



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월07일

(11) 등록번호 10-1683884

(24) 등록일자 2016년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7023099

(22) 출원일자(국제) 2008년04월02일

심사청구일자 2013년03월28일

(85) 번역문제출일자 2009년11월04일

(65) 공개번호 10-2010-0016237

(43) 공개일자 2010년02월12일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/053913

(87) 국제공개번호 WO 2008/122551

국제공개일자 2008년10월16일

(30) 우선권주장

07105628.7 2007년04월04일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

Hybridoma and hybridomics Vol. 21, pages 99-101 (2002)\*

British Journal of cancer, Vol. 92, pages 342-349 (2005)\*

International Journal of cancer, Vol. 100, pages 101-110 (2002)\*

British Journal of cancer, Vol 94, pages 128-135 (2006)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

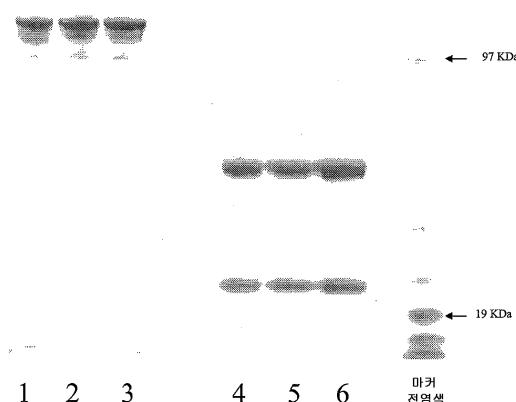
전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 항-EpCAM 항체 및 이의 용도

**(57) 요약**

ST3232/10으로 명명된, 쥐(murine) 기원의 항-EpCAM 항체는 치료 및 진단 두 용도 모두에 적절한 특성을 보인다. 이것은 자연 항원에 고 친화도를 보이며, 우수한 종양 선택성을 보인다.

**대 표 도 - 도1**

(72) 발명자

드 산티스, 리타

이탈리아, 로마, 아이-00040 로메지아, 비아 폰티  
나 쿤 30.400, 시그마-타우 인더스트리 파마슈티체  
리유니트 에스. 피. 에이. 내

---

알버티, 사베리오

이탈리아, (씨에이치), 아이-66034 란치아노, 비아  
가리발디 비코 17. 넘버. 15

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

항-EpCAM 항체 또는 이의 기능적 유도체로서, 상기 항체 또는 이의 기능적 유도체의 중쇄의 가변 영역은 서열 번호 2; 서열 번호 4 및 서열 번호 6의 서열을 갖는 3개의 모든 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하고, 상기 항체 또는 이의 기능적 유도체의 경쇄의 가변 영역은 서열 번호 8; 서열 번호 10 및 서열 번호 12의 서열을 갖는 3개의 모든 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 것인, 항-EpCAM 항체 또는 이의 기능적 유도체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, EpCAM 발현 종양의 성장을 완전히 그리고 영구히 억제할 수 있는 항-EpCAM 항체 또는 이의 기능적 유도체.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 항체는 단일클론성 항체, scFv, Fv 단편, Fab 단편, F(ab)<sub>2</sub> 단편, 다향체성 항체, 에피토프 결합 영역을 함유하는 웨타이드 또는 단백질 분해성 단편, 또는 다른 단백질에 융합되거나 제제 또는 마커에 연결된 키메라 항체, 또는 인간 또는 인간화 항체인 것인 항-EpCAM 항체 또는 이의 기능적 유도체.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 단일클론성 항체는 부다페스트 조약에 따라 이탈리아, 제노바의 어드밴스드 바이오테크놀로지 센터(Advanced Biotechnology Center)에 번호 PD06004로 기탁된 하이브리도마 세포주(cell line)에 의해 생성되거나, 키메라 단백질은 마우스-인간 키메라이거나, 융합 단백질은 사이토카인, 아비딘계 단백질, 비오틴, 라벨링된 비오틴 또는 다른 효과기 단백질을 포함하는 것인 항-EpCAM 항체 또는 이의 기능적 유도체.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 기능적 유도체를 암호화하는 핵산, 또는 이의 축퇴성 서열(degenerated sequence)로 이루어진 핵산.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 서열 번호 1, 서열 번호 3, 서열 번호 5, 서열 번호 7, 서열 번호 9 및 서열 번호 11의 서열 중 하나 이상을 포함하는 핵산.

#### 청구항 7

제5항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 8

제7항에 따른 발현 벡터로 형질전환된 단리된 숙주 세포.

#### 청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항-EpCAM 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 하이브리도마는 부다페스트 조약에 따라 이탈리아, 제노바의 어드밴스드 바이오테크놀로지 센터에 번호 PD06004로 기탁된 것인 하이브리도마 세포주.

#### 청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항-EpCAM 항체를 포함하는, 항종양 약제로서 사용하기 위한 약학 조성물.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 종양은 결장암, 유방암, 위암, 난소암, 방광암 또는 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 13**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 기능적 유도체, 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, 항종양 약제로서 사용하기 위한 약학 조성물.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 방사선 면역 치료를 위한 약학 조성물.

**청구항 15**

제13항에 있어서, 적어도 다른 종양 특이적 항체를 동일한 단위 용량 내에 또는 분리하여 포함하는 약학 조성물.

**청구항 16**

제13항에 있어서, 적어도 다른 종양 특이적 항체를 동일한 단위 용량 내에 또는 분리하여 포함하고, 종양 특이적 항체는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 기능적 유도체와 상이한 EpCAM 항체인 것인 약학 조성물.

**청구항 17**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항-EpCAM 항체를 포함하는, 생체내 또는 시험관 내 항종양 진단제로서 사용하기 위한 약학 조성물.

**청구항 18**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항-EpCAM 항체를 포함하는 생체내 종양 진단용 주사 가능한 가용성 조성물.

**청구항 19**

샘플 중 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 기능적 유도체에 결합가능한 항원을 면역 검출하는 방법으로서, 상기 항체 또는 이의 기능적 유도체를 샘플과 적정 조건에서 배양시켜 항원-항체 복합체(complex)를 얻는 단계, 및 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 20**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 기능적 유도체, 및 항원-항체 복합체 검출 수단을 포함하는, 샘플 중 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 기능적 유도체에 결합가능한 항원을 면역 검출하는 방법을 위한 진단 키트로서, 상기 방법은 상기 항체 또는 이의 기능적 유도체를 샘플과 적정 조건에서 배양시켜 항원-항체 복합체(complex)를 얻는 단계, 및 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 것인 진단 키트.

**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

### **발명의 설명**

#### **기술 분야**

[0001] 본 발명은 항-인간 EpCAM 단일클론성 항체 및 이의 기능적 유도체, 이들을 수득하는 방법 및 물질, EpCAM을 발현하는 종양의 진단 및 치료를 위한 상기 항체의 용도 및 의료 분야에서의 사용에 적절한 상기 항체를 포함하는 물질에 관한 것이다.

#### **배경 기술**

[0002] 종양 부위에 과잉 발현하는 항원을 선택적으로 인식할 수 있는 항체에 의한 종양 조직의 표적화는 모든 항종양 면역치료의 목표이다. 또한 종양 관련 칼슘 신호 변환자 1, TROP-1, GA733-2 등으로 알려진 상피 세포 부착 분자(EpCAM, 스위스prot no. P16422)는 칼슘 비의존적 동종친화성 세포 부착을 포함하는 단순 상피의 기저 층부 림브레인에서 발현되는 타입 I 트랜스-멤브레인 당단백질이다. 세포외 도메인은 일상 성장 인자 유사 반복에 이어, 티로글로불린(thyroglobulin) 반복 및 시스테인 부족 영역으로 이루어지나, 세포내 도메인은 26 아미노산 길이이며, 악틴(actin) 세포골격에 연결하기 위한,  $\alpha$ -악틴에 대한 두개의 결합 부위가 있다(Winter MJ 등. 2003). 많은 수의 결장, 위, 전립선 및 폐 종양 검사물에서 얻어지는 면역조직화학 결과를 보고한, Went 및 공동연구자(2006)에 의해 최근에 확인된 바와 같이, 주된 인간 악성종양의 세포는 EpCAM을 매우 과잉발현한다.

EpCAM 과잉발현 세포는 증식 및 악성 표현형의 성장과 관련하여, 정상 세포로부터 분리되는 경향이 있다(Winter 등, 2003). 이러한 데이터를 기초로, 면역 치료를 위해 EpCAM을 표적화하는 것이 가능하게 되었다.

[0003] 임상적 사용에 대하여 EpCAM 포지티브 세포에 대한 일부 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)과 쥐의 IgG2a 항체, 에드레콜로맙(Edrecolomab)이 독일에서 입증되었으며, 치료 수술을 받은 결장직장 또는 췌장암 환자의 치료를 위해 사용되었다. Dukes'C 결장직장암 환자의 에드레콜로맙 치료 후 최소한의 잔류 질환을 7년간 추적한 결과는 32%의 치사율 감소 및 23%의 재발율 감소였다(Riethmuller G 등, 1998; Weiner LM 등, 1993). 그러나, 전체적인 임상 시험의 결과는 이의 제한적인 항종양 효과로 인하여, 단일치료로서의 이 약물의 회수를 야기하였고(Punt CJ, 등, 2002). 항체를 다른 활성 화학 치료 화합물과 보조 치료로 사용되는, 새로운 임상 시험의 시도를 유도하였다(Frodin JE 등, 2002).

[0004] 이 표적에 대한 다른 항체는 전임상 또는 임상 세팅에 사용되었다. MT-201(아데카투무맙(Adecatumumab))은 EpCAM에 대한 중등도의 친화도를 갖는 전체적으로 인간 단일클론성 IgG1 항체이다(Naundorf S 등, 2002). 이의 효능은 결장암 세포주 HT-29를 이용한 누드 마우스 이종 이식 모델에서 확인되었다(Naundorf S 등, 2002). 다양한 종양 세포주에 대한 생체외 스터디는 MT201이 ADCC 및 상보 의존적 세포독성(CDC)에 의해 표적 세포의 분해를 매개하는 것을 보여 주고 있다(Prang N 등, 2005). 이 항체는 최근 호르몬 불응성 전립선 암의 치료를 위해 임상적으로 개발된 것이다(Oberndeder R 등, 2006).

