" 또는 "HVR" -또는 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로 지칭되기도 함-은 항원에 항체가 결합하는 것을 주로 담당하는 항체의 아미노산 잔기들을 지칭하는 것이다. 중쇄에서 일반적으로 세 개 HVR(HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3) 및 경쇄에서 세 개 HVR(HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3)가 있다. 일부 구체예에서, 초가변 부분은 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (HVR-L1), 50-56 (HVR-L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 31-35 (HVR-H1), 50-65 (HVR-H2) 및 95-102(HVR-H3)를 포함한다(Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). HVR-H3은 항체에 높은 특이성을 부여하는데 독특한 역할을 가는 것으로 본다. 예, Xu et al. (2000) *Immunity* 13:37-45; Johnson and Wu (2003) in *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ). "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 여기에서 정의한 바와 같이, 초가변 부분을 제외한 가변 도메인 잔기들이다.

[0059] 효소 파파인으로 항체를 절단하면, 두 개의 동일한 항원 결합 단편이 만들어지는데, "Fab" 단편-단일 항원-결합 영역을 가지는 단편, 및 "Fc" 단편-이것의 이름은 바로 결정화되는 능력이 반영됨-이다. 효소 펩신으로 처리하면 두 개-항원 결합 영역을 가지며, 항원에 교차 결합할 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이 생성된다.

[0060] "Fv"는 완벽한 항원-인지 및 항원-결합 영역을 포함하는 항체의 최소 단편을 말한다. 이 부분은 한 개의 중쇄 및 한 개의 경쇄 가변 도메인이 서로 단단하게, 비-공유적으로 연합된 것으로 구성된다. 이와 같은 형태(configuration)에서, 각 가변 도메인의 세 개의 초가변 부분은 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면에 항원-결합 영역을 한정시킨다. 집합적으로 6개의 초가변 부분은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 대한 특이성을 가지는 3개의 초가변 부분만을 포함하는 Fv의 절반)은 항원을 인지하고 항원에 결합하는 능력을 보유하지만, 전체 결합 영역 보다는 낮은 친화력을 가진다.

[0061] Fab는 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 포함한다. Fab' 단편은 항체 힌지 부분에 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇 개의 잔기가 추가됨으로써 Fab 단편과는 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기가 적어도 한 개의 자유 티올 기를 가지는 Fab'를 말한다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 원래 힌지 시스테인을 사이에 끼고 있는 Fab' 단편 쌍으로 만들어진다. 기타 항체 단편들의 화학적 커플링은 잘 알려져 있다.

[0062] 임의의 척추동물 종의 항체 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열에 근거하여 두 가지 별개의 유형, 카파(κ) 및 람다(λ)중 하나로 정해질 수 있다.

[0063] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편들은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인들은 단일 폴리펩티드 쇠에 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 VH 와 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함하여, 항원 결합을 위한 원하는 구조를 scFv가 형성할 수 있도록 한다. scFv을 알아보기 위해서, Pluckthun in *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)를 참고한다.

[0064] 용어 "디아바디(diabodies)"는 두 개의 항원-결합 영역을 가지는 작은 항체 단편을 지칭하는데, 동일한 펩티드 쇠(VH-VL)에서 가변 경쇄 도메인(VL)에 연결된 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함한다. 동일한 쇠에서 두 개 도메인의 쌍을 허용하기엔 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인들은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 이루도록 강요되어, 두 개의 항원-결합 영역이 만들어지게 된다. 디아바디는 예를 들면, EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)에서 충분히 설명되고 있다.

[0065] 비-인간(예, 설치류) 항체의 "인간화(humanized)" 형태는 비-인간 면역글로블린으로부터 유도된 최소 서열을 포함하는 키메라 항체다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 비-인간 제공자 항체, 예를 들면 합성 항체 또는 마우스, 쥐, 토끼 또는 원하는 특이성, 친화력 및/또는 능력을 보유하는 비-인간 영장류 항체의 초가변 영역의 잔기로 대체된 인간 면역글로블린(수용자 항체)다. 일부 경우, 인간 면역글로블린의 프레임워크 부분(FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 제공자 항체에서 볼 수 없는 잔기를 포함할 수 있다. 항체 기능을 추가로 개선하기 위해 이와 같은 변형이 만들어진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 한 개, 일반적으로 두 개의 가변 도메인을 실질적으로 포함할 수 있는데,

여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 면역글로블린의 것과 상응하며, 모든 FR 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로블린 서열의 것이다. 인간화된 항체는 일반적으로 인간 면역글로블린의 것과 같은 면역글로블린 불변 부분 (Fc)의 적어도 부분을 선택적으로 포함할 수 있다. 추가 상세한 내용은 *Jones et al, Nature 321 :522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)*을 참고한다.

[0066] "네이키드(naked) 항체"는 세포독성 모이머티 또는 방사능라벨과 같은 이형성 분자가 콘쥬게이트안된 항체(여기에서 정의된)다.

[0067] "친화력 성숙된" 항체는 하나 이상의 추가변 영역에 하나 이상의 변형을 가진 항체로써, 이와 같은 변형에 의해 변형을 가지지 않은 부모 항체와 비교하였을 때, 항원에 대한 항체의 친화력이 개선된다. 바람직한 친화력 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 피코몰 친화력을 가질 것이다. 친화력 성숙된 항체는 본 기술분야에 공지된 과정에 의해 만들어진다. *Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)*는 VH 및 VL 도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화력 성숙을 설명한다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이생성은 다음에서 설명된다: *Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91 :3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).*

[0068] "항진(agonist) 항체"는 수용체에 결합하여 수용체를 활성화시키는 항체다. 일반적으로, 항진 항체의 수용체 활성화 능력은 수용체의 고유 항진 리간드에 적어도 정량적으로 유사할 것이다(그리고 기본적으로 정량적으로 유사할 수 있다).

[0069] "분리된" 항체는 자연 환경에서 확인되고, 이의 성분으로부터 분리 및/또는 회수된 항체다. 자연 환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료 용도를 간섭할 수 있는 물질이 되며, 효소, 호르몬 및 기타 단백질 및 비-단백질 성 용질을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 항체는 Lowry 방법에 의해 측정되었을 때 항체 중량의 95% 이상으로 정제되거나, (2) 스피닝 컵 서열분석기(sequenator)를 이용하여 최소 15개 잔기로 된 N-말단 또는 내부 아미노산 서열을 얻는데 충분한 수준으로 정제되거나, 또는 (3) Coomassie 블루 또는 실버 착색을 이용하여, 또는 바람직하게는 형광 착색과 함께 CE-SDS를 이용하여 환원 또는 비-환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의한 동질성을 가지는 수준으로 정제될 것이다. 항체의 자연 환경의 적어도 한 개 성분이 존재하지 않기 때문에 분리된 항체는 재조합 세포내에 본래 장소에 있는 항체를 포함한다. 그러나, 보통, 분리된 항체는 최소 한 가지 정제 단계에 의해 준비될 수 있다.

[0070] 여기에서 사용된 바와 같이, "성장 억제 물질"은 세포, 가령 STEAP-1-발현시키는 암 세포의 성장을 시험관 또는 생체내에서 억제하는 화합물 또는 조성물을 말한다. 따라서, 성장 억제 물질은 S 상에서 STEAP-1-발현 세포의 비율을 상당히 감소시키는 것이 될 수 있다. 성장 저해 물질의 예로는 세포 주기 진행(S상을 제외한 위치에서)을 차단하는 물질, 예, G1 억제 및 M-상 억제를 유도하는 물질을 포함한다. 고전적 M-상 차단물질은 빈카(빈크리스틴 및 빈블라스틴), 타산, 및 토포 II 억제형, 예를 들면, 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토평시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 억제시키는 이들 물질은 S-상 억제로 넘어갈 수 있는데, 예를 들면, 탐옥시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로에타민, 시스플라틴, 메토타렉세이트, 5-플루오르우라실 및 아라-C와 같은 DNA 알킬화제다. 추가 정보는 *The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13.*에서 볼 수 있을 것이다.

[0071] "자가사멸을 유도하는" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA 단편화, 세포 축소, 세포질 망상구조 팽창, 세포 단편화, 및/또는 막 소포(자가사멸체라고 부름) 형성으로 판단되는 예정된 세포 사멸을 유도하는 항체다. 세포는 항체가 결합하는 항원 (예, STEAP-1)을 발현시키는 세포다. 하나의 구체예에서, 세포는 종양 세포다. 예를 들면, 포스파티딜 세린(PS) 전좌(translocation)는 아넥신 결합에 의해 측정될 수 있고; DNA 단편화는 DNA 사다리(DNA laddering)를 통하여 평가될 수 있으며; DNA 단편화와 함께 핵/크로마틴 응축은 저이배수성(hypodiploid) 세포에서 임의의 증가를 통하여 평가될 것이다. 특정 구체예에서, 자가사멸을 유도하는 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현시키는 세포를 이용한 아넥신 결합 분석에서 처리안된 세포와 비교하여, 아넥신 결합 유도가 약 2 내지 50 배, 바람직하게는 약 5 내지 50 배, 및 가장 바람직하게는 약 10 내지 50 배 결합을 초래한다.

[0072] "치료"는 치료요법적 처치 및 보호적인 또는 예방 수단을 모두 포함한다. 이와 같은 치료를 요하는 개체들은 이미 질병을 가지고 있거나 이 질환을 예방하기 위한 개체가 포함된다. 따라서, 여기에서 치료될 환자는 해당 질환을 가지는 것으로 진단을 받은 또는 이 질환에 걸리기 쉬운 또는 민감한 개체가 될 수 있다.



- [0073] 용어 "암" 및 "암의"는 포유류에서 통제불능의 세포 성장으로 일반적으로 특징화되는 생리적 상태를 말하거나 이를 설명한다. 암의 예로는 암종, 림프종, 세포종(수질아세포종 및 망막모세포종 포함), 육종(지방육종 및 혈액 세포 육종), 신경내분비 종양(암양종 종양, 가스트린종 및 섬세포 암을 포함), 중피종, 신경초종(청각 신경 종 포함), 수막종, 선암, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프 악성을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이와 같은 암의 좀더 특별한 예로는 편평 세포 암 (예, 상피 편평세포 암), 소-세포 폐암, 비-소세포 폐암을 포함하는 폐암, 폐 선암 및 폐 편평상피암, 복막암, 간세포암, 위장내 암을 포함한 위 또는 복부 암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난 소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 직장결장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선암, 신 장 또는 신장부 암, 전립선 암, 외음암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 고환암, 식도암, 담즙관 종 양 뿐만 아니라 머리 및 목 암을 포함한다. 전립선암의 특이적 예로는 안드로겐 독립적 전립선암과 안드로겐 의 존적 전립선암을 포함한다.
- [0074] 용어 "유효량(effective amount)"은 환자의 질환을 치료하는데 효과적인 약물의 양을 지칭한다. 질환이 암인 경 우, 약물의 유효량은 암 세포 수를 감소시킬 수 있고; 종양 크기를 감소시킬 수 있으며; 암 세포가 주변 기관으 로 침윤하는 것을 억제하고(예, 어느 정도 느리게 하거나 바람직하게는 중단시킴); 종양 전이를 억제시키거나 (예, 어느 정도 느리게 하거나 바람직하게는 중단시킴); 종양 성장을 어느 정도 억제시키고; 및/또는 암과 관련 된 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화시킬 수 있다. 약물이 존재하는 암 세포의 성장을 억제시키거나(부분적으 로 또는 완전하게) 및/또는 존재하는 암세포를 사멸시킬 수 있는 점에서 약물은 세포증식억제성 및/또는 세포 독성이 될 수 있다. 유효량은 무진행 생존(progression free survival)을 연장시킬 수 있고, 목적하는 반응을 초래할 수 있다(부분적 반응(PR) 또는 완전한 반응(CR), 전반적인 생존 시간을 연장시키고 및/또는 하나 이상의 암 증상을 개선시킴).
- [0075] "STEAP-1-발현 암"은 이들 세포 표면에 존재하는 STEAP-1 단백질을 보유하는 세포를 포함하는 암이다. STEAP-1을 "과다발현"시키는 STEAP-1 발현 암은 동일한 조직 유형의 암이 아닌 세포와 비교하였을 때, 세포 표면에 서의 STEAP-1 수준이 훨씬 더 높은 암이다. 이와 같은 과다발현은 유전자 증폭 또는 증가된 전사 또는 해독이 원인이 될 수도 있다. STEAP-1 발현 (또는 과다발현)은 세포 표면에 존재하는 STEAP-1의 수준을 평가함으로써 (예, 면역조직화학 분석: IHC를 통하여) 진단 또는 예측 분석에서 결정될 수 있다. 대안으로, 또는 추가적으로, 세포에서 STEAP-1-인코딩 핵산을 *in situ* 하이브리드 반응(FISH; W098/45479, 1998년 10월 공개, 참고), 서든 블랏 또는 폴리메라제 체 반응(PCR) 기술, 예를 들면 실시간 정량적 PCR(RT-PCR)을 통하여 측정할 수 있을 것이 다. 순환하는 종양 세포(CTC) 표면에 존재하는 STEAP-1을 탐지함으로써 (예, Schaffer et al., Clin. Cancer Res. 13:2023-2029 (2007), 혈청과 같은 생물학적 유체내에 존재하는 STEAP-1을 측정하여 STEAP-1 발현도 연구 할 수 있을 것이다. 상기 분석과는 별도로, 당업자들은 다양한 생체내 분석을 이용할 수 있다. 예를 들면, 방사 성 동위 원소와 같은 탐지가능한 라벨로 직간접적으로, 선택적으로 라벨된 항체에 환자의 신체내 세포를 노출시 킬 수 있고, 환자의 세포에 항체 결합은 방사선 활성의 외부 스캐닝을 통하여 또는 항체에 이미 노출된 환자로부터 취한 생체검사를 분석함으로써, 평가될 수 있다.
- [0076] 여기에서 사용된 용어 "세포독성 물질"은 세포의 기능을 억제 또는 방해하거나 또는 세포 파괴의 원인이 되는 물질을 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위 원소(예, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> 및 Lu의 방사성 동위 원소), 화학치료제 및 독소 뿐만 아니라 소분자 독소 또는 세균, 곰팡이, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성이 있는 독소 및 이의 단편들 또는 변이체들을 포함한다.
- [0077] "화학치료제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학치료제의 예로는 티오테파 및 사이클로포스파미드 (CYTOXAN®)와 같은 알킬화물질; 부술판, 임프로술판 및 피포술판과 같은 알킬 술포네이트; 벤조도파, 카르보도 파, 카르보퀴논, 메투레도파 및 우레도파와 같은 아지리딘; 알프레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라 미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 프리메틸로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸멜라민; 아세토게닌(특 히, 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라하이드로코카나비놀(드로나비놀, MARINOL®); 베타-라파론; 라파롤; 콜치신; 베툴리닌 산; 캄포테신(합성 유사 포토테칸(HYCANTIN®), CPT-11 (이리노테칸, CAMPTOSAR®), 아세틸캄 포테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄포테신을 포함); 브리요스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도제레신, 카르 제레신 및 비제레신 합성 유사체를 포함); 포도필로토신; 포도필리닌산; 테니포시드; 크립토피신(특히 크립토피 신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CBI-TM1을 포함); 에루테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕틴; 스폰기스타틴; 클로람부칠, 클로나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스 파미드, 메클로에타민, 메클로에타민 옥시드 하이드로클로라이드, 멜파란, 노뱌비친, 페네스페린, 프레디무스틴, 트로포스파미드, 우라실 무스타드와 같은 질소 무스타드; 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 란임무스틴과 같은 니트로조우레아; 에네디네 항생제(예, 칼리케마이신, 특

히 칼리케아미신 감마 1I 및 칼리케아미신 오메가1I)(예, *Agnew, Chem Intl. Ed. Engl, 33: 183-186 (1994)*)와 같은 항생제; 디네미신 A를 포함하는 디네미신; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오키토지노스타틴 발색단(chromophores) 및 관련 크로모단백질 에네디네 항생제 발색단), 아클라시노미신, 악티노마이신, 오우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, 독소루비신(ADRIAMYCIN®), 몰포르노-독소루비신, 시아노몰포르노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사(DOXIL®), 리포솜성 독소루비신 TLC D-99 (MYOCET®), 폐결화된 리포솜성 독소루비신(CAELYX®), 및 대옥시독소루비신을 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 C와 같은 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 퀘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 지노루비신; 메토타렉세이트, 겐시타빈(GEMZAR®), 테가푸르(UFTORAL®), 카페시타빈(XELODA®), 에포틸론, 및 5-플루오로우라셀(5-FU)과 같은 대사결함물질; 데노프테린, 메토타렉세이트, 프레로프테린, 트리메트레세이트와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈, 6-멜캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플로스우리딘과 같은 피리미딘 유사체; 아미노글루테이미드, 미토탄, 트리로스타틴; 프로리닌산과 같은 엽산 보충제; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노베를리닌산; 에닐루우라실; 암사크린; 베스트라부칠과 같은 항-아드레날; 비산트렌; 에다트라세이트; 데포파민; 데메콜린; 디아지퀴논; 엘포르니틴; 엘리프티니움 아세테이트; 에토글루시드; 갈리움 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄신 및 안스미토신과 같은 메이탄시노이드; 미토구아존; 미토산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피르아루비신; 로소산트론; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체(*JHS Natural Products, Eugene, OR*); 라즈옥산; 리즈옥신; 시조피란; 스피로게르마니움; 테누아조닌산; 트리아지퀴논; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테세네스(특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피로프로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예, 파클리탁셀(TAXOL®), 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제형(ABRAXANE™), 및 도세탁셀(TAXOTERE®); 클로로안부칠; 6-티오구아닌; 멜캅토피린; 메토타렉세이트; 시스플라틴, 옥살플라틴 및 카르보플라틴과 같은 백금제형; 튜블린 중합으로 미소관 형성을 억제시키는, 빈블라스틴 (VELBAN®), 빈크리스틴(ONCOVIN®), 빈데신(ELDISINE®, FILDESIN®), 및 비노렐빈(NAVELBINE®)을 포함하는 빈카; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토산트론; 루코보빈; 노반트론; 에다트레세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소메라제 억제형 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 베사로텐(TARGRETIN®)을 포함하는, 레티논산과 같은 레티노이드; 클로드로네이트(예를 들면, BONEFOS® 또는 OSTAC®), 에티드로네이트(DIDROCAL®), NE-58095, 조레드로네산/조레드로네이트(ZOMETA®), 알렌드로네이트(FOSAMAX®), 마피드로네이트(AREDIA®), 티루드로네이트(SKELID®), 또는 리세드로네이트(ACTONEL®)와 같은 비스포스포네이트; 트록사시타빈(1,3-디옥솔란 뉴클레이스드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 비정상적인 세포 증식에 연루된 시그널 생성 경로에서 유전자의 발현을 억제시키는, 예를 들면, PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 상피 성장 인자 수용체 (EGF-R); THERATOPE® 백신 및 유전자 치료 백신, 예를 들면, ALLOVECTIN® 백신, LEUVECTIN® 백신, 및 VAXID® 백신; 토포이소메라제 1 억제형(예, LURTOTECAN®); rmRH (예, ABARELIX®); BAY439006 (소라페니브; Bayer); SU-11248 (Pfizer); 페리포신, COX-2 억제형(예, 셀레코시브 또는 에토티록시브), 프로테아좀 억제형(예, PS341); 보르테조미브(VELCADE®); CCI-779; 티피파르니브(R11577); 오라페니브, ABT510; Bcl-2 억제형, 예를 들면, 오블리메르센 나트륨(GENASENSE®); 피산트론; EGFR 억제형(하기 정의 참고); 티로신 키나제 억제형(하기 정의 참고); 및 상기 열거된 임의의 것들의 약리학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 두 개 이상의 조합물, 예, CHOP( 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 및 프레디니졸론의 복합 치료제의 약어), 및 FOLFOX(5-FU와 루코보린과 복합된 옥살플라틴(ELOXATIN™)의 치료 접생의 약어)을 포함한다.

