



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월12일

(11) 등록번호 10-1968766

(24) 등록일자 2019년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/13 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7011609

(22) 출원일자(국제) 2010년11월05일

심사청구일자 2015년11월05일

(85) 번역문제출일자 2012년05월04일

(65) 공개번호 10-2012-0113705

(43) 공개일자 2012년10월15일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/055702

(87) 국제공개번호 WO 2011/057120

국제공개일자 2011년05월12일

(30) 우선권주장

61/258,565 2009년11월05일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

WO1996027016 A1*

(뒷면에 계속)

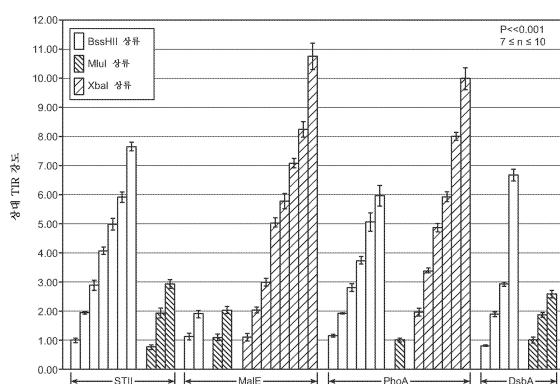
전체 청구항 수 : 총 72 항

심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 이종 폴리펩티드의 분비를 위한 방법 및 조성물

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 분자 생물학 및 단백질 기술의 분야에 대한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 박테리아로부터 이종 폴리펩티드의 분비를 위한 신호 서열에 대한 것이다. 본 발명은 또한 재조합 폴리펩티드 및 그의 용도에 대한 것이다.

대 표 도

(56) 선행기술조사문현

WO2005038031 A1*

WO2005063816 A2*

US20050032173 A1

US20070020725 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

명세서

청구범위

청구항 1

(1) 항체 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제1 번역 개시 영역 (TIR)으로서, DsbA의 변이체 공동-번역 원핵 분비 신호 서열을 포함하고, 서열 36-39, 41 및 42 중 하나의 서열을 포함하는 것인 제1 TIR; 및 (2) 항체 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제2 TIR로서, 공동-번역 또는 번역 후 원핵 분비 신호 서열을 포함하고, 서열 1-14, 16-24, 26-39, 및 41-42 중 하나의 서열을 포함하는 것인 제2 TIR을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 배양하여, 숙주 세포에서 항체의 발현시에 중쇄 및 경쇄가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 항체를 형성하는 것을 포함하는, 항체의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제2 번역 개시 영역이 PhoA 또는 MalE의 변이체 신호 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 제2 번역 개시 영역이 서열 1, 2, 8, 9, 11, 13, 29, 36, 및 37 중 하나의 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 숙주 세포가 (3) Fc 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제3 번역 개시 영역을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 제3 번역 개시 영역이 STII, PhoA, MalE 또는 DsbA의 변이체 신호 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 제3 번역 개시 영역이 PhoA 또는 DsbA의 변이체 신호 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 제3 번역 개시 영역이 서열 1-14, 16-24, 26-39, 및 41-42 중 하나의 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 제3 번역 개시 영역이 서열 23, 24, 26-39, 41 및 42 중 하나의 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 번역 개시 영역이 동등한 번역 강도를 제공하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상대 번역 강도가 1 또는 2인 방법.

청구항 11

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 제1, 제2 및 제3 번역 개시 영역이 동등한 번역 강도를 제공하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상대 번역 강도가 1 또는 2인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포에서 폴리뉴클레오티드가 프로모터를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 프로모터가 phoA, tac, lpp, lac-lpp, lac, ara, 및 T7 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵 프로모터인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 원핵 세포인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 원핵 세포가 이. 콜라이(*E. coli*)인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 이. 콜라이가 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 이. 콜라이의 유전자형이 degP 및 prc 유전자가 결핍되고, 돌연변이체 spr 유전자를 보유하는 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 DsbA, DsbC, DsbG 및 FkpA로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 원핵 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 DsbA 및 DsbC 둘 다를 코딩하는 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 항체를 집합적으로 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포 배양물로부터 항체를 회수하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 항체가 숙주 세포 배양 배지로부터 회수되는 것인 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 회수된 항체를 제약상 허용되는 담체, 부형제, 또는 항체를 포함하는 제약 제제를 제조하기 위한 담체와 조합하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 형성된 이뮤노글로불린 폴리펩티드 복합체의 적어도 50%가 항체인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 형성된 이뮤노글로불린 폴리펩티드 복합체의 적어도 70%가 항체인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 항체가 키메라 항체, 친화도 성숙 항체, 이중특이적 항체, 인간화 항체, 항체 단편 또는 인간 항체인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 항체 단편이 1-아암 항체인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 항체가 c-met에 결합하는 것인 방법.

청구항 31

제27항에 있어서, 항체가 이중특이적 항체인 방법.

청구항 32

변이체 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하며, 여기서 변이체 TIR은 DsbA 분비 신호의 핵산 변이체를 포함하고, 서열 36-39 및 41-42 중 하나의 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 변이체 번역 개시 영역의 번역 강도가 야생형 번역 개시 영역의 번역 강도 미만인 폴리뉴클레오티드.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 이종 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되어, 숙주 세포에서 이종 폴리펩티드의 발현시에 이종 폴리펩티드가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 이종 폴리펩티드를 형성하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 35

제34항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 항체 중쇄 및 항체 경쇄로부터 선택되는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 36

제35항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 (a) 항체 중쇄 및 (b) 항체 경쇄를 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 37

제36항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 (c) Fc 폴리펩티드를 더 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 38

(1) 항체 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제1 TIR로서, DsbA의 변이체 공동-번역 원핵 분비 신호 서열을 포함하고, 서열 36-39, 41 및 42 중 하나의 서열을 포함하는 것인 제1 TIR; 및 (2) 항체 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제2 TIR로서, 공동-번역 또는 번역후 원핵 분비 신호 서열을 포함하고, 서열 1-14, 16-24, 26-39, 및 41-42 중 하나의 서열을 포함하는 것인 제2 TIR을 포함하며, 숙주 세포에서 항체의 발현시에 중쇄 및 경쇄가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 항체를 형성하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 39

제38항에 있어서, 제2 번역 개시 영역이 *MaIE* 또는 *PhoA*의 변이체 신호 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 40

제38항에 있어서, 제2 번역 개시 영역이 서열 1, 2, 8, 9, 11, 13, 29, 36, 및 37 중 하나의 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 41

제38항에 있어서, (3) *Fc* 폴리펩ти드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제3 TIR을 더 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 42

제41항에 있어서, 제3 번역 개시 영역이 *STII*, *DsbA*, *MaIE* 또는 *PhoA*의 변이체 신호 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 43

제41항에 있어서, 제3 번역 개시 영역이 *PhoA* 또는 *DsbA*의 변이체 신호 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 44

제41항에 있어서, 제3 번역 개시 영역이 서열 1-14, 16-24, 26-39, 및 41-42 중 하나의 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 45

제38항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 번역 개시 영역이 동등한 번역 강도를 제공하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 46

제45항에 있어서, 상대 번역 강도가 1 또는 2인 폴리뉴클레오티드.

청구항 47

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제1, 제2, 및 제3 번역 개시 영역이 동등한 번역 강도를 제공하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 48

제47항에 있어서, 상대 번역 강도가 1 또는 2인 폴리뉴클레오티드.

청구항 49

제38항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터를 더 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 50

제49항에 있어서, 프로모터가 *phoA*, *tac*, *lpp*, *lac-lpp*, *lac*, *ara*, 및 *T7* 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵 프로모터인 폴리뉴클레오티드.

청구항 51

제38항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 원핵 세포인 폴리뉴클레오티드.

청구항 52

제51항에 있어서, 원핵 세포가 이. 콜라이(*E. coli*)인 폴리뉴클레오티드.

청구항 53

제52항에 있어서, 이. 콜라이가 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주인 폴리뉴클레오티드.

청구항 54

제52항에 있어서, 이. 콜라이의 유전자형이 degP 및 prc 유전자가 결핍되고, 돌연변이체 spr 유전자를 보유하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 55

제38항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 DsbA, DsbC, DsbG 및 FkpA로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 원핵 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 더 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 56

제55항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 DsbA 및 DsbC 둘 다를 코딩하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 57

제34항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 프로테아제, 이뮤노어드헤신, 또는 수용체의 세포외 도메인인 폴리뉴클레오티드.

청구항 58

제38항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 폴리뉴클레오티드.

청구항 59

제38항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 키메라 항체, 친화도 성숙 항체, 이중특이적 항체, 인간화 항체, 항체 단편 또는 인간 항체인 폴리뉴클레오티드.

청구항 60

제59항에 있어서, 항체 단편이 1-아암 항체인 폴리뉴클레오티드.

청구항 61

제60항에 있어서, 항체가 c-met에 결합하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 62

제59항에 있어서, 항체가 이중특이적 항체인 폴리뉴클레오티드.

청구항 63

제60항에 있어서, 항체 중쇄가 돌연변이 T366A, L368A, Y407V 및/또는 T366W 중 하나 이상을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 64

제60항에 있어서, Fc 폴리펩티드가 돌연변이 T366A, L368A, Y407V 및/또는 T366W 중 하나 이상을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 65

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득된 항체.

청구항 66

제38항 내지 제44항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

청구항 67

제66항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

청구항 68

제67항에 있어서, 원핵 세포가 이. 콜라이(*E. coli*)인 숙주 세포.

청구항 69

제68항에 있어서, 이. 콜라이가 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주인 숙주 세포.

청구항 70

제68항에 있어서, 이. 콜라이의 유전자형이 degP 및 prc 유전자가 결핍되고, 돌연변이체 spr 유전자를 보유하는 것인 숙주 세포.

청구항 71

제66항에 있어서, 원핵 샤페론 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 더 포함하는 것인 숙주 세포.

청구항 72

제71항에 있어서, 원핵 샤페론 단백질이 DsbA 및/또는 DsbC인 숙주 세포.

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002] 본 출원은 2009년 11월 5일에 출원된 미국 특허 출원 번호 61/258,565를 우선권 주장하며, 그 내용은 본원에 참

고로 포함된다.

[0003] <발명의 분야>

[0004] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 및 단백질 기술의 분야에 대한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 박테리아로부터 이종 폴리펩티드의 분비를 위한 신호 서열에 대한 것이다. 본 발명은 또한 원핵생물에 의해 생성된 재조합 폴리펩티드 및 그의 용도에 대한 것이다.

배경기술

[0005] 이. 콜라이 및 다른 원핵생물의 주변세포질 공간 또는 이들의 배양 배지로의 이종 폴리펩티드의 분비는 다양한 파라미터에 따른다. 전형적으로, 관심 폴리펩티드의 분비를 위한 벡터는 분비 신호 서열 5'을 코딩하는 DNA가 관심 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 배치되도록 조작된다.

[0006] 최근 수년간 이종 폴리펩티드, 예를 들어 항체를 다양한 장애 및 질환에 대한 진단제 및 치료제로서 사용하는 제안이 증가하였다. 다수의 연구 및 임상적 적용은 많은 양의 기능적 폴리펩티드를 요구하며, 이에 따라 폴리펩티드 생성을 위해 규모는 증가하면서 경제적인 시스템이 요청되고 있다. 원핵생물, 예컨대 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 비. 서브틸리스(*B. subtilis*)로부터 효모, 식물, 곤충 세포 및 포유동물 세포에 이르기까지 다양한 발현 숙주를 사용하는 항체의 재조합 생성이 특히 유용하다. 문헌 [Kipriyanov and Little (1999) Mol. Biotech. 12:173-201].

[0007] 다른 폴리펩티드 생성 시스템과 비교하여, 박테리아, 특히 이. 콜赖이는 다수의 고유한 이점을 제공한다. 사용되는 원료 (즉, 박테리아 세포)는 비용이 저렴하면서 성장도 용이하여, 생성물의 비용을 감소시킨다. 원핵 숙주는 예를 들어 포유동물 세포보다 훨씬 더 빠르게 성장하여, 유전자 조작을 보다 빠르게 분석하도록 한다. 보다 짧은 계대배양 시간 및 규모 증가의 용이성은 또한 박테리아 발효를 많은 양의 단백질 생성을 위한 보다 흥미로운 수단이 되도록 한다. 이. 콜赖이를 비롯한 다수의 박테리아 종의 계놈 구조 및 생물학적 활성을 잘 연구되어 있고, 광범위한 적합한 벡터가 이용가능하여, 바람직한 항체를 보다 편리하게 발현시킬 수 있다. 진핵생물과 비교하여, 보다 적은 단계가 생성 과정에 관련되며, 이는 재조합 유전자의 조작, 다중 카피의 숙주로의 적합한 형질전환, 발현 유도 및 생성물의 특성화를 포함한다. 문헌 [Pluckthun and Pack (1997) Immunotech 3:83-105].

[0008] 다양한 접근법이 박테리아에서 재조합 폴리펩티드를 만드는데 사용되어 왔다. 재조합 단백질은 세포질에서 발현되는 봉입체의 리폴딩 또는 박테리아 주변세포질로의 분비로 이어지는 발현을 통해 박테리아로부터 수득할 수 있다. 분비 및 리폴딩 사이의 선택은 일반적으로 여러 고려사항에 의해 안내된다. 분비는 일반적으로 항체를 생성하기 위한 보다 빠르고 보다 통상적으로 사용되는 전략이다. [Kipriyanov and Little (1999), 상기 문헌].

[0009] 원핵 시스템에서의 항체 발현은 상이한 규모에서 수행될 수 있다. 진탕-플라스크 배양 (2 내지 5 리터-범위)은 통상적으로 5 mg/리터 미만의 생성물을 생성한다. 문헌 [Carter et al. (1992) Bio/Technology 10:12-16]에서 는 항체 단편의 높은-수준 발현 (2 g/리터까지)이 얻어지는 높은 세포-밀도 발효 시스템을 개발하였다. 문헌 [Carter et al.]에 의해 수득한 Fab'의 그램/리터 역가는 단순한 진탕 플라스크의 것보다 발효조의 보다 정확하게 제어되는 환경으로부터 새성된 보다 높은 세포 밀도에 크게 기인한다. 시스템은 경쇄 및 중쇄 단편을 공동-발현하도록 설계된 디스트로닉 오페론을 함유한다. 디스트로닉 오페론은 포스페이트 고갈에 의해 유도될 수 있는 단일 이. 콜赖이 phoA 프로모터의 제어하에 있다. 각각의 항체 쇄는 주변세포질 공간으로의 분비를 지원하기 위해 이. 콜赖이 열-안정성 장독소 II (stII) 신호 서열 앞에 있다.

[0010] 이. 콜赖이에서의 항체 생성의 일반적인 검토를 위해, 문헌 [Pluckthun and Pack (1997) Immunotech 3:83-105]; [Pluckthun et al. (1996) in Antibody Engineering: A Practical Approach, pp 203-252 (Oxford Press)]; [Pluckthun (1994) in Handbook of Exp Pharmcol vol 3: The Pharmcol of Monoclonal Antibodies, pp269-315 (ed. M. Rosenberg and G.P. Moore; Springer-Verlag, Berlin)]을 참조한다.

[0011] 다수의 생물학적 검정 (예컨대, X선 결정학) 및 임상적 적용 (예컨대, 단백질 요법)은 많은 양의 단백질을 필요로 한다. 따라서, 적절하게 어셈블리된, 가용성 및 기능성 이종 폴리펩티드, 예컨대 항체의 생성을 위한, 고수율의 간단한 시스템이 요구되고 있다.

[0012] 특히 출원 및 공개공보를 포함하여 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0013] <발명의 개요>

본 발명은 공동-번역 분비 신호 펩티드 (공동-번역 방식으로 전위를 지시하는 신호 펩티드)를 포함하는 번역 개시 영역 (TIR) 변이체 및/또는 번역후 분비 신호 펩티드 (번역후 방식으로 전위를 지시하는 신호 펩티드)를 포함하는 TIR 변이체를 포함하는, 신규 TIR 변이체의 사용을 포함하는 이종 단백질의 생성을 증가시키기 위한 신규 수단을 제공한다. 또한, 피크 발현을 위해 공동-번역 또는 번역후 분비 신호 펩티드를 포함하는 TIR에 작동 가능하게 연결된 항체 경쇄 및 공동-번역 분비 신호 펩티드를 포함하는 TIR에 작동 가능하게 연결된 항체 중쇄를 포함하는 벡터를 사용하여 증가된 항체 생성이 본원에서 입증되었다. 신규 TIR 변이체가 또한 본원에 제공된다.

[0015] 한 측면에서, 본 발명은 변이체 번역 개시 영역을 제공한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 변이체 번역 개시 영역 (일부 실시양태에서, 원핵 번역후 분비 신호 서열 또는 원핵 공동-번역 분비 신호 서열)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 분비 신호 서열, 예컨대 PhoA, MaIE, DsbA 또는 STII의 핵산 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 MlaI, BssHII, 또는 XbaI 제한 부위를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 표 2에 나타낸 서열을 포함하는 번역 개시 영역 변이체를 포함한다.

[0016] 한 측면에서, 본 발명은 변이체 분비 신호 서열을 제공한다. 일부 실시양태에서, 분비 신호 서열은 원핵 번역 후 분비 신호 서열 또는 원핵 공동-번역 분비 신호 서열이다. 일부 실시양태에서, 분비 신호 서열은 진핵 번역 후 분비 신호 서열 또는 진핵 공동-번역 분비 신호 서열이다. 일부 실시양태에서, 변이체는 PhoA, MaIE, DsbA 또는 STII 분비 신호 서열의 핵산 변이체이다. 일부 실시양태에서, 변이체는 표 2에 나타낸 분비 신호 서열을 포함한다. 본 발명의 변이체 분비 신호 서열은, 예를 들어 본원에 개시된 임의의 방법에 사용하기 적합하다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 번역 개시 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 번역 개시 영역은 표 2에 나타낸 서열 (예를 들어, 서열 1-42 중 하나)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 번역 개시 영역은 서열 1-14, 16-24, 26-39, 41-42 중 하나를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 본원에 개시된 임의의 방법에 사용하기 적합하다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 분비 신호 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 분비 신호 서열은 표 2에 나타낸 서열 (예를 들어, 서열 1-42 중 하나)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 번역 개시 영역은 서열 1-14, 16-24, 26-39, 41-42 중 하나를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 본원에 개시된 임의의 방법에 사용하기 적합하다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이종 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 번역 개시 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 이에 의해 숙주 세포 (예를 들어, 원핵 숙주 세포, 예를 들어, 이. 콜라이 숙주 세포)에서 이종 폴리펩티드의 발현시에 이종 폴리펩티드가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 이종 폴리펩티드를 형성한다. 이종 폴리펩티드의 예는 본원에 추가로 개시되어 있다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드는 항체 중쇄이다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드는 항체 경쇄이다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드는 Fc 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드는 다량체 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드는 이종다량체이다. 일부 실시양태에서, 번역 개시 영역은 본원에 개시된 임의의 번역 개시 영역, 예를 들어 표 2에 나타낸 서열을 포함하는 번역 개시 영역이다. 일부 실시양태에서, 번역 개시 영역은 서열 1-42 중 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 번역 개시 영역은 서열 1-14, 36-39, 41-42 중 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 번역 개시 영역은 변이체 STII, DsbI, PhoA, 또는 MaIE 신호 서열을 포함한다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (1) 제1 이종 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 제1 번역 개시 영역 (TIR) (여기서, 상기 TIR은 공동-번역 원핵 분비 신호 서열을 포함함); 및 (2) 제2 이종 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 제2 TIR (여기서, 제2 TIR은 공동-번역 또는 번역 후 원핵 분비 신호 서열을 포함함)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 이에 의해 숙주 세포에서 항체의 발현시에 제1 및 제2 이종 폴리펩티드가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 폴리펩티드 복합체를 형성한다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 (1) 항체 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 제1 번역 개시 영역 및 (2) 항체 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 제2 번역 개시 영역을 포함하고, 이에 의해 숙주 세포 (예를 들어, 원핵 숙주 세포, 예를 들어, 이. 콜라이 숙주 세포)에서 항체의 발현시에 중쇄 및 경쇄가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 항체를 형성한다.

- [0022] 일부 실시양태에서, 제1 번역 개시 영역은 공동-번역 원핵 분비 신호 서열 (예를 들어, 신호 인식 웨티드를 통해 번역을 지시하는 신호 서열)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 번역 개시 영역은 STII 또는 DsbA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 번역 개시 영역은 DsbA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 번역 개시 영역은 PhoA 또는 MaIE 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 번역 개시 영역은 서열 1-10 및 36-42 중 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 번역 개시 영역은 서열 1-10 및 36-29 및 41 및 42 중 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 번역 개시 영역은 서열 1-42 중 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 번역 개시 영역은 서열 1-14, 16-24, 26-39, 41-42 중 하나의 서열을 포함한다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 제2 번역 개시 영역은 (i) 공동-번역 원핵 분비 신호 서열 또는 번역후 원핵 분비 신호 서열 (예를 들어, sec 경로를 통해 번역을 지시하는 신호 서열)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 번역 개시 영역은 STII, DsbA, MaIE 또는 PhoA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 번역 개시 영역은 PhoA 또는 MaIE 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 번역 개시 영역은 서열 1-42 중 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 번역 개시 영역은 서열 1-14, 16-24, 26-39, 41-42 중 하나의 서열을 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 (3) Fc 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제3 번역 개시 영역을 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 STII, PhoA 또는 DsbA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 DsbA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 PhoA 신호 서열을 포함한다.
- [0025] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (1) 항체 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제1 번역 개시 영역 (TIR) (여기서, 상기 TIR은 공동-번역 원핵 분비 신호 서열을 포함함); 및 (2) 항체 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제2 TIR (여기서, 제2 TIR은 공동-번역 또는 번역후 원핵 분비 신호 서열을 포함함)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 이에 의해 숙주 세포에서 항체의 발현시에 중쇄 및 경쇄가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 항체를 형성한다.
- [0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체 단편 (예컨대, 1가 항체 단편)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 (1) 항체 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 본 발명의 제1 번역 개시 영역; (2) 항체 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제2 번역 개시 영역; 및 (3) Fc 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제3 번역 개시 영역을 포함하고, 이에 의해 숙주 세포 (예를 들어, 원핵 숙주 세포)에서 항체의 발현시에 중쇄, 경쇄 및 Fc 폴리펩티드가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 항체 (예컨대, 1-아암 항체)를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 공동-번역 원핵 분비 신호 서열 또는 번역후 원핵 분비 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 STII, PhoA, MaIE, 또는 DsbA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 PhoA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 서열 1-42 중 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 서열 1-14, 16-24, 26-39, 41-42 중 하나의 서열을 포함한다.
- [0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 (1) 항체 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 본 발명의 제1 번역 개시 영역 (여기서, 제1 번역 개시 영역은 STII 또는 DsbA 신호 서열을 포함함) 및 (2) 항체 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제2 번역 개시 영역 (여기서, 제2 번역 개시 영역은 STII, DsbA, MaIE 또는 PhoA 신호 서열을 포함함)을 포함하고, 이에 의해 숙주 세포 (예를 들어, 원핵 숙주 세포)에서 항체의 발현시에 경쇄 및 중쇄가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 항체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 번역 개시 영역은 DsbA 신호 서열을 포함하고, 제2 번역 개시 영역은 MaIE 또는 PhoA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 (3) Fc 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 제3 번역 개시 영역을 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 STII, PhoA 또는 DsbA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 PhoA 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역은 DsbA 신호 서열을 포함한다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 상기 변이체 번역 개시 영역의 번역 강도는 야생형 번역 개시 영역의 번역 강도 미만이다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체 번역 개시 영역의 번역 강도는 야생형 번역 개시 영역의 번역 강도 초과이다. 일부 실시양태에서, 번역 개시 변이체의 아미노산 서열은 야생형 아미노산 서열에 비해 변경되지 않는다. 일부 실시양태에서, 번역 개시 변이체의 아미노산 서열은 야생형 아미노산 서열에 비해 변경된다. 일부 실시양태에

서, 번역 개시 영역은 원핵 분비 신호 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 번역 개시 영역 (및 일부 실시양태에서, 제3 번역 개시 영역)은 대략 동등한 번역 강도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 상대 번역 강도은 약 1 또는 2이다. 일부 실시양태에서, 상대 번역 강도는 약 1이다. 일부 실시양태에서, 상대 번역 강도는 약 2이다. 일부 실시양태에서, 상대 번역 강도는 1 및/또는 2이다. 일부 실시양태에서, 상대 번역 강도는 약 3 또는 약 4이다. 일부 실시양태에서, 상대 번역 강도는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 초과 (예컨대, 6 또는 7 또는 그 초과) 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0029] 일부 실시양태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이종 폴리펩티드에 작동가능하게 연결된 프로모터를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 phoA, tac, lpp, lac-lpp, lac, ara, trp, 및 T7 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 phoA 프로모터이다. 항체 중쇄 및 경쇄의 발현과 관련된 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 (a) 제1 프로모터 (여기서, 제1 프로모터는 경쇄에 작동가능하게 연결됨) 및 (b) 제2 프로모터 (여기서, 제2 프로모터는 중쇄에 작동가능하게 연결됨)를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 프로모터는 둘 다 phoA 프로모터이다. 항체 중쇄 및 경쇄 및 Fc 폴리펩티드의 발현과 관련된 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 (c) 제3 프로모터 (여기서, 제3 프로모터는 Fc 폴리펩티드에 작동가능하게 연결됨)를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 프로모터는 Fc 폴리펩티드이다.

[0030] 하나 초과의 폴리펩티드 (예를 들어, 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체)를 포함하는 폴리펩티드를 발현시켰을 때, 폴리펩티드를 발현시키기 위한 폴리뉴클레오티드는 폴리시스템트로닉 폴리뉴클레오티드 (즉, 단일 프로모터의 조절 제어하에 다수의 시스템트론을 함유하고 발현시키는 단일 폴리뉴클레오티드)일 수 있다. 폴리시스템트로닉 벡터의 통상적인 예는 하나의 프로모터의 제어하에 2개의 상이한 폴리펩티드를 함유하고 발현시키는 "디시스템트로닉" 벡터이다. 디시스템트로닉 또는 폴리시스템트로닉 벡터의 발현시에 다중 코딩 영역 (예를 들어, 유전자)은 먼저 단일 전사 유닛으로 전사된 후에 개별적으로 번역된다. 시스템트론은 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 인접한 제어 영역 (예를 들어, TIR 포함)을 포함하는 번역 유닛에 광범위하게 동등한 유전자 요소를 나타낸다. 다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 개별적인 시스템트론을 포함할 수 있고, 이는 적어도 2개의 개별적인 프로모터-시스템트론 쌍을 포함하는 단일 폴리뉴클레오티드를 나타내고, 여기서 각각의 시스템트론은 그 자신의 프로모터의 제어하에 있다. 개별적인 시스템트론 발현 벡터의 발현시에 상이한 유전자의 전사 및 번역 과정은 둘 다 개별적이고, 독립적이다. 또 다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 폴리시스템트로닉 부분 및 개별적인 시스템트론 부분을 포함할 수 있다.

[0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터이다.

[0032] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 담체는 제약상 허용된다.

[0033] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 항체 (일부 실시양태에서, 이중특이적 또는 1-아암 항체)를 코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 숙주 세포는 항체를 집합적으로 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 벡터는 임의의 유형, 예를 들어 재조합 벡터, 예컨대 발현 벡터일 수 있다. 임의의 다양한 숙주 세포가 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어, 이. 콜라이이다. 일부 실시양태에서, 이. 콜라이는 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주이다. 일부 실시양태에서, 이. 콜라이의 유전자형은 degP 및 prc 유전자가 결핍되어 있고, 돌연변이체 spr 유전자를 보유한다.

[0034] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 샤파론 단백질 (예컨대, Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, FkpA 및/ 또는 DsbG))을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 샤파론 단백질은 숙주 세포에서 과다발현된다. 일부 실시양태에서, 샤파론 단백질은 DsbA 및/또는 DsbC이다.

[0035] 한 측면에서, 숙주 세포는 1-아암 항체를 집합적으로 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 단일 폴리뉴클레오티드는 (a) 1-아암 항체의 경쇄 및 중쇄 성분, 및 (b) Fc 폴리펩티드를 코딩한다. 한 실시양태에서, 단일 폴리뉴클레오티드는 1-아암 항체의 경쇄 및 Fc 폴리펩티드 성분을 코딩하고, 개별적인 폴리뉴클레오티드는 중쇄 폴리펩티드를 코딩한다. 한 실시양태에서, 단일 폴리뉴클레오티드는 1-아암 항체의 중쇄 및 Fc 폴리펩티드 성분을 코딩하고, 개별적인 폴리뉴클레오티드는 1-아암 항체의 경쇄 성분을 코딩한다. 한 실시양태에서, 개별적인 폴리뉴클레오티드는 각각 1-아암 항체의 경쇄 성분, 1-아암 항체의 중쇄 성분 및 Fc 폴리펩티드를 코딩한다.

[0036]

이종 폴리펩티드는 본원에 기재된다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 다른 실시양태에서, 항체는 폴리클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 친화도 성숙 항체, 인간화 항체, 및 인간 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항체는 이중특이적 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체는 1가 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 또는 scFv이다. 일부 실시양태에서, 항체는 Fc 영역을 포함하는 1-아암 항체 (즉, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인이 단일 항원 결합 아암을 형성함)이고, 여기서 Fc 영역은 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 복합체에 존재하고, 상기 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자와 비교하여 상기 항체 단편의 안정성을 증가시키는 Fc 영역을 형성한다.

[0037]

일부 실시양태에서, 항체는 c-met에 결합한다 (일부 실시양태에서, 특이적으로 결합한다). 일부 실시양태에서,

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIIDPS  
NSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYW
```

항-c-met 항체는 (a) 서열 쇄 가변 도메인, CH1 서열, 및 제1 Fc 폴리펩티드를 포함하는 제1 폴리펩티드; (b) 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW ASTR ESGVPSRFSGSGETDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKR (서열 44)

를 갖는 경쇄 가변 도메인, 및 CL1 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 (c) 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 복합체로 존재하고, 단일 항원 결합 아암을 형성하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 복합체에 존재하고, 상기 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자와 비교하여 상기 항체 단편의 안정성을 증가시키는 Fc 영역을 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 도 7에 도시된 Fc 서열 (서열 68)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 도 8에 도시된 Fc 서열 (서열 47)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 도 8에 도시된 Fc 서열 (서열 47)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 도 7에 도시된 Fc 서열 (서열 68)을 포함한다.

[0038]

일부 실시양태에서, 항-c-met 항체는 (a) 중쇄 가변 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 (상기 폴리펩티드는 서

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIIDPS  
NSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYW  
GQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKS  
CDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLCAVKGFYPSDIAVEWESNG  
QPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
```

열 을 포함하는 제2 폴리펩티드 (서열 45) 를 포함함); (b) 경쇄 가변 도메인 (폴리펩티드는 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW ASTRESGVPSRFSGSGETDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWVVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFRGE (서열 46)

하는 제3 폴리펩티드 (폴리펩티드는 서열 DKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (서열 47) 을 포함함)를 포함하고, 여기서 중쇄

가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 복합체로 존재하고, 단일 항원 결합 아암을 형성하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 복합체에 존재하고, 상기 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자와 비교하여 상기 항체 단편의 안정성을 증가시키는 Fc 영역을 형성한다.

[0039] 한 실시양태에서, 항-c-met 항체는 7에 도시된 CDR1-HC, CDR2-HC 및 CDR3-HC 서열 (서열 52-53 및 66) 중 하나 이상을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 도 7에 도시된 CDR1-LC, CDR2-LC 및 CDR3-LC 서열 (서열 49-51) 중 하나 이상을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 도 7에 도시된 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및 FR4-HC 서열 (서열 62-65)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 도메인은 도 7에 도시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및 FR4-LC 서열 (서열 57-60)을 포함한다.

[0040] 일부 실시양태에서, 항체는 항체 단편 내에서 Fc 서열의 동종이량체화를 최소화하면서 이종이량체화는 촉진하는 적어도 하나의 특징을 포함한다. 이러한 특징(들)은 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 방법에 의해 수득 가능한 이뮤노글로불린 집단의 수율 및/또는 순도 및/또는 균질성을 개선시킨다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드 및 제2 Fc 폴리펩티드는 인터페이스에서 만나고/상호작용한다. 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 인터페이스에서 만나는 일부 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드 (서열)의 인터페이스는 제1 Fc 폴리펩티드 (서열)의 인터페이스에서 함몰부 (또한, "홀(hole)"로 지칭됨)에 배치가능한 돌출부 (또한, "눕(knob)"으로 지칭됨)를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 WO2005/063816에 기재된 바와 같이 "눕" 및 "홀"을 구성하는 Fc 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 홀 돌연변이는 Fc 폴리펩티드의 T366A, L368A 및/또는 Y407V 중 하나 이상일 수 있고, 놓 돌연변이는 T366W일 수 있다.