[0005] ING-1은 EpCAM 포지티브 세포를 표적으로 하는 고 친화도 인간 조작된 단일클론성 항체이다. 이것은 진행성 샘암종(adenocarcinoma), 표준 치료에 불응성인 환자의 I상 임상 시험에 사용되었으며, 이 스터디의 데이터는 종양 세포에 대하여 더 높은 세포독성을 가지며, EpCAM에의 높은 친화도를 갖는 항체가 췌장 독성 손상을 빠르게 유도할 수 있어, 전신 투여에 대한 이의 치료 영역을 제한할 수 있다는 것을 제안하였다(De Bono JS 등, 2004). 면역 치료의 효과에 대한 항체 친화도의 발현에 대해서는 여려가지 의견이 있다. Velders 등(1998)은 EpCAM에 대하여 상이한 친화도를 갖는 2개의 항체의 비교에서 얻어지는 것과 같이, ADCC상의 항원 밀도 및 항체 친화도의 효과에 대한 생체외 데이터를 개시하였다. 이 스터디에서 얻은 데이터는 고 친화도 항체가 낮은 항원 발현 수준으로, 또는 고 효능으로 유사한 결합 수준에서 세포 살상(cell killing)을 매개할 수 있다는 것을 보여주었다. 표적 항원 발현의 이질성이 모든 종양의 일반적인 특성이기 때문에, 고 친화도 항체의 사용은 임상 결과를 개선할 수 있다. 고 친화도 항-EpCAM 항체의 치료적 사용과 관련하여, 가능한 전신 독성 효과는 주어진 시간에서, 순환 항체를 줄이는 추적 단계(chasing step)를 포함하는 선제 표적화(pre-targeting) 전략에 의해 감소될 수 있다. 대안적으로, 고 친화도 항-EpCAM 항체의 사용은 로코(loco)-영역 치료에 제한적일 수 있다.

[0006] 스트렙타비딘(streptavidin) 융합 단백질로 유전적으로 조작된, EpCAM 항원에 특이적인, 인간화 단쇄 Fv 항체 단편, NR-LU-10은 선제-표적 방사선면역치료 또는 방사선면역화 유방 수술을 위해 개발되었다. 전임상 데이터는 NR-LU-10 후 투여된 <sup>90</sup>Y-DOTA-비오틴 800 μCi의 단일 용량이 정립된 피하 인간 소세포폐암 또는 결장암 이종이식된 마우스를 치료한 것을 보여 주었다(Goshorn S 등, 2001). Burak WE Jr 등(2001)의 두번째 보고서에서, 라벨링된 NR-LU-10 Fab의 사용은 10명 중 7명의 환자에서 종양 국소화를 나타내기 위한 수술 중 탐침에 유용하였고, 따라서 표적화제로서 이의 능력을 확인하였다.

[0007] 여러 병리학에서 단일클론성 항체의 임상적인 성공에도 불구하고, 고형암의 면역치료는 여전히 만족스럽지 못했다. 선제 표적화 항체 가이드 방사선 면역 치료(PAGRIT<sup>TM</sup>)는 종양에 방사성동위원소의 제한적이며 종폭적인 축적이 가능하도록 하는 다치료 접근법이다. 제1 단계로서 사용되는 항종양 단일클론성 항체의 특이성 및 친화도는 치료 효능에 대하여 기본이 된다.

[0008] 본 출원인은 저- 및 고 항원-발현 인간 이종이식 종양 모두에서 ST2146 항-테나신(tenascin) 단일클론성 항체의 예외적으로 많고 특이적인 축적을 보고하였다(De Santis 등, Clinical Cancer Research, p.2191, 2006. 4. 1).

[0009] EP 0 496 074의 교시를 기초로, G. Paganelli 등은 종양의 전신 및 로코-영역 치료에 대한 이 3단계 선제 표적화 접근법을 개발하였다(Cremonesi M. 등, Eur. J. Nucl. Med. 26(2):110- 120, 1999; Paganelli G. 등, Eur. J. Nucl. Med. 26 (4): 348-357, 1999; Paganelli G. 등 Cancer Biother. & Radiopharm. 16(3):227- 235, 2001).

[0010] 3단계 선제 표적화 방법에 대한 다른 참조 문헌은 WO 94/04702 및 US 5, 578, 287이다.

[0011] 3단계 선제 표적화 치료는 각각 스트렙타비딘 및 <sup>90</sup>Y-라벨링된 비오틴 이전에, 아비딘 및 비오틴화(biotinylated) 알부민의 두 추적 투여와 비오틴화된 항-테나신 단일클론성 항체, 스트렙타비딘, 및 <sup>90</sup>Y-라벨링

된 비오틴의 정맥내 연속 투여를 기초로 하여, 비 특이적 백그라운드를 감소시킨다.

[0012] 의약 분야에서, 예를 들어, PAGRIT 접근에서와 같이, 암 진단 및 치료에 유용한 항-EpCAM 항체를 더욱 개선하는 것이 필요하다.

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 개요

[0014] 본 발명은 추가의 모이어티 및 진단 체제를 함유할 수 있는 항체 및 항체 단편, 이를 항체 및 항체 단편을 함유하는 조성물, 및 이들을 함유하는 진단 및 치료 조성물, 치료 및 진단에서의 이들의 용도 및 이를 항체 및 항체 단편을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0015] 본 발명의 목적은 항체 중쇄의 가변 영역이 서열 번호 2; 서열 번호 4 또는 서열 번호 6으로부터 선택되는 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) 중 하나 이상을 포함하는 항-EpCAM 항체 또는 이의 기능적 유도체를 제공하는 것이다.

[0016] 바람직하게는 항체 중쇄의 가변 영역은 서열 번호 2; 서열 번호 4 또는 서열 번호 6의 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) 중 2 이상을 포함한다.

[0017] 또한 바람직하게는 항체 중쇄의 가변 영역은 서열 번호 2; 서열 번호 4 및 서열 번호 6의 서열을 갖는 3개의 모든 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.

[0018] 본 발명의 추가 목적은 항체 경쇄의 가변 영역이 서열 번호 8; 서열 번호 10 또는 서열 번호 12의 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) 중 하나 이상을 포함하는 항-EpCAM 항체 또는 이의 기능적 유도체를 제공하는 것이다.

[0019] 바람직하게는 항체 경쇄의 가변 영역은 서열 번호 8; 서열 번호 10 또는 서열 번호 12의 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) 중 2 이상을 포함한다.

[0020] 더욱 바람직하게는 항체 경쇄의 가변 영역은 서열 번호 8; 서열 번호 10 및 서열 번호 12의 서열을 갖는 3개의 모든 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.

[0021] 본 발명의 추가 목적은 서열 번호 2; 서열 번호 4 또는 서열 번호 6의 서열 중 하나 이상, 2개 또는 모두를 포함하는 중쇄의 가변 영역, 및 서열 번호 8; 서열 번호 10 또는 서열 번호 12의 서열 중 하나 이상, 2개 또는 모두를 포함하는 경쇄의 가변 영역을 갖는 항-EpCAM 항체 또는 이의 기능적 유도체를 제공하는 것이다.

[0022] 바람직하게는 본 발명에 따른 항-EpCAM 항체 또는 이의 기능적 유도체는 EpCAM 발현 종양의 성장을 완전하고 영구적으로 억제할 수 있다.

[0023] 또한 본 발명은 CDR의 서열 중 하나 이상의 아미노산을 돌연변이시킴으로써 개시된 CDR의 돌연변이 발생을 의도 한다. CDR 중 적당한 위치의 단일 아미노산 치환은 친화도를 향상시키는데 충분할 수 있는 것으로 알려져 있다. 연구자들은 특정 부위 돌연변이화(site directed mutagenesis)를 사용하여 일부 면역 글로불린 생성물의 친화도를 약 10배 증가시켰다. CDR를 돌연변이시켜 항체의 친화도를 증가시키거나 감소시키는(즉, 조절하는) 이 방법은 일반적으로 알려져 있다(예를 들어, Paul, W. E., 1993 참고). 따라서, 특이성 또는 결합 친화도를 증가시키거나 감소시키기 위한(즉, 조절하기 위한) 본 발명의 CDR에 대한 아미노산의 치환, 결실 또는 부가 또한 본 발명의 범주 내이다.

[0024] 간략하게는, 본 발명에 따른 바람직한 항체는 명칭 ST3232/10으로 동정될 것이다. 본 발명의 일례로서, 본 발명은 ST3232/10에 관심이 집중되나, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 일단 본 명세서가 제공되면, 다른 유사한 항체, 및 ST3232/10의 항체 단편 뿐만 아니라 이를 유사한 항체의 항체 단편이 본 발명의 범주내에서 생산될 수 있으며 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 이러한 유사한 항체는 당업자에 의해 실험 적정량으로 생산될 수 있다.

[0025] 바람직하게는 항-EpCAM 항체는 단일클론성 항체이다. 더욱 바람직하게는 부다페스트 조약에 따라 이탈리아 제노바의 어드밴스드 바이오테크놀러지 센터(Advanced Biotechnology Center)에 번호 PD06004로 기록된 하이브리도마 세포주(cell line)에 의해 생산된다.

[0026] 또한 바람직하게는 항체는 에피토프 결합 영역을 포함하는 scFv, Fv 단편, Fab 단편, F(ab)<sub>2</sub> 단편, 다량체성 항체, 웨타이드 또는 단백질 분해성 단편이다.

