



등록특허 10-2089526



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월17일  
(11) 등록번호 10-2089526  
(24) 등록일자 2020년03월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/46* (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)  
*G01N 33/53* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 16/46* (2013.01)  
*C07K 16/18* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7017228(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년05월10일  
심사청구일자 2019년06월19일
- (85) 번역문제출일자 2019년06월14일
- (65) 공개번호 10-2019-0073592
- (43) 공개일자 2019년06월26일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7004783  
원출원일자(국제) 2013년05월10일  
심사청구일자 2019년02월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/040575
- (87) 국제공개번호 WO 2013/170168  
국제공개일자 2013년11월14일
- (30) 우선권주장  
61/645,302 2012년05월10일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2011133886 A2\*

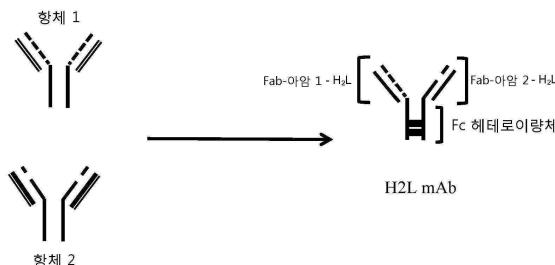
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **다중-특이적 모노클로날 항체****(57) 요약**

본 발명은 다수의 항원에 특이적으로 및 친화적으로 결합하는 능력에 의해 구분되는 다중-특이적 항체의 생성에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 이-특이적 항체에 관한 것이다.

**대 표 도** - 도1

(52) CPC특허분류

*C07K 16/461* (2013.01)

*G01N 33/53* (2018.05)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

경쇄(LC1) 및 중쇄(HC1)를 포함하는 항원 1로 결합하는 항체, 및 경쇄(LC2) 및 중쇄(HC2)를 포함하는 항원 2로 결합하는 다른 하나의 항체로부터 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 상기 중쇄들(HC1, HC2)의 면역글로불린 중쇄 가변 항체 영역들을 기능적으로 보완하는 단일 면역글로불린 경쇄 가변 항체 영역을 확인하는 단계로서, 상기 확인 단계는:

(i) 상기 항원 1로 결합하는 항체들에 대해 상기 경쇄(LC1)를 진화시킴으로써 생성된 LC1 라이브러리를 상기 중쇄(HC1)의 면역글로불린 중쇄 가변 항체 영역과 공동-발현시킴으로써 생성된 항체 라이브러리를 스크리닝(screening)하는 단계;

(ii) 상기 항원 2로 결합하는 항체들에 대해 상기 경쇄(LC2)를 진화시킴으로써 생성된 LC2 라이브러리를 상기 중쇄(HC2)의 면역글로불린 중쇄 가변 항체 영역과 공동-발현시킴으로써 생성된 다른 하나의 항체 라이브러리를 스크리닝(screening)하는 단계; 및

(iii) 항체를 :

(1) 상기 항원 1로 결합하는 (i) 단계로부터의 항체들의 경쇄들을 상기 중쇄(HC2)의 상기 면역글로불린 중쇄 가변 항체 영역과 공동-발현시켜 상기 항원 2로 결합하는 항체에 대한 선택, 또는

(2) 상기 항원 2로 결합하는 (ii) 단계로부터의 항체들의 경쇄들을 상기 중쇄(HC1)의 상기 면역글로불린 중쇄 가변 항체 영역과 공동-발현시켜 상기 항원 1로 결합하는 항체에 대한 선택,

을 통해 선택하는 단계로서,

(1) 단계 또는 (2) 단계에서 선택된 항체의 경쇄 가변 영역은 상기 중쇄들(HC1, HC2)의 면역글로불린 중쇄 가변 항체 영역들을 기능적으로 보완하는 면역글로불린 경쇄 가변 영역인, 항체를 선택하는 단계;

에 의해 수행되는, 확인 단계;

