



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월19일
 (11) 등록번호 10-1930964
 (24) 등록일자 2018년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 16/46 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
 C07K 19/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7030223
 (22) 출원일자(국제) 2011년04월20일
 심사청구일자 2016년04월20일
 (85) 번역문제출일자 2012년11월19일
 (65) 공개번호 10-2013-0103325
 (43) 공개일자 2013년09월23일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/056388
 (87) 국제공개번호 WO 2011/131746
 국제공개일자 2011년10월27일
 (30) 우선권주장
 61/326,082 2010년04월20일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
 (56) 선행기술조사문헌
 W02008119353 A1*
 US20100015133 A1*
 Cytotechnology. 2007, 55:109-114.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
젠맵 에이/에스
 덴마크 1560 코펜하겐 브이 칼베보드 브뤼게 43
 (72) 발명자
라브리즌, 아란, 프랑크
 네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트레흐트 알렐라안 60
미이스터스, 조이스
 네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트레흐트 알렐라안 60
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 40 항

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **이종이량체 항체 F C-함유 단백질 및 그의 생산 방법**

(57) 요약

신규한 이종이량체 항체-Fc-함유 단백질, 예컨대 이중특이적 항체, 및 그러한 단백질을 생산하기 위한 신규한 방법을 개시한다.

(72) 발명자

브레머, 에알드 반 덴

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트레흐트 알렐라안 60

네이즈센, 주스트, 제이.

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트레흐트 알렐라안 60

버켈, 패트릭 반

네덜란드 엔엘-3544 엔에이치 우트레흐트 데르데
웨스터파클라안 321

괴이지, 바트 데

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트레흐트 알렐라안 60

빈크, 톰

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트레흐트 알렐라안 60

반 데 원켈, 잔

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트레흐트 알렐라안 60

슈우르만, 자닌

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트레흐트 알렐라안 60

파렌, 폴

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트레흐트 알렐라안 60

(30) 우선권주장

PA 2010 00330 2010년04월20일 덴마크(DK)

PA 2010 01066 2010년11월24일 덴마크(DK)

명세서

청구범위

청구항 1

a) Fc 영역이 제1 CH3 영역을 포함하는, 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하는 제1 동종이량체 단백질을 제공하는 단계이며, 여기서 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Arg 아미노산을 가지는 것인 단계,

b) Fc 영역이 제2 CH3 영역을 포함하는, 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하는 제2 동종이량체 단백질을 제공하는 단계이며, 여기서 상기 제2 동종이량체 단백질은

(i) 위치 368에서 Ala, Glu, Gly, His, Ile, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val 또는 Trp, 또는

(ii) 위치 399에서 Phe, Arg, Tyr, His 또는 Lys, 또는

(iii) 위치 405에서 Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser 또는 Trp, 또는

(iv) 위치 407에서 Gly, Leu 또는 Trp

으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 치환을 가지는 것인 단계,

c) 힌지 영역 내의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 단백질을 상기 제2 단백질과 함께 인큐베이션하는 단계, 및

d) 이종이량체 단백질을 얻는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 상이하고, 이들 서열이, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 강하도록 하는 것이며, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체 단백질 둘 모두가 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함하는 것인, 이종이량체 단백질을 생성하기 위한 시험관내 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질 및 상기 제2 동종이량체 단백질이 (i) Fc 영역, (ii) 항체, (iii) Fc 영역을 포함하는 융합 단백질, 및 (iv) 전구약물, 펩티드, 약물 또는 독소에 접합된 Fc 영역으로 이루어진 군 중에서 선택된 것인 시험관내 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질이 모두 항체이고, 상이한 에피토프에 결합하는 것인 시험관내 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 동종이량체 단백질의 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군 중에서 선택된 이소형의 것이고, 제2 동종이량체 단백질의 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군 중에서 선택된 이소형의 것인 시험관내 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체 단백질 둘 모두의 Fc 영역이 IgG1 이소형의 것인 시험관내 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 생성되는 이종이량체 단백질 내의 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이종이량체 상호작용이,

a) 0.5 mM 글루타티온을 함유하는 0.5 mL PBS (포스페이트-완충 염수) 중에서 37°C에서 24시간 반응 하에 Fab-아암 교환이 발생할 수 없도록 하는 것,

- b) 마우스에 상기 이중이량체 단백질 및 10배 과량의 무관한 IgG4 (나탈리주맙, 항- $\alpha 4$ -인테그린)을 정맥내 주사하였을 때, 마우스의 생체 내에서 Fab-아암 교환이 발생하지 않도록 하는 것, 및
- c) 2개의 동종이량체 상호작용의 최대치보다 2배 초과로 더 강한 것
- 중 하나 이상의 특징을 갖는 것인 시험관내 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 생성되는 이중이량체 단백질 내의 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용이 2개의 동종이량체 상호작용의 최대치보다 3배 초과로 더 강한 것인 시험관내 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 생성되는 이중이량체 단백질 내의 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용이 2개의 동종이량체 상호작용의 최대치보다 5배 초과로 더 강한 것인 시험관내 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이,

- a) 생성되는 이중이량체 단백질에서 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용의 해리 상수가 0.05 마이크로몰 미만인 되도록 하거나, 또는
- b) 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.01 마이크로몰 초과로 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.05 마이크로몰 초과로 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.01 초과 내지 10 마이크로몰이 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.05 내지 10 마이크로몰이 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.01 초과 내지 5 마이크로몰이 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.05 내지 5 마이크로몰이 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.01 초과 내지 1 마이크로몰이 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.05 내지 1 마이크로몰이 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 17

제9항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.01 초과 내지 0.5 마이크로몰이 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 18

제9항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 2개의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 0.01 초과 내지 0.1 마이크로몰이 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 아미노산 치환체가 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산인 시험관내 방법.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 야생형 CH3 영역에 비해 CH3 영역에 1개 이하의 아미노산 치환을 가지며, 제2 동종이량체 단백질이 야생형 CH3 영역에 비해 CH3 영역에 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것인 시험관내 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

제1항 또는 제2항에 있어서,

- a) 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 405에 Leu 및 위치 409에 Lys을 포함하거나,
- b) 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함하거나,
- c) 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 370에 Lys, 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함하거나,
- d) 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Arg을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Gly, Leu 또는 Trp 및 위치 409에 Lys을 갖는 것인, 시험관내 방법.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역이 명시된 돌연변이를 제외하고 서열 1에 제시된 서열을 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질이 임의의 명시된 돌연변이를 제외하고 인간 항체인 시험관내 방법.

청구항 27

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체 단백질 둘 모두가 경쇄를 추가로 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 28

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질 또는 상기 제2 동종이량체 단백질 또는 둘다가 Asn-연결된 글리코실화를 위한 수용 부위를 제거하는 돌연변이를 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 29

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 a) 및 b)에서 제공된 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질이 정제된 것인 시험관내 방법.

청구항 30

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질 또는 상기 제2 동종이량체 단백질 또는 둘다가 약물, 전구약물 또는 독소에 접합되거나 또는 그에 대한 수용 기를 함유하는 것인 시험관내 방법.

청구항 31

제1항 또는 제2항에 있어서, 동종이량체 단백질 둘 모두가 항체이고, 이때 제1 항체가 종양 세포 상의 에피토프에 결합하고, 다른 항체가 의도된 용도를 위해 관련된 임의의 생체내 결합 활성이 없는 무관한 또는 불활성 항체인 시험관내 방법.

청구항 32

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 c)에서의 환원 조건이 환원제의 첨가를 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 환원제가 2-메르캅토에틸아민, 디티오프레이톨 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 또는 그의 화학적 유도체로 이루어진 군 중에서 선택된 것인 시험관내 방법.

청구항 34

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 c)가 -150 내지 -600 mV의 산화환원 전위를 사용하여 환원 조건 하에 수행되는 것인 시험관내 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 단계 c)가 -250 내지 -400 mV의 산화환원 전위를 사용하여 환원 조건 하에 수행되는 것인 시험관내 방법.

청구항 36

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 c)가 적어도 25 mM 2-메르캅토에틸아민의 존재 하에 또는 적어도 0.5 mM 디티오프레이톨의 존재 하에 적어도 20°C의 온도에서 적어도 90 min 동안의 인큐베이션을 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 37

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 d)가 환원제의 제거를 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 단계 d)가 탈염에 의한 환원제의 제거를 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 39

a) 상이한 가변 영역을 갖는 항체를 포함하는 동종이량체 항체의 제1 세트를 제공하는 단계이며, 여기서 상기 제1 세트의 상기 항체는 동일한 제1 CH3 영역을 포함하고, 상기 CH3 영역은 위치 409에서 Arg 아미노산을 가지는 것인 단계,

b) 상이한 가변 영역 또는 동일한 가변 영역을 갖는 항체를 포함하는 동종이량체 항체의 제2 세트를 제공하는 단계이며, 여기서 상기 제2 세트의 상기 항체는 동일한 제2 CH3 영역을 포함하고, 상기 CH3 영역은

- (i) 위치 368에서 Ala, Glu, Gly, His, Ile, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val 또는 Trp, 또는
- (ii) 위치 399에서 Phe, Arg, Tyr, His 또는 Lys, 또는
- (iii) 위치 405에서 Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser 또는 Trp, 또는
- (iv) 위치 407에서 Gly, Leu 또는 Trp

으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 치환을 가지는 것인 단계,

c) 힌지 영역 내의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 세트의 항체 및 상기 제2 세트의 항체의 조합물을 인큐베이션하여 이중특이적 항체의 세트를 생성하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 동일하지 않은 위치에 아미노산 치환을 함유하는 것인 단계,

d) 임의로 조건을 비-환원으로 회복시키는 단계,

e) 생성되는 이중특이적 항체의 세트를 제시된 요구되는 특성에 대해 검정하는 단계, 및

f) 요구되는 특성을 갖는 이중특이적 항체를 선택하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 상이하고, 이들 서열이, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 강하도록 하는 것이며, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체 항체 둘 모두가 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함하는 것인, 요구되는 특성을 갖는 이중특이적 항체를 선택하는 방법.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

제1항에 따른 방법에서 제1 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고 제2 동종이량체 단백질은 위치 405에 Leu 및 위치 409에 Lys을 포함하는 것인, 제1항에 따른 방법에 의해 얻거나 얻을 수 있는 이중이량체 항체.

청구항 44

이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 상기 제1 Fc 영역이 제1 CH3 영역을 포함하고, 상기 제2 Fc 영역이 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 이중이량체 항체이며, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 상이하고, 이들 서열이, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 강하도록 하는 것이고,

여기서 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 405에 Leu 및 위치 409에 Lys을 포함하며, 상기 이중이량체 항체는 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함하는 것인, 이중이량체 항체.

청구항 45

제43항에 따른 이중이량체 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 암 치료용 제약 조성물.

청구항 46

제44항에 따른 이중이량체 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 암 치료용 제약 조성물.

- 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
삭제
- 청구항 77
삭제
- 청구항 78
삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 이중이량체 항체-Fc-함유 단백질, 예컨대 이중특이적 항체, 및 그러한 단백질을 생산하기 위한 신규한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 모노클로날 항체는 최근에 특히 암의 치료를 위한 성공적인 치료 분자가 되었다. 그러나, 불운하게도, 모노클로날 항체는 종종 단독요법으로서 사용될 때 질환을 치유할 수 없다. 이중특이적 항체는 모노클로날 항체 요법의 일부 제한을 잠재적으로 극복할 수 있고, 예를 들어, 이들은 약물 또는 독성 화합물을 표적 세포에 대해 표적화하기 위한 매개자로서, 이펙터 메카니즘을 질환 관련 부위로 재표적화하기 위한 매개자로서 또는 예를 들어 종양 세포 상에서만 발견되는 표적 분자의 조합물에 결합함으로써 종양 세포에 대한 특이성을 증가시키기 위한 매개자로서 사용될 수 있다.

[0003] 이중특이적 항체의 상이한 포맷 및 용도가 최근에 문헌 [Chames and Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12:276]에서 검토되었다. 이중특이적 항체 개발에서 주요 장애 중의 하나는 전통적인 기술, 예컨대 하이브리드 하이브리도마 및 화학적 접합 방법에 의해 물질을 충분한 품질 및 양으로 생산하기가 어렵다는 점이다 (Marvin and Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26:649). 상이한 중쇄 및 경쇄로 이루어진 2개의 항체의 숙주 세포 내에서의 동시 발현은 요구되는 이중특이적 항체 이외에 가능한 항체 생성물의 혼합물을 생성시킨다.

[0004] 몇몇의 전략은 상이한 항체 구축물의 동시-발현 시에 이중이량체, 즉 이중특이적 생성물의 형성에 유리한 것으로 설명된 바 있다.

[0005] 문헌 [Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219)]은 상이한 항체를 생산하는 래트 및 마우스 하이브리도마의 융합이, 우선적인 중-제한적 중쇄/경쇄 페어링 때문에 기능적 이중특이적 항체의 농축을 유발한다고 설명하였다. 동종이량체보다 이중이량체의 형성을 촉진하기 위한 또 다른 전략은 이중이량체 형성을 촉진하고 동종이량체 형성을 억제하기 위해서 돌출부가 공동 내에 위치할 수 있도록 돌출부가 제1 중쇄 폴리펩티드의 계면 및 제2 중쇄 폴리펩티드의 계면 내의 상응하는 공동에 도입되는 "뿔-인투-홀 (knob-into-hole)" 전략이다. "돌출부"는 제1 폴리펩티드의 계면으로부터 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄로 교체함으로써 형성된다. 돌출부와 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동"이, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄로 교체함으로써 제2 폴리펩티드의 계면에서 생성된다 (미국 특허 5,731,168). EP1870459 (추가이 (Chugai)) 및 WO 2009089004 (암젠 (Amgen))은 숙주 세포에서 상이한 항체 도메인의 동시-발현시에 이중이량체 형성에 유리한 다른 전략을 설명한 바 있다. 상기 방법에서, 두 CH3 도메인에서 CH3-CH3 계면을 구성하는 하나 이상의 잔기는 동종이량체 형성이 정전기적으로 불리하고 이중이량체화가 정전기적으로 유리하도록 하전된 아미노산으로 교체된다. WO2007110205 (메르크 (Merck))에는 IgA와 IgG CH3 도메인 사이의 차이가 이중이량체화를 촉진하기 위해 이용되는 또 다른 전략이 기재되어 있다.

[0006] 문헌 [Dall'acqua et al. (1998 Biochemistry 37:9266)]은 CH3 동종이량체의 계면에서 CH3-CH3 접촉에 관련된 5개의 매우 핵심적인 아미노산 잔기 (366, 368, 405, 407 및 409)를 확인하였다.

[0007] WO 2008119353 (젠맵 (Genmab))에는 이중특이적 항체가 환원 조건 하에서의 인큐베이션시에 2개의 단일특이적 IgG4 또는 IgG4-유사 항체 사이의 "Fab-아암 (arm)" 또는 "1/2-분자" 교환 (중쇄 및 부착된 경쇄의 교환)에 의해 형성되는 이중특이적 항체를 생산하기 위한 시험관내 방법이 기재되어 있다. 상기 Fab-아암 교환 반응은 CH3 도메인의 디설피드-결합 이성질체화 반응 및 해리-회합의 결과이고, 여기서 모 (본래 단일특이적) 항체의 힌지 영역 내의 중쇄 디설피드 결합은 환원되고, 생성되는 유리 시스테인은 또 다른 모 항체 분자 (본래 상이한 특이성을 갖는)의 시스테인 잔기와 중쇄간 디설피드 결합을 형성하고, 이와 동시에 모 항체의 CH3 도메인이 해리-회합에 의해 방출되고 재형성된다. 생성되는 산물은 잠재적으로 상이한 서열로 이루어진 2개의 Fab 아암을 갖는 이중특이적 항체이다. 그러나, 과정이 무작위적이고, Fab-아암 교환이 또한 동일한 서열을 갖는 2개의 분자 사이에서도 발생할 수 있거나 또는 2개의 이중특이적 분자가 Fab-아암 교환에 참여하여 본래의 단일특이적 모 항체 특이성을 포함하는 항체를 재생할 수 있음을 이해하여야 한다.

[0008] 놀랍게도, 본 발명에서 2개의 단일특이적 출발 단백질의 CH3 영역에 비대칭 돌연변이를 도입함으로써, Fab-아암 교환 반응이 방향성 (directional)을 갖도록 만들어 크게 안정한 이중이량체 단백질을 생성할 수 있음이 밝혀졌다.

발명의 내용

[0009] 발명의 개요

[0010] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 안정한 동종이량체 Fc-함유 출발 물질을 기초로 한 크게 안정한 이중이량체 Fc-함유 단백질의 생산을 위한 효율적인 시험관내 방법을 제공한다. 예를 들어, 크게 안정한 이중특이적 항체는 출발 물질로서 2개의 안정한 단일특이적 항체를 기초로 하여 높은 수율 및 순도로 형성될 수 있다.

[0011] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 이중이량체 단백질을 생성하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이고, 상기 방법은

[0012] a) 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 Fc 영역이 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 제1 동종이량체 단백질을 제공하는 단계,

[0013] b) 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 Fc 영역이 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 제2 동종이량체 단백질을 제공하는 단계,

[0014] c) 힌지 영역 내의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 단백질을 상기 제2 단백질과 함께 인큐베이션하는 단계, 및

[0015] d) 상기 이중이량체 단백질을 얻는 단계

[0016] 를 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 이들 서열은, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이다.

[0017] 방법은 예를 들어 다양한 용도, 예컨대 치료 또는 진단 용도를 위한 이중이량체 단백질, 예컨대 이중특이적 항체의 시험관내 생산을 위해 사용될 수 있다. 상기 시험관내 방법의 이점은 중쇄/경쇄 페어링이 반응 동안 무손상 상태로 유지되어, 중쇄 및 경쇄의 요구되지 않는 조합이 생성물 내에 얻어지지 않는다는 점이다. 이것은 세포 내에서의 무작위 중쇄/경쇄 페어링에 의한 비-기능적 중쇄/경쇄 생성물의 형성을 방지하기 위해 두 중쇄를 모두 갖는 기능적 항체를 형성할 수 있는 공통 경쇄가 발견될 필요가 있는 선행 기술 (상기 참조)에 기재된 일부 동시 발현 방법과 대조적이다. 또한, 시험관내 과정을 동시-발현에 의해 허용되는 것보다 이중이량체 단백질에 대한 보다 큰 제어, 융통성 및 수율을 허용하는 실험실에서 수행할 수 있다.

[0018] 본 발명의 시험관내 방법은 또한 예를 들어 유리한 특이성 조합을 확인하기 위한 스크리닝 방법에서 크기가 보다 큰 화합물 라이브러리를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 표적의 일부 조합에 대해, 어떠한 이중특이적 항체도 기능적이지 않고, 즉 두 표적에 동시에 결합하고 요구되는 기능적 효과를 매개할 수 없다. 상기 경우에, 요구되는 특성, 예를 들어 최적 표적 결합 또는 세포 사멸을 갖는 이중특이적 항체는

[0019] a) 상이한 가변 영역을 갖는 동종이량체 항체의 제1 세트를 제공하는 단계이며, 이때 상기 제1 세트의 상기 항체가 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,

[0020] b) 상이한 가변 영역을 갖는 동종이량체 항체의 제2 세트를 제공하는 단계이며, 이때 상기 제2 세트의 상기 항

체가 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 단계

- [0021] (여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이다),
- [0022] c) 힌지 영역 내의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 세트의 항체 및 상기 제2 세트의 항체의 조합물을 인큐베이션하여 이중특이적 항체의 세트를 생성하는 단계,
- [0023] d) 임의로 조건을 비-환원으로 회복시키는 단계,
- [0024] e) 생성되는 이중특이적 항체의 세트를 요구되는 특성에 대해 검정하는 단계, 및
- [0025] f) 요구되는 특성을 갖는 이중특이적 항체를 선택하는 단계
- [0026] 에 의해 확인될 수 있다.
- [0027] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 얻거나 얻을 수 있는 이중이량체 단백질 및 적합한 숙주 세포에서의 동시-발현에 의해 본 발명의 이중이량체 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0028] **도 1: 중간 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성.** 표시된 EGFR (2F8) 및 CD20 (7D8) IgG4 항체 사이의 GSH-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 항체의 생성은 ELISA에 의해 결정하였다. 0-1 µg/ml의 일련의 농도 (총 항체)를 ELISA로 측정하였다. 이중특이적 결합은 동일한 종의 2개의 항체 사이보다 붉은털원숭이 (Rh)와 인간 (Hu) IgG4 항체 사이의 Fab-아암 교환 후에 더 컸다.

도 2: 인간 및 붉은털원숭이 항체 이소형의 코어 힌지 (즉, 중쇄간 디설피드 결합을 형성할 잠재성이 있는 2개의 시스테인 잔기 및 다른 인간 이소형 또는 다른 종 내의 상응하는 잔기를 포함하는 인간 IgG1 내의 CPPC 서열) 및 CH3-CH3 계면의 아미노산 서열의 정렬.

도 3: Fab-아암 교환에 참여하는 돌연변이체 인간 IgG1을 사용한 이중특이적 항체의 생성. 인간 CD20 (7D8) IgG4 항체와 표시된 인간 EGFR (2F8) IgG1 항체 사이의 GSH-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 항체의 생성은 ELISA에 의해 결정하였다. 제시된 그래프는 1 µg/ml의 총 항체 농도가 ELISA를 위해 사용되는 3개의 독립적인 Fab-아암 교환 실험의 평균 수치를 보여준다. 이중특이적 결합은 2개의 IgG4 항체 사이보다 IgG1-2F8-CPSC-ITL과 IgG4-7D8 사이의 Fab-아암 교환 후에 더 컸다. IgG4-7D8과 IgG1-2F8-CPSC 또는 IgG1-2F8-ITL의 조합은 사용된 조건 하에서 이중특이적 항체를 생성하지 않았다.

도 4: 인간 IgG4 및 돌연변이체 IgG1 항체의 생체내 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성. 면역결핍 마우스에서 인간 CD20 (7D8) IgG4 및 표시된 인간 EGFR (2F8) IgG1 및 IgG4 돌연변이체 항체 사이의 생체내 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 항체의 생성은 ELISA에 의해 결정하였다. 제시된 그래프는 평균 수치를 보여준다 (n=4). 이중특이적 반응성은 총 IgG 농도에 대한 이중특이적 항체의 농도 (백분율)로서 제시된다. 안정화된 힌지 (CPPC) 또는 CH3 도메인 내의 R409K 돌연변이를 갖는 인간 IgG4는 Fab-아암 교환에 참여할 수 없다. 힌지 내의 CPSC 서열 및 CH3 도메인 내의 K409R 돌연변이를 모두 갖는 IgG1은 Fab-아암 교환에 참여한다. (*) IgG1-2F8, IgG4-2F8-CPPC 또는 IgG4-2F8-R409K를 함유하는 혼합물에 대한 이중특이적 결합은 검출 한계 미만이고, 따라서 임의로 0으로 설정되었다.

도 5: 인간 IgG1과 IgG4 항체 사이의 2-메르캅토-에틸아민·HCl-(2-MEA-) 유도 Fab-아암 교환을 사용한 이중특이적 항체의 생성. 표시된 인간 EGFR (2F8)과 CD20 (7D8) 항체 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 항체의 생성은 ELISA에 의해 결정하였다. 0-40 mM 2-MEA의 일련의 농도를 시험하였다. 제시된 그래프는 20 µg/ml의 총 항체 농도를 사용한 ELISA의 결과를 보여준다. 2-MEA는 또한 안정화된 힌지 (CPPC)를 함유하는 항체 사이에서 Fab-아암 교환을 효율적으로 유도하였다. CH3 도메인에 대해, 삼중 돌연변이 T350I-K370T-F405L를 갖는 인간 IgG4 x 인간 IgG1의 조합은 2개의 야생형 IgG4 항체에 비해 보다 높은 수준의 이중특이적 반응성을 유발하였다.

도 6: 인간 IgG1과 IgG4 항체 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환을 사용한 이중특이적 항체의 생성. 표시된 인간 EGFR (2F8)과 CD20 (7D8) 항체 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 항체의 생성을 0-40 mM 2-MEA의 일련의 농도의 모든 샘플에 대해 질량 분광측정법에 의해 결정하였다. (a) 0 mM, 7 mM 및 40 mM 2-MEA를 사용하여 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 사이의 Fab-아암 교환 반응의 샘플에 대한 질량 분광측정

프로파일의 대표적인 예가 제시된다. (b) 질량 분광측정 데이터의 정량 후에, 이중특이적 항체의 백분율을 계산하고, Fab-아암 교환 반응에서 2-MEA의 농도에 대해 그래프로 표시하였다. IgG4-2F8 x IgG4-7D8은 약 50% 이중특이적 항체를 생성하였다. IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC는 약 95% 이중특이적 항체를 생성하였다.

도 7: 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 얻은 이중이량체 이중특이적 항체의 안정성 분석. IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC (A), 또는 IgG4-2F8 x IgG4-7D8 (B)을 조합함으로써 2-MEA 유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 샘플의 안정성을 표시된 농도의 무관한 IgG4의 존재 하에 GSH-유도 Fab-아암 교환 반응 후에 ELISA로 EGFR/CD20 이중특이적 결합을 측정함으로써 시험하였다. 이중특이적 결합은 100%로 설정된 출발 물질 (대조군)의 이중특이적 결합에 대해 제시된다. (A) IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC로부터 유래된 2-MEA-유도 이중특이적 생성물의 이중특이적 결합이 보존되었고, 이것은 GSH 조건 하에서 Fab-아암 교환에 참여하지 않은 안정한 생성물을 나타낸다. (B) IgG4-2F8 x IgG4-7D8로부터 유래된 2-MEA-유도 이중특이적 생성물의 이중특이적 EGFR/CD20 결합이 감소하였고, 이것은 생성물이 GSH 조건 하에서 무관한 IgG4를 사용한 Fab-아암 교환에 참여함을 나타낸다.

도 8: 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중이량체 이중특이적 항체의 혈장 클리어런스율. 3개의 마우스 군 (3마리의 마우스/군)에게 다음과 같이 표시된 항체를 주사하였다: (1) IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 사이의 시험관내 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 100 µg 이중특이적 항체; (2) 100 µg 이중특이적 항체 + 1,000 µg 무관한 IgG4; (3) 50 µg IgG1-2F8-ITL + 50 µg IgG4-7D8-CPPC. (A) ELISA에 의해 결정된 시간에 따른 총 항체 농도. 총 항체 혈장 농도의 곡선은 모든 항체에 대해 동일하였다. (B) ELISA에 의해 결정된 이중특이적 항체 농도. 주사된 항체의 이중특이성은 과량의 무관한 IgG4의 첨가 및 무점가시에 모두 동일하였다. (*) IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC 혼합물에 대한 이중특이적 결합은 검출 한계 미만이었으며, 따라서 상응하는 기호는 상기 그래프에 표시될 수 없었다. 2개의 ELISA 실험의 평균값을 제시한다.

도 9: 인간 IgG1-2F8과 IgG4-7D8-CPPC 사이의 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 순도. (9a) 환원성 SDS-PAGE (a)는 이중특이적 샘플 및 IgG1 대조군 샘플 둘 모두에 대한 중쇄 및 경쇄의 밴드를 보여준다. 비-환원성 SDS-PAGE (b). (9b) HP-SEC 분석의 피크 결과는 >98%의 이중특이적 샘플이 균질하고, 사실상 항체 응집체가 검출가능하지 않았음을 보여준다. (9c) 질량 분광측정법은 Fab-아암 교환에 의해 약 100%의 이중특이적 생성물이 생성되었음을 보여준다.

도 10: 인간 IgG4-7D8을 사용한 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성에서 삼중 돌연변이체 (ITL), 이중 돌연변이체 (IT, IL, TL) 및 단일 돌연변이체 (L) 인간 IgG1-2F8 사이의 비교. 인간 IgG1-2F8 삼중 및 이중 돌연변이체 및 CPSC 힌지를 갖는 야생형 IgG4-7D8 (A) 또는 안정화된 힌지를 갖는 돌연변이체 IgG4-7D8-CPPC (B), 또는 단일 돌연변이체 IgG1-2F8-F405L 및 야생형 CPSC 또는 안정화된 CPPC 힌지를 갖는 IgG4-7D8 (C) 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 항체의 생성을 ELISA에 의해 결정하였다. 0-20 µg/ml 또는 0-10 µg/ml의 일련의 농도 (총 항체)를 각각 이중 및 단일 돌연변이체를 포함하는 실험에 대해 ELISA로 분석하였다. 이중 돌연변이체 IgG1-2F8-IL 및 -TL의 조합은 삼중 돌연변이체 IgG1-ITL과 유사한 이중특이적 EGFR/CD20 결합을 유발한다. IgG1-2F8-IT의 조합은 이중특이적 생성물을 유발하지 않는다. 단일 돌연변이체 IgG1-2F8-F405L의 조합은 이중특이적 EGFR/CD20 결합을 유발한다.

도 11: 상이한 온도에서 2-MEA-유도 Fab-아암 교환을 사용한 이중특이적 항체의 생성. 0°C, 20°C 및 37°C에서 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환 반응에서 표시된 인간 EGFR (2F8) 및 CD20 (7D8) 항체의 조합에 의한 이중특이적 항체의 생성에 이어서 ELISA를 수행하였다. 이중특이적 결합은 37°C에서 가장 효율적이었고, 20°C에서 보다 느렸다. 0°C에서는, 이중특이적 결합의 생성이 측정되지 않았다.

도 12: 상이한 환원제에 의해 유도된 시험관내 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성. 표시된 환원제의 일련의 농도를 사용한 환원 반응에서 인간 IgG1-2F8-ITL 및 IgG4-7D8-CPPC의 조합에 의한 이중특이적 항체의 생성을 측정하기 위해 ELISA를 사용하였다. 이중특이적 결합은 DTT (2.5 mM DTT에서 최대치가 얻어짐) 및 2-MEA (25 mM 2-MEA에서 최대치가 얻어짐)를 사용한 반응 후에 측정되었지만, GSH를 사용한 경우에는 측정되지 않았다. (*) GSH 농도 > 10 mM의 데이터는 항체 응집체의 형성 때문에 제외하였다.

도 13: IgG1-2F8-ITL과 IgG1-7D8-K409X 돌연변이체 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환. IgG1-2F8-ITL과 표시된 IgG1-7D8-K409X 돌연변이체 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 항체의 생성을 ELISA에 의해 결정하였다. (A) 0-20 µg/ml의 일련의 농도 (총 항체)를 분석하였다. 양성 대조군은 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC로부터 유래된 이중특이적 항체의 정제된 배치이다. (B) 교환은 양성 대조군 (흑색 막대)에 비해

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 이중특이적 결합으로서 제시된다. 짝은 회색 막대는 IgG4 대조군 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8), 음성 대조군 (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R) 및 IgG1-2F8-ITL과 IgG4-7D8-CPPC 사이의 이중특이적 결합을 나타낸다. 연회색 막대는 표시된 IgG1-7D8-K409X 돌연변이체와 IgG1-2F8-ITL 사이의 동시에 수행된 Fab-아암-교환 반응의 결과를 나타낸다.

도 14: 항체 탈글리코실화는 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성에 영향을 주지 않는다. 표시된 EGFR (2F8)과 CD20 (7D8) 항체 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 항체의 생성을 ELISA에 의해 결정하였다. 7D8 항체를 사용한 교환을 효소에 의해 탈글리코실화된 그의 변이체와 비교하였다. 0-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 일련의 농도 (총 항체)를 ELISA로 분석하였다. 탈글리코실화된 (deglyc) 항체를 수반하는 Fab-아암 교환 반응은 이들이 유래된 글리코실화된 변이체와 동일한 이중특이적 결합 곡선을 보였다.

도 15: Fab-아암 교환에 참여하는 능력은 CH3-CH3 상호작용 강도와 상관성이 있다. (a), (b) 및 (c) ELISA에서 시간에 따른 이중특이적 결합으로서 제시된, 표시된 돌연변이를 갖는 IgG1-2F8 및 IgG1-7D8 (a) 또는 IgG4-2F8 및 IgG4-7D8 (b 및 c) 구조물 사이의 GSH-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성. 이중특이성은 24 h 후에 IgG4-2F8 x IgG4-7D8 대조군에 대해 상대적으로 제시된다. (d) 및 (e) IgG1-기반 (d) 또는 IgG4-기반 (e) 분자에 대한, 겔보기 K_D (표 2)와 24 hr 후의 이중특이적 항체 생성 (도 15a/b/c) 사이의 관계.

도 16: IgG1, IgG4 및 (부분적인) IgG3 백본 내의 항-EGFR 항체 2F8의 서열 정렬. 카바트 (Kabat) 및 EU-인덱스에 따른 아미노산 넘버링이 제시된다 (둘 모두 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에 기재됨).

도 17: 상이한 환원제에 의해 유도된 시험관내 Fab-아암-교환에 의한 이중특이적 항체의 생성. 표시된 환원제의 일련의 농도를 사용한 환원 반응에서 인간 IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R의 조합에 의한 이중특이적 항체의 생성을 측정하기 위해 ELISA를 사용하였다. 측정된 OD 값을 100%로 설정된 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환으로부터 유래된 이중특이적 대조군 샘플의 신호에 대해 정규화하였다. 최대 이중특이적 결합은 농도 범위 0.5-50 mM의 DTT, 농도 범위 25-50 mM의 2-MEA 및 농도 범위 0.5-5.0 mM의 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP)과의 반응 후에 측정되었지만, GSH와 반응시에는 측정되지 않았다. (*) GSH 농도 ≥ 25 mM에 대한 데이터는 항체 응집체의 형성 때문에 제외하였다.

도 18: 인간 IgG1-2F8-F405L과 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환을 사용한 이중특이적 항체의 생성. (A) 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암-교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 ELISA에 의해 결정하였다. 제시된 그래프는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 총 항체 농도가 사용된 ELISA의 결과를 보여준다. 2-MEA는 Fab-아암-교환을 효율적으로 유도하였다. (B) 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암-교환 후의 이중특이적 항체의 생성은 0-40 mM 2-MEA의 일련의 농도의 모든 샘플에 대해 질량 분광측정법에 의해 결정하였다. 질량 분광측정 데이터의 정량 후에, 이중특이적 항체의 백분율을 계산하고, Fab-아암-교환 반응에서 2-MEA의 농도에 대해 그래프로 표시하였다. IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R은 약 100% 이중특이적 항체를 생성하였고, 이것은 ELISA 데이터를 확증해 주었다.

도 19: 인간 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 순도. 질량 분광측정법은 Fab-아암-교환에 의해 약 100% 이중특이적 생성물이 생성되었음을 보여준다.

도 20: 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 혈장 클리어런스. 마우스의 2개의 군 (3마리의 마우스/군)에게 다음과 같은 표시된 항체를 주사하였다: (1) IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 시험관내 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 100 μg 이중특이적 항체; (2) 100 μg 이중특이적 항체 + 1,000 μg 무관한 IgG4. (A) ELISA에 의해 결정된, 시간에 따른 총 항체 농도. 총 항체 혈장 농도의 곡선은 모든 항체에 대해 동일하였다. (B) ELISA에 의해 결정된 이중특이적 항체 농도. 주사된 항체의 이중특이성은 과량의 무관한 IgG4의 첨가 및 무첨가시에 모두 동일하였다.

도 21: IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체에 의한 CD20-발현 세포의 CDC-매개 세포 사멸. 표시된 항체의 일련의 농도를 사용하여, 다우디 (Daudi) (A) 및 라지 (Raji) (B) 세포에 대해 CDC를 매개한 그의 능력을 시험하였다. 두 세포주는 CD20을 발현하지만, EGFR은 발현하지 않는다. IgG1-7D8에 K409R의 도입은 CDC를 유도하는 그의 능력에 영향을 주지 않았다. IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환으로부터 유래된 이중특이적 항체는 CDC를 계속 유도할 수 있었다.

도 22: IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체에 의한 EGFR-발현 세포의 ADCC-매개 세포 사멸. A431 세포에 대해 ADCC를 매개하는 그의 능력을 시험하기 위해 표시된 항체의 일련의 농도를 사용하였다. IgG1-7D8은 CD20-음성 A431 세포에 결합할 수 없고, 그 결과 ADCC를 유도하지 않았다. ADCC는 또한 CH3 도메인 내의 F405L 돌연변이의 도입 후에 EGFR 항체 IgG1-2F8에 의해 유도되었다. IgG1-2F8-F405L의 ADCC 이펙터 기능은 IgG1-2F8- F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 Fab-아암-교환에 의해 얻은 이중특이적 포맷에 유지되었다.

도 23: IgG1-2F8-F405X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환. 표시된 IgG1-2F8-F405X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암-교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 ELISA에 의해 결정하였다. (A) 0-20 µg/ml의 일련의 농도 (총 항체)를 ELISA로 분석하였다. 양성 대조군은 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R로부터 유래된 이중특이적 항체의 정제된 배치이다. (B) 교환은 양성 대조군 (흑색 막대)에 비해 20 µg/ml 항체 농도에서 이중특이적 결합으로서 제시된다. 짙은 회색 막대는 IgG4 대조군 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8)과 음성 대조군 (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R) 사이의 이중특이적 결합을 나타낸다. 연회색 막대는 표시된 IgG1-2F8-F405X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 또는 대조군 사이의 동시에 수행된 Fab-아암-교환 반응의 결과를 나타낸다.

도 24: IgG1-2F8-Y407X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환. 표시된 IgG1-2F8-Y407X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암-교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 ELISA에 의해 결정하였다. (A) 0-20 µg/ml의 일련의 농도 (총 항체)를 ELISA로 분석하였다. 양성 대조군은 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R로부터 유래된 이중특이적 항체의 정제된 배치이다. (B) 교환은 양성 대조군 (흑색 막대)에 비해 20 µg/ml의 항체 농도에서 이중특이적 결합으로서 제시된다. 짙은 회색 막대는 IgG4 대조군 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8)과 음성 대조군 (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R) 사이의 이중특이적 결합을 나타낸다. 연회색 막대는 표시된 IgG1-2F8-Y407X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 또는 대조군 사이의 동시에 수행된 Fab-아암-교환 반응의 결과를 나타낸다.

도 25: 비-환원 (도 25(A)) 및 환원 (도 25(B)) 조건 하에 SDS-PAGE에 의한, 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 분석.

도 26: 동종이량체 출발 물질 IgG1-2F8-F405L (도 26(B)), 동종이량체 출발 물질 IgG1-7D8-K409R (도 26(A)), 두 동종이량체의 혼합물 (1:1) (도 26(C)), 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물 (도 26(D))의 HP-SEC 프로파일.

도 27: 동종이량체 출발 물질 IgG1-2F8-F405L (도 27(B)), 동종이량체 출발 물질 IgG1-7D8-K409R (도 27(A)), 두 동종이량체의 혼합물 (1:1) (도 27(C)), 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물 (도 27(D))의 질량 분광측정법 (ESI-MS).

도 28: 동종이량체 출발 물질 IgG1-2F8-F405L (도 28(A)), 동종이량체 출발 물질 IgG1-7D8-K409R (도 28(B)), 두 동종이량체의 혼합물 (1:1) (도 28(C)), 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물 (도 28(D))의 모세관 등전 포커싱 (cIEF) 프로파일.

도 29: 동종이량체 출발 물질 IgG1-2F8-F405L (도 29(A)), 동종이량체 출발 물질 IgG1-7D8-K409R (도 29(B)), 두 동종이량체의 혼합물 (1:1) (도 29(C)), 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물 (도 29(D))의 HPLC-CIEF 프로파일.

도 30: IgG1-7D8-K409R 또는 IgG1-2F8-F405의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 발현 벡터의 동시 형질감염에 의해 얻은 IgG의 전기분무 이온화 질량 분광 분석. 이중이량체 피크는 *로 표시한다. 동종이량체 피크는 †로 표시한다.

도 31: 상이한 간격에서 주사 후에 고압 액체 크로마토그래피 양이온 교환 (HPLC-CIEF)에 의해 모니터링된 동종이량체 IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R의 교환 반응.

도 32: CIEF 방법에 의해 검출된 도 31에 제시된 교환 반응의 잔류 동종이량체 (화살표로 표시됨).

도 33: ELISA에 의해 결정된 다양한 IgG 농도, 2-MEA 농도, 인큐베이션 온도 및 시간에서 이중특이적 항체의 생성.

도 34: ELISA에 의해 결정되고 임의로 100%로 설정된 대조군과 비교된, 다양한 IgG 농도, 2-MEA 농도, 인큐베이션 온도 및 시간에서 이중특이적 항체의 생성.

도 35: HPLC-CIEX에 의해 분석된, 다양한 IgG 농도, 2-MEA 농도, 인큐베이션 온도 및 시간에서 이중특이적 항체의 생성.

도 36: 표시된 IgG1-2F8-L368X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암-교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 0-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 일련의 농도 (총 항체)를 사용한 ELISA에 의해 결정하였다 (도 36(A)). 양성 대조군은 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R로부터 유래된 이중특이적 항체의 정제된 배치이다. 도 36 (B)는 양성 대조군 (흑색 막대)에 비해 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 이중특이적 결합을 보여준다. 짙은 회색 막대는 IgG4 대조군 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8)과 음성 대조군 (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R) 사이의 이중특이적 결합을 나타낸다. 연회색 막대는 표시된 IgG1-2F8-L368X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 동시에 수행된 Fab-아암-교환 반응의 결과를 나타낸다.

도 37: 표시된 IgG1-2F8-K370X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암-교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 0-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 일련의 농도 (총 항체)를 사용한 ELISA에 의해 결정하였다 (도 37(A)). 양성 대조군은 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R로부터 유래된 이중특이적 항체의 정제된 배치이다. 도 37 (B)는 양성 대조군 (흑색 막대)에 비해 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 이중특이적 결합을 보여준다. 짙은 회색 막대는 IgG4 대조군 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8)과 음성 대조군 (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R) 사이의 이중특이적 결합을 나타낸다. 연회색 막대는 표시된 IgG1-2F8-D370X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 동시에 수행된 Fab-아암-교환 반응의 결과를 나타낸다.

도 38: 표시된 IgG1-2F8-D399X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암-교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 0-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 일련의 농도 (총 항체)를 사용한 ELISA에 의해 결정하였다 (도 38(A)). 도 38(B)는 양성 대조군 (흑색 막대)에 비해 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항체 농도에서 이중특이적 결합을 보여준다. 짙은 회색 막대는 IgG4 대조군 (IgG4-7D8 x IgG4-2F8)과 음성 대조군 (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R) 사이의 이중특이적 결합을 나타낸다. 연회색 막대는 표시된 IgG1-2F8-D399X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 동시에 수행된 Fab-아암-교환 반응의 결과를 나타낸다.

도 39: 샌드위치 (sandwich) ELISA에 의해 결정된, 15°C에서 0, 30, 60, 105 및 200 min 인큐베이션 후에 4개의 상이한 IgG1 돌연변이체 조합 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환.

도 40: 샌드위치 ELISA에 의해 결정된, 15°C에서 90 min 동안 항체 인큐베이션 후에 상이한 IgG1 돌연변이체 조합 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환.

도 41: c-Met 특이적 항체에 의한 c-Met의 인산화. A549 세포를 HGF 또는 상이한 항체의 패널과 함께 15 min 동안 인큐베이션한다. 단백질을 SDS-page 겔 전기영동에 의해 분리하고, 웨스턴 블로팅 (western blotting)에 의해 막으로 옮긴다. 인산화된 c-Met, 총 c-Met 및 β -액틴을 인산화된 c-Met, 총 c-Met 또는 β -액틴에 대한 항체에 의해 검출한다.

도 42: NCI-H441 세포를 사용한 증식 검정. NCI-H441 세포를 일가 이중특이적 IgG1 069/b12, 비처리 상태의 대조군 항체 (IgG1-069, 유니바디 (UniBody)-069, IgG1-b12)와 함께 7일 동안 인큐베이션하였다. 세포 질량을 결정하고, 비-처리 샘플 (100%로 설정)의 백분율로서 그래프로 표시하였다.

도 43: IgG1-7D8-F405L 또는 IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체에 의한 CD20 발현 세포의 CDC-매개 세포 사멸. 표시된 항체의 일련의 농도를 사용하여 다우디 (A) 및 라지 (B) 세포에 대해 CDC를 매개하는 그의 능력을 시험하였다. 두 세포주는 CD20을 발현하지만, EGFR은 발현하지 않는다. IgG1-7D8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체는 CDC 매개 세포 사멸의 유도시에 IgG1-7D8만큼 효과적이었다. IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환으로부터 유도된 이중특이적 항체는 일가 CD20 결합 이중특이적 항체를 생성하고, 이것은 CDC 매개 세포 사멸의 유도에 대해 경미한 영향을 주었다.

도 44: 항-카파-ETA' 예비-인큐베이션된 HER2 x HER2 이중특이적 항체에 의해 유도된 A431 세포의 사멸. 항-카파-ETA'와 함께 예비-인큐베이션된 HER2 항체와 함께 3일 인큐베이션한 후 A431 세포의 생존력. 세포 생존력은 알라마르블루 (Alamarblue)를 사용하여 정량하였다. 제시된 데이터는 항-카파-ETA'-접합된 HER2 항체 및 HER2 x HER2 이중특이적 항체로 처리된 A431 세포를 사용한 한 실험의 형광 강도 (FI)이다. 스타우로스포린이 양성 대조군으로 사용되었고, 이소형 대조군 항체는 음성 대조군으로 사용되었다.

도 45: HER2 수용체의 HER2 x HER2 이중특이적 분자 유도 하향조정. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mAb과 함께 3일 인큐베이션한 후

AU565 세포 용해물 내의 HER2 발현 수준의 상대적인 백분율. HER2의 양은 HER2-특이적 포획 ELISA를 사용하여 정량하였고, 비처리된 세포와 비교시의 억제 백분율로서 도시하였다. 제시된 데이터는 2개의 실험의 평균 + 표준 편차이다.

도 46: 리소솜 마커 LAMP1 (Cy5)을 사용한 HER2 x HER2 이중특이적 항체의 공동 국지화 (colocalization) 분석 (FITC). 다양한 단일특이적 HER2 항체 및 HER2 x HER2 이중특이적 항체에 대해 Cy5와 중첩되는 FITC 화소 강도 (도 46(B)). 3개의 상이한 영상의 LAMP1/Cy5 양성 (positive) 화소의 FITC 화소 강도를 시험된 각각의 항체에 대해 그래프로 표시하였다. 단일특이적 항체는 이중특이적 항체에 비해 LAMP1/Cy5 양성 화소에서 보다 낮은 FITC 화소 강도를 보인다. 도 46(B)는 3개의 상이한 영상으로부터 계산된 LAMP1/Cy5 양성 화소당 FITC 화소 강도의 평균 값을 제시한다. 이들 결과는 함께, 내재화 후에 단일특이적 항체에 비해 보다 높은 수준의 이중특이적 항체가 Lamp1/Cy5 양성 소포 (vesicle)에 위치함을 나타낸다.

도 47: HER-2 단일 및 이중특이적 항체에 의한 증식의 억제. AU565 세포를 10 µg/ml HER2 항체 또는 HER2 x HER2 이중특이적 항체의 존재 하에 무혈청 세포 배양 배지에 시딩(seeding)하였다. 3일 후에, 생존가능 세포의 양을 알라마르블루를 사용하여 정량하고, 세포 생존력을 비처리된 세포에 대한 백분율로서 제시하였다. 이소형 대조군 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. 제시된 데이터는 5배 ± 표준 편차로 측정된 비처리된 세포에 비해 생존가능 AU565 세포의 백분율이다. *는 1개의 데이터 점만이 도시되었음을 나타낸다.

도 48: 상이한 pH에서 인간 및 마우스 FcRn에 대한 단일 및 이중특이적 IgG1 및 힌지-결실 IgG1 항체의 결합. 인간 및 마우스 FcRn이 존재하는 플레이트를 상이한 단일특이적 및 이중특이적 IgG1 항체 또는 힌지-결실 IgG1 분자와 함께 인큐베이션하였다. FcRn에 대한 결합을 405 nm에서 ELISA에 의해 분석하였다. (a) pH 7.4 및 6.0에서 인간 FcRn에 대한 단일 및 이중특이적 IgG1 항체 및 힌지-결실 IgG1 (Uni-G1) 분자의 결합. 인간 FcRn에 대한 결합은 중성 pH에서 매우 낮다. pH 6.0에서, (이중특이적) 항체는 H435A 돌연변이를 함유하지 않는 경우 인간 FcRn에 효율적으로 결합한다. 힌지-결실 IgG1 (Uni-G1) 분자는 낮은 효율성으로 인간 FcRn에 결합한다. (b) pH 7.4 및 6.0에서 마우스 FcRn에 대한 단일 및 이중특이적 IgG1 항체 및 힌지-결실 IgG1 (Uni-G1) 분자의 결합. 마우스 FcRn에 대한 결합은 중성 pH에서 매우 낮다. pH 6.0에서, (이중특이적) 항체는 두 Fab-아암 모두에 H435A 돌연변이를 함유하지 않는 경우 마우스 FcRn에 매우 효율적으로 결합한다. 한 Fab-아암에만 H435A 돌연변이를 보유하는 이중특이적 항체는 마우스 FcRn에 계속 결합할 수 있다. 힌지-결실 IgG1 (Uni-G1) 분자는 중간 효율성으로 마우스 FcRn에 결합하고, 한 Fab-아암에만 H435A 돌연변이를 보유하는 힌지-결실 IgG1 (Uni-G1) 이중특이적 분자는 약간 덜 효율적이다.