- [0027] 또한 바람직하게는, 항체는 키메라이거나, 다른 단백질에 융합되거나 제제 또는 마커에 연결된다. 더욱 바람직하게는 키메라 항체는 마우스-인간 키메라이다.
- [0028] 바람직하게는 융합 단백질은 사이토카인, 아비딘계 단백질, 비오틴, 라벨링된 비오틴 또는 다른 효과기 단백질을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역글로불린 생성물은 제제에 연결될 수 있다. 연결은 공유 결합 또는 항체-에피토프 결합에 의할 수 있다. 예를 들어, 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역글로불린 생성물은 2차 항체와 가교될 수 있으며, 2차 항체는 제제에 대한 친화도를 가질 수 있다. 제제는 세포 독성제일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 용어 "세포 독성제"는 세포의 기능을 억제하거나 막을 수 있고/있거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 말한다. 상기 용어는 방사성 동위원소(예를 들어, I, Y, Pr), 화학치료제 및 독소, 예컨대, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 이의 단편을 포함하는 것으로 의도된다. 제제는 화학치료제일 수 있다. 화학치료제는 암 치료에 유용한 화학 화합물이다. 화학치료제의 예는 아드리아마이신, 독소루비신, 5-플루오로우라실, 시토신 아라비노사이드("Ara-C"), 사이클로포스파마이드, 티오텐파, 부설판, 시톡신, 탁솔, 메토트렉세이트, 시스플라틴, 멜팔란, 빈블라스틴, 블레오마이신, 에토포사이드, 이포스파마이드, 미토마이신 C, 미토산트론, 빈크리스틴, 비노렐빈, 카보플라틴, 테니포사이드, 다우노마이신, 카르미노마이신, 아미노프테린, 닥티노마이신, 미토마이신, 에스페라미신(미국 출원 번호 4,675,187 참고), 멜팔란 및 기타 질소 머스타드계를 포함한다. 제제는 사이토카인일 수 있다. 용어 사이토카인은 세포간 매개 물질로서, 다른 세포상에서 작용하는 한 세포 집단에 의해 분비되는 단백질에 대한 일반 용어이다. 이러한 사이토카인의 예는 럼포카인, 모노카인, 및 일반적으로 폴리펩타이드 호르몬이다. 포함되는 사이토카인은 성장 호르몬 예컨대, 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 릴액신; 프로릴액신; 당단백질 호르몬 예컨대, 여포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 및 항체형성 호르몬(LH); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락チン; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자; 물러(mullerian) 억제 물질; 마우스 생식샘자극 호르몬-관련 펩타이드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인터그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자, 예컨대, NGF; 혈소판-성장 인자; 전환 성장 인자(TGF); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 인터페론 예컨대, 인터페론-알파, -베타, 및 -감마, 접락 자극 인자(CSF); 과립구-대식세포-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); 인터루킨(IL) 예컨대, IL-1, IL-1.알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 종양 괴사 인자; LIF 및 키트 리간드(KL)을 비롯한 기타 폴리펩타이드 인자를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 용어 사이토카인은 자연 공급원 또는 재조합 세포 배양물 및 자연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 등가물의 단백질을 포함한다.
- [0030] 진단을 위해, 본 발명의 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역글로불린 생성물은 항체에 직접 또는 간접적으로 컨쥬게이트된 화합물 또는 조성물을 검출하기 위해 라벨에 부착될 수 있다. 라벨을 그 자체로 검출가능하거나(예를 들어, 방사성 동위원소 라벨 또는 형광 라벨) 또는 효소 라벨의 경우에는 검출가능한 조성물 또는 기질화합물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.
- [0031] 더욱 바람직하게는 항체는 인간 또는 인간화 항체이다.
- [0032] 따라서, 본 발명은 EpCAM을 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편 또는 (예를 들어, 마우스-인간 키메라 또는 사이토카인, 아비딘계 단백질 또는 다른 효과기 단백질과 같은 문자와의 융합 단백질과 같은) 항체 키메라 또는 면역글로불린 문자를 제공한다. 본 발명은 ST3232/10의 가변 경쇄의 CDR 및/또는 ST3232/10의 가변 중쇄의 CDR 중 하나 이상을 포함하는 항체 또는 항체 단편 또는 항체 키메라 또는 면역글로불린 문자를 제공한다. 본 발명의 항체 또는 항체 단편 또는 항체 키메라 또는 면역글로불린 문자는 항체, Fv 단편, Fab 단편, F(ab)<sub>2</sub> 단편, 단쇄 항체, 또는 다량체성 항체일 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항체 단편 또는 항체 키메라 또는 면역글로불린 문자는 IgM, IgD, IgG, IgA, 또는 IgE 이소타입이거나 이들로부터 유도될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체의 재조합 유도체를 제공하는 것이다. 특히, 바람직한 재조합 유도체는 쥐의 불변 영역이 인간 대응물로 대체된 것이거나(Ferrer C. 등, 1996) 또는 쥐의 불변 영역이 예를 들어, 아비딘계의 구성원(Penichet ML 등, 1999), (예를 들어, G-CSF, GM-CSF와 같은) 자극 종양 직접 면역 효과기에 유용한 성장인자와 같은 생물학적 활성 모이어티에 의해 대체된 것이거나, 또는 쥐의 불변 영역이 예를 들어, 독소, 초항원, 사이토카인 또는 항종양 치료 효능 증강에 유용한 임의의 기타 단백질과 같은 약학적 활성 모이어티에 의해 대체된 것들(Di Massimo A. M. 등, 1997; Parente D. 등, 1997)이다.
- [0034] 상기 재조합 유도체를 수득하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다.

- [0035] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체의 컨쥬게이트 유도체를 제공하는 것이다.
- [0036] 특히, 바람직한 컨쥬게이트 유도체는 생물학적 활성 모이어티가 통상적인 방법에 의해 항체에 연결된 것들이다. 생물학적 활성 모이어티의 예는 아비딘계의 구성원, (예를 들어, G-CSF, GM-CSF와 같은) 자극 종양-직접 면역 효과기에 유용한 성장 인자, 예를 들어, 독소, 초항원, 사이토카인, 또는 항종양 치료 효능 증강에 유용한 임의의 기타 단백질, 항종양 약물, 방사성 동위원소와 같은 약학적 활성 모이어티이다.
- [0037] 본 발명에 따른 단일클론성 항-인간 EpCAM의 재조합 유도체 또는 컨쥬게이트 또는 이의 단편은 "유도체"로 지칭된다. 본 발명의 가장 특히 바람직한 구체예에서, 항체 또는 단편 이외에 이의 유도체도 비오틴화된다.
- [0038] 본 발명의 추가 목적인 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 유도체를 암호화하는 핵산 또는 상기 핵산과 혼성화되거나 이의 축퇴성 서열(degenerated sequence)로 구성된 핵산을 제공하는 것이다.
- [0039] 바람직하게는 핵산은 서열 번호 1, 서열 번호 3, 서열 번호 5, 서열 번호 7, 서열 번호 9 및 서열 번호 11의 서열 중 하나 이상을 포함한다.
- [0040] 다른 구체예는 본 발명의 항체 또는 항체 단편 또는 항체 키메라 또는 면역글로불린 분자 생성물을 암호화하는 정제된 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명의 면역글로불린 생성물을 암호화하는 핵산 분자는 통상적인 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 합성화제(synthesizer)를 이용하여 합성되고, 함께 연결되어 본 발명의 면역글로불린 생성물을 암호화하는 기능적 오픈 리딩 프레임을 형성한다. 일단 핵산 분자가 합성되면, 핵산 벡터내로 클로닝될 수 있다. 플라스미드, 코스미드, 파지미드(phagemid), 이스트 플라스미드, 파지 벡터, TI 플라스미드 등과 같은 핵산 벡터는 당해 분야에 공지되어 있다. 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 발현 벡터 및 발현 시스템은 Stratagene(La Jolla, CA)과 같은 제조업체로부터 상업적으로 입수 가능하다.
- [0041] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [0042] 본 발명의 추가 목적은 본 발명의 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다.
- [0043] 세포는 형질감염에 의해 제조될 수 있다. 형질감염 방법은 공지되어 있으며, 원핵 세포 및 진핵 세포의 형질감염용 키트는 상업적 공급처(예, Stratagene, La Jolla, CA)로부터 입수될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 항-EpCAM 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공하는 것이다. 바람직하게는 하이브리도마 세포주는 부다페스트 조약에 따라 이탈리아, 제노바의 어드밴스드 바이오테크놀로지 센터(Advanced Biotechnology Center)에 번호 PD06004로 기탁된 하이브리도마 cST3232/10이다.
- [0045] 단일클론성 항체의 제조 방법은 당업자의 기술 범위내이며, 상기 하이브리도마 세포주를 배양하는 단계, 및 표준 처리과정에 따라 항체를 단리시키는 단계를 포함한다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 목적은 약제로 사용하기 위한 본 발명의 항-EpCAM 항체를 제공하는 것이다. 바람직하게는 항종양 약제로 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 종양은 결장암, 유방암, 위암, 난소암, 방광암, 또는 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 다른 구체예는 본 발명의 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역 글로불린 생성물 또는 본 발명의 핵산을 신생물 질환(neoplastic disorder) 환자에게 투여하는 것을 포함하여 신생물 질환 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 암 면역 치료 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Old, L. J. Immunotherapy for Cancer, Scientific American, September 1996]을 참조한다. 항체는 비오틴과 결합될 수 있으며, 전신 투여의 잠재적인 독성 효과를 예방하기 위해 아비딘과 같은 추적제(chasing agent)를 이용하여 순환으로부터 제거할 수 있다.
- [0047] 또한 본 명세서에는 우선, 환자 개체의 고형 조직 장기(예를 들어, 결장)으로부터 고형암(예, EpCAM를 발현하는 종양)을 제거하는 단계, 및 그 후 치료 유효량으로 고형암의 세포에 선택적으로 독성인 본 발명의 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역글로불린 생성물(예, EpCAM에 결합하는 항체)과 같은 항신생물제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 고형암 치료 방법을 개시한다. 본 발명의 구체예에서, 투여 단계는 절제 강내로 항신생물제를 침착시켜 수행된다.
- [0048] 본 발명의 추가 목적은 유효량의 본 발명에 따른 항체 또는 이의 유도체 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 바람직하게는 본 발명의 약학 조성물은 방사선면역치료용이다. 약학 조성물은 이 분야에서 일반적이며, 공통적인 일반 지식에 기초하여 당업자에 의해 제조될 수 있다. 약학 조성물의 예는 본 발명에서 언급되는 참고문헌에서 제공된다. 동일하게 진단 키트에 사용된다. 특히 바람직하게는

Paganelli 등에 의해 상기 언급된 문헌 및 EP 0 496 074에 개시된 바와 같이 종양의 방사선 면역치료용 키트이다.

[0049] 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 비히클과 혼합된 항체 및/또는 단편 및/또는 재조합 유도체 및/또는 이의 컨쥬게이트를 포함하는 약학 조성물을 본 발명의 범주내에 포함된다.

[0050] 본 발명의 또 다른 양태는 종양의 방사선 면역 치료용 약제이며, 이는 EpCAM 발현 종양을 앓고 있는 개체에 투여되고, 상기 단일클론성 항체 또는 단백질 분해성 단편 또는 이의 유도체를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 단일클론성 항체 또는 단백질 분해성 단편 또는 이의 유도체는 비오틴화되며, 보다 특히 바람직한 구체예에서, 약제는 방사선 면역 치료에 적합하며, 예를 들어, EP 0 496 074, Paganelli 등 1999, 및 미국 특허 번호 5,968,405의 당해 분야에 기술된 바와 같이, 3단계 표적화 방법을 수행하는데 적합하다. 이 후자의 양태에서, 본 발명에 따른 약제는 키트 형태일 것이며, 상기 키트는 4개의 바이알로 구성되며, 이 중 제1 바이알은 비오틴화된 항체 또는 단편 또는 이의 유도체를 함유하며, 제2 바이알은 아비딘을 함유하며, 제3 바이알은 비오틴화된 알부민을 함유하며, 제4 바이알은 방사성 라벨링된 비오틴 또는 비오틴 유도체를 함유한다. 이러한 키트류는 Paganelli 등, 1999.에서 제공된다. 아비딘은 아비딘, 스트렙타비딘, PEG-아비딘 또는 PEG-스트렙타비딘, 디- 또는 폴리아비딘 또는 디- 또는 폴리스트렙타비딘 애생형 또는 탈글리코실화된 유형을 포함한다. 방사성 라벨링된 비오틴은 EP 0 496 074에 개시된 것과 같은 방사성핵종을 포함하며, 예를 들어, WO 02/066075에는 <sup>90</sup>Y 비오틴 유도체가 바람직한 것으로 개시되어 있다. 이 유형의 키트는 Paganelli 등, 1999에 개시되어 있다. 바람직하게는 바이알은 인체 주입에 적절하다.

