



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월29일

(11) 등록번호 10-2392598

(24) 등록일자 2022년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7030836

(22) 출원일자(국제) 2015년04월12일

심사청구일자 2020년04월08일

(85) 번역문제출일자 2016년11월03일

(65) 공개번호 10-2016-0143739

(43) 공개일자 2016년12월14일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/057919

(87) 국제공개번호 WO 2015/158636

국제공개일자 2015년10월22일

(30) 우선권주장

14164523.4 2014년04월13일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

EP01293514 A1*

KR1020040091616 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

아피메트 게엠베하

독일 69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트 582

(72) 발명자

리틀레 델빈

독일 25826 세인트 페테르-오딩 이멘제베크 17

추코프스키 유게네

독일 68165 만하임 칸트슈트라세 17

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

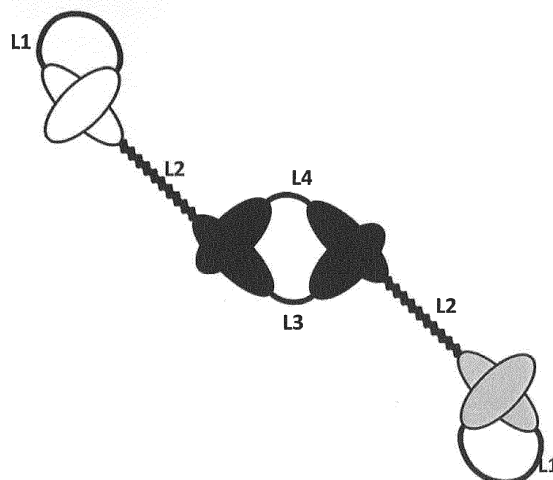
심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 삼관능성 항원-결합 분자

(57) 요약

본 발명은 삼중특이성(trispecific) 항원-결합 분자에 관한 것으로서, 상기 항원-결합 분자는 적어도 4가(tetravalent)이고, 제1 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 항원-결합 부위, 제2 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 항원-결합 부위 및 제3 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 2개의 항원-결합 부위를 포함하며, 이는 중앙 치료를 위한 약제로서 사용된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 16/2878 (2013.01)

C07K 16/468 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/35 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/626 (2013.01)

(72) 발명자

에저 마르쿠스

독일 40593 뒤셀도르프 카메라츠펠트슈트라쎄 71

바이헬 미하엘

독일 65474 비쇼프스하임 마인쯔 슈트라쎄 32

간트케 토르슈텐

독일 68535 에딩겐-네카르하우젠 하우프트슈트라쎄
77

로이슈 우베

독일 67487 마이카머 디테르바이첸슈트라쎄 13

엘방거 크리스티나

독일 69120 하이델베르크 훔볼트슈트라쎄 24

레 갈 파브리체

독일 55122 마인쯔 콘스바흐블라크 29

명세서

청구범위

청구항 1

2개의 폴리펩티드를 포함하는 삼중특이성 항원-결합 분자로서,

상기 2개의 폴리펩티드 각각은 서로 연결된 가변 항체 영역 (Fv)을 갖고,

여기에서

(a) 제1 폴리펩티드는 (i) 12개 이하의 아미노산 잔기를 갖는 링커에 의해서 제2 항체 가변 중쇄 영역(VH)에 연결되는 제1 항체 가변 중쇄 영역(VH), 및 (ii) 항체 가변 경쇄 영역(VL)과 연결된 제3 항체 가변 중쇄 영역(VH)을 갖는 단쇄 Fv 항원 결합 유닛을 포함하며, 상기 제3 항체 가변 중쇄 영역(VH) 및 상기 항체 가변 경쇄 영역(VL)은 결합하여 제1 항원 결합 부위가 될 수 있고, 상기 제1 항체 가변 중쇄 영역(VH) 또는 제2 항체 가변 중쇄 영역(VH)은 펩티드 링커에 의해서 상기 단쇄 Fv 항원 결합 유닛과 연결되며;

(b) 상기 제2 폴리펩티드는 (i) 12개 이하의 아미노산 잔기를 갖는 링커에 의해서 제2 항체 가변 경쇄 영역(VL)에 연결되는 제1 항체 가변 경쇄 영역(VL), 및 (ii) 항체 가변 중쇄 영역(VH)과 펩티드 링커에 의해 연결된 제3 항체 가변 경쇄 영역(VL)을 갖는 단쇄 Fv 항원 결합 유닛을 포함하며, 상기 제3 항체 가변 경쇄 영역(VL) 및 상기 항체 가변 중쇄 영역(VH)은 결합하여 제2 항원 결합 부위가 될 수 있고, 상기 제1 항체 가변 경쇄 영역(VL) 또는 제2 항체 가변 경쇄 영역(VL)은 펩티드 링커에 의해서 상기 단쇄 Fv 항원 결합 유닛과 연결되며;

(c) 상기 제1 폴리펩티드의 상기 제1 항체 가변 중쇄 영역(VH)은 상기 제2 폴리펩티드의 상기 제2 항체 가변 경쇄 영역(VL)과 결합하여 제3 항원 결합 부위가 되며;

(d) 상기 제1 폴리펩티드의 상기 제2 항체 가변 중쇄 영역(VH)은 상기 제2 폴리펩티드의 상기 제1 항체 가변 경쇄 영역(VL)과 결합하여 제4 항원 결합 부위가 되고;

(e) 상기 4개의 항원 결합 부위들 중 2개의 항원 결합 부위는 동일한 항원에 대해 특이성이 있는 삼중특이성 항원-결합 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드의 제1 및 제2 가변 영역과 상기 제2 폴리펩티드의 제1 및 제2 가변 영역은 3개 내지 9개의 아미노산 잔기를 갖는 링커에 의해서 연결되는 삼중특이성 항원-결합 분자.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 각각의 폴리펩티드에서, 상기 제2 가변 영역 및 상기 단쇄 Fv 유닛과, 2개 내지 35개의 아미노산 잔기를 갖는 링커에 의해서 연결되는 것인 삼중특이성 항원-결합 분자.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 동일한 항원에 대해 특이성이 있는 2개의 상기 항원 결합 부위는 T-세포 또는 자연 살해(natural killing: NK) 세포상에 존재하는 항원에 대해 특이성이 있는 삼중특이성 항원-결합 분자.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 항원은 CD3, CD16 또는 CD16A로 구성된 군에서 선택되는 것인 삼중특이성 항원-결합 분자.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 4에 있어서, 2개의 상기 항원 결합 부위는 동일한 종양 세포상의 2개의 상이한 항원에 대해 특이성이 있는 삼중특이성 항원-결합 분자.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 2개의 상이한 항원은 CD19, CD20, CD26, CD29, CD30, CD33, CD200, CD267, EGFR, EGFRvIII, HER2, HER3, IGFR, IGF-1R, Ep-CAM, PLAP, 톰센-프리덴라이히(Thomsen-Friedenreich: TF) 항원, MUC-1(mucin), CD5, IL4-R 알파, IL13-R, FcεRI 및 IgE, gpA33, MHC I/펩티드 복합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 삼중특이성 항원-결합 분자.

청구항 9

청구항 1에 따른 항원-결합 분자를 코딩하는 벡터(vector).

청구항 10

청구항 9에 따른 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포(host cell).

청구항 11

종양 치료에 사용하기 위한, 청구항 1 내지 5, 7, 및 8 중 어느 한 항에 따른 삼중특이성 항원-결합 분자.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다관능성(multifunctional), 예를 들면 삼관능성(trifunctional) 항원-결합 분자 및 그의 치료 적용, 예를 들면 면역 치료(immunotherapy)에의 적용에 관한 것이다. 상기 분자는 Fv-항체 유도체이다. 특정 구현예에서, 본 발명은 다량체(multimeric), 예를 들면 이량체(dimeric) 항원 결합 분자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이중특이성(bispecific), 즉 이관능성(bifunctional) 항체는 2개의 상이한 치료 표적을 결합시키거나 또는 2개의 구별되는 기능을 수행하는데 사용할 수 있다. 상기 항체들은 예를 들면 특정 표적 세포에 대해서 면역 효과

기 세포(immune effector cell), 예컨대 T-세포 또는 NK-세포를 모집하는데 사용할 수 있다. 암 치료를 위한 다양한 항체-단편에 기반한 분자가 알려져 있고, 연구 중에 있다.

[0003] 이관능성 및 이량체 항체는 항체 가변 영역(antibody variable domains)만을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면 VH 영역과 VL 영역 사이의 링커(linker) 서열은 이들이 접힐 수 없고 분자내 형태로 서로 결합할 수 있을 정도까지 단축될 수 있다. 예컨대 2-12개의 잔기의 짧은 링커는, scFv 분자의 접힘(folding)을 방지하고, 이량체 "디아바디(diabody)"를 형성하는 상이한 폴리펩티드 사슬의 상보적 가변 영역들 사이의 분자간 VH-VL 페어링(pairings)을 선호한다(Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448). 상기 디아바디는 이관능성 항체에 대해서 사용할 수 있고, 이러한 이관능성 항체는 2개의 단쇄 폴리펩티드 융합 생성물의 비공유 결합에 의해서 획득되며, 융합 생성물 각각은 짧은 링커에 의해서 하나의 항체로부터 다른 항체의 VL 영역으로 연결되는 VH 영역으로 이루어진다.