도 49: Her2 x CD3 이중특이적 항체에 의한 및 Her2 x CD3 이중특이적 항체의 N297Q 돌연변이체에 의한 AU565 세포의 T 세포 매개 세포독성.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] **발명의 상세한 설명**

[0030] 정의

[0031] 용어 "이뮤노글로불린"은 4개 모두가 디설피드 결합에 의해 상호연결된 한 쌍의 저분자량 경쇄 (L) 및 한 쌍의 중쇄 (H)의 2쌍의 폴리펩티드 사슬로 이루어지는, 구조상 관련된 당단백질의 클래스를 나타낸다. 이뮤노글로불린의 구조는 특징이 잘 결정되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)] 참조). 간단히 설명하면, 각각의 중쇄는 대개 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 대개 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2, 및 CH3으로 이루어진다. 중쇄는 소위 "힌지 영역"에서 디설피드 결합을 통해 상호연결된다. 각각의 경쇄는 대개 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 대개 1개의 도메인 CL로 이루어진다. 일반적으로, 상기 불변 영역 내에서 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에 기재된 EU-인덱스에 따라 수행된다. 도 16은 항체 2F8의 상이한 이소형 형태에 대한 EU 및 카바트 넘버링의 개관을 제시한다 (WO 02/100348). VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 불리는 추가변 영역 (또는 서열이 추가변성이고/이거나 구조적으로 규정된 루프를 형성할 수 있는 추가변 영역)으로 추가로 세분될 수 있고, 이들 영역에는 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 대개 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어지고, 이들은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 다음 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (또한, 문헌 [Chothia and Lesk

J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)] 참조).

- [0032] 본원에서 사용될 때, 용어 "Fab-아암"은 하나의 중쇄-경쇄쌍을 의미한다.
- [0033] 본원에서 사용될 때, 용어 "Fc 영역"은 적어도 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 항체 영역을 의미한다.
- [0034] 본 발명의 맥락에서 용어 "항체" (Ab)는 이뮤노글로불린 분자, 이뮤노글로불린 분자의 단편, 또는 이들의 유도체를 지칭하고, 이는 전형적인 생리학적 조건 하에 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 또는 그 초과, 약 48시간 또는 그 초과, 약 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과 등과 같은 유의한 기간의 시간, 또는 임의의 기타 관련된 기능적으로 정의된 기간 (예컨대, 항원에 대한 항체 결합과 관련된 생리학적 응답을 유도하고/하거나, 촉진하고/하거나, 증강시키고/시키거나 조정하는데 충분한 시간 및/또는 항체가 이펙터 활성을 동원하는데 충분한 시간)의 반감기로 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다. 이뮤노글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체 (Ab)의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예컨대 이펙터 세포) 및 보체계의 성분, 예를 들어 고전적인 보체 활성화 경로의 제1 성분인 C1q가 포함되는 숙주 조직 또는 인자에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 또한, 항체는 이종특이적 항체, 디아바디 (diabody), 또는 유사 분자일 수 있다. 용어 "이종특이적 항체"는 적어도 2개의 상이한 에피토프, 일반적으로 비-중복 에피토프에 대해 특이성을 갖는 항체를 의미한다. 상기 나타낸 바와 같이, 본원에서 용어 항체는 달리 언급되거나 문맥적으로 명백하게 모순되지 않는 한, 항원에 특이적으로 결합하는 능력이 유지된 항체의 단편을 포함한다. 상기 단편은 임의의 공지 기법, 예컨대 효소에 의한 절단, 펩티드 합성 및 재조합 발현 기술에 의해 제공될 수 있다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편, 예를 들어, F(ab')₂ 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 또한, 달리 특정되지 않으면 용어 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (mAb), 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메라 항체 및 인간화 항체도 포함함을 이해되어야 한다. 생성된 항체는 임의의 이소형을 가질 수 있다.
- [0035] 용어 "전장 항체"는 본원에서 사용될 때 이소형의 항체에서 통상적으로 발견되는 모든 중쇄 및 경쇄 불변 및 가변 도메인을 함유하는 항체를 의미한다.
- [0036] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 이뮤노글로불린 클래스 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 또는 IgM)를 의미한다.
- [0037] 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 배선 (germline) 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하도록 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스의 배선로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프팅된 항체를 포함하도록 의도되지 않는다.
- [0038] 본원에서 사용될 때, 용어 "중쇄 항체" 또는 "중-쇄 항체"는 2개의 중쇄만으로 이루어지고, 대체로 항체에서 발견되는 2개의 경쇄가 결여된 항체를 의미한다. 예를 들어 낙타류 (camelid)에서 천연적으로 발생하는 중쇄 항체는 VH 도메인만을 갖는 항원에 결합할 수 있다.
- [0039] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정자를 의미한다. 에피토프는 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자들의 표면 군으로 일반적으로 이루어지고, 일반적으로 특이적인 3차원 구조 특성뿐만 아니라 특이적인 전하 특성을 갖는다. 입체형태적 및 비입체형태적 에피토프는 변성 용매의 존재 하에 입체형태적 에피토프에 대한 결합은 손실되지만 비-입체형태적 에피토프에 대해서는 손실되지 않는다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접 관련되는 아미노산 잔기 (에피토프의 면역우성 성분으로도 칭해짐) 및 결합에 직접 관련되지 않는 기타 아미노산 잔기, 예컨대 특이적 항원 결합 펩티드에 의해 효과적으로 차단되는 아미노산 잔기 (즉, 아미노산 잔기가 특이적 항원 결합 펩티드의 풋프린트 (footprint) 내에 존재함)를 포함할 수 있다.
- [0040] 본원에서 사용되는 바와 같이, 예정된 항원에 대한 항체의 결합이라는 맥락에서 용어 "결합"은 일반적으로 예를 들어 항원을 리간드로, 항체를 분석물로 사용하여 BIAcore 3000 기기에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술에 의해 결정하는 경우, 약 10⁻⁶ M 이하, 예를 들어 10⁻⁷ M 이하, 예컨대 약 10⁻⁸ M 이하, 예컨대 약 10⁻⁹ M 이하, 약 10⁻¹⁰ M 이하, 또는 약 10⁻¹¹ M 이하의 K_D에 상응하는 친화도의 결합이고, 예정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항

원 이외의 비-특이적 항원 (예컨대, BSA, 카제인)에 대한 결합을 위한 그의 결합 친화도보다 10배 이상 낮은, 예컨대 100배 이상 낮은, 예를 들어 1,000배 이상 낮은, 예컨대 10,000배 이상 낮은, 예를 들어 100,000배 이상 낮은 K_D 에 상응하는 친화도로 예정된 항원에 결합한다. 친화도가 더 낮은 양은 항체의 K_D 에 의존적이기 때문에, 항체의 K_D 가 매우 낮으면 (즉, 항체가 고도로 특이적이면), 항원에 대한 친화도가 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 더 낮은 양은 10,000배 이상일 수 있다. 본원에 사용된 용어 " K_D " (M)는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭한다.

[0041] 본원에서 사용될 때 용어 "제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용"은 제1-CH3/제2-CH3 이종이량체 단백질에서 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 사이의 상호작용을 의미한다.

[0042] 본원에서 사용될 때 용어 "제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체 상호작용"은 제1-CH3/제1-CH3 동종이량체 단백질에서 제1 CH3 영역과 또 다른 제1 CH3 영역 사이의 상호작용 및 제2-CH3/제2-CH3 동종이량체 단백질에서 제2 CH3 영역과 또 다른 제2 CH3 영역 사이의 상호작용을 의미한다.

[0043] 본원에 사용된 "단리된 항체"는 물질이 그의 본래의 환경 (예를 들어, 천연적으로 생성되는 경우 천연 환경 또는 재조합 방식으로 발현될 경우 숙주 세포)으로부터 제거됨을 나타낸다. 또한, 항체는 정제된 형태가 유리하다. 용어 "정제된"은 절대적인 순도를 필요로 하지 않고; 오히려 출발 물질에 비교할 때 조성물 내의 오염물의 농도에 비해 항체 농도의 증가를 나타내는 상대적인 정의로 의도된다.

[0044] 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 발현 벡터, 예를 들어 본 발명의 항체를 코딩하는 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하도록 의도된다. 재조합 숙주 세포는 예를 들어, 트랜스펙토마 (transfectoma), 예컨대 CHO 세포, HEK293 세포, NS/O 세포, 및 림프구성 세포를 포함한다.

[0045] 본원에서 사용될 때, 용어 2개 이상의 핵산 구축물의 "동시-발현"은 단일 숙주 세포에서 2개의 구축물의 발현을 의미한다.

[0046] 용어 "중양 세포 단백질"은 중양 세포의 세포 표면에 위치하는 단백질을 의미한다.

[0047] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이펙터 세포"는 면역 반응의 인지 및 활성화 단계와 대조적으로, 면역 반응의 이펙터 단계에 수반되는 면역 세포를 지칭한다. 예시적인 면역 세포에는 골수 또는 림프 기원의 세포, 예를 들어 림프구 (예컨대, 세포용해성 T 세포 (CTL)가 포함되는 B 세포 및 T 세포), 킬러 (killer) 세포, 천연 킬러 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 다형핵 세포, 예컨대 호중구, 과립구, 비만 (mast) 세포 및 호염기구가 포함된다. 일부 이펙터 세포는 특정 Fc 수용체를 발현하고, 특정 면역 기능을 수행한다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포는 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 유도할 수 있고, 예컨대 천연 킬러 세포가 ADCC를 유도할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포는 표적 항원 또는 표적 세포를 포식할 수 있다.

[0048] 용어 "환원 조건" 또는 "환원 환경"은 기질, 본원에서는 항체의 힌지 영역 내의 시스테인 잔기가 산화보다는 환원될 가능성이 더 큰 조건 또는 환경을 의미한다.

[0049] 용어 "디설피드 결합 이성질체화"는 상이한 시스테인 사이의 디설피드 결합의 교환, 즉, 디설피드 결합의 셔플링 (shuffling)을 의미한다.

[0050] 본 발명의 추가의 측면 및 실시양태

[0051] 상기 설명한 바와 같이, 제1 측면에서, 본 발명은 이종이량체 단백질을 생성하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이고, 상기 방법은

[0052] a) 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 Fc 영역이 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 제1 동종이량체 단백질을 제공하는 단계,

[0053] b) 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 Fc 영역이 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 제2 동종이량체 단백질을 제공하는 단계,

[0054] c) 힌지 영역 내의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 단백질을 상기 제2 단백질과 함께 인큐베이션하는 단계, 및

[0055] d) 상기 이종이량체 단백질을 얻는 단계

[0056] 를 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 이들 서열은, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사

이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동중이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이다.

- [0057] 이중특이적 포맷은 이중특이적 항체의 요구되는 조합을 생성하기 위해 많은 방식으로 사용될 수 있다. 이것은 상이한 항원을 표적화하는 항체를 매우 선택적인 방식으로 조합할 수 있는 능력 이외에, 요구되는 특성을 변경하기 위해, 예를 들어 CDC를 증가시키기 위해 동일한 항원을 표적화하는 2개의 상이한 항체를 조합함으로써 사용될 수 있다. 또한, 이것은 무관한 (불활성) 항체로 그의 이중특이적 항체를 제조함으로써 길항 항체의 부분적인 효능 활성을 제거하거나 또는 효능 항체를 길항 항체로 전환하기 위해 사용될 수 있다.
- [0058] 한 실시양태에서, 동중이량체 단백질은 (i) Fc 영역, (ii) 항체, (iii) Fc 영역, 예컨대 수용체, 시토카인 또는 호르몬에 융합된 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질, 및 (iv) 전구약물, 펩티드, 약물 또는 독소에 접합된 Fc 영역으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0059] 일부 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 동중이량체 단백질은 Fc 영역 이외에, 항체의 다른 영역, 즉 CH1 영역, VH 영역, CL 영역 및/또는 VL 영역 중의 하나 이상 또는 전부를 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 동중이량체 단백질은 전장 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 제2 동중이량체 단백질은 전장 항체이다.
- [0060] 중요한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 동중이량체 단백질은 둘 모두 항체, 바람직하게는 전장 항체이고, 상이한 에피토프에 결합한다. 상기 실시양태에서, 생성되는 이중이량체 단백질은 이중특이적 항체이다. 상기 에피토프는 상이한 항원 또는 동일한 항원 상에 위치할 수 있다.
- [0061] 다른 실시양태에서, 그러나, 동중이량체 단백질 중의 하나만이 전장 항체이고, 다른 동중이량체 단백질은 전장 항체가 아니고, 예를 들어, 수용체, 시토카인 또는 호르몬과 같은 또 다른 단백질 또는 펩티드 서열과 함께 발현되거나 또는 전구약물, 펩티드, 약물 또는 독소에 접합된, 가변 영역이 없는 Fc 영역이다. 추가의 실시양태에서, 어떤 동중이량체 단백질도 전장 항체가 아니다. 예를 들어, 두 동중이량체 단백질은 수용체, 시토카인 또는 호르몬과 같은 또 다른 단백질 또는 펩티드 서열에 융합되거나 또는 전구약물, 펩티드, 약물 또는 독소에 접합될 수 있다.
- [0062] 한 실시양태에서, 제1 동중이량체 단백질의 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 이소형의 것이고, 제2 동중이량체 단백질의 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 이소형의 것이다. 바람직한 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 동중이량체 단백질 둘 모두의 Fc 영역은 IgG1 이소형의 것이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 동중이량체 단백질의 하나의 Fc 영역은 IgG1 이소형의 것이고, 다른 하나는 IgG4 이소형의 것이다. 후자의 실시양태에서, 생성되는 이중이량체는 IgG1의 Fc 영역 및 IgG4의 Fc 영역을 포함하고, 따라서 이펙터 기능의 활성화에 대해 흥미로운 중간 특성을 가질 수 있다. 상기 제1 및/또는 상기 제2 동중이량체 단백질이 Asn-연결된 글리코실화를 위한 수용 부위를 제거하는 돌연변이를 포함하거나 또는 글리코실화 특성을 변경하도록 조작될 경우 유사한 생성물이 얻어질 수 있다.
- [0063] 추가의 실시양태에서, 동중이량체 단백질 중의 하나 또는 둘 모두는 예를 들어 US2009317869에 기재되거나 또는 문헌 [van Berkel et al. (2010) *Biotechnol. Bioeng.* 105:350]에 기재된 바와 같이 항체 생산 동안 배양 배지에 화합물을 첨가하거나 또는 예를 들어 문헌 [Yamane-Ohnuki et al (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614]에 기재된 바와 같은 FUT8 녹아웃 (knockout) 세포를 사용함으로써 푸코스를 감소시키고 따라서 ADCC를 향상시키기 위해 당-조작된다. ADCC는 별법으로 문헌 [Umana et al. (1999) *Nature Biotech* 17: 176]에 기재된 방법을 사용하여 최적화될 수 있다.
- [0064] 추가의 실시양태에서, 동중이량체 단백질 중의 하나 또는 둘 모두는 예를 들어 문헌 [Natsume et al. (2009) *Cancer Sci.* 100:2411]에 기재된 바와 같이 보체 활성화를 향상시키기 위해 조작되었다.
- [0065] 추가의 실시양태에서, 동중이량체 단백질 중의 하나 또는 둘 모두는 이중이량체 단백질의 혈청 반감기를 조작하기 위해 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합을 감소시키거나 증가시키기 위해 조작되었다.
- [0066] 추가의 실시양태에서, 동중이량체 출발 단백질 중의 하나는 단백질 A에 결합하지 않고, 따라서 생성물을 단백질 A 칼럼에 통과시킴으로써 이중이량체 단백질을 상기 동중이량체 출발 단백질로부터 분리할 수 있도록 조작되었다. 이것은 출발 물질로서의 다른 동중이량체 단백질에 비해 과량의 하나의 동중이량체 단백질이 사용되는 실시양태에서 특히 유용할 수 있다. 상기 실시양태에서, 단백질 A에 결합하는 그의 능력을 상실하도록 과량으로 존재하는 동중이량체 단백질을 조작하는 것이 유용할 수 있다. 이중이량체화 반응 후에, 이중이량체 단백질은

단백질 A 칼럼의 통과에 의해 과잉의 비교환된 동종이량체 단백질로부터 분리될 수 있다.

- [0067] 추가의 실시양태에서, 동종이량체 단백질 중의 하나는 비-관련 에피토프를 인식하는 Fc 영역 또는 전장 항체 또는 체세포 과다돌연변이를 겪지 않고 자가-항원에 결합하지 않는 배선-유래 서열을 함유하는 전장 항체이다. 상기 실시양태에서, 이종이량체 단백질은 일가 항체로서 기능한다. 또 다른 실시양태에서, 두 동종이량체 단백질은 모두 동일한 중쇄를 포함하지만, 동종이량체 단백질 중의 하나만이 상기 중쇄와 기능적 항원-결합 부위를 형성하는 경쇄를 함유하고, 다른 동종이량체 단백질은 상기 중쇄와 조합되어 임의의 항원에 결합하지 않는 비기능적 경쇄를 함유한다. 상기 실시양태에서, 이종이량체 단백질은 일가 항체로서 기능한다. 상기 비-기능적 경쇄는 예를 들어 체세포 과다돌연변이를 겪지 않고 자가-항원에 결합하지 않는 배선-유래 서열일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 동종이량체 출발 물질로서 사용될 수 있는 항체는 예를 들어 문헌 [Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 생산될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 생산될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)]에 기재된 기법을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 모노클로날 항체는 임의의 적합한 공급원으로부터 입수할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 모노클로날 항체는 예를 들어 표면에 항원을 발현하는 세포 또는 관심있는 항원을 코딩하는 핵산 형태의 관심있는 항원으로 면역화시킨 마우스로부터 얻은 뮤린 비장 B 세포로부터 제조한 하이브리도마로부터 입수할 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 면역화된 인간 또는 비-인간 포유동물, 예를 들어 래트, 개, 영장류 등의 항체-발현 세포로부터 유래된 하이브리도마로부터 입수할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 동종이량체 출발 물질로서 사용되는 항체는 예를 들어 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 동종이량체 출발 단백질 중의 하나 또는 둘 모두는 임의의 명시된 돌연변이를 제외하고 인간 항체이다. 인간 모노클로날 항체는 마우스 면역계보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모솨말 (transchromosomal) 마우스, 예를 들어, HuMAb 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. HuMAb 마우스는 재배열되지 않은 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자 미니로커스 (minilocus)를 내인성 μ 및 κ 사슬 로커스를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께 함유한다(Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 보이고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스젠 (transgene)에서는 클래스 스위칭 및 체세포 돌연변이가 일어나 고친화도 인간 IgG, κ 모노클로날 항체가 생성된다 ([Lonberg, N. et al. (1994), 상기 문헌]; [Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)]에서 검토됨, [Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995)] 및 [Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)]). HuMAb 마우스의 제조는 문헌 [Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)], [Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993)], [Tuaille et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)], [Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994)], [Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 상세하게 설명되어 있다. 또한, US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 및 WO 01/09187을 참조한다. 공지된 기법에 따라 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생성하기 위해서 상기 트랜스제닉 마우스의 비장 세포를 사용할 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명의 인간 항체 또는 다른 종으로부터의 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 기법을 사용하여 파지 디스플레이, 레트로바이러스 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 포유동물 디스플레이, 및 다른 기법을 포함하고 이로 제한되지 않는 디스플레이-유형의 기술을 통해 확인될 수 있고, 생성되는 분자는 추가의 성숙, 예를 들어 친화도 성숙에 적용될 수 있고, 그러한 기법은 당업계에 공지되어 있다
- [0071] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 항체 또는 그의 일부, 예를 들어, 하나 이상의 CDR은 낙타과 (Camelidae)의 종 (WO2010001251 참조), 또는 연골 어류의 종, 예컨대 수염 상어 (nurse shark) 또는 중쇄 또는 도메인 항체의 것이다.
- [0072] 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 상기 단계 a) 및 b)에 제시되는 제1 및 제2 동종이량체 단백질은 정제된다.
- [0073] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 동종이량체 단백질은 약물, 전구약물 또는 독소에 접합되거나 또는 그에 대한 수용 기를 함유한다. 상기 수용 기는 예를 들어 비천연 아미노산일 수 있다.
- [0074] 상기 설명한 바와 같이, 동종이량체 출발 단백질의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고 상기 제1 및 제2

CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이다.

- [0075] 한 실시양태에서, 각각의 동종이량체 상호작용에 비해 이중이량체 상호작용의 증가된 강도는 공유 결합, 시스템 인 잔기 또는 하전된 잔기의 도입 이외의 다른 CH3 변형에 의한 것이다.
- [0076] 일부 실시양태에서, 본 발명의 생성물은 크게 안정하고, 시험관 내에서 약한 환원 조건 하에 또는, 중요하게는, 인간에게 투여될 때 생체 내에서 Fab-아암 교환을 겪지 않는다. 따라서, 한 실시양태에서, 생성되는 이중이량체 단백질에서 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용은 Fab-아암 교환이 실시예 13에 기재된 조건 하에서 0.5 mM GSH에서 발생할 수 없도록 하는 것이다.
- [0077] 또 다른 실시양태에서, 생성되는 이중이량체 단백질에서 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용은 실시예 14에 기재된 조건 하에서 마우스의 생체 내에서 Fab-아암 교환이 발생하지 않도록 하는 것이다.
- [0078] 또 다른 실시양태에서, 생성되는 이중이량체 단백질에서 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용은 예를 들어 실시예 30에서 기재된 바와 같이 결정할 때 2개의 동종이량체 상호작용의 최대치보다 2배 초과, 예컨대 3배 초과, 예를 들어 5배 초과로 더 크다.
- [0079] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 생성되는 이중이량체 단백질에서 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 30에 기재된 바와 같이 검정될 때 0.05 마이크로몰 미만이 되도록 하는 것이다
- [0080] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 두 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 21에 기재된 바와 같이 검정될 때 0.01 마이크로몰 초과, 예컨대 0.05 마이크로몰 초과, 바람직하게는 0.01 내지 10 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 10 마이크로몰, 보다 바람직하게는 0.01 내지 5, 예컨대 0.05 내지 5 마이크로몰, 훨씬 더 바람직하게는 0.01 내지 1 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 1 마이크로몰, 0.01 내지 0.5 또는 0.01 및 0.1이 되도록 하는 것이다. 동종이량체 출발 단백질이 상대적으로 안정한 실시양태는 매우 다량의 출발 단백질을 생산하고 예를 들어 응집 또는 오류폴딩 (misfolding)을 방지하기가 쉽다는 이점을 가질 수 있다.
- [0081] 일부 실시양태에서, 안정한 이중이량체 단백질은 CH3 영역에 단지 몇 개의 상당히 보존성인 비대칭 돌연변이만을 보유하는 2개의 동종이량체 출발 단백질을 기초로 하여 본 발명의 방법을 사용하여 고수율로 얻을 수 있다.
- [0082] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 동일하지 않은 위치에 아미노산 치환을 함유한다.
- [0083] 아미노산 치환체는 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산일 수 있다. 비천연 아미노산의 예는 예를 들어 문헌 [Xie J and Schultz P. G., Current Opinion in Chemical Biology (2005), 9:548-554], 및 [Wang Q. et al., Chemistry & Biology (2009), 16:323-336]에 개시되어 있다.
- [0084] 한 실시양태에서, 아미노산은 천연 아미노산이다.
- [0085] 한 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 야생형 CH3 영역에 비해 CH3 영역에 1개 이하의 아미노산 치환을 갖고, 제2 동종이량체 단백질은 CH3 영역에 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는다.
- [0086] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖고, 상기 제1 동종이량체 단백질 및 상기 제2 동종이량체 단백질은 동일한 위치에서 치환되지 않는다.
- [0087] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 366에 아미노산 치환을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시양태에서, 위치 366의 아미노산은 Arg, Lys, Asn, Gln, Tyr, Glu 및 Gly으로부터 선택된다.
- [0088] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 368에 아미노산 치환을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.
- [0089] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 370에 아미노산 치환을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.

- [0090] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 399에 아미노산 치환을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 405, 407 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.
- [0091] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 405에 아미노산 치환을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 399, 407 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.
- [0092] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 407에 아미노산 치환을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 399, 405, 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.
- [0093] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 아미노산 치환을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 399, 405, 및 407로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.
- [0094] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 비대칭 돌연변이, 즉 2개의 CH3 영역 내의 상이한 위치에 돌연변이, 예를 들어, CH3 영역 중의 하나의 위치 405에 돌연변이 및 다른 CH3 영역의 위치 409에 돌연변이를 포함한다.
- [0095] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.
- [0096] 하나의 상기 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산을 갖는다. 그의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산을 갖는다.
- [0097] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 포함한다. 그의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe을, 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 포함한다.
- [0098] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe을, 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 405에 Leu 및 위치 409에 Lys을 포함한다. 그의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 포함한다.
- [0099] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 405에 Leu 및 위치 409에 Lys을 포함한다.
- [0100] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함한다.
- [0101] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함한다.
- [0102] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 370에 Lys, 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함한다.
- [0103] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys 및 a) 위치 350에 Ile 및 위치 405에 Leu, 또는 b) 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함한다.
- [0104] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys 및 a) 위치 350에 Ile 및 위치 405에 Leu, 또는 b) 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함한다.
- [0105] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 350에 Thr, 위치 370에 Lys, 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys 및 a) 위치 350에 Ile 및 위치 405에 Leu, 또는 b) 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함한다.

- [0106] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 350에 Thr, 위치 370에 Lys, 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 350에 Ile, 위치 370에 Thr, 위치 405에 Leu 및 위치 409에 Lys을 포함한다.
- [0107] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산을 갖는다.
- [0108] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 407에 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp을 갖는다.
- [0109] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 407에 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp을 갖는다.
- [0110] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 407에 Tyr, 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 갖는다.
- [0111] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 407에 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp 및 위치 409에 Lys을 갖는다.
- [0112] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 407에 Tyr을, 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 407에 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp 및 위치 409에 Lys을 갖는다.
- [0113] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Arg을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 갖는다.
- [0114] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Arg을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 407에 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp 및 위치 409에 Lys을 갖는다.
- [0115] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Arg을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 위치 407에 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp 및 위치 409에 Lys을 갖는다.
- [0116] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 제2 동종이량체 단백질은
- [0117] (i) 위치 368에 Phe, Leu 및 Met 이외의 다른 아미노산, 또는
- [0118] (ii) 위치 370에 Trp, 또는
- [0119] (iii) 위치 399에 Asp, Cys, Pro, Glu 또는 Gln 이외의 다른 아미노산을 갖는다.
- [0120] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Arg, Ala, His 또는 Gly을 갖고, 제2 동종이량체 단백질은
- [0121] (i) 위치 368에 Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp, 또는
- [0122] (ii) 위치 370에 Trp, 또는
- [0123] (iii) 위치 399에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr을 갖는다.
- [0124] 한 실시양태에서, 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Arg을 갖고, 제2 동종이량체 단백질은
- [0125] (i) 위치 368에 Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp, 또는
- [0126] (ii) 위치 370에 Trp, 또는
- [0127] (iii) 위치 399에 Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr을 갖는다.

- [0128] 상기 특정된 아미노산 치환 이외에, 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질은 야생형 Fc 서열에 비해 추가의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 함유할 수 있다.
- [0129] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역은 명시된 돌연변이를 제외하고 서열 1에 제시된 서열 (IgG1m(a))을 포함한다:
- [0130] 서열 1:
- GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0131]
- [0132] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역은 명시된 돌연변이를 제외하고 서열 2에 제시된 서열 (IgG1m(f))을 포함한다:
- [0133] 서열 2:
- GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0134]
- [0135] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역은 명시된 돌연변이를 제외하고 서열 3에 제시된 서열 (IgG1m(ax))을 포함한다:
- [0136] 서열 3:
- GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
- [0137]
- [0138] 추가의 실시양태에서, 제공되는 동종이량체 단백질은 문헌 [Lindhofer et al. (1995) J Immunol 155:219 (상기 참조)]에 기재된 바와 같은 우선적인 페어링을 보이는 래트 항체 및 마우스 항체, 또는 미국 특허 5,731,168 (상기 참조)에 기재된 바와 같은 소위 톱-인 홀 (knob-in-hole) 변이체 항체일 수 있다. 그러나, 몇몇의 경우에 후자의 동종이량체 출발 단백질은 너무 약한 동종이량체 CH3-CH3 상호작용 때문에 생산이 보다 어려울 수 있다. 따라서, 위치 350, 370, 405 및 409에 돌연변이를 갖는 본원에 기재된 변이체가 바람직할 수 있다,
- [0139] 동종이량체 출발 단백질의 힌지 영역의 서열은 상이할 수 있다. 그러나, 생성되는 이종이량체 단백질은 힌지 영역이 IgG4-유사가 아니고, 바람직하게는 IgG1-유사인 경우에 몇몇의 상황 하에서 보다 안정할 수 있다.
- [0140] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체 단백질은 (코어) 힌지 영역에 Cys-Pro-Ser-Cys 서열을 포함하지 않는다.
- [0141] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체 단백질은 모두 (코어) 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함한다.
- [0142] 제1 및 상기 제2 동종이량체 단백질이 항체인 많은 실시양태에서, 상기 항체는 경쇄를 추가로 포함한다. 상기 설명한 바와 같이, 상기 경쇄는 상이할 수 있고, 즉 서열이 상이하고, 각각 단지 하나의 중쇄와 기능적 항원-결합 도메인을 형성한다. 그러나, 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질은 중쇄 항체이고, 이는 항원 결합을 위해 경쇄를 필요로 하지 않는다. 예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446]을 참조한다.
- [0143] 상기 설명한 바와 같이, 본 발명의 방법의 단계 c)는 상기 제1 단백질을 상기 제2 단백질과 함께 힌지 영역 내의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함한다. 적합한 조건의 예는 본원에서 제시된다. 힌지 영역 내의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪기 위한 최소 요건은 동종이량체 출발 단백질에 따라, 특히 힌지 영역 내의 정확한 서열에 따라 상이할 수 있다. 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용은 힌지 영역 내의 시스테인이 제시된 조건 하에서 디설피드-결합 이성질체화를 겪기에 충분히 약하다는 것이 중요하다.
- [0144] 한 실시양태에서, 단계 c)의 환원 조건은 환원제, 예를 들어, 2-메르캅토에틸아민 (2-MEA), 디티오프레이톨 (DTT), 디티오에리트릴 (DTE), 글루타티온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP), L-시스테인 및 베타-메르캅토-에탄올로 이루어진 군 중에서 선택된 환원제, 바람직하게는 2-메르캅토에틸아민, 디티오프레이톨 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀으로 이루어진 군 중에서 선택된 환원제의 첨가를 포함한다.

- [0145] 한 실시양태에서, 제어된 Fab-아암 교환을 가능하게 하는 환원 조건은 요구되는 산화환원 전위의 측면에서 설명된다. 트립티드 글루타티온 (GSH)은 세포 내의 주요 저-분자량 티올이고, 생체 내에서 정상적인 산화환원 신호전달에 필수적인 티올-디설피드 산화환원 상태를 제어한다. 세포의 산화환원 균형의 역학은 환원된 GSH 및 그의 산화된 형태 GSSG의 티올-대-디설피드 상태의 유지에 의해 달성된다. 환원 전위에 대한 값은 문헌 [Rost and Rapoport, Nature 201: 185 (1964)] 및 [Aslund et al., J. Biol. Chem. 272: 30780-30786 (1997)]에 기재된 바와 같이 측정될 수 있다. GSSG당 산화된 2개의 GSH의 화학양론을 고려하는 산화환원 전위 E_h 는 산화환원 상태에 대한 정량적 척도이다. E_h 는 네른스트 (Nernst) 식에 의해 계산된다: $E_h = E_o + (RT/nF)\ln ([GSSG(ox)]/[GSH(red)]^2)$. E_o 는 규정된 pH에서 산화환원 커플에 대한 표준 전위이고, R은 기체 상수이고, T는 절대 온도이고, F는 패러데이 (Faraday) 상수이고, n은 전달된 전자의 수이다. GSH/GSSG 커플에 대한 E_h 의 생체내 추정치는 -260 내지 -200 mV이다 (Aw, T., News Physiol. Sci. 18:201-204 (2003)). 이에 의해, 최종적으로 분화된 세포는 E_h 를 대략 -200 mV로 유지하는 반면에, 활발하게 증식하는 세포는 약 -260 mV의 보다 환원된 E_h 를 유지한다.
- [0146] DTT에 대한 표준 산화환원 전위는 -330 mV이다 (Cleland et al. Biochemistry 3: 480-482 (1964)). TCEP는 용액 내에서 DTT를 감소시키는 것으로 밝혀졌고, 따라서 DTT보다 더 음성인 산화환원 전위를 갖는다. 그러나, 정확한 값은 보고되지 않았다. 따라서, 제어된 Fab-아암 교환 조건을 허용하는 환원 조건은 요구되는 산화환원 전위 E_h 의 측면에서 설명되고, 이것은 생체 내에서 정상 혈장 조건 하에서 달성되고 현지 영역에 위치하고 중쇄 간 디설피드 결합 형성에 관여하는 것 외부의 항체 디설피드 결합을 환원시키는 산화환원 전위를 초과하는 값 미만이 최적이다.
- [0147] 따라서, 추가의 실시양태에서, 단계 c)는 산화환원 전위가 -50 mV 미만, 예컨대 -150 mV 미만, 바람직하게는 -150 내지 -600 mV, 예컨대 -200 내지 -500 mV, 보다 바람직하게는 -250 내지 -450 mV, 예컨대 -250 내지 -400 mV, 훨씬 더 바람직하게는 -260 내지 -300 mV인 환원 조건 하에 수행된다.
- [0148] 추가의 실시양태에서, 단계 c)는 적어도 25 mM 2-메르캅토에틸아민의 존재 하에 또는 적어도 0.5 mM 디티오프라이톨의 존재 하에 적어도 20°C의 온도에서 적어도 90 min 동안의 인큐베이션을 포함한다. 인큐베이션은 5 내지 8의 pH, 예컨대 pH 7.0 또는 pH 7.4에서 수행될 수 있다.
- [0149] 추가의 실시양태에서, 단계 d)는 조건을 환원제의 제거에 의해, 예를 들어 탈염 (desalting)에 의해 비-환원 또는 낮은 환원 조건이 되도록 회복시키는 것을 포함한다.
- [0150] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 80% 초과, 예컨대 90% 초과, 예를 들어 95% 초과, 예컨대 99% 초과, 항체 분자가 요구되는 이중특이적 항체인 항체 생성물을 생산한다.
- [0151] 후반 처리 (post-production)는 동시-발현을 기초로 한 선행 기술의 방법에 비해 제어가 보다 융통성이 있고 용이하다.
- [0152] 본원에서 개시되는 바와 같이 환원 조건 하에 (예컨대 2-MEA의 첨가에 의한) Fab-교환에 의해 이중특이적 항체를 제조하는 후반 처리의 특성 때문에 상기 방법은 이중특이적 항체 발견을 위한 특이성의 다수의 조합에 대한 (고처리량 (high-throughput)) 스크리닝을 위한 전략이 될 수 있다. 또한, 시험관내 과정은 동시-발현에 의해 허용되는 것보다 더 큰 이중이량체 단백질의 제어, 융통성 및 수율을 허용하는 실험실에서 수행될 수 있다. 상기 전략의 추가의 이점은 후보물질 최적화시에 조작의 필요성을 배제하면서 스크리닝을 최종 치료 포맷으로 수행할 수 있다는 점이다.
- [0153] 상기 설명한 바와 같이, 추가의 측면에서, 본 발명의 방법은 "매트릭스 (matrix)" 스크리닝, 즉 한 세트는 동일한 제1 CH3 영역을 갖고 다른 세트는 동일한 제2 CH3 영역을 갖는 2개의 항체 세트를 기초로 하여 결합 특이성의 다수의 상이한 조합을 생성하기 위해 사용될 수 있고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이다.
- [0154] 따라서, 한 실시양태에서 본 발명은 요구되는 특성을 갖는 이중이량체 단백질의 선택 방법에 관한 것이고, 상기 방법은
- [0155] a) Fc 영역을 포함하는 동종이량체 단백질의 제1 세트를 제공하는 단계이며, 이때 상기 동종이량체 단백질이 동

일한 제1 CH3 영역을 갖는 것인 단계,

- [0156] b) Fc 영역을 포함하는 동종이량체 단백질의 제2 세트를 제공하는 단계이며, 이때 상기 동종이량체 단백질이 동일한 제2 CH3 영역을 갖는 것인 단계
- [0157] (여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 이들 서열은 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이다),
- [0158] c) 힌지 영역 내의 시스템이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 세트의 동종이량체 단백질 및 상기 제2 세트의 동종이량체 단백질의 조합물을 인큐베이션하여 이중특이적 항체의 세트를 생성하는 단계,
- [0159] d) 임의로 조건을 비-환원으로 회복시키는 단계,
- [0160] e) 생성되는 이종이량체 단백질의 세트를 제시된 요구되는 특성에 대해 검정하는 단계,
- [0161] f) 요구되는 특성을 갖는 이종이량체 단백질을 선택하는 단계
- [0162] 를 포함한다.
- [0163] 한 실시양태에서, 본 발명은 요구되는 특성을 갖는 이중특이적 항체를 선택하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은
- [0164] a) 상이한 가변 영역을 갖는 항체를 포함하는 동종이량체 항체의 제1 세트를 제공하는 단계이며, 이때 상기 제1 세트의 상기 항체가 동일한 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,
- [0165] b) 상이한 가변 영역 또는 동일한 가변 영역을 갖는 항체를 포함하는 동종이량체 항체의 제2 세트를 제공하는 단계이며, 이때 상기 제2 세트의 상기 항체가 동일한 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,
- [0166] c) 힌지 영역 내의 시스템이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 세트의 항체 및 상기 제2 세트의 항체의 조합물을 인큐베이션하여 이중특이적 항체의 세트를 생성하는 단계,
- [0167] d) 임의로 조건을 비-환원성으로 회복시키는 단계,
- [0168] e) 생성되는 이중특이적 항체의 세트를 제시된 요구되는 특성에 대해 검정하는 단계, 및
- [0169] f) 요구되는 특성을 갖는 이중특이적 항체를 선택하는 단계
- [0170] 를 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 이들 서열은, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이다.
- [0171] 한 실시양태에서, 제2 세트의 동종이량체 항체는 상이한 가변 영역을 갖는다.
- [0172] 한 실시양태에서, 제2 세트의 동종이량체 항체는 동일한 가변 영역을 갖지만, 항원 결합 영역 외부에 상이한 아미노산 또는 구조적 변이를 갖는다.
- [0173] 2개 세트는 요구되는 바에 따라 많은 상이한 방식으로 구성될 수 있다. 따라서, 2개 세트는 동일한 항원 상의 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프를 표적화할 수 있다. 2개 세트는 또한 상이한 항원을 표적화할 수 있고, 각각의 세트는 논의되는 항원 상의 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 결합하는 항체를 함유할 수 있다. 또한, 세트 중의 하나 또는 둘 모두가 상이한 항원을 표적화하는 항체를 각각 함유할 수 있다.
- [0174] 또 다른 실시양태에서, 상기 요구되는 특성은 세포 사멸, 세포 용해, 세포 증식의 억제, 또는 두 항원 표적을 발현하는 세포에 대한 결합이다.
- [0175] 스크리닝 전략은 다양한 특이성을 보유하는 항체 벡터의 2개의 패널을 포함하고, 여기서 하나의 패널은 환원 조건 하에 (예컨대 2-MEA의 첨가에 의한) 제2 패널의 백본과의 Fab-아암 교환에 참여할 수 있는 백본 내로 클로닝된다. 예를 들어, 제1 패널은 IgG1-F405L 백본 내로 클로닝되고, 제2 패널은 IgG1-K409R 백본 내로 클로닝된다 (다른 가능한 백본 조합에 대해서는, 또한 실시예 19, 28, 29, 30, 35, 36, 37, 38, 및 39를 참조한다).
- [0176] 이어서, 항체 벡터의 2개의 패널의 각각의 멤버는 소규모로 개별적으로 발현된다. 예를 들어, 모든 항체 벡터는 HEK293 세포에 일시적으로 형질감염되고, 24-웰 플레이트 내의 2.3 ml 배양액에서 발현된다. 별법으로, 당 업계에 공지된 다른 적합한 (소규모) 생산 시스템이 사용될 수 있다.

- [0177] 이어서, 항체의 2개의 패널의 발현된 항체를 등몰비로 매트릭스-유사 방식으로 쌍별로 (pairwise) 혼합한다. 예를 들어, 모든 개별적인 항체는 소규모 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제되고, 항체 농도는 280 nm의 파장에서의 흡광도에 의해 측정된다. 다른 적합한 (소규모) 정제 방법 또는 당업계에 공지된 단백질 농도 결정 방법이 별법으로 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 정제 단계는 하류 적용이 발현 배지에 의해 영향받지 않을 경우 생략될 수 있다. 이후에, 항체 농도는 적합한 부피가 등몰량의 두 항체를 함유하도록 정규화된다. 예를 들어, F405L 백본 내의 8개 항체의 패널은 100 μ l의 64개 혼합물이 80 μ g/ml의 항체 A (F405L) 및 80 μ g/ml의 항체 B (K409R)를 함유하도록 K409R 백본 내의 8개의 항체와 개별적으로 혼합된다. 별법으로, 전략이 이중특이적 항체-특이적 정제 단계를 하류에 포함할 경우에는, 항체 양을 정규화하는 단계는 생략될 수 있다.
- [0178] 항체의 혼합물에, 적합한 양의 환원제를 첨가하고, 허용되는 온도에서 적합한 기간 동안 인큐베이션한다. 예를 들어, 80 μ g/ml의 항체 A (F405L) 및 80 μ g/ml의 항체 B (K409R)를 함유하는 100 μ l에, 25 μ l의 125 mM 2-MEA를 첨가하고 (최종 농도 25 mM 2-MEA), 25°C에서 밤새 인큐베이션한다.
- [0179] 그 결과, 환원제가 혼합물 (이제 이중특이적 항체를 함유하는)로부터 제거되어 디설피드 결합의 산화를 촉진하고, 스크리닝 검정에서 환원제의 간섭을 방지한다. 예를 들어, 2-MEA는 제바 스핀 (Zeba Spin) 96-웰 탈염 플레이트 (피어스 바이오테크놀로지 (Pierce Biotechnology), #89807)를 사용하여 64개 혼합물의 완충제 교환을 수행함으로써 제거된다. 별법으로, 당업계에 공지된 환원제를 제거하기 위한 다른 적합한 방법이 사용될 수 있다.
- [0180] 이어서, 이중특이적 항체는 선도 후보물질을 확인하기 위해 생화학적으로 또는 기능적으로 특성을 결정한다. 예를 들어, 64개의 이중특이적 항체는 적합한 세포주의 증식 억제 또는 적합한 세포주에 대한 결합에 대해 평가된다. 이어서, 확인된 선도 후보물질은 보다 큰 규모로 생산되고, 보다 상세하게 특성이 결정될 것이다.
- [0181] 동시-발현에 의한 생산
- [0182] 본 발명의 이중이량체 단백질은 또한 단일 세포에서 제1 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 구축물의 동시-발현에 의해 얻을 수 있다.
- [0183] 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 이중이량체 단백질의 생산 방법에 관한 것이다:
- [0184] a) 이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 제1 Fc 영역이 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 구축물을 제공하는 단계,
- [0185] b) 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 제2 Fc 영역이 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산 구축물을 제공하는 단계,
- [0186] c) 상기 제1 및 제2 핵산 구축물을 숙주 세포 내에서 동시-발현시키는 단계, 및
- [0187] d) 상기 이중이량체 단백질을 세포 배양액으로부터 얻는 단계
- [0188] (여기서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 이들 서열은 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이고,
- [0189] 이때, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖고/갖거나,
- [0190] 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 각각의 CH3 영역의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 21에 기재된 바와 같이 검정할 때 0.01 내지 10 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 10 마이크로몰, 보다 바람직하게는 0.01 내지 5, 예컨대 0.05 내지 5 마이크로몰, 훨씬 더 바람직하게는 0.01 내지 1 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 1 마이크로몰, 0.01 내지 0.5, 또는 0.01 내지 0.1이 되도록 하는 것이다).
- [0191] 프로모터, 인핸서 등을 포함하는 적합한 발현 벡터, 및 항체의 생산에 적합한 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있다. 숙주 세포의 예는 효모, 박테리아 및 포유동물 세포, 예컨대 CHO 또는 HEK 세포를 포함한다.
- [0192] 상기 방법의 한 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산을 갖고/갖거나
- [0193] 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 각각의 CH3 영역의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 21에 기재된 바와 같이 검정할 때 0.01 내지 10 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 10 마이크로몰, 보다 바람직하게는 0.01 내지

5, 예컨대 0.05 내지 5 마이크로몰, 훨씬 더 바람직하게는 0.01 내지 1 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 1 마이크로몰, 0.01 내지 0.5, 또는 0.01 내지 0.1이 되도록 하는 것이다.

- [0194] 상기 방법의 또 다른 실시양태에서,
- [0195] 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산, 예컨대 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산을 갖거나 또는
- [0196] 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산을 갖는다.
- [0197] 일부 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 상이한 에피토프에 결합하는 2개의 항체의 전장 중쇄이고 (즉, 상기 제1 및 제2 핵산 구축물은 상이한 에피토프에 결합하는 2개의 항체의 전장 중쇄를 코딩한다), 따라서 이종이량체 단백질은 이중특이적 항체이다. 상기 이중특이적 항체는 중쇄 항체일 수 있거나, 또는 상기 숙주 세포는 경쇄를 코딩하는 하나 이상의 핵산 구축물을 추가로 발현할 수 있다. 단지 하나의 경쇄 구축물만이 중쇄 구축물과 동시 발현될 경우, 기능적 이중특이적 항체는 경쇄 서열이 각각의 중쇄와 기능적 항원-결합 도메인을 형성할 수 있도록 하는 경우에만 형성된다. 2개 이상의 상이한 경쇄 구축물이 중쇄와 동시 발현될 경우, 다수의 생성물이 형성될 것이다.
- [0198] 추가의 실시양태에서, 본 발명에 따른 동시-발현 방법은 상기 시험관내 방법에서 설명한 임의의 추가의 특징을 포함한다.
- [0199] 추가의 측면에서, 본 발명은 상기 본원에서 구체적으로 설명한 제1 및 제2 핵산 구축물을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 또 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 상기 본원에서 구체적으로 설명한 제1 및 제2 핵산 구축물을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0200] 이종이량체 단백질
- [0201] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 얻거나 얻을 수 있는 이종이량체 단백질에 관한 것이다.
- [0202] 또한, 본 발명의 방법에 따르면 비대칭 분자, 각각의 Fab-아암 상에 또는 각각의 CH3 도메인 상에 상이한 특징을 갖는 분자 또는 분자 전체에 걸쳐 별개의 변형을 갖는 분자, 예를 들어, 접합을 위한 비천연 아미노산 치환(들)을 갖는 분자의 형성이 가능하다. 그러한 비대칭 분자는 임의의 적합한 조합으로 생성될 수 있다. 이것은 몇몇의 비-제한적인 예에 의해 아래에서 추가로 예시된다.
- [0203] 이중특이적 항체는 종양 세포를 포함하고 이로 제한되지 않는 관심있는 표적 세포를 예비표적화하기 위해 사용될 수 있다. 표적 세포의 예비표적화는 영상화 연구 또는 면역치료 목적을 위해 사용될 수 있다.
- [0204] 본 발명의 방법의 실시양태에서, 이중특이적 분자의 제1 Fab-아암은 종양 세포, 예컨대 종양 세포 표면 단백질 또는 종양 세포 표면 탄수화물, 예컨대 본원에서 제시되는 종양 세포 표면 단백질의 하나에 결합하고, 제2 Fab-아암은 펩티드 또는 합텐에 커플링된 또는 연결된 (킬레이터를 통해) 방사성 표지를 포함하고 이로 제한되지 않는 방사성 이펙터 분자를 인식한다. 상기 방사성 표지된 펩티드의 예는 인듐-표지된 디에틸렌트리아민펜타아세트산이다 (항-DTPA(In), van Schaijk et al. Clin. Cancer Res. 2005; 11: 7230s-7126s). 또 다른 예는 합텐-표지된 콜로이드 입자, 예컨대 리포솜, 예를 들어 테크네튬(technetium)-99와 같은 방사성 핵종을 보유하는 중합성 미셀의 나노입자를 사용하는 것이다 (Jestin et al. Q J Nucl Med Mol Imaging 2007; 51:51-60).
- [0205] 또 다른 실시양태에서, 합텐-커플링된 다른 세포증식 억제 분자, 예컨대 독소가 사용된다.
- [0206] 본 발명의 방법의 추가의 실시양태에서, 이중특이적 분자의 제1 Fab-아암은 위치 N297 (EU 넘버링)에서 글리코실화되고, 이중특이적 분자의 제2 Fab-아암은 비글리코실화된다 (예를 들어 N297을 Q 또는 A 또는 E 돌연변이로 돌연변이시키므로써 비글리코실화된다 (Bolt S et al., Eur J Immunol 1993, 23:403-411)). Fc-영역 내의 비대칭 글리코실화는 Fc γ -수용체에 대한 상호작용에 영향을 주고, 항체의 항체-의존성 세포성 세포독성 효과 (Ha et al., Glycobiology 2011, April 5) 및 다른 이펙터 기능 분자, 예컨대 C1q와의 상호작용에 영향을 준다.
- [0207] 본 발명의 방법의 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 분자의 제1 Fab-아암은 신생아 Fc 수용체인 FcRn과 상호작용하고 (Roopenian DC, et al. Nat. Rev. Immunol. 2007, 7:715-725), 제2 Fab-아암은 예를 들어 H435A 돌연변이를 형성함으로써 분자 상의 FcRn 상호작용 부위의 돌연변이에 의해 FcRn에 대한 결합이 손상된다 ([Shields, R.L., et al., J Biol Chem, 2001], [Firan, M., et al., Int Immunol, 2001]).