[0078]

이 정의에는 또한 중앙에서 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 호르몬길항제 예, 항진제/길항제 프로파일의 혼합된 항-에스트로겐이 포함되는데, 예를 들면, 탐옥시펜(NOLVADEX®), 4-하이드록시탐옥시펜, 토레미펜(FARESTON®), 이독시펜, 드롤로옥시펜, 탈옥시펜(EVISTA®), 트리옥시펜, 케옥시펜 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절물질(SERMs) 예, SERM3; 항진 성질이 없는 순수한 항-에스트로겐, 예, 폴베스트란트(FASLODEX®), 및 EM800 (이와 같은 물질은 에스트로겐 수용체 (ER) 이형체화를 차단시키고, DNA 결합을 억제시키고, ER 턴오버를 증가시키고, 및/또는 ER 수준을 억압시킬 수 있다); 스테로이드성 아로마타제 억제형을 포함하는 아로마타제 억제형, 예, 포르메스탄 및 엑세메스탄(AROMASIN®), 및 비-스테로이드성 아로마타제 억제형, 예를 들면, 아나스트라졸(ARIMIDEX®), 레트로졸(FEMARA®) 및 아미노글루테이미드, 및 보로졸(RIVISOR®), 메게스트롤 아세테이트



트(MEGASE®), 파드로졸, 이미다졸을 포함하는 기타 아로마타제 억제제; 루프로리드(LUPRON® 및 ELIGARD®), 고세레린, 부세레린 및 트리프렐린을 포함하는 황체화호르몬-방출 호르몬 항진제; 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트와 같은 프로게스틴, 디에틸stil베스트롤 및 프레마린과 같은 에스트로겐 및 플루옥시메스테론, 모든 트란스테티논산 및 펜테티니드와 같은 안드로겐/레티노이드를 포함하는 성 스테로이드; 오나프리스톤; 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향-조절제(ERDs); 플루타미드, 니루타미드 및 비칼루타미드와 같은 항-안드로겐; 테스톨락톤; 및 상기 언급된 것들중 임의의 것의 약리학적 허용가능한 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 언급된 것들중 두 개 이상의 조합물을 포함한다.

[0079]

## II. 제형용 항체 및 면역공유제이트

[0080]

### (A) 방법 및 조성물

[0081]

하나의 측면에서, 본 발명에 따라 제조되는 치료 단백질은 Asp-Asp 모티프를 포함하는 단백질이다. 하나의 구체예에서, 치료 단백질은 항체 또는 면역공유제이트다. 이와 같은 항체 및 면역공유제이트는 다음과 같이 예시된다

[0082]

#### (i) 항원 선택 및 준비

[0083]

바람직하게는, 항체가 결합하는 항원은 단백질이며, 질환 또는 이상을 가진 포유류에게 항체를 투여하면 해당 포유류에서 치료 효과를 얻을 수 있다. 그러나, 비-폴리펩티드 항원(종양-연관된 글리코리피드 항원, US 특허 5,091,178 참고)에 대응하는 항체도 고려된다.

[0084]

항원이 폴리펩티드가면, 이는 막통과 분자(예, 수용체) 또는 성장 인자와 같은 리간드가 될 수 있다. 예시적인 항원은 레닌과 같은 분자들; 인간의 성장 호르몬 및 소의 성장 호르몬을 포함하는 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 리포단백질; 알파-1-안티트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 난포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성 호르몬; 글루카곤; 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자(TF), 및 본 빌레브란트(von Willebrands) 인자와 같은 응고 인자; 단백질 C와 같은 항-응고 인자; 심방 이노성 인자; 폐 계면활성제; 유로키나제 또는 인간 뇨 또는 조직-타입 플라스미노겐 활성화물질(t-PA)과 같은 플라스미노겐 활성화물질; 봄베신; 트롬빈; 조절 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 베타; 엔케팔리나제; RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); 인간 대식세포 염증 단백질(MIP-1-알파); 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민; 무엘레리안(Muellerian)-억제 물질; 레락신 A-사슬; 레락신 B-사슬; 프로레락신; 마우스 고키도프로핀-연합된 펩티드; 베타-락타메이즈와 같은 미생물 단백질; DNase; IgE; 세포독성 T-임파세포 연합된 항원 (CTLA), 가령 CTLA-4; 인히빈; 악티빈; 맥관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자의 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양성 인자 예, 소-유도된 신경영양성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 NGF-b와 같은 신경 성장 인자; 혈소판-유도된 성장 인자 (PDGF); aFGF 및 bFGF와 같은 섬유아세포 성장 인자; 상피 성장 인자 (EGF); TGF-알파 및 TGF-b2, TGF-b3, TGF-b4, 또는 TGF-b5를 포함하는 TGF-베타와 같은 형질변형 성장 인자 (TGF); TNF-알파 또는 TNF-베타와 같은 종양 괴사 인자 (TNF); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I(또는 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 및 CD40과 같은 CD 단백질; 에리트로포에틴; 골유도성 인자; 항체독소; 골 형성 단백질(BMP); 인터페론-알파, -베타, 및 -감마와 같은 인터페론; 콜로니 자극 인자(CSFs), 예, M-CSF, GM-CSF, 및 G-CSF; 인터루킨 (ILs), 예, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 및 IL-10; 슈퍼옥사이드 디스무타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 부식 가속화 인자; 바이러스 항원 예를 들면, AIDS 외피의 일부; 운반 단백질; 호밍(homing) 수용체; 어드레신(addressins); 조절 단백질; CD11a, CD11b, CD11c, CD18, 및 ICAM, VLA-4 및 VCAM과 같은 인테그린; 종양 연관된 항원 예, HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 및 상기 열거된 폴리펩티드중 임의의 것의 단편들을 포함한다.

[0085]

본 발명에 포함되는 항체를 표적하는 예시적인 분자는 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34 및 CD40과 같은 CD 단백질들; EGF 수용체, HER2, HER3 또는 HER4 수용체와 같은 ErbB 수용체 패밀리의 멤버들; CD20 또는 BR3과 같은 B 세포 표면 항원; DR5를 포함하는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리의 멤버; 전립선 세포 표면 항원들 예, Annexin 2, Cadherin-1, Cav-1, Cd34, CD44, EGFR, EphA2, ERGL, Fas, 헵신(hepsin), HER2, KAI1, MSR1, PATE, PMEPA-I, Prostatein, Prostein, PSCA, PSGR, PSMA, RTVP-1, ST7, STEAP-1, STEAP-2, TMPRSS2, TRPM2, 및 Trp-p8; 세포 흡착 분자들, 예, LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-I, VCAM, 알파4/베타7 인테그린, 및 알

과 또는 베타 소단위를 포함하는 알파v/베타3 인테그린(예, 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); VEGF와 같은 성장 인자 뿐만 아니라 이의 수용체; 조직 인자 (TF); TNF-알파 또는 TNF-베타, 알파 인터페론(알파-IFN)과 같은 종양 괴사 인자 (TNF); IL-8와 같은 인터루킨; IgE; 혈액균 항원; fik2/flt3 수용체; 비만(OB) 수용체; mp1 수용체; CTLA-4; 단백질 C 등을 포함한다.

[0087] 기타 분자들에 선택적으로 콘주게이트된 가용성 항원 또는 이의 단편들은 항체를 만드는 이뮤노겐으로 이용될 수 있다. 수용체와 같은 막통과 분자의 경우, 이들 단편들(예, 수용체의 세포외 도메인)은 이뮤노겐으로 이용될 수 있다. 대안으로, 막통과 분자를 발현시키는 세포는 이뮤노겐으로 이용될 수 있다. 이와 같은 세포들은 자연 상태의 소스(예, 암 세포계)로부터 유도되거나, 또는 막통과 분자를 발현시키기 위하여 재조합 기술에 의해 변형된 세포가 될 수 있다. 항체를 준비하는데 유용한 기타 항원 및 이의 형태는 당업자에게 명백할 것이다.

[0088] 항-STEAP-1 항체 생산을 위하여, STEAP-1 항원은 STEAP-1의 가용성 형태, STEAP-1의 세포외 루프, 또는 원하는 에피토프를 포함하는 이의 일부분이 될 수 있다. 대안으로, 세포 표면에서 STEAP-1를 발현시키는 세포 (예, STEAP-1을 인코딩하는 벡터로 형질변환된 293T 세포)는 항체를 만들기 위해 이용될 수 있다(예, *Challita-Eid et al. Cancer Res. 67:5798-805 (2007)*).

[0089] (ii) 단클론 항체

[0090] 단클론 항체는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득되는데, 예, 집단을 구성하는 개별 항체는 단클론항체를 생산하는 동안 발생할 수 있는 가망 변이체를 제외하고, 동일하거나 및/또는 동일한 에피토프에 결합한다. 따라서, 변형자 "단클론"은 개별 항체 혼합물이 아닌 항체의 성격을 나타낸다.

[0091] 예를 들면, 단클론 항체는 *Kohler et al, Nature, 256:495 (1975)*에서 처음으로 설명된 하이브리도마 방법에 의해 만들거나 또는 재조합 DNA 방법(U.S. 특허 No. 4,816,567)에 의해 만들 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 햄스터와 같은 적절한 숙주 동물을 면역화에 이용되는 단백질에 특이적으로 결합되는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 임파세포를 유도하기 위하여 상기에서 설명된 것과 같이 면역화시킨다. 대안으로, 임파세포를 시험관에서 면역화시킬 수 있다. 그 다음, 임파세포를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 융합제를 이용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 만든다(*Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)*).

[0092] 따라서, 준비된 하이브리도마 세포를 융합안된, 모계 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제시키는 하나 이상의 물질을 포함하는 바람직한 적절한 배양 배지에 접종시키고 성장시킨다. 예를 들면, 부모 골수종 세포가 효소 하이포산틴 구아닌 포스포리보실 전이효소(HGPRT 또는 HPRT)가 부족하다면, 하이브리도마용 배양 배지는 하이포산틴, 아미노프려티 및 티미딘(HAT 배지)을 포함할 것이며, 이들 물질이 HGPRT-결핍된 세포의 성장을 방해한다.

[0093] 바람직한 골수종 세포는 효과적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의해 안정적인 높은 수준의 항체 생산을 지원하고, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 세포다. 이들 가운데, 바람직한 골수종 세포는 뮤린 골수종계, 예, Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA에서 이용가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스, 및 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA에서 이용가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포들이 된다. 인간 단클론 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포계가 설명되어 있다(*Kozbor, J. Immunol, 133:3001 (1984)*; and *Brodeur et al, Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)*).

[0094] 항원에 대한 단클론항체의 생산에 대해 하이브리도마 세포가 성장한 배양 배지를 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단클론 항체의 결합 특이성은 면역침전 또는 시험관 결합 분석, 예를 들면 방사능면역분석(RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 분석(ELISA)에 의해 결정된다. 단클론항체의 결합 특이성은 *Scatchard analysis of Munson et al, Anal. Biochem., 107:220 (1980)*에 의해 결정될 수 있다.

[0095] 원하는 특이성, 친화력 및/또는 활성을 가진 항체를 생산하는 하이브리도마 세포가 확인되면, 제한된 희석과정에 의해 클론을 서브클론시키고, 표준 방법에 의해 성장시킨다(*Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)*). 이와 같은 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들면, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지다. 추가로, 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로 생체내에서 성장시킬 수도 있다. 서브클론에 의해 분비되는 단클론 항체는 통상의 항체 정제 과정, 예를 들면, 단백질 A-세파로즈, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화력 크로마토그래피와 같은 과정에 의해 배양 배지, 복수

액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.

- [0096] 단클론 항체를 인코딩하는 통상의 과정(뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용하여)을 이용하여 DNA를 바로 분리하고, 서열화시킨다. 하이브리도마 세포는 이와 같은 DNA의 바람직한 소스로 작용한다. 분리시킨 후, DNA를 발현 벡터내에 위치시키고, 재조합 숙주 세포에서 단클론 항체를 합성하기 위하여, 대장균, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 항체 단백질 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포안으로 형질감염시킬 수 있다. 박테리아에서 항체를 인코딩하는 DNA의 재조합 발현에 대한 검토 문헌은 *Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993)* and *Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992)*을 포함한다.
- [0097] 추가 구체예에서, 단클론 항체 또는 항체 단편들은 *McCafferty et al, Nature, 348:552-554 (1990)*에서 설명된 기술에 의해 생성된 항체 파아지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. *Clackson et al, Nature, 352:624-628 (1991)* 및 *Marks et al, J. Mol Biol, 222:581-597 (1991)*은 차례로 파아지 라이브러리를 이용하여 뮤린 및 인간 항체를 분리하는 것을 설명한다. 사슬 서플링에 의한 고친화력(nM 범위)의 인간 항체 생산(*Marks et al, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)*), 뿐만 아니라 복합 감염 및 매우 큰 파아지 라이브러리를 작제하기 위한 생체내 재조합 (*Waterhouse et al, Nuc. Acids. Res., 21 :2265-2266 (1993)*)이 설명되어 있다. 따라서, 이와 같은 기술들은 단클론 항체를 분리시키기 위한 전통적인 단클론 항체 하이브리도마 기술에 대해 실행가능한 변형이다.
- [0098] 또한, DNA는 상동성 뮤린 서열을 대신하여 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인의 코딩 서열로 대체시키거나(U.S. 특허 No. 4,816,567; 및 *Morrison, et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81 :6851 (1984)*), 또는 비-면역글로블린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부분을 면역글로블린 코딩 서열에 공유적으로 결합시켜, 변형시킬 수도 있다. 일반적으로, 이와 같은 비-면역글로블린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인에 대해 대체되거나 또는 항체의 하나의 항원-복합 영역의 가변 도메인에 대체되어, 키메라 이가(bivalent) 항체를 만들게 되는데, 이 항체는 항원에 특이성을 가지는 하나의 항원-복합 영역과, 상이한 항원에 특이성을 가지는 또 다른 항원-복합 영역을 포함한다.
- [0099] 단클론 항체 중쇄 및 경쇄, 또는 이의 일부분의 아미노산 서열은 대응하는 DNA 서열로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, VH, VL, 및/또는 하나 이상의 HVRs의 아미노산 서열을 확인할 수 있다.
- [0100] (iii) 인간화 항체
- [0101] 비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당분야에 설명되어 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 인간이 아닌 소스로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 이와 같은 비-인간 아미노산 잔기를 "이입(import)" 잔기라고 하고, 이는 "이입" 가변 도메인으로부터 일반적으로 취한다. 인간화(humanization)는 Winter 및 공동-작업자들(*Jones et al, Nature, 321 :522-525 (1986)*; *Riechmann et al, Nature, 332:323-327 (1988)*; *Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)*)의 방법에 따라 인간 항체의 대응 서열을 대신하여 초가변 영역 서열로 대체시켜 기본적으로 실시된다. 따라서, 이와 같은 "인간화된" 항체는 키메라 항체(U.S. 특허 No. 4,816,567)이며, 여기서 비-인간 종의 대응 서열에 의해 고유 인간 가변 도메인보다 실질적으로 적게 치환된다. 실제, 인간화된 항체는 일부 초가변 영역 잔기와 가능하다면 일부 FR 잔기가 설치류 항체에 있는 유사 영역의 잔기로 대체된 전형적으로 인간항체다.
- [0102] 인간화 항체를 만드는데 이용되는 인간 가변 도메인, 경쇄 및 중쇄의 선택은 항원성을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "best-fit" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지의 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝하였다. 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열은 인간화 항체에서 인간의 프레임워크부분(FR)으로 간주된다(*Sims et al., J. Immunol., 151 :2296 (1993)*; *Chothia et al, J. Mol. Biol, 196:901 (1987)*). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위 군의 모든 인간 항체의 컨센션스 서열로부터 유도된 특정 프레임워크 부분을 이용한다. 몇 가지 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크가 이용될 수 있다(*Carter et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)*; *Presta et al, J. Immunol, 151 :2623 (1993)*).
- [0103] 특정 구체예들에서, 항체는 항원에 대한 높은 친화력을 보유하고, 기타 우호적인 생물학적 성질을 가지도록 인간화된다. 이와 같은 목적을 이루기 위하여, 인간화된 항체는 부모 서열의 분석 과정과 부모 및 인간화된 서열의 3차원적 모델을 이용한 다양한 구상적 인간화된 산물의 분석 과정에 의해 준비된다. 3차원적 면역글로블린

모델은 시판되는 것을 이용할 수 있으며, 본 기술분야에 숙지된 자에게 잘 알려져 있다. 선택된 후보 면역글로블린 서열의 가능성있는 3차원 형태적 구조를 설명하고 보여주는 컴퓨터 프로그램이 있다. 이와 같은 디스플레이를 검사하여 후보 면역글로블린 서열의 기능에서 잔기의 역할, 예를 들면, 항원에 결합하는 후보 면역글로블린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 분석할 수 있다. 이와 같은 방식에서, 수용자로부터 FR 잔기를 선별하고, 복합하여, 서열을 이입시켜, 원하는 항체 특징들, 가령 표적 항원에 대한 증가된 친화력이 수득된다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합에 영향을 주는데, 대부분 직접적으로 및 실질적으로 관여한다.

[0104] 여기에서 인간화된 항체는 예를 들면, 인간 가변 중쇄 도메인에 통합된 비-인간 초가변 영역 잔기를 포함할 수 있으며, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)에서 제시한 가변 도메인 넘버링 시스템을 이용하여 69H, 71H 및 73H로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서 프레임워크 부분(FR) 치환을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 구체예에서, 인간화된 항체는 69H, 71H 및 73H 위치중 두 개 또는 모두에서 FR 치환을 포함한다.

[0105] 여기에서 특히 관심 대상이 되는 인간화 항체는 STEAP-1에 결합하고, Asp-Asp 모티프를 포함한다. WO 2008/052187는 HVR-H3에 Asp-Asp 모티프를 가지는 인간화된 항-STEAP-1 항체를 설명한다. HVR을 포함하는 이와 같은 항체의 VH 및 VL의 아미노산 서열이 여기에서 제공된다. WO 2008/052187에서 설명하고 있는 이와 같은 항체의 모든 구체예는 참고자료로 명백히 통합된다.

[0106] 본 출원은 또한 여기에서 설명된 임의의 항체로부터 유도된 친화력 성숙된 항체를 고려하는데, 이와 같은 친화력 성숙된 항체는 바람직하게는 Asp-Asp 모티프를 포함한다. 부모 항체는 여기에서 설명된 것과 같이 인간 항체 또는 인간화 항체가 될 수 있다. 다양한 형태의 인간화 항체 및 친화력 성숙된 항체를 고려한다. 예를 들면, 인간화 항체 또는 친화력 성숙된 항체는 Fab와 같은 항체 단편이 될 수 있는데, 이들은 면역곤주게이트를 만들기 위하여 불변 부분과 선택적으로 복합되거나 및/또는 하나 이상의 세포독성 물질과 곤주게이트된다. 대안으로, 인간화 항체 또는 친화력 성숙된 항체는 전장 항체, 예를 들면, 전장 IgG1 항체가 될 수 있으며, 이들 항체는 면역곤주게이트를 만들기 위하여 하나 이상의 세포독성 물질과 곤주게이트된다.