[0004] WO 03/025018에서는 이중특이성 및 다량체 항원-결합 분자를 기술하고 있으며, 이의 구조는 적어도 4개의 결합 영역을 갖는 동일한 단쇄 폴리펩티드에 의해서 형성된다. 각 폴리펩티드 사슬의 말단 부분에서 VH 및 VL 영역은 짧은 링커에 의해서 연결되고, 다른 폴리펩티드 사슬의 상응하는 VH 및 VL 영역과 분자간 결합하며, 각 폴리펩티드 사슬의 다른 VH 및 VL 영역은 동일 사슬내에서 서로 분자내 결합하여 항원-결합 scFv 유닛을 생성한다. 상기 구조물은 호모이량체(homodimers)인 바, 즉 이들은 서로 결합된 동일한 단쇄 폴리펩티드로 이루어 진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명에서는 다관능성 항원-결합 분자, 적어도 삼관능성인 항원-결합 분자가 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 삼관능성 항원-결합 분자는 적어도 삼중특이성인 바, 즉 적어도 3개의 상이한 항원 에피토프(epitope)에 대해 특이성을 갖는다.

[0006] 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 Fv-유도체이며, 가변 (Fv) 항체 영역만을 포함하지만, 불변 항체 영역은 포함하지 않는다. 상기 항원-결합 분자의 가변 (Fv) 항체 영역이 펩티드 링커 또는 펩티드 결합에 의해서 서로 연결된다. 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 단일 폴리펩티드 사슬의 단량체 또는 다중사슬 폴리펩티드의 다량체일 수 있다. 다량체 항원-결합 분자는, 예를 들면 2개의 폴리펩티드 사슬을 갖는 이량체, 3개의 폴리펩티드 사슬을 갖는 삼량체, 또는 4개의 폴리펩티드 사슬을 갖는 사량체일 수 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 일부 구현예에서, 상기 삼중특이성 항원-결합 분자는 적어도 4가(tetravalent)이다. "4가"는 항원-결합 분자가 4개의 항원-결합 부위를 포함하는 것을 의미하며, 각 항원-결합 부위는 동일한 항원 에피토프 특이성을 갖고, 서로 결합된 가변 경쇄 (VL) 영역과 가변 중쇄 (VH) 영역을 갖는 VH/VL 쌍(pair)을 포함한다. 그러므로, 상기 4가 항원-결합 분자는 적어도 8개의 가변 항체 영역, 즉 4개의 가변 중쇄 (VH) 영역 및 4개의 가변 경쇄 (VL) 영역을 포함한다. 상기 삼중특이성 및 4가 항원-결합 분자는 제1 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 항원-결합 부위, 제2 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 항원-결합 부위 및 제3 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 2개의 항원-결합 부위를 포함한다. 그러므로, 상기 삼중특이성 및 4가 항원-결합 분자는 3개의 상이한 항원 에피토프에 대해서 상이한 특이성들을 갖는다. 예를 들면, 상기 항원-결합 분자는 제1 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제1 항원-결합 부위, 제2 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제2 항원-결합 부위, 제3 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제3 및 제4 항원-결합 부위를 포함한다. 삼중특이성 및 4가 항원-결합 분자가 다량체인 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 분자는 헤테로이량체(heterodimeric)인 바, 즉 적어도 2개의 상이한 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 상기 2개의 폴리펩티드 사슬은 적어도 하나의 가변 영역에서 상이한 바, 예를 들어 하나의 폴리펩티드 사슬은 VH 영역만을 포함하고, 다른 하나는 동일한 항원 에피토프 특이성의 VL 영역만을 포함한다.

[0008] 상기 4가 항원-결합 분자는 8개의 항체 가변 영역을 포함하기 때문에, 이의 분자량은 100 kDa 이상이며, 따라서 3가 및 삼중특이성 단쇄 Fv 분자에 비해 더 긴 반감기가 얻어진다.

[0009] 또한, 각 삼중특이성 및 4가 항원-결합 분자는 동일한 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 2개의 항원-결합 부위를 포함한다. 이로 인해, 항원항체결합력(avidity), 즉 항원 에피토프와 항원-결합 분자 사이의 상호작용의 강도가 증가한다. 항원항체결합력이 높아지면 표적에서 유지 및 상호작용의 안정성이 증가한다는 이점이 있다. 예를 들면, 상기 표적이 세포독성 면역 효과기 세포, 가령 T-세포 또는 NK-세포인 경우, 항원항체결합력이 높아지면 항원-결합 분자의 세포용해(cytolytic) 가능성이 증가할 수 있다. 다른 예에서, 상기 표적이 종양 세포인

경우, 항원항체결합력이 높아지면 표적에서 유지 시간은 향상되고 표적으로부터의 해리 비율(off-rates)은 감소한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 삼중특이성 및 4가 항원-결합 분자는 동일한 종류의 종양 세포의 2개의 상이한 항원 에피토프에 대해 특이성이 있는 제1 및 제2 항원-결합 부위와, 면역 효과기 세포, 가령 T-세포 또는 NK-세포상의 항원 에피토프에 대해 특이성이 있는 제3 및 제4 항원 결합 부위를 포함한다. 이러한 항원-결합 분자는 특정 종류의 종양 세포에 대해서 항원항체결합력 뿐만 아니라 특이성을 증가시키고 면역 효과기 세포상의 수용체(receptor)를 활성화시키는 항원항체결합력을 증가시켜서 상기 항원-결합 분자의 특이적 세포용해 능력을 유익하게 증가시킨다. 2개의 구별되는 종양 항원 에피토프에 결합함으로써, 표적 특이성(targeting specificity)이 증가하고, 오프-타겟(off-target) 독성 감소에 의한 치료창(therapeutic window) 확장이 야기된다. 중요하게, 본 발명에 따른 삼중특이성 및 4가 항원-결합 분자는 구조적 복잡성에도 불구하고 안정하다.

[0010] 그러므로, 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 면역 효과기 세포의 세포독성 포텐셜을 재편하는 다양한 방법으로 사용됨으로써 종양 세포 또는 감염원(infectious agents)을 파괴할 수 있다. 일부 구현예에서, 삼중특이성 항원-결합 분자는 표적에서 2개의 상이한 항원 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들면, 상기 2개의 상이한 에피토프는 동일한 항원상에 존재함으로써 도피 돌연변이(escape mutants)를 방지하거나 또는 효능을 향상시키거나 또는 상기 2개의 에피토프는 상기 표적의 2개의 상이한 항원상에 존재할 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 삼중특이성 항원-결합 분자는 면역 효과기 세포상의 2개의 상이한 항원 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들면, 제1 항원-결합 부위는 활성 수용체, 예컨대 CD16A 또는 CD3에 대한 특이성을 가지며, 제2 항원-결합 부위는 동시자극 수용체(co-stimulatory receptor), 예컨대 CD137 또는 CD28에 대한 특이성을 갖는다. 다른 예에서, 제1 항원-결합 부위는 CD16A에 대한 특이성을 가지며, 제2 항원-결합 부위는 NK 세포, 예컨대 NKG2D, DNAM, NCRs에서 다른 활성 수용체에 대한 특이성을 갖는다.

[0011] 다른 구현예에서, 삼중특이성 항원-결합 분자는 종양 세포의 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제1 항원-결합 부위, 면역 효과기 세포의 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제2 항원-결합 부위, 및 성장인자(growth factors), 시토킨(cytokines), 케모킨(chemokines), 미토젠(mitogens) 및 알부민의 군으로부터 선택된 가용성 단백질 상의 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제3 항원-결합 부위를 갖는다. 상기 가용성 단백질의 예로는 IL-6, BAFF, APRIL, TGF-베타, IL-10, VEGF-A, HB-EGF, 안지오펙틴(angiopoietin)-2 및 인간 혈청 알부민(HSA)이 있다.

[0012] 다른 구현예에서, 상기 항원-결합 분자는 1개 형태의 세포에 존재하는 항원의 항원 에피토프에 대한 특이성을 갖는 1개의 항원-결합 부위, 및 하나 이상의 다른 형태의 세포 상의 항원 에피토프들에 대한 특이성을 갖는 3개의 항원-결합 부위를 갖는다.

[0013] "효과기 세포(effector cells)"는 세포독성(cytotoxicity), 식세포작용(phagocytosis), 항원 제시(antigen presentation), 시토킨 분비(cytokine release)를 자극하거나 또는 유발할 수 있는 면역계의 세포이다. 상기 효과기 세포는, 예를 들면 이에 한정되는 것은 아니지만, T 세포, 자연살해(natural killer: NK) 세포, 과립구(granulocytes), 단핵구(monocytes), 대식세포(macrophages), 수지상 세포(dendritic cells) 및 항원-제시 세포(antigen-presenting cells)이다. 효과기 세포에 대한 적당한 특이성의 예로는 이에 한정되는 것은 아니지만, T 세포에 대해서는, CD2, CD3 및 CD3 ϵ 와 같은 CD3 서브유닛, CD5, CD28 및 T-세포 수용체(TCR)의 기타 성분들; NK 세포에 대해서는, CD16 CD16A, CD25, CD38, CD44, CD56, CD69, CD94, CD335 (NKp46), CD336 (NKp44), CD337 (NKp30), NKp80, NKG2C 및 NKG2D, DNAM, NCRs; 과립구에 대해서는, CD18, CD64 및 CD89; 단핵구 및 대식세포에 대해서는, CD18, CD32, CD64, CD89 및 만노스 수용체; 수지상 세포에 대해서는, CD64 및 만노스 수용체; 뿐만 아니라 CD35를 들 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 효과기 세포의 특이성들, 즉, 세포 표면 분자는 상기 세포 표면 분자에 삼중특이성 항원-결합 분자의 결합시에 세포 살해(cell killing)를 매개함으로써 세포용해 또는 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는데 적당하다.