- [0208] 본 발명의 방법의 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 분자의 제1 Fab-아암은 항체의 정제를 위해 종종 사용되는 스타필로코쿠스 단백질 A (단백질 A, [Deisenhofer et al., Biochemistry 20, 2361-2370 (1981)]) 및 스트렙토코쿠스 단백질 G (단백질 G, [Derrick et al., Nature 359, 752-754 (1992)])와 상호작용하고, 이중특이적 분자의 제2 Fab-아암은 단백질 A 또는 G와의 상호작용이 손상된다. 그 결과, 이중이량체로의 교환 후에 손상된 단백질 A 또는 G 결합을 갖는 동중이량체의 잔여량의 제거는 단백질 A 또는 G를 사용한 이중특이적 분자의 정제에 의해 쉽게 수행된다.
- [0209] 또 다른 실시양태에서, Fc γ -수용체 또는 FcRn에 대한 결합은 이중특이적 분자의 2개의 Fab-아암 중의 하나에서 개선되거나 감소된다.
- [0210] 또 다른 실시양태에서, C1q에 대한 결합은 이중특이적 분자의 2개의 Fab-아암 중의 하나에서 개선되거나 감소된다.
- [0211] 또 다른 실시양태에서, 단백질은 분자의 2개의 Fab-아암 중의 하나 또는 둘 모두에 대해 보체 활성화를 향상시키기 위해 조작되었다.
- [0212] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 분자에 존재하는 각각의 Fab-아암은 상이한 IgG 하위클래스로부터 유래한다.
- [0213] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 분자에 존재하는 각각의 Fab-아암은 상이한 동중이형 (allotype) 돌연변이를 보유한다 (Jefferis & Lefranc, 2009, MABs 1: 332-8).
- [0214] 또 다른 실시양태에서, 비대칭 면역치료 분자의 또 다른 범주는 이중특이적 분자의 Fab-아암 중의 하나의 Fab를 면역 활성화, 자극성 또는 억제성 시토카인으로 교체함으로써 생성된다. 상기 시토카인의 비-제한적인 예는 IL-2, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6, IL-13이다. 별법으로, (성장) 인자 또는 호르몬 자극제 또는 억제제가 분자에 포함된다.
- [0215] 또 다른 실시양태에서, Fab-아암 중의 하나의 Fab는 용해 펩티드, 즉 마가이닌, 멜리틴, 세크로핀, KLAKKLAK 및 그의 변이체와 같은 항미생물 펩티드를 포함하고 이로 제한되지 않는, 중앙 세포, 박테리아, 진균 등을 용해시킬 수 있는 펩티드 ([Schweizer et al. Eur. J. Pharmacology 2009; 625: 190-194], [Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39:3107-3113], [Marks et al., Cancer Res 2005; 65:2373-2377], [Rege et al., Cancer Res. 2007; 67:6368-6375]) 또는 양이온성 용해 펩티드 (CLYP 테크놀로지 (CLYP technology), US2009/0269341)에 의해 교체된다.
- [0216] 또 다른 실시양태에서, Fab 아암 상의 Fab 중의 하나 또는 둘 모두는 시토카인 및/또는 성장 인자에 대한 수용체로 교체되어 소위 디코이 (decoy) 수용체를 생성하고, TNF- α 를 표적화하는 엔브렐 (Enbrel)[®] (에타네르셉트) 및 VEGF를 표적화하는 VEGF-트랩 (trap)이 그의 잘 알려진 예이다. 이들 2개의 디코이 수용체를 한 분자로 조합하면 단일 디코이 수용체보다 우수한 활성을 보였다 (Jung, J.Biol. Chem. 2011; 286:14410-14418).
- [0217] 또 다른 실시양태에서, 비대칭 면역치료 분자의 또 다른 범주는 면역 활성화, 자극성 또는 억제성 시토카인을 이중특이적 분자에 존재하는 Fab-아암 중의 하나 또는 둘 모두의 N-말단 또는 C-말단에 융합시킴으로써 생성된다. 이것은 이중특이적 분자의 항-중앙 활성화에 좋은 영향을 끼친다. 상기 분자의 예는 IL-2 (Fournier et al., 2011, Int. J. Oncology, doi: 10.3892/ijo.2011.976), IFN- α , IFN- β 또는 IFN- γ ([Huan et al., 2007; J. Immunol. 179: 6881-6888], [Rossie et al., 2009; Blood 114: 3864-3871]), TNF- α 이고 이로 제한되지 않는다. 별법으로, 시토카인, 예컨대 예를 들어 G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6, 또는 IL-13의 N-말단 또는 C-말단 융합은 이중특이적 항체 분자 이펙터 기능에 좋은 영향을 끼칠 수 있다. 별법으로, (성장) 인자 또는 호르몬 자극제 또는 억제제는 N-말단 또는 C-말단 상에서 분자에 포함된다.
- [0218] 또 다른 실시양태에서, Fab-아암 중의 하나 또는 둘 모두에 대한 용해 펩티드, 예를 들어 마가이닌, 멜리틴, 세크로핀, KLAKKLAK 및 그의 변이체와 같은 항미생물 펩티드 ([Schweizer et al. Eur. J. Pharmacology 2009; 625: 190-194], [Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39: 3107-3113], [Marks et al., Cancer Res 2005; 65: 2373-2377], [Rege et al., Cancer Res. 2007; 67: 6368-6375]) 또는 양이온성 용해 펩티드 (CLYP 테크놀로지, US2009/0269341)의 N-말단 또는 C-말단 융합은 분자의 활성을 향상시킬 수 있다.
- [0219] 또 다른 실시양태에서, 비대칭 면역치료 분자의 또 다른 범주는 선택된 표적과 상호작용하는 한 Fab-아암을 갖는 분자인 일가 항체이다. 상기 분자에서, 이중특이적 분자에 존재하는 Fab-아암의 하나는 선택된 표적 분자에 대해 작용하고, 분자의 제2 Fab-아암은 Fab를 보유하지 않거나 또는 MetMab (제넨테크 (Genentech); WO

96/38557)에 대해 설명된 바와 같은 비-결합/비-기능적 Fab를 갖는다. 별법으로, 인자 VIII 및 IX (Peters et al., Blood 2010; 115: 2057-2064)에 대해 기재된 바와 같은 단량체 Fc-융합 단백질이 사용될 수 있다.

- [0220] 별법으로, 상기한 임의의 비대칭 분자의 조합이 본 발명의 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0221] 또 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중이량체 단백질에 관한 것이고, 상기 제1 Fc 영역은 제1 CH3 영역을 포함하고, 상기 제2 Fc 영역은 제2 CH3 영역을 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이고,
- [0222] 여기서, 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖고/갖거나,
- [0223] 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 각각의 CH3 영역의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 21에 기재된 바와 같이 검정할 때 0.01 내지 10 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 10 마이크로몰, 보다 바람직하게는 0.01 내지 5, 예컨대 0.05 내지 5 마이크로몰, 훨씬 더 바람직하게는 0.01 내지 1 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 1 마이크로몰, 0.01 내지 0.5 또는 0.01 내지 0.1이 되도록 하는 것이다.
- [0224] 한 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산을 갖고/갖거나,
- [0225] 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 각각의 CH3 영역의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 21에 기재된 바와 같이 검정할 때 0.01 내지 10 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 10 마이크로몰, 보다 바람직하게는 0.01 내지 5, 예컨대 0.05 내지 5 마이크로몰, 훨씬 더 바람직하게는 0.01 내지 1 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 1 마이크로몰, 0.01 내지 0.5 또는 0.01 내지 0.1이 되도록 하는 것이다.
- [0226] 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산, 예컨대 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산을 갖거나 또는
- [0227] 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산을 갖는다.
- [0228] 추가의 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중이량체 단백질은 생산 방법에 대해 상기 설명한 임의의 추가의 특징을 포함한다.
- [0229] 따라서, 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 폴리펩티드는 항체, 바람직하게는 인간 항체의 전장 중쇄이다.
- [0230] 본 발명의 이중이량체 단백질의 또 다른 실시양태에서, 상기 제2 폴리펩티드는 항체, 바람직하게는 인간 항체의 전장 중쇄이다.
- [0231] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 폴리펩티드는 2개의 항체의 두 전장 중쇄, 바람직하게는 상이한 에피토프에 결합하는 두 인간 항체이고, 따라서 생성되는 이중이량체 단백질은 이중특이적 항체이다. 상기 이중특이적 항체는 중쇄 항체, 또는 중쇄에 추가로 동일하거나 상이할 수 있는 2개의 전장 경쇄를 포함하는 항체일 수 있다.
- [0232] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 제1 폴리펩티드의 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군 중에서 선택된 이소형의 것이고 (명시된 돌연변이 제외), 제2 폴리펩티드의 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군 중에서 선택된 이소형의 것이다 (명시된 돌연변이 제외).
- [0233] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 폴리펩티드 둘 모두의 Fc 영역은 IgG1 이소형의 것이다.
- [0234] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 폴리펩티드의 Fc 영역 중의 하나는 IgG1 이소형의 것이고, 다른 하나는 IgG4 이소형의 것이다.
- [0235] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 각각의 동종이량체 상호작용에 비해 이중이량체 상호작용

의 증가된 강도는 공유 결합, 시스테인 잔기 또는 하전된 잔기의 도입 이외의 다른 CH3 변형에 의한 것이다.

- [0236] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 이중이량체 단백질 내의 상기 제1 및 제2 폴리펩티드 사이의 이중이량체 상호작용은 Fab-아암 교환이 실시예 13에 기재된 조건 하에 0.5 mM GSH에서 발생할 수 없도록 하는 것이다.
- [0237] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 생성되는 이중이량체 단백질 내의 상기 제1 및 제2 폴리펩티드 사이의 이중이량체 상호작용은 Fab-아암 교환이 실시예 14에 기재된 조건 하에 마우스의 생체 내에서 발생하지 않도록 하는 것이다.
- [0238] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산을 및 위치 409에 Lys을 포함한다.
- [0239] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에 Leu을 및 위치 409에 Lys을 포함한다.
- [0240] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에 Leu을 및 위치 409에 Lys을 포함한다.
- [0241] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 409에 Lys을, 및 a) 위치 350에 Ile 및 위치 405에 Leu, 또는 b) 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함한다.
- [0242] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 409에 Lys을, 및 a) 위치 350에 Ile 및 위치 405에 Leu, 또는 b) 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함한다.
- [0243] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 350에 Thr, 위치 370에 Lys, 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 409에 Lys을, 및 a) 위치 350에 Ile 및 위치 405에 Leu, 또는 b) 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함한다.
- [0244] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 350에 Thr, 위치 370에 Lys, 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 350에 Ile, 위치 370에 Thr, 위치 405에 Leu 및 위치 409에 Lys을 포함한다.
- [0245] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 폴리펩티드는 힌지 영역에 Cys-Pro-Ser-Cys 서열을 포함하지 않는다.
- [0246] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 폴리펩티드 둘 모두가 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함한다.
- [0247] 본 발명의 이중이량체 단백질의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 상기 제2 폴리펩티드는 Asn-연결된 글리코실화를 위한 수용 부위를 제거하는 돌연변이를 포함한다.
- [0248] 표적 항원
- [0249] 상기 설명한 바와 같이, 본 발명의 중요한 실시양태에서, 이중이량체 단백질은 결합 특이성이 상이한, 즉 상이한 에피토프에 결합하는 2개의 가변 영역을 포함하는 이중특이적 항체이다.
- [0250] 원칙적으로, 특이성의 임의의 조합이 가능하다. 상기한 바와 같이, 이중특이적 항체는 단일특이적 항체의 몇몇의 제한을 극복하기 위해 잠재적으로 사용될 수 있다. 단일특이적 항체의 가능한 하나의 제한은 항체 결합이 요구되지 않는 다른 세포 종류 상의 표적 항원의 발현 때문에 요구되는 표적 세포에 대한 특이성의 결여이다. 예를 들어, 종양 세포 상에서 과다발현되는 표적 항원은 또한 그 항원에 대해 작용하는 항체의 처리시에 요구되지 않는 부작용을 야기할 수 있는 건강한 조직에서 발현될 수 있다. 표적 세포 종류 상에서만 발현되는 단백질에 대한 추가의 특이성을 갖는 이중특이적 항체는 종양 세포에 대한 특이적 결합을 잠재적으로 개선할 수 있다.
- [0251] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 에피토프는 동일한 세포, 예를 들어, 종양 세포 상에 위치할 수 있다. 종양 세포 상의 적합한 표적은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: erbB1 (EGFR), erbB2

(HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), CD74, EpCAM 및 MRP3. 종양 세포 표적의 가능한 조합은 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: erbB1 + erbB2, erbB2 + erbB3, erbB1 + erbB3, CD19 + CD20, CD38 + CD34, CD4 + CXCR5, CD38 + RANKL, CD38 + CXCR4, CD20 + CXCR4, CD20 + CCR7, CD20 + CXCR5, CD20 + RANKL, erbB2 + AXL, erbB1 + cMet, erbB2 + c-Met, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.

[0252] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 에피토프는 동일한 표적 항원 상에 위치할 수 있고, 여기서, 표적 항원 상의 2개의 에피토프의 위치는 하나의 에피토프에 대한 항체의 결합이 다른 에피토프에 대한 항체 결합을 방해하지 않도록 하는 것이다. 그의 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질은 동일한 표적 항원 상에 위치하는 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 항체이지만, 표적 세포, 예를 들어, 종양 세포를 사멸시키기 위해 상이한 작용 방식을 갖는다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 표적 항원은 erbB2 (HER2)이고, 이중특이적 항체는 퍼투주맵 및 트라스투주맵 항원-결합 부위를 조합한다. 또 다른 실시양태에서, 표적 항원은 erbB1 (EGFR)이고, 이중특이적 항체는 잘루투주맵 및 니모투주맵 항원-결합 부위를 조합한다.

[0253] 이중특이적 항체는 또한 이펙터 메카니즘을 질환 연관 조직, 예를 들어, 종양으로 재표적화하기 위한 매개자로서 사용될 수 있다. 따라서, 추가의 실시양태에서, 상기 제1 또는 상기 제2 에피토프는 종양 세포, 예컨대 종양 세포 단백질 또는 종양 세포 탄수화물 상에 위치하고, 다른 에피토프는 이펙터 세포 상에 위치한다.

[0254] 한 실시양태에서, 이펙터 세포는 T 세포이다.

[0255] 이펙터 세포 상의 가능한 표적은 다음을 포함한다: FcγRI (CD64): 단핵구 및 대식세포 및 활성화된 호중구 상에서 발현됨; FcγRIII (CD16): 천연 킬러 및 대식세포 상에서 발현됨; CD3: 순환 T 세포 상에서 발현됨; CD89: PMN (다형핵 호중구), 호산구, 단핵구 및 대식세포 상에서 발현됨; CD32a: 대식세포, 호중구, 호산구 상에서 발현됨; FcεRI: 호염기구 및 비만 세포 상에서 발현됨. 한 실시양태에서, 에피토프는 T 세포 상에서 발현되는 CD3 상에 위치한다.

[0256] 또 다른 실시양태에서, 제1 항체는 병원성 미생물에 대한 결합 특이성을 갖고, 제2 항체는 이펙터 세포 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD40, CD25, CD28, CD16, CD89, CD32, CD64, FcεRI 또는 CD1에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0257] 또한, 이중특이적 항체는 화학치료제를 화학치료제가 작용하여야 하는 세포에 보다 특이적으로 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 동종이량체 단백질 중의 하나는 소분자 또는 작은 펩티드를 인식하는 항체이거나, 또는 예를 들어 문헌 [Rader et al., (2003) PNAS 100: 5396]에 기재된 원칙에 따라 상기 분자와 공유 결합을 형성할 수 있다. 본 발명의 방법의 추가의 실시양태에서, 제1 항체는 종양 세포 또는 종양 세포 표면 단백질, 예컨대 erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, EGFR3vIII, CEA, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, EPCAM, c-Met, AXL, L1-CAM, 조직 인자, CD74 또는 CXCR5에 대한 결합 특이성을 갖고 (즉, 이들 상의 에피토프에 결합한다), 제2 항체는 화학치료제, 예컨대 독소 (방사성 표지된 펩티드 포함), 약물 또는 전구약물에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0258] 이중특이적 항체는 또한 독소, 약물 또는 전구약물을 함유하는 세포, 예를 들어, 전자 고밀도 (electron dense) 세포, 또는 미니세포 (minicell)를 종양에 대해 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [MacDiarmid et al. (2009) Nature Biotech 27: 643]을 참조한다. 미니세포는 염색체 DNA를 함유하지 않는, 비정상적인 세포 분열의 생성물인 무염색체 (achromosomal) 세포이다. 따라서, 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 또는 상기 제2 에피토프가 종양 세포, 예컨대 종양 세포 단백질 또는 종양 세포 탄수화물 상에 위치하고, 다른 에피토프는 전자 고밀도 세포 또는 미니세포 상에 위치한다.

[0259] 또한, 항체의 혈청 반감기는 혈청 단백질에 대한 결합 특이성을 이중특이적 항체에 포함시킴으로써 변경될 수 있다. 예를 들어, 혈청 반감기는 혈청 알부민에 대한 결합 특이성을 이중특이적 항체에 포함시킴으로써 연장될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법의 추가의 실시양태에서, 제1 항체는 종양 세포 또는 종양 세포 단백질, 예컨대 erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), CD74, EpCAM 또는 MRP3, CEA에 대한 결합 특이성을 갖고, 제2 항체는 혈청 단백질, 예컨대 혈청 알부민에 대한 결합 특이성을 갖는다. 제2 결합 특이성은 또한 항체를 특이적 조직, 예컨대 중추신경계 또는 뇌 (혈액 뇌 장벽을 가로질러)에 대해 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법의 추가의 실시양태에서, 제1 항체

는 뇌-특이적 표적, 예컨대 아밀로이드-베타 (예를 들어, 알츠하이머병 치료를 위해), Her-2 (예를 들어, 뇌에서 유방암 전이의 치료를 위해), EGFR (예를 들어, 원발성 뇌암의 치료를 위해), Nogo A (예를 들어, 뇌 손상의 치료를 위해), TRAIL (예를 들어, HIV의 치료를 위해), 알파-시누클레인 (예를 들어, 파킨슨병의 치료를 위해), Htt (예를 들어, 헌팅턴 (Huntington) 병의 치료를 위해), 프리온 (예를 들어, 광우병의 치료를 위해), 웨스트나일 (West Nile) 바이러스 단백질에 대한 결합 특이성을 갖고, 제2 항체는 혈액 뇌 장벽 단백질, 예컨대 트랜스페린 수용체 (TfR), 인슐린 수용체, 멜라노트랜스페린 수용체 (MTfR), 락토페린 수용체 (LfR), 아포지단백질 E 수용체 2 (ApoER2), LDL-수용체-관련 단백질 1 및 2 (LRP1 및 LRP2), 진행성 글리코실화 최종-생성물에 대한 수용체 (RAGE), 디프테리아 독소-수용체 = 헤파린-결합 표피 성장 인자-유사 성장 인자 (DTR = HB-EGF), gp190 (Abbott et al., Neurobiology of Disease 37 (2010) 13-25)에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0260] 혈액 뇌 장벽 단백질에 대한 결합 특이성은 또한 또 다른 비-항체 분자를 특이적 조직, 예컨대 중추신경계 또는 뇌 (혈액 뇌 장벽을 가로질러)에 대해 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 추가의 실시양태에서, 동종이량체 단백질 중의 하나는 혈액 뇌 장벽 단백질 (예컨대 TfR, 인슐린 수용체, MTfR, LfR, ApoER2, LRP1, LRP2, RAGE, DTR (= HB-EGF) 또는 gp190)에 대한 결합 특이성을 갖는 전장 항체이고, 다른 동종이량체 단백질은 또 다른 단백질, 예컨대 시토카인, 가용성 수용체 또는 다른 단백질, 예를 들어, VIP (혈관작용성 장 펩티드), BDNF (뇌-유래 신경친화성 (neurotrophic) 인자), FGF (섬유모세포 성장 인자), 다중 FGF, EGF (표피 성장 인자), PNA (펩티드 핵산), NGF (신경 성장 인자), 뉴로트로핀 (NT)-3, NT-4/5, 신경교 유래 신경친화성 인자, 섬모 신경친화성 인자, 뉴르투린, 뉴레굴린, 인터류킨, 전환 성장 인자 (TGF)-알파, TGF-베타, 에리트로포이에틴, 간세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 아르테민, 페르세핀, 네트린, 카디오트로핀-1, 줄기 세포 인자, 미드킨, 플레이오토로핀, 골 형성 단백질, 사포신, 세마포린, 백혈구 억제 인자, 알파-L-이두로니다제, 이두로네이트-2-술포타제, N-아세틸-갈락토사민-6-술포타제, 아릴술포타제 B, 산 알파-글루코시다제, 또는 스펅고미엘리나제에 N- 또는 C-말단에서 연결된 Fc 영역이다 ([Pardridge, Biopharmaceutical drug targeting to the brain, Journal of Drug Targeting 2010, 1-11]; [Pardridge, Re-engineering Biopharmaceuticals for delivery to brain with molecular Trojan horses. Bioconjugate Chemistry 2008, 19: 1327-1338]).

[0261] 또한, 제2 결합 특이성은 혈액 응고 인자를 특정 요구되는 특정 작용 부위에 대해 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 종양 세포에 대한 제1 결합 특이성 및 혈액 응고 인자에 대한 제2 결합 특이성을 갖는 이중 특이적 항체는 종양에 대해 혈액 응고를 유도하고, 따라서 종양 성장을 정지시킨다. 따라서, 본 발명의 방법의 추가의 실시양태에서, 제1 항체는 종양 세포 또는 종양 세포 단백질, 예컨대 erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4 또는 CXCR5에 대한 결합 특이성을 갖고, 제2 항체는 혈액 응고에 관여하는 단백질, 예컨대 조직 인자에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0262] 추가의 특히 흥미로운 결합 특이성 조합은 다음을 포함한다: CD3 + HER2, CD3 + CD20, IL-12 + IL18, IL-1a + IL-1b, VEGF + EGFR, EpCAM + CD3, GD2 + CD3, GD3 + CD3, HER2 + CD64, EGFR + CD64, CD30 + CD16, NG2 + CD28, HER2 + HER3, CD20 + CD28, HER2 + CD16, Bc12 + CD3, CD19 + CD3, CEA + CD3, EGFR + CD3, IgE + CD3, EphA2 + CD3, CD33 + CD3, MCSP + CD3, PSMA + CD3, TF + CD3, CD19 + CD16, CD19 + CD16a, CD30 + CD16a, CEA + HSG, CD20 + HSG, MUC1 + HSG, CD20 + CD22, HLA-DR + CD79, PDGFR + VEGF, IL17a + IL23, CD32b + CD25, CD20 + CD38, HER2 + AXL, CD89 + HLA 클래스 II, CD38+CD138, TF + cMet, Her2 + EpCAM, HER2 + HER2, EGFR + EGFR, EGFR + c-Met, c-Met + 비-결합 아암 및 G-단백질 커플링된 수용체의 조합.

[0263] 추가의 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 본질적으로 문헌 [Taylor et al. J. Immunol. 158: 842-850 (1997)] 및 [Taylor and Ferguson, J. Hematother. 4:357-362, 1995]에 기재된 바와 같이 적혈구를 표적화함으로써 순환계로부터 병원체, 병원성 자가항체 또는 해로운 화합물, 예컨대 독 및 독소를 청소하기 위해 사용될 수 있다. 상기 제1 에피토프는 적혈구 보체 수용체 1을 포함하고 이로 제한되지 않는 적혈구 (red blood cell) 단백질 상에 위치하고, 상기 제2 에피토프는 클리어런스를 위해 표적화되는 화합물 또는 유기체 상에 위치할 수 있다.

[0264] 추가의 실시양태에서, 제2 Fab-아암은 자가항원 또는 dsDNA와 같은 자가항원을 부착하기 위한 접합 부위를 제시하는 융합 단백질을 포함한다. 본 발명의 이중특이적 항체에 의한 병원체, 자가항체 또는 해로운 화합물의 표적화, 이어서 적혈구-매개 청소는 따라서 다양한 질환 및 증후군의 치료에서 치료적 유용성을 갖는다.

[0265] **접합**

[0266] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 동종이량체 단백질은 독소 (방사성동위원소 포함), 전구약물 또는 약물로 이루어진 군 중에서 선택된 화합물에 연결된다. 상기 화합물은 예를 들어 암 요법에서 표적 세포

의 사멸을 보다 효과적으로 만들 수 있다. 생성되는 이중이량체 단백질은 따라서 면역접합체이다. 화합물은 별도로 생성되는 이중이량체 단백질에, 즉 Fab-아암 교환이 발생한 후에 커플링될 수 있다.

[0267] 본 발명의 면역접합체 형성에 적합한 화합물은 탁솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뮴 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로-테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 퓨로마이신, 항대사물질 (예컨대, 메토크세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 히드록시우레아, 아스파라기나제, 겐시타빈, 클라드리빈), 알킬화제 (예컨대, 메클로레타민, 티오에파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부솔판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진 (DTIC), 프로카르바진, 미토마이신 C, 시스플라틴 및 다른 백금 유도체, 예를 들어 카르보플라틴), 항생제 (예컨대, 닥티노마이신 (이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 다우노루비신 (이전의 다우노마이신), 독소루비신, 이다루비신, 미트라마이신, 미토마이신, 미톡산트론, 플리카마이신, 안트라마이신 (AMC)), 디프테리아 독소 및 관련 분자 (예컨대, 디프테리아 A 사슬 및 그의 활성 단편 및 혼성체 (hybrid) 분자), 리신 독소 (예컨대, 리신 A 또는 탈글리코실화 리신 A 사슬 독소), 콜레라 독소, 시가 (Shiga)-유사 독소 (SLT-I, SLT-II, SLT-IIIV), LT 독소, C3 독소, 시가 독소, 백일해 독소, 파상풍 독소, 대두 보우만-버크 (Bowman-Birk) 프로테아제 억제제, 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 외독소, 알로린, 사포린, 모데신, 겐라닌, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스 (*saponaria officinalis*) 억제제, 겐로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신 및 에노마이신 독소를 포함한다. 다른 적합한 접합된 분자는 리보뉴클레아제 (RNase), DNase I, 스타필로코쿠스 장독소-A, 역새폴 항바이러스 단백질, 디프테린 독소, 및 슈도모나스 내독소, 메이탄시노이드, 오리스타틴 (MMAE, MMAF), 칼리케이아미신 및 듀오카르마이신 유사체 (Ducry and Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21: 5-13), 돌로스타틴-10, 돌로스타틴-15, 이리노테칸 또는 그의 활성 대사물질 SN38, 피롤로벤조디아제핀 (PBD)을 포함한다.

[0268] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 동종이량체 단백질은 토폴-227, 라뎀-223, 비스무트-212, 및 악티늄-225를 포함하고 이로 제한되지 않는 알파 방출체에 연결된다.

[0269] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 동종이량체 단백질은 아이오뎀-313, 이트륨-90, 플루오린-18, 레늄-186, 갈륨-68, 테크네튬-99, 인듐-111, 및 루테튬-177을 포함하고 이로 제한되지 않는 베타 방출 방사성 핵종에 연결된다.

[0270] 또 다른 실시양태에서, 접합되는 화합물은 핵산 또는 핵산-회합 분자를 포함한다. 본 발명의 상기 한 측면에서, 접합되는 핵산은 세포독성 리보뉴클레아제, 안티센스 핵산, 억제성 RNA 분자 (예를 들어, siRNA 분자) 또는 면역자극성 핵산 (예를 들어, 면역자극성 CpG 모티프-함유 DNA 분자)이다.

[0271] 문헌 [Hunter et al., Nature 144, 945 (1962)], [David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974)], [Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)] 및 [Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)]에 기재된 방법을 비롯하여 당업계에 공지된 임의의 접합 방법이 사용될 수 있다. 접합체는 다른 모이어티를 단백질의 N-말단측 또는 C-말단측에 화학적으로 접합시킴으로써 생산될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)] 참조). 상기 접합된 항체 유도체는 또한 적절한 경우 내부 잔기 또는 당에서의 접합에 의해 생성될 수 있다. 이 작용제는 본 발명의 단백질에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 제2 작용제의 간접 커플링의 일례는 스페이서 모이어티에 의한 커플링이다. 약물-접합체에 대한 연결 기술은 최근에 문헌 [Ducry and Stump (2010) Bioconjugate Chem. 21:5]에 요약되었다.

[0272] 조성물 및 용도

[0273] 추가의 주요 측면에서, 본 발명은 본원에서 기재된 바와 같은 본 발명에 따른 이중이량체 단백질 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0274] 제약 조성물은 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에 개시된 것과 같은 통상적인 기술에 따라 제제화될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 예를 들어 희석제, 충전제, 염, 완충제, 세제 (예컨대, 비이온성 세제, 예를 들어 트윈 (Tween)-20 또는 트윈-80), 안정화제 (예컨대, 당 또는 단백질-유리 아미노산), 보존제, 조직 고정제, 가용화제 및/또는

제약 조성물에 포함시키기에 적합한 다른 물질을 포함할 수 있다.

- [0275] 제약상 허용되는 담체는 본 발명의 화합물과 생리학상 상용성인 임의의 모든 적합한 용매, 분산 매질, 코팅, 항 박테리아 및 항진균제, 등장화제, 항산화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 에탄올, 텍스트로스, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜)을 포함한다. 제약상 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 적절한 유통성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0276] 또한, 본 발명의 제약 조성물은 제약상 허용되는 항산화제, 예를 들어 (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 지용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트화제, 예를 들어 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 또한 포함할 수 있다.
- [0277] 본 발명의 제약 조성물은 조성물 내에 등장화제, 예컨대 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 또는 염화나트륨을 또한 포함할 수 있다.
- [0278] 본 발명의 제약 조성물은 제약 조성물의 저장 수명 또는 유효성을 향상시킬 수 있는, 선택된 투여 경로에 적절한 하나 이상의 보조제, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제, 분산제, 보존제 또는 완충제를 또한 함유할 수 있다. 본 발명의 화합물은 임플란트, 경피 패치 및 미세캡슐화된 전달계를 포함한 제어 방출 제형과 같은, 신속한 방출에 대해 화합물을 보호할 담체를 사용하여 제조할 수 있다. 그러한 담체는 젤라틴, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 디스테아레이트, 생분해성의 생체적합성 중합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안히드라이드 (polyanhydride), 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산을 단독으로 또는 왁스와 함께, 또는 당업계에 공지된 다른 물질을 포함할 수 있다. 그러한 제제의 제조 방법은 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다.
- [0279] 멸균 주사가능 용액은 요구되는 양의 활성 화합물을 적절한 용매 내에, 요구되는 경우에 상기 열거된 성분 중 하나 또는 이들의 조합물과 함께 혼입한 후 멸균 미세여과하여 제조할 수 있다.
- [0280] 제약 조성물 내의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 없으면서 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 목적하는 치료 반응을 달성하기 위해 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위해 변화될 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료 지속 기간, 사용되는 특정 조성물과 조합 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강 및 사전 의료력, 및 의학 분야에 잘 공지된 기타 인자와 같은 다양한 약동학 인자에 따라 결정될 것이다.
- [0281] 제약 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 비경구로 투여된다. "비경구로 투여되는"은 본원에서 사용될 때 장관 및 국소 투여 이외의 다른 투여 방식, 대체로 주사에 의한 것을 의미하고, 표피, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 낭내, 안와내, 심장내, 피부내, 복강내, 건내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 낭하, 거미막하, 척수내, 두개내, 흉곽내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0282] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입에 의해 투여된다.
- [0283] 주요 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 본 발명에 따른 이종이량체 단백질, 예컨대 본 발명에 따른 이종특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명의 이종이량체 단백질은 많은 목적을 위해 사용될 수 있다. 특히, 상기 설명한 바와 같이, 본 발명의 이종이량체 단백질은 전이암 및 불응성 암을 비롯한 다양한 형태의 암의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0284] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 본 발명에 따른 이종이량체 단백질을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 종양 세포의 성장 및/또는 증식을 억제하고/하거나 종양 세포를 사멸시키는 방법에 관한 것이다.
- [0285] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이종이량체 단백질은 면역 및 자가면역 질환, 염증성 질환, 감염성 질환, 심혈관 질환, CNS 및 근골격 질환의 치료를 위해 사용된다.

- [0286] 상기 치료 및 사용 방법에서 투여 요법은 최적의 목적하는 반응 (예컨대, 치료 반응)을 제공하기 위해 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스를 투여할 수 있거나, 몇몇 분할 용량을 일정 시간에 걸쳐 투여할 수 있거나, 치료 상황의 응급성에 따라 용량을 비례적으로 감소 또는 증가시킬 수 있다.
- [0287] 이종이량체 단백질에 대한 효율적인 투여량 및 투여 요법은 치료할 질환 또는 병태에 의존적이고 당업자가 결정할 수 있다. 본 발명의 이종특이적 항체의 치료 유효량에 대한 예시적인 비-제한적 범위는 약 0.1-100 mg/kg, 예컨대 약 0.1-50 mg/kg, 예를 들어 약 0.1-20 mg/kg, 예컨대 약 0.1-10 mg/kg, 예를 들어 약 0.5, 예컨대 약 0.3, 약 1, 약 3, 약 5, 또는 약 8 mg/kg이다.
- [0288] 당업계의 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사는 요구되는 제약 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 제약 조성물에서 사용되는 이종이량체 단백질의 용량을 목적하는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것보다 더 낮은 수준에서 시작하여 목적하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적합한 일일 용량은 치료 효과를 생성하기 위해 효과적인 최저 용량인 화합물의 양일 것이다. 투여는 예를 들어 비경구, 예컨대 정맥내, 근육내 또는 피하 투여될 수 있다.
- [0289] 본 발명의 이종이량체 단백질은 또한 질환, 예컨대 암 발병 위험을 감소시키고/시키거나, 질환 진행에서 사건 발현의 발생을 지연시키고/시키거나 질환, 예컨대 암이 관해 상태일 때 재발 위험을 감소시키기 위해 예방 목적으로 투여될 수 있다.
- [0290] 본 발명의 이종이량체 단백질, 예컨대 이종특이적 항체는 또한 조합 요법으로, 즉, 치료할 질환 또는 병태에 관련된 다른 치료제와 조합으로 투여될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 이종이량체 단백질-함유 의약은 하나 이상의 추가의 치료제, 예컨대 세포독성제, 화학요법제 또는 항-혈관신생제와 조합하기 위한 것이다. 그러한 조합 투여는 동시, 별개 또는 순차적일 수 있다. 추가의 실시양태에서, 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명의 이종이량체 단백질, 예컨대 이종특이적 항체를 방사선 치료 및/또는 수술과 조합하여 그를 필요로 하는 대상 체에게 투여하는 것을 포함하는, 질환, 예컨대 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0291] 본 발명의 이종이량체 단백질, 예컨대 이종특이적 항체는 또한 진단 목적을 위해 사용될 수 있다.
- [0292] **실시예**
- [0293] **실시예 1: 인간 IgG1-2F8 및 IgG1-7D8의 발현을 위한 발현 벡터**
- [0294] HuMab 2F8 (WO 02/100348) 및 HuMab 7D8 (WO 04/035607)의 VH 및 VL 코딩 영역을 인간 IgG1 중쇄의 생산을 위해 발현 벡터 pConG1f (인간 IgG1f 동종이형 불변 영역의 게놈 서열을 함유함 (론자 바이올로지스 (Lonza Biologics)) 및 카파 경쇄의 생산을 위해 pConKappa (인간 카파 경쇄 불변 영역을 함유함, 론자 바이올로지스) 내에 클로닝하였다. IgG4 항체에 대해, VH 영역은 pTomG4 벡터 (pEE12.4 벡터 내에 인간 IgG4 불변 영역의 게놈 서열을 함유함 (론자 바이올로지스)) 내에 삽입되었다. 별법으로, 후속 구축물에서, pEE12.4 벡터 내에 중쇄의 완전 코돈-최적화된 코딩 영역 (IgG1 또는 IgG4) 또는 pEE6.4 벡터 내에 HuMab 2F8 또는 HuMab 7D8의 인간 카파 경쇄를 함유하는 벡터 (론자 바이올로지스)를 사용하였다.
- [0295] **실시예 2: 힌지-결실-IgG1-2F8, 및 특이적 돌연변이를 함유한 인간 IgG1 및 IgG4 CH2-CH3 단편의 발현을 위한 발현 벡터**
- [0296] 항체 중쇄의 힌지 및 CH3 영역 내에 돌연변이를 도입하기 위해, 퀵체인지 (Quickchange) 부위-지정 돌연변이 유발 키트 (스트라타젠 (Stratagene, 미국 캘리포니아주 라 줄라))를 제조자의 권장사항에 따라 사용하였다. 별법으로, 구축물을 완전 합성하거나, VH 영역을 이미 치환을 코딩하는 특이적 아미노산을 함유하는 벡터 내에 클로닝하였다.
- [0297] CH2 및 CH3 단편을 코딩하는 구축물을 PCR에 의해 제작하거나, 완전 코돈 최적화되도록 합성하였다. 이들 구축물은 N-말단 신호 펩티드 및 6 아미노산 His 태그를 갖고, 인간 IgG1/4 불변 영역의 아미노산 341-447을 함유하였다. 구축물을 pEE12.4 내에 클로닝하였다.
- [0298] 힌지-결실-IgG1 (Uni-G1) 분자를 제작하기 위해, EGFR 특이성을 가진 인간 IgG1 이소형에 대한 Uni-G1 포맷을 코딩하는 합성 DNA 구축물을 제조하였다. 상기 구축물에서, 천연 힌지 영역 (힌지 엑손에 의해 규정된 바와 같이)은 결실되었다. 상기 아형 내에서 HC 및 LC 사슬 사이의 Cys 결합을 회복하기 위해 IgG1 구축물 내에 위치 158에서 추가의 Ser에서 Cys 돌연변이를 만들었다. 단백질 서열을 아래에 제시한다. 구축물을 pEE6.4 벡터 내

에 삽입하고, pHG1-2F8로 명명하였다.

QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDGGSYKYYG
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVT
 SSASTKGPVFLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGL
 YLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

[0299]

[0300] 실시예 3: 붉은털원숭이 IgG4-2F8 및 IgG4-7D8의 발현을 위한 발현 벡터

[0301]

IgG4 중쇄 및 카파 경쇄 차이니즈 붉은털원숭이, 및 Humab 2F8 및 7D8의 VH 및 VL 영역을 위한 코딩 영역을 함유하는 벡터를 합성하고, 완전 코돈-최적화하고, pEE12.4 (중쇄) 및 pEE6.4 (경쇄) 내에 삽입하였다. 사용된 중쇄 불변 영역 서열 (문헌 [Scinicariello et al., Immunology 111: 66-74, 2004]에 기재된 서열에 기초함)은 다음과 같았다 (인간 서열에 대해 정렬됨):

인간 IgG4 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 붉은털원숭이 (Ch) IgG4 -STKGPSVFPLASCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

인간 IgG4 TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYTCNVHDKPSNTKVDKRVESKYG
 붉은털원숭이 (Ch) IgG4 TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYVCNVVHEPSNTKVDKRVVEFT--

인간 IgG4 PPCPSCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEV
 붉은털원숭이 (Ch) IgG4 PPCPACPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEV

인간 IgG4 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 붉은털원숭이 (Ch) IgG4 QFNWYVDGAEVHHAQTKPRERQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYTCKV

인간 IgG4 SNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
 붉은털원숭이 (Ch) IgG4 SNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYILPPPEELTKNQVSLTCLVTGFY

[0302]

인간 IgG4 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
 붉은털원숭이 (Ch) IgG4 PSDIAVEWESNGQPENYKTTTPVLDSDGSYLLYSKLTVNKSRWQPGNIF

인간 IgG4 SCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK
 붉은털원숭이 (Ch) IgG4 TCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0303]

[0304] 사용된 붉은털원숭이 경쇄 불변 영역 (CL) 서열은 다음과 같았다:

AVAAPSVFIFPPSEDQVKSGTVSVVCLLNFPREASVKWKVDGVLKGTGNSQESVTEQDSKDN
 TYSLSSTLTLSSDYQSHNVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0305]

[0306] 실시예 4: HEK-293F 세포 내에서 일시적 발현에 의한 항체 생산

[0307]

제조자의 지시에 따라 293펙틴(293fectin) (인비트로젠 (Invitrogen))을 사용하여 HEK-293F 세포 (인비트로젠) 내에서 관련된 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 동시형질감염함으로써 무혈청 조건 하에 항체를 생산하였다.

[0308]

[0309] 실시예 5: IgG1 및 IgG4 항체의 정제

[0309]

IgG1 및 IgG4 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 세포 배양 상청액을 0.20 μM 전량 (dead-end) 필터 상에서 여과한 후, 5 ml 단백질 A 칼럼 (r프로테인(rProtein) A FF, 지이 헬스케어 (GE Healthcare, 스웨덴 웁살라)) 상에 로딩하고, IgG를 0.1 M 시트르산-NaOH (pH 3)으로 용리하였다. 용리액을 2 M 트리스(Tris)-HCl (pH 9)로 즉시 중화시키고, 12.6 mM 인산나트륨, 140 mM NaCl (pH 7.4) (비. 브라운 (B. Braun, 네덜란드 오스)) 내로 밤새 투석하였다. 투석 후에, 샘플을 0.20 μM 전량 필터 위로 멸균 여과하였다. 정제된 IgG의 농도는 혼탁법 및 280 nm에서 흡광도에 의해 결정하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE, IEF, 질량 분광측정법 및 당분석에 의해 분석하였다.

[0310] 실시예 6: CH2-CH3 단편의 정제

[0311] His-태깅된 CH2-CH3 단백질을 고정된 금속 이온 (Ni^{2+}) 친화도 크로마토그래피 (마세레이-나겔 (Macherey-Nagel GmbH, 독일 뒤렌))에 의해 정제하고, PBS로 평형화시킨 PD-10 칼럼 (지이 헬스케어)을 이용하여 탈염하고, 0.2 μM 전량 필터 위에서 멸균 여과하였다. 정제된 단백질의 농도를 280 nm에서 흡광도에 의해 결정하였다. 정제된 단백질의 품질은 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.

[0312] 실시예 7: 인간 및 붉은털원숭이 IgG4 항체 사이에서 GSH-유도된 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성

[0313] 상기 언급한 바와 같이, WO 2008119353 (젠맵)에서는 이중특이적 항체를 생산하기 위한 시험관내 방법을 설명하고 있고, 여기서 이중특이적 항체는 환원 조건 하에 인큐베이션시에 2개의 단일특이적 IgG4- 또는 IgG4-유사 항체 사이의 "Fab-아암" 또는 "1/2-분자" 교환 (중쇄 및 부착된 경쇄의 교환 (swapping))에 의해 형성된다. 상기 Fab-아암 교환 반응은 디설피드-결합 이성질체화 반응의 결과이고, 여기서 단일특이적 항체의 힌지 영역 내의 중쇄간 디설피드 결합은 환원되고, 생성되는 유리 시스템은 상이한 특이성을 가진 또 다른 항체 분자의 시스템인 잔기와 새로운 중쇄간 디설피드 결합을 형성한다. 생성되는 생성물은 상이한 서열을 갖는 2개의 Fab 아암을 가진 이중특이적 항체이다.

[0314] 인간 및 붉은털원숭이 igG4 항체 사이의 Fab-아암 교환에 대해 시험하기 위해, 인간 IgG4-2F8 (항-EGFR), 인간 IgG4-7D8 (항-CD20), 붉은털원숭이 IgG4-2F8 및 붉은털원숭이 IgG4-7D8을 사용하여 2개의 항체의 모든 가능한 조합물을 제조하였다. 시험관내 Fab-아암 교환을 위해, 0.5 mM 환원된 글루타티온 (GSH)과 함께 0.5 ml PBS 내에 각각의 항체를 4 $\mu g/ml$ 의 최종 농도로 함유하는 항체 혼합물을 37°C에서 24h 동안 인큐베이션하였다. 환원 반응을 중지시키기 위해, 0.5 ml PBS/0.05% 트윈 20 (PBST)을 반응 혼합물에 첨가하였다.

[0315] 이중특이적 항체의 존재는 샌드위치 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 이용하는 이중특이적 결합의 결정에 의해 시험하였다. ELISA 플레이트 (그라이너 바이오-원 (Greiner bio-one, 독일 프릭켄하우젠))를 4°C에서 PBS 내의 2 $\mu g/ml$ (100 $\mu l/웰$)의 EGFR의 재조합 세포외 도메인으로 밤새 코팅하였다. 플레이트를 PBST로 1회 세척하였다. PBST/0.2% BSA (PBSTB) 내의 항체 샘플의 연속 희석액 (3배 희석액 내의 0-1 $\mu g/ml$)을 코팅된 ELISA 플레이트 (100 $\mu l/웰$)로 옮기고, 실온 (RT)에서 60 min 동안 플레이트 진탕기 (300 rpm)에서 인큐베이션하였다. 샘플을 폐기하고, 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20 (PBST)로 1회 세척하였다. 이어서, 플레이트를 60 min 동안 PBSTB (100 $\mu l/웰$) 내의 2 $\mu g/ml$ 마우스 항-이디오타입 (idiotypic) 모노클로날 항체 2F2 SAB1.1 (7D8에 대해 작용함; 젠맵)와 함께 플레이트 진탕기 (300 rpm)에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20 (PBST)로 1회 세척하였다. 이어서, 플레이트를 60 min 동안 RT에서 PBSTB (100 $\mu l/웰$) 내의 HRP-접합된 염소 항-마우스 IgG (15G; 잭슨 이뮤노리써치 래보라토리즈 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 미국 펜실베이니아주 웨스트그로브); 1:5,000)와 함께 플레이트 진탕기 (300 rpm)에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20 (PBST)로 1회 세척하였다. ABTS (50 mg/ml; 로슈 다이아그노스틱스 게엠베하 (Roche Diagnostics GmbH, 독일 만하임))를 첨가하고 (100 $\mu l/웰$), 차광하여 30 min 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 반응을 2% 옥살산 (100 $\mu l/웰$; 리델 데 헨 (Riedel de Haen, 독일 켈제))으로 중지시켰다. RT에서 10 min 후에, 405 nm에서 흡광도를 ELISA 플레이트 판독기에서 측정하였다.

[0316] 도 1은 인간 및 붉은털원숭이 IgG4의 조합이 동일한 종의 각각의 IgG4 분자의 조합의 조합에 비해 보다 높은 이중특이적 결합 (보다 높은 OD 405 nm)을 생성함을 보여준다. 상기 데이터는 Fab-아암 교환이 인간 IgG4와 붉은털원숭이 IgG4 사이에서 발생함을 보여준다. 또한, 보다 높은 이중특이적 결합은 인간 IgG4 1/2 분자가 붉은털원숭이 IgG4 1/2 분자에 대한 우선적인 이량체화 (이종이량체화)를 보이고, Fab-아암 교환 반응의 평형이 50% 이종이량체 및 50% 동종이량체의 확률적인 교환 대신에 이중특이적 이종이량체를 향해 이동함을 시사한다.

[0317] 실시예 8: 인간 및 붉은털원숭이 IgG4의 서열 분석

[0318] 항체가 Fab-아암 교환에 참여하는 능력은 단지 환원 환경이 활성화될 것만을 필요로 하는 소위 허용성 (permissive) (예를 들어 CPSC 함유-) 힌지 영역 이외에 제3 불변 도메인 (CH3)을 수반하는 것으로 설명되었다 (Van der Neut Kolfshoten, 2007, Science). 인간 항체의 경우, Fab-아암 교환은 CH3 도메인 내의 위치 409의 아르기닌 (R) 및 허용성 힌지 (226-CPSC-229)를 특징으로 하는, IgG4의 고유한 특징으로 밝혀졌다 (WO 2008145142 (젠맵) 참조). 이와 대조적으로, Fab-아암 교환에 참여하지 않는 인간 IgG1은 위치 409의 리신 (K) 및 안정한 (즉, 비-허용성) 힌지 (226-CPPC-229) (EU 넘버링, 또한 도 16 참조)를 갖는다.

[0319] 동일한 종의 IgG4 분자 사이의 Fab-아암 교환에 비해 증가된 인간 및 붉은털원숭이 IgG4 사이의 Fab-아암 교환을 규명하기 위한 시도에서, 인간 및 붉은털원숭이 항체 사이의 코어 힌지 및 CH3-CH3 계면 아미노산을 분석하

였다 (예를 들어, 인간 CH3-CH3 계면의 잔기의 개요에 대해서는 문헌 [Dall'Acqua, et al. (1998) Biochemistry 37:9266] 참조). 도 2는 차이니즈 붉은털원숭이 IgG4 내의 코어 힌지 서열은 226-CPAC-229이고, CH3 도메인은 위치 409에 리신 (K)을 함유함을 보여준다. 또한, 서열 정렬은 붉은털원숭이 IgG4가 다음과 같이 인간 IgG4에 비해 CH3-CH3 계면에 3개 더 많은 아미노산 치환을 특징으로 함을 보여주었다: 위치 350에서 붉은털원숭이의 이소류신 (I) 대 인간의 트레오닌 (T); 위치 370에서 붉은털원숭이의 트레오닌 (T) 대 인간의 리신 (K); 및 위치 405에서 붉은털원숭이에서 류신 (L) 대 인간의 페닐알라닌 (F).

