



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월18일

(11) 등록번호 10-1328756

(24) 등록일자 2013년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)*A61K 47/48* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7031815

(22) 출원일자(국제) 2007년05월29일

심사청구일자 2008년12월29일

(85) 번역문제출일자 2008년12월29일

(65) 공개번호 10-2009-0023649

(43) 공개일자 2009년03월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/069889

(87) 국제공개번호 WO 2007/140371

국제공개일자 2007년12월06일

(30) 우선권주장

60/809,328 2006년05월30일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US05789554 A1*

Clinical Cancer Research Vol.9,
pp.3982s-3990s(2003.09.01.)*Clinical Cancer Research Vol.11,
pp.5215-5222(2005.07.20.)*Clinical Cancer Research Vol.11,
pp.843-852(2005.02.08.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

제넨테크, 임크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자

에벤스, 알렌, 제이., 주니어

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 아로요 애
비뉴 1932

그레이, 엘린 엠.

미국 94005 캘리포니아주 브리즈번 케스트렐 코트
122

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위혜숙, 양영준

전체 청구항 수 : 총 70 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 항체 및 면역접합체 및 이들의 용도

(57) 요약

항-CD22 항체 및 그의 면역접합체를 제공한다. 항-CD22 항체 및 그의 면역접합체를 사용하는 방법을 제공한다.

(72) 발명자

리양, 웨이-청

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 #112 씨 스
프레이 레인 840

유, 양

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 블라이드 스
트리트 1160

우, 상-판

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 샌달우드 레인
1103

(30) 우선권주장

60/908,941 2007년03월29일 미국(US)

60/911,829 2007년04월13일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

세포독성제에 공유 부착되고, (1) 서열 2의 HVR-H1, (2) 서열 4의 HVR-H2, (3) 서열 6의 HVR-H3, (4) 서열 9 또는 10의 HVR-L1, (5) 서열 12의 HVR-L2, 및 (6) 서열 14의 HVR-L3을 포함하는, CD22에 결합하는 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 77

삭제

청구항 78

제76항에 있어서, 세포독성제가 독소, 화학요법제, 약물 모이어티(moiety), 항생제, 방사성 동위원소, 및 뉴클레오티드 분해(nucleolytic) 효소로부터 선택된 것인 면역접합체.

청구항 79

제78항에 있어서, 화학식 $Ab-(L-D)_p$ (여기서, (a) Ab 는 제76항의 항체이고, (b) L 은 링커이고, (c) D 는 약물 모이어티이고, (d) p 는 1 내지 20임)로 표시되는 면역접합체.

청구항 80

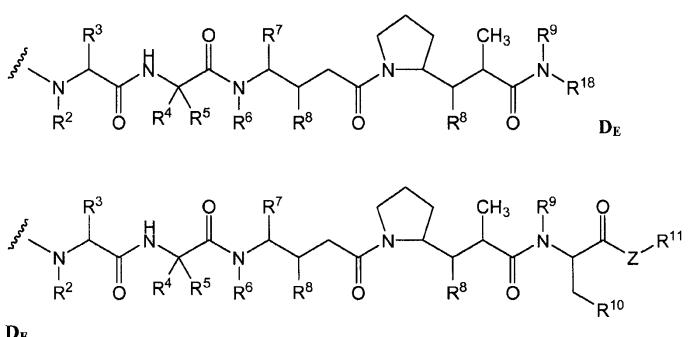
제79항에 있어서, L이 6-말레이미도카프로일 (MC), 말레이미도프로파노일 (MP), 발린-시트룰린 (val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (ala-phe), p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB), N-숙신이미딜 4-(2-페리딜티오)펜타노에이트 (SPP), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트 (SMCC) 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트 (SIAB)로부터 선택된 것인 면역접합체.

청구항 81

제79항에 있어서, D가 오리스타틴 및 돌로스타틴으로부터 선택될 것이 면역접합체.

청구항 82

제81학에 있어서, D가 하기 화학식 D_e 또는 $D_{e'}^*$ 의 양을 모이어 티이고, (d) D가 1 내지 8인 면역접합체:



여기서,

R^2 및 R^6 은 각각 메틸이고,

R^3 및 R^4 는 각각 이소프로필이고

R^5 는 H 또는 메틸이고

R^7 은 sec-부팅이고

각각의 R⁸은 CH₃, O-CH₃, OH 및 H로부터 돋립적으로 선택되고

Page 9

R^{10} 은 아령이고

7는 $-O-$ 또는 $-NH-$ 이 고

$\text{R}^{11}\text{H} \rightarrow \text{C}_1-\text{C}_2 \text{ 암 키}$ 또는 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{CH}_2\text{H}$ 에

$P^{18}O_3 - C(P^8) - C(P^8)$ - 알칼리다

천국학 83

제76학년 이어서 시험과목 또는 생체내 세포 사면 화석을 가는 면역전화체

첨구한 81

제79학에 있어서 럭커가 학체이 티오기르 통해 학체에 부착된 거이 면연접학체

청구항 85

제79항에 있어서, 링커가 프로테아제에 의해 절단가능한 것인 면역접합체.

청구항 86

제80항에 있어서, 링커가 val-cit 디펩ти드를 포함하는 면역접합체.

청구항 87

제79항에 있어서, 링커가 p-아미노벤질 단위를 포함하는 면역접합체.

청구항 88

제80항에 있어서, 링커가 6-말레이미도카프로일을 포함하는 면역접합체.

청구항 89

제82항에 있어서, 약물이 MMAE 및 MMAF로부터 선택된 것인 면역접합체.

청구항 90

제89항에 있어서, 약물이 MMAE인 면역접합체.

청구항 91

제89항에 있어서, 약물이 MMAF인 면역접합체.

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

제79항에 있어서, 화학식 $Ab-(L-MMAE)_p$ (여기서, L은 링커이고, p는 2 내지 5임)로 표시되는 면역접합체.

청구항 102

제101항에 있어서, L이 val-cit을 포함하는 면역접합체.

청구항 103

제101항에 있어서, L이 MC를 포함하는 면역접합체.

청구항 104

제101항에 있어서, L이 PAB를 포함하는 면역접합체.

청구항 105

제101항에 있어서, L이 MC-PAB를 포함하는 면역접합체.

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

제79항에 있어서, 화학식 $Ab-(L-MMAF)_p$ (여기서, L은 링커이고, p는 2 내지 5임)로 표시되는 면역접합체.

청구항 112

제111항에 있어서, L이 val-cit을 포함하는 면역접합체.

청구항 113

제111항에 있어서, L이 MC를 포함하는 면역접합체.

청구항 114

제111항에 있어서, L이 PAB를 포함하는 면역접합체.

청구항 115

제111항에 있어서, L이 MC-PAB를 포함하는 면역접합체.

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

제79항에 있어서, D가 메이탄시노이드인 면역접합체.

청구항 122

제121항에 있어서, D가 DM1, DM3 및 DM4로부터 선택된 것인 면역접합체.

청구항 123

제121항에 있어서, 시험관내 또는 생체내 세포 사멸 활성을 갖는 면역접합체.

청구항 124

제121항에 있어서, 링커가 항체의 티울기를 통해 항체에 부착된 것인 면역접합체.

청구항 125

제121항에 있어서, 링커 L이 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트 (SMCC) 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트 (SIAB)로부터 선택된 것인 면역접합체.

청구항 126

제122항에 있어서, 약물이 DM1인 면역접합체.

청구항 127

제122항에 있어서, L이 SPP를 포함하는 면역접합체.

청구항 128

제122항에 있어서, L이 SMCC를 포함하는 면역접합체.

청구항 129

제122항에 있어서, p가 2 내지 4인 면역접합체.

청구항 130

제122항에 있어서, p가 3 또는 4인 면역접합체.

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

제79항의 면역접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 암, 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 (aggressive) NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 외투층 세포(mantle cell) 림프종으로부터 선택되는 B 세포 증식 장애 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

제76항 또는 제78항의 면역접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 암, 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL),

활동성(aggressive) NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 외투층 세포(mantle cell) 림프종으로부터 선택되는 B 세포 증식 장애 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

제79항의 면역접합체를 포함하는, 암, 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성(aggressive) NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 외투층 세포(mantle cell) 림프종으로부터 선택되는 장애에서의 B 세포 증식의 억제를 위한 제약 조성물.

청구항 151

삭제

청구항 152

제150항에 있어서, B 세포가 이종이식편인 제약 조성물.

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

청구항 198

삭제

청구항 199

삭제

청구항 200

삭제

청구항 201

오리스타틴 또는 메이탄시노이드 약물 모이어티에 공유 부착되고,

(1) 서열 2의 HVR-H1, (2) 서열 4의 HVR-H2, (3) 서열 6의 HVR-H3, (4) 서열 9 또는 10의 HVR-L1, (5) 서열 12의 HVR-L2, 및 (6) 서열 14의 HVR-L3을 포함하며,

카바트(Kabat) 넘버링 규정에 따른 경쇄의 205, EU 넘버링 규정에 따른 중쇄의 118, 및 EU 넘버링 규정에 따른 중쇄의 400으로부터 선택된 1개의 위치에 시스테인을 추가로 포함하는, CD22에 결합하는 항체

를 포함하는 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 202

제201항에 있어서, 항체 (Ab), 및 오리스타틴 또는 메이탄시노이드 약물 모이어티 (D)를 포함하고, 시스테인 조작된 항체가 링커 모이어티 (L)에 의해 1개 이상의 유리 시스테인 아미노산을 통해 D에 부착된, 하기 화학식 I의 화합물인 항체-약물 접합체 화합물:

<화학식 I>

$Ab-(L-D)_p$

여기서, p는 1, 2, 3 또는 4이다.

청구항 203

제202항에 있어서, p가 2인 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 204

제202항에 있어서, L이 하기 식으로 표시되는 항체-약물 접합체 화합물.

$-A_a-W_w-Y_y-$

상기 식에서,

-A-는 시스테인 조작된 항체 (Ab)의 시스테인 티올에 공유 부착된 스트레처(Stretcher) 단위이고,

a는 0 또는 1이고,

각각의 W는 독립적으로 아미노산 단위이고,

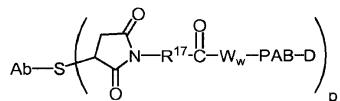
w는 0 내지 12의 정수이고,

Y는 약물 모이어티에 공유 부착된 스페이서 단위이며,

y는 0, 1 또는 2이다.

청구항 205

제204항에 있어서, 하기 식으로 표시되는 항체-약물 접합체 화합물:



상기 식에서,

PAB는 파라-아미노벤질카르바모일이고,

R¹⁷은 (CH₂)_r, -C₃-C₈ 카르보시클릴, -O-(CH₂)_r, 아릴렌, (CH₂)_r-아릴렌-, -아릴렌-(CH₂)_r-, (CH₂)_r-(C₃-C₈ 카르보시클릴), (C₃-C₈ 카르보시클릴)-(CH₂)_r, C₃-C₈ 헤테로시클릴, (CH₂)_r-(C₃-C₈ 헤테로시클릴), -(C₃-C₈ 헤�테로시클릴)-(CH₂)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, 및 -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-로부터 선택된 2가 라디칼이고, 여기서의 R^b는 H, C₁-C₆ 알킬, 폐닐 또는 벤질이고, r은 독립적으로 1 내지 10의 정수이다.

청구항 206

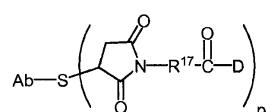
제204항에 있어서, W_w가 발린-시트룰린인 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 207

제205항에 있어서, R¹⁷이 (CH₂)₅ 또는 (CH₂)₂인 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 208

제204항에 있어서, 하기 식으로 표시되는 항체-약물 접합체 화합물:



상기 식에서, R¹⁷은 (CH₂)_r, -C₃-C₈ 카르보시클릴, -O-(CH₂)_r, 아릴렌, (CH₂)_r-아릴렌-, -아릴렌-(CH₂)_r-, (CH₂)_r-(C₃-C₈ 카르보시클릴), (C₃-C₈ 카르보시클릴)-(CH₂)_r, C₃-C₈ 헤테로시클릴, (CH₂)_r-(C₃-C₈ 헤�테로시클릴), -(C₃-C₈ 헤�테로시클릴)-(CH₂)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, 및 -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-로부터 선택된 2가 라디칼이고, 여기서의 R^b는 H, C₁-C₆ 알킬, 폐닐 또는 벤질이고, r은

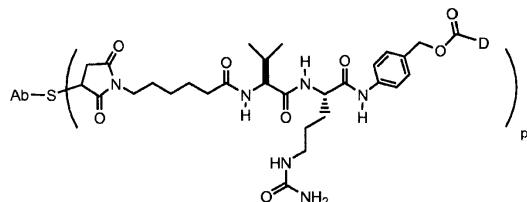
독립적으로 1 내지 10의 정수이다.

청구항 209

제208항에 있어서, R^{17} 이 $(CH_2)_5$ 또는 $(CH_2)_2$ 인 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 210

제204항에 있어서, 하기 식으로 표시되는 항체-약물 접합체 화합물:

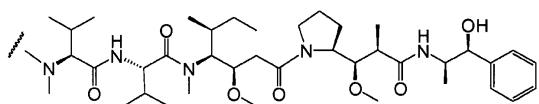


청구항 211

제202항에 있어서, L이 SMCC, SPP 또는 BMPEO(비스말레이미도-폴리(에틸렌 옥시드))인 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 212

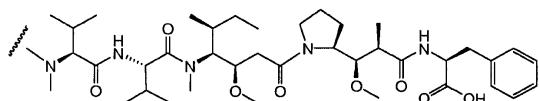
제202항에 있어서, D가 하기 구조로 표시되는 MMAE인 항체-약물 접합체 화합물:



여기서, 물결선은 링커 L에 대한 부착 부위를 나타낸다.

청구항 213

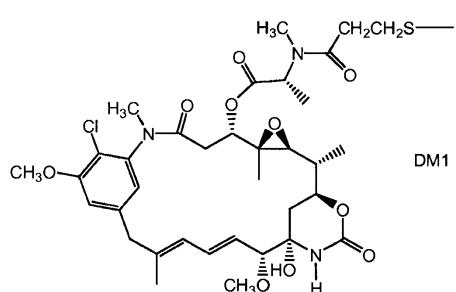
제202항에 있어서, D가 하기 구조로 표시되는 MMAF인 항체-약물 접합체 화합물:



여기서, 물결선은 링커 L에 대한 부착 부위를 나타낸다.

청구항 214

제202항에 있어서, D가 하기 구조로 표시되는 DM1인 항체-약물 접합체 화합물:



여기서, 물결선은 링커 L에 대한 부착 부위를 나타낸다.

청구항 215

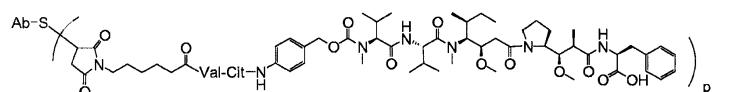
제201항에 있어서, 모 항-CD22 항체가 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 인간화 항체 및 항체 단편으로부터 선택된 것인 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 216

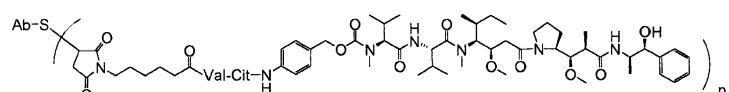
제215항에 있어서, 항체 단편이 Fab 단편인 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 217

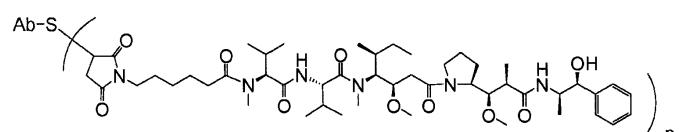
하기 구조로부터 선택된 항체-약물 접합체 화합물:



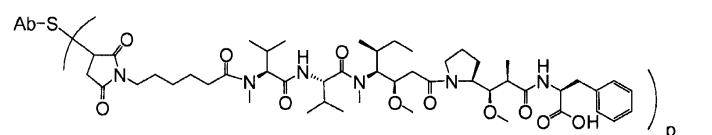
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



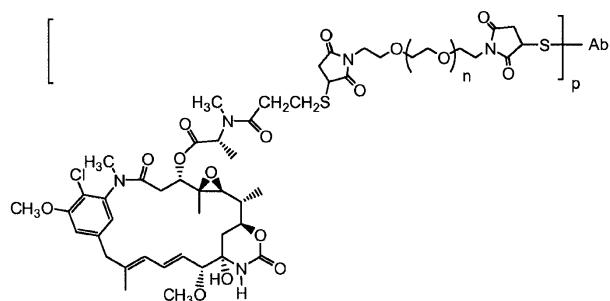
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAAF



Ab-BMPEO-DM1

여기서, Val은 발린이고, Cit는 시트룰린이고, n은 0, 1 또는 2이고, p는 1, 2, 3 또는 4이고, Ab는 제201항에 기재된 바와 같다.

청구항 218

제201항에 있어서, 오리스타틴이 MMAE 또는 MMAF인 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 219

제202항에 있어서, L이 MC-val-cit-PAB 또는 MC인 항체-약물 접합체 화합물.

청구항 220

- (a) 개체로부터 분리된 세포를 제201항의 항체-약물 접합체 화합물에 노출시키는 단계, 및
- (b) 항체-약물 접합체 화합물의 세포에 대한 결합 정도를 결정하는 단계
를 포함하는, B 세포를 검출하기 위한 분석법.

청구항 221

세포 배양 배지 중 포유동물 암성 B 세포를 제201항의 항체-약물 접합체 화합물로 처리하여 암성 B 세포의 증식을 억제하는 단계를 포함하는, 세포 증식을 억제하는 방법.

청구항 222

제201항의 항체-약물 접합체 화합물, 및 제약상 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는, 암, 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성(aggressive) NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 외투층 세포(mantle cell) 림프종으로부터 선택되는 B 세포 증식 장애를 치료하기 위한 제약 제제.

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

제222항에 있어서, 세포독성제를 추가로 포함하는 제약 제제.

청구항 226

제222항의 제약 제제,

용기, 및

화합물이 CD22 폴리펩티드의 과발현을 특징으로 하는 암을 치료하는데 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물 또는 라벨

을 포함하는 제조 용품.

청구항 227

제226항에 있어서, 암이 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 외투층 세포 림프종으로 이루어지는 군으로부터 선택된 것인 제조 용품.

청구항 228

- (a) 제201항에 기재된 바와 같은 항-CD22 항체 (Ab)의 조작된 시스테인기를 링커 시약과 반응시켜 항체-링커 중간체 Ab-L을 형성하는 단계, 및
- (b) Ab-L을 활성화된 약물 모이어티 D와 반응시켜, 항체-약물 접합체 화합물을 형성시키는 단계
를 포함하거나, 또는
- (c) 약물 모이어티의 친핵기를 링커 시약과 반응시켜 약물-링커 중간체 D-L을 형성하는 단계, 및

(d) D-L을 항체의 조작된 시스테인기와 반응시켜, 항체-약물 접합체를 형성시키는 단계

를 포함하는, 제201항의 항-CD22 항체 (Ab), 및 오리스타틴 또는 메이탄시노이드 약물 모이어티 (D)를 포함하고 항체가 링커 모이어티 (L)에 의해 1개 이상의 조작된 시스테인 아미노산을 통해 D에 부착된 하기 화학식 I의 화합물인 항체-약물 접합체 화합물의 제조 방법:

<화학식 I>

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

여기서, p는 1, 2, 3 또는 4이다.

청구항 229

제228항에 있어서, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 항체를 발현시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 230

제229항에 있어서, 발현된 항체를 환원제로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 231

제230항에 있어서, 환원제가 TCEP 및 DTT로부터 선택된 것인 방법.

청구항 232

제230항에 있어서, 발현된 항체를 환원제로 처리한 후 산화제로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 233

제232항에 있어서, 산화제가 황산구리, 데히드로아스코르브산 및 공기로부터 선택된 것인 방법.

청구항 234

삭제

청구항 235

삭제

청구항 236

삭제

청구항 237

삭제

청구항 238

삭제

명세서

[0001]

본원은 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된 미국 출원 60/809,328 (2006년 5월 30일), 60/908,941 (2007년 3월 29일) 및 60/911,829 (2007년 4월 13일)의 미국 특허법 35 USC § 119(e) 하의 우선권을 주장하는 37 CFR § 1.53(b)하에 출원된 정규 출원이다.

기술 분야

[0002]

본 발명은 항-CD22 항체 및 그의 면역접합체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항-CD22 항체 및 그의 면역접합체

를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0003] 램프구는 조혈의 과정 동안 골수에서 생산되는 많은 종류의 백혈구 중 하나이다. 2가지 주요 램프구 집단이 존재한다: B 램프구 (B 세포) 및 T 램프구 (T 세포). 본원에서 특히 관심있는 램프구는 B 세포이다.
- [0004] B 세포는 골수 내에서 성숙하고, 그들의 세포 표면 상에 항원-결합 항체를 발현하는 골수를 떠난다. 나이브 (naive) B 세포가 그의 막-결합된 항체에 특이적인 항원과 처음 마주치면, 세포는 빠르게 분열하기 시작하고 그의 자손은 기억 B 세포 및 효과기 (effector) 세포 ("혈장 세포"로 불림)로 분화한다. 기억 B 세포는 수명이 보다 길고, 원래의 모(parent) 세포와 동일한 특이성을 갖는 막-결합된 항체를 계속 발현한다. 혈장 세포는 막-결합된 항체를 생산하지 않지만, 대신에 분비될 수 있는 형태의 항체를 생산한다. 분비된 항체는 체액성 면역의 주 효과기 분자이다.
- [0005] B 세포-관련 장애는 악성 램프종 (비-호지킨 램프종, NHL), 다발 골수종, 및 만성 램프성 백혈병 (CLL, B 세포 백혈병 (CD5+ B 램프구)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 비-호지킨 램프종 (NHL) (암 주로 B 램프구로부터 발생하는 불균질한 군의 암)이 모든 새로 진단되는 암의 약 4%에 상당한다 [Jemal, A. et al., CA-Cancer J Clin, 52: 23-47, (2002)]. 활동성(aggressive) NHL은 성인 NHL의 약 30-40%를 구성하고 [Harris, N.L. et al., Hematol. J. 1:53-66 (2001)], 미만성 거대 B-세포 램프종 (DLBCL), 외투층 세포(mantle cell) 램프종 (MCL), 말초 T-세포 램프종, 및 역형성 대세포 램프종을 포함한다. 최전선 조합 화학요법으로는 활동성 NHL의 환자의 절반 미만을 치유하고, 대부분의 환자는 결국 그들의 질환에 굴복한다 (Fisher, R.I. Semin. Oncol. 27(suppl 12): 2-8 (2000)).
- [0006] B 세포-관련 장애는 또한 자가면역 질환을 포함한다. 자가면역 질환은 인간에 있어서 임상적으로 중요한 질환으로 남아있다. 병명 자체가 의미하는 바와 같이, 자가면역 질환은 신체의 자체 면역계를 통해 작용한다. 병리 메카니즘은 개별적인 종류의 자가면역 질환 사이에서 다르지만, 하나의 일반적인 메카니즘은 신체의 외인성 단백질에 대한 특정 항체 (본원에서 자가반응성 항체 또는 자가항체로서 칭함)의 결합을 포함한다. 의사 및 과학자들은 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 혈관염, 면역-매개 당뇨, 및 루푸스, 예를 들어 전신 홍반 루푸스를 포함한 70가지가 넘는 임상적으로 구분되는 자가면역 질환을 확인하였다. 많은 자가면역 질환은 희귀하지만 (200,000명 미만에 걸림), 종합적으로 상기 질환은 수백만명의 미국인들 (인구의 5%로 추정됨)이 걸리고, 여성은 불균형하게 대부분의 질환에 걸린다. 상기 질환의 만성 특성으로 인해 사회 경제적으로 막대한 부담이 된다.
- [0007] B 세포 표면 항원을 표적으로 하는 세포독성제가 B 세포-관련암 요법의 중요한 초점이다. 그러한 하나의 B 세포 표면 항원이 CD20이다. 리툭시맙 (Rituximab) (리툭산 (Rituxan); 제넨테크, Inc., 미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코) 및 아이디이씨 파마슈티칼 코퍼레이션 (IDEC Pharmaceutical Corp., 미국 캘리포니아주 샌디에이고)) (키메라 (마우스/인간) 항-CD20 모노클로날 항체)는 재발성 또는 불응성 저등급 또는 여포성 NHL의 치료를 위해 미국 식품의약국 (United States Food and Drug Administration)에서 승인받은 첫번째 치료 항체이다 [Leonard, J.P. et al., Clin. Canc. Res. 10:5327-5334 (2004)].
- [0008] 다른 B-세포 항원, 예를 들어 CD19, CD22 및 CD52는 램프종의 치료를 위한 치료 표적이 된다 [Grillo-Lopez A.J. et al., Curr Pharm Biotechnol, 2:301-11, (2001)]. CD22는 분화의 성숙 단계에서만 B-세포 표면 상에 발현된 135-kDa B-세포-제한된 시알로당단백질이다 [Dorken, B. et al., J. Immunol. 136:4470-4479 (1986)]. 인간에서 CD22의 주된 형태는 세포외 도메인에 7개의 면역글로불린 수퍼페밀리 도메인을 함유하는 CD22 베타이다 (도 1) [Wilson, G.L. et al., J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991)]. 변이체 형태인 CD22 알파에는 면역글로불린 수퍼페밀리 도메인 3 및 4가 결여된다 [Stamenkovic, I. and Seed, B., Nature 345:74-77 (1990)]. 인간 CD22에 대한 리간드 결합은 면역글로불린 수퍼페밀리 도메인 1 및 2 (에피토프 1 및 2로도 언급됨)와 관련이 있는 것으로 나타났다 [Engel, P. et al., J. Exp. Med. 181: 1581-1586, 1995].
- [0009] B-세포 NHL에서, CD22 발현은 각각 활동성 및 무통성 집단에서 91% 내지 99% 범위이다 [Cesano, A. et al., Blood 100:350a (2002)]. CD22는 B-세포 활성화 복합체의 성분으로서 [Sato, S. et al., Semin. Immunol. 10:287-296 (1998)] 및 부착 분자로서 [Engel, P. et al., J. Immunol. 150:4719-4732 (1993)] 기능할 수 있다. CD22-결핍 마우스의 B 세포는 수명이 더 짧고 세포자멸이 향상되며, 이는 B-세포 생존에서 상기 항원의 핵심 역할을 제안한다 [Otipoby, K.L. et al., Nature(Lond) 384:634-637 (1996)]. 그의 천연 리간드(들) 또는 항체와 결합한 후, CD22는 신속하게 내재화하여, 원발 B 세포에서 강력한 동시자극 신호 및 신생물성 B 세포

에서 전세포자멸 신호를 제공한다 [Sato, S. et al., *Immunity* 5:551-562 (1996)].

[0010] 항-CD22 항체는 B 세포 암 및 다른 B 세포 증식 질환에 대한 잠재적인 요법제로서 연구되었다. 상기 항-CD22 항체는 RFB4 [Mansfield, E. et al., *Blood* 90:2020-2026 (1997)], CMC-544 [DiJoseph, J.F., *Blood* 103: 1807-1814 (2004)] 및 LL2 [Pawlak-Byczkowska, E.J. et al., *Cancer Res.* 49:4568-4577 (1989)]를 포함한다. LL2 항체 (이전에 HPB-2로 불렸)는 CD22 항원에 대해 생성된 IgG2a 마우스 모노클로날 항체이다 [Pawlak-Byczkowska, E.J. et al. (1989), 상기 문헌]. 시험관내 면역조직학적 평가는 시험된 51개 B-세포 NHL 시료 중 50개에서 LL2 항체의 반응성을 입증하였지만, 다른 종양 또는 정상 비림프 조직에서는 입증되지 않았다 [Pawlak-Byczkowska (1989), 상기 문헌; Stein, R. et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 37:293-298 (1993)].

[0011] 암 치료에서 세포독성제 또는 세포증식 억제제, 즉 종양 세포를 치사시키거나 억제하는 약물의 국소 전달을 위한 항체-약물 접합체의 사용 ([Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172]; 미국 특히 4,975,278)은 종양으로 약물 모이어티 (moiety)의 표적화된 전달, 및 그 내부의 세포내 축적을 허용하고, 여기서 상기 비-접합된 약물 물질의 전신 투여는 정상 세포뿐만 아니라 제거하고자 하는 종양 세포에 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 ([Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05]; [Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506]). 그에 의해 최소 독성을 갖는 최대 효능이 추구된다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체는 모두 상기 전략에서 유용한 것으로 보고되었다 (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). 상기 방법에서 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (Rowland et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-87 (1986)). 항체-독소 접합체에서 사용되는 독소는 세균 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 독소, 예를 들어 리신, 소분자 독소, 예를 들어 젤다나마이신 ([Kerr et al., (1997) *Bioconjugate Chem.* 8(6):781-784]; [Mandler et al., (2000) *Journal of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581]; [Mandler et al., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028]; [Mandler et al., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; [Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623]), 및 칼리케아미신 ([Lode et al., (1998) *Cancer Res.* 58:2928]; [Hinman et al., (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342])을 포함한다. 독소는 투불린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소미라제 억제를 포함한 메카니즘에 의해 그들의 세포독성 및 세포증식 억제 효과를 달성할 수 있다 (Meyer, D.L. and Senter, P.D. "Recent Advances in Antibodi Drug Conjugates for Cancer Therapy" in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol. 38 (2003) Chapter 23, 229-237). 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합될 때 불활성이거나 활성이 작은 경향이 있다.

[0012] 제발린 (ZEVALIN)(등록상표) (이브리투모맙 티옥세탄, 비오겐 (Biogen)/이덱 (Idec))은 티오우레이 링커-킬레이터 (chelator)에 의해 결합된, 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견되는 CD20 항원에 대해 생성된 뮤린 IgG1 카파 모노클로날 항체 및 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성 동위원소로 이루어진 항체-방사성 동위원소 접합체이다 ([Wiseman et al., (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77]; [Wiseman et al., (2002) *Blood* 99(12):4336-42]; [Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63]; [Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69]). 제발린은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 대해 활성을 갖지만, 투여는 대부분의 환자에서 중증 및 장기 혈구감소증을 일으킨다. 마일로타그 (MYLOTARG)TM (겔투주맙 오조가미신, 와이어쓰 파마슈티칼스 (Wyeth Pharmaceuticals)) (칼리케아미신에 연결된 hu CD33 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)는 2000년에 주사에 의한 급성 골수성 백혈병의 치료를 위해 승인되었다 ([Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특히 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,693,762; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). 칸투주맙 메르탄신 (이뮤노젠, 인크. (Immunogen, Inc.)) (디술피드 링커 SPP를 통해 메이탄시노이드 약물 모이어티, DM1에 연결된 huC242 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)은 CanAg 항원을 발현하는 암, 예를 들어 결장암, 췌장암, 위암 등의 치료를 위해 개발되고 있다. MLN-2704 (밀레니엄 팜 (Millennium Pharm.), 비지엘 바이올로직스 (BZL Biologics), 이뮤노젠, 인크.) (메이탄시노이드 약물 모이어티, DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)는 전립선 종양의 잠재적인 치료를 위해 개발되고 있다. 동일한 메이탄시노이드 약물 모이어티, DM1은 비-디술피드 링커, SMCC를 통해 마우스 뮤린 모노클로날 항체인 TA.1에 연결되었다 (Chari et al. (1992) *Cancer Research* 52: 127-131). 상기 접합체는 상응하는 디술피드 링커 접합체보다 200배 더 강력한 것으로 보고되었다. SMCC 링커는 여기서 "절단

불가능한" 것으로 간주되었다.

- [0013] 몇몇 짧은 패티드 화합물이 해양 연체동물인 돌라밸라 오리큘라리아 (*Dolabella auricularia*, 원뿔군소)로부터 단리되었고, 생물학적 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다 ([Pettit et al., (1993) Tetrahedron 49:9151]; [Nakamura et al., (1995) Tetrahedron Letters 36:5059-5062]; [Sone et al., (1995) Journal Org Chem. 60:4474]). 상기 화합물의 유사체가 또한 제조되었고, 일부는 생물학적 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (개괄을 위해 문헌 [Pettit et al., (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277] 참조). 예를 들어, 오리스타틴 E (US 5,635,483)는 해양 천연 산물 돌라스타틴 10 (튜불린 상에 항암 약물 빙크리스틴과 동일한 부위에 결합함으로써 튜불린 중합화를 억제하는 물질)의 합성 유사체이다 (G. R. Pettit, (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70: 1-79). 돌라스타틴 10, 오리스타틴 PE 및 오리스타틴 E는 4개의 아미노산 (이 중 3개는 돌라스타틴 클래스의 화합물에 특유함) 및 C-말단 아미드를 갖는 선형 패티드이다.
- [0014] 오리스타틴 패티드, 오리스타틴 E (AE) 및 모노메틸오리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체)은 (i) 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 Lewis Y에 특이적인); (ii) 혈액암 상의 CD30에 특이적인 cAC10 ([Klussman, et al., (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773]; [Doronina et al., (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784]; ["Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"]); [Francisco et al., (2003) Blood 102(4): 1458-1465]; US 2004/0018194); (iii) CD20-발현 암 및 면역 장애의 치료를 위한 항-CD20 항체, 예를 들어 리툭산(등록상표) (리툭시맙) (WO 04/032828); (iv) 결장직장암 치료를 위한 항-EphB2 항체 2H9 및 항-IL-8 (Mao, et al., (2004) Cancer Research 64(3):781-788); (v) E-셀렉틴 항체 (Bhaskar et al., (2003) Cancer Res. 63:6387-6394); 및 (vi) 다른 항-CD30 항체 (WO 03/043583)에 접합되었다. 모노메틸오리스타틴 (MMAE)은 또한 2H9 (마우스와 인간 사이에 밀접한 상동성을 갖는 타입 1 TM 티로신 키나제 수용체인 EphB2R에 대한 항체이고, 결장직장암 세포에서 과발현됨)에 접합되었다 [Mao et al., (2004) Cancer Res. 64:781-788].
- [0015] 모노메틸오리스타틴 MMAF (C-말단에서 페닐알라닌을 갖는 오리스타틴 E (MMAE)의 변이체) (US 5,767,237; US 6,124,431)는 MMAE보다 덜 강력하지만, 모노클로날 항체에 접합될 때 더 강력한 것으로 보고되었다 (Senter et al, Proceedings fo the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004). 오리스타틴 F 페닐렌 디아민 (AFP) (MMAE의 페닐알라닌 변이체)은 페닐렌 디아민 스페이서를 통해 1F6의 C-말단을 통해 항-CD70 mAb, 1F6에 연결되었다 (Law et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 625, presented March 28, 2004).
- [0016] 항-CD22 항체-독소 접합체는 또한 잠재적인 치료 화합물로서 연구되었다. 예를 들어, 초기 보고에서는 항-CD22에 대해 생성된 리신 A 사슬-함유 면역독소를 잠재적인 항암제로서 기재하였다 ([May, R.D. et al., Chemical Abstracts 106(21): 168656x pages 35-36 (1987)]; [Ghetie, M.A. et al., Cancer Research 48:2610-2617 (1988)] 및 [Amlot, P.L. et al., Blood 82(9):2624-2633 (1993)]). 독소가 방사성 동위원소인 경우에, 에프라투주맙 (LL2의 인간화 (CDR-그래프팅된) IgG1 버전)은 방사성 면역접합체에 대한 치료 활성의 증거를 보여주었다 ([Juweid, M.E. et al., Clin. Cancer Res. 5 (Suppl 10):3292s-3303s (1999)]; [Griffiths, G.L. et al., J. Nucl. Med. 44:77-84 (2003)]; [Linden, O. et al., Clin. Cancer Res. 5(suppl 10):3287s-3291s (1999)]).
- [0017] 당업계에서 각종 B 세포-관련암, 예를 들어 림프종, 예를 들어 비-호지킨 림프종 및 다른 B 세포 증식 장애를 치료하기 위한 추가의 약물이 필요하다. 상기 목적에 특히 유용한 약물은 독성이 유의하게 더 작지만, 유용한 치료 효율을 갖는 B 세포 표적화된 항-CD22 항체-약물 접합체를 포함한다. 선행 기술의 상기 및 다른 제한 및 문제점을 본 발명에서 다룬다.
- [0018] 본원에서 임의의 참조문을 인용한 경우에도, 그 참조문이 본원에 대한 선행 기술이라고 인정하는 것은 아니다. 특히, 특히 출원 및 공개를 포함하여 본원에 인용된 모든 참조문헌은 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된다.
- [0019] <발명의 개요>
- [0020] 본 발명은 항-CD22 항체 및 이의 사용 방법을 제공한다
- [0021] 한 측면에서, 다음 중에서 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는, CD22에 결합하는 항체를 제공한다:
- [0022] (1) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

- [0023] (2) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0024] (3) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0025] (4) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0026] (5) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0027] (6) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.
- [0028] 다른 측면에서, CD22에 결합하는 항체는 (a) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 및 (b) 다음 중에서 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 HVR을 포함한다:
- [0029] (1) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0030] (2) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0031] (3) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0032] (4) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0033] (5) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.
- [0034] 다른 측면에서, CD22에 결합하는 항체는 (a) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 및 (b) 다음 중에서 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 HVR을 포함한다:
- [0035] (1) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0036] (2) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0037] (3) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0038] (4) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0039] (5) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.
- [0040] 다른 측면에서, CD22에 결합하는 항체는 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 및 (b) 다음 중에서 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 HVR을 포함한다:
- [0041] (1) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0042] (2) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0043] (3) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0044] (4) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0045] (5) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.
- [0046] 다른 측면에서, CD22에 결합하는 항체는 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 및 (b) 다음 중에서 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 HVR을 포함한다:
- [0047] (1) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0048] (2) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0049] (3) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0050] (4) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0051] (5) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.
- [0052] 한 실시태양에서, 항체는 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 및 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 추가로 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.
- [0053] 특정 실시태양에서, 임의의 상기 항체는 VH 하위군 III 컨센서스(consensus) 프레임워크 및 VL 하위군 I 컨센서

스 프레임워크 중에서 선택되는 적어도 하나의 프레임워크를 추가로 포함한다.

[0054] 한 측면에서, 서열 16의 아미노산 서열에 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, CD22에 결합하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 항체는 서열 16의 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0055] 한 측면에서, 항체는 서열 17의 아미노산 서열에 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 추가로 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 서열 17의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0056] 한 측면에서, 항체는 서열 18의 아미노산 서열에 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 추가로 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 서열 18의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0057] 한 실시태양에서, 항체는 서열 16의 아미노산 서열에 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인, 및 서열 17의 아미노산 서열에 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 서열 16의 아미노산 서열에 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인, 및 서열 18의 아미노산 서열에 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시태양에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 16의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열 17의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 16의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열 18의 아미노산 서열을 포함한다.

[0058] 특정 실시태양에서, 임의의 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한 실시태양에서, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 한 실시태양에서, 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 한 실시태양에서, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 적합한 조건하에서 숙주 세포를 배양하고, 항체를 단리하는 것을 포함하는, 항-CD22 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0059] 한 측면에서, 세포의 표면 상에 발현된 CD22에 결합하는 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 항체는 도메인 1 또는 도메인 2 또는 도메인 1 및 2를 포함하는 인간 또는 마우스 CD22의 영역 내의 에피토프에 결합한다. 한 실시태양에서, 세포는 포유동물 세포이다. 한 실시태양에서, 세포는 인간 세포이다. 한 실시태양에서, 세포는 암 세포이다. 한 실시태양에서, 세포는 B 세포이다. 한 실시태양에서, 암 세포는 B 세포이다.

[0060] 특정 실시태양에서, 임의의 상기 항체는 모노클로날 항체이다. 한 실시태양에서, 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 또는 (Fab')₂ 단편 중에서 선택되는 항체 단편이다. 한 실시태양에서, 항체는 인간화 항체이다. 한 실시태양에서, 항체는 인간 항체이다.

[0061] 한 측면에서, 생물학적 샘플을 CD22에 대한 항체의 결합을 허용하는 조건하에 임의의 상기 항체와 접촉시키고, 항체와 CD22 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 것을 포함하는, 생물학적 샘플 중 CD22의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 한 실시태양에서, 생물학적 샘플은 B 세포를 포함한다. 한 실시태양에서, 생물학적 샘플은 림프종, 비-호지킨 (Hogkin) 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투증 세포 림프종을 포함하지만 이에 제한되지 않는 B 세포 장애 및/ 또는 B 세포 증식 장애를 겪거나 겪는 것으로 의심되는 포유동물로부터의 것이다.

[0062] 한 측면에서, 시험 세포를 임의의 상기 항체와 접촉시키고; CD22에 대한 항체의 결합을 검출함으로써 CD22의 발현 수준을 결정하고; 시험 세포에 의한 CD22의 발현 수준을 대조 세포에 의한 CD22의 발현 수준과 비교하는 것을 포함하고, 여기서 대조 세포에 비해 시험 세포에 의한 CD22의 보다 높은 수준의 발현은 CD22의 증가된 발현과 관련이 있는 세포 증식 장애의 존재를 나타내는 것인, CD22의 증가된 발현과 관련이 있는 세포 증식 장애의 진단 방법을 제공한다. 한 실시태양에서, 시험 세포는 세포 증식 장애, 예를 들어 B-세포 증식 장애에 걸린 것

으로 의심되는 환자로부터의 세포이다. 한 실시태양에서, 세포 증식 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투증 세포 림프종을 포함하지만 이에 제한되지 않는 B 세포 장애 중에서 선택된다. 한 실시태양에서, 방법은 시험 세포의 표면 상에서 CD22의 발현 수준을 결정하고, 시험 세포의 표면 상의 CD22의 발현 수준을 대조 세포의 표면 상의 CD22의 발현 수준과 비교하는 것을 포함한다.

[0063] 한 측면에서, 생물학적 샘플 내의 시험 세포를 임의의 상기 항체와 접촉시키고; CD22에 대한 항체의 결합을 검출함으로써 샘플 내의 시험 세포에 결합된 항체의 수준을 결정하고; 대조 샘플 내의 세포에 결합된 항체의 수준을 비교하는 것을 포함하고, 여기서 결합된 항체의 수준을 시험 및 대조 샘플 내의 CD22-발현 세포의 수로 표준화하고, 여기서 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 보다 높은 수준의 결합된 항체는 CD22를 발현하는 세포와 관련이 있는 세포 증식 장애의 존재를 나타내는 것인, CD22를 발현하는 세포, 예를 들어 B 세포의 증가와 관련이 있는 세포 증식 장애를 진단하는 방법을 제공한다.

[0064] 한 측면에서, B 세포 증식 장애를 겪는 것으로 의심되는 포유동물로부터의 혈액 또는 혈청의 시험 샘플을 본 발명의 항-CD22 항체와 접촉시키고, 정상 포유동물로부터의 혈액 또는 혈청의 대조 샘플에 비해 시험 샘플 내의 가용형 CD22의 증가를 검출하는 것을 포함하는, 혈액 또는 혈청 내에 가용형 CD22를 검출하는 방법을 제공한다. 한 실시태양에서, 검출 방법은 포유동물의 혈액 또는 혈청에서 가용형 CD22의 증가와 관련이 있는 B 세포 증식 장애를 진단하는 방법으로서 유용하다.

[0065] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 모 항체의 1개 이상의 아미노산이 WO 2006/034488 (그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨)에 개시된 유리 시스테인 아미노산으로 교체된 시스테인 조작된 항체를 포함한다. 임의의 형태의 항-CD22 항체가 이와 같이 조작, 즉 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, 모 Fab 항체 단편은 조작되어 시스테인 조작된 Fab (본원에서 "ThioFab"로서 칭함)를 형성할 수 있다. 유사하게, 모 모노클로날 항체는 조작되어 "ThioMab"을 형성할 수 있다. 단일 부위 돌연변이는 ThioFab에서 단일 조작된 시스테인 잔기를 생성시키는 반면, IgG 항체의 이량체 성질 때문에 단일 부위 돌연변이는 ThioMab에서 2개의 조작된 시스테인 잔기를 생성시킴을 알아야 한다. 본 발명의 시스테인 조작된 항-CD22 항체는 세포-회합된 CD22 폴리펩티드에 우선적으로 결합하는 모노클로날 항체, 인간화 또는 키메라 모노클로날 항체, 및 항체의 항원-결합 단편, 융합 폴리펩티드 및 유사체를 포함한다. 시스테인 조작된 항체는 별법으로 반드시 모 항체를 변경시키지는 않으면서 항체의 서열 설계 및/또는 선택에 의해, 예를 들어 파지 디스플레이 항체 설계 및 선택에 의해 또는 경쇄 및/또는 중쇄 프레임워크 서열 및 불변 영역의 드 노보 (de novo) 설계를 통해, 항체 또는 Fab 내에 본원에서 개시된 위치에 시스테인을 포함하는 항체를 포함할 수 있다. 시스테인 조작된 항체는 티올 반응성 값이 0.6 내지 1.0; 0.7 내지 1.0 또는 0.8 내지 1.0인 1개 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함한다. 유리 시스테인 아미노산은 모 항체로 조작되고 디슬피드 브릿지의 일부가 아닌 시스테인 잔기이다. 시스테인 조작된 항체는 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해 세포독성 및/또는 영상화 화합물의 조작된 시스테인의 부위에 대한 부착에 유용하다. 말레이미드기에 대한 Cys 잔기의 티올 관능기의 친핵 반응성은 단백질 내의 임의의 다른 아미노산, 예를 들어 라이신 잔기의 아미노기 또는 N-말단 아미노기에 비해 약 1000배 더 크다. 요오도아세틸 및 말레이미드 시약의 티올 특이적 관능기는 아민기와 반응할 수 있지만, 보다 높은 pH (>9.0) 및 보다 긴 반응 시간이 필요하다 (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

[0066] 한 실시태양에서, 본 발명의 시스테인 조작된 항-CD22 항체는 아래에 제시되는 임의의 하나의 위치에서 조작된 시스테인을 포함하고, 여기서 위치는 경쇄의 경우에 카바트 (Kabat) 등에 따른 수이고 ([Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD] 참조), 중쇄 (Fc 영역 포함)의 경우에는 EU 넘버링에 따른 수이고 ([Kabat et al. (1991), 상기 문헌] 참조), 도 17A에서 밑줄로 나타낸 경쇄 불변 영역은 위치 108 (카바트 넘버링)에서 시작하고, 도 17B 및 17C에서 밑줄로 나타낸 중쇄 불변 영역은 위치 118 (EU 넘버)에서 시작한다. 또한, 위치는 도 17A-17C에 제시된 전장 경쇄 또는 중쇄의 아미노산의 순차적인 넘버링에서 그의 위치로 언급될 수 있다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 항-CD22 항체는 LC-V205C (카바트 넘버: Val 205; 그 위치에 Cys이 존재하도록 조작된 도 17A에서의 순차적인 넘버 210)에서 조작된 시스테인을 포함한다. 경쇄에서 조작된 시스테인은 도 17A에서 굵은 이중 밑줄 표시부로 제시한다. 한 실시태양에 따르면, 항-CD22 항체는 HC-A118C (EU 넘버: Ala 118; 그 위치에 Cys이 존재하도록 조작된 도 17B에서의 순차적인 넘버 121)에서 조작된 시스테인을 포함한다. 중쇄 내의 조작된 시스테인은 도 17B에서 굵은 이중 밑줄 표시부로 제시한다. 한 실시태양에 따르면, 항-CD22 항체는 Fc-S400C (EU 넘버: Ser 400; 그 위치에 Cys이 존재하도록 조작된 도 17C에서의 순차적인 넘버 403)에서 조

작된 시스테인을 포함한다. 중쇄 내의 Fc 영역의 조작된 시스테인은 도 17C에서 굵은 이중 밑줄 표시부로 제시한다. 다른 실시태양에서, 중쇄 (Fc 영역 포함)의 조작된 시스테인은 다음 위치 (EU 넘버링에 따른)의 임의의 하나에 존재한다: 41, 88, 116, 118, 120, 171, 282, 375, 또는 400. 따라서, 본 발명의 모 항-CD22 항체에 대한 상기 위치에서의 아미노산의 변화는 A41C, A88C, S116C, A118C, T120C, A171C, V282C, S375C, 또는 S400C이다. 다른 실시태양에서, 경쇄의 조작된 시스테인은 다음 위치 (카바트 넘버링에 따른)의 임의의 하나에 존재한다: 15, 43, 110, 144, 168, 205. 따라서, 본 발명의 모 항-CD22 항체에 대한 상기 위치에서의 아미노산의 변화는 V15C, A43C, V110C, A144C, S168C, 또는 V205C이다.

[0067] 시스테인 조작된 항-CD22 항체는 1개 이상의 유리 시스테인 아미노산을 포함하고, 여기서 시스테인 조작된 항-CD22 항체는 CD22 폴리펩티드에 결합하고, 모 항-CD22 항체의 1개 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 치환하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조되고, 상기 모 항체는 다음 서열로부터 선택되는 적어도 하나의 HVR 서열을 포함한다:

[0068] (a) HVR-L1 서열 RSSQSIVHSNGNTFLE (서열 9) 또는 서열 RSSQSIVHSVGNLFLE (서열 10) (도 2B);

[0069] (b) HVR-L2 서열 an HVR-L2 sequence KVSNRFS SEQ II (서열 12) (도 2B);

[0070] (c) HVR-L3 서열 an HVR-L3 sequence FQGSQFPYI (서열 14) (도 2B);

[0071] (d) HVR-H1 서열 an HVR-H1 sequence GYEFSRSWMN (서열 2) (도 2A);

[0072] (e) HVR-H2 서열 an HVR-H2 sequence GRIYPGDGDTNYSGKFKG (서열 4) (도 2A); 및

[0073] (f) HVR-H3 서열 an HVR-H3 sequence DGSSWDWYFDV (서열 6) (도 2A).

[0074] 특정 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열을 갖는 시스테인 조작된 항체, 또는 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 결여된 시스테인 조작된 항체 아미노산 서열에 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성, 별법으로 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 시스테인 조작된 항-CD22 항체에 관한 것이다.

[0075] 또다른 측면에서, 본 발명은 (a) 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열을 갖는 시스테인 조작된 항체, (b) 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 결여된 시스테인 조작된 항체 아미노산 서열, (c) 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 존재하거나 존재하지 않는 막횡단 (transmembrane) 시스테인 조작된 항체 단백질의 세포외 도메인, (d) 본원에 개시된 임의의 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 (e) 본원에 개시된 바와 같은 전장 시스테인 조작된 항체 아미노산 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편을 코딩하는 DNA 분자의 보체에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 시스테인 조작된 항-CD22 항체에 관한 것이다.

[0076] 특정 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는, N-말단 신호 서열이 존재하지 않고/않거나 개시 메티오닌이 존재하지 않는 단리된 시스테인 조작된 항-CD22 항체를 제공한다. 상기 항체를 제조하는 방법을 또한 본원에 기재하고, 여기서 상기 방법은 적절한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 시스테인 조작된 항체의 발현에 적합한 조건하에 배양하고, 세포 배양액으로부터 시스테인 조작된 항체를 회수하는 것을 포함한다.

[0077] 본 발명의 다른 측면은 막횡단 도메인이 결실되거나 또는 막횡단 도메인이 불활성화된 단리된 시스테인 조작된 항-CD22 항체를 제공한다. 상기 항체를 제조하기 위한 방법을 또한 본원에 기재하고, 여기서 상기 방법은 적절한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 시스테인 조작된 항체의 발현에 적합한 조건하에 배양하고, 세포 배양액으로부터 시스테인 조작된 항체를 회수하는 것을 포함한다.

[0078] 다른 실시태양에서, 본 발명은 이종 (비-CD22) 폴리펩티드에 융합된, 본원에 기재된 임의의 시스테인 조작된 항체를 포함하는 단리된 항-CD22 키메라 시스테인 조작된 항체를 제공한다. 상기 키메라 분자의 예는 이종 폴리펩티드, 예를 들어 면역글로불린의 에피토프 태그 서열 또는 Fc 영역에 융합된, 본원에 기재된 임의의 시스테인 조작된 항체를 포함한다.

[0079] 시스테인 조작된 항-CD22 항체는 그의 각각의 항원 에피토프에 대한 항-CD22 폴리펩티드 항체의 결합을 경쟁적

으로 억제하는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일쇄 항체 또는 항체일 수 있다. 본 발명의 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 독소, 예를 들어 오리스타틴, 항생제, 방사성 동위원소, 뉴클레오티드 분해(nucleolytic) 효소 등에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 항체는 임의로 CHO 세포 또는 세균 세포에서 생산될 수 있고, 바람직하게는 항체가 결합하는 세포의 성장 또는 증식을 억제하거나 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 진단 목적을 위해, 본 발명의 항체는 검출가능하게 표지되거나, 고체 지지체 등에 부착되는 바와 같이 처리될 수 있다.

[0080] 본 발명의 다른 실시태양에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항-CD22 항체 및 항-CD22 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 또한, 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포도 제공된다. 예로서, 숙주 세포는 CHO 세포, 이. 콜라이 (*E. coli*) 세포 또는 효모 세포일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법을 추가로 제공하고, 이는 숙주 세포를 목적하는 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 배양하고, 세포 배양액으로부터 목적하는 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함한다.

[0081] 시스테인 조작된 항체는 암 치료에 유용할 수 있고, 세포 표면 및 막횡단 수용체, 및 종양 관련이 있는 항원 (TAA)에 특이적인 항체를 포함한다. 상기 항체는 네이키드 (naked) 항체 (약물 또는 표지 모이어티에 접합되지 않은)로서 또는 항체-약물 접합체 (ADC)로서 사용될 수 있다. 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 티올-반응성 시약과 부위-특이적으로 및 효율적으로 커플링될 수 있다. 티올-반응성 시약은 다기능성 링커 시약, 포획 표지 시약, 형광단 시약, 또는 약물-링커 중간체일 수 있다. 시스테인 조작된 항체는 검출가능한 표지로 표지되고, 고상 지지체에 고정되고/되거나 약물 모이어티와 접합될 수 있다. 티올 반응성은 반응성 시스테인 아미노산으로의 아미노산 치환이 L-10 내지 L-20, L-38 내지 L-48, L-105 내지 L-115, L-139 내지 L-149, L-163 내지 L-173의 아미노산 범위로부터 선택된 경쇄의 범위 내에서; H-35 내지 H-45, H-83 내지 H-93, H-114 내지 H-127, 및 H-170 내지 H-184의 아미노산 범위로부터 선택된 중쇄의 범위 내에서; 및 H-268 내지 H-291, H-319 내지 H-344, H-370 내지 H-380, 및 H-395 내지 H-405에서 선택된 범위 내의 Fc 영역에서 이루어질 수 있는 임의의 항체로 일반화될 수 있고, 여기서 아미노산 위치의 넘버링은 카바트 넘버링 시스템 (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)의 위치 1에서 시작되고 이후에 WO 2006034488에 개시된 바와 같이 순차적으로 계속된다. 또한, 티올 반응성은 항체의 특정 도메인, 예를 들어 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 일반화될 수도 있다. 0.6 이상의 티올 반응성 값을 유도하는 시스테인 치환은 무손상 항체 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM (IgG 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2 포함) 각각의 중쇄 불변 도메인 α , δ , ϵ , γ 및 μ 에서 만들어질 수 있다. 상기 항체 및 그의 용도는 WO 2006/034488에 개시되어 있다.

[0082] 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 바람직하게는 그의 야생형 모 항체 대응물의 항원 결합 능력을 보유한다. 따라서, 시스테인 조작된 항체는 바람직하게는 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 항원은 예를 들어 종양 관련이 있는 항원 (TAA), 세포 표면 수용체 단백질 및 다른 세포 표면 분자, 막횡단 단백질, 신호전달 단백질, 세포 생존 조절 인자, 세포 증식 조절 인자, 조직 발달 또는 분화와 관련이 있는 분자 (예를 들어, 조직 발달 또는 분화에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 의심되는), 림포킨, 시토킨, 세포 주기 조절에 관여하는 분자, 혈관형성에 관여하는 분자 및 혈관신생에 관여하는 분자 (예를 들어, 혈관신생에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 의심되는)를 포함한다. 종양 관련이 있는 항원은 클러스터 (cluster) 분화 인자 (즉, CD22를 포함하지만 이에 제한되지 않는 CD 단백질)일 수 있다. 본 발명의 시스테인 조작된 항-CD22 항체는 그의 모 항-CD22 항체 대응물의 항원 결합 능력을 보유한다. 따라서, 바람직하게는 본 발명의 시스테인 조작된 항-CD22 항체는 B 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는 세포의 표면 상에 CD22 항원이 발현될 때를 포함하여 CD22 항원, 예를 들어 인간 항-CD22 이소형 베타 및/또는 알파에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0083] 본 발명의 항체는 그 내부의 반응성기가 예를 들어 말레이미드, 요오도아세트아미드, 피리딜 디술피드, 또는 다른 티올-반응성 접합 파트너인 다른 티올-반응제에 접합될 수 있다 ([Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2]; [Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London]; [Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2]; [Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]). 파트너는 세포독성제 (예를 들어 독소, 예를 들어 독소루비신 또는 백일해 독소), 형광단, 예를 들어 플루오레세인 또는 로다민과 같은 형광 염료, 영상화 또는 방사성치료 금속에 대한 킬레이팅제, 펩티딜 또는 비-펩티딜 표지 또는 검출 태그, 또는 소실(clearance)-변형제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜의 다양한 이성질체, 제3 성분에 결합하는 펩티드, 또는 다른 탄수화물 또는 친지질성 물질일 수 있다.

- [0084] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 반응성 모이어티, 활성화된 모이어티, 또는 반응성 시스테인 티올기를 통해 항체에 공유 부착될 수 있는 임의의 표지 모이어티에 접합될 수 있다 ([Singh et al., (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15]; [Harlow E. and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]; [Lundblad R.L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL]). 부착된 표지는 리간드 친화도, 항체/항원 결합, 또는 이온 복합체 형성을 조정하기 위해 (i) 검출가능한 신호를 제공하거나, (ii) 제2 표지와 상호작용하여 제1 또는 제2 표지에 의해 제공되는 검출가능한 신호를 변형시켜, 예를 들어 FRET (형광 공명 에너지 전달)를 생성시키거나; (iii) 항원 또는 리간드와의 상호작용을 안정화하거나 이들과의 결합친화도를 증가시키거나, (iv) 이동성, 예를 들어 전기영동 이동성, 또는 세포-투과도에 전하, 소수성, 형태 또는 다른 물리적 파라미터로 인한 영향을 주거나, 또는 (v) 포획 모이어티를 제공하는 기능을 할 수 있다.
- [0085] 표지된 시스테인 조작된 항체는 예를 들어 특이적 세포, 조직, 또는 혈청에서 목적하는 항원의 발현을 검출하기 위한 진단 분석에서 유용할 수 있다. 진단 용도를 위해, 항체는 대개 검출가능한 모이어티로 표지될 것이다. 일반적으로 하기 범주로 분류될 수 있는 수많은 표지를 이용할 수 있다:
- [0086] (a) 방사선 동위원소 (방사선헤풍), 예를 들어 ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At 또는 ^{213}Bi . 방사선 동위원소 표지된 항체는 수용체 표적화된 영상화 실험에 유용하다. 항체는 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 방사선 동위원소 금속에 결합하거나 킬레이팅되거나 또는 다른 방식으로 복합체를 형성하며 항체의 조작된 시스테인 티올과 반응성인 리간드 시약으로 표지될 수 있다. 금속 이온과 복합체를 형성할 수 있는 킬레이팅 리간드로는 DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA 및 TETA (마크로시클릭스 (Macrocyclics), 미국 텍사스주 달라스) 등이 있다. 방사선헤풍은 본 발명의 항체-약물 접합체와의 복합체 형성을 통해 표적화될 수 있다 [Wu et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146].
- [0087] 링커 시약, 예를 들어 DOTA-말레이미드 (4-말레이미도부티르아미도벤질-DOTA)는 문헌 [Axworthy et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4):1802-1807]의 절차에 따라 아미노벤질-DOTA를 이소프로필클로로포르메이트 (알드리치 (Aldrich))로 활성화시킨 4-말레이미도부티르산 (플루카 (Fluka))와 반응시켜 제조할 수 있다. DOTA-말레이미드 시약은 시스테인 조작된 항체의 유리 시스테인 아미노산과 반응하여 항체 상에 금속 착물 형성 리간드를 제공한다 [Lewis et al. (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86]. 킬레이팅 링커 표지 시약, 예를 들어 DOTA-NHS (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노(N-히드록시숙신이미드 에스테르)는 시판되고 있다 (마크로시클릭스). 방사선헤풍 표지된 항체를 사용한 수용체 표적 영상화는 종양 조직 중 항체의 점진적인 축적을 검출 및 정량함으로써 경로 활성화의 마커를 제공할 수 있다 [Albert et al. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210]. 접합된 방사성 금속은 리소좀 분해 후 세포 내에 남아있을 수 있다.
- [0088] 영상화 실험을 위한 항체 표지로서 적합한 금속-킬레이트 복합체가 다음 문헌에 개시되어 있다: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; [Hnatowich et al., (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157]; [Meares et al., (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78]; [Mirzadeh et al., (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65]; [Meares et al., (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26]; [Izard et al., (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350]; [Nikula et al., (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90]; [Camera et al., (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62]; [Kukis et al., (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110]; [Verel et al., (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670]; [Camera et al., (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646]; [Ruegg et al., (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226]; [Verel et al., (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670]; [Lee et al., (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482]; [Mitchell, et al., (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112]; [Kobayashi et al., (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111]; [Miederer et al., (2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137]; [DeNardo et al., (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90]; [Blend et al., (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363]; [Nikula et al., (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-176]; [Kobayashi et al., (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36]; [Mardirossian et al., (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74]; [Roselli et al., (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20].
- [0089] (b) 형광 표지, 예를 들어 희토류 킬레이트 (유로퓸 킬레이트), FITC, 5-카르복시플루오레세인, 6-카르복시플루오레세인 등을 비롯한 플루오레세인 유형, TAMRA 등을 비롯한 로다민 유형; 댄실; 리쓰아민 (Lissamine); 시아닌; 피코에리트린; 텍사스 레드 (Texas Red) 및 이들의 유사체. 형광 표지는 예를 들어 문헌 [Current

Protocols in Immunology, 상기 문헌]에 개시된 기술을 이용하여 항체에 접합될 수 있다. 형광 염료 및 형광 표지 시약은 인비트로겐 (Invitrogen)/몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes, 미국 오레곤주 유진) 및 피어스 바이오테크놀로지, 인크. (Pierce Biotechnology, Inc., 미국 일리노이주 록크포드)에서 시판하는 것을 포함한다.

[0090] (c) 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하거나 문헌에 개시되어 있다 (US 4275149). 효소는 일반적으로 다양한 기술을 이용하여 측정할 수 있는 발색 기질의 화학적 변경을 촉매한다. 예를 들어, 효소는 기질에서 색상 변화를 촉매할 수 있고, 이것은 분광학적으로 측정할 수 있다. 별법으로, 효소는 기질의 형광 또는 화학발광을 변경시킬 수 있다. 형광 변화를 정량하는 기술은 상기한 바와 같다. 화학발광 기질은 화학 반응에 의해 전자적으로 여기되고, 이후에는 (예를 들어 화학발광 계측기를 사용하여) 측정될 수 있는 광을 방출하거나 형광 수용자에게 에너지를 제공할 수 있다. 효소 표지의 예로는 루시페라제 (예, 개똥벌레 루시페라제 및 세균 루시페라제, US 4737456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 테히드로케나제, 우레아제, 퍼옥시다제, 예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제 (AP), β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 당류 옥시다제 (예, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 테히드로케나제), 헤테로시클릭 옥시다제 (예를 들어 우리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등이 있다. 효소를 항체에 접합시키는 기술은 문헌 [O'Sullivan et al. (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166]에 기재되어 있다.

효소-기질 조합의 예는, 예를 들어 다음을 포함한다:

[0091] (i) 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 기질로서의 히드로겐 퍼옥시다제 - (여기서, 히드로겐 퍼옥시다제는 염료 전구체 (예, 오르토페닐렌 디아민 (OPD) 또는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 염산염 (TMB))를 산화시킴),

[0092] (ii) 알칼리성 포스파타제 (AP)와 발색 기질로서의 파라-니트로페닐 포스페이트, 및

[0093] (iii) β -D-갈락토시다제 (β -D-Gal)와 발색 기질 (예, p-니트로페닐- β -D-갈락토시다제) 또는 형광 기질 4-메틸움벨리페릴- β -D-갈락토시다제.

[0094] 당업자는 많은 다른 효소-기질 조합을 이용할 수 있다. 일반적인 검토를 위해서 US 4275149 및 US 4318980을 참조한다.

[0095] 표지는 아미노산 측쇄, 활성화된 아미노산 측쇄, 시스테인 조작된 항체 등에 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체를 바이오틴과 접합시키고, 상기 언급한 표지의 3가지 광범위한 범주 중 임의의 표지가 아비딘 또는 스트렙타비딘에 접합될 수도 있고, 또는 그 반대로 접합될 수도 있다. 바이오틴은 스트렙타비딘에 선택적으로 결합하기 때문에, 표지가 이러한 간접적인 방식으로 항체에 접합될 수 있다. 별법으로, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시키기 위해서, 폴리펩티드 변이체는 작은 합텐 (예, 디곡신)과 접합시키고 상기 언급한 여러 유형의 표지 중 하나를 항-합텐 폴리펩티드 변이체 (예, 항-디곡신 항체)와 접합시킨다. 따라서, 표지를 폴리펩티드 변이체와 간접적으로 접합시킬 수 있다 [Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego].

[0096] 본 발명의 항체는 임의의 공지된 분석 방법, 예를 들어 ELISA, 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 검정 및 면역침전 분석 등에 사용될 수 있다 [Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.].

[0097] 검출 표지는 결합 또는 인식 사건을 국소화하고 가시화하며 정량하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 표지된 항체는 세포-표면 수용체를 검출할 수 있다. 검출가능하게 표지된 항체의 또다른 용도는 비드를 형광 표지된 항체와 접합시키고, 리간드의 결합시에 형광 신호를 검출하는 것을 포함하는 비드-기재의 면역포획 (immunocapture) 방법이다. 유사한 결합 검출 방법은 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 효과를 이용하여 항체-항원 상호작용을 측정하고 검출한다.

[0098] 검출 표지, 예를 들어 형광 염료 및 화학발광 염료 [Briggs et al. (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc, Perkin-Trans. 1:1051-1058]는 검출가능한 신호를 제공하고, 일반적으로 다음 특성을 갖는 항체 표지에 적용가능한 것이 바람직하다: (i) 표지된 항체는 낮은 배경으로 매우 높은 신호를 생성하여 소량의 항체가 무-세포 분석 및 세포-기반 분석 둘 모두에서 민감하게 검출될 수 있도록 해야 하고, (ii) 표지된 항체는 광안정성이어서 형광 신호가 유의한 광표백(photo bleaching) 없이 관찰되고 모니터링되며 기록될 수 있어야 한다. 표지된 항체를 특히 살아있는 세

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

[0100] 세포 형광 강도의 직접 정량화 및 형광 표지 사건의 확인, 예를 들어 웨티드-염료 접합체의 세포 표면 결합은 살아있는 세포 또는 비드와의 혼합/해독 (mix-and-read), 비-방사성 분석을 자동화한 시스템 (FMAT(등록상표) 8100 HTS 시스템, 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems, 미국 캘리포니아 포스터 시티))에서 수행될 수 있다 [Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204]. 표지된 항체의 용도에는, 세포 표면 수용체 결합 분석, 면역포획 분석, 형광 연결된 면역흡착 검정 (FLISA), 카스파제-절단 ([Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23], US 6372907), 세포자멸 [Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51] 및 세포독성 분석도 포함된다. 형광 마이크로부피 분석 기술은, 세포 표면에 표적화된 분자에 의한 상향 또는 하향 조절을 확인하는데 이용될 수 있다 [Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51].

[0101] 본 발명의 표지된 항체는 생체의학적 영상화와 분자 영상화의 다양한 방법 및 기술, 예를 들어: (i) MRI (자기 공명 영상화), (ii) MicroCT (컴퓨터 단층촬영술), (iii) SPECT (단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영술), (iv) PET (양전자 방출 단층촬영술) [Chen et al (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49], (v) 생체발광, (vi) 형광, 및 (vii) 초음파에 의한 영상화 생물마커 및 프로브로서 유용하다. 면역섬광조영술 (immunoscintigraphy)은 방사성 물질로 표지된 항체를 동물 또는 인간 환자에게 투여하고 항체가 위치하는 신체 부위의 사진을 찍는 영상화 절차이다 (US 6528624). 영상화 생물마커는 객관적으로 측정되어 정상적인 생물학적 과정, 발병 과정 또는 치료 개입에 대한 약물 반응의 지시자로서 평가될 수 있다. 생물 마커는 여러가지 유형일 수 있다: 제0형은 질환의 천연 병력 마커이며, 공지된 임상 지표, 예를 들어 류마티스성 관절염에서 활액 염증의 MRI 평가와 장기적으로 상관관계가 있고; 제I형 마커는 작용 메카니즘이 임상 결과와 관련되지 않을 수 있는 경우에도 이 메카니즘에 따른 개입 효과를 보여주며; 제II형 마커는 대리 종말점으로서 기능하여, 생물마커의 변화 또는 생물마커로부터의 신호가 표적화된 반응의 "유효성", 예를 들어 류마티스성 관절염에서 CT에 의한 골 침식 측정치에 대한 임상적 잇점을 예측한다. 따라서, 영상화 생물마커는 (i) 표적 단백질의 발현, (ii) 표적 단백질에 대한 치료제의 결합, 즉 선택성, 및 (iii) 소실율 및 반감기 약력학 데이터에 대한 약동학 (PD) 치료 정보를 제공할 수 있다. 시험관 기재의 생물마커에 비해 생체내 영상화 생물마커의 잇점은 비-침해성 치료, 정량화 가능한 전신 평가, 반복적 투여 및 평가, 즉 여러 시점에서의 투여 및 평가, 및 전임상 결과 (작은 동물)로부터 임상 (인간) 결과로의 잠재적으로 전이가능한 효과를 포함한다. 몇몇 용도의 경우, 생체영상화는 전임상 연구에서의 동물 실험을 대체하거나 그 횟수를 최소화한다.

[0102] 웨티드 표지 방법은 공지되어 있다. 문헌 ([Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.], [Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2], [Gorman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2], [Glazer et al. (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York], [Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York], [Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York] 및 [Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, CRC Press, Boca Raton, Fla.], [De Leon-Rodriguez et al. (2004) Chem. Eur. J. 10:1149-1155], [Lewis et al. (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324], [Li et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115], [Mier et al. (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237])을 참조한다.

[0103] 충분히 근접한 두 모이어티, 즉 형광 리포터 및 켄쳐(quencher)로 표지된 웨티드 및 단백질에서는 형광 공명 에너지 전달 (FRET)이 일어난다. 리포터기는 대체로 특정 파장의 광에 의해 여기되고 최대 밝기에서 방출될 수 있는 적절한 스톡스 이동 (Stokes shift)으로 에너지를 수용하기 또는 켄쳐기에게 전달하는 형광 염료이다. 형광 염료에는 연장된 방향성 (extended aromaticity)을 갖는 분자, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 이들

의 유도체 등이 있다. 형광 리포터는 무손상 웨티드 중의 켄체 모이어티에 의해 부분적으로 또는 유의하게 켄 청될 수 있다. 웨티다제 또는 프로테아제에 의한 웨티드의 절단시에, 검출가능한 형광 증가가 측정될 수 있다 [Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34].

[0104] 본 발명의 표지된 항체는 친화도 정제제로서 사용될 수도 있다. 이 과정에서, 표지된 항체는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 세파텍스 (Sephadex) 수지 또는 여과지와 같은 고체상에 고정된다. 고정된 항체를 정제될 항원을 함유하는 샘플과 접촉시킨 후, 지지체를 정제될 항원을 제외하고는 샘플 중에 존재하는 실질적으로 모든 물질을 제거할 적합한 용매로 세척하는데, 상기 항원은 고정된 폴리웨티드 변이체에 결합한다. 최종적으로, 상기 지지체를 폴리웨티드 변이체로부터 항원을 방출시킬 또 다른 적합한 용매, 예를 들어 글리신 베퍼 (pH 5.0)로 세척한다.

[0105] 표지 시약은 전형적으로 (i) 시스테인 조작된 항체의 시스테인 티올과 직접 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있거나, (ii) 링커 시약과 반응하여 링커-표지 중간체를 형성할 수 있거나, 또는 (iii) 링커 항체와 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있는 반응성 관능기를 보유한다. 표지 시약의 반응성 관능기로는, 말레이미드, 할로아세틸, 요오도아세트아미드 숙신이미딜 에스테르 (예, NHS, N-히드록시숙신이미드), 이소티오시아네이트, 술포닐 클로라이드, 2,6-디클로로트리아지닐, 펜타플루오로페닐 에스테르 및 포스포르아미다이트 등이 있으나, 다른 관능기도 사용될 수 있다.

[0106] 예시적인 반응성 관능기는 검출가능한 표지, 예를 들어 바이오판 또는 형광 염료의 카르복실기 치환체 중의 N-히드록시숙신이미딜 에스테르 (NHS)이다. 표지의 NHS 에스테르는 예비 형성, 단리, 정제 및/또는 특징규명될 수 있거나, 또는 계내 형성되어 항체의 친핵기와 반응할 수 있다. 전형적으로, 표지의 카르복실 형태는 카르보디이미드 시약, 예를 들어 디시클로헥실카르보디이미드, 디이소프로필카르보디이미드, 또는 유로늄 시약, 예를 들어 TSTU (0-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 테트라플루오로보레이트, HBTU (0-벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트) 또는 HATU (0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트), 활성자, 예를 들어 1-히드록시 벤조트리아졸 (HOBT) 및 N-히드록시숙신이미드의 몇가지 조합과의 반응으로 활성화되어 표지의 NHS 에스테르를 형성한다. 몇몇 경우에는, 표지 및 항체가 표지의 계내 활성화 및 항체와의 반응으로 커플링되어 표지-항체 접합체를 1단계로 형성할 수 있다. 다른 활성화 및 커플링 시약으로는, TBTU (2-(1H-벤조트리아조-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트), TFFH (N,N',N",N'"-테트라메틸유로늄 2-플루오로-헥사플루오로포스페이트), PyBOP (벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트), EEDQ (2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로-퀴놀린), DCC (디시클로헥실카르보디이미드), DIPCDI (디이소프로필카르보디이미드), MSNT (1-(메시틸렌-2-술포닐)-3-니트로-1H-1,2,4-트리아졸 및 아릴 술포닐 할라이드, 예를 들어 트리이소프로필벤젠술포닐 클로라이드 등이 있다.