(b) 상기 중쇄들(HC1, HC2)의 2개의 상이한 면역글로불린 중쇄 가변 항체 영역들 중 각각을, 변형된 IgG 불변 도메인들이 면역글로불린 중쇄 호모-이랑체들을 형성하기 위해 더 이상 어셈블링(assemble)할 수 없도록, 상기 변형된 IgG 불변 도메인과 프레임 내에서 클로닝(cloning)하는 단계; 및

(c) (a) 단계에서 선택된 상기 면역글로불린 경쇄(LC) 가변 항체 영역을 (b) 단계에서 클로닝(cloning)된 상기 중쇄들(HC1, HC2)의 상기 2개의 상이한 면역글로불린 중쇄(HC) 가변 항체 영역들과 호스트 세포에서 공동-발현시켜 상기 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 생성하는 단계;

를 포함하는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 IgG 불변 도메인은 다른 면역글로불린 중쇄의 CH3 도메인에서 디자인된 구멍에 맞는 하나의 면역글로불린 중쇄의 CH3 도메인으로의 아미노산 측쇄의 도입에 의해 변형되는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 하나 이상의 특성들을 개선하기 위해 상기 경쇄 또는 상기 2개의 중쇄들 중 하나를 진화시키는 부가적인 단계를 더 포함하는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

**청구항 4**

제3항에 있어서,

상기 하나 이상의 특성들이 평형 해리 상수( $K_D$ ); 안정성; 용융 온도( $T_m$ ); pI: 용해도: 발현 수준; 감소된 면역원성 및 개선된 이펙터(effecter) 기능으로부터 선택되는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

**청구항 5**

제3항에 있어서,

상기 부가적인 진화 단계는 포괄적 위치상 진화(CPE): 포괄적 위치상 삽입 진화(CPI); 포괄적 위치상 결실 진화(CPD); 포괄적 위치상 진화(CPE)에 이은 조합적 단백질 합성(CPS); 및 포괄적 위치상 결실 진화(CPD)에 이은 조합적 단백질 합성(CPS) 중 하나를 포함하는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

**청구항 6**

제1항에 있어서,

상기 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 유기 모이어티(moiety)에 접합시켜 접합된, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 생성하는 단계를 더 포함하는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서,

상기 중쇄들(HC1, HC2)은 모두 동일한 모(母) 항체로부터 유도되는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

제1항에 있어서,

상기 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체는 3개의 에피토프들(epitopes)을 특이적으로 결합하는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서,

상기 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체는 4개의 에피토프들(epitopes)을 특이적으로 결합하는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서,

상기 호스트 세포는 3T3 마우스 섬유아세포들; BHK21 시리안 햄스터 섬유아세포들; MDCK 개 상피 세포들; HeLa 사람 상피 세포들; PtK1 캥거루쥐 상피 세포들; SP2/0 마우스 혈장 세포들; NSO 마우스 혈장 세포들; HEK 293 사람 배아 신장 세포들; COS 원숭이 신장 세포들; CHO CHO-S 쳐이니즈 햄스터 난소 세포들; R1 마우스 배아 세포들; E14.1 마우스 배아 세포들; H1 사람 배아 세포들; H9 사람 배아 세포들; PER C.6 사람 배아 세포들; 에스. 세레비지애 효모 세포들(*S. cerevisiae* yeast cells); 및 퍼치아 효모 세포들(*pichia* yeast cells)로부터 선택된 진핵생물 호스트 세포 라인인, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

### 청구항 13

제1항에 있어서,

상기 호스트 세포가 원핵생물 호스트 세포인, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

### 청구항 14

제1항에 있어서, 상기 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 제조하는 단계를 더 포함하는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

### 청구항 15

제1항에 있어서,

(d) 제조 호스트에서 한 세트의 진화된 다중-특이적 항체들을 생성하기 위해 제1항의 상기 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 진화시키는 단계;

(e) 상기 진화된 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체들의 세트를 스크리닝( screening)하는 단계;