[0014] CD3 항원은 T-세포에서 T-세포 수용체 복합체와 결합한다. 효과기 세포에 대한 특이성이 CD3인 경우에, 본 발명에 따른 항원-결합 분자가 CD3에 결합함으로써 T-세포의 세포독성 활성이 유발된다. 상기 항원-결합 분자가 CD3 및 표적 세포, 예컨대 종양 세포에 결합함으로써 상기 표적 세포의 세포 용해가 유도될 수 있다.

[0015] 상기 CD16A (Fc γ IIIA) 항원은 NK 세포의 표면에서 발현되는 수용체이다. NK 세포는 고유한 세포용해 활성을 보유하며, 본 발명에 따른 항원-결합 분자가 CD16 또는 CD16A에 결합함으로써 표적에 대한 NK 세포의 세포독성 활성이 유발될 수 있다.

[0016] "표적(target)"은 항원 에피토프가 위치하고 항원-결합 분자가 결합되어야 하는 부위이다. 표적의 예로는 세포, 바이러스 또는 박테리아 병원체와 같은 감염원, 예를 들면 땡기 바이러스, 헤르페스 심플렉스(herpes simplex),

인플루엔자 바이러스, HIV, HCV, 또는 IL-2/IL2R과 같은 자가면역 표적(autoimmune targets)을 운반하는 세포, 자가면역 마커(autoimmune marker), 또는 자가면역 항원, 또는 종양 세포가 있다. 구현예에서, 항원-결합 부위들 중 적어도 하나는 효과기 세포에 대한 특이성을 가지며, 상기 표적은 상기 효과기 세포가 상기 표적으로 보내어져서 각각의 생물학적 반응, 예를 들면 면역 반응을 유도하거나 또는 유발할 수 있도록 하는 종양 세포일 수 있다.

[0017] 종양 세포에 대한 적당한 특이성은 각각의 종양 세포의 종양 항원 및 세포 표면 항원, 예를 들면 특이적 종양 마커일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어인 "종양 항원(tumor antigen)"은 종양 관련 항원(tumor associated antigen: TAA) 및 종양 특이성 항원(tumor specific antigen: TSA)을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 "종양 관련 항원(TAA)"은 종양 세포에 존재하는 단백질, 및 태아일 때 정상 세포(암태아성 항원(once-fetal antigens))에 존재하는 단백질, 및 출생 후 선택된 기관에 존재하지만 종양 세포에서보다 매우 낮은 농도로 존재하는 단백질을 나타낸다. TAA는 또한 종양 세포의 주변 스트로마(stroma)에 존재할 수 있지만, 신체내 어디서든 스트로마내에 더 적은 양으로 발현될 수 있다. 대조적으로, 용어 "종양 특이성 항원(TSA)"은 종양 세포에 의해서 발현되는 단백질을 나타낸다. 용어 "세포 표면 항원(cell surface antigen)"은 세포 표면에서 항체에 의해서 인식될 수 있는 분자, 항원 또는 이의 단편을 나타낸다.

[0018] 종양 세포에 대한 특이성의 예로는, 이에 한정되는 것은 아니지만, CD19, CD20, CD26, CD29, CD30, CD33, CD52, CD200, CD267, EGFR, EGFR2, EGFR3, EGFRvIII, HER2, HER3, IGF-1R, Ep-CAM, PLAP, 톰센-프리덴 라이히(Thomsen-Friedenreich: TF) 항원, TNFRSF17, gpA33, MUC-1(mucin), IGF-1R, CD5, IL4-R 알파, IL13-R, FcεRI, MHCI/펩티드 복합체 및 IgE를 포함한다.

[0019] 종양 특이성이 CD19 항원을 향하는 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 B-세포 악성종양(malignancies)의 면역 치료에 사용될 수 있으며, 이는 CD19 항원이 림프모구 백혈병(lymphoblastic leukemia: ALL)에서 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma: NHL)까지 거의 모든 B-계열 악성 종양(B-lineage malignancies)에서 발현되기 때문이다.

[0020] 종양 특이성이 CD 30을 향하는 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 호지킨 질환(Hodgkin's disease) 및 T-세포 림프종을 치료하는데 특히 유용할 수 있다.

[0021] 본 발명에 따른 항원-결합 분자의 혈청-반감기를 신체에서 증가시키기 위하여, 원하는 경우에는, 항원-결합 분자가 알부민, 예컨대 HSA에 융합될 수 있거나 또는 페길화(pegylated), 시알릴화(sialylated) 또는 글리코실화(glycosylated)될 수 있다(예를 들면 Stork et al., 2008, J. Biol. Chem., 283:7804-7812 참조).

[0022] 일부 구현예에서, 상기 삼중특이성 항원-결합 분자는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함하며, 상기 항원 결합 부위의 VH/VL 쌍의 VH 및 VL 영역은 서로 비공유 결합, 즉 상기 VH/VL 쌍의 VH 및 VL 영역은 펩티드 링커 또는 펩티드 결합에 의해서 연결되지 않는다. 특정 구현예에서, 상기 비공유 결합된 VH 및 VL 영역은 다량체 항원-결합 분자의 상이한, 즉 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬들에 위치한다. 다른 구현예에서, 상기 비공유 결합된 VH 및 VL 영역은 단량체 항원-결합 분자의 동일한 폴리펩티드 사슬에 위치하며, 적어도 다른 가변 영역이 상기 비공유 결합된 VH 및 VL 영역들 사이의 단량체상에 배열된다. 일부 구현예에서, 상기 항원 결합 부위의 비공유 결합된 VH 및 VL 영역 각각은 펩티드 링커 또는 펩티드 결합에 의해서 나란히 놓인 항원 결합 부위의 제2 VH/VL 쌍의 VH 또는 VL 영역에 결합된다. 바람직하게, 나란히 놓인 항원 결합 부위의 VH/VL 쌍의 VH 또는 VL 영역에 대한 상기 펩티드 링커는 나란히 놓인 영역들 사이에서 분자내 접힘을 방지하고 2개의 비공유 결합된 VH 및 VL 영역들이 서로 결합하도록 할 수 있을 정도로 짧다. 예를 들면 상기 펩티드 링커는 12개 이하의 아미노산 잔기, 바람직하게는 3개 내지 9개의 아미노산 잔기를 포함한다. 2개의 비공유 결합된 VH 및 VL 영역들에 의한 적어도 하나의 항원 결합 부위의 생성은 항원-결합 분자의 안정성에 있어서 유리한데, 이는 더 콤팩트한 항원-결합 분자를 유도하기 때문이다.

[0023] 예를 들면, 도 1 및 도 2는 삼중특이성 항원-결합 분자를 나타내며, 종양의 VH/VL 쌍의 VH 및 VL 영역(검정색으로 표시)은 서로 비공유 결합한다. 본 예에서, 비공유 결합된 VH 및 VL 영역은 상이한 폴리펩티드 사슬에 위치한다. 상기 항원의 비공유 결합된 VH 및 VL 영역 각각은 펩티드 링커 L3 또는 L4에 의해서 나란히 놓인 항원 결합 부위의 제2 VH/VL 쌍의 VH 또는 VL 영역에 결합한다.

[0024] 부가의 구현예에서, 상기 삼중특이성 항원-결합 분자는 적어도 하나의 제1 항원 결합 부위를 포함하며, 상기 제1 항원 결합 부위의 VH/VL 쌍의 VH 및 VL 영역들은 서로 비공유 결합, 즉 상기 VH/VL 쌍의 VH 및 VL 영역들은 펩티드 링커 또는 펩티드 결합에 의해 연결되지 않으며, 상기 제1 항원 결합 부위의 비공유 결합된 VH 영역은

펩티드 링커에 의해서 상기 제1 항원-결합 부위에 나란히 놓인 제2 항원 결합 부위의 VH/VL 쌍의 VH 영역에 결합되고, 상기 제1 항원-결합 부위의 비공유 결합된 VL 영역이 펩티드 링커에 의해서 상기 제1 항원-결합 부위에 나란히 놓인 제2 항원 결합 부위의 VH/VL 쌍의 VL 영역에 결합된다. 항원-결합 분자가 단쇄, 즉 단량체 폴리펩티드인 구현예에서, 상기 VH 및 VL 영역들이 동일한 폴리펩티드 사슬에 배열된다. 항원-결합 분자가 다량체, 즉 다중-사슬 폴리펩티드인 구현예에서, 펩티드 링커 또는 펩티드 결합에 의해서 제2 항원 부위의 VH 영역에 결합된 제1 항원 결합 부위의 VH 영역이 제1 폴리펩티드상에 위치하고, 펩티드 링커 또는 펩티드 결합에 의해서 제2 항원 결합 부위의 VL 영역에 결합된 제1 항원 결합 부위의 VL 영역은 제2 폴리펩티드상에 위치한다. 바람직하게, 상기 펩티드 링커는 나란히 놓인 VH-VH 영역과 나란히 놓인 VL-VL 영역 사이 각각의 분자내 접힘을 방지하고, VL-VL 영역과 VH-VH 영역이 결합하여 제1 및 제2 항원 결합 부위들을 형성하도록 할 만큼 짧으며, 예컨대 12개 미만의 아미노산 잔기, 바람직하게는 3개 내지 9개의 아미노산 잔기이다. 상기 VH-VH 및 VL-VL 영역 배열은 삼중특이성 항원-결합 분자가 올바르게 접히는 것을 돕는다.