[0107] 본 발명의 알부민 결합 웨티드-Fab 화합물:

[0108] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 알부민 결합 단백질에 융합된다. 혈장-단백질 결합은 수명이 짧은 분자의 약력학 특성을 개선시키는데 효과적인 수단일 수 있다. 알부민은 혈장에서 가장 풍부한 단백질이다. 혈청 알부민 결합 웨티드 (ABP)는 조직 흡수, 투과 및 확산의 변경 등을 비롯하여 융합된 활성 도메인 단백질의 약동학을 변경시킬 수 있다. 이를 약동학 파라미터는 적절한 혈청 알부민 결합 웨티드 서열의 특이적 선택을 통해 조정될 수 있다 (US 20040001827). 일련의 알부민 결합 웨티드가 파지 디스플레이 스크리닝을 통해 확인되었다 ([Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043], WO 01/45746). 본 발명의 화합물은 (i) 문헌 [Dennis et al. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043]의 표 III 및 표 IV, 35038 페이지, (ii) US 20040001827의 [0076] 서열 9 내지 22, 및 (iii) WO 01/45746의 12 내지 13 페이지에 제시되어 있는 ABP 서열을 포함하며, 상기 문헌 모두가 본원에 참조로 포함된다. 알부민 결합 웨티드를 Fab 중쇄의 C-말단에 1:1의 화학양론적 비율 (1 ABP/1 Fab)로 융합시켜 알부민 결합 (ABP)-Fab를 조작한다. 이를 ABP-Fab와 알부민의 회합은 토끼 및 마우스에서 항체 반감기를 25배 초과로 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 상기 기재한 반응성 Cys 잔기는 이를 ABP-Fab에 도입되어 세포독성 약물과의 부위-특이적 접합 및 이후의 생체내 동물 연구에 사용될 수 있다. 도 9는 알부민 결합 웨티드-Fab 융합 (ABP-Fab) 링커 약물 접합체를 그래픽으로 나타낸다.

[0109] 예시적인 알부민 결합 웨티드 서열은 서열 42-46에 나열된 아미노산 서열을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	서열 42
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	서열 43
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	서열 44
RLIEDICLPRWGCLWEDD	서열 45
DICLPRWGCLW	서열 46

[0110]

항체-약물 접합체

[0111] 다른 측면에서, 본 발명은 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체, 또는 항체-약물 접합체 (ADC)를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 추가로 면역접합체를 사용하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 면역접합체는 세포독성제 또는 검출가능한 물질에 공유 부착된 임의의 상기 항-CD22 항체를 포함한다.

[0113] 암 치료에서 세포독성제 또는 세포증식 억제제, 즉 종양 세포를 치사시키거나 억제하는 약물의 국소 전달을 위한 항체-약물 접합체의 사용 ([Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26: 151-172]; 미국 특히 4,975,278)은 종양으로 약물 모이어티의 표적화된 전달, 및 그 내부의 세포내 축적을 허용하고, 여기서 상기 비접합된 약물 물질의 전신 투여는 정상 세포뿐만 아니라 제거하고자 하는 종양 세포에 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 ([Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05]; [Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506]). 이에 따라 최소 독성을 가지면서 최대 효능을 보이는 것이 추구된다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체는 모두 상기 전략에서 유용한 것으로 보고되었다 (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21: 183-87). 상기 방법에서 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소 루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (Rowland et al., (1986) 상기 문현). 항체-독소 접합체에서 사용되는 독소는 세균 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 독소, 예를 들어 리신, 소분자 독소, 예를 들어 젤다나마이신 ([Mandler et al., (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581]; [Mandler et al., (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028]; [Mandler et al., (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; [Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]), 및 칼리케아미신 ([Lode et al., (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al., (1993) Cancer Res. 53:3336-3342])을 포함한다. 독소는 튜뷸린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 억제를 포함한 메카니즘에 의해 그들의 세포독성 및 세포증식 억제 효과를 달성할 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합될 때 불활성이거나 활성이 작은 경향이 있다.

[0114] 제발린(등록상표) (이브리투모맙 티옥세탄, 비오젠/이텍)은 티오우레이 링커-킬레이터 (chelator)에 의해 결합된, 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견된 CD20 항원에 대해 작용하는 뮤린 IgG1 카파 모노클로날 항체 및 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성 동위원소로 이루어진 항체-방사성 동위원소 접합체이다 ([Wiseman et al., (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77]; [Wiseman et al., (2002) Blood 99(12):4336-42]; [Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20 (10):2453-63]; [Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(15): 3262-69]). 제발린이 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 대한 활성을 갖지만, 이를 투여하면 대부분의 환자에서 중증의 혈구감소증이 장기간 나타난다. 칼리케아미신과 연결된 hu CD33 항체로 구성된 항체-약물 접합체인 마일로타그 (MYLOTARG)™ (켐투주맙 오조가미신; 와이어쓰 파마슈티칼스)는 주사에 의해 급성 골수성 백혈병을 치료하기 위한 것으로 2000년에 승인되었다 ([Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특히 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). 디슬피드 링커 SPP를 통하여 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 huC242 항체로 이루어진 항체-약물 접합체인 칸투주맙 메르탄신 (이류노겐, 인크.)을 대상으로 하여, CanAg를 발현하는 암, 예를 들어 결장암, 췌장암, 위암 등을 치료하기 위한 II상 시험이 진행되고 있다. 메이탄시노이드 약물 모이어티인 DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 이루어진 항체-약물 접합체인 MLN-2704 (밀레니엄 팜., 비지엘 바이올로직스, 이류노겐, 인크.)는 현재 전립선 종양의 가능한 치료를 위해 개발되고 있다. 오리스타틴 웨티드인 오리스타틴 E (AE) 및 모노메틸오리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체)을 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 루이스 Y에 특이적임) 및

cAC10 (혈액학적 악성종양 상의 CD30에 특이적임)에 접합시켰고 (Doronina et al., (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784), 이는 현재 치료제 개발 중에 있다.

[0115] 면역접합체 생성에 유용한 화학요법제를 본원에서 기재한다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 애루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디아 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시 날리스 (*Sapaponaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코 테센을 포함한다 (예를 들어, WO 93/21232 (1993년 10월 28일 공개) 참조). 다양한 방사선핵종이 방사성 접합된 항체의 생산에 이용될 수 있다. 그 예는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이기능성 단백질-커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이기능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디페미네이트 HC1), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., (1987) *Science*, 238:1098]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14 표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이 항체에 대한 방사성핵종의 접합을 위한 예시적인 킬레이팅제이다 (WO 94/11026).

[0116] 항체 및 1종 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 오리스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 세포독성 활성을 갖는 상기 독소의 유도체의 접합체도 본원에서 고려된다.

메이탄신 및 메이탄시노이드

[0118] 일부 실시태양에서, 면역접합체는 1개 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 본 발명의 항체 (전장 또는 단편)를 포함한다.

[0119] 메이탄시노이드는 튜뷸린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 3,896,111). 뒤이어, 특정 미생물도 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 밝혀졌다 (미국 특허 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0120] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의해 제조하기 위해 비교적 이용가능하고, (ii) 비-디술피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체 약물 접합체에서 매력적인 약물 모이어티이다.

[0121] 메이탄시노이드 약물 모이어티로서 사용하기 적합한 메이탄신 화합물은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 방법에 따라 천연 공급원으로부터 단리되거나 유전자 조작 기술을 사용하여 생산할 수 있거나 (Yu et al., (2002) *PNAS* 99:7968-7973 참조), 또는 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체는 공지된 방법에 의해 합성 방식으로 제조될 수 있다.

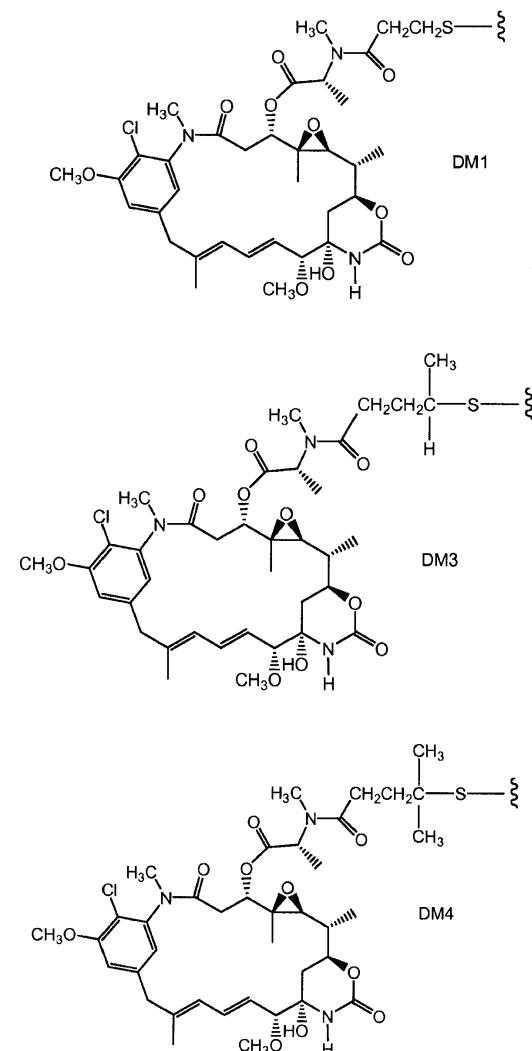
[0122] 예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 C-19-데클로로 (미국 특허 4256746) (안사미토신 P2의 수소화알루미늄리튬 환원에 의해 제조); C-20-히드록시 (또는 C-20-데메틸) +/- C-19-데클로로 (미국 특허 4361650 및 4307016) (스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 또는 악티노마이세스 (*Actinomyces*)를 사용한 탈메틸화 또는 LAH를 사용한 탈염소화에 의해 제조)과 같은 변형된 방향족 고리를 갖는 것; 및 C-20-데메톡시, C-20-아실옥시 (-OCOR), +/- 데클로로 (미국 특허 4,294,757) (아실 클로라이드를 사용한 아실화에 의해 제조), 및 다른 위치에 변형을 갖는 것을 포함한다.

[0123] 예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 또한 C-9-SH (미국 특허 4424219) (메이탄시놀과 H₂S 또는 P₂S₅의 반

응에 의해 제조); C-14-알콕시메틸(데메톡시/CH₂OR) (US 4331598); C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸(CH₂OH 또는 CH₂OAc) (미국 특허 4450254) (노카르디아 (*Nocardia*)로부터 제조됨); C-15-히드록시/아실옥시 (US 4364866) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 전환에 의해 제조); C-15-메톡시 (미국 특허 4313946 및 4315929) (트레위아 누들들로라 (*Trewia nudiflora*)로부터 단리됨); C-18-N-데메틸 (미국 특허 4362663 및 4322348) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조); 및 4,5-데옥시 (US 4371533) (메이탄시놀의 삼염화티탄/LAH 환원에 의해 제조)와 같은 변형을 갖는 것을 포함한다.

[0124]

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



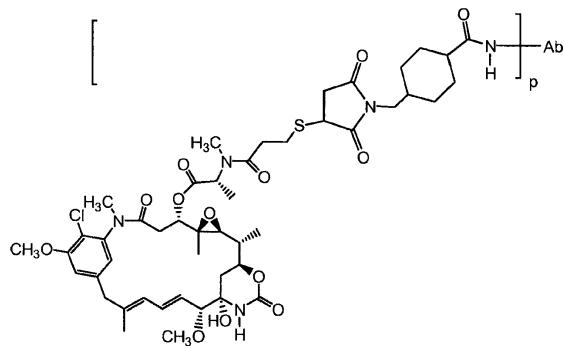
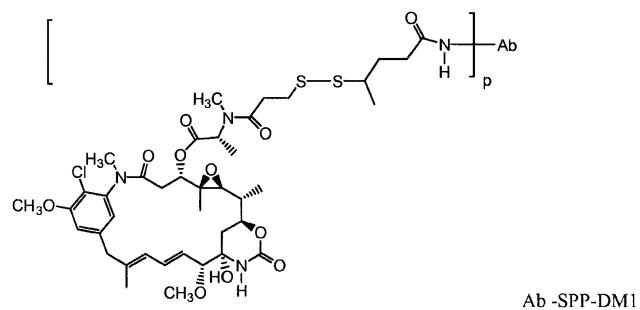
[0125]

[0126]

여기서, 물결선은 항체 약물 접합체의 링커 (L)에 대한 약물의 황 원자의 공유 부착을 나타낸다. SMCC에 의해 DM1에 연결된 헤르셉틴 (HERCEPTIN)(등록상표) (트라스투주맙, 항-HER2 항체)은 보고된 바 있다 (그 전부가 본 원에 참고로 포함된 WO 2005/037992). 본 발명의 항체 약물 접합체는 본원에 개시된 절차에 따라 제조할 수 있다.

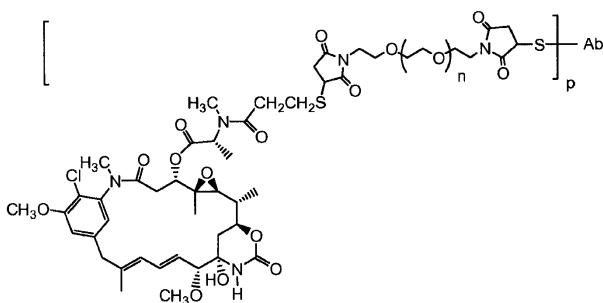
[0127]

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



[0128]

[0129] DM1이 BMPEO 링커를 통해 항체의 티울기에 연결된 예시적인 항체 약물 접합체는 하기 구조 및 약어를 갖는다.



[0130]

[0131] 여기서, Ab는 항체이고; n은 0, 1 또는 2이고; p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0132]

메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 그의 제조 방법, 및 이들의 치료 용도는 예를 들어 그 개시내용이 본원에 참고로 명백하게 포함되는 미국 특허 5,208,020; 5,416,064; 6,441163 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다. 문헌 [Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 작용하는 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 높은 세포독성을 보이는 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 분석에서 항종양 활성을 보였다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에서는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤린 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1에 디술피드 링커를 통해 접합된 면역접합체를 기재하고 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당 3×10^5 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관내에서 시험하였다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물에 유사한 수준의 세포독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시켜 증가시킬 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 보였다.

[0133]

항-CD22 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 결합시킴으로써 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 5,208,020 (그 개시 내용이 본원에 명백하게 참고로 포함됨) 참조). 1개의 항체 분자에 접합된 평균 3 내지 4 개의 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증대시키는 효능을 나타내지만, 심지어 하나의 독소/항체 분자도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증대시킬 것으로 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 기술에 의해 합성되거나 천연 공급

원으로부터 단리될 수 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 5,208,020, 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예를 들어 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0134] 예를 들어 그 개시 내용이 본원에 명백하게 참고로 포함된 미국 특허 5208020, 6441163, 또는 유럽 특허 0 425 235 B1, 문현 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)] 및 US 2005/016993 A1에 개시된 것을 포함하여, 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 위한, 당업계에 공지된 많은 연결기가 있다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 미국 특허 출원 11/141344 (2005년 5월 31일 출원, "Antibody Drug Conjugates and Methods")에 개시된 바와 같이 제조될 수 있다. 링커기는 상기 확인된 특허에 개시된 바와 같은 디슬퍼드기, 티오에테르기, 산불안정기, 광불안정기, 펩티다제 불안정기, 또는 에스테라제 불안정기를 포함한다. 추가의 링커기가 본원에서 기재되고 예시된다.

[0135] 항체와 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 이기능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로파오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티ول란 (IT), 이미도에스테르의 이기능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디프이미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 슬퍼드 연결을 제공하기 위한 특히 바람직한 커플링제는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로파오네이트 (SPDP) [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)] 또는 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티올)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.

[0136] 링커는 결합 유형에 따라서 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결은 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실기와 반응시킴으로써 형성될 수 있다. 이러한 반응은 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

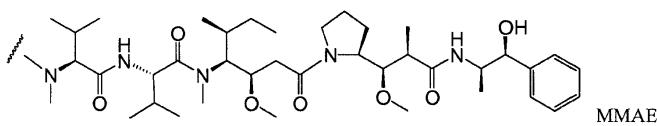
[0137] 한 실시태양에서, 본 발명의 임의의 항체 (전장 또는 단편)는 1개 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된다. 면역접합체의 한 실시태양에서, 세포독성제 D는 메이탄시노이드 DM1이다. 면역접합체의 한 실시태양에서, 링커는 SMCC이다. 한 실시태양에서, 항체-링커-약물 접합체는 SMCC 링커를 통해 DM1 세포독성제에 공유 부착된 본원에 개시된 항-CD22 항체이다.

오리스타틴 및 돌로스타틴

[0138] 일부 실시태양에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 즉 오리스타틴에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국 특허 5635483; 5780588). 돌라스타틴 및 오리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 ([Woyke et al., (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584]), 항암 (미국 특허 5663149) 및 항진균 활성 ([Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 오리스타틴 약물 모이어티는 펩티드성 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

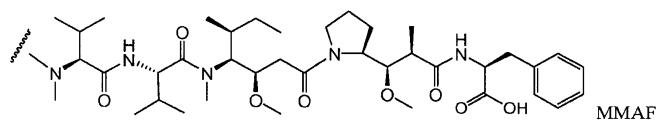
[0139] 예시적인 오리스타틴 실시태양은 그 개시내용의 전문을 명백하게 본원에 참고로 포함시킨 문현 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004]에 개시된 N-말단 연결된 모노메틸오리스타틴 약물 모이어티 D_E 및 D_F를 포함한다.

[0140] 예시적인 오리스타틴 실시태양은 MMAE이다 (여기서, 물결선은 항체 약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 부착을 나타낸다).



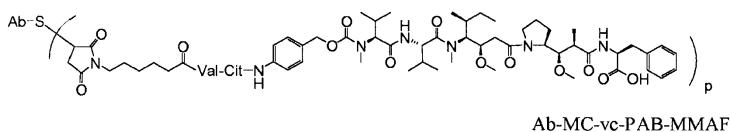
[0141]

[0142] 다른 예시적인 오리스타틴 실시태양은 MMAF이고, 여기서 물결선은 항체 약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 부착을 나타낸다 (US 2005/0238649):

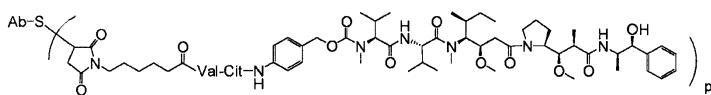


[0144]

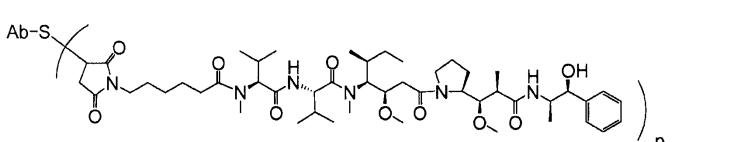
MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 성분 (본원에서 추가로 기재됨)을 포함하는 추가의 예시적인 실시태양은 하기 구조 및 약어를 갖는다 (여기서, Ab는 항체를 의미하고; p는 1 내지 약 8임):



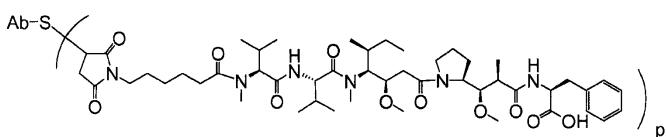
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

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

칼리케아미신

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

다른 세포독성제

본 발명의 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양제는 BCNU, 스트렙토조신, 빙크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국

특허 5,053,394, 5,770,710에 기재된, 접합체로 공지된 물질의 패밀리, 및 에스페라미신 (미국 특허 5,877,296)을 포함한다.

[0153] 사용될 수 있는 효소 활성의 독소 및 그의 단편으로는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (슈도모나스 애루기노사로부터 유래됨), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAPS), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 들 수 있다 (예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조).

[0154] 또한, 본 발명은 항체와 뉴클레오티드 분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예를 들어 테옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체도 고려한다.

[0155] 종양의 선택적인 파괴를 위해, 항체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 방사성 접합체의 생산을 위해 다양한 방사성 동위원소가 이용가능하다. 그 예는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 접합체를 검출용으로 사용하는 경우에는, 접합체는 섬광조영 연구용 방사성 원자, 예를 들어 Tc^{99m} 또는 I¹²³을 포함할 수 있거나, 또는 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, MRI로도 공지됨)용 스펜 표지, 예를 들어 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0156] 방사성 표지 또는 다른 표지를 공지된 방식으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 웨티드는 생합성할 수 있거나, 또는 예를 들어 수소 대신에 불소-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 이용하는 화학적 아미노산 합성에 의해 합성할 수 있다. Tc^{99m} 또는 I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ 및 In¹¹¹과 같은 표지를 웨티드 내의 시스테인 잔기를 통하여 부착시킬 수 있다. 이트륨-90은 라이신 잔기를 통하여 부착시킬 수 있다. 요오도겐 (IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57])을 사용하여 요오드-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.

[0157] 항체와 세포독성제의 접합체는 다양한 이기능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로파오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이기능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14 표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이 항체에 대한 방사성핵종의 접합을 위한 예시적인 킬레이팅제이다 (WO 94/11026 참조). 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산불안정성 링커, 웨티다제 감수성 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디술퍼드-함유 링커 (Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992); 미국 특허 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0158] 본 발명의 화합물은 상업적으로 이용가능한 (예를 들어 피어스 바이오텍놀로지, 인크.로부터) 가교결합 시약, 즉 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 사용하여 제조된 ADC를 고려하고, 이로 제한되지 않는다 (문헌 [pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog] 참조).

항체 약물 접합체의 제조:

[0160] 본 발명의 항체 약물 접합체 (ADC)에서, 항체 (Ab)는 링커 (L)를 통해 항체 당 1개 이상의 약물 모이어티 (D), 예를 들어 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티에 접합된다. 화학식 I의 ADC는 다음을 포함한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 여러 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 항체의 친핵기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 D-L을 형성시킨 다음, 이를 항체의

친핵기와 반응시키는 방법. ADC를 제조하기 위한 추가의 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0161]

<화학식 I>

[0162]

Ab-(L-D)_p

[0163]

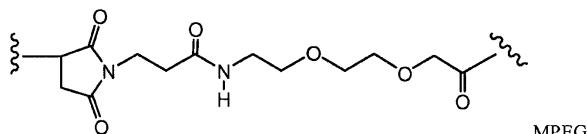
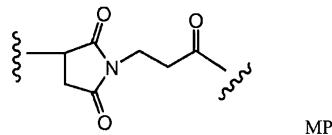
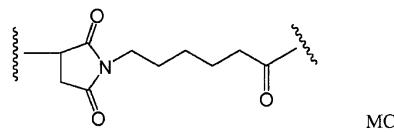
링커는 1종 이상의 링커 성분으로 구성될 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-페리딜티오)펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC"), 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트 ("SIAB")를 포함한다. 추가의 링커 성분은 당업계에 공지되어 있고, 일부가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

[0164]

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

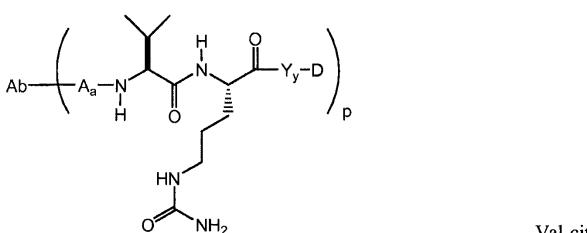
[0165]

예시적인 링커 성분 구조는 아래에 제시한다 (여기서, 물결선은 ADC의 다른 성분에 대한 공유 부착 부위를 나타낸다):

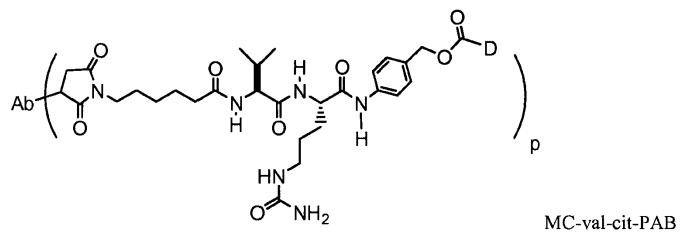
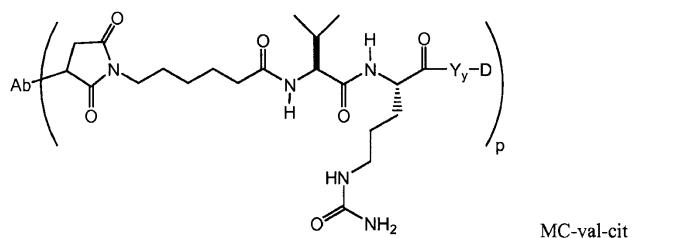


[0166]

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



[0168]



[0169]

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

[0171]

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

[0172]

유사하게, 약물 모이어티 상의 친핵기는 (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBr 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기를 포함하는, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0173]

또다른 측면에서, 항체는 1개 이상의 술포드릴기를 도입하기 위해 화학적으로 변형될 수 있는 1개 이상의 라이신 잔기를 갖는다. 항체 단위는 술포드릴기의 황 원자를 통해 링커 단위에 결합한다. 라이신을 변형하는데 사용될 수 있는 시약은 N-숙신이미딜 S-아세틸티오아세테이트 (SATA) 및 2-이미노티올란 염산염 (트라우트 시약)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0174]

다른 실시태양에서, 항체는 1개 이상의 술포드릴기를 갖도록 화학적으로 변형될 수 있는 1개 이상의 탄수화물기를 보유할 수 있다. 항체 단위는 본원에 개시된 바와 같이 술포드릴기의 황 원자를 통해 링커 단위, 예를 들어

스트레처 (Stretcher) 단위에 결합한다.

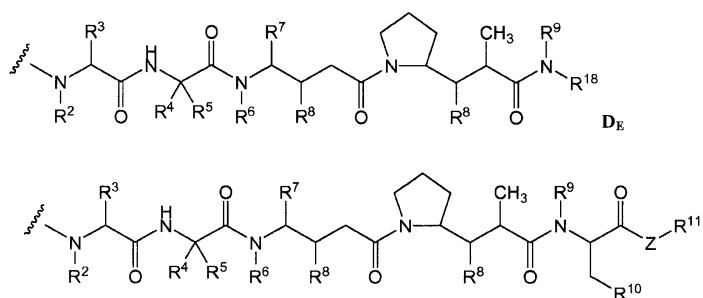
[0175] 또 다른 실시태양에서, 항체는 산화되어 알데히드 (-CHO)기를 제공할 수 있는 1개 이상의 탄수화물기를 가질 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Laguzza, et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55] 참조). 상응하는 알데히드는 스트레처 상의 반응성 부위와 결합을 형성할 수 있다. 항체 상의 카르보닐기와 반응할 수 있는 스트레처 상의 반응성 부위는 히드라진 및 히드록실아민을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약물 단위의 부착 또는 회합을 위한 단백질의 변형을 위한 다른 프로토콜은 본원에 참고로 포함된 문헌 [Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002)]에 기재되어 있다.

[0176] 링커-약물을 세포 표적화 단백질, 예를 들어 항체, 면역글로불린 또는 그의 단편에 접합하기 위한 방법은 예를 들어 본원에 참고로 포함된 US5,208,020; US6,441,163; WO 2005037992; WO 2005081711; 및 WO 2006/034488에서 볼 수 있다.

[0177] 별법으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 웨티드 합성에 의해 제조할 수 있다. DNA의 길이는 접합체의 목적하는 특성을 파괴하지 않는 링커 웨티드를 코딩하는 영역에 의해 분리되거나 또는 서로 인접해 있는 접합체의 두 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.

[0178] 또 다른 실시태양에서, 항체를 종양 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (상기, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 소실제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

[0179] 면역접합체의 한 실시태양에서, 세포독성제 D는 하기 화학식 D_E 또는 D_F의 오리스타틴이고,



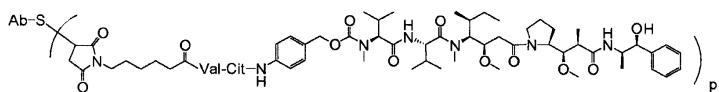
[0180]

[0181] 여기서, R² 및 R⁶은 각각 메틸이고, R³ 및 R⁴는 각각 이소프로필이고, R⁷은 sec-부틸이고, 각각의 R⁸은 CH₃, O-CH₃, OH, 및 H 중에서 독립적으로 선택되고; R⁹는 H이고; R¹⁰은 아릴이고; Z는 -O- 또는 -NH-이고; R¹¹은 H, C₁-C₈ 알킬, 또는 -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃이고; R¹⁸은 -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-아릴이고;

[0182] (d) p는 약 1 내지 8이다.

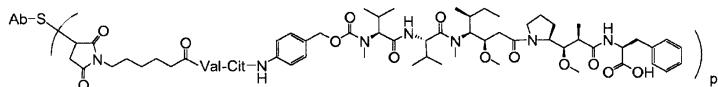
[0183] 다음 실시태양은 임의의 상기 면역접합체를 위해 추가로 제공된다. 한 실시태양에서, 면역접합체는 시험관내 또는 생체내 세포 사멸 활성을 갖는다. 한 실시태양에서, 링커는 항체 상의 티올기를 통해 항체에 부착된다. 한 실시태양에서, 링커는 프로테아제에 의해 절단가능하다. 한 실시태양에서, 링커는 val-cit 디웨티드를 포함한다. 한 실시태양에서, 링커는 p-아미노벤질 단위를 포함한다. 한 실시태양에서, p-아미노벤질 단위는 약물과 링커 내의 프로테아제 절단 부위 사이에 배치된다. 한 실시태양에서, p-아미노벤질 단위는 p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB)이다. 한 실시태양에서, 링커는 6-말레이이미도카프로일을 포함한다. 한 실시태양에서, 6-말레이이미도카프로일은 항체와 링커 내의 프로테아제 절단 부위 사이에 배치된다. 상기 실시태양은 단독으로 또는 실시태양의 임의의 조합으로 이루어질 수 있다.

[0184] 한 실시태양에서, 약물은 MMAE 및 MMAF 중에서 선택된다. 한 실시태양에서, 면역접합체는 하기 화학식으로 표시된다:



[0185]

[0186] 여기서, Ab는 임의의 상기 항-CD22 항체이고, S는 황 원자이고, p는 2 내지 5이다. 한 실시태양에서, 면역접합체는 하기 화학식으로 표시된다:



[0187]

[0188] 여기서, Ab는 임의의 상기 항-CD22 항체이고, S는 황 원자이고, p는 약 1 내지 약 6, 약 2 내지 약 5, 약 2 내지 약 6, 약 2 내지 약 4, 약 2 내지 약 3, 약 3 내지 약 4, 약 3 내지 약 5, 약 3 내지 약 6, 또는 약 4 내지 약 6이다.

[0189] 표지된 항체 영상화 방법:

[0190] 본 발명의 다른 실시태양에서, 시스테인 조작된 항체는 방사선핵종, 형광 염료, 생체발광-촉발 기질 모이어티, 화학발광-촉발 기질 모이어티, 효소, 및 진단, 약동학, 및 치료 적용으로 영상화 실험을 위한 다른 검출 표지를 갖는 시스테인 티올을 통해 표지될 수 있다. 일반적으로, 표지된 시스테인 조작된 항체, 즉 "바이오마커" 또는 "프로브"는 생존 유기체, 예를 들어 인간, 설치류, 또는 다른 소형 동물, 관류된 장기, 또는 조직 샘플에 주사, 관류, 또는 경구 섭취에 의해 투여된다. 프로브의 분포를 시간 경로에 걸쳐 탐출하고, 영상으로 나타낸다.

[0191] 제조 용품:

[0192] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 상기 언급된 장애의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조 용품 또는 "키트"가 제공된다. 본 발명의 제조 용품은 용기, 및 상기 용기 상의 또는 상기 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 또는 블리스터 팩 (blister pack)이 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들면, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 용기는 상기 병태를 치료하는데 효과적인 항체-약물 접합체 (ADC) 조성물을 보유하고, 멸균 주입구를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 봉지 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 적어도 하나의 활성제는 ADC이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 해당 조성물이 선택된 병태, 예를 들어 암을 치료하는데 사용됨을 나타낸다. 별법으로 또는 추가로, 제조 용품은 제약상 허용되는 버퍼, 예를 들어 주사용 정규수 (BWFI), 포스페이트 완충 식염수, 링거액 및 멕스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료, 예를 들면, 기타 버퍼, 회석제, 필터, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다.

[0193] 제약 조성물:

[0194] 한 측면에서, 임의의 상기 면역접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 한 측면에서, 개체에게 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, B 세포 증식 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 한 실시태양에서, B 세포 증식 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투증 세포 림프종 중에서 선택된다. 한 실시태양에서, 세포 증식 장애는 세포의 표면 상에서 CD22의 증가된 발현과 관련이 있다.

[0195] 한 측면에서, 세포를 CD22에 대한 면역접합체의 결합을 허용하는 조건하에 임의의 상기 면역접합체에 노출시키는 것을 포함하는, 세포 증식을 억제하는 방법이 제공된다. 한 실시태양에서, B 세포는 종양 세포이다. 한 실시태양에서, 종양 세포는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투증 세포 림프종으로부터 선택되는 B 세포 증식 장애를 경험하거나 경험한 것으로 의심되는 포유동물의 B 세포이고, 세포는 이종이식편이다. 한 실시태양에서, 노출은 시험관내에서 일어난다. 한 실시태양에서, 노출은 생체내에서 일어난다.

[0196] 한 측면에서, B-세포 백혈병 또는 B-세포 림프종을 진단하기 위해서 백혈병 또는 림프종을 경험하는 포유동물에서 혈청 가용형 CD22를 분석하고, 질환의 임상 진행 또는 퇴행을 측정하고, 또는 종양 부하 또는 재발을 평가하

기 위해 본 발명의 항-CD22 항체를 사용하는 방법을 제공한다. 항-CD22 RFB4 항체 PE38 (슈도모나스 외독소 A 단편 38) 독소 접합체 (문헌 [Kreitman, RJ. et al., NEJM 345:241-247 (2001)] 참고)를 사용하는 상기 방법이 US 20050244828 (Kreitman, R.J. et al., 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨)에 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

[0237]

CD22에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 항-CD22 항체를 포함하는 면역접합체를 추가로 제공한다. 시스테인 조작된 항-CD22 항체 및 그의 면역접합체를 추가로 제공한다. 본 발명의 항체 및 면역접합체는 예를 들어 CD22의 변경된 발현, 예를 들어 증가된 발현과 관련이 있는 장애의 진단 또는 치료에 유용하다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 세포 증식 장애, 예를 들어 종양 또는 암의 진단 또는 치료에 유용하다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 CD22, 예를 들어 세포 표면 상에 발현된 CD22의 검출에 유용하다.

[0238]

항-CD22 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 항-CD22 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하고, 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 임의의 하나 이상의 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 항-CD22 항체, 또는 면역접합체를 포함하는 조성물 (제약 제제 포함)을 또한 제공한다.

[0239]

일반적인 기술

[0240]

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

[0241]

정의 및 약어

[0242]

정의

[0243]

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

[0244]

"단리된" 핵산 분자는 예를 들어 그의 자연 환경에서 그와 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 다른 핵산 분자로부터 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 핵산 분자를 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유된 핵산

분자를 추가로 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외부에 존재하거나 또는 그의 천연 염색체 위치와 상이한 상이한 염색체 위치에 존재한다.

[0245] "정제된"은 분자가 함유된 샘플의 적어도 95 중량%, 또는 적어도 98 중량%의 농도로 분자가 샘플 내에 존재함을 의미한다.

[0246] 본원에서 사용될 때 용어 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 당업자가 특정 값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주하도록 2개의 수치값 (예를 들어, 하나는 본 발명의 항체와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 분자와 관련이 있는) 사이에 충분히 높은 정도의 유사성을 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교값의 함수로서, 예를 들어 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 및/또는 약 10% 미만이다.

[0247] 본원에서 사용될 때 구문 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 당업자가 특정 값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하도록 2개의 수치값 (일반적으로 하나는 분자와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 분자와 관련이 있는) 사이의 충분히 높은 정도의 차이를 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 분자에 대한 값의 함수로서, 예를 들어 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과, 및/또는 약 50% 초과이다.

[0248] 본원에서 사용될 때 용어 "벡터"는 그가 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 나타내도록 의도된다. 한 종류의 벡터는 그 내부에 추가의 DNA 세그먼트가 라이케이션될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA를 의미하는 "플라스미드"이다. 다른 종류의 벡터는 과지 벡터이다. 또다른 종류의 벡터는 바이러스 벡터이고, 여기서 추가의 DNA 세그먼트는 바이러스 게놈 내로 라이케이션될 수 있다. 특정 벡터는 그가 도입되는 숙주 세포 내에서 자동 복제할 수 있다 (예를 들어, 세균 복제 기점을 갖는 세균 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 그에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 그들이 작동적으로 연결되는 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터", 또는 단순히 "재조합 벡터"로서 칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태로 존재한다. 플라스미드는 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태이므로, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0249] "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 본원에서 상호교환가능하게 사용될 때 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 의미하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 포함될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형 뉴클레오티드, 예를 들어 메틸화 뉴클레오티드 및 그들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에는 비-뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 합성 후에 이루어진 변형(들), 예를 들어 표지에 대한 접합을 포함될 수 있다. 다른 종류의 변형은 예를 들어 1종 이상의 천연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 "캡 (cap)" 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예를 들어 전하를 띠지 않는 연결기 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등)로 및 전하를 띤 연결기 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형, 매달린 모이어티, 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펫티드, 폴리-L-라이신 등)을 함유하는 것, 인터컬레이터 (intercalator) (예를 들어, 아크리딘, 솔라렌 등)을 갖는 것, 퀼레이터 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 봉소, 산화 금속 등)을 함유하는 것, 알킬레이터 (alkylator)를 함유하는 것, 변형 연결기 (예를 들어, 알파 아노머 (anomeric) 핵산 등)을 갖는 것과, 폴리뉴클레오티드(들)의 비변형 형태를 포함한다. 또한, 당 내에 보통 존재하는 임의의 히드록실기는 예를 들어 포스포네이트기, 포스페이트기에 의해 교체되거나, 표준 보호기로 보호되거나, 추가의 뉴클레오티드에 대해 추가의 연결기를 제조하기 위해 활성화될 수 있거나, 고체 또는 반-고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 아민 또는 1내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑 (capping)기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 또한 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사형, 예를 들어 2'-0-메틸-, 2'-0-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, α-아노머 당, 에피머 당, 예를 들어 아라비노스, 자일로스 또는 라이속스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헵툴로스, 비환식 유사체 및 염기성 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어 메틸 리보시드를 함유할 수 있다. 1개 이상의 포스포디에스테르 연결기는 대체 연결기로 교체될 수 있다. 상기 대체 연결기는 포스페이트가 P(O)S ("티오에

이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H 또는 임의로 에테르 (-O-) 연결기를 함유하는 치환 또는 비치환 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알케닐, 시클로알케닐 또는 아르알딜임)로 교체되는 실시태양을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연결기가 동일할 필요는 없다. 상기 기재는 RNA 및 DNA를 포함하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[0250] 본원에서 사용될 때 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로, 반드시는 아니지만, 일반적으로 길이가 약 200개 뉴클레오티드 미만인 짧은, 일반적으로 단일가닥의, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 배제하는 의미가 아니다. 폴리뉴클레오티드에 대한 상기 기재는 올리고뉴클레오티드에 동등하고 충분히 적용가능하다.

[0251] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap)을 도입시킨 후, 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 본원에서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 비율을 결정하기 위한 정렬은 당업자에게 공지된 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 전장 서열에 걸친 최대 정렬의 달성을 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 동일성 비율값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 얻을 수 있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크. 소유로서, 미국 저작권 (U.S. Copyright Office, 미국 워싱턴 디. 씨. 20559)에 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 TXU510087하에 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크로부터 공개적으로 입수가능하거나 소스 코드 (source code)로부터 수집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체제, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.

[0252] 아미노산 서열 비교를 위해 ALIGN-2가 사용되는 상황에서, 제시된 아미노산 서열 A의 제시된 아미노산 서열 B에 대한 아미노산 서열 동일성 % (별법으로 제시된 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 제시된 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0253] 100 x X/Y

[0254] 상기 식에서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 것으로 평가된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않으면, 본원에서 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 %값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞의 문단에서 기재한 바와 같이 얻는다.

[0255] 본원에서 "B-세포 표면 마커" 또는 "B-세포 표면 항원"은 그에 대해 결합하는 길항체, 예를 들어 천연 발생 B-세포 항원에 대한 리간드의 결합을 길항할 수 있는, B-세포 표면 항원 또는 가용성 형태의 B-세포 표면 항원에 대한 항체 (이로 제한되지 않음)로 표적화될 수 있는, B 세포의 표면 상에 발현되는 항원이다. 예시적인 B-세포 표면 마커는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 및 CD86 백혈구 표면 마커를 포함한다 (이에 대한 기재는 문헌 [The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York]을 참고). 다른 B-세포 표면 마커는 RP105, FcRH2, B-세포 CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, 및 239287을 포함한다. 특히 목적하는 B-세포 표면 마커는 포유동물의 다른 비-B-세포 조직에 비해 B 세포 상에 우선적으로 발현되고, 전구체 B 세포와 성숙 B 세포 모두 상에 발현될 수 있다.

[0256] 본원에서 사용되는 용어 "CD22"는 달리 나타내지 않으면 포유동물, 예를 들어 영장류 (예를 들어 인간, 사이노몰거스 원숭이 (cyno)) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 CD22를 의미한다. 이 용어는 비처리된 "전장" CD22 및 세포 내에서의 처리에 의해 생성된 임의의 형태의 CD22를 포함한다. 또한, 상기 용어는 CD22의 천연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체, 대립유전자 변이체, 및 이소형을 포함한다. D22 (CD22베타)의 주요 이소형은 847개의 아미노산 및 세포의 도메인 내

의 7개의 면역글로불린-유사 영역을 포함한다 ([Wilson, G.L. et al., J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991)] 참조). 소수 이소형인 CD22알파는 647개의 아미노산을 포함하고, 세포외 도메인에 면역글로불린-유사 도메인 3 및 4가 결여되어 있다 ([Stamenkovic, I. and Seed, B., Nature 345:74-77 (1990)] 및 [Wilson et al. (1991), 상기 문헌] 참조). CD22 베타의 아미노산 서열을 도 1B에 도시하고, 여기서 밑줄로 표시한 부분은 세포외 도메인 (ECD)이고, 이탈릭체 부분은 CD22 알파 세포외 도메인 서열로부터 상실된 아미노산을 나타낸다. 도 1C는 CD22알파의 아미노산 서열을 보여주고, 여기서 ECD는 밑줄로 표시한다. 아미노산 1 내지 아미노산 21의 아미노산 서열은 성숙 형태의 단백질로부터 절단된 신호 서열이다. 한 실시태양에서, CD22는 세포 표면, 예를 들어 정상 B 세포 또는 종양 B 세포의 표면 상에 발현된다. 도 1D는 사이노물거스 원숭이로부터의 CD22의 아미노산 서열을 도시한 것이다.

[0257] "항체" (Ab) 및 "면역글로불린" (Ig)은 동일한 구조적 특징을 갖는 당단백질이다. 항체는 특이적 항원에 결합 특이성을 나타내지만, 면역글로불린은 항체, 및 일반적으로 항원 특이성이 결여된 다른 항체-유사 분자를 모두 포함한다. 후자의 종류의 폴리펩티드는 예를 들어 립프계에 의해 낮은 수준으로, 골수종에 의해 증가된 수준으로 생산된다.

[0258] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 가장 넓은 의미에서 상호교환가능하게 사용되고, 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 1가, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 이중특이적 항체)를 포함하고, 또한 특정 항체 단편 (본원에서 보다 상세히 기재된 바와 같이)을 포함할 수 있다. 항체는 키메라, 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙 항체일 수 있다.

[0259] 용어 "항-CD22 항체" 또는 "CD22에 결합하는 항체"는 CD22를 표적으로 할 때 항체가 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 CD22에 결합할 수 있는 항체를 나타낸다. 바람직하게는, 관련되지 않는 비-CD22 단백질에 대한 항-CD22 항체의 결합 정도는 예를 들어 방사 면역 측정법 (RIA)으로 측정시에 CD22에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시태양에서, CD22에 결합하는 항체의 해리 상수 (Kd)는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, 또는 $\leq 0.1 \text{nM}$ 이다. 특정 실시태양에서, 항-CD22 항체는 상이한 종으로부터의 CD22 사이에서 보존된 CD22의 에피토프에 결합한다.

[0260] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 나타낸다. 중쇄의 가변 도메인은 "VH"로 언급될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 "VL"로 언급될 수 있다. 상기 도메인은 일반적으로 항체의 최대 가변 부분이고, 항원 결합 부위를 함유한다.

[0261] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분의 서열이 항체들 사이에서 크게 상이함을 의미하고, 그의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역 (HVR)으로 불리는 3개의 세그먼트에 집중된다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은, 루프 연결부를 형성하고 일부 경우에 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 3개의 CDR에 의해 연결된, 주로 베타-시트 형태를 취하는 4개의 FR 영역을 각각 포함한다. 각 사슬 내의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (예를 들어 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체의 항원 결합에 직접 관여하지 않지만, 상이한 효과기 기능, 예를 들어 항체 의존성 세포독성에서 항체의 참여를 나타낸다.

[0262] 임의의 척추동물종으로부터의 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2개의 명백하게 구분되는 종류 중 하나에 분류될 수 있다.

[0263] 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체 (면역글로불린)는 상이한 클래스로 분류될 수 있다. 면역글로불린의 5가지 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 불린다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 잘 알려져 있고, 예를 들어 문헌 [Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (2000)]에 일반적으로 기재되어 있다. 항체는 항체와 1종 이상의 다른 단백질 또는 펩티드의 공유 또는 비공유 회합에 의해 형성된 보다 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.

[0264] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 본원에서 상호 교환가능하게 사용되고, 아래에 정의된 항체 단편이 아닌, 그의 실질적으로 무손상 형태의 항체를 의미한다. 상기 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를

갖는 항체를 의미한다.

- [0265] "항체 단편"은 무손상 항체 내에 존재할 때 그 부분과 정상적으로 관련이 있는 기능의 적어도 하나 및 대부분 또는 전부를 보유하는, 무손상 항체의 일부만을 포함한다. 한 실시태양에서, 항체 단편은 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하고, 따라서 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 다른 실시태양에서, 항체 단편, 예를 들어 Fc 영역을 포함하는 항체 단편은 무손상 항체 내에 존재할 때 Fc 영역과 정상적으로 관련이 있는 적어도 하나의 생물학적 기능, 예를 들어 FcRn 결합, 항체 반감기 조정, ADCC 기능 및 보체 결합을 보유한다. 한 실시태양에서, 항체 단편은 무손상 항체에 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 상기 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암 (arm)을 포함할 수 있다.
- [0266] 항체를 파파인 소화시키면 각각 단일 항원 결합 부위를 갖는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (상기 명칭은 쉽게 결정화하는 그의 능력을 반영한다)을 생성시킨다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편을 생성시킨다.
- [0267] "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 한 실시태양에서, 이종쇄 Fv종은 강하게 비공유 회합된 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 단일쇄 Fv (scFv) 종에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 이중쇄 Fv종에서와 유사한 "이량체" 구조로 회합할 수 있도록 가요성 펩티드 링커 (linker)에 의해 공유 연결될 수 있다. 상기 형태에서, 각 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면 상에 항원 결합 부위를 규정한다. 집합적으로, 6개의 CDR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)도 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도이지만 항원을 인식하여 결합하는 능력을 갖는다.
- [0268] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 포함한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 1개 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가된다는 점에서 Fab 단편과 다르다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 갖는 Fab'에 대한 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 결합이 또한 공지되어 있다.
- [0269] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 여기서 상기 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬로 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합에 요구되는 구조를 형성할 수 있도록 하는, VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv에 대해서는, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.
- [0270] 용어 "디아바디 (diabody)"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타내고, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 (VH-VL) 내의 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른 사슬의 상보성 도메인과 페어링하여 2개의 항원 결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 ([Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134;] 및 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)])에 상세히 기재되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디도 문헌 [Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134]에 기재되어 있다.
- [0271] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 의미한다. 즉, 이 집단을 구성하는 개개의 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 돌연변이, 예를 들어 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 별개의 항체의 혼합물이 아닌 항체의 특성을 나타낸다. 특정 실시태양에서, 모노클로날 항체는 일반적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 표적-결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선별을 포함하는 방법에 의해 수득하였다. 예를 들어, 선별 방법은 복수의 클론, 예를 들어 하이브리도마 클론, 과자 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 특유한 클론의 선택일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열은 예를 들어 표적에 대한 친화도를 개선시키고, 표적 결합 서열을 인간화하고, 세포 배양액에서 그의 생산을 개선시키고, 생체내에서 그의 면역원성을 감소시키고, 다중특이적 항체를 생성시키기 위해서 등을 위해 추가로 변경될 수 있고, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체도 본 발명의 모노클로날 항체임을 이해하여야 한다. 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 일반적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제제에 비해, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 작용한다. 그들의 특

이성에 추가로, 모노클로날 항체 제제는 전형적으로 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않았다는 점에서 유리하다.

[0272] 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정 방법에 의한 항체 제조를 필요로 하는 것으로서 생각하지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 다양한 기술, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, [Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975)]; [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 4,816,567 참조), 파지 디스플레이 기술 (예를 들어, [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992)]; [Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)]; [Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)]; [Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004)] 및 [Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)] 참조), 및 인간 면역글로불린 서열을 코딩하는 인간 면역글로불린 로커스 또는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 ([Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]); 미국 특허 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; 문헌 ([Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)]; [Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)]; [Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996)]; [Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)] 및 [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)] 참조)에 의해 제조할 수 있다.

[0273] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 요구되는 생물학적 활성을 보이는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종에서 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고 사슬(들)의 나머지는 다른 종에서 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 및 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 4,816,567; 및 [Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)]).

[0274] 비인간 (예, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 면역글로불린에서 유래한 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 한 실시태양에서, 인간화 항체는 수여자의 초가변 영역의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 능력을 갖는 비인간종 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 영역의 잔기로 치환된 인간 면역글로불린 (수여 항체)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수여 항체 또는 공여 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 보다 개선하기 위해 수행된다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 면역글로불린의 초가변 루프에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 FR에 상응한다. 인간화 항체는 또한 임의로 적어도 일부의 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 일반적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 ([Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)] 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)])을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌 ([Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)]; [Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)] 및 여기에 인용된 참조문헌을 참조한다.

[0275] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고/하거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체의 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 구체적으로 비-인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 제외한다.

[0276] 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 본원에서 사용될 때 서열에서 초가변이고/하거나 구조상 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역; 즉 VH 내에 3개 (H1, H2, H3), 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3이 6개의 초가변 영역의 대부분의 다양성을 보이고, 특히 H3이 항체에 우수한 특이성을 부여할 때 특유한 역할을 수행하는 것으로 생각된다 ([[Xu et al. (2000) Immunity 13:37-45]; [Johnson and Wu (2003) in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ)]). 실제로, 중쇄만으로 구성된 천연 발생 카멜리드 (camelid)

항체가 경쇄의 부재하에 기능을 보이고, 안정하다 ([Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363:446-448]; [Sheriff et al. (1996) Nature Struct. Biol. 3:733-736]).

[0277] 많은 초가변 영역 묘사가 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 변동성에 기초하고, 가장 흔히 사용된다 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 코티아는 그 대신 구조 루프의 위치를 나타낸다 (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). AbM 초가변 영역은 카바트 CDR과 코티아 구조 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라 (Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된다. "접촉" 초가변 영역은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석에 기초한다. 각각의 상기 초가변 영역의 잔기를 아래에 나타낸다.

[0278]

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

[0279]

초가변 영역은 다음과 같이 "연장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다. 본 발명의 항-CD22 10F4 항체의 HVR-H1 및 HVR-H2 초가변 영역은 카바트 넘버링을 사용한 H26-H35 및 H49-H65이다.

[0280]

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

[0281]

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

[0282]

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

[0283]

용어 "티올 반응성 값"은 유리 시스테인 아미노산의 반응성에 대한 정량적 특성이다. 티올 반응성 값은 티올-반응성 시약과 반응하는, 시스테인 조작된 항체 내의 유리 시스테인 아미노산의 비율이고, 최대 1의 값으로 전환된다. 예를 들어, 100% 수율로 티올-반응성 시약, 예를 들어 바이오틴-말레이이미드 시약과 반응하여 바이오틴-표지된 항체를 형성하는, 시스테인 조작된 항체 상의 유리 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 1.0이다. 80% 수율로 티올-반응성 시약과 반응하는, 동일한 또는 상이한 모 항체로 조작된 다른 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0.8이다. 티올-반응성 시약과 전혀 반응하지 못하는, 동일한 또는 상이한 모 항체로 조작된 다른 시스테인 아미노산의 티올 반응성 값은 0이다. 특정 시스테인의 티올 반응성 값 결정은 ELISA 분석, 질량 분광분석, 액체 크로마토그래피, 자가방사선촬영, 또는 다른 정량 분석적 시험에 의해 수행할 수 있다. 시스테인 조작된 항체의 포획 및 시스테인 반응성의 비교 및 정량을 가능하게 하는 티올-반응성 시약은 바이오틴-PEO-말레이이미드 ((+)-바이오틴-3-말레이이미도프로파온아미딜-3,6-디옥사옥타인디아민, [Oda et al., (2001) Nature Biotechnology 19:379-382], 피어스 바이오텍크놀로지, 인크.), 바이오틴-BMCC, PEO-요오도아세틸 바이오틴, 요오도아세틸-LC-바이오틴, 및 바이오틴-HPDP (피어스 바이오텍크놀로지, 인크.), 및 N_a-(3-말레이이미딜프로페오닐)비오시틴 (MPB, 몰레큘라 프로브스)을 포함한다. 바이오틴화, 이기능성 및 다기능성 링커 시약의 다른

상업적인 공급처는 몰레큘라 프로브스 및 시그마 (Sigma, 미국 미주리주 세인트루이스)를 포함한다.

[0284] "모 항체"는 그로부터 1개 이상의 아미노산 잔기가 1개 이상의 시스테인 잔기로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 모 항체는 천연 또는 야생형 서열을 포함할 수 있다. 모 항체는 다른 천연, 야생형, 또는 변형된 형태의 항체에 비해 기존재하는 아미노산 서열 변형 (예를 들어 부가, 결실 및/또는 치환)을 가질 수 있다. 모 항체는 목적하는 표적 항원, 예를 들어 생물학상 중요한 폴리펩티드에 대해 작용할 수 있다. 또한, 비폴리펩티드 항원 (예를 들어 종양-결합 당지질 항원; US 5091178 참조)에 대해 작용하는 항체도 고려된다.

[0285] 다음 약어가 본원에서 사용되고, 나타낸 정의를 갖는다: BME는 베타-머캅토에탄올, Boc는 N-(t-부톡시카르보닐), cit는 시트룰린 (2-아미노-5-우레이도 펜탄산), dap는 돌라프로인, DCC는 1,3-디시클로헥실카르보디이미드, DCM은 디클로로메탄, DEA는 디에틸아민, DEAD는 디에틸아조디카르복실레이트, DEPC는 디에틸포스포릴시아니데이트, DIAD는 디이소프로필아조디카르복실레이트, DIEA는 N,N-디이소프로필에틸아민, dil은 돌라이소류신, DMA는 디메틸아세트아미드, DMAP는 4-디메틸아미노페리딘, DME는 에틸렌글리콜 디메틸 에테르 (또는 1,2-디메톡시에탄), DMF는 N,N-디메틸포름아미드, DMSO는 디메틸су포시드, doe는 돌라페닌, dov는 N,N-디메틸발린, DTNB는 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산), DTPA는 디에틸렌트리아민펜타아세트산, DTT는 디티오프레이톨, EDCI는 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염, EEDQ는 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린, ES-MS는 전자 분사 질량분석법, EtOAc는 에틸 아세테이트, Fmoc는 N-(9-플루오레닐 메톡시카르보닐), gly는 글리신, HATU는 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 핵사플루오로포스페이트, HOEt는 1-히드록시벤조트리아졸, HPLC는 고압 액체 크로마토그래피, ile는 이소류신, lys는 라이신, MeCN(CH₃CN)는 아세토니트릴, MeOH는 메탄올, Mtr는 4-아니실디페닐메틸 (또는 4-메톡시트리틸), nor는 (1S,2R)-(+)-노르에페드린, PAB는 p-아미노벤질카르바모일, PBS는 포스페이트 완충 염수 (pH 7.4), PEG는 폴리에틸렌 글리콜, Ph는 폐닐, Pnp는 p-니트로페닐, MC는 6-말레이미드카프로일, phe는 L-페닐알라닌, PyBrop는 브로모 트리스-피롤리디노 포스포늄 핵사플루오로포스페이트, SEC는 크기 배제 크로마토그래피, Su는 숙신이미드, TFA는 트리플루오로아세트산, TLC는 박막 크로마토그래피, UV는 자외선, 및 val는 발린이다.

[0286] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 그의 1개 이상의 HVR에 1개 이상의 변경을 갖는 항체이다. 한 실시태양에서, 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 갖는다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 과정에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙을 기재하고 있다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발은 문헌 ([Barbas et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al., Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)] 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)])에 기재되어 있다.

[0287] "차단" 항체 또는 "길항체" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 특정 차단 항체 또는 길항체 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.

[0288] 본원에서 사용되는 "작용제 항체"는 목적하는 폴리펩티드의 기능적 활성의 적어도 하나를 모방하는 항체이다.

[0289] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인한 생물학적 활성을 의미하고, 항체 이소형에 따라 상이하다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0290] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 일부 실시태양에서, FcR은 천연 인간 FcR이다. 일부 실시태양에서, FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하고 상기 수용체의 대립 유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 (spliced) 형태를 포함하여 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함하는 것이다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 포함한다 (문헌 [Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 ([Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994)] 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)])에 개시되어 있다. 미래에 확인되는 것을 포함하여 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다.

- [0291] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 또한 모체 IgG의 태아로의 전달 ([Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]) 및 면역글로불린의 항상성 조절에 작용하는 신생아의 수용체인 FcRn을 포함한다. FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, Ghetie 1997, Hinton 2004 참조). 생체내 인간 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 (transgenic) 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 Fc 변이체 폴리펩티드가 투여된 영장류에서 분석될 수 있다.
- [0292] WO 00/42072 (Presta)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 포함된다 (또한, 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)] 참조).
- [0293] "인간 효과기 세포"는 1종 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 특정 실시태양에서, 세포는 적어도 Fc γ RIII을 발현하고 ADCC 효과기 기능(들)을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함한다. 효과기 세포는 천연 공급원, 혈액으로부터 단리할 수 있다.
- [0294] "항체 의존성 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성의 세포 (예를 들어 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 상기 세포독성의 효과기 세포가 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 의미한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하고, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991)]의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337 또는 미국 특허 6,737,056 (Presta)에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석에 유용한 효과기 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 별법으로, 또는 추가로, 목적하는 분자의 ADCC 활성을 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가할 수 있다.
- [0295] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하여 표적 세포의 용해를 의미한다. 전통적인 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 서브클래스의)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해서, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)]에 기재된 CDC 분석을 수행할 수 있다.
- [0296] 변경된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖고 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 예를 들어 미국 특허 6,194,551 B1 및 WO 1999/51642에 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 포함된다 (또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)] 참조).
- [0297] 용어 "Fc 영역-포함 폴리펩티드"는 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어 항체 또는 면역어드헤신을 의미한다. Fc 영역의 C-말단 라이신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 폴리펩티드의 정제 동안 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 재조합 처리에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 K447을 갖는 폴리펩티드, 모든 K447 잔기가 제거된 폴리펩티드, 또는 K447 잔기가 존재하거나 존재하지 않는 폴리펩티드의 혼합물을 갖는 폴리펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0298] 본원의 목적을 위해 "엑셀터 인간 프레임워크"는 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된" 엑셀터 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 이미 존재하는 아미노산 서열 변화를 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 이미 존재하는 아미노산 변화의 수는 10 이하, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하, 또는 2 이하이다. 이미 존재하는 아미노산 변화가 VH에 존재할 경우, 바람직하게는 상기 변화는 위치 71H, 73H 및 78H 중의 3개, 2개 또는 1개에서만 발생하고; 예를 들어, 상기 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A일 수 있다. 한 실시태양에서, VL 엑셀터 인간 프레임워크의 서열은 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 동일하다.
- [0299] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔하게 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 선택된다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins

of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서와 같은 하위군이다. 한 실시태양에서, VL에 대해서, 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시태양에서, VH에 대해서, 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 III이다.

[0300] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 얻은 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, 서열 1)-HVR-H1-

WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, 서열 3)-HVR-H2-

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (FR-H3, 서열 5)-HVR-H3-

WGQGTLVTVSS (FR-H4, 서열 7).

[0301] [0302] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 얻은 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (FR-L1, 서열 8)-HVR-L1-

WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, 서열 11)-HVR-L2-

GVPSRFSGSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYC (FR-L3, 서열 13)-HVR-L3-

FGQGTKVEIK (FR-L4, 서열 15).

[0303] [0304] "분비 신호 서열" 또는 "신호 서열"은 목적하는 새로 합성된 단백질을 원핵세포의 세포막, 대체로 내막 또는 내막과 외막 모두를 통해 유도하는데 사용될 수 있는 짧은 신호 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 의미한다. 따라서, 목적하는 단백질, 예를 들어 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 폴리펩티드가 원핵 숙주 세포의 원형질막 주위공간 내로 또는 배양 배지 내로 분비된다. 발현되는 폴리펩티드에 천연 펩티드인 신호 펩티드를 포함하여 신호 서열에 의해 코딩되는 신호 펩티드는 숙주 세포에 내인성일 수 있거나, 또는 외인성일 수 있다. 분비 신호 서열은 일반적으로 발현되는 폴리펩티드의 아미노 말단에 존재하고, 일반적으로 세포질로부터 폴리펩티드의 생합성과 분비 사이에 효소에 의해 제거된다. 따라서, 신호 펩티드는 보통 성숙 단백질 산물 내에 존재하지 않는다.

[0305] [0306] "결합 친화도"는 일반적으로 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 나타낸다. 달리 나타내지 않으면, 본원에서 사용될 때 "결합 친화도"는 결합쌍의 멤버 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 나타낸다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (K_d)에 의해 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 포함한 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 측정할 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하고 쉽게 해리하는 경향이 있는 반면, 고-친화도 항체는 일반적으로 항원에 보다 빠르게 결합하고 보다 오래 결합된 상태로 유지되는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 임의의 방법이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 실시태양을 아래에 기재한다.

한 실시태양에서, 본 발명에 따른 " K_d " 또는 " K_d 값"은 하기 분석에서 기재되는 바와 같이 목적하는 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 분석 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재하에 (125 I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정한다 (Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293 : 865-881). 분석 조건을 확립하기 위해, 미세적정 플레이트 (다이넥스 (Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 μ g/ml의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스 (Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (약 23°C)에서 차단하였다. 비흡착 플레이트 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [125 I]-항원을 목적하는 Fab의 연속 희석액과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599])의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 목적하는 Fab를 밤새 인큐베이션하지만, 평행이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물은 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션을 위해 포획 플레이트로 옮긴다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% Tween-20으로 8회 세척한

다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μl /웰의 섬광제 (scintillant) (MicroScint-20; 팩카드 (Packard))를 첨가하고, 플레이트를 Topcount 감마 계수기 (팩카드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각각의 Fab의 농도를 경쟁적 결합 분석에서 사용하기 위해 선택한다.

[0307] 다른 실시태양에 따르면, Kd 또는 Kd 값은 10 이하의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 BIACore™-2000 또는 BIACore™-3000 (비아코아, 인크. (BIACore, Inc., 미국 뉴저지주 피스카타웨이))를 사용하는 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용함으로써 측정한다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코아, 인크.)을 제조사의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 염산염 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~0.2 μM)으로 희석한 후, 커플링된 단백질의 약 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후에, 미반응기를 차단하기 위해 1M 에탄올아민을 주입한다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 약 25 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 25°C에서 0.05% Tween 20을 갖는 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 회합 및 해리 센소그램을 동시에 피팅함으로써 단순 일대일 랭그뤼어 (Langmuir) 결합 모델 (BIACore 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 비 k_{off}/k_{on} 으로서 계산한다 (예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol 293: 865-881] 참조). 온-레이트 (on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 분광계, 예를 들어 정지 유동 설치 분광분석기 (아비브 인스트루먼츠 (Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도계 (씨모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0308] 본 발명에 따른 "온-레이트" 또는 "회합율" 또는 "회합 속도" 또는 " k_{on} "은 또한 BIACore™-2000 또는 BIACore™-3000 (비아코아, 인크.)를 사용하여 상기한 바와 같이 결정할 수 있다.

[0309] "장애"는 본 발명의 물질/분자 또는 방법을 사용한 치료로부터 이익을 얻는 임의의 병태 또는 질환이다. 이것은 포유동물이 문제의 질환에 걸리기 쉽게 하는 병태를 포함하는 만성 및 급성 장애를 포함한다. 본원에서 치료하고자 하는 장애의 비제한적인 예는 암성 병태, 예를 들어 B 세포 증식 장애 및/또는 B 세포 종양, 예를 들어 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투증 세포 림프종을 포함한다.

[0310] 용어 "세포 증식 장애" 및 "증식 장애"는 일정 정도의 비정상적인 세포 증식과 관련이 있는 장애를 나타낸다. 한 실시태양에서, 세포 증식 장애는 암이다.

[0311] 본원에서 사용될 때 "종양"은 악성이든 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다. 용어 "암", "암성", "세포 증식 장애", "증식 장애" 및 "종양"은 본원에 언급된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.

[0312] 용어 "암" 및 "암성"은 일반적으로 비조절된 세포 성장/증식의 특징을 갖는 포유동물의 생리적 상태를 나타내거나 기재한다. 암의 예는 암성 B 세포 증식 장애를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. B 세포 증식 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투증 세포 림프종으로부터 선택된다. 다른 암 병태는 예를 들어 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종, 및 백혈병을 포함한다. 상기 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포암, 위장관암, 췌장암, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암종, 유방암, 결장암, 결직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종, 백혈병 및 다른 림프구 증식 장애, 및 다양한 종류의 두경부 암을 포함한다.

[0313] 본원에서 "B-세포 종양"은 비-호지킨 림프종 (NHL), 예를 들어 저등급/여포성 NHL, 작은 림프성 (SL) NHL, 중등급/여포성 NHL, 중등급 미만성 NHL, 고등급 면역모세포 NHL, 고등급 림프모구 NHL, 고등급 작은 비-절단된 세포 NHL, 큰 종양 (bulky disease) NHL, 외투증 세포 림프종, AIDS-관련 림프종, 및 발덴스트롬 (Waldenstrom) 마크로글로불린혈증, 비-호지킨 림프종 (NHL), 림프구 우세 호지킨병 (LPHD), 소형 림프구성 림프종 (SLL), 만성

림프구성 백혈병 (CLL), 무통성 NHL, 예를 들어 재발형 무통성 NHL 및 리툭시맙-불응성 무통성 NHL; 백혈병, 예를 들어 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 유모 세포 백혈병, 만성 골수모구성 백혈병; 외투증 세포 림프종; 및 다른 혈액 종양을 포함한다. 상기 종양은 B-세포 표면 마커, 예를 들어 CD22에 대해 작용하는 항체로 치료될 수 있다. 상기 질환은 B 세포 표면 마커, 예를 들어 CD22에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료되는 것으로 본원에서 고려되고, 비접합된 ("네이키드") 항체 또는 본원에 개시된 바와 같이 세포독성제에 접합된 항체의 투여를 포함한다. 또한, 상기 질환은 본 발명의 항-CD22 항체 또는 본 발명의 항-CD22 항체 약물 접합체를 다른 항체 또는 항체 약물 접합체, 다른 세포독성제, 방사선 조사 또는 다른 치료와 동시에 또는 연속적으로 투여하는 조합 요법에 의해 치료되는 것으로 본원에서 고려된다. 본 발명의 예시적인 치료 방법에서, 본 발명의 항-CD22 항체는 함께 또는 순차적으로 항-CD20 항체, 면역글로불린, 또는 그의 CD20 결합 단편과 조합되어 투여된다. 항-CD20 항체는 네이키드 항체 또는 항체 약물 접합체일 수 있다. 조합 요법의 실시태양에서, 항-CD22 항체는 본 발명의 항체이고, 항-CD20 항체는 리툭산(등록상표) (리툭시맙)이다.

[0314] 본원에서 사용되는 용어 "비-호지킨 림프종" 또는 "NHL"은 호지킨 림프종 이외의 림프계의 암을 의미한다. 호지킨 림프종은 일반적으로 호지킨 림프종에 리드-스턴버그 (Reed-Sternberg) 세포가 존재하고 비-호지킨 림프종에 상기 세포가 존재하지 않는다는 사실에 의해 비-호지킨 림프종과 구별될 수 있다. 본원에서 사용되는 상기 용어에 포함되는 비-호지킨 림프종의 예는 당업계에 공지된 분류 방식, 예를 들어 문헌 [Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000)]에 기재된 Revised European-American Lymphoma (REAL) 방식에 따라 당업자 (예를 들어, 종양학자 또는 병리학자)에 의해 확인되는 임의의 림프종을 포함한다. 특히, 도 11.57, 11.58 및 11.59의 목록을 참조한다. 보다 구체적인 예는 재발된 또는 불응성 NHL, 전선 (front line) 저등급 NHL, 단계 III/IV NHL, 화학요법 내성 NHL, 전구체 B 림프모구 백혈병 및/또는 림프종, 소형 림프구성 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병 및/또는 전립프구성 백혈병 및/또는 소형 림프구성 림프종, B-세포 전립프구성 림프종, 면역종 및/또는 림프형질세포성 림프종, 림프형질세포성 림프종, 변연대 B 세포 림프종, 비장 변연대 림프종, 림프절외 변연대 - MALT 림프종, 림프절 변연대 림프종, 모발 세포 백혈병, 형질세포종 및/또는 형질세포 골수종, 저등급/여포성 림프종, 중등급/여포성 NHL, 외투세포 림프종, 여포 중심 림프종 (여포성), 중등급 미만성 NHL, 미만성 대 B-세포 림프종, 활동성 NHL (활동성 전선 NHL 및 활동성 재발된 NHL), 자가 줄기세포 이식 후에 재발된 또는 이식에 불응성인 NHL, 원발성 종격 대 B-세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, 고등급 림프모세포성 NHL, 고등급 림프모구 NHL, 고등급 비-절단된 소세포 (small non-cleaved 세포) NHL, 큰 종양 NHL, 버크트 (Burkitt) 림프종, 전구체 (말초) 대과립 림프구성 백혈병, 균상식육종 및/또는 세자리 (Sezary) 증후군, 피부 (cutaneous) 림프종, 큰세포 역형성 림프종, 혈관중심성 림프종을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0315] 본원에서 사용되는 "자가면역 질환"은 개체의 자기 자신의 조직 또는 장기 또는 동시 분리계 (co-segregate)로부터 자기 조직에 대해 발생하는 비약성 질환 또는 장애 또는 그의 증상 또는 그로부터 발생하는 병태이다. 많은 상기 자가면역 및 염증성 장애에서, 많은 임상적 및 실험적 마커가 존재할 수 있으며, 이에는 과감마글로불린혈증, 자가항체의 높은 수준, 조직 내의 항원-항체 복합체 침착, 코르티코스테로이드 또는 면역억제 치료로부터의 이점, 및 이환된 조직에서의 림프구양 세포 접합체가 포함되나 이에 제한되지 않는다. B-세포 매개 자가면역 질환에 대해 임의의 특정 이론에 제한되지 않지만, B 세포는 자가항체 생산, 면역 복합체 형성, 수지상 및 T-세포 활성화, 시토kin 합성, 직접 캐모킨 방출 및 신생 림프 형성을 위한 핵심 장소의 제공을 포함하여, 많은 기계적인 경로를 통한 인간 자가면역 질환에서 발병 효과를 보이는 것으로 생각된다. 각각의 상기 경로는 자가면역 질환의 발병시에 상이한 정도로 참여할 수 있다.

[0316] "자가면역 질환"은 장기-특이적 질환 (즉, 면역 반응은 내분비계, 조혈계, 피부, 심폐계, 위장관계 및 간계, 신장계, 갑상선, 귀, 신경근육계, 중추신경계 등과 같은 장기계에 대해 특이적으로 작용함) 또는 다수의 장기계에 영향을 줄 수 있는 전신 질환 (예를 들어, 전신 홍반 루푸스 (SLE), 류마티스성 관절염, 다발성 근육염 등)일 수 있다. 바람직한 질환은 자가면역 류마티스성 장애 (예를 들어, 류마티스성 관절염, 쇼그렌 (Sjogren) 증후군, 공피증, 루푸스, 예를 들어 SLE 및 루푸스 신장염, 다발성 근육염/피부근육염, 한랭글로불린혈증, 항-인지 질 항체 증후군, 및 건선성 관절염), 자가면역 위장관 및 간 장애 (예를 들어, 염증성 장 질환 (예를 들어, 케양성 대장염 및 크론 (Crohn) 병), 자가면역 위염 및 악성 빈혈, 자가면역 간염, 원발성 담즙성 간경변, 원발성 경화성 담관염, 및 복강 질환), 혈관염 (예를 들어 ANCA-음성 혈관염 및 ANCA-관련 혈관염, 예컨대 쳐크-스트라우스 (Churg-Strauss) 혈관염, 베게너 (Wegener) 육아종증, 및 혈미경적 다발성 혈관염), 자가면역 신경 장애 (예를 들어, 다발성 경화증, 안전전 간대성 근경련 증후군, 중증 근무력증, 시신경척수염, 파킨슨 (Parkinson) 병, 알츠하이머 (Alzheimer) 병, 및 자가면역 다발성 신경병증), 신장 장애 (예를 들어, 사구체신염, 구드페스 쿠어 (Goodpasture) 증후군, 및 베거 (Berger) 병), 자가면역 피부 장애 (예를 들어, 건선, 두드러기, 심상성

천포창, 수포성 유사천포창, 및 피부 홍반성 루프스), 혈액 장애 (예를 들어, 혈소판감소 자색반, 혈전 혈소판감소 자색반, 수혈후 자색반, 및 자가면역 용혈 빈혈), 죽상경화증, 포도막염, 자가면역 청각 질환 (예를 들어, 내이 질환 및 난청), 베체트 (Behcet) 병, 레이나우드 (Raynaud) 증후군, 장기 이식 및 자가면역 내분비 질환 (예를 들어, 당뇨-관련 자가면역 질환, 예를 들어 인슐린-의존 당뇨병 (IDDM), 애디슨 (Addison) 병, 및 자가면역 갑상선 질환 (예를 들어, 그레이브 (Grave) 병 및 갑상선염))을 포함한다. 보다 바람직한 질환은 예를 들어, 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염, ANCA-관련 혈관염, 루푸스, 다발성 경화증, 쇼그렌 증후군, 그레이브 병, IDDM, 악성 빈혈, 갑상선염, 및 사구체신염을 포함한다.