[0320] 실시예 9: 인간 IgG4와 붉은털원숭이 IgG4 CH3 서열을 함유하는 인간 IgG1 사이의 GSH-유도 Fab-아암 교환을 사용한 이중특이적 항체의 생성

[0321] 인간 항체에 대해, Fab-아암 교환이 IgG1 분자에서 발생할 수 있도록 하기 위해, IgG1 코어 힌지 서열 (CPPC)을 P228S 치환에 의해 인간 IgG4 서열 (CPSC)로 교체하는 것은 효과가 없지만, CH3을 IgG4-유사 서열로 돌연변이시키는 것은 Fab-아암 교환 활성을 위해 필요함이 문헌에 기재되었다 (Van der Neut Kolfshoten, 2007, Science).

[0322] 실시예 7에서 설명된 인간 및 붉은털원숭이 IgG4 사이의 Fab-아암 교환을 기초로 하여, 차이니즈 붉은털원숭이 IgG4 CH3 서열이 Fab-아암 교환을 위해 인간 IgG1에 참여할 수 있는지를 분석하였다. 따라서, 힌지 서열 CPSC을 생성하는 P228S 돌연변이 이외에 삼중 돌연변이 T350I-K370T-F405L (이후에 ITL로 언급됨)을 인간 IgG1-2F8에 도입하였다. 인간 IgG1-2F8 돌연변이체를 시험관내 GSH-유도 Fab-아암 교환을 위해 인간 IgG4-7D8과 조합하였다. 각각의 항체를 0.5 ml PBS 내의 4 µg/ml의 최종 농도로 0.5 mM GSH와 함께 함유하는 항체 혼합물을 37°C에서 0-3-6-24h 동안 인큐베이션하였다. 환원 반응을 중지시키기 위해, 0.5 ml PBS/0.05% 트윈 20 (PBST)을 반응 혼합물에 첨가하였다. ELISA에서 이중특이적 결합의 측정은 실시예 7에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0323] 도 3은 CPSC 힌지 단독의 도입은 인간 IgG4-7D8과 조합될 때 GSH-유도 Fab-아암 교환을 위해 인간 IgG1-2F8에 참여하지 않음을 확인해준다. 또한, 야생형 IgG1 힌지를 보존하면서, 붉은털원숭이 IgG4-특이적 CH3 계면 아미노산 (ITL)의 인간 IgG1-2F8 내로의 도입은 상기 조건 하에서 인간 IgG4-7D8과 조합될 때 Fab-아암 교환을 위해 참여하지 않았다. 이와 대조적으로, 힌지 내의 CPSC 서열 및 붉은털원숭이 IgG4-특이적 CH3 계면 아미노산 (ITL)을 모두 보유하는 변이체 인간 IgG1-2F8 백본 서열은 2개의 인간 IgG4 항체에 비해 인간 IgG4-7D8을 사용한 GSH-유도 Fab-아암 교환 후에 증가된 이중특이적 결합을 보였다. 상기 데이터는 위치 350, 370 및 405에 각각 I, T 및 L을 함유하는 CH3 도메인과 조합된 CPSC-함유 힌지가 GSH-유도 Fab-아암 교환을 위해 인간 IgG1에 참여하기 위해 충분하고, 교환 반응의 평형은 인간 IgG4와 조합될 때 교환된 이중특이적 생성물을 향해 이동함을 보여준다.

[0324] 실시예 10: 인간 IgG4 및 IgG1 또는 IgG4 돌연변이체 사이의 생체내 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성

[0325] Fab-아암 교환 참여를 위해 필요한 특징을 추가로 확인하기 위해, 인간 IgG4 및 IgG1 변이체를 생체 내에서 분석하였다. 군당 4마리의 암컷 SCID 마우스 (찰스 리버 (Charles River, 네덜란드 마스트리히트))에게 300 µl의 총 부피에 600 µg 항체 (500 µg 7D8 + 100 µg 2F8)을 함유하는 항체 혼합물을 i.v. 주사하였다. 혈액 샘플을 주사 3, 24, 48 및 72시간 후에 복제 정맥으로부터 채취하였다. 혈액을 헤파린-함유 바이알에 모으고, 세포로부터 혈장을 분리하기 위해 10,000 g에서 5 min 동안 원심분리하였다. 이중특이적 항체의 생성 후에, 실시예 7에 기재된 바와 같이 PBSTB 내의 연속 희석 혈장 샘플을 사용하여 CD20 및 EGFR 이중특이적 반응성을 ELISA로 평가하였다. 참고물질로서 시험관 내에서 교환된 항체 혼합물을 사용하여 혈장 샘플 중의 이중특이적 항체를 비-선형 회귀 곡선-피팅 (fitting) (그래프패드 소프트웨어 (GraphPad 소프트웨어), 미국 캘리포니아주 샌디에고)에 의해 정량하였다.

[0326] 도 4는 힌지 또는 CH3 서열이 상응하는 인간 IgG1 서열 (각각 CPPC 또는 R409K)로 전환된 인간 IgG4-2F8이 생체 내에서 Fab-아암 교환에 더 이상 참여하지 않음을 보여준다. 역으로, 힌지 영역 및 CH3 계면 서열 둘 모두가 상응하는 인간 IgG4 서열 (CPSC 및 K409R)로 전환된 인간 IgG1은 생체 내에서 Fab-아암 교환에 참여할 수 있다. 상기 데이터는 위치 409에 아르기닌 (R)을 함유하는 CH3 도메인과 조합된 CPSC-함유 힌지 (위치 228에 S 존재)가 생체 내에서 인간 IgG1에 의한 Fab-아암 교환을 가능하게 하기에 충분함을 보여준다.

[0327] 실시예 11: 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성: 안정화된 힌지의 우회/붕괴

[0328] 2-메르캅토에틸아민 · HCl (2-MEA)은 중쇄와 경쇄 사이의 디설피드 결합을 보존하면서 항체의 힌지 영역 내의 디설피드 결합을 선택적으로 절단하는 것으로 설명된 약한 환원제이다. 따라서, 2-MEA의 일련의 농도는 CPSC 또

는 CPPC 힌지 영역을 함유하는 2개의 항체 사이의 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성을 유도하는 그의 능력에 대해 시험되었다. 각각의 항체를 0.5 mg/ml의 최종 농도로 함유하는 항체 혼합물을 37°C에서 90 min 동안 100 μ l TE의 총 부피 내의 2-MEA (0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 7.0, 10.0, 15.0, 25.0 및 40.0 mM)의 일련의 농도와 함께 인큐베이션하였다. 환원 반응을 중지시키기 위해, 환원제 2-MEA를 스핀 칼럼 (마이크로콘 (Microcon) 원심분리 필터, 30k, 밀리포어 (Millipore))을 제조사의 권장사항에 따라 사용하여 샘플을 탈염함으로써 제거하였다. 이중특이적 결합은 실시예 7에 기재된 바와 같이 ELISA로 측정하였다.

[0329] 2-MEA-유도 Fab-아암 교환을, CPSC 힌지 영역을 함유하고 GSH-유도 Fab-아암 교환에 참여하는 것으로 알려진 IgG4-2F8 x IgG4-7D8 조합, 및 안정화된 힌지 영역 때문에 GSH-유도 Fab-아암 교환에 참여하지 않는 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 조합 (실시예 9, 도 3에 제시된 바와 같은)에 대해 시험하였다. 놀랍게도, 2-MEA는 비-환원성 SDS-PAGE에 의해 결정시에 중쇄로부터 경쇄의 분리를 유도하는 것으로 밝혀졌다 (데이터 미제시). 그럼에도 불구하고, 기능적 이중특이적 항체는 도 5에 제시된 바와 같이 생성되었다. 야생형 인간 IgG4-2F8과 IgG4-7D8 사이의 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 결합의 최대 수준은 2.0 mM 2-MEA의 농도에서 도달하였고, 실시예 9에 기재된 바와 같이 0.5 mM GSH에서 도달한 수준과 대등하였다 (도 3). 그러나, 2-MEA는 용량-의존성 방식으로 인간 항체 IgG1-2F8-ITL과 IgG4-7D8-CPPC (안정화된 힌지 영역을 갖는) 사이의 Fab-아암 교환을 유도할 수 있었다. 아마도 두 항체의 힌지 영역 내의 CPPC 서열의 존재 때문에 이중특이적 항체가 낮은 2-MEA 농도에서 거의 또는 전혀 형성되지 않지만, 이중특이적 항체의 생성은 보다 높은 농도의 2-MEA에서 매우 효율적이었다. 최대 이중특이적 결합은 25 mM 2-MEA에서 도달하였고, 2개의 야생형 IgG4 항체 사이의 Fab-아암 교환 후의 최대 결합을 초과하였다. 상기 최대 결합 수준은 CPSC 힌지를 갖는 상응하는 항체 (IgG1-2F8-CPSC-ITL)의 GSH 처리에 대해 실시예 9 (도 3)에서 설명된 바와 대등하였다. IgG1-2F8-ITL 및 IgG4-7D8-CPPC 둘 모두는 CPPC 힌지를 함유하기 때문에, 상기 데이터는 2-MEA가 시험관내 Fab-아암 교환을 위한 CPSC 힌지의 필요성을 제거할 수 있음을 나타낸다.

[0330] **실시예 12: 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성 후의 질량 분광측정법**

[0331] 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성은 실시예 11에서 설명되었고, 여기서 이중특이적 결합은 ELISA에 의해 제시되었다 (도 5). 이중특이적 항체가 형성되었는지를 확인하기 위해, 샘플을 분자량을 결정하기 위해 전기분무 이온화 질량 분광측정법 (ESI-MS)에 의해 분석하였다. 먼저, 샘플을 200 μ g 항체를 180 μ l PBS 내의 0.005 U N-글리코시라제 (cat. no. GKE-5006D; 프로자임 (Prozyme))와 함께 37°C에서 밤새 인큐베이션함으로써 탈글리코실화시켰다. 샘플을 60°C에서 BEH300 C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm 칼럼을 사용하여 애퀴티 (Aquity) UPLC™ (워터스 (Waters, 미국 밀포드)) 상에서 탈염하고, MQ 물 (용리액 A) 및 0.05% 포름산 (플루카 디델-데 헨 (Fluka Riedel-de Haen, 독일 부크스))을 함유하는 LC-MS 등급 아세트니트릴 (용리액 B) (바이오솔브 (Biosolve, 네덜란드 팔켄스바르트))의 혼합물의 구배로 용리시켰다. 비행시간형 (time-of-flight) 전기분무 이온화 질량 스펙트럼을 양이온 모드로 작동하는 마이크로토프(micrOTOF)™ 질량 분광측정계 (브루커 (Bruker, 독일 브레넨))로 온라인으로 기록하였다. 분석 전에, 500-4000 m/z 스케일을 ES 튜닝 믹스 (tuning mix) (애질런트 테크놀로지스 (Agilent Technologies, 미국 산타 클라라))를 사용하여 보정하였다. 질량 스펙트럼은 데이터어널리시스 (DataAnalysis™) 소프트웨어 v. 3.4 (브루커, 독일 브레넨)가 제공된 맥시멀 엔트로피 (Maximal Entropy)를 사용하여 디컨볼루션 (deconvolution)하였다. 상기 실험에서 Fab-아암 교환에 사용되는 항체의 분자 질량을 기초로 하여, 이중특이적 항체는 본래의 항체와 구별될 수 있다 (또한 IgG1-2F8-ITLxIgG4-7D8-CPPC에 대해서는 실시예 15, 도 9c에 설명됨). 이중특이적 항체의 피크에 대해, 곡선하 면적을 결정하고, 각각의 샘플 내의 이중특이적 항체의 백분율을 계산하기 위해 곡선하 총 면적으로 나누었다. 도 6a는 0 mM 2-MEA (모 항체에 상응하는 2개의 피크), 7 mM 2-MEA (모 및 이중특이적 항체에 상응하는 3개의 피크), 및 40 mM 2-MEA (이중특이적 항체에 상응하는 1개의 피크)를 사용한, IgG1-2F8-ITL과 IgG4-7D8-CPPC 사이의 Fab-아암 교환의 3개의 대표적인 질량 분광측정 프로파일을 보여준다. 이중특이적 생성물의 균일한 피크는 하위 분할된 피크를 생성하는 경쇄 미스페이어링이 발생하지 않았음을 나타낸다. 정량된 데이터는 도 6b에 제시되고, IgG1-2F8-ITL과 IgG4-7D8-CPPC 사이의 Fab-아암 교환이 거의 100% 이중특이적 항체를 생성함을 보여준다. 이와 대조적으로, 야생형 IgG4 항체 사이의 Fab-아암 교환은 50% 미만의 이중특이적 생성물을 생성하였다. 이들 데이터는 실시예 11 (도 5)에 기재된 이중특이적 결합 ELISA로부터의 결과를 확인해준다.

[0332] **실시예 13: 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 안정성**

[0333] 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 안정성을 시험하였다. 따라서, 7.0 mM 2-MEA를 사용하여 IgG1-2F8-ITL 및 IgG4-7D8-CPPC로부터 생성된 2 μ g의 이중특이적 샘플 (실시예 11, 도 5에 기재됨)을, 2 μ g 이중특이적 시험 샘플에 비해 0, 1, 10, 50x 과량의 IgG4-MG를 나타내는 무관한 IgG4 (아세트

콜린 수용체에 대한 IgG4-MG)의 일련의 농도 (0, 2, 20, 100 μg)의 존재 하에 GSH-유도 Fab-아암 교환 반응에 사용하였다. 상기 반응에서 Fab-아암 교환은 이중특이적 EGFR/CD20 결합의 상실을 야기할 것이다. GSH 환원 반응의 조건은 실시예 7에 기재된 바와 동일하였다 (0.5 ml PBS/0.5 mM GSH 내에서 37°C에서 24h). 환원 반응을 중지시키기 위해, 0.5 ml PBSTB를 반응 혼합물에 첨가하였다. 이중특이적 결합은 실시예 7에 기재된 바와 같이 ELISA로 측정하였다. GSH 환원 반응 후에 이중특이적 결합은 100%로 설정된 출발 물질 (대조군)에서 측정된 이중특이적 결합에 대해 제시된다.

[0334] 도 7A는 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 유래 이중특이적 샘플에서 EGFR/CD20 이중특이적 결합이 무관한 IgG4의 존재 하에 GSH-유도 Fab-아암 교환 후에 유의하게 변화되지 않음을 보여준다. 이것은 이중특이적 생성물이 안정함을, 즉 GSH-유도 Fab-아암 교환에 참여하지 않음을 나타낸다. 대조군으로서, 도 7B는 IgG4-2F8 x IgG4-7D8 유래 샘플이 무관한 IgG4의 존재 하에 GSH-유도 Fab-아암 교환 후에 약화된 EGFR/CD20 이중특이적 결합을 보여주고, 이것은 상기 생성물이 안정하지 않음을 나타낸다. 상기 데이터는 CH3 도메인에 삼중 돌연변이 T350I-K370T-F405L을 함유하는 인간 IgG1 중쇄, 및 안정화된 힌지 (CPPC)를 생성하는 S228P 치환을 함유하는 인간 IgG4 중쇄로 이루어진 이중이량체가 안정함을 보여준다.

[0335] **실시예 14: 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 약동학 및 안정성에 대한 생체내 분석**

[0336] 모 항체 IgG1-2F8-ITL 및 IgG4-7D8-CPPC에 비해 그의 안정성 (생체내 Fab-아암 교환) 및 약동학적 특성 (혈장 클리어런스율)을 분석하기 위해 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 사이의 시험관내 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체를 SCID 마우스에 주사하였다. 3개의 마우스 군 (3마리의 마우스/군)에게 200 μl 의 정제된 항체를 꼬리 정맥에 정맥 내로 주사하였다: (1) 100 μg 이중특이적 항체; (2) 100 μg 이중특이적 항체 + 1,000 μg 무관한 IgG4 (나탈리주맙, 항- $\alpha 4$ -인테그린); (3) 50 μg IgG1-2F8-ITL + 50 μg IgG4-7D8-CPPC. 혈액 샘플 (50-100 μl)을 항체 투여 후에 소정의 시간 간격 (10 min, 3h, 1, 2, 7, 14, 21일)에서 볼에 구멍을 내어 수집하였다. 혈액을 헤파린 함유 바이알 내로 수집하고, 14,000 g에서 10 min 동안 원심분리하였다. 혈장을 추가의 분석 전에 -20°C에서 보관하였다.

[0337] 혈장 샘플 내의 총 IgG 농도를 ELISA에 의해 검정하였다. 계속되는 단계의 검정 조건은 실시예 7에서 설명된 ELISA에 대한 것과 동일하였다. 총 IgG 측정을 위해 사용된 특이적 화합물은 다음과 같았다: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 마우스 항-인간 IgG (클론 MH16-1; CLB; cat. no. M1268)의 코트; 혈청 샘플 희석액 (군 1 및 3에 대해 1:500 및 1:2,500) 및 (군 2에 대해 1:2,500 및 1:10,000); 접합체: HRP-접합된 염소 항-인간 IgG (클론 11H ; 잭슨; cat. no. 109-035-098; 1:10,000). 혈장 샘플 내의 이중특이적 항체의 존재는 실시예 10에 기재된 ELISA에서 CD20 및 EGFR 이중특이적 반응성에 의해 검정 및 정량하였다.

[0338] 도 8A는 총 항체 혈장 농도를 보여준다. 혈장 클리어런스 곡선이 형태는 모든 군에서 동일하였고, 이것은 이중특이적 항체의 혈장 클리어런스가 분석된 시간 간격에 걸쳐 모 항체 IgG1-2F8-ITL 및 IgG4-7D8-CPPC에 대해 동일함을 나타낸다. 도 8B는 시간에 따른 이중특이적 항체의 혈장 농도를 보여준다. 이중특이적 항체에 대한 10 배 과량의 무관한 IgG4의 투여는 이중특이적 항체 농도에 영향을 주지 않았고, 이것은 Fab-아암 교환이 생체 내에서 발생하지 않았음을 나타낸다. 모 항체 (IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC)의 주사 후에, 이중특이적 항체가 혈장에서 검출가능하지 않았고, 이를 통해 상기 항체가 생체 내에서 Fab-아암 교환에 참여하지 않음을 확인할 수 있다. 상기 데이터는 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 사이의 시험관내 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체 생성물은 생체 내에서 안정하고 (Fab-아암 교환 없음), 모 일가 항체와 대등한 약동학적 특성 (혈장 클리어런스율)을 보였음을 나타낸다.

[0339] **실시예 15: 2개의 항체 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 순도**

[0340] 인간 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체 배치를 PD-10 탈염 칼럼 (cat. no. 17-0851-01; 지이 헬스케어) 상에서 정제하였다. 이어서, 이중특이적 생성물의 순도를 나트륨 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE), 고성능 크기 배제 크로마토그래피 (HP-SEC) 및 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. 생성된 이중특이적 항체의 기능성은 ELISA에서 이중특이적 결합에 의해 확인하였다 (데이터 미제시).

[0341] SDS-PAGE를 샘플이 중성 pH에서 이동하는 변형된 램리 (Laemli) 방법 (Laemli 1970 Nature 227(5259): 680-5)을 사용하여 4-12% 누페이지(NuPAGE) 비스-트리스(Bis-Tris) 겔 (인비트로젠, 네덜란드 브레다) 상에서 환원 및 비-환원 조건 하에 수행하였다. SDS-PAGE 겔을 쿠마시 (Coomassie)로 염색하고, 진지니어스 (GeneGenius) (시놉틱스 (Synoptics, 영국 캠브리지))를 사용하여 디지털 영상을 찍었다. 도 9a는 Fab-아암 교환 후의 항체

샘플이 무손상 IgG로 이루어짐을, 비-환원된 겔 상에서 검출가능한 1/2 분자 (HIL1)의 흔적과 함께 보여준다 (도 9a-b).

[0342] HP-SEC 분획화를 TSK HP-SEC 칼럼 (G3000SW_{XL}; 토소 바이오사이언시스 (Toso Biosciences), 옴닐라보 (Omnilabo, 네덜란드 브레다)) 및 워터스 2487 듀얼 λ 흡광도 검출기 (워터스)에 연결된 워터스 얼라이언스 (Alliance) 2695 분리 유닛 (워터스, 네덜란드 에텐-루어)를 사용하여 수행하였다. 샘플은 1 ml/min로 이동하였다. 결과를엠펙워(Empower) 소프트웨어 버전 2002를 사용하여 처리하고, 총 피크 높이의 백분율로서 피크마다 표현하였다. 도 9b는 >98%의 샘플이 무손상 IgG로 이루어지고, 사실상 응집체가 형성되지 않음을 보여준다.

[0343] 질량 분광측정법을 실시예 12에 기재된 바와 같이 수행하였다. 도 9c는 출발 물질 IgG1-2F8-ITL 및 IgG4-7D8-CPPC, 및 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 사이의 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물의 질량 분광 측정 프로파일을 보여준다. Fab-아암 교환된 샘플 내의 생성물은 145,901 kDa이고, 이것은 IgG1-2F8-ITL (146,259.5/2=73,130) + IgG4-7D8-CPPC (145,542.0/2 = 72,771)로부터 유래한 이중특이적 생성물과 완벽하게 일치한다. 또한, 이중특이적 항체 생성물은 균일한 피크를 보였고, 이것은 하위 분할된 피크를 생성하는 경계 미스페이어링이 발생하지 않았음을 나타낸다. 상기 데이터는 Fab-아암 교환에 의해 100% 이중특이적 항체가 생성되었음을 보여준다. IgG4-7D8-CPPC 및 이중특이적 샘플의 주 피크 (K0) 이외에 검출된 작은 피크는 하나 (K1) 또는 2개의 (K2) C-말단 리신의 존재에 의한 것일 수 있다.

[0344] 이들 데이터는 약 100% 기능적 이중특이적 항체 샘플이 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성되었음을 보여준다.

[0345] **실시예 16: 인간 IgG1의 Fab-아암 교환 참여를 위한 T350I, K370T 및 F405L 치환의 필요성의 규명**

[0346] IgG1이 Fab-아암 교환에 참여하기 위해 필요한, IgG1 CH3 도메인 내의 결정자를 추가로 확인하기 위해서, 삼중 돌연변이 T350I-K370T-F405L (ITL)을 함유하는 IgG1을 이중 돌연변이체 T350I-K370T (IT), T350I-F405L (IL) 및 K370T-F405L (TL)과 비교하였다. 또한, 단일 돌연변이체 F405L (L)을 시험하였다. 시험관내 Fab-아암 교환을 유도하기 위한 2-MEA를 환원제로서 사용하였다 (90 min 동안 37°C에서 100 μl PBS/25 mM 2-MEA 중 50 μg의 각각의 항체). 단일 돌연변이체 F405L 항체의 경우, 일시적 형질감염의 상청액으로부터의 비정제된 항체를 아미콘 울트라 (Amicon Ultra) 원심분리 장치 (30k, 밀리포어, cat. no. UFC803096)를 사용하여 PBS로의 완충제-교환 후에 사용하였다. 환원 반응을 중지시키기 위해, 환원제 2-MEA를 실시예 11에 기재된 바와 같이 스핀 칼럼을 사용하여 샘플을 탈염함으로써 제거하였다. 이중특이적 항체의 생성을 실시예 7에 기재된 바와 같이 ELISA로 측정된 이중특이적 결합에 의해 결정하였다.

[0347] 삼중 (ITL), 이중 돌연변이 (IT, IL 및 TL) 및 단일 돌연변이 (L)를 IgG1-2F8에 도입하였다. 상기 돌연변이체를 90 min 동안 37°C에서 25 mM 2-MEA를 사용한 Fab-아암 교환을 위해 CPSC 힌지 (야생형) 또는 안정화된 힌지 (IgG4-7D8-CPPC)를 함유하는 IgG4-7D8과 조합하였다. 도 10A-B는 IgG1-2F8-IL 및 -TL 돌연변이체가 조합된 IgG4-7D8 (CPSC 또는 CPPC 힌지)과 관계없이 삼중 돌연변이체 ITL과 동일한 수준의 Fab-아암 교환을 보였음을 제시한다. 이와 대조적으로, IgG1-2F8-IT 돌연변이체와의 조합에 대해서는 이중특이적 결합이 관찰되지 않았다. 도 10C는 또한 IgG1-2F8-F405L 돌연변이체가 조합된 IgG4-7D8 (CPSC 또는 CPPC 힌지)과 관계없이 Fab-아암 교환을 보였음을 제시한다. 상기 데이터는 F405L 돌연변이가 상기 언급한 조건 하에서 인간 IgG1을 Fab-아암 교환에 참여하도록 하기에 충분함을 나타낸다.

[0348] **실시예 17: 상이한 온도에서 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성.**

[0349] 2개의 상이한 항체 사이의 Fab-아암 교환에 의해 이중특이적 항체의 생성을 유도하는 2-MEA의 능력을 상이한 온도에서 시험하였다. Fab-아암 교환 반응은 0°C, 20°C (RT) 또는 37°C에서 320 μl PBS/25 mM 2-MEA (각각의 항체에 대해 0.5 mg/ml의 최종 농도) 내에서 160 μg 인간 IgG1-2F8-ITL을 160 μg IgG4-7D8-CPPC와 함께 인큐베이션함으로써 출발하였다. 상기 반응으로부터, 20 μl 샘플을 상이한 시점 (0, 2.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 및 240 min)에서 채취하였다. 20 μl PBS를 각각의 샘플에 첨가한 후, 환원제 2-MEA를 제바 96-웰 스핀 탈염 플레이트 (7k, cat# 89808 써모 피셔 사이언티픽 (Thermo Fisher Scientific))를 제조사의 권장사항에 따라 사용하여 샘플을 탈염함으로써 제거하였다. 총 항체 농도는 나노드롭 (Nanodrop) ND-1000 분광광도계 (이소젠 라이프 사이언스 (Isogen Life Science, 네덜란드 마르션))를 사용하여 280 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 항체 샘플의 연속 희석액 (25배 희석액 내의 총 항체 농도 0-20 μg/ml)을 실시예 7에 기재된 바와 같이 이중특이적 결합을 측정하기 위해 ELISA에 사용하였다.

[0350] 도 11은, 인간 IgG1-2F8-ITL과 IgG4-7D8-CPPC 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생

성이 37°C에서 가장 효율적인 것으로 나타났고, 최대 이중특이적 결합은 45 min 후에 도달함을 보여준다. 실온에서, 이중특이적 항체의 생성은 보다 느렸고, 240 min 후에 최대 이중특이적 결합에 도달하였다. 0°C에서, 분석된 시간 경로 동안 이중특이적 결합의 생성은 관찰되지 않았다.

[0351] **실시예 18: 시험관내 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성을 유도하는 능력에 대한 상이한 환원제의 분석**

[0352] 0.5 mM GSH는 인간 IgG4 및 IgG1-CPSC-ITL 사이의 시험관내 Fab-아암 교환을 유도할 수 있지만, 인간 IgG4 및 안정한 힌지를 함유하는 IgG1-ITL 사이에서는 그렇지 않음이 밝혀졌다 (도 3). 또한, 2-MEA는 안정화된 힌지 영역을 갖는 항체, 예컨대 IgG1-ITL x IgG4-CPPC 사이에서 Fab-아암 교환을 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌다 (도 5). 다른 농도의 GSH 또는 2-MEA 또는 다른 환원제가 2개의 상이한 항체 사이에서 시험관내 Fab-아암 교환을 유도할 수 있는지를 시험하기 위해서, 2-MEA, GSH 및 DTT (디티오트레이톨)의 일련의 농도를 시험하였다. 따라서, 20 μ l PBS 내의 10 μ g 인간 IgG1-2F8-ITL 및 10 μ g IgG4-7D8-CPPC의 조합물 (각각의 항체에 대해 0.5 mg/ml의 최종 농도)을 상이한 환원제 (0.0, 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 12.5, 25.0 및 50.0 mM)의 일련의 농도와 함께 37°C에서 인큐베이션하였다. 90 min 후에, 20 μ l PBS를 각각의 샘플에 첨가하고, 환원제를 실시예 17에 기재된 바와 같이 스핀 탈염 플레이트를 사용하여 샘플을 탈염함으로써 제거하였다. 총 항체 농도는 실시예 17에 기재된 바와 같이 결정하였다. 항체 샘플의 연속 희석액 (3배 희석액 내의 총 항체 농도 0-20 μ g/ml)을 실시예 7에 기재된 바와 같이 이중특이적 결합을 측정하기 위해 ELISA에 사용하였다.

[0353] 도 12는 2-MEA가 25 mM 2-MEA의 농도에서 최대 이중특이적 결합을 유도함을 확인해준다. DTT는 이중특이적 항체의 생성에 매우 효과적이고 최대 이중특이적 결합은 2.5 mM DTT에서 도달함이 밝혀졌다. 0-5 mM 범위의 GSH 농도는 둘 모두 안정화된 힌지 영역을 함유하는 IgG1-ITL 및 IgG4-CPPC 항체 사이의 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성을 유도할 수 없었다. 보다 높은 GSH 농도 (12.5-50 mM)는 비-환원성 SDS-PAGE에 결정될 때 항체 응집체의 형성을 유발하였다 (데이터 미제시). 따라서, 상기 샘플은 분석으로부터 제외하였다. 상기 데이터는 2개의 상이한 항체 사이의 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성이 상이한 환원제에 의해 유도될 수 있음을 보여준다.

[0354] **실시예 19: IgG1-ITL과 함께 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 참여하기 위한 IgG1 409 위치의 결정자**

[0355] 2-MEA는 실시예 11에 기재된 바와 같이 인간 IgG1-ITL과 IgG4-CPPC 사이의 Fab-아암 교환을 유도할 수 있다 (도 5). 인간 IgG1 및 IgG4의 CH3 계면 잔기는 위치 409에서만 상이하다: IgG1의 리신 (K) 및 IgG4의 아르기닌 (R) (실시예 8, 도 2에 기재됨). 따라서, 아르기닌 또는 임의의 다른 아미노산 (K409X)에 의한 위치 409에서 리신의 치환이, IgG1-ITL과의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 IgG1이 참여가능하도록 할 수 있는지 시험하였다. 20 μ l PBS/25 mM 2-MEA 내의 10 μ g 인간 IgG1-2F8-ITL 및 10 μ g IgG1-7D8-K409X의 조합물 (각각의 항체에 대해 0.5 mg/ml의 최종 농도)을 90 min 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 일시적 형질감염의 상청액으로부터의 비정제된 항체를 아미콘 울트라 원심분리 장치 (30k, 밀리포어, cat. no. UFC803096)를 사용하여 PBS로의 완충제-교환 후에 사용하였다. Fab-아암 교환 반응 후에, 20 μ l PBS를 각각의 샘플에 첨가하고, 환원제를 실시예 17에 기재된 바와 같이 스핀 탈염 플레이트를 사용하여 샘플을 탈염함으로써 제거하였다. 항체 샘플의 연속 희석액 (3배 희석액 내의 총 항체 농도 0-20 μ g/ml)을 실시예 7에 기재된 바와 같이 이중특이적 결합을 측정하기 위해 ELISA에 사용하였다.

[0356] 도 13A는 IgG1-2F8-ITL x IgG1-7D8-K409X 사이의 2-MEA 유도 Fab-아암 교환시에 이중특이적 결합의 결과를 보여준다. 도 13B에서, 교환은 100%로 설정된, IgG1-2F8-ITL과 IgG4-7D8-CPPC 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환으로부터 유래된 이중특이적 항체의 정제된 균과 비교한 이중특이적 결합으로서 제시된다. 상기 데이터는 또한 표 1에 제시된 바와 같이 (-) Fab-아암 교환 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간 또는 (++) 높은 Fab-아암 교환으로서 평가되었다. Fab-아암 교환 부재 (-)는 IgG1-7D8의 409 위치가 K (= 야생형 IgG1), L 또는 M일 때 발견되었다. Fab-아암 교환은 IgG1-7D8의 409 위치가 F, I, N 또는 Y일 때 중간 (+)이고, IgG1-7D8의 409 위치가 A, D, E, G, H, Q, R, S, T, V 또는 W일 때 높은 (++) 것으로 밝혀졌다.

표 1

IgG1-2F8-ITL과 IgG1-7D8-K409X 돌연변이체 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환.
 IgG1-2F8-ITL과 IgG1-7D8-K409X 돌연변이체 사이의 2-MEA-유도 시험관내
 Fab-아암 교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 샌드위치 ELISA에 의해 결정하였다.
 (-) 교환 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간, (++) 높은 Fab-아암 교환.

	Fab-아암 교환
IgG1-7D8-K409X	x IgG1-2F8-ITL
A	++
D	++
E	++
F	+
G	++
H	++
I	+
K	-
L	-
M	-
N	+
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	+

[0357]

[0358]

실시예 20: 항체 탈글리코실화는 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성에 영향을 주지 않는다.

[0359]

200 µg 항체를 180 µl PBS 내의 0.005 U N-글리카나제 (cat. no. GKE-5006D; 프로자임)와 함께 밤새 37°C에서 인큐베이션함으로써 IgG4-7D8 및 IgG4-7D8-CPPC 샘플을 탈글리코실화시켰다. 상기 샘플을 직접 Fab-아암 교환 반응에 사용하였다. Fab-아암 교환은 100 µl PBS/25 mM 2-MEA (각각의 항체에 대해 0.5 mg/ml의 최종 농도) 내의 50 µg의 각각의 항체를 90 min 동안 37°C에서 인큐베이션함으로써 수행하였다. 환원제 2-MEA를 실시예 11에 기재된 바와 같이 스핀 칼럼을 사용하여 샘플을 탈염함으로써 제거하였다. 항체 샘플의 연속 희석액 (3배 희석액 내의 총 항체 농도 0-20 µg/ml)을 실시예 7에 기재된 바와 같이 이중특이적 결합을 측정하기 위해 샌드위치 ELISA에 사용하였다.

[0360]

질량 분광측정법 분석은 탈글리코실화 반응이 100% 탈글리코실화된 항체 생성물을 유발함을 보여주었다 (데이터 미제시). 도 14는 탈글리코실화된 항체를 수반하는 Fab-아암 교환이 상응하는 글리코실화된 항체의 Fab-아암 교환과 상이하지 않음을 보여준다 (IgG4-2F8 x IgG4-7D8-탈글리코실화된 대 IgG4-2F8 x IgG4-7D8 및 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC-탈글리코실화된 대 IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC). 상기 데이터는 탈글리코실화가 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성에 영향을 주지 않았음을 나타낸다.

[0361]

실시예 21: 비-공유 CH3-CH3 상호작용의 정량

[0362]

CH3 계면에서 상호작용의 강도는 모 항체 내의 두 중쇄가 Fab-아암 교환 반응에서 해리되고 후속적으로 이중이량체화 반응에서 회합될 수 있도록 하는 것이어야 한다. 따라서, Fab-아암 교환에 참여하는 능력과 비-공유 CH3-CH3 상호작용의 강도 (해리 상수, K_D) 사이의 상호관련성을 분석하였다. GSH-유도 Fab-아암 교환은 다음 조합의 인간 항체에 대해 실시예 9 (37°C에서 0.5 mM GSH)에 기재된 바와 같이 수행하였다:

IgG1-2F8 x IgG1-7D8
 IgG1-2F8-CPSC x IgG1-7D8-CPSC
 IgG1-2F8-CPSC-T350I x IgG1-CPSC-7D8-T350I
 IgG1-2F8-CPSC-K370T x IgG1-7D8-CPSC-K370T
 IgG1-2F8-CPSC-ITL x IgG1-7D8-CPSC-ITL
 IgG1-2F8-CPSC-K409R x IgG1-7D8-CPSC-K409R
 IgG4-2F8 x IgG4-7D8
 IgG4-2F8-R409K x IgG4-7D8-R409K
 IgG4-2F8-R409A x IgG4-7D8-R409A
 IgG4-2F8-R409L x IgG4-7D8-R409L
 IgG4-2F8-R409M x IgG4-7D8-R409M
 IgG4-2F8-R409T x IgG4-7D8-R409T
 IgG4-2F8-R409W x IgG4-7D8-R409W
 IgG4-2F8-F405A x IgG4-7D8-F405A
 IgG4-2F8-F405L x IgG4-7D8-F405L
 IgG4-2F8-Y349D x IgG4-7D8-Y349D
 IgG4-2F8-L351K x IgG4-7D8-L351K
 IgG4-2F8-E357T x IgG4-7D8-E357T
 IgG4-2F8-S364D x IgG4-7D8-S364D
 IgG4-2F8-K370Q x IgG4-7D8-K370Q
 IgG4-2F8-K370E x IgG4-7D8-K370E

[0363]

[0364]

이중특이적 항체의 생성은 실시예 7에 기재된 바와 같이 샌드위치 ELISA에서 이중특이적 결합의 결정에 의해 측정하였다. 도 15a/b/c는 Fab-아암 교환 반응 후의 이중특이적 결합의 결과를 보여준다.

[0365]

CH3-CH3 상호작용의 강도에 대한 상기 언급된 CH3 돌연변이의 효과를 측정하기 위해, CH2-CH3 도메인만으로 이루어진 단편을 제작하였다. 상기 단편 내의 힌지 영역의 결여는 공유 중쇄간 디설피드 결합을 방지하였다. 단편을 천연 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. 샘플을 10 kDa MWCO 스핀-필터 칼럼을 사용하여 100 mM 암모늄 아세테이트 (pH 7)로 완충제 교환하였다. 연속 희석된 샘플 (20 μ M - 25 nM; 단량체 등가물)의 분취액 (약 1 μ l)을 LCT 질량 분광측정계 (워터스)로 분석을 위해 금-도금된 보로실리케이트 모세관 내로 로딩하였다. 단량체 신호 (M_s)는 스펙트럼 내의 모든 피크의 면적에 대한 단량체 피크의 면적의 비율로서 규정되었다 ($M_s/(M_s+D_s)$) (여기서, D_s = 이량체 신호). 평형시의 단량체의 농도 $[M]_{eq}$ 는 $M_s \cdot [M]_0$ 로서 규정되고, 여기서 $[M]_0$ 는 단량체 기준에서 총 단백질 농도이다. 평형시의 이량체 농도 $[D]_{eq}$ 는 $([M]_0 - [M]_{eq})/2$ 로 규정되었다. 이어서, K_D 를 $[D]_{eq}$ 대 $[M]_{eq}^2$ 의 그래프의 구배로부터 추출하였다. 비-공유 CH3-CH3 상호작용의 K_D 를 표 2에 제시한다.

[0366]

Fab-아암 교환에 참여하는 능력과 비-공유 CH3-CH3 상호작용의 강도 사이의 상호관련성을 분석하였다. 도 15d/e는 상응하는 CH2-CH3 단편의 측정된 K_D 에 대해 그래프로 표시된 Fab-아암 교환 후의 이중특이적 결합의 비율을 보여준다 (IgG1은 도 15d; IgG4는 도 15e 참조). 상기 데이터는 시험된 조건 하에 효율적인 Fab-아암 교환을 허용하는 CH3-CH3 상호작용의 겉보기 K_D 값의 특정 범위가 존재함을 시사한다.

표 2

비-공유 CH3-CH3 상호작용의 K_D

CH2-CH3 구조물	K_D (M)	차이 배수 *
G1	3.0×10^{-9}	1.0000
G1-T350I	7.0×10^{-9}	0.4000
G1-K370T	4.5×10^{-8}	0.0700
G1-ITL	1.0×10^{-6}	0.0030
G1-K409R	1.1×10^{-7}	0.0300
G4	4.8×10^{-8}	1.0000
G4-R409K	8.0×10^{-9}	6.0000
G4-R409A	1.6×10^{-7}	0.3000
G4-R409L	1.5×10^{-8}	3.2000
G4-R409M	3.0×10^{-9}	16.0000
G4-R409T	7.2×10^{-7}	0.0700
G4-R409W	3.4×10^{-5}	0.0014
G4-F405A	1.9×10^{-5}	0.0025
G4-F405L	2.5×10^{-5}	0.0019
G4-L351K	7.4×10^{-7}	0.0600
G4-E357T	4.1×10^{-5}	0.0012
G4-S364D	4.7×10^{-8}	1.0200
G4-K370Q	1.1×10^{-8}	4.3000
G4-K370E	2.0×10^{-9}	24.0000

* 야생형 IgG1 또는 IgG4의 상응하는 CH2-CH3 단편에 비해

[0367]

[0368]

실시예 22: IgG1-2F8-F405L과 IgG1-7D8-K409R 사이의 시험관내 Fab-아암-교환에 의한 이중특이적 항체의 생성을 유도하는 그의 능력에 대한 상이한 환원제의 분석

[0369]

2-MEA 및 DTT는 인간 IgG1-ITL과 IgG4-CPPC 사이의 시험관내 Fab-아암-교환을 유도하는 것으로 밝혀졌다 (도 12). 상기 환원제가 또한 인간 IgG1-2F8-F405L과 IgG1-7D8-K409R 사이의 시험관내 Fab-아암-교환을 유도할 수 있는지 시험하였다. 2-MEA, DTT, GSH 및 TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀)의 일련의 농도를 시험하였다. Fab-아암-교환을 실시예 18에 기재된 바와 같이 수행하였다. 상이한 환원제의 시험된 일련의 농도는 다음과 같았다: 0.0, 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 25.0, 50.0 mM 2-MEA, GSH, DTT 또는 TCEP.

[0370]

도 17은 2-MEA가 25 mM 2-MEA의 농도에서 최대 Fab-아암-교환을 유도함을 확인해주고, 이것은 보다 고농도의 50.0 mM 2-MEA에서 지속되었다. DTT는 이중특이적 항체의 생성에 매우 효과적인 것으로 밝혀졌고, 최대 Fab-아암-교환은 0.5 mM DTT에서 도달하였고, 이것은 또한 보다 고농도의 DTT (1.0-50.0 mM)에 걸쳐서 지속되었다. 또한, TCEP는 이중특이적 항체의 생성에 매우 효과적인 것으로 밝혀졌고, 최대 Fab-아암-교환은 0.5 mM에 도달하였다. 농도 \geq 25.0 mM에서, TCEP에 의한 Fab-아암-교환은 붕괴되었다. 0.0-5.0 mM 범위의 GSH 농도는 Fab-아암-교환에 의한 이중특이적 항체의 생성을 유도할 수 없었다. 보다 높은 GSH 농도 (25.0-50.0 mM)는 항체 응집체의 형성을 유발하였다 (데이터 미제시). 따라서, 상기 샘플은 분석으로부터 제외하였다. 상기 데이터는 2개의 상이한 항체 사이의 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성이 상이한 환원제에 의해 유도될 수 있음을 보여준다.

[0371]

실시예 23: IgG1-2F8-F405L과 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성

[0372]

인간 IgG1-2F8-F405L과 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 형성을 확인하기 위해, 2-MEA의 일련의 농도를 사용한 Fab-아암-교환 반응으로부터의 샘플의 분자량을 ESI-MS에 의해 결정하였다. 시험된 일련의 농도는 다음과 같다: 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 7.0, 10.0, 15.0, 25.0 및 40.0 mM 2-MEA. Fab-아암-교환 (PBS 내의) 및 샌드위치 ELISA를 실시예 11에 기재된 바와 같이 수행하였다. ESI-MS를 실시예 12에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0373]

도 18A는 2-MEA가 IgG1-2F8-F405L과 IgG1-7D8-K409R 사이의 Fab-아암-교환을 용량-의존성 방식으로 유도하고, 이중특이적 항체의 생성을 효율적으로 유발하고, 이중특이적 결합의 최대 수준은 15.0 mM 2-MEA의 농도에서 도달함을 보여준다. 정량된 ESI-MS 데이터는 도 18B에 제시되고, IgG1-2F8-F405L과 IgG1-7D8-K409R 사이의 Fab-아암-교환이 거의 100%의 이중특이적 항체를 생성함을 보여주고, 이는 이중특이적-결합 ELISA로부터의 결과를

확인해준다.

- [0374] **실시예 24: 인간 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 순도**
- [0375] 인간 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 배치를 PD-10 탈염 칼럼 (cat.no. 17-0851-01; 지이 헬스케어)을 사용하여 정제하였다. 이어서, 이중특이적 생성물의 순도를 실시예 12에 기재된 바와 같이 질량 분광측정법에 의해 분석하였다.
- [0376] 도 19는 출발 물질 IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R, 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물의 질량 분광측정 프로파일을 보여준다. Fab-아암-교환된 샘플 내의 생성물은 146,160.7 kDa이고, IgG1-2F8-F405L ($146,606.8/2 = 73,303.3$) x IgG1-7D8-K409R ($146,312.2/2 = 73,156.1$)로부터 유래된 이중특이적 생성물 (= 146,459.4 kDa)과 일치한다. 또한, 이중특이적 항체 생성물은 균일한 피크를 보였고, 이것은 하위 분할된 피크를 생성하는 경계 미스페이어링이 발생하지 않았음을 나타낸다. 상기 데이터는 Fab-아암-교환이 약 100% 이중특이적 항체를 생성함을 보여준다.
- [0377] **실시예 25: 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R로부터 생성된 이중특이적 항체의 안정성 및 약동학에 대한 생체내 분석**
- [0378] 실시예 14에 기재된 바와 같이 그의 안정성 (생체내 Fab-아암-교환) 및 약동학적 특성을 분석하기 위해 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 시험관내 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체를 SCID 마우스에 주사하였다. 2개의 군의 마우스 (3마리의 마우스/군)를 분석하였다: (1) 100 μ g 이중특이적 항체; (2) 100 μ g 이중특이적 항체 + 1,000 μ g 무관한 IgG4 (IgG4-637, WO2007068255에 기재됨). 혈장 샘플 내의 총 IgG 농도를 실시예 14에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 검정하되, 본 실시예에서는 HRP-접합된 염소 항-인간 IgG (잭슨, cat. no. 109-035-098, 1/10,000)를 검출을 위한 접합체로서 사용하였다. 혈장 샘플 내의 이중특이적 항체의 존재를 실시예 14에 기재된 바와 같이 샌드위치 ELISA로 CD20 및 EGFR 이중특이적 반응성에 의해 검정하고 정량하였다.
- [0379] 도 20A는 시간에 따른 총 항체 혈장 농도를 보여준다. 혈장 클리어런스 곡선의 형태는 두 군에서 동일하였다. 도 20B는 시간에 따른 이중특이적 항체의 혈장 농도를 보여준다. 10배 과량의 무관한 IgG4를 이중특이적 항체에 첨가하여도 이중특이적 항체 농도에 영향을 주지 않았고, 이것은 Fab-아암-교환이 생체 내에서 발생하지 않았음을 나타낸다. 상기 데이터는 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 시험관내 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체 생성물이 생체 내에서 안정함 (Fab-아암-교환 부재)을 보여준다.
- [0380] **실시예 26: 인간 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체에 의한 CDC-매개 세포 사멸**
- [0381] CD20 항체 IgG1-7D8은 보체-의존성 세포독성 (CDC)에 의해 CD20-발현 세포를 효율적으로 사멸시킬 수 있다. 이와 대조적으로, EGFR 항체 IgG1-2F8은 EGFR을 발현하는 표적 세포에 대한 CDC를 매개하지 않는다. 돌연변이체 IgG1-7D8-K409R, 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체가 여전히 CD20-발현 세포에 대해 CDC를 유도할 수 있는지 시험하였다. 10^5 개의 다우디 또는 라지 세포를 실온에서 진탕기에서 0.1% BSA로 보충된 80 μ l RPMI 배지에서 항체의 일련의 농도와 함께 15 min 동안 예비-인큐베이션하였다. 20 μ l의 정상 인간 혈청 (NHS)을 보체 (20% NHS 최종 농도)의 공급원으로서 첨가하고, 45 min 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 0.1% BSA로 보충된 30 μ l 빙냉 RPMI 배지를 첨가하여 CDC 반응을 중지시켰다. 죽은 및 생존가능 세포는 10 μ l의 10 μ g/ml 아이오딘화프로피듐 (PI) (1 μ g/ml 최종 농도)을 첨가하고 FACS 분석에 의해 구별하였다.
- [0382] 도 21은 IgG1-7D8에 의한 CD20-발현 다우디 (도 21A) 및 라지 (도 21B) 세포의 CDC-매개 세포 사멸은 K409R 돌연변이의 도입에 의해 영향받지 않음을 보여준다. 다우디 및 라지 세포 둘 모두는 EGFR을 발현하지 않고, IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 일가 결합을 유발한다. 그럼에도 불구하고, 이중특이적 항체는 CD20-발현 세포의 CDC-매개 세포 사멸을 계속 유도하였다. 상기 데이터는 모 항체의 CDC 능력이 이중특이적 포맷에서 유지됨을 나타낸다.
- [0383] **실시예 27: 인간 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체에 의한 ADCC-매개 세포 사멸**
- [0384] EGFR 항체 IgG1-2F8은 항체-의존성 세포독성 (ADCC)에 의해 EGFR-발현 세포, 예컨대 A431을 사멸시킬 수

있다. A431 세포는 CD20을 발현하지 않고, 따라서 CD20 항체 IgG1-7D8은 상기 세포에 대해 ADCC를 유도하지 않는다. 돌연변이체 IgG1-2F8-F405L, 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체가 여전히 A431 세포에 대해 ADCC를 유도할 수 있는지 시험하였다. 이펙터 세포 단리, 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 류코세프 (Leucosep)[®] 튜브 (그라이너 바이오-원, cat.# 227290)를 제조자의 권장사항에 따라 사용하여 건강한 공여자의 전혈로부터 단리하였다. 100 μ Ci ⁵¹Cr을 0.1% BSA로 보충된 1 ml RPMI 배지 내의 5x10⁶개의 A431 세포에 첨가함으로써 표적 세포를 표지하였고, 37°C 진탕 수조에서 60 min 동안 인큐베이션하였다. 표지된 세포를 세척하고, 0.1% BSA로 보충된 RPMI 내에 재현탁시켰다. 0.1% BSA로 보충된 RPMI 내의 5x10⁴개의 표지된 표적 세포를 실온에서 항체 일련의 농도 (3배 희석액 내의 ADCC 검정에서의 0-10 μ g/ml 최종 농도 범위)와 함께 15 min 동안 100 μ l에서 예비인큐베이션하였다. ADCC 검정은 100:1의 E:T 비에서 50 μ l 이펙터 세포 (5x10⁶개 세포)를 첨가함으로써 출발하였다. 37°C에서 4시간 후에, 삼중 실험으로부터의 ⁵¹Cr 방출을 분당 계수 (cpm)로서 섬광계수기로 측정하였다. 세포 독성의 백분율은 다음 식을 사용하여 계산하였다: 특이적 용해의 백분율 = (실험 cpm - 기초 cpm)/(최대 cpm - 기초 cpm) X 100. 최대 ⁵¹Cr 방출은 50 μ l의 5% 트리톤 (Triton) X-100을 50 μ l 표적 세포 (5x10⁴개의 세포)에 첨가함으로써 결정하고, 기초 방출은 감작 (sensitizing) 항체 및 이펙터 세포의 부재 하에 측정하였다.