[0051] 조성물은 바람직하게는 적어도 다른 종양 특이적 항체를 동일 단위 용량 내에 또는 별개로 포함한다. 바람직하게는 종양 특이적 항체는 본 발명의 항체와 다른 EpCAM 항체이다. 다른 구체예에서 본 발명의 항체, 항체 단편, 항체 키메라, 또는 면역글로불린 생성물을 포함하는 치료 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 면역글로불린 생성물은 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역글로불린 생성물, 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 치료 조성물은 인간과 같은 포유동물의 질환 치료에 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명의 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역글로불린 생성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 포유동물 치료 방법을 제공하며, 상기 포유동물은 암과 같은 질환을 앓으며, 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역글로불린 생성물의 치료가 필요하다.

[0052] 본 발명의 다른 목적은 진단에 사용하기 위한 본 발명의 항-EpCAM 항체를 제공하는 것이다. 바람직하게는 항종양 진단용이다. 더욱 바람직하게는 생체내 항종양 진단용이다. 질환의 검출 또는 진단은 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역 글로불린 생성물과 EpCAM 항원간 복합체를 형성할 수 있는 조건하에서, 본 발명의 항체, 항체 단편, 항체 키메라 또는 면역글로불린 생성물을 개체의 조직 샘플과 표적화하는 단계, 및 상기 복합체 형성을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 항체는 다양한 유형의 면역학적 또는 생화학적 진단 기술에 적용될 수 있다. 예를 들어, 진단 기술은 (1) 단일클론성 항체가 형광 염료와 같은 염료로 라벨링되어 가시적으로 관찰되는 단일클론성 항체와 항원간 연결이 존재하도록 형광성 항체 또는 화학적 염색 방법을 이용하는 방법, (2) 단일클론성 항체를 라벨링하는 데 형광성 염료 대신 효소를 사용하는 효소-항체 방법, (3) 항원 등의 양을 측정하기 위해 단백질-라벨링된 2차 항체를 이용하는 ELISA 방법, (4) 동위원소를 이용하여 단일클론성 항체를 라벨링하는 방사선면역측정법, 및 (5) 항원-항체 반응에 의한 응집 반응을 이용하는 면역침전 방법을 포함한다.

[0053] 진단 기술은 추가로 단백질을 전기영동하여 분류하고, 단일클론성 항체로 검출하는 웨스턴 블로팅 방법을 포함한다. 웨스턴 블로팅 방법은 단일클론성 항체와 관련한 항원 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 직접 클로닝에 유리하다. 웨스턴 블로팅 방법은 웨스턴 방법, 사우스 웨스턴 방법, 노던 웨스턴 방법 및 웨스트 웨스턴 방법과 같은 여러 변형을 포함한다.

[0054] 본 발명의 다른 구체예에서, 항체 및 이의 단편은 추가의 마커 및/또는 진단제제를 더 포함할 수 있다. 상기 마커 및/또는 진단 제제는 본 발명과 관련된 당업자에게 잘 알려져 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에 따라, 상기 항체 또는 이의 단백질 분해성 단편은 비오틴화된다.

[0055] 본 발명의 추가 목적은 본 발명의 항-EpCAM 항체를 포함하는 생체내 종양 진단을 위해 주입가능한 가용성 조성물을 제공하는 것이다.

[0056] 본 발명의 추가 목적은 적당한 조건하에서 청구항 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 유도체를 함유하는 샘플을 배양하여 항원-항체 복합체를 형성하는 단계, 및 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를

포함하는, 샘플 중 본 발명에 따른 항체 또는 이의 유도체에 결합가능한 항원을 면역 검출하는 방법을 제공한다.

[0057] 본 발명의 추가 목적은 청구항 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 유도체 및 항원-항체 복합체 검출 수단을 포함하는, 청구항 제30항에 따른 방법을 위한 진단 키트를 제공하는 것이다.

[0058] 본 발명의 다른 구체예에서, 치료 키트 중 비오틴화된 항체는 다른 EpCAM-특이적 항체와 조합된다. 대안적으로 비오틴화된 항체는 다른 종양 특이적 항체와 조합된다. 상기 유형의 키트의 일반적인 교시는 EP 0 496 074, Paganeli 등, 1999 및 U.S. 특허 번호 5,968,405에서 개시된다.

[0059] 특히, 본 발명은 또한 3 단계 선제 표적화 방법을 위한 치료 키트의 사용에 적절한 비오틴화된 항체 또는 단편 또는 이의 유도체, 완충제 및 시약을 포함하며, 임의적으로 다수의 컴파트먼트를 함유하는 컨테이너를 포함한다.

[0060] 본 발명의 다른 목적은 EpCAM 발현 질환의 검출을 위한, 특히 생체내 종양 이미지를 검출하기 위한, 진단 수단 제제용, 상기 단일클론성 항체 또는 단편 또는 재조합 유도체 또는 이의 컨쥬게이트 또는 이의 비오틴화된 유도체의 용도를 제공한다.

[0061] ST3232/10은 하기 실시예에서 구체적으로 개시되는 상응하는 하이브리도마 세포 클론 cST3232/10으로부터 수득된다.

[0062] 본 발명의 산업적 이용가능성과 관련하여, 본 명세서에 기술되는 항체는 이 기술 분야에 통상적으로 사용되는 약학 조성물 또는 진단 키트로 적절히 제제화될 것이다.

[0063] 본 발명은 하기 설명에서 구체적으로 기술될 것이며, 또한 하기 도면에서 언급되는 비제한적인 실시예에 의해 기술될 것이다.

## 실시예

### 방법

#### 하이브리도마 세포

[0073] EpCAM에 대한 새로운 하이브리도마 세포 클론을 생성하기 위해, Balb/c 마우스를 인간 EpCAM 분자(NCBI RefSeq NM\_002354)로 안정적으로 형질감염된 L 쥐의 섬유육종 세포주(Alberti S 등 1998)로 면역화시켰다. 면역화된 마우스의 비장림프구(splenocyte)를 표준 방법(Cianfriglia M. 등 1986)으로 Sp2/0Ag14 골수종 세포와 융합시키고, 하이브리도마 집락을 HT29와 같이 EpCAM을 발현하는 종양 세포주상에서 세포형광분석법(cytofluorimetry)으로 스크리닝하였다. EpCAM 특이적 하이브리도마를 FCS 함유 배지에서 2회 및 무단백 배지(Animal Derived Component Free Medium HyClone, HyQRPerbio)에서 4회 제한 회석하여 클로닝하였다. 4번째 제한 회석한 클로닝으로부터 유래한 포지티브 클론 중 하나를 cST3232로 명하고, 미니 바이오반응기에서 발효시켰다. cST3232 세포 주의 안정성은 98.65% 였다. 따라서 포지티브 클론, cST3232을 선별하고, 추가 성장을 위해 증폭하였다.

#### 항체

[0077] 상업적 키트(Roche, Germany)로 측정한 바와 같이, ST3232/10은 쥐의 면역글로불린의 IgG1/k 이소타입이다. 카파 경쇄 가변 영역은 문헌[M. Sassano 등 (1994)]에 기술된 바와 같이, 항체 불변 영역에 어닐링된 한쌍의 프라이머(5'-TGTCAAGAGCTTCAACAGGA-3'(서열 번호:13), 5'-AAGATGGATACAGTTGGTGC-3'(서열 번호:14))를 이용하여 원형 cDNA로부터 증폭하였다.

[0078] 감마 중쇄 가변 영역은 문헌[M. Sassano 등 (1994)]에 기술된 바와 같이, 항체 불변 영역에 어닐링된 프라이머 올리고뉴클레오티드 마우스 γ 1CH1 5'-ATGGAGTTAGTTGGCAGCAG-3'(서열 번호:15) 및 올리고뉴클레오티드 마우스 γ 1CH3 5'-GCACAAACCACCATACTGAGAAG-3'(서열 번호: 16)을 이용하여 원형 cDNA로부터 증폭하였다.

[0079] PCR은 다음 조건을 이용하여 수행되었다: 94°C에서 40초, 62°C에서 40초, 72°C에서 1분, 30 주기.

[0080] 증폭된 단편은 TA 클로닝 키트 듀얼 프로모터 PCRII (Invitrogen, #K2050-01)을 이용하여 PCRII 클로닝 벡터에서 직접 클로닝하였다. 카파 경쇄를 함유하는 9개의 클론 및 감마 중쇄 가변 영역을 함유하는 7개의 클론을 서열화하였다. 서열화는 독일 MWG Biotech에서 수행하였다. 양 가닥을 서열화하였다. 애매한 경우는 없었다.