[0107] (iv) 인간 항체

[0108] 인간화에 대안으로, 인간 항체를 만들 수 있다. 예를 들면, 면역화시기에 내생 면역글로블린 생산 없이 완전한 인간 항체 레파토리를 만들 수 있는 이식유전자 동물(예, 마우스)의 생산이 현재 가능하다. 예를 들면, 키메라 생식계열 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 결합 부분(JH) 유전자의 동형접합성 결손으로 내생성 항체 생산이 완벽하게 억제된다는 것이 설명되었다. 이와 같은 생식계 돌연변이 마우스에서 인간 생식계 면역글로블린 유전자의 전이로 항원 도전시 인간 항체를 생산할 수 있을 것이다. 예, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 및 U.S. 특허 Nos. 5,591,669, 5,589,369 및 5,545,807 참고.

[0109] 대안으로, 파아지 디스플레이 기술을 이용하여(McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990)), 면역안된 제 공자로부터 면역글로블린 가변(V) 도메인 유전자 레파토리로부터 인간 항체 및 항체 단편들을 시험관에서 만들 수 있다. 이와 같은 기술에 따라, 항체 V도메인 유전자들을 M13 또는 fd와 같은 필라멘트형 박테리오파지의 주요 또는 소수 피복 단백질 유전자내로 인-프레임 클론시키고, 파아지 입자의 표면에 기능을 하는 항체 단편을 디스플레이시킨다. 필라멘트형 입자는 파아지 게놈의 단일-가닥 DNA 복사체를 포함하고 있기 때문에, 항체의 기능적 성질에 근거한 선택으로 이와 같은 성질들을 나타내는 항체를 인코딩하는 유전자를 선택하게 된다. 따라서, 파아지는 B 세포의 일부 성질을 모방한다. 파아지 디스플레이는 다양한 포맷으로 실행될 수 있는데; 이에 대한 검토는 예, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)을 참고한다. 파아지 디스플레이에 V-유전자 단편들의 몇 가지 소스가 이용될 수 있다. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)은 면역화된 마우스의 비장으로부터 유도된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 분리하였다. 면역안된 인간 제공자로부터 V 유전자 레파토리를 만들 수 있고, Marks et al., *J. Mol Biol.* 222:581-597 (1991), 또한 Griffith et al., *EMBOJ.* 12:725-734 (1993)에서 설명하고 있는 기술을 기본적으로 이용하여 항원의 다양한 배열(자가-항원 포함)에 대한 항체를 분리할 수 있다. U.S. 특허 No. 5,565,332 및 5,573,905 또한 참고. 상기에서 설명된 것과 같이, 인간-유도된 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 가변 도메인 서열을 공지의 인간 불변 도메인 서열과 복합시킬 수 있다. 상기에서 설명된 것과 같이, 인간 항체를 시험관에서 활성화된 B 세포에 의해 만들 수도 있다 (U.S. 특허 5,567,610 및 5,229,275).



[0110] (v) 항체 단편

[0111] 항체 단편을 생산하기 위한 다양한 기술들이 개발되어 왔다. 전통적으로, 이와 같은 단편은 전장 항체의 단백질 분해성 절단에 의해 유도된다(예, *Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); and *Brennan et al., Science*, 229:81 (1985)). 그러나, 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 이들 단편을 만들 수 있다. 예를 들면, 상기에서 논의된 바와 같이, 항체 파아지 라이브러리로부터 항체 단편을 분리시킬 수 있다. 대안으로, Fab'-SH 단편은 대장균(*E. coli*)으로부터 바로 회수하고, 화학적으로 결합시켜 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 만들 수 있다(*Carter et al., Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). 또 다른 방식에 따르면, F(ab')<sub>2</sub> 단편을 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 분리시킬 수 있다. 항체 단편을 만드는 다른 기술은 숙지된 기술자에게 명백할 것이다. 기타 구체예에서, 선택 항체는 단일 쇠 Fv 단편(scFv)이다. WO 93/16185; U.S. 특허 No. 5,571,894; U.S. 특허 No. 5,587,458 참고. 항체 단편은 또한 예를 들면, U.S. 특허 5,641,870에서 설명된 것과 같이 “선형(linear) 항체”가 될 수 있다. 이와 같은 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0112] (vi) 이중특이적 항체

[0113] 이중특이적 항체는 적어도 두 가지 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 가지는 항체다. 예시적인 이중특이적 항체는 STEAP-1 단백질의 두 가지 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 기타 이와 같은 항체는 STEAP-1 결합 영역을 또 다른 전립선 세포 표면 항원, 예, Annexin 2, Cadherin-1, Cav-1, Cd34, CD44, EGFR, EphA2, ERGL, Fas, 헵신, HER2, KAI1, MSR1, PATE, PMEPA-1, Prostatein, Prostein, PSCA, PSGR, PSMA, RTVP-1, ST7, STEAP-2, TMPRSS2, TRPM2, 및 Trp-p8에 대한 결합 영역과 복합시킬 수 있다(예, *Tricoli et al. Cancer Res.* 10:3943-3953 (2004) for listing of prostate cell surface antigens. 참고) 대안으로, 세포 방어 기전을 STEAP-1-발현 세포에 집중시키기 위하여, STEAP-1 팔(arm)을 T-세포 수용체 분자(예, CD2 또는 CD3), 또는 IgG의 Fc 수용체(FcγR) 예, FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) 및 FcγRIII(CD16)와 같은 백혈구세포상의 촉발 분자에 결합하는 팔(arm)과 복합시킬 수 있다. 이중특이적 항체를 이용하여 STEAP-1를 발현시키는 세포로 세포독성물질을 국소화시킬 수도 있다. 이와 같은 항체들은 STEAP-1-결합 팔과, 세포독성 물질(예, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리친 A 사슬, 메토크세이트 또는 방사성 동위 원소 합텐)에 결합하는 팔을 가진다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편(예, F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적 항체)으로 만들어질 수 있다.

[0114] 이중특이적 항체를 만드는 방법은 당분야에 공지된 것이다. 전장 이중특이적 항체를 만드는 전통적인 방법은 두 개의 면역글로블린 중쇄-경쇄 쌍의 공동 발현에 기초하며, 이때 두 개 쇠는 상이한 특이성을 가진다(*Millstein et al., Nature*, 305:537-539 (1983)). 유사한 과정이 WO 93/08829, 및 *Traunecker et al., EMBOJ.*, 10:3655-3659 (1991)에 설명되어 있다. 상이한 방법에 따라, 원하는 결합 특이성(항체-항원 복합 영역)을 가지는 항체가 변 도메인을 면역글로블린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2, 및 CH3 부분의 적어도 일부분을 포함하는 면역글로블린 중쇄 불변 도메인과 하는 것이다. 융합체중 적어도 하나에 존재하는 경쇄 결합에 필수적인 영역을 포함하는 제1중쇄 불변부분(CH1)을 보유하는 것이 바람직하다. 면역글로블린 중쇄 융합부 및 원하는 경우, 면역글로블린 경쇄를 인코딩하는 DNA들을 별도의 발현 벡터로 삽입시키고, 적절한 숙주 유기체 안으로 공동-형질감염시킨다. 이것은 구조에 이용된 세 가지 폴리펩티드 단편의 차등 비율이 최적 생산을 제공할 때, 구체예에서 세 가지 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는데 상당한 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 두 개의 폴리펩티드 쇠가 발현되면 높은 수율을 초래할 때 또는 비율이 특별한 의미가 없을 때, 한 개 발현 벡터에 두 개 또는 세 가지 모든 폴리펩티드 쇠에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0115] 이와 같은 방법의 바람직하나의 구체예에서, 이중특이적 항체는 한 쪽 팔에 제 1 결합 특이성을 가지는 하이브리드 면역글로블린 중쇄와 또 다른 팔에 하이브리드 면역글로블린 중쇄-경쇄 쌍(제 2 결합 특이성을 제공)으로 구성된다. 이와 같은 비대칭 구조는 원하지 않은 면역글로블린 사슬 복합물로부터 원하는 이중특이적 화합물을 분리할 수 있도록 하는데, 그 이유는 이중특이적 분자의 한 쪽 절반에만 면역글로블린 경쇄가 존재함으로써 용이한 분리 방법을 제공하기 때문이다. 이와 같은 방법은 WO 94/04690에서 설명되고 있다. 이중특이적 항체를 만드는 더 자세한 설명은 *Suresh et al., Methods in Enzymology*, 121 :210 (1986)을 참고한다.

- [0116] U.S. 특허 No. 5,731,168에서 설명하고 있는 또 다른 방법에 따르면, 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이형 이량체 비율을 최대화하기 위하여 항체 분자 쌍 사이에 경계면을 만들 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의 C<sub>H</sub>3 의 적어도 일부분을 포함한다. 이 방법에서, 제 1 항체 분자의 경계면에 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 더 큰 측쇄(예, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄(예, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄와 동일한 또는 유사한 크기의 상보적인 동공("cavities")이 제 2 항체 분자의 경계면에 만들어진다. 이는 동종이량체와 같은 기타 원하지 않는 최종 산물보다 이종이량체의 생산을 증가시키는 기전을 제공한다.
- [0117] 이중특이적 항체는 교차-연결된 또는 이중공유제이트("heferoconjugate") 항체를 포함한다. 예를 들면, 이중공유제이트에서 항체 중 하나는 아비딘에 결합될 수 있고, 다른 하나의 항체는 바이오틴에 결합될 수 있다. 이와 같은 항체들은 예를 들면 원하지 않는 세포에게 면역계 세포를 표적화 시키는데 (U.S. 특허 No. 4,676,980), 및 HIV 감염 치료에 제안되었다(WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089). 이중공유제이트 항체는 임의의 교차-연결 방법을 이용하여 만들 수 있다. 적절한 교차-연결제는 해당 분야에 잘 알려져 있으며, 다수의 교차-연결 기술과 함께 U.S. 특허 No. 4,676,980에 설명되어 있다.
- [0118] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 만드는 방법 또한 문헌에서 설명되고 있다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 화학적 링키지를 이용하여 준비될 수 있다 Brennan *et al*, *Science*, 229: 81 (1985)는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 만들기 위하여 전장 항체를 단백질 분해에 의해 절단시키는 과정을 설명한다. 이와 같은 단편들은 근접 디티올을 안정화시키고, 분자간 이황화결합 형성을 방지하기 위하여 아비산나트륨염에 복합된 디티올 존재하에 환원된다. 생성된 Fab' 단편들은 그 다음 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환된다. Fab'-TNB 유도체중 하나는 멸균 토에틸아민으로 환원되어 Fab'-티올로 다시 전환되고, 동일한 몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어, 이중특이적 항체가 형성된다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정을 위한 물질로 이용될 수 있다.
- [0119] 대장균(*E. coli*)으로부터 Fab'-SH 단편을 직접적으로 회수하기 위하여 최근 과정이 실행되었으며, Fab'-SH 단편들은 화학적으로 결합되어 이중특이적 항체를 형성할 수 있다. Shalaby *et al*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)는 완전한 인간화 이중특이적 항체 F(ab')<sub>2</sub> 분자의 생산을 설명한다. 각 Fab' 단편은 대장균(*E. coli*)으로부터 별도로 분비시키고, 시험관내에서 유도된 화학적 결합을 거치게 하여 이중특이적 항체를 만들었다. 따라서 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체 및 정상적인 인간 T 세포를 과다발현시키는 세포에 결합할 수 있고, 뿐만 아니라 인간의 유방 종양 표적에 대한 인간의 세포독성 림프구의 용혈 활성을 촉발시킬 수 있었다. 재조합 세포 배양물로부터 이중특이적 항체 단편을 직접 만들고, 분리시키는 다양한 기술들도 설명되었다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 루이신 지퍼를 이용하여 만들었다. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Fos 및 Jun 단백질의 루이진 지퍼 펩티드를 유전자 융합에 의해 두 가지 상이한 항체의 Fab' 부분에 링크시켰다. 항체 동종이량체를 힌지 부분에서 환원시켜 단량체를 만들었고, 다시 재-산화시켜 항체 이종이량체를 만들었다. 이 방법을 항체 동종이량체를 만들 때 이용할 수도 있다. Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)에 의해 설명된 디아바디("diabody") 기술은 이중특이적 항체 단편을 만드는 또 다른 기전을 제공하였다. 이 단편들은 동일한 체에서 두 개 도메인 사이에 쌍을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 따라서, 한 개 단편의 VH 및 VL 도메인은 또 다른 단편의 상보적 VL 및 VH 도메인과 쌍을 이루도록 강요되고, 따라서, 두 개의 항원-결합 영역이 형성된다. 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 이용한 이중특이적 항체 단편을 만드는 또 다른 방법도 보고되었다. Gruber *et al*, *J. Immunol*, 152:5368 (1994) 참고.
- [0120] 두 개 이상의 원자가를 가진 항체들도 고려된다. 예를 들면, 삼중특이적 항체를 만들 수도 있다. Tutt *et al*. *J. Immunol*. 147: 60 (1991).
- [0121] (vii) 기타 아미노산 서열 변형
- [0122] 여기에서 설명된 항체의 아미노산 서열 변형도 고려된다. 예를 들면, 항체의 결합 친화력 및/또는 기타 생물학적 성질을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 인코딩하는 핵산에 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입시켜 만들거나, 또는 펩티드 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이와 같은 변형은 예를 들면, 항체의 아미노산 서열로부터 잔기의 결손 및/또는 이 서열에 잔기의 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구조물이 원하는 성질을 가진다면 결손, 삽입, 및 치환의 임의의 조합을 만들어 최종 산물에 이른다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 영역 번호 또는 위치를 변경시키는 것과 같은 항체의 해독후-프로세싱을 변경시킬



수 있다.

[0123] 돌연변이를 위한 바람직한 위치가 되는 항체의 특정 잔기 또는 부분을 확인하는 유용한 방법은 Cunningham and Wells Science, 244: 1081-1085 (1989)에서 설명되고 있는 알라닌 스캐닝 돌연변이생성("alanine scanning mutagenesis")이라고 한다. 여기에서, 표적 잔기 또는 잔기 군이 확인되고(예, Arg, Asp, His, Lys, 및 Glu와 같은 전하를 띤 잔기) 및 중성 또는 음전하를 띤 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어, 항원 예, STEAP-1 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 준다. 치환에 기능적 민감도를 설명하는 이들 아미노산 위치는 치환 영역에 추가 또는 또 다른 변이체를 도입함으로써 세밀하게 된다. 따라서, 아미노산 서열 변이가 도입되는 부분이 사전 결정되고, 돌연변이 자체 성질은 사전 결정될 필요가 없다. 예를 들면, 주어진 위치에서 돌연변이 기능을 분석하기 위하여 Ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 생성을 표적 코돈 또는 부분에서 실행하고, 원하는 활성에 대해 발현된 항체 변이체를 스크리닝한다.

[0124] 아미노산 서열 삽입은 한 개 잔기 부터 백개 또는 그 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩티드 범위 길이의 아미노-및/또는 카르복시- 말단 융합 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입도 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 가진 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 기타 삽입 변이체는 효소(예, ADEPT에 대한) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 항체의 N-또는 C-말단 융합을 포함한다.

[0125] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체다. 이와 같은 변이체는 항체에서 상이한 잔기로 대체된 적어도 한 개의 아미노산 잔기를 가진다. 치환성 돌연변이 형성에 대한 최대 관심 영역은 초가변 영역을 포함하지만, FR 또는 Fc 부분 변이도 고려된다. 표 1에서 “바람직한 치환”이라는 제목으로 보존성 치환을 나타낸다. 하나 이상의 생물학적 성질(예, 안정성 또는 효과)을 변화시키지만 기타 성질(예, 항원 특이성)은 변화시키지 않는 치환이 만들어질 수 있다. 바람직한 치환으로 원하는 성질을 가진 항체가 만들어진다면, 표 1에서 “예시적인 치환”으로 표시된 또는 아미노산 부류와 관련하여 하기에서 추가적으로 설명되는 것과 같이 실질적인 변화가 도입될 수 있으며, 더 개선된 성질에 대해 항체를 스크리닝한다.

표 1

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

[0126]

[0127]

항체의 생물학적 성질의 실질적인 변형은 (a) 예를 들면, 쉬트 또는 헬릭스 형태의 치환 영역에서 폴리펩티드 기본골격 구조의 유지, (b) 표적 영역에서 분자의 전하 또는 소수성 또는 (c) 측쇄의 부피에 영향에서 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 이루어진다. 아미노산들은 이들 측쇄의 성질의 유사성에 따라 하기 군으로 분류될 수 있다(*in A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)*):

[0128]

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

[0129]

(2) 전하를 띄지 않는 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0130]

(3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0131]

(4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His(H)

[0132]

대안으로, 자연 발생적 잔기들은 공통의 측쇄 성질에 근거하여 하기 군으로 분류될 수 있다:

[0133]

(1) 소수성: 노르루이신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0134]