(f) 개선된 특성을 갖는 상기 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 선택하는 단계;

(g) 유기 모이어티를 포함하는 변형된 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 제공하기 위해 상기 선택된, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 변형시키는 단계: 및

(h) 상기 변형된, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 상기 제조 호스트에서 생성하는 단계;

를 추가로 포함하는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

### 청구항 16

제15항에 있어서,

상기 제조 호스트는 3T3 마우스 섬유아세포들; BHK21 시리안 햄스터 섬유아세포들; MDCK 개 상피 세포들; HeLa 사람 상피 세포들; PtK1 캥거루쥐 상피 세포들; SP2/0 마우스 형질 세포들; NSO 마우스 형질 세포들; HEK 293 사람 배아 신장 세포들; COS 원숭이 신장 세포들; CHO CHO-S 쳐이니즈 햄스터 난소 세포들; R1 마우스 배아 세포들; E14.1 마우스 배아 세포들; H1 사람 배아 세포들; H9 사람 배아 세포들; PER C.6 사람 배아 세포들; 에스. 세레비지애 효모 세포들(*S. cerevisiae* yeast cells); 및 퍼치아 효모 세포들(*pichia* yeast cells)로부터 선택되는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

### 청구항 17

제1항에 있어서,

상기 경쇄들(LC1, LC2) 또는 상기 중쇄들(HC1, HC2)이 승인된 단백질 치료제 (ethical protein therapeutic drug)로부터 유도되는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

### 청구항 18

제1항에 있어서,

상기 스크리닝 단계 (i) 및 (ii)는 정성적 ELISA, 친화성 ELISA, ELISPOT, 유동 세포분석, 면역세포학, Biacore® 표면 페라스몬 공명 분석, Sapidyne KinEx A™ 동력학 배제 검정, SDS-PAGE, 웨스턴 븍롯(Western blot), 및 HPLC로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

### 청구항 19

제15항에 있어서,

상기 스크리닝 단계 (e)는 정성적 ELISA, 친화성 ELISA, ELISPOT, 유동 세포분석, 면역세포학, Biacore® 표면 페라스몬 공명 분석, Sapidyne KinEx A™ 동력학 배제 검정, SDS-PAGE, 웨스턴 븍롯(Western blot), 및 HPLC로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

## 청구항 20

제1항에 있어서,

상기 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체는 5개 이상의 에피토프들(epitope)을 특이적으로 결합하는, 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체의 생성 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 다수의 항원에 특이적으로 및 친화적으로 결합하는 능력에 의해 구분되는 다중-특이적 항체의 생성에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 이-특이적 항체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 하나 초과의 표적물에 결합하는 다른 다중-특이적 단백질에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 저친화성(약 >1uM) 항체는 종종 다수의 항원에 결합하는 것으로 잘 알려져 있는데 반하여, 친화도 성숙 및 최적화에 대한 자연적 및 인위적 과정들(지시된 진화(evolution) 또는 분자 진화)은 전형적으로 분자의 오로지 단일 에피토프에 대한 친화도 및 특이성 모두를 높은 긴밀도로 증가시키도록 디자인된다. 일반적으로, 대부분의 적용에 대해, 특이성이 가장 중요한 특성이며, 예를 들어, 치료학에서 특이성은 분자의 안전성을 감소시킬 수 있는 표적을 벗어난 영향을 방지할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 특히, 예를 들어, 암과 관련된 질환과 같은 다수의 활성화 경로들이 있는 질환을 치료하기 위해, 제한된 수(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10, 바람직하게는 2 또는 3)의 선택된 표적 항원에 결합하는 능력이 상당히 유용하다. 보통의 모노클로날 항체를 사용한 암에 대한 면역요법은 T-세포를 활성화시키지 않는데, 이는 상기 항체가 Fc-수용체를 발현하지 않기 때문이다. 이-특이적 항체(하나의 아암은 종양 마커에 결합하고, 하나의 아암은 T-세포 특이적 표면 항원, 예를 들어, CD3에 결합)는 이러한 문제를 극복하고 종양 세포와 T-세포를 연결할 수 있다. 또한, 삼-기능성 항체(2개의 상이한 결합 특이성 및 온전한 Fc 도메인을 갖는 IgG)는 대식구 및 수지상 세포와 같이 Fc 수용체 발현 세포에 결합할 수 있다. 이 경우, 종양 세포는 추후 이를 파괴시키는 면역계의 1 또는 2개의 세포에 연결된다.