[0025] "항원-결합 분자(antigen-binding molecule)"는 다가 항원-결합 특성, 바람직하게는 적어도 4개의 항원-결합 부위를 갖는 면역글로불린 유도체의 분자이다. 상기 항원-결합 분자는 단쇄, 즉 단량체 폴리펩티드 또는 다중사슬, 즉 다량체 폴리펩티드일 수 있다. 상기 항원-결합 분자의 각 폴리펩티드는 펩티드 링커 또는 펩티드 결합에 의해서 서로 연결된 항체 가변 (Fv) 영역을 포함한다. 각 항원-결합 부위는 동일한 항원 에피토프에 결합하는, 항체, 즉 면역글로불린, 가변 중쇄 영역 (VH) 및 항체 가변 경쇄 영역 (VL)에 의해서 형성된다. 상기 항원 에피토프는 동일하거나 또는 상이한 항원에 존재할 수 있다. 바람직하게, 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 면역글로불린 불변 영역 또는 이의 단편을 포함하지 않는다.

[0026] 용어 "폴리펩티드(polypeptide)"는 아마이드 결합에 의해서 연결된 아미노산 잔기의 폴리머를 나타낸다. 상기 폴리펩티드는 바람직하게 분지쇄형(branch)이 아닌 단쇄 융합 단백질이다. 상기 폴리펩티드내에서, 항체 가변 (Fv) 영역은 차례로 연결된다. 상기 폴리펩티드는 N-말단 및/또는 C-말단 이외에도 연속하는 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 예를 들면 상기 폴리펩티드는 Tag 서열, 바람직하게는 C-말단에 Tag 서열을 포함할 수 있으며, 이는 폴리펩티드의 정제에 유용할 수 있다. Tag 서열의 예로는 His-Tag, 예컨대 6개의 His-잔기로 이루어진 His-Tag, FLAG, 예컨대 DYKDDDDK 옥타펩티드(서열번호: 5) 또는 STREP® II, 예컨대 WSHQPFEK 옥타펩티드(서열번호: 6)가 있다. 다량체 항원-결합 분자에 있어서, 바람직하게 다른 Tag 서열이 상이한 폴리펩티드에 대해 사용된다.

[0027] 펩티드 링커의 아미노산 구성에 있어서, 영역들의 결합을 방해하지 않을 뿐만 아니라 다량체 분자들의 다량체화(multimerization), 예컨대 이량체화(dimerization)를 방해하지 않는 펩티드가 선택된다. 예를 들면, 글리신과 세린 잔기를 포함하는 링커는 일반적으로 프로테아제 저항성(protease resistance)을 제공한다. 상기 링커의 아미노산 서열은, 예를 들면 파아지-디스플레이 방법(phage-display methods)에 의해서 항원-결합 분자의 제조 수율 및 항원 결합을 향상시키도록 최적화될 수 있다. 구현예에서, (G₂S)_x 펩티드 링커가 사용된다.

[0028] 본 발명의 일부 구현예에서, 적어도 하나의 항체 가변 영역, 바람직하게는 모든 항체 가변 영역은 완전한 인간, 인간화된(humanized) 또는 키메라(chimeric) 영역이다. 인간화된 항체는 잘 알려진 방법, 가령, 예를 들면 CDR-그래프팅(grafting)에 의해서 제조될 수 있다(예를 들면 Antibody engineering: methods and protocols / edited by Benny K.C. Lo; Benny K.C. II Series: Methods in molecular biology (Totowa, N.J.) 참조). 그러므로 당분야의 통상의 지식을 가진 자라면, 인간 면역계에서 항원-결합 분자의 효능을 향상시키고 면역원성(immunogenicity)을 감소시키기 위해서, 당분야에 알려져 있는 표준 분자생물학 기술에 의해서, 인간이 아닌, 예컨대 쥐과(murine) 또는 비영장류(non-primate) 기원으로부터, 가변 영역 및 항원-결합 분자의 인간화된 또는 완전한 인간 버전을 용이하게 제조할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 모든 항체 가변 영역은 인간화되거나 또는 완전한 인간의 것이며; 가장 바람직하게는, 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 인간화되거나 또는 완전한 인간의 것이다. 본 명세서에서 사용된 용어 "완전한 인간(fully human)의 것"은 폴리펩티드내 가변 영역 및 가변 영역을 연결하는 펩티드의 아미노산 서열이 인간으로부터 기원하거나 또는 인간에게서 발견될 수 있다는 것을 의미한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 가변 영역은 인간 또는 인간화될 수 있지만, 항체 가변 영역들을 연결하는 펩티드는 아닐 수 있다.

[0029] 일부 구현예에서, 본 발명은 다관능성 항원-결합 폴리펩티드 다량체를 제공한다.

[0030] 일부 구현예에서, 본 발명은 3개의 상이한 항원 또는 에피토프를 표적으로 하기 위해 디자인된 삼관능성 항원-결합 폴리펩티드 다량체의 항원-결합 분자를 제공한다. 상기 다량체는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함한다. 2개의 폴리펩티드 각각은 각 폴리펩티드의 N-말단으로부터 C-말단까지 차례로 연결된 적어도 4개의 항

체 가변 영역을 갖는 단쇄 융합 펩티드이다. 각 폴리펩티드는 동일한 폴리펩티드내 분자내 페어링을 방지하기 위해 짧은 링커에 의해서 연결된 2개의 항체 가변 영역과 동일한 폴리펩티드내 가변 영역 쌍에 의해서 항원 결합 부위를 분자내 형성할 수 있는 2개의 다른 가변 영역의 항체 가변 영역 쌍을 갖는 단쇄 Fv 유닛을 포함한다. 상기 다량체는 2개의 폴리펩티드 사이에서 비공유 결합에 의해서 형성되는 반면에, 하나의 폴리펩티드의 짧은 링커에 의해서 연결된 상기 2개의 항체 가변 영역은, 다른 폴리펩티드의 2개의 상응하는 항체 가변 영역과 결합함으로써, 2개의 추가 항원 결합 부위를 형성한다. 그러므로, 상기 다량체는 적어도 4개의 항원 결합 부위를 포함하며, 적어도 4가이다. 본 발명의 특정 양태에서, 상기 다량체는 이량체, 예컨대 2개의 폴리펩티드 사슬로 이루어진 이량체이다.

[0031] 상기 삼중특이성 및 4가 항원-결합 이량체를 생성하기 위해서, 2개의 폴리펩티드는 상이한 항체 가변 영역 조성들을 가져야 하는데, 이는 3개의 특이성들 중 적어도 하나에 있어서, 각각의 항체 가변 경쇄 영역 및 가변 중쇄 영역이 상이한 폴리펩티드로 삽입됨으로써 폴리펩티드들 중 하나는 상기 특이성에 대한 가변 중쇄 영역만을 포함하고 다른 폴리펩티드는 가변 경쇄 영역만을 포함하여야 하기 때문이다. 그러므로, 본 발명에 따른 이량체는 헤테로이량체인 바, 이는 2개의 상이한 폴리펩티드로 이루어지기 때문이다.

[0032] 3개의 상이한 특이성 대한 항체 가변 영역을 포함하는 2개의 상이한 폴리펩티드가 올바르게 결합하고, 2개의 동일한 폴리펩티드들 사이에 호모이량체화(homodimerization)가 잘못되는 것이 방지되도록 특별한 조치가 취해질 수 있다. 예를 들면, 본 발명자들은, 짧은 링커에 의해 연결된 2개의 항체 가변 중쇄 영역을 하나의 폴리펩티드내에 삽입하고, 짧은 링커에 의해서 연결된 2개의 상응하는 항체 가변 경쇄 영역을 다른 폴리펩티드로 삽입함으로써, 2개의 상이한 삼중특이성 폴리펩티드들 사이에서 올바른 헤테로이량체화를 달성하였다. 놀랍게도, 삼중특이성 항원-결합 폴리펩티드 이량체의 헤테로이량체 중(heterodimeric species)들 만이 형성되었다.

[0033] 그러므로, 구현예에서 본 발명은 삼중특이성 항원-결합 분자를 제공하며, 상기 분자는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 삼중특이성 항원-결합 폴리펩티드 이량체이고, 적어도 4개의 항체 가변 영역들을 갖는 각 폴리펩티드는 차례로 연결되며,

[0034] (a) 상기 제1 폴리펩티드는 동일한 폴리펩티드내에서 분자내 페어링을 방지하는, 예를 들면 약 12개 이하의 아미노산 잔기를 갖는 제1 링커에 의해서 서로 연결되는 제1 및 제2 항체 가변 중쇄 영역(VH)과, 항체 가변 경쇄 영역(VL)과 제2 펩티드 링커에 의해서 연결된 제3 항체 가변 중쇄 영역(VH)을 갖는 단쇄 Fv 항원 결합 유닛을 포함하며, 상기 제3 항체 가변 중쇄 영역(VH) 및 항체 가변 경쇄 영역(VL)은 결합하여 제1 항원 결합 부위가 되고, 상기 제2 항체 가변 중쇄 영역(VH)은 제3 펩티드 링커에 의해서 상기 단쇄 Fv 항원 결합 유닛과 연결되고;

[0035] (b) 상기 제2 폴리펩티드는 동일한 폴리펩티드내에서 분자내 페어링을 방지하는, 예를 들면 약 12개 이하의 아미노산 잔기를 갖는 제2 펩티드 링커에 의해서 서로 연결되는 제1 및 제2 항체 가변 경쇄 영역(VL)과, 항체 가변 중쇄 영역(VH)과 제2 펩티드 링커에 의해서 연결된 제3 항체 가변 영역(VL)을 갖는 단쇄 Fv 항원 결합 유닛을 포함하며, 상기 제3 항체 가변 경쇄 영역(VL) 및 항체 가변 중쇄 영역(VH)은 결합하여 제2 항원 결합 부위가 되고, 상기 제2 항체 가변 경쇄 영역(VL)은 제3 펩티드 링커에 의해서 상기 단쇄 Fv 항원 결합 유닛과 연결되고;

[0036] (c) 상기 제1 폴리펩티드의 상기 제1 및 제2 항체 가변 중쇄 영역(VH)은 상기 제2 폴리머의 상기 제1 및 제2 항체 가변 경쇄 영역(VL)과 결합하여 2개의 추가적인, 즉 제3 및 제4 항원 결합 부위가 되며, 바람직한 구현예에서, 상기 제1 폴리펩티드의 제1 항체 가변 중쇄 영역(VH)은 상기 제2 폴리펩티드의 상기 제2 항체 경쇄 영역(VL)과 결합하여 제3 항원 결합 부위가 되고, 상기 제1 폴리펩티드의 상기 제2 항체 가변 중쇄 영역(VH)은 상기 제2 폴리펩티드의 제1 항체 가변 경쇄 영역(VL)과 결합하여 제4 항원 결합 부위가 된다.