[0041] 본 발명은 또한 본 발명의 변이체 TIR 및 신호 서열을 사용하는 방법을 제공한다. 본원에 개시된 임의의 변이체 TIR, 신호 서열 및 폴리뉴클레오티드가 방법, 예를 들어 본원에 개시된 본 발명의 방법에 사용하기 적합한 것으로 이해된다. 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 이종 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 이종 폴리펩티드 (예를 들어, 전장 항체 및 그의 단편을 포함하는, 본원에 정의된 바와 같은 항체)의 제조 방법을 제공하고, 상기 방법은 폴리뉴클레오티드가 발현되도록 본 발명의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 번역 개시 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하고, 이에 의해 숙주 세포 (예를 들어, 원핵 숙주 세포)에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현시에 이종 폴리펩티드가 폴딩되어 생물학적 활성 이종 폴리펩티드를 형성한다. 항체의 발현이 관련된 실시양태에서, 숙주 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현시에 경쇄 및 중쇄가 폴딩 및 어셈블리되어 생물학적 활성 항체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포 배양물로부터 이종 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 회수하는 것을 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드는 숙주 세포 배양 배지로부터 회수된다. 일부 실시양태에서, 방법은 회수된 이종 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 제약상 허용되는 담체, 부형제, 또는 이종 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 포함하는 제약 제제를 제조하기 위한 담체와 조합하는 것을 더 포함한다.

[0042] 한 측면에서, 본 발명은 세포로부터 관심 이종 폴리펩티드를 분비시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 폴리뉴클레오티드가 발현되고, 이종 폴리펩티드가 분비되도록 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0043] 한 측면에서, 본 발명은 세포로부터 관심 이종 폴리펩티드를 전위시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 폴리뉴클레오티드가 발현되고, 이종 폴리펩티드가 전위되도록 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0044] 또 다른 측면에서, 본 발명은 번역 개시 영역의 폴리뉴클레오티드 변이체 세트의 제어하에 폴리펩티드의 발현의 수준을 비교하는 것 (여기서, 변이체 세트는 소정 범위의 번역 강도를 나타냄), 및 성숙 폴리펩티드의 생성을 위한 최적의 번역 강도를 결정하는 것을 포함하는, 세포에서 관심 이종 폴리펩티드의 분비를 최적화하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 최적의 번역 강도는 야생형 번역 개시 영역의 번역 강도 미만이다. 일부 실시양태에서, 최적의 번역 강도는 야생형 번역 개시 영역의 번역 강도 초과이다. 일부 실시양태에서, 번이체는 분비 신호 서열의 폴리뉴클레오티드 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 번이체 분비 신호 서열은 sec 경로 신호 서열 및/또는 SRP 경로 신호 서열이다. 일부 실시양태에서, 번이체 분비 신호 서열은 PhoA, MalE, DsbA, 또는 STII 번이체 신호 서열이다. 일부 실시양태에서, 번이체는 표 2에 나타낸 하나 이상의 번이체이다. 일부 실시양태에서, 번이체는 서열 1-14, 36-39, 41-42 중 하나의 서열을 포함한다.

[0045] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 방법에 의해 수득한 이종 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드는 항체이다.

- [0046] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 및/또는 면역 (예컨대, 자가면역) 장애의 치료적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 방법을 사용하여 생성된 이종 폴리펩티드의 용도를 제공한다. 이종 폴리펩티드는 항체, 항체 단편, 폴리펩티드 (예를 들어, 올리고펩티드), 또는 이들의 조합을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 형태의 것일 수 있다.
- [0047] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애 및/또는 면역 (예컨대, 자가면역) 장애의 치료적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 용도를 제공한다.
- [0048] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애 및/또는 면역 (예컨대, 자가면역) 장애의 치료적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 백터의 용도를 제공한다.
- [0049] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애 및/또는 면역 (예컨대, 자가면역) 장애의 치료적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 숙주 세포의 용도를 제공한다.
- [0050] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애 (상처 치유)의 치료적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 제조품의 용도를 제공한다.
- [0051] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애 및/또는 면역 (예컨대, 자가면역) 장애의 치료적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 키트의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1: 박테리아의 내막을 가로지르는 표시된 신호 웨პ티드의 전위. 말토스-결합 주변세포질 단백질 (MalE) 및 알칼리성 포스파타제 (PhoA) 신호 웨პ티드는 분자 모터 SecA의 도움을 받아 번역후 방식으로 세포질로부터 주변 세포질로의 전위를 지시한다. 열-안정성 장독소 II (StII) 및 티올:디슬피드 교환 단백질 (DsbA) 신호 웨პ티드는 신호 인식 입자 (SRP)로부터 도움을 받아 공동-번역 방식으로 전위를 지시한다.
- 도 2: 신호 웨პ티드 변이체의 상대 전위 개시 영역 강도. StII, MalE, PhoA, 또는 DsbA 신호 웨პ티드와 이. 콜라이 알칼리성 포스파타제 (BAP) 유전자의 성숙 도메인 사이에 융합을 갖는 백터를 운반하는 27C7 세포의 정상화된 기본 알칼리성 포스파타제 활성. 각각의 막대는 밤색 기질 PNPP와 인큐베이션된 개별 배양물을 나타내고, 효소 활성은 빈 백터 (pBR322)를 운반하는 배양물의 흡광도보다 낮은 410 nm에서의 그 배양물의 흡광도로 결정하였다. 활성은 플라스미드 pPho41을 운반하는 27C7 세포의 기초 활성에 대해 정상화하였다. 밤색 막대는 개시 코돈의 제1 염기쌍에 대해 -9 위치에서 BssHII 제한 부위를 갖는 신호 웨პ티드 변이체를 나타낸다. 회색 또는 줄무늬 막대는 각각 -9 위치에서 MluI 또는 XbaI 부위를 나타낸다. 모든 활성은 7회 내지 10회 반복 실험의 평균이다. 오차 막대는 95% 신뢰도 한계를 갖는 평균에서 확실하지 않은 것으로 보고된다. 인접한 막대 사이의 상대 TIR 강도의 차이는 모두 통계적으로 유의하다 ($P < 0.001$). 막대는 클론 SH1.2, SH2.41, SH3.38, SH4.60, SH5.34, SH6.52, SH8.36, SL1.2, SL2.74, SL3.72, MH1.92, MH2.100, ML1.97, ML2.123, MX1.wt, MX2.15, MX3.12, MX5.37, MX6.4, MX7.25, MX8.13, MX11.34, PH1.70, PH2.64, PH3.wt, PH4.67, PH5.71, PH6.77, PL1.104, PX2.41, PX3.wt, PX5.53, PX6.15, PX8.24, PX10.23, DH1.48, DH2.wt, DH3.79, DH7.72, DL1.wt, DL2.3, DL3.37 (왼쪽에서 오른쪽 순서로)을 나타낸다.

도 3: 중쇄 신호 웨პ티드 조작된 항체 종의 어셈블리 모니터링. 64B4 세포를 25 mL의 C.R.A.P. 포스페이트-제한 배지에서 24시간 동안 성장시키고, 광학 밀도 (OD)에 의해 정상화된 가용성 분획 뿐만 아니라 전체 단백질 펠릿을 SDS-PAGE 분석을 위해 준비하였다. (A) 플라스미드 pBR-SS-5D5-1.1 (SS1.1), pBR-MS-5D5-1.1 (MS1.1), pBR-DS-5D5-1.1 (DS1.1) 또는 pBR-PS-5D5-1.1 (PS1.1)을 운반하는 세포로부터의 샘플을 SDS-PAGE 겔 전기영동에 의해 분리하고 (질량 (kDa) 좌측 표시), 니트로셀룰로스로 옮기고, α -Fc 특이적 항체로 중쇄-함유 종의 존재에 대해 프로빙하였다. 가용성 샘플 (상부 블롯)은 (상부로부터 하부로): 전장 항체, 중쇄-중쇄-경쇄 (HHL), 중쇄-경쇄 (HL) 또는 유리 중쇄 (중쇄 단량체)에 상응하는 추정상 확인된 밴드로 이루어진다. 정상화된, 전체 단백질 샘플 (하부 블롯)을 0.2 M DTT로 환원시키 디슬피드 결합 구조를 파괴하고, 각각의 개별 레인은 약 49 kDa의 겉보기 질량을 갖는 단일 밴드로 이동하였다. (B) (A)로부터의 샘플은 별개의 SDS-PAGE 겔 상에서 수행하고 (질량 (kDa) 우측 표시), 니트로셀룰로스로 옮기고, α - κ Lc 특이적 항체로 경쇄를 함유하는 복합체에 대해 프로빙하였다. 가용성 샘플 (상부 블롯)은 (상부로부터 하부로): 전장 항체, HL, 경쇄-경쇄 (LL) 이량체 또는 유리 경쇄 (경쇄 단량체)에 상응하는 추정상 확인된 밴드로 이루어진다. 정상화된, 전체 단백질 샘플 (하부 블롯)을 0.2 M DTT로 환원시키고, 각각의 개별 레인은 약 25 kDa의 겉보기 질량을 갖는 단일 밴드로 이동하였다. 약어: S = 신호 서열 StII M = 신호 서열 MalE D = 신호 서열 DsbA P = 신호 서열 PhoA. XX#.#

(예를 들어, DS1.1)은 실험에 사용된 중쇄 신호 서열, 경쇄 신호 서열, 중쇄 TIR, 경쇄 TIR을 나타낸다.

도 4: 경쇄 신호 패티드 조작된 항체 종의 어셈블리의 모니터링. 64B4 세포를 25 mL의 C.R.A.P. 포스페이트-제한 배지에서 24시간 동안 성장시키고, 광학 밀도 (OD)에 의해 정상화된 가용성 분획 뿐만 아니라 전체 단백질 펠릿을 SDS-PAGE 분석을 위해 준비하였다. 플라스미드 pBR-DS-5D5-1.1 (DS1.1), pBR-DS-5D5-1.2 (DS1.2), pBR-DM-5D5-1.1 (DM1.1), pBR-DM-5D5-1.2 (DM1.2), pBR-DD-5D5-1.1 (DD1.1), pBR-DD-5D5-1.2 (DD1.2), pBR-DP-5D5-1.1 (DP1.1), 또는 pBR-DP-5D5-1.2를 운반하는 세포로부터의 샘플을 SDS-PAGE 젤 전기영동에 의해 분리하고 (질량 (kDa) 좌측 표시), 니트로셀룰로스로 옮기고, 영상의 우측을 따라 표시된 바와 같이, 각각 α -Fc 또는 α - κ Lc 특이적 항체로 중쇄 또는 경쇄-함유 종의 존재에 대해 프로빙하였다. 가용성 샘플 (상부 블롯)은 (상부로부터 하부로): 전장 항체, 중쇄-중쇄-경쇄 (HHL), 중쇄-경쇄 (HL) 이량체 또는 유리 중쇄에 상응하는 추정상 확인된 밴드로 이루어진다. 정상화된, 전체 단백질 샘플 (중간 블롯, 하부)을 0.2 M DTT로 환원시켜 디슬피드 결합 구조를 파괴하고, 각각의 개별 레인은 α -Fc 항체로 프로빙되었을 때 약 49 kDa의 겉보기 질량을 갖는 단일 밴드로 이동하였다. α - κ Lc 특이적 항체로 프로빙되었을 때, 모든 레인은 약 25 kDa 또는 약 27 kDa 및 약 25 kDa의 겉보기 질량을 갖는 단일 또는 이중 밴드로 이동하였다. 약어: S = 신호 서열 STII M = 신호 서열 MaIE D = 신호 서열 DsbA P = 신호 서열 PhoA. XX#.# (예를 들어, DS1.1)은 실험에 사용된 중쇄 신호 서열, 경쇄 신호 서열, 중쇄 TIR, 경쇄 TIR을 나타낸다.

도 5: 10-L 발효로부터 시간 경과에 따른 항체 종의 어셈블리 모니터링. 64B4 세포를 규칙적인 시간 간격에서 취한 샘플 (샘플을 취한 시간을 각각의 레인 위에 접종후 시간으로 표기)과 3일 동안 10-L 발효에서 높은 세포 밀도로 성장시키고, 이로부터 광학 밀도 (OD)에 의해 정상화된 가용성 분획 뿐만 아니라 전체 단백질 펠릿을 SDS-PAGE 분석을 위해 준비하였다. 샤페론-보유 플라스미드 pJJ247 (SS1.1 + 샤페론), pBR-DD-5D5-1.1 + pJJ247 (DD1.1 + 샤페론), pBR-DS-5D5-1.1 + pJJ247 (DM1.1 + 샤페론), 또는 pBR-DP-5D5-1.1 + pJJ247 (DP1.1 + 샤페론)을 공동-발현하는 플라스미드 pBR-SS-5D5-1.1을 운반하는 세포로부터의 샘플을 SDS-PAGE 젤 전기영동에 의해 분리하고 (질량 (kDa) 좌측 표시), 니트로셀룰로스로 옮기고, 영상의 우측을 따라 표시된 바와 같이 각각 α -Fc 또는 α - κ Lc 특이적 항체로 중쇄 또는 경쇄-함유 종의 존재에 대해 프로빙하였다. 가용성 샘플 (상부 블롯)은 (상부로부터 하부로): 전장 항체, 중쇄-중쇄-경쇄 (HHL), 중쇄-경쇄 (HL) 이량체, 경쇄-경쇄 (LL) 이량체, 또는 유리 경쇄에 상응하는 추정상 확인된 밴드로 이루어진다. 정상화된, 전체 단백질 샘플 (중간 블롯, 하부)을 0.2 mM DTT로 환원시켜 디슬피드 결합 구조를 파괴하고, 각각의 개별 레인은 α -Fc로 프로빙되었을 때 약 49 kDa의 겉보기 질량을 갖는 단일 밴드로 이동하였다. α - κ Lc 특이적 항체로 프로빙되었을 때, 모든 레인은 약 25 kDa의 겉보기 질량을 갖는 단일 밴드로 이동하였다. 약어: S = 신호 서열 STII M = 신호 서열 MaIE D = 신호 서열 DsbA P = 신호 서열 PhoA. XX#.# (예를 들어, DS1.1)은 실험에 사용된 중쇄 신호 서열, 경쇄 신호 서열, 중쇄 TIR, 경쇄 TIR을 나타낸다.

도 6: 유도 조건하의 성숙 PhoA의 축적. 27C7 세포를 25-mL의 C.R.A.P. 포스페이트-제한 배지에서 24시간 동안 성장시키고, 가용성 분획을 광학 밀도 (OD)에 의해 정상화시키고, SDS-PAGE 분석을 위해 준비하였다. 이. 콜라이 phoA 유전자의 성숙 도메인을 표시된 DsbA 또는 STII (하부) TIR 변이체 (상부)에 융합시켰다. 젤을 쿠마시블루 염색에 의해 단백질의 존재에 대해 시각화하였다. PhoA의 성숙 도메인에 상응하는 추정상 확인된 밴드 (우측)는 약 47 kDa (좌측에 표시된 질량)의 질량에서 나타났다.

도 7: MetMab (OA5D5v2)의 프레임워크 (FR), CDR, 제1 불변 도메인 (CL 또는 CH1) 및 Fc 영역 (Fc)의 아미노산 서열을 도시한다. 도면은 나타나는 순서대로 각각 서열 57-60, 49-51 및 61로 경쇄 서열을 개시하고, 나타나는 순서대로 각각 서열 62-65, 52-53 및 66-68로 중쇄 서열을 개시한다. 도시된 Fc 서열은 WO 2005/063816에 기재된 바와 같이 "홀" (함몰부) 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다.

도 8: WO 2005/063816에 기재된 바와 같은 "놉" (돌출부) 돌연변이 T366W를 포함하는 Fc 폴리펩티드의 서열 (서열 47)을 도시한다. 한 실시양태에서, 이 서열을 포함하는 Fc 폴리펩티드는 도 7의 Fc 서열을 포함하는 Fc 폴리펩티드와 복합체를 형성하여 Fc 영역을 생성한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] <발명의 상세한 설명>

[0054] 일반적 기술

[0055] 본원에서 기재하거나 언급한 기술 및 절차는 일반적으로 널리 이해되고, 당업자가 통상적인 방법론, 예컨대 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003))]; 연속 간행물 [METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995))], [Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, AND ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987))]에 기재되어 있는 광범위하게 활용되는 방법론을 사용하여 통상적으로 사용되는 것이다.

[0056] 정의

본원에 사용된 용어 "벡터"는 그에 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 나타내는 것으로 의도된다. 한 가지 유형의 벡터가 "플라스미드"인데, 이는 추가의 DNA 절편을 라이케이션시킬 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 나타낸다. 또 다른 유형의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 추가의 DNA 절편이 바이러스 게놈 내로 라이케이션될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 그것이 도입된 숙주 세포 내에서 자율 복제가 가능하다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 벡터가 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "재조합 벡터")로서 칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이기 때문에 교환가능하게 사용될 수 있다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "시스템론"은 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인접한 제어 영역을 포함하는 번역 유닛에 광범위하게 통등한 유전자 요소를 나타내도록 의도된다. "인접한 제어 영역"은 예를 들어 번역 개시 영역 (TIR; 아래에 정의된 바와 같음) 및 종결 영역을 포함한다.

[0059] "폴리시스템트로닉" 발현 벡터는 하나의 단일 프로모터의 조절 제어하에 다수의 시스템론을 함유하고 발현시키는 단일 벡터를 나타낸다. 폴리시스템트로닉 벡터의 통상적인 예는 하나의 프로모터의 제어하에 2개의 상이한 폴리펩티드를 함유하고 발현시키는 "디시스템트로닉" 벡터이다. 디시스템트로닉 또는 폴리시스템트로닉 벡터의 발현시에 다중 유전자가 먼저 단일 전사 유닛으로 전사된 후에, 개별적으로 번역된다.

[0060] 본 발명에 따른 "개별적인 시스템론" 발현 벡터는 적어도 2개의 개별적인 프로모터-시스템론 쌍을 포함하는 단일 벡터를 나타내고, 여기서 각각의 시스템론은 그 자신의 프로모터의 제어하에 있다. 개별적인 시스템론 발현 벡터의 발현시에 상이한 유전자의 전사 및 번역 과정 둘 다는 개별적으로 독립적이다.

[0061] 본원에 사용된 "번역 개시 영역" 또는 TIR 또는 번역 개시 영역 또는 번역 개시 서열은 관심 유전자의 번역 개시의 효율을 제공하는 핵산 영역을 나타낸다. 일반적으로, 특정 시스템론 내의 TIR은 리보솜 결합 부위 (RBS) 및 RBS에 대해 5' 및 3' 서열을 포함한다. RBS는 최소로 샤인-달가노 영역 및 개시 코돈 (AUG)을 함유하는 것으로 정의된다. 따라서, TIR은 또한 적어도 번역될 핵산 서열의 부분을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 TIR은 시스템론 내에서 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 서열 앞에 신호 펩티드를 코딩하는 분비 신호 서열을 포함한다. TIR 변이체는 TIR의 적절성, 예컨대 본원에 정의된 바와 같은 그의 번역 강도를 변경시키는 TIR 영역 내의 서열 변이체 (특히, 치환)를 함유한다. 바람직하게는, 본 발명의 TIR 변이체는 시스템론 내의 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 서열 앞에 분비 신호 서열의 처음 2 내지 약 14개, 바람직하게는 약 4 내지 12개, 보다 바람직하게는 약 6개의 코돈 내에 서열 치환을 포함한다.

[0062] 본원에 사용된 "번역 강도"는 TIR의 하나 이상의 변이체가 폴리펩티드의 분비를 지시하는데 사용되는 제어 시스템에서 분비된 폴리펩티드의 측정값을 나타내고, 그 결과를 동일한 배양 및 검정 조건하에 야생형 TIR 또는 일부 다른 대조군과 비교하였다. 어떠한 이론에도 제한되지 않고, 본원에 사용된 "번역 강도"는 예를 들어 mRNA 안정성의 측정값, 리보솜 결합 부위에 대한 리보솜 결합의 효율, 및 막을 가로지르는 전위의 모드를 포함할 수 있다.

[0063] "분비 신호 서열" 또는 "신호 서열"은 세포막, 일반적으로 원핵생물의 내막 또는 내막 및 외막 둘 다를 통해 새로 합성된 관심 단백질을 지시하는데 사용될 수 있는 짧은 신호 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 나타낸다. 이와 같이, 관심 단백질, 예컨대 이뮤노글로불린 경쇄 또는 중쇄 폴리펩티드는 원핵 숙주 세포의 주변세포질 또는 배양 배지로 분비된다. 분비 신호 서열에 의해 코딩되는 신호 펩티드는 숙주 세포에 내인성일 수 있거나, 또는 이들이 외인성일 수 있으며, 발현될 폴리펩티드에 대해 본래의 신호 펩티드를 포함한다. 분비 신호 서열은 전형적으로 발현된 폴리펩티드의 아미노 말단에 존재하고, 전형적으로 생합성과 세포질로부터의 폴리펩티드의 분

비 사이에 효소에 의해 제거된다. 따라서, 신호 웨티드는 일반적으로 성숙 단백질 생성물에 존재하지 않는다.

[0064] "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 성분의 병렬배치를 나타내고, 여기서 이와 같이 기재된 성분은 이들이 이들의 의도된 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 있다. 예를 들어, 프로모터는 이것이 연결된 서열의 전사를 제어 또는 조절하기 위해 시스 작용하는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 필수적이지는 않지만, "작동가능하게 연결된" DNA 서열은 근접하여 있고, 2개의 단백질 코딩 영역이 연결될 필요가 있거나 또는 분비 리더의 경우에, 근접하여 있고 리딩 프레임 내에 있다. 그러나, 작동가능하게 연결된 프로모터가 일반적으로 코딩 서열의 상류에 위치하더라도, 이는 반드시 이와 근접하여 있지 않다. 작동가능하게 연결된 인핸서는 코딩 서열의 상류, 내부 또는 하류, 및 프로모터로부터 상당한 거리에 위치할 수 있다. 연결은 당업계에 공지된 재조합 방법에 의해, 예를 들어 PCR 방법론을 사용하거나, 어닐링에 의해, 또는 편리한 제한 부위에서의 라이케이션에 의해 수행된다. 편리한 제한 부위가 존재하지 않는다면, 종래의 실시에 따라 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 사용한다.

[0065] 본원에 사용된 "조절 요소"는 이종 폴리웨티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 폴리웨티드로의 전사 및 번역에 필요한, 시스에 존재하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 전사 조절 요소는 일반적으로 발현될 유전자 서열의 프로모터 5', 전사 개시 및 종결 부위, 및 폴리아데닐화 신호 서열을 포함한다. 용어 "전사 개시 부위"는 일차 전사체, 즉 mRNA 전구체에 혼입된 제1 핵산에 상응하는 구축물의 핵산을 나타내고; 전사 개시 부위는 프로모터 서열과 중첩될 수 있다.

[0066] "프로모터"는 작동가능하게 연결된 유전자 또는 서열의 전사를 제어하는 폴리뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 프로모터는 RNA 폴리머라제 결합 및 전사 개시를 위한 신호를 포함한다. 사용된 프로모터는 선택된 서열의 발현이 고려되는 숙주 세포의 세포 유형에서 기능적일 것이다. 다양한 상이한 공급원으로부터의 구성적, 유도 가능한 또는 억제 가능한 프로모터를 포함하는 다수의 프로모터가 당업계에 주지되어 있고 (데이터베이스, 예컨대 진뱅크(GenBank)에서 확인됨), (예를 들어, 보관소, 예컨대 ATCC 뿐만 아니라 다른 상업적 또는 개별적인 공급 원으로부터의) 클로닝된 폴리뉴클레오티드로서 또는 그 안에서 이용가능하다. 유도 가능한 프로모터를 사용하여, 프로모터의 활성을 신호에 반응하여 증가 또는 감소한다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "숙주 세포" (또는 "재조합 숙주 세포")는 유전자가 변경된, 또는 외인성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 재조합 플라스미드 또는 벡터의 도입에 의해 유전자가 변경될 수 있는 세포를 나타내도록 의도된다. 이러한 용어는 특정 해당 세포 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손까지도 나타내고자 하는 것임을 이해해야 한다. 돌연변이 또는 환경 상의 영향으로 인해 다음 세대에서 특정의 변형이 일어날 수도 있기 때문에, 이러한 자손은 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에 사용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다.

[0068] "단리된" 폴리웨티드 (예를 들어, 항체)는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 항체의 천연 환경의 오염 성분은 상기 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 폴리웨티드는 (1) 로우리 (Lowry) 방법에 의해 측정시 폴리웨티드의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과 수준까지, (2) 스피닝 겹서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도까지, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE (나트륨 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 의해 균질해질 때까지 정제될 것이다. 단리된 폴리웨티드는 재조합 세포 내의 계내 폴리웨티드를 포함하는데, 이는 상기 폴리웨티드의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리웨티드는 적어도 1회의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.

[0069] "단리된" 핵산 분자는 핵산의 천연 공급원 내에서 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염성 핵산 분자로부터 확인되어 이로부터 분리시킨 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 자연계에서 발견되는 형태 또는 세팅 이외의 것이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 것과 같은 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 예를 들어 핵산 분자가 천연 세포의 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재하는 경우, 통상적으로 핵산 (예를 들어, 항체 코딩 핵산)을 발현하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 포함한다.

[0070] 본원에서 교환가능하게 사용된 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 나타내고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 포함될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어 메틸화 뉴클레오

티드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 구조에 대한 변형이 존재하는 경우, 이러한 변형은 중합체의 어셈블리 이전 또는 이후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에 비뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 합성 후에, 예컨대 표지와의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 다른 종류의 변형은 예를 들어 하나 이상의 자연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 "캡" 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예를 들어 하전되지 않은 연결기 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등) 및 하전된 연결기 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형, 펜던트 모이어티, 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 인터칼레이터 (예를 들어, 아크리딘, 프소랄렌 등)을 갖는 것, 퀼레이터 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 봉소, 산화금속 등)을 함유하는 것, 알킬레이터를 함유하는 것, 변형 연결기 (예를 들어, 알파 아노머 핵산 등)를 갖는 것 뿐만 아니라, 폴리뉴클레오티드(들)의 변형되지 않은 형태를 포함한다. 추가로, 당 내에 통상적으로 존재하는 임의의 히드록실 기가 예를 들어 포스포네이트 기, 포스페이트 기로 대체되거나, 표준 보호기로 보호되거나, 추가의 뉴클레오티드에 대한 추가의 연결부가 제조되도록 활성화되거나, 또는 고체 또는 반고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 또는 아민 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑 기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 표준 보호기로 유도체화될 수도 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사한 형태, 예를 들어 2'-0-메틸-, 2'-0-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, 알파-아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 크실로스 또는 릭소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헵ти로스, 비시클릭 유사체 및 염기성 뉴클레오시드 유사체, 예컨대 메틸 리보시드 등을 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결부가 대안적 연결 기로 대체될 수 있다. 이를 대안적인 연결 기는 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'은 독립적으로 H이거나 또는 임의로 에테르 (-O-) 연결기를 함유하는 치환 또는 비치환 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알딜임)로 대체되는 실시양태를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연결부가 동일할 필요는 없다. 전술한 설명은 RNA 및 DNA를 비롯하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[0071] 본원에 사용된 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로, 반드시는 아니지만, 일반적으로 길이가 뉴클레오티드 약 200개 미만으로 짧은, 일반적으로 단일가닥의, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오티드에 대한 상기 기재는 올리고뉴클레오티드에 동일하고 완전하게 적용가능하다.

[0072] 본원에 사용된 "폴리펩티드"는 일반적으로, 약 10개 초과의 아미노산을 갖는 임의의 세포 공급원으로부터의 펩티드 및 단백질을 나타낸다. "이종" 폴리펩티드는 사용된 숙주 세포에 대하여 외래의 것인 폴리펩티드, 예로서, 이. 콜라이에 의해 생성된 인간 단백질이다. 이종 폴리펩티드는 원핵생물 또는 진핵생물의 것일 수 있지만, 진핵생물의 것이 바람직하고, 포유동물의 것이 더욱 바람직하며, 인간의 것이 가장 바람직하다. 바람직하게는, 그것은 재조합형으로 제조하거나, 재조합 폴리펩티드이다. "이종" 폴리펩티드는 사용된 숙주 세포에 대하여 외래의 것인 폴리펩티드, 예컨대 이. 콜라이에 의해 생성된 인간 단백질이다. 이종 폴리펩티드는 원핵생물 또는 진핵생물의 것일 수 있지만, 진핵생물의 것이 바람직하고, 포유동물의 것이 더욱 바람직하며, 인간의 것이 가장 바람직하다. 바람직하게는, 그것은 재조합형으로 제조하거나, 재조합 폴리펩티드이다.

[0073] 포유동물 폴리펩티드의 예는 분자, 예컨대, 예를 들어 레닌, 성장 호르몬 (인간 성장 호르몬 포함); 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 1-안티트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 트롬보포이에틴; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체 형성 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자, 및 혼 빌레브란트 인자; 항응고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방성 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예컨대 우로키나제 또는 인간 소변 또는 조직 유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA) 및 그의 변이체, 예컨대 레타바제(RETEVASE)TM 및 TNKASETM; 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; ErbB2의 세포외 도메인 내의 영역 (예를 들어, ErbB2의 약 잔기 22 내지 약 잔기 584 (포함) 영역 내의 임의의 하나 이상의 잔기)에 결합하는, ErbB2 도메인(들), 예컨대 2C4에 대한 항체 (WO 01/00245; 하이브리도마 ATCC HB-12697); 엔케팔리나제; 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 월러-억제 물질; 렐락신 A-쇄; 렐락신 B-쇄; 프로렐락신; 마우스 고나도트로핀 관련 펩티드; 미생물 단백질, 예를 들어 베타-락타마제; DNase; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 인테그린; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대 뇌 유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예컨대 NGF; 카디오토로

핀 (심장 비대증 인자), 예컨대 카디오토로핀-1 (CT-1); 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타 (TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4, 또는 TGF-5 포함); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예컨대 CD-3, CD-4, CD-8, 및 CD-19; 에리트로포이에틴; 골유도 인자; 면역독소; 골 형태발생 단백질 (BMP); 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민 (HSA) 또는 소 혈청 알부민 (BSA); 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨 (IL), 예를 들어 IL-1 내지 IL-10; 항-HER-2 항체; Apo2 리간드; 수퍼옥시드 디스뮤타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 봉괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예컨대 AIDS 외피의 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 항체; 및 상기 열거된 임의의 폴리펩티드의 단편을 포함한다.

[0074]

본원에서 바람직한 폴리펩티드는 인간 혈청 알부민 (HSA), 2C4, 조직 인자, 항-조직 인자, 항-CD20, 항-HER-2, 헤레글린, 항-IgE, 항-CD11a, 항-CD18, VEGF 및 수용체 및 이에 대한 항체, 예컨대 rhuFab V2 및 아바스틴 (AVASTIN)TM 성장 호르몬 및 그의 변이체, 예컨대 hGH, 성장 호르몬 수용체, 성장 호르몬 방출 단백질 (GHRP), LIV-1 (EP 1,263,780), TRAIL, 종양 괴사 인자 (TNF) 및 이에 대한 항체, TNF 수용체 및 관련 항체, TNF-수용체-IgG, TNF 수용체 관련 인자 (TRAF) 및 그의 억제제, 인자 VIII, 인자 VIII B 도메인, 인터페론, 예컨대 인터페론-감마, 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-베타, 항-TGF, 예컨대 항-TGF-베타, 액티빈, 인히빈, 항-액티빈, 항-인히빈, 조직-플라스미노겐 활성화제 및 이들의 변이체, 예컨대 t-PA, 레테플라제(RETEPLASE)TM 및 TNKase, 항-Fas 항체, Apo-2 리간드; Apo-2 리간드 억제제; Apo-2 수용체, Apo-3, 아폽토시스 인자, Ced-4, DcR3, 사멸 수용체 및 효능제 항체 (DR4, DR5), 림포톡신 (LT), 프로락틴, 프로락틴 수용체, SOB 단백질, WISP (wnt-유도된 분비 단백질), 뉴로톡신-3 (NT-3), 신경 성장 인자 (NGF) 및 항-NGF, DNase, 간염 항원, 단순 포진 항원, 렙틴, 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 예컨대 IGF-1 및 IGF-2 및 이들의 결합 단백질 및 수용체, 예컨대 IGFBP-1-IGFBP-6, 인슐린, 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 예컨대 FGF-17, Toll 단백질, TIE 리간드, CD40 및 항-CD40, 이뮤노어드헤신, 서브틸리신, 간세포 성장 인자 (HGF), 트롬보포이에틴 (TPO), 인터류킨, 예컨대 IL-2, IL-12, IL-17, IL-22, IL-8, IL-9, 및 이에 대한 항체, 및 전립선-특이적 암 항원 (PSCA)을 포함한다.

[0075]

특히 바람직한 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드, 보다 바람직하게는 항체이고, 이는 모노클로날 항체 및 인간화 항체를 포함한다. 이러한 항체는 전장 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 보다 바람직하게는, 이를 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 보다 더 바람직하게는, 항체는 항-c-met, 항-IgE, 항-CD18, 항-VEGF, 항-조직 인자, 2C4, 항-Her-2, 항-CD20, 항-CD40, 또는 항-CD11a 항체이다. 폴리펩티드의 정의 내에 포함되는 항체 단편은 바람직하게는 경쇄, 보다 바람직하게는 카파 경쇄를 포함한다. 이러한 바람직한 단편은, 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 F(ab')₂-류신 지폐 (LZ) 융합체, 및 1-아암 항체를 포함한다.