(2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

- [0135] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0136] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0137] (5) 쇠 방향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0138] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0139] 비-보존적 치환은 이들 부류중 하나의 구성원이 또 다른 부류의 구성원으로의 교환되는 것이다.
- [0140] 항체의 적절한 형태를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는 일반적으로 세린으로 치환되어, 분자의 산화 안정성을 개선시키고, 비정상적인 교차결합을 방지할 수 있다. 역으로, 시스테인 결합이 항체에 추가되어 항체의 안정성 (특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우)을 개선시킬 수 있다.
- [0141] 하나의 구체예에서, 치환에 의한 변이체는 부모 항체에서 하나 이상의 추가변 영역 잔기의 치환을 포함한다. 일반적으로 추가 개발을 위하여 선택된 생성 변이체들은 이들이 유래된 부모 항체와 비교하여 개선된 생물학적 성질을 가질 수 있다. 치환에 의한 변이체를 만드는 통상적인 방법은 파아지 디스플레이를 이용한 친화력 돌연변이를 포함한다. 간략하게 설명하면, 몇 가지 추가변 영역 (예, 6-7 영역)가 돌연변이되어 각 영역에서 모든 가능한 아미노산 치환을 만든다. 따라서, 생성된 항체 변이체는 각 입자내 패키징된 M13의 유전자 III 산물에 융합체로 필라멘트성 파아지 입자로부터 단가(monovalent) 방식으로 디스플레이된다. 그 다음, 이들의 생물학적 활성(예, 결합 친화력)에 대해 파아지-디스플레이된 변이체를 여기에서 설명되는 것과 같이 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 추가변 영역을 확인하기 위하여, 알려진 스캐닝 돌연변이생성을 실행하여 항원 결합에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 대안으로, 또는 추가적으로, 항체 및 이의 항원 사이에 접촉점을 확인하기 위하여, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 것이다. 이와 같은 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 여기에서 설명되는 기술에 따라 치환용 후보가 된다. 일단 이와 같은 변이체들이 만들어지면, 여기에서 설명된 것과 같이 변이체 패널은 스크리닝을 받게 되며, 하나 이상의 관련 분석에서 우수한 성질을 가지는 항체들이 추가 개발을 위해 선택될 것이다.
- [0142] 항체의 또 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 고유 글리코실화 패턴을 변경시킨다. 변경(altering)이란 항체에서 볼 수 있는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 결손, 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 영역의 추가를 의미한다.
- [0143] 항체의 글리코실화는 일반적으로 N-링크된 또는 O-링크된 것이다. N-링크는 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 모이어티를 부착시키는 것을 말한다. 3개 펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (이때, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 모이어티의 효소적 부착을 위한 인지 서열이 된다. 따라서, 폴리펩티드에서 이와 같은 삼가펩티드 서열의 존재는 잠재적인 글리코실화 영역을 만든다. O-링크된 글리코실화는 하이드록시아미노산, 가장 흔하게는 세린 또는 트레오닌 (단, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신도 이용될 수는 있지만)에 N-아세틸갈락토사민, 갈락토즈, 또는 크실로즈 슈가중 하나의 부착을 의미한다.
- [0144] 항체에 글리코실화 영역의 추가는 항체가 상기 설명된 삼가펩티드 서열중 하나 이상을 포함하도록(N-링크된 글리코실화 영역을 위하여) 아미노산 서열을 변경시켜 통상적으로 실시된다. 고유의 항체에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 추가 또는 치환(O-링크된 글리코실화 영역을 위하여)에 의해 변화를 만들 수도 있다.
- [0145] 항체가 Fc 부분을 포함하는 경우, 여기에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 예를 들면, 항체의 Fc 부분에 부착된 퓨코스가 없는 성숙한 탄수화물 구조를 가진 항체는 US 특허 출원 US 2003/0157108 A1, *Presta, L.*에서 설명되어 있다. US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) 또한 참고. 항체의 Fc 부분에 부착된 탄수화물에서 양분된 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)를 가진 항체들은 WO 03/011878, *Jean-Mairet et al.* 및 US 특허 No. 6,602,684, *Umana et al*에서 참고한다. 항체의 Fc 부분에 부착된 올리고사카라이드에 적어도 한 개의 갈락토즈 잔기를 가진 항체는 WO97/30087, *Patel et al.*에서 보고된다. 항체의 Fc 부분에 부착된 변경된 탄수화물을 가진 항체와 관련하여 WO 98/58964 (*Raju, S.*) 및 WO 99/22764 (*Raju, S.*)을 참고. Fc 부분에 부착된 이와 같은 탄수화물 구조를 가진 주요 종(species) 항체를 포함하는 항체 조성물도 고려된다.
- [0146] 항체의 아미노산 서열 변이체를 인코딩하는 핵산 분자를 본 기술분야에 공지된 다양한 방법을 이용하여 준비한다. 이와 같은 방법들은 천연 소스로부터 분리(자연 발생적 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오타이드 매개된(또는 영역-직접적인) 돌연변이 생성에 의한 준비, 및 항체의 미리 준비된 변이체 또는 비-변이체 형태를 카세트 돌연변이 생성에 의한 준비를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0147] (viii) 시스테인 조작된(engineered) 항체
- [0148] 하나의 측면에서, 본 발명의 항체는 시스테인 조작된 항체(또한 ThioMAbs라고도 함)을 포함하는데, 이때 부모 항체에서 하나 이상의 아미노산은 WO 2006/034488 (전문이 참고문헌에 통합된다)에서 설명된 것과 같이, 자유 시스테인 아미노산으로 대체된다. 시스테인 조작된 항체는 0.6 내지 1.0 범위의 티올 반응성 값을 가지는 하나 이상의 자유 시스테인 아미노산을 포함한다. 자유 시스테인 아미노산은 부모 항체에서 조작된 그러나 이황화 다리의 일부가 아닌 시스테인 잔기다. 시스테인 조작된 항체는 예를 들면, 말레이미드 또는 할로아세틸을 통하여 조작된 시스테인 영역에 세포독성 및/또는 이미지 화합물을 부착시키는데 유용하다. 말레이미드 기에 Cys 잔기의 티올 기능성의 친핵성 반응성은 리신 잔기의 아미노 기 또는 N-말달 아미노기와 같은 단백질에서 임의의 기타 아미노산 반응성과 비교하여 약 1000 배 높다. 요오드아세틸 및 멜레이미드 시약에서 티올 특이적 기능성은 아민기와 반응할 수 있지만, 더 높은 pH(>9.0) 및 더 긴 반응 시간을 요구한다 (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London).
- [0149] 시스테인 조작된 항체들은 암치료에 유용하고, 세포 표면 및 막통과 수용체, 및 종양-연합된 항원 (TAA)에 대한 항체 특이성을 포함한다. 이와 같은 항체는 네이키드(naked) 항체(약물 또는 라벨 모이어티에 콘쥬게이트안된) 또는 항체-약물 콘쥬게이트(ADC)(소위 면역콘쥬게이트라고도 부름)로 이용될 수 있다. 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 티올-반응성 시약과 영역-특이적 및 효과적으로 결합될 수 있다. 티올-반응성 시약은 다기능성 링커 시약, 캡처 라벨 시약, 형광단 시약 또는 약물-링커 중간물질이 될 수 있다. 시스테인 조작된 항체는 탐지가능한 라벨로 라벨되거나, 고정상 서포트에 고정되거나 및/또는 약물 모이어티와 콘쥬게이트될 수 있다. 임의 항체에 대해 티올 반응성은 일반화될 수 있는데, 이때 아미노산이 반응성 시스테인 아미노산으로 치환은 아미노산 범위 L-10 내지 L-20; L-38 내지 L-48; L-105 내지 L-115; L-139 내지 L-149; 및 L-163 내지 L-173에서 선택된 경쇄내에서 이루어지거나: 아미노산 범위 H-35 내지 H-45; H-83 내지 H-93; H-114 내지 H-127 및 H-170 내지 H-184에서 선택된 중쇄내 범위에서 이루어지거나: 및 H-268 내지 H-291; H-319 내지 H-344; H-370 내지 H-380; 및 H-395 내지 H-405범위에서 선택된 Fc 부분에서 이루어지며, 아미노산 위치의 넘버링은 Kabat 넘버링 시스템의 1에서 시작하며(Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) 및 WO 2006/034488에서 설명된 것과 같이 연속적으로 지속된다. 특정 구체예에서, 아미노산을 시스테인으로 치환은 EU 넘버링에 따라 중쇄의 A118(예, A118C) 및/또는 Kabat 넘버링에 따라 경쇄의 V205(예, V205C)에서 있을 수 있다. 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3와 같은 항체의 특정 도메인에 대해 티올 반응성이 일반화될 수 있다. 티올 활성이 0.6 또는 그 이상을 초래하는 시스테인 치환은 IgG 하위부류 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2을 포함하는 고유 항체 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM의 각각의 중쇄 불변 도메인  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , 및  $\mu$ 에서 만들어질 수 있다. 이와 같은 항체 및 이들의 용도는 WO 2006/034488에서 설명되고 있다.
- [0150] 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 바람직하게는 부모 항체의 항원 결합 능력을 적어도 어느 정도 보유한다. 따라서, 시스테인 조작된 항체는 바람직하게는 항원에 결합할 수 있다. 이와 같은 항원들은 예를 들면, 종양-연합된 항원(TAA), 세포 표면 수용체 단백질 및 기타 세포 표면 분자들, 막통과 단백질, 신호발생 단백질, 세포 생존 조절 인자, 세포 증식 조절 인자, 조직 발생 또는 분화와 연관된 분자(예, 조직 발생 또는 분화에 기능적으로 기여하는 것으로 알려진 또는 기여하는 것으로 짐작되는), 림포카인, 사이토킨, 세포 주기 조절에 관련된 분자, 맥관(vasculogenesis) 형성에 관련된 분자 및 혈관생성(angiogenesis)에 관련된 분자(혈관생성에 기능적으로 기여하는 것으로 알려진 또는 기여하는 것으로 짐작되는)를 포함한다.
- [0151] 본 발명의 항체는 기타 티올-반응성 물질과 콘쥬게이트될 수 있는데, 이때 반응기는 예를 들면, 말레이미드, 요오드아세트아미드, 피리딜 디설파이드 또는 기타 티올-반응성 콘쥬게이트 짝이 된다(Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1 :2; Hermanson, G. in *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). 짝은 세포독성 물질 (예, 독소루비신 또는 백일해 독소와 같은 독소), 플로레신 또는 로다민과 유사한 형광 염료와 같은 형광단, 영상 또는 방사선치료 금속, 펩티드 또는 비-펩티드 라벨 또는 탐지 태그에 대한 킬레이트제, 또는 폴리에틸렌 글리콜의 다양한 이성체와 같은 제거-변형제 (clearance-modifying agent), 제3성분, 기타 탄수화물 또는 친지성 물질에 결합하는 펩티드가 될 수 있다.

- [0152] (ix) 원하는 성질을 가진 항체의 스크리닝
- [0153] 항체를 만드는 기술들을 상기에서 설명하였다. 원하는 특정 생물학적 성질을 가진 항체를 추가 선택할 수 있다.
- [0154] 예를 들면, 세포 표면상에 STEAP-1에 결합하는 항체를 면역조직화학, FACs 또는 임의의 적절한 기술을 이용하여 확인할 수 있다. STEAP-1에 결합하고, 생체내 종양 성장을 억제시키는 항체는 *Challita-Eid et al. Cancer Res. 67:5798-5805 (2007)*에서 설명하는 것과 같은 분석을 이용하여 확인할 수 있다. 간단히 설명하면, 환자로 부터 유도된 안드로젠 의존성 전립선암 이종이식편 LAPC-9AD 또는 방광암 UM-UC-3 이종이식편을 포함하는 SCID 마우스를 항-STEAP-1 항체 (또는 이와 같은 항체를 포함하는 면역콘주게이트)로 처리하고, 효과를 평가하기 위하여 종양 용적 및/또는 PSA 수준을 측정한다. STEAP-1에 결합하고, STEAP-1 매개된 세포간 소통을 차단하는 항체는 *Challita-Eid, supra*에서 설명한 것과 같은 분석을 이용하여 확인할 수 있다. 간단하게, 제공자 및 수용자 PC3 세포에 적절한 제공자 및 수용자 염료를 로딩시키고, 색의 변화에 의해 탐지되는 세포간 소통을 허용하기 위하여 혼합한다.
- [0155] (x) 면역콘주게이트
- [0156] 본 발명은 세포독성 물질, 가령 화학치료제, 독소(예, 소분자 독소 또는 세균, 곰팡이, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성이 있는 독소, 이들의 단편 및/또는 변이체 포함) 또는 방사성 동위 원소(예, 방사선콘주게이트)에 콘주게이트된 면역콘주게이트와 또한 관련된다.
- [0157] 이와 같은 면역콘주게이트를 만드는데 유용한 화학치료제는 상기에서 설명하였다. 항체와 예, 칼리케아미신, 메이탄신(U.S. 특허 No. 5,208,020), 트리코텐, 및 CC1065와 같은 하나 이상의 소분자 독소의 콘주게이트 또한 여기에서 고려된다.
- [0158] 본 발명의 하나의 구체예에서, 항체는 하나 이상의 메이산틴 분자(예, 항체 분자당 약 1개 내지 약 10개의 메이탄신)에 콘주게이트된다. 메이탄신은 예를 들면, May-SS-Me으로 전환되고, May-SH3으로 환원되고, 변형된 항체와 반응되어(*Chari et al. Cancer Research 52 : 127-131 (1992)*) 메이탄시노이드-항체 면역콘주게이트가 생성될 수 있다.
- [0159] 또 다른 면역콘주게이트는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 콘주게이트된 항체를 포함한다. 항생제의 칼리케아미신 패밀리는 피코몰 이하의 농도에서 이중-가닥 DNA 브레이크(breaks)를 만들 수 있다. 사용되는 칼리케아미신의 구조적 유사체는  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-아세틸- $\gamma_1^I$ , PSAG 및  $\Theta_1^I$ (*Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993)* and *Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)*)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. US 특허 No. 5,714,586; 5,712,374; 5,264,586; 및 5,773,001 또한 참고(참고문헌에 통합된다).
- [0160] 사용될 수 있는 효소적으로 활성이 있는 독소 및 이의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터), 리친 A 사슬, 아브린 A 사슬, 도데친 A 사슬, 알파-사르신, 알루리라이트 포르디(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제형, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제형, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 참고 WO 93/21232 (1993년 10월 28일자 공개).
- [0161] 본 발명은 항체와 핵 절단 활성이 있는 화합물(예, 데옥시리보뉴클레아제와 같은 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역콘주게이트를 추가 고려한다. 본 발명은 항체와 방사성 동위 원소 사이에 형성된 면역콘주게이트를 추가 고려한다. 다양한 방사성 동위 원소들이 방사선콘주게이트 항체를 생산하는데 이용된다. 예로는  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$  및 Lu의 방사성 동위 원소를 포함한다.
- [0162] 또 다른 구체예에서, 종양 사전표적화(tumor pretargeting)에 이용하기 위하여 항체는 "수용체" (스트렙토아비딘과 같은)에 콘주게이트될 수 있는데, 이때 항체-수용체 콘주게이트를 환자에게 투여하고, 제거제를 이용하여 순환계로부터 결합안된 콘주게이트를 제거하고, 세포독성 물질에 콘주게이트된 "리간드" (예, 아비딘)를 투여한다.
- [0163] 항체 및 세포독성 물질의 콘주게이트는 예, N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트(SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이기능기 유도체(예, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르(예, 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드(예, 글루타레알데



히드), 비스-아지도 화합물(예, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예, 톨리에네 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물(예, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)과 같은 다양한 이기능성 단백질 결합제를 이용하여 만들 수 있다. 예를 들면, 리친 면역독소는 *Vitetta et al. Science* 238: 1098(1987)에서 설명된 것과 같이 준비될 수 있다. 탄소-14-라벨된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체에 방사선뉴클레오타이드 콘쥬게이트를 위한 예시적인 킬레이트 물질이다. WO94/11026 참고. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 실시하는 “절단가능한 링커”가 될 수 있다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 펩티다제-민감한 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드-함유 링커 (*Chari et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992))가 이용될 수 있다.

[0164] 일반적으로, 펩티드-계 약물 모이어티는 두 개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이에 펩티드 결합을 형성시켜 만들 수 있다. 이와 같은 펩티드 결합은 펩티드 화학 분야에 잘 알려진 액상 합성 방법(*E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press*)에 따라 준비될 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티들은 US 5635483; US 5780588; *Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465*; *Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277*; *Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725*; and *Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863*의 방법에 따라 준비될 수 있다. 또한, *Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784*; "*monomethylvaline Compounds capable of Conjugation to Ligands*", US 특허 출원 공개 2005-0238649 A1도 참고(참고문헌에 통합된다; 예, 링커 및 링커에 콘쥬게이트된 MMAE 및 MMAF와 같은 모노메틸발린 화합물을 준비하는 방법을 설명).

# [0165] 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0166] 일부 구체예에서, 면역콘쥬게이트는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 콘쥬게이트된 본 발명의 항체(전장 또는 단편)를 포함한다.

[0167] 메이탄시노이드는 튜블린 중합을 억제시키는 작용을 하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타(*Maytenus serrata*)로부터 처음 분리되었다(U.S. 특허 No. 3896111). 그 후, 특정 미생물이 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르와 같은 메이탄시노이드를 생산한다는 것을 발견하였다(U.S. 특허 No. 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 이의 유도체 및 유사체들은 예를 들면, U.S. 특허 No. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에서 설명되고 있다.

[0168] 메이탄시노이드 약물 모이어티는 항체 약물 콘쥬게이트에서 매력적인 약물 모이어티가 되는데, 그 이유는 (i) 발효, 화학적 변형, 발효 산물의 유도화에 의해 준비하는데 상대적으로 용이하며, (ii) 디설파이드가 아닌 링커를 통하여 항체에 콘쥬게이트시키는데 적절한 기능기로 유도화시킬 수 있으며, (iii) 혈장에서 안정적이며, (iv) 다양한 종양 세포계에 효과가 있기 때문이다.

[0169] 메이탄시노이드 약물 모이어티로 이용하기에 적합한 메이탄신 화합물들은 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 공지된 방법에 따라 자연 소스로부터 분리시킬 수 있으며, 유전공학 기술을 이용하여 만들 수 있고(*Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973* 참고), 또는 공지의 방법에 따라 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체를 만들 수 있다.

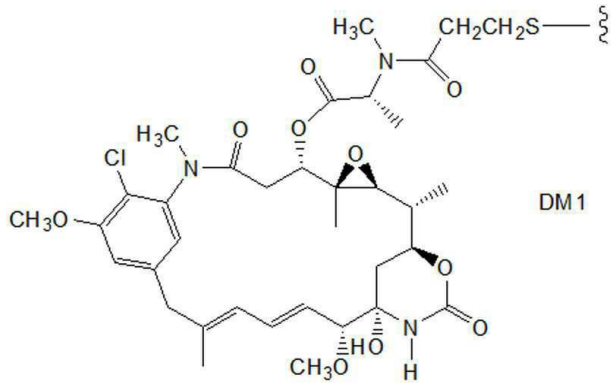
[0170] 예시적인 메이탄시노이드 약물은 변형된 방향족 고리를 가진 것들을 포함하며, 가령: C-19-테클로로(US 4256746) (안사미토신 P2의 리튬 알루미늄 수소화물 환원에 의해 준비됨); C-20-하이드록시(또는 C-20-데메틸) +/-C-19-테클로로(US Pat. No. 4361650 및 4307016) (스트렙토미세스 또는 악티노미세스를 이용한 메틸제거에 의해 준비되거나 또는 LAH를 이용한 염소제거에 의해 준비됨); 및 C-20-데메톡시, C-20-아실옥시 (-OCOR), +/-테클로로(U.S. Pat. No. 4,294,757) (아실 클로라이드를 이용한 아실화에 의해 준비됨); 및 다른 위치에서의 변형을 가지는 것들을 포함한다.

[0171] 예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 또한 다음과 같은 변형을 가지는 것들도 포함하는데, 예, C-9-SH (US 4424219) (메이탄시놀과 H<sub>2</sub>S 또는 P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>와 반응에 의해 준비됨); C-14-알콕시메틸 (데메톡시/CH<sub>2</sub>OR)(US 4331598); C-14-하이드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH<sub>2</sub>OH 또는 CH<sub>2</sub>OAc) (US 4450254) (*Nocardia*로부터 준비됨); C-15-하이드록시/아실옥시(US 4,364,866) (스트렙토미세스에 의해 메이탄시놀의 전환으로 준비됨); C-15-메톡시(US Pat. No. 4,313,946 및 4,315,929) (트레위아 누들플로라(*Trewia nudiflora*)로부터 분리시킴);

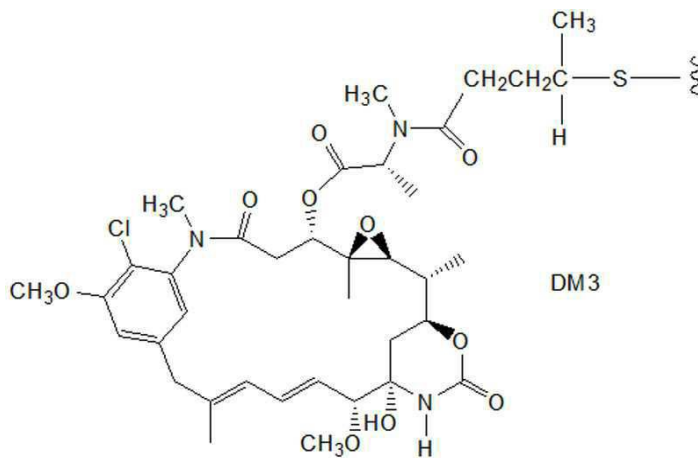


C-18-N-데메틸 (US Pat. No. 4,362,663 및 4,322,348) (스트렙토미세스에 의해 메이탄시놀의 메틸제거에 의해 준비됨); 및 4,5-데옥시(US 4371533) (메이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드/LAH 환원에 의해 준비됨).