#### SDS-PAGE 분석

- [0082] 항체는 비활원 조건 및 활원 조건하에서, 유동 완충액으로 1x MES과 4-12% 농도의 비스 트리스(Bis Tris) NuPAGE상에서 유동시키고, 쿠마시 용액(모든 시약은 Invitrogen, USA으로부터 입수)으로 염색하였다.
- [0083] 크로마토그래프 프로파일
- [0084] ST3232/10은 유동 완충액으로서 PBS + NaN3 0.05%와 1ml/분의 유속으로 TSGK3000 컬럼(Tosoh Bioscience GmbH, 슈투트가르트, 독일)상을 유동시켰다.
- [0085] 세포 형질감염
- [0086] 문현[Alberti S 등 1988]에 따라 Trop-1 또는 Trap 2로 형질감염을 시켰다.
- [0087] FACS 분석
- [0088] 세포의 표면상에서 자연 Trop-1 분자에 결합하는 ST3232/10 항체를 인간 세포주의 패널상에서 유세포분석기로 분석하였다. 반응은 웰 당 약  $3 \times 10^5$  세포를 이용하여 2단계로 V 바닥의 96-웰 플레이트에서 수행하였다. 세포 혼탁액을 우선 ST3232/10 항체의 1  $\mu\text{g}$ /웰에서 배양하고; 다음 2차 PE-컨쥬게이트된 항 마우스 항체(550589, BD Pharmingen, 에腼보데겐, 벨기에) 2 $\mu\text{l}$ 로 배양하였다. 세포를 각 단계에서 4°C에서 30분 동안 배양하고, 1% FCS를 함유하는 PBS로 세척하였다. 최종 세척 후, 세포를 수집하기 위해 PBS에서 재현탁하고, 전용 소프트웨어(BD Biosciences, 에腼보데겐, 벨기에)의 FACS 어레이 장치를 이용하여 분석하였다. 대조군으로서 다른 Trop1, Trop2 또는 관련 없는 항체를 사용하고, 7-AAD(BD Biosciences, 에腼보데겐, 벨기에)을 생체 염색하기 위해 샘플(5  $\mu\text{l}$ /106 세포)에 가하였다.
- [0089] 공초점 현미경
- [0090] 유방 종양 세포주 MCF7는 Alexafluor-488 라벨링된 ST3232/10으로 염색하고, 공초점 현미경으로 분석하였다. MCF7 세포는 15x15 mm 커버 슬립 위에 플레이팅하고, 48 시간 후 실온에서 30분 동안 PBS/4% 파라포름알데히드에서 배양하여 고정하였다. 실온에서 0.05% 사포닌을 함유한 SM(PBS 중 10% 혈청)에서 30분 동안 투과화(permeabilization)시킨 후, 1차 항체(슬라이드 당 1 $\mu\text{g}$ 의 ST3232-Alexa488)를 실온에서 SM+사포닌에서 30분 배양시켰다. SM에서 3회 세척한 후, 공초점 현미경 관찰을 위해 커버 슬립을 옮렸다.
- [0091] 세포 ELISA
- [0092] 우선 96웰 플레이트를 37°C에서 30분 동안 1xPBS 200  $\mu\text{l}$ /웰, 10% FCS로 차단한 후, 총 부피가 100  $\mu\text{l}$ 이 되게 250.000 세포/웰에 1차 항체를 더하여 씨딩하였다. 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 배양한 후, 수초간 2000 rpm에서 원심분리하여 1x PBS, 1% FCS로 3차례 세척하였다. 항 마우스 IgG 알칼리 포스파타아제 컨쥬게이트(Sigma A2429, 1/1000 희석)를 1차 항체-세포 복합체에 가하고, 실온에서 1 시간 동안 배양한 후, 5차례 세척한 후, pNpp 기질 200 $\mu\text{l}$ (Sigma A3496)를 각 웰에 가하고, 37°C에서 30 분간 배양하였다. 플레이트를 최종적으로 원심분리하고, 170  $\mu\text{l}$ 의 상청액을 새 플레이트로 옮기고, 405 nm에서 ELISA 분광광도계(SEAC Sirio S)로 판독하였다.
- [0093] 표면 플라즈몬 공명
- [0094] EpCAM에 대한 ST3232/10의 친화도는 상업적으로 입수가능한 키메릭 융합 단백질 Fc-EpCAM 세포외 도메인(R&D, USA) CM5 칩상에 고정시킨 표면 플라즈몬 공명 (SPR, Biacore X, Biacore, 옵살라, 스웨덴)으로 평가하였다. 500-7.8 nM의 농도 범위에서 ST3232/10을 주입하여 얻은 곡선은 2가 모델(Biaevaluation software, v. 3.1, Biacore, 옵살라, 스웨덴)로 평가하였다.
- [0095] 면역조직화학
- [0096] 폐암의 35개 절편 및 10개의 정상 폐(cod. # 49561006), 35개의 결장 직장암 및 10개의 정상 결장(cod. # 49561004), 35개의 난소암 및 10개의 정상(cod. # 49561006) 및 정상 조직(cod. # 49561001)의 슬라이드와 TRISTAR 테크놀로지 래보레이토리즈(USA)로부터 얻은 동결 절편을 선택성 연구를 위해 이용하였다. ST3232/10를 차단 용액(PBS+2.5%의 정상 말 혈청) 중 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 희석하였다. 이소타입 매칭 네가티브 대조군을 시험 아이템의 동일한 농도에서 모조 슬라이드 상에서 사용하였다.
- [0097] 제조사의 지시에 따라 슬라이드를 처리하고, 항체 결합은 Vectastain ABC Elite kit cod. PK6102 kit(Vector Laboratories)의 사용에 의해 발현되었다. 조직 수화 후, 내인성 페옥시다아제의 퀸칭을 5분 동안 0.3%의 수소 페옥시다아제 용액 중 슬라이드를 침지시켜 수행하였다. 5분간 x3, PBS에서 세척하고 PBS +2.5%의 말 정상 혈청

으로 절편을 차단한 후, 5 $\mu$ g/mL으로 차단 용액에 희석된 1차 항체를 실온에서 2시간 동안 가하였다. PBS로 3회 세척한 후, 슬라이드를 2차 거위 항 마우스 비오틴 컨쥬게이트된 항체와 배양한 후, 30분간 아비딘-비오틴 복합체 퍼옥시다아제와 배양하였다. 추가 세척 후, 슬라이드를 2분간 Vector® DAB/Ni 기질 키트(Cat. SK-4100) 중 신선한 DAB 용액에서 배양하고, 수돗물로 반응을 중지시켰다. 대비염색은 10초간 Meyer's 헤마톡실린(hematoxylin)에 침지시켜 이루어졌다. 최종적으로 슬라이드를 각각 1분간 75%, 80%, 95% 및 100% 에탄올에서 탈수시키고, 크실렌으로 정제하고 합성 마운틴트(mountant)로 영구히 고정하고 현미경으로 관찰하였다.

[0098] 생체내 모델: 흉선샘 없는 누드 마우스의 동종이식

[0099] Trop-1로 형질감염(L/Trop-1)되거나 인간 Trop-1으로 형질감염되지 않은(L/벡터) 쥐의 L 섬유육종 세포주를 3개의 군의 흉선샘 없는 누드 마우스(10 마리/군)에 피하 주사하였다. 접종일에 동물을 200  $\mu$ g 의 ST3232/10 (L/벡터+ST3232 및 L/Trop-1+ST3232), 에드레콜로맙(Edrecolomab)(L/Trop-1+Panorex) 또는 관련 없는 쥐의 IgG(L/벡터 및 L/Trop-1)으로 처리하였다. 7일, 15일 및 22일에 다른 3가지 투여가 이루어졌으며, 화살표로 나타냈다. 모든 군에서 종양 성장은 50일까지 칼리퍼(Caliper) 측정으로 평가하였다.

[0100] 생체내 모델: 인간 결장직장 세포주의 이종이식

[0101] Trop-1을 자연적으로 발현하는, 인간 결장암 세포주 KM12-SM을 누드 마우스에 피하 이식시켰다. 접종일로부터 시작하여 일주일에 1회, 200 $\mu$ g의 ST3232/10 (ST3232 군), M104 (M104 군) 또는 비히클(대조군)로 4회 처리가 이루어졌다. 종양 진행을 30일까지 모니터링하였다.

## 결과

[0103] ST3232/10의 가변 중쇄(VH) 상보성 결정 영역 및 가변 경쇄(VL) 상보성 결정 영역의 서열을 표 1에 도시하였다.

[0104] [표 1: ST3232/10 항체의 VH 및 VL 상보성 결정 영역의 서열]

	뉴클레오티드 서열	아미노산 서열
가변 중쇄		
CDR1	AGCGGTTATTACTGGAAC (SEQ ID 1)	S G Y Y W N (SEQ ID 2)
CDR2	TATATAAGTTACGACGGTAGGAAT AAGTACAACCCATATCTCAAAAAT (SEQ ID 3)	Y I S Y D G R N K Y N P Y L K N (SEQ ID 4)
CDR3	GCCCTCGGGGGGGATTACGATGCT TTGGACTGC (SEQ ID 5)	A L G G D Y D A L D C (SEQ ID 6)
가변 경쇄		
CDR1	AAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCC AGTCAGAGTCTGTAAACAGTAGA AGTCAAAGAACTACTTGACC (SEQ ID 7)	K V T M S C K S S Q S L L N S R S Q K N Y L T (SEQ ID 8)
CDR2	TGGGCATCCACTAGGGAATCT (SEQ ID 9)	W A S T R E S (SEQ ID 10)
CDR3	CAGAAATGATTATTTATCCGCTC ACG (SEQ ID 11)	Q N D Y I Y P L T (SEQ ID 12)

[0105]

[0106] ST3232/10는 SDS-PAGE 분석 및 크로마토그래프 프로파일에 의해 보여지는 바와 같이, 경쇄 및 중쇄 조성물에 대하여 균일한 것으로 증명되었다(도 1 및 2). 사실, 비활원 조건(레인 1-3)하에서, 유동 완충제로서 1x MES와 4-12% 농도의 비스 트리스 NuPAGE상에서 3번씩 유동시키고, 쿠마시 용액(모든 시약은 Invitrogen, USA에서 입수)으로 염색한 항체는 예상 분자량(150 KDa)의 밴드를 보였다. 활원 조건하에서(레인 4-6)는 단지 중쇄(50 KDa) 및 경쇄(25 KDa)에 상응하는 두개의 밴드가 보였으며, 이는 다른 오염된 생성물의 부재를 보이는 것이다. 이러한 발견은 TSGK3000 컬럼 상의 ST3232/10 런으로부터 유출된 단일의 균일한 퍼크가 관찰되는 크로마토그래피 프

로파일에 의해 확인되었다(도 2).

[0107] EpCAM 계열 구성원에 대한 ST3232/10의 특이성은 항원을 발현하지 않으며, EpCAM(TROP-1) 또는 고 균일성 분자 TROP2로 형질감염된 쥐의 세포주상에서 FACS 분석에 의해 평가되었다. 도 3에서 보여지는 바와 같이, ST3232/10은 Trop-1 포지티브 세포(패널 A)와만 반응하고, Trop-1 네ガ티브 세포, 예컨대, L 세포(패널 G) 또는 L-Trop2 세포(패널 D)와는 반응하지 않기 때문에 EpCAM에 대하여 특이적이다. 유사한 결과가 다른 EpCAM 특이적 항체(패널 B, E, H: M104; C, I: HT29/26)에서도 관찰된다. T16 항체는 TROP2-L 세포(패널 F)에서 포지티브 대조군으로 사용하였다.

[0108] 또한, ST3232/10은 다른 EpCAM 항체, 예컨대, M104 (Klein CE. 등 1990)에 대한 동등한 결합 활성을 갖는다. 자연 항원의 이의 유효한 인식 능력은 상이한 수준의 EpCAM 분자가 관찰되는 경우 암 세포주의 패널상의 세포유체 연구에 의해 기술된다(표 II).

[표 2: ST3232/10 또는 M104 항-TROP-1 항체를 이용하여 다양한 기원의 종양 세포주의 패널상에서 얻은 FACS 결과]

세포주 (ATCC No.)	종양 유형	ST3232/10	M104
HT 29 (HTB-38)	결장암	++++	++++
LoVo (CCL-229)	"	++++	++++
COLO320DMF	"	nd	-
SW 620 (CCL-227)	"	++++	++++
CACO-2 (HTB-37)	"	++++	++++
LS 174T (CL-188)	"	++++	++++
KB 3-1 (이탈리아, Dr.Cianfriglia 제공)	코인두암종 (nasopharyngeal ca.)	++++	++++
SKBR-3 (HTB-30)	유방암	++++	nd
MDA-MB-231 (HTB-26)	"	++	nd
MDA-MB-468 (HTB-132)	"	+	nd
MCF10-2A (CRL-10781)	"	++	nd
MCF7 (HTB-22)	"	++	++
SKOV-3 (HTB-77)	난소암	+	nd
NIH:OVCAR3 (HTB-161)	"	++++	++++
IGROV-1(종양 국립센터, 이탈리아)	"	-	-
SKMEL28 (HTB-72)	흑색종	-	nd
U-118 MG (HTB-15)	아교모세포종	-	nd

++++ 100% 포지티브, ++ > 90% 포지티브, + > 50% 포지티브, + > 20% 포지티브,  
+/- < 15% 포지티브, -네가티브, nd = 미확정

[0110]

[0111] 유방 종양 세포주 MCF7은 Alexafluor-488 라벨링된 ST3232/10에 의해 염색되고, 공초점 현미경에 의해 분석된다(도 4). Alexa488-ST3232/10 컨쥬게이트는 세포-세포 경계에서 최고의 강도로 예상되는 염색 패턴을 보였으며, 단리된 패취의 염색을 보였다(도 4A 및 B의 두 예).