[0076]

단백질 "발현"은 유전자 내에 코딩된 정보의 메신저 RNA (mRNA)로, 이어서 단백질로의 전환을 나타낸다.

[0077]

"면역접합체" (교환가능하게 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"로 지칭됨)는 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 이들의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 항체를 의미한다.

[0078]

"차단" 항체 또는 항체 "길항체"는 이것이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제 또는 감소시키는 것이다. 일부 실시양태에서, 차단 항체 또는 길항체 항체는 항원의 생물학적 활성을 완전히 억제한다.

[0079]

본원에 사용된 "효능제 항체"는 관심 폴리펩티드 (예를 들어, HGF)의 적어도 하나의 기능적 활성을 모방하는 항체이다.

[0080]

"결합 친화도"는 일반적으로 문자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 나타낸다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내재적 결합 친화도를 나타낸다. 파트너 Y에 대한 문자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 표시될 수 있다. 바람직하게는, Kd는 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , 또는 심지어 1×10^{-10} 이거나 또는 이보다 더 강하다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원과 서서히 결합하고 용이하게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원과 보다 신속하게 결합하고 보다 오랫 동안 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 목적상, 이를 중 임의의 방법이 사용될 수 있다. 구체적인 예시적

실시양태를 아래에 기재한다.

[0081]

한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 비표지된 항원의 연속 적정물의 존재하에 (^{125}I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후에 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도를 측정하는 하기 분석에서 기재되는 바와 같이 (문헌 [Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]), 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 분석 (RIA)에 의해 측정된다. 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터 플레이트 (다이넥스 (Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랙스 (Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단하였다. 비흡착 플레이트 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석액과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하되; 그러나, 평형이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물을 실온에서의 인큐베이션 (예를 들어, 1시간 동안)을 위해 포획 플레이트로 보유한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 트윈-20으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 섬광제 (마이크로신트(MicroScint)-20; 팩커드 (Packard))를 첨가하고, 플레이트를 텁카운트(Topcount) 감마 계수기 (팩커드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각각의 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다. 다른 실시양태에 따르면, Kd 또는 Kd 값은 약 10의 반응 유닛 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어 (BIAcore)TM-2000 또는 비아코어TM-3000 (비아코어, 인크. (BIAcore, Inc.), 미국 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용함으로써 측정한다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 유닛 (RU)을 달성하도록 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 주입한다. 항원 주입 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈 20이 포함된 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 일부 실시양태에서, 하기 변형을 표면 플라즈몬 공명 검정 방법에 사용하였다: 항체를 대략 400 RU를 달성하도록 CM5 바이오센서 칩에 고정하고, 동역학 측정을 위해 표적 단백질의 2배 연속 희석액을 약 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 25°C에서 PBST 완충제 내에서 주입한다. 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 회합 및 해리 센서그램을 동시 팟팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]을 참조한다. 온-레이트 (on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 분광분석기, 예컨대 정지-유동 설치 분광광도분석기 (아비브 인스트루먼츠 (Aviv Instruments)) 또는 적색 교반 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-아민코(Aminco) 분광광도분석기 (써모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정시 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0082]

본 발명에 따른 "온-레이트" 또는 "회합률" 또는 "회합 속도" 또는 "K_{on}"은 또한 약 10의 반응 유닛 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어TM-2000 또는 비아코어TM-3000 (비아코어, 인크., 미국 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 상기 기재된 바와 동일한 표면 플라즈몬 공명 기술로 측정할 수 있다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 유닛 (RU)을 달성하도록 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 주입한다. 항원 주입 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈 20이 포함된 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 일부 실시양태에서, 하기 변형을 표면 플라즈몬 공명 검정 방법에 사용하였다: 항체를 대략 400 RU를 달성하도록 CM5 바이오센서 칩에 고정하고, 동역학 측정을 위해 표적 단백질의 2배 연속 희석액을 약 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 25°C에서 PBST 완충제 내에서 주입한다. 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 회합 및 해리 센서그램을 동시 팟팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어

결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{off}/k_{on} 비로 계산하였다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]을 참조한다. 그러나, 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 바람직하게는 분광분석기, 예를 들어 정지 유동 설치 분광광도분석기 (아비브 인스트루먼츠) 또는 적색 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-아민코 분광광도분석기 (씨모스펙트로닉)에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정한다.

[0083] "네이키드 항체"는 이종 분자, 예를 들어 세포독성 잔기 또는 방사성 표지에 접합되지 않은 항체이다.

[0084] 지정된 항체의 "생물학적 특징"을 갖는 항체는 이러한 항체를 동일 항원에 결합하는 다른 항체와 구별시켜 주는, 항체의 하나 이상의 생물학적 특징을 보유하는 항체이다.

[0085] 관심 항체가 결합하는 항원상의 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위해, 통상적인 교차-차단 검정, 예컨대 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 검정을 수행할 수 있다.

[0086] 본 발명의 아미노산 서열을 함유하는 항체 또는 폴리펩티드의 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 번호 5,739,277에 기재된 바와 같이 샐비지 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편)에 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 이러한 샐비지 수용체 결합 에피토프를 코딩하는 핵산 분자를 본 발명의 폴리펩티드 서열을 코딩하는 핵산과 프레임에 맞게 연결시켜서, 조작된 핵산 분자에 의해 발현된 융합 단백질이 샐비지 수용체 결합 에피토프 및 본 발명의 폴리펩티드 서열을 포함하게 할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "샐비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 나타낸다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie et al., Ann. Rev. Immunol. 18:739-766 (2000)], 표 1). 그의 Fc 영역 내에 치환이 존재하는 항체 및 증가된 혈청 반감기가 또한 WO00/42072, WO 02/060919; 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001)]; [Hinton, J. Biol. Chem. 279:6213-6216 (2004)]에 기재되어 있다. 또 다른 실시양태에서, 혈청 반감기는 또한 예를 들어 다른 폴리펩티드 서열을 부착시켜 증가될 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 유용한 항체 또는 다른 폴리펩티드를 FcRn 수용체에 결합하는 혈청 알부민 또는 혈청 알부민의 일부, 또는 혈청 알부민 결합 웹티드에 부착시켜서 혈청 알부민이 이러한 항체 또는 폴리펩티드와 결합되도록 할 수 있고, 예를 들어 이러한 폴리펩티드 서열은 WO01/45746에 기재되어 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 부착된 혈청 알부민 웹티드는 DICLPRWGCLW의 아미노산 서열 (서열 48)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fab의 반감기는 이를 방법에 의해 증가된다. 또한, 혈청 알부민 결합 웹티드 서열에 대해서는 문헌 [Dennis et al. J. Biol. Chem. 277:35035-35043 (2002)]을 참조한다.

[0087] "단편"은 바람직하게는 참조 핵산 분자 또는 폴리펩티드 전체 길이의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과를 함유하는 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 일부를 의미한다. 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100, 200, 300, 400, 500, 600개 또는 그 초과의 뉴클레오티드, 또는 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200개 또는 그 초과의 아미노산을 함유할 수 있다.

[0088] 용어 "항체" 및 "이뮤노글로불린"은 가장 넓은 의미에서 교환가능하게 사용되고, 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체)를 포함하고, 또한 특정 항체 단편 (본원에서 보다 상세히 기재되어 있음)을 포함할 수 있다. 항체는 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙 항체일 수 있다.

[0089] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분들이 항체들 사이에서 광범위한 서열 상이성을 나타낸다는 사실을 나타내고, 각각의 특정 항체의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다. 그러나, 가변성이 항체 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 상보성-결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역으로 칭해지는 3개의 절편에 놓축시켰다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 (FR)으로 지정된다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 β -시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 CDR에 의해 연결된, β -시트 형태를 주로 채택한 4개의 FR 영역을 포함한다. 각각의 쇄 내의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇄로부터의 CDR들과 함께 항체의 항원-결합 부위를 형성하는데 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of

Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는 것에 직접 수반되지는 않지만, 항체-의존적 세포 독성에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0090] 항체를 과파인으로 소화시키면 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편 (각각 단일 항원-결합 부위를 가짐) 및 나머지 "Fc" 단편 (이러한 명칭은 용이하게 결정화되는 능력을 반영함)이 생성된다. 펩신 처리에 의해, 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다.

[0091] "Fv"는 완전한 항원-인식 부위 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 2-쇄 Fv 종에서, 이러한 영역은 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인이 단단한 비공유적으로 회합된 이량체로 이루어진다. 단일쇄 Fv 종에서, 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 2-쇄 Fv 종에서와 유사한 "이량체" 구조로 회합할 수 있도록 가요성 펩티드 링커에 의해 공유적으로 연결될 수 있다. 이러한 형태에서, 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면의 항원 결합 부위를 규정한다. 전체적으로, 6개의 CDR이 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮긴 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0092] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올 기를 보유하는 Fab'을 나타낸다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 가운데에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생성된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0093] 임의의 척추동물 종의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파(κ) 및 람다(λ)라고 불리는 2개의 분명하게 상이한 유형 중 하나로 배정될 수 있다.

[0094] 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 클래스로 지정될 수 있다. 5가지 주요 클래스의 이뮤노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이중 몇 가지는 하위클래스 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 추가로 나뉠 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 주지되어 있다. "항체 단편"은 바람직하게는 무손상 항체 내에 존재할 때 그 부분과 정상적으로 연관된 기능의 적어도 하나, 바람직하게는 대부분 또는 전부를 보유하는, 무손상 항체의 일부만을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편, 디아바디, 선형 항체, 단일쇄 항체 분자, 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하기 때문에 항원과 결합하는 능력을 보유한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 단편, 예를 들어 Fc 영역을 포함하는 항체 단편은, 무손상 항체 내에 존재하는 경우에 Fc 영역과 통상적으로 연관된 생물학적 기능들, 예를 들어 FcRn 결합, 항체 반감기 조정, ADCC 기능 및 보체 결합 중의 적어도 하나의 기능을 보유하고 있다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 이같은 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암을 포함할 수 있다.

[0095] 용어 "초가변 영역", "HVR" 또는 "HV"가 본원에 사용된 경우, 이것은 서열에서 초가변이고/거나 구조적으로 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역을 포함하는데; VH에 3개가 있고 (H1, H2, H3), VL에 3개가 있다 (L1, L2, L3). 많은 초가변 영역 묘사가 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기초로 하며, 가장 흔히 사용된다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 대신, 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 나타낸다 (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM 초가변 영역은 카바트 CDR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라 (Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된다. "접촉" 초가변 영역은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석에 기초한다. 각각의 이들 초가변 영역의 잔기를 아래에 나타낸다.

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

[0096]

[0097] 초가변 영역은 하기와 같은 "확장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL 내의 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH 내의 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0098]

"프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0099]

비인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 바람직한 특이성, 친화도 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 치환된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비인간 잔기로 대체한다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되게 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 또한, 하기 검토 논문 및 그에 인용된 참고문헌을 참조한다: [Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)]; [Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)].

[0100]

"키메라" 항체 (이뮤노글로불린)는 특정 종으로부터 유래되었거나 특정 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성이 있는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부를 가지며, 상기 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되었거나 또 다른 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체, 뿐만 아니라 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한은 이러한 항체의 단편의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성이 있다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]). 본원에 사용된 인간화 항체는 키메라 항체의 하위세트이다.

[0101]

"단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 쇄 내에 존재하는, 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 하는, VH 도메인과 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해, 문헌 [Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0102]

"항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 미리 정해진 항원이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 혼산, 지질, 합텐 또는 다른 자연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 바람직하게는, 표적 항원은 폴리펩티드이다.

[0103]

용어 "디아바디"는 동일 폴리펩티드 쇄 (VH-VL) 내에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 나타낸다. 동일 쇄 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원-결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있

다.

[0104] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖고/거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 제외된다.

[0105] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 하나 이상의 CDR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어는 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 셀룰링에 의한 친화도 성숙을 설명하고 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발이 문헌 [Barbas et al., Proc Natl. Acad. Sci., USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al., Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.

[0106] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 일반적으로, FcR은 IgG 항체에 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 하위 클래스의 수용체를 포함하며, 이들은 이를 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하는데, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 차이가 나는 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신 기재의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)]의 검토 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토된다. 추후로 확인될 것을 포함하는 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하고 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]), 이뮤노글로불린의 항상성을 조절하는 신생아 수용체 FcRn을 또한 포함한다. WO 00/42072 (Presta)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 본문이 참고로 본원에 구체적으로 인용된다. 또한 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]을 참조한다.

[0107] FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie 1997], [Hinton 2004] 참조). 인간 FcRn에 높은 친화도로 결합하는 폴리펩티드의 혈청 반감기 및 생체 내에서의 인간 FcRn에 대한 결합을, 예를 들어, 인간 FcRn를 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 Fc 변이체 폴리펩티드가 투여된 영장류에서 분석할 수 있다.

[0108] 변경된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖고 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 번호 6,194,551B1 및 WO 99/51642에 기재되어 있다. 이러한 특허 공개공보의 내용은 본원에 참고로 명확하게 포함된다. 또한, 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)]을 참조한다.

[0109] 본원에 사용된 용어 "Fc 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 폴리펩티드 서열을 포함하는 이량체 복합체를 일반적으로 나타내고, 여기서 C-말단 폴리펩티드 서열은 무손상 항체의 파파인 소화에 의해 수득 가능한 것이다. Fc 영역은 천연 또는 변이체 Fc 서열을 포함할 수 있다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 서열의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 서열은 통상적으로 약 위치 Cys226의 아미노산 잔기로부터 또는 약 위치 Pro230의 아미노산 잔기로부터 Fc 서열의 카르복실 말단까지 이르는 스트레치로 정의된다. 이뮤노글로불린의 Fc 서열은 일반적으로 CH2 도메인 및 CH3 도메인의 2개의 불변 도메인을 포함하고, 임의로 CH4 도메인을 포함한다. 본원에서의 "Fc 폴리펩티드"는 Fc 영역을 구성하는 폴리펩티드들 중 하나를 의미한다. Fc 폴리펩티드는 임의의 적합한 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위유형, IgA, IgE, IgD 또는 IgM으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 폴리펩티드는 야생형 한지 서열의 일부 또는 모두를 포함한다 (일반적으로 그의 N 말단에서). 일부 실시양태에서, Fc 폴리펩티드는 기능성 또는 야생형 한지 서열을 포함하지 않는다.

[0110] 본원에 사용된 "항체 돌연변이체" 또는 "항체 변이체"는 종-의존성 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변형시킨, 항체의 아미노산 서열 변이체를 나타낸다. 이러한 돌연변이체는 종-의존성 항체와 반드시 100% 미만의 서열 동일성 또는 유사성을 가져야 한다. 한 실시양태에서, 항체 돌연변이체는 종-의존성 항체의 종쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%,

보다 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 가질 것이다. 본원에서, 이러한 서열과 관련된 동일성 또는 유사성은 서열을 정렬하고 필요한 경우에는 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위한 갭(gap)을 도입한 후에 종-의존성 항체 잔기와 동일 (즉, 동일 잔기) 또는 유사한 (즉, 공통적인 측쇄 특성을 기초로 할 때 동일 군으로부터의 아미노산 잔기, 이하 참조) 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 가변 도메인에 속하지 않는 항체 서열에서의 N-말단, C-말단 또는 내부 연장, 결실 또는 삽입 어느 것도 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 미치는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0111] "장애" 또는 "질환"은 본 발명의 물질/분자 또는 방법을 이용한 치료로부터 이점을 얻을 수 있는 모든 질환이다. 여기에는 만성 및 급성 장애 또는 질환 (포유동물이 당해 장애에 걸리기 쉬운 병리 상태 포함)이 포함된다. 본원에서 치료될 장애의 비-제한적인 예로는 악성 및 양성 종양; 암종, 모세포종, 및 육종이 포함된다.

[0112] "치료"는 치료적 치료 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 나타낸다. 치료를 필요로 하는 대상체에는 이미 양성, 전암성 또는 비전이성 종양이 있는 대상체 뿐만 아니라 암의 발생 또는 재발을 방지시키고자 하는 대상체가 포함된다.

[0113] 용어 "치료 유효량"은 포유동물에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하 위한 치료제의 양을 나타낸다. 암의 경우에, 치료제의 치료 유효량은 암 세포의 수를 감소시킬 수도 있고/거나; 원발성 종양 크기를 감소시킬 수도 있고/거나; 말초 기관 내로의 암 세포 침윤을 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고 바람직하게는 정지)할 수도 있고/거나; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고 바람직하게는 정지)할 수 있고/거나; 종양 성장을 어느 정도까지 억제할 수도 있고/거나; 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도까지 완화할 수도 있다. 약물이 기존 암 세포의 성장을 예방하고/거나 기존 암 세포를 사멸시킬 수 있는 정도라면, 이것은 세포증식 억제성 및/ 또는 세포독성일 수 있다. 암 요법의 경우, 생체내 효능은 예를 들어 생존 기간, 질환 진행까지의 시간 (TTP), 반응률 (RR), 반응 지속기간, 및/또는 삶의 질을 평가하여 측정될 수 있다.

[0114] 본원에서의 "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직으로부터 발생되고 이에 대해 지시되는 비-악성 질환 또는 장애이다. 본원에서의 자가면역 질환은 악성 또는 암성 질환 또는 용태를 명확하게 제외하고, B 세포 림프종, 급성 림프모세포성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모발상 세포 백혈병 및 만성 골수모세포성 백혈병을 특히 제외한다. 자가면역 질환 또는 장애의 예는 염증성 반응, 예컨대 염증성 피부 질환, 예를 들어 건선 및 피부염 (예를 들어, 아토피성 피부염); 전신 경피증 및 경화증; 염증성 장 질환 (예컨대 크론병 및 궤양성 대장염)과 관련이 있는 반응; 호흡 곤란 증후군 (성인 호흡 곤란 증후군; ARDS 포함); 피부염; 수막염; 뇌염; 포도막염; 결장염; 사구체신염; 알레르기성 상태, 예컨대 습진 및 천식, 및 T 세포의 침윤 및 만성 염증성 반응을 수반하는 다른 상태; 아데롭성동맥경화증; 백혈구 접착 결핍; 류마티스 관절염; 전신 홍반성 루푸스 (SLE); 진성 당뇨병 (예를 들어, 제I형 진성 당뇨병 또는 인슐린 의존적 진성 당뇨병); 다발성 경화증; 레이노 증후군; 자가면역 갑상선염; 알레르기성 뇌척수염; 쇼그렌 증후군; 유년 발병형 당뇨병; 및 결핵, 사르코이드증, 다발성 근염, 육아종증 및 혈관염에서 전형적으로 발견되는, 시토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 관련이 있는 면역 반응; 악성 빈혈 (애디슨병); 백혈구 누출을 수반하는 질환; 중추 신경계 (CNS) 염증성 장애; 다발성 장기 손상 증후군; 용혈성 빈혈 (비제한적으로, 한랭글로불린혈증 또는 쿰스 양성 빈혈 포함); 중증 근무력증; 항-항체 복합체 매개 질환; 항-사구체 기저막 질환; 항-인지질 증후군; 알레르기성 신경염; 그레이브스병; 램버트-이튼 근무력증 증후군; 수포성 유천포창; 천포창; 자가면역 다발성내분비병증; 라이터병; 강직 인간 증후군; 베체트병; 거대 세포 동맥염; 면역 복합체 신염; IgA 신증; IgM 다발성신경병증; 면역 혈소판감소성 자반병 (ITP) 또는 자가면역 혈소판감소증 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0115] 용어 "암" 및 "암성"은 조절되지 않는 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물의 생리적 상태를 지칭하거나 기재한다. 이 정의에는 양성 및 악성 암이 포함된다. "조기 암" 또는 "조기 종양"이란 침습성 또는 전이성이 아닌 암, 또는 0기, I기 또는 II기 암으로서 분류되는 암을 의미한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종 (수모세포종 및 망막모세포종 포함), 육종 (지방육종 및 활막 세포 육종 포함), 신경내분비 종양 (카르시노이드 종양, 가스트린종, 및 도세포 암 포함), 중피종, 슈반세포종 (청신경종 포함), 수막종, 선암종, 흑색종, 및 백혈병 또는 림프양 악성종양을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 상기 암의 보다 특정한 예는 편평세포암 (예를 들어, 상피 편평세포암), 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암 종을 포함하는 폐암, 복막암, 간세포암, 위장암을 포함하는 위암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암 (전이성 유방암 포함), 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 고환암, 식도암,

담관의 종양 뿐만 아니라 두경부암 및 다발성 골수종을 포함한다.

[0116] 용어 "전암성"은 전형적으로 암으로 진행되거나 암을 발생시키기는 상태 또는 성장을 나타낸다. "전암성" 성장은 비정상적인 세포 주기 조절, 증식 또는 분화를 특징으로 하는 세포를 가질 것인데, 이는 세포 주기 조절, 세포 증식 또는 분화의 마커에 의해 결정될 수 있다.

[0117] "이형성"은 조직, 기관 또는 세포의 임의의 비정상적인 성장 또는 발생을 의미한다. 바람직하게, 이형성은 고등급 또는 전암성이다.

[0118] "전이"는 암이 그의 원발성 부위로부터 신체 내 다른 부위로 확산되는 것을 의미한다. 암 세포는 원발성 종양으로부터 분리되어, 림프관 및 혈관 내로 침투하고, 혈류를 통하여 순환하여 신체 내 그 밖의 정상 조직의 원위 중심에서 성장(전이)할 수 있다. 전이는 국소 또는 원위일 수 있다. 전이는 원발성 종양으로부터 분리된 종양 세포에 우발적으로 발생하고 혈류를 통해 이동하여 원위 부위에서 중단하는 순차적 과정이다. 이러한 새로운 부위에서 상기 세포는 혈류 공급을 확립시키고 성장하여 생명을 위협하는 종괴를 형성할 수 있다.

[0119] 종양 세포 내에서의 자극성 분자 경로와 억제성 분자 경로 둘 다가 이러한 거동을 조절하고, 종양 세포와 원위 부위의 숙주 세포 사이의 상호 작용이 또한 유의하다.

[0120] "비전이성"은, 양성인 암, 또는 여전히 원발성 부위 내에 있으면서 림프계 또는 혈관계로 침투되지 않았거나 원발성 부위 이외의 조직 내로 침투되지 않은 암을 의미한다. 일반적으로, 비전이성 암은 0, I 또는 II기의 암 및 때때로 III기 암인 임의의 암이다.

[0121] "원발성 종양" 또는 "원발성 암"은 본래의 암을 의미하고, 대상체 신체 내 또 다른 조직, 기관 또는 위치에 위치하는 전이성 병변이 아니다.

[0122] "양성 종양" 또는 "양성 암"은 본래의 부위에 국소화된 채로 있고 원위 부위로 침윤, 침습 또는 전이될 수 있는 능력이 갖지 않는 종양을 의미한다.

[0123] "종양 부담"은 신체 내 암 세포 수, 종양 크기 또는 암의 양을 의미한다. 종양 부담은 또한 종양 부하로 지칭되기도 한다.

[0124] "종양 수"는 종양의 수를 의미한다.

[0125] "대상체"는 인간 또는 비인간 포유동물, 예컨대 소, 말, 개, 양 또는 고양이를 포함하지만 이에 제한되지는 않은 포유동물을 의미한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다.

[0126] 용어 "항암 요법"은 암 치료에 유용한 요법을 나타낸다. 항암 치료제의 예는, 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 작용제, 항혈관신생제, 아톱토시스 작용제, 항-튜불린 작용제, 및 암을 치료하기 위한 다른 작용제, 항-CD20 항체, 혈소판 유래 성장 인자 억제제(예를 들어, 글리벡(Gleevec)TM(이마티닙 메실레이트)), COX-2 억제제(예를 들어, 셀레콕시브), 인터페론, 시토카인, 하기 표적 ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체(들) 중 하나 이상에 결합하는 길항제(예를 들어, 중화 항체), TRAIL/Apo2, 및 다른 생물활성제 및 유기 화학 작용제 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이들의 조합 역시 본 발명에 포함된다.

[0127] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 저해하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소(예를 들어, I^{131} , I^{125} , Y^{90} 및 Re^{186}), 화학요법제, 및 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편을 포함한다.

[0128] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 암 치료에 유용한 화학적 화합물을 포함한다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)[®] 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 크립토피신(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민 옥

시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디인 항생제 (예를 들어 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1 (예를 들어 [Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 비스 포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 밸색단 및 관련 밸색 단백질 에네디인 항생 밸색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캐 티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)[®] 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토푸린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-아드레날, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라تون; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포텔론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK[®] 다당류 복합체 (제이에이치에스 내츄럴 프로덕츠 (JHS Natural Products, 미국 오레곤주 유진)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 앙구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오텐파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL)[®] 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology, 미국 뉴저지주 프린스頓)); 아브락산(ABRAXANE)TM, 파클리탁셀의 크레모포르-비함유, 알부민-조작 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스 (American Pharmaceutical Partners, 미국 일리노이주 샤큘버그)), 및 탁소테레(TAXOTERE)[®] 독세탁셀 (론-프랑 로러 (Rhone-Poulenc Rorer, 프랑스 안토니)); 클로란부실; 켐자르(GEMZAR)[®] 챔시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토푸린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE)[®] 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (캄프토사르, CPT-11) (이리노테칸과 5-FU 및 류코보린의 치료 요법 포함); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 카페시타빈; 콤브레타스타틴; 벨케이드(VELCADE) 보르테조닙; 레블리미드(REVLIMID) 레날리도미드; 류코보린 (LV); 옥살리플라틴 (옥살리플라틴 치료 요법 (FOLFOX) 포함); 세포증식을 감소시키는 PKC-알파, Raf, H-Ras, EGFR (예를 들어, 예를로티닙 (타르세바(Tarceva)TM) 및 VEGF-A의 억제제 및 임의의 상기 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0129] 또한, 상기 정의는 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예컨대 항-에스 트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX)[®] 타목시펜 포함), 랄록시펜, 드록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 파레스톤 (FARESTON) · 토레미펜, 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)[®] 메게스트롤 아세테이트, 아로마신 (AROMASIN)[®] 액세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)[®] 보로졸, 페마라(FEMARA)[®] 레트로졸, 및 아리미덱스(ARIMIDEX)[®] 아나스트로졸; 및 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린 뿐만 아니라; 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식과 관련이 있는 신호전달 경로에서의 유전자 발현을 억제하는 것, 예컨대

PKC-알파, Raf 및 H-Ras; 리보자임, 예컨대 VEGF 발현 억제제 (예를 들어, 안지오자임(ANGIOZYME)[®] 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신, 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)[®] 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)[®] 백신, 및 박시드(VAXID)[®] 백신; 프로류킨(PROLEUKIN)[®] rIL-2; 루르토테칸(LURTOTECAN)[®] 토포이소마라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)[®] rmRH; 비노렐빈 및 에스페라마이신 (미국 특허 번호 4,675,187 참조) 및 임의의 상기 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0130] 본원에 사용된 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 종양 세포에 덜 세포독성이고, 효소에 의해 활성화되거나 전환되어 더욱 활성인 모 형태가 될 수 있는, 제약 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 나타낸다. 예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조한다. 본 발명의 전구약물은 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 웨티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형된 전구약물, 글리코실화 전구약물, β-락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 폐녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 폐닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신, 및 더욱 활성이고 세포독성이 없는 약물로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기 기재된 화학요법제를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0131] "방사선 요법"은, 정상적으로 기능하거나 세포를 파괴시키는 능력이 완전히 제한되도록 세포에 대한 충분한 손상을 유도시키기 위해 지정된 감마선 또는 베타선을 사용하는 것을 나타낸다. 당업계에는 투여량 및 치료의 지속시간을 결정하는 수많은 방법이 공지되어 있음을 이해할 것이다. 전형적인 치료는 1회 투여로 제공되며, 전형적인 투여량은 하루당 10 내지 200 유닛 (그레이(Gray))의 범위이다.

[0132] "생물학적 활성" 또는 "기능적" 폴리펩티드 (예컨대, 이종 폴리펩티드)는 구조, 조절, 생화학적 또는 생체물리학 사건에서 그의 천연 활성 중 하나 이상을 발휘할 수 있는 것이다.

[0133] "생물학적 활성" 또는 "기능적" 항체는 구조, 조절, 생화학적 또는 생체물리학 사건에서 그의 천연 활성 중 하나 이상을 발휘할 수 있는 것이다. 예를 들어, 생물학적 활성 항체는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 가질 수 있고, 결합은 다시 세포 또는 분자 사건, 예컨대 신호 변환 또는 효소 활성을 도출 또는 변경시킬 수 있다. 생물학적 활성 항체는 또한 수용체의 리간드 활성화를 차단하거나 또는 효능제 항체로서 작용할 수 있다. 그의 천연 활성 중 하나 이상을 발휘하는 항체의 능력은 폴리펩티드 쇄의 적절한 폴딩 및 어셈블리를 포함한 여러 요인에 따라 달라진다. 본원에 사용된, 개시된 방법에 의해 생성된 생물학적 활성 항체는 전형적으로 다수의 디술피드 결합에 의해 연결되고 적절하게 폴딩된 2개의 동일한 L 쇄 및 2개의 동일한 H 쇄를 갖는 이종사량체를 포함한다.

[0134] 본 발명의 조성물 및 그의 사용 방법

[0135] 한 측면에서, 본 발명은 TIR 변이체를 제공한다. 따라서, 주어진 TIR의 경우, 일련의 아미노산 또는 핵산 서열 변이체가 소정 범위를 범역 강도로 생성될 수 있고, 이에 의해 다수의 다양한 폴리펩티드의 최적의 분비를 위해 이러한 인자를 조정하기 편리한 수단을 제공한다. 이들 변이체, 예컨대 PhoA의 제어하에 발현되는 리포터 유전자의 사용은 상이한 범역 개시 영역의 상대 범역 강도를 정량하는 방법을 제공한다. 변이체 또는 돌연변이체 TIR은 플라스미드 벡터의 백그라운드에 제공될 수 있고, 이에 의해 관심 유전자를 삽입할 수 있고 그의 발현을 측정할 수 있는 플라스미드 세트를 제공하여, 성숙 폴리펩티드의 최대 발현을 위한 최적 범위의 범역 강도를 구축한다.

[0136] TIR의 돌연변이유발은 뉴클레오티드 서열의 사일런트 변화가 바람직하더라도 아미노산 서열을 변경시킬 수 있는 코돈 변화를 생성하는 통상적인 기술에 의해 수행된다. TIR의 변경은, 예를 들어 신호 서열의 변경과 함께 샤인-달가노 서열의 수 또는 스페이싱의 변경을 포함할 수 있다. 돌연변이체 신호 서열을 생성하는 한 방법은 신호 서열의 아미노산 서열이 변하지 않는 (즉, 변화가 사일런트임) 코딩 서열의 도입부에서의 "코돈 뱅크"의 생성이다. 이는 각각의 코돈의 제3 뉴클레오티드 위치를 변화시켜 수행될 수 있고; 추가로 일부 아미노산, 예컨대 류신, 세린 및 아르기닌은 뱅크 제조에 복합성을 추가할 수 있는 다수의 제1 및 제2 위치를 갖는다. 이 돌연변이유발 방법은 문헌 [Yansura et al. (METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158 (1992))]에 상세하게 기재되어 있다. 기본적으로, 신호 서열 및 성숙 폴리펩티드의 도입부를 코딩하는 DNA 단편은 각각의 처

음 6 내지 12개 코돈의 제3 (및, 아마도 상기 기재된 바와 같은 제1 및 제2) 위치가 변경되도록 합성된다. 이들 코돈 하류의 추가의 뉴클레오티드는 하부 가닥을 만드는데 사용되는 상보성 프라이머의 결합 부위를 제공한다. 상부 코딩 가닥 및 하부 가닥 프라이머를 DNA 폴리머라제 I (클레나우(Klenow))로 처리하면 랜덤화된 코돈을 함유하는 듀플렉스 DNA 단편 세트가 생성될 것이다. 프라이머는 이후에 DNA 단편을 적절한 벡터에 삽입하는데 사용될 수 있는 유용한 클로닝 부위를 함유하도록 설계되고, 이에 의해 코돈 벙크의 증폭이 허용된다. 대안적 방법은, 예를 들어 전체 rbs의 랜덤 뉴클레오티드로의 대체 (문헌 [Wilson et al., BioTechniques 17:944-952 (1994)]), 및 파지 디스플레이 라이브러리의 사용 (예를 들어, 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4457-4461 (1992)]; [Garrard et al., Gene 128:103-109 (1993)] 참조)을 포함한다.

[0137] 박테리아 Sec 전위효소는 원핵생물에서 단백질 유출을 용이하게 한다. 분비 단백질은 2가지 상이한 메카니즘, 즉 공동-번역 및 번역후 표적화에 의해 Sec 전위효소에 표적화될 수 있다. 후자에서, 분비 단백질을 함유하는 신호 서열은 그의 합성 완료 상태에서 리보솜으로부터 방출되고, Sec-전위효소에 대해 지시된다. 다양한 그램-음성 박테리아에서, 분비 단백질은 이들 단백질을 전위-적격, 비풀딩 상태로 함유하는 분비 특이적 샤페론 SecB에 의해 Sec-전위효소로 안내된다. 공동-번역 표적화 동안, 신호 인식 입자 (SRP)는 리보솜으로부터 나타나는 한편 분비 단백질의 신호 서열에 결합하고, SRP/리보솜/발생기 분비 단백질 쇄의 전체 3원 복합체는 Sec-전위효소에 표적화된다.