[0385] 도 22는 CD20-특이적 항체 IgG1-7D8이 CD20-음성 A431 세포에 대한 ADCC를 유도하지 않았음을 보여준다. IgG1-2F8 및 돌연변이체 IgG1-2F8-F405L은 모두 A431 세포에 대해 ADCC를 유도할 수 있었고, 이것은 IgG1-2F8에 대한 F405L 돌연변이의 도입이 그의 ADCC 이펙터 기능에 영향을 주지 않았음을 나타낸다. 또한, IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R로부터 유래된 이중특이적 항체가 A431 세포에 대한 ADCC를 용량-의존성 방식으로 유도하고, 이것은 ADCC 이펙터 기능이 이중특이적 포맷에서 유지됨을 나타낸다.

[0386] **실시예 28: IgG1-K409R과 함께 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 참여하기 위한 IgG1 405 위치의 결정자**

[0387] 실시예 16에서 F405L 돌연변이가 IgG1-7D8과 조합될 때 인간 IgG1을 Fab-아암 교환에 참여하도록 하기에 충분함이 설명되었다. 인간 IgG1-K409R과 조합되어 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 참여하기 위한 IgG1 405 위치의 결정자를 추가로 시험하기 위해, 모든 가능한 IgG1-2F8-F405X 돌연변이체 (C 및 P를 제외한)를 IgG1-7D8-K409R과 조합하였다. 절차를 실시예 19에 기재된 바와 같이 정제된 항체를 사용하여 수행하였다.

[0388] 도 23은 IgG1-2F8-F405X x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA 유도 Fab-아암 교환시에 이중특이적 결합의 결과를 보여준다. 상기 데이터는 또한 표 3에 제시된 바와 같이 (-) Fab-아암 교환 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간 또는 (++) 높은 Fab-아암 교환으로서 평가된다. Fab-아암 교환 부재 (-)는 IgG1-2F8의 405 위치가 F (= 야생형 IgG1)일 때 발견되었다. Fab-아암 교환은 IgG1-2F8의 405 위치가 G 또는 R일 때 낮은 (+/-) 것으로 밝혀졌다. Fab-아암 교환은 IgG1-2F8의 405 위치가 A, D, E, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W 또는 Y일 때 높은 (++) 것으로 밝혀졌다. 상기 데이터는 IgG1 405 위치의 특정 돌연변이가 IgG1-K409R과 조합될 때 IgG1이 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 참여하도록 할 수 있음을 나타낸다.

표 3

IgG1-2F8-F405X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환.
 IgG1-2F8-F405X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 샌드위치 ELISA에 의해 결정하였다.
 (-) 교환 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간, (++) 높은 Fab-아암 교환.

IgG1-2F8-F405X	Fab-아암 교환 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	+/-
H	++
I	++
K	++
L	++
M	++
N	++
Q	++
R	+/-
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	++

[0389]

[0390] 실시예 29: IgG1-K409R과 함께 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 참여하기 위한 IgG1 407 위치의 결정자

[0391]

실시예 28에서 위치 F405에서 특정 단일 돌연변이가 IgG1-K409R과 조합될 때 인간 IgG1을 Fab-아암 교환에 참여하도록 하기에 충분함이 설명되었다. CH3 도메인 내의 Fc:Fc 계면 위치에 관련되는 다른 결정자가 또한 Fab-아암-교환 메커니즘을 매개할 수 있는지 시험하기 위해, IgG1 407 위치의 돌연변이 유발을 수행하고, 돌연변이체가 인간 IgG1-K409R과 조합하여 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 참여하는지 시험하였다. 모든 가능한 IgG1-2F8-Y407X 돌연변이체 (C 및 P를 제외한)를 IgG1-7D8-K409R과 조합하였다. 절차를 실시예 19에 기재된 바와 같이 정제된 항체를 사용하여 수행하였다.

[0392]

도 24는 IgG1-2F8-Y407X x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환 시에 이중특이적 결합의 결과를 보여준다. 상기 데이터는 또한 표 4에 제시된 바와 같이 (-) Fab-아암 교환 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간 또는 (++) 높은 Fab-아암 교환으로서 평가하였다. Fab-아암 교환 부재 (-)는 IgG1-2F8의 407 위치가 Y (= 야생형 IgG1), E, K, Q, 또는 R일 때 발견되었다. Fab-아암 교환은 IgG1-2F8의 407 위치가 D, F, I, S 또는 T일 때 낮고 (+/-), IgG1-2F8의 407 위치가 A, H, N 또는 V일 때 중간 (+)이고, IgG1-2F8의 407 위치가 G, L, M 또는 W일 때 높은 (++) 것으로 밝혀졌다. 상기 데이터는 IgG1 407 위치의 특정 단일 돌연변이가 IgG1-K409R과 조합될 때 IgG1이 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 참여하도록 할 수 있음을 나타낸다.

표 4

IgG1-2F8-Y407X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환.

IgG1-2F8-Y407X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후에 이중특이적 항체의 생성을 샌드위치 ELISA에 의해 결정하였다. (-) 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간, (++) 높은 Fab-아암-교환.

IgG1-2F8-Y407X	Fab-아암 교환 x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+/-
E	-
F	+/-
G	++
H	+
I	+/-
K	-
L	++
M	++
N	+
Q	-
R	-
S	+/-
T	+/-
V	+
W	++
Y	-

[0393]

[0394] 실시예 30: IgG1 이중이량체에서 비-공유 CH3-CH3 상호작용의 정량

[0395] 효율적인 Fab-아암-교환을 허용하는, CH3-CH3 동종이량체 상호작용의 강도의 특이적인 범위가 존재한다고 실시예 21에서 설명하였다. CH3 계면에서 상호작용의 강도는 모 항체 (동종이량체) 내의 두 중쇄가 Fab-아암 교환 반응에서 해리되고 후속적으로 이중이량체화 반응에서 회합될 수 있도록 하는 것이어야 한다. 안정한 이중이량체를 생성하기 위해서, 이중이량체 상호작용의 강도는 동종이량체화보다 이중이량체화에 유리하도록 동종이량체 상호작용의 강도보다 더 커야 한다. 이를 확인하기 위해서, 이중이량체에서 CH3-CH3 상호작용의 강도를 측정하고 동종이량체에서의 강도와 비교하였다. IgG1-K409R, IgG1-F405L 및 IgG1-ITL 동종이량체로부터 유래된 CH2-CH3 단편의 K_D 는 실시예 21에 기재된 바와 같이 측정하였다. 이중이량체에서 K_D 의 결정을 위해, CH2-CH3 도메인 단편 (G1-F405L 및 G1-ITL)을 힌지를 제외하고 모든 항체 도메인을 함유하는 IgG1-7D8-K409R의 IgG1Δ 힌지 단편과 혼합하였다. 두 단편에서 힌지 영역은 결여는 공유 중쇄간 디설피드 결합을 방지하였다. 단편을 혼합하고, 실시예 21에 기재된 바와 같이 천연 질량 분광측정법에 의해 24시간 후에 분석하였다. 표시된 CH2-CH3 단편 또는 CH2-CH3 단편과 IgG1Δ 힌지의 혼합물에서 비-공유 CH3-CH3 상호작용의 K_D 값을 표 5에 제시한다. 상기 데이터는 시험된 조건 하에 이중이량체 상호작용의 강도는 상응하는 동종이량체 상호작용보다 더 큼 (더 낮은 K_D)을 시사한다.

표 5

CH2-CH3 구축물 (IgG1Δ 힌지)	상호작용	K_D (M)
G1-F405L/G1-K409R	이중이량체	1.2×10^{-8}
G1-ITL/G1-K409R	이중이량체	1.7×10^{-8}
G1-K409R	동종이량체	1.1×10^{-7}
G1-F405L	동종이량체	8.5×10^{-7}
G1-ITL	동종이량체	1.2×10^{-6}

[0396]

[0397] 실시예 31: 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 생화학적 분석

[0398] 인간 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 배

치를 PD-10 탈염 칼럼 (cat.no. 17-0851-01; 지이 헬스케어) 상에서 정제하였다. 이어서, 이중특이적 생성물의 순도를 나트륨 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE), 고성능 크기 배제 크로마토그래피 (HP-SEC), 질량 분광측정법, HPLC 양이온 교환 크로마토그래피 (HPLC-CIEX), 모세관 등전 포커싱 (cIEF)에 의해 분석하였다.

[0399] SDS-PAGE를 실시예 15에 기재된 바와 같이 비-환원 (도 25A) 및 환원 (도 25B) 조건 하에서 수행하였다. 도 25A는 2-MEA 유도 Fab-아암 교환 후의 항체 샘플이 무손상 IgG로 이루어짐을, 비-환원된 겔 상에서 검출가능한 1/2 분자 (H1L1)의 흔적과 함께 보여준다.

[0400] HP-SEC를 실시예 15에 기재된 바와 같이 수행하였다. 도 26(B) 및 도 26(A)는 각각 출발 물질 IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R의 HP-SEC 프로파일을 보여준다. 두 항체, 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA 유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물의 혼합물 (1:1)을 각각 도 26C 및 도 26D에 제시한다. 또한, 도 26D는 >99%의 샘플이 무손상 IgG로 이루어지고, 사실상 응집체가 형성되지 않았음을 보여준다.

[0401] 질량 분광측정법 (ESI-MS)을 실시예 12에 기재된 바와 같이 수행하였다. 도 27(B) 및 도 27(A)는 각각 출발 물질 IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R의 질량 분광측정 프로파일을 보여준다. 두 항체, 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA 유도 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물의 혼합물 (1:1)을 각각 도 27C 및 도 27D에 제시한다. 2-MEA 유도 Fab-아암 교환된 샘플 내의 생성물은 146,159.7 kDa이고, 이것은 IgG1-2F8-F405L (146,289.0/2=73,145) x IgG1-7D8-K409R (146,028.0/2=73,014)로부터 유래된 이중특이적 생성물과 완벽하게 일치한다. 또한, 이중특이적 항체 생성물은 균일한 피크를 보였고, 이것은 하위 분할된 피크를 생성하는 경쇄 미스페어링이 발생하지 않았음을 나타낸다. 상기 데이터는 2-MEA 유도 Fab-아암 교환이 이중특이적 IgG를 생성함을 보여준다. (*)로 표시된 작은 피크는 분석 전의 불완전한 탈글리코실화에 의한 것이었다. 상기 데이터는 이중특이적 항체 샘플이 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성되었음을 보여준다.

[0402] 모세관 등전 포커싱 (cIEF)은 iCE280 애널라이저 (Analyzer) (컨버전트 바이오사이언시스 (Convergent Biosciences))를 사용하여 수행하였다. 도 28A 및 도 28B는 각각 출발 물질 IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R의 cIEF 프로파일을 보여준다. 두 항체, 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물의 혼합물 (1:1)을 각각 도 28C 및 도 28D에 제시한다. 모든 샘플은 사용 전에 탈염되었다. 검정 믹스 내의 최종 농도는 0.3 mg/ml IgG (0.35% 메틸 셀룰로스; 2% 캐리어 암폴라이츠(Carrier Ampholytes) 3-10; 6% 캐리어 암폴라이츠 8-10.5; 0.5% pI 마커 7.65 및 0.5% pI 마커 10.10)이었다. 포커싱은 7 min 동안 3000 V에서 수행하였고, 전체 모세관 흡수 영상은 전하 결합 소자 카메라에 의해 캡처하였다. 피크 프로파일의 보정 후에, 데이터를 이지크롬(EZChrom) 소프트웨어에 의해 분석하고, pI 마커는 (*)로 표시한다. 상기 데이터는 이중특이적 항체 샘플이 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성되었음을 보여준다.

[0403] 모노클로날 항체의 하전된 이소형을 연구하기 위한 또 다른 기술은 고압 액체 크로마토그래피 양이온 교환 (HPLC-CIEX)이다. 도 29A 및 도 29B는 각각 출발 물질 IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R의 HPLC-CIEX 프로파일을 보여준다. 두 항체, 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA 유도된 Fab-아암 교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물의 혼합물 (1:1)을 각각 도 29C 및 도 29D에 제시한다. 샘플을 HPLC 내로의 주입을 위해 이동상 A (10 mM NaPO₄, pH 7.0) 내에 1 mg/ml로 희석하였다. 상이하게 하전된 IgG 분자를 1 ml/min의 유속에서 프로팍(ProPac)® WCX-10, 4 mm x 250 mm, 분석 칼럼을 사용하여 분리하였다. 용리는 이동상 A에서 이동상 B (10 mM NaPO₄, pH 7.0, 0.25 M NaCl)로의 구배를 사용하여 수행하고, 검출은 280 nm에서 발생하였다. 상기 데이터는 이중특이적 항체 샘플이 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의해 생성되었음을 보여준다. 이것은 또한 양이온 교환이 잔류 동종이량체를 이중이량체로부터 분리하기 위한 강력한 도구임을 보여준다. 양이온 교환 크로마토그래피의 또 다른 용도는 따라서 이중특이적 이중이량체의 제거, 즉 교환 후에 임의의 잔류 동종이량체를 정제하는 것이다.

[0404] **실시예 32: 두 동종이량체의 동시적인 동시-발현에 의한 이중이량체의 재조합 발현**

[0405] 이중이량체 형성이 또한 2개의 동종이량체가 재조합 방식으로 동시 발현될 때 발생함을 입증하기 위해, HEK-293F 세포를 1:1:1:1의 비로 IgG1-7D8-K409R 및 IgG1-2F8-F405의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 4개의 발현 벡터 (실시예 1 참조)로 동시 형질감염시켰다. 항체를 실시예 4에 기재된 바와 같이 무혈청 상태 하에 일시적으로

생성시켰다. 이어서, IgG를 실시예 5에 기재된 바와 같이 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 정제된 IgG를 탈글리코실화시키고, 후속적으로 실시예 12에 기재된 바와 같이 전기분무 이온화 질량 분광측정법에 의해 분석하였다.

[0406] IgG1-7D8-K409R 및 IgG1-2F8-F405의 중쇄 및 경쇄의 이론적 질량을 표 6에 제시한다.

표 6

IgG1-7D8-K409R 및 IgG1-2F8-F405의 중쇄 및 경쇄의 이론적 질량

동종이량체	L-쇄 (Da)	H-쇄 (Da)
IgG1-2F8-F405	23252.8	49894.6
IgG1-7D8-K409R	23438.1	49579.0

[0407]

[0408] 상기 질량을 기초로 하여, 다음 IgG 분자가 이론상 검출될 수 있었다 (표 7). 측정된 질량 (도 30)은 마지막 칼럼에 표시되어 있다.

표 7

IgG1-7D8-K409R 및 IgG1-2F8-F405의 중쇄 및 경쇄의 이론적 검출

IgG1-2F8-F405		IgG1-7D8-K409R		이론적 질량 (Da)	측정된 질량 (Da)
H-쇄	L-쇄	H-쇄	L-쇄		
2	2			146287	146284
		2	2	146026	146026
2			2	146657	146664
	2	2		145656	145660
2	1		1	146472	146477
	1	2	1	145841	145846
1	1	1	1	146157	146159
1	2	1		145971	145972
1		1	2	146342	146345

[0409]

[0410] 146345 및 146159 Da의 2개의 가장 풍부한 피크는 각각 단일 (IgG1-7D8-K409R로부터의) 또는 두 경쇄가 도입된 이종이량체를 나타낸다. IgG1-7D8-K409R 또는 IgG1-2F8-F405의 두 중쇄의 동종이량체가 검출되었지만, 단지 소량이였다. 상기 데이터는 2개의 동종이량체가 동시 발현될 때 이종이량체화도 발생함을 보여준다.

[0411] 실시예 33: 2-MEA-유도 Fab-아암 교환의 동역학의 모니터링 및 HPLC-CIEX를 사용한 교환 후에 잔류 동종이량체의 정량

[0412] 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성은 실시예 11에서 기재되어 있다. 상기 실시예에서, 교환 반응은 교환 반응 동안 다양한 시점에서 고압 액체 크로마토그래피 양이온 교환 (HPLC-CIEX; 실시예 31에 기재된 바와 같이)을 수행함으로써 모니터링하였다.

[0413] 동종이량체 IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R을 각각 1 mg/ml의 농도에서 몰비 1:1로 혼합하였다. 25 mM 2-MEA의 첨가 후에, 샘플을 HPLC의 자동 샘플주입기에 넣고, 25°C에서 예열하였다. 도 31A 내지 31H는 2-MEA의 첨가 후에 각각 t = 0 min 내지 t = 450 min에 걸쳐 HPLC-CIEX에 의해 얻은, 상이한 시간 간격의 8회의 연속 주사를 보여준다. 데이터는 이중특이적 IgG가 보다 신속하게 형성되고 대부분의 동종이량체가 135 min 후에 교환됨을 보여준다. 45 min 후에 나타나는 불균일 이종이량체 피크는 약 180 min 후에 보다 균질한 피크로 분해되고, 이것은 교환이 상이한 상에서 발생함을 제시한다. 또한, 도 32A는 약 3%의 잔류 동종이량체가 CIEX 방법으로 검출됨을 보여준다 (화살표로 표시됨). 제시된 바와 같이, 상기 방법은 남아있는 동종이량체 함량의 정량에 적합하다 (교환 반응이 거의 완전할 때 동종이량체의 용리는 도 32B에 도시됨).

[0414] 실시예 34: 다양한 2-MEA 농도, 온도 및 인큐베이션 시간에서 높은 항체 농도에서의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환

에 의한 이중특이적 항체의 생성

- [0415] 2-MEA 유도 Fab-아암 교환을 높은 IgG 농도에서 수행하였다. 교환의 양에 대한 2-MEA 농도, 인큐베이션 온도 및 시간의 영향을 연구하였다.
- [0416] 교환 과정은 IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L의 조합을 사용하여 수행하였다. 두 물질을 단백질 A를 사용하여 친화도 크로마토그래피로 정제하였다. >20 mg/ml으로의 물질의 농축 후에, 연속적인 음이온 교환 단계를 하이프랩(HiPrep) Q FF 16/10 (지이 헬스 케어, #28-9365-43)을 사용하여 수행하였다 (관류 (flow through) 방식으로). 최종 정제된 물질에 대해 PBS로 완충제를 교환하였다.
- [0417] 이중특이적 교환을 PBS 내의 20 mg/ml (최종 농도 10 mg/ml의 각각의 동종이량체) 및 10 mg/ml (최종 농도 5 mg/ml의 각각의 동종이량체)의 최종 IgG 농도에서 연구하였다. 별개의 혼합물을 10, 25, 50 및 100 mM의 최종 농도에서 2-MEA를 포함하는 두 IgG 농도에 대해 제조하였다. 혼합물을 에펜도르프 튜브에 100 μ l 분취액으로 나누어 15, 25 및 37°C에서 보관하였다. 별개의 튜브를 각각의 온도에서 90 min, 5시간 및 24시간의 상이한 인큐베이션 시간 동안 사용하였다.
- [0418] 혼합물을 또한 두 IgG 농도에 대해 2-MEA 없이 제조하고 비처리된 대조군으로서 4°C에서 보관하였다. 적절한 인큐베이션 시간 후에, 90 min 및 5시간 샘플을 2-MEA를 제거하기 위해 탈염을 위해 수거하였다 (90 min 샘플은 교환 반응을 중지시키기 위해서 초기에 얼음 상에 두었다). 샘플을 제바 96-웰 탈염 플레이트 (7k, cat# 89808, 써모 피셔 사이언티픽)를 이용하여 탈염하였다. 24시간 샘플들을 24시간 인큐베이션 후에 따로 탈염하였다.
- [0419] 항체 샘플의 연속 희석액 (90 min 및 5시간 샘플에 대해 3배 희석액 내의 총 항체 농도 10 - 0.123 μ g/ml; 24시간 샘플에 대해 3배 희석액 내의 10 - 0.041 μ g/ml)을 실시예 7에 기재된 바와 같이 이중특이적 결합을 측정하기 위해 샌드위치 ELISA에 사용하였다. 각각의 플레이트에 대해, IgG1-2F8-ITL과 IgG4-7D8-CPPC 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환으로부터 유래된 이중특이적 항체의 정제된 군 (실시에 15에 기재된 바와 같이)의 대조군을 포함시켰다. 도 34(a)-(f)는 개개의 ELISA 플레이트에서 측정된 이중특이적 결합의 결과를 보여준다. 최고 OD405 값 (ELISA에서 10 μ g/ml 농도에 대해 결정된)을 임의로 100%로 설정된 대조군에 비해 이중특이적 결합을 계산하기 위해 사용하였다. 이를 통해 각각의 2-MEA 농도에 대해 도 34(a)-(d)에서 제시된 바와 같이 대조군에 비해 제어된 Fab-아암 교환 비율 (% cFAE)을 얻었다.
- [0420] 데이터는 이중특이적 결합의 최대 수준 (대조군에 대해 89-109%)이 모든 온도-시간 조건에서 두 IgG 농도에 대해 100 mM 2-MEA의 농도에서 도달하였음을 보여준다. 50 mM 2-MEA에서, 최대 결합 (88-107%)은 25°C 및 37°C 및 또한 15°C에서 24시간 인큐베이션 후에 달성되었다. 25 mM 및 10 mM 2-MEA의 보다 낮은 농도에 대해, 교환은 보다 높은 온도에서 더 효율적이었고, 긴 인큐베이션 시간에서 증가하여, 25 mM 2-MEA에서 24시간 인큐베이션시에 37°C에서 최대 교환을 유도하였다. 10 mM 2-MEA에서 시험된 어떠한 조건도 100% 이중특이적 생성물을 생성하지 않았다. 교환 과정은 20 mg/ml 총 IgG에 비해 10 mg/ml의 IgG 농도에서 약간 더 빨랐다.
- [0421] 이중특이적 항체가 형성되었는지 확인하고 이중특이적 생성물을 보다 상세하게 연구하기 위해서, 샘플을 양이온 교환 (HPLC-CIEX) 분석으로 분석하였다. HPLC-CIEX 분석을 5시간 및 24시간 인큐베이션 후의 20 mg/ml의 IgG 농도 및 모든 2-MEA 농도를 사용하여 샘플에 대해 실시예 31에 기재된 바와 같이 수행하였다.
- [0422] 도 35(a)-(d)의 CIEX 크로마토그램은 이중특이적 생성물의 최고 수율이 50 및 100 mM 2-MEA에서 얻어짐을 보여주고, 이것은 이중특이적 ELISA의 결과를 확인해준다. 그러나, 소량의 잔류 동종이량체가 50 및 100 mM 2-MEA에서 계속 검출되었다 (25°C 및 37°C에서 인큐베이션된 샘플에 대해 2 - 3.5%의 각각의 동종이량체). 보다 높은 온도, 보다 긴 (24시간) 인큐베이션 시간 및 증가하는 2-MEA 농도에서의 교환은 CIEX 프로파일에서 22-24 min에서의 추가의 피크의 출현을 유발한다.
- [0423] 최소량의 추가의 피크는 교환이 5시간 내에 종료될 때 얻어졌다. 상기 피크의 특성을 확인하기 위해, SDS-PAGE 분석 및 HP-SEC 분석을 수행하였다. HP-SEC는 응집체의 양이 모든 조건에 대해 1% 미만임을 보여주고, 이것은 추가의 피크가 응집체를 나타내지 않음을 시사한다. 그러나, 비-환원 SDS-PAGE는 추가의 피크가 하나 또는 2개의 경쇄가 결합된 이중이량체를 제시할 수 있음을 나타내었다. 소량의 1/2-분자도 검출되었다.
- [0424] 실험은 교환 반응이 높은 동종이량체 농도에서 발생하고 (이것은 공정을 상업적 규모에서 매력적인 것으로 만든다), 이중특이적 항체의 수율이 2-MEA 농도, 온도 및 인큐베이션 시간에 따라 결정됨을 보여준다.
- [0425] 실시예 35: IgG1-K409R과 함께 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 참여하기 위한 IgG1 368 위치의 결정자

[0426] 실시예 28 및 29는 위치 F405 및 Y407의 특정 단일 돌연변이가 IgG1-K409R과 조합될 때 인간 IgG1이 Fab-아암 교환에 참여할 수 있도록 하기에 충분함을 보여준다. 본 실시예에서 입증되는 바와 같이, CH3 도메인 내의 Fc:Fc 계면 위치에 관련되는 추가의 결정자는 또한 Fab-아암 교환 메카니즘을 매개할 수 있다. 상기 효과에 IgG1 368 위치의 돌연변이 유발을 수행하고, 돌연변이체를 인간 IgG1-K409R과 함께 2-MEA-유도 Fab-아암-교환의 참여에 대해 시험하였다. 모든 가능한 IgG1-2F8-L368X 돌연변이체 (C 및 P를 제외한)를 IgG1-7D8-K409R과 조합하였다. 절차를 실시예 19에 기재된 바와 같이 정제된 항체를 사용하여 수행하였다.

[0427] 도 36은 IgG1-2F8-L368X x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 시의 이중특이적 결합의 결과를 보여준다. 이들 데이터는 또한 표 8에 제시된 바와 같이 (-) Fab-아암 교환 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간 또는 (++) 높은 Fab-아암 교환으로서 평가되었다. Fab-아암 교환 부재 (-)는 IgG1-2F8의 368 위치가 L (= 야생형 IgG1), F 또는 M일 때 발견되었다. Fab-아암 교환은 IgG1-2F8의 368 위치가 Y일 때 낮은 (+/-) 것으로 밝혀졌다. Fab-아암 교환은 IgG1-2F8의 368 위치가 K일 때 중간 (+)이고, IgG1-2F8의 368 위치가 A, D, E, G, H, I, N, Q, R, S, T, V, 또는 W일 때 높은 (++) 것으로 밝혀졌다. 상기 데이터는 IgG1 368 위치의 특정 돌연변이가 IgG1-K409R과 조합될 때 IgG1이 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 참여하도록 할 수 있음을 나타낸다.

표 8

IgG1-2F8-L368X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환.
IgG1-2F8-L368X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시험관내 Fab-아암 교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 샌드위치 ELISA에 의해 결정하였다.
 (-) 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간 또는 (++) 높은 Fab-아암 교환.

IgG1-2F8-L368X	Fab-아암 교환 Fab-아암 교환 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	++
H	++
I	++
K	+
L	-
M	-
N	++
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++

[0428]

[0429] 실시예 36: IgG1-K409R과 함께 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 참여하기 위한 IgG1 370 위치의 결정자

[0430] 실시예 28, 29 및 35는 위치 F405, Y407 또는 L368에서의 특정 단일 돌연변이가 IgG1-K409R과 조합될 때 인간 IgG1이 Fab-아암 교환에 참여할 수 있도록 하기에 충분함을 보여준다. 본 실시예에서 입증되는 바와 같이, CH3 도메인 내의 Fc:Fc 계면 위치에 관련되는 추가의 결정자는 또한 Fab-아암 교환 메카니즘을 매개할 수 있다. 상기 효과에 IgG1 370 위치의 돌연변이 유발을 수행하고, 돌연변이체를 인간 IgG1-K409R과 함께 2-MEA-유도 Fab-아암-교환의 참여에 대해 시험하였다. 모든 가능한 IgG1-2F8-K370X 돌연변이체 (C 및 P를 제외한)를 IgG1-7D8-K409R과 조합하였다. 절차를 실시예 19에 기재된 바와 같이 정제된 항체를 사용하여 수행하였다.

[0431] 도 37은 IgG1-2F8-K370X x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 시의 이중특이적 결합의 결과를 보여준다. 상기 데이터는 또한 표 9에 제시된 바와 같이 (-) Fab-아암 교환 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간 또는 (++) 높은 Fab-아암 교환으로서 평가된다. Fab-아암 교환 부재 (-)는 IgG1-2F8의 370 위치가 K (= 야생형 IgG1), A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, T, V 또는 Y일 때 발견되었다. 단지 K370의 W에 의한 치환만이 중간 Fab-아암 교환 (+)을 유발하였다. 상기 데이터는 IgG1 370 위치의 하나의 돌연변이 (K370W)만이 IgG1-

K409R과 조합될 때 IgG1이 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 참여하도록 할 수 있음을 나타낸다.

표 9

IgG1-2F8-K370X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환.
 IgG1-2F8-K370X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시험관내
 Fab-아암 교환 후의 이중특이적 항체의 생성을 샌드위치 ELISA에 의해 결정하였다.
 (-) 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간 또는 (++) 높은 Fab-아암 교환.

	Fab-아암 교환
IgG1-2F8-K370X	x IgG1-7D8-K409R
A	-
D	-
E	-
F	-
G	-
H	-
I	-
K	-
L	-
M	-
N	-
Q	-
R	-
S	-
T	-
V	-
W	+
Y	-

[0432]

[0433] 실시예 37: IgG1-K409R과 함께 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 참여하기 위한 IgG1 399 위치의 결정자

[0434] 실시예 28, 29, 35 및 36은 위치 F405, Y407, L368 또는 K370에서 특정 단일 돌연변이가 IgG1-K409R과 조합될 때 인간 IgG1이 Fab-아암 교환에 참여할 수 있도록 하기에 충분함을 보여준다. 본 실시예에서 입증되는 바와 같이, CH3 도메인 내의 Fc:Fc 계면 위치에 관련되는 추가의 결정자는 또한 Fab-아암 교환 메카니즘을 매개할 수 있다. 상기 효과에 IgG1 399 위치의 돌연변이 유발을 수행하고, 돌연변이체를 인간 IgG1-K409R과 함께 2-MEA-유도 Fab-아암-교환의 참여에 대해 시험하였다. 모든 가능한 IgG1-2F8-D399X 돌연변이체 (C 및 P를 제외함)를 IgG1-7D8-K409R과 조합하였다. 절차를 실시예 19에 기재된 바와 같이 정제된 항체를 사용하여 수행하였다.

[0435] 도 38은 IgG1-2F8-D399X x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 시의 이중특이적 결합의 결과를 보여준다. 상기 데이터는 또한 표 10에 제시된 바와 같이 (-) 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간 또는 (++) 높은 Fab-아암 교환으로서 평가하였다. Fab-아암 교환 부재 (-)는 IgG1-2F8의 399 위치가 D (= 야생형 IgG1), E 및 Q일 때 발견되었다. Fab-아암 교환은 IgG1-2F8의 399 위치가 V일 때 낮고 (+/-), IgG1-2F8의 399 위치가 G, I, L, M, N, S, T 또는 W일 때 중간 (+)인 것으로 밝혀졌다. Fab-아암 교환은 IgG1-2F8의 399 위치가 A, F, H, K, R 또는 Y일 때 높은 (++) 것으로 밝혀졌다. 상기 데이터는 IgG1 399 위치의 특정 돌연변이가 IgG1-K409R과 조합될 때 IgG1이 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 참여하도록 할 수 있음을 나타낸다.

표 10

IgG1-2F8-D399X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환.
 IgG1-2F8-D399X 돌연변이체와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 시퀀스내
 Fab-아암 교환 후의 이종특이적 항체의 생성을 샌드위치 ELISA에 의해 결정하였다.
 (-) 부재, (+/-) 낮은, (+) 중간 또는 (++) 높은 Fab-아암 교환.

IgG1-2F8-D399X	Fab-아암 교환 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	-
E	-
F	++
G	+
H	++
I	+
K	++
L	+
M	+
N	+
Q	-
R	++
S	+
T	+
V	+/-
W	+
Y	++

[0436]

[0437]

실시예 38: 고도로 효율적인 IgG1 돌연변이체를 구별하기 위해 2-MEA-유도 Fab-아암 교환이 최적 미만으로 발생하는 조건 범위의 결정

[0438]

2-MEA-유도 Fab-아암 교환의 과정은 25 mM 2-MEA가 사용될 때 37°C에서 효율적으로 발생한다. 상기 조건 하에서, 대부분의 허용성 IgG1 돌연변이체 (실시예 19, 28, 29, 및 35-37에 기재된 바와 같이 위치 368, 370, 399, 405 및 407 및/또는 409에 특정 단일 돌연변이를 갖는 IgG1)는 높은 수준의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 (80% - 100%)을 보인다. 최고 효율을 갖는 IgG1 돌연변이체의 구별을 가능하도록 하는 실험 조건을 확인하기 위해, 4개의 상이한 돌연변이체 조합 (IgG1-2F8-F405S x IgG1-7D8-K409A, IgG1-2F8-D399R x IgG1-7D8-K409G, IgG1-2F8-L368R x IgG1-7D8-K409H 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R)에 대한 2-MEA-유도 Fab-아암 교환을 각각 15°C 및 20°C에서 경시적으로 연구하였다. 온도, 기간 및 항체 희석액 (20, 2, 0.2 및 0.02 µg/ml) 변화와 무관하게, 절차는 실시예 19에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0439]

20°C에서, 4개의 돌연변이체 조합의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환이 최대 교환 (양성 대조군)에 비해 상이한 속도로 발생하였다. 105 min 인큐베이션 후에, IgG1-2F8-L368R x IgG1-7D8-K409H는 최대 교환 수준에 도달한 반면, IgG1-2F8-F405S x IgG1-7D8-K409A, IgG1-2F8-D399R x IgG1-7D8-K409G 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R은 200 min 후에 각각 최대치의 90%, 85% 및 85%에 도달하였다.

[0440]

15°C에서 상이한 IgG1 돌연변이체 조합의 인큐베이션은 가장 현저한 교환 속도 차이를 보였다 (도 39에 제시됨). 4개의 돌연변이체 조합에서 2-MEA-유도 Fab-아암 교환의 차이는 60 및 105 min 인큐베이션 후에 가장 컸다. 200 min 인큐베이션 후의 Fab-아암 교환은 양성 대조군에 비해 100% (IgG1-2F8-L368R x IgG1-7D8-K409H), 85% (IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 및 IgG1-2F8-D399R x IgG1-7D8-K409G) 또는 65% (IgG1-2F8-F405S x IgG1-7D8-K409A)의 효율을 보였다.

[0441]

실시예 39: 최적 미만 조건에서 돌연변이체의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 효율의 분석

[0442]

2-MEA-유도 Fab-아암 교환의 과정은 25 mM 2-MEA가 사용될 때 37°C에서 효율적으로 발생한다. 상기 조건 하에서, 대부분의 허용성 IgG1 돌연변이체 (실시예 19, 28, 29, 및 35-37에 기재된 바와 같이 위치 368, 370, 399, 405 및 407 및/또는 409에 특정 단일 돌연변이를 갖는 IgG1)는 높은 수준의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 (80-100%)을 보인다. 실시예 38에서, 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 효율의 차이는 소위 최적 미만 조건, 즉 60 내지 105 min 동안 15°C에서 인큐베이션 후에 가장 현저하다고 설명되었다. IgG1-7D8-K409R (실시예 28, 29, 및 35-37)을 사용한 >90% 2-MEA-유도 Fab-아암 교환을 보이는, L368, D399, F405 및 Y407에서의 총 24개의 IgG1-

2F8 돌연변이체 (표 11 참조)를 선택하고, IgG1-7D8-K409A, G, H 또는 R (실시예 19에 보고된 결과를 기초로 함)을 사용한 Fab-아암 교환 분석에 적용하였다. 상기 돌연변이체 조합을 이중특이적 항체를 생성하는 효율에 대해 분류하기 위해, 2-MEA-유도 Fab-아암 교환을 15°C에서 90 min 동안 (최적 미만 조건) 수행하였다. IgG1-7D-K409R (실시예 29 및 37)을 사용한 인큐베이션 후에 약한 2-MEA-유도 Fab-아암 교환을 보인 2개의 IgG1-2F8 돌연변이체 (Y407Q 및 D399Q)를 추가의 음성 대조군으로서 함께 사용하고, K409 위치의 또 다른 아미노산 (G, H, 또는 W)을 사용한 인큐베이션이 상이한 결과를 유발하는지 연구하기 위해 사용하였다. 온도 변화 및 항체 희석액의 변화 (20, 2, 0.2 및 0.02 µg/ml)과 무관하게, 절차를 실시예 19에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0443]

모든 상이한 IgG1 돌연변이체 조합 (표 11로부터 분명히 알 수 있는)의 15°C에서 90 min 동안의 인큐베이션은 다양한 상이한 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 효율을 보였다. 20 µg/ml의 항체 농도에서 이중특이적 결합의 결과를 표 11에 제시한다. 결과를 다음과 같이 4 클래스로 분류한다; 표 11의 아래에 제시된 기호의 설명에 구체적으로 제시된 바와 같이 부재 (-), 낮은 (+/-), 중간 (+) 및 높은 (++) 이중특이적 결합 효율. 상기 결과로부터, 최적 미만의 조건 하에서 IgG1 분자의 아미노산 돌연변이의 몇몇의 조합이 2-MEA-유도 Fab-아암 교환에 유리할 것임이 분명해진다.

표 11

15°C에서 90 min 동안 허용성 IgG1 돌연변이체 (20 µg/ml) 사이의 이중특이적 결합 (양성 대조군에 대한 %)

Fab-아암 교환	IgG1-7D8-K409A	IgG1-7D8-K409G	IgG1-7D8-K409R	IgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-L368A	33	33	25	37
IgG1-2F8-L368D	49	50	41	54
IgG1-2F8-L368E	32	38	37	42
IgG1-2F8-L368G	46	53	44	53
IgG1-2F8-L368H	26	25	21	29
IgG1-2F8-L368N	47	52	43	54
IgG1-2F8-L368R	55	64	52	91
IgG1-2F8-L368S	39	45	37	53
IgG1-2F8-L368T	42	51	39	56
IgG1-2F8-L368V	42	49	33	51
IgG1-2F8-L368W	56	56	41	60
IgG1-2F8-D399F	13	15	14	15
IgG1-2F8-D399H	12	14	10	19
IgG1-2F8-D399K	40	43	34	46
IgG1-2F8-D399R	47	45	38	52
IgG1-2F8-D399Q	0	0	0	0
IgG1-2F8-F405I	32	49	39	60
IgG1-2F8-F405K	29	48	47	40
IgG1-2F8-F405L	31	44	39	46
IgG1-2F8-F405S	34	51	45	39

[0444]

IgG1-2F8-F405T	35	47	42	46
IgG1-2F8-F405V	36	46	37	43
IgG1-2F8-F405W	17	20	16	18
IgG1-2F8-Y407L	44	41	49	49
IgG1-2F8-Y407W	48	53	47	62
IgG1-2F8-Y407Q	4	9	1	44

표 11에서의 범례
이중특이적 결합 부재 (0-3%) (-)
낮은 (4-39%) 이중특이적 결합 (+/-)
중간 (40-69%) 이중특이적 결합 (+)
높은 (70-100%) 이중특이적 결합 (++)

[0445]

[0446]

시험된 돌연변이된 IgG1-2F8 분자 (표 11)로부터, 이전에 얻은 결과 (표 11)를 확인하기 위한 제2 분석을 위해 6개를 선택하였다. 몇몇의 돌연변이체는 높은 (IgG1-2F8-L368R) 및 중간 (IgG1-2F8-L368W, IgG1-2F8-F405I, IgG1-2F8-F405L 및 IgG1-2F8-Y407W) 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 효율에 대해 선택되었다. 또한, IgG1-2F8-Y407Q는 IgG1-7D8-K409H와 예상치 못한 양성 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 반응을 보였기 때문에 다시 분석하였다. 일반적으로, 도 40에 제시된 상기 결과는 1차 분석 (표 11)을 확인해주고, 돌연변이된 IgG1-2F8 분자의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 반응을 보여주고, IgG1-7D8-K409H가 최고 효율을 보였다. 또한, 실시예 28, 29, 및 35-37에서 음성으로 보고된, 돌연변이된 IgG1-2F8 분자와 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암 교환 반응은 IgG1 2-MEA-유도 Fab-아암 교환을 잠재적으로 촉진하는 것으로 계속 관심을 끌고 있다.

[0447]

실시예 40: 길항성 c-Met 항체를 일가, 이중특이적 포맷으로 전환하는, 상기 항체의 비바람직한 효능 활성을 제거하기 위한 이중특이적 포맷의 사용

[0448]

모노클로날 항체 요법을 위해 개발된 몇몇의 이가 항체는 그의 표적에 대한 결합시에 바람직하지 않은 효능 활성을 보인다. 이것은 또한 수용체 티로신 키나제 c-Met를 표적화하는 대부분의 IgG1 기반 항체에 대해 적용된다. 상기 효능 항체는 수용체 이량체화, 이어서 몇몇 하류 신호전달 경로의 활성화를 유도한다. 그 결과, (종양) 세포의 성장 및 분화가 유도된다. 일가 항체 포맷을 사용하면 수용체 이량체화의 유도를 방지할 수 있다. 항-c-Met 항체 Fab-아암을 무관한 항체의 Fab-아암과 조합하면, 기능적으로 일가이고 따라서 완전히 길항성인 이중특이적 항체가 생성된다. 여기서, 본 발명자들은 이중특이적 항체에 부분- (IgG1-069) 또는 전체 (IgG1-058) 효능 항체를 IgG1-b12 (문헌 [Burton DR, et al., "Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody", Science. 1994 Nov 11; 266(5187): 1024-1027]에 처음 기재됨)와 조합하였다. IgG1-b12는 바이러스 단백질 (HIV-gp120)에 대해 생성되기 때문에 무관한 비-결합 항체로서 간주되었다. 본 실시예에서 사용되는 항-c-Met 항체는 트랜스제닉 마우스에서 생성된 완전 인간 모노클로날 항체이다. IgG1-058 및 IgG1-069는 c-Met 상의 상이한 에피토프에 결합한다.

[0449]

사용되는 2개의 항-c-Met 항체는 추가로 개시되는 바와 같이 그의 Fc 영역이 변형된 IgG1, κ 항체이다. 이들은 다음 중쇄 및 경쇄 가변 서열을 갖는다.

058:

VH 058	EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYW VRQTPEKRLEWVATISDDGSYTYYPDSVKGRFTISR NAKNNLYLQMSLSKSEDTAMYYCAREGLYYGSGSY YNQDYWGQGLTVTVSS
VL 058	AIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGLSSALAWYR QKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQFTSYPIITFGQGRLEIK

069:

VH 069	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFSTYGISW VRQAPGHGLEWMGWISAYNGYNTYAQKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDY WGQGLTVTVSS
VL 069	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWF QHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGRLEIK

[0450]

[0451]

수용체 인산화

[0452]

일가 이중특이적 c-Met 항체를 25 mM 2-MEA를 사용하여 실시예 23에 기재된 바와 같이 IgG1-058-F405L 또는 IgG1-069-F405L 및 IgG1-b12-K409R의 Fab-아암 교환 반응에 의해 생성하였다. c-Met 인산화에 대한 이중특이적 항체의 효과를 평가하였다. 천연 리간드 HGF에 의한 또는 효능작용 이가 항체에 의한 2개의 인접한 c-Met 수용체의 이량체화시에, c-Met의 세포내 도메인 내의 3개의 티로신 잔기 (위치 1230, 1234 및 1235)는 교차 인산화된다. 이것은 c-Met의 세포내 도메인 내의 몇몇의 다른 아미노산의 인산화 및 많은 신호전달 캐스케이드의 활성화를 유도한다. c-Met의 이량체화 및 활성화는 항-c-Met 항체의 잠재적인 효능작용의 관독치로서 기능하는, 상기 위치에서 인산화된 수용체에 특이적인 항체를 사용하여 모니터링할 수 있다.

[0453]

ATCC로부터 얻은 CCL-185인 A549 세포를 70% 융합도 (confluency)에 도달할 때까지 혈청 함유 DMEM 배지에서 성장시켰다. 세포를 트립신 처리하고, 세척하고, 혈청 함유 배양 배지에 1x10e6개 세포/웰로 6 웰 배양 플레이트에 플레이팅하였다. 밤새 인큐베이션한 후에, 세포를 HGF (R&D 시스템즈; cat. 294-HG) (50 ng/ml) 또는 항체 패널 (30 µg/ml)로 처리하고, 15 min 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세포를 빙냉 PBS로 2회 세척하고, 프로테아제 억제제 콕테일 (로슈; cat. 11836170001)로 보충된 용해 완충제 (셀 시그널링 (Cell Signaling); cat. 9803)로 용해시켰다. 세포 용해물 샘플을 -80°C에서 보관하였다. 수용체 활성화는 포스포 c-Met 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에서 c-Met 인산화의 검출에 의해 결정하였다. 세포 용해물에 존재하는 단백질을 4-12% SDS-PAGE 겔 상에서 분리하고, 니트로셀룰로스 막으로 이송한 후, 인산화된 c-Met (Y1234/1235) (셀 시그널링, cat: 3129)에 대해 특이적인 항체로 염색하였다. 겔 로딩에 대한 대조군으로서 총 β-액틴 및 c-Met 수준을 항 c-Met (셀 시그널링, Cat. No. 3127) 및 항 β-액틴 (셀 시그널링, Cat. No. 4967) 항체를 사용하여 결정하였다. 웨스턴 블롯 결과를 도 41에 제시한다.

[0454]

조직 배양 배지 대조군 및 항체 5D5 (제넨테크; WO 96/38557)의 일가 포맷 유니바디® (젠맵, W02007059782 및 W02010063785)로 처리된 세포는 임의의 c-Met 수용체 인산화를 보이지 않았다. 여기서 사용된 일가 유니바디 포맷은 힌지 영역이 결실되고 CH3 영역이 위치 405 및 407에서 돌연변이된 IgG4이다. 이와 대조적으로, 양성 대조군 HGF 또는 효능작용 항체 IgG1-058로 처리된 세포의 웨스턴 블롯 분석은 인산화된 c-Met의 예상된 높이에서 분명한 밴드를 보였다. 부분적인 효능작용 항체 IgG1-069는 보다 작지만 검출가능한 수용체 인산화를 보였고, 이것은 수용체의 몇몇의 가교결합이 발생하였음을 나타낸다. 그러나, 두 이중특이적 IgG1 058/b12 및 이중 특이적 069/b12 항체는 c-Met 인산화를 전혀 유도하지 않았고, 이것은 모 항체와 연관된 효능 활성이 완전히 부재함을 보여준다 (도 41).

[0455]

시험관 내에서 NCI-H441 증식에 대한 c-Met 항체의 효과

[0456]

c-Met 항체의 잠재적인 증식 효능 활성을 폐 선암종 세포주 NCI-H441 (ATCC, HTB-174™)에서 시험관 내에서 시험하였다. 상기 세포주는 높은 수준의 c-Met를 발현하지만, 그의 리간드 HGF를 생산하지 않는다. NCI-H441 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트 (그라이너 바이오-원, 독일 프릭켄하우젠) (5,000개 세포/웰)에 혈청이 없는 RPMI (론자)에 접종하였다. 항 c-Met 항체를 혈청이 없는 RPMI 배지 내에 66.7 nM로 희석하고, 세포에 첨가하였다. 37°C/5% CO₂에서 7일 인큐베이션한 후, 생존가능 세포의 양을 제조자의 지시에 따라 알라마르블루 (바이오소스 인터내셔널 (BioSource International, 미국 샌프란시스코))로 정량하였다. 표준 알라마르블루 설정의 엔비전 (EnVision) 2101 멀티라벨 (Multilabel) 관독기 (퍼킨엘머 (PerkinElmer, 핀란드 터쿠))를 사용하여 형광을 모니터링하였다.