[0112]

ST3232/10의 면역반응성은 인간 전사체로 형질감염되거나 자연적으로 EpCAM을 발현하는 종양 세포주상에서 다른 입수 가능한 항-EpCAM 항체와 비교하여 세포-ELISA로 평가되었다. 예로서, ST3232/10 및 HT29/26(Klein CE 등 1990) 항-EpCAM 항체의 HT29 인간 결장암 세포주상의 세포-ELISA는 도 5에 도시된다. ST3232/10은 용량의존적으로 HT29 세포상에서 자연적으로 발현되는 EpCAM에 결합할 수 있다. 이 어세이에서 HT29/26은 다른 항체들이 결합한 것(데이터 도시 않음)과 같이, ST3232/10 보다 더 높은 친화도로 EpCAM에 결합하는 것으로 나타났다.

[0113]

EpCAM에 대한 ST3232/10의 친화도는 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 평가하였다. 500-7.8 nM의 농도 범위에서 ST3232/10를 주입하여 얻은 곡선은 2가 모델에 의해 평가되며(도 6A),  $\chi^2$ (1.97)에 의해 확인되는 바와 같이 우수한 질의 피트를 보이며, 나머지는 실험에서 기록된 최고값의 RU(140) <10% 였다. ST3232/10의 KD는 9.3E-10( $k_{on} = 7.75E+04 \pm 297$ ;  $k_{off} = 7.2E-05 \pm 8.48E-06$ )였다. EpCAM에 대한 ST3232/10의 친화도는 에드레콜로맙에 의해 나타나는 SPR-평가된 친화도보다 274배 높았으나( $K_D 2.55E-07$ , Naundorf 등 2002) 문헌에 공지된 다른

항-Trop-1 항체에 대한 사용가능한 친화도 정보는 없었다.

[0114] ST3232/10의 내재화(internalization)와 관련하여, FACS 테스트는 4°C에서 EpCAM 발현 세포주와 항체를 배양한 후, 30-120분의 시간 동안 37°C에서 복합체를 가져와 수행하였다. 포지티브 세포의 퍼센트 또는 4°C에서의 대조 샘플과 관련하여 37°C-배양 샘플의 평균 형광 강도에서 차이가 관찰되지 않았으며(표 3), EpCAM/항체 복합체의 내재화의 결핍을 나타냈다.

[0115] [표 III: LoVo 세포주에서의 ST3232/10 내재화 평가]

	모 포지티브 %	MFI
4°C 대조군	98.5	3959
30' 37°C	99.2	4182
60' 37°C	98.1	4092
120' 37°C	98.2	4149

[0116]

[0117] ST3232/10의 선택성은 여러 고형암 및 정상 조직의 조직 마이크로어레이 절편의 면역조직화학으로 조사하였다. 결과를 표 IV 및 V에 요약하였으며, 예를 도 7에 도시하였다.

[0118]

[표 IV: 종양에서의 ST3232/10 반응성]

	Nº 수	포지티브 (%)
폐	32	19 (59.3%)
결장	34	32 (94.1%)
난소	35	31 (88.6%)
총 시험 조직	101	82 (81.2%)

[0119]

[표 V: 정상조직에서의 ST3232/10 반응성]

	Nº 수	포지티브 (%)
폐	8	1 (12.5%)
결장	8	5 (62.5%)
난소	8	0 (0%)
총 시험 조직	24	6 (25.0%)

[0120]

[0122] 높은 발병율의 고형암 유형의 동결 종양 슬라이드(표 IV)를 조직유형이 매치되는 정상 장기로부터 유도된 슬라이드와 비교하여 평가하였다(표 V). ST3232/10은 시험 샘플의 거의 모든 결장암(94.1%) 및 난소암(88.6%), 및 대다수의 폐암 (59.3%) 슬라이드에 결합할 수 있다. 암 세포에 대한 ST3232/10의 선택성은 항체와 반응하는 정상 조직이 없는, 난소 검사물의 경우 매우 높았으며, 종양 샘플의 88.6%가 ST3232에 포지티브였다. 또한, ST3232/10는 다른 종양 유형 중 정상 세포에 비행 암 세포에 높은 발생율 및 강한 염색으로 반응한다. 정상 조직에 대한 결장 및 폐 종양의 선택성은 도 7에 도시되며, 종양 조직은 EpCAM을 과잉발현하며 명백히 포지티브 반응이며, 정상 조직은 네가티브 염색이다.

[0123]

두개의 상이한 동물 모델이 종양 세포 성장에 대한 생체내 항체 활성을 탐구하는데 사용하였다. 1차 실험에서, 흥선샘 없는 누드 마우스의 3개의 군(10 마리/군)을 쥐의 섬유육종 L-hTrop-1 세포주로 피하(s.c.)이식하고, 접종일로부터 시작하여, 일주일에 1회, 4주 동안, ST3232/10, 에드레콜로맙 또는 관련 없는 쥐의 IgG으로 처리하였다. EpCAM으로 형질감염되지 않은 L 세포를 2개의 추가 군에 이식하고, 동물을 ST3232/10 또는 대조 항체로 처리하였다. 도 8에서 보는 바와 같이, EpCAM 발현 종양(L/Trop)은 비형질감염 종양(L/벡터 또는 L/벡터 + ST3232)과 비교시, 더 빠른 성장을 갖는다. 또한 ST3232/10은 EpCAM 발현 종양의 성장을 완전하고 영구히 억제하고, EpCAM 네가티브 종양의 성장을 방해하지 않는다. 반면, 에드레콜로맙(Panorex)은 또한 EpCAM 발현 종양의 성장을 변경하였다. 그러나, 종양은 에데트로콜로맙 처리 중단에 따라 빠르게 성장하였다.

[0124]

인간 결장직장 세포주, KM12SM으로 이종 이식한 누드 마우스의 제2 동물 모델을 이전 결과를 확장하고 확인하는데 사용하였다. 마우스를 이전 실험과 동일한 용량 및 스케줄로 ST3232/10, 쥐의 IgG 및 다른 항-EpCAM 항체, M104로 처리하였다(표 VI, 도 9). 표 VI에서 나타내는 것과 같이, ST3232/10 처리된 군의 종양율은 다른 두개의

군(90-100%)보다 낮았다(56%).

[0125] [표 VI: 종양 발병율]

	종양 발병율 (%)
대조군	100
M104	90
ST3232/10	56

[0126]

또한 도 9에서 보이는 바와 같이, ST3232/10는 종양 성장을 감소시키며, 다른 군에 비하여 종양 발생의 잠재성을 증가시켰다. 이러한 결과는 표적 분자에 단순 결합하는 것보다 ST3232/10의 직접적인 치료 효과의 가설을 뒷받침하는 것이다.

#### 참고문헌

[0129] Alberti S et al., 1988, PNAS 85: 8391-8394

[0130] Burak WE Jr et al., 2001, Tumori 87: 142-146

[0131] Cianfriglia M. et al., 1986, Methods Enzymol. 121: 193210

[0132] De Bono JS et al., 2004, Clin Cancer Res 10: 7555-7565

[0133] Di Massimo A.M. et al., 1997, Br J Cancer 75: 822-828

[0134] Ferrer C. et al., 1996, J. Biotechnol. 52: 51-60

[0135] Frodin JE et al., 2002, Hybrid Hybridomics 21: 99-101

[0136] Goshorn S et al., 2001, Cancer Biot Radiopharm 16: 109-123

[0137] Klein CE et al., 1990, J Invest Dermatol 95: 74-82.

[0138] Naundorf S et al., 2002, Int J Cancer 100: 101-110

[0139] Oberneder R et al., 2006, Eur J Cancer 42: 2530-8

[0140] Old, LJ , 1996, Sci Am 275: 136-143.

[0141] Paganelli et al., 1999, Eur J Nucl Med 26: 348-357

[0142] Parente D. et al., 1997, Anticancer Research 17: 4073-4074

[0143] Paul, W. E., Fundamental Immunology, Raven Press, NY, N.Y. 1993, chapter 23

[0144] Penichet ML. et al., 1999, J. Immunol, 163: 4421-4426

[0145] Prang N et al., 2005, Br J Cancer 92: 342-9

[0146] Punt CJ et al., 2002, Lancet 360: 671-7

[0147] Riethmuller G et al., 1998, J Clin Oncol 16: 1788-1794

[0148] Sassano et al., 1994, Nucleic Acids Res 22: 1768-1769

[0149] Spizzo G et al., 2004, Breast Cancer Res Treat 86: 207-213

[0150] Velders et al., 1998, Br J Cancer 78: 478-483

[0151] Weiner LM et al. , 1993 , J Immunother 13: 110-116

[0152] Went et al., 2006, Br J Cancer, 94: 128-35

[0153] Winter MJ et al., 2003, AJP 163: 2139-2148

## SEQUENCE LISTING

<110> Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A  
 ANASTASI, Anna Maria  
 PETRONZELLI, Fiorella  
 DE SANTIS, Rita

<120> Anti-EpCAM antibody and uses thereof

<130> PCT 102485

<150> EP07105628.7  
 <151> 2007-04-04

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic CDR1 VH

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(18)

<400> 1  
 agc ggt tat tac tgg aac 18  
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn  
 1 5

<210> 2  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 2  
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn  
 1 5

<210> 3  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic CDR2 VH

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(48)

<400> 3  
 tat ata agt tac gac ggt agg aat aag tac aac cca tat ctc aaa aat 48  
 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Asn  
 1 5 10 15

[0154]

<210> 4  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Synthetic Construct  
<400> 4  
Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Asn  
1 5 10 15

<210> 5  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> synthetic CDR3 VH  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(33)  
<400> 5  
gcc ctc ggg ggg gat tac gat gct ttg gac tgc 33  
Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Asp Ala Leu Asp Cys  
1 5 10

<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Synthetic Construct  
<400> 6  
Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Asp Ala Leu Asp Cys  
1 5 10

<210> 7  
<211> 69  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> synthetic CDR1 VL  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(69)  
<400> 7  
aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agt ctg tta aac agt aga 48  
Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg  
1 5 10 15  
agt caa aag aac tac ttg acc 69  
Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Thr  
20

[0155]