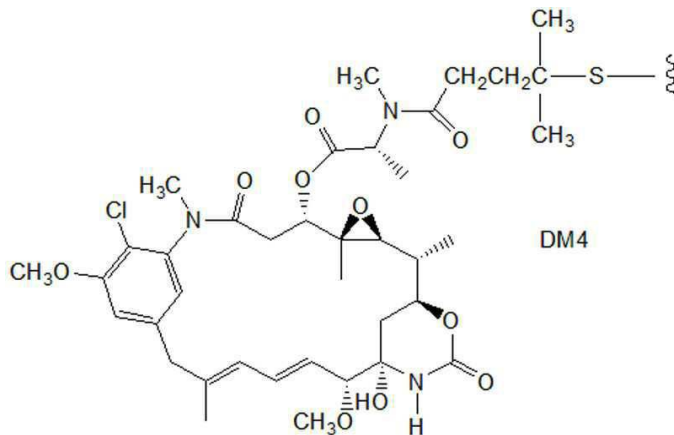
[0172] 메이탄시노이드 약물 모이어티의 예시적인 구체예들은 다음의 구조를 가지는 DM1; DM3; 및 DM4을 포함한다:



[0173]



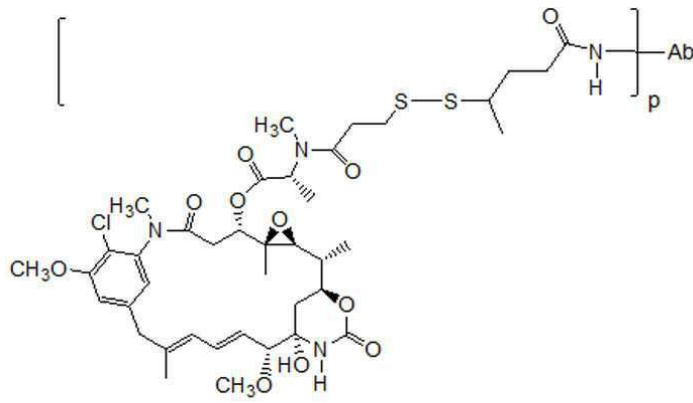
[0174]



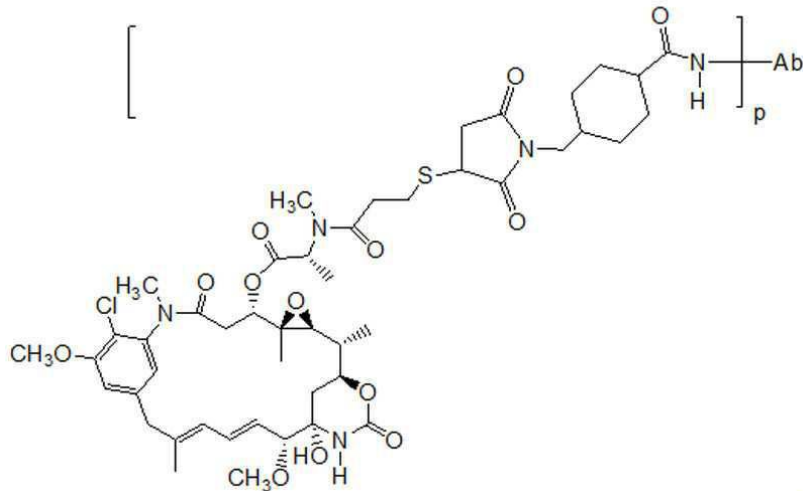
[0175]

[0176] 이때, 물결선은 항체 약물 콘쥬게이트의 링커(L)에 약물의 황 원자의 공유결합에 의한 부착을 나타낸다. DM1에 SMCC에 의해 링크된 HERCEPTIN® (트라스투주마브)가 보고되었다(WO 2005/037992, 전문이 참고문헌에 통합된다). 본 발명의 항체 약물 콘쥬게이트는 여기에서 설명된 과정에 따라 준비될 수 있다.

[0177] 기타 예시적인 메이탄시노이드 항체 약물 콘쥬게이트는 다음의 구조 및 약어를 가진다(이때 Ab는 항체가 되며, p 는 1 내지 약 8이다):

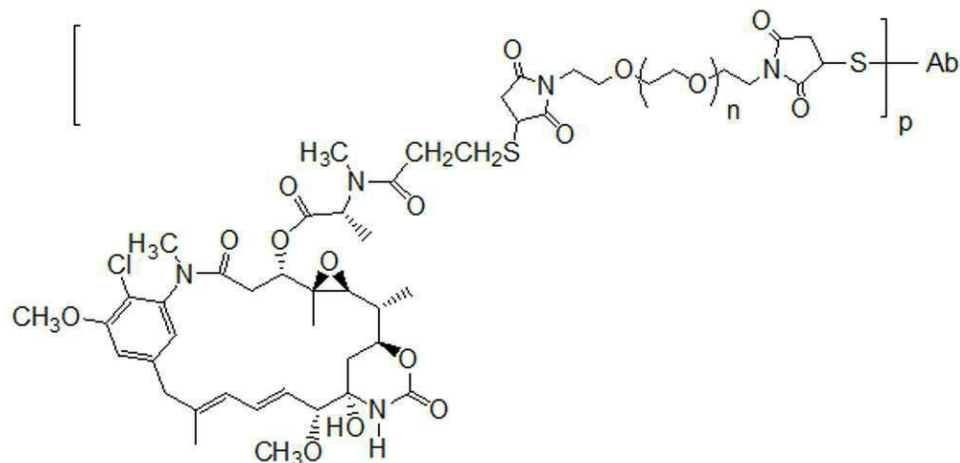


Ab-SPP-DM1



Ab-SMCC-DM1

항체의 티올기에 BMPEO 링커를 통하여 DM1이 연결된 예시적인 항체 약물 콘쥬게이트는 다음의 구조 및 약어를 가진다:



이때, Ab 는 항체이며; n은 0, 1, 또는 2가 되며; p는 1, 2, 3, 또는 4가 된다.

메이탄시노이드를 포함하는 면역콘쥬게이트, 이를 만드는 방법, 이의 치료요법적 용도는 예를 들면, U.S. 특허 No. 5,208,020; 5,416,064; 6,441,163 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에서 설명하고 있으며, 이들의 전문은 참고문헌에 통합된다. *Liu et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)* 는 인간의 직장결장암에 대한 단클론 항체 C242에 링크된 DM1으로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역콘쥬게이트를 설명한다. 이 콘쥬게이트는 배양된 결장암 세포에 대해 매우 독성이 높은 것으로 밝혀졌으며, 생체내 종양 성장 분석에서 항종양 활성을 나타내었다. *Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)* 은 메이탄시노이드가 인간의 결장암 세포 표면에 있는 항원에 결합하는 뮤린 항체 A7에 디설파이드 링커를 통하여 콘쥬게이트되거나 또는 HER-2/neu 은코겐에 결합하는 다른 뮤린 단클론 항체 TA.1에 콘쥬게이트된 면역콘쥬게이트를 설명한다. 세포당  $3 \times 10^5$  HER-2

표면 항원을 발현시키는 인간의 유방암 세포계 SK-BR-3 상에서 시험관에서 TA.1-메이탄시노이드 콘쥬게이트의 세포 독성을 테스트하였다. 약물 콘쥬게이트는 자유 메이탄시노이드 약물과 유사한 수준의 세포독성을 가지며, 항체 분자당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시키면 증가될 수 있다. A7-메이탄시노이드 콘쥬게이트는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타내었다.

[0183] 항-STEAP-1 항체-메이탄시노이드 콘쥬게이트는 바람직하게는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 심각하게 줄이지 않으면서, 메이탄시노이드 분자에 항체를 화학적으로 연결시켜 준비한다. 예, U.S. 특허 No. 5,208,020 참고(이 내용은 여기 참고문헌에 통합된다). 항체 분자당 콘쥬게이트되는 평균 3-4개 메이탄시노이드 분자가 항체의 기능 또는 용해도에 부정적으로 영향을 주지 않으면서 표적 세포의 세포 독성을 강화시키는데 효과가 있는 것으로 나타났지만, 한 개 분자의 독소/항체도 네이키드 항체를 사용한 경우보다는 세포독성을 강화시키는 것으로 예측된다. 메이탄시노이드는 본 기술 분야에 잘 알려진 것이며, 공지 기술에 의해 합성될 수 있거나 천연 소스로부터 분리시킬 수 있다. 적절한 메이탄시노이드는 예를 들면, U.S. 특허 No. 5,208,020 및 기타 특허 및 여기에서 언급된 비-특허 공개자료에서 설명되고 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀 및 다양한 메이탄시놀 에스테르와 같이, 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형이 있는 메이탄시놀 유사체다.

[0184] 항체-메이탄시노이드 콘쥬게이트를 만들기 위하여 본 발명 분야에 공지된 많은 연결(linking) 군이 있으며, U.S. 특허 No. 5,208,020, 6,441,163, 또는 EP 특허 0 425 235 B1, *Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)*, 및 US 2005/0169933 A1에서 설명된 것들을 포함하며, 이들 내용은 참고문헌에 통합된다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드는 U.S. 특허 출원 11/141344, (2005년 5월 31일자 출원됨, "*Antibody Drug Conjugates and Methods*")에서 설명된 것과 같이 준비될 수 있다. 연결군은 상기 언급된 특허들에서 명시된 것과 같이, 디설파이드 군, 티오에테르 군, 산-불안정 군, 광-불안정 군, 펩티다제 불안정 군 또는 에스테라제 불안정 군을 포함한다. 추가적인 연결군을 설명하며, 여기에서 예를 든다.

[0185] 항체 및 메이탄시노이드의 콘쥬게이트는 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란(IT), 이미노에스테르의 이기능성 유도체(예, 디메틸 아디피테이트 HCl), 활성 에스테르(예, 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드(예, 글루타알데히드), 비스-아지도 화합물(비스(p-아지도벤조일) 헥사디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플로린 화합물(예, 1,5-디폴로오르-2,4-디니트로벤젠)과 같은 다양한 이기능성 단백질 결합제(링커)를 이용하여 만들 수 있다. 바람직한 결합제는 디설파이드 링커를 제공하기 위하여 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP) (*Carlsson et al, Biochem. J. 173:723-737 (1978)*) 및 N-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오) 펜타노에이트(SPP)를 포함한다.

[0186] 링커는 연결 타입에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들면, 에스테르 링커지는 통상적인 결합 기술을 이용하여 하이드록시 기와 반응에 의해 만들어질 수 있다. 반응은 하이드록시기를 가진 C-3 위치, 하이드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 하이드록시메틸로 변형된 C-15 위치 및 하이드록시메틸로 변형된 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직하나의 구체예에서, 링커지는 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

[0187] 하나의 구체예에서, 본 발명의 임의의 항체(전장 또는 단편)는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 콘쥬게이트된다. 면역콘쥬게이트의 하나의 구체예에서, 세포독성 물질 D는 메이탄시노이드 DM1, DM3, 또는 DM4가 된다. 면역콘쥬게이트의 이와 같은 하나의 구체예에서, 링커는 SPDP, SMCC, IT, SPDP, 및 SPP로 구성된 군으로부터 선택된다.

#### [0188] 아우리스타틴(Auristatin) 면역콘쥬게이트

[0189] 특정 바람직하나의 구체예에서, 면역콘쥬게이트는 도라스타틴 또는 도로스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 아우리스타틴(US 특허 No. 5635483; 5780588)에 콘쥬게이트된 항체를 포함한다. 도라스타틴 및 아우리스타틴은 미소관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 간섭하는 것으로 밝혀졌고(*Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584*), 및 항암(US 5663149) 및 항곰팡이 활성(*Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965*)을 가진다. 도라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복시) 말단을 통하여 항체에 부착될 수 있다(WO 02/088172).

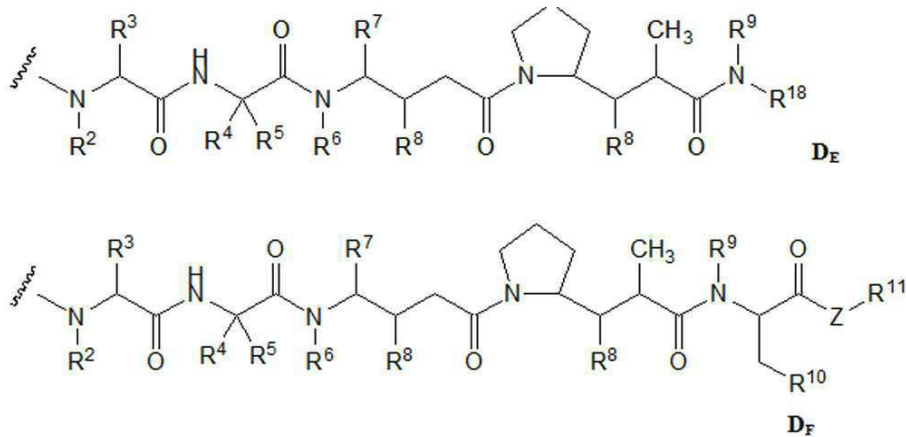
[0190] 예시적인 아우리스타틴 구체에는 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US 특허 출원 공개 2005-0238649 A1(이의 내용들은 전문이 참고문헌에 통합된다)에서 설명된 N-말단 링크된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 D<sub>E</sub> 및 D<sub>F</sub>를 포함한다. 추가 구체예에서, 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티는 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 및 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)를 포함한다.

[0191] 추가 구체예에서, 식 Ab-(L-D)<sub>p</sub>를 가지는 면역콘쥬게이트가 제공되는데, 이때:

[0192] (a) Ab는 항체이며,

[0193] (b) L은 링커이고;

[0194] (c) D는 식 D<sub>E</sub> 또는 D<sub>F</sub>의 약물이며;



[0195]

[0196] 이때, R<sup>2</sup> 및 R<sup>6</sup>는 각각 메틸이며,

[0197] R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup>는 각각 이소프로필이며,

[0198] R<sup>7</sup>는 sec-부틸이며,

[0199] 각 R<sup>8</sup>는 CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, OH, 및 H가 되며;

[0200] R<sup>9</sup>는 H가 되며;

[0201] R<sup>10</sup>는 아릴이며;

[0202] Z 는 -O- 또는 -NH-가 되며;

[0203] R<sup>11</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬이거나 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>가 되며; R<sup>18</sup>는 -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-아릴이며;

[0204] (d) p는 약 1 내지 8의 범위가 된다.

[0205] 예시적인 링커 성분(L)은 다음의 하나 또는 조합을 포함한다:

[0206] MC = 6-말레이미도카프로일

[0207] Val-Cit 또는 "vc" = 발린-시트룰린(프로테아제 절단가능한 링커에 예시적인 이가펩티드)

[0208] 시트룰린= 2-아미노-5-우레도 펜타논산

[0209] PAB = p-아미노벤조일옥시카르보닐 (스스로 희생시키는("self immolative") 링커 성분의 예)

[0210] Me-Val-Cit = N-메틸-발린-시트룰린 (이때, 링커 펩티드 결합은 변형되어 카텝신 B에 의해 절단되지 않는다)

[0211] MC(PEG)6-OH = 말레이미도카프로일-폴리에틸렌 글리콜(항체 시스테인에 부착될 수 있다).

[0212] 추가 구체예에서, 링커는 항체에 있는 티올기를 통하여 항체에 부착된다(예, ThioMAb). 하나의 구체예에서, 링커는 프로테아제에 의해 절단될 수 있다. 하나의 구체예에서, 링커는 val-cit 이가펩티드다. 하나의

구체예에서, 링커는 p-아미노벤질 유닛을 포함한다. 하나의 구체예에서, p-아미노벤질 유닛은 약물과 링커에서 프로테아제 절단 영역 사이에 배치된다. 하나의 구체예에서, p-아미노벤질 유닛은 p-아미노벤질옥시카르보닐(PAB)이다. 하나의 구체예에서, 링커는 6-말레이미도카프로일을 포함한다. 하나의 구체예에서, 6-말레이미도카프로일은 항체와 링커에서 프로테아제 절단 영역 사이에 배치된다. 상기 구체예는 단독으로 만들어지거나 또는 다른 것과 임의 조합으로 만들어질 수 있다.

[0213] 추가 구체예에서, 약물은 다음에서 선택된다:

[0214] MMAE = 모노메틸 아우리스타틴 E (MW 718)

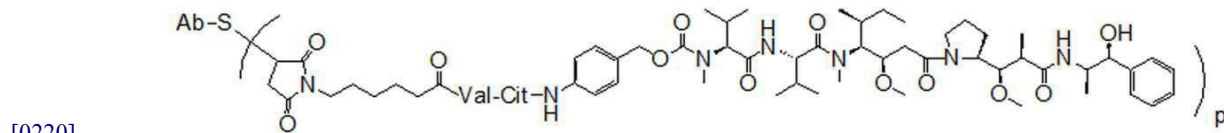
[0215] MMAF = 약물 (MW 731.5)의 C-말단에서 페닐알라닌을 가지는 아우리스타틴 E (MMAE)의 변이체

[0216] MMAF-DMAEA = C-말단 페닐알라닌 (MW 801.5)에 아마이드 링커지의 DMAEA (디메틸아미노에틸아민)를 가지는 MMAF

[0217] MMAF-TEG = 페닐알라닌에 에스테르화된 테트라에틸렌 글리콜을 가지는 MMAF

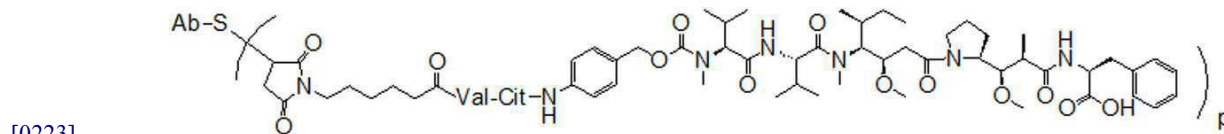
[0218] MMAF-NtBu = MMAF의 C-말단에 아마이드로 부착된 N-t-부틸

[0219] 특정 구체예들에서, 약물은 MMAE 및 MMAF로부터 선택된다. 하나의 구체예에서, 면역콘주게이트는 다음 구조를 가진다:



[0221] 이때, Ab는 항체이며, S는 황원자가 되며, p는 2 내지 5가 된다. 이와 같은 구체예에서, 면역콘주게이트는 Ab-MC-val-cit-PAB-MMAE로 명명된다. 또 다른 구체예에서, 면역콘주게이트는 Ab-MC-MMAE가 된다.

[0222] 또 다른 구체예에서, 면역콘주게이트는 다음의 구조를 가진다:



[0224] 이때, Ab는 항체이며, S는 황원자가 되며, p는 2 내지 5가 된다. 이와 같은 구체예에서, 면역콘주게이트는 Ab-MC-val-cit-PAB-MMAF로 명명된다. 또 다른 구체예에서, 면역콘주게이트는 Ab-MC-MMAF이다.

[0225] (xi) 기타 항체 변형

[0226] 항체의 기타 변형도 고려된다. 예를 들면, 항체는 다양한 비-단백질성 폴리머, 예, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌 또는 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체에 연결될 수 있다. 또한, 항체는 코아세르베이션(coacervation) 기술에 의해 또는 경계면(interfacial) 중합반응(예, 차례로, 하이 드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메트아크릴레이트) 마이크로캡슐)에 의해 준비된 마이크로캡슐에 포집되거나, 콜로이드성 약물 운반 시스템(예를 들면, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐), 또는 마크로에멀전에 포집될 수도 있다. 이와 같은 기술은 *Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)*에서 설명되어 있다.