- [0457] IgG1-069와 반대로, 도 42에 도시된 바와 같이 NCI-H441 세포를 이중특이적 IgG1-069/b12와 인큐베이션한 경우에는 증식이 유도되지 않았다. 또한, 유니바디-069 대조군은 증식을 유도하지 않았고, 이것은 비처리 또는 IgG1-b12 처리시와 대등하였다.
- [0458] **실시예 41: 인간 IgG1-2F8-F405L 또는 IgG1-7D8-F405L 및 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체에 의한 CDC-매개 세포 사멸**
- [0459] CD20 항체 IgG1-7D8은 보체-의존성 세포독성 (CDC)에 의해 CD20-발현 세포를 효율적으로 사멸시킬 수 있다. 이와 대조적으로, EGFR 항체 IgG1-2F8은 EGFR을 발현하는 표적 세포에 대해 CDC를 매개하지 않는다. IgG1-7D8-K409R, 및 IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체들 모두는 CD20-발현 세포에 대해 CDC를 유도할 수 있다 (실시예 26에 기재된 바와 같이). IgG1-7D8-F405L과 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체가 CD20 발현 세포에 대해 CDC를 유도할 수 있는지 시험하였다. 10^5 개의 다우디 또는 라지 세포를 실온에서 진탕기 내에서 0.1% BSA로 보충된 100 μ l RPMI 배지 내에서 항체의 일련의 농도와 함께 15 min 동안 예비-인큐베이션하였다. 25 μ l 정상 인간 혈청 (NHS)을 보체의 공급원 (20% NHS 최종 농도)으로서 첨가하고, 45 min 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 플레이트를 얼음 상에 두어 CDC 반응을 중지시켰다. 죽은 및 생존가능 세포는 10 μ l의 10 μ g/ml 아이오딘화프로피듐 (PI) (0.6 μ g/ml 최종 농도)을 첨가하고 FACS 분석에 의해 구별하였다.
- [0460] 도 43은 IgG1-7D8, 및 IgG1-7D8-F405L과 IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 생성물이 CD20-발현 다우디 (도 43A) 및 라지 (도 43B)의 CDC-매개 세포 사멸을 유도하는, 동일한 효능을 가짐을 보여준다. 다우디 및 라지 세포들 모두는 EGFR을 발현하지 않고, IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R 사이의 2-MEA-유도 Fab-아암-교환에 의해 생성된 이중특이적 항체의 일가 결합을 유도한다. 상기 이중특이적 생성물도 약간 덜 효율적이지만 CDC 매개 세포 사멸을 유도하였다. 상기 데이터는 모 항체의 CDC 능력이 이중특이적 포맷에 유지됨을 나타낸다. 이가 이중특이적 생성물 (IgG1-7D8-F405L x IgG1-7D8-K409R)에 의한 CDC 매개 세포 사멸의 유도는 일가 이중특이적 생성물 (IgG2-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R)에 비해 약간 더 효율적이었다. CD20 표적화 11B8 항체는 CDC 매개 세포 사멸을 유도할 수 없고, 음성 대조군으로서 기능한다.
- [0461] **실시예 42: 시험관내 카파-지정 ETA' 사멸 검정에서 시험된 HER2 x HER2 이중특이적 항체**
- [0462] 본 실시예는 HER2 x HER2 이중특이적 항체가 카파-지정 슈도모나스-외독소 A (항-카파-ETA')를 사용한 포괄적인 시험관내 세포-기반 사멸 검정에서 세포독성제를 내재화 후에 종양 세포 내로 전달할 수 있음을 보여준다. 상기 검정은 슈도모나스-외독소 A의 말단절단된 형태에 접합된 고친화도 항-카파 도메인 항체를 이용한다. 항체 결합 단백질 (스트렙토코쿠스 단백질 A 또는 단백질 G로부터의 IgG-결합 모티프) 및 디프테리아 독소 또는 슈도모나스 외독소 A의 유사한 융합 단백질이 문헌에 기재되어 있다 ([Mazor Y. et al., J. Immunol. Methods 2007; 321:41-59], [Kuo SR. et al., 2009 Bioconjugate Chem. 2009; 20:1975-1982]). 이들 분자는 항-카파-ETA'와는 달리 완전 항체의 Fc 부분에 결합하였다. 내재화 및 세포내 이입 분류 (endocytic sorting)시에 항-카파-ETA' 도메인 항체는 단백질 분해 (proteolysis) 및 디설피드-결합 환원을 겪고, 결합 도메인으로부터 촉매 도메인을 분리시킨다. 이어서, 촉매 도메인은 골지체로부터 KDEL 보유 모티프를 통해 소포체로 수송한 후, 단백질 합성을 억제하고 아포토시스를 유도하는 시토졸로 이동한다 (Kreitman RJ. et al., BioDrugs 2009; 23:1-13).
- [0463] 본 실시예 및 다음 실시예 43-45에 사용된 항-HER2 항체는 트랜스제닉 마우스에서 생성된 완전 인간 모노클로날 항체이다. 이들은 HER2 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0464] 이들은 모두 추가로 개시되는 바와 같이 그의 Fc 영역에서 변형된 IgG1, κ 항체이다. 이들은 다음 중쇄 및 경쇄 가변 서열을 갖는다.

005:

VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWGIVRQMPGKGLEWMGS IYPGDSSTRYRPSFQGGVTTISADKSIISTAYLQWTSKASDTAIYYCARQRGD YYYYFGMDVWGQGTITVTVSS
VL 005	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQYGS- LTFGGGTKVEIK

025:

VH 025	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKLEWIGE IHHSNSTNYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYYDS GVYYFDYWAQGTITVTVSS
VL 025	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAA SSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYNSYPITFGQGTR LEIK

153:

VH 153	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSDYVIHWVRQAPGKLEWVTV ISYDGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSAEDTAMYYCARGGI TGTTGVFDYWGQGTITVTVSS
VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYDA SSLQSGVPSRFSGSGYGTDFSLTISLQPEDFAIYYCQYKSYPIITFGQGTRL EIK

169:

VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTNYGISWVRQAPGKLEWMG WLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDR IVVRPDYFDYWGQGTITVTVSS
VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTK VEIK

[0465]

[0466]

HER2 x HER2 이중특이적 항체를 항-카파-ETA'와 예비-인큐베이션한 후, A431 세포와 함께 인큐베이션하였다. A431 세포는 세포당 약 15,000개의 HER2 항체를 발현하고 (퀴피 (Qifi) 분석을 통해 결정함), '네이키드 (naked)' HER2-항체를 사용한 처리에 대해 감수성이 아니다.

[0467]

먼저, 항-카파 -ETA'의 최적 농도, 즉 비특이적 세포 사멸의 유도를 야기하지 않는 최대 허용 용량을 각각의 세포주에 대해 결정하였다. A431 세포 (2500개 세포/웰)를 96-웰 조직 배양 플레이트 (그라이너 바이오-원) 내에 정상 세포 배양 배지에 접종하고, 적어도 4시간 동안 부착시켰다. 이들 세포를 정상 세포 배양 배지에서 항-카파-ETA' 연속 희석액 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 및 0 µg/ml과 함께 인큐베이션하였다. 3일 후에, 생존가능 세포의 양을 제조자의 지시에 따라 알라마르블루 (바이오소스 인터내셔널, 미국 샌프란시스코)로 정량하였다. 형광을 표준 알라마르블루 설정의 엔비전 2101 멀티라벨 판독기 (퍼킨엘머, 핀란드 터쿠)를 사용하여 형광을 모니터링하였다. 그 단독으로 세포를 사멸시키지 않은 항-카파-ETA'의 최고 농도 (A431 세포에 대해 1 µg/ml)를 다음 실험에서 사용하였다.

[0468]

이어서, 항-카파-ETA'와 함께 예비-인큐베이션된 HER2 x HER2 이중특이적 항체 및 HER2 단일특이적 항체의 효과를 세포 사멸을 유도하는 능력에 대해 시험하였다. A431 세포를 상기한 바와 같이 접종하였다. HER2 특이적 항체 (단일특이적 및 이중특이적 항체)의 연속 희석액을 만들고, 30 min 동안 예정된 농도의 항-카파-ETA'와 함께 예비-인큐베이션한 후, 세포에 첨가하였다. 37°C에서 3일 인큐베이션한 후, 생존가능 세포의 양을 상기한 바와 같이 정량하였다. 항체와 함께 예비-인큐베이션된 항-카파-ETA'로 처리된 세포의 알라마르블루 신호를 항체 처리 없이 처리된 세포에 비교하여 그래프로 표시하였다. EC₅₀ 값 및 최대 세포 사멸은 그래프패드 프리즘 (GraphPad Prism) 5 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 스타우로스포린 (23.4 µg/ml)을 세포 사멸에 대한 양성 대조군으로 사용하였다. 이소형 대조군 항체 (IgG1/카파; IgG1-3G8-QITL)는 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0469]

도 44는 모든 항-카파-ETA' 예비-인큐베이션된 HER2 이중특이적 항체가 A431 세포를 용량-의존성 방식으로 사멸시킬 수 있음을 보여준다. 상기 결과는 시험된 대부분의 HER2 이중특이적 항체가 상기 항-카파-ETA' 점점에서 함께 존재하는 단일특이적 항체보다 더 효과적이었음을 입증한다. 또한, 이중특이적 항체 005X169, 025X169 및 153X169의 효능은 상기 시험관내 카파-지정 ETA' 사멸에서 활성이 결여된 단일특이적 항체인 HER2 특이적 항체 169의 효능이 또 다른 HER2 특이적 항체와의 이중특이적 조합을 통해 증가될 수 있음을 보여주었다.

[0470]

실시예 43: 상이한 HER2 에피토프를 표적화하는 이중특이적 항체와의 인큐베이션에 의한 HER2 수용체 하향조정

- [0471] HER2 x HER2 이중특이적 항체는 2개의 공간적으로 상이한 HER2 수용체 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이 때문에 다른 HER2 x HER2 이중특이적 항체가 상기 수용체 상의 남아있는 에피토프에 결합할 수 있다. 이것은 (일가 항체에 의해 유도된 이량체화에 비해) 다가 수용체 가교결합을 유발하고, 따라서 수용체 하향조정을 향상시킬 수 있다. HER2 x HER2 이중특이적 항체가 HER2의 하향조정 증가를 유도하는지 조사하기 위해서, AU565 세포를 3일 동안 항체 및 이중특이적 항체와 함께 인큐베이션하였다. HER2의 총 수준 및 항체 결합 HER2의 수준을 결정하였다.
- [0472] AU565 세포를 24-웰 조직 배양 플레이트 (100,000개 세포/웰) 내의 정상 세포 배양 배지에 접종하고, 10 µg/ml HER2 항체 또는 HER2 x HER2 이중특이적 항체의 존재 하에 3일 동안 37°C에서 배양하였다. PBS로 세척한 후, 세포를 25 µl 슈어파이어 (Surefire) 용해 완충제 (퍼킨 엘머, 핀란드 터쿠)와 함께 실온에서 30 min 동안 인큐베이션함으로써 용해시켰다. 총 단백질 수준은 비신코닌산 (BCA) 단백질 검정 시약 (피어스)을 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여 정량하였다. 용해물 내의 HER2 단백질 수준을 HER2-특이적 샌드위치 ELISA를 사용하여 분석하였다. 토끼-항-인간 HER2 세포내 도메인 항체 (셀 시그널링)를 사용하여 HER2를 포획하고, 비오틴화 염소-항-인간 HER2 폴리클로날 항체 (R&D 시스템즈, 미국 미네아폴리스), 이어서 스트렙타비딘-폴리-HRP를 사용하여 결합된 HER2를 검출하였다. 반응은 2,2'-아지노-비스 3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산 (50 ml ABTS 완충제 내에 희석된 하나의 ABTS 정제 [로슈 다이아그노스틱스 (Roche Diagnostics, 네덜란드 알메레)])을 사용하여 가시화하고, 옥살산 (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), 네덜란드 쿤드레트)으로 중지시켰다. 405 nm에서의 형광을 미량역가 플레이트 판독기 (바이오텍 인스트루먼트 (Biotek Instruments, 미국 위누스키))로 측정하고, HER2의 양을 비처리된 세포에 대한 백분율로서 표현하였다.
- [0473] 그 결과를 도 45에 도시하고, 이것은 모든 시험된 HER2 x HER2 이중특이적 항체는 ≥40% HER2 하향조정을 유도하였음을 입증한다. 흥미롭게도, 모든 HER2 x HER2 이중특이적 항체는 그의 단일특이적 대응물 둘 모두에 비해 증가된 HER2 하향조정을 입증하였다.
- [0474] **실시예 44: 공초점 현미경에 의해 분석한 리소솜 마커 LAMP1을 사용한 HER2 x HER2 이중특이적 항체의 공동 국지화**
- [0475] 실시예 43에 기재된 바와 같은 HER2 하향조정 검정은 HER2 x HER2 이중특이적 항체가 HER2의 리소솜에 의한 분해를 증가시킬 수 있음을 나타내었다. 상기 발견을 확인하기 위해, 공초점 현미경 기술을 적용하였다. AU565 세포를 3일 동안 37°C에서 유리 커버슬립 (두께 1.5 마이크로미터, 씨모 피셔 사이언티픽, 독일 브라운슈바이크) 상의 표준 조직 배양 배지에서 성장시켰다. 세포를 리소솜 활성을 차단하기 위해 1시간 동안 류펩틴 (시그마)과 함께 예비-인큐베이션한 후, 10 µg/ml HER2 단일특이적 항체 또는 HER2 x HER2 이중특이적 항체를 첨가하였다. 세포를 추가로 3 또는 18시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 PBS로 세척하고, 4% 포름알데히드 (클리니패스 (Klinipath))와 함께 30 min 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 슬라이드를 차단 완충제 (0.1% 사포닌 [로슈] 및 2% BSA [로슈]로 보충된 PBS)로 세척하고, 포름알데히드를 켜기 위해 20 mM NH₄Cl를 함유하는 완충제와 함께 20 min 동안 인큐베이션하였다. 슬라이드를 다시 차단 완충제로 세척하고, 리소솜을 염색하기 위해 마우스-항-인간 CD107a (LAMP1) (비디 파밍겐 (BD Pharmingen))과 함께 실온에서 45 min 동안 인큐베이션하였다. 차단 완충제로 세척한 후, 슬라이드를 2차 항체인 염소-항-마우스 IgG-Cy5 (잭슨) 및 염소-항-인간 IgG-FITC (잭슨)의 각테일과 함께 30 min 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 슬라이드를 차단 완충제로 다시 세척하고, 20 µl 봉입 매질 (mounting medium)을 사용하여 현미경 슬라이드 상에 밤새 봉입하였다 (6 g 글리세롤 [시그마] 및 2.4 g 모위올 (Mowiol) 4-88 [옵닐라보])을 6 ml 증류수에 용해시키고, 12 ml 0.2M 트리스 [시그마] (pH 8.5)를 첨가한 후, 10 min 동안 50-60°C에서 인큐베이션하였다. 봉입 매질을 분취하여 -20°C에서 보관하였다). 63x 1.32-0.6 유침 대물 렌즈 및 LAS-AF 소프트웨어가 장착된 레이카 SPE-II 공초점 현미경 (레이카 마이크로시스템즈 (Leica Microsystems))으로 슬라이드의 영상을 찍었다. 중복되는 화소 강도를 정량하기 위해, 화소의 채도를 방지하여야 한다. 따라서, FITC 레이저 강도를 10%로 감소시키고, 스마트 게인 (smart gain)을 830 V로 설정하고, 스마트 오프셋을 -9.48%로 설정하였다. 상기 설정을 사용함으로써, 이중특이적 항체는 화소 채도 없이 분명하게 가시화되었지만, 단일특이적 항체는 때로 검출이 곤란하였다. 단일특이적 및 이중특이적 항체 사이의 리소솜 공동 국지화를 비교하기 위해, 상기 설정을 모든 분석된 공초점 슬라이드에 대해 동일하게 유지하였다.
- [0476] 12-비트 영상을 메타모프 (MetaMorph)[®] 소프트웨어 (버전 메타 시리즈 (Meta Series) 6.1, 몰레큘라 디바이시스 인크 (Molecular Devices Inc, 미국 캘리포니아주 서니빌))를 사용하여 공동 국지화에 대해 분석하였다. FITC 및 Cy5 영상을 스택 (stack)으로 도입하고, 배경을 공제하였다. 동일한 역치 설정을 모든 FITC 영상 및

모든 Cy5 영상에 대해 사용하였다 (수동으로 설정함). 공동 국지화는 중복 영역 (ROI) 내의 FITC의 화소 강도로서 도시하였고, 여기서 ROI는 모든 Cy5 양성 영역으로 이루어진다. 몇몇의 HER2 항체 또는 HER2 x HER2 이중특이적 항체로 염색된 상이한 슬라이드를 비교하기 위해, 영상을 Cy5의 화소 강도를 사용하여 정규화하였다. 염소-항-마우스 IgG-Cy5를 사용하여 리소솜 마커 LAMP1 (CD107a)을 염색하였다. LAMP1의 화소 강도는 다양한 HER2 항체 또는 시험된 HER2 x HER2 이중특이적 항체 사이에서 상이하지 않아야 한다 (하나의 세포는 약 200,000의 Cy5의 화소 강도를 가졌다).

[0477] FITC 및 Cy5의 공동 국지화에 대한 정규화된 값 = [(TPI-FITC x FITC-Cy5 공동 국지화 백분율)/100] x [200,000/TPI-Cy5]

[0478] 상기 식에서, TPI는 총 화소 강도이다.

[0479] 다양한 단일특이적 HER2 항체 및 HER2 x HER2 이중특이적 항체에 대해 Cy5와 중복되는 FITC 화소 강도에 의해 측정된 생존가능 세포의 비율을 제시한다. 도시된 각각의 항체 또는 이중특이적 분자에 대해, 3개의 상이한 영상을 약 1, 3 또는 >5 세포를 함유하는 하나의 슬라이드로부터 분석하였다. 유의한 변이가 각각의 슬라이드 내의 상이한 영상 사이에서 관찰되었다. 그러나, 모든 HER2 x HER2 이중특이적 항체는 그의 단일특이적 대응물과 비교할 때 리소솜 마커 LAMP1을 사용한 공동 국지화의 증가를 보임이 분명하였다. 상기 결과는 일단 내재화된 후에, HER2 x HER2 이중특이적 항체는 리소솜 구획을 향해 효율적으로 분류되고, 이에 의해 이들 항체는 이중특이적 항체 약물 접합체 방법에 적합하게 됨을 나타낸다.

[0480] **실시예 45: HER2 단일특이적 또는 HER2 X HER2 이중특이적 항체와 함께 인큐베이션시에 AU565 세포 증식의 억제**

[0481] HER2 이중특이적 항체를 시험관 내에서 AU565 세포의 증식을 억제하는 그들의 능력에 대해 시험하였다. AU565 세포 상에서의 높은 HER2 발현 수준 때문에 (퀴피-키트에 의해 결정시에 약 1,000,000 카피/세포), HER2는 상기 세포에서 구성적으로 활성화되고, 따라서 리간드-유도 이중이량체화에 의존하지 않는다. 96-웰 조직 배양 플레이트 (그라이너 바이오-원, 독일 프리켄하우젠)에서, 웰당 9,000개의 AU565 세포를 무혈청 세포 배양 배지 내에 10 µg/ml HER2 항체 또는 HER2 x HER2 이중특이적 항체의 존재 하에 접종하였다. 대조군으로서, 세포를 항체 또는 이중특이적 항체가 없는 무혈청 배지에 접종하였다. 3일 후에, 생존가능 세포의 양을 알라마르블루 (바이오소스 인터내셔널, 미국 샌프란시스코)를 제조자의 지시에 따라 사용하여 정량하였다. 표준 알라마르블루 설정의 엔비전 2101 멀티라벨 관독기 (피킨엘머, 핀란드 터쿠)를 사용하여 형광을 모니터링하였다. 항체-처리된 세포의 알라마르블루 신호를 비처리 세포에 대한 백분율로서 그래프로 표시하였다.

[0482] 도 47은 HER2 항체 및 HER2XHER2 이중특이적 항체와 함께 인큐베이션한 후 AU565 세포의 알라마르블루의 형광 강도를 도시한 것이다. 헤르셉틴® (트라스투주맵)은 양성 대조군으로 포함되었고, 문헌 [Juntilla TT. et al., Cancer Cell 2009; 15: 429-440]에 기재된 바와 같이 증식의 억제를 보였다. 모든 HER2 x HER2 이중특이적 항체는 AU565 세포의 증식을 억제할 수 있었다. 이중특이적 항체 IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R 및 IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R은 상기 검정에서 그의 단일특이적 항체 대응물에 비해 더 효과적이었다.

[0483] **실시예 46: Fc 영역에 하나 또는 2개의 FcRn 결합 부위를 함유하는, 이중특이적 IgG1 항체 및 힌지-결실 IgG1 이중특이적 항체에 의한 FcRn 결합의 시험관내 및 생체내 분석.**

[0484] 본 실시예는 비대칭 이중특이적 분자, 즉, 본 발명에 따른 각각의 Fab-아암에 상이한 특징을 갖는 분자의 생성을 예시한다.

[0485] 신생아 Fc 수용체 (FcRn)은 IgG를 분해로부터 보호함으로써 IgG의 긴 혈장 반감기를 책임진다. 항체의 내재화 후에, FcRn은 엔도솜 내의 항체 Fc 영역에 결합하고, 여기서 상호작용은 약산성 환경 (pH 6.0)에서 안정하다. 환경이 중성 (pH 7.4)인 혈장막으로의 재순환시에, 상호작용은 상실되고, 항체는 순환계로 다시 방출된다. 항체의 Fc 영역은 2개의 FcRn 결합 부위 (CH2-CH3 계면에서 각각의 중쇄에 하나)를 함유한다. 항체의 Fc 영역 내의 H435A 돌연변이는 FcRn에 대한 결합이 이루어지지 못하게 만들고 ([Shields, R. L., et al., J Biol Chem, 2001], [Firan, M., et al., Int Immunol, 2001]), 또한 힌지 영역도 FcRn 결합에 영향을 주는 것으로 생각된다 (Kim, J.K., et al., Mol Immunol., 1995). 또한, FcRn에 대한 일가 항체 결합보다 이가 항체의 역할이 효율적인 재순환에서 제시되었다 (Kim, J.K., et al., Scand J Immunol., 1994).

[0486] 본 실시예에서, FcRn 결합가의 영향은 단일 FcRn 결합 부위를 함유하는 비대칭 이중특이적 IgG1 분자에 의해 평가한다. 힌지 영역의 추가의 기여는 비대칭 이중특이적 힌지-결실 IgG1 (Uni-G1) 분자에 의해 평가한다.

[0487] FcRn 결합 부위를 함유하지 않거나 1 또는 2개 함유하는 이중특이적 IgG1 또는 힌지-결실 IgG1 (Uni-G1) 분자의

FcRn 결합을 인간 및 마우스 FcRn ELISA에 의해 측정하였다. 항체 IgG1-2F8-ITL, IgG1-7D8-K409R 및 IgG1-7D8-K409R-H435A 단일특이적 분자를 실시예 2, 3, 4 및 5에 기재된 바와 같이 제조하였다. 힌지-결실 IgG1 분자 Uni-G1-2F8-ITL, Uni-G1-7D8-K409R 및 Uni-G1-7D8-K409R-H435A 단일특이적 분자를 실시예 11에 기재된 바와 같이 제조하였다. 이중특이적 IgG1 분자는 IgG1-2F8-ITL과 IgG1-7D8-K409R 또는 IgG1-7D8-K409R-H435A 분자 사이의 2-MEA 유도된 Fab-아암 교환에 의해 생성되었다. 이중특이적 힌지-결실 IgG1 분자는 Uni-G1-7D8-K409R 또는 Uni-G1-7D8-K409R-H435A와 함께 Uni-G1-2F8-ITL의 인큐베이션에 의해 생산되었다. 단일특이적 및 이중특이적 IgG1 분자 및 힌지-결실 IgG1 분자의 3배 연속 희석액을 스트렙타비딘 코팅 ELISA 플레이트 상에 포획된 비오틴닐화 인간- 또는 마우스-FcRn에 첨가한 후, pH 6.0 및 7.4에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 결합된 항체 및 힌지-결실 IgG1 분자를 접합체로서 양고추냉이 퍼옥시다제-표지된 염소-항-인간 (Fab')₂ 및 기질로서 ABTS를 사용하여 가시화하였다. 그 결과를 EL808-Elisa-판독기를 사용하여 405 nm의 파장에서 광학 밀도로서 측정하였다.

[0488] 도 48은 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 FcRn (a) 및 마우스 FcRn (b)에 대한 일가 또는 이가 IgG1 항체 및 힌지-결실 IgG1 분자의 결합 결과를 보여준다. 예상되는 바와 같이, 시험된 모든 항체, 즉 (이중특이적) IgG1 및 힌지-결실 IgG1 분자 둘 모두는 pH 7.4에서 FcRn (인간 및 마우스 둘 모두의)에 효율적으로 결합하지 않는다. 약산성 조건 (pH 6.0)에서, 단일특이적 IgG1-2F8-ITL 및 IgG1-2F8-ITL 및 IgG1-7D8-K409R로부터 생성된 이중특이적 IgG1은, 인간에 비해 마우스 FcRn에 대해 3배 더 높았지만 FcRn에 대한 이가 결합 효율을 보이고, 이것은 FcRn 결합에 대해 양성 대조군 (IgG1-2F8)과 유사한 것이다. 이것은 ITL 돌연변이 및 K409R이 FcRn에 대한 결합을 방해하지 않음을 나타낸다.

[0489] 2 대 1 대 0 FcRn 상호작용 부위의 분명한 효과는 IgG1 분자의 인간 및 마우스 FcRn에 대한 결합을 pH 6.0에서 비교할 때 관찰될 수 있다 (도 XXA 및 B, pH6, 좌측 패널). IgG1-2F8-ITL, IgG1-7D8-K409R 및 IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R (2개의 FcRn 결합 부위)은 대조군 (IgG1-2F8)과 대등한 수준으로 결합한다. FcRn 결합 부위를 갖지 않는 분자 IgG1-7D8-K409R-H435A는 결합을 전혀 보이지 않는다. 1개의 FcRn 결합 부위를 갖는 분자 IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R-H435A는 2개의 FcRn 결합 부위를 갖는 분자에 비해 중간 정도의 결합을 보인다.

[0490] 도 48(a), pH 6.0, 우측 패널은 힌지-결실 IgG1 분자 (Uni-G1)의 인간 FcRn에 대한 결합을 보여준다. 모든 힌지-결실 분자는 대조군 IgG1 분자 (IgG1-2F8)에 비해 인간 FcRn에 대한 상호작용이 손상되고, 이것은 힌지가 FcRn 결합 ELISA로 평가할 때 FcRn과의 상호작용에 실제로 영향을 줄을 나타낸다. pH 6.0에서 인간 FcRn에 대한 결합을 이들 힌지-결실 분자에 대해 비교할 때, 2 대 1 대 0 FcRn 상호작용 부위의 어떠한 분명한 효과도 관찰할 수 없었다.

[0491] 그러나, 인간 IgG의 마우스 FcRn에 대한 결합이 더 강하기 때문에, 2 대 1 대 0 FcRn 상호작용 부위의 분명한 효과는 pH 6.0에서 마우스 FcRn에 대한 이들 힌지-결실 IgG 분자의 결합을 비교할 때 관찰될 수 있다 (도 48(b), pH 6.0, 우측 패널). Uni-G1-7D8-K409R-H435A/Uni-G1-2F8-ITL (1개의 FcRn 결합 부위)의 결합은 Uni-G1-2F8-ITL, Uni-G1-7D8-409R 및 Uni-G1-2F8-ITL/Uni-G1-7D8-K409R (2개의 FcRn 결합 부위) 및 Uni-G1-2F8-ITL-H435A (0개의 FcRn 결합 부위, 결합 부제)의 결합에 비해 중간 수준이다.

[0492] 실시예 47: 시험관내 세포독성 검정에서 시험된 Her2 x CD3 이중특이적 항체

[0493] CD3은 성숙 T 세포 상에 발현된 T 세포 수용체 복합체 내의 공동-수용체이다. 이중특이적 항체에서 CD3 특이적 항체 Fab-아암과 종양 항원 특이적 항체 Fab-아암의 조합은 T 세포의 종양 세포에 대한 특이적 표적화를 유도하여, T 세포 매개 종양 세포 용해를 유발할 것이다. 이와 유사하게, CD3 양성 T 세포는 신체 내의 다른 이탈 (derailed) 세포에, 감염된 세포에 또는 직접 병원체에 대해 표적화될 수 있다.

[0494] Her2 x CD3 이중특이적 항체를 생성하였다. Her2 특이적 Fab-아암에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 실시예 42의 항체 153 및 169에 대해 나타난 바와 같았다. CD3 특이적 Fab-아암에 대해 다음 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이 사용되었다:

[0495] YTH12.5 (문헌 [Routledge et al., Eur J Immunol. 1991, 21(11): 2717-25]에 기재된 서열).

VH YTH12.5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFPMAWVRQAPGKLEWVSTI STSGGRTYYRDSVKGRFTISRDNLSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQY SGGFDYWGQGLTVVSS
VL YTH12.5	DIQLTQPNVSTSLGSTVKLSCTLSGSGNIENNYVHWYQLYEGRSPPTMIYDD DKRPDGVPDFRFSGSIDRSSNSAFLTIHVAIEDEAIYFCHSYVSSFNVFGGG TKLTVL

[0496]

[0497] huCLB-T3/4 (문헌 [Parren et al., Res Immunol. 1991, 142(9):749-63]에 기재된 서열. 서열을 가장 가까운 인간 배선에 유사하도록 만들기 위해 작은 아미노산 치환이 도입되었다).

VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWRQAPGKGLEWVAT ISRYSRYIYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRPLY GSSPDYWGQGTLVTVSS
VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQAPRLLIYDTSK LASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCFQGSYPLTFGSGTKLEM R

[0498]

[0499] 모든 항체는 다음과 같이, 그의 Fc 영역에서 변형된 IgG1, κ로서 표현되었다: IgG1-Her2-153-K409R 및 IgG1-Her2-153-N297Q-K409R, IgG1-Her2-169-K409R, IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L 및 IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-YTH12.5-F405L 및 IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L.

[0500] 상기 Her2 및 CD3 특이적 항체로부터의 이중특이적 항체를 실시예 11에 기재된 바와 같이 생성하고, AU565 세포를 사용하는 시험관내 세포독성 검정에서 시험하였다.

[0501] AU565 세포를 용합도 근처까지 배양하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, 5분 동안 37°C에서 트립신으로 처리하였다. 12 ml 배양 배지를 첨가하여 트립신을 불활성화시키고, 세포를 5 min 동안 800 rpm에서 원심분리하였다. 세포를 10 ml 배양 배지 내에 재현탁시키고, 세포를 세포 여과기 (cell strainer)를 통과시킴으로써 단일 세포 현탁액을 제조하였다. 100 μl의 5x10⁵개 세포/ml 현탁액을 96-웰 배양 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 플레이트에 부착시키기 위해 적어도 3 hr 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다.

[0502] 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 류코세프 30 ml 튜브를 제조자의 프로토콜 (그라이너 바이오-윈)에 따라 사용하여 건강한 지원자의 혈액으로부터 분리하였다. T 세포는 본래 그대로의 (Untouched) 인간 T-세포 다이내비드 (Dynabead) 키트 (다이날 (Dyna1))를 사용하여 음성 선택에 의해 PBMC 제제로부터 분리하였다. 분리된 세포를 세포 배지 내에 7x10⁶개 세포/ml의 최종 농도로 재현탁시켰다.

[0503] 배양 배지를 부착된 AU565 세포로부터 제거하고, 50 μl/웰의 2x 농축 항체-희석액 및 50 μl/웰의 7x10⁶개 T 세포/ml (이펙터:표적 비 = 7:1)로 교체하였다. 플레이트를 3일 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 상층액을 제거하고, 플레이트를 PBS로 2회 세척하였다. 각각의 웰에, 150 μl 배양 배지 및 15 μl 알라마르 블루를 첨가하였다. 플레이트를 4시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하고, 흡광도를 측정하였다 (엔비전, 퍼킨 엘머).

[0504] 도 49는 대조군 항체 (Her2 단일특이적 IgG1-헤르셉틴, CD3 단일특이적 IgG1-YTH12.5 및 단일특이적 IgG1-huCLB-T3/4, 무관한 항원 단일특이적 IgG1-b12, 및 CD3 x b12 이중특이적 항체)는 T 세포 매개 세포독성을 유도하지 않지만, 이중특이적 (Duo) Her2 x CD3 항체 huCLB/Her2-153, huCLB/Her2-169, YTH12.5/Her2-153 및 YTH12.5/Her2-169는 AU565 세포의 용량 의존 T 세포 매개된 세포독성을 유도하였음을 보여준다. Her2-169 함유 이중특이적 항체는 Her2-153을 함유하는 것보다 더 효능이 컸다.

[0505] 글리코실화 부위를 제거하기 위해 N297Q 돌연변이를 함유하는 IgG1-hu-CLB-T3/4, IgG1-YTH12.5 및 Her2-153의 돌연변이체를 제조하였고; 상기 부위의 글리코실화는 IgG-Fc γ 수용체 상호작용에 매우 중요하다 (Bolt S et al., Eur J Immunol 1993, 23: 403-411). 도 49는 Her2 x CD3 이중특이적 항체 YTH12.5/Her2-153 및 huCLB/Her2-153의 N297Q 돌연변이 및 따라서 Fc 글리코실화의 부재가 AU565 세포의 용량 의존성 T 세포 매개 세포독성을 유도하는 능력에 영향을 주지 않았음을 보여준다.

[발명의 실시양태]

[실시양태 1]

- a) 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 Fc 영역이 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 제1 동종이량체 단백질을 제공하는 단계,
- b) 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 Fc 영역이 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 제2 동종이량체 단백질을 제공하는 단계,
- c) 힌지 영역 내의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 단백질을 상기 제2 단백질과 함께 인큐베이션하는 단계, 및

d) 이중이량체 단백질을 얻는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 상이하고, 이들 서열이, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것인, 이중이량체 단백질을 생성하기 위한 시험관내 방법.

[실시양태 2]

제1 실시양태에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질 및 상기 제2 동종이량체 단백질이 (i) Fc 영역, (ii) 항체, (iii) Fc 영역을 포함하는 융합 단백질, 및 (iv) 전구약물, 펩티드, 약물 또는 독소에 접합된 Fc 영역으로 이루어진 군 중에서 선택된 것인 시험관내 방법.

[실시양태 3]

제1 실시양태에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 전장 항체인 시험관내 방법.

[실시양태 4]

제1 실시양태 내지 제3 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 동종이량체 단백질이 전장 항체인 시험관내 방법.

[실시양태 5]

제1 실시양태 내지 제4 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질이 모두 항체이고, 상이한 에피토프에 결합하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 6]

제1 실시양태 내지 제5 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 제1 동종이량체 단백질의 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군 중에서 선택된 이소형의 것이고, 제2 동종이량체 단백질의 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군 중에서 선택된 이소형의 것인 시험관내 방법.

[실시양태 7]

제1 실시양태 내지 제6 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체 단백질 둘 모두의 Fc 영역이 IgG1 이소형의 것인 시험관내 방법.

[실시양태 8]

제1 실시양태 내지 제7 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 동종이량체 단백질의 Fc 영역 중의 하나가 IgG1 이소형의 것이고, 다른 하나가 IgG4 이소형의 것인 시험관내 방법.

[실시양태 9]

제1 실시양태 내지 제8 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 각각의 동종이량체 상호작용에 비해 이중이량체 상호작용의 강도가 증가된 것이 공유 결합, 시스테인 잔기 또는 하전된 잔기의 도입 이외의 다른 CH3 변형에 의한 것인 시험관내 방법.

[실시양태 10]

제1 실시양태 내지 제9 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 생성되는 이중이량체 단백질 내의 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용이 실시예 13에 기재된 조건 하에 0.5 mM GSH에서 Fab-아암 교환이 발생할 수 없도록 하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 11]

제1 실시양태 내지 제10 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 생성되는 이중이량체 단백질 내의 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용이 실시예 14에 기재된 조건 하에 마우스의 생체 내에서 Fab-아암 교환이 발생하지 않도록 하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 12]

제1 실시양태 내지 제11 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 생성되는 이중이량체 단백질에서 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용이 예를 들어 실시예 30에서 기재된 바와 같이 결정할 때 2개의 동종이량체 상

호작용의 최대치보다 2배 초과, 예컨대 3배 초과, 예를 들어 5배 초과로 더 큰 것인 시험관내 방법.

[실시양태 13]

제1 실시양태 내지 제12 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 생성되는 이중이량체 단백질에서 상기 제1 및 제2 단백질 사이의 이중이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 30에 기재된 바와 같이 검정될 때 0.05 마이크로몰 미만인 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 14]

제1 실시양태 내지 제13 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 두 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 21에 기재된 바와 같이 검정할 때 0.01 마이크로몰 초과, 예컨대 0.05 마이크로몰 초과, 바람직하게는 0.01 내지 10 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 10 마이크로몰, 보다 바람직하게는 0.01 내지 5, 예컨대 0.05 내지 5 마이크로몰, 훨씬 더 바람직하게는 0.01 내지 1 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 1 마이크로몰, 0.01 내지 0.5, 또는 0.01 내지 0.1 마이크로몰이 되도록 하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 15]

제1 실시양태 내지 제14 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 동일하지 않은 위치에 아미노산 치환을 함유하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 16]

제15 실시양태에 있어서, 아미노산 치환체가 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산인 시험관내 방법.

[실시양태 17]

제1 실시양태 내지 제16 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 야생형 CH3 영역에 비해 CH3 영역에 1개 이하의 아미노산 치환을 가지며, 제2 동종이량체 단백질이 CH3 영역에 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 18]

제1 실시양태 내지 제16 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 366, 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 366, 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖고, 이때 상기 제1 동종이량체 단백질 및 상기 제2 동종이량체 단백질이 동일한 위치에서 치환되지 않은 것인 시험관내 방법.

[실시양태 19]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 366, 368, 370, 399, 405, 및 407로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 20]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 21]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 22]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 23]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 24]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 405에 Leu 및 위치 409에 Lys을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 25]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 26]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 405에 Leu 및 위치 409에 Lys을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 27]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 28]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 29]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 370에 Lys, 위치 405에 Phe 및 위치 409에 Arg을 포함하고, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, 위치 370에 Thr 및 위치 405에 Leu을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 30]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 31]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 32]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 33]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr,

Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 34]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp 및 위치 409에 Lys을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 35]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp 및 위치 409에 Lys을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 36]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Arg을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에 Lys을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 37]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Arg을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp 및 위치 409에 Lys을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 38]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 407에 Tyr 및 위치 409에 Arg을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 위치 407에 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp 및 위치 409에 Lys을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 39]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 제2 동종이량체 단백질이

- (i) 위치 368에 Phe, Leu 및 Met 이외의 다른 아미노산, 또는
- (ii) 위치 370에 Trp, 또는
- (iii) 위치 399에 Asp, Cys, Pro, Glu 또는 Gln 이외의 다른 아미노산

을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 40]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Arg, Ala, His 또는 Gly을 가지며, 제2 동종이량체 단백질이

- (i) 위치 368에 Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp, 또는
- (ii) 위치 370에 Trp, 또는
- (iii) 위치 399에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr

을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 41]

제1 실시양태 내지 제18 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Arg을 갖고, 제2 동종이량체 단백질이

- (i) 위치 368에 Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp, 또는

(ii) 위치 370에 Trp, 또는

(iii) 위치 399에 Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr

을 갖는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 42]

제1 실시양태 내지 제41 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역이 명시된 돌연변이를 제외하고 서열 1에 제시된 서열을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 43]

제1 실시양태 내지 제42 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 또는 상기 제2 동종이량체 단백질 중 어느 것도 힌지 영역에 Cys-Pro-Ser-Cys 서열을 포함하지 않는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 44]

제1 실시양태 내지 제43 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체 단백질 둘 모두가 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 45]

제1 실시양태 내지 제44 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질이 임의의 명시된 돌연변이를 제외하고 인간 항체인 시험관내 방법.

[실시양태 46]

제1 실시양태 내지 제45 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질이 중쇄 항체인 시험관내 방법.

[실시양태 47]

제1 실시양태 내지 제46 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체 단백질 둘 모두가 경쇄를 추가로 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 48]

제47 실시양태에 있어서, 상기 경쇄가 상이한 것인 시험관내 방법.

[실시양태 49]

제1 실시양태 내지 제48 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 상기 제2 동종이량체 단백질이 Asn-연결된 글리코실화를 위한 수용 부위를 제거하는 돌연변이를 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 50]

제1 실시양태 내지 제49 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 단계 a) 및 b)에서 제공된 상기 제1 및 제2 동종이량체 단백질이 정제된 것인 시험관내 방법.

[실시양태 51]

제1 실시양태 내지 제50 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 동종이량체 단백질이 약물, 전 구약물 또는 독소에 접합되거나 또는 그에 대한 수용 기를 함유하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 52]

제4 실시양태 내지 제51 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 상기 제2 에피토프가 종양 세포 상에 위치하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 53]

제4 실시양태 내지 제52 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 또는 상기 제2 에피토프가 종양 세포 상에 위치하고, 다른 에피토프가 이펙터 세포 상에 위치하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 54]

제4 실시양태 내지 제53 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 에피토프가 T 세포 상에, 예컨대 T 세포 상에 발현된 CD3 상에 위치하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 55]

제4 실시양태 내지 제52 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 또는 상기 제2 에피토프가 종양 세포 상에 위치하고, 다른 에피토프가, 펩티드 또는 합텐에 임의로 커플링되거나 또는 연결될 수 있는 방사성동위원소, 독소, 약물 또는 전구약물 상에 위치하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 56]

제4 실시양태 내지 제52 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 또는 상기 제2 에피토프가 종양 세포 상에 위치하고, 다른 에피토프가 전자 고밀도 소포 또는 미니세포(minicell) 상에 위치하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 57]

제1 실시양태 내지 제52 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 동종이량체 단백질 둘 모두가 항체이고, 이때 제1 항체 및 제2 항체가 동일한 종양 세포 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 58]

제1 실시양태 내지 제52 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 동종이량체 단백질 둘 모두가 항체이고, 이때 제1 항체가 종양 세포 상의 에피토프에 결합하고, 다른 항체가 의도된 용도를 위해 관련된 임의의 생체내 결합 활성이 없는 무관한 또는 불활성 항체인 시험관내 방법.

[실시양태 59]

제1 실시양태 내지 제58 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서의 환원 조건이 환원제, 예를 들어 2-메르캅토에틸아민, 디티오프레이톨 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 또는 그의 화학적 유도체로 이루어진 군 중에서 선택된 환원제의 첨가를 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 60]

제1 실시양태 내지 제59 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)가 -150 내지 -600 mV, 예컨대 -250 내지 -400 mV의 산화환원 전위를 사용하여 환원 조건 하에 수행되는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 61]

제1 실시양태 내지 제60 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)가 적어도 25 mM 2-메르캅토에틸아민의 존재 하에 또는 적어도 0.5 mM 디티오프레이톨의 존재 하에 적어도 20°C의 온도에서 적어도 90 min 동안의 인큐베이션을 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 62]

제1 실시양태 내지 제61 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 단계 d)가 환원제의 제거, 예를 들어 탈염에 의한 제거를 포함하는 것인 시험관내 방법.

[실시양태 63]

a) 상이한 가변 영역을 갖는 항체를 포함하는 동종이량체 항체의 제1 세트를 제공하는 단계이며, 이때 상기 제1 세트의 상기 항체가 동일한 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,

b) 상이한 가변 영역 또는 동일한 가변 영역을 갖는 항체를 포함하는 동종이량체 항체의 제2 세트를 제공하는 단계이며, 이때 상기 제2 세트의 상기 항체가 동일한 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,

c) 힌지 영역 내의 시스템이 디설피드-결합 이성질체화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 세트의 항체 및 상기 제2 세트의 항체의 조합물을 인큐베이션하여 이중특이적 항체의 세트를 생성하는 단계,

d) 임의로 조건을 비-환원으로 회복시키는 단계,

e) 생성되는 이중특이적 항체의 세트를 제시된 요구되는 특성에 대해 검정하는 단계, 및

f) 요구되는 특성을 갖는 이중특이적 항체를 선택하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 상이하고, 이들 서열이, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사

이의 이종이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것인, 요구되는 특성을 갖는 이종특이적 항체를 선택하는 방법.

[실시양태 64]

제63 실시양태에 있어서, 제2 세트의 동종이량체 항체가 상이한 가변 영역을 갖는 것인 방법.

[실시양태 65]

제63 실시양태에 있어서, 제2 세트의 동종이량체 항체가 동일한 가변 영역을 갖지만, 항원 결합 영역 외부에 상이한 아미노산 또는 구조적 변이를 갖는 것인 방법.

[실시양태 66]

a) 이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 제1 Fc 영역이 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 구축물을 제공하는 단계,

b) 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역을 포함하며 이때 상기 제2 Fc 영역이 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산 구축물을 제공하는 단계,

c) 상기 제1 및 제2 핵산 구축물을 숙주 세포 내에서 동시-발현시키는 단계, 및

d) 이종이량체 단백질을 세포 배양액으로부터 얻는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 상이하고, 이들 서열이, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이고,

이때, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖고/갖거나,

상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 각각의 CH3 영역의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 21에 기재된 바와 같이 검정할 때 0.01 내지 10 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 10 마이크로몰, 보다 바람직하게는 0.01 내지 5, 예컨대 0.05 내지 5 마이크로몰, 훨씬 더 바람직하게는 0.01 내지 1 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 1 마이크로몰, 0.01 내지 0.5, 또는 0.01 내지 0.1이 되도록 하는 것인, 이종이량체 단백질의 생산 방법.

[실시양태 67]

제66 실시양태에 있어서, 상기 제1 CH3 영역이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 CH3 영역이 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산, 예컨대 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산을 갖거나 또는

상기 제1 CH3 영역이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 CH3 영역이 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산을 갖는 것인 방법.

[실시양태 68]

제66 실시양태 또는 제67 실시양태에 있어서, 상기 제1 및 제2 폴리펩티드가 상이한 에피토프에 결합하는 2개의 항체의 전장 중쇄인 방법.

[실시양태 69]

제66 실시양태 내지 제68 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)가 경쇄를 코딩하는 하나 이상의 핵산 구축물을 상기 숙주 세포에서 동시-발현시키는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

[실시양태 70]

제66 실시양태 내지 제69 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 제2 실시양태 내지 제58 실시양태 중 어느 하나 이상의 실시양태의 특징을 추가로 포함하는 방법.

[실시양태 71]

제66 실시양태 내지 제70 실시양태 중 어느 하나에 명시된 핵산 구축물을 포함하는 발현 벡터.

[실시양태 72]

제66 실시양태 내지 제70 실시양태 중 어느 하나에 명시된 핵산 구축물을 포함하는 숙주 세포.

[실시양태 73]

제1 실시양태 내지 제72 실시양태 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 얻거나 얻을 수 있는 이중이량체 단백질.

[실시양태 74]

이뮤노글로불린의 제1 Fc 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 이뮤노글로불린의 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고, 이때 상기 제1 Fc 영역이 제1 CH3 영역을 포함하고, 상기 제2 Fc 영역이 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 이중이량체 단백질이며, 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 상이하고, 이들 서열이, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 크도록 하는 것이고,

여기서, 상기 제1 동종이량체 단백질이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체 단백질이 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군 중에서 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖고/갖거나,

상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이, 각각의 CH3 영역의 동종이량체 상호작용의 해리 상수가 실시예 21에 기재된 바와 같이 검정할 때 0.01 내지 10 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 10 마이크로몰, 보다 바람직하게는 0.01 내지 5, 예컨대 0.05 내지 5 마이크로몰, 훨씬 더 바람직하게는 0.01 내지 1 마이크로몰, 예컨대 0.05 내지 1 마이크로몰, 0.01 내지 0.5 또는 0.01 내지 0.1이 되도록 하는 것인, 이중이량체 단백질.

[실시양태 75]

제74 실시양태에 있어서,

상기 제1 CH3 영역이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 CH3 영역이 위치 405에 Phe 이외의 다른 아미노산, 예컨대 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산을 갖거나 또는

상기 제1 CH3 영역이 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 가지며, 상기 제2 CH3 영역이 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산을 갖는 것인 이중이량체 단백질.

[실시양태 76]

제74 실시양태 또는 제75 실시양태에 있어서, 상기 제1 및 제2 폴리펩티드가 상이한 에피토프에 결합하는 2개의 항체의 전장 중쇄인 이중이량체 단백질.

[실시양태 77]

제76 실시양태에 있어서, 2개의 전장 경쇄를 추가로 포함하는 이중이량체 단백질.

[실시양태 78]

제74 실시양태 내지 제77 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 제2 실시양태 내지 제58 실시양태 중 어느 하나 이상의 실시양태의 특징을 추가로 포함하는 이중이량체 단백질.

[실시양태 79]

제74 실시양태 내지 제78 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 이중이량체 단백질.

[실시양태 80]

제79 실시양태에 있어서, 암의 치료에 사용하기 위한 이중이량체 단백질.

[실시양태 81]

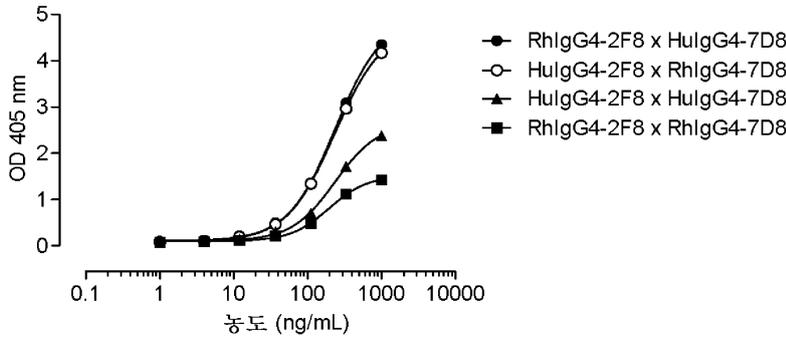
제74 실시양태 내지 제78 실시양태 중 어느 하나에 따른 이중이량체 단백질 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

[실시양태 82]

종양 세포의 성장 및/또는 증식을 억제하고/하거나 종양 세포를 사멸시키는 것을 필요로 하는 개체에 제74 실시양태 내지 제78 실시양태 중 어느 하나에 따른 이중이량체 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 종양 세포의 성장 및/또는 증식을 억제하고/하거나 종양 세포를 사멸시키기 위한 방법.