[0037] 상기 4개의 항원 결합 부위 중 2개의 항원 결합 부위가 동일한 항원에 대해서 특이성이 있는 경우, 삼중특이성 항원-결합 폴리펩티드 이량체가 형성된다.

[0038] 상기 삼중특이성 이량체는 3개의 상이한 특이성을 인식하는데, 예를 들면 표적 세포상의 2개의 상이한 항원 또는 에피토프를 표적으로 할 수 있고, 제3 관능성(functionality), 즉 특이성으로, 예를 들면 면역 효과기 세포, 가령 예를 들면 T-세포 또는 NK-세포에 결합할 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 삼중특이성 이량체는 다양한 방법으로 사용할 수 있다.

[0040] 예를 들면, 상기 항체 가변 영역이 폴리펩티드내에서, 다른 폴리펩티드의 2개의 상응하는 항체 가변 영역들과 결합하는 2개의 항체 가변 영역이 예를 들면 상기 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 위치할 수 있도록 배열될 수 있다. 상기 2개의 항체 가변 영역은 동일한 특이성 또는 별개의 특이성을 가질 수 있다. 예를 들면 상기 2개

의 항체 가변 영역 모두는 동일한 면역 효과기 세포에 대해서 특이성을 갖거나 또는 종양 세포상의 2개의 항원에 대해서 별개의 특이성을 가질 수 있다.

- [0041] 또한, 단쇄 Fv 유닛을 형성하는 상기 2개의 항체 가변 영역은, 예를 들면 상기 폴리펩티드의 N-말단에서 C-말단의 방향으로 VH-VL 또는 VL-VH 순서일 수 있다. 상기 2개의 이량체화된 폴리펩티드의 단쇄 Fv 유닛은 동일하거나 또는 상이한 특이성을 가질 수 있다. 예를 들면 다른 폴리펩티드의 2개의 상응하는 항체 가변 영역과 결합하는 2개의 항체 가변 영역이 동일한 특이성을 갖는다면, 상기 2개의 폴리펩티드의 단쇄 Fv 유닛은 삼중특이성 이량체를 달성하기 위해서 상이한 특이성을 갖는다.
- [0042] 그러므로, 상기 적어도 4개의 항체 가변 영역은 예를 들면 다른 폴리펩티드의 2개의 상응하는 항체 가변 영역과 결합하는 2개의 항체 가변 영역이 면역 효과기 세포에 대해서 특이성이 있고 2개의 폴리펩티드의 단쇄 Fv 유닛이 2개의 구별되는 종양 항원에 대해서 특이성을 갖거나, 또는 다른 폴리펩티드의 2개의 상응하는 항체 가변 영역과 결합하는 2개의 항체 가변 영역이 별개의 종양 항원에 대해서 특이성이 있고 상기 2개의 폴리펩티드의 단쇄 Fv 유닛 양자 모두는 면역 효과기 세포에 대해서 동일한 특이성을 갖도록 배열될 수 있다.
- [0043] 상기 항원-결합 폴리펩티드는 "이량체(dimer)"이며, 상기 용어는 제1 및 제2 폴리펩티드 모노머의 복합체를 나타낸다. 하나의 양태에서, 상기 항원-결합 폴리펩티드 이량체는 "हे테로이량체"이며, 상기 용어는 항원-결합 폴리펩티드가 2개의 별개의 폴리뉴클레오티드에 의해서 코딩되는 2개의 상이한 폴리펩티드 단량체로 이루어지는 것을 의미한다.
- [0044] 바람직하게, 상기 항원-결합 이량체에서, 특히 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드 사이에 공유 결합하지 않는다는 조건으로 제1 및 제2 폴리펩티드는 서로 비공유 결합한다. 그러나, 원하는 경우에는, 상기 2개의 폴리펩티드는 상이한 폴리펩티드의 시스테인 잔기들 사이의 적어도 하나의 공유 결합, 예컨대 디설피드 연결(bridge)에 의해서 부가적으로 안정화할 수 있다.
- [0045] 상기 링커의 길이는 항원-결합 폴리펩티드 이량체의 유연성(flexibility)에 영향을 준다. 상기 항원-결합 폴리펩티드 이량체의 목적하는 유연성은 표적 항원 밀도 및 상기 표적 항원, 즉 에피토프의 접근성(accessibility)에 의존한다. 링커가 길어지면, 더 예민한 항원-결합 부위를 갖는 더 유연한 항원-결합 폴리펩티드 이량체가 제공된다. 이량체 항원-결합 폴리펩티드의 형성에 링커 길이가 미치는 효과는 예를 들면 Todorovska et al., 2001 Journal of Immunological Methods 248:47-66; Perisic et al., 1994 Structure 2:1217-1226; Le Gall et al., 2004, Protein Engineering 17:357-366 및 WO 94/13804에 기술되었다.
- [0046] 본 발명에 따르면, 제1 폴리펩티드의 제1 및 제2 항체 가변 중쇄 영역의 제1 펩티드 링커의 길이와, 제2 폴리펩티드의 제1 및 제2 항체 가변 경쇄 영역은 제1 폴리펩티드의 영역들이 제2 폴리펩티드의 영역들과 분자간 결합하여 이량체 항원-결합 폴리펩티드를 형성할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 상기 링커는 "짧으며", 예컨대 0개, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 또는 약 12개의 아미노산 잔기로 이루어진다. 아미노산 잔기가 0개인 경우, 상기 링커는 펩티드 결합이다. 상기 짧은 링커는 상이한 폴리펩티드의 항체 가변 경쇄 영역과 항체 가변 중쇄 영역 사이에 항원-결합 부위들을 결합하고 형성함으로써 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드의 이량체화를 올바르게 한다. 약 12개 이하의 아미노산 잔기로 상기 링커를 짧게 하면 일반적으로 동일한 폴리펩티드 사슬의 인접한 영역들이 서로 상호작용하는 것을 방지한다. 본 발명의 구현예에서, 상기 링커들은 약 3개 내지 약 10개, 예를 들면 7개의 연속되는 아미노산 잔기로 이루어진다. 또한, 가변 항체 영역들 사이에 12개 이상의 아미노산 잔기들을 갖는 링커를 가진 2개의 폴리펩티드를 서로 올바르게 이량체화하는 것이 대체로 가능하다(예를 들면 Le Gall et al., 2004, Protein Engineering 17:357-366 참조).
- [0047] 상기 폴리펩티드의 단쇄 Fv 유닛에 있어서, 제2 펩티드 링커는 헤드(head)에서 테일(tail)까지 분자내 접히고 단쇄 항원-결합(scFv) 유닛을 형성할 수 있을 정도로 길고 유연하다(일반적으로 약 12개 이상의 아미노산 잔기로 이루어짐). 부가적인 아미노산 잔기는 추가적인 유연성을 제공한다. 예를 들면 폴리펩티드내 단쇄 Fv 유닛의 VH와 VL 사이 또는 VL과 VH 사이의 링커는 약 12개 내지 약 35개, 특히 15개 내지 25개의 연속하는 아미노산 잔기로 이루어질 수 있다.
- [0048] 다른 폴리펩티드의 상응하는 가변 영역과 결합하는 다른 2개의 항체 가변 영역과 단쇄 Fv 유닛을 연결하는 폴리펩티드의 제3 펩티드 링커는 예를 들면 5개 내지 30개, 바람직하게는 적어도 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 또는 12개의 연속하는 아미노산 잔기일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 구현예에서, 삼중특이성 항원-결합 폴리펩티드 이량체는 종양 세포에서 2개의 구별되는 항원에 대해 이중특이성이 있고, 부가적으로 효과기 세포, 특히 T 세포 또는 NK 세포에 대해 특이성이 있다. 종양 세포에 대

한 적당한 특이성은 각각의 종양 세포, 예를 들면 구체적인 종양 마커상의 종양 항원 및 세포 표면 항원일 수 있다. 삼중특이성 항원-결합 이량체는 종양 세포 및 면역 효과기 세포에 이관능성으로 결합함으로써 T 세포 또는 NK 세포에 의해서 유도된 세포독성 반응을 유발한다.