[0227] 항체의 항원 의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 강화시키기 위하여, 효과물질 기능에 대해 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 Fc 부분에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입시키면 이와 같이 될 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로, 시스테인 잔기를 Fc 부분에 도입시키면, 이에 따라 이 부분에서 사슬간 이황화결합 형성이 허용된다. 따라서, 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내화 능력 및/또는 증가된 보체-매개된 세포 사멸 및 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)을 가질 수 있다. Caron et al, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). 강화된 항-종양 활성을 가진 동종이량체 항체를 Wolff et al. *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)에서 설명된 것과 같이, 이중기능성 교차-링커를 이용하여 만들 수도 있다. 대안으로, 이중 Fc 부분을 가지도록 항체를 조작할 수 있



고, 따라서, 강화된 보체 용해 및 ADCC 능력을 보유할 수 있다. *Stevenson et al. Anti-Cancer drug Design 3:219-230 (1989)* 참고.

- [0228] W000/42072 (*Presta, L.*)는 인간의 효과물질 세포 존재하에 개선된 ADCC 기능을 가지는 항체를 설명하는데, 이때 항체는 이의 Fc 부분에 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는, 개선된 ADCC를 가지는 항체는 Fc 부분의 위치 298, 333, 및/또는 334에 치환을 포함한다. 바람직하게는, 변형된 Fc 부분은 이들 위치중 하나, 둘, 또는 세 개에서 치환을 포함하거나 치환으로 구성된 인간 IgG1 Fc 부분이 된다.
- [0229] 변형된 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 가지는 항체는 W099/51642, US 특허 No. 6,194,551B1, US 특허 No. 6,242,195B1, US 특허 No. 6,528,624B1 및 US 특허 No. 6,538,124 (*Idusogie et al*)에서 설명되고 있다. 이 항체는 항체의 Fc 부분의 하나 이상의 위치 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 및/또는 334에서 아미노산 치환을 포함한다.
- [0230] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위하여, 예를 들면, US 특허 5,739,277에서 설명된 것과 같이, 항체(특히, 항체 단편)에 구출(salvage) 수용체 결합 에피토프를 통합시킬 수도 있다. 여기에서 설명된 것과 같이, "구출 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 것을 담당하는 IgG 분자 (예, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 부분의 에피토프를 말한다. Fc 부분에 치환을 가지고, 혈청 반감기가 증가된 항체 또한 W000/42072 (*Presta, L.*)에서 설명되어 있다.
- [0231] 세 개 이상의(바람직하게는 4개) 기능적 항원 결합 영역을 가진 조작된 항체도 고려된다(US 출원. US2002/0004587 A1, *Miller et al.*).
- [0232] 여기에서 설명된 항체는 면역리포솜으로 조제될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 당분야에 공지된 방법에 의해 준비되는데, 예를 들면, *Epstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); U.S. Pat. Nos. 4,485,045 및 4,544,545; 및 W097/38731 (1997년 10월 23일자 공개됨)*에서 설명되고 있다. 순환 시간이 강화된 리포솜은 U.S. 특허 No. 5,013,556에 설명되고 있다.
- [0233] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물로 역상 증발 방법으로 만들 수 있다. 원하는 직경의 리포솜을 만들기 위하여 한정된 포어 크기를 가진 필터를 통하여 리포솜을 압출시킨다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편을 이황화결합 상호교환 반응을 통하여 *Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)*에서 설명된 것과 같이 리포솜에 콘주게이트시킬 수 있다. 화학치료제가 리포솜내에 선택적으로 포함될 수 있다. *Gabizon et al. J. National Cancer Inst.81(19)1484 (1989)*.
- [0234] **(B) 예시적인 항체 및 면역콘주게이트**
- [0235] Asp-Asp 모티프를 포함하는 항체(예, 단클론 항체)를 여기에서 설명된 제형로 이용하는 것을 특별히 고려한다. 예를 들면, 항체는 VH 또는 VL의 임의 부분에 Asp-Asp 모티프를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, Asp-Asp 모티프는 HVRs중 임의의 것을 포함하나 이에 한정되지 않은 항원 결합에 영향을 주는 부분에 발생되며, 특정 구체예들에서, HVR-H3에서 발생된다.
- [0236] 하나의 구체예에서, Asp-Asp 모티프를 포함하는 항체는 항-STEAP-1 항체이다. WO 2008/052187은 HVR-H3에 Asp-Asp 모티프를 포함하는 예시적인 항-STEAP-1 항체를 제공한다. WO 2008/052187에서 설명된 것과 같은 이와 같은 항체들의 모든 구체예는 참고문헌에 통합된다. 이들 항체들중 VH 및 VL의 아미노산 서열은 도 2a 및 2b에서 제공된다. 이들 항체중 일부의 HVR의 아미노산은 아래에 제공된다:
- [0237] HVR-L1 : KSSQSLLYRSNQKNYLA (서열 번호: 11)
- [0238] HVR-L2: WASTRES (서열 번호: 12)
- [0239] HVR-L3: QQYYNYPRT (서열 번호: 13)
- [0240] HVR-H1 : GYSITSDYAWN (서열 번호: 14)
- [0241] HVR-H2: GYISNSGSTSYNPSLKS (서열 번호: 15)
- [0242] HVR-H3: ERNYDYDDYYAMDY (서열 번호: 16)



- [0243] WO 2008/052187에서 설명하고 있는 임의의 항체를 포함하는 제형은 본 발명에서 분명히 고려된다.
- [0244] 특정 구체예들에서, 항-STEAP-1 항체는 HVRs중 임의의 것을 포함하나 이에 한정되지 않은 항원 결합에 영향을 주는 부분에 Asp-Asp 모티프를 포함하며, 특정 구체예들에서, HVR-H3를 포함한다. 하나의 구체예에서, 항-STEAP-1 항체는 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3를 포함한다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 항-STEAP-1 항체는 (a) 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 ; (c) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (d) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (e) 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 하나 이상의 HVR을 추가로 포함한다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 항체는 (a) 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0245] 특정 구체예들에서, 항-STEAP-1 항체는 중쇄 가변 영역 (VH)를 포함하는데, 이때, VH는 서열 번호: 8-10으로부터 선택된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체예에서, 항체는 경쇄 가변 영역 (VL)를 추가로 포함하는데, 이때, VL은 서열 번호: 5-6으로부터 선택된 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 상기 구체예에서, HVR-H3에서 Asp-Asp 모티프는 보존된다. 상기 VH의 임의의 구체예에서, VH는 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3와, 선택적으로 (a) 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; 및 (b) 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2으로부터 선택된 적어도 하나의 HVR을 포함한다. 상기 VL 의 임의의 구체예에서, VL은 (a) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 한 개, 두 개 또는 세 개의 HVR을 포함한다. 특정 구체예들에서, VH 및 VL은 도 2a와 2b에서처럼 쌍을 이룰 수 있는데, 예, 서열 번호:5와 서열 번호:8, 및 서열 번호:6 과 서열 번호:9 또는 서열 번호: 10이 쌍을 이룬다.
- [0246] 상기에서 설명하는 임의의 면역곤주게이트에 이용되는 예시적인 항체는 여기에서 설명된 항-STEAP-1 항체가 된다. 바람직한 항-STEAP-1 항체 및 면역곤주게이트 (ThioMAb 면역곤주게이트를 포함) 또한 WO 2008/052187에 설명되고 있으며, 이는 참고문헌에 통합된다. 이와 같은 면역곤주게이트를 포함하는 제형은 분명히 본 발명에서 고려된다. 특정 구체예들에서, 상기 항-STEAP-1 항체들중 임의의 것은 세포독성 물질에 곤주게이트된다. 하나의 구체예에서, 세포독성 물질은 아우리스타틴이다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 아우리스타틴은 MMAE 또는 MMAF이다.
- [0247] **III. 예시적인 제형**
- [0248] 본 발명은 Asp-Asp 모티프를 가지는 치료 단백질을 포함하는 제형에 적어도 부분적으로 관련되며, 이때 제형은 Asp-Asp 모티프에서 Asp 잔기의 아스파르트산 이성체화를 억제시키는 pH를 가진다.
- [0249] 하나의 측면에서, Asp-Asp 모티프를 가지는 치료 단백질을 포함하며, 제형의 pH가 6.0 이상, 9.0 미만인 제형이 제공된다. 하나의 구체예에서, pH는 6.0 이상, 8.0 미만이다. 또 다른 구체예에서, pH는 6.25 이상, 7.5 미만이다. 또 다른 구체예에서, pH는 6.25 이상, 7.0 미만이다. 또 다른 구체예에서, pH는 6.5 이상, 7.5 미만이다. 또 다른 구체예에서, pH는 6.5 이상, 7.0 미만이다. 또 다른 구체예에서, pH는 약 6.5이다. 또 다른 구체예에서, pH는 6.0-9.0 범위내에 있으며, 이 범위의 시작 및 종료점은 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 및 9.0 으로부터 선택되며, 출발 점은 pH 종료점보다는 더 낮다.
- [0250] 특정 치료 단백질의 특별히 적합한 pH 또는 pH 범위는 다양한 pH에서 Asp-Asp 모티프를 포함하는 치료 단백질을 만들고, 단백질의 안정성을 최적화시키는 pH를 선택함으로써 실험적으로 결정될 수 있다. 예를 들면, Asp-Asp 이성체화를 최대로 억제시키는 pH (예, 염기성 pH)는 바람직하지 못한 수준의 탈아미드화, 응집 및 단편화를 유도할 수 있는 반면, 탈아미드화, 응집, 및 단편화를 최소화시키는 pH (예, 산성 pH)는 바람직하지 못한 수준의 Asp-Asp 이성체화를 유도할 수 있다. 따라서, 단백질의 안정화를 최적화시키는 pH는 이와 같은 분해성 프로세스의 균형화에 의해 이루어질 수 있다. 여기에서 교시되는 내용에 근거하여, 이와 같은 pH는 상기에서 제공된 범위에 속하는 것으로 예상되며, 여기에는 약간의 산성 및 염기성 pH가 포함된다.

- [0251] 특정 구체예들에서, Asp-Asp 모티프를 포함하는 치료 단백질에서 아스파르트산 이성체화를 억제시키는 방법이 제공되는데, 이때 제형에 치료 단백질이 포함되며, 이 방법은 제형의 pH를 단백질에서 아스파르트산 이성체화를 억제시키는데 충분한 pH로 상승시키는 것을 포함한다. 이와 같은 pH는 상기에서 설명된 것중 임의의 것이 될 수 있다. 아스파르트산 이성체화는 출발 pH에서 관찰된 이성체화와 비교하여, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 억제될 수 있다. 특정 구체예들에서, Asp-Asp 모티프를 포함하는 치료 단백질에서 아스파르트산 이성체화를 억제시키는 방법이 제공되는데, 이 방법은 여기에서 제공된 상기 구체예 중 일부에서 제공된 것과 같이, 제형안에 치료 단백질을 유지시키는 것을 포함한다. 상기 특정 구체예에서, 제형의 pH가 5.5인 경우 이성체화 수준과 비교하여, 제형의 pH가 6.5일 때 치료 단백질에서 아스파르트산 이성체화가 억제되었다. 치료 단백질은 항체가 될 수 있는데, 예, 여기에서 제공되는 임의의 항-STEAP-1 항체 또는 이의 ADC가 될 수 있다. 제형은 여기에서 설명된 제형이 될 수 있다.
- [0252] 예, 여기 실시예에서 설명된 것과 같은 질량 분석법, 펩티드 메핑, 전자 전달 해리-질량 분석법, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)의 다양한 분석적인 방법을 이용하여, Asp-Asp 이성체화를 결정할 수 있다. 제형 안에서 치료 단백질의 탈아미드화, 응집 및/또는 단편화는 *Daugherty et al., Advanced Drug Delivery Reviews 58:686-706 (2006)*에서 살펴본 바와 같은 분석 방법에 의해 결정될 수 있다. 탈아미드화, 응집 및/또는 단편화를 평가하는 예시적인 방법은 하기에서 더 제공된다.
- [0253] 실온에서 백색 형광아래 흑백 배경에 대해 샘플의 색, 외양 및 투명도를 관찰하여 응집(aggregation)을 평가할 수 있다. 추가적으로, 제형(희석된 또는 희석되지 않은)의 UV 흡수도를 이용하여 응집을 평가할 수 있다. 하나의 구체예에서, UV 흡수도는 278 nm 및 320 nm에서 HP 8453 분광 광도계상에 1cm 통로 길이를 가진 석영 큐벳에서 측정된다. 320 nm의 흡수도를 이용하여 더 큰 응집체, 버블 및 입자로 인한 배경 광 산란을 교정한다. 제형 완충액에 대한 측정은 생략한다. 단백질 농도는  $1.65 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 의 흡수성을 이용하여 결정된다.
- [0254] 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 전하 변이체에서 변화를 측정할 수 있다. 하나의 구체예에서, 이 분석은 HP 1100™ HPLC 시스템상에서 DIONEX PROPAC WCX-10™ 컬럼을 이용한다. 샘플은 pH 7.9에서 20mM HEPES를 포함하는 이동 상 A에 의해 1 mg/mL로 희석된다. 30-50  $\mu\text{L}$ 의 희석된 시료를 40℃에 유지된 컬럼에 로딩한다. 20 mM HEPES, 200 mM NaCl를 포함하는 이동상 B, pH 7.9를 이용하여 약한 NaCl 그라디언트로 피크를 용리시킨다. 280 nm에서 용리액을 모니터한다. HP CHEMSTATION™ 소프트웨어(Rev B.01.03 또는 더 새것)를 이용하여 데이터를 분석한다.
- [0255] 제형에서 Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편의 순도는 모세관 구역 전기영동법(CZE)으로 결정될 수 있다. 이 분석은 BIOCAP XL™ 모세관, 50  $\mu\text{m}$  LD., 44.6 cm 전체 길이 및 감지기까지 40 cm가 되는 BIORAD BIOFOCUS™ 3000™ 모세관 전기영동 시스템에서 실시될 수 있다.
- [0256] 크기 압출 크로마토그래피는 응집 및 단편을 정량화시키는데 이용될 수 있다. 이 분석은 HP 1100™ HPLC 시스템 상에 TSK G3000 SWXL™, 7.8 × 300 mm 컬럼을 이용할 수 있다. 이동상 및 25-50  $\mu\text{L}$ 의 주입 용적으로 시료를 1-2 mg/mL으로 희석한다. 이동상은 200 mM 인산칼륨 및 250 mM 염화칼륨, pH 6.2이고, 단백질은 30분간 0.5 mL/min의 등용매(isocratic) 그라디언트로 용리된다. 280nm에서 용리액을 모니터한다. HP CHEMSTATION™ 소프트웨어 (Rev B.01.03 또는 더 새것)을 이용하여 적분을 실시한다.
- [0257] 단백질의 활성을 결정하여 제형내 치료 단백질의 안정성을 평가할 수도 있다. 치료 단백질이 항체인 경우, 예, ELISA 또는 여기 실시예 A에서 설명된 것과 같은 세포계 분석과 같이 세포 표면 항원의 경우 세포계 분석에 의해 항원에 결합하는 항체의 능력이 어느 정도 유지되는지를 결정함으로써 항체의 안정성을 평가할 수 있다. 특정 구체예들에서, 제형내 항체(임의의 항-STEAP-1 항체 또는 여기에서 제공된 면역공유체)는 예, 상기 설명된 pH 및/또는 하기 예시적인 제형에서 설명된 항체/ADC 농도, 완충액 성분들, 슈가 성분들 및/또는 계면활성제 성분들을 포함하는 실질적으로 동일한 조건하에서 6개월간 5℃에 보관된 항체와 비교하여, 4주간 40℃에 보관되었을 때 항원 결합의 40% 또는 30% 미만의 손실, 바람직하게는 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 손실을 보인다.
- [0258] 치료 단백질 (예, 여기에서 설명된 항체 또는 ADC)은 예, 1 mg/ml 내지 200 mg/ml의 농도, 및 특정 구체예에서, 5 내지 50 mg/ml, 및 특정 구체예에서, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml 또는 100 mg/ml 농도로 제형내에 존재할 수 있다. 다양한 하나의 구체예에서, 치료 단백질의 농도는 환자에게 투여하는데 적합하며, 개체에게 투여시 치료 효과를 제공한다. 특정 구체예에서, 항-STEAP-1 항체 또는 ADC는 1 mg/ml, 2

mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 또는 25 mg/ml 농도가 된다.

[0259] 또 다른 측면에서, 제형은 상기에서 제공된 pH에서 히스티딘-아세트산염 완충액을 포함한다. 히스티딘 아세테이트는 1 mM 내지 100 mM의 농도, 및 특정 구체예들에서, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 또는 40 mM이 될 수 있다. 히스티딘 아세트산염 완충액은 예, WO 2006/044908에서 설명되며, 이는 참고문헌에 통합된다. 예시적인 구체예에서, 히스티딘 아세트산염 완충액은 네이키드("naked") 항체, 예, 네이키드 항-STEAP-1 항체에 이용되며, 또는 대안으로, ADC, 예, 항-STEAP-1 ADC에 이용된다. 또 다른 측면에서, 제형은 히스티딘 클로라이드 완충액을 포함한다. 히스티딘 클로라이드는 1 mM 내지 100 mM 농도가 될 수 있으며, 특정 구체예들에서, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 또는 40 mM가 된다. 예시적인 구체예에서, 히스티딘 클로라이드 완충액은 ADC, 예, 항-STEAP-1 ADC용에 이용되며, 또는 대안으로, 네이키드 항체, 예, 네이키드 항-STEAP-1 항체에 이용된다. 추가 예시적인 구체예에서, 제형이 동결건조될 때 히스티딘 클로라이드 완충액이 이용된다.

[0260] 또 다른 측면에서, 제형은 사카라이드를 포함한다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 사카라이드는 트레할로즈 및 수크로오스로 구성된 군으로부터 선택된다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 트레할로즈 또는 수크로오스는 약 60mM 내지 약 250mM의 양으로 존재한다. 특정 구체예에서, 트레할로즈 또는 수크로오스는 100 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 200 mM, 210 mM, 220 mM, 230 mM, 240 mM, 또는 250 mM으로 존재한다.

[0261] 또 다른 측면에서, 제형은 계면활성제를 포함한다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20 (TWEEN 20으로 시판됨)이다. 이와 같은 하나의 구체예에서, 폴리소르베이트 20은 약 0.005% 내지 약 0.1%의 농도로 존재한다. 특정 구체예에서, 폴리소르베이트 20은 0.005%, 0.01%, 0.0125%, 0.015%, 0.0175%, 0.02%, 0.025%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09% 또는 0.1% 폴리소르베이트 20의 농도로 존재한다.

[0262] 또 다른 측면에서, 상기에서 제공된 pH에서 제형은 상기에서 제공된 임의의 구체예 중 하나와 같이, 하나 이상의 히스티딘-아세트산염 완충액, 사카라이드, 및 계면활성제를 포함한다. 추가 측면에서, 제공된 pH에서 제형은 상기에서 제공된 임의의 구체예 중 하나와 같이, 하나 이상의 히스티딘-클로라이드 완충액, 사카라이드, 및 계면활성제를 포함한다.