도면

도면1

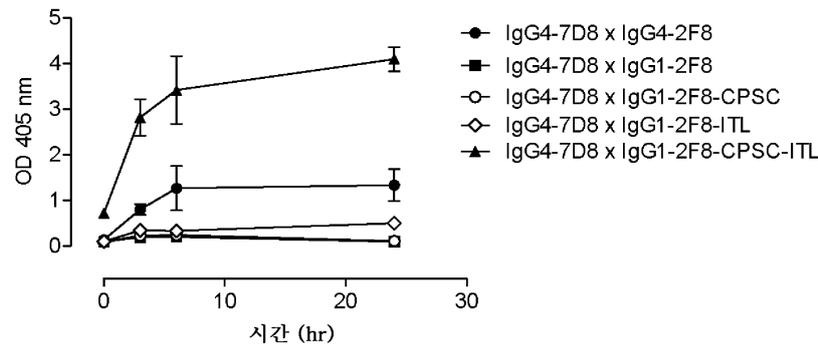


도면2

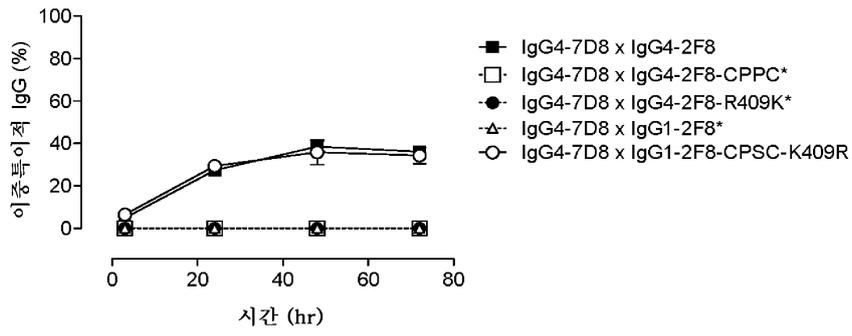
종 (통상 명칭)	이소형	아미노산 위치 *																				
		코어-헨지						CH3-CH3 계면														
		226	227	228	229	230	347	349	350	351	366	368	370	392	394	395	397	398	399	405	407	409
호모 사피엔스	IgG1	C	P	P	C	P	Q	Y	T	L	T	L	K	K	T	P	V	L	D	F	Y	K
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-
	IgG3	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	M	-	-	-	-	-
	IgG4	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R
마카카 몰라타 (붉은털원숭이)	IgG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG3	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG4 (In)**	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-
	IgG4 (Ch)***	-	-	A	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-

*EU 넘버링; **In, 인도인; ***Ch, 중국인

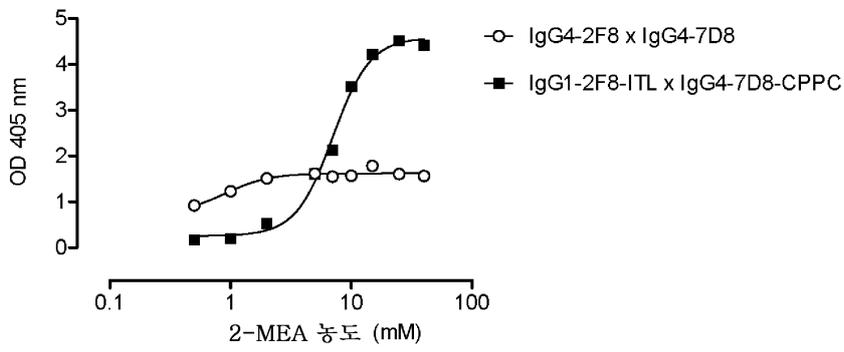
도면3



도면4

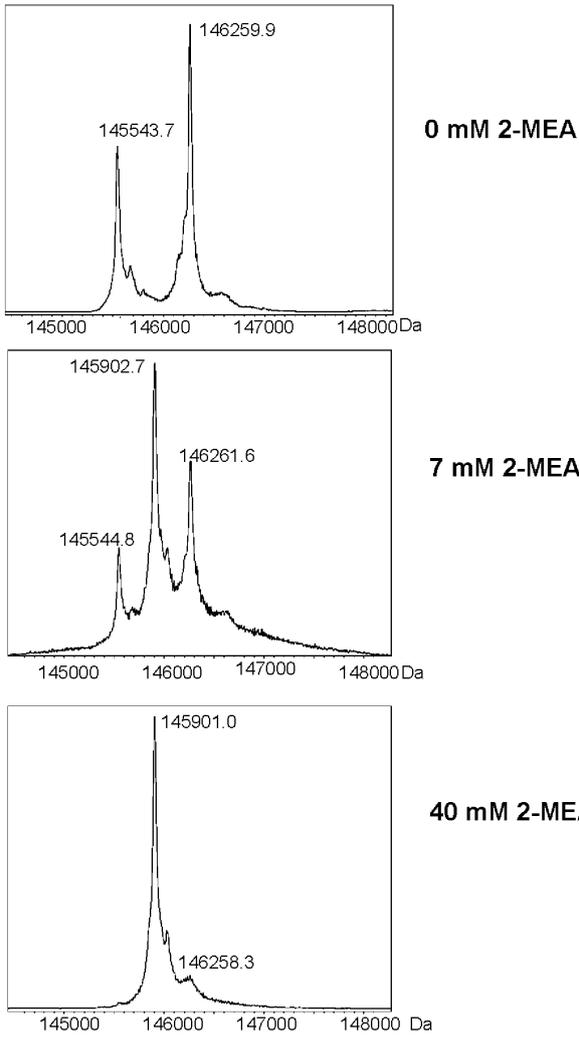


도면5

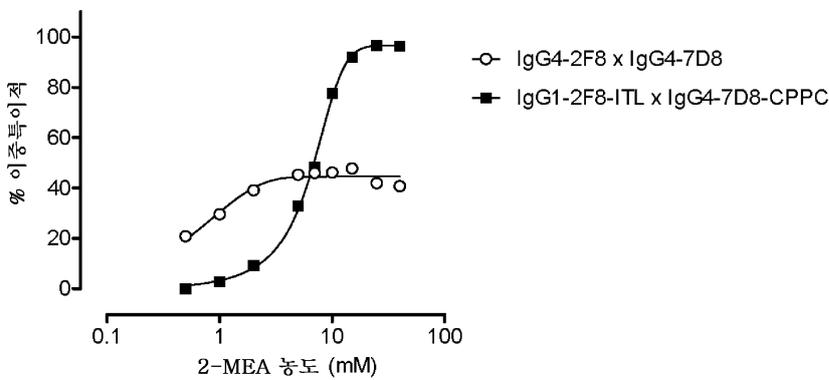


도면6a

IgG1-2F8-ITL X IgG4-7D8-CPPC

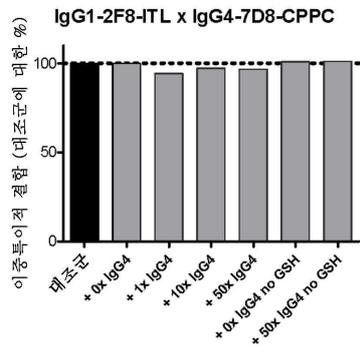


도면6b

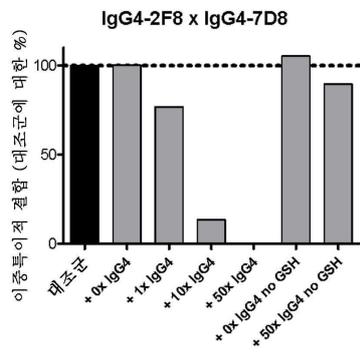


도면7

A

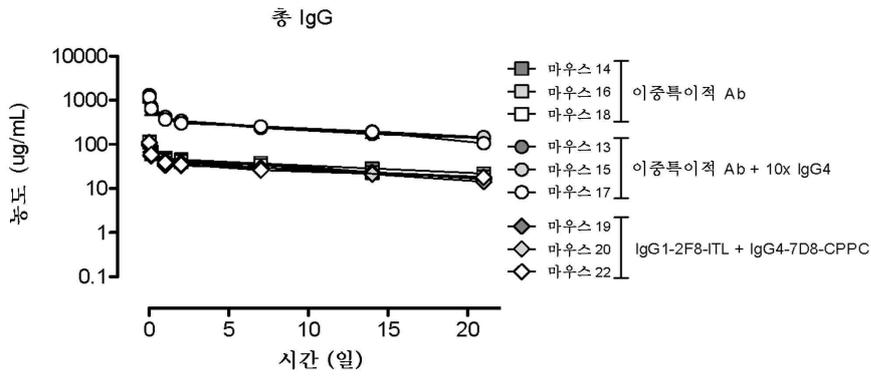


B

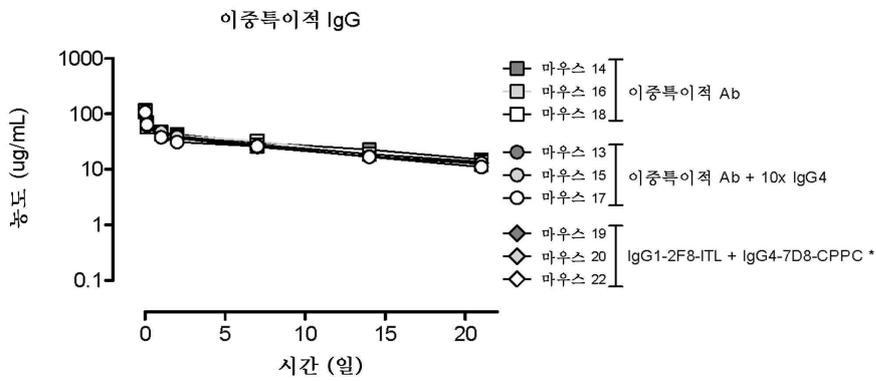


도면8

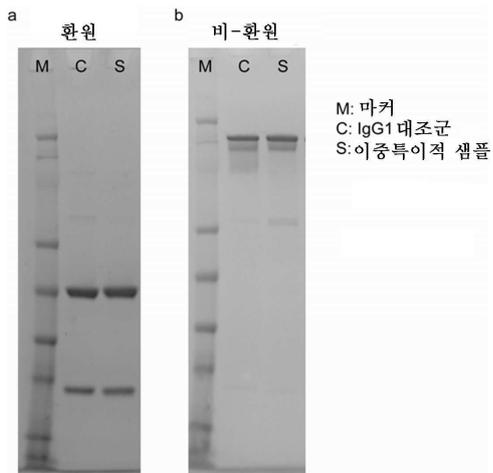
A



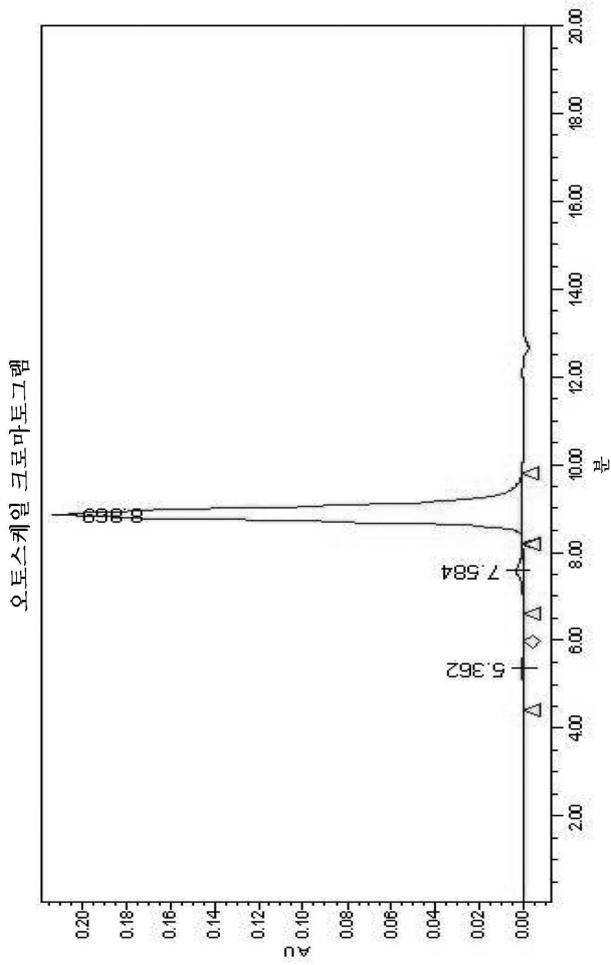
B



도면9a



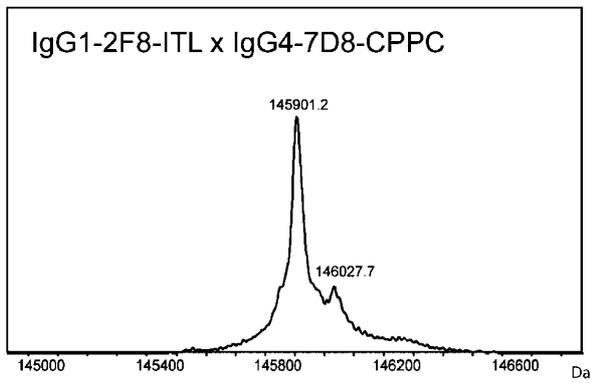
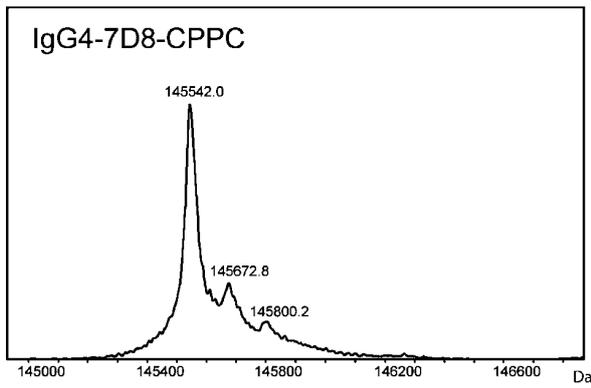
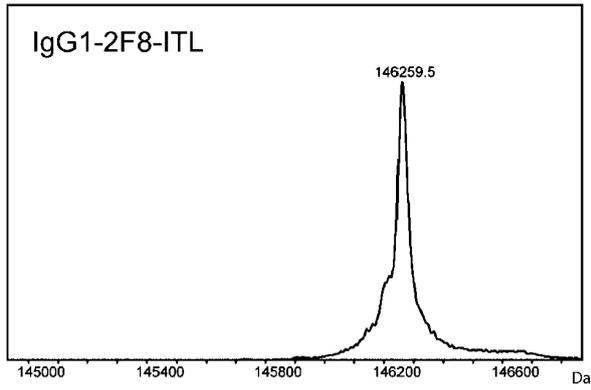
도면9b



피크 결과:

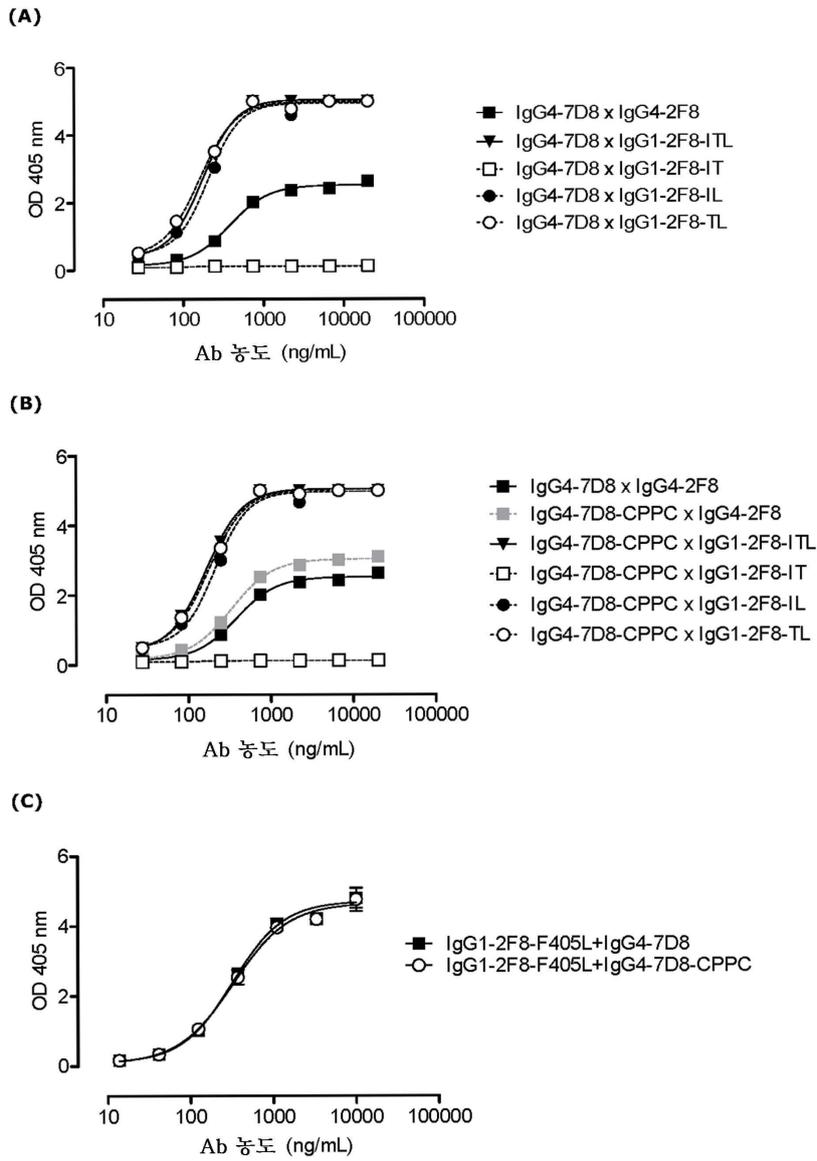
	RT (min)	면적	높이	%높이
1	5.362	18309	448	0.21
2	7.584	82197	2876	1.36
3	8.869	4431069	207416	98.42

도면9c

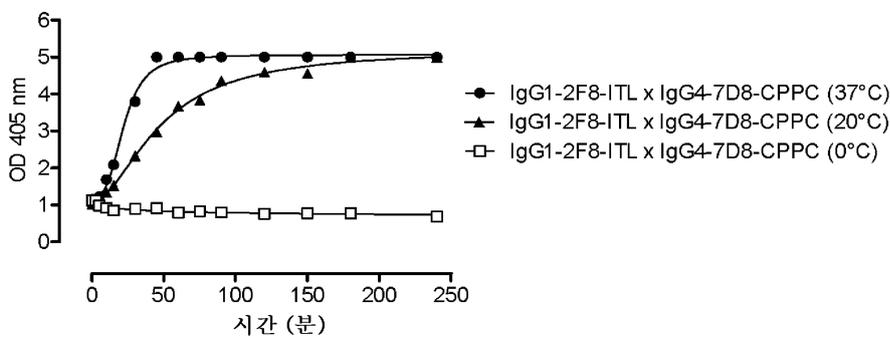


	측정치	측정치	측정치
IgG1-2F8-ITL	146259.5		
IgG4-7D8-CPPC	145542.0	145672.8	145800.2
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-	145901.2	146027.7	

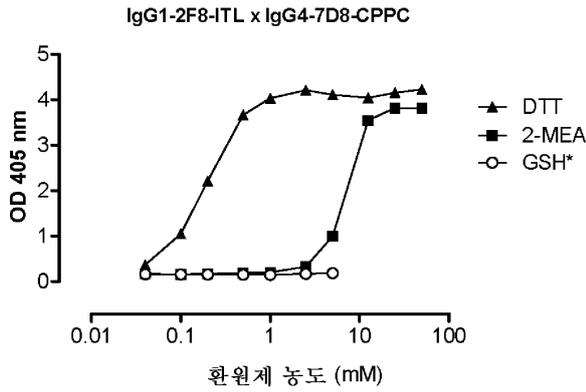
도면10



도면11

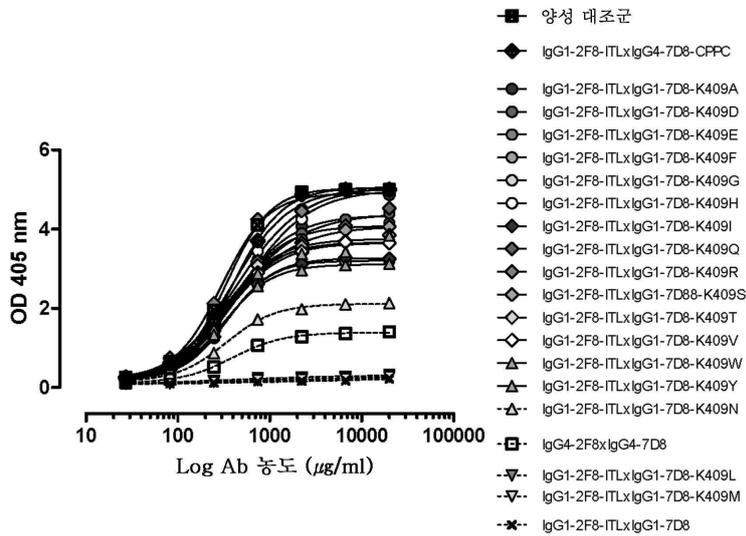


도면12

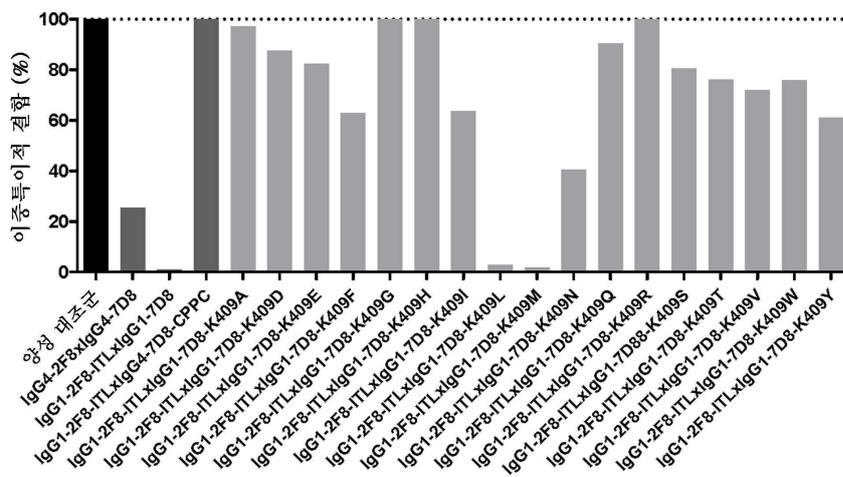


도면13

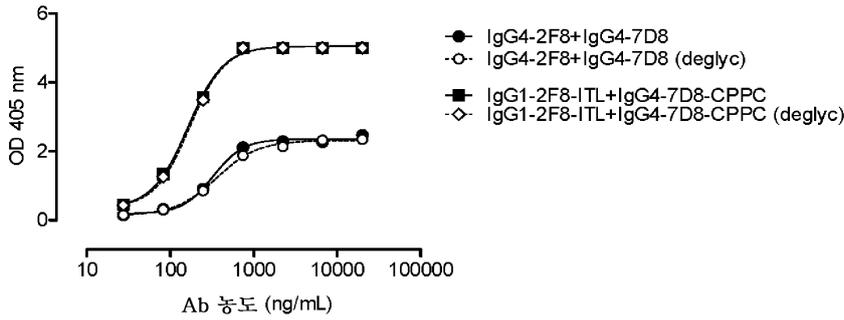
A



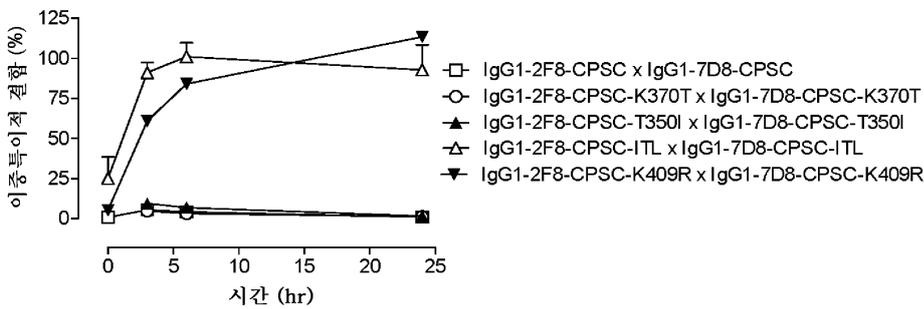
B



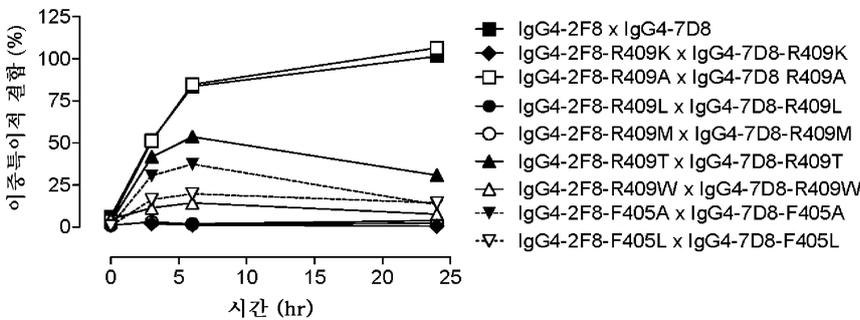
도면14



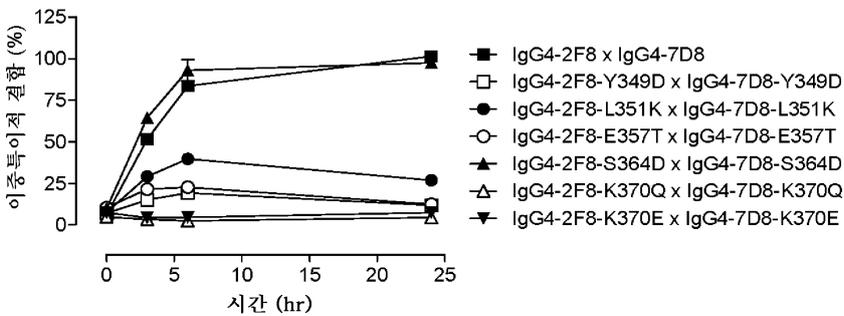
도면15a



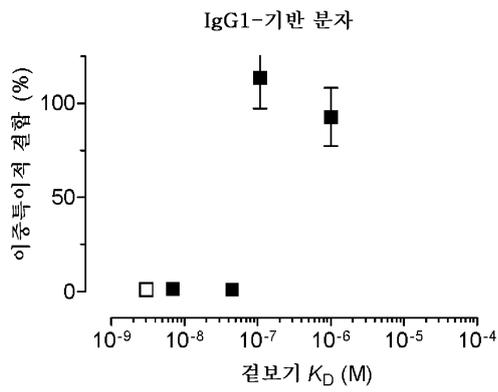
도면15b



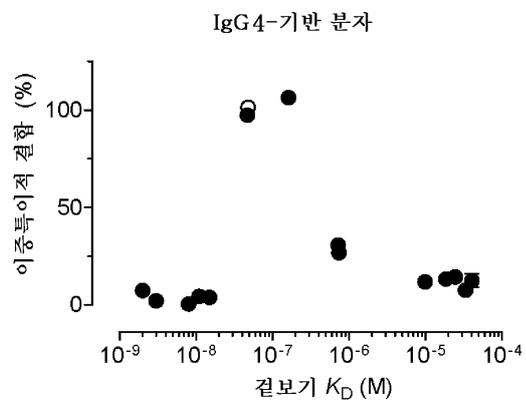
도면15c



도면15d

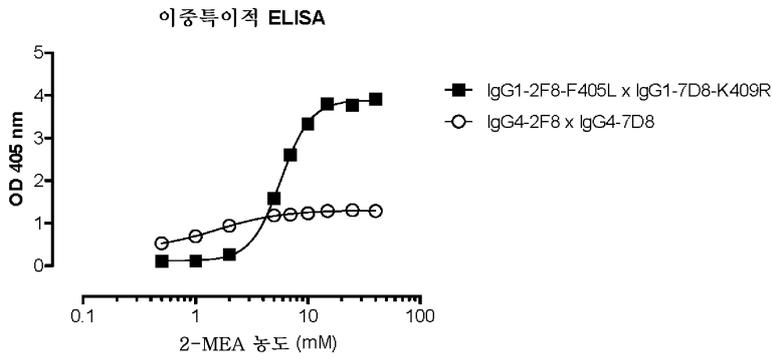


도면15e

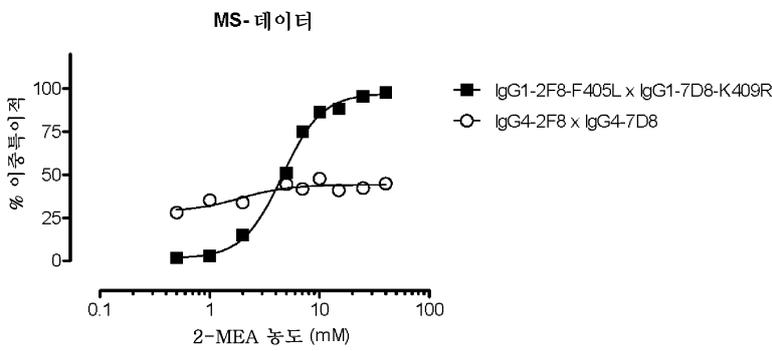


도면18

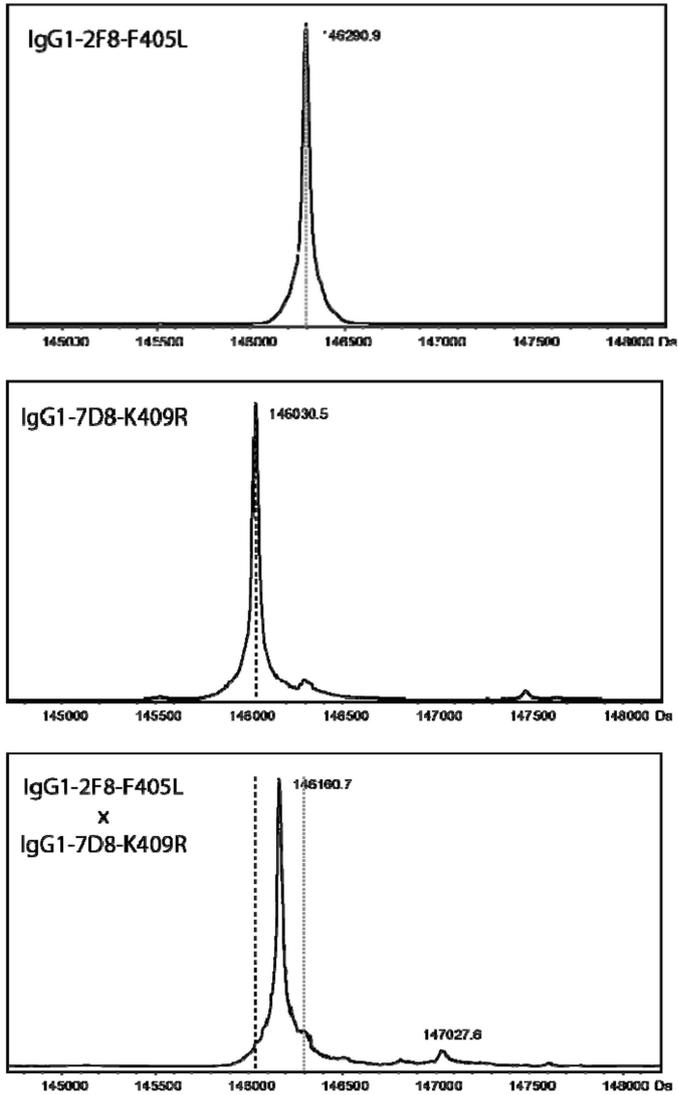
A



B



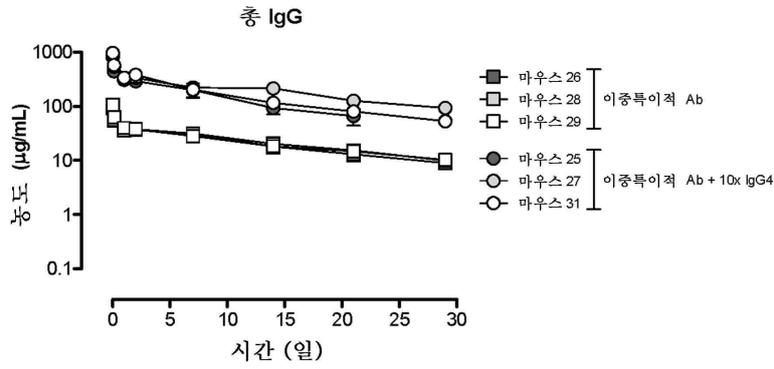
도면19



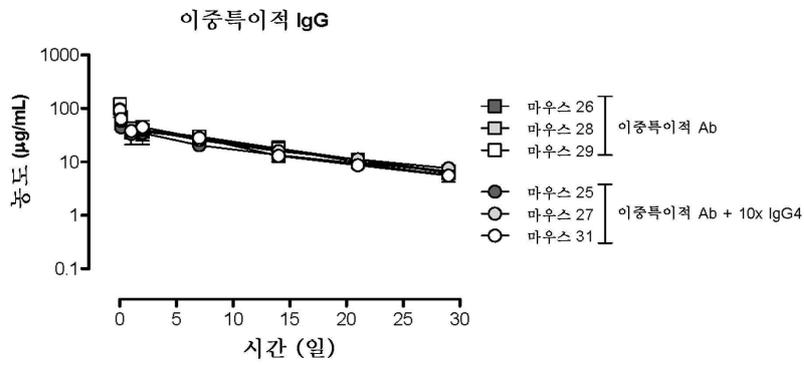
	측정된 MW
IgG1-2F8-F405L	146,290.9
IgG1-7D8-K409R	146,030.5
IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R	146,160.7

도면20

A

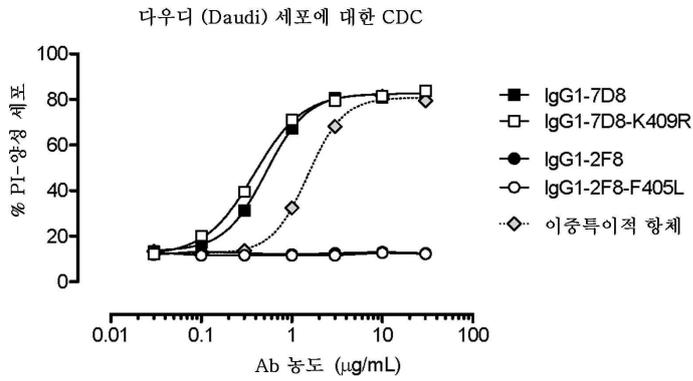


B

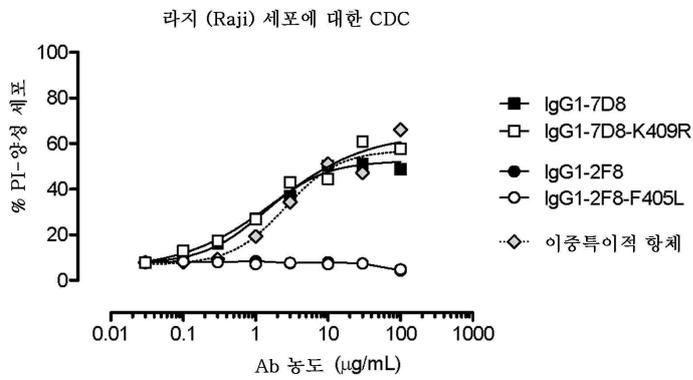


도면21

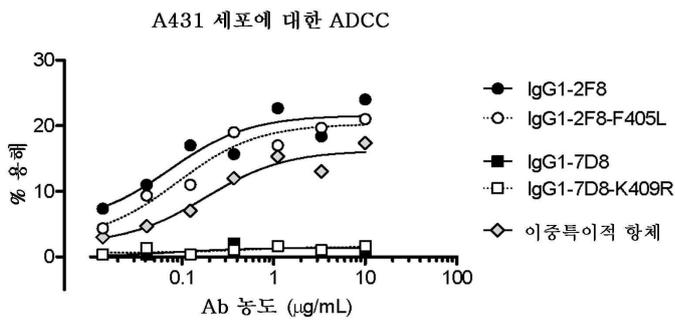
A



B

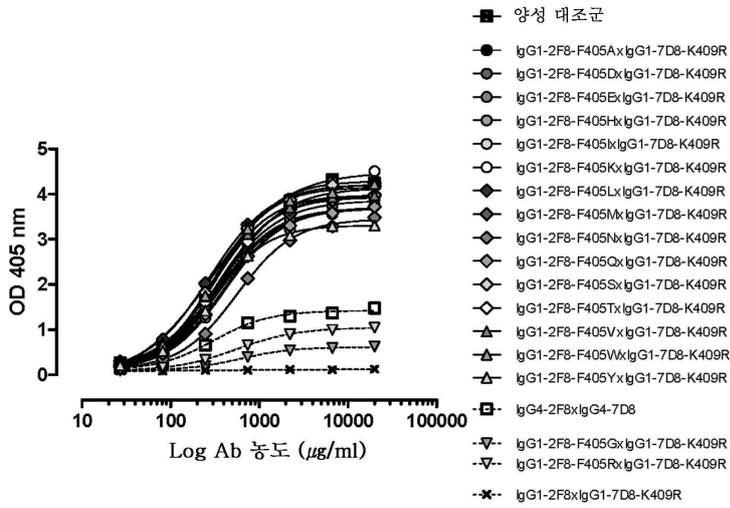


도면22

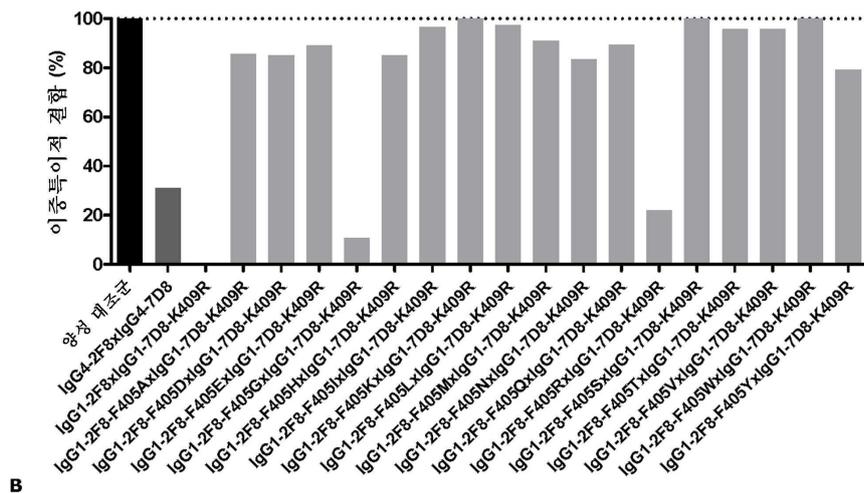


도면23

A

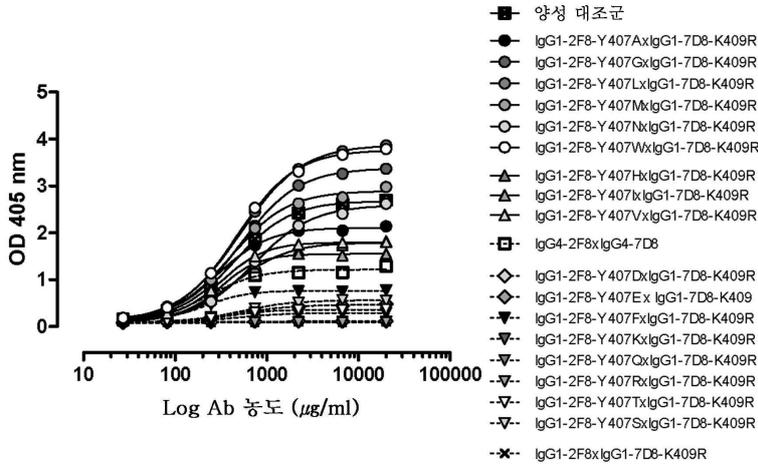


B

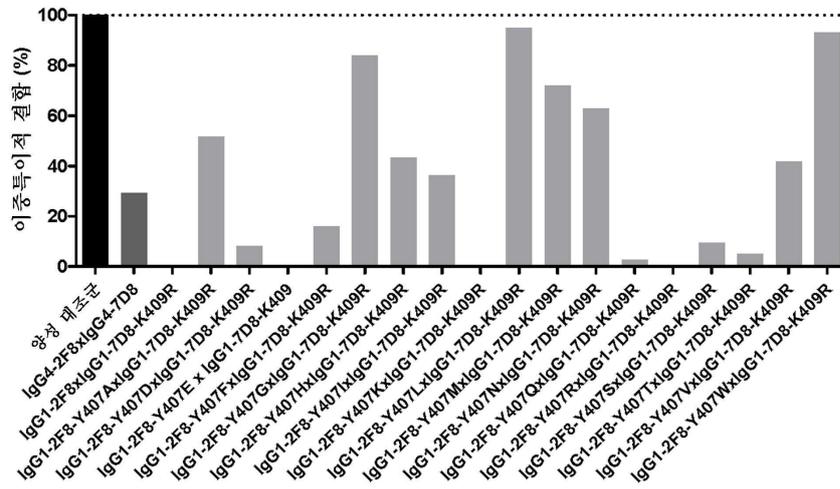


도면24

A

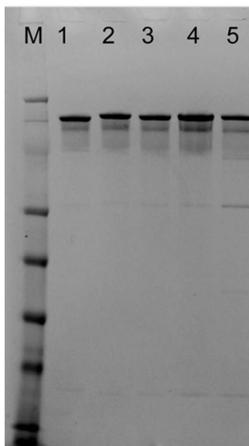


B

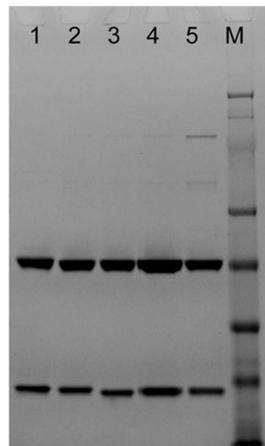


도면25

A 비-환원

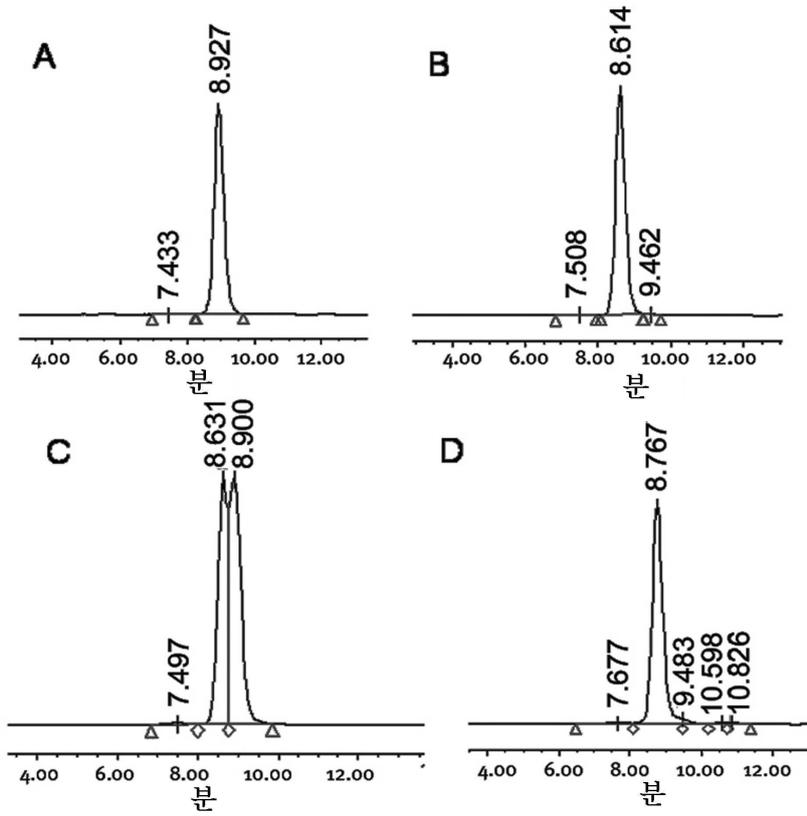


B 환원

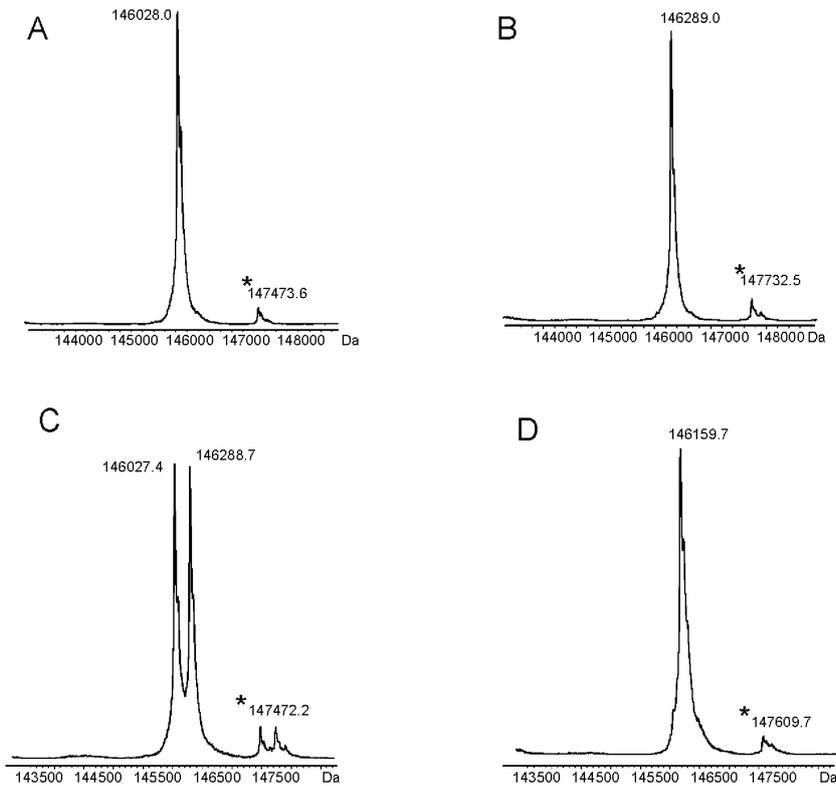


- 1) IgG1 대조군 B12
- 2) IgG1-7D8-K409R
- 3) IgG1-2F8-F405L
- 4) IgG1-7D8-K409R + IgG1-2F8-F405L (1:1)
- 5) IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L (교환)