[0003] 몇몇 그룹들이, 예를 들어, 2개의 독립적인 항체의 중쇄를 디설파이드 결합 환원을 통해 커플링을 해체시킨 후 항체를 산화 환경하에 재결합시켜 이가 IgG 분자의 Fab가 상이하고 별개의 항원에 결합하는 이종 항체를 제조함으로써, 이-특이적 항체를 디자인하려고 노력해 왔다. 이러한 접근법은 동일한 표적 분자에 대해 결합력이 없고 생성물 생성 및 정제 과정에 돈이 많이 드는 단점이 있다. 또한, 각각의 항원 결합 포켓이 단일 항체 분자 상에서 상이한 항원 특이성을 가질 수 있도록 항체 상에 항원 결합 포켓을 효과적으로 복제시키는, Fab 내에서의 서열 확장을 포함하는 다른 계획도 개발되었다. 이는 제조 및 정제를 단순화시키는 반면, 구조가 사람 신체와 맞지 않고 환자에서 부정적 면역 반응을 자극하는 위험이 있다. 또 다른 그룹들도 다중-에피토프 결합을 달성하기 위해 새로운 공유 결합을 이용함으로써 "항체-유사" 분자를 생성하였다.

[0004] 종래의 이-특이적 또는 다중-특이적 항체는 제조가 어려울 수 있다. 예를 들어, 이들 항체들은 2개의 개별적인 중쇄 및 2개의 개별적인 경쇄를 동일한 세포에서 발현시켜 작제될 수 있으나[Quadroma technology, Milstein et al., 1983], 이러한 접근법은 문제가 있으며, 이는 목적하는 경쇄1/중쇄1 - 중쇄2/경쇄2 혼테로-이량체 이외에 총 10개의 가능한 중쇄 및 경쇄 조합을 형성할 것이기 때문이다 [Suresh et al., 1986]. 바람직하지 못한 경쇄/중쇄 페어링의 결합 친화도 및 특이성은 미지이다. 생성된 집단의 가능한 경쇄/중쇄 어셈블링의 복잡성을 줄이기 위한 작업은, 중쇄의 Fc 부분을 호모-이량체 중 일부의 형성을 제거하도록 변형시킬 수 있는, "눕 인 홀(knob in hole)" 디자인[Ridgeway et al., 1996, 본원에 참조로 포함됨]과 같은 방법을 포함한다. 그러나 상기 집단은 이들 변형으로도 종래의 기술과 더불어 여전히 매우 복잡하다. 목적하는 이특이적(또는 다중특이적) 생성물은 혼합물 중 단지 소분획이어서, 이특이적(다중특이적) 항체의 정제를 어렵게 하고 때때로 많은 경우에 시판 규모로는 실시할 수 없다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기 문제점을 해소하기 위해 안출된 것으로, 다중-특이적 모노클로날 항체를 제공함에 그 목적이 있

다.