[0317]

몇몇 경우에 상기 나열된 것을 포함하는, 본원에 규정된 다른 자가면역 질환의 구체적인 예는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 관절염 (급성 및 만성 류마티스성 관절염, 예를 들어 연소성 발병 류마티스성 관절염 및 병기, 예를 들어 류마티스성 활막염, 통풍 또는 통풍성 관절염, 급성 면역학적 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 타입 II 콜라겐 유발 관절염, 감염성 관절염, 라임 (Lyme) 관절염, 증식성 관절염, 건선성 관절염, 스틸 (Still) 병, 척추 관절염, 골관절염, 만성 프로그레디엔테 (chronica progrediente) 관절염, 변형 관절염, 만성 원발성 (chronica primaria) 다발관절염, 반응성 관절염, 폐경기 관절염, 에스트로겐 결핍 관절염, 및 강직 척추염/류마티스성 척추염), 자가면역 림프구 증식 질환, 염증성 파다증식성 피부병, 건선, 예를 들어 반상 건선, 물방울 모양 (gutatte) 건선, 농포성 건선, 및 손톱 건선, 아토피, 예를 들어 아토피성 질환, 예를 들어 고초열 및 읍 (Job) 증후군, 피부염, 예를 들어 접촉 피부염, 만성 접촉 피부염, 탈락 피부염, 알레르기 피부염, 알레르기 접촉 피부염, 두드러기, 포진성 피부염, 화폐상 피부염, 지루성 피부염, 비-특이적 피부염, 원발성 자극성 접촉성 피부염 및 아토피성 피부염, x-관련 파다 IgM 증후군, 알레르기성 안내 염증성 질환, 만성 자가면역 담마진을 비롯한 담마진, 예컨대 만성 알레르기성 담마진 및 만성 특발성 담마진, 근육염, 다발성 근육염/피부근육염, 아동 피부근육염, 독성 표피 괴사성 용해, 경피증 (전신성 경피증 포함), 경화증, 예컨대 전신성 경화증, 다발성 경화증 (MS), 예컨대 척수-눈 (spino-optical) MS, 원발성 진행성 MS (PPMS) 및 재발 완화형 MS (RRMS), 진행성 전신성 경화증, 죽상경화증, 동맥경화증, 파종성 경화증, 실조성 경화증, 시신경 척수염 (NMO), 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론 병, 자가면역-매개 위장관 질환, 위장관 염증, 대장염, 예컨대 궤양성 대장염, 현미경적 대장염, 콜라겐성 대장염, 폴립성 대장염, 괴사성 전장염, 및 전층의 대장염, 및 자가면역 염증성 장 질환), 장 염증, 괴저성 농피증, 결절성 홍반, 원발성 경화성 담관염, 성인성 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)을 비롯한 호흡 곤란 증후군, 수막염, 포도막의 전체 또는 부분 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역 혈액성 장애, 이식편 대 숙주 질환, 혈관부종, 예컨대 유전성 혈관부종, 수막염에서의 뇌신경 손상, 임신성 포진, 임신성 유사천포창, 음낭 소양증, 자가면역 조숙 난소 부전, 자가면역 상태로 인한 돌발성 청각 상실, IgE-매개 질환, 예컨대 아나필락시스 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염, 예컨대 라스무센 (Rasmussen) 뇌염 및 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예컨대 앞포도막염, 급성 앞포도막염, 육아종성 포도막염, 비-육아종성 포도막염, 수정체항원성 포도막염, 뒤포도막염, 또는 자가면역 포도막염, 신증후군이 있거나 없는 사구체신장염 (GN), 예컨대 만성 또는 급성 사구체신장염, 예컨대 원발성 GN, 면역-매개 GN, 막성 GN (막성 신장병증), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신장병증, 유형 I 및 유형 II를 비롯한 막- 또는 막성 증식성 GN (MPGN), 및 급속 진행성 GN (RPGN), 증식성 신장염, 자가면역 다분비선 내분비 부전, 국한성 형질세포 귀두염을 비롯한 귀두염, 귀두포피염, 중심원심성 윤상 홍반, 지속성 피부이색성 홍반, 다형 홍반, 윤상 육아종, 광택 태선, 경화성 및 위축성 태선, 단순 만성 태선, 극상 태선, 편평 태선, 판상 어린선, 표피박리성 과각화증, 전암성 각화증, 괴저성 농피증, 알레르기성 상태 및 반응, 음식 알레르기, 약물 알레르기, 곤충 알레르기, 희귀 알레르기성 장애, 예컨대 비만세포증, 알레르기성 반응, 알레르기성 또는 아토피성 습진, 건조 습진, 발한장애 성 습진 및 소수포성 수장족저 습진을 비롯한 습진, 천식, 예컨대 기관지성 천식, 기관지 천식 및 자가면역 천식, T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 수반하는 상태, 외래 항원, 예를 들어 임신 동안 태아 A-B-O 혈액형에 대한 면역 반응을 수반하는 상태, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍, 루푸스, 예를 들어 신장염 루푸스, 뇌염 루푸스, 소아 루푸스, 비-신장 루푸스, 신장외 루푸스, 원관상 루푸스 및 원관상 홍반성 루푸스, 탈모성 루푸스, SLE, 예를 들어 피부 SLE, 아급성 SLE, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 및 파종상 홍반성 루푸스, 연소성 발병 (타입 I) 당뇨병, 예를 들어 소아 IDDM, 성인 발병 당뇨병 (타입 II 당뇨병), 자가면역 당뇨병, 특발성 요붕증, 당뇨성 망막병증, 당뇨성 신장병증, 당뇨성 대장염, 당뇨성 대동맥 장애, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연 과민과 관련이 있는 면역 반응, 결핵, 사르코이드증, 림프종양 육아종증을 비롯한 육아종증, 무과립증, 맥관염 (예를 들어 대혈관 혈관염, 예를 들어 류마티스성 다발성 근육통 및 거대-세포 (타카야스 (Takayasu)) 동맥염, 중간혈관 혈관염, 예를 들어 카와사키 (Kawasaki) 병 및 결절성 다발성 동맥염/결절성 동맥주위염, 면역혈관염, CNS 혈관염, 피부 혈관염, 과민 혈관염, 괴사성 혈관염, 예컨대 섬유소성 괴사성 혈관염, 전신성 괴사성 혈관염, ANCA-음성 혈관염 및 ANCA-관련 혈관염, 예컨대 처크-스트라우스

증후군 (CSS), 베게너 육아종증, 및 현미경적 다발성 혈관염), 관자 동맥염, 재생불량성 빈혈, 자가면역 재생불량성 빈혈, 콤스 (Coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 (Diamond Blackfan) 빈혈, 자가면역 용혈성 빈혈 (AIHA)을 비롯한 용혈성 빈혈 또는 면역 용혈성 빈혈, 악성 빈혈, 애디슨병, 적혈구계 빈혈 또는 무형성증 (PRCA), 인자 VIII 결핍증, 혈우병 A, 자가면역성 호중구감소증(들), 혈구감소증, 예컨대 범혈구감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 누출과 관련이 있는 질환, CNS 염증성 장애, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 기관 손상 증후군, 예컨대 패혈증, 외상 또는 출혈에 대한 이차성 다발성 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 운동신경염, 알레르기성 신경염, 베체트병/증후군, 캐슬맨 (Castleman) 증후군, 구드페스츄어 증후군, 레이나우드 증후군, 쇼그伦 증후군, 스티븐스-존슨 (Stevens-Johnson) 증후군, 유사천포창 또는 천포창, 예컨대 수포성 유사천포창, 반흔성 (점막) 유사천포창, 피부 유사천포창, 심상성 천포창, 부신생물성 천포창, 낙엽상 천포창, 점막 유천포창 및 홍반 천포창, 후천성 수포성 표피 박리증, 안구 염증, 바람직하게는 알레르기성 안구 염증, 예를 들어 알레르기성 결막염, 선형 IgA 수포 질환, 자가면역-유발 결막 염증, 자가면역 다내분비질환, 라이터 (Reiter) 질환 또는 증후군, 자가면역 상태로 인한 열 손상, 전자간증, 면역 복합성 장애, 예컨대 면역 복합성 신장염, 항체-매개 신장염, 신경염증성 장애, 다발성 신경병증, 만성 신경병증, 예컨대 IgM 다발성 신경병증 또는 IgM-매개 신경병증, 저혈소판증 (예를 들어, 심근 경색 환자에 의해 발병됨), 예를 들어 혈전 저혈소판 자반병 (TTP), 수혈후 자반병 (PTP), 혜파린-유도 저혈소판증, 및 자가면역 또는 면역-매개 저혈소판증, 예를 들어 특발성 저혈소판자반병 (ITP) (만성 또는 급성 ITP 포함), 공막염, 예컨대 특발성 각공막염, 상공막염, 고환 및 난소의 자가면역 질환 (자가면역 고환염 및 난소염 포함), 원발성 갑상선기능저하증, 부갑상선기능저하증, 자가면역 내분비 질환, 예를 들어 갑상선염, 예컨대 자가면역 갑상선염, 하시모토 (Hashimoto) 병, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염) 또는 아급성 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선기능저하증, 그레이브 병, 그레이브 안질환 (안병증 또는 갑상선-관련 안병증), 다분비선 증후군, 예컨대 자가면역 다분비선 증후군, 예를 들어 유형 I (또는 다분비선 내분비병증 증후군), 신경학적 부신생물 증후군, 예컨대 람버트-이튼 (Lambert-Eaton) 근무력증 증후군 또는 이튼-람버트 (Eaton-Lambert) 증후군을 비롯한 부신생물 증후군, 근육강직 (stiff-man 또는 stiff-person) 증후군, 뇌척수염, 예를 들어 알레르기 뇌척수염 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 중증 근육 무력증, 예를 들어 흉선종-관련 중증 근육 무력증, 소뇌변성, 신경근강직증, 안진전 또는 안진전 근경련 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 다소성 운동 신경병증, 쉬한 (Sheehan) 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 루푸스양 간염, 거대세포 간염, 만성 활성 간염 또는 자가면역 만성 활성 간염, 폐렴, 예를 들어 림프양 간질 폐렴 (LIP), 폐쇄 세기관지염 (비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 버거병 (IgA 신병증), 특발성 IgA 신병증, 선상 IgA 피부병, 급성 유열 호중구성 피부병, 각질화 농포성 피부병, 일과성 극세포해리 피부병, 경화증, 예컨대 원발성 담관성 경화증 및 폐경화증, 자가면역 장병증 증후군, 복강 질환, 비열대 스프루 (글루텐 장병증), 불응성 스프루, 특발성 스프루, 한랭글로불린혈증, 예를 들어 혼합 한랭글로불린혈증, 근위축 측삭 경화증 (ALS; 루게릭 (Lou Gehrig) 병), 관상 동맥 질환, 자가면역 귀 질환, 예컨대 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 청각 상실, 다발성연골염, 예컨대 불응성 또는 재발된 또는 재발성 다발성연골염, 폐단백증, 각막염, 예를 들어 코간 (Cogان) 증후군/비-매독성 간질성 각막염, 벨 (Bell) 마비, 스위트 (Sweet) 질환/증후군, 자가면역 딸기코, 포진 (zoster)-관련 통증, 아밀로이드증, 비-암성 림프구 증가증, 원발성 림프구 증가증 (모노클로날 B 세포 림프구 증가증 (예를 들어, 양성 모노클로날 감마병증 및 비결정된 중요 모노클로날 감마병증, MGUS) 포함), 말초신경병증, 부신생물 증후군, 채널병증, 예컨대 간질, 편두통, 부정맥, 근육 장애, 난청, 실명, 주기성 마비, 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근육병증, 국소성 또는 분절성 또는 국소성 분절성 사구체경화증 (FSGS), 내분비 안구병증, 포도막망막염, 맥락망막염, 자가면역 간장 장애, 섬유근육통, 다내분비 기능부전, 쉬미트 증후군, 부신염, 위 위축, 초로성 치매, 탈수초 질환, 예컨대 자가면역 탈수초 질환 및 만성 염증성 탈수초 다발성 신경병증, 드레슬러 증후군, 원형 탈모증, 전체 탈모증, CREST 증후군 (석회증, 레이나우드 현상, 식도 운동장애, 수지경화증 및 모세혈관확장증), 남성 및 여성 자가면역 불임, 예를 들어 항-정자 항체로 인한 불임, 혼합성 결합 조직 질환, 샤가스병, 류마티스성 열, 재발성 유산, 농부 폐, 다형 홍반, 심장절개후 증후군, 쿠싱 (Cushing) 증후군, 조류 사육자 폐, 알레르기성 육아종 맥관염, 양성 림프구성 맥관염, 알포트 (Alport) 증후군, 폐포염, 예컨대 알레르기성 폐포염 및 섬유성 폐포염, 간질성 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 기생충 질환, 예컨대 리슈만편모충증, 과동편모충증, 주혈흡충증, 회충증, 아스페르질루스증, 샘터 (Sampter) 증후군, 카플란 (Caplan) 증후군, 뎅기열, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 확산 간질성 폐 섬유증, 간질성 폐 섬유증, 섬유성 종격염, 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭성 섬유증, 안구내염, 장기 용기성 홍반 (erythema elevatum et diutinum), 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 술만 (Shulman) 증후군, 펠티 (Felty) 증후군, 사상충증, 섬모체염, 예를 들어 만성 섬모체염, 이시성 섬모체염, 홍채섬모체염 (급성 또는 만성), 또는 푸크 (Fuch) 섬모체염, 헤노호-쉔라인 (Henoch-Schonlein) 자색반, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, SCID, 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS), 에코바이러스

감염, 폐혈증 (전신성 염증성 반응 증후군 (SIRS)), 내독소혈증, 췌장염, 티록신증, 파보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신처리후 증후군, 선천 풍진 감염, 앱스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스 감염, 볼거리, 에반 (Evan) 증후군, 자가면역 생식선 기능부전, 시덴함 (Sydenham) 무도병, 연쇄상구균 감염후 신염, 폐색성 혈전혈관염, 갑상선독소증, 척수 매독, 맥락막염, 거대-세포 다발성근육통, 만성 과민 폐렴, 결막염, 예컨대 봄철 카타르, 건조 각막결막염 및 유행성 각막결막염, 특발성 신장염 증후군, 최소 변화 신장병증, 양성 가족성 및 허혈-재판류 손상, 이식 기관 재판류, 망막 자가면역, 관절 염증, 기관지염, 만성 폐쇄성 기도/폐 질환, 규폐증, 아프타, 아프타 구내염, 동맥경화성 장애 (뇌혈관 부전증), 예컨대 동맥경화성 뇌병증 및 동맥경화성 망막병증, 무정자형성증, 자가면역 용혈, 브크 (Boeck) 병, 한랭글로불린혈증, 뒤피트렌 (Dupuytren) 구축, 수정체 아나필라시성 안염, 알레르기성 장염, 나성 결절성 홍반, 특발성 안면 마비, 만성 피로 증후군, 류머티스성 열, 하만-리치 (Hamman-Rich) 병, 감각신경 청각 상실, 발작성 혈색소뇨증, 성선기능저하증, 국한성 회장염, 백혈구 감소증, 염증성 단핵구증, 횡단 척수염, 원발성 특발성 점액부종, 신장증, 교감성 안염, 신생아 안염, 시작 신경염, 육아종성 고환염, 췌장염, 급성 다발성 신경근염, 괴저성 농피증, 케르바인 (Quervain) 갑상선염, 후천성 비장 위축증, 비-악성 흉선종, 럼프성 모낭 흉선염, 백반증, 독성-쇼크 증후군, 음식 중독, T 세포 침윤과 관련이 있는 상태, 백혈구-부착 결핍증, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연 과민과 관련이 있는 면역 반응, 백혈구 누출과 관련이 있는 질환, 다발성 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항사구체 기저막 질환, 자가면역 다내분비질환, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역 위축성 위염, 류머티스성 질환, 혼합성 결합조직 질환, 신증후군, 췌도염, 다내분비 부전, 자가면역 다분비선 증후군, 예를 들어 다분비선 증후군 유형 I, 성인발병형 특발성 부갑상선기능저하증 (AOIH), 심근병증, 예컨대 확장성 심근병증, 후천성 수포 표피박리증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신증후군, 원발성 경화성 담관염, 화농성 또는 비-화농성 부비동염, 급성 또는 만성 부비동염, 별점, 전두, 상악 또는 접형 부비동염, 알레르기성 부비동염, 호산구-관련 장애, 예컨대 호산구 증가증, 폐 침윤 호산구증가증, 호산구증가증-근육통 증후군, 로플러 (Loffler) 증후군, 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구증가증, 기관지폐 아스페르길루스증, 아스페르길루스종, 또는 호산구 함유 육아종, 아나필라시스, 척추관절병증, 혈청검사 음성인 척추관절염, 다내분비 자가면역 질환, 경화성 담관염, 공막, 상공막, 만성 점막피부 칸디다증, 브루톤 (Bruton) 증후군, 유아의 일파성 저감마글로불린혈증, 워스코트-알드리치 (Wiskott-Aldrich) 증후군, 혈관확장성 운동실조증 증후군, 혈관확장증, 콜라겐 질환과 관련이 있는 자가면역 장애, 류머티즘, 예컨대 만성 관절류머티즘, 럼프절염, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능장애, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각 과민, 신장 허혈, 뇌 허혈, 및 혈관화 동반 질환, 알레르기성 과민 장애, 사구체신염, 재판류 손상, 허혈성 재판류 장애, 심근 또는 다른 조직의 재판류 손상, 럼프종성 기관기관지염, 염증성 피부병, 급성 염증성 성분을 동반한 피부병, 다발성 기관 부전, 수포성 질환, 신장 피질 괴사, 급성 화농성 수막염 또는 기타 종추 신경계 염증성 장애, 눈 및 안와 염증성 장애, 과립구 수혈-관련 증후군, 시토킨-유도 독성, 기면증, 급성 중증 염증, 만성 난치 염증, 신우염, 동맥내막 과증식증, 위궤양, 판막염 및 자궁내막증이다. 상기 질환은 B 세포 표면 마커, 예를 들어 CD22에 결합하는 항체의 투여에 의해 치료되는 것으로 본원에서 고려되고, 비접합된 ("네이키드") 항체 또는 본원에 개시된 세포독성제에 접합된 항체의 투여를 포함한다. 또한, 상기 질환은 동시에 또는 연속적으로 투여되는 다른 항체 또는 항체 약물 접합체, 다른 세포독성제, 방사선 조사 또는 다른 치료제와 본 발명의 항-CD22 항체 또는 항-CD22 항체 약물 접합체의 조합 요법에 의해 치료되는 것으로 본 발명에서 고려된다.

[0318] 본원에서 사용되는 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 변형 표현)는 치료되는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키려는 임상 시술을 나타내고, 임상 질환의 예방을 위해 또는 그 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 억제, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 억제, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 호전, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 항체는 질환 또는 장애의 발생을 지연시키거나 질환 또는 장애의 진행을 지연시키는데 사용된다.

[0319] "개체"는 척추동물이다. 특정 실시태양에서, 척추동물은 포유동물이다. 포유동물은 농장 동물 (예를 들어 소), 스포츠 동물, 애완동물 (예를 들어 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 래트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 실시태양에서, 포유동물은 인간이다.

[0320] "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 목적하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기 위해 효과적인 양을 의미한다.

[0321] 본 발명의 물질/분자의 "치료 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 물질/분자의 능력과 같은 요인에 따라 변할 수 있다. 또한, 치료 유효량은 물질/분자의 임의의 독성

또는 유해한 효과를 치료상 유익한 효과가 능가하는 양이다. "예방 유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 목적하는 예방 결과를 달성하기 위해 효과적인 양을 나타낸다. 반드시는 아니지만 대개, 예방 용량은 질환의 보다 초기 단계 전에, 또는 보다 초기 단계에서 대상에서 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량보다 적을 것이다.

[0322]

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

[0323]

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

[0324]

"화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들어 티오태파 및 CYTOXAN(등록상표) 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 엘타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, MARINOL(등록상표)); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히친; 부틸린산; 캄포테신 (합성 유사체 토포테칸 (HYCAMTIN(등록상표) 포함); CPT-11 (이로노테칸, CAMPTOSAR(등록상표)), 아세틸캄토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도제레신, 카르제레신 및 비제레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 태니포시드; 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 에류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디타이인; 스폰기스타틴; 질소머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 염산염, 멜파란, 노벤비친, 폐네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디와인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 발색단 (chromophore) 및 관련 발색단백질 에네디와인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우쓰라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캐티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(R) 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에파루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포르피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜버시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신, 항대사제, 예를 들어 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 드시풀루리딘, 에노시타빈, 플로스우리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-아드레날, 예를 들어 아미노글루테치미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어 프로리닌산; 아세글라تون; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포탈론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레이; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄신 및 암사미토신; 미토구아존; 미토잔트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로소잔트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(등록상표) 다당체 복합체 (제이에이치에스 내쳐럴 프로덕츠 (JHS Natural Products, 미국 오래곤주 유진)); 로족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안귀딘); 우레탄; 빈데신 (ELDISINE(등록상표), FILDESIN(등록상표)); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오

테파; 탁소이드, 예를 들어 TAXOL(등록상표) 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology, 미국 뉴저지주 프린스톤)), ABRAXANE(등록상표) 크레모포르-프리 (Cremophor-free), 파클리탁셀의 알부민-처리된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스 (American Pharmaceutical Partners, 미국 일리노이주 샤퍼버그)), 및 TAXOTERE(등록상표) 도세탁셀 (롱-프랑 로라 (Rhone-Poulenc Rorer, 프랑스 앤토니)); 클로람부실; 캠시타빈 (GEMZAR(등록상표)); 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (VELBAN(등록상표)); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토잔트론; 빙크리스틴 (ONCOVIN(등록상표)); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (NAVELBINE(등록상표)); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 카페시타빈 (XELODA(등록상표)); 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체 및 2개 이상의 상기 물질의 조합물, 예를 들어 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빙크리스틴, 및 플레드니솔론의 조합 요법의 약어) 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보빈과 조합한 옥살리플라틴 (ELOXATIN™)을 사용한 치료의 약어)를 포함한다.

[0325]

또한, 상기 정의에는 암의 성장을 촉진시킬 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하고, 종종 전신 또는 신체 전체 치료 형태로 사용되는 항호르몬제가 포함된다. 이들은 호르몬 자체일 수 있다. 그 예는 항에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절인자 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (예를 들어 NOLVADEX(등록상표) 타목시펜), EVISTA(등록상표) 랄록시펜, 드로록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 FARESTON(등록상표) 토레미펜; 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향 조절인자 (ERD); 난소를 억제하거나 기능을 차단하는 물질, 예를 들어 황체화 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 작용제, 예를 들어 LUPRON(등록상표) 및 ELIGARD(등록상표) 류프롤리드 아세테이트, 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트립테렐린; 다른 항-안드로겐, 예를 들어 폴루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신선에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테치미드, MEGASE(등록상표) 메게스트롤 아세테이트, AROMASIN(등록상표) 엑세메스탄, 포르메스탄, 파드로졸, RIVISOR(등록상표) 보로졸, FEMARAO(등록상표) 레트로졸, 및 ARIMIDEX(등록상표) 아나스트로졸을 포함한다. 또한, 상기 화학요법제의 정의에는 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트 (예를 들어, BONEFOS(등록상표) 또는 OSTAC(등록상표)), DIDROCAL (등록상표) 에티드로네이트, NE-58095, ZOMETA(등록상표) 졸레드론산/졸레드로네이트, FOSAMAX(등록상표) 알렌드로네이트, AREDIA(등록상표) 팔미드로네이트, SKELID(등록상표) 텔루드로네이트, 또는 ACTONEL(등록상표) 리세드로네이트; 및 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 부착성 세포 증식와 관련이 있는 신호 전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예를 들어 THERATOPE (등록상표) 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 ALLOVECTIN(등록상표) 백신, LEUVECTIN(등록상표) 백신, 및 VAXID(등록상표) 백신; LURTOTECAN(등록상표) 토포이소머라제 1 억제제; ABARELIX(등록상표) rmRH; 라파티닙 디토실레이트 (Erbb-2 및 GW572016으로도 알려진 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0326]

본원에서 사용되는 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포 (예를 들어, CD22를 발현하는 세포)의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포 (예를 들어, CD22를 발현하는 세포)의 비율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 시기에) 차단하는 물질, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 물질을 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빙카 (빙크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 물질, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지로까지 이어질 수 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 특히 p.13]에서 볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 주목에서 유도된 항암약이다. 유럽 주목에서 유도된 도세탁셀 (TAXOTERE(등록상표), 롱-프랑 로라)은 파클리탁셀 (TAXOL(등록상표)), 브리스톨-마이어스 스퀴브 (Bristol-Myers Squibb))의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이랑체로부터 미세관의 회합을 촉진시키고, 세포의 유사분열을 억제하는 탈중합을 억제함으로써 미세관을 안정화시킨다.

[0327]

용어 "세포내 대사물질"은 항체-약물 접합체 (ADC)에 대한 세포 내부의 대사 과정 또는 반응으로부터 생성되는 화합물이다. 대사 과정 또는 반응은 효소 과정, 예를 들어 ADC의 웨티드 링커의 단백질 분해 절단, 또는 관능기, 예를 들어 히드라존, 에스테르, 또는 아미드의 가수분해일 수 있다. 세포내 대사물질은 세포 내로의 도입,

확산, 섭취 또는 수송 후에 세포내 절단을 겪는 항체 및 유리 약물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0328] 용어 "세포 내에서 절단된" 및 "세포내 절단"은 약물 모이어티 (D)와 항체 (Ab) 사이의 공유 부착, 즉 링커가 파괴되어 유리 약물을 세포 내에서 항체로부터 해리시키는, 항체-약물 접합체 (ADC)에 대한 세포 내의 대사 과정 또는 반응을 의미한다. 따라서, ADC의 절단된 모이어티는 세포내 대사물질이다.

[0329] 용어 "생체이용률"은 환자에게 투여된 약물의 소정량의 전신 이용률 (즉, 혈액/혈장 수준)을 의미한다. 생체이용률은 투여된 투여형으로부터 전신 순환계에 도달하는 약물의 시간 (속도) 및 총량 (정도)의 측정치를 나타내는 절대적인 용어이다.

[0330] 용어 "세포독성 활성"은 항체-약물 접합체 또는 항체-약물 접합체의 세포내 대사물질의 세포-사멸, 세포증식 억제 또는 성장 억제 효과를 의미한다. 세포독성 활성은 1/2의 세포가 생존하는 단위 부피당 농도 (몰 또는 질량)인 IC₅₀ 값으로서 표현될 수 있다.

[0331] "알킬"은 n, 2차, 3차 또는 시클릭 탄소 원자를 포함하는 C₁-C₁₈ 탄화수소이다. 그 예는 메틸 (Me, -CH₃), 에틸 (Et, -CH₂CH₃), 1-프로필 (n-Pr, n-프로필, -CH₂CH₂CH₃), 2-프로필 (i-Pr, i-프로필, -CH(CH₃)₂), 1-부틸 (n-Bu, n-부틸, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-메틸-1-프로필 (i-Bu, i-부틸, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-부틸 (s-Bu, s-부틸, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-메틸-2-프로필 (t-Bu, t-부틸, -C(CH₃)₃), 1-펜틸 (n-펜틸, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-펜틸 (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-펜틸 (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-메틸-2-부틸 (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-메틸-2-부틸 (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-메틸-1-부틸 (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-메틸-1-부틸 (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-헥실 (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-헥실 (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-헥실 (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-메틸-2-펜틸 (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-메틸-2-펜틸 (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-메틸-2-펜틸 (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-메틸-3-펜틸 (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-메틸-3-펜틸 (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-디메틸-2-부틸 (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-디메틸-2-부틸 (-CH(CH₃)C(CH₃)₃)이다.

[0332] 본원에서 사용되는 용어 "C₁-C₈ 알킬"은 1 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄, 포화 또는 불포화 탄화수소를 의미한다. 대표적인 "C₁-C₈ 알킬"기는 -메틸, -에틸, -n-프로필, -n-부틸, -n-펜틸, -n-헥실, -n-헵틸, -n-옥틸, -n-노닐 및 -n-데실을 포함하지만 이에 제한되지 않으며; 분지쇄 C₁-C₈ 알킬은 -이소프로필, -sec-부틸, -이소부틸, -t-부틸, -이소펜틸, 2-메틸부틸을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 불포화 C₁-C₈ 알킬은 -비닐, -알릴, -1-부테닐, -2-부테닐, -이소부틸레닐, -1-펜테닐, -2-펜테닐, -3-메틸-1-부테닐, -2-메틸-2-부테닐, -2,3-디메틸-2-부테닐, 1-헥실, 2-헥실, 3-헥실, -아세틸레닐, -프로파닐, -1-부티닐, -2-부티닐, -1-펜티닐, -2-펜티닐, -3-메틸-1-부티닐, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, t-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, n-헥실, 이소헥실, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 2,2-디메틸부틸, 2,3-디메틸부틸, 2,2-디메틸펜틸, 2,3-디메틸펜틸, 3,3-디메틸펜틸, 2,3,4-트리메틸펜틸, 3-메틸헥실, 2,2-디메틸헥실, 2,4-디메틸헥실, 2,5-디메틸헥실, 3,5-디메틸헥실, 2,4-디메틸펜틸, 2-메틸헵틸, 3-메틸헵틸, n-헵틸, 이소헵틸, n-옥틸, 및 이소옥틸을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. C₁-C₈ 알킬기는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -Ar, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂-NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)R', -OH, -할로겐, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ 및 -CN (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, -C₁-C₈ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 1개 이상의 기로 비치환되거나 치환될 수 있다.

[0333] "알케닐"은 적어도 하나의 불포화 부위, 즉 탄소-탄소, sp² 이중 결합을 갖는, n, 2차, 3차 또는 시클릭 탄소 원자를 포함하는 C₂-C₁₈ 탄화수소이다. 그 예는 에틸렌 또는 비닐 (-CH=CH₂), 알릴 (-CH₂CH=CH₂), 시클로펜테닐 (-C₅H₇), 및 5-헥세닐 (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH=CH₂)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0334] "알ки닐"은 적어도 하나의 불포화 부위, 즉 탄소-탄소, sp 삼중 결합을 갖는, n, 2차, 3차 또는 시클릭 탄소 원자를 포함하는 C₂-C₁₈ 탄화수소이다. 그 예는 아세틸렌 (-C≡CH) 및 프로파르길 (-CH₂C≡CH)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0335] "알킬렌"은 1-18개 탄소 원자의 포화, 분지쇄 또는 직쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미하고, 모 알칸의 동일한 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 1가 라디칼 중심을

갖는다. 대표적인 알킬렌 라디칼은 메틸렌 ($-\text{CH}_2-$), 1,2-에틸 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-프로필 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-부틸 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

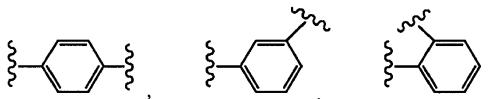
[0336] " $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 알킬렌"은 화학식 $-(\text{CH}_2)_{1-10}-$ 의 직쇄, 포화 탄화수소기이다. $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 알킬렌의 예는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌, 펜틸렌, 헥실렌, 헵틸렌, 옥틸렌, 노닐렌 및 데칼렌을 포함한다.

[0337] "알케닐렌"은 2-18개 탄소 원자의 불포화, 분지쇄 또는 직쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미하고, 모 알켄의 동일한 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 1가 라디칼 중심을 갖는다. 대표적인 알케닐렌 라디칼은 1,2-에틸렌 ($-\text{CH}=\text{CH}-$)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0338] "알키닐렌"은 2-18개 탄소 원자의 불포화, 분지쇄 또는 직쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미하고, 모 알킨의 동일한 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 1가 라디칼 중심을 갖는다. 대표적인 알키닐렌 라디칼은 아세틸렌 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), 프로파르길 ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$), 및 4-펜티닐 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0339] "아릴"은 카르보시클릭 방향족기를 나타낸다. 아릴기의 예는 폐닐, 나프틸 및 안트라세닐을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 카르보시클릭 방향족기 또는 헤테로시클릭 방향족기는 $-\text{C}_1\text{-C}_8$ 알킬, $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-C}_8)$ 알킬, $-\text{Aril}$, $-\text{C(O)R}'$, $-\text{OC(O)R}'$, $-\text{C(O)OR}'$, $-\text{C(O)NH}_2$, $-\text{C(O)NHR}'$, $-\text{C(O)N(R')}_2\text{-NHC(O)R}'$, $-\text{SO}_2\text{R}'$, $-\text{S(O)R}'$, $-\text{OH}$, $-\text{Halogen}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH(R')}_2$, $-\text{N(R')}_2$ 및 $-\text{CN}$ (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, $-\text{C}_1\text{-C}_8$ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 1개 이상의 기로 비치환되거나 치환될 수 있다.

[0340] "아릴렌"은 하기 구조로 제시되는 바와 같이 두개의 공유 결합은 가지며 오르쏘, 메타, 또는 파라 배위로 존재할 수 있는 아릴 기이며, 여기서, 폐닐 기는 비치환되거나, 또는 $-\text{C}_1\text{-C}_8$ 알킬, $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-C}_8)$ 알킬, $-\text{Aril}$, $-\text{C(O)R}'$, $-\text{OC(O)R}'$, $-\text{C(O)OR}'$, $-\text{C(O)NH}_2$, $-\text{C(O)NHR}'$, $-\text{C(O)N(R')}_2\text{-NHC(O)R}'$, $-\text{S(O)R}'_2$, $-\text{S(O)R}'$, $-\text{OH}$, $-\text{Halogen}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH(R')}_2$, $-\text{N(R')}_2$ 및 $-\text{CN}$ (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, $-\text{C}_1\text{-C}_8$ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 4개 이하의 기로 치환될 수 있다:



[0341]

[0342] "아릴알킬"은 탄소 원자 (통상적으로 말단 또는 sp^3 탄소 원자)에 결합한 수소 원자 중의 하나가 아릴 라디칼로 대체된 비환식 알킬 라디칼을 의미한다. 대표적인 아릴알킬기는 벤질, 2-폐닐에탄-1-일, 2-폐닐에텐-1-일, 나프틸메틸, 2-나프틸에탄-1-일, 2-나프틸에텐-1-일, 나프토벤질, 2-나프토폐닐에탄-1-일 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 아릴알킬기는 6 내지 20개의 탄소 원자를 포함하고, 예를 들어 알카닐, 알케닐 또는 알키닐 기를 포함하는, 아릴알킬기의 알킬 모이어티는 탄소 원자 1 내지 6개이고, 아릴 모이어티는 탄소 원자 5 내지 14개이다.

[0343] "헤테로아릴알킬"은 탄소 원자, 통상적으로 말단 또는 sp^3 탄소 원자에 결합한 수소 원자 중의 하나가 헤테로아릴 라디칼로 대체된 비환식 알킬 라디칼을 의미한다. 통상적인 헤테로아릴알킬기는 2-벤즈이미디졸릴메틸, 2-푸릴에틸 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 헤테로아릴알킬기는 탄소 원자 6 내지 20개를 포함하며, 예를 들어 알카닐, 알케닐 또는 알키닐기를 포함하는, 헤테로아릴알킬기의 알킬 모이어티는 탄소 원자 1 내지 6개이고 헤테로아릴 모이어티는 탄소 원자 5 내지 14개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개이다. 헤테로아릴알킬기의 헤테로아릴 모이어티는 3 내지 7원의 모노사이클 (탄소 원자 2 내지 6개) 또는 7 내지 10원의 비사이클 (탄소 원자 4 내지 9개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개), 예를 들어 비시클로 [4.5], [5.5], [5.6], 또는 [6.6] 시스템일 수 있다.

[0344] "치환된 알킬", "치환된 아릴" 및 "치환된 아릴알킬"은 1개 이상의 수소 원자가 각각 독립적으로 치환기로 대체된 알킬, 아릴, 및 아릴알킬을 각각 의미한다. 통상적인 치환기는 $-\text{X}$, $-\text{R}$, $-\text{O}-$, $-\text{OR}$, $-\text{SR}$, $-\text{S}-$, $-\text{NR}_2$, $-\text{NR}_3$, $=\text{NR}$, $-\text{CX}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{OCN}$, $-\text{SCN}$, $-\text{N}=\text{C}=0$, $-\text{NCS}$, $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $=\text{N}_2$, $-\text{N}_3$, $\text{NC}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$, $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$, $-\text{PO}_3^-$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{X}$,

$-C(=S)R$, $-CO_2R$, $-CO_2-$, $-C(=S)OR$, $-C(=O)SR$, $-C(=S)NR_2$, $-C(=O)NR_2$, $-C(=NR)NR_2$ 를 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 여기서 각각의 X는 독립적으로 할로겐: F, Cl, Br 또는 I이고; 각각의 R은 독립적으로 $-H$, C_2-C_{18} 알킬, C_6-C_{20} 아릴, C_3-C_{14} 헤테로사이클, 보호 기 또는 전구약물 모이어티이다. 상기 언급된 바와 같은 알킬렌, 알케닐렌, 및 알키닐렌기는 또한 유사하게 치환될 수 있다.

[0345] "헤테로아릴" 및 "헤테로사이클"은 1개 이상의 고리 원자가 헤테로원자, 예를 들어 질소, 산소, 및 황인 고리계를 의미한다. 헤�테로사이클은 라디칼은 탄소 원자 1 내지 20개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개를 포함한다. 헤테로사이클은 3 내지 7원의 모노사이클 (탄소 원자 2 내지 6개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개)일 수 있거나, 또는 7 내지 10원의 비사이클 (탄소 원자 4 내지 9개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤�테로원자 1 내지 3개), 예를 들어: 비시클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템일 수 있다.

[0346] 헤테로사이클은 문헌 [Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)], 특히 제1장, 제3장, 제4장, 제6장, 제7장, 및 제9장; 문헌 ["The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)], 특히 제13권, 제14권, 제16권, 제19권, 및 제28권; 및 문헌 [J. Am. Chem. Soc. (1960)82 : 5566]에 기재되어 있다.

[0347] 헤�테로사이클의 예는 피리딜, 디히드로피리딜, 테트라히드로피리딜 (피페리딜), 티아졸릴, 테트라히드로티오페닐, 황 산화 테트라히드로티오페닐, 피리미디닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 테트라졸릴, 벤조푸라닐, 티아나프탈레닐, 인돌릴, 인돌레닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 피페라디닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 2-피롤리도닐, 피롤리닐, 테트라히드로푸라닐, 비스-테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 비스-테트라히드로피라닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 데카히드로퀴놀리닐, 옥타히드로이소퀴놀리닐, 아조시닐, 트리아지닐, 6H-1,2,5-티아디아지닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐릴, 티에닐, 티안트레닐, 피라닐, 이소벤조푸라닐, 크로메닐, 크산테닐, 페녹사티닐, 2H-피롤릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 1H-인다졸릴, 푸리닐, 4H-퀴놀리지닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 시놀리닐, 프테리디닐, 4aH-카르바졸릴, 카르바졸릴, β -카르볼리닐, 페난트리디닐, 아크리디닐, 피리미디닐, 페난트롤리닐, 폐나지닐, 폐노티아지닐, 푸라자닐, 페녹사지닐, 이소크로마닐, 크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피페라지닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 퀴누클리디닐, 모르폴리닐, 옥사졸리디닐, 벤조트리아졸릴, 벤즈이속사졸릴, 옥신돌릴, 벤족사졸리닐, 및 이사티노일을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0348] 헤�테로사이클에 결합하는 탄소는 예를 들어, 피리딘의 2, 3, 4, 5, 또는 6번 위치, 피리다진의 3, 4, 5, 또는 6번 위치, 피리미딘의 2, 4, 5, 또는 6번 위치, 피라진의 2, 3, 5, 또는 6번 위치, 푸란, 테트라히드로푸란, 티오푸란, 티오펜, 피롤 또는 테트라히드로피롤의 2, 3, 4, 또는 5번 위치, 옥사졸, 이미다졸 또는 티아졸의 2, 4, 또는 5번 위치, 이속사졸, 피라졸, 또는 이소티아졸의 3, 4, 또는 5번 위치, 아지리딘의 2 또는 3번 위치, 아제티딘의 2, 3, 또는 4번 위치, 퀴놀린의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8번 위치, 이소퀴놀린의 1, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8번 위치에 결합하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 보다 통상적으로는, 헤�테로사이클에 결합하는 탄소는 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 5-피리딜, 6-피리딜, 3-피리다지닐, 4-피리다지닐, 5-피리다지닐, 6-피리다지닐, 2-피리미디닐, 4-피리미디닐, 5-피리미디닐, 6-피리미디닐, 2-피라지닐, 3-피라지닐, 5-피라지닐, 6-피라지닐, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 또는 5-티아졸릴을 포함한다.

[0349] 헤�테로사이클에 결합하는 질소는 예를 들어, 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린, 1H-인다졸의 1번 위치, 이소인돌, 또는 이소인돌린의 2번 위치, 모르폴린의 4번 위치, 및 카르바졸 또는 β -카르볼린의 9번 위치에 결합하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 보다 통상적으로, 헤�테로사이클에 결합하는 질소는 1-아지리딜, 1-아제테딜, 1-피롤릴, 1-이미다졸릴, 1-피라졸릴, 및 1-피페라디닐을 포함한다.

[0350] " C_3-C_8 헤�테로사이클"은 고리 탄소 원자 1개 내지 4개가 O, S, 및 N으로 이루어지는 군의 헤�테로원자로 독립적으로 대체된 방향족 또는 비방향족 C_3-C_8 카르보사이클을 의미한다. C_3-C_8 헤�테로사이클의 대표적인 예는 벤조푸라닐, 벤조티오펜, 인돌릴, 벤조피라졸릴, 쿠마리닐, 이소퀴놀리닐, 피롤릴, 티오펜, 푸라닐, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 퀴놀리닐, 피리미디닐, 피리디닐, 피리도닐, 피라지닐, 피리다지닐, 이소티아졸릴, 이속사졸릴 및 테트라졸릴을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. C_3-C_8 헤�테로사이클은 비치환되

거나, 또는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -아릴, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -할로겐, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ 및 $-CN$ (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, $-C_1-C_8$ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 7개 이하의 기로 치환될 수 있다.

[0351] " C_3-C_8 헤테로시클로"는 헤테로사이클 기의 수소 원자 중의 하나가 결합으로 대체된 상기 정의된 C_3-C_8 헤테로사이클을 기를 의미한다. C_3-C_8 헤�테로시클로는 비치환되거나, 또는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -아릴, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -할로겐, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ 및 $-CN$ (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, $-C_1-C_8$ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 6개 이하의 기로 치환될 수 있다.

[0352] "카르보사이클"은 모노사이클로서 탄소 원자 3 내지 7개 또는 비사이클로서 탄소 원자 7 내지 12개를 갖는 포화 또는 불포화 고리를 의미한다. 모노시클릭 카르보사이클은 고리 원자 3 내지 6개, 보다 통상적으로는 고리 원자 5 또는 6개를 갖는다. 비시클릭 카르보사이클은 예를 들어 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 고리 원자 7 내지 12개, 비시클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 고리 원자 9 또는 10개를 갖는다. 모노시클릭 카르보사이클의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 1-시클로펜트-1-에닐, 1-시클로펜트-2-에닐, 1-시클로펜트-3-에닐, 시클로헥실, 1-시클로헥스-1-에닐, 1-시클로헥스-2-에닐, 1-시클로헥스-3-에닐, 시클로헵틸, 및 시클로옥틸을 포함한다.

[0353] " C_3-C_8 카르보사이클"은 3-, 4-, 5-, 6-, 7- 또는 8원의 포화 또는 불포화 비-방향족 카르보시클릭 고리이다. 대표적인 C_3-C_8 카르보사이클은 -시클로프로필, -시클로부틸, -시클로펜틸, -시클로펜타디에닐, -시클로헥실, -시클로헥세닐, -1,3-시클로헥사디에닐, -1,4-시클로헥사디에닐, -시클로헵틸, -1,3-시클로헵타디에닐, -1,3,5-시클로헵타트리에닐, -시클로옥틸, 및 -시클로옥타디에닐을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. C_3-C_8 카르보사이클기는 비치환되거나, 또는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -아릴, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -할로겐, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ 및 $-CN$ (여기서, 각각의 R'는 독립적으로 H, $-C_1-C_8$ 알킬 및 아릴로부터 선택됨)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 1개 이상의 기로 치환될 수 있다.

[0354] " C_3-C_8 카르보시클로"는 카르보사이클 기의 수소 원자 중의 하나가 결합으로 대체된 상기 정의된 C_3-C_8 카르보사이클기를 의미한다.

[0355] "링커"는 공유 결합을 포함하는 화학적 모이어티 또는 항체를 약물 모이어티에 공유 부착시키는 원자의 사슬을 의미한다. 다양한 실시태양에서, 링커는 알킬디일, 아릴디일, 헤테로아릴디일과 같은 2가 라디칼, 알킬옥시의 반복 단위 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ (예를 들어, 폴리에틸레녹시, PEG, 폴리메틸레녹시), 및 알킬아미노 (예를 들어, 폴리에틸렌아미노, 제프아민™ (Jeffamine™))와 같은 모이어티; 및 숙시네이트, 숙신아미드, 디글리콜레이트, 말로네이트, 및 카프로아미드를 포함하는 이산 에스테르 및 아미드를 포함한다.

[0356] 용어 "키랄"은 거울상 파트너에 겹쳐질 수 없는 특성을 갖는 문자를 의미하고, 용어 "아키랄"은 그의 거울상 파트너에 겹쳐질 수 있는 문자를 의미한다.

[0357] 용어 "입체 이성질체"는 동일한 화학적 구성을 가지나, 공간의 원자 또는 기의 배열에서 상이한 화합물을 의미한다.

[0358] "부분 입체 이성질체"는 2 이상의 키랄 중심이 있고 이들 문자가 서로 거울상이 아닌 입체 이성질체를 의미한다. 부분 입체 이성질체는 상이한 물리적 특성, 예를 들어 융점, 비점, 스펙트럼 성질, 및 반응성을 갖는다. 부분 입체 이성질체의 혼합물은 전기영동 및 크로마토그래피와 같은 고 분해능 분석 과정하에 분리될 수 있다.

[0359] "거울상 이성질체"는 서로 겹쳐질 수 없는 거울상인 두개의 입체 이성질체 화합물을 의미한다.

[0360] 본원에서 사용된 입체화학 정의 및 규약은 일반적으로 문헌 ([S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York] 및 [Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc. New York])을 따른다. 많은 유기 화합물은 광학 활성

형태로 존재한다. 즉, 이들은 평면 편광의 평면을 회전하는 능력을 가진다. 광학 활성 화합물을 기재함에 있어서, 접두사 D 및 L, 또는 R 및 S는 그의 키랄 중심(들)에 대해 분자의 절대적 배위를 표시하는데 사용된다. 접두사 d 및 l 또는 (+) 및 (-)은 화합물에 의한 평면 편광 회전 표시를 나타내는데 사용되는데, (-) 또는 l은 화합물이 좌선성임을 의미한다. 접두사 (+) 또는 d로 표시된 화합물은 우선성이다. 주어진 화학적 구조에서, 이 입체 이성질체는 이들이 서로 거울상이라는 것만 제외하고는 동일하다. 특정 입체 이성질체는 또한 거울상 이성질체로 불릴 수 있고, 이러한 이성질체의 혼합물은 종종 거울상 이성질체 혼합물로 불린다. 거울상 이성질체의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체로 불리는데, 이들은 화학적 반응 또는 과정에 있어, 임의의 입체선택성 또는 입체특이성도 존재하지 않은 경우가 있을 수 있다. 용어 "라세미 혼합물" 및 "라세미체"는 광학 활성이 없는, 두개의 거울상 이성질체 종의 등몰 혼합물을 의미한다.

[0361] "이탈기"는 또 다른 관능기에 의해 치환될 수 있는 관능기를 의미한다. 이러한 이탈기는 당업계에 잘 알려져 있으며, 그 예는 할라이드 (예, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드), 메탄술포닐 (메실), p-톨루엔술포닐 (토실), 트리플루오로메틸술포닐 (트리플레이트), 및 트리플루오로메틸술포네이트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0362] 약어

[0363] 링커 성분:

[0364] MC = 6-말레이미도카프로일

[0365] Val-Cit 또는 "vc" = 발린-시트룰린 (프로테아제 절단가능 링커 내의 예시적인 디펩티드)

[0366] 시트룰린 = 2-아미노-5-우레이도 펜탄산

[0367] PAB = p-아미노벤질옥시카르보닐 ("자가 희생적 (self immolative)" 링커 성분의 예)

[0368] Me-Val-Cit = N-메틸-발린-시트룰린 (여기서, 링커 웹티드 결합은 카텝신 B에 의한 그의 절단을 방지하기 위해 변형됨)

[0369] MC(PEG)6-OH = 말레이미도카프로일-폴리에틸렌 글리콜 (항체 시스테인에 부착될 수 있음)

[0370] SPP = N-숙신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트

[0371] SPDP = N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로파오네이트

[0372] SMCC = 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트

[0373] IT = 이미노티올란

[0374] 세포독성 약물:

[0375] MMAE = 모노-메틸 오리스타틴 (auristatin) E (MW 718)

[0376] MMAF = 약물의 C-말단에 폐닐알라닌이 존재하는 오리스타틴 E의 변이체 (MMAE) (MW 731.5)

[0377] MMAF-DMAEA = DMAEA (디메틸아미노에틸아민)가 C-말단 폐닐알라닌에 아미드 연결된 MMAF (MW 801.5)

[0378] MMAF-TEG = 테트라에틸렌 글리콜이 폐닐알라닌에 에스테르화된 MMAF

[0379] MMAF-NtBu = MMAF의 C-말단에 아미드로서 부착된 N-t-부틸

[0380] DM1 = N(2')-테아세틸-N(2')-(3-머캅토-1-옥소프로필)-메이탄신

[0381] DM3 = N(2')-테아세틸-N2-(4-머캅토-1-옥소펜틸)-메이탄신

[0382] DM4 = N(2')-테아세틸-N2-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-메이탄신

[0383] 추가의 약어는 다음과 같다: AE는 오리스타틴 E, Boc는 N-(t-부톡시카르보닐), cit는 시트룰린, dap는 돌라프로인, DCC는 1,3-디시클로헥실카르보디이미드, DCM은 디클로로메탄, DEA는 디에틸아민, DEAD는 디에틸아조디카르복실레이트, DEPC는 디에틸포스포릴시아니데이트, DIAD는 디이소프로필아조디카르복실레이트, DIEA는 N,N-디이소프로필에틸아민, di1는 돌라이소류신, DMA는 디메틸아세트아미드, DMAP는 4-디메틸아미노페리딘, DME는 에틸렌글리콜 디메틸 에테르 (또는 1,2-디메톡시에탄), DMF는 N,N-디메틸포름아미드, DMSO는 디메틸су포시드, doe는 돌라페닌, dov는 N,N-디메틸발린, DTNB는 5,5'-디티오비스(2-나트로벤조산), DTPA는 디에틸렌트리아민펜타아세

트산, DTT는 디티오트레이톨, EDCI는 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염, EEDQ는 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린, ES-MS는 전자 분사 질량분석법, EtOAc는 에틸 아세테이트, Fmoc는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐), gly는 글리신, HATU는 O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트, HOEt는 1-히드록시벤조트리아졸, HPLC는 고압 액체 크로마토그래피, ile는 이소류신, lys는 라이신, MeCN(CH₃CN)는 아세토니트릴, MeOH는 메탄올, Mtr는 4-아니실디페닐메틸 (또는 4-메톡시트리틸), nor는 (1S,2R)-(+)-노르에페드린, PBS는 포스페이트 완충 염수 (pH 7.4), PEG는 폴리에틸렌 글리콜, Ph는 페닐, Pnp는 p-니트로페닐, MC는 6-말레이이미드카프로일, phe는 L-페닐알라닌, PyBrop는 브로모 트리스-피롤리디노 포스포늄 헥사플루오로포스페이트, SEC는 크기 배제 크로마토그래피, Su는 숙신이미드, TFA는 트리플루오로아세트산, TLC는 박막 크로마토그래피, UV는 자외선, 및 val는 발린이다.

[0384] 조성물 및 그의 제조 방법

CD22에 결합하는 항체를 제공한다. 항-CD22 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다. 본 발명의 항체 및 면역접합체는 예를 들어 CD22의 변경된 발현, 예를 들어 발현 증가와 관련이 있는 장애의 진단 또는 치료를 위해 유용하다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 세포 증식 장애, 예를 들어 암의 진단 또는 치료를 위해 유용하다.

[0386] 항-CD22 항체

한 측면에서, 본 발명은 CD22에 결합하는 항체를 제공한다. 일부 실시태양에서, 인간 및 사이노몰거스 원숭이(cyno) CD22의 성숙 형태에 결합하는 항체가 제공된다. 상기 하나의 실시태양에서, 인간 CD22의 성숙 형태는 서열 27의 아미노산 서열을 갖는다. 성숙 주요 인간 이소형은 7개의 Ig-유사 도메인 및 서열 28의 아미노산 서열을 포함하는 세포외 도메인을 갖는다. 다른 실시태양에서, 세포외 도메인 3 및 4가 결여된 인간 CD22의 소수 이소형은 서열 29의 아미노산 서열을 갖는다. 소수 이소형의 세포외 도메인의 아미노산 서열은 서열 30이다. cyno CD22는 서열 31의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시태양에서, CD22에 대한 항체는 세포 표면상에 발현된 CD22의 성숙 형태에 결합한다. 일부 실시태양에서, 세포 표면상에 발현된 CD22의 성숙 형태에 결합하는 항체는 세포의 성장을 억제한다. 일부 실시태양에서, 항-CD22 항체는 세포 표면상에 발현된 CD22의 성숙 형태에 결합하고, 세포 증식을 억제한다. 특정 실시태양에서, 항-CD22 항체는 세포 표면상에 발현된 CD22의 성숙 형태에 결합하고, 세포 사멸을 유도한다. 일부 실시태양에서, 항-CD22 항체는 암 세포의 표면상에 발현된 CD22의 성숙 형태에 결합한다. 일부 실시태양에서, 항-CD22 항체는 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 암 세포의 표면상에 과발현된 CD22의 성숙 형태에 결합한다. 일부 실시태양에서, 항-CD22 항체는 세포독소 또는 검출가능한 표지에 접합되고, 세포 표면상의 CD22에 결합한다. 일부 실시태양에서, 항체-독소 접합체는 세포의 성장을 억제한다. 일부 실시태양에서, 항체-검출가능한 표지 접합체는 그의 표면상에 CD22를 발현하는 세포를 시험관내 또는 생체내에서 검출가능하도록 만든다.

한 측면에서, 항-CD22 항체는 모노클로날 항체이다. 한 측면에서, 항-CD22 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 또는 (Fab')₂ 단편이다. 한 측면에서, 항-CD22 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다. 한 측면에서, 본원에 기재된 임의의 항-CD22 항체는 정제된 것이다.

파지 라이브러리로부터 유래된 예시적인 모노클로날 항체가 본원에서 제공된다. 라이브러리 스크리닝에 사용되는 항원은 CD22 베타 및 알파의 세포외 도메인 (ECD)에 상응하는 서열 28 또는 서열 30의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이었다. 라이브러리 스크리닝으로부터 생성된 항체는 친화도 성숙 항체이다.

한 측면에서, CD22에 결합하기 위해 뮤린 10F4.4.1, 인간화 10F4v1 및 v3, 및 뮤린 5E8.1.8과 경쟁하는 모노클로날 항체가 제공된다. 뮤린 10F4.4.1, 인간화 10F4v1 및 v3, 및 뮤린 5E8.1.8과 동일한 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체도 제공된다.

본 발명의 한 측면에서, 항-CD22 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 특정 실시태양에서, 항-CD22 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시태양에서, 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 다른 측면에서, 항-CD22 항체, 또는 항-CD22 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 조성물은 본원에 열거된 것과 같은 세포 증식 장애의 치료를 위한 제약 제제이다.

[0392] 항체 투여 및 제제

한 실시태양에서, 본 발명의 항-CD22 항체 또는 항-CD22 항체 약물 접합체 (본 발명의 항-CD22 ThioMab 약물 접

합체를 포함하지만 이에 제한되지 않음)는 B-세포 표면 항원의 길항제와 조합되어 투여된다. 1종 이상의 추가의 치료제와의 "조합" 투여는 동시 (병용) 및/또는 임의의 순서로 연속 투여하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 투여는 연속적이거나 순차적 투여이다. 또 다른 실시태양에서, 투여는 동시에, 병용 투여되거나 또는 동일한 제제 내에서 함께 투여된다. 한 실시태양에서, B-세포 표면 항원 길항제는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 한 실시태양에서, B-세포 표면 길항제는 항체 약물 접합체이다.

[0394] 본원에서 제제는 치료되는 특정 적응증에 필요한 1종 초과의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에 대해 유해한 영향을 주지 않는 상보적인 활성을 갖는 화합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 CD22 결합 올리고펩티드 이외에, 추가의 항체, 예를 들어 CD22 폴리펩티드 상의 상이한 에피토프에 결합하는 제2 항-CD22 항체, 또는 상이한 B-세포 표면 항원에 결합하는 제2 항체, 또는 일부 다른 표적, 예를 들어 특정 암의 성장에 영향을 주는 성장 인자에 대한 항체를 제제에 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 조성물은 화학요법제, 세포독성제, 시토킨, 성장 억제제, 항-호르몬제, 및/또는 심장보호제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분자는 적합하게는 의도하는 목적에 효과적인 양으로 조합하여 존재한다.

[0395] 현재, 암의 단계에 따라, 암 치료는 다음 요법의 하나 또는 조합을 수반한다: 암성 조직 제거 수술, 방사선 요법, 및 화학요법. 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드 요법은 화학요법의 독성 및 부작용을 잘 견디지 못하는 노인 환자에서 및 방사선 요법의 유용성이 제한되는 전이성 질환에 특히 바람직할 수 있다. 본 발명의 종양을 표적으로 하는 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드는 질환의 초기 진단시에 또는 재발 동안 CD22-발현 암의 완화에 유용하다. 치료 용도를 위해, 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드는 단독으로 또는 예를 들어 호르몬, 항혈관형성원 (antiangiogen), 또는 방사성 표지된 화합물과 조합하여, 또는 수술, 한랭요법, 및/또는 방사선 요법과 함께 사용될 수 있다. 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드 치료제는 다른 형태의 통상적인 요법과 함께, 통상적인 요법 전에 또는 후에 연속적으로 투여될 수 있다. 암을 치료하거나 완화시키기 위한 본 발명의 방법에서, 암 환자에게 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드를 1종 이상의 상기한 화학요법제와 함께 투여할 수 있다. 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드는 치료 유효 용량의 화학요법제와 함께 투여될 수 있다. 다른 실시태양에서, 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드는 화학요법제의 활성 및 효능을 향상시키기 위해서 화학요법제와 함께 투여된다. Physicians' Desk Reference (PDR)에는 다양한 암의 치료에 사용된 상기 치료제의 투여량이 개시되어 있다. 치료상 효과적인 상기 언급된 화학요법 약물의 투여 방법 및 투여량은 치료되는 특정 암, 질환의 정도 및 관련 의사가 잘 알고 있는 다른 요인에 따라 결정될 것이고, 의사에 의해 결정될 수 있다.

[0396] 한 특정 실시태양에서, 항-CD22 항체를 포함하는 접합체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 세포독성제에 접합된 올리고펩티드가 환자에게 투여된다. 바람직하게는, CD22 단백질에 결합된 면역접합체는 세포에 의해 내재화되어, 면역접합체가 결합한 암 세포의 치사에 대한 면역접합체의 치료 효능을 증가시킨다. 한 실시태양에서, 세포독성제는 암 세포에서 핵산을 표적으로 하거나 저해한다. 세포독성제의 예는 상기한 바 있고, 오리스타틴, 메이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제, 또는 그의 생물학적 활성 유도체를 포함한다.

[0397] 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드 또는 그의 독소 접합체케이트가 공지된 방법, 예를 들어 정맥내 투여, 예를 들어 볼러스 또는 일정 시간에 걸친 연속 주입, 근내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액내, 경막내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 따라 인간 환자에게 투여된다. 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드의 정맥내 또는 피하 투여가 바람직하다.

[0398] 다른 치료 요법이 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드의 투여와 조합될 수 있다. 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용한 동시 투여, 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함하고, 여기서 바람직하게는 두 (또는 모든) 활성제가 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 데에는 일정 시간이 소요된다. 바람직하게는, 상기 조합 요법은 상승적 치료 효과를 제시한다.

[0399] 또한, 항-CD22 항체 또는 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체 또는 올리고펩티드의 투여를 다른 종양 항원 또는 특정 암과 관련이 있는 B-세포 표면 항원에 대해 작용하는 항체의 투여와 조합하는 것이 바람직할 수도 있다.

[0400] 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 치료적 처치 방법은 항-CD22 항체 (또는 항체들), 항-CD22 항체 약물 접합체 (들) 또는 올리고펩티드 (들) 및 1종 이상의 화학요법제 또는 성장 억제제의 조합 투여 (상이한 화학요법제의 혼합물 (cocktail)의 동시 투여를 포함)를 수반한다. 화학요법제는 에스트라무스틴 포스페이트, 프레드니무스틴, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 멜파란, 시클로포스파미드, 히드록시우레아 및 히드록시우레아탁산 (예를 들어

파클리탁셀 및 독세탁셀) 및/또는 안트라사이클린 항생제, 및 이들의 조합물, 예를 들어 CHOP 또는 FOLFOX (이로 제한되지 않음)를 포함한다. 상기 화학요법제의 제제 및 투여 계획은 제조사의 지시에 따라 또는 숙련의에 의해 경험적으로 결정되는 바와 같이 사용될 수 있다. 상기 화학요법제의 제제 및 투여 계획은 또한 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다.

[0401] 항체는 임의의 적합한 수단, 예를 들어 비경구, 국소, 피하, 복강내, 폐내, 비내, 및/또는 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, 경막내 투여도 고려된다 (예를 들어, CD20 항체의 경막내 전달에 대해서는 미국 특허 출원 2002/0009444 (Grillo-Lopez) 참조). 바람직하게는 정맥내 또는 피하 투여된다.

[0402] 제2 의약은 치료 항체 또는 면역어드레신의 초기 노출 및/또는 추후 노출 방식으로 함께 투여될 수 있고, 상기 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용한 동시 투여, 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함하고, 여기서 바람직하게는 두 (또는 모든) 활성제가 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 데에는 일정 시간이 소요된다.

[0403] 치료 항-CD22 항체, 항-CD22 항체 약물 접합체, 면역어드레신 또는 다른 생물학적 활성제가 자가면역 질환 치료를 위해 단일 활성제로서 투여될 수 있지만, 일반적으로, 치료 항체 또는 면역어드레신은 1종 이상의 제2 의약 (들)과 조합될 수 있다. 예를 들어, RA 및 다른 자가면역 질환에 대해, 항체, 면역어드레신, 또는 다른 생물학 약물은 바람직하게는 면역억제제, 화학요법제, BAFF 길항제, 인테그린 길항제 또는 항체, 및/또는 상기 정의 색션에 나열된 시토킨; 임의의 1종 이상의 질환-변형 항류마티스 약물 (DMARD), 예를 들어 히드록시클로로퀸, 술파살라진, 메토트렉세이트, 레플루노미드, 아자티오프린, D-페니실라민, 금 (Gold) (경구), 금 (근내), 미노시클린, 시클로스포린; 스타필로코커스 (Staphylococcal) 단백질 A 면역흡착제; 정맥내 면역글로불린 (IVIG); 비스테로이드성 소염 약물 (NSAID); 글루코코르티코이드 (예를 들어 관절 주사를 통한); 코르티코스테로이드 (예를 들어 메틸프레드니솔론 및/또는 프레드니손); 엽산; 항-종양 괴사 인자 (TNF) 길항제, 예를 들어 에타네르셉트/ENBREL™, 인플럭시맙/REMICADE™, D2E7 (크놀 (Knoll)) 또는 CDP-870 (셀테크 (Celltech)); IL-IR 길항제 (예를 들어 키너레트 (Kineret)); IL-10 길항제 (예를 들어 일로데카인 (Ilodecakin)); 혈액 응고 조정제 (예를 들어 WinRho); IL-6 길항제/항-TNF (CBP 1011); CD40 길항제 (예를 들어 IDEC 131); Ig-Fc 수용체 길항제 (MDX33); 면역조정제 (예를 들어 탈리도마이드 또는 ImmuDyn); 항-CD5 항체 (예를 들어 H5g1.1); 대식세포 억제제 (예를 들어 MDX 33); 동시자극 차단제 (예를 들어 BMS 188667 또는 톨러리맙 (Tolerimab)); 보체 억제제 (예를 들어 h5G1.1, 3E10 또는 항-붕괴 촉진 인자 (DAF) 항체); IL-2 길항제 (zxSMART); EGFR 억제제 (상기 정의 참조); 티로신 키나제 억제제 (상기 정의 참조); 항-혈관신생제 (예를 들어 VEGF 항체, 예를 들어 베바시주맙); CD22 항체, 예를 들어 LL2 또는 에프라투주맙 (LYMPHOCIDE(등록상표); 이뮤노메딕스 (Immunomedics)), 예를 들어 에프라투주맙 Y-90 (Juwaid et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)), 아비오겐 (Abiogen)의 CD22 항체 (아비오겐, 이탈리아), CMC 544 (와이어쓰/셀테크), 콤보톡스 (유티 사우트웨스턴 (UT Southwestern)), BL22 (NIH), 및 LympoScan Tc99 (이뮤노메딕스); EpCAM 항체, 예를 들어 17-1A (PANOREX(R)); αvβ3 항체 (예를 들어 VITAXIN(등록상표); 메디뮨 (Medimmune)); CD37 항체, 예를 들어 TRU 016 (트루비온 (Trubion)); IL-21 항체 (자이모제네틱스 (ZymoGenetics)/노보 노르디스크 (Novo Nordisk)); 항-B 세포 항체 (임페론 (Impferon)); B 세포 표적화 MAb (이뮤노겐/아벤티스 (Aventis)); 1D09C3 (모르포시스 (Morphosys)/GPC); LymphoRad 131 (HGS); Lym-1 항체 Y-90 (USC); LIF 226 (인핸스트 리페시. (Enhanced Lifesci.)); BAFF 항체 (예를 들어, WO 03/33658); BAFF 수용체 항체 (예를 들어, WO 02/24909); BR3 항체; Blys 항체, 예를 들어 벨리무맙; LYMPHOSCD22-B™; 항-Lym-1 Oncolym (USC/페레그린 (Peregrine)); ISF 154 (UCSD/로슈 (Roche)/트라젠 (Tragen)); 고밀럭시마 (Idee 152; 비오겐 이텍); IL-6 수용체 항체, 예를 들어 아틀리주맙 (ACTEMRA™; 추가이 (Chugai)/로슈); IL-15 항체, 예를 들어 HuMax-IL-15 (젠팝 (Genmab)/암젠 (Amgen)); 케모킨 수용체 항체, 예를 들어 CCR2 항체 (예를 들어 MLN1202; 밀리네움 (Millieneum)); 항-보체 항체, 예를 들어 C5 항체 (예를 들어 에콜리주맙, 5G1.1; 알렉시온 (Alexion)); 인간 면역글로불린의 경구 제제 (예를 들어 IgPO; 단백질 치료제); IL-12 항체, 예를 들어 ABT-874 (CAT/Abbott); 테넬릭시맙 (Teneliximab) (BMS-224818); B 세포 백신; DN-BAFF (젠크오어 (Xencor)); CRx-119 (CombinatoRx); 암젠의 BAFF 길항제; 펜토스 타틴 (화이저 (Pfizer)); IC-485 (ICOS); 케모킨 길항제, 예를 들어 T-487 (툴라리크 (Tularik)) 또는 레티큘로스 (AVR-118); SCO-323 (SCIOS); 인테그린 길항제 683699, 타나베 (Tanabe), NGD-2001-1 (뉴로겐 (Neurogen)); SCIO-469 (SCIOS); BIRB-796 (뵈링거 인겔하임 (Boehringer Ingelheim)); VX702, VX850 (베어텍스 (Vertex)); 류코트리엔 B-4 길항제 (예를 들어 아멜루분트, BIIL-284; BI); 미세관 조정제 (팍시드 (Paxceed)); 안지오텍 (Angiotech)); 프로테아제 억제제 (MBS561392; BMS); AGIX-4207 (아테로게닉스 (Atherogenics)); ISIS-104838 (ISIS/엘란 (Elan)); MFG-IRAP (유니버시티 어브 피츠버그 (Univ. Pitt.)); IL-

1 트랩 (Trap) (RGN-303; 레게네론 (Regeneron)/노바티스 (Novartis)); 오프렐베킨 (oprelvekin) (와이어쓰); 에버를리무스 (everolimus) (체르티칸 (Certican); 노바티스); 아메비브 (Amevive) (비오젠 이텍); ORG-39141 (오가논 (Organon)); FK-506 (후지사와 (Fujisawa)); 및 IL-2 길항제 (타크로리무스; 후지사와) 중 임의의 하나 이상과 조합된다.

[0404] 예시적인 항-CD22 항체는 아래에서 상세히 기재된다.

1. 항-CD22 항체의 구체적인 실시태양

한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23 중의 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 14로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 개의 HVR을 포함하는 항체를 제공한다.

한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VH HVR 서열을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다.

[0408] 한 측면에서, 본 발명은 서열 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 서열 2로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다.

[0409] 한 측면에서, 본 발명은 서열 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 서열 4로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다.

[0410] 한 측면에서, 본 발명은 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1 및 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다.

[0411] 한 측면에서, 본 발명은 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다.

[0412] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 9 또는 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 14로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개의 모든 VL HVR 서열을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 9로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 10으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 19-23로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 측면에서, HVR-L1은 N28이 V로 치환(서열 10을 생성시키는 N28V 아미노산 변화)된 서열 9의 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에서, HVR-L1은 N28이 A로 치환(서열 19를 생성시키는 N28A 아미노산 변화)된 서열 9의 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에서, HVR-L1은 N28이 Q로 치환(서열 20을 생성시키는 N28Q 아미노산 변화)된 서열 9의 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에서, HVR-L1은 N28이 S로 치환(서열 21을 생성시키는 N28S 아미노산 변화)된 서열 9의 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에서, HVR-L1은 N28이 D로 치환(서열 22를 생성시키는 N28D 아미노산 변화)된 서열 9의 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에서, HVR-L1은 N28이 I로 치환(서열 23을 생성시키는 N28I 아미노산 변화)된 서열 9의 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23 중의 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 측면에서, HVR-L1은 서열 9, 10, 19, 20, 21, 22, 또는 23 중의 임의의 하나이고, 위치 N30의 아미노산 (위치 30의 아스파라긴)이 A로 치환된다 (N30A 아미노산 변화). 한 측면에서, HVR-L1은 서열 9, 10, 19, 20, 21, 22, 또는 23 중의 임의의 하나이고, 위치 N30의 아미노산 (위치 30의 아스파라긴)이 Q로 치환된다 (N30Q 아미노산 변화).

[0413] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 (b) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 일부 실시태양에서, CD22 항체는 (a) 서열 2를 포함하는 HVR-H1 및 서열 4를 포함하는 HVR-H2를 추가로 포함한다.

- [0414] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 (b) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2를 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 일부 실시태양에서, CD22 항체는 (a) 서열 2를 포함하는 HVR-H1 및 서열 4를 포함하는 HVR-H2를 추가로 포함한다.
- [0415] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 (b) 서열 9, 10, 19, 20, 21, 22 및 23으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 일부 실시태양에서, CD22 항체는 (a) 서열 2를 포함하는 HVR-H1 및 서열 4를 포함하는 HVR-H2를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 서열 9, 10, 19, 20, 21, 22, 또는 23의 아미노산 서열은 N30A 또는 N30Q 아미노산 변화를 포함한다. 일부 실시태양에서, CD22 항체는 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, CD22 항체는 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.
- [0416] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 HVR-L1로서 선택된 서열 9, 10, 19, 20, 21, 22, 또는 23의 아미노산 서열이 N30A 또는 N30Q 아미노산 변화에 의해 변형된 항체를 추가로 제공한다.
- [0417] 한 측면에서, 본 발명은 서열 16을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다 (도 2A 참조, h10F4v1). 한 측면에서, 본 발명은 서열 17을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다 (도 2B 참조, h10F4v1). 한 측면에서, 본 발명은 서열 18을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다 (도 2B 참조, h10F4v3).
- [0418] 한 측면에서, 본 발명은 서열 34를 포함하는 중쇄를 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다 (도 2A 참조, m10F4). 한 측면에서, 본 발명은 서열 35를 포함하는 경쇄를 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다 (도 2B 참조, m10F4).
- [0419] 한 측면에서, 본 발명은 ATCC에 기탁 번호 PTA-7621로 기탁된 하이브리도마에 의해 생산된 항체 10F4.4.1의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR 서열을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다.
- [0420] 한 측면에서, 본 발명은 ATCC에 기탁 번호 PTA-7620으로 기탁된 하이브리도마에 의해 생산된 항체 5E8.1.8의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR 서열을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다.
- [0421] 항-CD22 항체는 항체가 CD22에 결합하는 능력을 갖는 한, 임의의 적합한 프레임워크 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 본 발명의 항-CD22 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 상기 항체의 한 실시태양에서, 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서의 치환(들)을 포함한다. 상기 항체의 한 실시태양에서, 위치 71은 A, 위치 73은 T, 및/또는 위치 78은 A이다. 한 실시태양에서, 상기 항체는 huMAb4D5-8의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열, 예를 들어 서열 1, 3, 5, 7 (각각 FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4)을 포함한다. huMAb4D5-8은 헤르셉틴(등록상표) 항-HER2 항체 (제넨테크, 인크.)로 상업적으로 알려져 있고, 미국 특허 6,407,213 및 5,821,337, 및 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93]에도 언급되어 있다. 상기 한 실시태양에서, 상기 항체는 인간 하위군 I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 상기 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 huMAb4D5-8의 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열, 예를 들어 서열 8, 1, 13, 15 (각각 FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4)를 포함한다.
- [0422] 한 실시태양에서, 항-CD22 항체는 프레임워크 서열 및 초가변 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 프레임워크 서열은 각각 서열 1, 3, 5, 및 7의 FR-H1-FR-H4 서열을 포함하고, HVR-H1은 서열 2의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-H2는 서열 4의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-H3은 서열 6으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, 항-CD22 항체는 프레임워크 서열 및 초가변 영역을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 여기서 프레임워크 서열은 각각 서열 8, 11, 13, 및 15의 FR-L1-FR-L4 서열을 포함하고, HVR-L1은 서열 9, 10, 19, 20, 21, 22, 및 23으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 서열 9-10 또는 19-23 중의 임의의 하나는 N30A 또는 N30Q 아미노산 변화를 포함할 수 있고; HVR-L2는 서열 12의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-L3은 서열 14로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 항체의 한 실시태양에서, 중쇄 가변 도메인은 서열 16을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열 17 또는 18을 포함한다.
- [0423] 일부 실시태양에서, 본 발명은 서열 16의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 일부 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는

99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열은 참조 서열에 비해 치환, 삽입 또는 결실을 갖지만, 상기 아미노산 서열을 포함하는 항체는 CD22에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시태양에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 16의 서열에서 치환되거나, 삽입되거나, 결실된다. 일부 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 일부 실시태양에서, 항-CD22 항체는 서열 16으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0424] 일부 실시태양에서, 본 발명은 하기 제시된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다:

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro
Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
Ala Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 113 (서열 16)

(HVR 잔기는 밑줄로 표시함).

[0425] 일부 실시태양에서, 중쇄 HVR 및 FR 서열은 다음 서열을 포함한다:

HVR-H1 (Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn, 서열 2)
 HVR-H2 (Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly,
 서열 4)
 HVR-H3 (Asp Gly Ser Ser Trp Asp Try Tyr Phe Asp Tyr, 서열 6)
 FR-H1 (Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser, 서열 1)
 FR-H2 (Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val, 서열 3)
 FR-H3 (Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg, 서열 5)
 FR-H4 (Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser, 서열 7)

[0426] 본 발명은 하기 제시된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 108 (서열 17) (HVR 잔기는 밑줄로 표시하고, 위치 N28은
 굵은 글씨체로 표시함)

[0429] 또는

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 108 (서열 18) (HVR 잔기는 밑줄로 표시하고, 위치 N28V는
 굵은 글씨체로 표시함).

[0432] 일부 실시태양에서, 경쇄 HVR 서열은 다음 서열을 포함한다:

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu, 서열 9)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu, 서열 10)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu Glu, 서열 19)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu Glu, 서열 20)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu Glu, 서열 21)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Glu, 서열 22)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu Glu, 서열 23)

[0433]

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu Glu, 서열 32)
 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu Glu, 서열 33)
 HVR-L2 (Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser, 서열 12)

[0434] HVR-L3 (Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr, 서열 14).