<210> 8  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <400> 8  
 Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Thr  
20

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> synthetic CDR2 VL

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)  
 <400> 9  
 tgg gca tcc act agg gaa tct  
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

21

<210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <400> 10  
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

<210> 11  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> synthetic CDR3 VL

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(27)

<400> 11  
 cag aat gat tat att tat ccg ctc acg  
 Gln Asn Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr

27

[0156]

1 5

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Synthetic Construct  
<400> 12  
Gln Asn Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> synthetic primer  
<400> 13  
tgtcaagagc ttcaacagga

20

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> synthetic primer  
<400> 14  
aagatggata cagttggtgc

20

<210> 15  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> synthetic primer  
<400> 15  
atggagttag tttgggcagc ag

22

<210> 16  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> synthetic primer  
<400> 16  
gcacaaccac catactgaga ag

22

[0157]

### 도면의 간단한 설명

- [0064] **도 1:** 단백질 A 컬럼(MabSelect SuRe, GE Healthcare)상에서 정제된 cST3232/10 수집물의 4-12% 비스 트리스 SDS-PAGE(Precast, Invitrogen, USA). 레인 1-3: 비환원 조건하에서 정제된 ST3232/10 Mab, 레인 4-6: 환원 조건하에서 정제된 ST3232/10 Mab. 유동 완충제(running buffer) 1x MES. 쿠마시에 의한 겔 염색(Simp Lie Blu, Invitrogen, USA)
- [0065] **도 2:** TSGK3000 컬럼 상의 정제된 ST3232/10의 겔-여과, PBS pH 7에서 유동. 시간(분)을 가로 좌표로, 밀리 흡광 단위(mAU)를 세로 좌표로 기록함.
- [0066] **도 3:** 항 EpCAM 항체의 FACS 특이성 테스트. ST3232/10 또는 다른 대조군 항체(M104, HT29/26 및 T16)를 인간 TROP-1 분자(페널 A-C), 인간 TROP2 분자(페널 D-F) 또는 외인성 단백질이 도입되지 않는 빈 벡터(페널 G-I)로 형질감염된 자연적으로 EpCAM를 발현하지 않는 쥐의 섬유육종 L 세포와 배양한다( $1\mu\text{g}/10^6$  세포, 1시간 4°C). 2차 PE-컨쥬게이트된 항체(BD, USA)를 제조사의 지시에 따라 사용하고, 세포 치사율은 7-AAD(FACSCalibur, BD Biosciences, USA)로 염색하여 평가하였다. ST3232/10는 TROP-1 포지티브 세포와 포지티브를 보이며(페널 A), 야생형 L 세포 또는 TROP2 분자로 형질감염된 것들은 네가티브를 보였다(각각, 페널 G 및 D). 유사한 결과가 다른 EpCAM 특이적 항체에서도 관찰되었다(페널 B, E, H: M 104; C, I: HT29/26). T16 항체는 TROP2-L 세포에서 포지티브 대조군으로 사용하였다(페널F).
- [0067] **도 4:** MCF7 유방 종양 세포주상에서 Alexa488과 컨쥬게이트된 ST3232/10의 공초점 혼미경(ST3232/10). MCF7 세

포를 15x15 mm 커버슬립에 플레이팅시키고, RT에서 30분 동안 PBS/4% 파라포름알데히드에서 배양하여 48시간 후 고정하였다. 그 후 세포는 투과되며 항체로 염색되고, 공초점 현미경으로 여러 분야를 분석하였다. Alexa488-ST3232 컨쥬게이트는 세포-세포 경계에서 최고 강도로 염색되는 예상 패턴을 보이며, 단리된 패치의 염색을 보였다. 단리된 패치의 두 예는 패널 A 및 B에서 도시된다.

[0068] **도 5:** HT29 결장암 세포주상에서 발현되는 항원에 대한 단일클론성 항체 HT29/26 항 EpCAM 및 ST3232/10의 면역 반응. 데이터는 HT29 결장암과 배양한 두 항체( $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 로그자, X 축)의 증가하는 농도에서의 광학 밀도(405 nm에서 측정) 변화량(선형, Y축)으로 나타낸다.

[0069] **도 6:** CM5 센서 칩상에 고정된 EpCAM 분자의 세포외 도메인에 결합하는 ST3232/10의 역학 분석 및 파라미터. 패널 A: 시간 함수(분, X 축)로서 Mab 주입 농도의 센소그램(500, 250, 62.5, 15.6 및 7.8 nM) 및 공명 단위(RU, Y 축). 패널 B: BiaEvaluation 소프트웨어의 2가 모델을 데이터 피트를 위해 사용하고; 관찰된 곡선과 예상 곡선사이의 RU의 차이점을 나타내는 것은 각 시점(X 축)에 대하여 그래프(Y 축)으로 보고된다. 역학 상수는 다음과 같다:  $k_a = 7.75\text{E}+04 \pm 297$ ,  $k_d = 7.20\text{E}-05 \pm 8.48\text{E}-06$ ,  $K_D = 9.3\text{E}-10$ ,  $X^2 = 1.97$ .

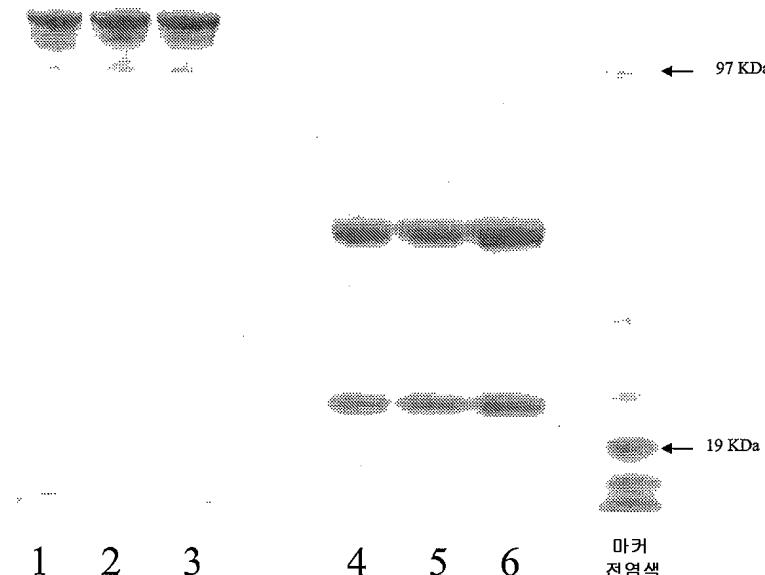
[0070] **도 7:** 인간 종양 및 정상 조직에 대한 ST3232/10 반응성. 예로서, 결장 및 폐 종양의 면역조직화학 결과를 이들의 정상 대응물(각각 패널 B 및 D)과 비교하여 도시한다(각각, 패널 A 및 C). 인간 종양 조직은 갈색으로 강하게 염색된다.

[0071] **도 8:** 누드 마우스의 동종 이식하고, 에드레콜로맙(Panorex®)과 ST3232/10의 처리 비교. (L/Trop-1)로 형질감염되거나 인간 Trop-1로 형질감염되지 않은(L/벡터) 쥐의 L 섬유육종 세포주를 누드 마우스에 피하 주사하였다. 접종일에 동물들을 200 $\mu\text{g}$ 의 ST3232/10(L/벡터+ST3232 및 L/Trop-1+ST3232), 에드레콜로맙(L/Trop-1+Panorex) 또는 관련 없는 쥐의 IgG(L/벡터 및 L/Trop-1)로 처리하였다. 7일, 15일 및 22일에 다른 3 차례 투여를 수행하고, 화살표로 나타낸다. 종양 진행은 50일까지 모니터링하였다.

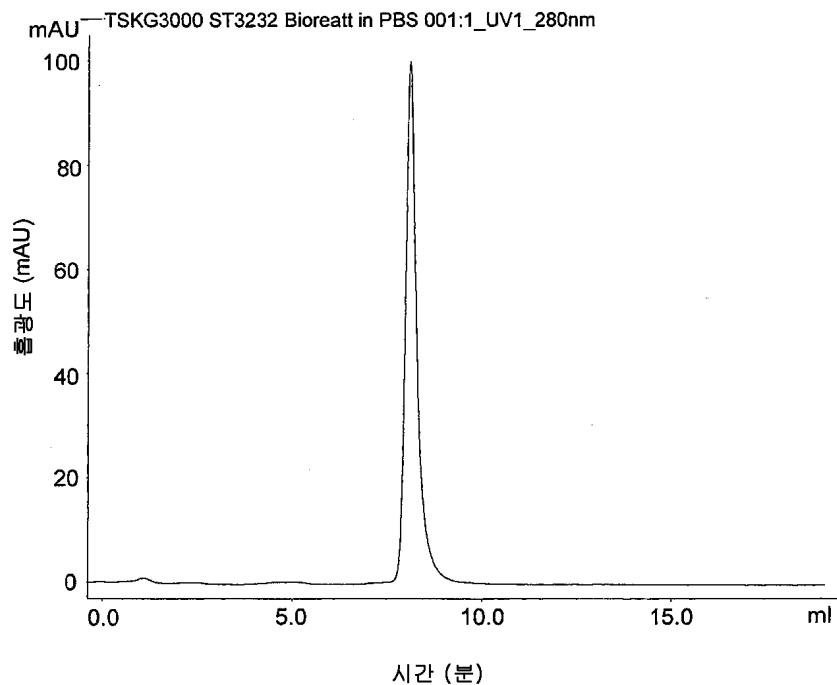
[0072] **도 9:** 누드 마우스에 이종 이식하고, M104 항체와 비교한 ST3232/10의 처리. 자연적으로 Trop-1을 발현하는 인간 결장암 세포주 KM 12-SM을 누드 마우스에 피하 이식하였다. 접종일로부터 시작하여 일주일에 1회, 200 $\mu\text{g}$ 의 ST3232/10(ST3232 군), M104(M104 군) 또는 비히클(대조군)으로 4 차례 처리하였다. 종양 진행은 30일까지 모니터링하였다.