### 과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 다중-특이적 항체는 다수의 항원을 특이적 및 친화적으로 (예: <10nM) 결합하는 능력으로 구별된다. 하나의 양태에서, 본 발명의 다중-특이적 항체는 2개의 상이한 중쇄 가변 도메인 (2개 이상의 상이한 항원을 결합), 중쇄 가변 도메인 모두에 맞거나 중쇄 모두에 맞도록 최적화된 단일 경쇄 가변 도메인 및 헤테로이량체를 형성하거나 헤테로이량체를 형성하도록 최적화된 Fc를 포함한다. 본 발명의 다중-특이적 항체의 작제는 수개의 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나의 접근법에서, 2개의 모 모노클로날 항체의 가변 도메인은, 동일한 단일 경쇄가 모 항체로부터의 중쇄 모두를 기능적으로 보완할 수 있도록, 본원에서 기술되는 방법을 포함한 수개의 방법 중 하나를 이용하여 진화된다. 또한, 단일 모 항체의 중쇄가 제2의 표적물에 결합할 수 있도록 단일 모 항체의 중쇄를 진화시켜 새로운 중쇄를 생성한 후 새로운 중쇄를 모 항체로부터의 경쇄와 페어링할 수 있다. 또 다른 접근법에서는, 단일 모 항체의 경쇄가 제2의 표적물에 결합할 수 있도록 진화시켜 새로운 경쇄를 생성한 후 새로운 경쇄를 모 항체로부터의 중쇄와 페어링할 수 있다. 본 발명의 다중-특이적 항체의 헤테로이량체를 형성하는 Fc 부분은 "놉-인-홀" 유형 접근법 또는 Fc가 Fc 형성 헤테로이량체를 형성하도록 하거나 Fc 형성 헤테로이량체를 형성하는 임의의 다른 접근법을 이용하여 생성될 수 있다.

[0007] 본 발명의 다중-특이적 항체의 작제에 대한 예가 본원에서 더욱 기재된다.

[0008] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 다중-특이적 항체의 분리 후, 하나 이상의 항원 또는 표적물에 대한 다중-특이적 항체의 친화도는 진화 과정, 예를 들어, 포괄적(comprehensive) 진화 과정을 통해 추가로 개선될 수 있다. 포괄적 진화 과정에 대한 하나의 실시형태에서, 증강 돌연변이체(up-mutant)는, 스크리닝 동안, 다른 항원에 대한 결합은 감소시키지 않으면서 적어도 하나의 항원 또는 항원 모두에 대한 결합을 개선하는 돌연변이체로서 확인된다. 이어서, 이를 증강 돌연변이체 (변화는 중쇄 및/또는 경쇄 모두에서 일어날 수 있다)는 추가로 혼합되고, 예를 들어, 조합적으로 매칭될 수 있다.

[0009] 특정한 다른 예에서, 표적 항원 중 하나에 대해서는 저친화도를 갖고 또 다른 표적 항원에 대해서는 높은 친화도를 갖는 것이 바람직하다. 예를 들어, 문헌 [Y. Joy Yu, et al, Science Translational Medicine, 25 May 2011, Vol 3, Issue 84 84ra44, "Boosting Brain Uptake of a Therapeutic Antibody by Reducing Its Affinity for a Transcytosis Target"]은 저친화도 항-트랜스페린 수용체 항체를 포함하는 하나의 아암 및 고친화도 BACE1 항체를 포함하는 다른 아암을 갖는 이특이적 항체가 혈액 뇌 장애물을 통과하고 마우스 뇌에서 치료적 농도에 도달할 수 있다고 기재하고 있다. 이러한 이특이적 항체는 모 일특이적 항체에 비해 실질적으로 더욱 효과적이었다.