[0435] 일부 실시태양에서, 경쇄 FR 서열은 다음을 포함한다:

FR-L1 (Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 Val Thr Ile Thr Cys, 서열 8);
 FR-L2 (Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr, 서열 11);
 FR-L3 (Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys, 서열 13)
 FR-L4 (Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg, 서열 15).

[0436]

[0437] 한 측면에서, 본 발명은 서열 17 또는 18로부터 선택되는 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 일부 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열은 참조 서열에 비해 치환, 삽입 또는 결실을 갖지만, 상기 아미노산 서열을 포함하는 항체는 CD22에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시태양에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 17 또는 18로부터 선택된 서열에서 치환되거나, 삽입되거나, 결실되었다. 일부 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 일부 실시태양에서, 항-CD22 항체는 서열 17 또는 18로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0438]

한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 16으로부터 선택되는 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 (b) 서열 17 또는 18로부터 선택되는 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 일부 실시태양에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열은 참조 서열에 비해 치환, 삽입 또는 결실을 갖지만, 상기 아미노산 서열을 포함하는 항체는 CD22에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시태양에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 참조 서열에서 치환되거나, 삽입되거나, 결실된다. 일부 실시태양에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 일부 실시태양에서, 항-CD22 항체는 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 18로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0439]

한 측면에서, 본 발명은 (a) 도 2A에 제시된 것으로부터 선택된 1, 2, 또는 3개의 VH HVR 및/또는 (b) 도 2B에 제시된 것으로부터 선택된 1, 2, 또는 3개의 VL HVR을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 도 2A에 제시된 것으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 및 도 2B에 제시된 것으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-CD22 항체를 제공한다.

[0440]

한 측면에서, 본 발명의 항-CD22 항체는 ATCC에 기탁 번호 PTA-7620으로 기탁된 하이브리도마에 의해 생산된 5E8.1.8 항체의 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 초가변 영역을 포함한다.

[0441] 2. 항체 단편

본 발명은 항체 단편을 포함한다. 항체 단편은 전통적인 수단, 예를 들어 효소 소화, 재조합 기술에 의해 생성할 수 있다. 특정 상황에서는, 온전한 항체보다 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 보다 작은 크기의 단편

은 신속한 소실을 가능하게 하고, 충실성 종양에 대한 접근성을 개선시킬 수 있다. 특정 항체 단편의 검토에 대해서는 문헌 [Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134]을 참조한다.

[0443] 항체 단편 생산을 위해 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 상기 단편은 무손상 항체의 단백질 분해 소화를 통해 유도되었다 (예를 들어, 문헌 ([Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)]) 참조). 그러나, 상기 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되고 이로부터 분비되어 다량의 상기 단편을 쉽게 생산하게 할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의한 바와 같이 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]. 다른 방법에 따르면, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접 단리될 수 있다. 살비지 (salvage) 수용체 결합 애피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편이 미국 특허 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 특정 실시태양에서, 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다 (WO 93/16185; 미국 특허 5,571,894; 및 미국 특허 5,587,458 참조). Fv 및 sFv는 불변 영역이 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이고, 따라서 생체내 사용 동안 비특이적 결합의 감소에 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에 효과기 단백질의 융합체를 생성시키도록 제조될 수 있다. 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 문헌]을 참조한다. 또한, 항체 단편은 예를 들어 미국 특허 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

3. 인간화 항체

[0445] 본 발명은 인간화 항체를 포함한다. 비-인간 항체를 인간화하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 그에 도입된 1개 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 일반적으로 "도입 (import)" 가변 도메인으로부터 취한 "도입" 잔기로서 종종 언급된다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 상응하는 서열을 초가변 영역 서열로 대체함으로써 윈터 (Winter) 및 공동연구자의 방법 ([Jones et al. (1986) *Nature*, 321: 522-525], [Riechmann et al. (1988) *Nature*, 332: 323-327]; [Verhoeyen et al. (1988) *Science*, 239: 1534-1536])을 따라 수행할 수 있다. 따라서, 상기 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 작은 도메인이 비-인간종의 상응하는 서열로 대체된 키메라 항체 (미국 특허 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 일반적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 항체이다.

[0446] 인간화 항체 제조에 사용되는 경쇄 및 중쇄 모두의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성 감소를 위해 중요할 수 있다. 소위 "최적 맞춤 (best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인 서열은 공지의 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 것과 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체의 인간 프레임워크로서 허용된다 ([Sims et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2296]; [Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901]). 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위집단의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래한 특정 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 복수개의 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 ([Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285]; [Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623]).

[0447] 항체가 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것이 일반적으로 더욱 바람직하다. 이를 달성하기 위해서, 한 방법에 따르면, 인간화 항체는 모서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하여 모서열 및 상이한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 입수 가능하고, 당업계의 숙련인에게 잘 알려져 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태적 구조를 그려 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다. 상기 디스플레이의 조사를 통해 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 면역글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 끼치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 목적하는 항체 특성, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합에 대한 영향에 직접적으로 가장 실질적으로 관련이 있다.

4. 인간 항체

[0449] 본 발명의 인간 항-CD22 항체는 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열

(들)을 상기한 바와 같이 공지의 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합함으로써 제조할 수 있다. 별법으로, 본 발명의 인간 모노클로날 항-CD22 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 제조를 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 예를 들어 문헌 ([Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984)], [Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)] 및 [Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)])에 기재되어 있다.

[0450]

면역화시에, 내인성 면역글로불린 생산의 부재하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어 마우스)를 생산하는 것이 또한 가능해졌다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포 돌연변이체 마우스의 항체 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자의 동종접합성 결실이 내인성 항체 생성을 완전히 억제한다고 기재되었다. 상기 생식세포 돌연변이체 마우스에서 인간 생식세포 면역글로불린 유전자 어레이의 전이는 항원 시험 접종시에 인간 항체를 생성시킬 것이다. 예를 들어, 문헌 ([Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature 362: 255 (1993)] 및 [Bruggermann et al., Year in Immunol, 7: 33 (1993)])을 참조한다.

[0451]

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

[0452]

5. 이중특이적 항체

[0453]

이중특이적 항체는 적어도 2종의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시태양에서, 이중특이적 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 특정 실시태양에서, 결합 특이성 중 하나는 CD22에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시태양에서, 이중특이적 항체는 CD22의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 CD22을 발현하는 세포에 세포독성제를 국소화시키는데 사용될 수도 있다. 이들 항체는 CD22-결합 아암, 및 사포린, 항-인터페론- α , 빈카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토트렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐과 같은 세포독성제에 결합하는 아암을 보유한다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어 $F(ab')_2$ 이중특이적 항체)으로서 제조될 수 있다.

[0454]

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

[0455]

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

[0456]

상기 접근법의 한 실시태양에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로

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

[0457] 다른 방법에 따르면, 한쌍의 항체 분자들 사이의 계면은 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 비율을 최대화하도록 처리될 수 있다. 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예, 티로신 또는 트립토판)으로 교체된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예, 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체함으로써 큰 측쇄(들)에 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "캐비티 (cavity)"가 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 다른 원치 않는 최종 생성물, 예를 들어 동종이량체 (homodimer)에 비해 이종이량체 (heterodimer)의 수율을 증가시키기 위한 메카니즘을 제공한다.

[0458] 이중특이적 항체는 가교결합된 또는 "이종접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 바이오틴에 커플링될 수 있다. 상기 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키기 위해 (미국 특허 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료를 위해 (WO 91/00360, WO 92/00373 및 EP 03089) 제안되었다. 이종접합체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 적합한 가교결합제는 당업계에 잘 알려져 있고, 많은 가교결합 기술과 함께 미국 특허 4,676,980에 개시되어 있다.

[0459] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 또한 문헌에서 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학적 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]에서는 무손상 항체가 단백질 분해 방식으로 절단되어 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 기술하고 있다. 이들 단편은 인접 디티올을 안정화시키고 분자간 디슬퍼드 형성을 방지하기 위해 디티올 착화제인 아비소산나트륨의 존재하에 환원된다. 이어서, 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. 이어서, Fab'-TNB 유도체 중 하나는 며캅토에틸아민으로 환원시켜 Fab'-티올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 물질로서 사용될 수 있다.

[0460] 최근의 진보는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]에서는 완전 인간화 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 기술하고 있다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비되었고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내에서 유도 화학 커플링 반응에 적용되었다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 뿐만 아니라 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발시킬 수 있었다.

[0461] 이중특이적 항체 단편을 재조합 세포 배양액으로부터 직접 제조하고 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 웨티드가 유전자 융합에 의해 2종의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 헌지 영역에서 환원되어 단량체를 형성한 다음, 재산화되어 항체 이종이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동종이량체의 생산에 이용될 수도 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편 제조를 위한 다른 메카니즘을 제공하였다. 이 단편은 동일한 사슬 상의 두개의 도메인 사이에 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인은 다른 단편의 상보성 VL 및 VH 도메인과 강제로 페어링되고, 이에 의해 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일체 Fv (sFv) 이량체를 사용한 이중특이적 항체 단편의 다른 제조 전략도 보고된 바 있다 ([Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994)] 참조).

[0462] 2가 초파의 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다 [Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991)].

6. 다가 항체

[0464] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 빠르게 내재화 (및/또는 이화)될 수

있다. 본 발명의 항체는 항원 결합 부위가 3개 이상인 (예를 들어 4가 항체) 다가 항체 (IgM 클래스 이외의 것)일 수 있고, 항체의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 쉽게 생산될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다 (또는 이루어진다). 상기 시나리오에서, 항체는 Fc 영역 및 Fc 영역의 아미노 말단에 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 특정 실시태양에서, 다가 항체는 3 내지 약 8개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이루어진다). 이러한 한 실시태양에서, 다가 항체는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이루어진다). 다가 항체는 적어도 하나의 폴리펩티드 사슬 (예를 들어 2개의 폴리펩티드 사슬)을 포함하고, 여기서 폴리펩티드 사슬(들)은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc (여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, Fc는 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이고, X1 및 X2는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1이다)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은 VH-CH1-가요성 링커-VH-CH1-Fc 영역 사슬; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 영역 사슬을 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 적어도 2개 (바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 예를 들어 약 2 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 추가로 포함한다.

[0465] 7. 단일-도메인 항체

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

[0467] 8. 항체 변이체

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

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

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

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

다.

[0472] 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 1개 이상의 상기 트리펩티드 서열 (N-연결 글리코실화 부위에 대해)이 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성된다. 또한, 변형은 본래 항체의 서열에 대한 1개 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가, 결실 또는 치환에 의해 수행될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0473] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 여기에 부착된 탄수화물은 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 결핍된 성숙 탄수화물 구조를 갖는 항체는 미국 특허 출원 공개 2003/0157108 A1 (Presta, L.)에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)을 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물에 이등분 (bisecting) N-아세틸글루코스아민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 WO 2003/011878 (Jean-Mairet 등)과 미국 특허 6,602,684 (Umana 등)에 언급되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당 내에 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 갖는 항체는 WO 1997/30087 (Patel 등)에 보고되어 있다. 또한, Fc 영역에 부착된 변경된 탄수화물을 갖는 항체에 관하여는 WO 1998/58964 (Raju, S.)와 WO 1999/22764 (Raju, S.)를 참조한다. 또한, 변경된 글리코실화가 존재하는 항원 결합 분자에 대해서는 US 2005/0123546 (Umana et al.)을 참조한다.

[0474] 특정 실시태양에서, 글리코실화 변이체는 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에 푸코스가 결핍되어 있는 Fc 영역을 포함한다. 상기 변이체는 개선된 ADCC 기능을 갖는다. 임의로, Fc 영역은 ADCC를 추가로 개선시키는 1개 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 Eu 네모닝)의 치환을 추가로 포함한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체에 관련이 있는 간행물의 예는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; 문헌 ([Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)])을 포함한다. 탈푸코실화 항체를 생산하는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 ([Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 공개 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al.), 특히 Example 11), 및 넉아웃 (knockout) 세포주, 예를 들어 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 넉아웃 CHO 세포 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]를 포함한다.

[0475] 한 실시태양에서, 항체는 그의 혈청 반감기가 개선되도록 변형된다. 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해서, 미국 특허 5739277에 기재된 바와 같이 샐비지 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히 항체 단편)에 삽입할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "샐비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 일을 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다 (미국 2003/0190311, 미국 6821505, 미국 6165745, 미국 5624821, 미국 5648260, 미국 6165745, 미국 5834597).

[0476] 다른 종류의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이들 변이체는 항체 분자의 적어도 하나의 아미노산 잔기 대신에 상이한 잔기가 삽입된다. 치환 돌연변이 유발을 위한 가장 흥미로운 부위는 초가변 영역을 포함하지만, FR 변형도 고려된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제하에 표 1에 나타낸다. 상기 치환이 생물학적 활성의 목적하는 변경을 유도하면, 하기 표 1에 "예시적인 치환"으로 명명된 또는 아미노산 종류에 대해 아래에서 상세히 기재하는 보다 큰 실질적 변화가 도입되고, 생성물을 스크리닝할 수 있다.

[0477] [표 1]

본래 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; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg

Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르뉴신	Leu

[0479] 항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은, (a) 치환 영역 내 폴리펩티드 백본의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선 형태, (b) 표적 부위의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크성 (bulk)을 유지하는 것에 미치는 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성한다. 아미노산은 그의 측쇄 특성의 유사성에 따라 다음 군으로 분류할 수 있다 [A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]:

[0480] (1) 비극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0481] (2) 비대전 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0482] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0483] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H).

[0484] 별법으로, 천연 발생 잔기는 통상적인 측쇄 특성을 기초로 하여 다음 군으로 분류할 수 있다:

[0485] (1) 소수성: 노르뉴신, Met, Ala, Val, Leu, Ile,

[0486] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,

[0487] (3) 산성: Asp, Glu,

[0488] (4) 염기성: His, Lys, Arg,

[0489] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro, 및

[0490] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0491] 비보존적 치환은 상기 종류의 하나의 멤버를 다른 종류와 교환하는 것을 수반할 것이다. 상기 치환되는 잔기는 또한 보존적 치환 부위 새로, 또는 나머지 (비-보존된) 부위 새로 도입될 수 있다.

[0492] 한 종류의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 개발을 위해 선택된 생성되는 변이체(들)은 이들이 생성되는 모 항체에 비해 변형된 (예를 들어 개선된) 생물학적 특성을 가질 것이다. 그러한 치환 변이체를 생성하기 위한 간편한 방법은 파지 디스플레이를 사용하는 친화도 성숙이다. 간단히 설명하면, 몇몇 초가변 영역 부위 (예를 들어 6-7개의 부위)가 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성하도록 돌연변이된다. 이렇게 생성된 항체는 각 입자 내에 패키징된 파지 외피 단백질의 적어도 일부 (예를 들어, M13의 유전자 III 산물)에 대한 융합체로서 필라멘트상 파지 입자로부터 디스플레이된다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 그들의 생물학적 활성 (예를 들어 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인하는 스캐닝 돌연변이 유발 (예를 들어, 알라닌 스캐닝)을 수행할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 상기 접촉 잔기 및 이웃 잔기가, 본원에서 기재된 기술을 포함하여 당업계에 공지된 기술에 따른 치환에 대한 후보이다. 일단 그러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에서 기재된 기술을 포함하여 당업계에 공지된 기술을 사용하여 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 검정에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가 개발을 위해 선택할 수 있다.

[0493] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조한다. 상기 방법은 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 항체의 초기 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위 지정) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발, 및 카세트 돌연변이 유발에 의한 제조를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0494] 본 발명의 항체의 Fc 영역에 1개 이상의 아미노산 변형을 도입하여 Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다. Fc 영역 변이체는 헌지 시스테인의 위치를 포함하여 1개 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0495] 본원 명세서 및 선행기술의 교시 내용에 따르면, 일부 실시태양에서, 본 발명의 항체는 야생형 상응 항체에 비해, 예를 들어 Fc 영역에 1개 이상의 변형을 포함할 수 있음이 고려된다. 그럼에도 불구하고, 상기 항체는 야생형 상응 항체에 비교할 때 치료 유용성에 필요한 실질적으로 동일한 특성을 보유할 것이다. 예를 들어, WO 99/51642에 기재된 바와 같이 변경된 (즉, 개선되거나 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 야기하는 특정 변형이 Fc 영역에서 형성될 수 있다고 생각된다. 또한, Fc 영역 변이체의 다른 예에 대해서는 문헌 ([Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 5,648,260; 미국 특허 5,624,821; 및 WO 94/29351)을 참고한다. WO 00/42072 (Presta) 및 WO 2004/056312 (Lowman)에는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다 (또한, 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조). 모체 IgG의 태아로의 전달을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) ([Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 개선된 결합 및 증가된 반감기를 갖는 항체는 US2005/0014934A1 (Hinton 등)에 기재되어 있다. 상기 항체는 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합을 개선시키는 1개 이상의 치환을 그 내부에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열 및 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 6,194,551 B1 및 WO 99/51642에 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다. 또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]도 참조한다.

[0496] 한 측면에서, 본 발명은 이종이량체화를 용이하게 하고/하거나 촉진시키는, Fc 영역을 포함하는 Fc 폴리펩티드의 계면에 변형을 포함하는 항체를 제공한다. 상기 변형은 제1 Fc 폴리펩티드 내에 돌출부를, 제2 Fc 폴리펩티드 내에 "캐비티"를 도입하는 것을 포함하고, 여기서 돌출부는 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 복합체화를 촉진시키기 위해 캐비티 내에 위치할 수 있다. 상기 변형을 갖는 항체를 생성시키는 방법은 예를 들어 미국 특허 5,731,168에 기재되어 있는 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.

9. 항체 유도체

[0498] 본 발명의 항체는 당업계에 공지되고 용이하게 이용가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 엑스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 엑스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이들의 혼합물을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 그의 물에서의 안정성 때문에 제조상의 잇점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있으며, 분지되거나 비분지될 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 1개 초과의 중합체가 부착될 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 종류는 개선될 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 한정된 조건하에서 요법에 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 고려사항을 기초로 하여 결정될 수 있다.

[0499] 다른 실시태양에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 실시태양에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 [Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005)]. 방사선은 임의의 파장을 가질 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

항체의 특정 제조 방법

1. 특정 하이브리도마-기반 방법

[0501] 본 발명의 항-CD22 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 4,816,567)에 의해 제조할 수 있다.

- [0503] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예를 들어 햄스터는 면역화를 위해 사용되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도하기 위해 면역화된다. CD22에 대한 항체는 일반적으로 CD22 및 아주반트를 피하 (sc) 또는 복강 내로 (ip) 다수회 주사하여 동물에서 유도된다. CD22은 그 일부가 본원에서 추가로 기재되는, 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, CD22은 제조합 방식으로 생성시킬 수 있다. 한 실시태양에서, 동물을 면역글로불린 중쇄의 Fc 부분에 융합된 CD22의 세포외 부분을 함유하는 CD22의 유도체로 면역화시킨다. 한 실시태양에서, 동물을 CD22-IgG1 융합 단백질로 면역화시킨다. 한 실시태양에서, 동물을 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노미콜레이트 (TDM) (리비 이뮤노켐 리서치, 인크. (Ribi Immunochem. Research, Inc., 미국 몬타나주 해밀턴)) 용액 중의 CD22의 면역원성 유도체로 면역화시키고, 용액을 여러 부위에서 피내 주사한다. 2주 후, 동물을 부스팅시킨다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하고, 혈청을 항-CD22 역가에 대해 분석한다. 동물을 역가가 안정한 수준에 도달할 때까지 부스팅한다.
- [0504] 별법으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 이어서, 림프구는 하이브리도마 세포를 형성하는데 적합한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합된다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)].
- [0505] 이와 같이 제조한 하이브리도마 세포는 적합한 배지, 예를 들어 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 히포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우, 하이브리도마의 배양 배지는 일반적으로 히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)를 포함할 것이고, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 저해한다.
- [0506] 특정 실시태양에서, 골수종 세포는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체 생성 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준 생성을 지지하고, 배지, 예를 들어 HAT 배지에 민감한 세포이다. 예시적인 골수종 세포는 뮤린 골수종 세포주, 예를 들어 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center)) 및 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포 (미국 메릴랜드주 로크빌 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 ((American Type Culture Collection)))에서 유도된 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주도 인간 모노클로날 항체 생성을 위해 기재된 바 있다 ([Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).
- [0507] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 CD22에 결합하는 모노클로날 항체의 생성에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어 방사성 면역 측정법 (RIA) 또는 효소-결합 면역 측정법 (ELISA)으로 결정할 수 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐챠드 (Scatchard) 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0508] 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 클론은 제한 회색 절차에 의해 서브클로닝하고 표준 방법 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]으로 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다. 서브클론에 의해 분비되는 모노클로날 항체는 통상적인 면역글로불린 정제 절차, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.
- [0509] 2. 특정 라이브러리 스크리닝 방법
- [0510] 본 발명의 항-CD22 항체는 목적하는 활성(들)을 갖는 항체를 스크리닝하기 위해 조합 라이브러리를 사용함으로써 제조할 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 원하는 결합 특징을 갖는 항체에 대하여 상기 라이브러리를 스크리닝하는 각종 방법이 당업계에 공지되어 있다. 그러한 방법은 일반적으로 문헌 [Hoogenboom et al. (2001) in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ)]에 기재되어 있고, 특정 실시태양에서는 문헌 [Lee et al. (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093]에 기재되어 있다.
- [0511] 원칙적으로, 합성 항체 클론은 파지 외피 단백질에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 디스플레이하

는 파지를 함유하는 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 선택된다. 이러한 파지 라이브러리는 관심 항원에 대하여 친화도 크로마토그래피에 의해 선택된다. 목적하는 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론은 항원에 흡착되어, 라이브러리 내의 비-결합 클론으로부터 분리된다. 이어서, 결합 클론은 항원으로부터 용출되고, 추가의 사이클의 항원 흡착/용출에 의해 더욱 풍부해질 수 있다. 본 발명의 임의의 항-CD22 항체는 관심 파지 클론에 대해 선택하는데 적합한 항원 스크리닝 과정을 설계한 후, 관심 파지 클론으로부터 Fv 서열 및 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에 기재된 적합한 불변 영역 (Fc) 서열을 사용하여 전장 항-CD22 항체 클론을 구성함으로써 얻을 수 있다.

[0512] 특정 실시태양에서, 항체의 항원 결합 도메인은 3개의 초가변 루프 (HVR) 또는 상보성 결정 영역 (CDR)을 제공하는 약 110개 아미노산의 2개의 가변 (V) 영역 (각각 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)에 하나씩)으로부터 형성된다. 가변 도메인은 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 단일쇄 Fv (scFv) 단편으로서 (여기서, VH 및 VL은 짧은 가요성 웨비드를 통해 공유 연결된다), 또는 Fab 단편으로서 (여기서, 이들을 각각 불변 도메인에 융합되고, 비공유 상호작용한다) 파지 상에 기능적으로 디스플레이될 수 있다. 본원에서 사용될 때, scFv 코딩 파지 클론 및 Fab 코딩 파지 클론은 통칭하여 "Fv 파지 클론" 또는 "Fv 클론"으로서 불린다.

[0513] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 따로 클로닝되고, 파지 라이브러리 내에서 무작위로 재조합될 수 있고, 이어서 이는 항원 결합 클론에 대해 탐색될 수 있다. 면역화 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 제작할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 별법으로, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이, 임의의 면역화 없이 광범위한 비-자가 및 또한 자가 항원에 대한 인간 항체의 단일 공급원을 제공하기 위해, 나이브 (naive) 레퍼토리가 클로닝될 수 있다. 마지막으로, 나이브 라이브러리는 또한 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 세그먼트를 클로닝하고, 고도 가변 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열을 달성하기 위해 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써 합성적으로 제조될 수 있다.

[0514] 특정 실시태양에서, 필라멘트상 파지는 부 (minor) 외피 단백질 pIII에 대한 융합으로 항체 단편을 디스플레이하는데 사용된다. 항체 단편은 단일쇄 Fv 단편으로서 (여기서, VH 및 VL 도메인은 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 가요성 폴리웨비드 스페이서에 의해 동일한 폴리웨비드 사슬 상에서 연결된다), 또는 Fab 단편으로서 (여기서, 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)]에 기재된 바와 같이 하나의 사슬은 pIII에 융합되고, 다른 사슬은 세균 숙주 세포 원형질막 공간 내로 분비되고, 여기서 Fab-외피 단백질 구조의 조립체가 야생형 외피 단백질의 일부를 치환함으로써 파지 표면 상에 디스플레이된다) 디스플레이될 수 있다.

[0515] 일반적으로, 항체 유전자 단편을 코딩하는 핵산은 인간 또는 동물로부터 수집한 면역 세포로부터 얻어진다. 항-CD22 클론에 유리하게 편향된 라이브러리가 요망되는 경우, 대상을 항체 반응을 생성하도록 CD22로 면역화시키고, 비장 세포 및/또는 순환 B 세포 또는 다른 말초혈 림프구 (PBL)를 라이브러리 제작을 위해 회수한다. 바람직한 실시태양에서, 항-CD22 클론에 유리하게 편향된 인간 항체 유전자 단편 라이브러리는 CD22 면역화가 CD22에 대한 인간 항체를 생산하는 B 세포를 유도하도록 기능적 인간 면역글로불린 유전자 어레이를 갖는 (또한 기능적 내인성 항체 생산 시스템이 결핍된) 트랜스제닉 마우스에서 항-CD22 항체 반응을 생성함으로써 얻어진다. 인간 항체-생산 트랜스제닉 마우스의 생성은 아래에서 기재된다.

[0516] 항-CD22 반응성 세포 집단에 대한 추가의 농축은 예를 들어 CD22 친화도 크로마토그래피 또는 플루오로크롬-표지된 CD22에 대한 세포의 흡착 후 유동-활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하는 세포 분리에 의해 CD22-특이적 막 결합 항체를 발현하는 B 세포를 단리하는 적합한 스크리닝 절차를 이용하여 얻을 수 있다.

[0517] 별법으로, 비면역화 공여체로부터의 비장 세포 및/또는 B 세포 또는 다른 PBL의 사용은 가능한 항체 레퍼토리의 보다 우수한 예시를 제공하고, 또한 CD22가 항원성이 아닌 임의의 동물 (인간 또는 비-인간) 종을 사용한 항체 라이브러리의 제작을 허용한다. 시험관내 항체 유전자 제조를 포함하는 라이브러리를 위해, 재배열되지 않은 항체 유전자 세그먼트를 코딩하는 핵산을 제공하기 위해 줄기 세포를 대상으로부터 수집한다. 관심 면역 세포는 다양한 동물 종, 예를 들어 인간, 마우스, 래트, 토끼, 늑대, 개, 고양이, 쇄지, 소, 말, 및 새 종 등으로부터 얻을 수 있다.

[0518] 항체 가변 유전자 세그먼트 (예를 들어 VH 및 VL 세그먼트)를 코딩하는 핵산을 관심 세포로부터 회수하고 증폭

시킨다. 재배열된 VH 및 VL 유전자 라이브러리의 경우에, 목적하는 DNA는 림프구로부터 게놈 DNA 또는 mRNA를 단리한 후, 문헌 [Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)]에 기재된 바와 같이 재배열된 VH 및 VL 유전자의 5' 및 3' 말단을 매칭시키는 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 수행하여 발현을 위한 다양한 V 유전자 레퍼토리를 제조함으로써 얻을 수 있다. V 유전자는 문헌 ([Orlandi et al., (1989)] 및 [Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989)]에 기재된 바와 같이, 성숙 V-도메인을 코딩하는 엑손의 5' 말단에서 역방향 프라이머 및 J-세그먼트 내에 기반한 정방향 프라이머를 사용하여 cDNA 및 게놈 DNA로부터 증폭될 수 있다. 그러나, cDNA로부터 증폭시키기 위해서는, 역방향 프라이머가 또한 문헌 [Jones et al., Biotechnol, 9: 88-89 (1991)]에 기재된 바와 같이 리더 (leader) 엑손에 기반할 수 있고, 정방향 프라이머는 문헌 [Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)]에 기재된 바와 같이 불변 영역 내에 기반할 수 있다. 상보성을 최대화하기 위해, 문헌 ([Orlandi et al. (1989)] 또는 [Sastry et al. (1989)])에 기재된 바와 같이 프라이머 내에 다의성 (degeneracy)을 혼입시킬 수 있다. 특정 실시태양에서, 라이브러리 다양성은 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol, 222: 581-597 (1991)]의 방법 또는 문헌 [Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)]의 방법에 기재된 바와 같이 면역 세포 핵산 샘플 내에 존재하는 모든 이용가능한 VH 및 VL 배열을 증폭하기 위해 각각의 V-유전자 패밀리에 표적화된 PCR 프라이머를 사용함으로써 최대화된다. 증폭된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해, 희귀 (rare) 제한 부위가 문헌 [Orlandi et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 한 단부에서 태그 (tag)로서, 또는 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 태깅된 프라이머를 사용하는 추가의 PCR 증폭에 의해 PCR 프라이머 내에 도입될 수 있다.

[0519]

합성적으로 재배열된 V 유전자의 레퍼토리는 V 유전자 세그먼트로부터 시험관내에서 유도될 수 있다. 대부분의 인간 VH-유전자 세그먼트는 클로닝되고 서열결정되고 (문헌 [Tomlinson et al., J. Mol. Biol, 227: 776-798 (1992)]에 보고됨), 맵핑되었고 (문헌 [Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)]에 보고됨); 상기 클로닝된 세그먼트 (H1 및 H2 루프의 주요 형태를 모두 포함함)는 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이 다양한 서열 및 길이의 H3 루프를 코딩하는 PCR 프라이머를 사용하여 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 생성하는데 사용될 수 있다. VH 레퍼토리는 또한 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)]에 기재된 바와 같이 단일 길이의 긴 H3 루프에 집중된 모든 서열 다양성을 갖도록 제조될 수 있다. 인간 V κ 및 V λ 세그먼트가 클로닝되어 서열결정되었고 (문헌 [Williams and Winter, Eur. J. Immunol, 23: 1456-1461 (1993)]에 보고됨), 합성 경쇄 레퍼토리를 제조하는데 사용될 수 있다. 합성 V 유전자 레퍼토리 (VH 및 VL 폴드 (fold)의 범위, 및 L3 및 H3 길이에 기반하는)는 상당히 구조적으로 다양한 항체를 코딩할 것이다. V-유전자 코딩 DNA의 증폭 후, 생식세포 V-유전자 세그먼트는 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227: 381-388 (1992)]의 방법에 따라 시험관내에서 재배열될 수 있다.

[0520]

항체 단편의 레퍼토리는 VH 및 VL 유전자 레퍼토리를 몇 가지 방식으로 함께 결합함으로써 제작될 수 있다. 각각의 레퍼토리는 상이한 벡터 내에 생성될 수 있고, 벡터는 예를 들어 문헌 [Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993)]에 기재된 바와 같이 시험관내에서, 또는 조합 감염, 예를 들어 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)]에 기재된 loxP 시스템에 의해 생체내에서 재조합될 수 있다. 생체내 재조합 방안은 이. 콜라이 형질전환 효율에 의해 부과된 라이브러리 크기의 제한을 극복하기 위해 Fab 단편의 2-사슬 특성을 활용한다. 나이브 VH 및 VL 레퍼토리는 하나는 파지미드 내로, 다른 하나는 파지 벡터 내로 따로 클로닝된다. 이어서, 2개의 라이브러리는 파지미드-함유 세균의 파지 감염에 의해 조합되어, 각각의 세포가 상이한 조합을 함유하고, 라이브러리 크기는 존재하는 세포의 수에 의해서만 제한된다 (약 10^{12} 개 클론). 두 벡터 모두는 생체내 재조합 신호를 함유하여, VH 및 VL 유전자가 단일 레플리콘 상으로 재조합되고, 파지 비리온 내로 함께 패키징된다. 상기 큰 라이브러리는 우수한 친화도 (약 10^{-8} M의 K_d^{-1})의 다수의 다양한 항체를 제공한다.

[0521]

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

- [0522] 나이브 라이브러리 (천연 또는 합성)에 의해 생산된 항체는 중등도 친화도 (약 10^6 내지 10^7 M^{-1} 의 K_d^{-1})의 것일 수 있지만, 친화도 성숙은 또한 문헌 [Winter et al., (1994), 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 2차 라이브러리를 제작하고 그로부터 재선택함으로써 시험관내 모방될 수도 있다. 예를 들어, 돌연변이는 문헌 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)]의 방법 또는 문헌 [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)]의 방법에서 오류-허용 (error-prone) 중합효소 (문헌 [Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)]에 보고된 것)를 사용함으로써 시험관내에서 무작위로 도입될 수 있다. 추가로, 친화도 성숙은 예를 들어 선택된 개별 Fv 클론에서 관심 CDR에 이르는 무작위 서열을 갖는 프라이머를 사용한 PCR을 이용하여 1개 이상의 CDR을 무작위 돌연변이시키고, 보다 고친화도의 클론을 스크리닝함으로써 수행될 수 있다. WO 9607754 (1996년 3월 14일 공개)에서는 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성하기 위해 면역글로불린 경쇄의 상보성 결정 영역에서 돌연변이를 유발하는 방법을 기재한 바 있다. 다른 효과적인 방안은 비면역화 공여체로부터 얻은 천연 발생 V 도메인 변이체의 래퍼토리를 사용하는 과지 디스플레이에 의해 선택된 VH 또는 VL 도메인을 재조합하고, 문헌 [Marks et al., Biotechnol, 10: 779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 수회의 사슬 재셔플링으로 보다 고친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 상기 기술을 통해 친화도가 10^{-9} M 이하인 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다.
- [0523] 라이브러리의 스크리닝은 당업계에 공지된 임의의 기술로 달성할 수 있다. 예를 들어, CD22은 흡착 플레이트의 웰을 코팅하는데 사용되거나, 흡착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에서 발현되거나, 세포 분류에 사용되거나, 스트렙타비딘-코팅된 비드로 포획하기 위해 바이오틴에 접합되거나, 과지 디스플레이 라이브러리를 패닝 (panning)하기 위한 임의의 다른 당업계에 공지된 방법에서 사용될 수 있다.
- [0524] 과지 라이브러리 샘플을 과지 입자의 적어도 일부를 흡착제와 결합시키는데 적합한 조건하에 고정된 CD22와 접촉시킨다. 보통, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함하는 조건은 생리적 조건을 모방하도록 선택된다. 고체상에 결합된 과지를 세척한 후, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 산으로, 또는 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 알칼리로, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]의 항원 경쟁 방법과 유사한 절차에 따른 CD22 항원 경쟁으로 용출시킨다. 과지는 단일 선별 라운드에서 20-1,000배 농축될 수 있다. 또한, 농축된 과지를 세균 배양액에서 성장시키고, 추가의 선별 라운드를 실행시킬 수 있다.
- [0525] 선별의 효율은 세척 동안의 해리 역학, 및 단일 과지 상의 다수 항체 단편이 항원과 동시에 결합할 수 있는지 여부를 포함하는 많은 요인에 따라 달라진다. 신속한 해리 역학 (및 약한 결합 친화도)을 갖는 항체는 짧은 세척, 다가 과지 디스플레이 및 고체상 중 높은 코팅 밀도의 항원을 사용하여 보유될 수 있다. 높은 밀도는 다가 상호작용을 통해 과지를 안정화시킬 뿐만 아니라, 해리된 과지의 재결합에 유리하다. 느린 해리 역학 (및 우수한 결합 친화도)을 갖는 항체의 선별은 문헌 [Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990)]과 WO 92/09690에 기재된 바와 같이 오랜 세척 및 1가 과지 디스플레이, 및 문헌 [Marks et al., Biotechnol, 10: 779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 낮은 코팅 밀도의 항원을 사용하여 촉진될 수 있다.
- [0526] CD22에 상이한 친화도, 심지어는 근소하게 상이한 친화도를 갖는 과지 항체를 선별하는 것이 가능하다. 그러나, 선별된 항체의 무작위 돌연변이 (예를 들어 일부 친화도 성숙 기술에서 수행된 바와 같음)는 항원에 가장 강하게 결합하고, 몇몇은 보다 고친화도를 갖는 많은 돌연변이체를 초래하는 경향이 있다. CD22을 제한하면, 드문 고친화도의 과지가 경쟁에 의해 제거될 수 있다. 보다 고친화도의 돌연변이체를 모두 보유하기 위해, 과지는 과량의 바이오틴화 CD22과 함께 인큐베이션될 수 있지만, 바이오틴화 CD22은 CD22에 대한 표적 물 친화도 상수보다 더 낮은 물농도의 농도로 사용된다. 이어서, 고친화도-결합 과지는 스트렙타비딘-코팅된 상자성 (paramagnetic) 비드에 의해 포획될 수 있다. 이러한 "평형 포획"으로 항체는 그들의 결합 친화도에 따라 선별될 수 있고, 그의 민감도는 친화도가 보다 낮은 매우 과량의 과지로부터 2배 더 높은 수준의 낮은 친화도를 갖는 돌연변이체 클론의 단리를 허용한다. 고체상에 결합된 과지를 세척하는데 사용되는 조건은 또한 해리 역학을 기초로 하여 식별하기 위해 조작될 수 있다.
- [0527] 항-CD22 클론은 활성에 기초하여 선별될 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 본래 CD22을 발현하는 살아있는 세포에 결합하는 항-CD22 항체를 제공한다. 한 실시태양에서, 본 발명은 CD22 리간드와 CD22 사이의 결합을 차단하지만, CD22 리간드와 제2 단백질 사이의 결합은 차단하지 않는 항-CD22 항체를 제공한다. 상기 항-CD22 항체에 상응하는 Fv 클론은 (1) 상기 기재된 과지 라이브러리로부터 항-CD22 클론을 단리하고, 임의로 과지 클론의 단리된 집단을 적합한 세균 숙주에서 집단을 성장시킴으로써 증폭시키고; (2) CD22, 차단 및 비-차단 활성 각각이 요망되는 및 제2 단백질을 선택하고; (3) 항-CD22 과지 클론을 고정된 CD22에 흡착시키고; (4) 과량의

제2 단백질을 사용하여 제2 단백질의 결합 결정자와 중복되고/되거나 공유하는 CD22-결합 결정자를 인식하는 임의의 바람직하지 않은 클론을 용출시키고; (5) 단계 (4) 이후에 흡착되어 남아있는 클론을 용출시킴으로써 선택될 수 있다. 임의로, 목적하는 차단/비-차단 특성을 갖는 클론은 본원에 기재된 선별 절차를 1회 이상 반복함으로써 추가로 농축될 수 있다.

[0528] 본 발명의 하이브리도마-유래된 모노클로날 항체 또는 파지 디스플레이 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 DNA 주형으로부터 목적하는 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 고안된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용함으로써) 쉽게 단리되고 서열결정된다. 일단 단리된 후, DNA는 발현 벡터 내로 도입될 수 있고, 이어서 이는 재조합 숙주 세포에서 목적하는 모노클로날 항체의 합성을 달성하기 위해 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 면역글로불린 단백질을 달리 생산하지 않는 골수종 세포 내로 형질감염된다. 세균에서 항체-코딩 DNA의 재조합 발현에 관한 문헌은 문헌 ([Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992)])을 포함한다.

[0529] 본 발명의 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 공자의 DNA 서열 (예를 들어, 적절한 DNA 서열은 문헌 [Kabat et al. 상기 문헌]으로부터 얻을 수 있다)과 조합되어, 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 클론을 형성할 수 있다. 임의의 이소형의 불변 영역, 예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있고, 상기 불변 영역은 임의의 인간 또는 동물종으로부터 얻을 수 있음이 이해될 것이다. 하나의 동물 (예를 들어 인간) 종의 가변 도메인 DNA로부터 유래된 후, 다른 동물종의 불변 영역 DNA에 융합되어 "하이브리드" 전장 중쇄 및/또는 경쇄를 위한 코딩 서열(들)을 형성하는 Fv 클론은 본원에 기재된 "키메라" 및 "하이브리드" 항체의 정의에 포함된다. 특정 실시태양에서, 인간 가변 DNA로부터 유래된 Fv 클론은 인간 불변 영역 DNA에 융합되어 모든 인간 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)을 형성한다.

[0530] 본 발명의 하이브리도마로부터 유래된 항-CD22 항체를 코딩하는 DNA는 또한 예를 들어 하이브리도마 클론에서 유래된 상동성 뮤린 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 코딩 서열로 치환함으로써 (예를 들어 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)]의 방법에서와 같이) 변형될 수도 있다. 하이브리도마- 또는 Fv 클론-유래 항체 또는 단편을 코딩하는 DNA는 비-면역글로불린 폴리펩티드 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 연결시켜 추가로 변형될 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명의 Fv 클론 또는 하이브리도마 클론-유래된 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.

3. 벡터, 숙주 세포, 및 재조합 방법

[0532] 본 발명의 항체의 재조합 생산을 위해, 그를 코딩하는 핵산을 단리하고 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능 벡터 내로 삽입시킨다. 항체를 코딩하는 DNA를 통상의 방법을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 용이하게 단리하고 서열결정한다. 다수의 벡터가 이용될 수 있다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 의해 결정된다. 일반적으로, 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 (일반적으로 포유동물)에서 기원한다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형의 불변 영역이 이러한 목적을 위해 사용될 수 있고, 상기 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 얻을 수 있음이 이해될 것이다.

[0533] 원핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0534] 벡터 제조

[0535] 본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오티드 서열은 항체 생산 세포, 예를 들어 하이브리도마 세포로부터 단리되어 서열 결정될 수 있다. 별법으로, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 얻은 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵 숙주에서 이종 폴리뉴클레오티드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적에 이용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따라 결정될 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이종 폴리뉴클레오티드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 포함한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 선별 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이종 핵산 삽입체 및 전사 종결 서열

을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0536] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 조절 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 상기 숙주와 함께 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 및 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공할 수 있는 마킹 (marking) 서열을 포함한다. 예를 들어, 이. 콜라이는 일반적으로 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 암피실린 (Amp) 및 테트라사이클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지도 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 상기 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 카터 (Carter) 등의 미국 특허 5,648,237에 상세하게 기재되어 있다.
- [0537] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 조절 서열을 함유하는 파지 벡터를 상기 숙주에 대한 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예를 들어 λGEM.TM.-11이 이. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포의 형질전환에 사용될 수 있는 재조합 벡터 제조에 사용될 수 있다.
- [0538] 본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 그의 발현을 조정하는 시스트론에 대해 상류 (5')에 위치하는 비변역 조절 서열이다. 원핵 생물 프로모터는 전형적으로 두 종류의 프로모터, 즉 유도가능 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도가능 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 반응하여 그의 제어하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.
- [0539] 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 매우 많은 프로모터가 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이종 프로모터를 둘다 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시태양에서, 이종 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.
- [0540] 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, β-갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 tac 또는 trc 프로모터를 포함한다. 그러나, 세균 (예를 들어 다른 공지의 세균 또는 파지 프로모터)에서 기능적인 다른 프로모터도 적합하다. 이들의 뉴클레오티드 서열은 공개되어 있고, 따라서 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하기 위한 링커 또는 어댑터 (adaptor)를 사용하여 이를 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이션시킬 수 있다 [Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269].
- [0541] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위 (translocation)를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택되는 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 웨პ티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이 종 폴리펩티드에 천연인 신호 서열을 인식하여 프로세싱하지 않는 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은 예를 들어 알칼린 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어지는 군으로부터 선택되는 원핵 신호 서열에 의해 치환된다. 본 발명의 한 실시태양에서, 발현 시스템의 두 시스트론 모두에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.
- [0542] 다른 측면에서, 본 발명에 따른 면역글로불린의 생산은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으며, 따라서 각 시스트론 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 면역글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고 조립되어 세포질 내에서 기능적 면역글로불린을 형성한다. 특정 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이 trxB- 균주)는 디슬퍼드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 적절한 폴딩 및 조립을 허용한다 [Proba and Pluckthun, Gene, 159:203 (1995)].
- [0543] 본 발명의 항체는 또한 발현된 폴리펩티드 성분의 정량적인 비율을 본 발명의 분비되고 적절하게 조립된 항체의 수율을 최대화하기 위해 조정할 수 있는 발현 시스템을 이용하여 생산될 수 있다. 이러한 조정은 적어도 부분적으로는 폴리펩티드 성분에 대한 변역 강도의 동시 조정에 의해 달성된다.
- [0544] 변역 강도의 조정을 위한 한 가지 기술은 미국 특허 제5,840,523호 (Simmons 등)에 개시되어 있다. 이는 시스트론 내의 변역 개시 영역 (TIR)의 변이체를 이용한다. 주어진 TIR에 대해, 일련의 아미노산 또는 핵산 서열

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

[0545] 한 실시태양에서, 각각의 시스템에 대한 일정 범위의 TIR 강도를 갖는 벡터의 세트가 생성된다. 상기 제한된 세트는 각각의 사슬의 발현 수준뿐만 아니라 다양한 TIR 강도 조합 하에서 목적하는 항체 생성물의 수율의 비교를 제공한다. TIR 강도는 미국 특허 제5,840,523호 (Simmons 등)에 상세히 기재된 바와 같이 리포터 유전자의 발현 수준을 정량화함으로써 측정될 수 있다. 번역 강도 비교를 기초로 하여, 본 발명의 발현 벡터 구조물에 조합되도록 목적하는 개별 TIR을 선택한다.

[0546] 본 발명의 항체 발현에 적합한 원핵 숙주 세포는 원시세균 및 진정세균, 예를 들어 그람-음성 또는 그람-양성 유기체를 포함한다. 유용한 세균의 예는 에스케리치아 (*Escherichia*) (예를 들어 이. 콜라이), 바실러스 (*Bacillus*) (예를 들어 비. 섭틸리스 (*B. subtilis*)), 장내세균 (*Enterobacteria*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사 (*P. aeruginosa*)), 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스 (*Serratia marcescans*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 프로테우스 (*Proteus*), 시겔라 (*Shigella*), 리조비아 (*Rhizobia*), 비트레오실라 (*Vitreoscilla*), 또는 파라코코스 (*Paracoccus*)를 포함한다. 한 실시태양에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 한 실시태양에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예로는 유전자형 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpC-fepE) degP41 kanR (미국 특허 5,639,635)을 갖는 균주 33D3를 비롯한 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체를 들 수 있다. 다른 균주 및 그의 유도체, 예를 들어 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 비, 이. 콜라이 λ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 상기 예는 제한적이 아니라 예시적이다. 한정된 유전자형을 갖는 임의의 상기 언급된 세균의 유도체를 제작하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 세균 세포 내의 레플리콘의 복제능을 고려하여 적절한 세균을 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종은 pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKN410과 같은 널리 공지된 플라스미드가 레플리콘을 공급하는데 사용될 경우 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제는 바람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.

항체 생산

[0548] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키는데 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.

[0549] 형질전환은 DNA가 염색체외 요소로서 또는 염색체 통합체에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 세균 세포에 일반적으로 사용된다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 이용되는 또다른 기술은 전기천공이다.

[0550] 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는데 사용되는 원핵 세포를 당업계에 공지되고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예는 필수 영양 보충물이 부가된 루리아 브로쓰 (luria broth) (LB)를 포함한다. 일부 실시태양에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵 세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구조를 기초로 하여 선택된 선별제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.

[0551] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로 또는 복합 질소 공급원과 같은 또다른 보충물 또는 배지와의 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지

는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트리톨 및 디티오프레이톨로 이루어지는 군으로부터 선택된 1종 이상의 환원제를 함유할 수 있다.

[0552] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 특정 실시태양에서, 이. 콜라이의 성장 온도는 예를 들어 약 20 °C 내지 약 39°C, 약 25°C 내지 약 37°C, 및 약 30°C이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 특정 실시태양에서, 이. 콜라이에 대해, pH는 약 6.8 내지 약 7.4, 또는 약 7.0이다.

[0553] 유도가능 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용될 경우, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도용의 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 한 실시태양에서, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 다른 인듀서가 사용될 수 있다.

[0554] 한 실시태양에서, 본 발명의 발현된 폴리펩티드는 숙주 세포의 원형질막 공간 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 단백질 회수는 전형적으로, 일반적으로 삼투압 충격, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물을 분쇄하는 것을 포함한다. 세포가 분쇄되면, 세포 파쇄물 또는 온전한 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질은 예를 들어 친화도 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 별법으로, 단백질을 배양 배지 내로 옮기고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상등액을 여과하고 농축하여 생성된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 추가로 단리하고, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.

[0555] 본 발명의 한 측면에서, 항체 생산은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 (fed-batch) 발효 절차는 재조합 단백질의 생산에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 특정 실시태양에서 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 상기 발효기는 산소 및 영양물, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키는 교반기 추진기를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로 부피 용량으로 대략 100 리터 이하인 발효기에서의 발효를 지칭하며, 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.

[0556] 발효 과정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건하에서 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD550으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 정지상이다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 인듀서를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.

[0557] 본 발명의 폴리펩티드의 생산 수율 및 품질을 개선시키기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적절한 조립 및 폴딩을 개선시키기 위해, Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 (chaperone) 활성을 갖는 웨티딜프롤린 시스, 트랜스-이소미라제)와 같은 샤페론 단백질을 과발현하는 추가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵 세포를 동시에 형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 세균 숙주 세포에서 생산된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다 (문헌 [Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605]; 조지오 (Georgiou) 등의 미국 특허 6,083,715; 조지오 등의 미국 특허 6,027,888; [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210]).

[0558] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질 분해에 감수성인 단백질)의 단백질 분해를 최소화하기 위해, 단백질 분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주는 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 이들의 조합물과 같은 공지된 세균 프로테아제를 코딩하는 유전자에서 유전자 돌연변이(들)를 수행하도록 변형될 수 있다. 일부 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하며, 예를 들어 문헌 ([Joly et al. (1998), 상기 문헌]; 조지오 등의 미국 특허 5,264,365; 조지오 등의 미국 특허 5,508,192; [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)])에 기재되어 있다.

[0559] 한 실시태양에서, 단백질 분해 효소가 결핍되고 1종 이상의 샤페론 단백질을 과발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로 사용된다.

[0560] 항체 정제

- [0561] 한 실시태양에서, 본원에서 생산된 항체 단백질을 추가의 검정 및 사용을 위해 추가로 정제하여 실질적으로 균질한 제제를 수득한다. 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 다음 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 면역친화도 또는 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱 (chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전법, 및 예를 들어 세파덱스 (Sephadex) G-75를 이용한 겔 여과.
- [0562] 한 측면에서, 고체상 상에 고정된 단백질 A가 본 발명의 항체 생성물의 면역친화도 정제에 사용된다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역에 고 친화도로 결합하는 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)로부터의 41 kD 세포벽 단백질이다 [Lindmark et al., (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]. 단백질 A가 고정되는 고체상은 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 컬럼 또는 제어된 공극 유리 컬럼 또는 규산 컬럼일 수 있다. 일부 용도에서, 컬럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅하여 가능하게는 오염물의 비특이적 부착을 방지한다.
- [0563] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양액으로부터 유래된 제제를 단백질 A가 고정된 고체상에 적용하여 관심 항체가 단백질 A에 특이적으로 결합하게 할 수 있다. 그 후, 고체상을 세척하여 고체상에 비-특이적 결합된 오염물을 제거한다. 최종적으로, 목적하는 항체를 용출에 의해 고체상으로부터 회수한다.
- [0564] 진핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:
- [0565] 진핵 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 일반적으로 다음 중 하나 이상의 비제한적인 성분을 포함한다: 신호 서열, 복제 기점, 1종 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [0566] 신호 서열 성분
- [0567] 진핵 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열, 또는 관심 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 선택된 이종 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱된 (즉, 신호 웨პ티다제에 의해 절단된) 것일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다. 이러한 전구체 영역을 위한 DNA는 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임 (reading frame)으로 라이게이션된다.
- [0568] 복제 기점
- [0569] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 대해서는 필요하지 않다. 예를 들어, SV40 기점이 전형적으로 사용될 수 있는데, 그 이유는 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.
- [0570] 선별 유전자 성분
- [0571] 발현 및 클로닝 벡터는 선별가능한 마커로도 지칭되는 선별 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선별 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암페실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 관련이 있는 경우에는 영양요구성 결핍을 보충하거나, (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양물을 공급하는 단백질을 코딩한다.
- [0572] 선별 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이종 유전자로 성공적으로 형질전환된 상기 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생성하고, 따라서 선별 처리시에도 생존한다. 이러한 우세한 선별의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 이용한다.
- [0573] 포유동물 세포에 적합한 선별가능 마커의 다른 예는 항체 핵산, 예를 들어 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등을 섭취하는데 감응성이 있는 세포의 확인을 가능하게 하는 것이다.
- [0574] 예를 들어, 일부 실시태양에서, DHFR 선별 유전자로 형질전환된 세포는 우선 메토트렉세이트 (Mtx), DHFR의 경쟁적 길항제를 함유하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인할 수 있다. 일부 실시태양에서, 야생형 DHFR을 사용할 때 적합한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.
- [0575] 별법으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질 및 또다른 선별가능 마커, 예를 들어 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환되거나 이것으로 함께 형질전환된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 선별가능 마커에 대한 선별제, 예를 들어 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신, 또는 G418를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선별될 수 있다. 미국 특허

4,965,199를 참조한다.

[0576] 프로모터 성분

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

[0578] 포유동물 숙주 세포 내의 벡터로부터의 전사는 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성일 경우 바이러스, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 조류폭스 바이러스, 아데노바이러스 (예를 들어 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 계놈으로부터, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로부터, 열 충격 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 조절될 수 있다.

[0579] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 또한 SV40 바이러스 복제 기점을 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 얻는다. 인간 사이토메갈로바이러스의 극초기 (immediate early) 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 얻는다. 소 유두종 바이러스를 벡터로서 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 시스템은 미국 특히 4,419,446에 기재되어 있다. 이 시스템의 변형은 미국 특히 4,601,978에 기재되어 있다. 또한, 단순 포진 바이러스로부터 티미딘 키나제 프로모터의 조절하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA를 발현시키는 것에 대해 기재한 문헌 [Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982)]을 참조한다. 별법으로, 라우스 육종 바이러스의 장쇄 말단 반복부가 프로모터로서 사용될 수도 있다.

[0580] 인핸서 요소 성분

[0581] 고등 진핵 세포에 의한 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA의 전사는 종종 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -페토단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 일반적으로 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 그 예는 복제 기점의 하류 (bp 100-270) 쪽의 SV40 인핸서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인핸서 요소를 기재한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 벡터에서 위치 5' 또는 3'에서 항체 폴리펩티드 코딩 서열로 스플라이싱될 수 있지만, 일반적으로 프로모터부터 부위 5'에 위치한다.

[0582] 전사 종결 성분

[0583] 진핵 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열을 함유할 수도 있다. 상기 서열은 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상 얻을 수 있다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 세그먼트를 포함한다. 한 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO 94/11026 및 그에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0584] 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0585] 본원의 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 척추동물 숙주 세포를 비롯하여 본원에 기재된 보다 고등한 진핵 세포를 포함한다. 배양 (조직 배양)시 척추동물 세포의 증식은 일상적인 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인 (현탁 배양으로 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1997)]; 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르툴리 세포 (TM4, [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 경부 암세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 간세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐세포 (W138, ATCC CCL 75), 인간 간세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)];

MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암세포주 (Hep G2)이다.

[0586] 숙주 세포는 항체 생산을 위해 상기한 발현 또는 클로닝 백터를 사용하여 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키는데 적절하게 변형된 통상의 영양 배지에서 배양한다.

숙주 세포의 배양

[0588] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양할 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예를 들어 햄 (Ham) F10 (시그마 (Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 (Dulbecco) 개질 이글 (Eagle) 배지 (DMEM, 시그마)가 숙주 세포를 배양하기에 적합하다. 또한, 문헌 ([Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:225 (1980)], 미국 특허 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985)에 기재된 임의의 배지를 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예를 들어, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예를 들어, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 베퍼 (예를 들어 HEPES), 뉴클레오티드 (예를 들어, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예를 들어, 젠타마이신(GENTAMYCIN)TM 약물), 미량 원소 (보통 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수 보충물이 또한 당업계의 숙련인에게 잘 알려진 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이며, 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

항체의 정제

[0590] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내에서 생산되거나 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산되면, 제1 단계로서, 입자형 파쇄물, 숙주 세포 또는 용해된 단편은 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 상기 발현 시스템으로부터의 상등액을 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 농축할 수 있다. 단백질 분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF가 임의의 선행 단계에서 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.

[0591] 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들어, 히드록실아파티트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화도 크로마토그래피가 편리한 기술이다. 친화도 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 인간 γ1, γ2 또는 γ4 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 [Lindmark et al. J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)]. 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 γ3에 대해 추천된다 [Guss et al. EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)]. 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 아가로스일 수 있지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를 들어 제어된 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠이 아가로스를 사용하여 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유동 속도와 더 짧은 처리 시간을 허용한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABXTM 수지 (제이.티. 베이커 (J.T. Baker), 미국 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들어 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전도 회수되는 항체에 따라 사용될 수 있다.

[0592] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 예를 들어 바람직하게는 낮은 염농도 (예를 들어, 약 0-0.25M 염)에서 수행되는, 약 2.5-4.5의 pH의 용출 베퍼를 사용하는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 추가의 정제 단계에 적용될 수 있다.

[0593] 일반적으로, 연구, 시험 및 임상 용도로 사용하기 위한 항체의 제조를 위한 다양한 방법은 당업계에 널리 확립되어 있으며, 상기한 방법과 일치하고/하거나 특정 관심 항체에 대해 당업자에 의해 적절한 것으로 간주된다.

면역접합체

[0595] 또한, 본 발명은 1종 이상의 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 세균, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 본 발명의 임의의 항-CD22 항체를 포함하는 면역접합체 (상호교환가능하게 "항체-약물 접합체" 또는

"ADC"로 언급됨)를 제공한다.

[0596] 특정 실시태양에서, 면역접합체는 항-CD22 항체 및 화학요법제 또는 다른 독소를 포함한다. 면역접합체 생성에 유용한 화학요법제는 본원에 기재되어 있다 (예를 들어, 상기 참조). 효소 활성 독소 및 그의 단편도 사용될 수 있고, 본원에서 기재된다.

[0597] 특정 실시태양에서, 면역접합체는 항-CD22 항체, 및 소분자 약물, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 오리스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 세포독성 활성을 갖는 상기 약물의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 1종 이상의 소분자 독소를 포함한다. 상기 면역접합체의 예를 아래에서 보다 상세하게 기재한다.

1. 예시적인 면역접합체- 항체-약물 접합체

[0599] 본 발명의 면역접합체 (또는 "항체-약물 접합체" ("ADC"))는 항-CD22 항체가 임의의 링커 (L)를 통해 1개 이상의 약물 모이어티 (D)에 접합된 (즉, 공유 부착된) 하기 화학식 I의 것일 수 있다:

[0600] <화학식 I>

[0601] $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$

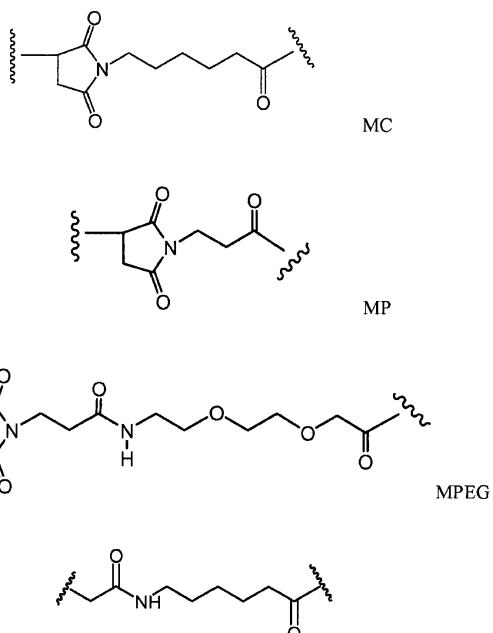
[0602] 따라서, 항-CD22 항체는 약물에 직접 또는 링커를 통해 접합될 수 있다. 화학식 I에서, p는 항체 당 약물 모이어티의 평균 수이고, 예를 들어 항체 당 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티, 특정 실시태양에서는 항체 당 1 내지 약 8개의 약물 모이어티일 수 있다.

예시적인 링커

[0604] 예시적인 링커 및 약물 모이어티가 본원에 개시된다. 링커는 1개 이상의 링커 성분을 포함할 수 있다. 예시적인 링커 성분으로는 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 밸린-시트룰린 ("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-페리딜티오)펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC"), 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트 ("SIAB")를 들 수 있다. 다양한 링커 성분이 당업계에 공지되어 있으며, 그 일부를 아래에서 기재한다.

[0605] 링커는 세포에서 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커 (예를 들어, 히드라준), 프로테아제-감수성 (예를 들어, 웨티다제-감수성) 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디슬피드 함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 5,208,020)를 사용할 수 있다.

[0606] 일부 실시태양에서, 링커 성분은 항체를 다른 링커 성분 또는 약물 모이어티에 연결시키는 "스트레처 (stretcher) 단위"를 포함할 수 있다. 예시적인 스트레처 단위를 아래에 제시한다 (물결선은 항체에 대한 공유 부착 부위를 나타낸다):



[0607]

[0608]

일부 실시태양에서, 링커 성분은 아미노산 단위를 포함할 수 있다. 하나의 상기 실시태양에서, 아미노산 단위는 프로테아제에 의한 링커의 절단을 허용하여, 세포내 프로테아제, 예를 들어 리소좀 효소에 대한 노출시에 면역접합체로부터 약물의 방출을 용이하게 한다 (예를 들어, 문헌 [Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784] 참조). 예시적인 아미노산 단위는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 및 펜타펩티드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 웨პ티드는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe); 페닐알라닌-라이신 (fk 또는 phe-lys); 또는 N-메틸-발린-시트룰린 (Me-val-cit)을 포함한다. 예시적인 트리펩티드는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)을 포함한다. 아미노산 단위는 천연 발생 아미노산 잔기 및 소수 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함할 수 있다. 아미노산 단위는 특정 효소, 예를 들어 종양-관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 그들의 선택성 측면에서 설계되고 최적화될 수 있다.

[0609]

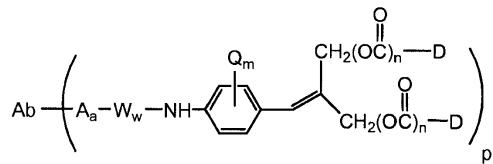
일부 실시태양에서, 링커 성분은 항체를 약물 모이어티에 직접 또는 스트레처 단위 및/또는 아미노산 단위에 의해 연결시키는 "스페이서" 단위를 포함할 수 있다. 스페이서 단위는 "자가 희생적" 또는 "비-자가 희생적"일 수 있다. "비-자가 희생적" 스페이서 단위는 그의 일부 또는 모두가 ADC의 효소적 (예를 들어, 단백질 분해) 절단시에 약물 모이어티에 결합된 상태로 유지되는 단위이다. 비-자가 희생적 스페이서 단위의 예는 글리신 스페이서 단위 및 글리신-글리신 스페이서 단위를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 서열-특이적 효소적 절단에 감수성인 웨პ티드성 스페이서의 다른 조합도 고려된다. 예를 들어, 종양 세포 관련 프로테아제에 의한, 글리신-글리신 스페이서 단위를 함유하는 ADC의 효소적 절단은 ADC의 나머지로부터 글리신-글리신-약물 모이어티의 방출을 야기할 것이다. 하나의 상기 실시태양에서, 글리신-글리신-약물 모이어티는 이어서 종양 세포 내에서 별도의 가수분해 단계를 거치고, 이에 의해 글리신-글리신 스페이서 단위가 약물 모이어티로부터 방출된다.

[0610]

"자가 희생적" 스페이서 단위는 별도의 가수분해 단계를 수행하지 않으면서 약물 모이어티의 방출을 허용한다. 특정 실시태양에서, 링커의 스페이서 단위는 p-아미노벤질 단위를 포함한다. 하나의 상기 실시태양에서, p-아미노벤질 알콜은 아미드 결합을 통해 아미노산 단위에 부착되고, 카르바메이트, 메틸카르바메이트, 또는 카르보네이트가 벤질 알콜과 세포독성제 사이에 형성된다. 예를 들어, 문헌 [Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103]을 참조한다. 한 실시태양에서, 스페이서 단위는 p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB)이다. 특정 실시태양에서, p-아미노 벤질 단위의 페닐렌 부분은 Q_m으로 치환되고, 여기서 Q는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이다. 자가 희생적 스페이서 단위의 예는 p-아미노벤질 알콜에 전기적으로 유사한 방향족 화합물 (예를 들어, US 2005/0256030 A1 참조), 예를 들어 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 [Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237] 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세탈을 추가로 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 아미드 결합 가수분해시에 고리화되는 스페이서, 예를 들어 치환 및 비치환된 4-아미노부티르산 아미드 [Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223]; 적절하게 치환된 비시클로[2.2.1] 및 비시클로[2.2.2] 고리계 [Storm, et al., J. Amer. Chem.

Soc., 1972, 94, 5815]; 및 2-아미노페닐프로파온산 아미드 [Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867]가 사용될 수 있다. 글리신의 a-위치에서 치환된 아민-함유 약물의 제거 [Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447]도 ADC에 유용한 자가 희생적 스페이서의 예이다.

[0611] 한 실시태양에서, 스페이서 단위는 아래에 제시된 분지쇄 비스(히드록시메틸)스티렌 (BHMS) 단위이고, 이것은 다수의 약물을 도입하고 방출시키는데 사용될 수 있다:



효소적
절단

2 약물

[0612]

[0613] 여기서, Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이고, n은 0 또는 1이고; p는 1 내지 약 20이다.

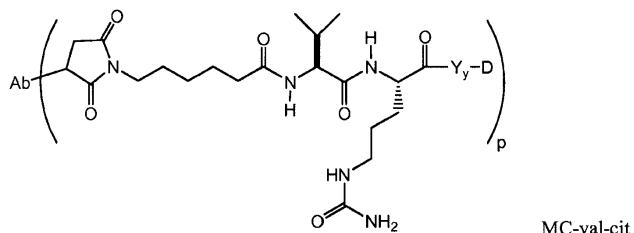
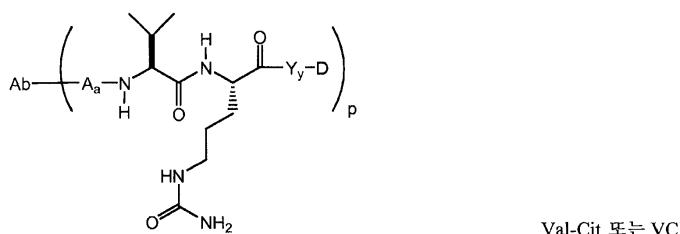
[0614] 링커는 임의의 1종 이상의 상기 링커 성분을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 링커는 하기 화학식 II에서 각 괄호 내에 제시된다:

[0615] <화학식 II>

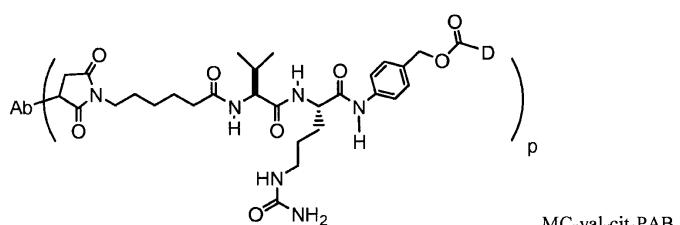
[0616] $Ab-([Aa-Ww-Yy]-D)_p$

[0617] 여기서, A는 스트레처 단위이고, a는 0 내지 1의 정수이고; W는 아미노산 단위이고; w는 0 내지 12의 정수이고; Y는 스페이서 단위이고, y는 0, 1, 또는 2이고; Ab, D, 및 p는 상기 화학식 I에서 정의된 바와 같다. 상기 링커의 예시적인 실시태양은 본원에 참고로 포함되는 US 20050238649 A1에 기재되어 있다.

[0618] 예시적인 링커 성분 및 그의 조합물은 화학식 II의 ADC와 관련하여 아래에 제시된다:



[0619]



[0620]

[0621] 스트레처, 스페이서 및 아미노산 단위를 포함하는 링커 성분은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 US 2005-0238649 A1에 기재된 방법에 의해 합성될 수 있다.

[0622] 예시적인 약물 모이어티

[0623] 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0624] 일부 실시태양에서, 면역접합체는 1개 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다. 메이탄시노이드는 튜불린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)에서 처음 단리되었다 (미국 특허 3,896,111). 뒤이어, 특정 미생물도 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 밝혀졌다 (미국 특허 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0625] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화로 제조하는데 비교적 이용가능하고, (ii) 비-디슬피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체-약물 접합체에서 매력적인 약물 모이어티이다.

[0626] 메이탄시노이드 약물 모이어티로서 사용하기 적합한 메이탄신 화합물은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 방법에 따라 천연 공급원으로부터 단리되거나 유전자 조작 기술을 사용하여 생산할 수 있다 ([Yu et al., (2002) PNAS 99:7968-7973] 참조). 또한, 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체는 공지된 방법에 의해 합성 방식으로 제조될 수 있다.

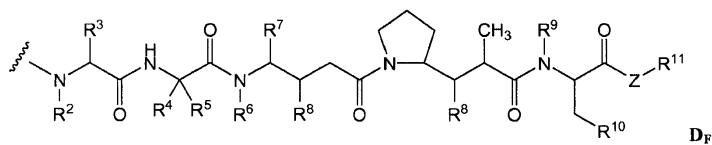
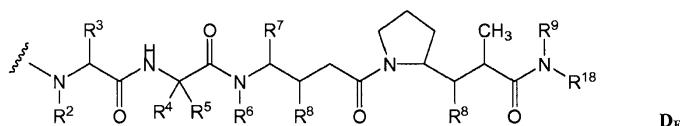
[0627] 메이탄시노이드 약물 모이어티의 예시적인 실시태양은 본원에 개시한 바와 같은 DM1, DM3 및 DM4를 포함한다.

[0628] 오리스타틴 및 돌라스타틴

[0629] 일부 실시태양에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 웨티드성 유사체 및 유도체, 예를 들어 오리스타틴에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국 특허 5635483; 5780588). 돌라스타틴 및 오리스타틴은 미세관역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 [Woyke et al., (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584], 항암 (미국 특허 5663149) 및 항진균 활성 [Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965]을 갖는 것으로 나타났다. 돌라스타틴 또는 오리스타틴 약물 모이어티는 웨티드성 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0630] 예시적인 오리스타틴 실시태양은 그 개시내용의 전문을 명백하게 본원에 참고로 포함시킨 문헌 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004]에 개시된 N-말단 연결된 모노메틸오리스타틴 약물 모이어티 D_E 및 D_F를 포함한다.

[0631] 웨티드성 약물 모이어티는 하기 화학식 D_E 및 D_F 중에서 선택될 수 있다:



[0632]

[0633] 여기서, D_E 및 D_F의 물결선은 독립적으로 각각의 위치에서 항체 또는 항체-링커 성분에 대한 공유 부착 부위를 나타내고;

- [0634] R^2 는 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;
- [0635] R^3 은 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카르보사이클), C_3-C_8 헤테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤테로사이클)로부터 선택되고;
- [0636] R^4 는 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카르보사이클), C_3-C_8 헤�테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤�테로사이클)로부터 선택되고;
- [0637] R^5 는 H 및 메틸로부터 선택되거나;
- [0638] 또는 R^4 및 R^5 는 함께 화학식 $-(CR^aR^b)_n$ -의 카르보시클릭 고리를 형성하고, 여기서 R^a 및 R^b 는 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬 및 C_3-C_8 카르보사이클로부터 선택되고, n은 2, 3, 4, 5 및 6으로부터 선택되고;
- [0639] R^6 은 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;
- [0640] R^7 은 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카르보사이클), C_3-C_8 헤�테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤�테로사이클)로부터 선택되고;
- [0641] 각각의 R^8 은 독립적으로 H, OH, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클 및 O-(C_1-C_8 알킬)로부터 선택되고;
- [0642] R^9 는 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;
- [0643] R^{10} 은 아릴 또는 C_3-C_8 헤�테로사이클로부터 선택되고;
- [0644] Z는 O, S, NH, 또는 NR¹²이고, 여기서 R¹²는 C_1-C_8 알킬이고;
- [0645] R^{11} 은 H, C_1-C_{20} 알킬, 아릴, C_3-C_8 헤�테로사이클, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ 로부터 선택되고;
- [0646] m은 1-1000의 정수이고;
- [0647] R¹³은 C_2-C_8 알킬이고;
- [0648] R¹⁴는 H 또는 C_1-C_8 알킬이고;
- [0649] 각각의 R¹⁵은 독립적으로 H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, 또는 $-(CH_2)_nSO_3-C_1-C_8$ 알킬이고;
- [0650] 각각의 R¹⁶은 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬, 또는 $-(CH_2)_n-COOH$ 이고;
- [0651] R¹⁸은 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-\alpha$ 릴, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 헤테로사이클), 및 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 카르보사이클)로부터 선택되고;
- [0652] n은 0 내지 6의 정수이다.
- [0653] 한 실시태양에서, R³, R⁴ 및 R⁷은 독립적으로 이소프로필 또는 sec-부틸이고, R⁵는 -H 또는 메틸이다. 예시적인 실시태양에서, R³ 및 R⁴는 각각 이소프로필이고, R⁵는 -H이고, R⁷은 sec-부틸이다.
- [0654] 또 다른 실시태양에서, R² 및 R⁶은 각각 메틸이고, R⁹는 -H이다.
- [0655] 또 다른 실시태양에서, 각각의 R⁸은 $-OCH_3$ 이다.

[0656] 예시적인 실시태양에서, R³ 및 R⁴은 각각 이소프로필이고, R² 및 R⁶은 각각 메틸이고, R⁵는 -H이고, R⁷은 sec-부틸이고, 각각의 R⁸은 -OCH₃이고, R⁹는 -H이다.

[0657] 한 실시태양에서, Z는 -O- 또는 -NH-이다.

[0658] 한 실시태양에서, R¹⁰은 아릴이다.

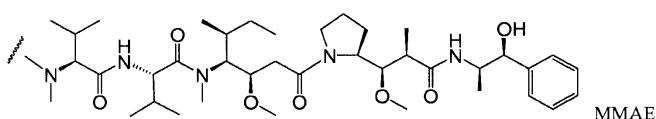
[0659] 예시적인 실시태양에서, R¹⁰은 -페닐이다.

[0660] 예시적인 실시태양에서, Z가 -O-일 때, R¹¹은 -H, 메틸 또는 t-부틸이다.

[0661] 한 실시태양에서, Z가 -NH일 때, R¹¹은 -CH(R¹⁵)₂이고, 여기서 R¹⁵는 -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂이고, R¹⁶은 -C₁-C₈ 알킬 또는 -(CH₂)_n-COOH이다.

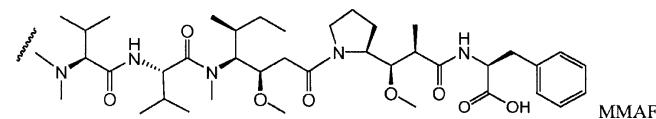
[0662] 다른 실시태양에서, Z가 -NH일 때, R¹¹은 -CH(R¹⁵)₂이고, 여기서 R¹⁵는 -(CH₂)_n-SO₃H이다.