#### [0263] IV. 제형을 이용한 치료

[0264] 하나의 구체예에서, 본 발명은 질병 또는 질환을 치료하기 위하여, 여기에서 설명된 제형의 효과적인 양을 개체에게 투여하는 것을 포함하는 개체의 질환 또는 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[0265] 제형이 항-STEAP-1 항체 ("네이키드" 항-STEAP-1 항체 뿐만 아니라 ADCs를 포함)를 포함하는 경우, 제형을 암 치료에 이용할 수 있다. 암은 일반적으로 STEAP-1-발현 세포를 포함할 것이며, 항-STEAP-1 항체는 암 세포에 결합할 수 있다. 따라서, 본 구체예에서 본 발명은 개체에서 STEAP-1-발현 암을 치료하는 방법에 관계하는데, 이 방법은 암을 치료하기 위하여 여기에서 설명된 항-STEAP-1 항체의 효과량을 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 이와 같은 제형로 치료될 수 있는 다양한 암은 전립선 암, Ewing 육종, 폐암, 결장암, 방광암, 난소암 및 췌장암을 포함한다. *Hubert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14523-14528 (1999); WO 99/62941; Challita-Eid et al. Cancer Res. 67:5798-5805; 및 WO2008/052187* 참고.

[0266] 환자를 항체 제형 및 화학치료제 병용으로 치료할 수 있다. 병용 투여는 별도 제형 또는 단일 제형을 이용한, 공동투여(coadministration) 또는 동시 투여, 및 어떤 순서건 간에 연속 투여를 포함한다. 따라서, 화학치료제는 항체 제형 투여전, 또는 투여후에 투여될 수 있다. 이와 같은 구체예에서, 화학요법제의 적어도 1회 투여와 항체 제형의 적어도 1회 투여 사이의 시격은 바람직하게는 약 1개월 이하이며, 가장 바람직하게는 약 2주 이하이다. 대안으로, 화학치료제 및 항체 제형은 단일 제형 또는 별도 제형로 환자에게 동시 투여된다.

[0267] 환자는 항-STEAP-1 항체 제형과 제 2 항체의 병용으로 치료될 수 있다. 제2 항체는 전립선 세포 표면 항원, 예, Annexin 2, Cadherin-1, Cav-1, Cd34, CD44, EGFR, EphA2, ERGL, Fas, 헵신, HER2, KAI1, MSR1, PATE, PMEPA-I, Prostatein, Prostein, PSCA, PSGR, PSMA, RTVP-I, ST7, TMPRSS2, TRPM2, 및 Trp-p8에 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 병용 투여는 별도 제형 또는 단일 제형을 이용한, 공동투여 또는 동시 투여, 및 어떤 순서건 간에 연속 투여를 포함한다. 따라서, 제2항체는 항-STEAP-1 항체 제형 투여전, 또는 투여후에 투여될 수 있다. 이와 같은 구체예에서, 제2항체의 적어도 1회 투여와 항-STEAP-1 항체 제형의 적어도 1회 투여 사이의 시격은 바람직하게는 1개월 또는 1개월 미만이며, 가장 바람직하게는 약 2주 또는 2주 미만이 된다. 대안으로, 항-STEAP-1 항체 제형과 제2항체는 단일 제형 또는 별도 제형로 환자에게 동시 투여된다.

- [0268] 여기에서 설명된 제형을 이용한 치료는 바람직하게는 암의 징후 또는 증상을 개선시킬 것이다. 예를 들면, 이와 같은 치료법은 생존의 개선(전반적인 개선 및/또는 무진행 생존)을 초래할 수 있고 및/또는 객관적인 임상 반응(부분적 또는 완전한)을 초래할 수 있다. 더욱이, 화학치료제와 항체 제형의 병용으로 치료하면, 환자에게 부가적, 치료 장점 이상의 더 큰 시너지 효과를 초래할 수 있다.
- [0269] 볼루스(bolus)와 같은 정맥 투여 또는 일정 시간에 걸쳐 연속 주입, 또는 근육내, 복막내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액내, 구강, 국소 또는 흡입 경로와 같은 공지의 방법에 따라 인간에게 제형을 투여할 수 있다. 항체 조성물은 정맥, 근육 또는 피하 투여가 바람직하며, 정맥 투여가 가장 바람직하다.
- [0270] 피하 운반을 위하여, 제형은 주사기; 주사 장치(예, INJECT-EASE™ 및 GENJECT™ 장치); 인젝터 팬(예, GENPEN™); 바늘없는 장치(예, MEDIJECTOR™ 및 BIOJECTOR™); 또는 피하 패취 운반 시스템을 통하여 투여될 수 있다.
- [0271] 질병의 예방 또는 치료를 위하여, 항체의 적절한 약량은 상지에서 정의된 바와 같이 치료될 질병의 유형, 질병의 중증도 및 과정, 항체가 예방 목적으로 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 기존 치료, 환자의 병력 및 환자의 항체에 대한 반응, 주치의의 판단에 따라 달라질 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료과정에 걸쳐 적절하게 투여된다. 질병의 유형 및 중증도에 따라, 환자에게 투여하기 위한 초기 권장 약량은 하나 이상의 별도 투여 또는 연속 주입에 의해서건 간에, 약 1  $\mu\text{g/kg}$  내지 50  $\text{mg/kg}$  (예, 0.1-20 $\text{mg/kg}$ )의 항-STEAP-1 항체가 된다. 항체의 약량은 일반적으로 약 0.05 $\text{mg/kg}$  내지 약 10 $\text{mg/kg}$ 의 범위 내에 있을 것이다. 화학치료제가 투여된다면, 통상적으로 알려진 약량 또는 약물의 복합 작용 또는 화학치료제 투여로 기인된 부작용 때문에 선택적으로 낮은 약량으로 투여된다. 이와 같은 화학치료제의 준비 및 투약 일정은 제조업자의 지침에 따라 이용되거나 또는 전문의의 임상적 경험에 의해 결정될 수 있다. 이와 같은 화학치료제의 준비 및 투약 일정은 *Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)*에도 설명되어 있다.
- [0272] 기타 치료 처방은 제2(제3, 제4, 등) 화학치료제 (예, 상이한 화학치료제의 “칵테일”); 또 다른 단클론 항체; 성장 억제제; 세포독성 물질; 화학치료제; EGFR-표적 약물; 티로신 키나제 억제제; 맥관형성억제제; 및/또는 사이토킨을 포함하나 이에 한정되지 않은 항체와 병용될 수 있다. 상기 치료 섭생에 추가하여, 암 세포의 외과적 제거 및/또는 방사선 치료를 환자가 받을 수 있다.
- [0273] 여기에서 제공된 것과 같은 제형(예, 항-STEAP-1 항체 제형)은 예를 들면, 생체내 진단 영상을 위한 진단 목적으로 투여될 수도 있다. 이와 같은 구체예에서, 탐지용으로 직간접적으로 항체를 라벨시킬 수 있다.
- [0274] **V. 제품**
- [0275] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 제형을 포함하는 제품 및 이의 사용을 위한 지침이 제공된다. 제품은 용기를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알(예, 이중 챔버 바이알), 주사기(예, 이중 챔버 주사기) 및 테스트 튜브를 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재질로 만들 수 있다. 용기는 제형을 보유하며, 이와 연관된 라벨이 붙어있고, 용기에 사용 지침을 나타낼 수 있다. 제형을 보유한 용기는 다용도 바이알이 될 수 있어, 재구성된 제형의 반복 투여(예, 2-6회 투여)를 허용한다. 제품은 기타 완충액, 희석액, 필터, 바늘, 주사기, 앞서 명시된 것과 같은 사용 지침과 함께 포장 삽입물을 포함하는 상업적 및 사용자 관점의 기타 물질을 더 포함할 수 있다.
- [0276] 다음의 실시예들을 참고하여 본 발명을 더 충분하게 이해할 것이다. 그러나, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 모든 문헌 및 특허 자료는 참고문헌에 통합된다.
- [0277] **실시예**
- [0278] **A. 이온 교환 크로마토그래피에 의한 석신이미드 중간체의 확인**
- [0279] 차례로 서열 번호 :6과 10의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 보유하는 전장 항-STEAP-1 항체를 100 mM 트레할로즈 및 0.01% Tween 20와 함께, pH 5.5에서 20 mM 히스티딘 아세트산염 완충액으로 조제하였다. 시료를 40℃(“스트레스 조건”)에서 유지시켰고, 0 주, 1 주, 2 주, 또는 4 주후에 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 도 3 은 이들 시간대에 얻은 용리 프로파일을 보여준다. “기본” 피크(화살표)는 스트레스 조건하에 시간이 증가됨에 따라 용리 피크가 3.9% 에서 20.7%로 증가되었다.
- [0280] 세포계 분석에서 항원에 결합하는 항체의 능력을 평가함으로써 시료의 “능력”을 결정하였다. 이 분석에서,



STEAP-1으로 안정적으로 형질감염된 인간의 배아 신장 (HEK) 293 세포인, LB50 세포를 HAM's F12/DMEM (1 :1 비율), 10% FBS와 0.2 mg/mL G418, 및 1×GLUTAMAX™ 배지(*Invitrogen, Carlsbad, CA*)를 포함하는 성장 배지에서 성장시켰다. 세포에서 STEAP-1 발현 수준을 Scatchard 분석을 이용하여 결정하였는데, 세포당 ~270,000개 영역(sites/cell)였다. LB50 세포를 폴리-D-리신 피복된 96개 웰 미량적정 세포 배양물 플레이트에 웰당  $1 \times 10^5$  개의 세포 농도로 접종하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 하룻밤동안 배양시켰다. 배양 후, 항-STEAP-1 항체 및 기준 시료 희석물은 분석 희석제(PBS+0.25% BSA)에서 준비하고, 플레이트에 첨가하였다. 그 다음, LB50 세포상에서 발현된 STEAP-1에 항-STEAP-1의 결합을 허용하기 위하여, 플레이트를 항온처리하였다. 그 다음, 결합안된 항체를 제거하기 위하여 플레이트를 세척하였다. 결합된 항-STEAP-1 항체는 항-인간 IgG-양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 및 SureBlue Reserve™ 테트라메틸벤지딘 퍼옥시다제(TMB) 기질 용액: 결합된 항-STEAP-1 항체의 양에 비례하여 발생 시그널을 만듦:으로 탐지되었다. 도 3의 표 마지막 컬럼에서 볼 수 있는 것과 같이, 스트레스 조건하에 시간이 증가됨에 따라 항-STEAP-1 항체의 능력의 손실이 증가되는 결과를 초래하였다.

[0281] 이온 교환 피크에 상응하는 분취물을 수거하여, 질량 분석을 하였다. 기본 피크(도 3에서 화살표)는 주요 피크보다 적은 18Da의 질량을 가지며, 이것은 석신이미드 중간체를 나타낸다. 석신이미드 중간체가 존재한다는 것은 아스파라긴의 아미드 제거 또는 아스파르트산의 이성체화가 있다는 것을 암시하였다.

## [0282] B. 펩티드 매핑 및 ETD-MS에 의한 iso-Asp의 확인

[0283] 시료에 펩티드(트린신에 의한) 매핑을 실시하였다. 도 4에서 볼 수 있는 것과 같이, 두 개 펩티드(T11 및 T11-iso-Asp)는 역상 크로마토그래피에서 상이하게 이동되는데, 이것은 두 개 펩티드가 상이한 하전을 띤 표면을 제공한다는 것을 나타낸다. 그러나, 두 개 펩티드는 질량 분석으로 결정한 바에 의하면 동일한 질량을 가지는데, 이는 펩티드 중 하나는 iso-Asp를 가진다는 것을 암시한다. 전자 이동 해리를 이용하여 펩티드를 분해하였고, 생성된 데이터에서 HVR-H3 (CDR3)의 Asp-Asp 서열에서 첫 Asp가 도 5에서 볼 수 있는 것과 같이 이성체화되었음을 보여주었다. 이 Asp는 도 5에 나타난 펩티드의 위치 5에 대응하며(NYDYDDYYAMD YWQGQTLTVSSCSTK (서열 번호: 17)), 이는 상기 서열 번호: 16의 위치 7에 상응한다.

## [0284] C. 증가된 pH의 효과

[0285] 실시예 A의 항-STEAP-1 항체는 도 6에 나타난 바와 같이, 다양한 pH에서 20 mM 히스티딘 클로라이드 완충액, 240 mM 수크로오스 및 0.02% Tween 20에서 조제하였다. 40°C, pH 5.5에서 42 주간 보관하였을 때, 항체는 STEAP-1 항원에 결합하는 능력을 손실하였다. 증가된 pH를 가진 제형은 40°C에서 결합 손실이 감소되었음을 보여주었다. 제형을 6개월간 5°C에서 보관하였을 때, 테스트된 pH중 임의의 pH에서 결합 손실이 관찰되지 않았다.

## [0286] D. iso-Asp 및 석신이미드의 HIC 탐지

[0287] 상기 실시예 C에서 pH 5.5에서 조제되고, 40°C에서 0 주, 1 주, 2 주, 및 4주간 보관된 항-STEAP-1 항체에서 iso-Asp 및 석신이미드의 양을 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 이용하여 정량화하였다. 도 7은 나타난 바와 같이, iso-Asp 및 석신이미드를 포함하는 용리 프로파일을 보여준다. 도 8은 나타난 바와 같이 다양한 온도 및 다양한 시간 동안 보관된 항-STEAP-1 항체에서 iso-Asp 및 석신이미드의 양(%로 표시함)을 보여준다. iso-Asp 및 석신이미드의 양을 정량화시키는데 HIC가 필요하였는데, 그 이유는 이온 교환 크로마토그래피를 이용하였을 때, iso-Asp 피크가 주요 피크에서 나타났기 때문이었다.

## [0288] E. iso-Asp 이성체화에 대한 Asp의 비율

[0289] 항-STEAP-1 항체는 pH 5.5에서 실시예 C에서 설명된 것과 같이 조제되었다. iso-Asp에 대한 Asp의 반응을 1차수 반응으로 가정하고(도 9), iso-Asp 이성체화에 대한 Asp의 비율을 다양한 온도에서 측정하였다(도 10). 도 10에서 측정된 비율을 이용하여 Arrhenius 플롯(도 11)을 만들었다. 이 플롯은 Asp-Asp 이성체화의 활성화 에너지를 약 25-30kcal/mol로 예측한다.

[0290] 상기 발명은 설명에 의해 및 명백한 이해를 목적으로 실시예를 통하여 어느 정도 상세하게 설명되었지만, 설명 및 실시예들을 본 발명의 범위를 한정시키는 것으로 간주해서는 안된다. 모든 특허 및 과학 논문의 내용은 명백하게 전문이 참고문헌에 통합된다.

도면

도면1

hSteap1 aa mSteap1 aa cyno Steap1 aa	<div>10203040506070</div> <div>MESRKDI TNQEEELWKNKPRRNLEEDDY LHKDTGETSM LKRPVLLHLHQTAHADEFDCPSELQHTQELFPQ MEISDQDV TNPEQLWKMKPKCNLEDDSYSTKDSGETSM LKRPGLSHLQHAHVHVDADFDCPSELQHTQELFPN MESRKDI TNQEEELWKNKPRRNLEEDDY LHKDTGETSM LKRPVLLHLHQTAHADEFDCPSELQHTQELFPQ</div> <div>ECD1</div>
hSteap1 aa mSteap1 aa cyno Steap1 aa	<div>8090100110120130140</div> <div>WHLPIKIAAIIASLTFLYTLLREV IHP LATS HQQYFYKIPILVINKVLPMSITLLALVYLPGVIAAIVQ WRLPVKVA AIIISLTFLYTLLREI IIP LVTSRHQYFYKIPILVINKVLPMAITLLALVYLPGLAAAVQ WHLPIKIAAIIASLTFLYTLLREV IHP LATS HQQYFYKIPILVINKVLPMSITLLALVYLPGVIAAIVQ</div> <div>ECD2</div>
hSteap1 aa mSteap1 aa cyno Steap1 aa	<div>150160170180190200210</div> <div>LHNGTKYKKKFPFHWLDKWM LTRKQFGLLSFFF FAVLHAIYSLSYPMRRSRYRYKLLNWAYQQVQONKEDAWIE LRNGTKYKKKFPFHWLDKWM LTRKQFGLLSFFF FAVLHAIYSLSYPMRRSRYRYKLLNWAYQQVQONKEDAWVE LHNGTKYKKKFPFHWLDKWM LTRKQFGLLSFFF FAVLHAIYSLSYPMRRSRYRYKLLNWAYQQVQONKEDAWIE</div> <div>ECD3</div>
hSteap1 aa mSteap1 aa cyno Steap1 aa	<div>220230240250260270280</div> <div>HDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPSVSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLTGTHALIFAWNKWIDI HDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPSVSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLTGTHALIFAWNKWVDV HDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPSVSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLTGTHALIFAWNKWIDI</div> <div>ECD4</div>
hSteap1 aa mSteap1 aa cyno Steap1 aa	<div>290300310320330340350</div> <div>KQFVWYTPPTFMIAVFLPIVVLI FKSILFLPCLRKKILKIRHGWEDVT KINKTEICSQLN (SEQ ID NO: 1) SQFVWYTPPTFMIAVFLPLVLICKIALQLPCLRKKILKIRHGWEDVSKINRT EASRLN (SEQ ID NO: 2) KQFVWYTPPTFMIAVFLPVPVVLIFKSILFLPCLRKKILKIRHGWEDIT KINKMEISQLN (SEQ ID NO: 3)</div> <div>ECD5</div>



도면2b

VH 서열의 배열

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A 36 37 38 39 40 41

Kabat - CDR H1  
Contact - CDR H1

hum III E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P  
mu120 D V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P  
120 graft E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P  
120.v24 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P

Kabat# 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a b c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat - CDR H2  
Contact - CDR H2

hum III G K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L  
mu120 G N K L E W M G Y I S N S G S T S Y N P S L K S R I S I R R D T S K N Q F F L  
120 graft G K G L E W V G Y I S N S G S T S Y N P S L K S R F T I S R R D N S K N T L Y L  
120.v24 G K G L E W V G Y I S N S G S T S Y N P S L K S R F T I S R R D N S K N T L Y L