## 도면

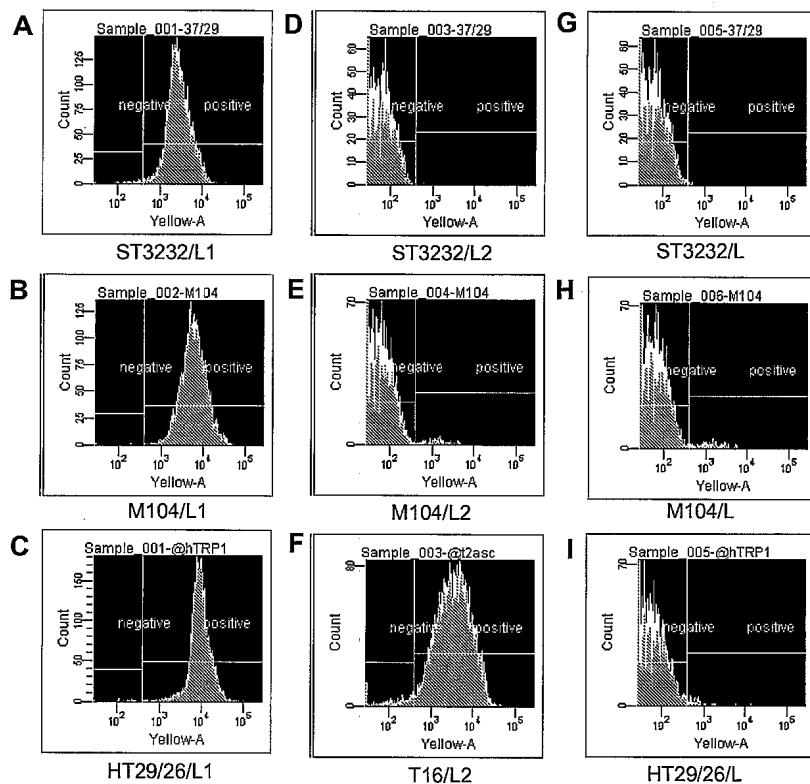
### 도면1



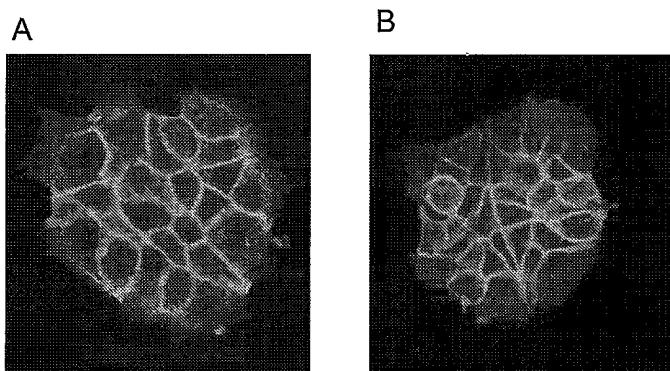
## 도면2



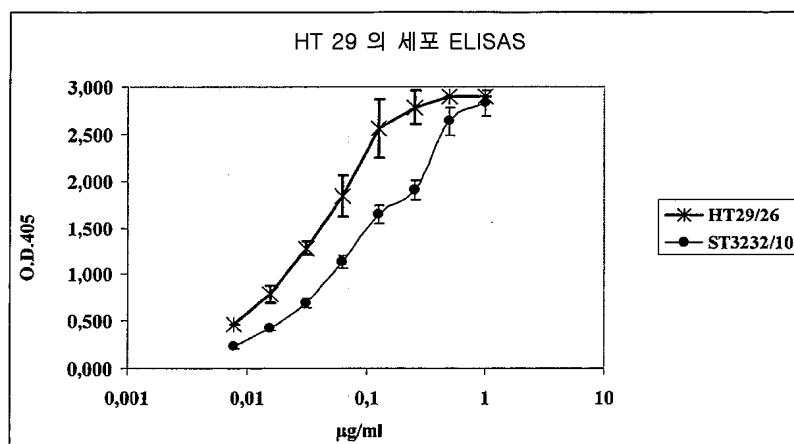
## 도면3



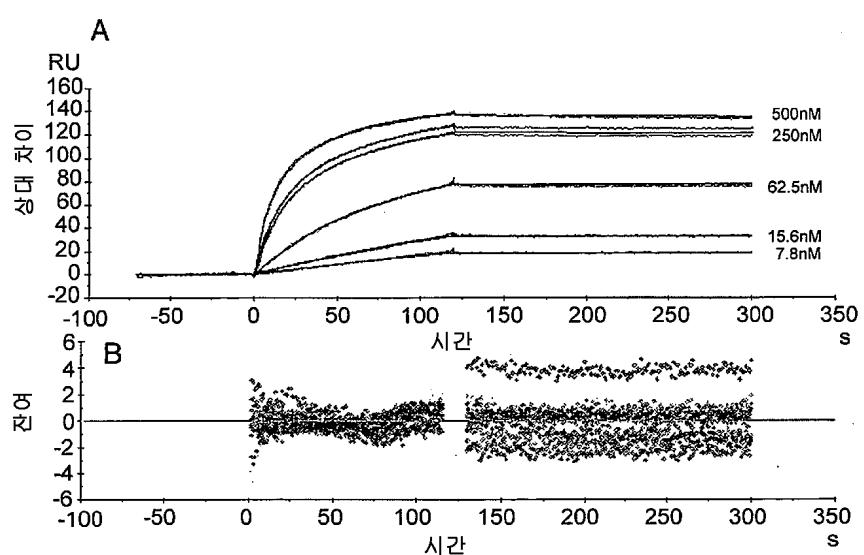
## 도면4



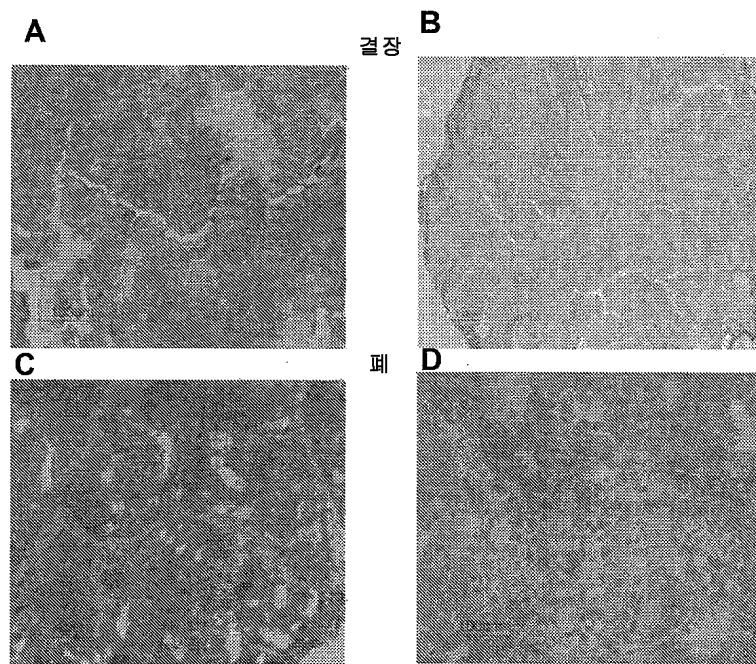
## 도면5



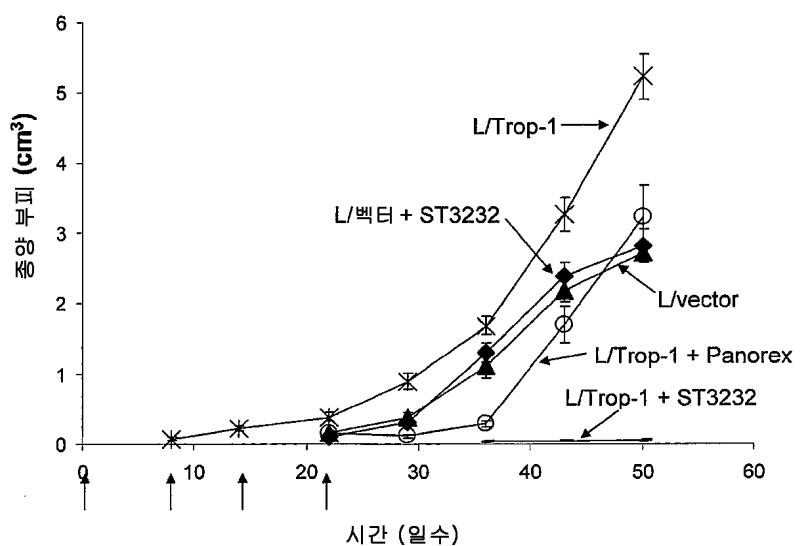
## 도면6



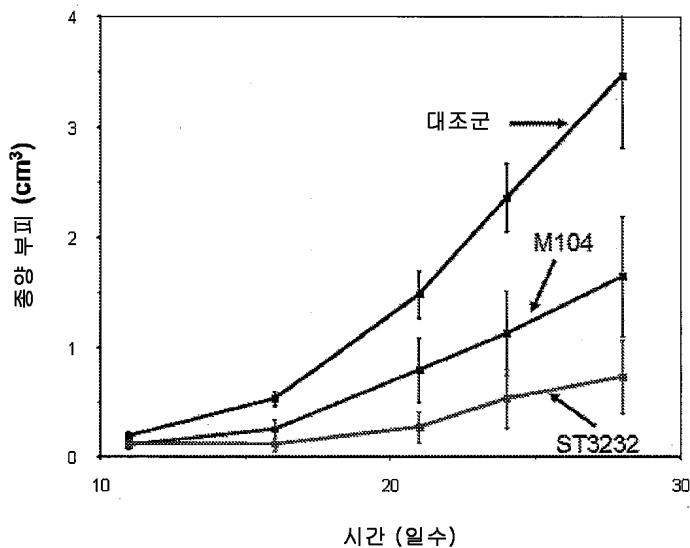
도면7



도면8



## 도면9



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

<110> Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A  
 ANASTASI, Anna Maria  
 PETRONZELLI, Fiorella  
 DE SANTIS, Rita

<120> Anti-EpCAM antibody and uses thereof

<130> PCT 102485

<150> EP07105628.7  
 <151> 2007-04-04

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic CDR1 VH

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(18)

<400> 1  
agc ggt tat tac tgg aac 18  
Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn  
1 5

<210> 2  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 2

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn  
1 5

<210> 3  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic CDR2 VH

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(48)

<400> 3  
tat ata agt tac gac ggt agg aat aag tac aac cca tat ctc aaa aat 48  
Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Asn  
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 4

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Asn  
1               5                           10                           15

<210> 5  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic CDR3 VH

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(33)

<400> 5  
gcc ctc ggg ggg gat tac gat gct ttg gac tgc                           33  
Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Asp Ala Leu Asp Cys  
1               5                                   10

<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 6

Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Asp Ala Leu Asp Cys  
1               5                           10

<210> 7  
<211> 69  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic CDR1 VL

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(69)

<400> 7  
aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agt ctg tta aac agt aga 48  
Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg  
1 5 10 15

agt caa aag aac tac ttg acc 69  
Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Thr  
20

<210> 8  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 8

Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Thr  
20

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic CDR2 VL

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 9

tgg gca tcc act agg gaa tct  
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

21

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic CDR3 VL

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(27)

<400> 11

cag aat gat tat att tat ccg ctc acg  
Gln Asn Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr

27

1 5

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Synthetic Construct

&lt;400&gt; 12

Gln Asn Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic primer

<400> 13  
 tgtcaagagc ttcaacagga 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic primer

<400> 14  
 aagatggata cagtttgtgc 20

<210> 15  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 15

atggagttag tttgggcagc ag

22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 16

gcacaaccac catactgaga ag

22