[0663] 화학식 D_E의 예시적인 오리스타틴 실시태양은 MMAE이고, 물결선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 부착을 나타낸다:



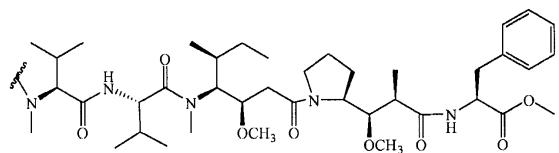
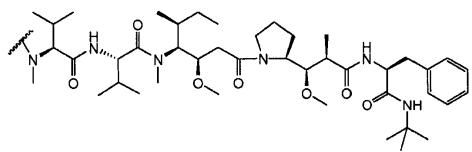
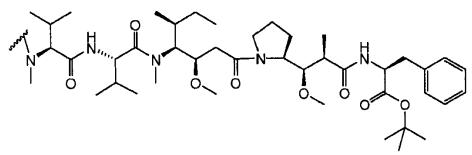
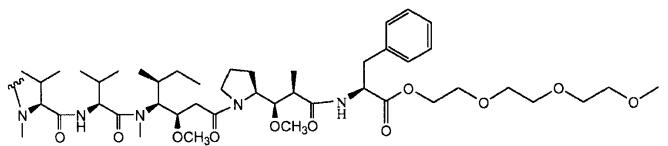
[0664]

[0665] 화학식 D_F의 예시적인 오리스타틴 실시태양은 MMAF이고, 물결선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 부착을 나타낸다 (US 2005/0238649 및 문헌 [Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124] 참조):

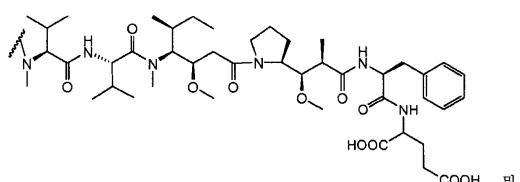
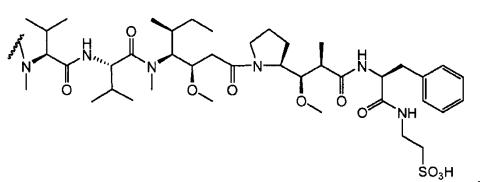
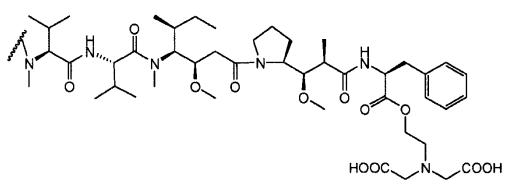
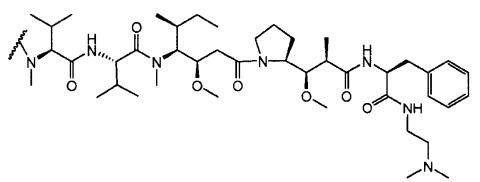


[0666]

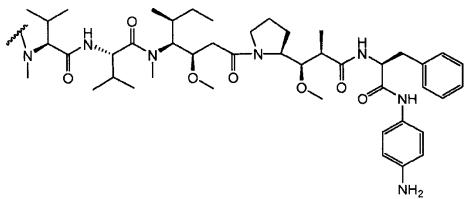
[0667] 다른 약물 모이어티는 하기 MMAF 유도체를 포함하고, 물결선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 부착을 나타낸다:



[0668]



[0669]

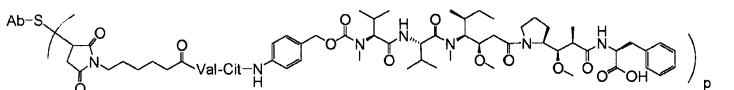


[0670]

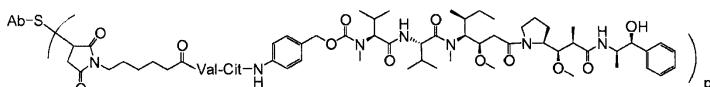
[0671] 한 측면에서, 상기 제시한 바와 같은 트리에틸렌 글리콜 에스테르 (TEG)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 친수 성기가 R¹¹에서 약물 모이어티에 부착될 수 있다. 임의의 특정 이론에 매이지 않지만, 친수성기는 약물 모이어티의 내재화 및 응집 방지를 돋는다.

[0672]

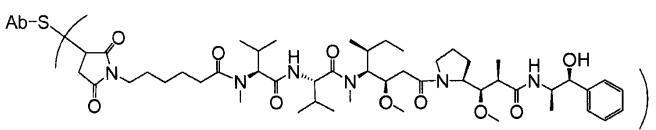
오리스타틴/돌라스타틴 또는 그의 유도체를 포함하는 화학식 I의 ADC의 예시적인 실시태양은 본원에 참고로 명백하게 포함되는 US 2005-0238649 A1 및 문헌 [Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124]에 기재되어 있다. MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 화학식 I의 ADC의 예시적인 실시태양은 하기 구조 및 약어를 갖는다 (여기서, "Ab"는 항체이고; p는 1 내지 약 8이고, "Val-Cit"는 발린-시트룰린 디펩티드이고; "S"는 황 원자이다):



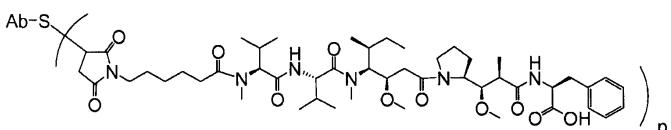
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

[0673]

[0675] MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 화학식 I의 ADC의 예시적인 실시태양은 Ab-MC-PAB-MMAF 및 Ab-PAB-MMAF를 추가로 포함한다. 흥미롭게도, 단백질 분해에 의해 절단가능하지 않은 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체는 단백질 분해에 의해 절단가능한 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체에 상응하는 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124]을 참조한다. 이 경우에, 약물 방출은 세포 내에서 항체 분해에 의해 이루어지는 것으로 생각된다 (상기 문헌 참조).

[0676]

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

784])의 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0677] 특히, 화학식 D_F의 오리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티, 예를 들어 MMAF 및 그의 유도체는 US 2005-0238649 A1 및 문헌 [Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. D_E의 오리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티, 예를 들어 MMAE 및 그의 유도체는 문헌 [Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 약물-링커 모이어티 MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, 및 MC-vc-PAB-MMAE는 예를 들어 문헌 [Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784], 및 미국 특허 출원 공개 US 2005/0238649 A1에 기재된 바와 같은 통상적인 방법으로 편리하게 합성한 후, 관심 항체에 접합될 수 있다.

약물 로딩

[0679] 약물 로딩은 화학식 I의 분자에서 항체 당 약물 모이어티의 평균 수인 p에 의해 제시된다. 약물 로딩은 항체 당 1 내지 20개의 약물 모이어티 (D)일 수 있다. 화학식 I의 ADC는 1 내지 20개의 약물 모이어티로 접합된 항체의 접합체를 포함한다. 접합 반응에 의한 ADC의 제조에서 항체 당 약물 모이어티의 평균 수는 통상적인 수단, 예를 들어 질량 분광분석, ELISA 분석, 및 HPLC에 의해 특정규명될 수 있다. 또한, ADC의 정량적 분포는 p의 측면에서 결정될 수도 있다. 일부 경우에, p가 다른 약물 로딩을 사용한 ADC로부터의 특정 값인 균질한 ADC의 분리, 정제 및 특정규명은 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성할 수 있다.

[0680] 일부 항체-약물 접합체에서, p는 항체 상의 부착 부위의 수에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 상기 예시적인 실시태양에서와 같이 부착이 시스테인 티올인 경우, 항체는 단지 한개 또는 수개의 시스테인 티올기를 가질 수 있거나, 또는 링커가 부착될 수 있는, 충분히 반응성인 티올기를 단지 한개 또는 수개 보유할 수 있다. 특정 실시태양에서, 보다 큰 약물 로딩, 예를 들어 p>5는 특정 항체-약물 접합체의 응집, 불용성, 독성, 또는 세포 투과성 상실을 야기할 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 ADC에 대한 약물 로딩은 1 내지 약 8; 약 2 내지 약 6, 약 3 내지 약 5, 약 3 내지 약 4, 약 3.1 내지 약 3.9, 약 3.2 내지 약 3.8, 약 3.2 내지 약 3.7, 약 3.2 내지 약 3.6, 약 3.3 내지 약 3.8 또는 약 3.3 내지 약 3.7이다. 실제로, 특정 ADC에서, 항체 당 약물 모이어티의 최적 비는 8 미만일 수 있고, 약 2 내지 약 5일 수 있음이 밝혀졌다. US 2005-0238649 A1을 참조한다 (상기 문헌은 본원에 그 전문이 참고로 포함됨).

[0681] 특정 실시태양에서, 이론적 최대치 미만의 약물 모이어티가 접합 반응 동안 항체에 접합된다. 항체는 예를 들어 아래에서 논의되는 바와 같이 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하지 않는 라이신 잔기를 포함할 수 있다. 가장 반응성인 라이신기만이 아민-반응성 링커 시약과 반응할 수 있다. 일반적으로, 항체는 약물 모이어티에 연결될 수 있는 많은 유리 및 반응성 시스테인 티올기를 함유하지 않고, 실제로 항체 내의 대부분의 시스테인 티올 잔기가 디슬퍼드 브릿지로 존재한다. 특정 실시태양에서, 항체는 부분 또는 완전한 환원 조건에서 환원체, 예를 들어 디티오톤레이톨 (DTT) 또는 트리카르보닐에틸포스핀 (TCEP)으로 환원시켜 반응성 시스테인 티올기를 생성시킬 수 있다. 특정 실시태양에서, 항체는 변성 조건에 적용되어 반응성 친핵기, 예를 들어 라이신 또는 시스테인을 드러내게 된다.

[0682] ADC의 로딩 (약물/항체 비)은 여러가지 방식, 예를 들어 (i) 항체에 비해 몰 과량의 약물-링커 중간체 또는 링커 시약의 제한, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도의 제한, 및 (iii) 시스테인 티올 변형에 대한 부분 또는 제한 환원 조건, (iv) 시스테인 잔기의 수와 위치가 링커-약물 부착의 수 및/또는 위치의 조절을 위해 변형되도록 하는, 재조합 기술에 의한 항체의 아미노산 서열의 조작 (예를 들어 본원 및 WO 2006/034488 (본원에서 그 전문이 참고로 포함됨)에 개시한 바와 같이 제조된 thioMab 또는 thioFab)에 의해 조절될 수 있다.

[0683] 1개 초과의 친핵기가 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과, 이어서 약물 모이어티 시약과 반응할 경우, 생성되는 산물은 항체에 1개 이상의 약물 모이어티가 부착된 분포를 갖는 ADC 화합물의 혼합물임을 이해하여야 한다. 항체 당 약물의 평균 수는 항체에 특이적이고 약물에 특이적인 이중 ELISA 항체 검정에 의해 혼합물로부터 계산될 수 있다. 개개의 ADC 분자는 질량 분광분석에 의해 혼합물에서 확인되고, 예를 들어 소수성 상호작용 크로마토 그래피에 의한 HPLC로 분리될 수 있다 (예를 들어, 문헌 ([Hamblett, K. J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004]; [Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004] 참조). 특정 실시태양에서,

단일 로딩 값을 갖는 균질 ADC는 전기영동 또는 크로마토그래피에 의해 접합 혼합물로부터 단리될 수 있다.

[0684] 면역접합체를 제조하는 특정 방법

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

항체 상의 친핵기는 (i) N-말단 아민기; (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 라이신; (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인; 및 (iv) 당 히드록실 또는 아미노기 (여기서, 항체는 글리코실화된다)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들어 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들어 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 사슬간 디슬피드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 항체가 완전히 또는 부분적으로 환원되도록, 항체를 환원제, 예를 들어 DTT (디티오프레이톨) 또는 트리카르보닐에틸포스핀 (TCEP)로 처리함으로써 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 브릿지는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 별법으로, 라이신 잔기의 변형을 통해, 예를 들어 아민을 티올로 전환시키는, 라이신 잔기와 2-아미노티올란 (트라우트 (Traut) 시약)의 반응에 의해 슬피드릴기를 항체 내로 도입할 수 있다. 반응성 티올기는 1, 2, 3, 4개, 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 1개 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 변이체 항체를 제조함으로써) 항체 내로 도입될 수 있다.

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

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

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

다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티올)프로파오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디프이미레이트 HC1), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루

엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체가 또한 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소를 문헌 [Vitetta et al., Science. 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 키레이팅제이다. WO 94/11026을 참조한다.

[0691] 별법으로, 항체와 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 웨პ티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 재조합 DNA 분자는 접합체의 목적하는 특성을 파괴하지 않는 링커 웨პ티드를 코딩하는 영역에 의해 분리되거나 또는 서로 인접해 있는 접합체의 항체 및 세포독성 부분을 코딩하는 영역을 포함할 수 있다.

[0692] 또 다른 실시태양에서, 항체를 종양 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (예를 들어, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 이러한 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 소실제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

2. 예시적인 면역접합체 - 티오-항체 약물 접합체

시스테인 조작된 항-CD22 항체의 제조

[0693] 본 발명의 시스테인 조작된 항-CD22 항체 및 모 항-CD22 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 DNA는 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 부위-지정 (또는 올리고뉴클레오티드-매개된) 돌연변이 유발에 의한 제조 ([Carter (1985) et al., Nucleic Acids Res. 13:4431-4443]; [Ho et al., (1989) Gene (Amst.) 77:51-59]; [Kunkel et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488]; [Liu et al., (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260]), PCR 돌연변이 유발 ([Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press]; [Ito et al., (1991) Gene 102:67-70]; [Bernhard et al., (1994) Bioconjugate Chem. 5: 126-132] 및 [Vallette et al., (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733]), 및 폴리웨პ티드를 코딩하는 미리 제조된 DNA 카세트 돌연변이 유발 (Wells et al., (1985) Gene 34:315-323)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 방법에 의해 제조된다. 돌연변이 유발 프로토콜, 키트, 및 시약은 상업적으로 이용 가능하고, 예를 들어 QuikChange(등록상표) 다중 부위 지정 돌연변이 유발 키트 (스트라타젠 (Stratagene), 미국 캘리포니아주 라 졸라)가 존재한다. 또한, 단일 돌연변이는 PCR 기반 돌연변이 유발에 의해 주형으로서 이중 가닥 플라스미드 DNA를 사용하는 올리고뉴클레오티드 유도 돌연변이 유발에 의해서 생성된다 ([Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition]; [Zoller et al., (1983) Methods Enzymol. 100:468-500]; [Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500]). 또한, 재조합 항체의 변이체는 제한 단편 조작에 의해 또는 합성 올리고뉴클레오티드를 사용한 중복 연장 (overlap extension) PCR에 의해서도 제조할 수 있다. 돌연변이 유발 프라이머는 시스테인 코돈 치환 (들)을 코딩한다. 표준 돌연변이 생성 기술을 사용하여 상기 돌연변이체 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA를 생성시킬 수 있다 ([Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989] 및 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N. Y., 1993]).

[0694] 파지 디스플레이 기술 (McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-553)을 사용하여, 항-CD22 인간 항체 및 항체 단편을 비면역화된 공여자로부터의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 래퍼토리로부터 시험관내에서 생산 할 수 있다. 상기 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자는 필라멘트형 박테리오파지, 예를 들어 M13 또는 fd의 주 또는 부 외피 단백질 유전자 내로 인-프레임을 클로닝되고, 파지 입자의 표면 상에 기능성 항체 단편으로서 디스플레이된다. 필라멘트형 입자는 파지 계놈의 단일 가닥 DNA 카페를 포함하고, 항체의 기능적 특성을 기초로 한 선택은 상기 특성을 보이는 항체를 코딩하는 유전자를 선택하는 것이다. 따라서, 파지는 B-세포의 특성의 일부를 모방한다 ([Johnson et al., (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571]; [Clackson et al., (1991) Nature, 352:624-628]; [Marks et al., (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597]; Griffith et al., (1993) EMBO J. 12:725-734]; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275).

[0695] 항-CD22 항체는 공자의 올리고웨პ티드 합성 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있거나, 재조합 기술을 사용하여 제조하고 정제할 수 있다. 적절한 아미노산 서열, 또는 그의 일부는 고상 기술을 사용하여 직접 웨პ티드 합성에 의해 생산할 수 있다 ([Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA]; [Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154]). 시험관내 단백질 합성은 수동 기술을 사용하여 또는 자동화에 의해 수행할 수 있다. 자동화 고체상 합성은 예를 들어 t-BOC 또는 Fmoc 보호

된 아미노산을 사용하고 어플라이드 바이오시스템즈 펩티드 합성기를 제조사의 지시에 따라 이용하여 달성할 수 있다. 항-CD22 항체 또는 CD22 폴리펩티드의 상이한 부분을 별개로 화학적으로 합성하고, 화학적 또는 효소적 방법에 의해 조합하여 목적하는 항-CD22 항체 또는 CD22 폴리펩티드를 생산할 수 있다.

[0698] 항체 단편을 생산하기 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 상기 단편은 무손상 항체의 단백질 분해 소화를 통해 유도되거나 ([Morimoto et al., (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117] 및 [Brennan et al., (1985) Science, 229:81]), 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산되었다. Fab, Fv 및 ScFv 항-CD22 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되고 이로부터 분비되어 다량의 상기 단편을 쉽게 생산할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의한 바와 같이 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있거나 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)), 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접 단리될 수 있다. 항-CD22 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)일 수 있다 (WO 93/16185; 미국 특허 5,571,894; 및 미국 특허 5,587,458). 항-CD22 항체 단편은 또한 "선형 항체" (미국 특허 5,641,870)일 수 있다. 상기 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0699] 하기 기재는 주로 항-CD22 항체-코딩 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 세포를 배양함으로써 항-CD22 항체를 생산하는 것에 관한 것이다. 항-CD22 항체를 코딩하는 DNA는 항-CD22 항체 mRNA를 보유하고 이를 검출가능한 수준으로 발현하는 것으로 생각되는 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 따라서, 인간 항-CD22 항체 또는 CD22 폴리펩티드 DNA는 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 편리하게 얻을 수 있다. 또한, 항-CD22 항체-코딩 유전자는 게놈 라이브러리로부터 얻을 수 있거나 또는 공지의 합성 과정 (예를 들어, 자동 핵산 합성)에 의해 제조할 수 있다.

[0700] 본 발명의 설계, 선택 및 제조 방법에 의해 친전자성 관능기와 반응성인 시스테인 조작된 항-CD22 항체를 얻을 수 있다. 상기 방법을 통해, 지정 및 설계된 선택적인 부위에 약물 분자를 갖는 항체 접합체 화합물을, 예를 들어 항체-약물 접합체 (ADC) 화합물을 추가로 얻을 수 있다. 항체 표면 상의 반응성 시스테인 잔기는 티올 반응기, 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통한 약물 모이어티의 특이적인 접합을 허용한다. Cys 잔기의 티올 관능기의 말레이미드기에 대한 친핵 반응성은 단백질 내의 임의의 다른 아미노산 관능기, 예를 들어 라이신 잔기의 아미노기 또는 N-말단 아미노기에 비해 약 1000배 더 크다. 요오도아세틸 및 말레이미드 시약 내의 티올 특이적 관능기는 아민기와 반응할 수 있지만, 보다 높은 pH (>9.0) 및 보다 긴 반응 시간이 필요하다 (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London). 단백질 내의 유리 티올의 양은 표준 엘만 (Ellman) 분석에 의해 추정할 수 있다. 면역글로불린 M은 디슬피드-연결 펜타머의 예이고, 면역글로불린 G는 함께 서브유닛을 연결하는 내부 디슬피드 브릿지를 갖는 단백질의 예이다. 이와 같은 단백질에서, 반응성 유리 티올을 생성시키기 위해 시약, 예를 들어 디티오프레이톨 (DTT) 또는 셀레놀을 사용한 환원 (Singh et al., (2002) Anal. Biochem. 304: 147-156)이 필요하다. 상기 방법은 항체 3차 구조 및 항원 결합 특이성을 상실시킬 수 있다.

[0701] 페셀렉터 (Pheselector) (반응성 티올의 선택을 위한 파지 ELISA) 분석을 통해 ELISA 파지 포맷으로 항체 내의 반응성 시스테인기를 검출하고, 이에 의해 시스테인 조작된 항체의 설계를 도울 수 있다 (WO 2006/034488). 시스테인 조작된 항체를 웰 표면에 코팅한 후, 파지 입자와 함께 인큐베이션하고, HRP 표지된 2차 항체를 부가하고, 흡광도를 검출한다. 파지 상에 디스플레이된 돌연변이체 단백질은 신속하고 강력한 고효율 방식으로 스크리닝될 수 있다. 시스테인 조작된 항체의 라이브러리를 제조하여, 항체 또는 다른 단백질의 무작위 단백질-파지 라이브러리로부터 유리 Cys 통합을 위한 적절하게 반응성인 부위를 확인하기 위한 것과 동일한 방법을 사용하여 결합에 대해 선택할 수 있다. 상기 기술은 파지 상에 디스플레이된 시스테인 돌연변이체 단백질을 또한 티올-반응성인 친화도 시약 또는 리포터기와 반응시키는 것을 포함한다.

[0702] 페셀렉터 분석은 항체 내의 반응성 티올기의 스크리닝을 허용한다. 이 방법에 의한 A121C 변이체의 확인은 예시적인 것이다. 전체 Fab 분자는 반응성 티올기를 갖는 보다 많은 ThioFab 변이체를 확인하기 위해 효과적으로 검색될 수 있다. 분획별 표면 접근성 (fractional surface accessibility) 파라미터를 사용하여 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기에 대한 용매의 접근성을 확인 및 정량하였다. 표면 접근성은 용매 분자, 예를 들어 물에 의해 접촉될 수 있는 표면적 (Å^2)으로서 표현될 수 있다. 물의 점유 공간은 1.4 Å^2 반경 구체와 비슷하다. 소프트웨어는 x-선 결정학으로 유도된 공지의 좌표를 사용하여 단백질의 각각의 아미노산의 표면 접근성을 계산하기 위한 알고리즘을 이용하는 결정학 프로그램의 CCP4 Suite로서 무료로 이용할 수 있거나 허가를 받아 사용할 수 있다 (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44)

1925 603825, 또는 인터넷 웹 사이트 www CCP4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763). 표면 접근성 계산을 수행하는 두개의 예시적인 소프트웨어 모듈은 문헌 [B. Lee and F. M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400]의 알고리즘을 기초로 한 "AREAIMOL" 및 "SURFACE"이다. AREAIMOL은 단백질의 용매 접근가능한 표면을 프로브 구 (용매 분자를 나타냄) 중심의 궤적으로서 정의하는데, 이것이 단백질의 판 데르 발스 (Van der Waals) 표면을 굴러다니기 때문이다. AREAIMOL은 (원자 반경과 프로브 반경의 합과 동일한, 원자 중심에서의 거리에서) 각 원자 주위의 연장된 구 상에 표면 지점을 생성하고 이웃하는 원자들과 회합된 동등한 구 내에 있는 것들을 제거하여 용매 접근가능한 표면적을 계산한다. AREAIMOL은 PDB 좌표 파일에서 원자의 용매 접근가능한 면적을 찾아내고, 상기 접근가능한 면적을 잔기, 사슬에 의해 전체 분자에 대해 총괄한다. 개개의 원자에 대하여 접근가능한 면적 (또는 면적 차이)은 슈도-PDB 아웃풋 (pseudo-PDB output) 파일에 기록될 수 있다. AREAIMOL은 각 원소에 대한 단일 반경을 추정하고, 오직 제한된 수의 상이한 원소들만을 인식한다.

[0703] AREAIMOL 및 SURFACE는 절대적 접근성, 즉 평방 옹스트롬(Å)의 수를 보고한다. 분획별 표면 접근성은 폴리펩티드 내 아미노산과 관련이 있는 표준 상태를 참조하여 계산된다. 참조 상태는 트리펩티드 Gly-X-Gly이며, 여기서 X는 목적하는 아미노산이고, 참조 상태는 '연장된' 형상, 즉, 베타-가닥으로 존재하는 것과 같아야 한다. 연장된 형상은 X의 접근성을 최대화한다. 접근가능한 면적의 계산치를 Gly-X-Gly 트리펩티드 참조 상태 내의 접근가능한 면적으로 나누고 그 몫을 보고하는데, 이것이 분획별 접근성이다. 접근성(%)은 분획별 접근용이성 × 100의 값이다. 표면 접근성 계산을 위한 또다른 예시적 알고리즘은, 물 구체에 대한 아미노산 잔기의 분획별 접근용이성을 그 폴리펩티드의 X선 좌표를 기초로 하여 계산하는 프로그램 xsae의 SOLV 모듈을 기초로 한다 [Broger, C, F. Hoffman-LaRoche, Basel]. 항체 내의 모든 아미노산에 대한 분획별 표면 접근성은 이용가능한 결정 구조 정보 [Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995]를 이용하여 계산할 수 있다.

[0704] 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리하여 서열을 결정할 수 있다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 공급원으로 작용한다. DNA가 일단 단리되면, 이것을 발현 벡터에 위치시킬 수 있고, 이후에는 이것을 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 항체 단백질을 달리 생성하지는 않는 다른 포유동물 숙주 세포, 예를 들어 골수 종 세포 [US 5807715, US 2005/0048572, US2004/0229310] 등에 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성물을 얻을 수 있다.

[0705] 설계 및 선택 후에, 조작된, 고도로 반응성이고 쌍을 이루지 않은 Cys 잔기를 갖는 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 ThioFab는, (i) 세균, 예를 들어 이. 콜라이 시스템 ([Skerra et al., (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262]; [Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151-188]) 또는 포유동물 세포 배양 시스템 (WO 01/00245), 예를 들어 차이니스 햄스터 난소 세포 (CHO)에서의 발현, 및 (ii) 통상의 단백질 정제 기술을 이용한 정제 [Lowman et al. (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988]를 통해 생성할 수 있다.

[0706] 조작된 Cys 티올기는 친전자성 링커 시약 및 약물-링커 중간체와 반응하여 시스테인 조작된 항체 약물 접합체 및 다른 표지된 시스테인 조작된 항체를 형성한다. 쌍을 이루어 사슬간 및 사슬내 디슬퍼드 결합을 형성하는 시스테인 조작된 항체의 Cys 잔기 (모 항체에 존재함)는 임의의 반응성 티올기를 갖지 않고 (환원제로 처리되지 않으면), 친전자성 링커 시약 또는 약물-링커 중간체와 반응하지 않는다. 새로이 조작된 Cys 잔기는 쌍을 이루지 않은 채로 유지되어 친전자성 링커 시약 또는 약물-링커 중간체, 예를 들어 약물-말레이미드와 반응, 즉 접합할 수 있다. 예시적인 약물-링커 중간체는 MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE, 및 MC-vc-PAB-MMAF를 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 조작된 Cys 잔기의 구조적 위치는 순차적 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다. 이 순차적 넘버링 시스템은 N-말단에서 출발하는 카바트 넘버링 시스템 [Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD]과 상관관계가 있으며, a, b, c로 표시한 삽입이 카바트 넘버링 방식 (아래쪽 열)과 다르다. 카바트 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 이 내부로의 삽입에 상응하는 더 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 시스테인 조작된 중쇄 변이체 부위는 순차적인 넘버링 및 카바트 넘버링 방식에 의해 확인된다.

[0707] 한 실시태양에서, 시스테인 조작된 항-CD22 항체는

[0708] (a) 모 항-CD22 항체의 1개 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 치환하고;

[0709] (b) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 시약과 반응시켜 시스테인 조작된 항-CD22 항체의 티올 반응성을 결정

하는 것

[0710] 을 포함하는 방법에 의해 제조된다.

[0711] 시스테인 조작된 항체는 모 항체보다 티올-반응성 시약에 대한 반응성이 더 클 수 있다.

[0712] 유리 시스테인 아미노산 잔기는 중쇄 또는 경쇄에, 또는 불변 또는 가변 도메인에 위치할 수 있다. 항체 단편, 예를 들어 Fab도 항체 단편의 아미노산을 치환하는 1개 이상의 시스테인 아미노산으로 조작되어 시스테인 조작된 항체 단편을 형성할 수 있다.

[0713] 본 발명의 다른 실시태양에서는

[0714] (a) 1개 이상의 시스테인 아미노산을 모 항-CD22 항체 내에 도입하여 시스테인 조작된 항-CD22 항체를 생성시키고;

[0715] (b) 시스테인 조작된 항체의 티올-반응성 시약에 대한 티올 반응성을 결정하는 것을 포함하고;

[0716] 여기서, 시스테인 조작된 항체가 모 항체보다 티올-반응성 시약에 대한 반응성이 더 큰 것인, 시스테인 조작된 항-CD22 항체를 제조하는 (만드는) 방법을 제공한다.

[0717] 시스테인 조작된 항체를 제조하는 방법의 단계 (a)는

[0718] (i) 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 핵산 서열의 돌연변이를 유발하고;

[0719] (ii) 시스테인 조작된 항체를 발현시키고;

[0720] (iii) 시스테인 조작된 항체를 단리하고 정제하는 것

[0721] 을 포함할 수 있다.

[0722] 시스테인 조작된 항체를 제조하는 방법의 단계 (b)는 과자 또는 과지미드 입자로부터 선택되는 바이러스 입자상에 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.

[0723] 시스테인 조작된 항체를 제조하는 방법의 단계 (b)는 또한

[0724] (i) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성시키고;

[0725] (ii) 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 포획 매질 (capture media)에 대한 결합을 측정하는 것

[0726] 을 포함할 수 있다.

[0727] 본 발명의 다른 실시태양은

[0728] (a) 1개 이상의 시스테인 아미노산을 모 항체 내로 도입하여 시스테인 조작된 항체를 생성시키고;

[0729] (b) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성시키고;

[0730] (c) 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 포획 매질에 대한 결합을 측정하고;

[0731] (d) 티올-반응성 시약에 대한 시스테인 조작된 항체의 티올 반응성을 결정하는 것

[0732] 을 포함하는, 고도로 반응성이고 쌍을 이루지 않은 시스테인 아미노산을 갖는, 시스테인 조작된 항체를 티올 반응성에 대해 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0733] 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (a)는

[0734] (i) 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 핵산 서열의 돌연변이를 유발하고;

[0735] (ii) 시스테인 조작된 항체를 발현시키고;

[0736] (iii) 시스테인 조작된 항체를 단리하고 정제하는 것

[0737] 을 포함할 수 있다.

[0738] 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (b)는 과자 또는 과지미드 입자로부터 선택되는 바이러스 입

자 상에 시스테인 조작된 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.

[0739] 시스테인 조작된 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (b)는 또한

[0740] (i) 시스테인 조작된 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체를 생성시키고;

[0741] (ii) 친화도 표지된, 시스테인 조작된 항체의 포획 매질에 대한 결합을 측정하는 것

[0742] 을 포함할 수 있다.

항-CD22 10F4 IgG 변이체의 시스테인 조작

[0744] 본원에 기재된 시스테인 조작 방법에 의해 시스테인을 중쇄 118 (EU 넘버링) (순차적인 넘버링의 중쇄 위치 121에 해당) 부위에서 전장, 키메라 모 모노클로날 항-CD22 항체에 도입하였다.

[0745] 모 항체, 즉 "std 항-CD22 Hu 10F4v3 Fc" (중쇄 서열: 서열 88, 경쇄 서열: 서열 87, 도 5B)를 시스테인 조작하여 "A118C 티오 hu 항-CD22 10F4v3" (중쇄 서열: 서열 92, 경쇄 서열: 서열 91, 도 17), "S400C 티오 hu 항-CD22 10F4v3" (중쇄 서열: 서열 93, 경쇄 서열: 서열 91, 도 17), 또는 "V205C 티오 항-CD22 10F4v3" (중쇄 서열: 서열 88, 경쇄 서열: 서열 91, 도 5B 및 17)을 생성시켰다.

[0746] 상기 시스테인 조작된 모노클로날 항체를 1 mM 시스테인을 포함하는 배지에서 일시적 발효에 의해 CHO (차이나스 햄스터 난소) 세포에서 발현시켰다.

표지된 시스테인 조작된 항-CD22 항체

[0748] 시스테인 조작된 항-CD22 항체는 부위-특이적으로 및 효율적으로 티올-반응성 시약과 커플링될 수 있다. 티올-반응성 시약은 다기능성 링커 시약, 포획, 즉 친화도, 표지 시약 (예를 들어 바이오틴-링커 시약), 검출 표지 (예를 들어 형광단 시약), 고체상 고정 시약 (예를 들어 SEPHAROSE™, 폴리스티렌, 또는 유리), 또는 약물-링커 중간체일 수 있다. 티올-반응성 시약의 한예는 N-에틸 말레이미드 (NEM)이다. 예시적인 실시태양에서, ThioFab과 바이오틴-링커 시약의 반응은 조작된 시스테인 잔기의 존재 및 반응성이 그에 의해 검출 및 측정될 수 있는 바이오틴화 ThioFab을 제공한다. ThioFab과 다기능성 링커 시약의 반응은 약물 모이어티 시약 또는 다른 표지와 추가로 반응할 수 있는 관능성 링커를 갖는 ThioFab을 제공한다. ThioFab과 약물-링커 중간체의 반응은 ThioFab 약물 접합체를 제공한다.

[0749] 본원에 기재된 예시적인 방법은 일반적으로 항체의 확인 및 생산에, 및 보다 일반적으로는 본원에서 기재한 설계 및 스크리닝 단계의 적용을 통해 다른 단백질에 적용될 수 있다.

[0750] 상기 방법은 반응성기가 예를 들어 말레이미드, 요오도아세트아미드, 피리딜 디솔피드, 또는 다른 티올-반응성 접합 파트너인 다른 티올-반응성 시약의 접합에 적용될 수 있다 ([Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.]; [Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2]; [Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London]; [Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2]; [Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]). 티올-반응성 시약은 약물 모이어티, 형광단, 예를 들어 플루오레세인 또는 로다민과 같은 형광 염료, 영상화 또는 방사성치료 금속에 대한 질레이팅제, 웨티딜 또는 비-웨티딜 표지 또는 검출 태그, 또는 소실-변형제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜의 다양한 이성질체, 제3 성분에 결합하는 웨티드, 또는 다른 탄수화물 또는 친지질성 물질일 수 있다.

시스테인 조작된 항-CD22 항체의 용도

[0752] 시스테인 조작된 항-CD22 항체, 및 그의 접합체는 치료제 및/또는 진단제로서 사용될 수 있다. 본 발명은 추가로 B-세포 관련 장애와 관련이 있는 하나 이상의 증상의 예방, 관리, 치료 또는 개선 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 세포 증식 장애, 예를 들어 암, 예를 들어 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투층 세포 림프종과 관련이 있는 하나 이상의 증상의 예방, 관리, 치료 또는 개선 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 CD22 관련 장애 또는 상기 장애가 발생할 소인의 진단 방법, 및 B 세포-회합 CD22 폴리펩티드에 우선적으로 결합하는 항체 및 항체의 항원-결합 단편의 확인 방법을 추가로 제공한다.

- [0753] 본 발명의 다른 실시태양은 B 세포 관련 장애에 따른 병태의 치료에 유용한 의약의 제조를 위한 시스테인 조작된 항-CD22 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0754] 시스테인 조작된 항체 약물 접합체 (티오-항체 약물 접합체)
- [0755] 본 발명의 다른 측면은 시스테인 조작된 항-CD22 항체 (Ab), 및 오리스타틴 약물 모이어티 (D)를 포함하는 하기 화학식 I의 항체-약물 접합체 화합물이고, 여기서 시스테인 조작된 항체는 링커 모이어티 (L)에 의해 1개 이상의 유리 시스테인 아미노산을 통해 D에 부착된다.
- [0756] <화학식 I>
- [0757] $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$
- [0758] 여기서, p는 1, 2, 3, 또는 4이고; 시스테인 조작된 항체는 모 항-CD22 항체의 1개 이상의 아미노산 잔기를 1개 이상의 유리 시스테인 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조된다.
- [0759] 도 10은 오리스타틴 약물 모이어티가 경쇄 (LC-ADC); 중쇄 (HC-ADC); 및 Fc 영역 (Fc-ADC) 내의 조작된 시스테인기에 부착된, 시스테인 조작된 항-CD22 항체 약물 접합체 (ADC)의 실시태양을 보여준다.
- [0760] 시스테인 조작된 항-CD22 항체 약물 접합체의 잠재적인 잇점은 개선된 안전성 (보다 큰 치료 지수), 개선된 PK 파라미터, 접합체를 안정화시키고 그의 활성 결합 입체형태를 유지시킬 수 있는 항체 사슬간 디슬피드 결합, 잘 규정된 약물 접합의 부위, 및 시스테인 조작된 항체를 약물-링커 시약에 접합시켜 얻은 시스테인 조작된 항체 약물 접합체에 의한 균질한 생성물 확보를 포함한다.
- [0761] 링커
- [0762] "링커", "링커 단위", 또는 "결합하다"는 항체를 약물 모이어티에 공유 부착시키는 공유 결합 또는 원자의 사슬을 포함하는 화학적 모이어티를 의미한다. 상이한 실시태양에서, 링커는 L로 표시된다. "링커" (L)은 1개 이상의 약물 모이어티 (D) 및 항체 단위 (Ab)를 연결하여 화학식 I의 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성할 수 있는 이기능성 또는 다기능성 모이어티이다. 항체-약물 접합체 (ADC)는 약물 및 항체에 결합하기 위한 반응성 관능기를 갖는 링커를 사용하여 편리하게 제조할 수 있다. 시스테인 조작된 항체 (Ab)의 시스테인 티올은 링커 시약의 친전자성 관능기, 약물 모이어티 또는 약물-링커 중간체와 결합을 형성할 수 있다.
- [0763] 한 측면에서, 링커는 항체 상에 존재하는 친핵 시스테인에 반응성인 친전자성 기를 갖는 반응성 부위를 갖는다. 항체의 시스테인 티올은 링커 상의 친전자성 기와 반응성이고, 링커에 대한 공유 결합을 형성한다. 유용한 친전자성 기는 말레이이미드 및 할로아세트아미드기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0764] 링커는 알킬디일, 아릴렌, 헤데로아릴렌과 같은 2가 리디칼, 알킬옥시의 반복 단위 $-(\text{CR}_2)_n\text{O}(\text{CR}_2)_n-$ (예를 들어, 폴리에틸레녹시, PEG, 폴리메틸레녹시), 및 알킬아미노 (예를 들어, 폴리에틸렌아미노, 제프아민™)와 같은 모이어티; 및 숙시네이트, 숙신아미드, 디글리콜레이트, 말로네이트, 및 카프로아미드를 포함하는 이산 에스테르 및 아미드를 포함한다.
- [0765] 시스테인 조작된 항체는 문헌 [Klussman, et al., (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773]의 766 페이지의 접합 방법, 및 실시예 x의 프로토콜에 따라 링커 시약 또는 약물-링커 중간체, 친전자성 관능기, 예를 들어 말레이이미드 또는 α -할로 카르보닐과 반응한다.
- [0766] 링커는 1종 이상의 링커 성분으로 이루어질 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이이미도카프로일 ("MC"), 말레이이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe" 또는 "af"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-페리딜티오)펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC"), N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트 ("SIAB"), 1개 이상의 반복 단위로서의 에틸렌옥시 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ("EO" 또는 "PEO")를 포함한다. 추가의 링커 성분이 당업계에 공지되어 있으며, 그 일부가 본원에 기재되어 있다.
- [0767] 한 실시태양에서, ADC의 링커 L은 하기 식으로 표시된다:
- [0768] $-\text{A}_a-\text{W}_w-\text{Y}_y-$
- [0769] 상기 식에서,

[0770] -A-는 항체 (Ab)의 시스테인 티올에 공유 부착된 스트레처 단위이고;

[0771] a는 0 또는 1이고;

[0772] 각각의 W는 독립적으로 아미노산 단위이고;

[0773] w는 독립적으로 0 내지 12의 정수이고;

[0774] -Y-는 약물 모이어티에 공유 부착된 스페이서 단위이고,

[0775] y는 0, 1, 또는 2이다.

스트레처 단위

[0777] 스트레처 단위 (-A-)는 존재하는 경우, 항체 단위를 아미노산 단위 (-W-)에 연결시킬 수 있다. 이와 관련하여, 항체 (Ab)는 스트레처의 관능기와 결합을 형성할 수 있는 관능기를 갖는다. 자연적으로 또는 화학적 조작을 통해 항체 상에 존재할 수 있는 유용한 관능기는 술프히드릴 (-SH), 아미노, 히드록실, 카르복시, 탄수화물의 아노머 히드록실기, 및 카르복실을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 측면에서, 항체 관능기는 술프히드릴 또는 아미노이다. 술피드릴기는 항체의 분자내 디술피드 결합의 환원에 의해 생성될 수 있다. 별법으로, 술피드릴기는 2-이미노티울란 (트라우트 시약) 또는 다른 술프히드릴 생성 시약을 사용하여 항체의 라이신 모이어티의 아미노기의 반응에 의해 생성시킬 수 있다. 한 실시태양에서, 항체 (Ab)는 스트레처 단위의 친전자성 관능기와 결합을 형성할 수 있는 유리 시스테인 티올기를 갖는다. 화학식 I 접합체에서 예시적인 스트레처 단위는 화학식 II 및 III에 도시하였으며, 여기서 Ab-, -W-, -Y-, -D, w 및 y는 상기에서 정의된 바와 같고, R¹⁷은 (CH₂)_r, -C₃-C₈ 카르보시클릴, -O-(CH₂)_r, 아릴렌, (CH₂)_r-아릴렌-, -아릴렌-(CH₂)_r-, (CH₂)_r-(C₃-C₈ 카르보시클릴), -(C₃-C₈ 카르보시클릴)-(CH₂)_r, -C₃-C₈ 헤테로시클릴, (CH₂)_r-(C₃-C₈ 헤테로시클릴), -(C₃-C₈ 헤�테로시클릴)-(CH₂)_r, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, 및 -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-로부터 선택되는 2가 라디칼이고; 여기서 R^b는 H, C₁-C₆ 알킬, 폐닐, 또는 벤질이고; r은 독립적으로 1-10 범위의 정수이다.

[0778] 아릴렌은 방향족 고리계로부터 2개의 수소 원자를 제거함으로써 유도된 6-20개 탄소 원자의 2가 방향족 탄화수소 라디칼이 포함한다. 전형적 아릴렌기에는 벤젠, 치환된 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 비페닐 등으로부터 유래된 라디칼이 포함되고, 이로 제한되지 않는다.

[0779] 헤테로시클릴기는 1개 이상의 고리 원자가 헤테로원자, 예를 들어 질소, 산소, 및 황인 고리계를 포함한다. 헤테로사이클 라디칼은 탄소 원자 1 내지 20개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개를 포함한다. 헤테로사이클은 3 내지 7원의 모노사이클 (탄소 원자 2 내지 6개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개)일 수 있거나, 또는 7 내지 10원의 비사이클 (탄소 원자 4 내지 9개 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 헤테로원자 1 내지 3개), 예를 들어 비사이클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템일 수 있다. 헤테로사이클은 문헌 ([Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), 특히 제1장, 제3장, 제4장, 제6장, 제7장, 및 제9장]; ["The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), 특히 제13권, 제14권, 제16권, 제19권, 및 제28권] 및 [J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566]에 기재되어 있다.

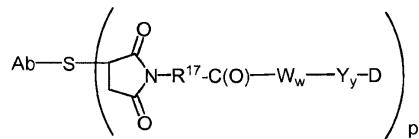
[0780] 헤테로사이클의 예는 피리딜, 디히드로피리딜, 테트라히드로피리딜 (피페리딜), 티아졸릴, 테트라히드로티오페닐, 황 산화 테트라히드로티오페닐, 피리미디닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 테트라졸릴, 벤조푸라닐, 티아나프탈레닐, 인돌릴, 인돌레닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 2-피롤리도닐, 피롤리닐, 테트라히드로푸라닐, 비스-테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 비스-테트라히드로피라닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 데카히드로퀴놀리닐, 옥타히드로이소퀴놀리닐, 아조시닐, 트리아지닐, 6H-1,2,5-티아디아지닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐, 티에닐, 티안트레닐, 피라닐, 이소벤조푸라닐, 크로메닐, 크산테닐, 폐녹사티닐, 2H-피롤릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 1H-인다졸릴, 푸리닐, 4H-퀴놀리지닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 시놀리닐, 프테리디닐, 4Ah-카르바졸릴, 카르바졸릴, β-카르볼리닐, 폐난트리디닐, 아크리디닐, 피리미디닐, 폐난트롤리닐, 폐나지닐, 폐노티아지닐, 푸라자닐, 폐녹사지닐, 이소크로

마닐, 크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피페라지닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 퀴누클리디닐, 모르풀리닐, 옥사졸리디닐, 벤조트리아졸릴, 벤즈이속사졸릴, 옥신돌릴, 벤족사졸리닐, 및 이사티노일을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0781] 카르보시클릴기는 모노사이클로서 탄소 원자 3 내지 7개 또는 비사이클로서 탄소 원자 7 내지 12개를 갖는 포화 또는 불포화 고리를 포함한다. 모노시클릭 카르보사이클은 고리 원자 3 내지 6개, 보다 통상적으로는 고리 원자 5 또는 6개를 갖는다. 비시클릭 카르보사이클은 예를 들어 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 고리 원자 7 내지 12개, 비시클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로 배열된 고리 원자 9 또는 10개를 갖는다. 모노시클릭 카르보사이클의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 1-시클로펜트-1-에닐, 1-시클로펜트-2-에닐, 1-시클로펜트-3-에닐, 시클로헥실, 1-시클로헥스-1-에닐, 1-시클로헥스-2-에닐, 1-시클로헥스-3-에닐, 시클로헵틸, 및 시클로옥틸을 포함한다.

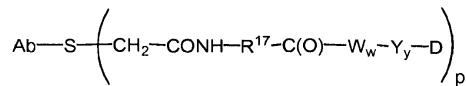
[0782] 명확하게 도시되지 않은 경우에도 조작된 시스테인 잔기의 수에 따라 1 내지 4개의 약물 모이어티가 항체 ($p = 1\text{-}4$)에 연결됨을, 화학식 I ADC, 예를 들어 II-VI의 모든 예시적인 실시태양으로부터 이해하여야 한다.

[0783] <화학식 II>



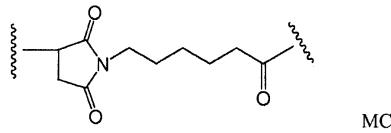
[0784]

<화학식 III>



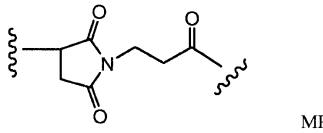
[0785]

화학식 II의 예시적인 스트레처 단위는 R^{17} 이 $-(CH_2)_5-$ 인 말레이미도-카프로일 (MC)로부터 유도된다:



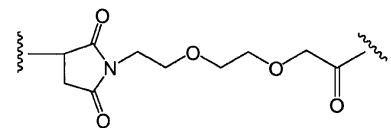
[0786]

화학식 II의 예시적인 스트레처 단위는 R^{17} 이 $-(CH_2)_2-$ 인 말레이미도-프로파노일 (MP)로부터 유도된다:



[0787]

화학식 II의 예시적인 다른 스트레처 단위는 R^{17} 이 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 이고 r 이 2인 화학식 II의 단위이다:



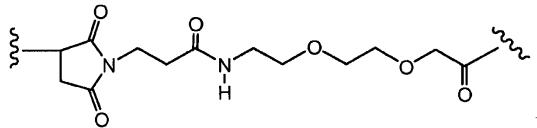
[0788]

화학식 II의 예시적인 다른 스트레처 단위는 R^{17} 이 $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 이고 R^b 가 H이고 각각의 r 이 2인 화학식 II의 단위이다:



[0789]

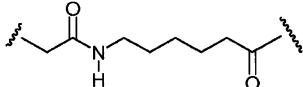
화학식 II의 예시적인 다른 스트레처 단위는 R^{17} 이 $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 이고 R^b 가 H이고 각각의 r 이 2인 화학식 II의 단위이다:



MPEG

[0794]

[0795] 화학식 III의 예시적인 스트레처 단위는 R^{17} 이 $-(CH_2)_5$ -인 화학식 III의 단위이다:

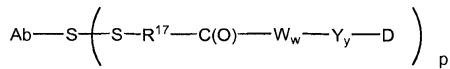


[0796]

[0797] 다른 실시태양에서, 스트레처 단위는 항체의 조작된 시스테인 황 원자와 스트레처 단위의 황 원자 간의 디술피드 결합을 통해 시스테인 조작된 항-CD22 항체에 연결된다. 이 실시태양의 대표적인 스트레처 단위는 하기 화학식 IV에 도시하였으며, 여기서 R^{17} , Ab-, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다:

[0798]

<화학식 IV>

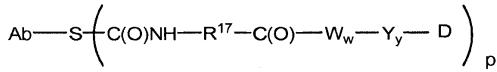


[0799]

[0800] 또 다른 실시태양에서, 스트레처의 반응기는 항체의 유리 시스테인 티올과 결합을 형성할 수 있는 티올-반응성 관능기를 함유한다. 티올-반응성 관능기의 예에는 말레이미드, α -할로아세틸, 활성화된 에스테르, 예를 들어 숙신이미드 에스테르, 4-니트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 무수물, 산 클로라이드, 솔포닐 클로라이드, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트가 포함되고, 이로 제한되지 않는다. 이 실시태양의 대표적인 스트레처 단위는 하기 화학식 Va 및 Vb에 도시하였으며, 여기서 $-R^{17}-$, Ab-, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w 및 y는 상기 정의된 바와 같다:

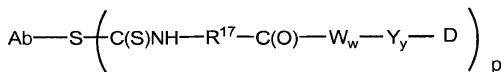
[0801]

<화학식 Va>



[0802]

<화학식 Vb>



[0803]

[0804]

[0805] 또 다른 실시태양에서, 링커는 1개 초파의 약물 모이어티를 분자화 다기능 링커 모이어티를 통해 항체에 공유 부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 ([Sun et al., (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al., (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]; [King (2002) Tetrahedron Letters 43: 1987-1990]). 수지상 링커는 ADC의 효능과 관계가 있는 약물 대 항체의 몰비, 즉 로드를 증가시킬 수 있다. 따라서, 시스테인 조작된 항체가 단지 1개의 반응성 시스테인 티올기를 보유하고 있는 경우에는, 다수의 약물 모이어티를 수지상 링커를 통하여 부착시킬 수 있다.

[0806]

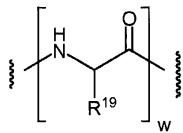
아미노산 단위

[0807]

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

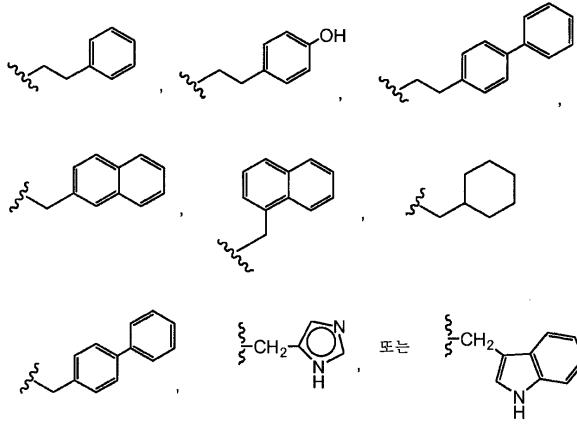
[0808]

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



[0809]

상기 식에서, R^{19} 는 수소, 메틸, 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸, 벤질, p-히드록시벤질, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-페리딜메틸-, 3-페리딜메틸-, 4-페리딜메틸-, 페닐, 시클로헥실,



이다.

[0811]

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

[0812]

예시적인 $-W_w-$ 아미노산 단위에는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드가 포함된다. 예시적인 디펩티드에는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)이 포함된다. 예시적인 트리펩티드에는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)이 포함된다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 천연 발생 아미노산 잔기 및 소수의 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함한다.

[0813]

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

[0814]

스페이서 단위

[0815]

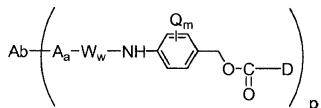
존재하는 경우 ($y = 1$ 또는 2) 스페이서 단위 ($-Y_y-$)는 아미노산 단위가 존재할 때 ($w = 1-12$) 아미노산 단위 ($-W_w-$)를 약물 모이어티 (D)에 연결시킨다. 별법으로, 스페이서 단위는 아미노산 단위가 존재하지 않을 때 스트레처 단위를 약물 모이어티에 연결시킨다. 아미노산 단위와 스트레처 단위가 모두 존재하지 않을 때 ($w, y = 0$), 스페이서 단위도 약물 모이어티를 항체 단위에 연결시킨다. 스페이서 단위는 자가 회생적 (self-immolative) 및 비-자가 회생적의 두 종류가 존재한다. 비-자가 회생적 스페이서 단위는 항체-약물 접합체 또는 약물 모이어티-링커로부터 아미노산 단위의 절단, 특히 효소적 절단 후에 일부 또는 모든 스페이서 단위가 약물 모이어티에 결합된 상태로 유지되는 단위이다. 글리신-글리신 스페이서 단위 또는 글리신 스페이서 단위를 포함하는 ADC가 종양 세포 관련 프로테아제, 암 세포 관련 프로테아제 또는 림프구 관련 프로테아제를 통한 효소적 절단을 거칠 경우, 글리신-글리신-약물 모이어티 또는 글리신-약물 모이어티는 $Ab-A_a-W_w-$ 로부터 절단된다. 한 실시태양에서, 독립적인 가수분해 반응은 표적 세포 내에서 발생하고, 글리신-약물 모이어티 결합을 절단하여 약물을 방출시킨다.

[0816] 다른 실시태양에서, $-Y_y-$ 는 그의 폐닐렌 부분이 Q_m 으로 치환된 p-아미노벤질카르바모일 (PAB) 단위이고, 여기서 Q 는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m 은 0-4의 정수이다.

[0817] 비-자가 희생적 스페이서 단위 ($-Y-$)의 예시적인 실시태양은 $-Gly-Gly-$; $-Gly-$; $-Ala-Phe-$; $-Val-Cit-$ 이다.

[0818] 한 실시태양에서, 스페이서 단위가 존재하지 않는 ($y=0$) 약물 모이어티-링커 또는 ADC 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물이 제공된다.

[0819] 별법으로, 자가 희생적 스페이서 단위를 포함하는 ADC는 $-D$ 를 방출할 수 있다. 한 실시태양에서, $-Y-$ 는 PAB기의 아미노 질소 원자를 통해 $-W_w-$ 에 연결되고 카르보네이트, 카르바메이트 또는 에테르기를 통해 $-D$ 에 직접 연결된 PAB기이고, 여기서 ADC는 다음과 같은 예시적인 구조를 갖는다:

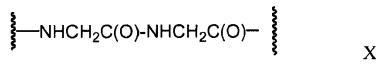
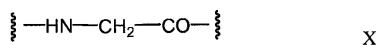
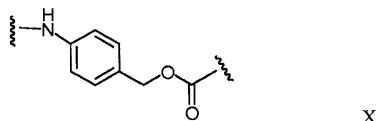


[0820]

[0821] 여기서, Q 는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8$ 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노이고; m 은 0-4의 정수이고, p 는 1 내지 4이다.

[0822] 자가 희생적 스페이서의 다른 예는 PAB기에 전기적으로 유사한 방향족 화합물, 예를 들어 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (Hay et al., (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), 헤테로시클릭 PAB 유사체 (US 2005/0256030), 베타-글루쿠로나이드 (WO 2007/011968), 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세탈을 추가로 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 아미드 결합 가수분해시에 고리화를 겪는 스페이서, 예를 들어 치환 및 비치환된 4-아미노부티르산 아미드 [Rodrigues et al., (1995) Chemistry Biology 2:223]; 적절하게 치환된 비시클로[2.2.1] 및 비시클로[2.2.2] 고리계 [Storm et al., (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815]; 및 2-아미노페닐프로페온산 아미드 [Amsberry, et al., (1990) J. Org. Chem. 55:5867]가 사용될 수 있다. 글리신에서 치환된 아민-함유 약물의 제거 (Kingsbury et al., (1984) J. Med. Chem. 27:1447)도 ADC에 유용한 자가 희생적 스페이서의 예이다.

[0823] 예시적인 스페이서 단위 ($-Y_y-$)는 하기 화학식 X-XII에 제시한다.



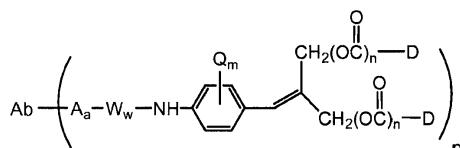
[0824]

수지상 링커

[0825] 다른 실시태양에서, 링커 L은 1개 초파의 약물 모이어티를 분자화 다기능성 링커 모이어티를 통해 항체에 공유부착시키기 위한 수지상 유형의 링커일 수 있다 ([Sun et al., (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215]; [Sun et al., (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768]). 수지상 링커는 ADC의 효능과 관계가 있는 약물 대 항체의 몰비, 즉 로드를 증가시킬 수 있다. 따라서, 시스테인 조작된 항체가 단지 1개의 반응성 시스테인 티올기를 보유하고 있는 경우에는, 다수의 약물 모이어티를 수지상 링커를 통하여 부착시킬 수 있다. 분자형 수지상 링커의 예시적인 실시태양은 2,6-비스(히드록시메틸)-p-크레졸 및 2,4,6-트리스(히드록시메틸)-페놀 텐드리머 단위를 포함한다 (WO 2004/01993; [Szalai et al., (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125: 15688-15689]; [Shamis et al., (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731]; [Amir et al., (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499]).

[0827] 한 실시태양에서, 스페이서 단위는 2-(4-아미노벤질리텐)프로판-1,3-디올 텐드리머 단위 (WO 2004/043493; [de Groot et al., (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494])를 포함하는, 아래에 제시된 구조의 분자체 비스

(히드록시메틸)스티렌 (BHMS)이고, 이것은 다수의 약물을 도입하고 방출시키는데 사용될 수 있다.

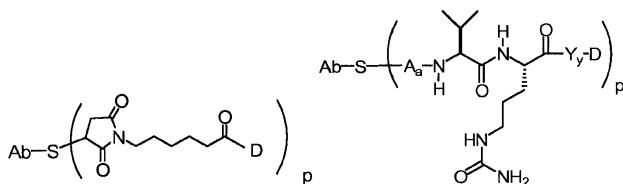


[0828]

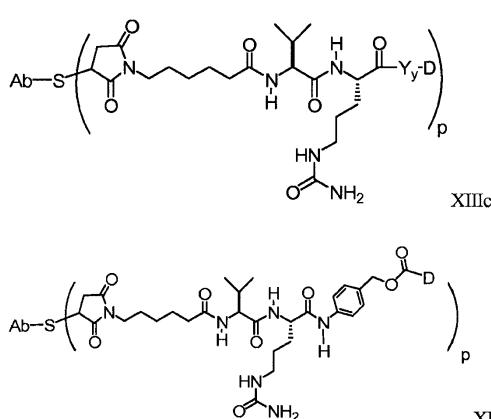
[0829] 여기서, Q는 $-\text{C}_1\text{--C}_8$ 알킬, $-\text{O}-(\text{C}_1\text{--C}_8$ 알킬), $-\text{할로겐}$, $-\text{니트로}$ 또는 $-\text{시아노}$ 이고; w 은 0-4의 정수이고, n 은 0 또는 1이고; p 는 1 내지 4이다.

[0830]

화학식 I의 항체-약물 접합체 화합물의 예시적인 실시태양은 화학식 XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit), 및 XIIId (MC-val-cit-PAB)의 화합물을 포함한다:

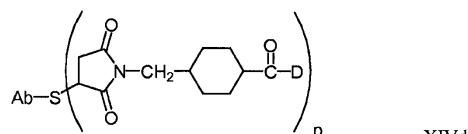
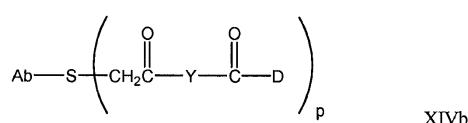
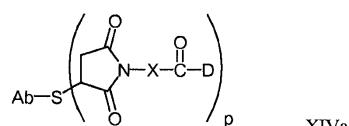


[0831]

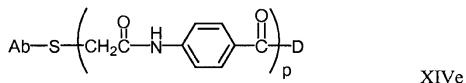


[0832]

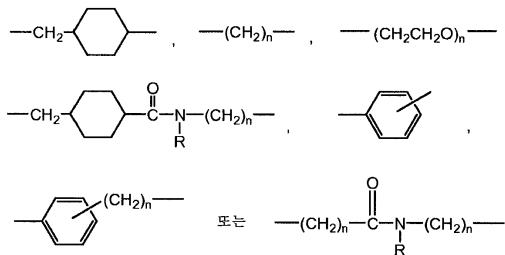
[0833] 화학식 Ia의 항체-약물 접합체 화합물의 다른 예시적인 실시태양은 화학식 XIVa-e의 화합물을 포함한다:



[0834]



[0835]



[0836] 여기서, X는 이고,

[0837] Y는 이고,

[0838] R은 독립적으로 H 또는 C₁-C₆ 알킬이고; n은 1 내지 12이다.

[0839] 또 다른 실시태양에서, 링커는 항체 상에 존재하는 친전자성 기에 반응성인 친핵기를 갖는 반응성 관능기를 갖는다. 항체 상의 유용한 친전자성 기는 알데히드 및 케톤 카르보닐기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 링커의 친핵기의 혜택으로 원자는 항체 상의 친전자성 기와 반응하여 항체 단위에 공유 결합을 형성할 수 있다. 링커 상의 유용한 친핵기는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카르바준, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 항체 상의 친전자성 기는 링커에 대한 편리한 부착 부위를 제시한다.

[0840] 일반적으로, 펩티드-타입 링커는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이에 펩티드 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 상기 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 공지된 액상 합성 방법 (E. Schroeder and K. Luebke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press)에 따라 제조할 수 있다. 링커 중간체는 스페이서, 스트레쳐 및 아미노산 단위를 포함하여 임의의 조합물 또는 반응 서열과 회합될 수 있다. 스페이서, 스트레쳐 및 아미노산 단위는 특성상 친전자성, 친핵성, 또는 유리 라디칼인 반응성 관능기를 이용할 수 있다. 반응성 관능기는 카르복실, 히드록실, 파라-니트로페닐카르보네이트, 이소티오시아네이트, 및 이탈기, 예를 들어 O-메칠, O-토실, -Cl, -Br, -I; 또는 말레이미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

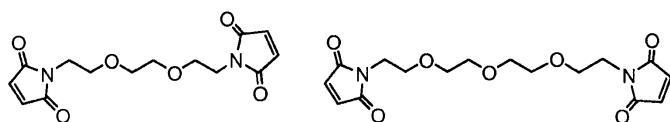
[0841] 또 다른 실시태양에서, 링커는 용해도 또는 반응성을 조정하는 기로 치환될 수 있다. 예를 들어, 하전된 치환체, 예를 들어 술포네이트 (-SO₃⁻) 또는 암모늄은 시약의 수용성을 증가시키고, 링커 시약과 항체 또는 약물 모이어티의 커플링 반응을 용이하게 하거나, 또는 ADC 제조에 사용되는 합성 경로에 따라 Ab-L (항체-링커 중간체)과 D, 또는 D-L (약물-링커 중간체)과 Ab의 커플링 반응을 용이하게 할 수 있다.

링커 시약

[0843] 항체 및 오리스타틴의 접합체는 다양한 이기능성 링커 시약, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-파리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이기능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디페미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예를 들어 디숙신 이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어 틀루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디나트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다.

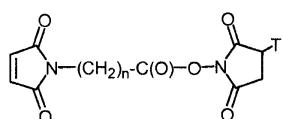
[0844] 또한, 항체 약물 접합체는 링커 시약, 즉 BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트), 및 비스-말레이미드 시약, 즉 DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)₃, 및 BM(PEO)₄ (피어스 바이오테크놀로지, 인크. (Customer Service Department, P. O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723, International +815-968-0747)로부터 시판됨)을 사용하여 제조할 수 있다. 비스-말레이미드 시약은 시스테인 조작된 항체의 티올기를 순차적 또는 동시 방식으로, 티올-

함유 약물 모이어티, 표지 또는 링커 중간체에 부착시킬 수 있게 해준다. 시스테인 조작된 항체의 티올기, 약물 모이어티, 표지, 또는 링커 중간체와 반응성인, 말레이미드 이외의 기타 관능기는 요오도아세트아미드, 브로모아세트아미드, 비닐 피리딘, 디솔피드, 피리딜 디솔피드, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함한다:

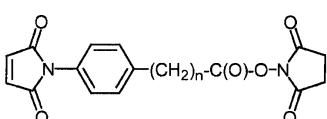
[0845] BM(PEO)₃BM(PEO)₄

[0846] 또한, 유용한 링커 시약은 다른 공급처, 예를 들어 몰레큘라 바이오사언시스 인크. (Molecular Biosciences Inc., 미국 콜로라도 보울더)로부터 입수할 수 있거나, 또는 문헌 ([Toki et al., (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872]; [Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355]; [Frisch et al., (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186]; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; 및 WO 04/032828)에 기재된 절차에 따라 합성될 수 있다.

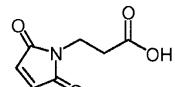
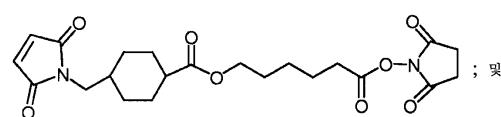
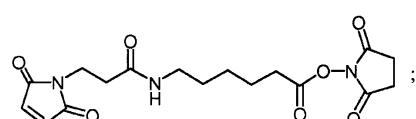
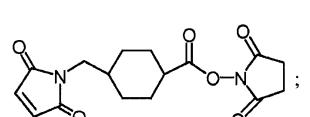
[0847] 화학식 IIIa의 스트레쳐는 하기 링커 시약을 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커에 도입시킬 수 있다:



[0848] (여기서, n은 1-10의 정수이고, T는 -H 또는 $-SO_3Na$ 이다),

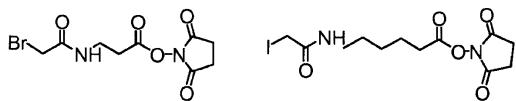
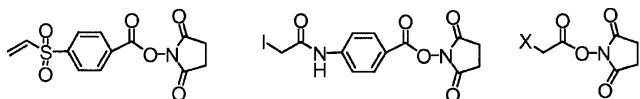


[0849] (여기서, n은 0-3의 정수이다),



[0852]

[0853] 스트레쳐 단위는 하기 이기능성 시약을 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커에 도입시킬 수 있다:

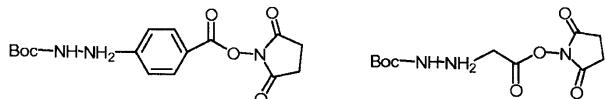
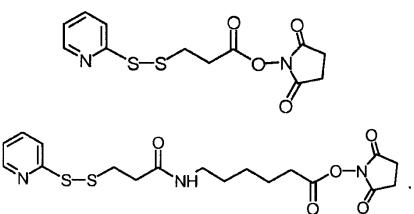


[0854]

[0855] 여기서, X는 Br 또는 I이다.

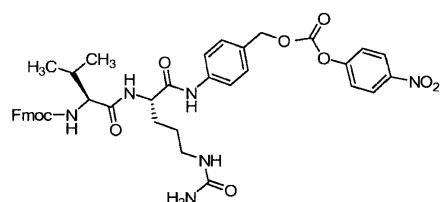
[0856]

또한, 스트레쳐 단위는 하기 이기능성 시약을 아미노산 단위의 N-말단과 반응시킴으로써 링커에 도입시킬 수 있다:



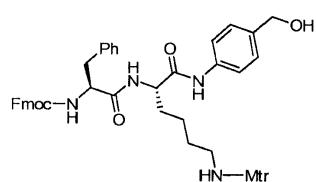
[0857]

[0858] 말레이이미드 스트레쳐 및 파라-아미노벤질카르바모일 (PAB) 자가 회생적 스페이서를 갖는 예시적인 발린-시트롤린 (val-cit 또는 vc) 디펩티드 링커 시약은 다음 구조를 갖는다:



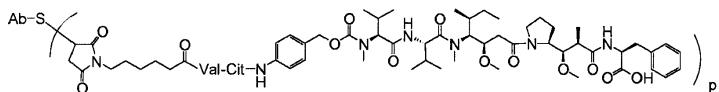
[0859]

[0860] 말레이이미드 스트레쳐 단위 및 PAB 자가 회생적 스페이서 단위를 갖는 예시적인 phe-lys (Mtr, 모노-4-페록시트리틸) 디펩티드 링커 시약은 문헌 [Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60]에 따라 제조할 수 있고, 다음 구조를 갖는다:

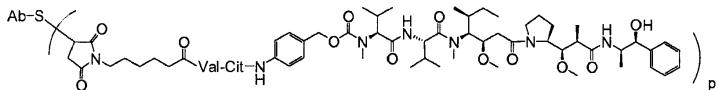


[0861]

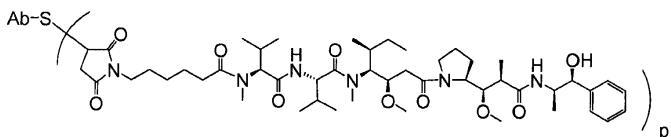
[0862] 본 발명의 예시적인 항체-약물 접합체 화합물은 다음을 포함한다:



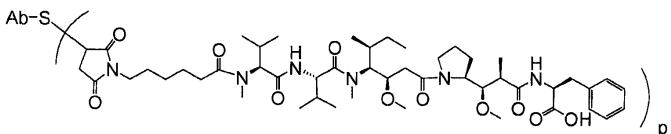
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

[0863]

[0864] 여기서, Val은 발린이고; Cit는 시트룰린이고; p는 1, 2, 3, 또는 4이고; Ab는 시스테인 조작된 항-CD22 항체이다.

[0865]

시스테인 조작된 항-CD22 항체-약물 접합체의 제조

[0866]

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

[0867]

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

[0868]

시스테인 조작된 항체는 환원제, 예컨대 DTT (클레란드 (Cleland) 시약, 디티오프레이톨) 또는 TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염산염; (Getz et al., (1999) Anal. Biochem. Vol 273: 73-80); 솔텍 벤쳐스 (Soltec Ventures, 미국 메릴랜드주 베벌리))로 처리한 후, 재산화에 의해 사슬간 및 사슬내 디술피드 결합을 재형성시킴으로써 (실시예 x), 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 할 수 있다. 예를 들어, CHO 세포에서 별현

되는 전장 시스테인 조작된 모노클로날 항체 (ThioMab)는 약 50배 과량의 TCEP로 3시간 동안 37 °C에서 환원시켜 새롭게 도입된 시스테인 잔기와 배양 배지에 존재하는 시스테인 사이에 형성될 수 있는 시스테인 애덕트 내의 디슬피드 결합을 환원시켰다. 환원된 ThioMab을 희석하고, 10 mM 아세트산나트륨 (pH 5) 중의 HiTrap S 칼럼 상에 로딩하고, 0.3M 염화나트륨을 함유한 PBS로 용리하였다. 디슬피드 결합은 모 Mab에 존재하는 시스테인 잔기와 희석한 (200 nM) 수성 황산구리 (CuSO_4) 간에 실온에서 밤새 재학립될 수 있다. 별법으로, 데히드로아스코르브산 (DHAA)이 시스테인 애덕트의 환원 절단 후에 시스테인 조작된 항체의 사슬내 디슬피드기를 재학립하는데 효과적인 산화제이다. 당업계에 공지된 기타 산화제, 즉 산화 제제, 및 산화 조건이 사용될 수 있다. 주위 공기 산화도 효과적이다. 이 약한 부분 재산화 단계는 높은 정확도로 사슬내 디슬피드를 효율적으로 형성하고, 새로 도입된 시스테인 잔기의 티울기를 유지시킨다. 대략 10배 과량의 약물-링커 중간체, 예를 들어 MC-vc-PAB-MMAE를 첨가하고, 혼합하고, 약 1시간 동안 실온에서 정치하여 접합시키고 10F4v3 항-CD22 항체-약물 접합체를 형성하였다. 접합체 혼합물을 젤 여과하고, 로딩하고, HiTrap S 칼럼을 통해 용리하여 과량의 약물-링커 중간체 및 다른 불순물을 제거하였다.

[0869]

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

[0870]

스크리닝 방법

[0871]

본 발명의 또 다른 실시태양은 샘플을 CD22 폴리펩티드에 결합하는 시스테인 조작된 항-CD22 항체, 또는 그의 항체 약물 접합체에 노출시키고, 샘플 내의 CD22 폴리펩티드에 대한 시스테인 조작된 항-CD22 항체 또는 그의 항체 약물 접합체의 결합을 결정하는 것을 포함하고, 여기서, 상기 결합의 존재는 샘플 내에 CD22 폴리펩티드가 존재함을 나타내는 것인, CD22 폴리펩티드를 함유하는 것으로 의심되는 샘플 내에서 CD22 폴리펩티드의 존재를 결정하는 방법에 관한 것이다. 임의로, 샘플은 CD22 폴리펩티드를 발현하는 것으로 의심되는 세포 (암 세포일 수 있음)를 포함할 수 있다. 방법에 사용되는 시스테인 조작된 항-CD22 항체, 또는 그의 항체 약물 접합체는 임의로, 예를 들어 검출가능하게 표지되거나, 고체 지지체에 부착될 수 있다.

[0872]

본 발명의 다른 실시태양은 (a) 포유동물로부터 얻은 조직 세포를 포함하는 시험 샘플을 CD22 폴리펩티드에 결합하는 시스테인 조작된 항-CD22 항체, 또는 그의 항체 약물 접합체와 접촉시키고, (b) 시스테인 조작된 항-CD22 항체, 또는 그의 항체 약물 접합체와 시험 샘플 내의 CD22 폴리펩티드 사이의 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함하고, 여기서 복합체의 형성은 포유동물에 종양이 존재함을 나타내는 것인, 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법에 관한 것이다. 임의로, 시스테인 조작된 항-CD22 항체, 또는 그의 항체 약물 접합체는 예를 들어 검출가능하게 표지되고, 고체 지지체에 부착되고/되거나 조직 세포의 시험 샘플은 암성 종양을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 얻는다.

[0873]

항체-약물 접합체의 대사산물

[0874]

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

[0875]

대사산물은 일반적으로 방사성 표지된 (예컨대, ^{14}C 또는 ^3H) ADC를 제조하고; 이를 래트, 마우스, 기니아 피그, 원숭이 등의 동물 또는 인간에게 검출 가능한 용량 (예컨대, 약 0.5 mg/kg 초과의 용량)으로 비경구 투여하고;

대사가 일어나기에 충분한 시간(전형적으로 약 30초 내지 30시간)을 허용한 다음; 그의 전환 생성물을 뇌, 혈액 또는 기타 생물학적 샘플로부터 단리시킴으로써 확인된다. 이를 생성물은 표지되었기 때문에 용이하게 단리된다 (다른 것들은 대사물질 내에 계속 존재하는 에피토프와 결합할 수 있는 항체를 사용함으로써 단리됨). 대사물질 구조는 통상적인 방식, 예를 들어 MS, LC/MS 또는 NMR 분석에 의해 결정한다. 일반적으로, 대사물질 분석은 당업자에게 널리 공지된 통상적인 약물 대사 연구와 동일한 방식으로 수행한다. 전환 생성물은 생체내에서 발견되지 않는 한, 본 발명의 ADC 화합물의 치료 투여를 위한 진단 분석에 유용하다.

[0876] 제약 제제

[0877] 티오-항체 약물 접합체를 포함하는 항체-약물 접합체의 투여

[0878] 티오-항체 약물 접합체 (TDC)를 포함하는 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)는 치료되는 병태에 적절한 임의의 경로로 투여될 수 있다. ADC는 일반적으로 비경구, 즉 주입, 피하, 근육내, 정맥내, 피내, 경막내 및 경막외로 투여될 것이다.