[0138] 예를 들어, 말토스-결합 주변세포질 단백질 (MalE) 및 알칼리성 포스파타제 (PhoA) 신호 웨პ티드는 분자 모터 SecA의 도움을 받아 번역후 방식으로 세포질로부터 주변세포질로의 전위를 지시한다. 번역후 방식으로 전위를 지시하는 다른 예시적 신호 웨პ티드는 dsbC, lola, ompA, lamb, 및 lpp이다. 열-안정성 장독소 II (stII) 및 티올:디술피드 교환 단백질 (dsbA) 신호 웨პ티드는 신호 인식 입자 (SRP)로부터 도움을 받아 공동-번역 방식으로 전위를 지시한다. 공동-번역 방식으로 전위를 지시하는 다른 예시적 신호 웨პ티드는 yraI, tort, tolB, sfmC, nikA, 및 sfmC이다. 또한 박테리아 세포질 막을 가로지르는 Sec- 및 Tat-매개된 단백질 분비의 검토를 위해 [Natale et al.]을 참조한다. (문헌 [Natale et al. (2008) Biochimica et Biophysica Acta 1778:1735-56]).

[0139] 본 발명자들은 이. 콜라이: sec (PhoA, MalE) 및 SRP (DsbA, STII)에서 내막을 가로지르는 수송을 위한 주요 분비 경로 중 2가지를 나타내는 신호 웨პ티드에 대한 신규 변이체 번역 개시 영역 (TIR) 신호 웨პ티드 라이브러리 (도 2, 표 2)를 개발하였다. 각각의 라이브러리는 달라지는 번역 강도의 변이체 TIR을 포함하는 벡터의 패널을 포함하며, 주어진 관심 단백질에 대한 번역 수준을 용이하게 조정하는 수단을 제공한다.

[0140] 전형적으로, TIR 변이체는 관심 유전자의 발현에 적절한 요소를 갖는 플라스미드 벡터에 제공될 것이다. 예를 들어, 전형적인 구축물은 신호 서열에 대한 프로모터 5', 관심 유전자 또는 리포터 유전자의 삽입을 위한 신호 서열에 대한 제한 효소 인식 부위 3', 및 생성된 플라스미드로 형질전환된 박테리아의 선택 및/또는 유지를 위한 선택가능한 마커, 예컨대 약물 내성 마커를 함유할 것이다. 플라스미드 벡터는 본원에서 추가로 논의 및 예시된다. 원핵 숙주와 사용하기 적합한 프로모터는 당업계에 알려져 있으며, 일부는 본원에서 예시 및 기재된다.

[0141] 일부 방식으로 정량화될 수 있는 임의의 리포터 유전자가 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어 알칼리성 포스파타제 생성은 phoA 유전자 생성물의 분비된 수준의 척도로서 정량화될 수 있다. 다른 예는, 예를 들어, β -락타마제 유전자를 포함한다.

[0142] 일반적으로, 벡터 세트는 그 중의 벡터의 각각의 시스트론에 대해 소정 범위의 TIR 강도로 생성될 수 있다. 이제한된 세트는 각각의 쇄의 발현 수준의 비교 뿐만 아니라 다양한 TIR 강도 조합하에 전장 생성물의 수율을 제공한다. TIR 강도는 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.)에 상세하게 기재된 바와 같이 리포터 유전자의 발현 수준을 정량하여 결정될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 벡터 내의 TIR의 특정 쌍에 대한 번역 강도 조합을 (N-경쇄, M-중쇄)로 표시하고, 여기서 N은 경쇄의 상대 TIR 강도이고, M은 중쇄의 상대 TIR 강도이다. 예를 들어, (3-경쇄, 7-중쇄)는 벡터가 경쇄 발현의 경우 약 3의 상대 TIR 강도를 제공하고, 중쇄 발현의 경우 약 7의 상대 TIR 강도를 제공한다는 것을 의미한다. 번역 강도 비교에 기초하여, 바람직한 개별 TIR은 본 발명의 발현 벡터 구축물에서 조합되도록 선택된다. 이와 같이 구축된 벡터는 적절한 숙주를 형질전환시키는데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 숙주는 원핵 숙주이다. 보다 바람직하게는, 숙주는 이. 콜라이이다.

[0143] 폴리웨პ티드의 분비된 수준은, 예를 들어 관심 폴리웨პ티드에 대한 기능적 검정에 의해, 이용가능하다면 방사성면역검정 (RIA), 효소-연결 면역검정 (ELISA), 또는 PAGE 및 정확한 분자량의 관심 폴리웨პ티드의 시각화에 의해 결정될 수 있다. 분비된 폴리웨პ티드 수준을 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 일부는 본원에서 예시된다.

[0144]

항체

[0145]

본 발명의 항체는 바람직하게는 모노클로날이다. 본원에서 제공하는 항체의 Fab, Fab', Fab'-SH 및 (Fab')₂ 단편 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 이러한 항체 단편들은 전통적인 수단, 예컨대 효소에 의한 소화에 의해 생성될 수 있거나, 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 이러한 항체 단편은 키메라 항체 단편 또는 인간화 항체 단편일 수 있다. 이러한 단편들은 하기 기재된 진단 및 치료 목적으로 유용하다.

[0146]

따라서, 일부 실시양태에서, 항-c-met 항체는 Fc 영역을 포함하는 1-아암 항체이며 (즉, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인이 단일 항원 결합 아암을 형성함), 여기서 Fc 영역은 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 복합체에 존재하여 상기 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자와 비교하여 상기 항체 단편의 안정성을 증가시키는 Fc 영역을 형성한다. 길항제 기능을 필요로 하고 항체의 2가성이 바람직하지 않은 효능 효과를 야기하는 병적 상태를 치료하는 경우, 1-아암 항체 (즉 단일 항원 결합 아암을 포함하는 항체)의 1가 특성은 항체의 표적 분자에의 결합시에 길항제 기능을 야기하고/거나 보장한다. 또한, Fc 영역을 포함하는 1-아암 항체는 유사한/실질적으로 동일한 항원 결합 특성을 갖는 Fab 형태와 비교하여 우수한 약동학적 속성 (예컨대 향상된 생체내 반감기 및/또는 감소된 청소율)을 특징으로 하며, 이에 따라 종래의 1가 Fab 항체를 사용하는데 있어서의 주요 문제점이 극복된다. 1-아암 항체는, 예를 들어 WO2005/063816; [Martens et al., Clin Cancer Res (2006), 12: 6144]에 개시되어 있다. 일부 실시양태에서, 1-아암 항체는 1가 항체 단편이고, 여기서 항체 단편은 경쇄 가변 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드, 중쇄 가변 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 및 상기 제1 Fc 폴리펩티드, 및 상기 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하고, 이에 의해 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 단일 항원 결합 아암을 형성하고, 이에 의해 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 복합체에 존재하고, 상기 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자와 비교하여 상기 항체 단편의 안정성을 증가시키는 Fc 영역을 형성한다.

[0147]

일부 실시양태에서, 항체는 c-met에 결합한다 (일부 실시양태에서, 특이적으로 결합한다). 일부 실시양태에서,

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMDPS
NSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYW
```

항-c-met 항체는 (a) 서열: GQGTLVTVSS (서열 43)

을 갖는

중쇄 가변 도메인, CH1 서열, 및 제1 Fc 폴리펩티드를 포함하는 제1 폴리펩티드; (b) 서열:

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW
```

```
ASTRESGVPSRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIK
```

R (서열 44)

를 갖는 경쇄 가변 도메인, 및 CL1 서

열을 포함하는 제2 폴리펩티드; 및 (c) 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 복합체로 존재하고, 단일 항원 결합 아암을 형성하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 복합체에 존재하고, 상기 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자와 비교하여 상기 항체 단편의 안정성을 증가시키는 Fc 영역을 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 도 7에 도시된 Fc 서열 (서열 68)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 도 8에 도시된 Fc 서열 (서열 47)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 도 8에 도시된 Fc 서열 (서열 47)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 도 7에 도시된 Fc 서열 (서열 68)을 포함한다.

[0148]

일부 실시양태에서, 항-c-met 항체는 (a) 중쇄 가변 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 (상기 폴리펩티드는 서