### 발명의 효과

[0010] 따라서, 포괄적 진화 과정의 또 다른 양태에서, 증강 돌연변이체는 스크리닝 동안 하나의 항원에 대한 결합을 개선하는 돌연변이체로 확인된다. 제2의 항원에 대한 결합 친화도를 감소시키는 돌연변이체가 우선 순위에 드는 것은 아니지만, 이러한 돌연변이체는, 조합 방식에서 돌연변이 과정의 조합 동안 다른 돌연변이와 조합시 억제 효과를 상실하는 경우 유용할 수 있었다. 선택된 항원 각각에 대한 항원: 항체 결합의 결합 (on) 및 해리 (off) 속도뿐만 아니라 전체 친화도에 기초하여 유력 후보물을 확인하기 위한 스크리닝이 수행될 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다중-특이적 항체는 다른 조건, 예를 들어, pH, 산화, 온도, 압력 또는 상이한 이온 농도에서의 증가 또는 감소된 결합력 또는 안정성을 위해 최적화될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 H<sub>2</sub>L 항체의 일 실시형태를 도시한다. H<sub>2</sub>L 항체는, 동일한 경쇄가 특정 항원에 대한 결합 특이성은 변화시키지 않으면서 2개의 상이한 모 항체로부터의 2개의 중쇄 (항체 1 및 항체 2) 각각과 어셈블링되게 하는 최적화된 가변 도메인을 갖는다. 경쇄는 항체 1로부터의 중쇄 1과 어셈블링하여 항원 1에 결합하는 "Fab-아암 1 - H<sub>2</sub>L"을 형성한다. 동일한 경쇄는 또한 항체 2로부터의 중쇄 2와 어셈블링하여 항원 2에 결합하는 "Fab-아암 2 - H<sub>2</sub>L"를 형성한다. 중쇄의 Fc 부분은 생체 내에서 HC1-HC2 이량체의 형성만을 가능하게 하는 방식 (예를 들어, 이러한 예에서 "놉-인-홀" 디자인에 의해 촉진되고, Fc 헤테로이량체로 표지되는)으로 변형된다. 단지 헤테로-이량체만을 형성하는 2개의 중쇄 및 단일 경쇄의 발현은 오로지 단일 생성물인 본 발명의 "H<sub>2</sub>L

"mAb" 항체의 형성만을 이끈다. 생성되는 각각의 분자는 항원 1에 결합하는 하나의 Fab 아암 및 항원 2에 결합하는 다른 Fab 아암을 갖는다. H<sub>2</sub>L mAb는 보통의 IgG와 마찬가지로 제조되고 정제될 수 있다.

도 2는 정렬된 사람 면역글로불린 경쇄 라이브러리의 스크리닝에 대한 일례를 도시한다. 미세역가 플레이트에 고정된 항원 표적물 A를 중쇄 HC1 및 완전 사람 경쇄(각각의 웰에 상이한 경쇄)로 이루어진 재조합 IgG와 함께 항온 처리하였다. 결합된 항체를 세척 후 항-사람 IgG-HRP 접합체로 검출하였다. 각각의 막대는 독특한 클론을 나타낸다. 수평의 검은선은 배경 활성을 나타내며, 수평의 점선은 2x 배경을 나타낸다. 2x 이상의 시그널을 갖는 클론을 주된 히트(hit)로서 계수하였다. x-축은 웰 위치를 나타내고, y-축은 OD<sub>450</sub> 값을 나타낸다.

도 3은 2개의 표적 항원에 대한 이특이적 H<sub>2</sub>L mAb 결합의 ELISA 자료를 도시한다. 미세역가 플레이트의 웰은 표적물 A (회색 막대) 또는 표적물 B (검은색 막대)로 코팅되었다. 야생형 경쇄 wtLC1 또는 신규 경쇄 LC-15D10과 결합된 중쇄 1 (HC1)은 표적물 A는 결합하나 표적물 B에는 결합하지 않으며, 야생형 경쇄 wtLC2 또는 신규 경쇄 LC-15D10과 결합된 HC2는 표적물 B에 결합한다. HC1, HC2 및 신규 경쇄 LC-15D10으로 이루어진 이-특이적 H<sub>2</sub>L mAb는 표적물 A 및 표적물 B 모두에 결합한다. x-축은 클론명을 나타낸다. y-축은 OD<sub>450</sub> 값을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

#### 용어 정의

[0014]

본원에서 제공되는 예시에 대한 이해를 쉽게 하고자 특정한 자주 나오는 방법 및/또는 용어를 기술할 것이다.