[0879] 상기 암을 치료하기 위해, 한 실시태양에서, 항체-약물 접합체는 정맥내 주입을 통해 투여된다. 주입을 통해 투여되는 투여량은 용량당 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $10,000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 이고, 일반적으로 총 1, 2, 3 또는 4회 용량을 위해 1주당 1회 투여한다. 별법으로, 투여량 범위는 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 및 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다. 용량은 1일 1회, 1주 1회, 1주 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1주 1회 미만, 1개월 1회 투여되거나, 또는 질환의 증상을 경감 또는 완화시키기 위해 간헐적으로 투여될 수 있다. 투여는 치료되는 림프종, 백혈병의 종양 또는 증상의 완화시까지 개시된 임의의 간격으로 계속될 수 있다. 투여는 증상의 완화 또는 경감이 계속된 투여에 의해 연장되는 경우 증상의 완화 또는 경감이 달성된 후에도 계속될 수 있다.

[0880] 본 발명은 또한 자가면역 질환으로 고통받는 환자에게 치료 유효량의 임의의 하나의 선행 실시태양의 인간화 10F4 항체-약물 접합체를 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질환을 완화시키는 방법을 제공한다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 정맥내 또는 피하 투여된다. 항체-약물 접합체는 용량당 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $100 \text{mg}/\text{m}^2$ 의 투여량으로 정맥내 투여되고, 특정 실시태양에서, 투여량은 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다. 용량은 1일 1회, 1주 1회, 1주 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1일 1회 미만, 1개월 다수회로서 1주 1회 미만, 1개월 1회 투여되거나, 또는 질환의 증상을 경감 또는 완화시키기 위해 간헐적으로 투여될 수 있다. 투여는 치료되는 자가면역 질환의 증상의 경감 또는 완화시까지 개시된 임의의 간격으로 계속될 수 있다. 투여는 증상의 완화 또는 경감이 계속된 투여에 의해 연장되는 경우 증상의 완화 또는 경감이 달성된 후에도 계속될 수 있다.

[0881] 본 발명은 또한 B 세포 장애, 예를 들어 B 세포 증식 장애 (비체한적으로 림프종 및 백혈병 포함) 또는 자가면역 질환으로 고통받는 환자에게, 세포독성 분자 또는 겸출가능한 분자에 접합되지 않은 치료 유효량의 임의의 하나의 선행 실시태양의 인간화 10F4 항체를 투여하는 것을 포함하는, B 세포 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 항체는 일반적으로 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $1000 \text{mg}/\text{m}^2$ 의 투여량으로 투여될 것이다.

[0882] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 항-CD22 항체 및/또는 그의 적어도 하나의 면역접합체 및/또는 본 발명의 적어도 하나의 항-CD22 항체-약물 접합체를 포함하는 제약 제제를 추가로 제공한다. 일부 실시태양에서, 제약 제제는 1) 항-CD22 항체 및/또는 항-CD22 항체-약물 접합체 및/또는 그의 면역접합체, 및 2) 제약 상 허용되는 담체를 포함한다. 일부 실시태양에서, 제약 제제는 1) 항-CD22 항체 및/또는 그의 면역접합체, 및 임의로, 2) 적어도 하나의 추가의 치료제를 포함한다.

[0883] 본 발명의 항체 또는 면역접합체 또는 본 발명의 항체-약물 접합체를 포함하는 제약 제제는 목적하는 순도를 갖는 항체 또는 항체-약물 접합체를 임의의 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합하여 수용액 또는 동결건조 또는 다른 건조된 제제 형태로 보관을 위해 제조한다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 이에는 베퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트, 히스티딘 및 기타 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m -크레솔); 저분자량 (약 10개 미

만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신; 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착물(예컨대, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 포함된다. 생체내 투여를 위해 사용되는 제약 제제는 일반적으로 멸균처리된다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

[0884] 활성 성분은 또한 예를 들어 액적 형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달계(예를 들어, 리포좀, 알부민 미세구, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에 또는 마크로에멀젼에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0885] 지속 방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예는 본 발명의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 소수성 고체 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로 캡슐의 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔(예를 들어 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드(미국 특허 3,773,919), L-글루탐산과 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT™(락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능 미세구) 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 중합체, 예를 들어 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일 이상 동안 분자의 방출을 가능하게 하지만, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 봉입된 항체 또는 면역접합체가 장기간 동안 신체에서 유지될 때, 이들은 37°C에서 습기에 노출될 때 변성 또는 응집되어 생물학적 활성 및 가능하게는 면역원성의 변경을 야기할 수 있다. 관련되는 메카니즘이 따라 안정화를 위한 합리적인 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디슬퍼드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 안정화는 술프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성할 수 있다.

항체-약물 접합체 치료

[0887] 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC)를 사용하여 예를 들어 종양 항원의 과발현을 특징으로 하는 다양한 질환 또는 장애를 치료할 수 있음이 고려된다. 예시적인 병태 또는 과다증식 장애는 양성 또는 악성 종양; 백혈병 및 림프계 종양을 포함한다. 다른 것들로는 신경, 신경교, 성상세포, 시상하부, 선상, 포식세포, 상피, 기질성, 포배강, 염증, 혈관신생 및 면역(자가면역 질환 포함) 질환 등이 있다.

[0888] 동물 모델 및 세포-기반 분석에서 확인되는 ADC 화합물은 종양이 존재하는 보다 고등한 영장류 및 인간 임상 시험에서 추가로 시험될 수 있다. 인간 임상 시험은 림프종, 비-호지킨 림프종(NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병(HCL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 및 외투층 세포 림프종을 포함하지만 이에 제한되지 않는 B 세포 증식 장애를 경험하는 환자에서 본 발명의 항-CD22 모노클로날 항체 또는 면역접합체의 효능을 시험하도록 설계될 수 있다. 임상 시험은 공지의 치료 요법, 예를 들어 공지의 화학요법제 및/또는 세포독성제를 수반하는 방사선 조사 및/또는 화학요법과 조합하여 ADC의 효능을 평가하도록 설계될 수 있다.

[0889] 일반적으로, 치료되는 질환 또는 장애는 과다증식 질환, 예를 들어 B 세포 증식 장애 및/또는 B 세포 암이다. 본원에서 치료되는 암의 예는 림프종, 비-호지킨 림프종(NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병(HCL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 및 외투층 세포 림프종으로부터 선택되는 B 세포 증식 장애를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0890] 암은 본 발명의 ADC가 암 세포에 결합할 수 있도록 CD22-발현 세포를 포함할 수 있다. 암에서 CD22 발현을 결정하기 위해, 다양한 진단/예후 분석을 이용할 수 있다. 한 실시태양에서, CD22 과발현은 IHC에 의해 분석할 수 있다. 종양 생검으로부터의 파라핀 포매 조직 절편을 IHC 분석에 적용하고, 조사되는 종양 세포의 염색 정도에 대해 및 조사되는 비율에서 CD22 단백질 염색 강도 기준을 부여할 수 있다.

[0891] 질환을 예방 또는 치료하는데 적절한 ADC 투여량은 상기 규정된 바와 같은 치료하고자 하는 질환의 종류, 질환

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

[0892] 병태에 따라서 수일 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우에, 치료는 질환 증상이 목적하는 수준으로 억제될 때까지 지속한다. 예시되는 투여 방법은 항-ErbB2 항체 약 4 mg/kg 의 초기 로드 용량을 투여한 다음, 매주 약 2 mg/kg 의 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 기타 투여 용법도 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링한다.

조합 요법

[0894] 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)는 제약 조합 제제 또는 조합 요법으로서의 투여 방법에서 항암 특성을 지닌 제2 화합물과 조합할 수 있다. 제약 조합 제제 또는 투여 방법의 제2 화합물은 조합물의 ADC에 대한 상보적 활성을 지녀, 이들이 서로 불리한 영향을 미치지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0895] 제2 화합물은 화학요법제, 세포독성제, 시토킨, 성장 억제제, 항-호르몬제, 및/또는 심장보호제일 수 있다. 이러한 분자는 의도하는 목적에 대해 유효한 양으로 함께 존재하는 것이 적합하다. 본 발명의 ADC를 함유하는 제약 조성물은 또한, 치료 유효량의 화학요법제, 예를 들어 투불린-형성 억제제, 토포이소미라제 억제제 또는 DNA 결합제일 수 있다.

[0896] 한 측면에서, 제1 화합물은 본 발명의 항-CD22 ADC이고, 제2 화합물은 항-CD20 항체 (네이키드 항체 또는 ADC)이다. 한 실시태양에서, 제2 화합물은 항-CD20 항체 리툭시맙 (리툭산(등록상표)) 또는 2H7 (제넨테크, 인크.)이다. 본 발명의 항-CD22 ADC와의 조합 면역 요법에 유용한 다른 항체는 항-VEGF (예를 들어, 아바스틴 (Avastin)(등록상표))를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0897] 방사선 요법 및/또는 골수 및 말초 혈액 이식, 및/또는 세포독성제, 화학요법제, 또는 성장 억제제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 치료 요법을 본 발명에 따라서 확인된 항암제의 투여와 조합할 수 있다. 상기 하나의 실시태양에서, 화학요법제는 1개의 물질 또는 물질의 조합물, 예를 들어 시클로포스파미드, 히드록시다우노루비신, 아드리아마이신, 독소루비신, 빙크리스틴 (OncovinTM), 프레드니솔론, CHOP, CVP, 또는 COP, 또는 면역치료제, 예를 들어 항-CD20 (예를 들어, 리툭산(등록상표)) 또는 항-VEGF (예를 들어, 아바스틴(등록상표))이다. 이러한 조합 요법은 동시 또는 순차적 요법으로서 투여할 수 있다. 순차적으로 투여되는 경우에는, 조합물을 2회 이상의 투여로 투여할 수 있다. 조합 투여에는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하여 동시 투여하는 것과, 어느 한 순서로 순차적으로 투여하는 것 (여기서, 바람직하게는 2개 (또는 모든) 활성체가 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 데에는 일정 시간이 소요됨)이 포함된다.

[0898] 한 실시태양에서, ADC를 이용한 치료가 본원에서 확인된 항암제와, 1종 이상의 화학요법제 또는 성장 억제제의 조합 투여 (이에는 상이한 화학요법제의 각태일을 동시에 투여하는 것이 포함됨)를 포함한다. 화학요법제에는 탁산 (예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀) 및/또는 안트라사이클린 항생제가 포함된다. 상기 화학요법제의 제제 및 투여 계획은 제조사의 지시에 따라 또는 숙련의에 의해 경험적으로 결정되는 바와 같이 사용될 수 있다. 상기 화학요법제의 제제 및 투여 계획은 또한 문헌 ["Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD]에 기재되어 있다.

[0899] 상기 동시 투여되는 임의의 물질에 대한 적합한 투여량은 현재 사용되고 있는 양이며, 이는 새로이 확인된 물질과 기타 화학요법제 또는 치료의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 낮아질 수 있다.

[0900] 조합 요법은 "상승작용"을 제공해줄 수 있고, "상승적"인 것으로 입증되었는데, 즉 활성 성분들을 함께 사용한 경우에 달성된 효과는 화합물을 개별적으로 사용하여 얻은 효과들의 합보다 크다. 상승적 효과는 활성 성분들을 (1) 조합된 단위 투여 제제로 동시-제제화하고 투여하거나 동시에 전달하거나; (2) 별개의 제제로서 교대로 또는 병행하여 전달하거나; 또는 (3) 몇몇 기타 요법에 의한 경우에 획득할 수 있다. 상승적 효과는 교대 요법으로 전달한 경우에는, 화합물을, 예를 들어 별개의 주사기로 상이한 주사제에 의해 순차적으로 투여 또는 전달할 경우에는 획득될 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 동안 각 활성 성분의 유효 투여량을 순차적으로, 즉 연속적으로 투여하는 반면, 조합 요법에서는 2가지 이상 활성 성분의 유효 투여량을 함께 투여한다.

[0901] 항체-약물 접합체의 대사물질

[0902] 선행 기술에 비해 신규하고 진보성을 갖는 한도 내에서, 본원에 기재된 ADC 화합물의 생체내 대사산물이 본 발명의 범위 내에 또한 포함된다. 이러한 생성물은, 예를 들어 투여된 화합물의 산화, 환원, 가수분해, 아미드화, 에스테르화, 효소적 절단 등으로부터 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물을 그의 대사산물 생성에 충분한 시간 동안 포유동물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 의해 제조된 신규하고 진보성을 갖는 화합물을 포함한다.

[0903] 대사산물은 일반적으로 방사성 표지된 (예컨대, ^{14}C 또는 ^3H) ADC를 제조하고; 이를 래트, 마우스, 기니아 피그, 원숭이 등의 동물 또는 인간에게 검출 가능한 용량 (예컨대, 약 0.5 mg/kg 초과의 용량)으로 비경구 투여하며; 대사가 일어나기에 충분한 시간(전형적으로 약 30초 내지 30시간)이 경과한 후; 그의 전환 생성물을 뇨, 혈액 또는 기타 생물학적 샘플로부터 단리시킴으로써 확인된다. 이를 생성물은 표지되었기 때문에 용이하게 단리된다 (다른 것들은 대사물질 내에 계속 존재하는 에피토프와 결합할 수 있는 항체를 사용함으로써 단리됨). 대사물질 구조는 통상적인 방식, 예를 들어 MS, LC/MS 또는 NMR 분석에 의해 결정한다. 일반적으로, 대사물질 분석은 당업자에게 널리 공지된 통상적인 약물 대사 연구와 동일한 방식으로 수행한다. 전환 생성물은 생체내에서 발견되지 않는 한, 본 발명의 ADC 화합물의 치료 투여를 위한 진단 분석에 유용하다.

[0904] **항-CD22 항체 및 면역접합체를 사용하는 추가의 방법**

[0905] **진단 방법 및 검출 방법**

[0906] 한 측면에서, 본 발명의 항-CD22 항체 및 면역접합체는 생물학적 샘플 중 CD22의 존재를 검출하기 위해 유용하다. 용어 "검출하는"은 본원에서 사용될 때 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 특정 실시태양에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직을 포함한다. 특정 실시태양에서, 상기 조직은 다른 조직에 비해 더 높은 수준으로 CD22를 발현하는 정상 및/또는 암성 조직, 예를 들어 B 세포 및/또는 B 세포 관련 조직을 포함한다.

[0907] 한 측면에서, 본 발명은 생물학적 샘플 중 CD22의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 이 방법은 생물학적 샘플을 CD22에 대한 항-CD22 항체의 결합을 허용하는 조건하에 항-CD22 항체와 접촉시키고, 항-CD22 항체와 CD22 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 것을 포함한다.

[0908] 한 측면에서, 본 발명은 CD22의 발현 증가와 관련이 있는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 이 방법은 시험 세포를 항-CD22 항체와 접촉시키고; CD22에 대한 항-CD22 항체의 결합을 검출함으로써 시험 세포에 의한 CD22의 발현 수준을 (정량적으로 또는 정성적으로) 결정하고; 시험 세포에 의한 CD22의 발현 수준을 대조 세포 (예를 들어, 시험 세포와 동일한 조직에서 기원하는 정상 세포 또는 상기 정상 세포와 대등한 수준으로 CD22를 발현하는 세포)에 의한 CD22의 발현 수준과 비교하는 것을 포함하고, 여기서 대조 세포에 비해 시험 세포에 의한 CD22의 더 높은 발현 수준은 CD22의 발현 증가와 관련이 있는 장애의 존재를 나타낸다. 특정 실시태양에서, 시험 세포는 CD22의 발현 증가와 관련이 있는 장애에 걸린 것으로 의심되는 개체로부터 얻어진다. 특정 실시태양에서, 장애는 세포 증식 장애, 예를 들어 암 또는 종양이다.

[0909] 본 발명의 항체를 사용하여 진단될 수 있는 예시적인 세포 증식 장애는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 의투증 세포 림프종을 포함하지만 이에 제한되지 않는 B 세포 장애 및/또는 B 세포 증식 장애를 포함한다.

[0910] 특정 실시태양에서, 상기한 바와 같은 진단 또는 검출 방법은 세포 표면 상에 발현되는 CD22에 대한 항-CD22 항체의 결합을 그의 표면 상에 CD22를 발현하는 세포로부터 얻은 막 제제에서 검출하는 것을 포함한다. 특정 실시태양에서, 이 방법은 세포를 CD22에 대한 항-CD22 항체의 결합을 허용하는 조건하에서 항-CD22 항체와 접촉시키고, 항-CD22 항체와 세포 표면 상의 CD22 사이에 복합체가 형성되는지를 결정하는 것을 포함한다. 세포의 표면 상에 발현된 CD22에 대한 항-CD22 항체의 결합을 검출하기 위한 예시적인 분석은 "FACS" 분석이다.

[0911] CD22에 대한 항-CD22 항체의 결합을 검출하기 위해 다른 방법이 사용될 수 있다. 상기 방법은 당업계에 공지된 항원 결합 분석, 예를 들어 웨스턴 븍롯 (western blot), 방사 면역 측정법, ELISA (효소 결합 면역흡착 분석), "샌드위치 (sandwich)" 면역분석, 면역침전 분석, 형광 면역분석, 단백질 A 면역분석, 및 면역조직화학 (IHC)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0912] 특정 실시태양에서, 항-CD22 항체는 표지된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예를 들어 형광, 발색, 전자 밀집 (electron-dense), 화학발광, 및 방사성 표지), 및 간접적으로, 예를 들어 효소적 반응 또

는 문자 상호작용을 통해 검출되는 모이어티, 예를 들어 효소 또는 리간드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 표지는 방사성 동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , 형광단, 예를 들어 히토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 덴실, 웜밸리페론, 또는 루시퍼라제, 예를 들어 개똥벌레 루시퍼라제 및 세균 루시퍼라제 (미국 특히 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소, 예를 들어 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링된 헤테로시클릭 옥시다제, 예를 들어 유리카제 및 잔틴 옥시다제, 바이오딘/아비딘, 스펀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 유리 라디칼 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0913] 특정 실시태양에서, 항-CD22 항체는 불용성 매트릭스 상에 고정된다. 고정은 용액에 유리된 상태로 남아있는 임의의 CD22로부터 항-CD22 항체를 분리하는 것을 수반한다. 이것은 통상적으로 분석 절차 전에 항-CD22 항체의 불용화에 의해, 수불용성 매트릭스 또는 표면에 대한 흡착에 의해 (Bennich 등, U.S. 3,720,760), 또는 공유커플링 (예를 들어, 글루타르알데히드 가교결합 사용)에 의해, 또는 예를 들어 면역침전에 의해 항-CD22 항체와 CD22 사이의 복합체 형성 후에 항-CD22 항체의 불용화에 의해 달성된다.

[0914] 상기 진단 또는 검출을 위한 임의의 실시태양은 항-CD22 항체 대신에 또는 항-CD22 항체에 추가하여 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행할 수 있다.

치료 방법

[0916] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 예를 들어 시험관내, 생체 외 및 생체내 치료 방법에 사용될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명은 생체내 또는 시험관내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 방법을 제공하고, 이 방법은 세포를 CD22에 대한 면역접합체의 결합을 허용하는 조건하에 항-CD22 항체 또는 그의 면역접합체에 노출시키는 것을 포함한다. "세포 성장 또는 증식을 억제하는"은 세포의 성장 또는 증식을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100% 감소시키는 것을 의미하고, 세포 사멸의 유도를 포함한다. 특정 실시태양에서, 세포는 종양 세포이다. 특정 실시태양에서, 세포는 B 세포이다. 특정 실시태양에서, 세포는 예를 들어 본원에서 예시되는 바와 같은 이종이식편이다.

[0917] 한 측면에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 B 세포 증식 장애를 치료하거나 예방하는데 사용된다. 특정 실시태양에서, 세포 증식 장애는 CD22의 증가된 발현 및/또는 활성과 관련이 있다. 예를 들어, 특정 실시태양에서, B 세포 증식 장애는 B 세포의 표면에서 CD22의 발현 증가와 관련이 있다. 특정 실시태양에서, B 세포 증식 장애는 종양 또는 암이다. 본 발명의 항체 또는 면역접합체에 의해 치료되는 B 세포 증식 장애의 예는 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투증 세포 림프종을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0918] 한 측면에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-CD22 항체 또는 그의 면역접합체를 투여하는 것을 포함하는, B 세포 증식 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, B 세포 증식 장애를 치료하는 방법은 개체에게 항-CD22 항체 또는 항-CD22 면역접합체 및 임의로 적어도 하나의 추가의 치료제, 예를 들어 아래에서 제시되는 것을 포함하는 제약 제제의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시태양에서, 세포 증식 장애를 치료하는 방법은 개체에게 1) 항-CD22 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체; 및 임의로 2) 적어도 하나의 추가의 치료제, 예를 들어 아래에 제시되는 것을 포함하는 제약 제제의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

[0919] 한 측면에서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 적어도 일부는 인간 이외의 다른 종으로부터 유래한 CD22에 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 예를 들어 CD22를 함유하는 세포 배양액에서, 인간에서, 또는 본 발명의 항체 또는 면역접합체가 교차-반응하는 CD22를 갖는 다른 포유동물 (예를 들어 침팬지, 비비 (baboon), 마모셋, 사이노몰거스 원숭이 및 붉은털 원숭이, 돼지 또는 마우스)에서 CD22에 결합하는데 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 항-CD22 항체 또는 면역접합체는, 면역접합체의 접합된 세포독소가 세포 내부에 접근하도록 항체 또는 면역접합체를 CD22와 접촉시켜 항체 또는 면역접합체-항원 복합체를 형성시킴으로써 B 세포 상의 CD22를 표적화하는데 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, CD22는 인간 CD22이다.

[0920] 한 실시태양에서, 항-CD22 항체 또는 면역접합체는 증가된 CD22 발현 및/또는 활성과 관련이 있는 장애로 고통 받는 개체에서 CD22를 결합시키는 방법에 사용될 수 있고, 이 방법은 개체에 존재하는 CD22가 결합되도록 개체에게 항체 또는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 결합된 항체 또는 면역접합체는 CD22

를 발현하는 B 세포 내로 내재화된다. 한 실시태양에서, CD22는 인간 CD22이고, 개체는 인간이다. 별법으로, 개체는 항-CD22 항체가 결합하는 CD22를 발현하는 포유동물일 수 있다. 또한, 개체는 CD22가 도입된 (예를 들어, CD22의 투여에 의해 또는 CD22를 코딩하는 트랜스제 (transgene)의 발현에 의해) 포유동물일 수 있다.

[0921] 항-CD22 항체 또는 면역접합체는 치료 목적으로 인간에게 투여될 수 있다. 또한, 항-CD22 항체 또는 면역접합체는 수의용으로 또는 인간 질환의 동물 모델로서, 항체가 교차-반응하는 CD22를 발현하는 비인간 포유동물 (예를 들어, 영장류, 돼지, 래트 또는 마우스)에게 투여될 수 있다. 인간 질환의 동물 모델의 경우에, 상기 동물 모델은 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 치료 효능을 평가하는데 (예를 들어, 투여량 및 투여의 시간 경로를 시험하는데) 유용할 수 있다.

[0922] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 요법에서 단독으로 또는 다른 조성물과 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 적어도 하나의 추가의 치료제 및/또는 아주반트와 동시에 투여될 수 있다. 특정 실시태양에서, 추가의 치료제는 세포독성제, 화학요법제, 또는 성장 억제제이다. 상기 하나의 실시태양에서, 화학요법제는 1개의 물질 또는 물질의 조합물, 예를 들어 시클로포스파미드, 헤드록시다우노루비신, 아드리아마이신, 독소루비신, 빙크리스틴 (OncovinTM), 프레드니솔론, CHOP, CVP, 또는 COP, 또는 면역치료제, 예를 들어 항-CD20 (예를 들어, 리툭산(등록상표)) 또는 항-VEGF (예를 들어, 아바스틴(등록상표))이고, 조합 요법은 암 및/또는 B 세포 장애, 예를 들어 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 활동성 NHL, 재발형 활동성 NHL, 재발형 무통성 NHL, 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 림프종, 백혈병, 모발 세포 백혈병 (HCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 및 외투증 세포 림프종을 포함하는 B 세포 증식 장애의 치료에 유용하다.

[0923] 상기 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2 이상의 치료제가 동일한 또는 별개의 제제에 포함된다), 및 개별 투여를 포함하고, 개별 투여시에, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 수행될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 방사선 요법과 조합될 수도 있다.

[0924] 본 발명의 항체 또는 면역접합체 (및 임의의 추가의 치료제 또는 아주반트)는 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내, 및 국소 치료용으로 필요할 경우의 병변내 투여를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, 항체 또는 면역접합체는 적합하게는 특히 항체 또는 면역접합체의 감소하는 투여량으로 펄스 주입에 의해 투여된다. 용량은 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 간단한지 또는 만성인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해서 수행될 수 있다.

[0925] 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 우수한 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화, 투여량화 및 투여될 것이다. 이러한 측면에서 고려되는 인자는 치료될 특정 장애, 치료될 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 물질의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료인에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체 또는 면역접합체는 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로 해당 장애를 예방하거나 치료하는데 통상적으로 사용되는 1종 이상의 물질과 함께 제제화된다. 이러한 다른 물질의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체 또는 면역접합체의 양, 장애 또는 치료의 종류, 및 상기 논의된 다른 인자에 따라 결정된다. 이는 일반적으로 상기 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 1 내지 99%로, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 경로에 의해 사용된다.

[0926] 장애의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 적절한 투여량 (단독으로 또는 화학요법제와 같은 1종 이상의 다른 추가의 치료제와 조합으로 사용될 경우)은 치료될 질환의 종류, 항체 또는 면역접합체의 종류, 질환의 심도 및 과정, 항체 또는 면역접합체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 이전의 치료법, 환자의 임상 병력 및 항체 또는 면역접합체에 대한 반응, 및 담당 의사의 결정에 의존할 것이다. 항체 또는 면역접합체는 적합하게는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질환의 종류 및 심도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여로든 연속 주입으로든, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg (예를 들어 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg)의 항체 또는 면역접합체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 한 가지 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg 또는 그보다 큰 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 상태에 따라 치료는 일반적으로 질환 증상의 목적하는 억제가 일어날 때까지 지속될 것이다. 한 가지 예시적인 항체 또는 면역접합체의 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg , 2.0 mg/kg , 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 (예를 들어

환자가 약 2 내지 20회, 예를 들어 약 6회 용량의 항체 또는 면역접합체를 투여받도록) 투여될 수 있다. 보다 높은 초기 로드 용량, 이어서 1회 이상의 보다 낮은 용량이 투여될 수 있다. 예시적인 투여 용법은 약 4 mg/kg의 항체의 초기 로드 용량 후에 약 2 mg/kg의 항체를 매주 유지 용량으로 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 다른 투여 용법도 유용할 수 있다. 상기 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0927] 분석

[0928] 본 발명의 항-CD22 항체 및 면역접합체는 당업계에 공지된 상이한 분석에 의해 그들의 물리/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성을 대해 특징규명될 수 있다.

[0929] 활성 분석

[0930] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 항-CD22 항체 또는 그의 면역접합체를 확인하기 위한 분석이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 세포 성장 또는 증식을 억제하는 활성 (예를 들어, "세포 사멸" 활성), 또는 프로그래밍된 세포 사멸 (세포자멸)을 포함하는 세포 사멸을 유도하는 활성을 포함할 수 있다. 또한, 생체내에서 및/또는 시험관내에서 상기 생물학적 활성을 갖는 항체 또는 면역접합체도 제공된다.

[0931] 특정 실시태양에서, 항-CD22 항체 또는 그의 면역접합체를 시험관내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험한다. 세포 성장 또는 증식 억제에 대한 분석은 당업계에 잘 공지되어 있다. 본원에서 기재된 "세포 사멸" 분석에 의해 예시된, 세포 증식에 대한 특정 분석은 세포 생활력을 측정한다. 하나의 상기 분석은 CellTiter-Glo™ 발광 세포 생활력 분석 (Luminescent Cell Viability Assay)이고, 이는 프로메가 (Promega, 미국 위스콘신주 매디슨)로부터 상업적으로 입수 가능하다. 상기 분석은 대사적 활성 세포를 나타내는 존재하는 ATP의 정량에 기초하여 배양액 내의 생활성 세포의 수를 결정한다 (문헌 [Crouch et al., (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88], 미국 특허 6602677 참조). 분석은 분석을 자동 고효율 스크리닝 (HTS)에 적용하도록 하는 96- 또는 384-웰 포맷으로 수행될 수 있다 ([Cree et al., (1995) Anticancer Drugs 6:398-404] 참조). 분석 과정은 단일 시약 (CellTiter-Glo(등록상표) 시약)을 배양된 세포에 직접 첨가하는 것을 수반한다. 이에 의해, 세포가 용해되고, 루시퍼라제 반응에 의한 발광 신호가 생성된다. 발광 신호는 배양액 내에 존재하는 생활성 세포의 수에 정비례하는, 존재하는 ATP의 양에 비례한다. 데이터는 발광광도계 또는 CCD 카메라 영상 장치에 의해 기록될 수 있다. 발광 정도는 상대 광 단위 (RLU)로서 표현된다.

[0932] 세포 증식에 대한 다른 분석은 미토콘드리아 리덕타제에 의한 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드의 포르마잔으로의 산화를 측정하는 비색 분석인 "MTT" 분석이다. CellTiter-Glo™ 분석과 마찬가지로, 상기 분석은 세포 배양액 내에 존재하는 대사적 활성 세포의 수를 나타낸다 (예를 들어, 문헌 [Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63], 및 [Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882] 참조).

[0933] 한 측면에서, 항-CD22 항체는 시험관내에서 세포 사멸을 유도하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포 사멸 유도에 대한 분석은 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시태양에서, 상기 분석은 예를 들어 요오드화프로피듐 (PI), 트리판 블루 (문헌 [Moore et al. (1995) Cytotechnology 17:1-11] 참조) 또는 7AAD의 흡수에 의해 평가되는 막 통합성의 상실을 측정한다. 예시적인 PI 섭취 분석에서, 세포는 10% 열-불활성화 FBS (하이클론 (Hyclone)) 및 2 mM L-글루타민이 보충된 둘베코 (Dulbecco) 개질 이글 배지 (D-MEM):햄 F-12 (50:50)에서 배양된다. 따라서, 분석은 보체 및 면역 효과기 세포의 부재하에 수행된다. 세포를 100 x 20 mm 디쉬 내에 디쉬 당 3×10^6 의 밀도로 접종하고, 철야 부착시킨다. 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독으로 또는 다양한 농도의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배지로 교체한다. 세포를 3일 동안 인큐베이션한다. 처리 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신화에 의해 탈착시킨다. 이어서, 세포를 1200 rpm에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하고, 펠렛을 3 ml의 차가운 Ca^{2+} 결합 베퍼 (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2)에 재현탁시키고, 세포 덩어리를 제거하기 위해 35 mm의 스트레이너 마개가 있는 12 x 75 mm 튜브 (1 ml/튜브, 처리군당 3개의 튜브) 내로 분취한다. 이어서, 튜브에 PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣는다. FACSCAN™ 유동 세포 측정기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소프트웨어 (베톤 디킨슨 (Becton Dickinson))를 사용하여 샘플을 분석한다. PI 흡수에 의해 측정되는, 통계상 유의한 수준의 세포 사멸을 유도하는 항체 또는 면역접합체가 이와 같이 확인된다.

[0934] 한 측면에서, 항-CD22 항체 또는 면역접합체가 시험관내에서 세포자멸 (프로그래밍된 세포 사멸)을 유도하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포자멸을 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 예시적인 분석은 아넥신 결합 분석이다. 예시적인 아넥신 결합 분석에서, 상기 문단에서 기재한 바와 같이 세포를 배양하고 디쉬 내에 접종한다. 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독으로 또는 0.001 내지 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배

지로 교체한다. 3일의 인큐베이션 기간 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신화에 의해 탈착시킨다. 이어서, 세포를 원심분리하고, Ca^{2+} 결합 버퍼에 재현탁시키고, 상기 문단에서 기재한 바와 같이 퓨브 내로 분취한다. 이어서, 퓨브에 표지된 아넥신 (예를 들어 아넥신 V-FITC) ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 넣는다. FACSCAN™ 유동 세포 측정기 및 FACSCONVERT™ CellQuest 소프트웨어 (비디 바이오사이언스 (BD Biosciences))를 사용하여 샘플을 분석한다. 대조군에 비해 통계상 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체 또는 면역접합체가 이와 같이 확인된다. 세포자멸을 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 다른 예시적인 분석은 게놈 DNA의 뉴클레오티드 (internucleosomal) 분해를 검출하기 위한 히스톤 DNA ELISA 비색 분석이다. 상기 분석은 예를 들어, 세포 사멸 검출 ELISA 키트 (로슈 (Roche, 미국 캘리포니아주 팔로 alto))를 사용하여 수행할 수 있다.

[0935] 임의의 상기 시험판내 분석에 사용하기 위한 세포는 자연적으로 CD22를 발현하거나 CD22를 발현하도록 조작된 세포 또는 세포주를 포함한다. 상기 세포는 동일한 조직에서 기원하는 정상 세포에 비해 CD22를 과발현하는 종양 세포를 포함한다. 상기 세포는 또한 CD22를 발현하는 세포주 (종양 세포주 포함), 및 정상적으로 CD22를 발현하지 않지만 CD22를 코딩하는 핵산으로 형질감염된 세포주를 포함한다.

[0936] 한 측면에서, 항-CD22 항체 또는 그의 면역접합체는 생체내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 특정 실시태양에서, 항-CD22 항체 또는 그의 면역접합체는 생체내에서 종양 성장을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 생체내 모델 시스템, 예를 들어 이종이식 모델이 상기 시험을 위해 사용될 수 있다. 예시적인 이종이식 시스템에서, 인간 종양 세포를 적합하게 면역순상시킨 비인간 동물, 예를 들어 SCID 마우스에 도입한다. 본 발명의 항체 또는 면역접합체를 동물에게 투여한다. 종양 성장을 억제하거나 감소시키는 항체 또는 면역접합체의 능력을 측정한다. 상기 이종이식 시스템의 특정 실시태양에서, 인간 종양 세포는 인간 환자로부터의 종양 세포이다. 이종이식 모델 제조에 유용한 상기 세포는 BJAB-luc 세포 (루시퍼라제 리포터 유전자로 형질감염된 EBV-음성 베كت트 림프종 세포주), Ramos 세포 (ATCC, 미국 버지니아주 매나서스, CRL-1923), Raji 세포 (ATCC, CCL-86), SuDHL-4 세포 (DSMZ, 독일 브라운쉬바이크, AAC 495), DoHH2 세포 ([Kluin-Nilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221-224 (1991)], 및 [Kluin-Nilemans, H.C. et al., Leukemia 8: 1385-1391 (1994)] 참조), 그란타-519 세포 ([Jadayel, D.M. et al., Leukemia 11(1):64-72 (1997)] 참조)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 인간 백혈병 및 림프종 세포주를 포함한다. 특정 실시태양에서, 인간 종양 세포는 피하 주사에 의해 적합하게 면역순상시킨 비인간 동물 내로 또는 이식에 의해 적합한 부위, 예를 들어 유지방체 (mammary fat pad) 내로 도입된다.

결합 분석 및 다른 분석

[0937] 한 측면에서, 항-CD22 항체를 그의 항원 결합 활성을 대해 시험한다. 예를 들어, 특정 실시태양에서, 항-CD22 항체를 세포 표면 상에 발현되는 CD22에 결합하는 그의 능력에 대해 시험한다. FACS 분석을 상기 시험을 위해 사용할 수 있다.

[0938] 한 측면에서, 경쟁 분석은 CD22에 대한 결합을 위해 뮤린 10F4.4.1 항체, 인간화 10F4v1 항체, 인간화 10F4v3 항체 및/또는 뮤린 5E8.1.8 항체와 경쟁하는 모노클로날 항체를 확인하는데 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 경쟁 항체는 뮤린 10F4.4.1 항체, 인간화 10F4v1 항체, 인간화 10F4v3 항체 및/또는 뮤린 5E8.1.8 항체에 의해 결합되는 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 예시적인 경쟁 분석은 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]에 제시된 것과 같은 통상적인 분석을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 항체가 결합하는 에피토프를 매핑하기 위한 상세한 예시적인 방법은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제시되어 있다. 두 항체가 각각 서로 다른 항체의 결합을 50% 이상 차단할 경우 두 항체는 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 언급된다.

[0939] 예시적인 경쟁 분석에서, CD22에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, 뮤린 10F4.4.1 항체, 인간화 10F4v1 항체, 인간화 10F4v3 항체 및/또는 뮤린 5E8.1.8 항체) 및 CD22에 대한 결합을 위해 제1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 시험되는 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 고정된 CD22를 인큐ベ이션한다. 제2 항체는 하이브리도마 상등액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 제1 표지된 항체만을 포함하고 제2 비표지된 항체가 존재하지 않는 용액 중에서 고정된 CD22를 인큐베이션한다. CD22에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건하에서 인큐베이션한 후, 과량의 비결합 항체를 제거하고, 고정된 CD22와 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정된 CD22와 회합된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소할 경우, 이것은 제2 항체가 CD22에 대한 결합을 위해 제1 항체와 경쟁함을 나타낸다. 특정 실시태양에서, 고정된 CD22는 세포의 표면에 또는 그의

표면에 CD22를 발현하는 세포로부터 수득한 막 제제에 존재한다.

[0941] 한 측면에서, 정제된 항-CD22 항체는 N-말단 서열 결정, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파파인 소화를 포함하지만 이에 제한되지 않는 일련의 분석에 의해 추가로 특징규명될 수 있다.

[0942] 한 실시태양에서, 본 발명은 항체를, 생체내에서 항체의 반감기가 중요하지만 특정 효과기 기능 (예를 들어 보체 및 ADCC)에는 불필요하거나 유해한 많은 용도에 대한 바람직한 후보가 되게 하는, 모든 효과기 기능이 아니라 일부의 효과기 기능만을 보유하는 변경된 항체를 고려한다. 특정 실시태양에서, 목적하는 특성만이 유지되는 것을 보장하기 위해 항체의 Fc 활성이 측정된다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석을 수행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석은 항체에 Fc γ R 결합이 결여되어 있지만 (따라서 ADCC 활성이 결여될 수 있음), 항체가 FcRn 결합능을 보유하는 것을 보장하기 위해 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하지만, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 464페이지의 표 3에 요약되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 예는 미국 특히 5,500,362 또는 5,821,337에 기재되어 있다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포로는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 들 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 목적하는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물모델에서 평가될 수 있다. 또한, C1q 결합 분석을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성이 없는지를 확인할 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다. 또한, FcRn 결합 및 생체내 청소율/반감기 측정을 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

실시예

[0943] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제시된 일반적인 기재가 주어지면, 다양한 다른 실시태양이 실시될 수 있는 것으로 이해된다.

실시예 1: 뮤린 항-인간 CD22 모노클로날 항체의 제조

[0945] 인간 CD22에 특이적으로 결합할 수 있는 뮤린 모노클로날 항체를 제조하였다. 6주령의 BALB/c 암컷 마우스를 리비 (Ribi) 아주반트 중의 도메인 3 및 4가 결여된 정제된 인간 CD22 his-8 태깅된 (tagged) 세포외 도메인 (서열 30 (ECD) + C-말단의 서열 GRAHHHHHHHH) 또는 도메인 1-7을 포함하는 CD22 his-8 태깅된 세포외 도메인 (서열 28 (ECD) + 상기 His 서열 태그)으로 발바닥에서 면역화시켰다. 후속 주사를 초기 면역화 1 및 3주 후에 동일한 방식으로 수행하였다. 최종 주사 3일 후, 서혜 및 오금 림프절을 제거하여 모으고, 조직을 스틸 거즈 (steel gauze)를 통해 통과시켜 단일 세포 혼탁액을 제조하였다. 세포를 4:1 비율로 50% w/v 폴리에틸렌 글리콜 4000을 함유하는 고 글루코스 (DMEM) 중에서 마우스 골수종, 예를 들어 P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580)과 융합시켰다. 이어서, 융합된 세포를 2×10^5 /웰의 밀도로 96 웰 조직 배양판에 플레이팅하였다. 24시간 후, HAT 선택 배지 (히포크산틴/아미노프테린/티미딘, 시그마, #H0262)를 첨가하였다. 융합 15일 후, 성장하는 세포의 상등액을 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA)을 이용하여 인간 CD22에 특이적인 항체의 존재에 대해 시험하였다.

[0946] 뮤린 항-인간 CD22 10F4.4.1 (μ 10F4) 및 5E8.1.8 (μ 5E8) 모노클로날 항체를 인간 CD22에 특이적으로 결합하는 항체를 보여주는 세포-기반 분석 및 플레이트 분석에 기반한 추가의 연구를 위해 선택하였다. 분석은 다음 문단에서 기재한다.

[0947] ELISA-기반 분석: ELISA에 의한 항-CD22 항체 스크리닝을 다음과 같이 수행하고, 모든 인큐베이션은 실온에서 수행한다. 시험 플레이트 (넉크 이뮤노플레이트 (Nunc Immunoplate))를 2시간 동안 50 mM 탄산나트륨 버퍼, pH 9.6 중 정제된 CD22로 코팅한 후, 포스페이트 원총 염수 (PBS) 중 0.5% 소 혈청 알부민으로 30분 동안 차단한 후, 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS (PBST)로 4회 세척하였다. 시험 항체 상등액을 첨가하고, 2시간 동안 진탕하면서 인큐베이션한 후, PBST로 4회 세척하였다. 플레이트를 25 ml 포스페이트 시트레이트 버퍼, pH 5.0 중 10 mg의 o-페닐렌디아민 이염산염 (시그마, #P8287) 및 10 μl의 30% 과산화수소 용액을 함유하는 용액을 100 μl/웰로 첨가하고, 15분 동안 인큐베이션하여 현상시켰다. 100 μl/웰의 2.5 M 황산을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 490 nm의 흡광도에서 자동화 ELISA 플레이트 판독기 내에서 플레이트를 판독하여 데이터를 얻었다.

실시예 2: 항-인간 CD22 모노클로날 항체 (MAb)의 분석을 위한 FACS 기반 분석

- [0949] 그의 표면에 인간 CD22를 발현하는 CHO 세포를 $100 \mu\text{l}$ FACS 버퍼 (PBS, pH 7.4 중 0.1% BSA, 10 mM 나트륨 아지드) 중의 항-CD22 하이브리도마 상등액과 함께 30분 동안 4°C에서 인큐베이션한 후, FACS 버퍼로 1회 세척하였다. 항-CD22 결합의 양은 항체/세포 혼합물의 분취액을 폴리클로날 FITC 접합된 염소 또는 토끼 항-마우스 IgG (어큐레이트 켐. 코. (Accurate Chem. Co., 미국 뉴욕주 웨스트버리)) (뮤린 시험 항체에 대해) 또는 염소 또는 토끼 항-인간 IgG (인간화 항체에 대해)와 함께 30분 동안 4°C에서 인큐베이션한 후 FACS 버퍼로 3회 세척하여 결정하였다.
- [0950] 실시예 3: 인간화 항-CD22 항체의 제조
- [0951] 인간화 10F4 항체를 생성하였고, 여기서 초가변 영역 (HVR) 아미노산 잔기 (상보성 결정 영역 또는 CDR로서 상호교환가능하게 언급됨)가 부위-지정 돌연변이 유발 (Kunkel et al., Methods Enzymol. (1987), 154:367-382)을 통해 변형되어 2개의 변이체, 즉, 인간화 10F4v1 및 인간화 10F4v2 (본원에서 각각 "10F4v1," "hu10F4v1," "10F4v2," 또는 "hu10F4v2"로도 언급됨)를 생성하였다. 본원에 개시된 일부 연구에서 사용된 제3 버전인 인간화 10F4v3 ("10F4v3" 또는 "hu10Fv3")은 hu10F4v2와 성숙 단백질에 대한 동일한 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 갖지만, 단백질 발현을 위해 사용된 벡터 내에서 상이한 신호 서열을 포함한다.
- [0952] 뮤린 10F4 항체의 인간화는 본원에 개시된 바와 같이 수행하였다. 간단히 설명하면, 뮤린 10F4의 경쇄 및 중쇄의 초가변 영역을 변형된 컨센서스 프레임워크 서열 내로 클로닝하여 도 2A 및 2B에 제시된 경쇄 및 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 생성하였다. 본 발명의 항체의 프레임워크 서열로서 사용될 수 있는 별도의 경쇄 및 중쇄 프레임워크 서열은 도 3 및 4에 제시되어 있다.
- [0953] *phoA* 프로모터의 제어하에 2개의 개방 판독 프레임을 갖는 1가 Fab-g3 디스플레이 벡터 (pV0350-2B) 파지미드 (특히 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. 340: 1073-93 (2004)]에 기재된 바와 같은)를 10F4 항체의 인간화에 사용하였다. 제1 개방 판독 프레임은 억셉터 경쇄 서열의 VL 및 CH1 도메인에 융합된 단백질 분비를 위한 이. 콜라이 열 안정성 STII 신호 서열을 포함하였다. 제2 개방 판독 프레임은 억셉터 중쇄 서열의 VH 및 CH1 도메인에 융합된 STII 신호 서열에 이어 끝이 잘린 (truncated) 부 파지 외피 단백질 P3을 포함하였다.
- [0954] 뮤린 10F4로부터의 VH 및 VL 도메인 (각각 서열 89 및 90)을 각각 인간 하위군 컨센서스 VH (huIII) 도메인 (서열 24) 및 인간 컨센서스 카파I (huK1) 도메인 (서열 25)과 함께 정렬하였다. 뮤린 항-인간 CD22 MAb 10F4의 초가변 영역 (HVR, 본원에서 상호교환가능하게 상보성 결정 영역 (CDR)으로서 칭함)의 아미노산 서열을 다음과 같이 컨센서스 프레임워크 서열 내로 삽입하였다. 뮤 (mu) 10F4 항체의 경쇄 HVR (HVR-L1 (카바트 위치 24-34), HVR-L2 (카바트 위치 50-56), 및 HVR-L3 (카바트 위치 89-97)을 인간 카파 I (huKI) 컨센서스 서열 항체 프레임워크 내로 조작하여 인간화 10F4v1 경쇄 (서열 17, 도 2B)를 생산하였다. 뮤 10F4 항체의 중쇄 HVR (HVR-H1 (카바트 위치 26-35), HVR-H2 (카바트 위치 49-65), 및 HVR-H3 (카바트 위치 95-102)을 3개의 위치, 즉 R71A, N73T, 및 L78A에서 humIII 서열과 상이한 변형된 인간 하위군 III (humIII) 컨센서스 VH 도메인 내로 조작하여 ([Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)] 참조), 인간화 10F4v1 중쇄 가변 영역 (서열 16, 도 2A)을 생산하였다. 억셉터 프레임워크 내로 HVR의 유전자 조작은 각각의 초가변 영역에 대해 개별적인 올리고뉴클레오티드를 사용하는 Kunkel 돌연변이 유발에 의해 수행하였다. 각각의 클론의 서열은 표준 DNA 서열결정 기술에 의해 결정하였다. 도 2A 및 2B에 제시된 초가변 영역 및 프레임워크 영역은 카바트 넘버링 (Kabat et al. (1991), 상기 문헌)에 따라 넘버링된다. 경쇄 및 중쇄를 서열결정하였고, huKI, humIII, 뮤린 10F4, 인간화 10F4v1 및 인간화 10F4v2의 가변 영역 (HVR 및 프레임워크 영역 (FR) 포함)의 아미노산 서열을 도 2A 및 2B에 제시한다. 인간화 10F4v3 항체는 10F4v2와 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0955] 항체, 항체 단편, VL 도메인 또는 VH 도메인의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 제조한다. 상기 방법은 천연 공급원으로부터 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 올리고뉴클레오티드-매개 (부위-지정) 돌연변이 유발에 의한 제조, PCR 돌연변이 유발, 및 항체, 항체 단편, VL 도메인 또는 VH 도메인의 미리 제조된 변이체 또는 비-변이체 형태의 카세트 돌연변이 유발을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 라이브러리는 Kunkel 방법을 이용하는 변이체 아미노산으로 아미노산 치환을 위해 VH 및 임의로 1개 이상의 CDR에서 VL 접근가능한 아미노산 위치를 표적화함으로써 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Kunkel et al., Methods Enzymol. (1987), 154:367-382] 및 본원의 실시예를 참조한다. 무작위 서열의 생성을 또한 하기 실시예에 기재한다.
- [0956] 올리고뉴클레오티드의 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 CDR (HVR) 또는 FR 영역 내에 특정 위치에 대한 1개 이상의 설계된 코돈 세트를 포함한다. 코돈 세트는 목적하는 변이체 아미노산을 코딩하도록 사용된 상이한 뉴클레오티드 삼중체 서열의 세트이다. 코돈 세트는 IUB 코드에 따라 아래 나타낸 바와 같이 특정 뉴클레오티드 또는

뉴클레오티드의 등물 혼합물을 지정하기 위해 기호를 사용하여 나타낼 수 있다.

[0957] IUB 코드

[0958] G 구아닌

[0959] A 아데닌

[0960] T 티민

[0961] C 시토신

[0962] R (A 또는 G)

[0963] Y (C 또는 T)

[0964] M (A 또는 C)

[0965] K (G 또는 T)

[0966] S (C 또는 G)

[0967] W (A 또는 T)

[0968] H (A 또는 C 또는 T)

[0969] B (C 또는 G 또는 T)

[0970] V (A 또는 C 또는 G)

[0971] D (A 또는 G 또는 T)

[0972] N (A 또는 C 또는 G 또는 T)

[0973] 예를 들어, 코돈 세트 DVK에서, D는 뉴클레오티드 A 또는 G 또는 T일 수 있고; V는 A 또는 G 또는 C일 수 있고; K는 G 또는 T일 수 있다. 상기 코돈 세트는 18가지 상이한 코돈을 제시할 수 있고, 아미노산 Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, 및 Cys를 코딩할 수 있다.

[0974] 올리고뉴클레오티드 또는 프라이머 세트는 표준 방법을 이용하여 합성할 수 있다. 코돈 세트에 의해 제공되는 뉴클레오티드 삼중체의 모든 가능한 조합을 나타내고, 목적하는 군의 아미노산을 코딩하는 서열을 함유하는 올리고뉴클레오티드의 세트는 예를 들어 고체상 합성에 의해 합성할 수 있다. 특정 위치에서 선택된 뉴클레오티드 "다의성 (degeneracy)"을 갖는 올리고뉴클레오티드의 합성은 당업계에 잘 공지되어 있다. 특정 코돈 세트를 갖는 상기 뉴클레오티드 세트는 시판 핵산 합성기 (예를 들어, 어플라이드 바이오시스템즈로부터 입수 가능함)를 사용하여 합성할 수 있거나, 상업적으로 입수할 수 있다 (예를 들어, 라이프 테크놀로지스 (Life Technologies, 미국 매릴랜드주 록빌)로부터). 따라서, 특정 코돈 세트를 갖는 합성된 올리고뉴클레오티드의 세트는 대개 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함할 것이고, 상기 차이는 전체 서열 내에서 코돈 세트에 의해 확립된다. 본 발명에 따라 사용될 때 올리고뉴클레오티드는 가변 도메인 핵산 주형에 혼성화를 허용하는 서열을 갖고, 또한 클로닝 목적을 위한 제한 효소 부위를 포함할 수 있다.

[0975] 한 방법에서, 변이체 아미노산을 코딩하는 핵산 서열은 올리고뉴클레오티드-매개된 돌연변이 유발에 의해 생성될 수 있다. 상기 기술은 문헌 [Zoller et al, 1987, Nucleic Acids Res. 10:6487-6504]에 기재된 바와 같이 당업계에 잘 공지되어 있다. 간단히 설명하면, 변이체 아미노산을 코딩하는 핵산 서열은 목적하는 코돈 세트를 코딩하는 올리고뉴클레오티드 세트를 DNA 주형에 혼성화함으로써 생성되고, 여기서 주형은 가변 영역 핵산 주형 서열을 함유하는 단일 가닥 형태의 플라스미드이다. 혼성화 후, DNA 중합효소를 사용하여 주형의 전체 제2 상보성 가닥을 합성하고, 이는 따라서 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 것이고, 올리고뉴클레오티드 세트에 의해 제공되는 바와 같은 코돈 세트를 함유할 것이다.

[0976] 일반적으로, 길이가 적어도 25개 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드가 사용된다. 최적 올리고뉴클레오티드는 돌연변이(들)을 코딩하는 뉴클레오티드(들)의 양 측면 상에서 주형에 완전히 상보성이 12 내지 15개의 뉴클레오티드를 가질 것이다. 이는 뉴클레오티드가 단일 가닥 DNA 주형 분자에 적절하게 혼성화할 것을 보장한다. 올리고뉴클레오티드는 문헌 [Crea et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978)]에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 기술을 사용하여 쉽게 합성된다.

- [0977] DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터로부터 유래된 벡터 (상업적으로 이용가능한 M13mp18 및 M13mp19 벡터가 적합함), 또는 문헌 [Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987)]에 기재된 바와 같이 단일 가닥 파지 복제 기점을 함유하는 벡터에 의해 생성된다. 따라서, 돌연변이시킬 DNA를 단일 가닥 주형을 생성하기 위해 상기 벡터 중 하나에 삽입시킬 수 있다. 단일 가닥 주형의 생산은 상기 문헌 [Sambrook et al.]의 섹션 4.21-4.41에 기재되어 있다.
- [0978] 천연 DNA 서열을 변경시키기 위해, 올리고뉴클레오티드를 적합한 혼성화 조건하에 단일 가닥 주형에 혼성화시킨다. 이어서, DNA 중합화 효소, 보통 T7 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I의 Klenow 단편을 첨가하여, 합성을 위한 프라이머로서 올리고뉴클레오티드를 사용하여 주형의 상보성 가닥을 합성한다. 따라서, DNA의 하나의 가닥이 유전자 1의 돌연변이형을 코딩하고, 다른 가닥 (원래의 주형)이 유전자 1의 천연의 비변경된 서열을 코딩하도록 이종이중체 분자가 형성된다. 이어서, 상기 이종이중체 분자를 적합한 숙주 세포, 보통 원핵세포, 예를 들어 이. 콜라이 JM101 내로 형질전환시킨다. 세포를 성장시킨 후 아가로스 플레이트 상에 플레이팅하고, 돌연변이된 DNA를 함유하는 세균 콜로니를 확인하기 위해 32-포스페이트로 방사성 표지된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 스크리닝한다.
- [0979] 바로 앞에 기재된 방법은 플라스미드의 두 가닥이 모두 돌연변이(들)을 함유하는 동종이중체 분자가 생성되도록 변형될 수 있다. 변형은 다음과 같다: 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 상기 기재된 바와 같이 단일 가닥 주형에 어닐링시킨다. 3가지 데옥시리보뉴클레오티드, 즉, 데옥시리보아데노신 (dATP), 데옥시리보구아노신 (dGTP), 및 데옥시리보티미딘 (dTTP)의 혼합물을 dCTP-(aS)로 불리는 변형된 티오데옥시리보시토신 (아머샴 (Amersham)으로부터 입수가능함)과 합한다. 상기 혼합물을 주형-올리고뉴클레오티드 복합체에 첨가한다. DNA 중합효소를 상기 혼합물에 첨가하면, 돌연변이된 염기를 제외하고 주형에 동일한 DNA의 가닥이 생성된다. 또한, 상기 새로운 DNA 가닥은 dCTP 대신에 dCTP-(aS)를 함유할 것이고, 이는 제한 엔도뉴클레아제 소화로부터 보호하는 기능을 한다. 이중가닥 이종이중체의 주형 가닥을 적절한 제한 효소로 절단한 후, 주형 가닥을 ExoIII 뉴클레아제 또는 다른 적절한 뉴클레아제로 돌연변이를 유발시킬 부위(들)을 함유하는 영역을 지나서 소화시킬 수 있다. 이어서, 반응을 중지시켜 단지 부분적으로 단일 가닥인 분자를 남긴다. 이어서, 4가지 모든 데옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트, ATP, 및 DNA 리가제의 존재하에 DNA 중합효소를 사용하여 완전 이중가닥 DNA 동종이중체를 형성한다. 이어서, 상기 동종이중체 분자를 적합한 숙주 세포 내로 형질전환시킬 수 있다.
- [0980] 앞서 나타낸 바와 같이, 올리고뉴클레오티드 세트의 서열은 주형 핵산에 혼성화하기에 충분한 길이이고, 또한 반드시는 아니지만 제한 부위를 함유할 수 있다. DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터로부터 유래된 벡터, 또는 문헌 [Viera et al., (1987) Meth. Enzymol., 153:3]에 기재된 바와 같이 단일 가닥 파지 복제 기점을 함유하는 벡터에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 돌연변이시킬 DNA를 단일 가닥 주형을 생성하기 위해 상기 벡터 중 하나에 삽입되어야 한다. 단일 가닥 주형의 생산은 상기 문헌 [Sambrook et al.]의 섹션 4.21-4.41에 기재되어 있다.
- [0981] 다른 방법에 따르면, 각각의 세트가 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오티드를 갖는 상류 및 하류 올리고뉴클레오티드 세트를 제공함으로써 라이브러리를 생성시킬 수 있고, 상기 상이한 서열은 올리고뉴클레오티드의 서열 내에 제공된 코돈 세트에 의해 확립된다. 상류 및 하류 올리고뉴클레오티드 세트는 가변 도메인 주형 핵산 서열과 함께 중합효소 연쇄 반응에서 사용되어 PCR 산물의 "라이브러리"를 생성할 수 있다. PCR 산물은 확립된 분자 생물학 기술을 이용하여 다른 관련 또는 비관련 핵산 서열, 예를 들어 바이러스 외피 단백질 및 이량체화 도메인과 융합될 수 있으므로 "핵산 카세트"로서 언급될 수 있다.
- [0982] 올리고뉴클레오티드 세트는 주형으로서 가변 도메인 핵산 주형 서열을 사용하는 중합효소 연쇄 반응에서 사용되어 핵산 카세트를 생성할 수 있다. 가변 도메인 핵산 주형 서열은 표적 핵산 서열 (즉, 치환을 위해 표적화되는 아미노산을 코딩하는 핵산 서열)을 함유하는 중쇄 면역글로불린 사슬의 임의의 부분일 수 있다. 가변 영역 핵산 주형 서열은 제1 핵산 가닥 및 상보성 제2 핵산 가닥을 갖는 이중 가닥 DNA 분자의 부분이다. 가변 도메인 핵산 주형 서열은 가변 도메인의 적어도 일부를 함유하고, 적어도 하나의 CDR을 갖는다. 일부 경우에, 가변 도메인 핵산 주형 서열은 1개 초파의 CDR을 함유한다. 가변 도메인 핵산 주형 서열의 상류 부분 및 하류 부분은 상류 올리고뉴클레오티드 세트 및 하류 올리고뉴클레오티드 세트의 멤버와의 혼성화를 위해 표적화될 수 있다.
- [0983] 상류 프라이머 세트의 제1 올리고뉴클레오티드는 제1 핵산 가닥에 혼성화할 수 있고, 하류 프라이머 세트의 제2 올리고뉴클레오티드는 제2 핵산 가닥에 혼성화할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 프라이머는 1개 이상의 코돈 세

트를 포함하고, 가변 영역 핵산 주형 서열의 일부에 혼성화하도록 설계될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드를 사용하면 PCR 후에 2개 이상의 코돈 세트를 PCR 산물 (즉, 핵산 카세트) 내로 도입할 수 있다. 항체 가변 도메인을 코딩하는 핵산 서열의 영역에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프라이머는 아미노산 치환을 위해 표적화되는 CDR 잔기를 코딩하는 부분을 포함한다.

[0984] 상류 및 하류 올리고뉴클레오티드 세트는 또한 올리고뉴클레오티드 서열 내에 제한 부위를 포함하도록 합성될 수 있다. 상기 제한 부위는 추가의 항체 서열을 갖는 발현 벡터 내로 핵산 카세트 (즉, PCR 반응 산물)의 삽입을 용이하게 할 수 있다. 한 실시태양에서, 제한 부위는 외래 핵산 서열을 도입하거나 원래의 CDR 또는 프레임워크 핵산 서열을 제거하지 않으면서 핵산 카세트의 클로닝을 용이하게 하도록 설계된다.

[0985] 핵산 카세트는 PCR 반응을 통해 생성된 표적화된 아미노산 치환을 함유하는 일부 또는 전체 경쇄 또는 중쇄 서열의 발현을 위해 임의의 적합한 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 본 발명에 상세히 기재된 방법에 따라, 핵산 카세트를 전체 또는 일부의 바이러스 외피 단백질에 융합되고 (즉, 융합 단백질을 생성하는) 입자 또는 세포의 표면 상에 디스플레이되는 일부 또는 전체 경쇄 또는 중쇄 서열의 생산을 허용하는 벡터 내로 클로닝한다. 몇몇 종류의 벡터가 이용가능하고 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있지만, 파지미드 벡터가 비교적 쉽게 제작될 수 있고 쉽게 증폭될 수 있으므로 본원에서 사용하기 위해 바람직한 벡터이다. 파지미드 벡터는 일반적으로 프로모터, 신호 서열, 표현형 선별 유전자, 복제 기점 부위, 및 당업자에게 공지된 바와 같은 다른 필요한 성분을 포함한 다양한 성분을 함유한다.

[0986] 특정 변이체 아미노산 조합이 발현되어야 할 때, 핵산 카세트는 전체 또는 일부의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 코딩할 수 있고 변이체 아미노산 조합을 코딩할 수 있는 서열을 함유한다. 라이브러리에서와 같이 상기 변이체 아미노산 또는 변이체 아미노산의 조합을 함유하는 항체의 생산을 위해, 핵산 카세트는 추가의 항체 서열, 예를 들어 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 가변 또는 불변 도메인의 전부 또는 일부를 함유하는 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 상기 추가의 항체 서열은 또한 다른 핵산 서열, 예를 들어 바이러스 외피 단백질을 코딩하는 서열에 융합될 수 있고, 따라서 융합 단백질의 생산을 허용한다.

실시예 4: 가변 영역 서열 결정

[0988] 뮤린 및 인간화 10F4 모노클로날 항체의 핵산 및 아미노산 서열을 표준 절차에 의해 결정하였다. 총 RNA를 마우스 항-인간 CD22 10F4.4.1 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포로부터 RNeasy(등록상표) 미니 키트 (퀴아겐 (Qiagen, 독일))를 사용하여 추출하였다. 변성 (degenerate) 프라이머를 사용하는 RT-PCR을 이용하여 가변 경쇄 (VL) 및 가변 중쇄 (VH) 도메인을 증폭시켰다. 전방향 프라이머는 항체의 VL 및 VH 영역의 N-말단 아미노산 서열에 특이적이었다. 각각, 경쇄 및 중쇄 역방향 프라이머는 종 사이에 고도로 보존되는 불변 경쇄 도메인 (CL) 및 불변 중쇄 도메인 1 (CH1) 내의 영역에 어닐링하도록 설계되었다. 증폭된 VH 및 VL을 pRK 포유동물 세포 발현 벡터 내로 클로닝하였다 (Shields et al., J. Biol. Chem. 276:659-04 (2000)). 일상적인 서열결정 방법을 이용하여 삽입체의 폴리뉴클레오티드 서열을 결정하였다. 뮤린 키메라 10F4 및 인간화 10F4v1 및 인간화 10F4v2 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 도 2A 및 2B에 제시되어 있다.

[0989] 인간화 10F4v1을 HVR-L1 위치 28 (N28)에서 더욱 변형시켰다 (서열 9) (도 2B 참조). 상기 위치에서 아스파라긴 잔기를 발린 잔기 (N28V)로 교체하여 hu10F4v2 및 hu10F4v3 변이체를 위한 HVR-L1 (서열 10)을 생성하였고, 이는 개선된 결합 친화도를 보여주었다. 상기 변이체는 성숙 항체의 동일한 가변 및 불변 도메인 서열을 포함하고, 본 발명의 성숙 항체에서 발견되지 않는 신호 서열에서만 상이하다.

[0990] hu10F4v1의 HVR-L1 초가변 영역 (도 2B)의 아미노산 Asn28 (N28) 및/또는 Asn30 (N30) 중 하나 또는 둘 모두에서 추가의 아미노산 서열 변형을 생성하였다. N28 및 N30은 탈아민화 가능 부위이기 때문에, 상기 부위에서 아미노산 변화를 시험하였다. 예를 들어, 위치 28에서 아스파라긴 (N28)을 별법으로 A, Q, S, D, V 또는 I로 교체하고, 위치 30에서 아스파라긴 (N30)을 별법으로 A 또는 Q로 교체하였다. 본 발명에 따른 HVR-L1 도메인에서 아미노산 서열 변화를 표 1에 표준 절차를 이용하여 과지 ELISA 분석 (IC50)에서 경쟁 분석에 의해 시험한 결합 친화도와 함께 제시한다:

표 2

hu10F4v1 항체의 치환 변이체

HVR-L1에서 아미노산 변화 도 2B	HVR-L1 서열 번호	결합 친화도 (nM)
변화 없음 (N28, N30)	9	8

N28A, N30	19	8
N28Q, N30	20	7.3
N28S, N30	21	12
N28D, N30	22	12
N28V, N30	10	7.3
N28I, N30	23	9.8
N28, N30A	32	7.7
N28, N30Q	33	10

[0992] 인간화 10F4 항체의 전장 인간 IgG1 버전을 생성하기 위해, 중쇄 및 경쇄를 문현에 기재된 pRK 플라스미드 [Gorman, C.M. et al. (1990), DNA Protein Eng. Tech. 2:3] 내로 따로 서브클로닝한다. 적절한 중쇄 및 경쇄 플라스미드 (목적하는 서열 변화(들)에 따라)를 293으로 알려진 아데노바이러스-형질전환된 인간 배아 신장 세포주 [Graham, F.L. et al. (1977), J. Gen. Virol. 36:59] 내로 고효율 절차 ([Graham et al., 상기 문현] 및 [Gorman, C.M., Science 221:551])를 이용하여 동시형질감염시켰다. 배지를 무혈청으로 바꾸고, 5일까지 동안 매일 회수한다. 항체를 단백질 A-세파로스 CL-4B (파마시아 (Pharmacia))를 사용하여 모아진 상등액으로부터 정제한다. 용리된 항체를 G25 웰 여과에 의해 PBS 내로 베퍼 교환하고, Centriprep-30 또는 Centricon-100 (밀리포어 (Millipore))을 사용하여 한외여과에 의해 농축시키고, 4°C에서 저장한다. 항체의 농도는 총 IgG-결합 ELISA를 이용하여 결정한다.

[0993] 본 발명에 따른 예시적인 중쇄 IgG1 불변 도메인은 도 5A에 제시되어 있다. 예시적인 인간 경쇄 κ 불변 도메인은 예를 들어 하기 서열 37을 포함한다: RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHDVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 37). h10F4v2의 전장 아미노산 서열은 경쇄 및 중쇄의 불변 영역을 밑줄로 표시한 도 5B에 제시되어 있다. h10F4v1, v2, 및 v3 항체는 IgG1 이소형이다.

항-CD22 항체의 특징규명

실시예 5: 에피토프 매핑:

[0994] 10F4.4.1 및 5E8.1.8 항체가 결합하는 CD22의 에피토프는 다음 절차에 따라 결정하였다. 주요 CD22 이소형 (CD22베타)의 7개의 면역글로불린-유사 도메인이 다양하게 결여된 CD22 서열을 클로닝하고, 안정한 발현을 위한 세포 내로 형질전환시킨다. 예를 들어, 도메인 1 ($\Delta 1$), 도메인 2 ($\Delta 2$), 또는 도메인 3 및 4 ($\Delta 3,4$)이 결여되는 CD22 변이체를 클로닝하고, CHO 세포 내로 형질전환시키고, 세포 상에 발현시켰다. 대조 세포는 CD22베타를 발현하였다. 결실은 스트라타젠 QuikChange XL™ 시약 키트를 사용하여 수행하였다. 도메인 1의 결실은 아미노산 22-138의 결실에 의해 수행하고; 도메인 2의 결실은 아미노산 139-242의 결실에 의해 수행하고; 결실된 도메인 3 및 4는 소수 이소형 CD22알파 (아미노산 241-417의 결실)로 이용 가능하였다. 모든 아미노산 번호는 문현 [Wilson, G.L. et al., J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991)]의 도 1에 제시된 바와 같은 전장 전구체 CD22 베타의 넘버링을 따른 것이다. 도 14는 결실된 도메인의 분석도이다. 결합은 이소형 대조군을 사용하여 유동 세포 측정에 의해 결정하였다. 10F4.4.1의 결합은 염소 항-마우스 IgG Alexa 488을 사용하여 검출하였다. 5E8.1.8의 결합은 바이오티닐화 염소 항-마우스 IgG + 스트렙타비딘 PE를 사용하여 검출하였다. 특정 ECD 도메인의 부재하에 뮤린 10F4.4.1 또는 뮤린 5E8.1.8 항체의 결합에 대한 유해한 효과는 항체가 상기 도메인에 결합함을 보여주었다. 뮤린 10F4.4.1 및 5E8.1.8은 상기 조건하에 동일한 결합 특징을 보였다. 둘 모두 도메인 1 또는 도메인 2가 결여되는 CD22에 결합하지 않고, 도메인 1 및 2를 포함하지만 도메인 3 및 4가 결여되는 CD22에 결합한다. 상기 방법을 사용하여, 10F4.4.1 및 5E8.1.8은 서열 27의 아미노산 22 내지 아미노산 240으로부터의 서열 내에서 인간 CD22의 도메인 1 및 2에 결합하는 것으로 결정되었다 (문현 [Wilson, G.L. et al., (1991) 상기 문현] 참조).

실시예 6: 가용형 항원에 대한 결합 친화도의 특징규명

[0995] 가용형 CD22 세포의 도메인 (ECD)에 대한 뮤린 및 인간화 10F4 항체의 결합 친화도를 BIACORE(등록상표) 3000 시스템 (비아코아, 인크.)을 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정하였다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코아, 인크.)을 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 염산 염 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 공급자의 지시에 따라 활성화시켰다. 상기 활성화된 칩을 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.8로 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석한 후, 약 500 반응 단위 (RU)의 캐플링된 항체를 달성하기 위해 5 μl /

분의 유속으로 주입함으로써 항-CD22 IgG1 항체 10F4 (뮤린 또는 인간화)로 코팅하였다. 이어서, 1 M 에탄올아민을 주입하여 비반응된 기를 차단하였다. 역학 측정을 위해, 인간 CD22-베타-ECD-His 태깅된 가용형 항원의 2 배 연속 희석액 (약 500 nM 내지 약 7.8 nM)을 0.05% Tween 20이 존재하는 PBS 내에서 25°C에서 30 μ l/min의 유속으로 주입하였다. 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 단순 일대일 랭그워어 결합 모델 (BIAevaluation 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_d)는 비 k_{off}/k_{on} 으로서 계산하였다. 항-CD22 항체인 RFB4를 대조군으로서 사용하였다 (케미콘 인터내셔널, 인크. (Chemicon International, Inc., 미국 캘리포니아주 테메큘라, 카탈로그 no. CBL147). 본 실험의 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0999] [표 2]

[1000] 가용형 인간 CD22에 대한 항-CD22 결합 친화도 (BIACORE(등록상표) 분석)

[1001]

클론	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	K_d (nM)
뮤린 10F4	0.19	2.8	15
키메라 10F4	0.26	4.2	16
인간화 10F4v1	0.18	3.5	19
인간화 10F4v2	0.32	2.5	7.8
대조군 RFB4	0.33	1.4	4.2

[1002]

[1003] 실시예 7: 세포 표면 항원에 대한 결합 친화도의 특징규명

[1004]

CHO 세포의 표면 상에 발현된 인간 및 사이노몰거스 원숭이 (cyno) CD22에 대한 뮤린 10F4.4.1 및 인간화 10F4v1 및 10F4v2의 결합 친화도를 경쟁 분석을 이용하여 검사하였다. 간단히 설명하면, 전장 인간 CD22 (서열 27) 또는 사이노몰거스 원숭이 (cyno) CD22 (서열 31)을 안정하게 발현하는 CHO 세포를 생성한다. 항-CD22 항체 (뮤린 또는 인간화 10F4v1 또는 v2)를 Iodogen(등록상표) [^{125}I] 시약으로 약 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 의 비활성도로 요오드화시켰다. 연속 희석시킨 비표지된 항-CD22 항체를 사용하여 세포-기반 경쟁적 결합 분석을 수행하였다. 항체를 4시간 동안 4°C에서 세포에 결합하도록 하였다. 항체의 결합 친화도 (K_D)는 비-선형 곡선 피팅 프로그램을 이용하여 수행된 표준 Scatchard 분석에 따라 결정하였다 (예를 들어, 문헌 [Munson et al., Anal Biochem, 107: 220-239, 1980] 참조). 본 실험의 결과를 하기 표 3에 나타낸다.

표 3

[1005]

인간 및 Cyno CD22에 대한 10F4 MAb 결합 친화도

항체	인간 CD22 K_d (nM)	Cyno CD22 K_d (nM)
Mu 10F4.4.1	2.4	2.3
Hu 10F4v1*	1.1, 1.7	1.4, 1.8
Hu 10F4v2	1.6	2.1

* 반복 분석

[1006]

[1007] 결과는 뮤린 및 인간화 10F4가 CHO 세포의 표면 상에 발현된 인간 및 cyno CD22에 대략 동등한 친화도로 결합하는 것을 나타낸다.

[1008]

실시예 8: 항체-CD22 항체 약물 접합체의 생산

[1009]

항-CD22 항체 RFB4, 뮤린 5E8, 뮤린 10F4, 인간화 10F4v1, 인간화 Thiomab 10F4v1 (티오-10F4v1), 인간화 10F4v2, 및 인간화 10F4v3을 다음 약물-링커 모이어티에 접합하여 항-CD22 ADC를 생산하였다: spp-DM1, smcc-DM1, MC-vc-PAB-MMAE; MC-vc-PAB-MMAF; MC-MMAE 및 MC-MMAF (상기 약물 및 링커 모이어티는 본원과 WO 2004/010957 (2004년 2월 5일 공개) 및 WO 2006/034488 (2005년 9월 9일 공개) (각각의 특허 출원의 내용이 본원에 참고로 포함됨)에 개시되어 있다). 접합에 앞서, 항체를 WO 2004/010957에 기재된 방법론에 따라 표준 방

법을 이용하여 TCEP로 부분적으로 환원시켰다. 부분적으로 환원된 항체를 문헌 [Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784] 및 US 2005/0238649 A1에 기재된 방법론에 따라 표준 방법을 이용하여 상기 약물-링커 모이어티에 접합하였다. 간단히 설명하면, 부분적으로 환원된 항체를 약물 링커 모이어티와 합하여 시스템에 대한 모이어티의 접합을 허용하였다. 접합 반응을 켄칭시키고, ADC를 정제하였다. 각각의 ADC에 대한 약물 로드 (항체 당 약물 모이어티의 평균 수)를 HPLC에 의해 결정하였다. ADC의 제조를 위한 다른 유용한 링커는 비제한적으로 BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트), 및 비스-말레이미드 시약: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)₃, 및 BM(PEO)₄를 포함한다.