- [0050] 상기에 기술된 구현예들 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자는 항원-결합 분자를 형성하는 개별의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현함으로써 제조할 수 있다. 그러므로 본 발명의 또 다른 구현예는 상기에 기술된 항원-결합 분자의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 DNA 또는 RNA이다.
- [0051] 상기 폴리뉴클레오티드는 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 알려져 있는 방법, 예컨대 펩티드 링커에 의해서 분리되거나 또는 폴리펩티드의 펩티드 결합에 의해서 직접 연결되는 항체 가변 영역을 코딩하는 유전자들을, 적당한 프로모터(promoter) 및 선택적으로는 적당한 전사 종결자(transcription terminator)에 연결된 유전자 구조체(genetic construct)로 결합시키고, 이를 박테리아 또는 다른 적당한 발현 시스템, 가령 예를 들면 CHO 세포에서 발현시킴으로써 제조할 수 있다. 사용되는 벡터(vector) 시스템 및 숙주(host)에 따라서, 항시성(constitutive) 및 유도성(inducible) 프로모터를 포함하는 적당한 수의 전사 및 번역 인자들이 사용될 수 있다. 상기 프로모터는 각각의 숙주 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있도록 선택된다.
- [0052] 상기 폴리뉴클레오티드가 벡터, 바람직하게는 발현 벡터로 삽입될 수 있으며, 상기 벡터는 본 발명의 부가의 구현예를 나타낸다. 상기 재조합 벡터는 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 알려져 있는 방법에 따라 제조할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 발현하도록 하는 다양한 발현 벡터/숙주 시스템을 사용할 수 있다. 대장균(*E. coli*)에서 발현하기 위한 발현 벡터의 예는 pSKK이고(LeGall et al., J Immunol Methods. (2004) 285(1):111-27), 포유류 세포에서 발현하기 위한 발현 벡터의 예는 pcDNA5 (Invitrogen)이다.
- [0054] 그러므로, 본 명세서에서 기술된 바와 같이 항원-결합 분자는 상기에 기술된 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 벡터를 숙주 세포에 도입하고, 상기 폴리펩티드 사슬이 발현되는 조건들하에 상기 숙주 세포를 배양함으로써 제조할 수 있고, 이를 분리할 수 있으며, 선택적으로 추가로 정제할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 부가의 구현예에서, 전술한 항원-결합 분자 폴리뉴클레오티드와 적어도 하나의 부가의 성분을 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0056] 본 발명은 전술한 항원-결합 분자를 암(예컨대, 비호지킨 림프종; 만성 림프구성 백혈병)의 치료를 위해서 피험체, 예컨대 질환자에게 유효량(effective dose)으로 투여하는 방법을 추가로 제공한다. 상기 항원-결합 분자는 약제(medicament)로서 사용할 수 있다.
- [0057] 당분야의 통상의 지식을 가진 사람은 당분야에 알려져 있는 입증된 기술 및 표준 방법을 사용하여 전술한 항원-결합 분자를 과도한 부담 없이 용이하게 제조하고 수득할 수 있으며, 예를 들면 Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.; The Protein Protocols Handbook, edited by John M. Walker, Humana Press Inc. (2002); 또는 Antibody engineering: methods and protocols / edited by Benny K.C. Lo; Benny K.C. II Series: Methods in molecular biology (Totowa, N.J.)를 참조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 본 발명에 따른 삼관능성, 즉 삼중특이성 항원-결합 폴리펩티드 이량체를 형성하는 제1 및 제2 폴리펩티드를 나타낸다. 상기 제1 폴리펩티드는 차례로 연결되는 4개의 항체 가변 영역 VH, VL, VH, VL를 갖는다. 제1 및 제2 VH 항체 가변 영역(검정색)은 동일한 제1 특이성을 가지며, 동일한 폴리펩티드내에 분자내 페어링을 방지하기 위한 짧은 링커(L3)에 의해서 연결되며, 단쇄 Fv 유닛은 다른 제3 가변 항체 영역(VL)과 제4 가변 항체 영역(VH)의 항체 가변 영역 쌍(흰색)을 가지며, 이는 제2 링커(L1)에 의해서 연결됨으로써, 동일한 폴리펩티드내 가변 영역 쌍에 의해 제2 특이성을 갖는 항원 결합 부위를 분자내 형성할 수 있게 된다. 상이한 특이성을 갖는 제2 항체 가변 영역(VH)과 제3 항체 가변 영역(VL)은 제3 링커(L2)에 의해서 연결된다.

상기 제2 폴리펩티드는 차례로 연결된 4개의 항체 가변 영역 VL, VL, VL, VH를 갖는다. 제1 및 제2 VL 항체 가변 영역(검정색)은 동일한 제1 특이성을 가지며 동일한 폴리펩티드내에서 분자내 페어링을 방지하기 위한 짧은 링커(L4)에 의해서 연결되며, 단쇄 Fv 유닛은 제3 특이성을 갖는 다른 제3 가변 항체 영역(VL) 및 제4 가변 항체 영역(VH)의 항체 가변 영역 쌍(회색)을 가지며, 이는 제2 링커(L1)에 의해서 연결됨으로써, 동일한 폴리펩티드내에서 가변 영역 쌍에 의해서 항원 결합 부위를 분자내 형성할 수 있게 된다. 상이한 특이성을 갖는 제2 항

체 가변 영역(VL) 및 제3 항체 가변 영역(VL)은 제3 링커(L2)에 의해서 연결된다.

도 2는 도 1의 2개의 폴리펩티드 사이에서 비공유 결합에 의해서 형성된 항원-결합 폴리펩티드 이량체를 나타내며, 제1 폴리펩티드의 짧은 링커에 의해서 연결된 2개의 항체 가변 VH 영역은 제2 폴리펩티드의 2개의 상응하는 항체 가변 VL 영역들과 결합함으로써, 동일한 특이성을 갖는 2개의 항원 결합 부위를 형성하고(검정색), 제2 특이성은 제1 폴리펩티드의 단쇄 Fv 유닛에 의해서 제공되며(흰색), 제3 특이성은 제2 폴리펩티드의 단쇄 Fv 유닛에 의해서 제공된다(회색).

도 3은 종양 세포를 이중 표적(dual targeting)화하기 위해서 삼중특이성 항체인, 본 발명에 따른 삼관능성 항원-결합 분자, 특히 삼관능성 항원-결합 폴리펩티드를 나타낸다. 상기 항체, 즉 항원-결합 폴리펩티드는 종양 세포에서 2개의 상이한 표적/에피토프를 표적으로 하도록 디자인되었고, 제3 관능기는 효과기 세포에 높은 친화도로 결합된다. 상기 항원-결합 폴리펩티드는 4개의 항원 결합 부위로 이루어지며, 2개의 종양 항원 결합 부위는 종양 세포상의 2개의 다른 항원에 결합하고, 2개의 주변 항원 결합 부위는 효과기 세포에 결합한다.

하기 실시예는 본 발명의 범위를 한정하지 않고 본 발명을 부가적으로 설명한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1

DNA 구조체:

폴리펩티드 사슬을 코딩하는 플라스미드 DNA는 DNA 엔지니어링 또는 유전자 합성 및 시퀀싱에 의해 제조하였다. 포유류 세포의 일시적 또는 안정적 형질감염(transfection)을 위한 발현 구조체는 진핵세포 발현 벡터 pCDNA5/FRT (Life Technologies)에 기반하고, 선택 마커(selection marker)로서 히그로마이신 내성 카세트(Hygromycin resistance cassette) 뿐만 아니라 바이러스성 또는 유비쿼터스 프로모터(ubiquitous promoter)의 조절 하에 목적하는 산물 유전자를 포함한다. 정제 및 분석을 위해서, 상기 산물 사슬은 His-tag, FLAG-tag 또는 StreptII-tag에 의해서 발현된다.

세포주 및 세포배양:

Flp-In CHO 세포(Life Technologies), CHO-K1 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO-K1 Chinese Hamster ovary cells)(ATCC, CCL-61)의 유도체(Kao and Puck, 1968)를 L-글루타민, 10% FCS 및 100 μ g/ml 제오신(Zeocin)이 보충된 햄스 F-12 뉴트리언트 믹스(Ham's F-12 Nutrient Mix)에서 배양하였다. 부착성 세포를 0.25% 트립신-EDTA로 분리하고 표준 세포 배양 프로토콜에 따라 계대배양하였다.

현탁액내 성장을 적응시키기 위해서, 세포를 조직 배양 플라스크에서 분리하여 무혈청 배지(serum-free medium)에 넣고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 및 120 rpm에서 셰이크 플라스크(shake flasks, Corning)내에 넣고 후속 배양하였다. 현탁액-적응된 Flp-In CHO 세포의 배양을 위한 표준 배지는 L-글루타민(Life Technologies), HT 보충제(Life Technologies), 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies) 및 100 μ g/ml 제오신(Life Technologies)이 보충된 HyClone CDM4 CHO (Thermo Scientific)이다. 현탁액-적응된 세포는 2E+6 내지 3E+6 세포/ml의 접종 밀도(seeding densities)로 매 2-3일마다 계대배양하였다. 상기 세포 농도 및 생존도(viability)는 모든 배양액에서 트립판 블루 배제 방법(trypsin blue exclusion method)을 사용하여 측정하였다. 세포는 10% DMSO를 포함하는 배지에서 냉동보존하고, MycoAlert 미코플라즈마 검출 키트(MycoAlert Mycoplasma detection Kit, Lonza)를 사용하여 미코플라즈마에 대해 음성으로 테스트하였다.