도면26

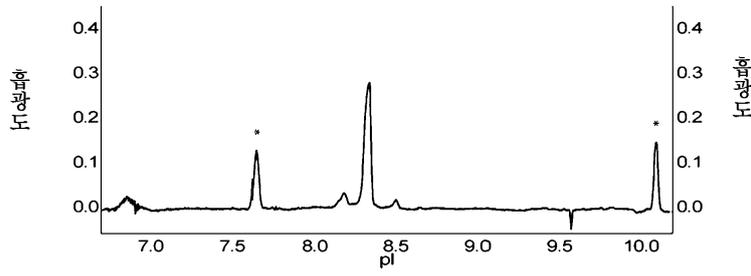


도면27

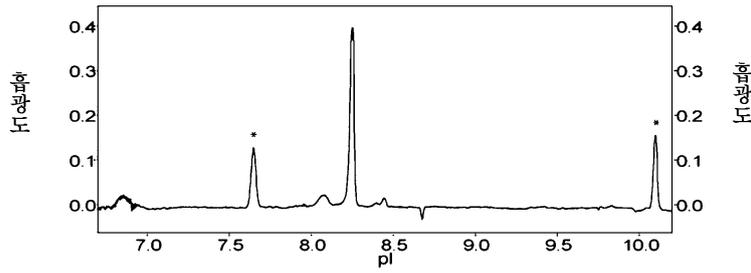


도면28

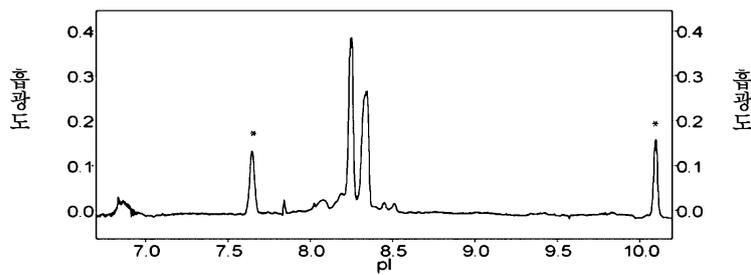
A



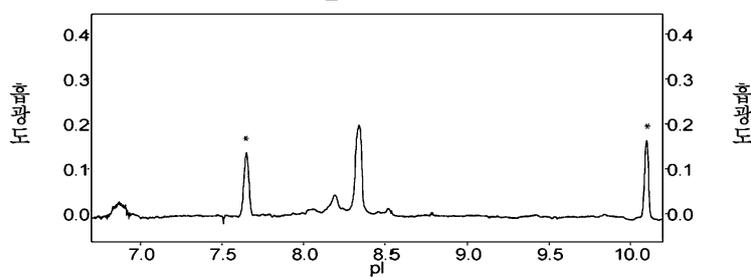
B



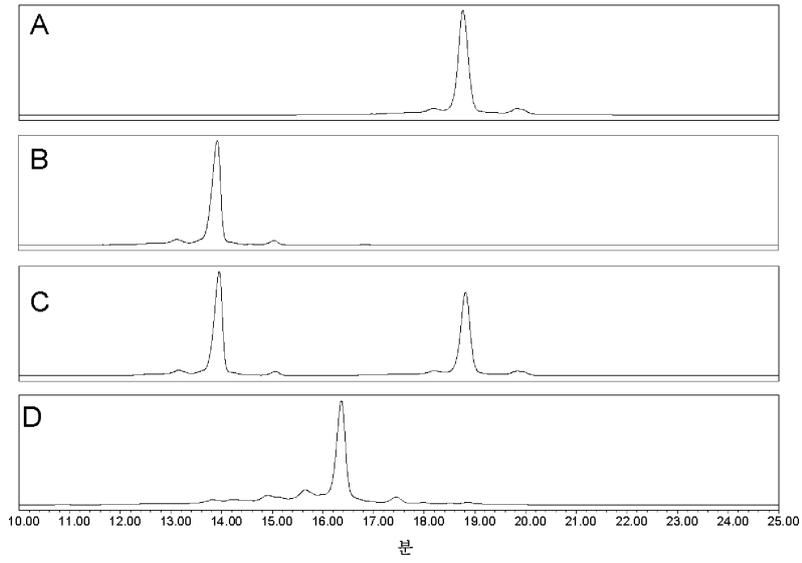
C



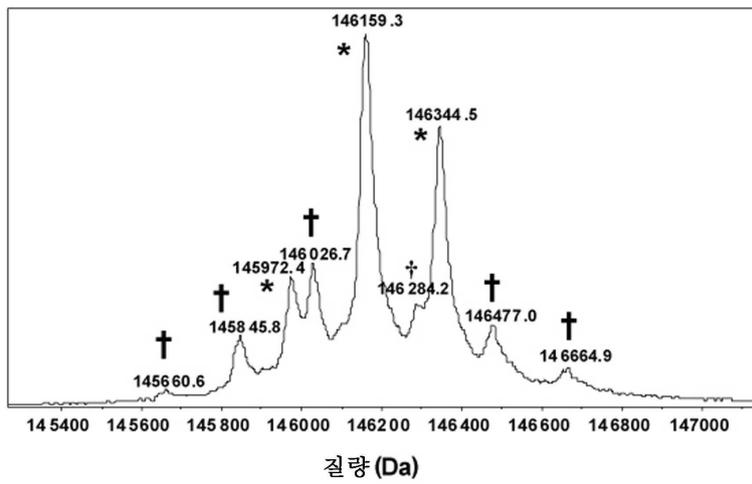
D



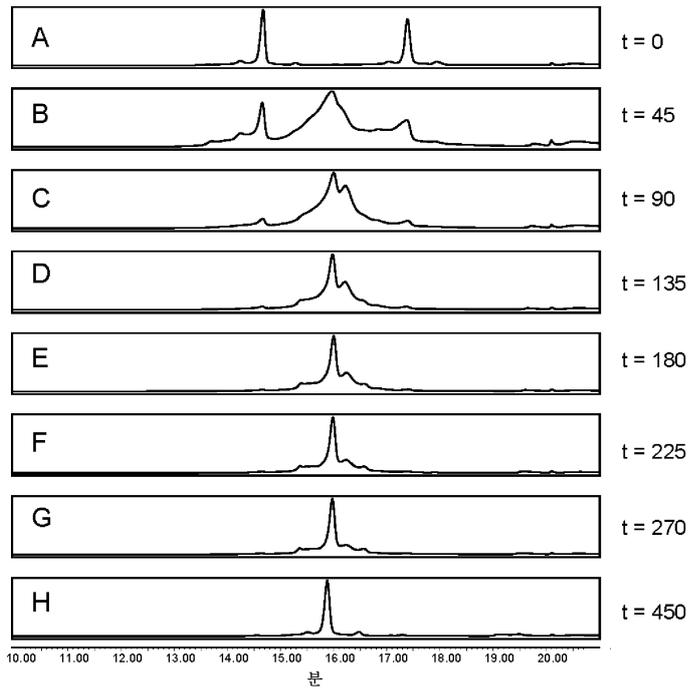
도면29



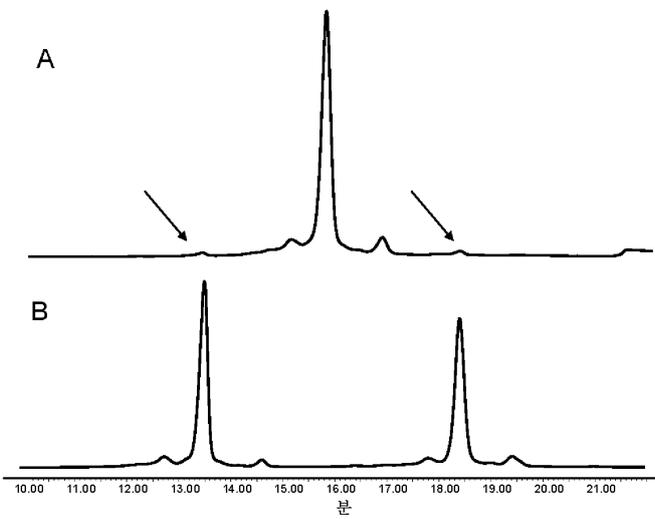
도면30



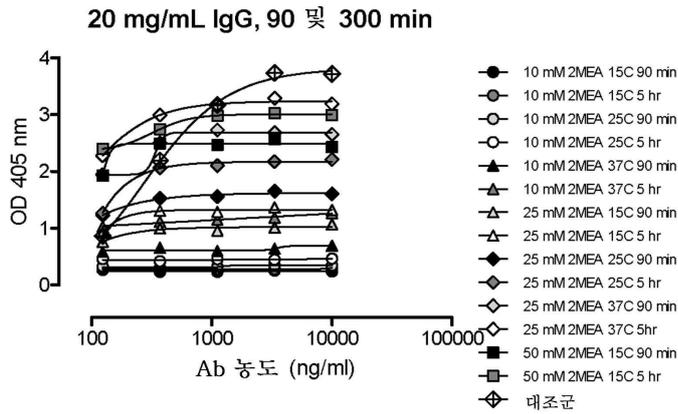
도면31



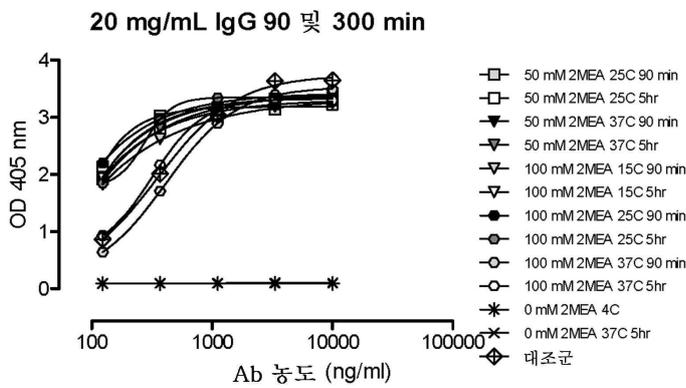
도면32



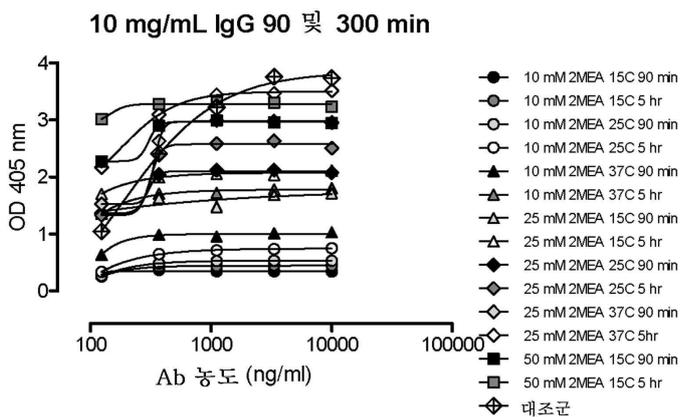
도면33a



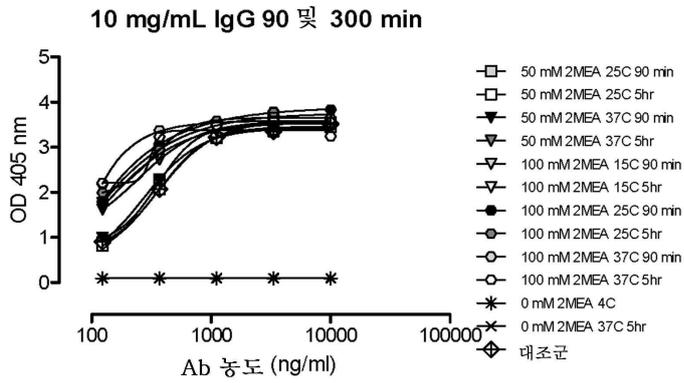
도면33b



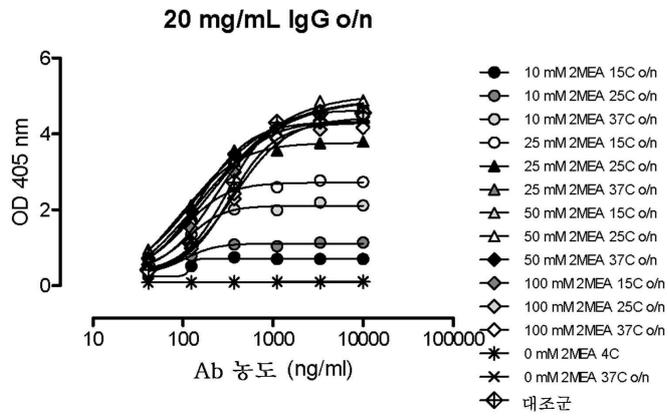
도면33c



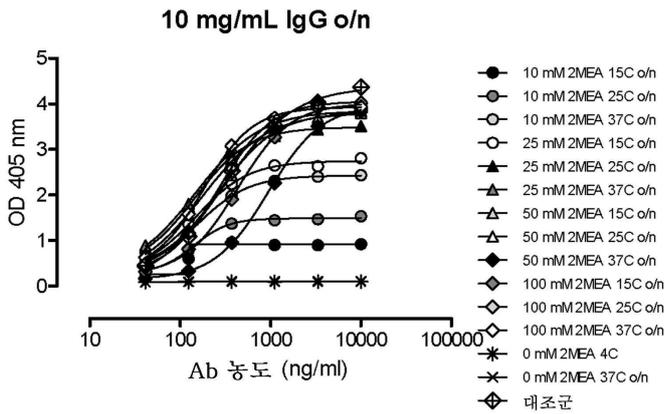
도면33d



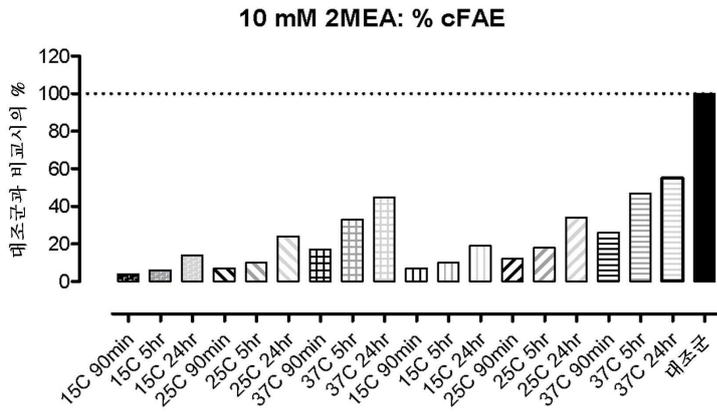
도면33e



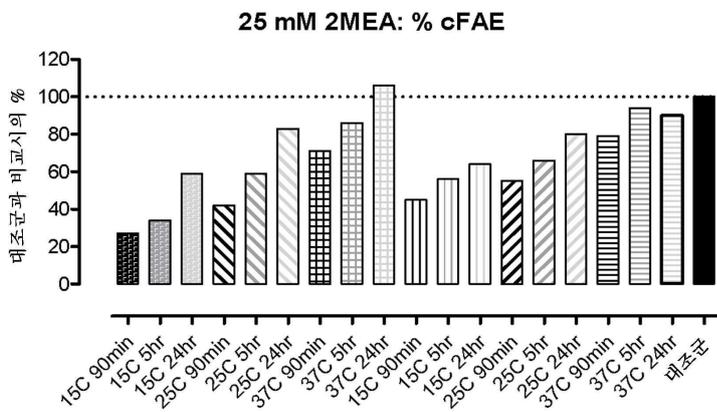
도면33f



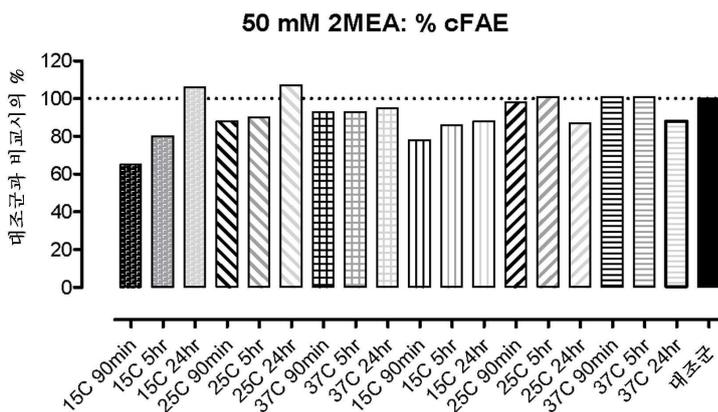
도면34a



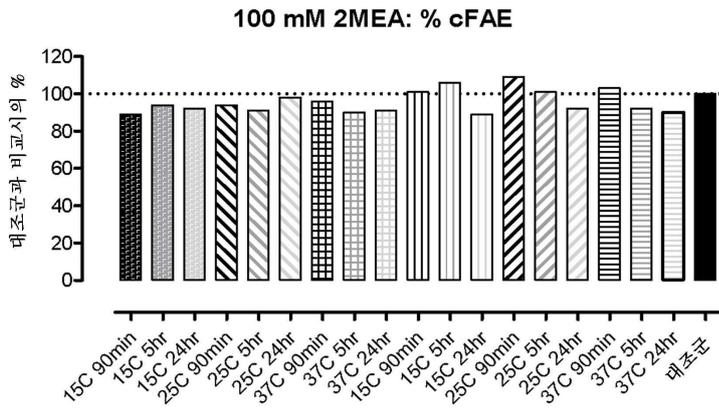
도면34b



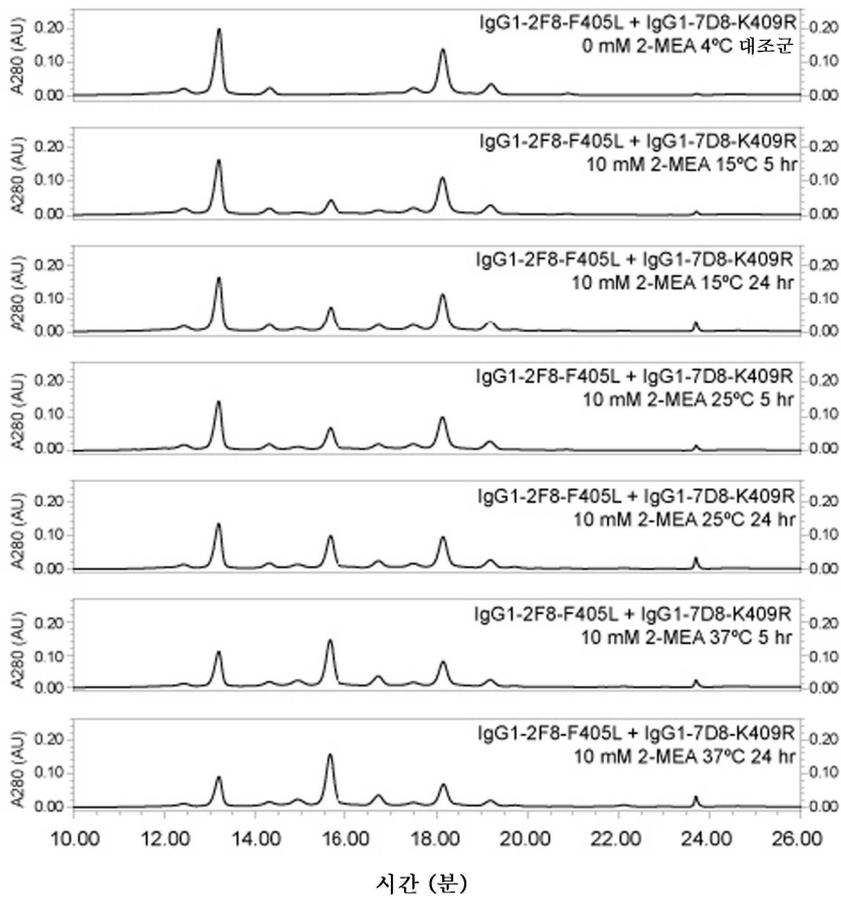
도면34c



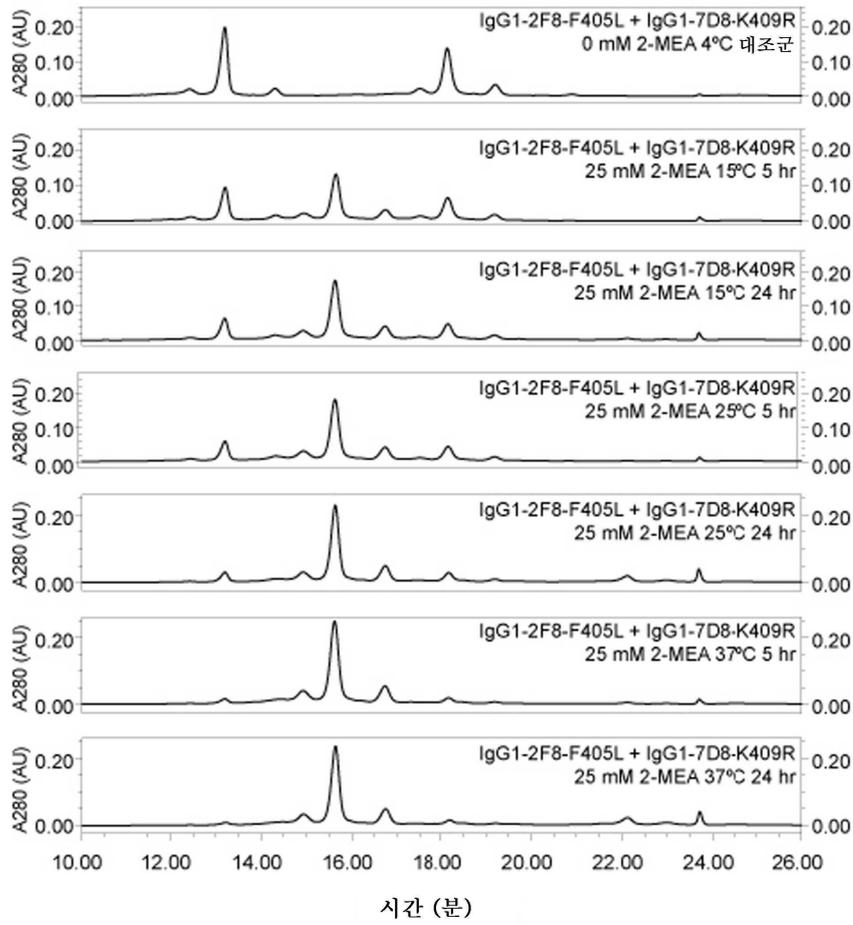
도면34d



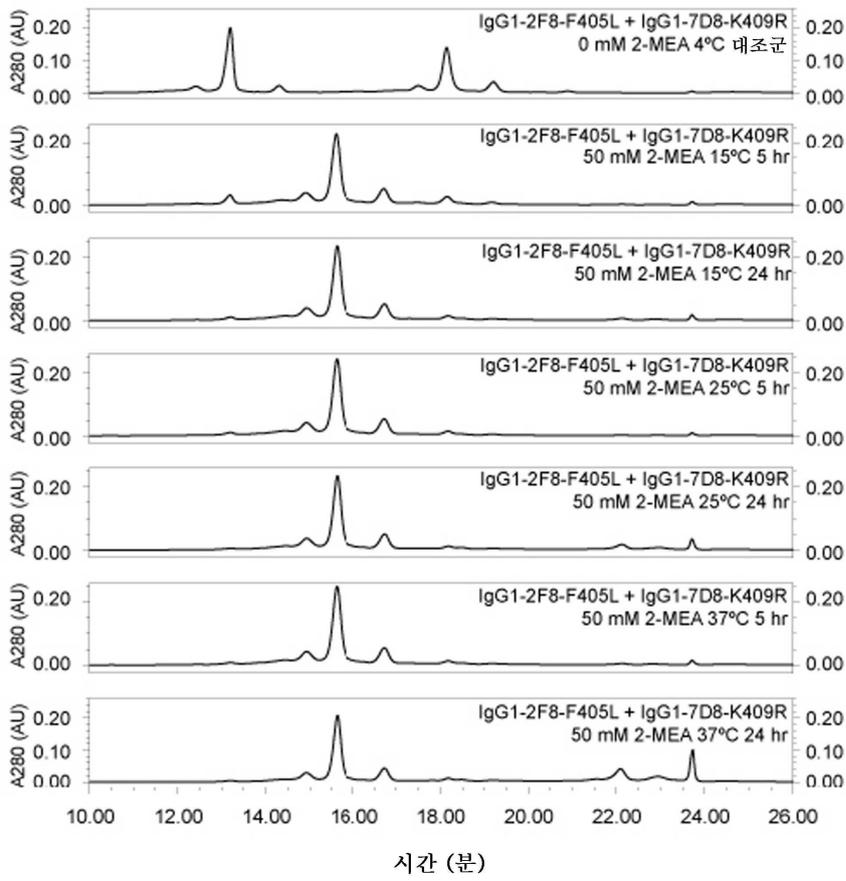
도면35a



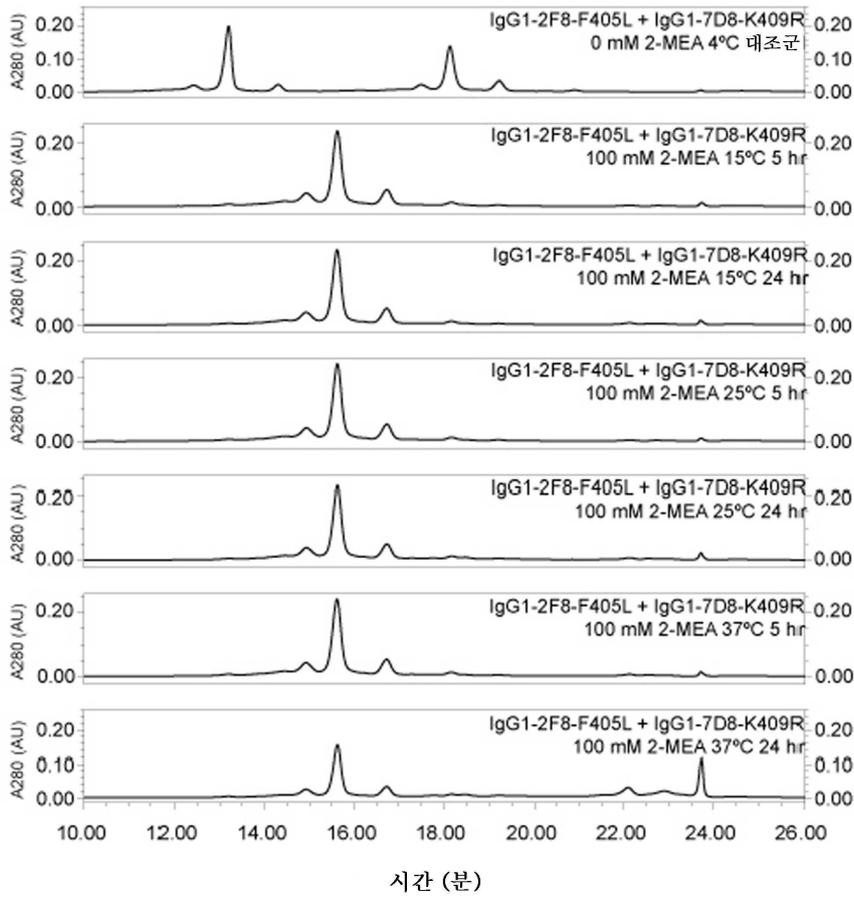
도면35b



도면35c

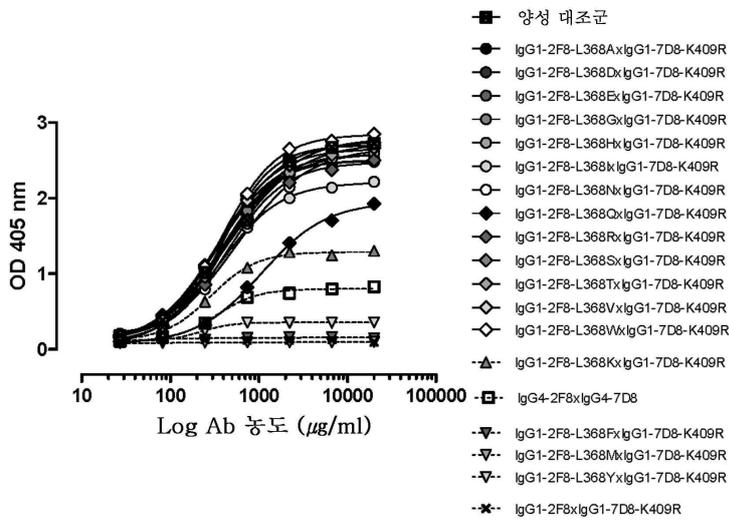


도면35d

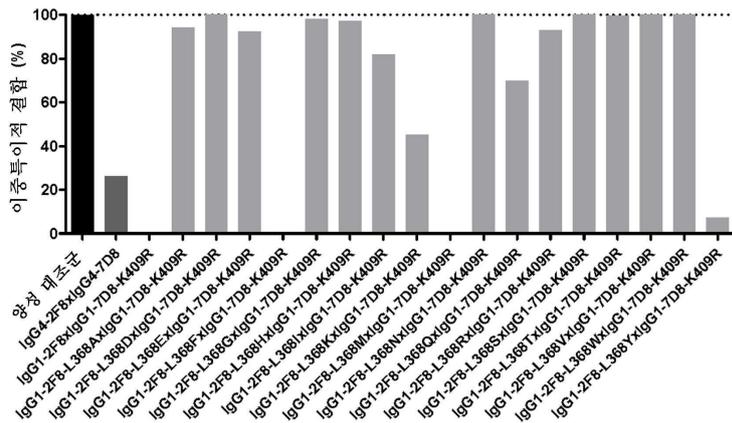


도면36

A

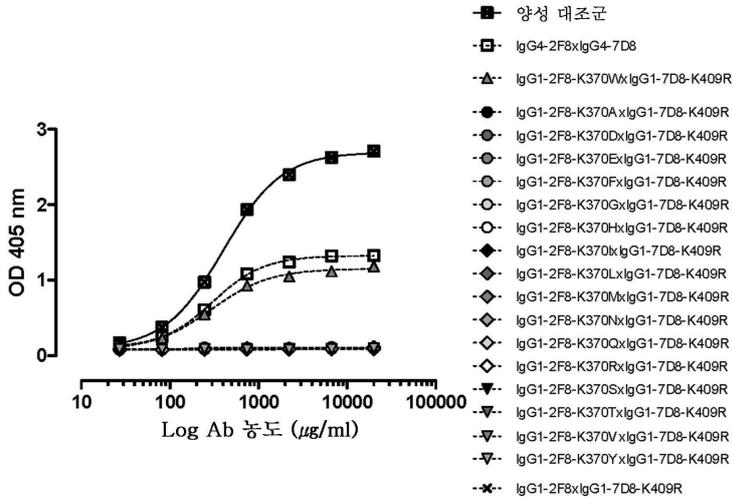


B

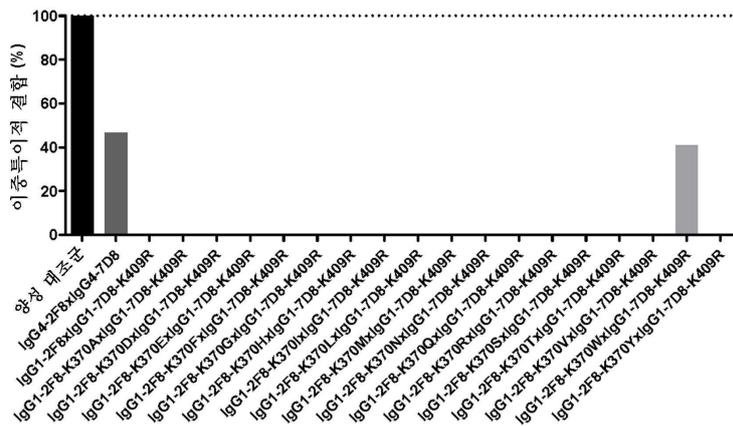


도면37

A

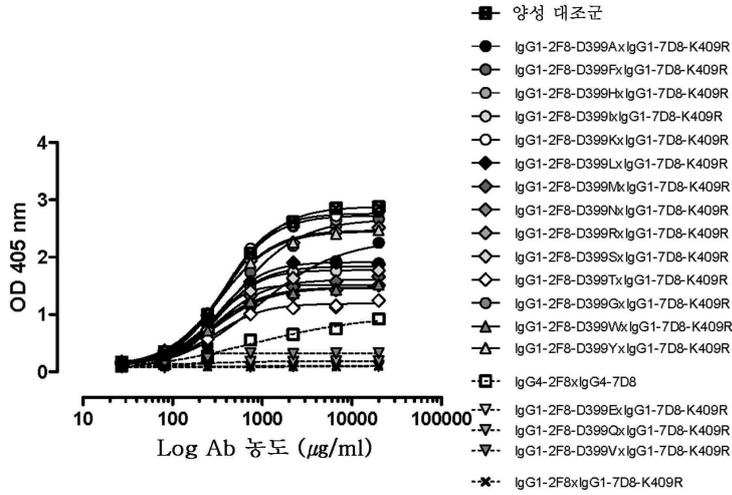


B

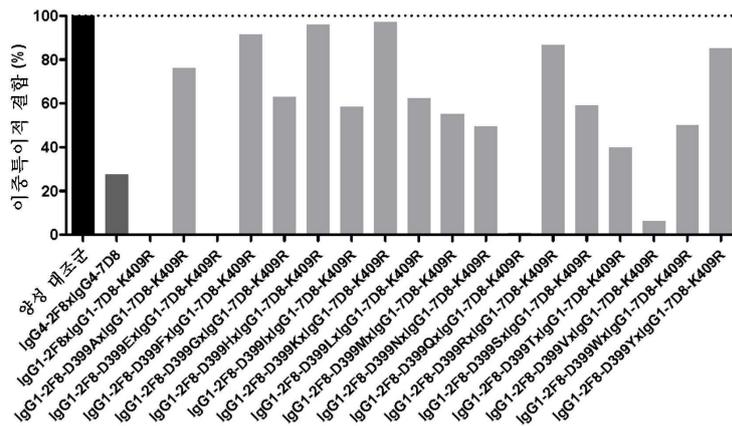


도면38

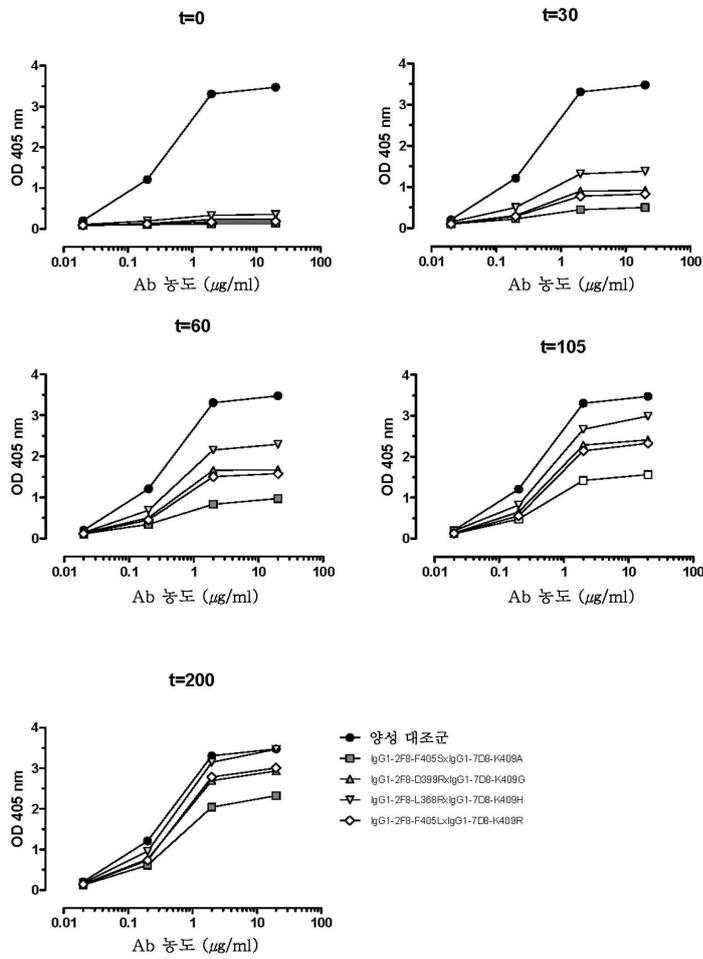
A



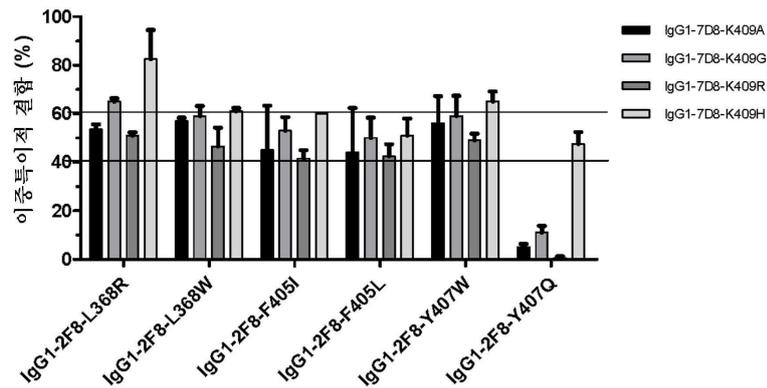
B



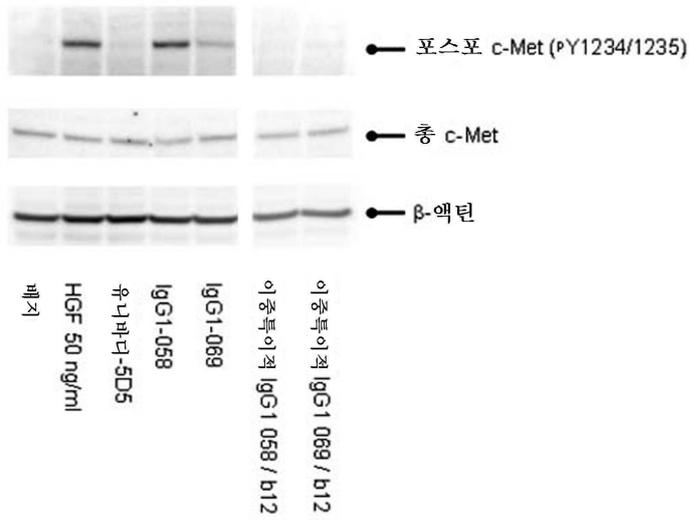
도면39



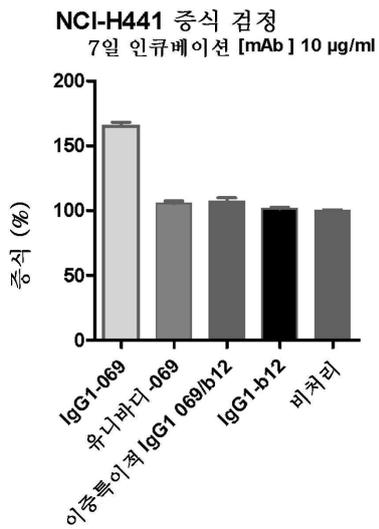
도면40



도면41



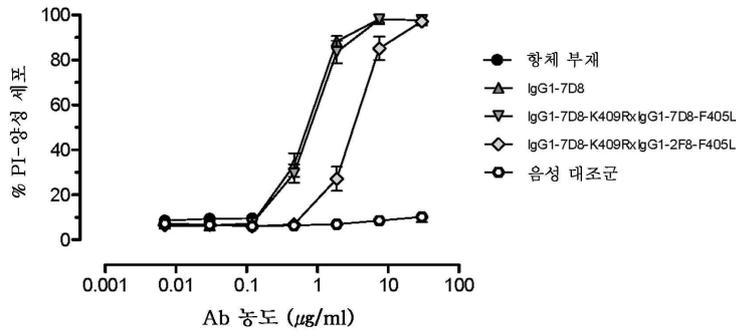
도면42



도면43

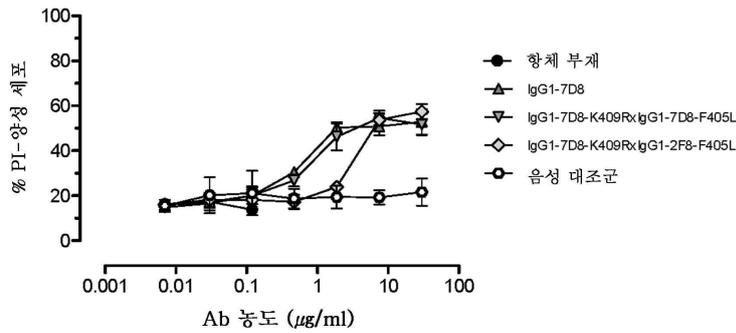
A

다우디 세포에 대한 CDC

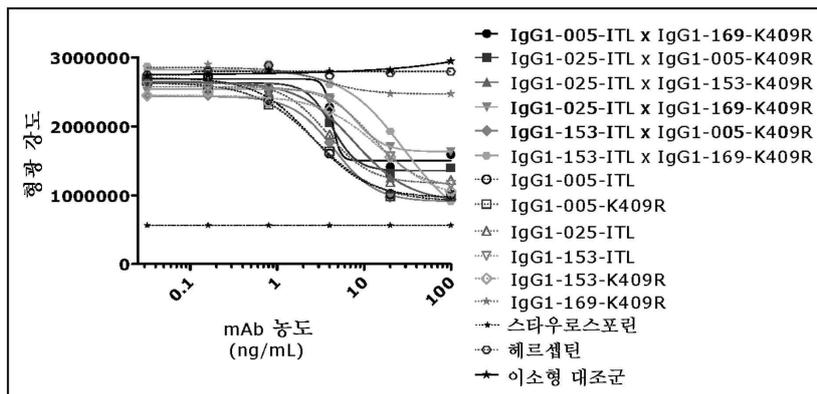


B

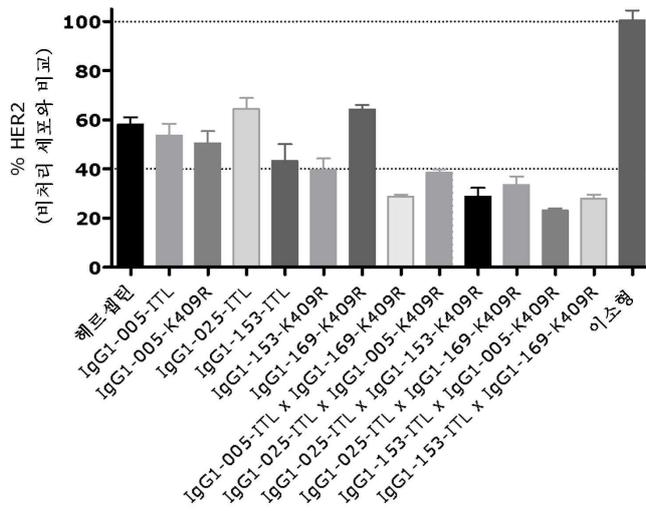
라지 세포에 대한 CDC



도면44

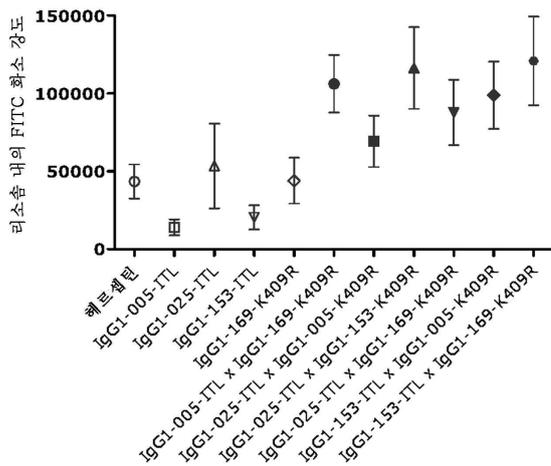


도면45

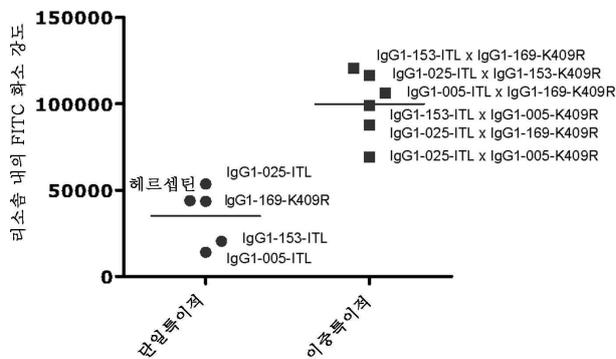


도면46

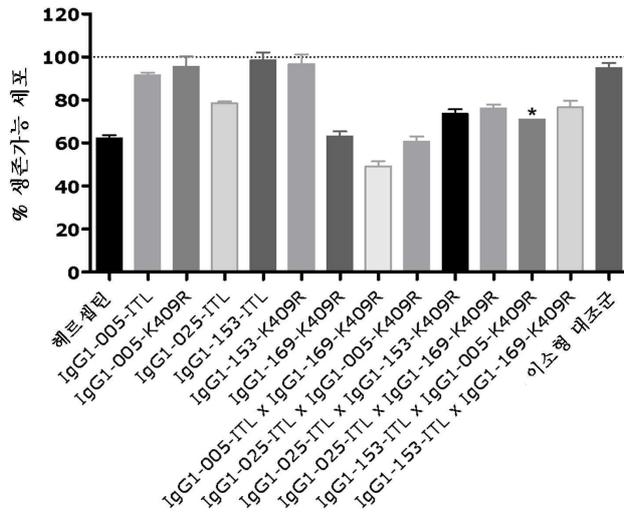
A



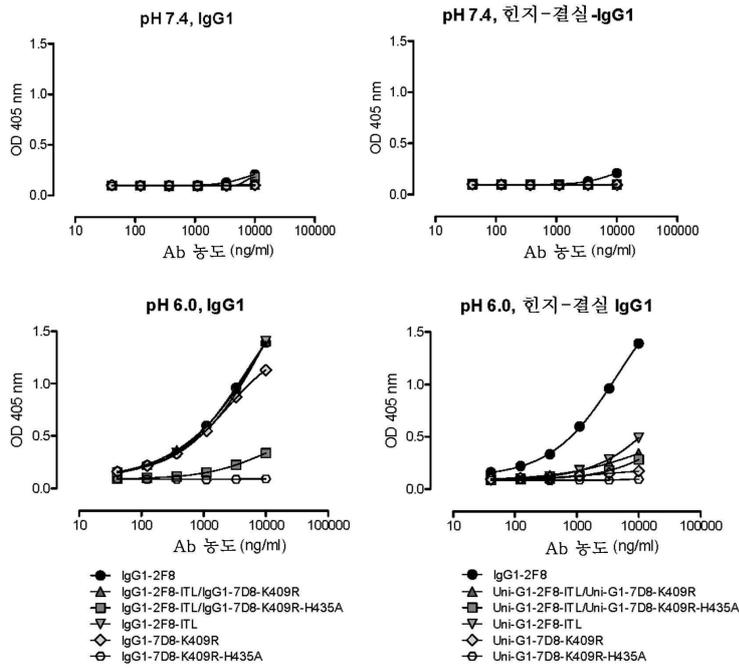
B



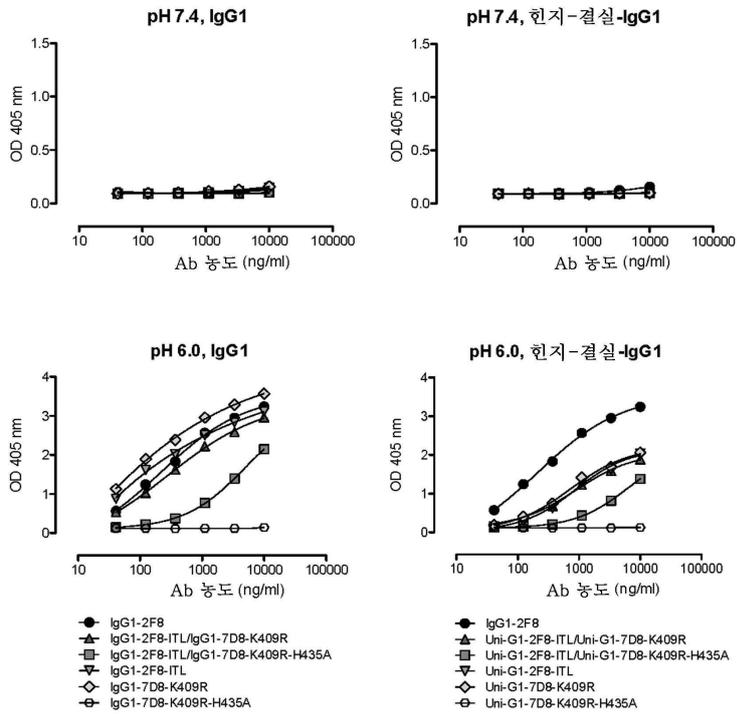
도면47



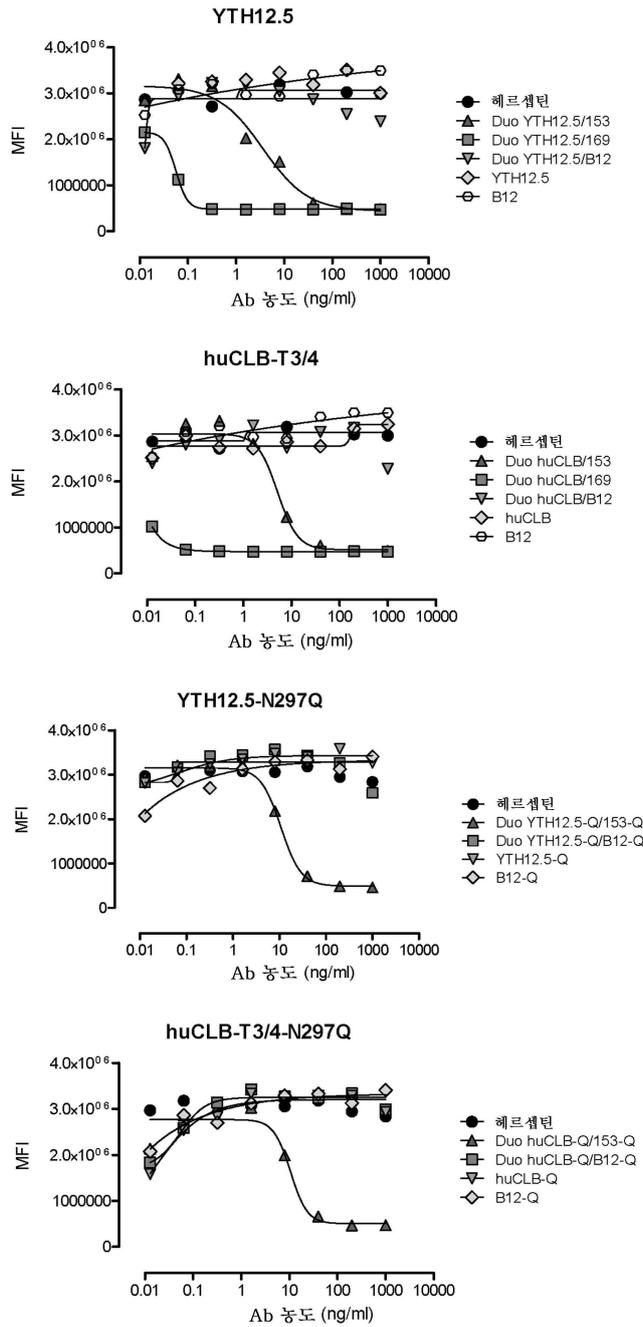
도면48a



도면48b



도면49



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab A/S

<120> Heterodimeric antibody Fc-containing proteins and methods for production thereof

<130> P/61.W0

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

 100 105

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