[1010] 항-CD22 ADC는 또한 항체의 라이신 잔기에 대한 접합에 의해 생산한다. 항체의 라이신은 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같이 트라우트 시약 (피어스 케미칼 컴퍼니 (Pierce Chemical Co.))을 사용하여 술피드릴기로 전환된다. 생성되는 술피드릴기는 ADC의 제조를 위한 링커 또는 링커 약물 분자와 반응성이다. 별법으로, ADC는 항-CD22 항체 상의 라이신을 약물 분자에 이미 부착될 수 있거나 후속적으로 약물 분자, 예를 들어 메이탄시노이드와 반응할 수 있는 링커인 SPP (N-숙신이미딜 4-(2'-피리딜디티오)펜타노에이트와 반응시킴으로써 생산된다. 예를 들어, 항체는 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된 문헌 [Wang, L. et al., Protein Science 14:2436-2446 (2005)]에 개시된 바와 같이 SPP와의 반응에 이어, f와의 접합에 의해 변형된다. 항-CD22 항체 상의 라이신 잔기는 또한 SMCC의 아민-반응성 N-히드록시숙신이미드 (NHS 에스테르)가 항체와 안정한 아미드 결합을 형성하도록 링커인 SMCC (피어스 케미칼 컴퍼니)와 pH 7-9에서 반응할 수 있다. SMCC의 술프히드릴-반응성 말레이미드기는 pH 6.5-7.5에서 DM1의 술피드릴기와 반응하여 (피어스 케미칼 컴퍼니, piercenet.com 참고) ADC를 형성한다. 라이신 또는 시스테인 잔기는 링커-약물과 반응하여 평균 약물 로드가 항체 당 약 1-8 링커 약물 분자, 별법으로 항체 당 1-6, 1-4, 1-3 또는 1-2 링커 약물 분자인 ADC를 생산한다.

[1011] ADC 항-CD22(RFB4)-SMCC-DM1 및 항-GP120-SMCC-DM1을 본 방법에 따라 제조하였고, 여기서 RFB4-smcc-DM1은 저 (1.95), 중 (3.7) 및 고 (6.75) 약물 로드로 제조되었다. 항-GP120-smcc-DM1은 고 (6.1) 약물 로드로 제조되었다. 상기 ADC는 하기 실시예 9 및 표 9에 나타낸 바와 같이 생체내에서 효과적인 것으로 나타났다.

[1012] 실시예 9: 항-CD22 항체 약물 접합체의 효능

[1013] 효능 결정자의 시험관내 연구.

[1014] 림프종 세포주에서 항-CD22 ADC (또는 TDC) 효능의 결정자를 결정하였다. B 세포의 표면 상에 발현된 CD22는 그의 리간드(들) 또는 항체의 결합 시에 내재화하는 것으로 알려져 있다 (Sato, S. et al., Immunity 5:551-562 (1996)). CD22의 B 세포 표면 발현 및/또는 CD22의 내재화의 수준이 효능에 영향을 미치는지 및 어떻게 영향을 미치는지 시험하기 위해, 다음 시험관내 연구를 수행하였다.

[1015] 다수 림프종 세포주 상에서 인간 CD22의 표면 발현. 그의 표면 상에 다양한 양의 CD22를 발현하는 19가지 림프종 세포주를 배양하고, 지수 증식기 성장 시에 회수하였다. 세포를 100 μ g/ml의 각각의 정상 마우스 IgG 및 정상 인간 IgG를 함유하는 FACS 세척 버퍼 (PBS; 0.5% 소 혈청 알부민; 0.1% 나트륨 아지드) 내에 재현탁시키고 얼음 상에 유지하였다. 약 1×10^6 세포/100 μ l을 항-huCD22 APC (mIgG1, 클론 RFB4, 서던 바이오테크 (Southern Biotech) #9361-11) 또는 뮤린 IgG1 APC 이소형 (비디 파밍엔 (BD Pharmingen) #555751)으로 얼음 상에서 30분 동안 염색하였다. 죽은 세포를 7-AAD (비디 파밍엔 #559925)로 염색하였다. 데이터는 BD FacsCalibur™ 유동 세포 측정기 상에서 획득하고, FlowJo™ 소프트웨어로 분석하였다. hu10F4v3-SMCC-DM1 또는 각각의 유리 약물 (DM1, MMAF 또는 MMAE)에 대한 IC₅₀ 결정치는 상기한 바와 같은 림프종 세포를 배양하고, 배양된 세포를 지수기에 회수하고, 5,000 세포를 90 μ l 배양 배지/웰로 96 웰 플레이트에 접종함으로써 결정하였다. ADC 및 유리 약물을 검출 범위 내에서 연속 회석하였다 (ADC에 대해 300 μ g/ml, 또는 유리 약물에 대해 90 nM에서 출발하여, 본질적으로 제로 분석 표적으로 회석함). 10 μ l의 회석된 ADC 또는 유리 약물의 분취액을 세포를 함유하는 이중 웰에 첨가하고, 3일 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 각각의 웰에, 100 μ l의 CellTiter Glo™을 첨가하고, 30 min 동안 인큐베이션하였다. 화학발광을 검출하고, 데이터를 Prism™ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 결과는 도 6A에 제시되어 있고, 여기서 높은 표면 CD22 수준은 hu10F4v3-SMCC-DM1의 낮은 IC₅₀ (보다 높은 효능)과 상호관련이 있다. 도 6C는 유리 약물에 대한 세포의 고유 감수성과 ADC의 IC₅₀ 사이에 더 강한 상관관계가 있음을 나타낸다.

[1016] hu10F4v3-SMCC-DM1의 내재화를 FACS 분석에 의해 결정하였다. 간단히 설명하면, 림프종 세포를 hu10F4v3-

SMCC-DM1의 존재하에 표준 FACS 기술에 의해 CD22-FITC (RFB4)로 염색하고, 20-30분 동안 열음 상에서 인큐베이션하였다. 초기 염색 후에 세포 표면 상의 CD22 수준을 결정하기 위해, 세포를 냉 RPMI/10% FBS 배지 내에 세척하고, 200 μ l의 예열시킨 RPMI/10% FBS를 첨가하고, 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 80 μ l 염색 버퍼 및 20 μ l 열 불활성화된 정상 마우스 혈청 (HI NMS)을 첨가한 후, 15분 동안 열음 상에서 인큐베이션하였다. 항-DM1-Alexa-647을 첨가하고, 열음 상에서 20-30분 동안 인큐베이션하고, 세포를 세척하고 200 μ l PBS/1% 파라포름알데히드로 고정시킨 후 FACS 분석하였다. 초기 염색 후에 CD22의 표면 및 내부 염색을 결정하기 위해, 세포를 냉 RPMI/10% FBS로 세척하고, 예열시킨 RPMI/10% FBS를 첨가하고, 세포를 15분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 FACS 세척액으로 세척하고, Fix 시약 A (Dako™ #k2311)로 실온에서 15분 동안 고정시키고, Fix 시약 B (Dako™)를 사용하여 상기 단계를 반복하였다. 염색 버퍼 및 HI NMS를 첨가하고, 세포 혼합물을 열음 상에서 15 min 동안 인큐베이션하였다. Fix 시약 B를 첨가한 후, 항-DM1-Alexa-647을 첨가하고, 실온에서 20-30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 세척액 내에 세척하고, PBS/1% 파라포름알데히드 내에 고정시켰다. FACS 분석을 각각의 세포 혼합물 (표면, 내재화 후 표면, 및 내부 염색)에 대해 BD FacsCalibur™ 유동 세포 측정기를 사용하여 수행하고, FlowJo™ 소프트웨어로 분석하였다. 결과는 도 6B (여기서, 다량의 내재화된 DM1은 낮은 IC50 (높은 효능)와 상호관련이 있다); 및 도 6D (여기서, 내재화된 DM1은 형광 현미경하에 가시화된다)에 제시되어 있다.

[1017] 생체내 효능 연구.

[1018] 생체내에서 종양 부피를 감소시키는 능력에 대해 독소-접합된 또는 비접합된 항-CD22 모노클로날 항체의 효능을 시험하기 위해, 다음 프로토콜을 사용하였다.

[1019] SCID 마우스에게 2×10^7 인간 B-세포 림프종 세포주를 각각 옆구리에 피하 접종하였다. 인간 세포주는 인간 베킷트 림프종 세포주 Daudi, Ramos 및 Raji 세포 (아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (American Type Culture Collection; 미국 베지니아주 매나서스)으로부터 입수가능), 및 다른 B-세포주, 예를 들어 U-698-M 세포 및 Su-DHL-4 세포 (DSMZ로부터 입수가능); Su-DHL-4 세포를 루시퍼라제 리포터 유전자로 형질감염시켰다), DoHH2 세포 (Kluin-Neilemans, H.C. (1991), 상기 문헌), 및 그란타-519 (외투 세포 림프종 세포, Jadayel, D.M. et al., Leukemia 11(1):64-72 (1997)), 및 BJAB-luc 세포 (리포터 유전자 루시퍼라제를 발현하는 BJAB 인간 B-세포 림프모구 세포주)를 포함하였다. 종양이 $100-200 \text{ mm}^3$ 의 평균 종양 부피에 도달했을 때, 마우스를 여러 군으로 나누고, 하기 표 4-16에 나타낸 바와 같이 제0일에 독소-접합된 항체 또는 비접합된 항체로 정맥내 주사하여 처리하였다.

[1020] 항-CD22 메이탄신 약물 접합체는 B-세포 종양 부피를 감소시킨다.

[1021] 65마리의 SCID 마우스에게 2×10^7 BJAB-luc 세포를 0.2 ml/마우스의 부피로 옆구리에 피하 주사하였다. 세포를 HBSS에 혼탁시켰다. 평균 종양 크기가 $100-200 \text{ mm}^3$ 에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 각각 9마리 마우스의 4개 군으로 나누고, 하기 표 4에 나타낸 항-CD22 또는 대조 항체로 단일 I.V. 처리하였다 (꼬리 정맥을 통해).

표 4

[1022] 항체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소

투여된 항체	TI	PR	CR	Ab 용량 (mg/kg)	DM1 용량 (μ g/m 2)	약물 비율 (약물 모이어티/Ab)
항-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	9/9	2	0	3.0	200	4.6
hu10F4v2-smcc-DM1	9/9	0	0	3.4	200	4.0
hu10F4v1	9/9	0	0	3.4	---	---

"TI" - 각각의 군의 마지막 시점에서의 종양 발생률; 분자는 종양-보유 동물의 수를 의미하고, 분모는 동물의 총수를 의미한다. "PR"은 종양이 그의 초기 부피로부터 50-99% 퇴행한 동물의 수를 의미한다. "CR"은 완전 관해를 보인 동물의 수를 의미한다.

[1023] 평균 종양 부피를 각각의 처리군에서 항체 주사 후 32일 동안 모니터링하였다. 종양은 캘리퍼스 (caliper)로 측정하였다. 독소-접합된 항-CD22 항체의 효능은 대조군 및 비접합된 항체에 비교하여 결정하였다. 결과는 도 7A에 제시되어 있다. 뮤린 및 인간화 10F4v1-smcc-DM1 모노클로날 항체는 비접합된 항-CD22 항체 및 비-특이적 대조 항체에 비해 종양 성장을 유의하게 느리게 하였다.

[1024] 상기한 바와 동일한 프로토콜을 사용하여, 하기 표 5에 나타낸 바와 같이 독소-접합된 인간화 10F4v2를 독소-접합된 뮤린 및 네이키드 인간화 항체에 비교하는 분석을 수행하였다.

표 5

[1025] 항체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소

투여된 항체	TI	PR	CR	Ab 용량 (mg/kg)	DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	약물 비율 (약물 모이어티/Ab)
항-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	7/9	1	2	4.7	200	2.9
hu10F4v2-smcc-DM1	8/9	1	1	4.5	200	3.0
hu10F4v2	9/9	0	0	4.5	---	---

"TI" - 각각의 군의 마지막 시점에서의 종양 발생률; 분자는 종양-보유 동물의 수를 의미하고, 분모는 동물의 총수를 의미한다. "PR"은 종양이 그의 초기 부피로부터 50-99% 퇴행한 동물의 수를 의미한다. "CR"은 완전 관해를 보인 동물의 수를 의미한다.

[1026] 평균 종양 부피를 각각의 처리군에서 항체 주사 후 32일 동안 모니터링하였다. 종양은 캘리퍼스로 측정하였다. 독소-접합된 항-CD22 항체의 효능은 대조 및 비접합된 항체에 비교하여 결정하였다. 결과는 도 7B에 제시되어 있다. 뮤린 10F4-smcc-DM1 및 인간화 10F4v2-smcc-DM1 모노클로날 항체는 비접합된 항-CD22 항체 및 비-특이적 대조 항체에 비해 종양 성장을 유의하게 느리게 하였다.

[1027] 항-CD22 항체를 본원에 개시된 접합 방법에 따라 spp 링커 또는 smcc 링커를 통해 DM1에 접합시켰다. 네이키드 항-CD20 항체를 양성 대조군으로서 사용하고, 독소 접합체, 항-HER2-spp-DM1 및 항-HER2-smcc-DM1을 음성 대조군으로서 사용하였다. 80마리의 SCID 마우스에게 2×10^7 BJAB-1uc 세포를 0.2 ml/마우스의 부피로 옆구리에 피하 주사하였다. 세포를 HBSS에 혼탁시켰다. 평균 종양 크기가 100-200mm³에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 각각 10마리 마우스의 6개 군으로 나누고, 시험 또는 대조 항체의 정맥내 주사를 수행하였다. 투여를 총 3회 투여를 위해 매주 1회 반복하였다 (표 6 참조).

표 6

[1028] 항체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소

투여된 항체	Ab 용량 (mg/kg)	DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)
항-Her2-spp-DM1*	4	214
항-Her2-smcc-DM1**	6.9	405
항-CD22-spp-DM1*	5	214
항-CD22-spp-DM1	2.5	107
항-CD22-smcc-DM1**	10	405
네이키드 항-CD22	10	---

* 일치된 약물 로드

** 일치된 약물 로드

- [1029] 평균 종양 부피를 3주 동안 매주 2회, 이어서 그 후 총 8주 동안 매주 1회 모니터링하였다. 시간 경과에 따른 종양 부피의 변화 (도 7C)는 214 및 $107 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 로 투여된 항-CD22-spp-DM1 및 $405 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 로 투여된 항-CD22-smcc-DM1이 BJAB-luc 이종이식편 종양에서 강하고 거의 동등한 항-종양 활성을 보였음을 보여준다. 모든 항-CD22 ADC 군은 완전한 반응을 보였다.
- [1030] 항-CD22 항체, RFB4, 5E8, 및 7A2를 본원에 개시된 접합 방법에 따라 smcc 링커를 통해 DM1에 접합시켰다. 독소 접합체, 항-HER2-smcc-DM1 (본원에서 상호교환가능하게 HER-smcc-DM1 또는 HER2-smcc-DM1로서 언급함)을 음성 대조군으로서 사용하였다.
- [1031] SCID 마우스에서 다양한 이종이식편에서 종양 부피를 감소시키는 상기 항체의 능력을 검사하였다. 마우스에서 이종이식편 종양을 생성하는데 사용되는 인간 B-세포 림프종 세포주는 Ramos 세포 및 BJAB-luc 세포였다. 각각의 이종이식편에 대해, SCID 마우스에게 5×10^6 인간 B-세포 림프종 Ramos 세포를 $0.1 \text{ ml}/\text{마우스}$ 의 부피로 (또는 2×10^7 BJAB-luc 세포를 0.2 ml 로) 옆구리에 피하 주사하였다. 세포를 HBSS에 혼탁시켰다. 평균 종양 크기가 $100-200\text{mm}^3$ 에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 각각 8-10마리 마우스의 군으로 나누고, 각각의 마우스에게 시험 또는 대조 항체를 단일 정맥내 주사하였다. DM1 약물 로딩은 투여된 DM1의 용량을 제공하도록 각 군에 대해 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 으로 표준화하였다. 평균 종양 부피를 4주 동안 매주 2회 모니터링하였다. 결과는 각각 하기 표 7 및 8에 제시되고, 도 8A 및 8B에 플로팅된다.

표 7

항체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소 (Ramos 이종이식편)

투여된 항체	Ab 용량 (mg/kg)	DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)
항-Her2-smcc-DM1	4.2	200
항-CD22(7A2)-smcc-DM1	3.8	200
항-CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200
항-CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200

표 8

항체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소 (BJAB-luc 이종이식편)

투여된 항체	Ab 용량 (mg/kg)	DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	약물 비율 (약물 모이어티/Ab)
항-Her2-smcc-DM1	4.2	200	3.2
항-CD22(7A2)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
항-CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
항-CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200	4.25

- [1034] 상기 결과는 항-CD22-smcc-DM1 항체 약물 접합체가 대조군 항체 또는 네이키드 항-CD22 항체에 비해 Ramos 및 BJAB-luc 이종이식편에서 B-세포 종양 부피를 유의하게 감소시키는 것을 보여준다.
- [1035] BJAB-luc SCID 마우스 이종이식편에서 종양 부피를 감소시키는 항-CD22-smcc-DM1 항체 약물 접합체의 능력에 대

한 항체 약물 로드 (항체의 집단에서 항체 당 접합된 약물 분자의 평균 수)의 영향을 검사하였다. 140 마리의 SCUD 마우스에게 2×10^7 BJAB-luc 세포를 0.2 ml/마우스의 부피로 옆구리에 피하 주사하였다. 세포를 HBSS에 혼탁시켰다. 평균 종양 크기가 100-200mm³에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 각각 8-10마리 마우스의 군으로 나누고, 각각의 마우스에게 시험 또는 대조 항체를 단일 정맥내 주사하였다. 상대적인 저, 중 또는 고 약물 로드 (각각 항체 당 평균 약물 로드 1.95, 3.7, 또는 6.75 접합된 DM1 분자)를 갖는 항-CD22(RFB4)-smcc-DM1의 집단을 시험 항체로서 투여하였다. 네이키드 RFB4 항체 및 항-GP120-smcc-DM1 (고 약물 로드)이 대조군이었다. 항체 약물 접합체 (시험 및 대조)의 용량을 5 mg/kg 단백질 수준의 용량으로 표준화하였다. 항체에 대한 링커 접합체 부착은 라이신 잔기를 통해 이루어진다 (표 9 참조).

표 9

[1036] 항-CD22(RFB4)-smcc-DM1 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소 (BJAB-luc 이종이식편)

투여된 항체	Ab 용량 (mg/kg)	DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	약물 비율 (약물 모이어티/Ab)
항-CD22(RFB4) (네이키드 항체)	10	--	--
항-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (저)	5	144	1.95
항-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (중)	5	273	3.7
항-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (고)	5	497	6.75
항-GP120-smcc-DM1 (고)	5	449	6.1

[1037] 일치시킨 단백질 수준 (5 mg/kg)에서 투여될 때, 고 약물 로드 (6.75 DM1 분자/항체 분자)로 로딩시킨 항-CD22(RFB4)-smcc-DM1은 3.7의 중간 로드의 항체 약물 접합체보다 종양 부피를 약간 더 감소시킨 반면, 저 약물 로드의 항체 약물 접합체의 영향은 대조군 접합체 또는 네이키드 항체와 다르지 않았다. 결과는 도 9에 플로팅 된다.

[1038] 항-CD22 오리스타틴 약물 접합체는 B-세포 종양 부피를 감소시킨다

[1039] 마우스 이종이식편에서 종양 부피에 대한 항-CD22 오리스타틴 MMAF 약물 접합체의 영향을 검사하였다. 항-CD22(RFB4) 및 대조 항체 항-GP120을 본원에 개시된 방법에 따라 MC-vcPAB 링커 또는 MC 링커를 통해 MMAF에 접합시켰다. SCID 마우스에게 5×10^6 Ramos 세포를 0.2 ml/마우스의 부피로 옆구리에 피하 주사하였다. 세포를 HBSS에 혼탁시켰다. 평균 종양 크기가 100-200mm³에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 각각 8-10마리 마우스의 군으로 나누고, 각각의 마우스에게 시험 또는 대조 항체를 단일 정맥내 주사하였다. 약물 용량, 약물 로드 (약물 비율) 및 마우스에 투여된 항체 용량을 표 10에 나타낸다.

표 10

[1040] 항-CD22(RFB4) MMAF 접합체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소 (Ramos 이종이식편)

투여된 항체	MMAF 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 용량 (mg/kg)	약물 비율 (약물 모이어티/Ab)
항-CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAF	405	6.6	4.2
항-CD22(RFB4)-MC-MMAF	405	6.9	4.0
항-GP120-MCvcPAB-MMAF	405	5.8	4.8
항-GP120-MC-MMAF	405	5.9	4.7

[1041] 항-CD22-MC-MMAF는 Ramos RA1 이종이식편에서 항-CD22-MC-vc-PAB-MMAF에 비해 거의 동등한 활성을 보였다. 결과는 도 10에 플로팅된다.

[1042] 마우스 이종이식편에서 종양 부피에 대한 항-CD22 오리스타틴 MMAE 및 DM1 약물 접합체의 영향을 검사하였다.

항-CD22(RFB4) 및 대조 항체 항-GP 120을 본원에 개시된 방법에 따라 MC-vcPAB 링커 또는 MC 링커를 통해 MMAE에 또는 smcc 링커를 통해 DM1에 접합하였다. SCID 마우스에게 5×10^6 Ramos 세포를 0.1 ml/마우스의 부피로 옆구리에 피하 주사하였다. 세포를 HBSS에 혼탁시켰다. PBS를 대조물로서 투여하였다. 평균 종양 크기가 100-200mm³에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 각각 8-10마리 마우스의 군으로 나누고, 각각의 마우스에게 시험 또는 대조 항체를 단일 정맥내 주사하였다. 약물 용량, 약물 로드 (약물 비율) 및 마우스에 투여된 항체 용량을 표 11에 나타낸다.

표 11

[1043] 항-CD22(RFB4) MMAE 및 DM1 접합체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소 (Ramos 이종이식편)

투여된 항체	MMAE 또는 DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 용량 (mg/kg)	약물 비율 (약물 모이어티/Ab)
항-GP120-smcc-DM1	405	6.7	4.1
항-CD22(RFB4)-smcc-DM1	405	6.9	4.25
항-GP120-MCvcPAB-MMAE	405	6.0	4.7
항-CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAE	405	6.3	4.5
PBS	--	--	--

[1044] 항-CD22-MCvcPAB-MMAE는 Ramos RA1 이종이식편에서 강력한 항-종양 활성을 보였다. 항-CD22-MCvcPAB-MMAE는 항-CD22-smcc-DM1에 비해 우월한 활성을 보였다. ADC 대조군, 항-GP120-MCvcPAB-MMAE는 유의한 활성을 보이지 않았다. 결과는 도 11에 플로팅된다.

[1045] 마우스 이종이식편에서 종양 부피에 대한 항-CD22 오리스타틴 MMAF 및 DM1 약물 접합체의 영향을 검사하였다. 항-CD22 hu10F4v2-MC-MMAF, hu10F4v2-smcc-DM1 및 티오-10F4v1-MC-MMAF를 투여하고, 종양 부피에 대한 영향에 대해 비교하였다. 대조군 항체는 항-Her2-MC-MMAF 및 항-Her2-smcc-DM1이었다. SCID 마우스에게 2×10^7 BJAB-luc 세포를 0.2 ml/마우스의 부피로 옆구리에 피하 주사하였다. 세포를 HBSS에 혼탁시켰다. 평균 종양 크기가 100-200mm³에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 각각 8-10마리 마우스의 군으로 나누고, 각각의 마우스에게 시험 또는 대조 항체를 단일 정맥내 주사하였다. "티오"는 본원에 개시된 바와 같은 thioMab을 나타내고, 여기서 링커-약물 모이어티가 항체 상의 시스테인 조작된 부위를 통해 항체에 접합된다. 약물 용량, 약물 로드 (약물 비율) 및 마우스에 투여된 항체 용량을 표 12에 나타낸다.

표 12

Hu10F4 MMAF 및 DM1 접합체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소 (BJAB-luc 이종이식편)

투여된 항체	MMAF 또는 DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 용량 (mg/kg)	약물 비율 (약물 모이어티/Ab)
항-Her2-MC-MMAF	100	1.1	6.3
Hu10F4v2-MC-MMAF	100	2.0	3.4
Hu10F4v2-MC-MMAF	50	1.0	3.4
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	100	4.6	1.5
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	50	2.3	1.5
항-Her2-smcc-DM1	200	4.2	3.2
Hu10F4v2-smcc-DM1	200	4.5	3.0
Hu10F4v2-smcc-DM1	100	2.3	3.0

[1047] Hu10F4v2 ADC는 BJAB-luc 이종이식편에서 강력한 항-종양 활성을 보였다. 결과는 도 12에 플로팅된다.

[1048] 상기 실험에서 개시된 절차를 이용하여, 상이한 이종이식편에서 상이한 용량의 hu10F4v3-smcc-DM1 및 -MC-MMAF ADC 효능을 검사하였다. SuDHL4-luc, DoHH2, 및 그란타-519 이종이식편을 상기 본원에 개시된 바와 같이 제조

하였다. 종양 크기가 100~200mm³에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 각각 8-10마리 마우스의 군으로 나누고, 각각의 마우스에게 시험 또는 대조 항체를 단일 정맥내 주사하였다. 약물 용량, 약물 로드 (약물 비율) 및 마우스에 투여된 항체 용량을 표 13A-13C에 나타내고, 결과는 도 13A-13C에 제시되어 있다.

표 13A

[1049] SuDHL-4-1uc 이종이식편에서 Hu10F4v3 MMAF 및 DM1 접합체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소

투여된 항체	MMAF 또는 DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 용량 (mg/kg)	약물 비율 (약물/Ab)
항-Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	13.6	2.9
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	6.8	2.9
항-Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.3	3.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.0

표 13B

[1050] DoHH2 이종이식편에서 Hu10F4v3 MMAF 및 DM1 접합체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소

투여된 항체	MMAF 또는 DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 용량 (mg/kg)	약물 비율 (약물/Ab)
항-Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	11.8	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
항-Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.1	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
네이키드 hu10F4v3	--	13.1	--

표 13C

[1051] 그란타-519 이종이식편에서 Hu10F4v3 MMAF 및 DM1 접합체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소

투여된 항체	MMAF 또는 DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 용량 (mg/kg)	약물 비율 (약물/Ab)
항-Her2-smcc-DM1	300	5.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	150	2.9	3.35
항-Her2-MC-MMAF	300	4.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	150	3.3	3.04
네이키드 hu10F4v3	--	6.6	--

[1052] 항-CD22 hu10F4v3-smcc-DM1 및 -MC-MMAF ADC는 시험한 모든 이종이식편 모델에서 강력한 종양 감소를 보였다.

[1053] 실시예 10: 시스테인 조작된 항-CD22 항체의 제조

[1054] 시스테인 조작된 항-CD22 항체의 제조를 본원에 개시된 바와 같이 수행하였다. 10F4v2와 동일한 가변 및 불변 영역 서열을 갖는 10F4v3 항체를 코딩하는 DNA (경쇄, 서열 87; 및 중쇄, 서열 88, 도 5B)에 대해 본원에 개시

된 방법에 의해 돌연변이를 유발하여 경쇄, 중쇄 또는 중쇄의 Fc 영역을 변형시켰다. 경쇄를 코딩하는 DNA에 대해 돌연변이를 유발시켜, 도 17A에 제시된 바와 같이 경쇄에서 카바트 위치 205 (순차적인 위치 210)에서 발린을 시스테인으로 치환하였다 (인간화 항체 10F4v3 ThioMab의 경쇄 서열 91). 중쇄를 코딩하는 DNA에 대해 돌연변이를 유발시켜, 도 17B에 제시된 바와 같이 중쇄에서 EU 위치 118 (순차적인 위치 121)에서 알라닌을 시스테인으로 치환하였다 (인간화 항체 10F4v3 ThioMab의 중쇄 서열 92). Fc 영역에 대해 돌연변이를 유발시켜, 도 17C에 제시된 바와 같이 중쇄 Fc 영역에서 EU 위치 400 (순차적인 위치 403)에서 세린을 시스테인으로 치환하였다 (중쇄 서열 93).

[1055] 환원 및 재산화에 의한 접합을 위한 시스테인 조작된 항-CD22 항체의 제조

CHO 세포에서 발현된 전장, 시스테인 조작된 항-CD22 모노클로날 항체 (ThioMabs)를 500 mM 봉산나트륨 및 500 mM 염화나트륨에 약 pH 8.0에서 용해시키고, 약 50-100배 과량의 1 mM TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염산염; [Getz et al., (1999) Anal. Biochem. Vol 273: 73-80]; 솔텍 벤처스)으로 약 1-2시간 동안 37°C에서 환원시켰다. 환원된 ThioMab을 희석하고, HiTrap S 칼럼 상에 10 mM 아세트산나트륨, pH 5 중에 로딩하고, 0.3M 염화나트륨을 함유하는 PBS로 용리시켰다. 용리시킨 환원된 ThioMab을 2 mM 데히드로아스코르브산 (dHAA)으로 pH 7에서 3시간 동안, 또는 2 mM 수성 황산구리 (CuSO_4)로 실온에서 밤새 처리하였다. 주변 공기 산화가 또한 효과적일 수 있다. 베퍼는 Sephadex G25 수지 상에서 용리시켜 교환하고, 1 mM DTPA를 함유하는 PBS로 용리하였다. 용액의 280 nm에서 흡광도, DTNB (알드리치, 미국 위스콘신주 밀워키)와의 반응에 의해 티올 농도 및 412 nm에서 흡광도의 결정으로부터 환원된 항체 농도를 결정함으로써 티올/Ab 값을 검토하였다.

[1057] 실시예 11: 시스테인 조작된 항-CD22 항체 및 약물-링커 중간체의 접합에 의한 시스테인 조작된 항-CD22 항체 약물 접합체의 제조

실시예 10의 환원 및 재산화 절차 후, 시스테인 조작된 항-CD22 항체를 PBS (포스페이트 완충 염수) 베퍼에 용해시키고 열음 상에서 냉각시켰다. 항체 당조작된 시스테인에 비해 약 1.5 몰 당량의 오리스타틴 약물 링커 중간체, 예를 들어 MC-MMAE (말레이미도카프로일-모노메틸 오리스타틴 E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE, 또는 MC-val-cit-PAB-MMAF (티올-반응성 관능기, 예를 들어 말레이미도를 갖는)를 DMSO에 용해시키고, 아세토니트릴 및 물에 희석하고, PBS 중의 냉각시킨 환원되고 재산화된 항체에 첨가하였다. 약 1시간 후, 과량의 말레이미드를 첨가하여 반응을 켄칭시키고 임의의 미반응 항체 티올기를 차단하였다. 반응 혼합물을 원심분리 한외여과에 의해 농축시키고, 시스테인 조작된 항-CD22 항체 약물 접합체를 정제하고, G25 수지를 통해 PBS 내에서 용리시켜 탈염시키고, 0.2 μm 필터를 통해 무균 조건하에 여과하고, 저장을 위해 동결시켰다.

[1059] hu 10F4v3 HC(A118C) ThioMab-BMPEO-DM1의 제조를 다음과 같이 수행하였다. hu 10F4v3 HC(A118C) ThioMab 상의 유리 시스테인을 비스-말레이미도 시약 BM(PEO)4 (피어스 케미칼)에 의해 변형시켜, 항체의 표면 상에 미반응 말레이미도기를 남겼다. 이는 BM(PEO)4를 50% 에탄올/물 혼합물에 10 mM의 농도로 용해시키고, 10배 몰 과량의 BM(PEO)4를 약 1.6 mg/ml (10 마이크로몰)의 농도의 포스페이트 완충 염수 중 hu4D5Fabv8-(V110C) ThioFab를 함유하는 용액에 첨가하고, 1시간 동안 반응시킴으로써 달성하였다. 과량의 BM(PEO)4를 150 mM NaCl 베퍼를 사용하여 30 mM 시트레이트, pH 6 중에서 겔 여과 (HiTrap 칼럼, 파마시아)시켜 제거하였다. 디메틸 아세트아미드 (DMA)에 용해시킨 약 10배 몰 과량의 DM1을 hu4D5Fabv8-(V110C) ThioFab-BMPEO 중간체에 첨가하였다. 약물 모이어티 시약을 용해시키기 위해 디메틸포름아미드 (DMF)를 또한 사용할 수 있다. 반응 혼합물을 밤새 반응시킨 후, PBS 내로 겔 여과 또는 투석하여 미반응 약물을 제거하였다. PBS 중에서 S200 칼럼 상에 겔 여과하여 고분자량 응집물을 제거하고 hu 10F4v3 HC(A118C) ThioMab-BMPEO-DM1을 정제하였다.

[1060] 동일한 프로토콜에 의해, 대조군 HC (A118C) MAb-MC-MMAF, 대조군 HC ThioMab-MC-MMAF, 대조군 HCThiomab-MCvcPAB-MMAE, 및 대조군 HC ThioMab-BMPEO-DM1을 제조하였다.

[1061] 상기 절차에 의해, 다음 시스테인 조작된 항-CD22 항체 약물 접합체를 제조하고 시험하였다:

[1062] A118C 티오 hu 10F4v3 및 MC-MMAF의 접합에 의한 티오 hu 티오-HC-10F4v3-MC-MMAF;

[1063] A118C 티오 hu 10F4v3 및 MC-val-cit-PAB-MMAE의 접합에 의한 티오 hu 티오-HC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE;

[1064] A118C 티오 hu HC-10F4v3 및 bmpeo-DM1의 접합에 의한 티오 hu HC-10F4v3-bmpeo-DM1;

[1065] V205C 티오 hu LC-10F4v3 및 MC-val-cit-PAB-MMAE의 접합에 의한 티오 hu LC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE; 및

[1066] S400C 티오 hu Fc-10F4v3 및 MC-val-cit-PAB-MMAE의 접합에 의한 티오 hu Fc-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE.

[1067] 실시예 12: 세포 표면 항원에 대한 시스테인 조작된 ThioMab 약물 접합체의 결합 친화도의 특징규명

[1068] BJAB-lucs 세포 상에 발현된 CD22에 대한 티오 hu 10F4v3 약물 접합체의 결합 친화도를 FACS 분석에 의해 결정하였다. 간단히 설명하면, 100 μl 중 약 1×10^6 세포를 다양한 양의 다음 항-CD22 ThioMab 약물 접합체 중 하나와 접촉시켰다: 티오 hu LC(V205C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 티오 hu Fc(S400C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 티오 hu HC(A118C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 티오 hu HC(A118C) 10F4v3-MC-MMAF, 또는 티오 hu HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1 (각각 도 18A-18E 참조). 세포 표면에 결합된 항-CD22 항체를 바이오티닐화 염소 항-huFc + 스트렙타비딘-PE를 사용하여 검출하였다. 도 18A-18E의 플롯은 항원 결합이 시험된 모든 ThioMab 약물 접합체에 대해 대략 동일하였음을 나타낸다.

[1069] 실시예 13: 항-CD22 ThioMab 약물 접합체에 의한 생체내 종양 부피 감소의 분석

[1070] 이종이식편 모델에서 B-세포 종양 부피를 감소시키는 실시예 11에 따라 제조된 ThioMab 약물 접합체의 능력을 본원의 실시예 9에 개시된 절차에 따라 시험하였다. 그란타-519 세포 이종이식편 종양을 보유하는 SCID 마우스에게, 대조군 및 항-CD22 인간화 10F4v3 ThioMab 약물 접합체를 제0일에 하기 표 14에 나타낸 용량으로 투여하였다. 대조군 HC(A118C) ThioMab은 항-HER2 4D5 항체였다.

표 14

[1071] 그란타-519 이종이식편에서 티오 Hu10F4v3 MMAE 및 MMAF 접합체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소

투여된 항체	MMAF 또는 DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 용량 (mg/kg)	약물 비율 (약물/Ab)
티오 대조군 HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.99	1.65
티오 대조군 HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.33	1.55
티오 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.41	1.95
티오 10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6
티오 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	3.76	1.8
티오 10F4v3-Fc(S400C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6

[1072] 본 실험의 결과는 도 19에 제시되어 있다. 표 14에 나타낸 용량으로 티오 10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB-MMAE 및 티오 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ThioMab 약물 접합체를 투여하면 연구 기간 동안 평균 종양 부피를 감소시켰다.

[1073] 추가의 ThioMab 약물 접합체를 동일한 프로토콜을 사용하여 CB17 SCID 마우스에서 그란타-519 이종이식편에서 시험하였지만, 상이한 약물 용량을 시험하였다. 대조군 항체 또는 대조군 ThioMab은 항-HER2 4D5 항체 또는 HC(A118C) ThioMab이었다. 결과는 하기 표 15에 나타낸다.

표 15

[1074] 그란타-519 이종이식편에서 티오 Hu10F4v3 MMAE, MMAF, 및 DM1 접합체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소

투여된 항체	MMAF 또는 DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 용량 (mg/kg)	약물 비율 (약물/Ab)
10F4v3-MC-MMAF	150	3.2	3.1
티오 대조군 HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.3	1.9
티오 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	150	5.2	1.9
티오 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
티오 대조군 HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	6.5	1.55
티오 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	5.3	1.9
티오 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	75	2.7	1.9
티오 대조군 HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.2	1.9
티오 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.1	1.95
티오 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	75	2.6	1.95

[1075] 본 실험의 결과는 도 20A에 제시되어 있다. 티오 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ThioMab 약물 접합체를 150 및 $75 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 으로 투여하면 연구 기간 동안 평균 종양 부피를 감소시켰다. 동일한 연구에서, 처음 7일에 체중 변화 비율 (%)를 각각의 투여군에서 결정하였다. 도 20B에 플로팅된 결과는 상기 ThioMab 약물 접합체를 투여하면 상기 기간 동안 체중 손실을 일으키지 않았음을 나타낸다.

[1076] 유사한 연구에서, 상기 실시예에 개시된 것과 동일한 이종이식편 연구 프로토콜을 사용하여, TDC 및 투여된 용량을 변화시키면서, CB17 SCID 마우스에서 여포성 램프종 DOHH2 이종이식편에서 TDC의 효능을 연구하였다. TDC 및 용량을 하기 표 16에 제시한다.

표 16

[1077] DOHH2 이종이식편에서 티오 Hu10F4v3 MMAE, MMAF, 및 DM1 접합체 투여에 의한 생체내 종양 부피 감소

투여된 항체	MMAF 또는 DM1 용량 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 용량 (mg/kg)	약물 비율 (약물/Ab)
10F4v3-MC-MMAF	300	6.4	3.1
티오 대조군 HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	21.9	1.79
티오 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	20.8	1.9
티오 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
티오 대조군 HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	26.0	1.55
티오 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	21.4	1.9
티오 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	300	10.7	1.9
티오 대조군 HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.8	1.9
티오 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.4	1.95
티오 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	300	10.2	1.95

[1078] 도 20C는 동일한 종쇄 A118C 항-CD22 TDC로, 그러나 표 16에 나타낸 바와 같이 보다 높은 용량으로 처리한 CB17 SCID 마우스에서 여포성 램프종 DOHH2 이종이식편에서 시간 경과에 따른 평균 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다. 항-CD22 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC는 본 연구에서 시험 물질 중 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그러나, 본 실험에서 증가된 용량 수준에서, 항-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE 대조군에서 일부 효능이 인지되었다. 상기 활성을 가능하게는 순환 중에 ADC로부터 약물의 방출에 기여가능하다. 항-CD22 hu10F4-HC(A118C)-MC-MMAF 및 -BMPEO-DM1 시험체는 중간 효능을 보였고, 상기 링커의 증가된 안정성과 일치하고, 비-결합 항-HER2 대조군은 낮은 활성을 보였다. 도 20D는 DOHH2 이종이식편 연구로부터 마우스에서 체중 변화 비율 (%)의 플롯이고, 이는 연구의 처음 14일 동안 체중의 유의한 변화가 없었음을 보여준다.

[1079] 실시예 14: 래트 및 사이노몰거스 원숭이에서 항-CD22 약물 접합체의 안전성

[1080] hu10F4 항-CD22 항체는 사이노몰거스 (cyno) 원숭이 CD22와, 인간 CD22에 동등한 친화도로 상호작용한다. hu10F4 항-CD22 항체는 래트 CD22와 상호작용하지 않는다. 그 결과, 항-CD22 약물 접합체의 표적-비의존 및 표적-의존 안전성 및 독성을 각각 래트 및 cyno에서 평가하였다.

[1081] 래트에서의 안전성 및 독성.

[1082] 래트에서 안전성 및 독성 연구를 위해, 2가지 연구를 수행하였다. 한 연구에서, 래트에게 제1일에 약물이 절단 가능한 (-vc- 또는 -spp-) 또는 절단불가능한 (MC 또는 SMCC (MCC로도 언급됨)) 링커를 통해 연결되어 있는 hu10F4v3-SMCC-DM1, -SPP-DM1, -MC-vc-PAB-MMAE, 또는 -MC-MMAF 접합체를 정맥내 투여하였다. 비히클을 대조군으로서 투여하였다. 혈액 샘플을 약동학 분석을 위해 제5일에, 및 제12일 (부검시에)에 수집하였다. 임상 관찰 및 체중 기록을 매주 적어도 3회 수행하였다. 독성의 표시로서 혈청 AST (아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제)를 모니터링하였다. 혈청 AST 수준은 절단가능한 링커를 포함하는 20 mg/kg hu10F4v3-vcMMAE 및 hu10F4v3-SPP-DM1을 투여한 래트에서 제0일에 비해 제5일에 증가하였다 (도 21A). 중성구 수준은 20 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF 또는 hu10F4v3-MCC-DM1 (절단불가능한 링커, 도 21B)을 투여한 래트에서 제0일에 비해 제5일

에 증가하였다. 중성구 수준은 hu10F4v3-vc-MMAE 또는 hu10F4v3-SPP-DM1을 투여한 래트에서 제0일에 비해 제5일에 감소하였다. 절단 가능한 링커를 포함하는 ADC를 투여한 래트에서 증가된 혈청 AST 및 감소된 중성구는 상기 ADC의 증가된 독성을 나타낸다.

[1083] 동일한 래트 연구에서, 군 당 6마리 동물에게 20, 40, 또는 60 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF 또는 hu10F4v3-SMCC-DM1을 제1일에 투여하고, 12일 동안 모니터링하였다. hu10F4v3-MC-MMAF를 투여한 동물에서, 다음 표시자가 관찰되지 않았다: 감소된 체중, 혈청 간 효소의 증가, 혈소판의 감소, 또는 중성구의 감소. hu10F4v3-SMCC-DM1을 투여한 래트에서, 40 및 60 mg/kg의 용량 수준에서 가역적으로 감소된 체중 및 혈청 간 효소의 가역적인 증가가 관찰된 반면, 60 mg/kg 용량에서 중성구의 가역적 감소 및 혈소판의 일시적 감소가 관찰되었다.

[1084] 사이노몰거스 원숭이에서 안전성 및 독성.

[1085] 영장류 모델에서 항-CD22 ADC의 안전성 및 독성을 평가하기 위해, 30마리의 cyno 원숭이를 다음 처리군에 배정하였다: 비히를 대조군 (6마리 동물), 2, 4, 및 6 mg/m² 약물 용량의 용량에서 hu10F4v3-SMCC-DM1 (0, 10, 20, 및 30 mg/kg 항체 용량과 동등함; 4마리 동물/투여군), 및 2, 4, 및 6 mg/m²의 용량에서 hu10F4v3-MC-MMAF (4마리 동물/투여군). 동물에게 제1일 및 제22일에 정맥내 투여하였다. 동물을 체중, 음식 소비, 및 병리학 지표의 변화에 대해 평가하였다. 혈액 샘플을 수집하고, 독성학, 약동학 및 항-약물 항체 효과를 평가하기 위해 분석하였다. 각각의 군의 동물의 절반을 각각 제25일 및 제43일에 안락사시키고, 조직 샘플을 수집하였다.

[1086] 눈에 띄는 체중 변화는 ADC 군에서 관찰되지 않았다. 혈청 간 효소 AST (아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제), ALT (아미노트랜스퍼라제) 및 GGT (감마-글루타밀트랜스펩티다제)의 수준을 당업계에 잘 공지된 표준 방법에 따라 분석하였다. 30 mg/kg로 ADC를 투여한 동물에서 혈청 간 효소의 가역적인 증가가 관찰되었고, 여기서 ALT는 DM1 군에서 상승한 반면, AST 및 GGT는 MMAF군에서 상승하였다. 좌골 신경 변성은 DM1군에서 20 mg/kg의 용량에서 4마리 동물 중 2마리에서 및 30 mg/kg의 용량에서 4마리 동물 중 4마리에서 최소 내지 낮은 수준이었다. 좌골 신경 변성은 MMAF군에서 30 mg/kg의 용량에서 4마리 동물 중 1마리에서 최소였다. 다양한 장기로부터의 조직을 현미경으로 검사하였다. 30 mg/kg MMAF군에서 4마리 동물 중 2마리에서 의미가 알려지지 않은 폐 병변이 있는 반면, DM1군에서는 관찰되지 않았다.

[1087] hu10F4v3-MC-MMAF 및 -SMCC-DM1 ADC에 의한 말초 B 세포의 고갈은 제0일 및 제22일에 투여한 cyno 원숭이에서 43일에 걸쳐 혈액에서 CD20⁺ 세포 수준을 측정함으로써 결정하였다. 연구 동안 주기적으로 수집한 혈액을 형광 표지된 항-CD20 항체를 사용하여 FACS에 의해 분석하였다. 항-CD22 MMAF 및 DM1 ADC는 도 22A (MMAF군) 및 도 22B (DM1군)에 제시된 바와 같이 cyno 말초 B 세포를 고갈시킨다. MMAF 또는 DM1 ADC의 유의한 효과는 CD4⁺ 세포가 동일한 기간에 걸쳐 유의하게 고갈되지 않았음을 보여주는 도 23A 및 23B에 제시된 바와 같이 다른 림프구 집단에 대해 관찰되지 않았다.

[1088] Hu10F4v3-SMCC-DM1은 도 24A 및 24B의 현미경사진에 제시된 바와 같이 대조군에 비해 cyno 원숭이 편도 샘플에서 배 중심 B 세포를 고갈시켰다. 예시적인 배 중심을 도 24A에서 원으로 표시한다. 배 중심 B 세포의 완전 제거가 도 24B에 제시된 바와 같이 10 mg/kg 용량 수준에서 관찰되었다. 동일한 조건하에 hu10F4v3-MC-MMAF ADC의 투여 후 동일한 결과를 얻었다.

[1089] 10 mg/kg로 투여한 Hu10F4v3-MC-MMAF는 cyno 원숭이의 비장 여포 배 중심으로부터 분할하는 B 세포를 고갈시켰다 (도 25A의 분석도와 도 25B 및 25C의 조직 현미경사진 참조). hu10F4v3-SMCC-DM1 ADC를 동일한 조건하에 시험할 때 동일한 결과를 얻었다. 배 중심은 Ki-67 염색을 사용하여 도 25B에서 어두운 영역으로 보이고, 도 25D에서 검출가능하게 표지된 항-IgD로 염색할 때 어두운 영역에 의해 둘러싸인 염색되지 않은 영역으로서 보인다. 항-10F4v3-MC-MMAF에 의한 배 중심 B 세포의 고갈으로 인한 배 중심의 상실은 도 25C 및 25E에 제시되어 있다. 따라서, 상기 항-유사분열 약물은 증식하는 B 세포 집단에 영향을 미친다.

[1090] 다음 하이브리도마를 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (ATCC, 미국 20108 버지니아주 매마서스 피오 박스 549)에 기탁하였다:

[1091]	<u>세포주</u>	<u>ATCC 기탁 번호</u>	<u>기탁일</u>
[1092]	하이브리도마 10F4.4.1	PTA-7621	2006년 5월 26일
[1093]	하이브리도마 5E8.1.8	PTA-7620	2006년 5월 26일

[1094] 상기 기탁은 특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약 (부다페스트 조약)의 규정 및 그의 감독하에 이루어졌다. 이것은 기탁일로부터 30년 동안 기탁물의 생존가능한 배양의 유지를 보장한다. 세포주는 부다페스트 조약의 규정하에 ATCC로부터 이용가능할 것이고, 이는 제넨테크, 인크.와 ATCC 사이의 협정에 따르고, 관련 미국 특허의 등록시에 또는 임의의 미국 또는 타국 특허 출원의 공개시에 (두 시점 중 어느 한 빠른 시점에) 세포주의 영구적이고 비제한적인 이용성을 보장하고, 35 USC § 122 및 미국 특허청장의 규칙 (특히 886 OG 638에 대한 37 CFR § 1.14 포함)에 따라 청장에 의해 자격이 인정된 사람이 세포주를 이용할 수 있음을 보장한다.

[1095] 본원의 양수인은 기탁된 세포주가 적절한 조건하에 배양시에 상실 또는 파괴될 경우 동일한 세포주 시료로 신속하게 교체할 것임을 동의하였다. 기탁된 세포주의 이용가능성은 해당국 특허법에 따라 임의의 정부 당국에서 승인된 권리를 위배하여 본 발명의 실시할 권리로서 간주되지는 않는다.

[1096] 상기한 본 발명은 발명의 명확한 이해를 위해 예시와 실시예에 의해 일부 상세하게 기재되었지만, 상세한 설명과 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 학술 문헌의 개시내용은 그 전문을 명백하게 본원에 참고로 포함시킨다.

도면의 간단한 설명

[0197] 도 1A-1D: 도 1A는 베타 이소형의 세포와 도메인의 7개의 면역글로불린-유사 도메인을 나타내는 CD22의 분석도이다. 알파 이소형은 도메인 3 및 4가 결여된다. "TM"은 막횡단 도메인을 나타낸다. 도 1B는 베타 형의 CD22의 아미노산 서열을 도시한 것이다 (서열 27). 알파 형의 CD22는 이밸리체로 나타낸 아미노산 (세포와 도메인의 도메인 3 및 4를 코딩하는)이 결여된다. 성숙 형태의 단백질의 세포와 도메인은 밀줄로 표시한다 (서열 28). 아미노산 1-21은 성숙 형태로부터 절단된 신호 서열을 도시한 것이다. 도 1C는 CD22알파의 아미노산 서열이다 (서열 29). CD22알파의 ECD는 밀줄로 표시한다 (서열 30). 도 1D는 사이노몰거스 원숭이 (cyno)로부터의 CD22의 아미노산 서열이다 (서열 31). cyno CD22의 처음 19개 아미노산은 신호 서열이다.

[0198] 도 2A-2B: 도 2A는 인간화 10F4 버전 1 항체 (h10F4v1)와 함께 정렬되고 인간 하위군 III 서열과 함께 정렬된 본 발명의 뮤린 10F4 항-CD22 항체 (m10F4)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한 것이다. HVR은 박스로 표시한다 (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3). HVR을 묶는 서열은 프레임워크 서열이다 (FR-H1 내지 FR-H4). 서열은 카바트 넘버링에 따라 넘버링된다. 카바트, 코티아 (Chothia), 및 접촉 (contact) CDR은 박스로 표시한 HVR 둘레에 표시된다. 도 2B는 인간화 10F4 버전 1 항체 (h10F4v1)와 함께 정렬되고 인간 카파 I 서열과 함께 정렬된 본 발명의 뮤린 10F4 항-CD22 항체 (m10F4)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 인간화 10F4 항체의 버전 2 및 3 (h10F4v2 및 h10F4v3)은 분비된 성숙 형태에 대해 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 항체 h10F4v2 및 h10F4v3은 HVR-L1의 아미노산 28 (N28V)에서 h10F4v1과 다르다. HVR은 박스로 표시한다. FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4 서열은 HVR을 묶는다 (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3). 서열은 카바트 넘버링에 따라 넘버링된다. 카바트, 코티아, 및 접촉 CDR은 박스로 표시한 HVR 둘레에 표시된다.

[0199] 도 3A 및 3B는 다음과 같은 서열 식별기호를 사용하여 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적인 억셉터 인간 가변 중쇄 (VH) 컨센서스 프레임워크 서열을 도시한 것이고, 여기서 FR 서열은 FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4 순서로 나열된다:

- 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 26, 47, 48, 7).
- 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 "B," "C" 및 "D" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 50, 51, 52, 7; 서열 50, 51, 52, 7; 및 서열 50, 51, 53, 7).
- 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 54, 55, 56, 7).
- 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 "B," "C," 및 "D" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 57, 58, 56, 7; 서열 57, 58, 59, 7; 및 서열 57, 58, 60, 7).
- 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 61, 62, 63, 7).
- 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 "B," "C," 및 "D" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 64, 65, 63, 7; 서열 64, 65, 66, 7; 및 서열 64, 65, 67, 7).
- 인간 VH 억셉터 1 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 68, 62, 69, 7).

- [0207] - 인간 VH 억셉터 프레임워크 "B" 및 "C" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 64, 65, 69, 7; 및 서열 64, 65, 70, 7).
- [0208] - 인간 VH 억셉터 2 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 68, 62, 71, 7).
- [0209] - 인간 VH 억셉터 2 프레임워크 "B," "C," 및 "D" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 64, 65, 71, 7; 서열 64, 65, 72, 7; 및 서열 64, 65, 73, 7).
- [0210] 도 4A 및 4B는 다음과 같은 서열 식별기호를 사용하여 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적인 억셉터 인간 가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크 서열을 도시한 것이다:
- 인간 VL 카파 하위군 I-1 컨센서스 프레임워크 ($\kappa v1-1$): 서열 74, 75, 76, 77
 - 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 ($\kappa v1$): 서열 74, 78, 76, 77
 - 인간 VL 카파 하위군 II 컨센서스 프레임워크 ($\kappa v2$): 서열 49, 79, 80, 77
 - 인간 VL 카파 하위군 III 컨센서스 프레임워크 ($\kappa v3$): 서열 81, 82, 83, 77
 - 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 ($\kappa v4$): 서열 84, 85, 86, 77
- [0211] 도 5A 및 5B: 도 5A는 천연 서열 인간 IgG Fc 영역 서열, humIgG1 (비-A 동종이형, 서열 38; 및 A 동종이형, 여기서 서열 38 내의 아미노산 서열 SREEM은 SRDEL로 변화된다), humIgG2 (서열 39), humIgG3 (서열 40) 및 humIgG4 (서열 41)의 정렬을 도시한 것이고, 서열들 사이의 차이는 별표로 표시한다. 서열 위의 숫자는 EU 넘버링 시스템을 나타낸다. 예시적인 카파 불변 영역을 또한 도시한다. 도 5B는 인간화 항-CD22 항체 10F4v2, 이소형 IgG1의 경쇄 및 중쇄의 전장 아미노산 서열 (가변 및 불변 영역)을 도시한 것이다. 밑줄로 표시한 부분은 불변 도메인을 보여준다.
- [0212] 도 6A-6D는 림프종 세포주에서 CD22 ADC 효능의 다양한 결정자를 측정하는 분석의 결과를 도시한 것이다. 도 6A는 보다 높은 세포 표면 CD22 수준이 보다 낮은 항-CD22-MCC-DM1 IC50 (보다 높은 효능)에 상호관련되는 것을 나타낸다. 도 6B는 항-CD22-MCC-DM1의 증가된 내재화가 보다 낮은 항-CD22-MCC-DM1 IC50에 상호관련되는 것을 나타낸다. 도 6C는 유리 약물에 대한 세포의 고유 감수성 증가가 보다 낮은 항-CD22-MCC-DM1 IC50에 상호관련되는 것을 나타낸다. 도 6D는 세포 표면 상의 CD22에 결합한 이후 형광 표지된 항-CD22 항체의 내재화를 보여주는 현미경사진이다.
- [0213] 도 7A-7B: 도 7A는 인간 B 세포 종양을 보유하는 SCID 마우스에게 항-CD22 항체 mu10F4-smcc-DM1 및 hu10F4v1-smcc-DM1을 투여하면 종양 부피를 유의하게 감소시킴을 보여주는, 이종이식편 모델에서 생체내 종양 부피 감소의 그래프이다. 약물 로드는 약 4 및 4.6이다 (표 4 참조). 도 7B는 유사한 연구의 그래프이지만, 약물 로드가 약 2.9 및 3.0으로 약간 더 낮았고 (표 5 참조), mu10F4-smcc-DM1 및 hu10F4v2-smcc-DM1 효능을 대조 항체 및 비접합된 mu10F4와 비교하였다. 도 7C는 이종이식편 모델에서 생체내 종양 감소의 그래프이고, 여기서 항-CD22-spp-DM1을 표 6에 지시된 대로 투여하였다.
- [0214] 도 8A 및 8B: 도 8A는 Ramos 세포 이종이식편에 투여된 항-CD22 항체 5E8.1.8-smcc-DM1 및 RFB4-smcc-DM1의 그래프이다. 도 8B는 BJAB-luc 이종이식편에 투여된 항-CD22 항체 5E8.1.8-smcc-DM1 및 RFB4-smcc-DM1의 그래프이다.
- [0215] 도 9는 항-CD22(RFB4)-smcc-DM1의 저, 중 및 고 약물 로드의 투여 후 시간 경과에 따른 종양 부피에 대한 상대적인 영향을 보여주는 그래프이다.
- [0216] 도 10은 Ramos 이종이식편에서 항-CD22(RFB4)-MC-vcPAB-MMAF 또는 항-CD22(RFB4)-MC-MMAF의 투여 후 시간 경과에 따른 종양 부피에 대한 상대적인 영향을 보여주는 그래프이다.
- [0217] 도 11은 항-CD22(RFB4)-smcc-DM1 또는 -MCvcPAB-MMAE의 투여 후 시간 경과에 따른 종양 부피에 대한 상대적인 영향을 보여주는 그래프이다.
- [0218] 도 12는 표 12에 개시된 바와 같이 MMAF 또는 DM1 면역접합체로서 인간화 항-CD22 10F4 변이체의 투여 후 시간 경과에 따른 종양 부피에 대한 상대적인 영향을 보여주는 그래프이다.
- [0219] 도 13A-13C는 상이한 B 세포 림프종 이종이식편 모델인 SuDHL-4 (도 13A), DoHH2 (도 13B), 및 그란타 (Granta)-519 (도 13C)에서 항-CD22-smcc-DM1 또는 항-CD22-MC-MMAF의 투여 후 시간 경과에 따른 종양 부피에

대한 상대적인 영향을 보여주는 그래프이다.

[0225] 도 14는 실시예에 기재된 바와 같은 에피토프 맵핑 (mapping)을 위해 결실된 CD22 도메인의 분석도를 도시한 것이다. 도메인은 1-7로 넘버링된다. "TM"은 막횡단 도메인을 나타낸다.

[0226] 도 15는 약물 모이어티가 경쇄 (LC-ADC); 중쇄 (HC-ADC); 및 Fc 영역 (Fc-ADC) 내의 조작된 시스테인기에 부착되는, 시스테인 조작된 항-CD22 항체 약물 접합체 (ADC)의 도면이다.

[0227] 도 16은 (i) 환원제 TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염산염)를 사용하여 시스테인 조작된 항-CD22 항체 (ThioMab) 내에서 시스테인 디솔피드 애恸트 (adduct)와 사슬간 및 사슬내 디솔피드를 환원시키고; (ii) dhAA (데히드로아스코르브산)을 사용하여 부분적으로 산화, 즉 재산화시켜 사슬간 및 사슬내 디솔피드를 재형성시키고; (iii) 재산화된 항체를 약물-링커 중간체와 접합시켜 시스테인 조작된 항-CD22 항체 약물 접합체 (ADC)를 형성하는 단계를 도시한 것이다.

[0228] 도 17A-17C는 경쇄 또는 중쇄 또는 Fc 영역이 선택된 아미노산 위치에서 시스테인을 조작하도록 변경되는, 본 발명의 항-CD22 시스테인 조작된 항체의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 17A는 카바트 위치 205에서 발린 (순차적인 위치 발린 210)이 시스테인으로 변경되는 항-CD22 10F4 변이체 경쇄의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 17B는 EU 위치 118에서 알라닌 (순차적인 위치 알라닌 121)이 시스테인으로 변경되는 항-CD22 10F4 변이체 중쇄의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 17C는 EU 위치 400에서 세린 (순차적인 위치 세린 403)이 시스테인으로 변경되는 항-CD22 10F4 변이체 Fc 영역의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 각각의 도면에서, 변경된 아미노산은 이중 밑줄이 있는 굵은 문자로 도시된다. 단일 밑줄은 불변 영역을 나타낸다. 가변 영역은 밑줄로 표시하지 않는다.

[0229] 도 18A-18E는 BJAB-lucs 세포의 표면 상에 발현된 CD22에 대한 본 발명의 항-CD22 ThioMab 약물 접합체 (TDC)의 결합이 LC, HC 및 Fc ThioMab 변이체에 대해 및 도시된 상이한 약물 접합체에 대해 유사한 것을 나타내는 FACS 플롯이다.

[0230] 도 19는 조작된 시스테인의 위치 (LC, HC 또는 Fc) 및/또는 약물 접합체 (MMAF 또는 MMAE)가 변화하는 상이한 항-CD22 TDC로 처리된 이종이식편 모델에서 시간 경과에 따른 평균 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다. 항-CD22 10F4-LC-V210C-MCvcP AB-MMAE 및 항-CD22 10F4-HC-A121C-MCvcPAB-MMAE로 처리한 이종이식편 모델은 연구 동안 종양 부피의 감소를 보였다.

[0231] 도 20A는 상이한 링커 약물 모이어티에 접합된 중쇄 A118C 항-CD22 TDC로 처리되고/되거나 나타낸 바와 같이 상이한 용량으로 투여된 CB17 SCID 마우스에서 인간 외투증 세포 림프종 그란타-519 이종이식편에서 시간 경과에 따른 평균 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다. 항-CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC가 본 실험에서 시험체 중에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 도 20B는 동일한 중쇄 A118C 항-CD22 TDC로 처리되지만, 보다 높은 용량으로 처리되는 CB17 SCID 마우스에서 여포성 림프종 DOHH2 이종이식편에서 시간 경과에 따른 평균 종양 부피의 변화를 보여주는 그래프이다. 항-CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC가 본 실험에서 시험체 중에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 도 20C는 연구의 처음 14일 동안 체중의 유의한 변화가 없음을 보여주는, DOHH2 이종이식편 연구로부터의 마우스의 체중 변화 비율 (%)의 플롯이다.

[0232] 도 21A 및 21B는 절단가능한 및 절단불가능한 링커를 포함하는 ADC를 투여한, 제0일 및 제5일에 혈청 AST (아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제) (도 21A) 및 혈청 중성구 (도 21B)의 변화를 보여주는 막대 그래프이다.

[0233] 도 22A 및 22B는 10, 20, 및 30 mg/kg의 항-CD22 MMAF (도 22A) 및 항-CD22 DM1 (도 22B)를 투여한 사이노몰거스 원숭이에서 말초 B 세포 ($CD20^+$ 세포)의 고갈을 보여주는 그래프이다.

[0234] 도 23A 및 23B는 10, 20, 및 30 mg/kg의 항-CD22 MMAF (도 23A) 및 항-CD22 DM1 (도 23B)에서 $CD4^+$ 림프구의 유의한 변화가 없음을 보여주는 그래프이다.

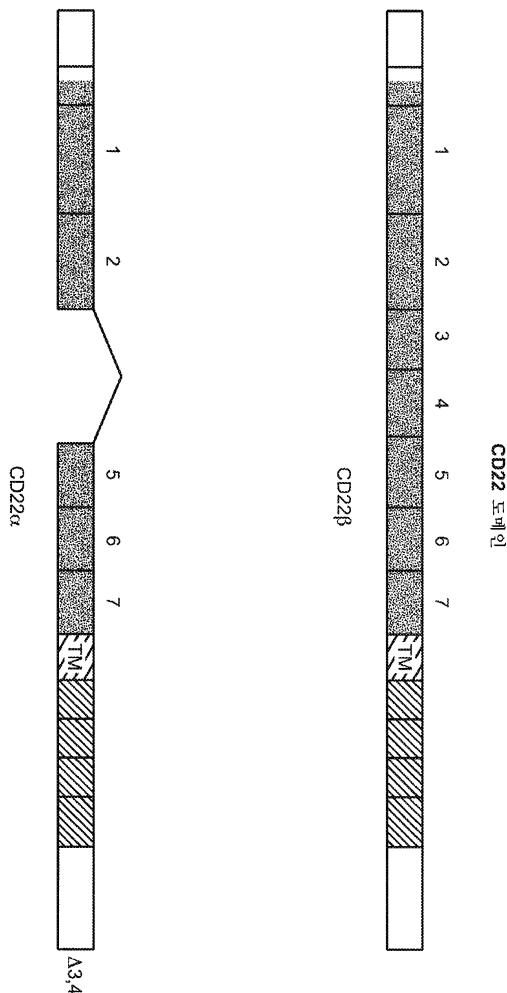
[0235] 도 24A 및 24B는 사이노몰거스 원숭이 편도 조직의 조직학적 샘플을 보여주고, 여기서 비히를 대조군에서 명백한 배 중심 (germinal center) B 세포의 고갈 (도 24A)이 10 mg/kg hu10F4v3-SMCC-DM1을 투여한 동물의 편도 샘플에서 고갈된다.

[0236] 도 25A는 연구를 위해 그로부터 조직 샘플을 취한 비장 여포 (follicle)의 영역을 나타내는 분석도이고, 여기서 항-CD22 ADC가 사이노몰거스 원숭이의 휴면 조직에서 B 세포를 절약하는 것으로 나타났다. cyno 비장 여포 배 중심 내의 분활하는 세포는 hu10F4v3-MC-MMAF를 10 mg/kg로 투여한 동물로부터의 cyno 비장의 분활하는 배아 세

포에서 고갈되었다 (도 25B 및 25C). 비-분할 나이브 B 세포는 동일한 조건하에 고갈되지 않았다 (도 25D 및 25E).