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMDPS
NSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYLPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
```

열: LSLSPGK (서열 45)

를 포함함); (b) 경쇄 가변 도메

인을

포함하는

제2

폴리펩티드

(폴리펩티드는

서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW
 ASTRESGVPSRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(서열 46)

을 포함함); 및 Fc 서열을 포함하는

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK (서열 47)

제3 폴리펩티드 (폴리펩티드는 서열

을

포함함)를 포함하고, 여기서 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 복합체로 존재하고, 단일 항원 결합 아암을 형성하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 복합체에 존재하고, 상기 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자와 비교하여 상기 항체 단편의 안정성을 증가시키는 Fc 영역을 형성한다.

[0149]

한 측면에서, 항-c-met 항체는 다음을 포함한다:

[0150]

(a) 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 초가변 영역 (CDR) 서열:

[0151]

(i) 서열 A1-A17을 포함하는 CDR-L1 (여기서, A1-A17은 KSSQSLYTSSQKNYLA (서열 49)임),

[0152]

(ii) 서열 B1-B7을 포함하는 CDR-L2 (여기서, B1-B7은 WASTRES (서열 50)임),

[0153]

(iii) 서열 C1-C9를 포함하는 CDR-L3 (여기서, C1-C9는 QQYYAYPWT (서열 51)임),

[0154]

(iv) 서열 D1-D10을 포함하는 CDR-H1 (여기서, D1-D10은 GYTFTSYWLH (서열 52)임),

[0155]

(v) 서열 E1-E18을 포함하는 CDR-H2 (여기서, E1-E18은 GMIDPSNSDTRFPNFKD (서열 53)임), 및

[0156]

(vi) 서열 F1-F11을 포함하는 CDR-H3 (여기서, F1-F11은 T/SYGSYVSPLDY (서열 54)임); 및

[0157]

(b) 적어도 하나의 변이체 CDR (여기서, 변이체 CDR 서열은 (i) 내지 (vi)에 도시된 서열의 적어도 하나의 잔기의 변형을 포함함). 한 실시양태에서, CDR-H3은 TYGSYVSPLDY (서열 55)를 포함한다. 한 실시양태에서, CDR-H3은 SYGSYVSPLDY (서열 56)를 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 서열 (본원에 기재된 바와 같이 조합)을 포함하는 본 발명의 항체는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0158]

한 실시양태에서, 항-c-met 항체는 도 7에 도시된 CDR1-HC, CDR2-HC 및 CDR3-HC 서열 (서열 52-53 및 66) 중 하나 이상을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 도 7에 도시된 CDR1-LC, CDR2-LC 및 CDR3-LC 서열 (서열 49-51) 중 하나 이상을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 도 7에 도시된 FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC 및 FR4-HC 서열 (서열 62-65)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 도메인은 도 7에 도시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및 FR4-LC 서열 (서열 57-60)을 포함한다.

[0159]

본 발명의 항-c-met 항체에서 변이체 HVR은 HVR 내의 하나 이상의 잔기의 변형을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, HVR-L2 변이체는 하기 위치의 임의의 조합에서 1 내지 5개 (1, 2, 3, 4 또는 5개)의 치환을 포함한다: B1 (M 또는 L), B2 (P, T, G 또는 S), B3 (N, G, R 또는 T), B4 (I, N 또는 F), B5 (P, I, L 또는 G), B6 (A, D, T 또는 V) 및 B7 (R, I, M 또는 G). 한 실시양태에서, HVR-H1 변이체는 하기 위치의 임의의 조합에서 1 내지 5개 (1, 2, 3, 4 또는 5개)의 치환을 포함한다: D3 (N, P, L, S, A, I), D5 (I, S 또는 Y), D6 (G, D, T, K, R), D7 (F, H, R, S, T 또는 V) 및 D9 (M 또는 V). 한 실시양태에서, HVR-H2 변이체는 하기 위치의 임의의 조합에서 1 내지 4개 (1, 2, 3 또는 4개)의 치환을 포함한다: E7 (Y), E9 (I), E10 (I), E14 (T 또는 Q), E15 (D, K, S, T 또는 V), E16 (L), E17 (E, H, N 또는 D) 및 E18 (Y, E 또는 H). 한 실시양태에서, HVR-H3 변이체는 하기 위치의 임의의 조합에서 1 내지 5개 (1, 2, 3, 4 또는 5개)의 치환을 포함한다: F1 (T, S), F3 (R, S, H, T, A, K), F4 (G), F6 (R, F, M, T, E, K, A, L, W), F7 (L, I, T, R, K, V), F8 (S, A), F10 (Y, N) 및 F11 (Q, S, H, F). 각각의 위치 다음의 팔호 내의 문자(들)은 예시적인 치환 (즉, 대체) 아미노산을 나타내고; 당업자에게 명백한 바와 같이, 본원에서 설명되는 맥락에서 다른 아미노산의 치환 아미노산으로서의 적합성은 당업계에 공지된 및/또는 본원에서 설명된 기술을 사용하여 통상적으로 평가될 수 있다. 한 실시양태에서, HVR-L1은 서열 49의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 변이체 HVR-H3에서 F1은 T이다. 한 실시양태에서, 변

이체 HVR-H3에서 F1은 S이다. 한 실시양태에서, 변이체 HVR-H3에서 F3은 R이다. 한 실시양태에서, 변이체 HVR-H3에서 F3은 S이다. 한 실시양태에서, 변이체 HVR-H3에서 F7은 T이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 F1이 T 또는 S이고, F3이 R 또는 S이고, F7이 T인 변이체 HVR-H3을 포함한다.

[0160] 한 실시양태에서, 본 발명의 항-c-met 항체는 F1이 T이고, F3이 R이고, F7이 T인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 F1이 S인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 F1이 T이고, F3이 R인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 F1이 S이고, F3이 R이고, F7이 T인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 F1이 T이고, F3이 S이고, F7이 T이고, F8이 S인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 F1이 T이고, F3이 S이고, F7이 T이고, F8이 A인 변이체 HVR-H3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체 HVR-H3 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 및 HVR-H2를 더 포함하고, 여기서 각각은 순서대로 서열 49, 50, 51, 52, 및 53에 도시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 더 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시양태에서, 위치 71은 A이고/거나, 73은 T이고/거나 78은 A이다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 이들 항체는 인간 κI 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 더 포함한다.

[0161] 한 실시양태에서, 본 발명의 항-c-met 항체는 B6이 V인 변이체 HVR-L2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체 HVR-L2 항체는 HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3을 더 포함하고, 여기서 각각은 순서대로 서열 49, 51, 52, 53, 54에 도시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체 HVR-L2 항체는 HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3을 더 포함하고, 여기서 각각은 순서대로 서열 49, 51, 52, 53, 55에 도시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체 HVR-L2 항체는 HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3을 더 포함하고, 여기서 각각은 순서대로 서열 49, 51, 52, 53, 56에 도시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 더 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시양태에서, 위치 71은 A이고/거나, 73은 T이고/거나 78은 A이다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 이들 항체는 인간 κI 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 더 포함한다.

[0162] 한 실시양태에서, 본 발명의 항-c-met 항체는 E14가 T이고, E15가 K이고, E17이 E인 변이체 HVR-H2를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 E17이 E인 변이체 HVR-H2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체 HVR-H3 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, 및 HVR-H3을 더 포함하고, 여기서 각각은 순서대로 서열 49, 50, 51, 52, 54에 도시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체 HVR-H2 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, 및 HVR-H3을 더 포함하고, 여기서 각각은 순서대로 서열 49, 50, 51, 52, 55에 도시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체 HVR-H2 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, 및 HVR-H3을 더 포함하고, 여기서 각각은 순서대로 서열 49, 50, 51, 52, 55에 도시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 더 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시양태에서, 위치 71은 A이고/거나, 73은 T이고/거나 78은 A이다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 이들 항체는 인간 κI 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 더 포함한다.

[0163] 본 발명의 방법에 사용하기 적합한 다른 항-c-met 항체는 당업계에 알려져 있다.

[0164] 한 측면에서, 항-c-met 항체는 항체 단편 내의 Fc 서열의 동종이량체화를 최소화하면서 이종이량체화를 촉진하는 적어도 하나의 특성을 포함한다. 이러한 특성(들)은 이뮤노글로불린 집단의 수율 및/또는 순도 및/또는 균질성을 개선시킨다. 한 실시양태에서, 항체는 WO2005/063816에 기재된 바와 같은 "놉" 및 "홀"을 구성하는 Fc 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 홀 돌연변이는 Fc 폴리펩티드 내의 T366A, L368A 및/또는 Y407V 중 하나 이상일 수 있고, 놈 돌연변이는 T366W일 수 있다. 놈과 홀 Fc 돌연변이는 본원에서 추가로 기재된다.

[0165] 모노클로날 항체는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득하고, 즉 집단을 이루는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어구 "모노클로날"은 항체의 특징을 별개의 항체의 혼합물이 아니라는 것으로 나타낸다.

[0166] 본 발명의 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 제조할 수 있다.

[0167] 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를 면역화시켜, 면역화에 사용된

단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유발시킨다. 항원에 대한 항체가 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 생성될 수 있다. 항원은 그의 일부가 본원에서 추가로 기재된 당업계에서 주지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 인간 및 마우스 항원의 재조합 생성은 아래 기재된다. 한 실시양태에서, 동물을 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 부분에 융합된 항원으로 면역화시킨다. 바람직한 실시양태에서, 항원-IgG1 융합 단백질로 동물을 면역화시킨다. 보통 동물을 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노미콜레이트 (TDM) (리비 이뮤노켐, 리서치, 인크.(Ribi Immunochem. Research, Inc.) (미국 몬타나주 해밀턴))를 사용하여 항원의 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화시키고, 용액을 여러 부위에 피내로 주사한다. 2주 후, 동물을 부스팅시킨다. 7일 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 검정한다. 역가가 정체기에 도달할 때까지 동물을 부스팅시킨다.

[0168] 대안적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 적합한 융합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포가 형성된다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0169] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게는 함유하는 적합한 배양 배지에 시딩하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0170] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생성 세포에 의한 높은 수준의 안정적인 항체 생성을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 특히 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 살크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)로부터 입수가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 및 미국 메릴랜드주 록크빌 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유래된 것이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주 역시 인간 모노클로날 항체 생성과 관련하여 기재된 바 있다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

[0171] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 분석법, 예컨대 방사성면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)에 의해 결정한다.

[0172] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드 분석으로 결정할 수 있다.

[0173] 바람직한 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 제한 회색 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.

[0174] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.

[0175] 본 발명의 항체를 조합 라이브러리로 사용함으로써 제조하여 바람직한 활성(들)을 갖는 합성 항체 클론을 스크리닝할 수 있다. 원칙적으로, 파지 코트 단백질에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 디스플레이하는 과자를 함유하는 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 합성 항체 클론이 선택된다. 바람직한 항원에 대한 친화도 크로마토그래피에 의해 이러한 파지 라이브러리가 폐닝된다. 바람직한 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론이 항원에 흡착되고, 따라서 라이브러리 내의 비결합 클론으로부터 분리된다. 이후에, 결합 클론이 항원으로부터 용리되고, 항원 흡착/용리의 추가적인 사이클에 의해 추가로 강화될 수 있다. 본 발명의 임의의 항체는 관심 파지 클론을 선택하는데 적합한 항원 스크리닝 절차를 설계한 후, 관심 파지 클론으로부터 Fv 서열 및 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에 기재된 적합한 불변 영역 (Fc) 서열을 사용하여 항체

클론을 구축함으로써 얻을 수 있다. 항체를 생성하기 위한 예시적 방법은 실시예에 개시된다.

- [0176] 항체의 항원-결합 도메인은 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)로부터 각각 하나씩의, 아미노산 약 110개의 2개의 가변 (V) 영역으로부터 형성되고, 둘 다 3개의 초가변 루프 또는 상보성-결정 영역 (CDR)을 나타낸다. 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이, VH 및 VL이 짧은 가요성 펩티드를 통해 공유결합에 의해 연결된 단일쇄 Fv (scFv) 단편으로서, 또는 VH 및 VL이 볼변 도메인에 각각 융합되어 비공유결합에 의해 상호작용하는 Fab 단편으로서, 가변 도메인이 과지 상에 기능적으로 디스플레이될 수 있다. 본원에 사용된 scFv 코딩 과지 클론 및 Fab 코딩 과지 클론은 총괄적으로 "Fv 과지 클론" 또는 "Fv 클론"으로 지칭된다.
- [0177] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리가 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 개별적으로 클로닝되어 과지 라이브러리에서 무작위로 재조합될 수 있고, 그 후 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 클론을 조사할 수 있다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비자가 항원 및 또한 자가 항원에 대한 인간 항체의 단일 공급원을 제공하도록 나이브(naive) 레퍼토리를 클로닝할 수 있다. 마지막으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다.
- [0178] 필라멘트형 과지가 마이너(minor) 코트 단백질 pIII에 대한 융합에 의해 항체 단편을 디스플레이하는데 사용된다. 항체 단편은, 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이, 가요성 폴리펩티드 스페이서에 의해 동일한 폴리펩티드 쇄 상에서 VH 및 VL 도메인이 연결된 단일쇄 Fv 단편으로서, 또는 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)]에 기재된 바와 같이, 하나의 쇄는 pIII에 융합되고 다른 하나는 박테리아 숙주 세포 주변세포질로 분비되어, 여기서 일부 야생형 코트 단백질을 대체함으로써 Fab-코트 단백질 구조의 어셈블리가 과지 표면 상에 디스플레이되게 되는 Fab 단편들로서 디스플레이될 수 있다.
- [0179] 일반적으로, 항체 유전자 단편을 코딩하는 핵산은 인간 또는 동물로부터 수거된 면역 세포로부터 수득하였다. 특정 항원을 표적화하는 클론에 유리하게 편향된 라이브러리가 요망되는 경우, 개체를 항체 반응을 생성하도록 항체로 면역화시키고, 비장 세포 및/또는 순환 B 세포, 다른 말초혈 림프구 (PBL)를 라이브러리 구축을 위해 회수한다. 바람직한 실시양태에서, 항원 반응성 클론에 유리하게 편향된 인간 항체 유전자 단편 라이브러리는 항원 면역화가 항원에 대한 인간 항체를 생성하는 B 세포를 유도하도록 기능적 인간 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 운반하는 (및 기능적 내인성 항체 생성 시스템이 결핍된) 트랜스제닉 마우스에서 항체 반응을 생성함으로써 얻어진다. 인간 항체-생성 트랜스제닉 마우스의 생성은 하기에서 기재된다.
- [0180] 항원 반응성 세포 집단에 대한 추가의 풍부화물은, 예를 들어 항원 친화도 크로마토그래피 또는 플루오로크로뮴-표지된 항원에 대한 세포의 흡착 후 유동-활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하는 세포 분리에 의해, 항원-특이적 결합 항체를 발현하는 B 세포를 단리하는 적합한 스크리닝 절차를 이용하여 얻을 수 있다.
- [0181] 대안적으로, 비면역화 공여자로부터의 비장 세포 및/또는 B 세포 또는 다른 PBL을 사용함으로써, 가능한 항체 레퍼토리의 보다 우수한 예시를 제공하고, 또한 항원이 항원성이 아닌 임의의 동물 (인간 또는 비인간) 종을 사용한 항체 라이브러리의 구축을 허용한다. 시험관내 항체 유전자 구축을 도입하는 라이브러리의 경우에는, 개체로부터 줄기 세포를 수확하여 재배열되지 않은 항체 유전자 절편을 코딩하는 핵산을 제공한다. 관심 면역 세포는 다양한 동물 종, 예컨대 인간, 마우스, 래트, 토끼목, 이리, 개, 고양이, 돼지, 소, 말, 및 조류 종 등으로부터 수득될 수 있다.
- [0182] 항체 가변 유전자 절편 (VH 및 VL 절편 포함)을 코딩하는 핵산이 관심 세포로부터 회수되어, 증폭된다. 재배열된 VH 및 VL 유전자의 라이브러리의 경우에, 바람직한 DNA는 림프구로부터 게놈 DNA 또는 mRNA를 단리한 후에 문헌 [Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)]에 기재된 바와 같이 재배열된 VH 및 VL 유전자의 5' 및 3' 말단을 매칭시키는 프라이머를 사용한 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 수행하여 발현을 위한 다양한 V 유전자 레퍼토리를 제조함으로써 얻을 수 있다. 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 및 [Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989)]에 기재된 바와 같이, 성숙 V-도메인을 코딩하는 엑손의 5' 말단에서의 역 방향 프라이머 및 J-절편을 기초로 하는 정방향 프라이머로, V 유전자가 cDNA 및 게놈 DNA로부터 증폭될 수 있

다. 그러나, cDNA로부터의 증폭을 위해, 역방향 프라이머가 문헌 [Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991)]에 기재된 바와 같이 리더 엑손을 기초로 할 수 있고, 정방향 프라이머가 문헌 [Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)]에 기재된 바와 같이 불변 영역을 기초로 할 수 있다. 상보성을 최대화하기 위해, 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 또는 [Sastry et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 프라이머 내에 축퇴성을 혼입시킬 수 있다. 바람직하게는, 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]의 방법에 기재된 바와 같이, 또는 문헌 [Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)]의 방법에 기재된 바와 같이, 면역 세포 혈산 샘플에 존재하는 모든 이용가능한 VH 및 VL 배열을 증폭시키기 위해 각각의 V-유전자 부류에 표적화된 PCR 프라이머를 사용함으로써 라이브러리 다양성이 최대화된다. 증폭된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해, 희귀 제한 부위가 문헌 [Orlandi et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 한 말단에서 태그로서, 또는 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 태그가 부착된 프라이머를 사용하는 추가의 PCR 증폭에 의해 PCR 프라이머 내에 도입될 수 있다.

[0183] 합성적으로 재배열된 V 유전자의 레퍼토리가 시험관내에서 V 유전자 절편으로부터 유래될 수 있다. 대부분의 인간 VH-유전자 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)]에 보고됨), 맵핑되어 있으며 (문헌 [Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)]에 보고됨); 이러한 클로닝된 절편들 (H1 및 H2 루프의 모든 주요 형태 포함)은 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이 다양한 서열 및 길이의 H3 루프를 코딩하는 PCR 프라이머로 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 생성시키는데 사용될 수 있다. 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)]에 기재된 바와 같이 모든 서열 다양성이 단일 길이의 긴 H3 루프에 초점이 맞춰진 VH 레퍼토리가 또한 제조될 수 있다. 인간 V_K 및 V_L 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)]에 보고됨), 합성 경쇄 레퍼토리를 제조하는데 사용될 수 있다. 광범위한 VH 및 VL 폴딩, 및 L3 및 H3 길이를 기초로 하는 합성 V 유전자 레퍼토리는 상당한 구조적 다양성의 항체를 코딩할 것이다. V-유전자 코딩 DNA의 증폭에 이어서, 배선 V-유전자 절편이 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]의 방법에 따라 시험관내에서 재배열될 수 있다.

[0184] 항체 단편의 레퍼토리는 VH 및 VL 유전자 레퍼토리를 서로 다양한 방식으로 조합하여 구축할 수 있다. 각각의 레퍼토리는 여러 벡터 내에 생성될 수 있고, 벡터는 예를 들어 문헌 [Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993)]에 기재된 바와 같이 시험관내 재조합되거나 조합 감염, 예를 들어 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993)]에 기재된 loxP 시스템에 의해 생체내 재조합될 수 있다. 생체내 재조합 접근법은 이. 콜라이 형질전환 효율로 인한 라이브러리 크기의 한계를 극복하기 위해 Fab 단편의 2쇄 특성을 이용한다. 나이브 VH 및 VL 레퍼토리를 하나는 파지미드에서, 다른 하나는 파지 벡터에서 개별적으로 클로닝한다. 이어서, 2개의 라이브러리를 파지미드-함유 박테리아의 파지 감염에 의해 조합하여 각각의 세포가 상이한 조합을 함유하도록 하고, 라이브러리 크기는 존재하는 세포의 개수로만 한정된다 (약 10¹²개 클론). 두 벡터는 VH 및 VL 유전자가 단일 레플리콘에서 재조합되어 파지 비리온 내에 공동패키징되도록 하는 생체내 재조합 신호를 함유한다. 이러한 거대 라이브러리는 양호한 친화도 (약 10⁻⁸ M의 K_d⁻¹)를 갖는 다양한 항체를 대량으로 제공한다.

[0185] 대안적으로, 레퍼토리들은 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 동일 벡터 내로 순차적으로 클로닝될 수도 있거나, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 함께 어셈블리된 후에 클로닝될 수도 있다. VH 및 VL DNA를 가요성 웹티드 스페이서를 코딩하는 DNA와 연결시켜 단일쇄 Fv (scFv) 레퍼토리를 형성시키는데 PCR 어셈블리가 또한 사용될 수 있다. 또 다른 기술에서는 문헌 [Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992)]에 기재된 바와 같이 "세포내 PCR 어셈블리"를 사용하여 VH 및 VL 유전자를 림프구 내에서 PCR로 조합시킨 후에 연결된 유전자의 레퍼토리를 클로닝한다.

[0186] 나이브 라이브러리 (천연 또는 합성)에 의해 생성된 항체는 친화도가 중등도일 수 있지만 (약 10⁶ 내지 10⁷ M⁻¹의 K_d⁻¹), [Winter et al. (1994), 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 제2 라이브러리의 구축 및 이로부터의 재선택에 의해 시험관 내에서 친화도 성숙이 또한 모방될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 문헌 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)]의 방법 또는 문헌 [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)]의 방법으로 오류-유발(error-prone) 폴리머라제 (문헌 [Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)]에 보고됨)를 사용함으로써 무작위로 시험관내 도입될 수 있다. 추가로, 예를 들어 관심 CDR에 스패닝

된 무작위 서열을 운반하는 프라이머로의 PCR을 사용하여, 선택된 개별 Fv 클론에서 하나 이상의 CDR을 무작위로 돌연변이시키고, 친화도가 더 높은 클론을 스크리닝함으로써 친화도 성숙이 수행될 수 있다. WO 96/07754 (1996년 3월 14일 공개)는 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성하기 위해 이뮤노글로불린 경쇄의 상보성-결정 영역에서 돌연변이유발을 유도하는 방법을 기재하였다. 또 다른 효과적인 접근법은, 면역화되지 않은 공여자로부터 수득한 자연 발생 V 도메인 변이체의 레퍼토리를 갖는 파지 디스플레이에 의해 선택된 VH 또는 VL 도메인을 재조합하고, 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10:779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 여러 회의 쇄 재셔플링으로 보다 높은 친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 이러한 기술은 친화도가 10^{-9} M 범위인 항체 및 항체 단편이 생성되도록 한다.

[0187] 바람직한 표적 항원을 코딩하는 핵산 서열은 항원의 바람직한 영역의 아미노산 서열을 사용하여 설계할 수 있다.

[0188] 표적 항원을 코딩하는 핵산은 당업계에 공지되어 있는 다양한 방법에 의해서 제조될 수 있다. 이러한 방법은 문헌 [Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989)]에 기재된 방법들 중 임의의 것, 예컨대 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스포네이트 방법에 의한 화학적 합성을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 항원 코딩 DNA를 설계하는데 발현 숙주 세포가 선호하는 코돈이 사용된다. 대안적으로, 항원을 코딩하는 DNA는 게놈 또는 cDNA 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0189] 항원을 코딩하는 DNA 분자의 구축 후, DNA 분자는 발현 백터, 예를 들어, 플라스미드 중의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결되는데, 여기서, 제어 서열은 상기 백터로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식된다. 일반적으로, 플라스미드 백터는 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 복제 및 제어 서열을 함유한다. 통상적으로 백터는 복제 부위, 뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 단백질을 코딩하는 서열을 보유한다. 원핵 및 진핵 숙주 세포에서의 발현을 위한 적절한 세포는 당업계에 주지되어 있고, 일부가 본원에서 추가로 기재된다. 진핵생물, 예컨대 효모, 또는 다세포 생물, 예컨대 포유동물로부터 유래된 세포가 사용될 수 있다.

[0190] 임의로, 항원을 코딩하는 DNA가 분비 리더 서열에 작동가능하게 연결되어, 숙주 세포에 의한 발현 생성물이 배양 배지 내로 분비된다. 분비 리더 서열의 예로는 stII, 에코틴, lamB, 포진 GD, lpp, 알칼리성 포스파타제, 인베타제, 및 알파 인자가 포함된다. 단백질 A의 36개 아미노산 리더 서열이 본원에 사용하기에 또한 적합하다 (문헌 [Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985)]).

[0191] 숙주 세포가 상기 기재된 본 발명의 발현 또는 클로닝 백터로 형질감염, 바람직하게는 형질전환되고, 프로모터의 유도, 형질전환체의 선택 또는 바람직한 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 적합하도록 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다.

[0192] 형질감염은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되는지 여부와 상관 없이 숙주 세포 내로 발현 백터가 들어가는 것을 나타낸다. 수많은 형질감염 방법, 예를 들어, CaPO₄ 침전 및 전기천공이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 백터의 작동의 임의의 지시가 숙주 세포 내에서 일어나는 경우 성공적인 형질감염이 일반적으로 인지된다. 형질감염 방법은 당업계에 주지되어 있고, 일부가 본원에서 추가로 기재된다.

[0193] 형질전환은 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 구성요소에 의해 복제가능하도록 DNA를 생물 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 형질전환 방법은 당업계에 주지되어 있고, 일부가 본원에서 추가로 기재된다.

[0194] 항원을 생성하는데 사용된 원핵 숙주 세포는 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 일반적으로 기재된 바와 같이 배양될 수 있다.

[0195] 당업계에 주지되어 있고, 일부는 본원에서 추가로 기재하는, 다양한 배지 중에서 항원을 제조하는데 사용되는 포유동물 숙주 세포를 배양할 수 있다.

[0196] 본 명세서에서 언급된 숙주 세포는 시험관내 배양물 내의 세포, 뿐만 아니라 숙주 동물 내에 있는 세포를 포함한다.

[0197] 항원의 정제는 당업계에 인지된 방법을 사용하여 달성될 수 있고, 그의 일부는 본원에서 기재된다.

[0198] 정제된 항원은 파지 디스플레이 클론의 친화도 크로마토그래피에 의한 분리에서 사용하기 위해 아가로스 비드, 아크릴아미드 비드, 유리 비드, 셀룰로스, 다양한 아크릴계 공중합체, 히드록실 메타크릴레이트 젤, 폴리아크릴

산 및 폴리메타크릴산 공중합체, 나일론, 중성 및 이온성 담체 등과 같은 적합한 매트릭스에 부착될 수 있다. 항원 단백질을 매트릭스에 부착시키는 것은 문헌 [Methods in Enzymology, vol. 44 (1976)]에 기재된 방법에 의해 달성될 수 있다. 단백질 리간드를 폴리사카라이드 매트릭스, 예를 들어 아가로스, 텍스트란 또는 셀룰로스에 부착시키기 위한 통상적으로 사용되는 기술은 담체를 시아노겐 할라이드로 활성화시키고 이어서 펩티드 리간드의 1차 지방족 또는 방향족 아민을 활성화된 매트릭스에 커플링시키는 것을 수반하였다.

[0199] 대안적으로, 항원은 흡착 플레이트의 웰을 코팅하기 위해 사용하거나, 흡착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에 발현시키거나, 세포 분류에서 사용하거나, 스트렙타비딘-코팅된 비드로 포획하기 위해 비오틴에 접합하거나, 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하기 위한 임의의 다른 당업계 공지의 방법에서 사용할 수 있다.

[0200] 파지 입자의 적어도 일부와 흡착제의 결합에 적합한 조건 하에 파지 라이브러리 샘플을 고정된 항원과 접촉시킨다. 일반적으로, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함하는 조건은 생리학적 조건을 모방하도록 선택된다. 고체상에 결합된 파지를 세척한 후, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)]에 설명된 바와 같이 산에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 설명된 바와 같이 알칼리에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]의 항원 경쟁 방법과 유사한 절차로 항원 경쟁에 의해 용리시킨다. 단일 라운드의 선택로 파지가 20 내지 1,000배 풍부화될 수 있다. 또한, 풍부화된 파지가 박테리아 배양에서 성장되어, 추가의 선택 라운드에 적용될 수 있다.

[0201] 선택 효율은 세정 동안의 해리 동역학, 및 단일 파지 상의 다중 항체 단편들이 동시에 항원과 맞물릴 수 있는지 여부를 비롯한 다수의 인자에 좌우된다. 신속한 해리 동역학 (및 약한 결합 친화도)의 항체는 단시간 세정, 다가 파지 디스플레이 및 고체상 내의 항원의 높은 코팅 밀도를 사용함으로써 유지될 수 있다. 높은 밀도는 다가 상호작용을 통해 파지를 안정화시킬 뿐만 아니라, 해리된 파지의 재결합을 장려한다. 느린 해리 동역학 (및 우수한 결합 친화도)의 항체의 선택은 문헌 [Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990)] 및 WO 92/09690에 기재된 바와 같은 1가 파지 디스플레이 및 장시간 세정, 및 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)]에 기재된 바와 같은 항원의 낮은 코팅 밀도를 사용함으로써 증진될 수 있다.

[0202] 항원에 대한 상이한 친화도, 심지어 근소하게 상이한 친화도를 갖는 파지 항체 사이로부터 선택할 수도 있다. 그러나, 선택된 항체의 무작위 돌연변이 (예를 들어, 상기 기재된 친화도 성숙 기술들 중 일부에서 수행되는 바와 같은 돌연변이)는 다수의 돌연변이체를 일으키기 쉽고, 여기서 대부분은 항원에 결합하고 몇몇은 친화도가 더 높다. 항원을 제한하여, 희귀 고친화도 파지를 경쟁시킬 수 있다. 보다 고친화도의 돌연변이체를 모두 보유하기 위해, 파지를 과량의 비오틴화된 항원과 함께 인큐베이션시킬 수 있지만, 비오틴화된 항원은 항원에 대한 표적 물 친화도 상수보다 더 낮은 물농도의 농도로 사용된다. 이후에, 고친화도-결합 파지가 스트렙타비딘이 코팅된 상자성 비드에 의해 포획될 수 있다. 이러한 "평형 포획"으로 항체는 그의 결합 친화도에 따라 선택될 수 있고, 그의 민감도는 친화도가 보다 낮은 매우 과량의 파지로부터 2배 더 높은 수준의 낮은 친화도를 갖는 돌연변이체 클론의 단리를 허용한다. 고체 상에 결합된 파지를 세정하는데 사용된 조건이 해리 동역학을 기초로 식별하도록 또한 조작될 수 있다.

[0203] 항원 클론은 활성 선택될 수 있다. 이러한 항원 항체에 상응하는 Fv 클론은 (1) 상기 기재된 파지 라이브러리로부터 항원 클론을 단리하고, 임의로 파지 클론의 단리된 집단을 적합한 박테리아 숙주에서 집단을 성장시킴으로써 증폭시키고; (2) 각각 차단 및 비-차단 활성이 요망되는 항원 및 제2 단백질을 선택하고; (3) 항원 결합 파지 클론을 고정된 항원에 흡착시키고; (4) 과량의 제2 단백질을 사용하여 제2 단백질의 결합 결정자와 중첩시키거나 공유하는 항원-결합 결정자를 인식하는 임의의 바람직하지 않은 클론을 용리시키고; (5) 단계 (4) 이후에 흡착되어 남아있는 클론을 용리시킴으로써 선택할 수 있다. 임의로, 본원에 기재된 선택 절차를 1회 이상 반복함으로써 바람직한 차단/비차단 특성을 갖는 클론을 추가로 풍부화시킬 수 있다.

[0204] 본 발명의 하이브리도마-유래된 모노클로날 항체 또는 파지 디스플레이 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 DNA 주형으로부터 관심 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석된다. 일단 단리되면, DNA를 발현 백터 내로 넣을 수 있고, 그 후 이를 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생성하지 않는 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 바람직한 모노클로날 항체의 합성물을 수득하였다. 박테리아에서 항체-코딩 DNA의 재조합 발현에 관한 검토 문헌은 문헌 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151 (1992)]을 포함한다.

[0205]

본 발명의 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 공지의 DNA 서열 (예를 들어, 적절한 DNA 서열은 [Kabat et al., 상기 문헌]으로부터 얻을 수 있음)과 조합되어, 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 클론을 형성할 수 있다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이같은 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있음이 이해될 것이다. 하나의 동물 (예컨대, 인간) 종의 가변 도메인 DNA로부터 유래된 후, 다른 동물 종의 불변 영역 DNA에 융합되어 "하이브리드" 전장 중쇄 및/또는 경쇄를 위한 코딩 서열(들)을 형성하는 Fv 클론은 본원에 기재된 "키메라" 및 "하이브리드" 항체의 정의에 포함된다. 바람직한 실시양태에서, 인간 가변 DNA로부터 유래된 Fv 클론이 인간 불변 영역 DNA에 융합되어 모두 인간형인 전장 또는 부분적 길이의 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)이 형성된다.

[0206]

본 발명의 하이브리도마로부터 유래된 항체를 코딩하는 DNA는 또한 예를 들어 하이브리도마 클론에서 유래된 상동성 뮤린 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열로 치환함으로써 (예를 들어, 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]의 방법에서와 같이) 변형될 수도 있다. 비이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유결합에 의해 결합시킴으로써 하이브리도마 또는 Fv 클론-유래 항체 또는 단편을 코딩하는 DNA를 추가로 변형시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명의 Fv 클론 또는 하이브리도마 클론-유래된 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.

[0207]

항원 특이성

[0208]

본 발명은 임의의 적절한 항원 결합 특이성의 항체에 적용가능하다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 생물학적으로 중요한 폴리펩티드인 항원에 특이적이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 항체는 포유동물에서 질환 또는 장애의 치료 또는 진단에 유용하다. 치료 항체의 비-제한적 예는 항-VEGF, 항-c-met, 항-IgE, 항-CD11, 항-CD18, 항-CD40, 항-조직 인자 (TF), 항-HER2, 및 항-TrkC 항체를 포함한다. 비-폴리펩티드 항원 (예컨대, 종양-관련 당지질 항원)에 대해 지시된 항체가 또한 고려된다.

[0209]

항원이 폴리펩티드인 경우, 이는 막횡단 분자 (예를 들어, 수용체, 예컨대 수용체 티로신 키나제) 또는 리간드, 예컨대 성장 인자일 수 있다. 예시적 항원은 분자, 예컨대 레닌, 성장 호르몬 (인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬 포함; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; α-1-안티트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 항체 형성 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 (TF), 및 폰 빌레브란트 인자; 항응고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방성 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예컨대 우로키나제 또는 인간 소변 또는 조직 유형 폴라스미노겐 활성화제 (t-PA); 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 피사 인자-알파 및 -베타; RANTES (정상적으로 T-세포 발현 및 분비 활성화에 대한 조절); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 월러-억제 물질; 렐락신 A-쇄; 렐락신 B-쇄; 프로렐락신; 마우스 고나도트로핀 관련 펩티드; 미생물 단백질, 예를 들어 베타-락타마제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 관련 항원 (CTLA), 예컨대 CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대 뇌 유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예컨대 NGF-β; 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타 (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, 또는 TGF-β5 포함); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 및 CD40; 에리트로포이에틴; 골유도 인자; 면역독소; 골 형태발생 단백질 (BMP); 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨 (IL), 예를 들어 IL-1 내지 IL-10; 수퍼옥시드 디스뮤타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예컨대 예를 들어 AIDS 외피의 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예컨대 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양 관련 항원, 예컨대 HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 및 상기 열거된 임의의 폴리펩티드의 단편을 포함한다.

[0210]

본 발명에 포함되는 항체에 대한 예시적 항원은 CD 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, 및 CD46; ErbB 수용체 부류, 예컨대 EGF 수용체, HER2, HER3 또는 HER4 수용체의 구성원; 세포 부착 분자, 예컨대 LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, α4/β7 인테그린, 및 αv/β3 인테그린 (그의 α 또는 β 서브유닛 포함) (예를 들어, 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); 성장 인자, 예컨대 VEGF; 조직 인자 (TF); TGF-β 알파 인터페론 (α-IFN); 인터류킨, 예컨대 IL-8; IgE; 혈액형 항원 Apo2, 사멸 수용체; flk2/flt3 수

용체; 비만 (OB) 수용체; mp1 수용체; CTLA-4; 단백질 C 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 c-met에 결합한다 (일부 실시양태에서, 특이적으로 결합함).

[0211] 항체 단편

본 발명은 항체 단편을 포함한다. 특정 상황에서는, 전체 항체가 아닌 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 단편의 크기가 작을수록 제거가 신속하고, 고형 종양에 대한 접근을 개선시킬 수 있다.

[0213] 항체 단편 생성을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이를 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들이 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두가 이. 콜라이에서 발현되어 분비될 수 있고, 이에 의해 다량의 이를 단편을 용이하게 생성할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 과자 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따라, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 샐비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편이 미국 특허 번호 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생성을 위한 또 다른 기술들이 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다 (예를 들어, WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 미국 특허 번호 5,587,458 참조). Fv 및 sFv는 불변 영역이 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이어서, 생체내 사용 동안 비특이적 결합을 감소시키는데 적합하다. sFv의 아미노 또는 카르복시 말단에서 이펙터 단백질의 융합체가 생성되도록 sFv 융합 단백질을 구축할 수 있다. [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 문헌]을 참조한다. 또한, 항체 단편은 예를 들어 미국 특허 번호 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0214] 따라서, 일부 실시양태에서, 항-c-met 항체는 Fc 영역을 포함하는 1-아암 항체이며 (즉, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인이 단일 항원 결합 아암을 형성함), 여기서 Fc 영역은 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 복합체 내에 존재하여 상기 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자와 비교하여 상기 항체 단편의 안정성을 증가시키는 Fc 영역을 형성한다. 1-아암 항체는 본원에서 추가로 기재된다.

[0215] 인간화 항체

[0216] 본 발명은 인간화 항체를 포함한다. 비인간 항체를 인간화하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체에는 비인간 공급원으로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있을 수 있다. 이를 비인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "유입" 가변 도메인의 것이다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열을 초가변 영역 서열로 치환하여 본질적으로 원터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [Jones et al. (1986) Nature 321:522-525]; [Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327]; [Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536])을 따라 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0217] 인간화 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 들 다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적-맞춤" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크로서 받아들여진다 (문헌 [Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296]; [Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 여러 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (문헌 [Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285]; [Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623]).

[0218] 추가로, 항체가 항원에 대해 높은 친화도를 보유하고 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위해서, 한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원

형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 바람직한 항체 특징, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 항원 결합에 대한 영향에는 초가변 영역 잔기가 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

[0219] 인간 항체

본 발명의 인간 항체는 인간-유래된 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 상기 언급된 바와 같은 공지된 인간 불변 도메인 서열(들)과 합함으로써 구축할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법에 의해 만들 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 제조를 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 예를 들어 문헌 [Kozbor J., Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]; 및 [Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991)]에 기재되어 있다.

[0221] 면역화시에 내인성 이뮤노글로불린의 생성 없이 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물(예를 들어, 마우스)을 생성하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생성이 완전히 억제된다는 것이 기재되어 있다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이같은 배선 돌연변이체 마우스에게 전달하면, 항원 접종 시 인간 항체가 생성될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993)]; [Brugermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)])을 참조한다.

[0222] 또한, 유전자 셔플링을 사용하여 비인간, 예를 들어 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도할 수 있고, 여기서 인간 항체는 출발 비인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅"으로도 불리는 상기 방법에 따라, 상기한 바와 같은 파지 디스플레이 기술에 의해 얻은 비인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역이 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어 비인간 쇄/인간 쇄 scFv 또는 Fab 키메라의 집단을 생성시킨다. 항원에 의한 선택 결과로서, 인간 쇄가 1차 파지 디스플레이 클론에서 상응하는 비인간 쇄의 제거 시에 파괴된 항원 결합 부위를 복원한 비인간 쇄/인간 쇄 키메라 scFv 또는 Fab가 단리되고, 즉, 에피토프가 인간 쇄 파트너의 선택을 좌우 (임프린팅)한다. 나머지 비인간 쇄를 대체하기 위해 상기 과정을 반복하는 경우에 인간 항체가 수득하였다 (1993년 4월 1일에 공개된 PCT WO 93/06213 참조). CDR 이식에 의한 비인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 이러한 기술은 비인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기가 없는 완전 인간 항체를 제공한다.

[0223] 이중특이적 항체

[0224] 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체인 모노클로날 항체이다. 본 경우에, 결합 특이성을 중 하나는 항원에 대한 것이고, 나머지는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 예시적인 이중특이적 항체는 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 항원을 발현하는 세포에 세포독성제를 위치시키는데 사용될 수 있다. 이들 항체는 항원-결합 아암, 및 세포 독성제 (예를 들어, 사포린, 항-인터페론-α, 빙카 알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토트렉세이트 또는 방사능 동위원소 핫텐)에 결합하는 아암을 보유한다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, $F(ab')_2$ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