안정하게 형질감염된 세포 풀(cell pools)의 생성:

삼중특이성 후보 항체들을 안정하게 발현하는 재조합 Flp-In CHO 세포주를 현탁액-적응된 세포의 형질감염에 의해서 생성하였다. 이를 위해서, 폴리에틸렌이민(PEI)을 사용하여 목적하는 단백질(pcDNA5/FRT) 및 Flp 재조합효소(recombinase) (pOG44, Life Technologies)를 코딩하는 발현 플라스미드(2.5 μ g)로 동시-형질감염(co-transfection)시키기 이전에 세포를 제오신 없는 표준 배지에 하루동안 두었다. 간단하게, 벡터 DNA 및 형질감염 시약을 전체 100 μ l의 OptiMEM I 배지(Life Technologies)내에 DNA:PEI 1:3의 질량비로 혼합하고, 10분동안 배양한 후에 1 ml의 CHO-S-SFMII 배지(Life Technologies)내 현탁된 2E+6 Flp-In CHO 세포를 첨가하였다. 24시간 동안 배양한 후에, 500 μ g/mL의 히그로마이신 B를 첨가하고, CHO-S-SFMII 배지 내에 0.1E+6 생존가능한 세포/mL의 밀도로 상기 배양액을 희석하며, T75 배양 플라스크에 접종함으로써, 안정하게 형질감염된 세포의 선택을 개시하였다. Flp 재조합효소는 부위-특이적 DNA 재조합을 통해서 통합된 FRT 부위에서 게놈(genome)으로의 Flp-

In 발현 구조체 삽입을 매개한다(0' Gorman et al 1991). 선택하는 동안 생존가능한 세포 밀도는 일주일에 2번 측정하고, 세포를 원심분리하고 신선한 선택 배지에 0.1×10^6 생존가능한 세포/mL의 최대 밀도로 재현탁하였다. 재조합 단백질 생성물을 안정하게 발현하는 세포 풀은 약 3주의 선택 후에 회수하였으며, 이 시점에서 세포들을 셰이크 플라스크 중의 표준 배양 배지로 옮겼다. 재조합 분비된 단백질들의 발현은 표준 무염(Criterion Stain-Free, Bio-Rad) 기술을 사용하여 세포 배양 상등액(supernatants)을 단백질 겔 전기영동(protein gel electrophoresis)시킴으로써 확인하였다. 안정한 세포 풀은 50% ProFreeze (Lonza) 및 7.5% DMSO를 함유하는 배지 내에 냉동보존하였다.

[0067] 유가식(fed-batch) CHO 세포 현탁 배양액에서 재조합 단백질의 생산:

[0068] 재조합 단백질은 세포 배양 상등액으로 분비시킴으로써, 안정하게 형질감염된 CHO 세포주를 10일 유가식 배양하여 생산하였다. 이를 위해서, 목적하는 생성물을 안정하게 발현하는 세포 풀을 가스투과 막개(Corning)를 갖는 폴리카르보네이트 삼각 플라스크내의 표준 배양 배지에 6×10^5 세포/mL의 개시 밀도로 접종하고, 140 rpm으로 교반하면서 37°C 및 5% CO_2 에서 배양하였다. 유가식 배양 중에, 0일(개시일)에 40 mL/L ActiCHO 공급물 A(PAA) 및 4 mL/L의 ActiCHO 공급물 B(PAA)를 배지에 보충하고, 3일, 5일 및 7일에 2배의 양으로 배지에 보충하였다. 세포 배양 상등액은 일반적으로 >75%의 배양 생존도에서 10일 후에 수확하였다. 영양 공급 전에 격일 간격으로 생성 배양액으로부터 샘플을 수집하고, 세포밀도 및 생존도를 평가하였다. 수확하는 날에, 세포 배양 상등액은, 추가 사용 이전에 밀리포어 익스프레스 플러스 멤브레인 필터(Millipore Express PLUS Membrane Filters, Millipore)를 사용하는 진공 여과($0.22 \mu\text{m}$) 및 원심분리에 의해서 제거하였다.

[0069] 발현 역가(expression titer)의 측정:

[0070] 세포 배양 상등액(CCS) 중 단백질 발현 역가 및 생성물 무결성(product integrity)은 7일 및 10일에 표준 무염 겔 이미징 시스템(Criterion Stain-Free gel imaging system, Bio-Rad)을 사용하는 SDS-PAGE에 의해서 분석하였다($0.22 \mu\text{m}$ 여과 이전 및 이후). 생성물 역가는 알려진 농도의 참조 단백질과 비교하여 반-정량적으로(semi-quantitatively) 측정하였다.

[0071] 삼중특이성 항원-결합 폴리펩티드의 정제:

[0072] His-태그된 생성물은 Ni-NTA- 및 제조용(preparative) 크기-배제 크로마토그래피를 포함하는 2단계 절차로 CHO 세포 배양 상등액으로부터 정제하였다. 먼저, 상등액을 진공 여과($0.22 \mu\text{m}$)에 의해서 제거하고, 5 mM의 이미다졸로 조절한 후에, 5 mL/분의 유속으로 IMAC 완충액 A로 평형화된 HisTrap FF 크로마토그래피 컬럼(GE Healthcare)상에 로딩(loading)하였다. 연이어 상기 컬럼을 5 CV IMAC 완충액 A 및 10 CV의 IMAC 완충액 A와 IMAC 완충액 B의 혼합물(7%)로 세척하였다. 그후 His-태그된 생성물을, 동일한 유속으로 10 CV의 30% IMAC 완충액 B 및 5 CV의 100% IMAC 완충액 B로 연이어 세척함으로써 용리시켰다. 2.5 mL의 용리액 분획물을 수집하고, 단백질 함량 및 순도는 각 분획물에 대해서 1차원 SDS-PAGE를 실시하고 표준 무염 기술(Bio-Rad)을 사용하여 단백질을 시각화(visualization)함으로써 평가하였다. 생성물을 함유하는 분획물을 수집하고, 한외여과에 의해서 농축하였다. 이후에 농축된 시료를, HiLoad 26/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare) 컬럼을 사용하는 겔 여과에 의해서 정제하고, 2.5 mL/분으로 SEC 완충액(20 mM 트리스-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5)에서 용리시켰다. 분자량 마커 단백질(GE Healthcare)의 컬럼 잔유량과 용리량의 비교에 의해서 결정된, 정제된 생성물을 함유하는 분획물을 수집하고, 모아두었다. PD-10 탈염화 컬럼(desalting columns, GE Healthcare)을 사용하여 최종 완충액을 교환한 후에(10 mM 소듐 아세테이트, pH 5.0), 전술한 바와 같이 한외여과에 의해서 시료를 1.0 - 1.5 mg/mL로 농축하였다. 최종 시료의 순도 및 균질성(homogeneity)(일반적으로 >90%)은 전술한 바와 같이 환원 및 비환원 SDS-PAGE 이후에 단백질의 표준 무염 겔 시각화에 의해서 평가하고, 선택된 경우에는 특정 항체에 의한 면역블로팅(immunoblotting) 및 분석 SEC(analytical SEC)를 각각 실시하였다. 정제된 단백질은 추가 사용될 때까지 -80°C 에서 분취량(aliquots)으로 보관하였다.

[0073] 실시예 2 CD3xCD19xCD30 삼중특이성 분자

[0074] 항체 OKT3, HD37 및 HRS3으로부터 각각 기원하는 CD3-항체 가변 결합 영역, CD19-항체 가변 결합 영역 및 CD30-항체 가변 결합 영역을 함유하는 항원-결합 폴리펩티드 이량체들을 실시예 1에 따라 제조하였다:

[0075] 삼중특이성 1(Trispec 1):

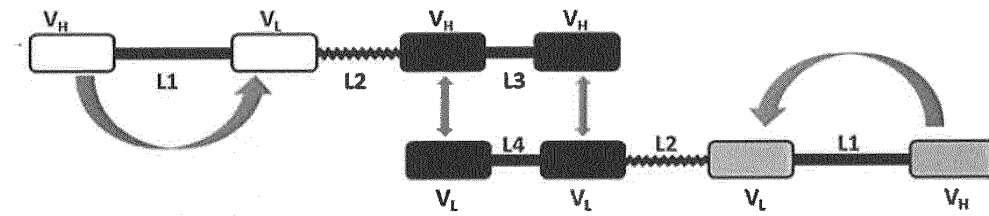
[0076] VH(CD3)-(G₂S)₂-VH(CD3)-(G₂S)₃-VH(CD30)-(G₂S)₅-VL(CD30)-His₆ (서열번호: 1)