도면

도면1A



도면1B

```

1 mhllgpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacy wipctyrald gdlesfilfh
61 npeynknntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevltl cllnfscygy piqlqwlleg
181 ypmrqaavts tsliksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
241 tpkleikvtp sdaivregds vtmtevvss npeytvswl kdgtstlkgn tftlnirevt
301 kdqsgkyccg vsndvgpgrs eevflqvqya pepstvqilh spavegsqve flicmslanpl
361 ptntytwyhn gemggerteek vhipkilmwh agtyscvaen ilgtgqrpg aeldvqyppk
421 kvttviqnpm piregdtvtl scnynnsnps vtryewkphg aweepslgvl kiqnvgwdnt
481 tiacarcnsw cswaspvaln vqyaprdvrv rkikplseih sgnsvs1qcd fssshpkevq
541 ffwekngll gkesqinfds ispedagsys cwvnnsigqt askawtlevl yaprrrlrvsm
601 spgdqvmegk satltcesda nppvshytwf dwnnqslphh sqklrlepk vqhsgaywcq
661 gtntsvgkgrs plstltvyys petigrrvav glgsclaili laicglklqr rwkrtqsqqg
721 lgenssqqsf fvrnkkvrta plseqphs1g cynpmmedgi syttrlfpeim niprtgdaes
781 semqrpprto ddtvtysalh krqvgdyenv ipdfpedegei hyseliqfgv gerpqaqenv
841 dyvilkh (서열 27)

```

도면1C

1 mhllgpwll1 lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacy wipctyrald gdlesfilh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
 121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlpp iquesgevtlt cllnfscygy piqlqwlleg
 181 vpmrqaavts tsiltiksvft rselkfspgw shhgkivtcq lgadgkfls ndtvqinvkh
 241 ppkkvttviq npmpiregdt vtlschnynss npsvtryewk phgaweepl gvlkigqnvgw
 301 dnttiacaac nswcswaspv alnvqyaprd vrvrkikpls eihsgnsvsl qcdfssshpk
 361 evgffwekng rllgkesqln fdsispedag syscwvnnsi gqtaskawtl evlyaprrlr
 421 ysmspgdqvm egksatlce sdnappvshy twfdwnqsl pyhsqkirle pvvqnhsgay
 481 wcqgtnsvgk grsplstltv yspetigr vavglgscla ililaicglk lqrwkrtqs
 541 qqglqenssg qsffvrnkvv rraplseph slgcncpmme dgisyttlrf pemniprtqd
 601 aessemqrpp pdcdtvtys alhkraqvgm rtsfqifqkm rgfitqs (서열 29)

도면1D

MHLLGPWLLLEYLAFLSDS SKWNIEHPGTIYAWEGACI WVPCTYRVL DGA
 LETFILFHNP EYNQNM SKFEGTRLYEST KDGKVP SGKRVQFLGNKINNNC
 TLSIHPVHVNDSGQLGLRMVSKTEKW MERIHLNV SERPFPPI QLPPKLQE
 SQEVTLTCLLNFS CYGYQIQLQWLLEGAPMRQA AVTLSLSTS VFT RSEL
 KFSPQWSHHGKIVTCELHDVDGKVLS ETDVQLNVKHTPKLTIEVT PNETIV
 RKGD SVTMTCKVN SSNPEYTTV SWLKDDIPLKEQNTLM TLHEVTKS QTGT
 YCCRVSN DVGPATSEK VFLQVQYAPEPSRVQIS QSPAVEGSEVN FLC ISPA
 NPLPTNYTWYHN GKEVQGRTEK QFQI QKILP WHACTYSCVAEN ILGIGERG
 PGTEL DVQYPPKKV TMVIENPTPIREGDT VTLSC NYSSNPIV NHYEWRPR
 GAWEEP S LGVLK I QNI GWNNNTAVACA ACNNWCS WASP VTLN VLYA PRGV RV
 RKLKPLSEI HSGNLVSLQCD FSSSHPKEVQFFWEKNGSLLGKES QLN FDSI
 SPEDAGSYSCWVNNSI GQASKAWTLEVLYA PRLRVSMSQGNQVM EGKTA
 ILCESDANPPVSYAWFDWNNQSLPYSGRMLRLEPV KVQHS GAYWCQGTN
 RVKGHSPLITLT VYYS PETIGRR VAVGLGSCLAILLILAMCGFKVQRRWKR
 TQS QGLQENSSGGSFFVRNKKV RRTPLSEGPHSLGCYNPM MEDG ISYATL
 RF PETNT PRTGDAETSELQRLPPD CDDTVTYSV LQKRQVG DYENVIPDFPE
 DEGIHYSELIQFGFGERPQAQENV DVIVVKH (서열 31)

도면2B

정체 가변 도메인
형-CD22 10F4 면 이체의 서열 정렬

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

카비트-CDRL1

코티아-CDRL1

침족 - CDR L1

humKI	D	I	Q	M	T	O	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	M	Y	L	A	W	Y	Q					
카비트	10F4	D	I	I	M	T	O	T	P	I	S	I	P	V	S	I	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	I	V	H	S	N	G	N	T	F	I	E	W	Y	L
h10F4.v1	D	I	I	M	T	O	S	P	S	S	I	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	S	I	V	H	S	N	G	N	T	F	I	E	W	Y	Q	
h10F4.v2	D	I	I	M	T	O	S	P	S	S	I	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	S	I	V	H	S	V	G	N	T	F	I	E	W	Y	Q	

38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

카비트-CDR L2

코티아-CDR L2

침족 - CDR L2

humKI	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	I	T	I	S	R	V	E	A
카비트	10F4	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	I	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	I	T	I	S	L	Q	P	
h10F4.v1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	I	T	I	S	L	Q	P	
h10F4.v2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	I	T	I	S	L	Q	P	

81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107

카비트-CDR L3

코티아-CDR L3

침족 - CDR L3

humKI	E	D	F	A	T	I	V	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	R	V	E	I	K	서열 25	
카비트	10F4	E	D	D	G	V	I	C	F	Q	G	S	Q	F	P	T	T	F	G	G	G	T	R	K	V	E	I	K	서열 35
h10F4.v1	E	D	F	A	T	I	V	C	F	Q	G	S	Q	F	P	T	T	F	G	Q	G	T	R	K	V	E	I	K	서열 17
h10F4.v2	E	D	F	A	T	I	V	C	F	Q	G	S	Q	F	P	T	T	F	G	Q	G	T	R	K	V	E	I	K	서열 18

도면3A

I	A B C D	QVOLVOSGAEVKPGASVVKVSCKASGYTFT QVOLVQSGAEVKKPGASVVKVSCKAS QVOLVQSGAEVKKPGASVVKVSCKAS QVOLVQSGAEVKKPGASVVKVSCKAS	-H1- -H1- -H1-	-H1-	WVRQAPGGGLEWMG WVRQAPGGGLEWM WVRQAPGGGLEWM WVRQAPGGGLEWM	-H2- -H2- -H2- -H2-	RVTIT RVTIT RVTIT RVTIT
II	A B C D	QVOLQESGGPLVKPSQTSLITCTVS QVOLQESGGPLVKPSQTSLITCTVS QVOLQESGGPLVKPSQTSLITCTVS QVOLQESGGPLVKPSQTSLITCTVS	-H1- -H1- -H1-	-H1-	WIROPPGKGLEWIG WIROPPGKGLEWII WIROPPGKGLEWII WIROPPGKGLEWII	-H2- -H2- -H2- -H2-	RVTIS RVTIS RVTIS RVTIS
III	A B C D	EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAASGFTFS EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAAS EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAAS EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAAS	-H1- -H1- -H1-	-H1-	WVRQAPGGGLEWWS WVRQAPGGGLEWW WVRQAPGGGLEWW WVRQAPGGGLEWW	-H2- -H2- -H2- -H2-	RFTIS RFTIS RFTIS RFTIS
억제부-1	A B C D	EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAASGPNIK EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAAS EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAAS EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAAS	-H1- -H1- -H1-	-H1-	WVRQAPGGGLEWWS WVRQAPGGGLEWW WVRQAPGGGLEWW WVRQAPGGGLEWW	-H2- -H2- -H2- -H2-	RFTIS RFTIS RFTIS RFTIS
억제부-2	A B C D	EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAASGPNIK EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAAS EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAAS EVOLVESGGGLVOPGGSIRLSCAAS	-H1- -H1- -H1-	-H1-	WVRQAPGGGLEWWS WVRQAPGGGLEWW WVRQAPGGGLEWW WVRQAPGGGLEWW	-H2- -H2- -H2- -H2-	RFTIS RFTIS RFTIS RFTIS

도면3B

I	A ADTSTSTAYMELSSIRSEDTAVYICAR B ADTSTSTAYMELSSIRSEDTAVYICAR C ADTSTSTAYMELSSIRSEDTAVYICAR D ADTSTSTAYMELSSIRSEDTAVYIC	-H3- -H3- -H3- -H3-	WGQGTLVTVSS WGCGTLVTVSS WGQGTLVTVSS WGQGTLVTVSS	서열: 26, 47, 48, 7 서열: 50, 51, 48, 7 서열: 50, 51, 52, 7 서열: 50, 51, 53, 7
II	A VDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYICAR B VDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYICAR C VDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYICAR D VDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYIC	-H3- -H3- -H3- -H3-	WGCGTLVTVSS WGQGTLVTVSS WGCGTLVTVSS WGQGTLVTVSS	서열: 54, 55, 56, 7 서열: 57, 58, 59, 7 서열: 57, 58, 59, 7 서열: 57, 58, 60, 7
III	A RDNSKNTLYLQMNSTRADTAVYICAR B RDNSKNTLYLQMNSTRADTAVYICAR C RDNSKNTLYLQMNSTRADTAVYICAR D RDNSKNTLYLQMNSTRADTAVYIC	-H3- -H3- -H3- -H3-	WGQGTLVTVSS WGCGTLVTVSS WGQGTLVTVSS WGCGTLVTVSS	서열: 61, 62, 63, 7 서열: 64, 65, 63, 7 서열: 64, 65, 66, 7 서열: 64, 65, 67, 7
외제부 1	A ADTSKNTAYLQMNSTRADTAVYICSR B ADTSKNTAYLQMNSTRADTAVYICSR C ADTSKNTAYLQMNSTRADTAVYICSR D ADTSKNTAYLQMNSTRADTAVYIC	-H3- -H3- -H3- -H3-	WGCGTLVTVSS WGQGTLVTVSS WGCGTLVTVSS WGQGTLVTVSS	서열: 68, 62, 69, 7 서열: 64, 65, 69, 7 서열: 64, 65, 70, 7 서열: 64, 65, 70, 7
외제부 2	A ADTSKNTAYLQMNSTRADTAVYICAR B ADTSKNTAYLQMNSTRADTAVYICAR C ADTSKNTAYLQMNSTRADTAVYICAR D ADTSKNTAYLQMNSTRADTAVYIC	-H3- -H3- -H3- -H3-	WGQGTLVTVSS WGCGTLVTVSS WGCGTLVTVSS WGQGTLVTVSS	서열: 68, 62, 71, 7 서열: 64, 65, 71, 7 서열: 64, 65, 72, 7 서열: 64, 65, 73, 7

도면4A

kv1	DIQMTQSPSSLSAVGDRVTITC	-L1-	WYQQKPGKAPKLLIY	-L2-	GVPDSRFSGSGSGTDFLTISISSLQP
kv1	DIQMTQSPSSLSAVGDRVTITC	-L1-	WYQQKPGKAPKLLIY	-L2-	GVPDSRFSGSGSGTDFLTISISSLQP
kv2	DIVMTQSPSLPLPVTPGEPASISC	-L1-	WYQQKPGKAPKLLIY	-L2-	GVPDRFSGSGSGTDFLTIKISRVEA
kv3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	-L1-	WYQQKPGQAPRLIY	-L2-	GIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP
kv4	DIVMTQSPDLSAVSLIGERATINC	-L1-	WYQQKPGQPPKLLIY	-L2-	GVPDRFSGSGSGTDFLTISISSLQA

도면4B

kv1	EDFATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	서열	74, 75, 76, 77
kv1	EDFATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	서열	74, 78, 76, 77
kv2	EDVGVYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	서열	49, 79, 80, 77
kv3	EDFAVYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	서열	81, 82, 83, 77
kv4	EDVAVYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	서열	84, 85, 86, 77

도면5A

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPPKDSDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPPKDSDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPPKDSDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPPKDSDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV	****		*	*
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP	*	*	*	*
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTIASKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
			D L		
humIgG2	APIEKTIASKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTIASKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSIETKTIASKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV	**	*	*	
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG4	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH	*	*	*	*
	430	440			
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK		서열 38		
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK		서열 39		
humIgG3	EALHNRTQKSLSLSPGK		서열 40		
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSPGK	***	서열 41		

도면5B

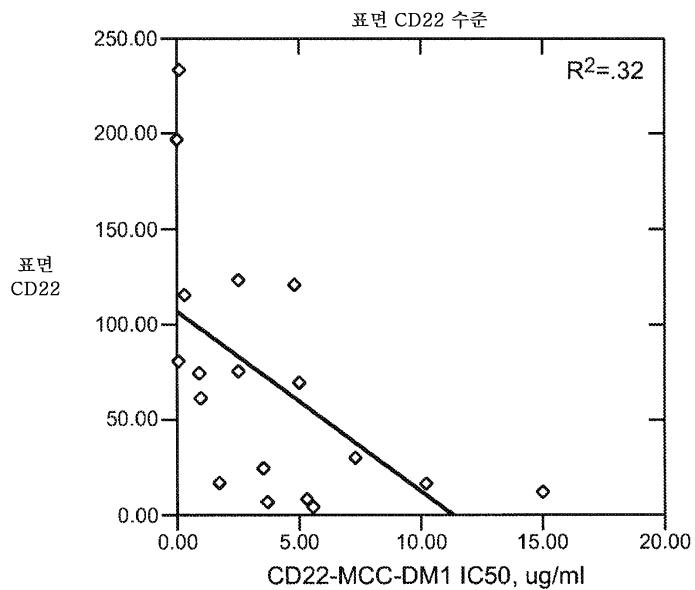
항-CD22 h10F4v2 경쇄

DIQMTQSPSSLSAVGDRVITCRSSQSIVHSGVNTFLEWYQQKPGKAPL
LYKVSNRFGVPSRFSGSGSTDFLTISLQPEDFATYYCFCQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPEREAKVQWKVDNAL
QSGNSOESTVTEQDSKDSTYSLSSLTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (서열 87)

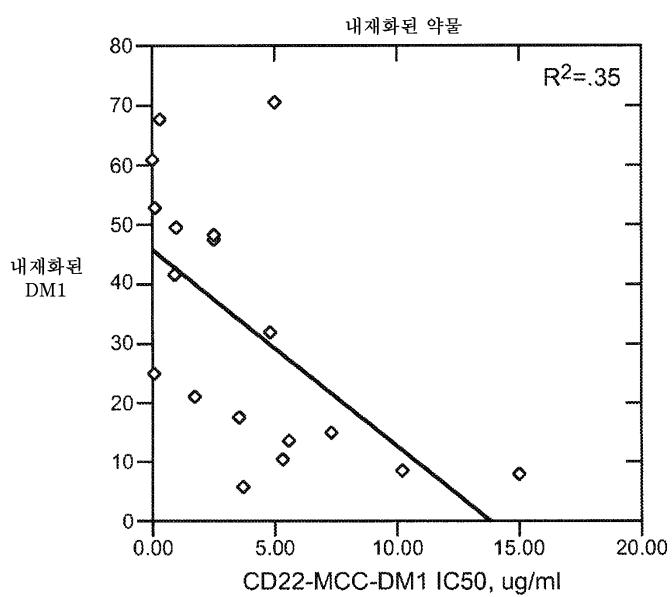
항-CD22 h10F4v2 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGFRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWQGQTIVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYPFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPVFLQSSGLYSSVVTPVSSSLGTOTYICVNHNKPSNT
KVDDKKVPEKSCDKTHTCPCPAPAEPLLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDPGEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNL
GKEYKCKVSNKAKPIEKTTSKAKGQPREEQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGN
VFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK (서일 88)

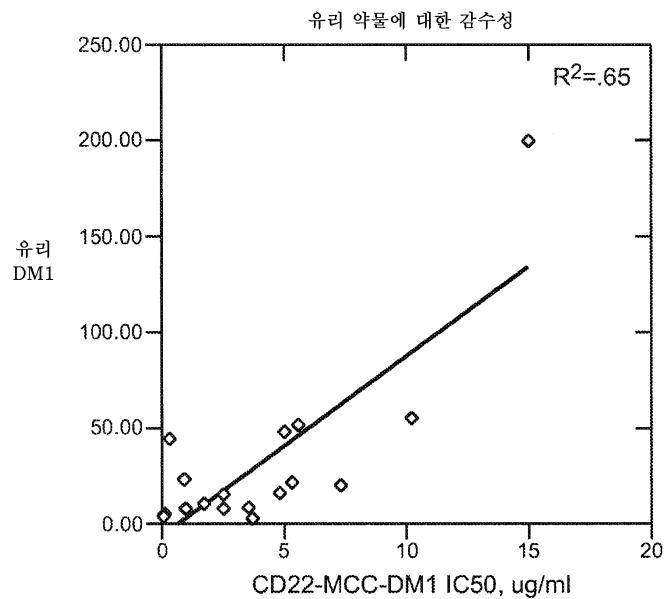
도면6A



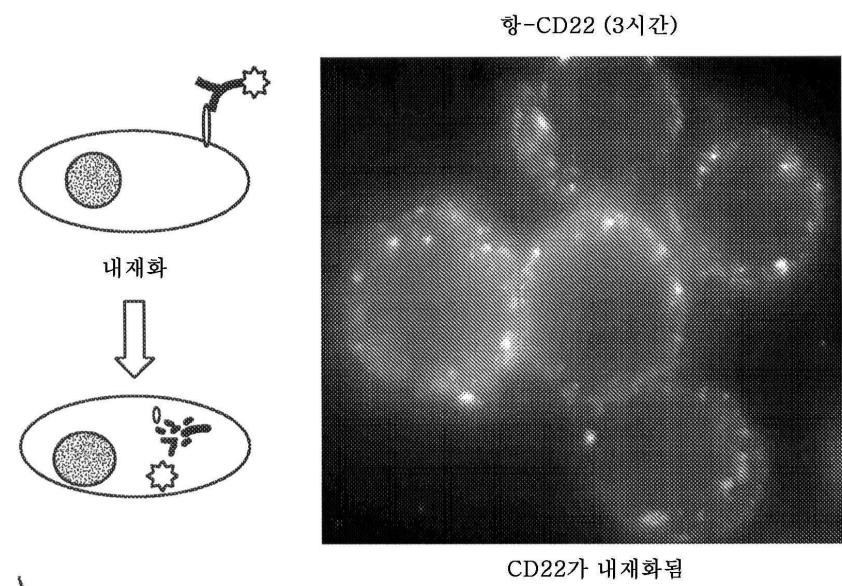
도면6B



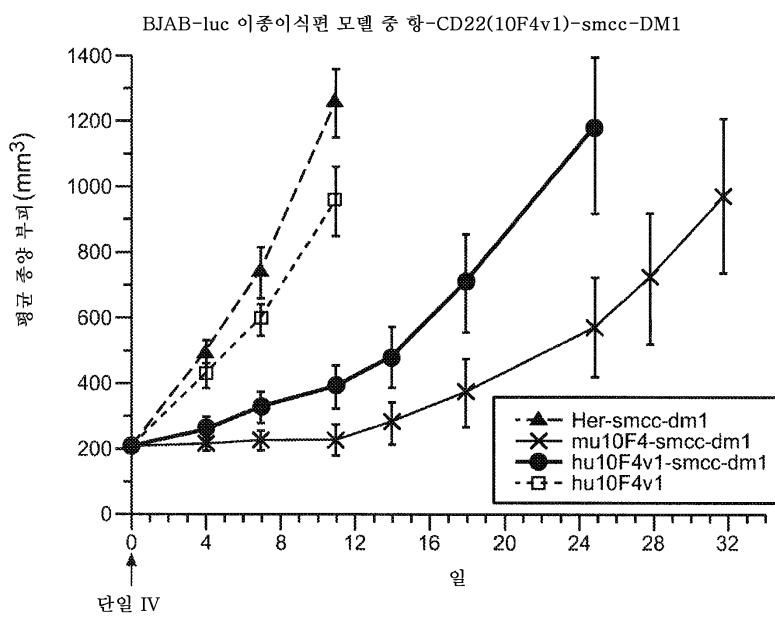
도면6C



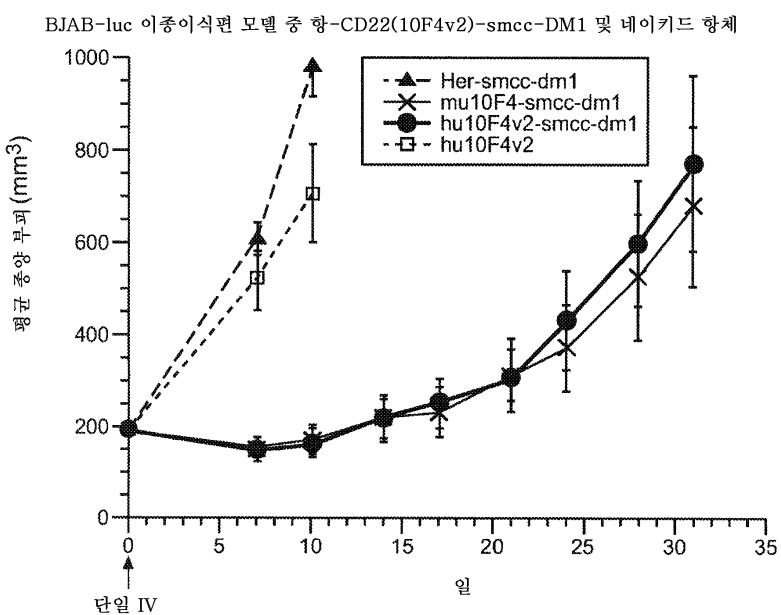
도면6D



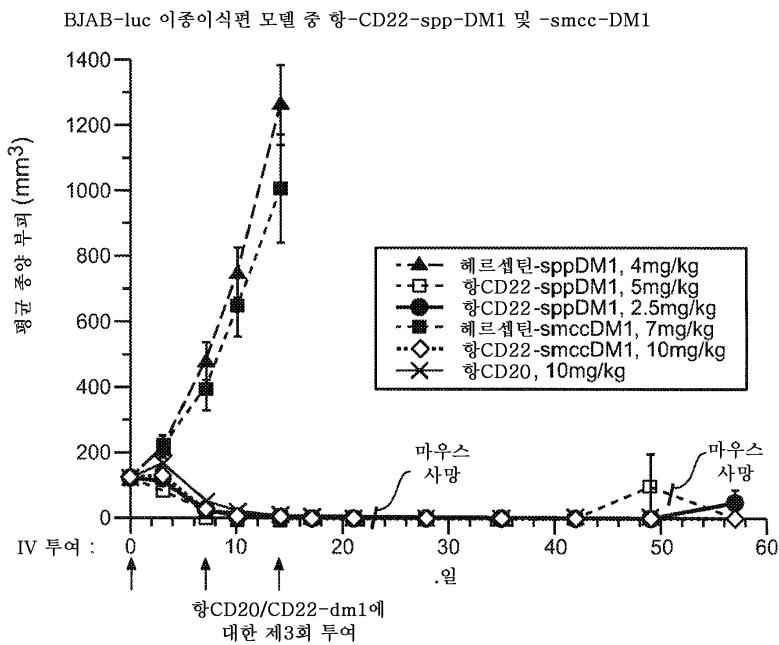
도면7A



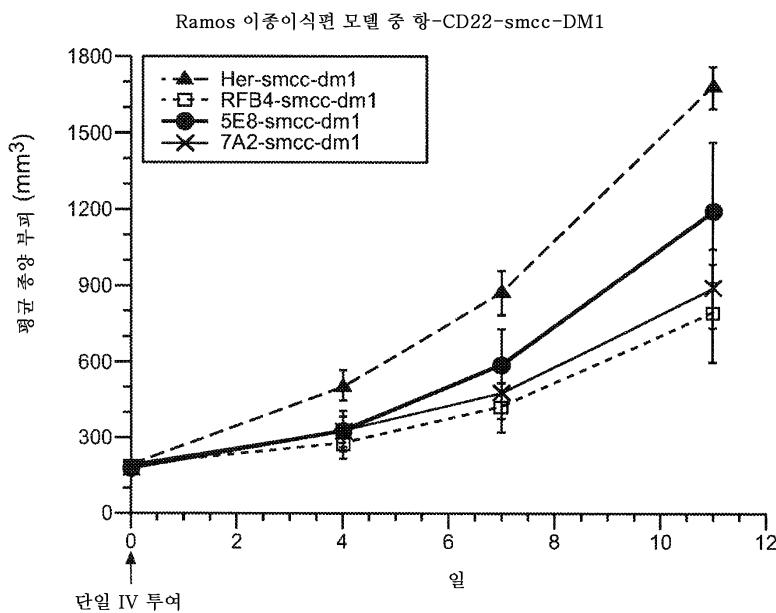
도면7B



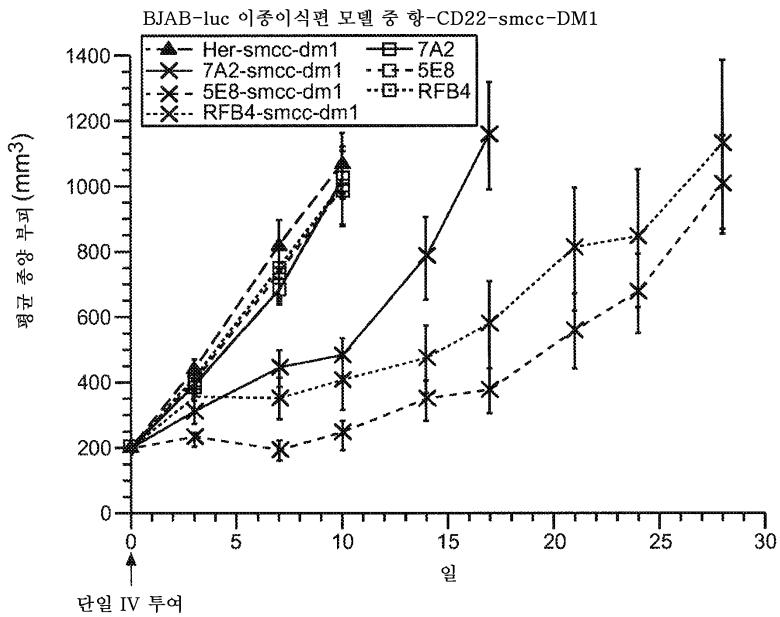
도면7C



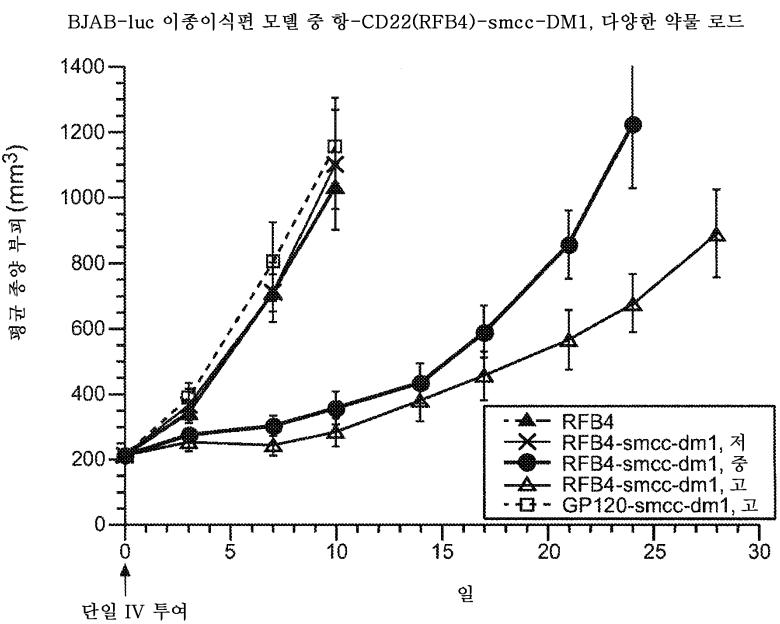
도면8A



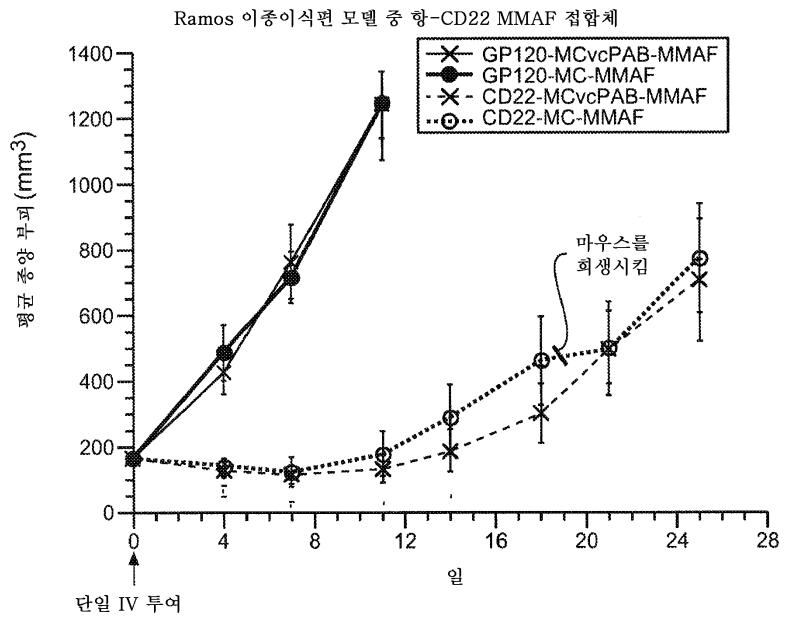
도면8B



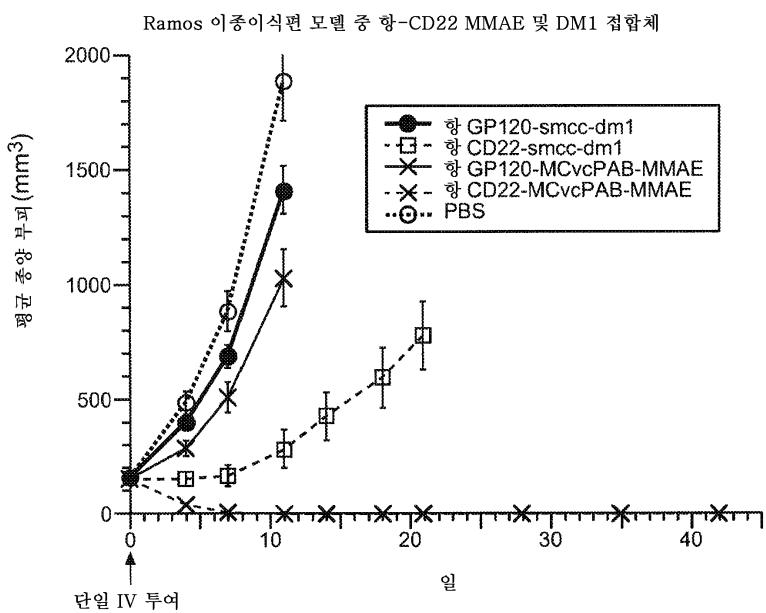
도면9



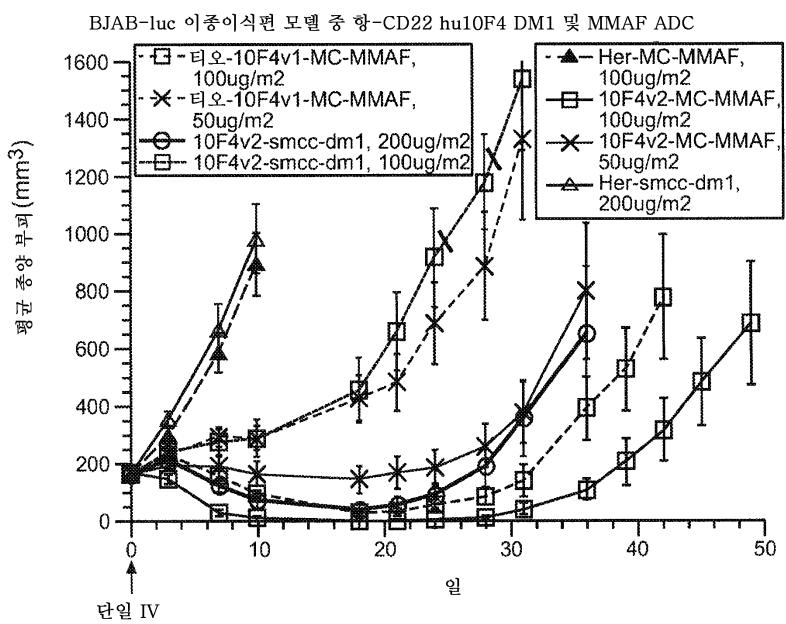
도면10



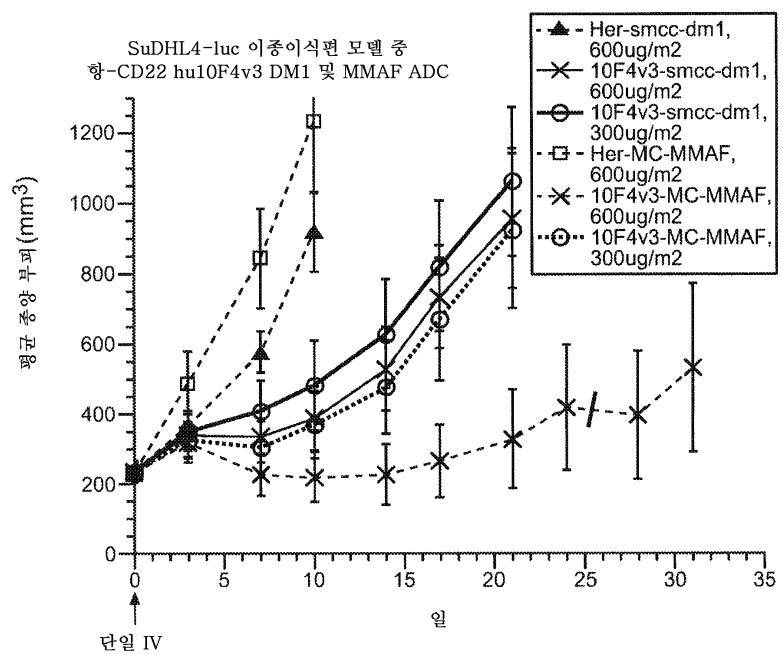
도면11



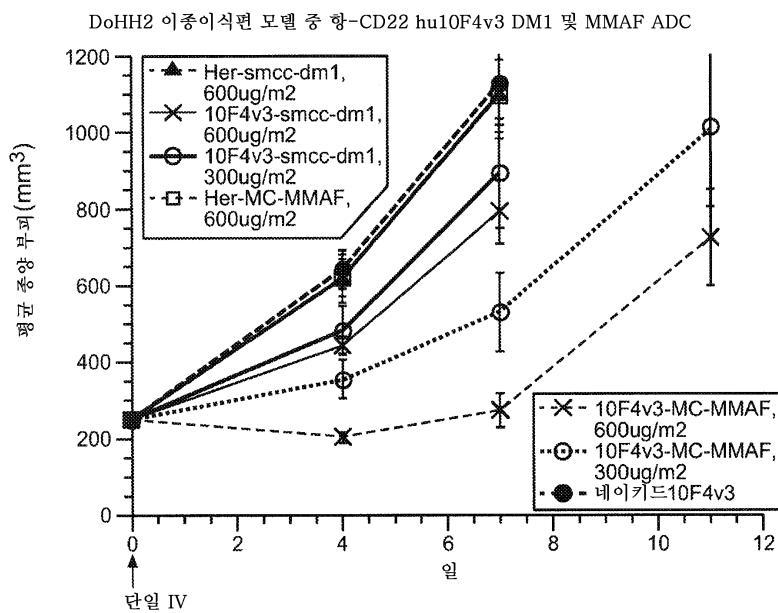
도면12



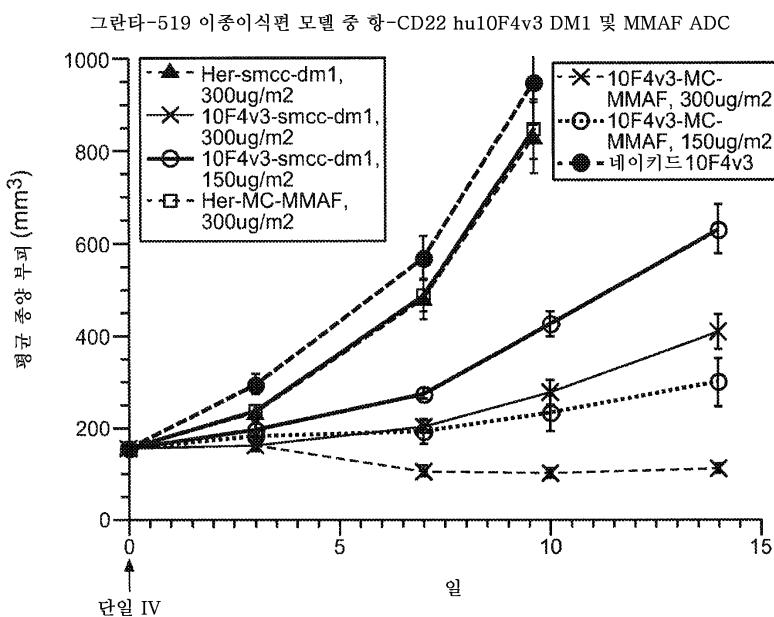
도면13A



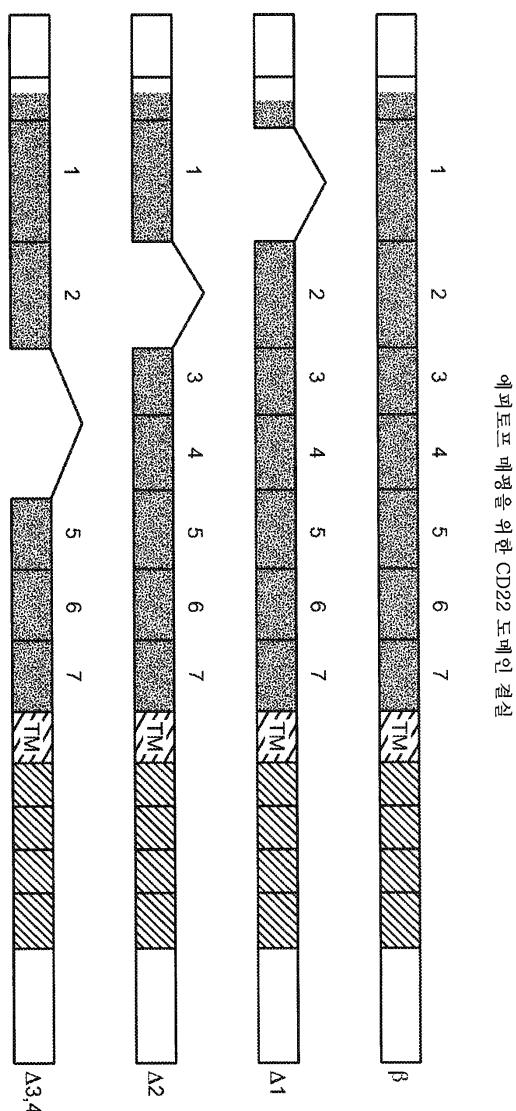
도면13B



도면13C

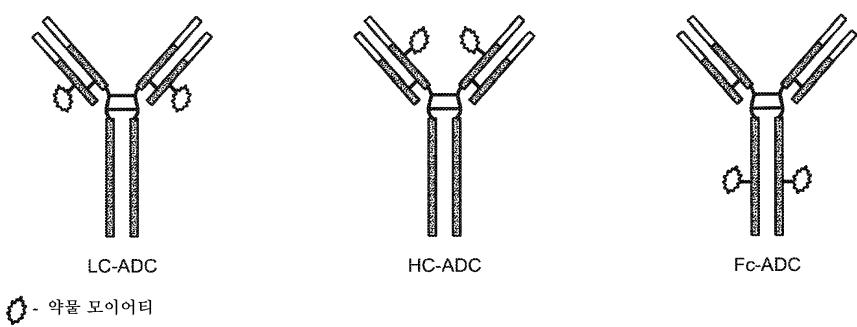


도면14



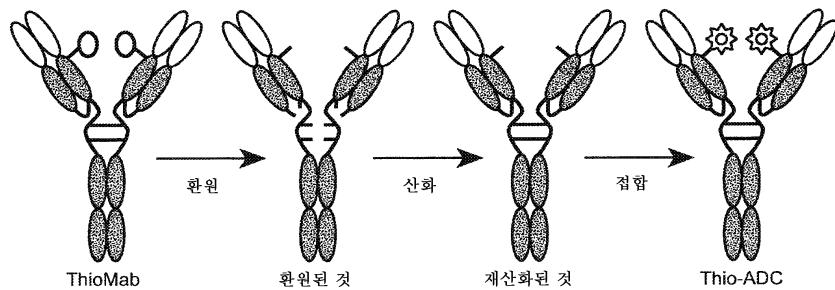
에피토프 배포를 위한 CD22 도메인 결실

도면15



○ - 약물 모이어티

도면16



도면17

항-CD22 V205C h10F4v3 시스테인 조작된 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSGVNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
 YKVSNRFSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL
OSGNSQESVTQEDSKDSTSLSSTLTSKADYEKKHVYACEVTHQGLSSPCTK
SFNRGEC (서열 91)

A

항-CD22 A118C h10F4v3 시스테인 조작된 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIGP
 GDGDTNYSGKFGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTIVTVSSCSTKGPSVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPGPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGOPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQOGN
VFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK (서열 92)

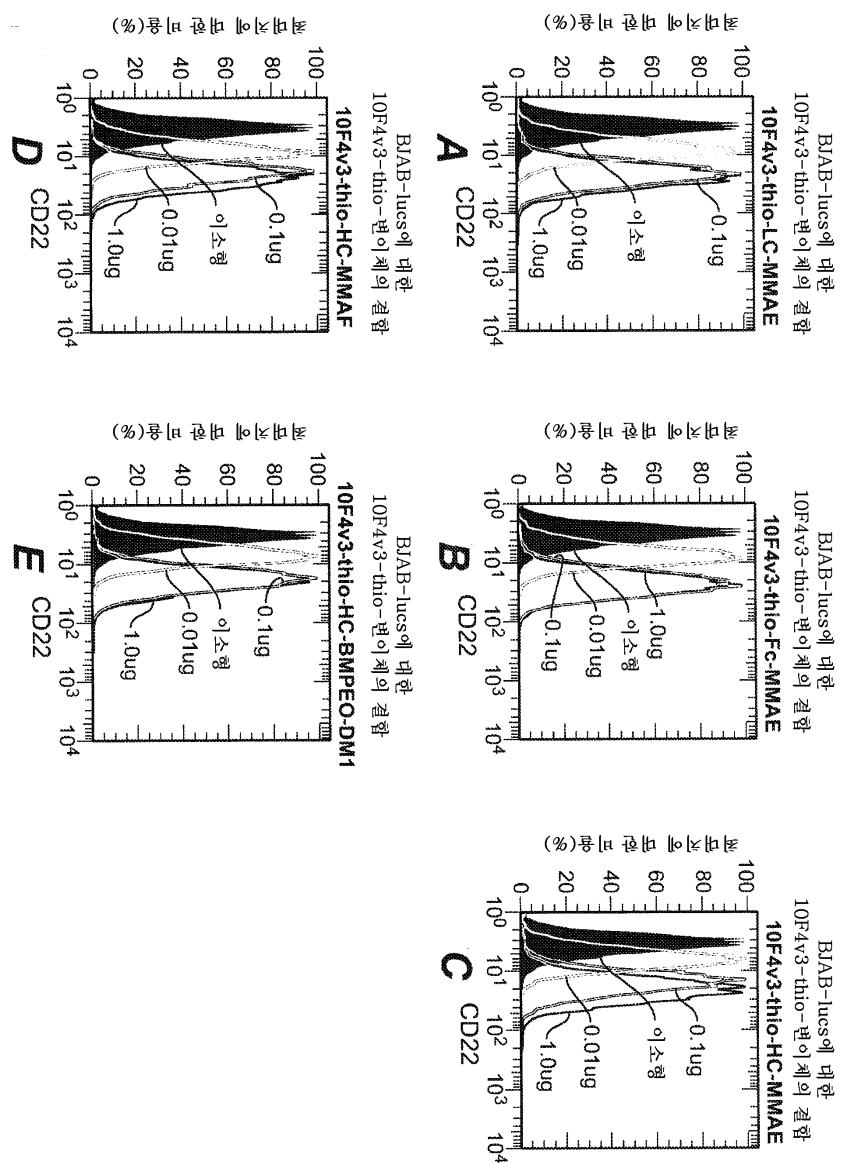
B

항-CD22 S400C h10F4v3 시스테인 조작된 Fc 영역

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIGP
 GDGDTNYSGKFGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTIVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPGPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGOPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTTPPVLDCDGSFFFLYSKLTVDKSRWQOGN
VFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK (서열 93)

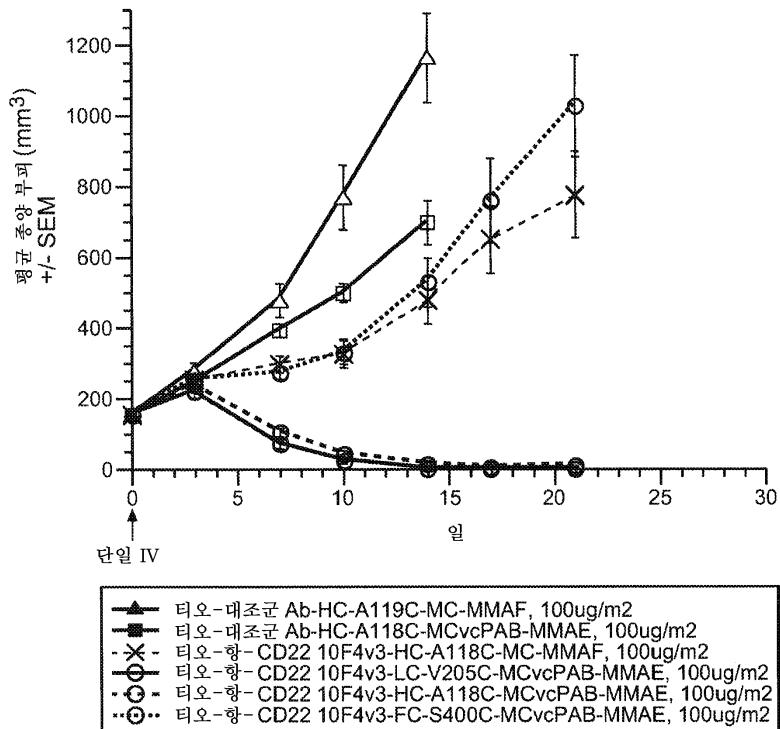
C

도면18



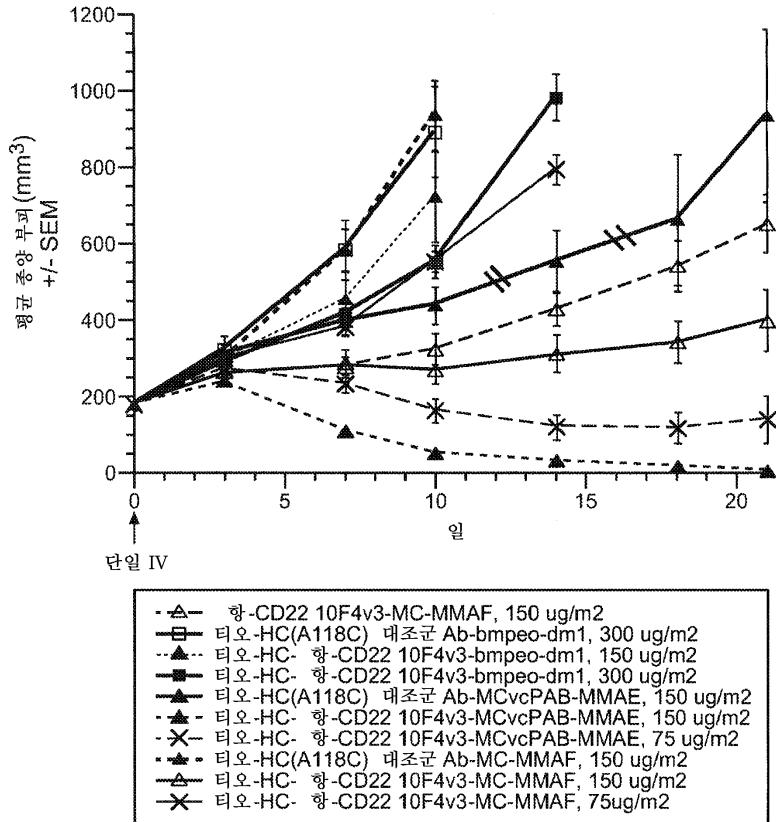
도면19

SCID 마우스 중 그란타-519 이종이식편에 투여된 항-CD22 TDC의 효과



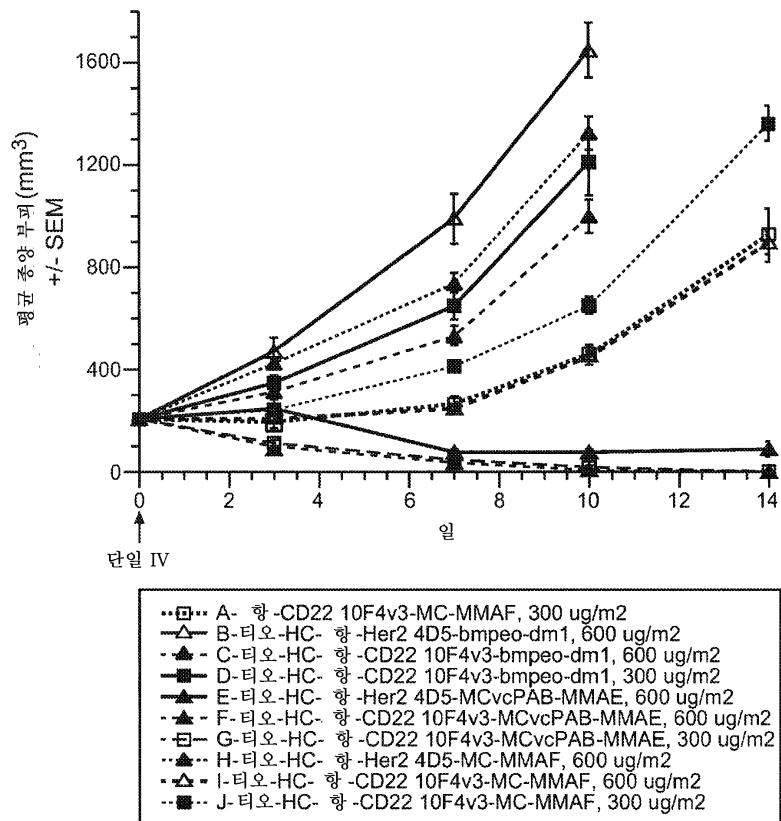
도면20A

CB17 SCID 마우스 중 인간 외투증 세포 텁프종 그란타-519 이종이식편에 대한 항-CD22 티오 HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1, -MCvcPAB-MMAE, 및 -MC-MMAF

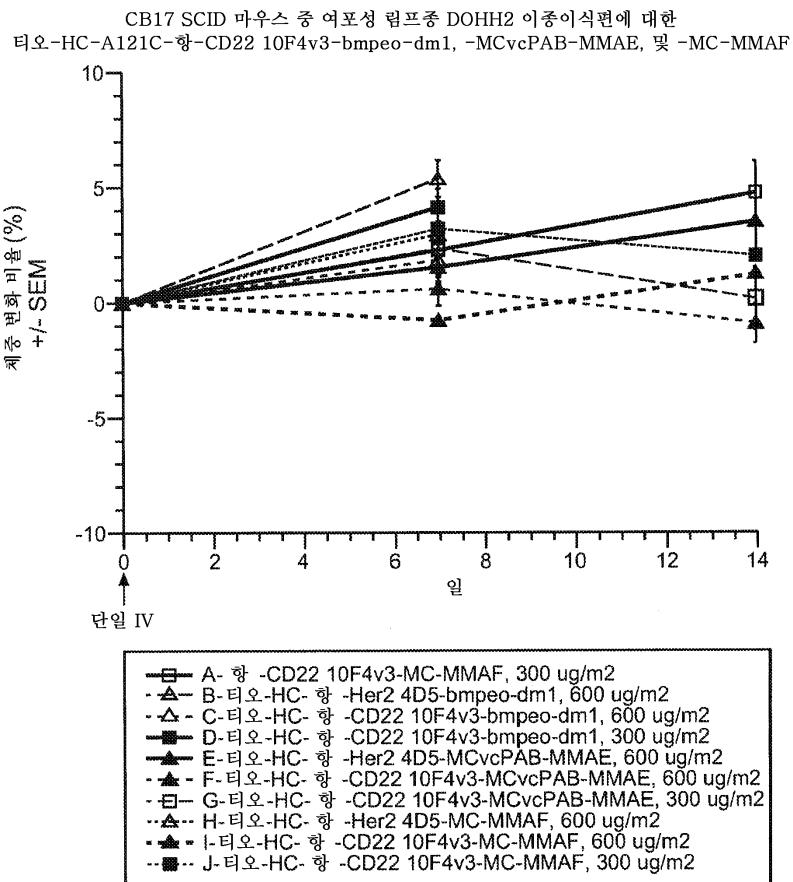


도면20B

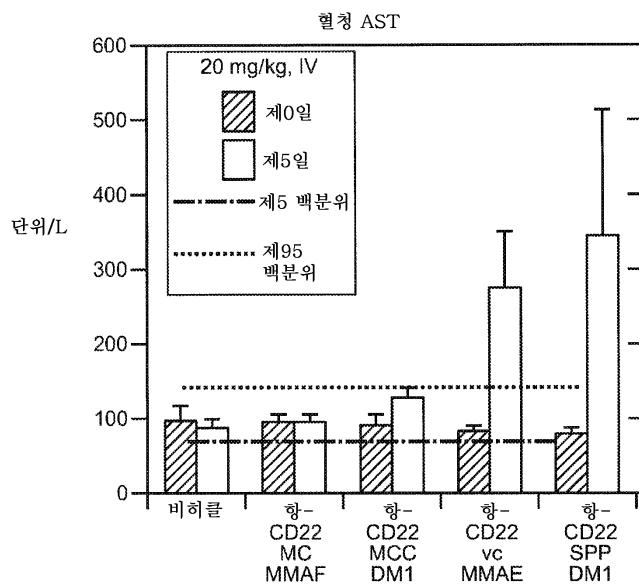
CB17 SCID 마우스 중 여포성 림프종 DOHH2 이종이식편에 대한
티오-HC-A121C-항-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, -MCvcPAB-MMAE, 및 -MC-MMAF



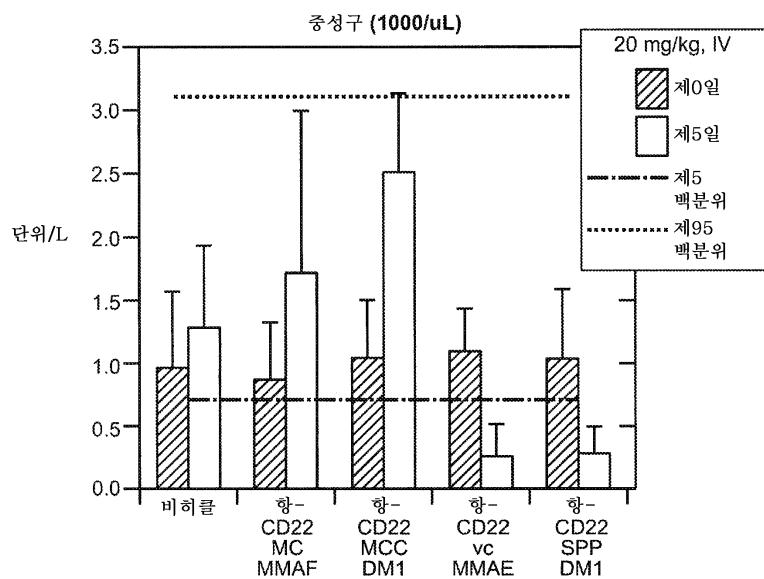
도면20C



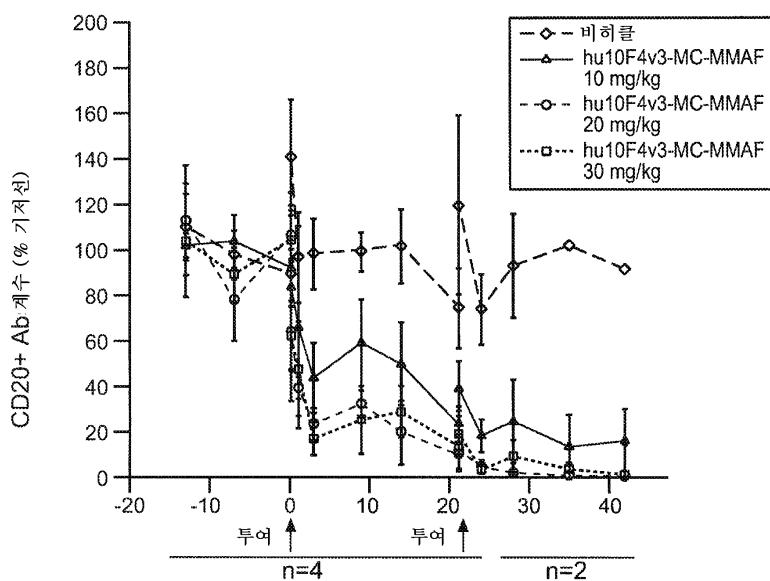
도면21A



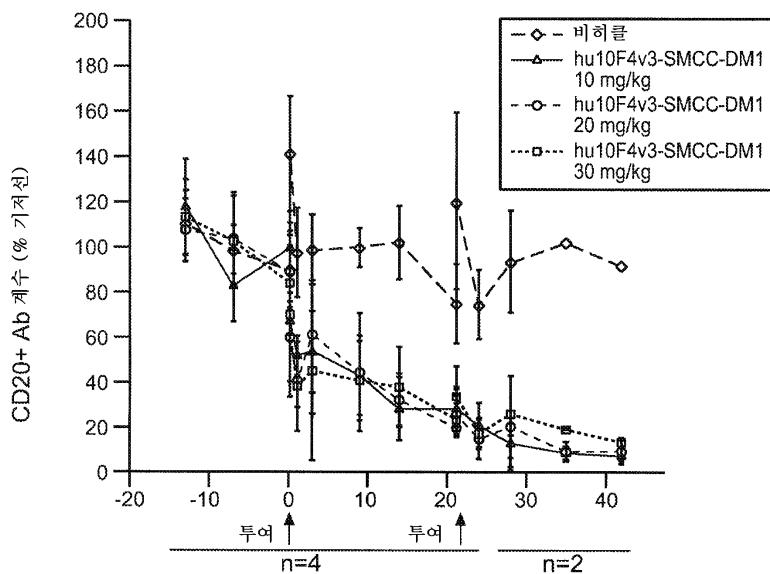
도면21B



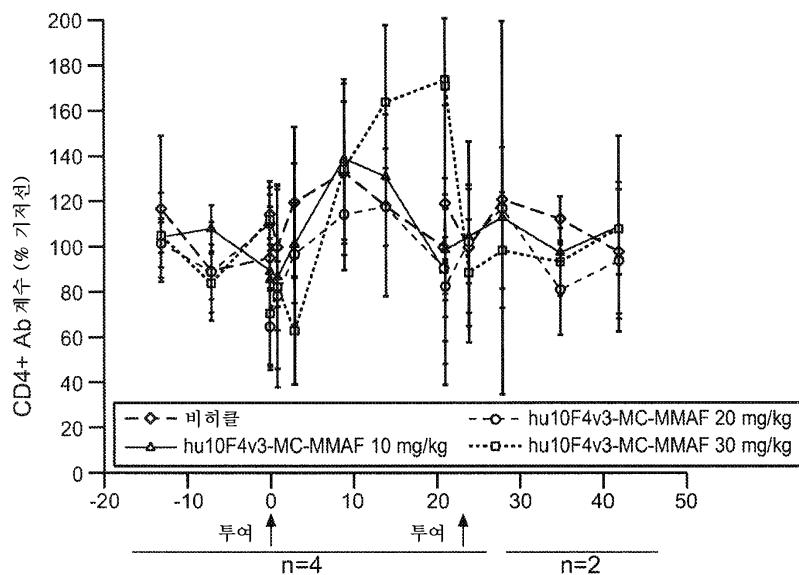
도면22A



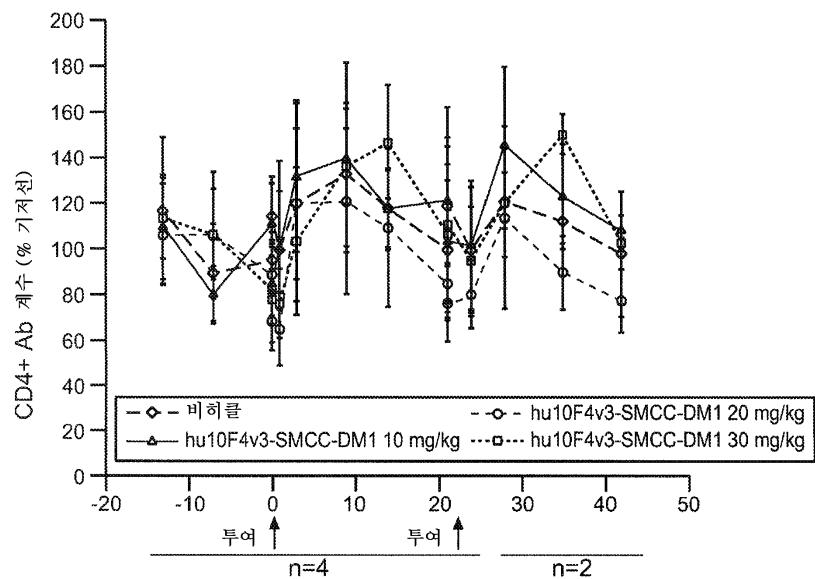
도면22B



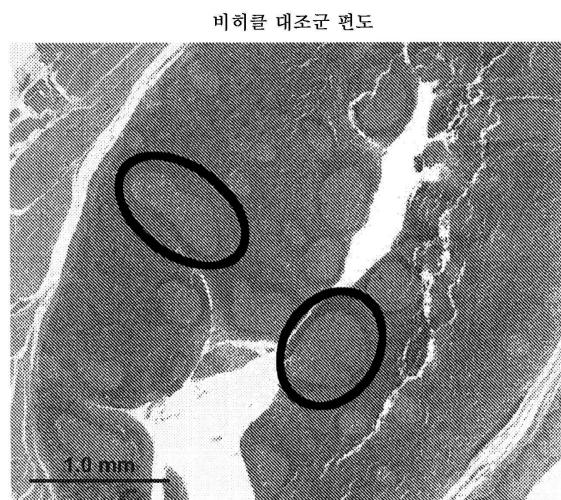
도면23A



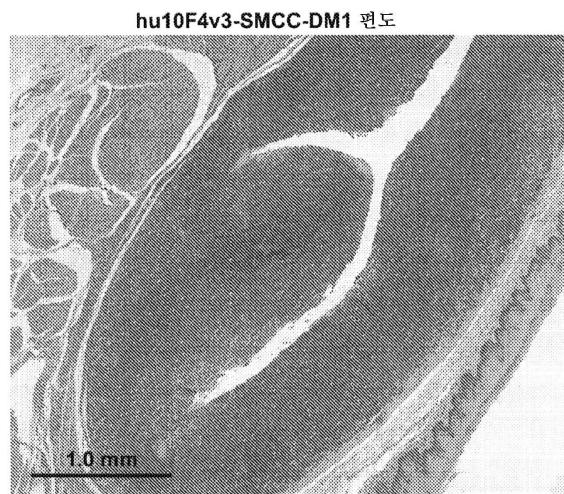
도면23B



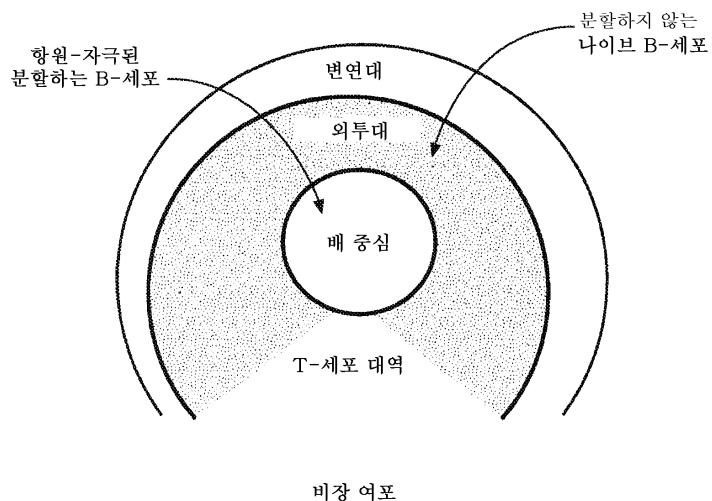
도면24A



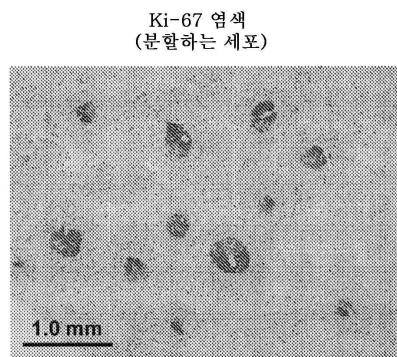
도면24B



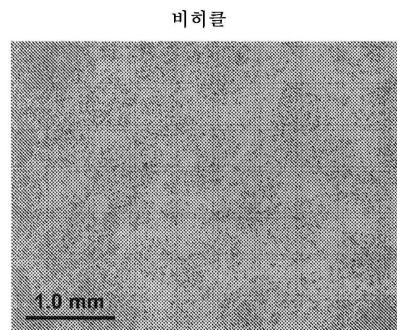
도면25A



도면25B

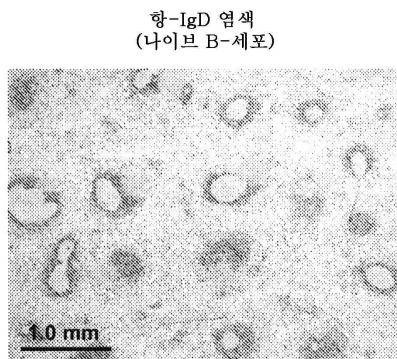


도면25C

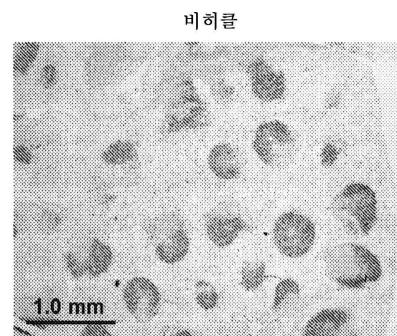


항-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

도면25D



도면25E



항-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

서열목록

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREOF

<130> P2262R1

<150> US 60/911,829

<151> 2007-04-13

<150> US 60/908,941

<151> 2007-03-29

<150> US 60/809,328

<151> 2006-05-30

<160> 93

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 2

Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
5 10

<210> 3

<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 3
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 4
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 5
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 6

Asp	Gly	Ser	Ser
Trp	Asp	Trp	Tyr
5		10	
Phe	Asp	Val	

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 7

Trp	Gly	Gln	Gly
Thr	Leu	Val	Thr
5		10	
Ser	Ser	Val	Ser

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 8

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 9

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu

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

Glu

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 10
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 11
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 12
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 5

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 13
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 14
Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr
5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 15
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 16
<211> 120
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 16

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1														
														15

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Glu	Phe	Ser
														30
20														25

Arg	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
														45
35														40

Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr
														60
50														55

Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
														75
65														70

Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
														90
80														85

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp
														105
95														100

Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
														120
110														115

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 17

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

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

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

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	35	40	45
---	----	----	----

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	50	55	60
---	----	----	----

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp	65	70	75
---	----	----	----

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr	80	85	90
---	----	----	----

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln	95	100	105
---	----	-----	-----

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	110	
---------------------------------	-----	--

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 18

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

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

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	35	40	45
---	----	----	----

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	50	55	60
---	----	----	----

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

65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 19
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 20
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu
 1 5 10 15

Glu

<210> 21
<211> 16
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 21

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu
1														
														15

Glu

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 22

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu
1														
														15

Glu

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 23

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ile	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu
1														
														15

Glu

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 24

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5				10				15		

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
						20			25				30	

Ser	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
					35				40			45		

Glu	Trp	Val	Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr
					50			55			60			

Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
				65				70			75			

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
					80			85			90			

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
					95				100			105		

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
						110								

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 25

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

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

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys

<210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 26
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15

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

<210> 27
 <211> 847
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr

1 5 10 15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
20 25 30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
 35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
50 55 60

Asn	Pro	Glu	Tyr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Lys	Phe	Asp	Gly	Thr	Arg
				65					70					75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
 80 85 90

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
95 100 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
 110 115 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
125 130 135

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
140 145 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
 155 160 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
170 175 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
185 190 195

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
 200 205 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
 215 220 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
 230 235 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val
 245 250 255

Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser
 260 265 270

Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser
 275 280 285

Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr
 290 295 300

Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val
 305 310 315

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala
 320 325 330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu
 335 340 345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu
 350 355 360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly
 365 370 375

Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His
 380 385 390

Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly
 395 400 405

Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys
 410 415 420

Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly
425 430 435

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser
440 445 450

Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro
455 460 465

Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser
485 490 495

Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val
500 505 510

Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val
515 520 525

Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln
530 535 540

Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln
545 550 555

Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser
560 565 570

Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp
575 580 585

Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met
590 595 600

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr
605 610 615

Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe

620	625	630
-----	-----	-----

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg	635	640
		645

Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln	650	655
		660

Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu	665	670
		675

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val	680	685
		690

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly	695	700
		705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly	710	715
		720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys	725	730
		735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly	740	745
		750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu	755	760
		765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser	770	775
		780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr	785	790
		795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val	800	805
		810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu	815	820
		825

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
 830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
845

<210> 28
<211> 660
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28
 Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu
 5 10 15

Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys
 35 40 45

Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys
50 55 60

Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
65 70 75

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu
80 85 90

Asn	Asp	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Arg	Met	Glu	Ser	Lys	Thr	Glu
				95				100					105	

Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe
 110 115 120

Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Gln Ser Gln Glu
125 130 135

Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro
140 145 150

Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala
155 160 165

Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg
170 175 180

Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile
185 190 195

Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn
200 205 210

Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys Leu Glu Ile
215 220 225

Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg Glu Gly Asp Ser Val
230 235 240

Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr Thr
245 250 255

Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr
260 265 270

Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser Gly Lys
275 280 285

Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser Glu
290 295 300

Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val
305 310 315

Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe
320 325 330

Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp
335 340 345

Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val
350 355 360

His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys
 365 370 375

Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala
380 385 390

Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile
 395 400 405

Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser
 410 415 420

Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp
425 430 435

Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys
440 445 450

Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Arg
455 460 465

Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val
470 475 480

Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu
485 490 495

Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe
 500 505 510

Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn
515 520 525

Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile
 530 535 540

Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser
545 550 555

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

560	565	570
-----	-----	-----

Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val		
575	580	585

Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn		
590	595	600

Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser		
605	610	615

Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val		
620	625	630

Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly		
635	640	645

Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro		
650	655	660

<210> 29

<211> 647

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr		
1	5	10
		15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu		
20	25	30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr		
35	40	45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His		
50	55	60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg		
65	70	75

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

80	85	90
----	----	----

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser	95	100	105
---	----	-----	-----

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg	110	115	120
---	-----	-----	-----

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn	125	130	135
---	-----	-----	-----

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu	140	145	150
---	-----	-----	-----

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe	155	160	165
---	-----	-----	-----

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly	170	175	180
---	-----	-----	-----

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile	185	190	195
---	-----	-----	-----

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp	200	205	210
---	-----	-----	-----

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp	215	220	225
---	-----	-----	-----

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His	230	235	240
---	-----	-----	-----

Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile	245	250	255
---	-----	-----	-----

Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser	260	265	270
---	-----	-----	-----

Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp	275	280	285
---	-----	-----	-----

Glu	Glu	Pro	Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn	Val	Gly	Trp
		290				295								300
Asp	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Cys	Ala	Ala	Cys	Asn	Ser	Trp	Cys	Ser
		305					310							315
Trp	Ala	Ser	Pro	Val	Ala	Leu	Asn	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Arg	Asp
		320				325								330
Val	Arg	Val	Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Leu	Ser	Glu	Ile	His	Ser	Gly
		335				340								345
Asn	Ser	Val	Ser	Leu	Gln	Cys	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Lys
		350				355								360
Glu	Val	Gln	Phe	Phe	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys
		365				370								375
Glu	Ser	Gln	Leu	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly
		380				385								390
Ser	Tyr	Ser	Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser
		395				400								405
Lys	Ala	Trp	Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg
		410			415									420
Val	Ser	Met	Ser	Pro	Gly	Asp	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Lys	Ser	Ala
		425			430									435
Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	His	Tyr
		440			445									450
Thr	Trp	Phe	Asp	Trp	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Tyr	His	Ser	Gln
		455			460									465
Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro	Val	Lys	Val	Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr
		470			475									480
Trp	Cys	Gln	Gly	Thr	Asn	Ser	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu
		485			490									495

Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg
 500 505 510

Val Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala
 515 520 525

Ile Cys Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser
 530 535 540

Gln Gln Gly Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val
 545 550 555

Arg Asn Lys Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His
 560 565 570

Ser Leu Gly Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr
 575 580 585

Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp
 590 595 600

Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp
 605 610 615

Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Thr Met
 620 625 630

Arg Thr Ser Phe Gln Ile Phe Gln Lys Met Arg Gly Phe Ile Thr
 635 640 645

Gln Ser

<210> 30

<211> 483

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu

1	5	10	15
Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly			
20		25	30
Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys			
35		40	45
Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys			
50		55	60
Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly			
65		70	75
Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu			
80		85	90
Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu			
95		100	105
Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe			
110		115	120
Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu			
125		130	135
Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro			
140		145	150
Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala			
155		160	165
Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg			
170		175	180
Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile			
185		190	195
Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn			
200		205	210

Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Pro Pro Lys Lys Val Thr		
215	220	225
Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val		
230	235	240
Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg		
245	250	255
Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly		
260	265	270
Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala		
275	280	285
Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala		
290	295	300
Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile		
305	310	315
Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln		
320	325	330
Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp		
335	340	345
Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe		
350	355	360
Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val		
365	370	375
Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu		
380	385	390
Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly		
395	400	405
Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser		
410	415	420

Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn
 425 430 435

Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro
 440 445 450

Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn
 455 460 465

Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr
 470 475 480

Tyr Ser Pro

<210> 31
 <211> 846
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<400> 31
 Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Ala
 1 5 10 15

Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile
 20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Ile Trp Val Pro Cys Thr Tyr Arg
 35 40 45

Val Leu Asp Gly Ala Leu Glu Thr Phe Ile Leu Phe His Asn Pro
 50 55 60

Glu Tyr Asn Gln Asn Met Ser Lys Phe Glu Gly Thr Arg Leu Tyr
 65 70 75

Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Gly Gln Lys Arg Val
 80 85 90

Gln Phe Leu Gly Asn Lys Ile Asn Asn Asn Cys Thr Leu Ser Ile

95	100	105
----	-----	-----

His Pro Val His Val Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met		
110	115	120

Val Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val		
125	130	135

Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Arg Ile Gln Leu Pro Pro Lys Leu		
140	145	150

Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser		
155	160	165

Cys Tyr Gly Tyr Gln Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Ala		
170	175	180

Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Leu Thr Ser Leu Ser Thr Lys		
185	190	195

Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser		
200	205	210

His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Glu Leu His Asp Val Asp Gly		
215	220	225

Lys Val Leu Ser Glu Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr		
230	235	240

Pro Lys Leu Thr Ile Glu Val Thr Pro Asn Glu Thr Ile Val Arg		
245	250	255

Lys Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Lys Val Asn Ser Ser Asn		
260	265	270

Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Asp Ile Pro Leu		
275	280	285

Lys Glu Gln Asn Thr Leu Met Leu Thr Leu His Glu Val Thr Lys		
290	295	300

Ser Gln Thr Gly Thr Tyr Cys Cys Arg Val Ser Asn Asp Val Gly
 305 310 315

Pro Ala Thr Ser Glu Lys Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro
 320 325 330

Glu Pro Ser Arg Val Gln Ile Ser Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly
 335 340 345

Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile Ser Pro Ala Asn Pro Leu Pro
 350 355 360

Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Val Gln Gly Arg
 365 370 375

Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile Leu Pro Trp His Ala
 380 385 390

Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Ile Gly Glu
 395 400 405

Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys
410 415 420

Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu Gly Asp
425 430 435

Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile Val
440 445 450

Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser
455 460 465

Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala
470 475 480

Val Ala Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro
485 490 495

Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Arg	Val	Arg
				500					505				510	

Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Leu Val Ser
 515 520 525

Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe
 530 535 540

Phe Trp Glu Lys Asn Gly Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu
 545 550 555

Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys
 560 565 570

Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr
 575 580 585

Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser
 590 595 600

Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys Thr Ala Ile Leu Thr Cys
 605 610 615

Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr Ser Tyr Ala Trp Phe Asp
 620 625 630

Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Arg Met Leu Arg Leu
 635 640 645

Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly
 650 655 660

Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser Pro Leu Ile Thr Leu Thr
 665 670 675

Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val Gly
 680 685 690

Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Met Cys Gly Phe
 695 700 705

Lys Val Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly Leu

710	715	720
-----	-----	-----

Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys		
725	730	735

Val Arg Arg Thr Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys		
740	745	750

Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Ala Thr Leu Arg		
755	760	765

Phe Pro Glu Thr Asn Thr Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Thr Ser		
770	775	780

Glu Leu Gln Arg Leu Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr		
785	790	795

Ser Val Leu Gln Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile		
800	805	810

Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile		
815	820	825

Gln Phe Gly Phe Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp		
830	835	840

Tyr Val Ile Val Lys His		
845		

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 32

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu		
1	5	10
		15

Glu

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 33
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 34
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
 95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 35
Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

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

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
110

<210> 36
<211> 847

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met	His	Leu	Leu	Gly	Pro	Trp	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Glu	Tyr
1		5		10		15							

Leu	Ala	Phe	Ser	Asp	Ser	Ser	Lys	Trp	Val	Phe	Glu	His	Pro	Glu
							20		25			30		

Thr	Leu	Tyr	Ala	Trp	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Trp	Ile	Pro	Cys	Thr
							35		40		45			

Tyr	Arg	Ala	Leu	Asp	Gly	Asp	Leu	Glu	Ser	Phe	Ile	Leu	Phe	His
							50		55		60			

Asn	Pro	Glu	Tyr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Lys	Phe	Asp	Gly	Thr	Arg
							65		70		75			

Leu	Tyr	Glu	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Glu	Gln	Lys
					80		85		90					

Arg	Val	Gln	Phe	Leu	Gly	Asp	Lys	Asn	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser
							95		100		105			

Ile	His	Pro	Val	His	Leu	Asn	Asp	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Arg
							110		115		120			

Met	Glu	Ser	Lys	Thr	Glu	Lys	Trp	Met	Glu	Arg	Ile	His	Leu	Asn
							125		130		135			

Val	Ser	Glu	Arg	Pro	Phe	Pro	Pro	His	Ile	Gln	Leu	Pro	Pro	Glu
							140		145		150			

Ile	Gln	Glu	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Phe
							155		160		165			

Ser	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Ile	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Glu	Gly
							170		175		180		

Val	Pro	Met	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Leu	Thr	Ile
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

185	190	195
-----	-----	-----

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp		
200	205	210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp		
215	220	225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His		
230	235	240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val		
245	250	255

Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser		
260	265	270

Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser		
275	280	285

Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr		
290	295	300

Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val		
305	310	315

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala		
320	325	330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu		
335	340	345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu		
350	355	360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly		
365	370	375

Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His		
380	385	390

Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly
395 400 405

Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys
410 415 420

Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly
425 430 435

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser
440 445 450

Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro
455 460 465

Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser
485 490 495

Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val
500 505 510

Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val
515 520 525

Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln
530 535 540

Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln
545 550 555

Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser
560 565 570

Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp
575 580 585

Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met
590 595 600

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr
 605 610 615

Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe
 620 625 630

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg
 635 640 645

Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln
 650 655 660

Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
 665 670 675

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val
 680 685 690

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
 695 700 705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
 710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys
 725 730 735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly
 740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
 755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser
 770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr
 785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val

800	805	810
-----	-----	-----

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu	815	820	825
---	-----	-----	-----

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val	830	835	840
---	-----	-----	-----

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His	845	
-----------------------------	-----	--

<210> 37

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	1	5	10	15
---	---	---	----	----

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn	20	25	30
---	----	----	----

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys	35	40
---	----	----

<210> 38

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	1	5	10	15
---	---	---	----	----

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	20	25	30
---	----	----	----

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	35	40	45
---	----	----	----

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
---	--	--

50	55	60
----	----	----

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	65	70	75
---	----	----	----

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	80	85	90
---	----	----	----

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys	95	100	105
---	----	-----	-----

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	110	115	120
---	-----	-----	-----

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser	125	130	135
---	-----	-----	-----

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	140	145	150
---	-----	-----	-----

Glu Trp Glu Ser Asn Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	155	160	165
---	-----	-----	-----

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys	170	175	180
---	-----	-----	-----

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	185	190	195
---	-----	-----	-----

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	200	205	210
---	-----	-----	-----

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	215
---------------------------------	-----

<210> 39

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 20 25 30

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 35 40 45

Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
				50					55				60	

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
65 70 75

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
80 85 90

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 95 100 105

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
110 115 120

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
125 130 135

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
140 145 150

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 155 160 165

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
170 175 180

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
185 190 195

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 200 205 210

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
215

<210> 40
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
35 40 45

Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
65 70 75

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
80 85 90

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
95 100 105

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
110 115 120

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
125 130 135

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
140 145 150

Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro
155 160 165

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 170 175 180

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys
 185 190 195

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
 200 205 210

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215

<210> 41

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
140 145 150

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Thr Tyr Gln Lys
 200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
215

<210> 42
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 42
Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu
1 5 10 15

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 43
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 43

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 44

Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 45

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 46

Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu	Trp
5									10	

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Trp	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
5									10				

<210> 48

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
1														
	5					10								15

Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
20				25										30

Ala Arg

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys
20							

<210> 50

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly
1				5				10					15	

Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser					
				20			25							

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
					5				10					

<210> 52

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
1				5			10					15		

Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20				25					30	

Ala

<210> 53

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
1				5			10					15		

Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20				25					30	

<210> 54
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
5 10

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 57
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 59
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

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

Ala

<210> 60
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

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

<210> 61
<211> 30
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5								10		15

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
									20			25		30

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser
									5			10	

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
1				5						10			15	

Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
									20			25		30

Ala Arg

<210> 64

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10		15		

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
									20

25

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 66
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30

<210> 69
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser Arg

<210> 70
<211> 31
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 70
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser

<210> 71
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ala Arg

<210> 72
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ala

<210> 73
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 74
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 76
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 78
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
5 10

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 80
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 81
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 83
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 84
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 86
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
 20 25 30

Tyr Cys

<210> 87
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 87
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
 95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

<210> 88

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 88

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
 20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
 50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125 130 135

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
140 145 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
155 160 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
185 190 195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
200 205 210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
215 220 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230 235 240

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

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 89
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 89

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
1														
														15

Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Glu	Phe	Ser
														30
20								25						

Arg	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Arg
														45
35								40						

Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr
														60
50								55						

Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
														75
65							70							

Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Val	Asp
														90
80								85						

Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp
														105
95								100						

Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
														120
110								115						

<210> 90

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 90

Asp	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu
1														
														15

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

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

35	40	45
----	----	----

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
 95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 110

<210> 91

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 91

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

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

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75

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

80	85	90
----	----	----

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln 95	100	105
---	-----	-----

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val 110	115	120
--	-----	-----

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala 125	130	135
--	-----	-----

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys 140	145	150
--	-----	-----

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln 155	160	165
--	-----	-----

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu 170	175	180
--	-----	-----

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys 185	190	195
--	-----	-----

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys 200	205	210
--	-----	-----

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 215
--

<210> 92

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 92

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly 1	5	10	15
--	---	----	----

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

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

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	35	40	45
---	----	----	----

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr	50	55	60
---	----	----	----

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser	65	70	75
---	----	----	----

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80	85	90
---	----	----	----

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp	95	100	105
---	----	-----	-----

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	110	115	120
---	-----	-----	-----

Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser	125	130	135
---	-----	-----	-----

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys	140	145	150
---	-----	-----	-----

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala	155	160	165
---	-----	-----	-----

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	170	175	180
---	-----	-----	-----

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	185	190	195
---	-----	-----	-----

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	200	205	210
---	-----	-----	-----

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	215	220	225
---	-----	-----	-----

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230 235 240

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

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 93
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 93
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
 20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
 50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
 95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 125 130 135

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

140	145	150
-----	-----	-----

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala		
155	160	165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
170	175	180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
185	190	195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
200	205	210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
215	220	225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
230	235	240

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

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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