[0225] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 생성은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동 발현을 기초로 하고, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (쿼드로마)는 10종의 상이한 항체 분자들의 잠재적인 혼합물을 생성하며, 이 중에서 오직 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 통상적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 상기 정확한 분자의 정체는 다소 성가시고 생성 수율이 낮다. 유사한 절차가 1993년 5월 13일에 공개된 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655 (1991)]에 개시되어 있다.

[0226] 상이하고 더욱 바람직한 접근법에 따라, 바람직한 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)를 갖는 항체 가변 도메인을 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 바람직하게는, 융합은 헌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인에 의한다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합물 중 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 바람직

한 경우에는 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쇄의 동일하지 않은 비율이 최적의 수율을 제공하는 실시양태에서 상기 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 2종의 폴리펩티드 쇄의 발현으로 높은 수율이 수득되는 경우, 또는 비율이 특별한 유의성을 갖지 않는 경우, 2종 또는 모든 3종의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0227] 이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터 바람직한 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 추가의 세부사항에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0228] 또 다른 접근법에 따라, 한 쌍의 항체 분자 사이의 인터페이스를 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 인터페이스는 항체 불변 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 인터페이스로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다 (눕 또는 돌출부). 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "함몰부(홀)"이 제2 항체 분자의 인터페이스 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치않는 최종-생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다. 놓 및 홀은 본원에서 추가로 기재된다.

[0229] 이중특이적 항체에는 가교된 또는 "이종접합체" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체들은, 예를 들어 원치않는 세포에 대한 면역계 세포의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/00373, 및 EP 03089)를 위해서 제안되었다. 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 이종접합체 항체가 제조될 수 있다. 적합한 가교제가 당업계에 주지되어 있고, 수많은 가교 기술과 함께 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0230] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]은 무순상 항체를 단백질 가수분해적으로 절단하여 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이러한 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재 하에 환원시켜, 인접한 디티올들을 안정화시키고 분자간 디술피드 형성을 방지한다. 그 후 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후 Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생성된 이중특이적 항체를 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

[0231] 최근의 진보는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]은 완전 인간화 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 생성을 기재한다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내 유도 화학 커플링을 실시하였다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상적인 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0232] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기술되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생성되었다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 헌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후, 다시 산화되어 항체 이중이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생성에 또한 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 대안적인 메카니즘을 제공하였다. 상기 단편은 동일 쇄 상의 2개의 도메인

사이의 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 VL 및 VH 도메인과 쌍을 이루게 되어, 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0233] 2가 초파의 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)].

[0234] 다가 항체

[0235] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 신속하게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 발명의 항체는 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 (예를 들어, 4가 항체) 다가 항체 (IgM 클래스 이외의 것)일 수 있고, 이는 항체의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 용이하게 생성될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 이러한 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역에 대해 아미노 말단인 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본원에서의 바람직한 다가 항체는 3개 내지 약 8개, 그러나 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 다가 항체는 적어도 1개의 폴리펩티드 쇄 (바람직하게는 2개의 폴리펩티드 쇄)를 포함하고, 여기서의 상기 폴리펩티드 쇄(들)은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어 폴리펩티드 쇄(들)은 VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc (여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, Fc는 Fc 영역의 1개의 폴리펩티드 쇄이고, X1 및 X2는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1임)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 쇄(들)은 VH-CH1-가요성 링커-VH-CH1-Fc 영역 쇄; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 영역 쇄를 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 바람직하게는 적어도 2개 (바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 더 포함한다. 본원에서의 다가 항체는 예를 들어 약 2개 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 더 포함한다.

[0236] 항체 변이체

[0237] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 핵산 내에 도입함으로써, 또는 웨프티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 바람직한 특성을 갖는다는 조건하에 결실, 삽입 및 치환의 임의 조합이 이루어져 최종 구축물에 도달된다. 아미노산 변경은 서열이 제조되는 시점에 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0238] 돌연변이유발을 위해 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하기 위한 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환되어 아미노산과 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치가 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 수행하고, 발현된 이뮤노글로불린을 바람직한 활성에 대해 스크리닝한다.

[0239] 아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 또는 그 초파의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 웨피오닐 잔기가 있는 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체가 포함된다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 (예를 들어, ADEPT) 또는 폴리펩티드에 대한 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합체를 포함한다.

[0240] 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 나타낸다. 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌

(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)이 아스파라긴 측쇄로 탄수화물 모이어티를 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 등의 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 나타내지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신 또한 사용될 수 있다.

[0241] 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 항체가 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 또한 변경은 원래의 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 달성될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0242] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 항체가 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.)에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 (교와 하코 고교 캄파니, 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))도 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물 내의 양분화 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체가 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.) 및 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.)에 언급되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체가 WO 1997/30087 (Patel et al.)에 보고되어 있다. 또한, 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물이 변경된 항체에 관한 WO 1998/58964 (Raju, S.) 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)를 참조한다. 글리코실화가 변형된 항원-결합 분자에 대한 US 2005/0123546 (Umana et al.)을 또한 참조한다.

[0243] 본원에서의 바람직한 글리코실화 변이체는 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에 푸코스가 없는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 변이체는 ADCC 기능이 개선된다. 임의로, Fc 영역은 ADCC를 더욱 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링)에서의 치환을 더 포함한다. "탈 푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 문헌의 예는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]을 포함한다. 탈푸코실화 항체를 생성하는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al.), 특히 실시예 11), 및 네아웃 (knockout) 세포주, 예를 들어 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 네아웃 CHO 세포 (문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]을 포함한다.

[0244] 한 측면에서, 본 발명은 항체 단편 내의 Fc 서열의 동종이량체화를 최소화하면서 이종이량체화를 촉진하는 적어도 하나의 특징을 포함하는 항체 단편을 제공한다. 이러한 특징(들)은 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 이유글로불린 접단의 수율 및/또는 순도 및/또는 균질성을 개선시킨다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드 및 제2 Fc 폴리펩티드는 인터페이스에서 만나고/상호작용한다. 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 인터페이스에서 만나는 일부 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드 (서열)의 인터페이스는 제1 Fc 폴리펩티드 (서열)의 인터페이스에서 함몰부 (또한, "홀"로 지칭됨)에 배치될 수 있는 돌출부 (또한 "놉"으로 지칭됨)를 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드가 함몰부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 제2 Fc 폴리펩티드가 돌출부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 둘 다이다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드가 함몰부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되고, 제2 Fc 폴리펩티드가 돌출부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경된다. 한 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스는 제1 Fc 폴리펩티드의 인터페이스에서 함몰부에 배치될 수 있는 돌출부를 포함하고, 여기서 함몰부 또는 돌출부 또는 둘 다는 각각 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스로 도입된다. 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 인터페이스에서 만나는 일부 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드 (서열)의 인터페이스는 제2 Fc 폴리펩티드 (서열)의 인터페이스에서 함몰부에 배치될 수 있는 돌출부를 포함한다. 한 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드가 함몰부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 제1 Fc 폴리펩티드가 돌출부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 둘 다이다. 한 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드가 함몰부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되고, 제1 Fc 폴리펩티드가 돌출부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경된다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드의 인터페이스는 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스에서 함몰부에 배치될 수 있는 돌출부를 포함하고, 여기서 돌출부 또는 함몰부 또는 둘 다는 각각 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스에서 만나고/상호작용한다.

리펩티드의 인터페이스로 도입된다.

[0245]

한 실시양태에서, 돌출부 및 함몰부는 각각 자연 발생 아미노산 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 주형/본래 폴리펩티드의 인터페이스로부터의 본래 잔기를 본래 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 유입 잔기로 대체하여 생성된다. 한 실시양태에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드의 인터페이스로부터의 본래 잔기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본래보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 유입 잔기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 대체되는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된다. 한 실시양태에서, 본래 잔기는 트레오닌이다. 한 실시양태에서, 본래 잔기는 T366이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 아르기닌 (R)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 페닐알라닌 (F)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 티로신 (Y)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 트립토판 (W)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 R, F, Y 또는 W이다. 한 실시양태에서, 돌출부는 주형/본래 폴리펩티드에서 2개 이상의 잔기를 대체하여 생성된다. 한 실시양태에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 366에서 트레오닌의 트립토판으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 문헌 [Kabat et al. (pp. 688-696 in Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Vol. 1 (1991; NIH, Bethesda, MD)]의 EU 넘버링 방식에 따름).

[0246]

일부 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 주형/본래 폴리펩티드의 인터페이스의 본래 잔기를 본래 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 유입 잔기로 대체하여 생성된다. 예를 들어, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드의 인터페이스로부터의 본래 잔기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본래보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 유입 잔기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 대체되는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다. 한 실시양태에서, 본래 잔기는 트레오닌이다. 한 실시양태에서, 본래 잔기를 류신이다. 한 실시양태에서, 본래 잔기를 티로신이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 시스테인 (C)이 아니다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 알라닌 (A)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 세린 (S)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 트레오닌 (T)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 발린 (V)이다. 함몰부는 주형/본래 폴리펩티드의 하나 이상의 본래 잔기를 대체하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 트레오닌, 류신 및 티로신으로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 본래 아미노산의 대체를 포함한다. 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 알라닌, 세린, 트레오닌 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 유입 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 트레오닌, 류신 및 티로신으로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 본래 아미노산의 대체를 포함하고, 여기서 상기 본래 아미노산은 알라닌, 세린, 트레오닌 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 유입 잔기로 대체된다. 일부 실시양태에서, 대체된 본래 아미노산은 T366, L368 및/또는 Y407이다. 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 366에서 트레오닌의 세린으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 [Kabat et al. 상기 문헌]의 EU 넘버링 방식에 따름). 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 368에서 류신의 알라닌으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 [Kabat et al. 상기 문헌]의 EU 넘버링 방식에 따름). 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 407에서 티로신의 발린으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 [Kabat et al. 상기 문헌]의 EU 넘버링 방식에 따름). 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 T366S, L368A 및 Y407V로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 아미노산 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 [Kabat et al. 상기 문헌]의 EU 넘버링 방식에 따름). 이들 항체 단편의 일부 실시양태에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 366에서 트레오닌의 트립토판으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 [Kabat et al. 상기 문헌]의 EU 넘버링 방식에 따름).

[0247]

한 실시양태에서, 항체는 WO2005/063816에 기재된 바와 같은 "놉" 및 "홀"을 구성하는 Fc 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 홀 돌연변이는 Fc 폴리펩티드의 T366A, L368A 및/또는 Y407V 중 하나 이상일 수 있고, 놈 돌연변이는 T366W일 수 있다.

[0248]

또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체에서는 항체 분자 내의 적어도 하나 (적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 그 초과)의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된다. 치환 돌연변이 유발에 가장 흥미로운 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변경 또한 고려된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제하에 표 A에 나타낸다. 이러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 야기하면, 표 A에 "예시적인 치환"으로 명명되거나 아미노산 클래스를 언급하며 아래에 추가로 기재된 보다 실질적인 변화를 도입하고 생성물을 스크리닝할 수 있다.

[0249]

[표 A]

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

[0250]

[0251]

항체의 생물학적 특성에 있어서의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형상으로서, 치환 영역 내의 폴리펩티드 백본의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 기초로 하기 군으로 분류될 수 있다:

[0252]

(1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0253]

(2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0254]

(3) 산성: asp, glu;

[0255]

(4) 염기성: his, lys, arg;

[0256]

(5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0257]

(6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0258]

비-보존적 치환은 이를 클래스 중의 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0259]

치환 변이체의 한 유형에는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기가 치환되는 것이 수반하였다. 일반적으로, 추가의 개발용으로 선택된 생성된 변이체(들)은 이들이 생성되는 모 항체에 비해 생물학적 특성이 개선될 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화도 성숙이다. 간략하게, 몇몇 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6-7개의 부위)가 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성하도록 돌연변이된다. 이렇게 생성된 항체 변이체가 필라멘트형 파지 입자로부터 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합물로서 디스플레이된다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 그의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌-스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체 및 항원 사이의 접촉 지점을 확인하기 위해서는 항원 항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이같은 접촉 잔기와 이웃 잔기는 본원에서 상술된 기술에 따른 치환에 대한 후보이다. 일단 이같은 변이체가 생성되면, 변이체들의

패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 검정에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가의 개발을 위해 선택할 수 있다.

[0260] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 (자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0261] 본 발명의 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입하여 Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다. Fc 영역 변이체는 헌지 시스테인의 위치를 포함하여 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0262] 본원 명세서 및 당업계의 교시 내용에 따라, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 야생형 대응물 항체에 비해, 예를 들어 Fc 영역에 하나 이상의 변경을 포함할 수 있음이 고려된다. 그럼에도 불구하고 이러한 항체는 그의 야생형 대응물과 비교하여 치료학적 유용성에 요구되는 실질적으로 동일한 특성을 유지할 것이다. 예를 들어, WO99/51642에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 초래할 특정 변경이 Fc 영역에서 이루어질 수 있는 것으로 생각된다. Fc 영역 변이체의 다른 예에 관한 문헌 [문헌 [Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO94/29351을 또한 참조한다. WO00/42072 (Presta) 및 WO 2004/056312 (Lowman)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 이러한 특허 공개공보의 내용은 본원에 참고로 명백하게 포함된다. 또한, 예를 들어 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]을 참조한다. 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 결합이 개선되고 반감기가 증가된 항체가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이를 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. Fc 영역 아미노산 서열이 변경되고 C1q 결합 능력이 증가 또는 감소된 폴리펩티드 변이체가 미국 특허 번호 6,194,551B1, WO99/51642에 기재되어 있다. 이러한 특허 공개공보의 내용은 본원에 참고로 명백하게 포함된다. 또한, 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 참조한다.

항체 유도체

[0263] 본 발명의 항체는 당업계에 공지되고 용이하게 입수 가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인해 제조에 유리할 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 1개를 초과하는 중합체가 부착될 경우, 중합체들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않은 고려사항을 기초로 결정될 수 있다.

바람직한 특성을 갖는 항체에 대한 스크리닝

[0265] 본 발명의 항체는 당업계에 알려져 있는 다양한 검정에 의해 그의 물리적/화학적 특성 및 생물학적 기능에 대해 특성화될 수 있다 (그의 일부가 본원에 개시되어 있음). 예를 들어, 항체를 N-말단 서열분석, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파파인 소화가 포함되지만 이에 제한되지는 않은 일련의 검정에 의해 추가로 특성화할 수 있다.

[0266] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본원에서 생성된 항체가 그의 생물학적 활성에 대해 분석된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체가 그의 항원 결합 활성에 대해 시험된다. 당업계에 공지되고 본원에 사용될 수 있는 항원 결합 검정에는 웨스턴 블롯, 방사성면역검정, ELISA (효소 결합 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침

전 검정, 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정과 같은 기술을 사용하는 임의의 직접적 또는 경쟁적 결합 검정이 비제한적으로 포함된다. 예시적인 검정은 이하의 실시예 섹션에서 제공된다.

[0268] 벡터, 숙주 세포, 및 재조합 방법

이종 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)의 재조합 생성을 위해서는, 이를 코딩하는 핵산을 단리시키고, 추가의 클로닝 (DNA 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터에 삽입한다. 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용)하여 용이하게 단리 및 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 따른다. 일반적으로, 바람직한 숙주 세포는 원핵생물 기원의 것이다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이같은 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있음이 이해될 것이다.

[0270] a. 원핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0271] i. 벡터 구축

본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 바람직한 폴리뉴클레오티드 서열은 항체 생성 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 단리되어 서열 결정될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 얻은 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵 숙주에서 이종 폴리뉴클레오티드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적에 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따른 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이종 폴리뉴클레오티드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 다) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 포함한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이종 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0273] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 상기 숙주와 함께 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 및 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 마킹 서열을 포함한다. 예를 들어, i. 콜라이는 전형적으로 i. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 암피실린 (Amp) 및 테트라시클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지 또한 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 상기 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et al.)에 상세하게 기재되어 있다.

[0274] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파지 벡터를 상기 숙주에 대한 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예컨대 λ GEM.TM.-11이 i. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포의 형질전환에 사용될 수 있는 재조합 벡터의 제조에 이용될 수 있다.

[0275] 본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 그의 발현을 조정하는 시스트론에 대해 상류 (5')에 위치하는 비번역 조절 서열이다. 원핵 세포 프로모터는 전형적으로 두 클래스의 프로모터, 즉 유도성 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 반응하여 그의 제어하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.

[0276] 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 수많은 프로모터가 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이종 프로모터를 둘 다 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.

[0277] 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, β -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 또는 trc 프로모터를 포함한다. 그러나, 박테리아에서 기능적인 다른 프로모터 (예컨대, 다른 공지의 박테리아 또는 파지 프로모터)도 적합하다. 그의 뉴클레오

티드 서열은 공개되어 있고, 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하도록 링커 또는 어댑터를 사용하여 이를 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이션할 수 있다 (문헌 [Siebenlist et al., (1980) Cell 20: 269].

[0278] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택되는 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 웨პ티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이종 폴리펩티드에 대해 본래의 신호 서열을 인식하고 프로세싱하지 못하는 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은 예를 들어 본 발명의 신호 폴리펩티드로부터 선택된 원핵 신호 서열로 치환된다. 또한 벡터는 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Lpp 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA, 및 MBP로 이루어진 군으로부터 선택된 신호 서열을 포함할 수 있다.

[0279] 본 발명의 한 측면에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 발현 벡터)는 집합적으로 1-아암 항체를 코딩한다. 한 실시양태에서, 단일 폴리뉴클레오티드는 (a) 1-아암 항체의 경쇄 및 중쇄 성분, 및 (b) Fc 폴리펩티드를 코딩한다. 한 실시양태에서, 단일 폴리뉴클레오티드는 1-아암 항체의 경쇄 및 중쇄 성분을 코딩하고, 개별적인 폴리뉴클레오티드는 Fc 폴리펩티드를 코딩한다. 한 실시양태에서, 개별적인 폴리뉴클레오티드는 각각 1-아암 항체의 경쇄 성분, 1-아암 항체의 중쇄 성분 및 Fc 폴리펩티드를 코딩한다. 1-아암 항체의 생성은 예를 들어 WO2005063816에 기재되어 있다.

[0280] 본 발명의 항체의 발현에 적합한 원핵 숙주 세포에는 원시세균 및 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체가 포함된다. 유용한 박테리아의 예에는 에스케리키아(Escherichia) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실러스 (예를 들어, 비. 서브틸리스), 엔테로박테리아, 슈도모나스(Pseudomonas) 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 시겔라(Shigella), 리조비아(Rhizobia), 비트레오실라(Vitreoscilla) 또는 파라코쿠스(Paracoccus)가 포함된다. 한 실시양태에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예는 유전자형 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kanR을 갖는 균주 33D3 (미국 특허 번호 5,639,635) 및 균주 63C1 및 64B4를 포함하는, 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체를 포함한다. 다른 균주 및 그의 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 λ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다. 지정된 유전자형을 갖는 임의의 상기 언급된 박테리아의 유도체를 구축하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내의 레플리콘의 복제능을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410과 같은 주지된 플라스미드를 사용하여 레플리콘을 공급하는 경우에는, 이. 콜라이, 세라티아, 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제는 바람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.

i. 항체 생성

[0281] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 바람직한 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 필요에 따라 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.

[0282] 형질전환은 DNA가 염색체외 요소로서 또는 염색체 통합체에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 사용되는 또 다른 기술은 전기천공이다.

[0283] 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는데 사용되는 원핵 세포를 당업계에 공지되고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예에는 필수 영양 보충물이 부가된 르리아 브로쓰(Luria broth; LB)가 포함된다. 일부 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구조를 기초로 하여 선택된 선택 작용제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.

- [0285] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로, 또는 복합 질소 공급원과 같은 또 다른 보충물 또는 배지와의 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트리톨 및 디티오프레이톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 환원제를 함유할 수 있다.
- [0286] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 이. 콜라이 성장을 위해, 바람직한 온도는 예를 들어 약 20°C 내지 약 39°C, 보다 바람직하게는 약 25°C 내지 약 37°C, 보다 더 바람직하게는 약 30°C이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이의 경우, pH는 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4, 보다 바람직하게는 약 7.0이다.
- [0287] 유도성 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사의 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도를 위한 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 바람직하게는, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조)이거나 WO2002/061090에 기재된 배지이다. 당업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 다른 유도제가 사용될 수 있다.
- [0288] 한 실시양태에서, 본 발명의 발현된 폴리펩티드는 숙주 세포의 원형질막 공간 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 전형적으로, 단백질 회수는 일반적으로 삼투성 충격, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물을 분쇄하는 것을 포함한다. 세포가 분쇄되면, 세포 잔해물 또는 전체 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질은 예를 들어 친화도 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 대안적으로, 단백질을 배양 배지 내로 읊기고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상청액을 여과하고 농축하여 생성된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 추가로 단리하고, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.
- [0289] 본 발명의 한 측면에서, 항체 생성은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 발효 절차가 재조합 단백질의 생성에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 이를 발효조는 산소 및 영양소, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키는 교반기 추진기를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 용적이 대략 100 리터 이하인 발효조 내에서의 발효를 나타내는데, 이는 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.
- [0290] 발효 공정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건 하에서 바람직한 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD550으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 정지상이다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 유도제를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.
- [0291] 본 발명의 폴리펩티드의 생성 수율 및 품질을 향상시키기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적절한 어셈블리 및 폴딩을 개선시키기 위해, Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 활성을 갖는 웨스턴 블롯 시스, 트랜스-이소머라제)와 같은 샤페론 단백질을 과다발현하는 추가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵세포를 공동-형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생성된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다. 문헌 [Chen et al., (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605]; 미국 특허 번호 6,083,715 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 6,027,888 (Georgiou et al.); 문헌 [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al., (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210]. 일부 실시양태에서, DsbA 및 C는 박테리아 숙주 세포에서 발현된다.
- [0292] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질분해에 감수성인 단백질)의 단백질분해를 최소화하기 위해, 단백질분해 효소가 결핍된 특정 숙주 군주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 군주는 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 이들의 조합물과 같은 공지된 박테리아 프로테아제를 코딩하는 유전자에서 유전자 돌연변이(들)을 달성하도록 변형될 수 있다. 몇몇 이. 콜라이 프로테아제-결핍 군주가 이용가능하며, 예를 들어, [Joly et al., (1998), 상기 문헌]; 미국 특허 번호 5,264,365 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 5,508,192 (Georgiou et al.); 문헌 [Hara et al., Microbial

Drug Resistance, 2:63-72 (1996)]에 기재되어 있다.

[0293] 한 실시양태에서, 단백질 분해 효소가 결핍되고 하나 이상의 샤페론 단백질을 과다발현하는 플라스미드로 형질 전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로 사용된다.

[0294] iii. 항체 정제

[0295] 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 면역친화도 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어 세파덱스(Sephadex) G-75를 이용한 겔 여과.

[0296] 한 측면에서, 고체 상에 고정된 단백질 A는 본 발명의 항체 생성물의 면역친화도 정제에 사용된다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역에 고친화도로 결합하는 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 유래의 41 kD 세포 벽 단백질이다. 문헌 [Lindmark et al., (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]. 단백질 A가 고정되는 고체 상은 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 보다 바람직하게는 제어된 공극 유리 칼럼 또는 규산 칼럼일 수 있다. 일부 용도에서, 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅하여 가능하게는 오염물의 비특이적 부착을 방지한다.

[0297] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양액으로부터 유래된 체제를 단백질 A 고정된 고체 상에 적용하여 관심 항체가 단백질 A에 특이적으로 결합하게 할 수 있다. 그 후, 고체 상을 세척하여 고체상에 비-특이적으로 결합된 오염물을 제거하였다. 최종적으로, 관심 항체를 용리에 의해 고체상으로부터 회수한다.

[0298] 면역접합체

[0299] 또한, 본 발명은 세포독성제, 예컨대 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 본원에 기재된 항체 중 어느 하나를 포함하는 면역접합체 (교환가능하게 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"로 언급됨)를 제공한다.

[0300] 세포독성제 또는 세포증식억제제의 국소 전달을 위한 항체-약물 접합체, 즉 암의 치료에서 종양 세포를 사멸 또는 억제시키기 위한 약물 (문헌 [Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172]; 미국 특히 번호 4,975,278)의 사용은 종양에의 약물 잔기의 표적화된 전달, 및 그 안의 세포내 축적을 가능하도록 하며, 여기서 이러한 비접합된 약물 작용제의 전신 투여는 정상 세포 뿐만 아니라 제거하고자 하는 종양 세포에 대한 허용되지 않는 수준의 독성을 유발할 수 있다 (문헌 [Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05]; [Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506]). 이에 의해 최소 독성과 함께 최대 효능이 추구된다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체 둘 다가 이러한 전략에 유용하다고 보고되었다 (문헌 [Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87]). 상기 방법에 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (문헌 [Rowland et al., (1986) 상기 문헌]). 항체-독소 접합체에 사용된 독소는 박테리아 독소, 예컨대 디프테리아 독소, 식물 독소 예컨대, 리신, 소형 분자 독소, 예컨대 젤다나미신 (문헌 [Mandler et al. (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581]; [Mandler et al., (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028]; [Mandler et al., (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; 문헌 [Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]), 및 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al., (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al., (1993) Cancer Res. 53:3336-3342])을 포함한다. 독소는 튜불린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소페라제 억제를 포함하는 메카니즘에 의해 그의 세포독성 및 세포증식억제 효과를 나타낼 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합되는 경우에 불활성이 되거나 활성이 감소되는 경향이 있다.

[0301] 제발린(ZEVALIN)® (이브리투모맙 티옥세탄, 비오겐/이덱(Biogen/Idec))은 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견되는 CD20 항원에 대해 지시된 뮤린 IgG1 카파 모노클로날 항체 및 티오우레이 링커-킬레이터에 의해 결합된 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성동위원소로 구성된 항체-방사성동위원소 접합체이다 (문헌 [Wiseman et al., (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77]; [Wiseman et al., (2002) Blood 99(12):4336-42]; [Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63]; [Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69]). 제발

린은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 대해 활성을 갖지만, 투여는 대부분의 환자에서 중증 및 장기 혈구감소 증을 일으킨다. 밀로타르그(MYLOTARG)TM (俭투주맙 오조가미신, 와이어쓰 파마슈티칼스(Wyeth Pharmaceuticals)) (칼리케아미신에 연결된 hu CD33 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)는 2000년에 주사에 의한 급성 골수성 백혈병의 치료를 위해 승인되었다 (문헌 [Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특허 번호 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,6937,62; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). 칸투주맙 메르탄신 (이뮤노겐, 인크.(Immunogen, Inc.)) (디슬피드 링커 SPP를 통해 메이탄시노이드 약물 모이어티, DM1에 연결된 huC242 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)은 CanAg를 발현하는 암, 예컨대 결장암, 췌장암, 위암 등의 치료를 위해 제II상 임상 시험이 진행되고 있다. MLN-2704 (밀레니엄 팜(Millennium Pharm.), 비지엘 바이올로직스(BZL Biologics), 이뮤노겐 인크.) (메이탄시노이드 약물 모이어티, DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)는 전립선 종양의 잠재적인 치료를 위해 개발되고 있다. 아우리스타틴 펩티드, 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체)은 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종에서의 루이스 Y에 특이적임) 및 cAC10 (혈액 암성종양에서의 CD30에 특이적임)에 접합되었으며 (문헌 [Doronina et al., (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784]), 치료학적 개발 하에 있다.