Kabat# 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

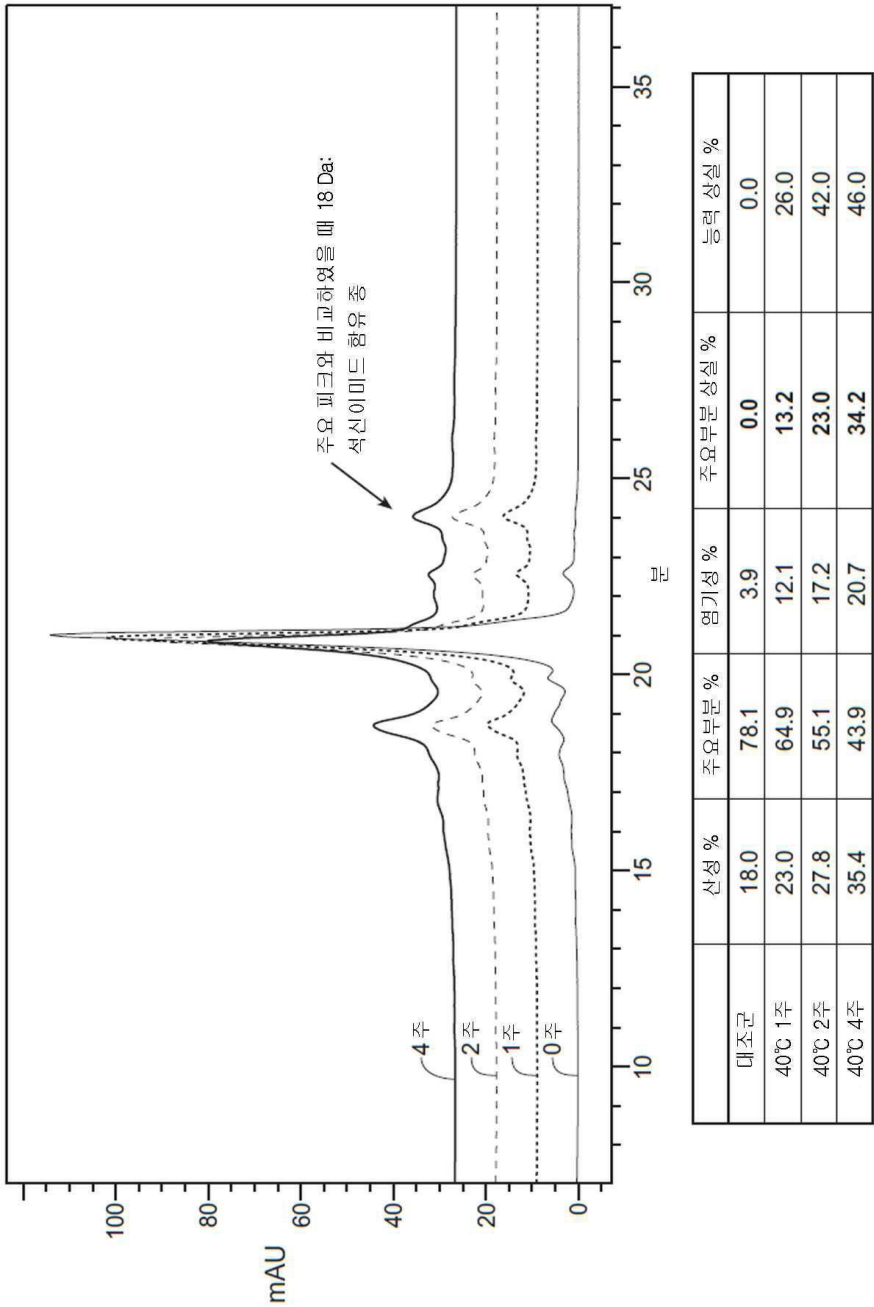
Kabat - CDR H3  
Contact - CDR H3

hum III Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G F D Y W G Q G T L V T V S S 7  
mu120 Q L I S V T T E D T A T Y Y C A R E R N Y D Y D D Y Y A M D Y W G Q G T T L V T V S S 8  
120 graft Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E R N Y D Y D D Y Y A M D Y W G Q G T T L V T V S S 9  
120.v24 Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E R N Y D Y D D Y Y A M D Y W G Q G T T L V T V S S 10

SEQ ID NO:

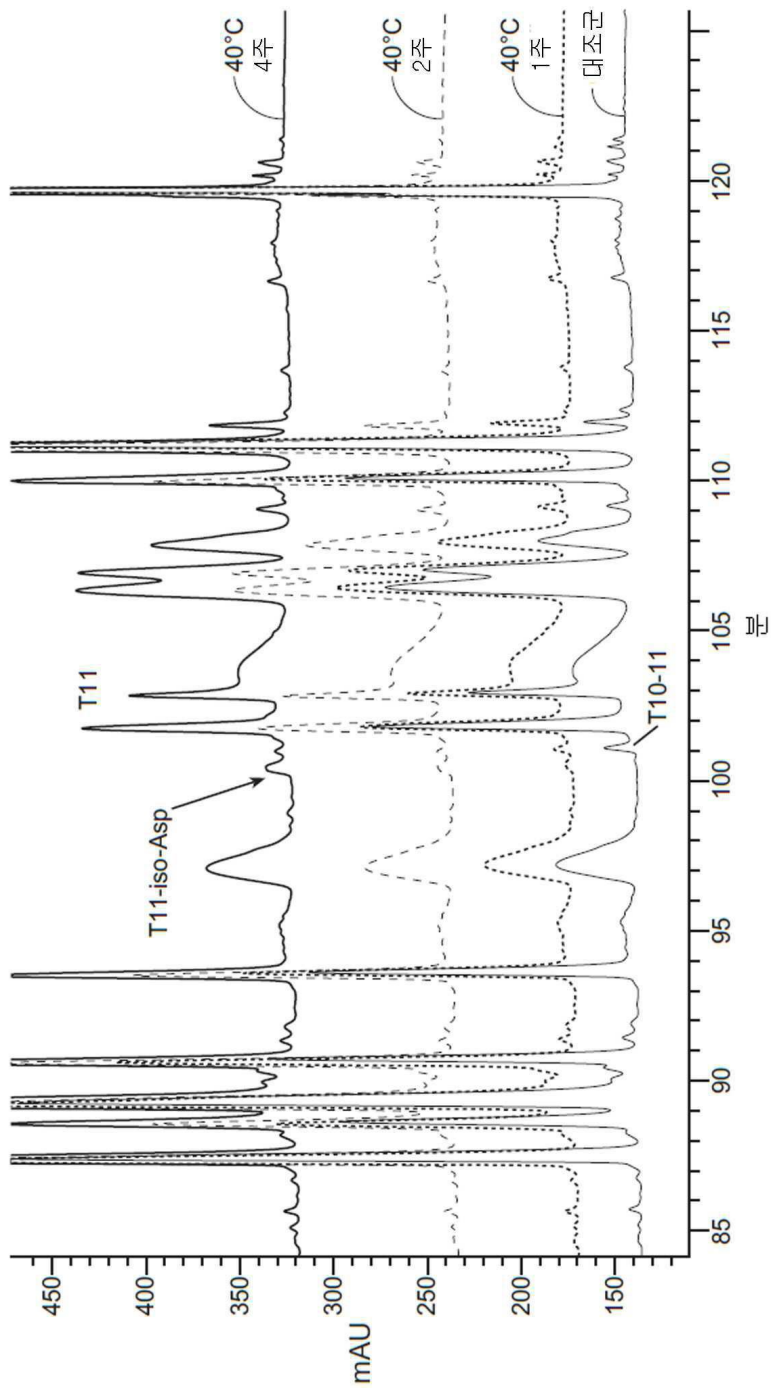


도면3



도면4

T11: Asp-Asp(DD) 서열을 포함하는 CDR 펩티드





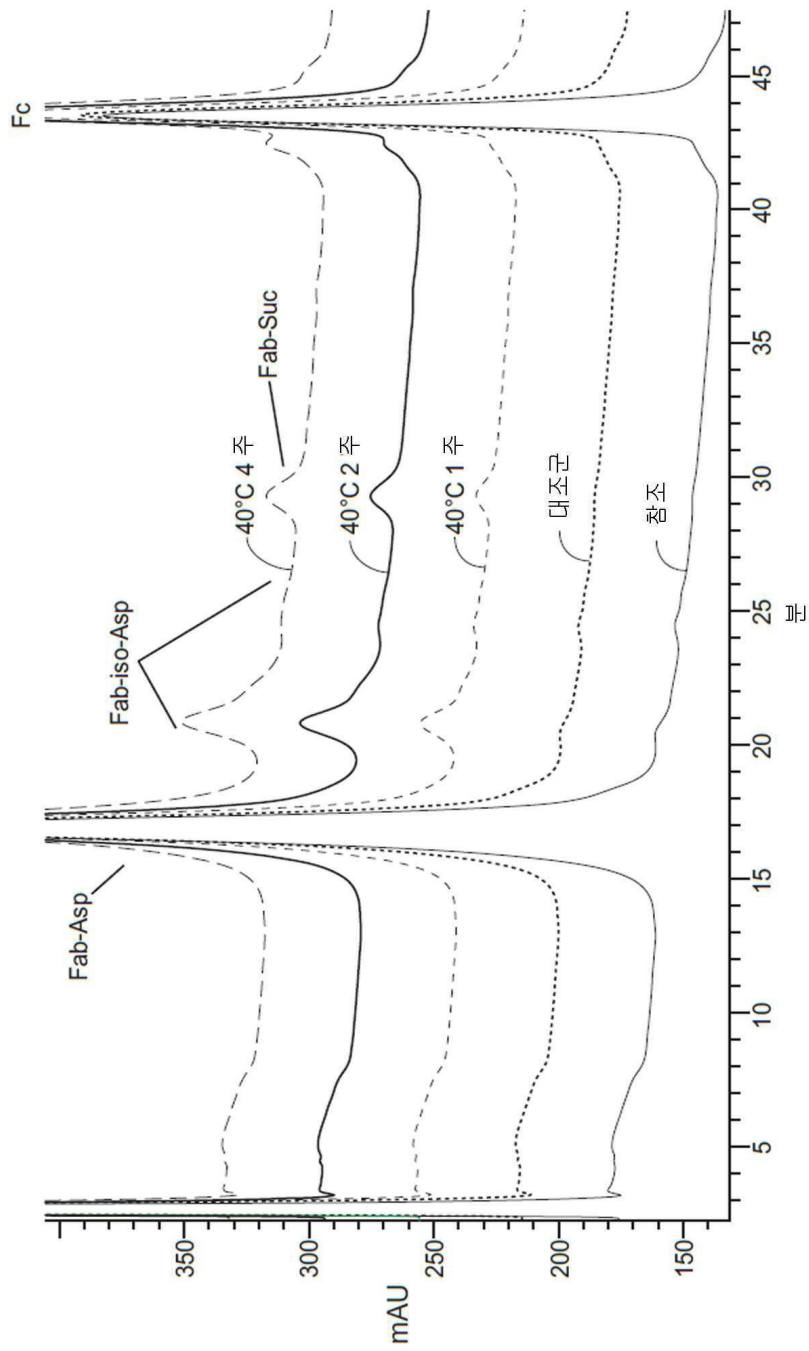
도면6

시료	결합 상실 %
pH 5.5 4주 40℃	48
pH 6.0 4주 40℃	41
pH 6.5 4주 40℃	16

시료	결합 상실 %
pH 5.5 6개월 5℃	0
pH 6.0 6개월 5℃	0
pH 6.5 6개월 5℃	0



도면7



도면8

시료 ID	% Asp	% Iso-Asp	% 석신이미드
TO 대조군 -70℃	95.5	4.2	0.4
5℃ 4 Wk	95.2	4.3	0.5
5℃ 12 Wk	94.9	4.6	0.5
5℃ 16 Wk	95.2	4.4	0.4
5℃ 26 Wk	94.9	4.7	0.4
15℃ 2 Wk	95.0	4.6	0.4
15℃ 4 Wk	94.9	4.7	0.5
15℃ 12 Wk	93.5	5.7	0.8
30℃ 1 Wk	93.1	6.1	0.8
30℃ 2 Wk	91.6	7.2	1.2
30℃ 4 Wk	87.7	10.1	2.2
40℃ 1 Wk	86.7	11.1	2.2
40℃ 2 Wk	81.2	15.5	3.4
40℃ 4 Wk	73.8	21.4	4.9

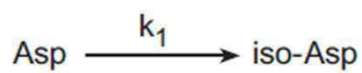
pH 5.5에서 시료

도면9



$$k_{\text{iso}} \gg k_1$$

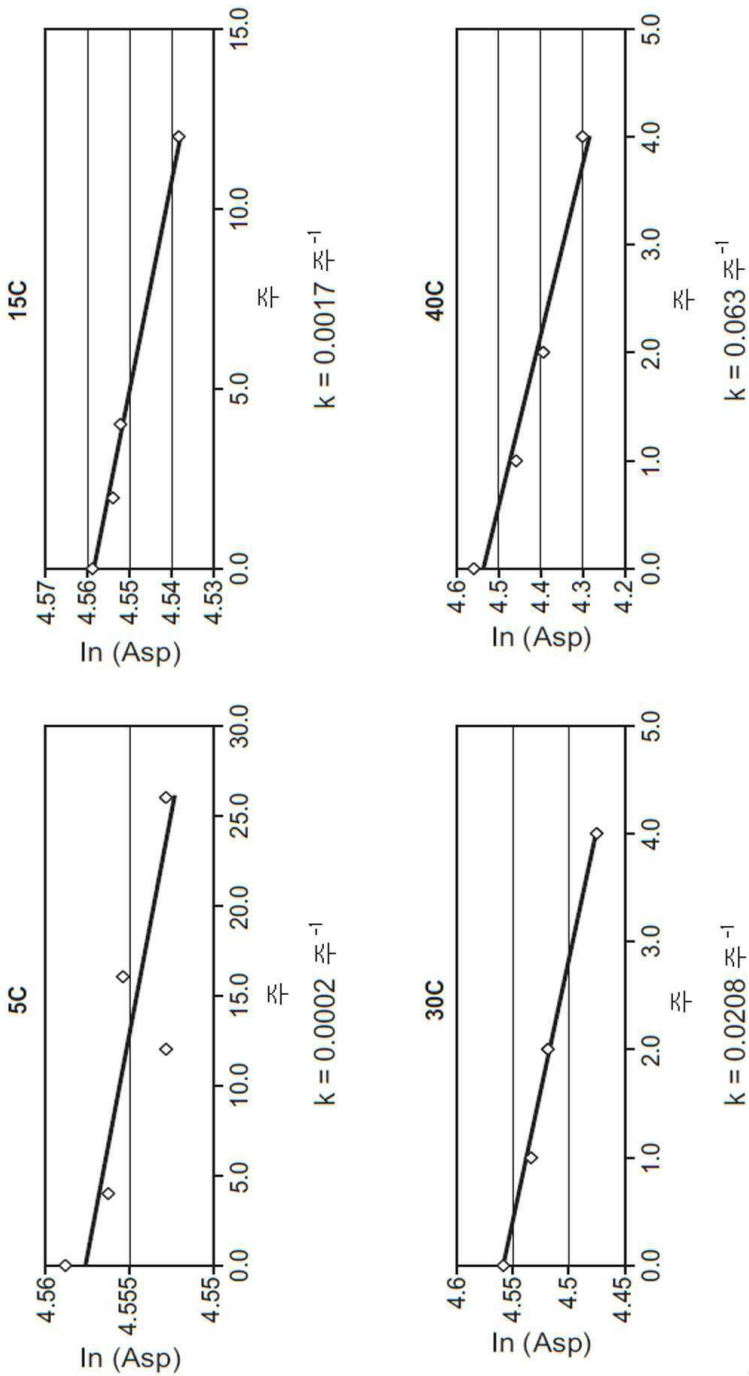
초기 속도



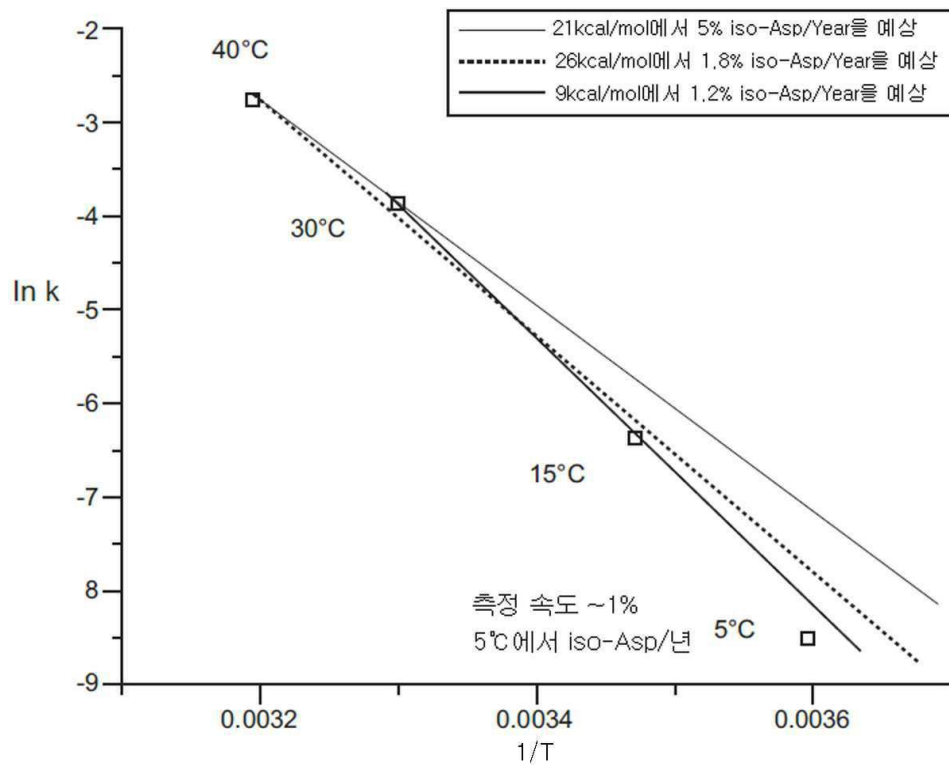
$$\ln[A] = \ln[A_0] - kt$$

가상 1차 반응

도면10



도면11



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC., et al.

<120> THERAPEUTIC PROTEIN FORMULATIONS

<130> P4252R1 WO

<140><141><150> 61/116,541

<151> 2008-11-20

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 340

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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



20	25	30	
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln			
35	40	45	
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr			
50	55	60	
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile			
65	70	75	80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His			
85	90	95	
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu			
100	105	110	
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu			
115	120	125	
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly			
130	135	140	
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr			
145	150	155	160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala			
165	170	175	
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu			
180	185	190	
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp			
195	200	205	
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile			
210	215	220	
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser			
225	230	235	240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys			
245	250	255	
Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe			
260	265	270	

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

Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe  
290 295 300

Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile  
305 310 315 320

Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys  
325 330 335

Ser Gln Leu Asn  
340

<210> 2

<211> 340

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

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

1 5 10 15  
Lys Pro Lys Gly Asn Leu Glu Asp Asp Ser Tyr Ser Thr Lys Asp Ser  
20 25 30

Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Gly Leu Ser His Leu Gln His  
35 40 45

Ala Val His Val Asp Ala Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr  
50 55 60

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

65 70 75 80  
Ile Ser Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Ile Ile Tyr  
85 90 95

Pro Leu Val Thr Ser Arg Glu Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu  
100 105 110

Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ala Ile Thr Leu Leu Ala Leu  
115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asn Trp Ala Tyr Lys Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp

195 200 205

Val Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys

245 250 255

Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Val His Ala Leu Val Phe

260 265 270

Ala Trp Asn Lys Trp Val Asp Val Ser Gln Phe Val Trp Tyr Met Pro

275 280 285

Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Thr Leu Val Leu Ile Cys

290 295 300

Lys Ile Ala Leu Cys Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile

305 310 315 320

Arg Cys Gly Trp Glu Asp Val Ser Lys Ile Asn Arg Thr Glu Met Ala

325 330 335

Ser Arg Leu Asn

340

<210> 3

<211> 340

<212> PRT

<213> Macaca sp.

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His

85 90 95

Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu

100 105 110

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

115 120 125

Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly

130 135 140

Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu

180 185 190

Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp

195 200 205

Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile

210 215 220

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

225                      230                      235                      240  
  
 Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys  
                          245                      250                      255  
 Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe  
                          260                      265                      270  
 Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro  
                          275                      280                      285  
 Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Val Val Val Leu Ile Phe  
                          290                      295                      300  
  
 Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile  
 305                      310                      315                      320  
 Arg His Gly Trp Glu Asp Ile Thr Lys Ile Asn Lys Met Glu Ile Ser  
                          325                      330                      335  
 Ser Gln Leu Asn  
                          340  
  
 <210> 4  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 4  
  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
  
                          20                      25                      30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                          35                      40                      45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                          50                      55                      60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp



85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105  
 <210> 5  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 5  
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg  
 20 25 30  
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys Arg

<210> 6  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide  
 <400> 6  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

100 105 110

Ser

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 9

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

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

                  100                    105                    110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

                  115                    120

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 10

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 12

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 13



Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr

1 5

<

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 14

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 17

Asn	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
1				5					10					15	

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys
				20				25			