- [0077] VL(CD3)-(G₂S)₂-VL(CD3)-(G₂S)₃-VH(CD19)-(G₂S)₅-VL(CD19)-FLAG (서열번호: 2)
- [0078] 삼중특이성 2(Trispec 2):
- [0079] VH(CD30)-(G₂S)₂-VH(CD19)-(G₂S)₂-VH(CD3)-(G₂S)₅-VL(CD3)-His₆ (서열번호: 3)
- [0080] VL(CD19)-(G₂S)₂-VL(CD30)-(G₂S)₂-VH(CD3)-(G₂S)₅-VL(CD3)-FLAG (서열번호: 4)
- [0081] 링커 1 = (G₂S)₂, 링커 2 = (G₂S)₅, 링커 3 = (G₂S)₃
- [0082] 삼중특이성 1 및 삼중특이성 2의 면역침강법(immunoprecipitation)으로 항원-결합 폴리펩티드 이량체의 헤테로 이량체 중만이 검출되었다. 삼중특이성 1 및 삼중특이성 2는 7일 후 40 °C에서 및 1시간 후 pH 3.5에서 우수한 안정성을 나타내었다.
- [0083] 실시예: 삼중특이성 항체에 의해서 매개된 세포독성 활성의 평가
- [0084] 연구 절차
- [0085] 버피 코트(buffy coats)로부터 PBMC의 분리 및 T 세포의 농축:
- [0086] 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation)에 의해서 버피 코트로부터 PBMC를 분리하였다. T 세포는 제조자의 지시에 따라, 터치하지 않은(untouched) 인간 T 세포의 면역자기 분리(immunomagnetic isolation)를 위한 EasySep™ 인간 T 세포 농축 키트(Enrichment Kit) 및 빅 이지 이지셉 마그네트(Big Easy EasySep™ Magnet)를 사용하여 PBMC 개체(population)로부터 농축하였다.
- [0087] FACS-기반 세포독성 분석:
- [0088] 효과기 세포로서 사용되는 T 세포는 기술된 바와 같이 유세포분석(flow cytometry)에 의해서 특성화하였다.
- [0089] 표적 세포(MEC-1: DSMZ, cat.: ACC 497; NALM-6: DSMZ, cat.: ACC 128)를 하기에 기술된 바와 같이 표준 조건 하에서 배양하였다. 세포독성 분석을 위해서, 표적 세포를 수확하고, FCS가 없는 RPMI 1640 배지로 두번 세척하고, PKH67 녹색 형광 세포 링커 미니 키트(Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit)에 제공된 희석제 C 중에서 2×10^7 /mL의 밀도로 재현탁시켰다. 이후 상기 세포 현탁액을 동일 부피의 두배-농축된 PKH67-표지 용액(예컨대, 250 μ L의 희석제 C 중 1 μ L PKH67)과 혼합하고, 제조자의 지시에 따라 배양하였다. 염색 반응(staining reaction)을 중지하였다. 표지된 표적 세포를 완전한 RPMI 배지로 세척한 후에, 세포를 계수하고, 완전한 RPMI 배지내에 2×10^5 /mL의 밀도로 재현탁하였다. 이후 2×10^4 의 표적 세포를 개별 웰(well)내에 지시된 항체 및 T 세포와 함께 접종하였다. 항체 부재하 효과기(effectors)에 의한 자발적 세포사 및 표적의 살해를 측정한다.
- [0090] 배양 후에, 배양액을 FACS 완충액으로 한번 세척하고, 2 μ g/mL의 PI가 보충된 150 μ L의 FACS 완충액 내에 재현탁시켰다. 포지티브 그린 PKH67 염색(positive green PKH67 staining)에 의해서 특성화되지만 PI 염색에는 음성인, 살아있는 표적 세포의 절대량을 Beckman-Coulter FC500 MPL 유세포분석기(Beckman-Coulter) 또는 Millipore Guava EasyCyte 유세포분석기(Merck Millipore)를 사용하여 측정하였다.
- [0091] 측정된 잔류 살아 있는 표적 세포에 근거하여, 특이적 세포 용해의 백분율을 하기 식에 따라 산출하였다: $[1 - (\text{살아있는 표적}_{(\text{시료})} \text{의 수}) / (\text{살아있는 표적}_{(\text{자연적})} \text{의 수})] \times 100\%$. S자형 투여량 반응 곡선 및 EC₅₀ 값을 그래프패드 프리즘 소프트웨어(GraphPad Prism software) (GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA)를 사용하여 비선형 회귀분석/4개의 파라미터 로지스틱 피트(non-linear regression/4-parameter logistic fit)에 의해서 산출하였다.
- [0092] 통계분석
- [0093] 주어진 항체 농도에 대해 수득된 용해 값은 프리즘 소프트웨어(GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA)를 사용하여 S자형 투여량-반응/4개의 파라미터 로지스틱 피트 분석에 의해서 측정 및 분석하고, 이를 사용하여 EC₅₀ 값, 백분율 용해의 복제물(replicates)의 평균 및 SD를 산출하였다.
- [0094] 결과:

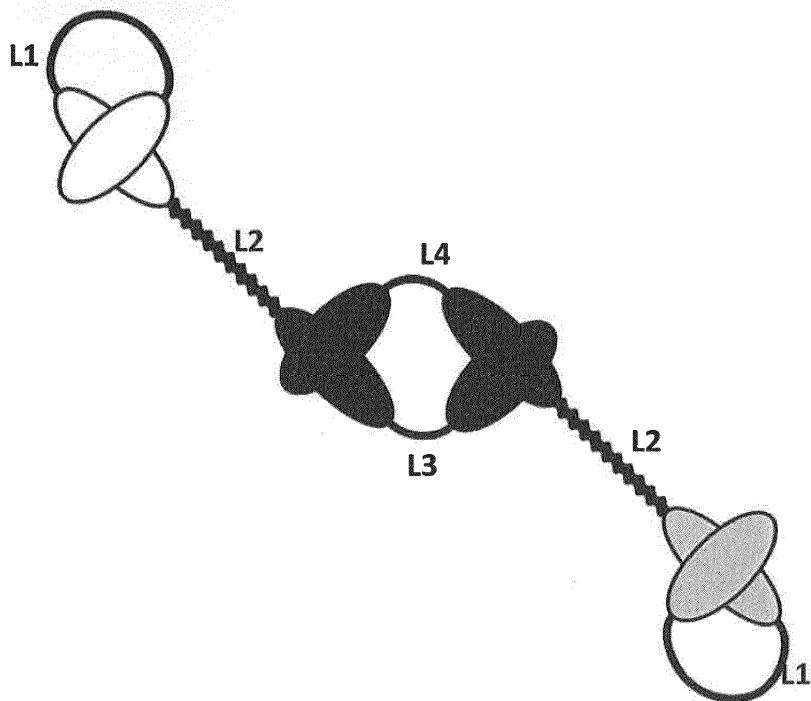
[0095] 삼중특이성 1 및 삼중특이성 2는 각각 단일-포지티브 세포주와 비교하여 이중-포지티브 세포주($CD19^+$ 및 $CD30^+$)에서 더 높은 세포독성 효능을 나타내었다.

도면

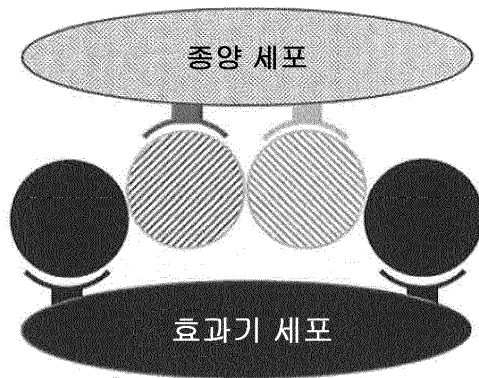
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Affimed

<120> Trifunctional Antigen Binding Molecule

<130> A 3264PCT

<150> EP14164523.4

<151> 2014-04-13

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> polypeptide chain

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln
 115 120 125
 Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
 130 135 140
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
 145 150 155 160

 Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
 165 170 175
 Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
 180 185 190
 Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 195 200 205
 Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr
 210 215 220

 Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln
 245 250 255
 Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
 260 265 270
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His
 275 280 285

 Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
 290 295 300
 Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys

305 310 315 320
 Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 325 330 335
 Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg
 340 345 350

 Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 355 360 365
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 370 375 380
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys
 385 390 395 400
 Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala
 405 410 415

 Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
 420 425 430
 Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly
 435 440 445
 Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 450 455 460
 Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln
 465 470 475 480

 Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 485 490 495
 Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His His
 500 505

 <210> 2
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> polypeptide chain
 <400> 2
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

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

 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 115 120 125
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 130 135 140
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

 145 150 155 160
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
 180 185 190
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 195 200 205
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly Gly Ser Gly Gly Ser

 210 215 220
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
 245 250 255

Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

260 265 270

Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn

275 280 285

Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser

290 295 300

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val

305 310 315 320

Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr

325 330 335

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly

340 345 350

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile

355 360 365

Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg

370 375 380

Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp

385 390 395 400

Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu

405 410 415

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe

420 425 430

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val

435 440 445

Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp

450 455 460

Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Ala Ala Ala

465 470 475 480

Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

485 490

<210> 3

<211> 513

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> polypeptide chain

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

130 135 140

Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys

180 185 190

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe

210	215	220	
Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met			
225	230	235	240
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser			
	245	250	255
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu			
	260	265	270
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly			
	275	280	285
Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly			
	290	295	300
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr			
305	310	315	320
Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys			
	325	330	335
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp			
	340	345	350
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu			
	355	360	365
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser			
	370	375	380
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu			
385	390	395	400
Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr			
	405	410	415
Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln			
	420	425	430
Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys			
	435	440	445
Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr			
	450	455	460

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
465 470 475 480

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly
485 490 495
Thr Lys Leu Glu Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ser His His His His His
500 505 510

His

<210> 4

<211> 486

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> polypeptide chain

<400> 4

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met
115 120 125

Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln

130	135	140	
Asn Val Gly Thr	Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
145	150	155	160
Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro			
	165	170	175
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
	180	185	190
Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr			
195	200	205	
His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn			
210	215	220	
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser			
225	230	235	240
Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys			
	245	250	255
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln			
260	265	270	
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg			
275	280	285	
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr			
290	295	300	
Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr			
305	310	315	320
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His			
	325	330	335
Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
340	345	350	
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln			
355	360	365	
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu			
370	375	380	

Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
385 390 395 400

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
405 410 415

Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly
420 425 430

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp
435 440 445

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe
450 455 460

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ser Trp Ser
465 470 475 480

His Pro Gln Phe Glu Lys
485

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Tag-sequence

<400> 5

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Tag-sequence

<400> 6

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5