[0302] 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 본원에서 기재된다 (예를 들어, 상기와 같음). 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디아 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*sapaonaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 폐노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일에 공개된 WO 93/21232를 참조한다. 방사성접합된 항체의 생성을 위한 다양한 방사성뉴클레오티드가 이용가능하다. 이것의 예는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2관능성 단백질-커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티울란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성뉴클레오티드의 접합을 위한 예시적인 퀼레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다.

[0303] 항체 및 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우로스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 이를 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에서 고려된다.

[0304] i. 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0305] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 본 발명의 항체 (전장 또는 단편)를 포함한다.

[0306] 메이탄시노이드는 투불린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타(*Maytenus serrata*)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 번호 3,896,111). 이후, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생성하는 것으로 발견되었다 (미국 특허 번호 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0307] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의한 제조에 비교적 이용가능하고, (ii) 비-디슬피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체 약물 접합체에서 매력적인 약물 모이어티이다.

- [0308] 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 그의 제조 방법, 및 이들의 치료 용도는 예를 들어 그 개시내용이 명백하게 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 번호 5,208,020; 5,416,064; 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다. 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 작용하는 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 상기 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타냈다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에서는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤린 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1에 디슬피드 링커를 통해 접합된 면역접합체를 설명하고 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당 3×10^5 개 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관내에서 시험하였다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물에 유사한 수준의 세포독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시켜 증가시킬 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타냈다.
- [0309] 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,208,020를 참조한다 (그 개시 내용은 본원에 명백하게 참고로 포함됨). 항체 분자당 평균 3 내지 4개로 접합된 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증진시키는 효능을 나타냈지만, 1개의 독소/항체 분자일지라도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 향상시킬 것이라 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 공지되어 있으며, 공지의 기술에 의해 합성될 수도 있고 천연 공급원으로부터 단리될 수도 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.
- [0310] 예를 들어 개시내용이 본원에 참고로 명백하게 포함되는 미국 특허 번호 5,208,020 또는 EP 특허 0 425 235 B1, 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)], 및 2004년 10월 8일에 출원된 미국 특허 출원 번호 10/960,602에 개시된 것을 비롯하여, 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 위한 다수의 연결 기가 당업계에 공지되어 있다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 2004년 10월 8일에 출원된 미국 특허 출원 번호 10/960,602에 개시된 바와 같이 제조될 수 있다. 연결 기는 상기 언급된 특허에 개시된 바와 같이 디슬피드 기, 티오에테르 기, 산 불안정성 기, 광분해성 기, 웹티다제 불안정성 기 또는 에스테라제 불안정성 기를 포함하고, 디슬피드 및 티오에테르 기가 바람직하다. 추가의 연결 기는 본원에 기재되고 예시되어 있다.
- [0311] 항체 및 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디파미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 디슬피드 연결을 제공하기 위해 특히 바람직한 커플링제는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)]), 및 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.
- [0312] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결부는 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실 기와의 반응으로 형성될 수 있다. 반응은 히드록실 기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실 기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.
- [0313] ii. 아우리스타틴 및 돌라스타틴
- [0314] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 웨티드 유사체 및 유도체, 아우리스타틴에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588). 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584]), 항암 (미국 특허 번호 5,663,149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 아우리스타

탄 약물 모이어티는 펩티드성 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0315] 예시적인 아우리스타틴 실시양태는, 그의 전체 개시내용이 참고로 명백하게 포함되는 2004년 11월 5일에 출원된 미국 특허 번호 10/983,340 (영문 명칭 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")에 개시된 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 포함한다.

[0316] 전형적으로, 펩티드-기재의 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합 형성으로 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은, 예를 들어 펩티드 화학 분야에 주지된 액상 합성 방법 (문헌 [E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides," volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조될 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588; 문헌 [Pettit et al., (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465]; [Pettit et al., (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277]; [Pettit, G.R., et al., Synthesis, 1996, 719-725]; 및 [Pettit et al., (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863]의 방법에 따라 제조될 수 있다. 또한, 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 문헌 [Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784]; 2004년 11월 5일에 출원된 미국 출원 번호 10/983,340 (영문 명칭 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands") (예를 들어, 링커 및 링커에 접합된 모노메틸발린 화합물, 예컨대 MMAE 및 MMAF의 제조 방법을 개시함)을 참조한다.

iii. 칼리케아미신

[0317] 다른 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다. 칼리케아미신 부류의 항생제는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA 절단부를 생성할 수 있다. 칼리케아미신 부류의 접합체를 제조하는 것에 대해서는 미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 캄파니 (American Cyanamid Company)의 특허)를 참조한다. 사용할 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 Θ_1^I 을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)] 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 항폴레이트인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 다 세포내 작용 부위를 갖고, 원형질막을 용이하게 통과하지 않는다. 따라서, 항체-매개 내재화를 통한 이들 작용체의 세포 흡수는 이들의 세포독성 효과를 크게 증진시킨다.

iv. 다른 세포독성제

[0319] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양제는 BCNU, 스트렙토조신, 빙크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 번호 5,053,394 및 5,770,710에 기재된, 접합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 작용제의 부류, 및 에스페라미신 (미국 특허 번호 5,877,296)을 포함한다.

[0320] 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 켈로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 폐노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232를 참조한다.

[0321] 본 발명은 항체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.

[0322] 종양의 선택적 파괴를 위해서, 항체는 높은 방사성의 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성동위원소가 방사성 접합된 항체의 생성을 위해 이용가능하다. 그 예는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 섬광조영 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc^{99m} 또는 I¹²³을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스플릿 표지, 예를 들어 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.

[0323] 방사성- 또는 다른 표지를 공지의 방식으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성될 수도 있고, 또는 예를 들어 수소 대신에 플루오린-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용한 화학적 아미노산

합성에 의해 합성될 수도 있다. tc^{99m} 또는 Tl^{123} , Re^{186} , Re^{188} 및 In^{111} 과 같은 표지가 펩티드 내의 시스테인 잔기 를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 아이오도겐 (IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57])을 사용하여 아이오딘-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.

[0325] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데하이드 (예컨대 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 툴루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성 뉴클레오티드의 접합을 위한 예시적인 퀄레이트화제이다. W094/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디슬퍼드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0326] 본 발명의 화합물은 시판하는 (예를 들어 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.) (미국 일리노이주 록포드)로부터의) 가교결합 시약: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)을 사용하여 제조된 ADC를 명백하게 고려하지만, 이에 제한되지는 않는다. 문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 467-498 페이지를 참조한다.

v. 항체 약물 접합체의 제조

[0328] 본 발명의 항체 약물 접합체 (ADC)에서, 항체 (Ab)는 링커 (L)를 통해 항체당 하나 이상의 약물 모이어티 (D), 예를 들어 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티에 접합된다. 화학식 I의 ADC는 (1) 항체의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 D-L을 형성시킨 후, 이를 항체의 친핵성 기와 반응시키는 것을 비롯한 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 사용하여 여러 경로에 의해 제조될 수 있다. ADC를 제조하는 추가의 방법은 본원에 기재되어 있다.

<화학식 I>

[0330] $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$

[0331] 링커는 하나 이상의 링커 성분으로 구성될 수 있다. 예시적인 링커 성분에는 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC"), 및 N-숙신이미딜 (4-아이오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")가 포함된다. 추가의 링커 성분이 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에서 기재된다. 또한 그의 전문이 본원에 참고로 도입되는 2004년 11월 5일에 출원된 미국 특허 번호 10/983,340 (영문 명칭 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")를 참조한다.

[0332] 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 아미노산 링커 성분은 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드를 포함한다. 예시적인 디펩티드는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)을 포함한다. 예시적인 트리펩티드는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)을 포함한다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 자연적으로 발생하는 것들 뿐만 아니라 소수의 아미노산 및 비-자연 발생 아미노산 유사체, 예컨대 시트룰린을 포함한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 종양-관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 이들의 선택도 측면에서 설계되고 최적화될 수 있다.

[0333] 항체상의 친핵성 기는 (i) N-말단 아민 기, (ii) 측쇄 아민 기, 예를 들어 리신, (iii) 측쇄 티올 기, 예를 들

어 시스테인, 및 (iv) 항체가 글리코실화되는 당 히드록실 또는 아미노 기를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOEt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드 기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 쇄간 디솔피드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 환원제, 예컨대 DTT (디티오프레이톨) 처리를 통해 항체를 링커 시약과의 접합에 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 브릿지는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 리신을 2-이미노티올란 (트라우트 시약)과 반응시켜서 아민을 티올로 전환시킴으로써 추가의 친핵성 기를 항체에 도입할 수 있다. 반응성 티올 기는 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비친연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 변이체 항체를 제조함으로써) 항체 내로 도입될 수 있다.

[0334]

본 발명의 항체 약물 접합체는 또한 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하는 항체의 개질에 의해 제조될 수 있다. 글리코실화된 항체의 당은 예를 들어, 과아이오딘산염 산화제로 산화시켜, 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민 기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 형성할 수 있다. 생성된 이민 쉬프 염기성 기는 안정적인 연결을 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어, 보로히드라이드 시약에 의해 환원되어 안정적인 아민 연결을 형성할 수 있다. 한 실시양태에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-페아이오데이트와 반응시키면, 약물상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤)기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (헤르만슨, 바이오컨쥬케이트 테크닉스 (Hermanson, Bioconjugate Techniques)). 또 다른 실시양태에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-페아이오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 (문헌 [Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; 미국 특허 번호 5,362,852). 이러한 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

[0335]

유사하게, 약물 모이어티 상의 친핵성 기는 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOEt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기를 포함하는, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바준, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드 기를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0336]

대안적으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 웨비드 합성에 의해 제조될 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접하거나 접합체의 바람직한 특성을 파괴하지 않는 링커 웨비드를 코딩하는 영역에 의해 분리된, 접합체의 2개 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.

[0337]

또 다른 실시양태에서, 항체는, 항체-수용체 접합체를 개인에게 투여한 후 결합되지 않은 접합체를 제거제를 사용하여 순환으로부터 제거하고 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성뉴클레오티드)와 접합되는 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여하는 종양 예비 표적화에 사용하기 위해, "수용체" (예컨대, 스트렙타비딘)에 접합될 수 있다.

[0338]

제약 제제

[0339]

수용액, 동결건조 제제 또는 다른 건조 제제의 형태로, 바람직한 정도의 순도를 갖는 이종 폴리웨비드를 임의적인 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)])와 함께 혼합함으로써 이종 폴리웨비드의 치료 제제가 보관용으로 제조된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 히스티딘 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리웨비드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐파롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 퀼레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN)TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다.

[0340]

본원에서의 제제는 치료될 특정 적응증에 필요하다면 하나를 초과하는 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역

효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것들을 또한 함유할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0341] 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 매크로에멀젼 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osoi, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0342] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0343] 서방성 제제를 제조할 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예로는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)TM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 항체가 신체 내에서 장기간 동안 유지되는 경우, 37°C에서 습도에 노출된 결과로 항체가 변성되거나 응집되어, 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화가 초래될 수 있다. 수반된 메카니즘이 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안된다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디솔피드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 안정화는 술프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.

0344] 용도

[0345] 본 발명의 이종 폴리펩티드는 예를 들어 시험관내 및 생체내 진단 및 치료 방법 둘 다를 포함하여 이것이 인식하는 특정 폴리펩티드를 정제, 검출 및 표적화하는데 사용될 수 있다.

[0346] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 생물학적 샘플에서 특정 항원을 정성적으로 및 정량적으로 측정하기 위한 면역 검정에 사용될 수 있다. 항원-항체 결합을 검출하기 위한 통상적인 방법은 예를 들어 효소 연결 면역흡착 검정 (ELISA), 방사성면역검정 (RIA) 또는 조직 면역조직화학을 포함한다. 다수의 방법은 검출 목적을 위해 항체에 결합된 표지를 사용할 수 있다. 항체와 사용되는 표지는 항체에 대한 그의 결합을 방해하지 않는 임의의 검출 가능한 관능기이다. 방사성동위원소 ^{32}P , ^{32}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , 및 ^{131}I , 형광단, 예컨대 흐토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 웜벨리페론, 루시페라제, 예를 들어, 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디하드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, 베타-갈라토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로케나제, 헤테로시클릭 옥시다제, 예컨대 우리카제 및 크산틴 옥시다제, 락토퍼옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼, 영상화 방사성핵종 (예컨대, 테크네슘) 등을 포함하는 다수의 표지가 공지되어 있다.

[0347] 통상적인 방법이 이를 표지를 이종 폴리펩티드에 공유 결합에 의해 결합시키는데 이용가능하다. 예를 들어, 커플링제, 예컨대 디알데히드, 카르보디이미드, 디말레이이미드, 비스-이미레이트, 비스-디아조화 벤지дин 등을 사용하여 항체에 상기 기재된 형광물질, 화학발광물질 및 효소 표지를 태그 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 3,940,475 (형광측정) 및 미국 특허 번호 3,645,090 (효소); 문헌 [Hunter et al. Nature 144: 945 (1962)]; [David et al. Biochemistry 13:1014-1021 (1974)]; [Pain et al. J. Immunol. Methods 40:219-230 (1981)]; 및 [Nygren Histochem. and Cytochem 30:407-412 (1982)]을 참조한다. 본원에서 바람직한 표지는 효소, 예컨대 양고추냉이 퍼옥시다제 및 알칼리성 포스파타제이다. 효소를 비롯한 이러한 표지의 항체 폴리펩티드에 대한 접합은 면역검정 기술에 있어 당업자에게 표준의 조작 절차이다. 예를 들어, 문헌 [O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, ed. J. J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166]을 참조한다. 이러한 결합 방법은 본 발명의 이종 폴리펩티드와 사용하기 적합하다.

[0348] 이종 폴리펩티드 표지에 대한 대안으로, 항원은 검출가능한 물질로 표지된 경쟁 항원 표준 및 표지되지 않은 이

종 폴리펩티드를 사용하는 경쟁 면역검정에 의해 생물학적 유체에서 검정될 수 있다. 이러한 검정에서, 생물학적 샘플, 표지된 항원 표준 및 이종 폴리펩티드를 합하고, 표지되지 않은 이종 폴리펩티드에 결합된 표지된 항원 표준의 양을 결정한다. 생물학적 샘플에서 시험된 항원의 양은 이종 폴리펩티드에 결합된 표지된 항원 표준의 양에 반비례한다.

[0349] 한 측면에서, 본 발명의 이종 폴리펩티드 (예컨대, 항체)는 시험관내 또는 생체내에서 특정 표면 항원의 발현을 검출 및 프로파일링하는데 특히 유용하다. 이전에 논의된 바와 같이, 일반적으로, 비글리코실화 항체는 이펙터 기능 (즉, ADCC 또는 CDC 활성)를 발휘하지 않는다. 따라서, 항체가 세포 표면 항원에 결합하였을 때, 이는 바람직하지 않은 세포독성 사건을 개시하지 않을 것이다. 표면 항원은 특정 세포 또는 조직 유형에 특이적일 수 있고, 이에 따라 세포 또는 조직 유형의 마커의 역할을 한다. 바람직하게는, 표면 항원 마커는 특정 세포 또는 조직 유형의 다양한 분화 단계에서 차별적으로 발현된다. 따라서, 이러한 표면 항원에 대해 지시된 항체는 마커를 발현하는 세포 또는 조직 집단의 스크리닝에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 줄기 세포, 예컨대 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포 및 중간엽 줄기 세포의 스크리닝 및 단리에 사용될 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 종양-관련 표면 항원, 예컨대 c-met, HER2, HER3 또는 HER4 수용체를 발현하는 종양 세포를 검출하는데 사용될 수 있다.

[0350] 본 발명의 항체 또는 다른 이종 폴리펩티드는 친화도 정제 작용제로서 사용될 수 있다. 이러한 공정에서, 당업계에 주지된 방법을 사용하여, 세파텍스 수지 또는 여과지와 같은 고체 상 위에 항체를 고정한다. 이와 같이 고정화시킨 항체는 정제시키고자 하는 항원을 함유하는 샘플과 접촉시킨 후, 지지체를 적합한 용매로 세척시키는데, 이러한 용매는 고정화 폴리펩티드와 결합되는 정제될 항원을 제외하고는 샘플 내의 실질적으로 모든 물질을 제거시킬 것이다. 최종적으로, 지지체를 또 다른 적합한 용매, 예를 들어 글리신 완충제 (pH 5.0)로 세척시키는데, 이로써 항원이 폴리펩티드로부터 방출될 것이다.

[0351] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 및/또는 면역 (예컨대 자가면역) 장애의 치료적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 방법을 사용하여 생성된 이종 폴리펩티드의 용도를 제공한다. 이종 폴리펩티드는 항체, 항체 단편, 폴리펩티드 (예를 들어, 올리고펩티드), 또는 이들의 조합을 포함하는 본원에 기재된 임의의 형태의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원은 인간 단백질 분자이고, 대상체는 인간 대상체이다.

[0352] 본 발명의 이종 폴리펩티드는 악성 및 양성 종양; 비-백혈병 및 림프성 악성종양; 뉴런, 신경교, 성상세포, 시상하부 및 다른 선상, 대식세포, 상피, 기질 및 포배강 장애; 및 염증성, 혈관신생 및 면역 장애를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 하나 이상의 항원 분자의 비정상적인 발현 및 활성과 관련된 질환, 장애 또는 상태를 진단, 치료, 억제 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

[0353] 특정 실시양태에서, 항체를 포함하는 면역접합체를 대상체에게 투여한다. 바람직하게는, 면역접합체 및/또는 이에 결합된 항원은 세포에 의해 내재화된다.

[0354] 본 발명의 이종 폴리펩티드는 요법에서 단독으로 또는 다른 조성물과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 이종 폴리펩티드는 항체, 화학요법제(들) (화학요법제의 칵테일 포함), 다른 세포독성제(제), 항-혈관신생제(들), 시토카인, 및/또는 성장 억제제(들)과 공동-투여될 수 있다. 이종 폴리펩티드가 종양 성장을 억제하는 경우, 이종 폴리펩티드를 또한 성장 인자를 억제하는 하나 이상의 다른 치료제(들)과 조합하는 것이 특히 바람직할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 환자는 조합된 방사선 요법 (예를 들어, 외부 빔 조사 또는 방사성 표지된 작용제, 예컨대 항체에 의한 요법)을 받을 수도 있다. 상기 언급된 이러한 조합 요법에는 조합 투여 (이 경우에는 2종 이상의 작용제가 동일 또는 개별 제제에 포함됨) 및 개별 투여가 포함되고, 이 경우 항체는 보조 요법 (들)의 투여 전 및/또는 후에 투여될 수 있다.

[0355] 이종 폴리펩티드 (및 임의로 보조 치료제)는 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내, 및 원한다면 국소 치료용의 병변내 투여를 비롯한 임의의 적합한 수단으로 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, 항체는 특히 항체의 용량을 감소시킨 펄스 주입에 의해 적합하게 투여된다. 바람직하게는, 투여는 부분적으로는 투여가 단기인지 장기인지에 따라 주사, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 제공된다.

[0356] 본 발명의 이종 폴리펩티드 조성물은 우수한 의약 관행과 일치하는 방식으로 제제화되고, 투여량이 정해지고, 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 요인은 치료할 특정 장애, 치료받을 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료 전문인에게 공지된 다른 요인을 포

함한다. 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로, 항체는 문제의 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 요인들에 의해 좌우된다. 일반적으로, 이들은 이전에 사용되던 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나, 이전에 사용되던 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

[0357] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 항체의 적합한 투여량 (단독으로 또는 또 다른 작용제, 예컨대 화학요법제와 조합되어 사용되는 경우)은 치료될 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 기준의 치료법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 좌우될 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형과 중증도에 따라서, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의해서든 아니면 연속식 주입에 의해서든지 간에, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 투여량 후보이다. 수일 또는 그보다 오랜 기간에 걸친 반복 투여의 경우, 상태에 따라서 치료는 질환 증상이 바람직한 수준으로 저해될 때까지 지속된다. 항체의 바람직한 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위가 될 것이다. 보다 높은 초기 부하 용량을 투여한 후, 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여 처방이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0358] 제조품

[0359] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 기재된 장애의 치료에 유용한 물질들을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 용기가 형성될 수 있다. 용기는 상태를 치료하는데 효과적인 조성물을 보유하고, 멀균 접근 포트가 있을 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하주사 바늘이 관통가능한 마개가 있는 정맥주사액 또는 바이알일 수 있음). 조성물의 하나 이상의 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택된 상태, 예컨대 암의 치료에 사용된다는 것을 표시한다. 또한, 제조품은 (a) 그 내부에 조성물을 함유하고 있는 제1 용기 (이 조성물은 본 발명의 항체를 포함함); 및 (b) 그 내부에 조성물을 함유하고 있는 제2 용기 (이 조성물은 추가의 세포독성제를 포함함)를 포함할 수 있다. 이러한 본 발명의 실시양태에서의 제조품은 상기 제1 및 제2 항체 조성물을 사용하여 암을 치료 할 수 있다는 것을 표시한 포장 삽입물을 더 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 주사용 정균수 (BWFI), 포스페이트 완충 염수, 링거액 및 엑스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 더 포함할 수 있다. 이것은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 더 포함할 수 있다.

[0360] 하기 실시예는 단순히 본 발명의 실행을 예증하기 위한 것이고 본 발명을 제한하기 위해 제공되지 않는다. 본 원에서 언급된 모든 특허 및 학술 문헌의 개시내용은 그 전문이 명백하게 참고로 포함된다.

[0361] 실시예

[0362] 물질 및 방법

[0363] 박테리아 균주 및 배지 - 본 연구에 사용된 균주 및 플라스미드는 표 1에 열거되어 있다. 진탕 플라스크 배양을 위해, 모든 균주는 30 또는 37°C에서 표시된 곳에서 라우리아-베르타니(Lauria-Bertani) (LB) 또는 C.R.A.P. 포스페이트-제한 배지 (1)에서 성장시켰다. 발효조 배지는 본질적으로 참고문헌 1에 기재된 바와 같다. 항생제는 하기 농도에서 첨가하였다: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 카르베니실린, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 카나마이신, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 클로람페니콜 또는 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 테트라시클린.

[0364] 관련 TIR 라이브러리의 구축 및 평가 - 열-안정성 장독소 II (stII), 말토스-결합 주변세포질 단백질 (male), 알칼리성 포스파타제 (phoA), 또는 티올:디슬피드 교환 단백질 (dsbA) 신호 웨티드를 PCR-증폭시키고, 모 유전자의 개시 코돈의 상류에 BssHII, MluI, 또는 XbaI 제한 부위 9개 염기쌍 (bp)을 갖는 상기 개시 코돈 뒤의 처음 6개 아미노산에 워블(wobble)-기재의 사일런트 코돈 돌연변이 (2)를 도입한 축퇴성 프라이머를 사용하여 phoA 유전자의 성숙 도메인에 융합시켰다 (표 2 참조). 각각의 신호 서열의 야생형 코돈을 코딩하는 DNA를 또한 생성하였다. 이어서, 이를 삽입물을 일상적으로 pPho41 (3) 플라스미드의 SpeI/NotI (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)) 부위에 클로닝하고, 컴피턴트 JM109 세포 (프로메가(Promega))로 형질전환시키고, 1시간 동안 회수하고, 카베니실린이 보충된 200 mL의 LB에서 16시간 동안 37°C에서 2차 배양하고, 이후에 맥시-프렙하였다_(퀴아젠(Qiagen)). 각각의 라이브러리로부터 회수된 세포의 분취액을 라이브러리 크기를 결정하기 위해 선택적 LB-아가 플레이트 상에 플레이팅하고; 모든 라이브러리는 이론상 라이브러리 크기에 대해 약 10 내

지 100x 커버리지를 생성하였다. 이어서, 정제된 DNA를 컴퍼턴트 27C7 세포로 형질전환시키고, 카르베니실린 및 100 µg/mL 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트 (BCIP; 시그마(Sigma))가 보충된 LB-아가 플레이트 상에 플레이팅하고, 37°C에서 16시간 동안 성장시켰다. 밝은 청색을 나타내는 콜로니는 추정상 이들이 적어도 낮은 수준의 PhoA 활성을 나타내는 TIR 변이체를 보유한다는 것을 나타내는 한편, 어두운 청색 콜로니는 강한 TIR 변이체 (4)를 보유하는 세포를 나타내고, 백색 콜로니는 세포가 거의 또는 전혀 PhoA 발현이 없는 TIR 변이체를 운반한다는 것을 의미하고; 각각의 라이브러리에 대해 주어진 아가 플레이트 상의 청색 콜로니의 백분율은 약 2 내지 70%이다. 다양한 색조의 청색을 나타내는 개별 콜로니로부터의 DNA를 미니프렙하고 (큐아젠), SRS 분석 (제넨테크, 인크.)에 의해 서열분석하고, 컴퍼턴트 27C7 세포로 다시 형질전환시키고, 이어서 이전에 기재된 바와 같이 (3) 이들의 기초 PhoA 활성에 대해 시험하였다. 간략하게, 콜로니를 선택적 LB에서 16시간 동안 30°C에서 성장시키고, 신선한 배지로 1:100 희석하고, 추가의 4시간 동안 30°C에서 성장시켰다. 이어서, 배양물을 광학 밀도 (OD₅₅₀)에 기초하여 정상화시키고, 염격-AP 배지 (3)에 재현탁시키고, 이어서 -20°C에서 밤새 보관하였다. 이어서, 세포를 해동시키고, 틀루엔 (시그마) 처리 (5)로 부분적으로 투과시키고, 37°C에서 1시간 동안 공기통과시켰다. 이어서, 40 µl의 각각의 배양물을 1 M 트리스-HCl 완충제 (pH 8.0) 중에 1 mM 이나트륨 4-니트로페닐 포스페이트 핵사히드레이트 (PNPP; 프로메가)를 함유하는 용액에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 어두운 곳에서 인큐베이션하였다. 100 µl 나트륨 포스페이트 완충제 (pH 6.5)를 첨가하여 반응을 정지시키고, 410 nm에서의 흡광도 (A₄₁₀)를 20분 이내에 판독하였다. 상대 TIR 강도를 우선 각각의 샘플의 A₄₁₀으로부터 빈 벡터 (pBR322)를 함유하는 배양물로부터의 백그라운드 흡광도를 빼고, 이어서 pPho41プラス미드를 운반하는 배양물로부터 보정된 흡광도로 나누었다. 모든 보고된 TIR 값은 적어도 7개의 복제 실험의 결과이다.

[0365] 항체 발현 벡터의 구축 - 신호 웨პ티드를 일상적으로 이전에 기재된 2-시스트론 시스템 (1)으로 클로닝하였다. 중쇄 신호 웨პ티드 변이체는 관심 신호 웨პ티드를 스플라이싱 오버랩 연장 - (SOE) PCR을 통해 관심 중쇄에 융합시켜 생성하고, BssHII/HpaI (뉴 잉글랜드 바이오랩스) 부위로 클로닝하였다. 경쇄 신호 웨პ티드 변이체를 유사하게 SOE-PCR을 사용하여 제조하고, 개별 TIR 변이체 뉴클레오티드 서열에 의해 특정된 바와 같이 MluI/PacI (뉴 잉글랜드 바이오랩스) 또는 XbaI/PacI (뉴 잉글랜드 바이오랩스) 부위로 클로닝하였다 (표 2). 모든 구축물 서열을 SRS 분석 (제넨테크, 인크.)에 의해 확인하였다.

[0366] 소규모 유도 및 분석 - 세포를 5 mM 인산나트륨 (pH 7.0)이 보충된 선택적 LB 5 mL에서 16시간 동안 30°C에서 성장시켰다. 이어서, 세포의 500 µl 분취액을 사용하여 25 mL의 선택적 C.R.A.P. 포스페이트-제한 배지를 접종하고, 24시간 동안 30°C에서 성장시켰다. 표시된 곳에서, 플라스미드 pJJ247을 운반하는 세포는 이소프로필 β-D-티오갈락토시드 (IPTG)를 사용하여 세포가 OD₆₀₀ 약 2.0에 도달하였을 때 1.0 mM의 최종 농도로 유도하였다. 종점 전체 브로쓰 샘플을 취하고, 용해 완충제 (10 mM 트리스 pH 6.8, 5 mM EDTA, 0.2 mg/mL 리소자임 (시그마), 5 mM 아이오도아세트산 (시그마)) 중에서 약 3.0의 OD₆₀₀으로 희석하고, 얼음 상에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 초음파처리하고, 원심분리하여 세포 잔해물을 제거하고, 이어서 SDS-PAGE 분석 (10% 비스-트리스, 인비트로젠(Invitrogen))을 사용하여 분석하였다. 전체 세포 용해물 샘플을 0.2 M 디티오타이톨 (DTT, 시그마)로 환원된 동등한 광학 밀도로 정상화시키고, SDS-PAGE 분석을 사용하여 분석하였다. 모든 레인을 동등한 부피의 샘플로 로딩하고, 인간 항-Fc (서던 바이오텍(Southern Biotech)) 항체를 1:200,000 희석액으로 사용하거나 또는 마우스 항-κLc (서던 바이오텍) 항체를 1:200,000 희석액으로 사용하여 프로빙하였다. 모든 항체를 HRP-접합시키고, 이뮤노블롯을 웨스턴 라이트닝(Western Lightning)-ECL (퍼킨엘머(PerkinElmer))을 사용하고, 막을 바이오맥스(Biomax) XAR 필름 (코닥(Kodak))에 노출시켜 시작화하였다. 단백질 샘플을 또한 표준 기술에 따라 쿠마시 블루 염색을 통해 분석하였다.

[0367] 대규모 유도 - 발효를 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (1). 간략하게, 5 mL 선택적 LB 배양물로부터 동결 보존된 세포의 500 µl 분취액을 사용하여 500 mL의 선택적 LB를 접종하고, 30°C에서 16시간 동안 성장시켰다. 이어서, 10-L 발효조를 접종하고 (본질적으로 참고문헌 1에 기재된 바와 같음), 세포를 발효 요구에 기초하여 농축된 글루코스 용액을 공급하기 위한 컴퓨터-기반 알고리즘을 사용하여 고밀도로 성장시켰다. 표시된 곳에서, 플라스미드 pJJ247을 운반하는 세포를 표시된 곳에서 유도하고, 플라스미드 pJJ247을 운반하는 세포를 이소프로필 β-D-티오갈락토시드 (IPTG)를 사용하여 세포가 OD₅₅₀ 약 200에 도달하였을 때 1.0 M의 최종 농도로 유도하였다. 전체 브로쓰 및 정상화된 OD₅₅₀ 샘플을 규칙적인 시간 간격으로 취하고, 2 내지 3일 후에 모든 발효를 종결시켰다. 배양 적합성은 일상적으로 온라인 및 오프라인 파라미터를 사용하여 모니터링하였다. 샘플을 상기 기재된 바와 같이 SDS-PAGE 분석을 사용하여 분석하였다.

[0368] 샘플의 HPLC 분석 - 소규모 및 대규모 유도 실험으로부터의 샘플을 이전에 개발된 역상 HPLC 분석 기술 (리사

웡(Lisa Wong), 개인 통신)을 통해 전체 (불용성 및 가용성) 중쇄 또는 경쇄 농도에 대해 분석하였다. 샘플을 이중-칼럼, 단백질-L 역상 기반 HPLC 검정 (어날리티컬 오퍼레이션즈(Analytical Operations), 제넨테크, 인크.)에 의해 경쇄 함유 항체 중에 대해 분석하였다. 항체 역가는 크로마토그램 피크 영역을 블랭크 샘플의 공지된 양의 관심 분자로의 스파이킹에 의해 생성된 표준 곡선의 것과 비교하여 수득하였다.

표 1

본 연구에 사용되는 균주 및 플라스미드

균주 또는 플라스미드	관련 유전자형/표현형	참고문헌 또는 공급원
이. 콜라이 균주		
27C7	$\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $ptr3$ $degP41$ kan^R $ompT\Delta(nmpc-fepE)$	(3)
64B4	$W3110$ $\Delta fhuA$ $\Delta phoA$ $ilvG^+$ Δprc $spr43H1$ $\Delta degP$ $\Delta manA$ $lacI^q$ $\Delta ompT$	래보러토리 스톡
JM109	$e14^-(Mcra^-)$ $recA1$ $endA1$ $gyrA96$ $thi-1$ $hsdR17$ (r_K^- m_K^+) $supE44$ $relA1$ $\Delta(lac-proAB)$ [F' $traD36$ $proAB$ $lacI^q$ ZΔM15]	프로메가
플라스미드		
pPho41	Cb ^r	(3)
pBR322	Cb ^r , Tc ^r	래보러토리 스톡
ph5D5	pBR322로 클로닝된 인간화 5D5 항체 (교환가능하게 5D5.v2 항체로 명명됨)	래보러토리 스톡
pJJ247	pACYC-유래된 백터, Km ^r 에서 tac 프로모터의 제어 하의 이. 콜라이 dsbA 및 dsbC	래보러토리 스톡
pBR-STIIHc1.0-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHIII-ssSTII TIRv.1	본 연구
pBR-STIIHc2.41-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHIII-ssSTII TIRv.2	본 연구
pBR-STIIHc3.38-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHIII-ssSTII TIRv.3	본 연구
pBR-STIIHc4.60-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHIII-ssSTII TIRv.4	본 연구
pBR-STIIHc5.34-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHIII-ssSTII TIRv.5	본 연구
pBR-STIIHc6.52-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHIII-ssSTII TIRv.6	본 연구

pBR-STIIHc8.36-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssSTII TIRv.8	본 연구
pBR-STIILc1.0-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 MluI-ssSTII TIRv.1	본 연구
pBR-STIILc2.74-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 MluI-ssSTII TIRv.2	본 연구
pBR-STIILc3.72-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 MluI-ssSTII TIRv.3	본 연구
pBR-DsbAHc1.48- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssDsbA TIRv.1	본 연구
pBR-DsbAHc2.WT- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssDsbA TIRv.2	본 연구
pBR-DsbAHc3.79- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssDsbA TIRv.3	본 연구
pBR-DsbAHc7.72- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssDsbA TIRv.7	본 연구
pBR-DsbALc1.WT- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 MluI-ssDsbA TIRv.1	본 연구
pBR-DsbALc2.3-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 MluI-ssDsbA TIRv.2	본 연구
pBR-DsbALc3.37- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 MluI-ssDsbA TIRv.3	본 연구
pBR-PhoAHc1.70- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssPhoA TIRv.1	본 연구
pBR-PhoAHc2.64- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssPhoA TIRv.2	본 연구
pBR-PhoAHc3.WT- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssPhoA TIRv.3	본 연구
pBR-PhoAHc4.67- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssPhoA TIRv.4	본 연구
pBR-PhoAHc5.71- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssPhoA TIRv.5	본 연구

[0370]

pBR-PhoAHc6.77- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssPhoA TIRv.6	본 연구
pBR-PhoALc1.104- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 MluI-ssPhoA TIRv.1	본 연구
pBR-PhoAXb2.41- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssPhoA TIRv.2	본 연구
pBR-PhoAXb3.WT- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssPhoA TIRv.3	본 연구
pBR-PhoAXb5.53- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssPhoA TIRv.5	본 연구
pBR-PhoAXb6.15- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssPhoA TIRv.6	본 연구
pBR-PhoAXb7.1-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssPhoA TIRv.7	본 연구
pBR-PhoAXb8.24- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssPhoA TIRv.8	본 연구
pBR-PhoAXb10.23- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssPhoA TIRv.10	본 연구
pBR-MalEHc1.92- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssMalE TIRv.1	본 연구
pBR-MalEHc2.100- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 BssHII-ssMalE TIRv.2	본 연구
pBR-MalELc1.97- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 MluI-ssMalE TIRv.1	본 연구
pBR-MalELc2.123- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 MluI-ssMalE TIRv.2	본 연구
pBR-MalEXb1.WT- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssMalE TIRv.1	본 연구
pBR-MalEXb2.15- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssMalE TIRv.2	본 연구
pBR-MalEXb3.12- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssMalE TIRv.3	본 연구

[0371]

pBR-MalEXb5.37- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssMalE TIRv.5	본 연구
pBR-MalEXb6.4-PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssMalE TIRv.6	본 연구
pBR-MalEXb7.25- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssMalE TIRv.7	본 연구
pBR-MalEXb8.13- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssMalE TIRv.8	본 연구
pBR-MalEXb11.34- PhoA	pPho41에서 Δ(1-22)PhoA에 융합된 이. 콜라이 XbaI-ssMalE TIRv.11	본 연구
pBR-SS-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.1	본 연구
pBR-SS-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.2	본 연구
pBR-SS-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.1	본 연구
pBR-SS-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.2	본 연구
pBR-SM-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.1	본 연구
pBR-SM-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.2	본 연구
pBR-SM-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.1	본 연구
pBR-SM-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.2	본 연구
pBR-SD-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.1	본 연구
pBR-SD-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.2	본 연구
pBR-SD-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.1	본 연구

pBR-SD-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.2	본 연구
pBR-SP-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.1	본 연구
pBR-SP-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.2	본 연구
pBR-SP-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.1	본 연구
pBR-SP-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 STII TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.2	본 연구
pBR-MS-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.1 , 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.1	본 연구
pBR-MS-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.1 , 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.2	본 연구
pBR-MS-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.1	본 연구
pBR-MS-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.2	본 연구
pBR-MM-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.1 , 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.1	본 연구
pBR-MM-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.1 , 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.2	본 연구
pBR-MM-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.1	본 연구
pBR-MM-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.2	본 연구
pBR-MD-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.1 , 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.1	본 연구
pBR-MD-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.1 , 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.2	본 연구
pBR-MD-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.1	본 연구

[0373]

pBR-MD-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.2	본 연구
pBR-MP-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.1 , 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.1	본 연구
pBR-MP-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.1 , 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.2	본 연구
pBR-MP-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.1	본 연구
pBR-MP-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 MalE TIRv.2 , 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.2	본 연구
pBR-DS-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.1	본 연구
pBR-DS-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.2	본 연구
pBR-DS-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.1	본 연구
pBR-DS-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.2	본 연구
pBR-DM-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.1	본 연구
pBR-DM-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.2	본 연구
pBR-DM-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.1	본 연구
pBR-DM-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 MalE TIRv.2	본 연구
pBR-DD-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.1	본 연구
pBR-DD-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.2	본 연구
pBR-DD-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.1	본 연구

[0374]

pBR-DD-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.2	본 연구
pBR-DP-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.1	본 연구
pBR-DP-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.2	본 연구
pBR-DP-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.1	본 연구
pBR-DP-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 DsbA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.2	본 연구
pBR-PS-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.1	본 연구
pBR-PS-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.2	본 연구
pBR-PS-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.1	본 연구
pBR-PS-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 STII TIRv.2	본 연구
pBR-PM-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 MaIE TIRv.1	본 연구
pBR-PM-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 MaIE TIRv.2	본 연구
pBR-PM-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 MaIE TIRv.1	본 연구
pBR-PM-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 MaIE TIRv.2	본 연구
pBR-PD-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.1	본 연구
pBR-PD-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.2	본 연구
pBR-PD-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.1	본 연구
pBR-PD-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 DsbA TIRv.2	본 연구

[0375]

pBR-PP-5D5-1.1	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.1	본 연구
pBR-PP-5D5-1.2	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.1, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.2	본 연구
pBR-PP-5D5-2.1	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.1	본 연구
pBR-PP-5D5-2.2	5D5 Hc에 융합된 PhoA TIRv.2, 5D5 Lc에 융합된 PhoA TIRv.2	본 연구

Hc = 중쇄

Lc = 경쇄

5D5= 항-c-met 모노클로날 항체 클론 5D5.v2. 5D5.v2 중쇄 및 경쇄 서열을 도 7에 나타내고, 이는 또한 예를 들어 WO2006/015371; 문헌 [Jin et al., Cancer Res (2008) 68:4360]에 기재되어 있다.

[0376]

표 2

신호 서열 변이체

볼드 이밸리체 = 변이된 서열 (즉, 개시 코돈 뒤의 처음 6개의 아미노산)
 이밸리체 = BssHII, MluI, 또는 XbaI 제한 부위

보유전자	클론 ID	관련 유전자형/표현형	상대 TIR 강도	서열 번호
<i>stII</i>	SH1.2	<i>GCGCGCATTATGAAAGAAAAACATCGCTT</i> TT CTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCTAT T GCTACAAACGCTTACGCT	0.99 ± 0.07	1
	SH2.41	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAAATATAGCGT</i> T <i>TCTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCTA</i> TTGCTACAAACGCTTACGCT	1.94 ± 0.05	2
	SH3.38	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAAACATTGCCT</i> TTC	2.9 ± 0.2	3

[0377]

		TTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCTATT GC TACAAACGCTTACGCT		
	SH4.60	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGAATATTGCCT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCTAT T GCTACAAACGCTTACGCT	4.1 ± 0.1	4
	SH5.34	<i>GCGCGCATTATGAAAGAAAATATTGCAT</i> <i>TC</i> CTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCTA TTGCTACAAACGCTTACGCT	5.0 ± 0.2	5
	SH6.52	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAAATATTGCAT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	5.9 ± 0.2	6
	SH8.36	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAAATATTGCTT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	7.7 ± 0.1	7
	SL1.2	<i>ACGCGTATTATGAAAGAAAACATCGCTT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	0.75 ± 0.07	8
	SL2.74	<i>ACGCGTATTATGAAAAAGAATATCGCCT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	1.9 ± 0.2	9
	SL3.72	<i>ACGCGTATTATGAAAAAAAATATTGCTT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	2.9 ± 0.2	10
male	MH1.92	<i>GCGCGCATTATGAAAAATAAGACTGGAG</i> <i>CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTCCGCCTCGCTCTC GCC	1.1 ± 0.1	11
	MH2.100	<i>GCGCGCATTATGAAAGATTAAACCGGAG</i>	1.9 ± 0.1	12

[0378]

		<i>CCCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>		
	ML1.97	<i>ACCGGTATTATGAAGATCAAGACAGGCG CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1.1 ± 0.1	13
	ML2.123	<i>ACCGGTATTATGAAGATCAAGACAGGGG CCCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	2.0 ± 0.1	14
	MX1.wt	<i>TCTAGAATTATGAAAATAAAACAGGTG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1.1 ± 0.1	15
	MX2.15	<i>TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGGG CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	2.0 ± 0.1	16
	MX3.12	<i>TCTAGAATTATGAAAATCAAACCGGCG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	3.01 ± 0.09	17
	MX5.37	<i>TCTAGAATTATGAAGATCAAGACTGGAG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	5.0 ± 0.2	18
	MX6.4	<i>TCTAGAATTATGAAAATAAGACGGGAG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	5.8 ± 0.3	19
[0379]	MX7.25	<i>TCTAGAATTATGAAGATAAAGACTGGTG</i>	7.1 ± 0.2	20

		<i>CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTCCGCCTCGGCTCTC GCC		
	MX8.13	<i>TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGAG</i> <i>CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	8.2 ± 0.3	21
	MX11.34	<i>TCTAGAATTATGAAGATTAAGACGGGCG</i> <i>CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	10.8 ± 0.5	22
<i>phoA</i>	PH1.70	<i>GCGCGCATTATGAAACAAATCCACGATTG</i> <i>CCCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	1.14 ± 0.05	23
	PH2.64	<i>GCGCGCATTATGAAACAGTCGACGATCG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	1.93 ± 0.03	24
	PH3.wt	<i>GCGCGCATTATGAAACAAAGCACTATTG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	2.8 ± 0.1	25
	PH4.67	<i>GCGCGCATTATGAAAGCAATCTACTATCG</i> <i>CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	3.7 ± 0.1	26
	PH5.71	<i>GCGCGCATTATGAAAGCAATCAACTATCG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	5.1 ± 0.3	27
	PH6.77	<i>GCGCGCATTATGAAACAAATCTACTATTG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	6.0 ± 0.4	28
[0380]	PL1.104	<i>ACGCGTATTATGAAACAGTCTACTATCG</i> <i>CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	1.00 ± 0.07	29

	PX2.41	<i>TCTAGAATTATGAAGCAGAGTACGATTG</i> CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	2.0 ± 0.1	30
	PX3.wt	<i>TCTAGAATTATGAAACAAAGCACTATTG</i> CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	3.39 ± 0.09	31
	PX5.53	<i>TCTAGAATTATGAAGCAATCCACAATAG</i> CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	4.9 ± 0.1	32
	PX6.15	<i>TCTAGAATTATGAAACAAATCCACCATTGC</i> CCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC CCTGTGACAAAAGCC	5.9 ± 0.2	33
	PX8.24	<i>TCTAGAATTATGAAACAGTCTACTATCGC</i> GCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC CCTGTGACAAAAGCC	8.0 ± 0.1	34
	PX10.23	<i>TCTAGAATTATGAAACAAATCCACAATCG</i> CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTAC CCCTGTGACAAAAGCC	10.0 ± 0.4	35
dsbA	DH1.48	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAATTTGGCTCG</i> CCCTGGCTGGTTAGTTTAGCGTTAG CGCATCGGCG	0.80 ± 0.03	36
	DH2.wt	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATTTGGCTGG</i> CGCTGGCTGGTTAGTTTAGCGTTAG CGCATCGGCG	1.89 ± 0.09	37
	DH3.79	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGCTGG</i> CTCTGGCTGGTTAGTTTAGCGTTAG CGCATCGGCG	2.92 ± 0.08	38
	DH7.72	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGTTGG</i> CTCTGGCTGGTTAGTTTAGCGTTAG CGCATCGGCG	6.7 ± 0.2	39
	DL1.wt	<i>ACGCGTATTATGAAAAAGATTTGGCTGG</i> CGCTGGCTGGTTAGTTTAGCGTTAG	1.0 ± 0.1	40

[0381]

		CGCATCGGCG		
	DL2.3	<i>ACGCGTATTATGAAAGAAAATTTGGTTGG</i> CTCTGGCTGGTTAGTTTAGCGTTAG CGCATCGGCG	1.87 ± 0.09	41
	DL3.37	<i>ACGCGTATTATGAAAGAAGATTTGGTTA</i> GCACTGGCTGGTTAGTTTAGCGTTA GCGCATCGGCG	2.6 ± 0.1	42

범례: 클론 명명 규칙은 다음과 같다: XY.# = X는 신호 서열을 지정하고 (S= STII, P = PhoA 등); Y는 제한 서열을 지정하고 (H는 BssH11 제한 부위를 의미하고, X는 XbaI 부위를 지정하고, L은 MluI 제한 부위를 지정함), #는 TIR 강도를 지정한다 (예를 들어, 1 = 1의 TIR, 7.72 = 7.72의 TIR). wt = 야생형 TIR 서열.

[0382]

표 3

최종 시점 발효 적정

증쇄 신호 서열 (TIR)/ 경쇄 신호 서열 (TIR)	DsbA/C (+/-)	상대 전장 Ab 역가 *
STII (1)/STII (1)	-	1.0
STII (1)/STII (1)	+	4.9
STII (1)/PhoA (1)	-	0.6
STII (1)/PhoA (1)	+	5.6
STII (2)/STII (2)	+	0.8
MalE (1)/STII (1)	-	0.4
MalE (1)/PhoA (1)	-	0.4
MalE (1)/PhoA (1)	+	1.5
DsbA (1)/STII (1)	-	1.4
DsbA (1)/STII (1)	+	3.3
DsbA (1)/STII (2)	+	3.6
DsbA (2)/STII (1)	-	0.9
DsbA (1)/MalE (1)	-	1.7
DsbA (1)/MalE (1)	+	10.1
DsbA (1)/DsbA (1)	-	1.9
DsbA (1)/DsbA (1)	+	12.7
DsbA (2)/DsbA (2)	+	10.6
DsbA (1)/PhoA (1)	-	1.9
DsbA (1)/PhoA (1)	+	10.0
DsbA (2)/PhoA (1)	-	1.5
DsbA (2)/PhoA (1)	+	6.7
PhoA (1)/STII (1)	-	0.3

* 모든 샘플은 STII (1)/STII (1) 샘플의 역가로 정상화시키고,
이는 샤퐐론 DsbA 및 DsbC의 부재 하에 발현된 전장 항체를 포함한다.

[0383]

결과/논의

[0384]

본 발명자들은 이. 콜라이:sec (PhoA, MalE) 및 SRP (DsbA, STII)에서 내막을 가로지르는 수송을 위한 주요 분비 경로 중 2가지를 나타내는 신호 웨티드에 대한 신규 변이체 번역 개시 영역 (TIR) 신호 웨티드 라이브러리 (도 2, 표 2)를 개발하였다. 각각의 라이브러리는 달라지는 번역 강도의 변이체 TIR을 포함하는 백터의 패널을 포함하고, 주어진 관심 단백질에 대한 번역의 수준을 용이하게 조절하는 수단을 제공한다. 말토스-결합 주변세포질 단백질 (MalE) 및 알칼리성 포스파타제 (PhoA) 신호 웨티드는 분자 모터 SecA의 도움을 받아 번역 후 방식으로 세포질로부터 주변세포질로의 전위를 지시한다. 열-안정성 장독소 II (stII) 및 티올:디설피드 교환 단백질 (dsbA) 신호 웨티드는 신호 인식 입자 (SRP)로부터 도움을 받아 공동-번역 방식으로 전위를 지시한다 (도 1).

[0385]

라이브러리의 구축 동안, BssHII, MluI, 또는 XbaI 제한 부위를 모 유전자의 개시 코돈의 9개 염기쌍 (bp) 상류에 삽입하였다. 존재하는 제한 부위의 유형에 따라, 상이한 범위의 TIR 강도가 관찰되었다 (도 2). 일반적으로, MluI 부위를 보유하는 서열은 최소 범위의 TIR 강도 (약 1 내지 3)를 나타내는 한편, BssHII 부위 상류는 중간 정도의 TIR 강도 (약 1 내지 8)를 허용하고, XbaI 부위는 최고 범위 (약 1 내지 11)를 허용하였다. 이들 비번역 영역에 존재하는 제한 부위는 TIR (3)에 포함된다. 조사된 신호 웨티드/제한 부위 조합 중 임의의 것에 대해 보다 높은 TIR 변이체가 존재할 수 있다는 것이 배제될 수는 없으나, 이를 결과는 조사된 각각의 신호 웨티드 라이브러리의 평균 TIR 강도를 대표하는 것으로 보인다.

- [0387] 분비에 대한 번역 수준 및 신호 웨티드의 효과를 설명하기 위해 일련의 플라스미드를 구축하였다. 각각의 경우에, 관심 유전자를 상이한 상대 TIR 강도를 갖는 phoA 프로모터, trp 샤큐-달가노 및 신호 서열의 상류에 삽입하였다. 진탕 플라스크 규모에서의 phoA 프로모터의 형질전환 및 유도 후에, 이종 단백질, 항-c-met 항체 클론 5D5.v2를 발현하는 전체 세포로부터의 용해물을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 이들 실험에서, 중쇄 또는 경쇄 TIR을 변화시키고, 각각 상응하는 경쇄 또는 중쇄는 변하지 않도록 유지하였다.
- [0388] 도 3은 중쇄 신호 웨티드 조작의 결과를 보여준다. α -Fc 특이적 항체로 프로방하였을 때, ssDsbA-중쇄 TIR 1 변이체는 다른 신호 웨티드 변이체 보다 전장 항체 (FL-Ab) 뿐만 아니라 중쇄-경쇄 (HL) 이량체 및 중쇄-중쇄-경쇄 (HHL) 종을 명확하게 증가시켰다 (도 3A, 상부 블롯). 이를 샘플로부터의 전체 중쇄를 조사하여 조사된 모든 신호 웨티드 융합체 사이에 비교적 유사한 수준이 나타난다는 것을 밝혀내었다 (도 3A, 하부 블롯). 경쇄를 α -kLc 항체로 시각화하였을 때, 유사한 결과를 수득하였고, ssDsbA-중쇄 TIR 1 변이체는 다시 최고 수준의 FL-Ab를 나타내었다 (도 3B, 상부 블롯). 놀랍게도, 보다 낮은 질량 종이 결핍된 DsbA TIR 1-중쇄 융합 샘플 - 예측된 경쇄-경쇄 (LL) 이량체 및 유리 경쇄- -이 다른 샘플에서 나타났다. 일반적으로, 번역후 신호 (MalE, PhoA)가 중쇄에 융합되는 경우에 전체 경쇄가 공동-번역 (STII, DsbA) 신호 웨티드 융합체의 경우에서 보다 더 많이 발현되는 것으로 보인다 (도 3B, 하부 블롯). 일반적으로, 하기 위계는 중쇄에 융합된 신호 웨티드 및 전장 항체 생성과 관련하여 관찰되었다: DsbA > STII > MalE > PhoA. 두드러지게, DsbA 변이체 TIR은 상대 TIR 강도를 변화시키지 않았으나 (즉, 두 TIR 모두 강도 1임) STII 변이체 TIR에 비해 (예를 들어, 전장 항체의) 발현을 증가시켰다.
- [0389] 도 4는 경쇄 신호 웨티드 조작의 결과를 보여준다. STII TIR 1 변이체로부터 PhoA TIR 1 또는 2의 변이체로 경쇄 신호 웨티드를 변화시키자 FL-Ab 역가가 주목할 만하게 증가하였다 (도 4, 상부 블롯). 경쇄에 융합된 신호 웨티드의 변형은 발현되는 중쇄의 총량에 영향을 미치는 것으로 나타나지 않았으나 (도 4, 중간 블롯), 존재하는 경쇄의 총량은 유의하게 변경되었으며, 경쇄에 융합된 STII 또는 DsbA TIR 변이체 둘을 갖는 샘플에서 나타나는 프로세싱된 경쇄가 최대로 축적되었다 (도 4, 하부 블롯). 번역후 신호 웨티드에 융합되었을 때, 전체 경쇄 샘플에서 2개의 밴드가 관찰되었으며, 이는 프로세싱되지 않은 경쇄를 나타낸다. 일반적으로, 하기 위계가 경쇄에 대한 신호 웨티드 융합 및 전장 항체 생성과 관련하여 관찰되었다: PhoA \geq MalE > STII > DsbA.
- [0390] 10-L 발효로부터 시간 경과에 따라 항체 종의 어셈블리를 모니터링하여 도 3 및 4에 나타낸 진탕 플라스크 실험과 유사한 결과를 밝혀내었다. 최고 양의 FL-Ab는 중쇄에 융합된 DsbA-유래된 TIR 변이체 및 경쇄에 융합된 DsbA- 또는 PhoA-유래된 신호 웨티드를 갖는 샘플로부터 관찰되었다 (도 5, 상부 블롯). 이들 샘플은 또한 STII TIR 1 중쇄 융합체보다 더 많은 HHL 및 HL 이량체 종을 나타내었다. 추가로, LL 이량체 및 유리 경쇄는 경쇄에 융합된 PhoA TIR 1 신호 웨티드를 갖는 샘플에서 용이하게 시각화할 수 있다. 감소된 총 단백질 샘플을 조사하여 DsbA 신호 웨티드 융합체가 발효의 발현 유도 조건 하에서 STII 융합체보다 더 많은 전체 중쇄를 생성한다는 것을 밝혀내었다 (도 5, 중간 블롯). 경쇄 신호 웨티드 융합체의 경우와 유사하게, DsbA TIR 1 신호 웨티드 융합체에서 STII TIR 1보다 더 높은 경쇄의 축적이 관찰되었다 (도 5, 하부 블롯). 그러나, 경쇄의 최고 축적은 PhoA TIR 1 신호 웨티드 융합체에서 관찰되었다. 진탕 플라스크로부터 취한 전체 경쇄 샘플에서 관찰된 2개의 밴드는 발효 샘플에서의 오직 하나의 밴드와 같이 나타났는데, 이는 10-L 발효 동안 경쇄가 보다 더 효율적으로 프로세싱되었다는 것을 나타낸다.
- [0391] 본 발명자들은 상이한 신호 웨티드를 이. 콜라이 phoA 유전자의 성수 도메인 (m PhoA)에 융합시켜, STII- 또는 DsbA-유래된 TIR 변이체에 융합시키고, 유도 조건하에 진탕 플라스크 배양으로 발현시켰을 때 전체 경쇄 또는 중쇄 발현 수준의 차이를 추가로 조사하였다. 전체 경쇄 및 중쇄 발현 수준에 대한 유사한 효과가 관찰되었다 (도 6). 단백질 발현을 유도하였을 때, m PhoA의 발현은 DsbA 신호 웨티드 융합체에 대한 TIR 강도를 7의 TIR 강도 (본 연구에 사용된 최고 TIR 강도)까지 증가시킴에 따라 함께 상승하였다. 6 또는 8의 TIR 강도에 도달할 때까지 TIR 강도 증가에 따른 m PhoA 발현의 유사한 증가가 STII 신호 웨티드 융합체에서 관찰되었으며, 이에 의해 m PhoA의 양은 STII TIR 3 샘플에 존재하는 m PhoA와 비교하여 감소한 것으로 나타났다. 놀랍게도, DsbA 강도 1 TIR을 사용하여 STII 강도 1 TIR을 사용하는 것 보다 더 많은 중쇄 및 경쇄가 생성되었으며, PhoA의 STII-구동된 전위는 PhoA의 Dba-구동 전위보다 더 낮은 전체 단백질 농도에서 최대량에 도달하였다. 또한, STII로부터 DsbA로의 TIR 서열의 변화는 TIR 효과의 동적 범위를 증가시켰다.
- [0392] 10-L 발효로부터의 샘플을 단백질-L-기반 HPLC 검정을 사용하여 항체 역가에 대해 분석하였다 (표 3). HPLC 데이터는 웨스턴 블롯 분석에 의해 밝혀진 정성 역가 수준과 우수하게 일치하였다 (도 3, 4). STII-유래된 TIR 변이체로부터 DsbA-유래된 TIR 변이체로 중쇄 신호 서열을 변화시켰을 때, FL-Ab 역가가 약 40 내지 90% 증가하였다. 최고 역가는 DsbA 하나의 중쇄 융합체를 DsbA, MalE, 또는 PhoA TIR 1 신호 웨티드에 융합된 경쇄와 쌍

을 이루었을 때 생성되었다. 최고 역가는 경쇄가 MaIE 또는 PhoA TIR 신호 웨티드에 융합되었을 때 생성되었다.

[0393] 대조적으로, FL-Ab 역가는 번역후 신호 웨티드가 중쇄에 융합되었을 때 떨어졌는데, PhoA TIR 1 및 MaIE TIR 1 신호 웨티드 융합체는 각각 역가를 70% 및 60% 떨어뜨렸다. 본 발명자들은 공동-번역 신호 웨티드 (예를 들어, DsbA)를 사용하여 번역을 유도하였을 때 중쇄 발현이 최적화되었다는 결론을 내렸다.

[0394] 본 발명자들은 샤페론 과다발현의 효과를 시험하였다. 샤페론 DsbA 및 DsbC (때때로 본원에서 DsbA/C로 명명됨)의 과다발현은 중쇄에 융합된 DsbA 신호 웨티드 및 경쇄에 융합된 DsbA, PhoA, 또는 MaIE 신호의 이점을 향상시켰다. 중쇄 및 경쇄에 융합된 STII TIR 1 신호 (SS1.1 + 샤페론)에 의해 FL-Ab의 발현과 비교하였을 때, FL-Ab 역가의 대략 2배 내지 2.5배 증가가 MaIE, PhoA, 또는 DsbA TIR 1 경쇄 융합체와 커플링된 DsbA TIR 1-중쇄 융합체에서 관찰되었다.

[0395] 본 발명자들은 항체의 경쇄 및 중쇄에 융합된 신호 웨티드와 최종 항체 역가 사이의 관련성을 조사하였다. 완전히-어셈블리된 항체 (FL-Ab) 역가는 공동-번역 (예를 들어, DsbA 또는 STII) 신호 웨티드가 중쇄의 N-말단에 융합되었을 때 최고였으며, DsbA-유래된 TIR 변이체가 최대 관찰된 FL-Ab 수율을 나타내었다. 따라서, DsbA TIR 변이체는 유도 조건하에 STII TIR 변이체가 그러한 것 보다 높은 폐신저 단백질의 번역 수준을 허용할 수 있으며, 이에 의해 프로세싱된 폐신저 단백질의 보다 높은 발현 수준을 나타낼 수 있다. 대조적으로, 항체 역가는 번역후 신호 웨티드 (즉, MaIE 또는 PhoA)가 중쇄에 융합되었을 때 현저하게 떨어졌다. 이 효과는 단백질 분해 때문일 수 있거나 또는 중쇄로 이어지는 상이한 폴딩 경로 때문일 수 있다 (6). 중쇄에 융합된 PhoA 또는 MaIE TIR 1 신호 웨티드를 발현하는 샘플로부터의 전체 중쇄 수준을 조사하여, 잠재적으로 프로세싱되지 않은 중쇄의 존재 때문인 걸보기 질량의 약간의 이동을 밝혀내었다 (도 3A, 하부 블롯).

[0396] 번역후 신호 웨티드 MaIE-유래된 또는 PhoA-유래된 TIR 변이체의 경쇄로의 융합체는 10L 발효 동안 STII-매개된 전위 상에서 프로세싱된 경쇄의 대규모 축적 및 증가된 항체 역가를 유발한다 (도 5, 하부 블롯). STII TIR 변이체에 의해 전위된 경쇄와 비교하여 두 경쇄 뿐만 아니라 FL-Ab의 증가된 수율이 또한 경쇄가 DsbA TIR 변이체에 의해 전위되었을 때 관찰되었다. 그러나, DsbA TIR 1 변이체로부터 발현된 전체 경쇄의 양은 PhoA 또는 MaIE TIR 1 변이체로부터의 양에 큰 것을 아니었다. 흥미롭게도, 10-L 발효로부터 시간 경과에 따라 취한 샘플의 분석은 MaIE, DsbA, 또는 PhoA TIR 변이체에 융합된 경쇄를 사용한 수행으로부터의 FL-Ab 역가가 시간 경과에 따라 계속 상승하는 한편 STII TIR 변이체로의 융합이 보다 낮은 최대 역가에 도달하였을 뿐만 아니라 훨씬 더 이른 시점에 역가 수준에 도달하였다는 것을 나타낸다 (도 5, 상부 블롯). 따라서, 이들 데이터는 경쇄가 공동-번역 또는 번역후 방식으로 효과적으로 전위될 수 있는 한편 중쇄는 피크 발현을 위해 공동-번역 전위를 필요로 한다는 것으로 시사한다.

[0397] 1-아암 항-c-met 항체의 발현: 본 발명자들은 1-아암 항체의 경쇄, 중쇄 및 Fc에 융합된 신호 웨티드와 최종 항체 역가 사이의 관련성을 조사하였다. 플라스미드는 경쇄, 중쇄, 및 Fc 폴리웨티드의 경우 1의 TIR을 갖는 STII 신호 서열을 사용하고, 경쇄의 경우 1의 TIR을 갖는 PhoA 신호 서열 (서열 29) 및 중쇄 및 Fc 단편의 경우 1의 TIR을 갖는 DsbA 신호 서열 (서열 40)을 사용하고; 경쇄 및 Fc 단편의 경우 1의 TIR을 갖는 PhoA 신호 서열 및 HC의 경우 1의 TIR을 갖는 DsbA 신호 서열을 사용하여 구축하였다. 상대 역가 수는 수행 샘플의 종료시의 것이고, 상기 기재된 단백질 L-역상 HPLC 검정을 사용하여 측정하였다. 상대 역가 값을 표 4의 제1열의 경우 - STII 신호 서열 및 LC, HC, 및 Fc의 경우 TIR = 1 (DsbA/C의 공동 발현의 부재) - 에 대한 역가로 정상화시켰다.

[0398] 결과를 표 4에 나타내었다. 1-아암 항체 상대 역가는 공동-번역 (예를 들어, DsbA) 신호 웨티드가 중쇄의 N-말단에 융합되었을 때, 번역후 (예를 들어, PhoA) 신호 웨티드가 경쇄의 N-말단에 융합되었을 때, 및 번역후 (예를 들어, PhoA) 신호 웨티드가 Fc 영역에 융합되었을 때 최고였으며, DsbA/C의 존재하에 발현시켰다. 일반적으로, 하기 위계는 경쇄, 중쇄 및 Fc 단편에 융합된 신호 웨티드와 관련하여 관찰되었으며, 1-아암 항체는 DsbA/C의 존재하에 발현시켰다: P.D.D > P.D.P.> S.S.S. DsbA/C의 부재하의 발현 수준은 모든 시험된 샘플에서 유사하였고, 여기서 주변세포질로 분비된 대부분의 항체가 축적되었다. 디슬피드 결합 샤페론의 공동-발현은 생성되는 폴딩된 항체를 증가시켜, TIR 최적화에 의해 실현된 증가된 항체 발현을 나타내었다.

표 4

1가 1-아암 항-c-met 항체 MetMAb의 발현.

플라스미드	LC, HC, Fc	DsbA/C	상대 역가
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	Lc, Hc 및 Fc에 대한 STII TIR 1	-	1.0
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	Lc, Hc 및 Fc에 대한 STII TIR 1	+	1.7
pPDD.111.MetMAb	Lc에 대한 PhoA TIR 1, Hc 및 Fc에 대한 DsbA TIR 1	-	1.0
pPDD.111.MetMAb	Lc에 대한 PhoA TIR 1, Hc 및 Fc에 대한 DsbA TIR 1	+	3.8
pPDP.111.MetMAb	Lc에 대한 PhoA TIR 1, Hc에 대한 DsbA TIR 1, Fc에 대한 PhoA TIR	-	0.7
pPDP.111.MetMAb	Lc에 대한 PhoA TIR 1, Hc에 대한 DsbA TIR 1, Fc에 대한 PhoA TIR	+	2.5

[0399]

[0400] 약어: D = 신호 서열 DsbA P = 신호 서열 PhoA. XXX#.#.# (예를 들어, PDP.111)은 실험에 사용된 경쇄 신호 서열, 중쇄 신호 서열, Fc 신호 서열, 경쇄 TIR, 중쇄 TIR, Fc TIR을 나타낸다.

[0401] 요약하여, 이 기술은 예를 들어 이. 콜라이에서 TIR 변이체의 새로운 어레이로부터로의 선택을 통한 및 경쇄의 경우 공동-번역 또는 번역후 신호 서열의 사용 및 중쇄의 경우 공동-번역 신호 서열의 사용에 의한 경쇄 및 중쇄의 조작을 통해 풀딩된 항체 수율을 증가시키기 위한 새로운 수단을 제공한다. 중쇄, 경쇄 및 Fc 영역을 포함하는 1-아암 항체의 개선된 발현은 또한 본원에 개시된 신규 TIR 변이체를 사용하고, 또한 경쇄의 경우 공동-번역 또는 번역후 신호 서열을 사용하고, 중쇄의 경우 공동-번역 신호 서열을 사용하고, 생성된 Fc 폴리펩티드의 경우 공동-번역 또는 번역후 신호 서열을 사용하여 달성되었다. 이 방법의 유용성은 전체적으로 광범위한 항체 (예를 들어, 늄 및 홀 돌연변이를 포함하는 이중특이적 항체), 항체 유도체 및 박테리아-기반 제조합 단백질 생성에 광범위하게 적용가능한 것으로 나타났다.

[0402]

부분 참고문헌 목록

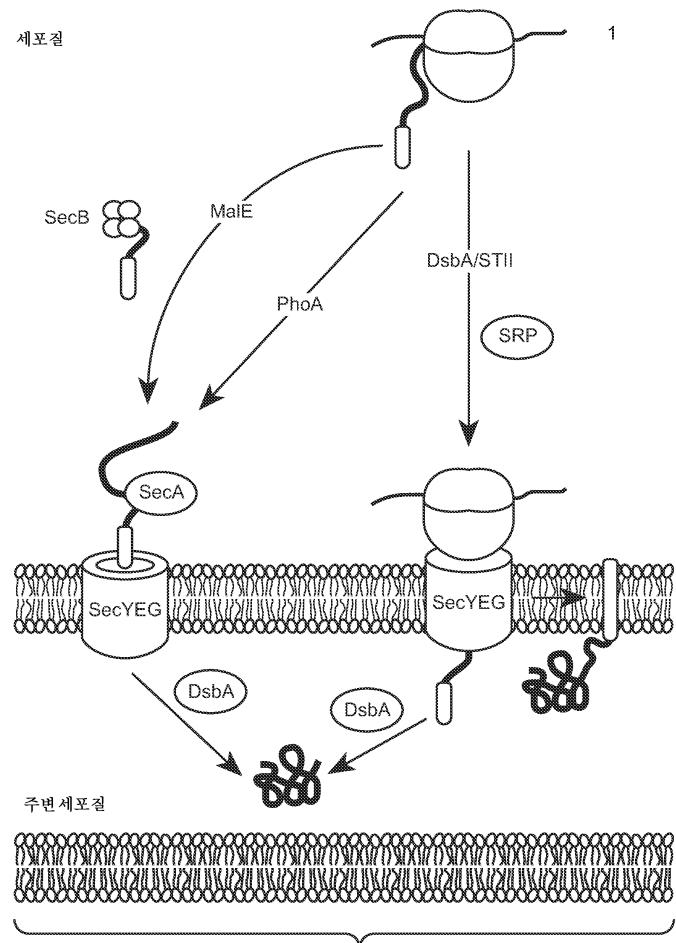
1. Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R. L., Damico, L. A., Rancatore, P., and Yansura, D. G. (2002) Journal of immunological methods 263(1-2), 133-147
2. Stemmer, W. P., Morris, S. K., Kautzer, C. R., and Wilson, B. S. (1993) Gene 123(1), 1-7
3. Simmons, L. C., and Yansura, D. G. (1996) Nature biotechnology 14(5), 629-634
4. Le Calvez, H., Green, J. M., and Baty, D. (1996) Gene 170(1), 51-55
5. Jackson, R. W., and DeMoss, J. A. (1965) Journal of bacteriology 90(5), 1420-1425
6. Kadokura, H., and Beckwith, J. (2009) Cell 138(6), 1164-1173

[0403]

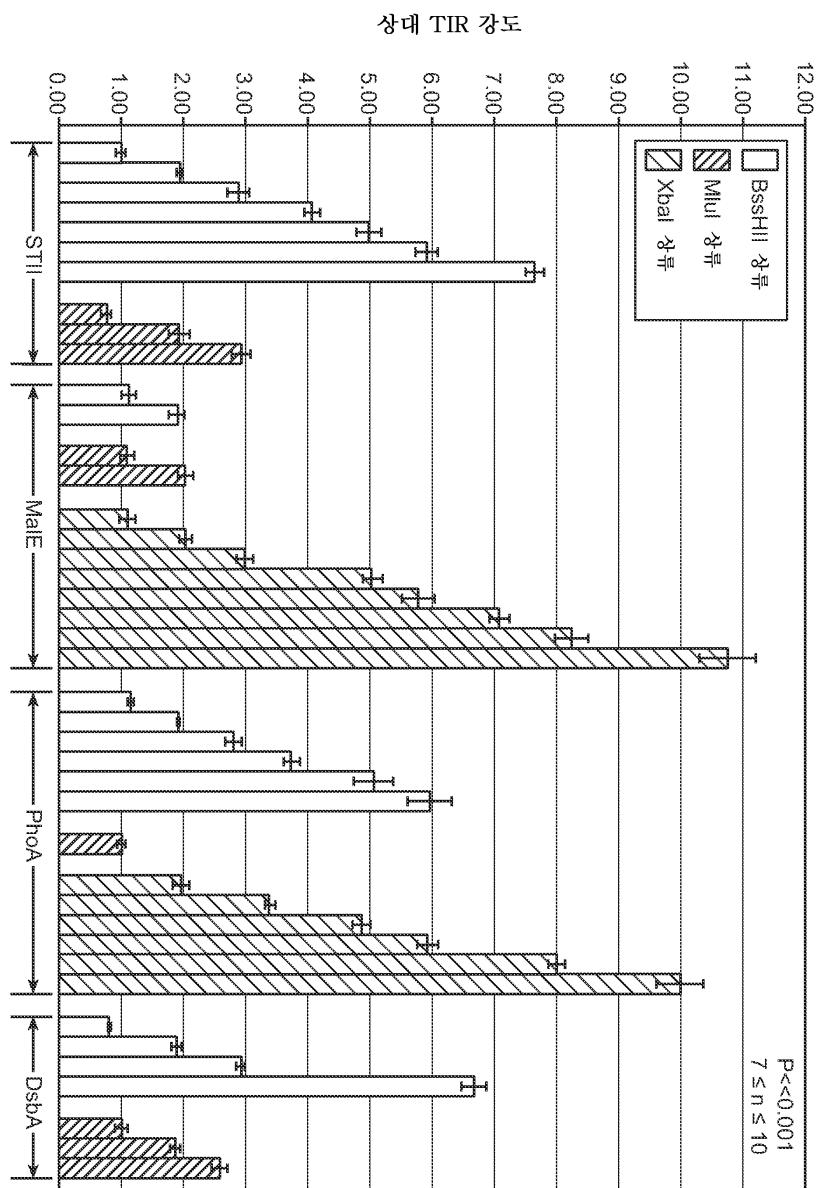
[0404] 상기 내용이 특정한 실시양태에 관해 언급할지라도, 본 발명이 이에 제한되지는 않는다는 것이 이해될 것이다. 당업자는 본 발명의 전체적인 개념을 바꾸지 않으면서 개시된 실시양태를 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 모든 이러한 변형은 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

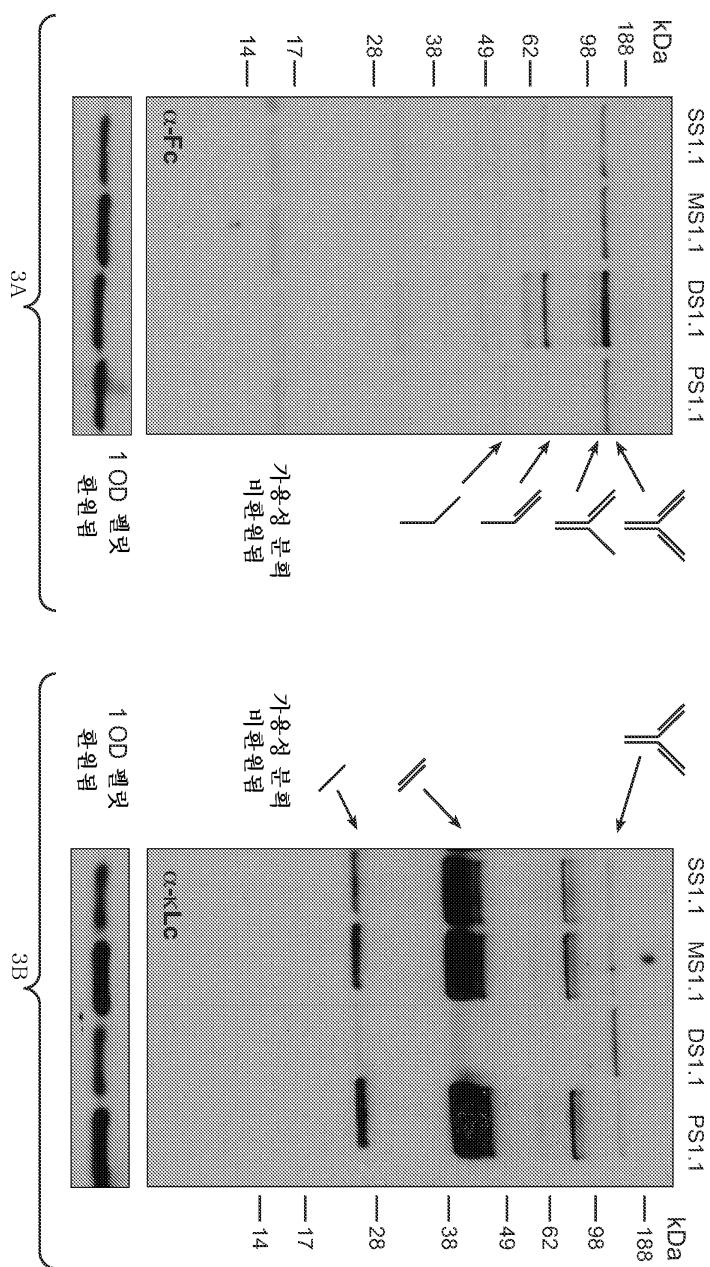
도면1



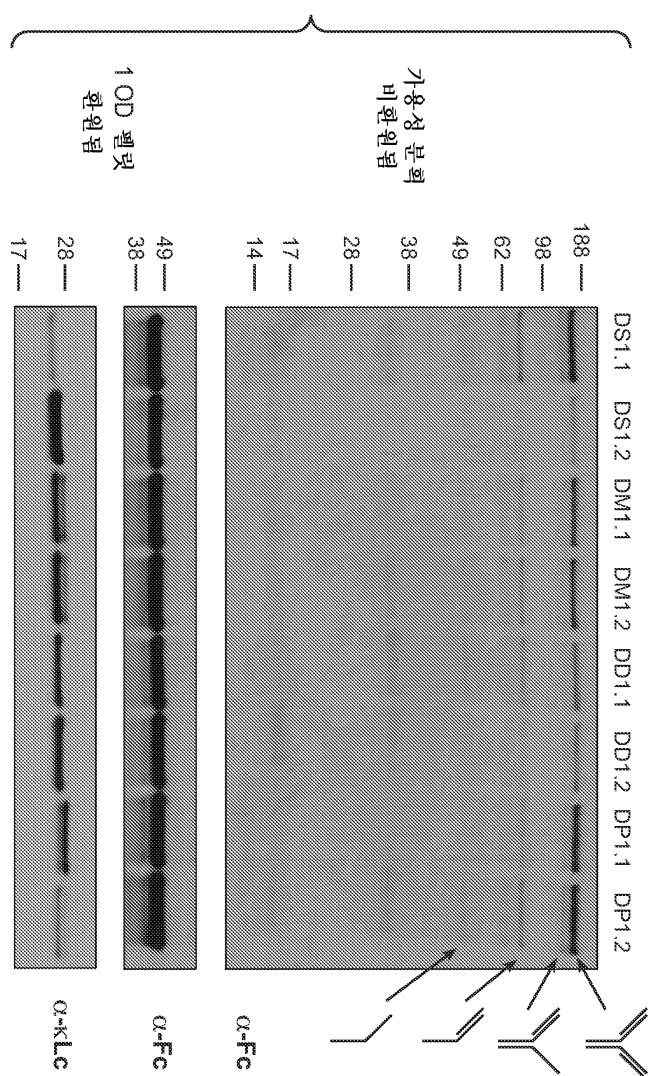
도면2



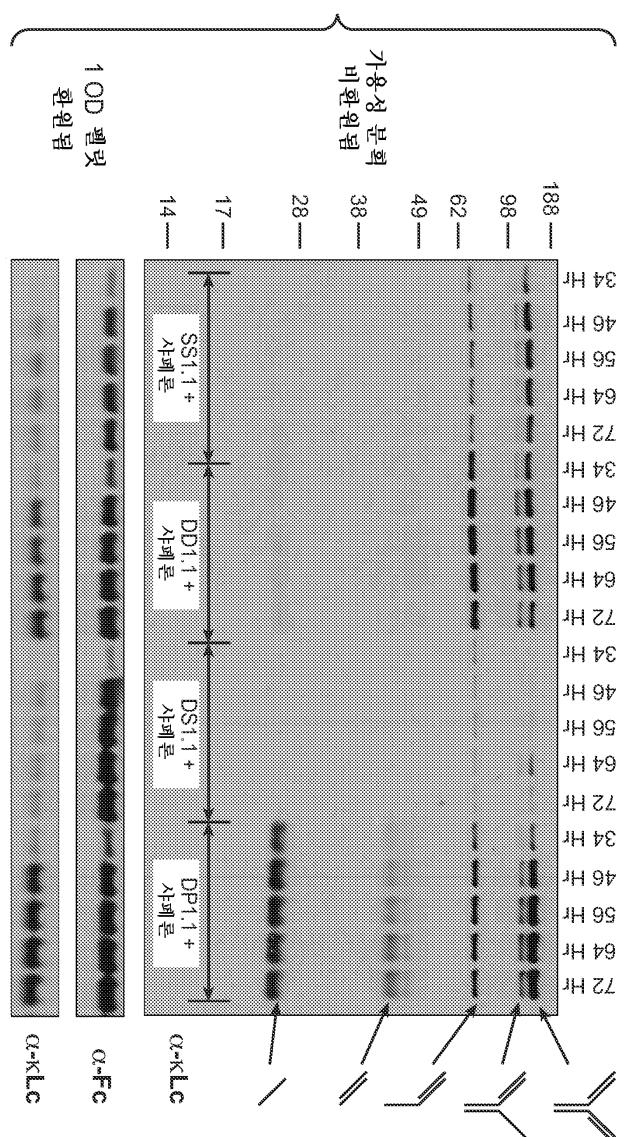
도면3



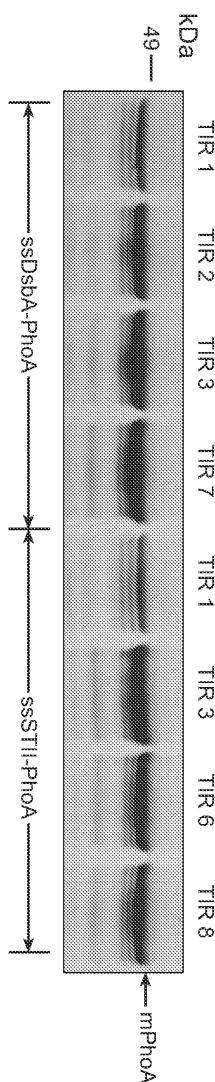
도면4



도면5



દોર્ચ 6



도면7

5D5.v2 경색

FR1-LC:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
FR2-LC:	WYQQKPKGKAPKLIV
FR3-LC:	GVPSRFSGSGSGTDFLTLSQPEDFATYYC
FR4-LC:	FQQTKEIKR
CDR1-LC:	KSSQSLLYTSSOKNYLA
CDR2-LC:	WASTRES
CDR3-LC:	QYYAYPWT
CL1:	TVAPSVFIPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSOESVTEQDSK DSTYSLSSTLTSKADYEKKHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5D5.v2 중쇄

FR1-HC:	EVOLVESGGGVQPGGSSLRLSCAAS
FR2-HC:	WVRQAPGKGLEWW
FR3-HC:	RFTISADTSKNNTAYLQMNSLRAEDTAWYYC
FR4-HC:	WGQGLTVTSS
CDR1-HC:	GYTTFSYWLH
CDR2-HC:	GMDPSNSDTRFPNPKD
CDR3-HC:	ATYRSVYPLDY
CH1:	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSWTVPPSSLGQTQTYCNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDTIMISRTPEVTCVVWDVSHEDPEVKFNWYDGVEVH NAKTKPREEQVNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDAVEWESNGQFENNYKTTPVLDSDGSFL VSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면8

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLWCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH INC.

<120> METHODS AND COMPOSITION FOR SECRETION OF HETEROLOGOUS
POLYPEPTIDES

<130> P4386R1 WO

<140><141><150> 61/258,565

<151> 2009-11-05

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 1

gcgcgcattatgaagaaaaacatcgctttcttcttgcattatgttcgtttttctatt 60

gctacaaacgccttacgct 78

<210> 2

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 2

gcgcgcattatgaaaaaaaaatagcgctttcttcttgcattatgttcgtttttctatt 60

gctacaaacgccttacgct 78

<210> 3

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 3

gcgcgcattatgaaaaaaaaataggcctttcttcttgcattatgttcgtttttctatt 60

gctacaaacgccttacgct 78

<210> 4

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 4

gcgcgcatta taaaaagaa tattgcctt cttcttgcat ctatgtcgt ttttctatt	60
gctacaaacg cttacgct	78

<210> 5

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 5

gcgcgcatta taaaagaaaa tattgcattc cttcttgcat ctatgtcgt ttttctatt	60
gctacaaacg cttacgct	78

<210> 6

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 6

gcgcgcatta tgaaaaaaaaa tattgcattt cttcttgcat ctatgtcgt ttttctatt	60
--	----

gctacaaacg cttacgct	78
---------------------	----

<210> 7

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 7

gcgcgcatta taaaaaaa tattgcttt cttttgtat ctatgttcgt ttttctatt	60
gctacaaacg cttacgct	78

<210> 8

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 8

acgcgttata taaaagaaaa catcgcttt cttttgtat ctatgttcgt ttttctatt	60
gctacaaacg cttacgct	78

<210> 9

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 9

acgcgttata tgaaaaagaa tatcgccctt cttttgtat ctatgttcgt ttttctatt	60
gctacaaacg cttacgct	78

<210> 10

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 10

acgcgttata tgaaaaaaa tattgcttt cttcttgcatt ctatgtcgt tttttctatt 60
gctacaaacg cttagct 78

<210> 11

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 11

gcgcgcattttt tgaaaattaa gactggagca cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg 60

atgatgtttt ccgcctcgcc tctcgcc 87

<210> 12

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 12

gcgcgcattttt tgaagattaa aaccggagcc cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg 60
atgatgtttt ccgcctcgcc tctcgcc 87

<210> 13

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 13

acgcgttata tgaagatcaa gacaggcgcg cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg 60
atgatgtttt ccgcctcgcc tctcgcc 87

<210> 14

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 14

acgcgtatta tgaagatcaa gacaggggcc cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgttt ccgcctcgcc tctcgcc	87

<210> 15

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 15

tctagaatta tgaaaataaa aacaggtgca cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgttt ccgcctcgcc tctcgcc	87

<210> 16

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 16

tctagaatta tgaaaattaa gacggggcg cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg	60
--	----

atgatgttt ccgcctcgcc tctcgcc	87
------------------------------	----

<210> 17

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 17

tctagaatta taaaaatcaa aaccggcgtt cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgtttt ccgcctcgcc tctcgcc	87

<210> 18

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 18

tctagaatta taaaatcaa gactggagctt cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgtttt ccgcctcgcc tctcgcc	87

<210> 19

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 19

tctagaatta taaaataaa gacgggagctt cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgtttt ccgcctcgcc tctcgcc	87

<210> 20

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

oligonucleotide"

<400> 20

tctagaatta tgaagataaa gactggtgcg cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgttt ccgcctcgcc tctcgcc	87

<210> 21

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 21

tctagaatta tgaaaattaa gacgggagca cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg	60
---	----

atgatgttt ccgcctcgcc tctcgcc

<210> 22

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 22

tctagaatta tgaagattaa gacgggcgt cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgttt ccgcctcgcc tctcgcc	87

<210> 23

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 23

gcgcgattta tgaacaatc cacgattgcc ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
---	----

gtgacaaaag cc	72
<210> 24	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 24	
gcgcgcatta taaaacatgc gacgatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 25	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 25	
gcgcgcatta taaaacaaag cactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 26	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 26	
gcgcgcatta taaaacaatc tactatcgct ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 27	
<211> 72	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 27

gcgcgcatta tgaagcaatc aactatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72

<210> 28

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 28

gcgcgcatta tgaacaatc tactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72

<210> 29

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 29

acgcgttata taaaacagtc tactatcgct ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72

<210> 30

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 30

tctagaatta tgaaggcagag tacgattgt ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 31

tctagaatta tgaaaacaaag cactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
---	----

gtgacaaaag cc	72
---------------	----

<210> 32

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 32

tctagaatta tgaagcaatc cacaatagct ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72

<210> 33

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 33

tctagaatta tgaacaatc caccattgcc ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 34	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 34	
tctagaatta tgaaacagtc tactatcgcg ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 35	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 35	
tctagaatta tgaacaatc cacaatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 36	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 36	
gcgcgcattta tgaaaaaaat ttggctcgcc ctggctggtt tagtttagc gtttagcgca	60
tcggcg	66
<210> 37	

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 37

gcgcgcatta taaaaagat ttggctggcg ctggctggtt tagtttagc gtttagcgca	60
tccgcg	66

<210> 38

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 38

gcgcgcatta taaaaagat atggctggct ctggctggtt tagtttagc gtttagcgca	60
tccgcg	66

<210> 39

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 39

gcgcgcatta taaaaagat atggctggct ctggctggtt tagtttagc gtttagcgca	60
tccgcg	66

<210> 40

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 40

acgcgtatta taaaaat ttggctggcg ctggctggtt tagtttagc gtttagcgca	60
tcggcg	66

<210> 41

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 41

acgcgtatta taaaat ttggctggct ctggctggtt tagtttagc gtttagcgca	60
--	----

tcggcg	66
--------	----

<210> 42

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 42

acgcgtatta taaaat ttggctggct ctggctggtt tagtttagc gtttagcgca	60
tcggcg	66

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 43

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

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 44

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30
 Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

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

<210> 45

<211> 449

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		15
20	25	30
Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser		
355	360	365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 46
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 46
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr

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

85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

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

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 47

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 47

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 48
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 48
 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 49

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 50

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 51

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr

1

5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 52

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His

1	5	10
---	---	----

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 53

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys Asp

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference with respect to that in the annotation for said position"

<400> 54

Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 55

Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 56

Ser Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 57

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 58

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 59

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 60

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 61

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 61

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 62

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 62

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 63

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

1 5 10

<210> 64

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 65

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 66

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 67

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 67

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

100 105

<210> 68

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 68

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys

85 90 95

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

100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val

130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

165

170

175

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

180

185

190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

195

200

205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210

215

220