[0015]

본원에서 사용되는 용어 "아미노산"은, 바람직하게는 유리 그룹으로서 또는 대안으로 축합 후 펩타이드 결합물의 일부로서, 아미노 그룹 (--NH<sub>2</sub>) 및 카복실 그룹 (--COOH)을 포함하는 임의의 유기 화합물을 지칭한다. "20개의 자연적으로 암호화된 폴리펩타이드-형성 알파-아미노산"이 당해 분야에서 이해되고 있고, 하기를 지칭한다: 알라닌 (ala 또는 A), 아르기닌 (arg 또는 R), 아스파라긴 (asn 또는 N), 아스파트산 (asp 또는 D), 시스테인 (cys 또는 C), 글루탐산 (glu 또는 E), 글루타민 (gin 또는 Q), 글리신 (gly 또는 G), 히스티딘 (his 또는 H), 이소루이신 (ile 또는 I), 루이신 (leu 또는 L), 리신 (lys 또는 K), 메티오닌 (met 또는 M), 페닐알라닌 (phe 또는 F), 프롤린 (pro 또는 P), 세린 (ser 또는 S), 트레오닌 (thr 또는 T), 트립토판 (trp 또는 W), 타이로신 (tyr 또는 Y), 및 발린 (val 또는 V).

[0016]

용어 "증폭"은 폴리뉴클레오타이드의 카피수가 증가되는 것을 의미한다.

[0017]

본원에서 사용되는 용어 "항체"는 온전한 면역글로불린 분자 (IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA 이소타입 포함) 및 항원의 에피토프에 결합할 수 있는, 면역글로불린 분자의 단편, 예를 들어, Fab, Fab', (Fab')2 및 Fv 단편을 지칭한다. 항체 단편이 유도되는 항체의 항원 (예: 폴리펩타이드 항원)에 선택적으로 결합하는 일부 능력을 보유하는 이들 항체 단편들은 당해 분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 제조될 수 있고 (예를 들어, 문헌 [Harlow and Lane, 상기 참조] 참조), 하기와 같이, 더욱 기술된다.

[0018]

(1) Fab 단편은 항체 분자의 일가 항원-결합 단편으로 이루어지며, 파파인 효소로 전체 항체 분자를 분해하여 온전한 경쇄 및 중쇄의 일부로 이루어진 단편을 수득함으로써 생성될 수 있다.

[0019]

(2) 항체의 Fab' 단편은 전체 항체를 펩신으로 처리한 후, 환원시켜 온전한 경쇄 및 중쇄의 일부로 이루어진 분자를 생성함으로써 수득될 수 있다. 이러한 방식으로 처리되는 항체 분자당 2개의 Fab' 단편이 수득된다.

[0020]

(3) 항체의 (Fab')2 단편은 후속적 환원 없이 전체 항체 분자를 효소 펩신으로 처리함으로써 수득될 수 있다. (Fab')2 단편은 2개의 디설파이드 결합으로 함께 유지되는 2개의 Fab' 단편의 이량체이다.

[0021]

(4) Fv 단편은 2개의 쇄로서 발현되는 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역을 포함하는 유전자 조작된 단편으로 정의된다.

[0022]

"키메릭(chimeric)" 특성을 갖는 분자는 1) 제1 참조 분자에 대해 일부 동종이고 일부 이종이고; 한편 2) 동시에 제2 참조 분자에 대해 일부 동종이고 일부 이종이며; 3) 동시에 하나 초과의 추가의 참조 분자에 대해 일부 동종이고 일부 이종인 가능성을 배제하지 않는 분자이다. 비-제한적 실시형태에서, 키메릭 분자는 부분적 분자 서열들의 재편성물을 어셈블링하여 제조될 수 있다. 비제한적 양태에서, 키메릭 폴리뉴클레오타이드 분자는, 생성된 키메릭 폴리뉴클레오타이드가 다수의 템플레이트 특성을 갖도록, 다수의 분자 템플레이트를 사용하여 키메릭 폴리뉴클레오타이드를 합성함으로써 제조될 수 있다.

[0023]

본원에서 "비교 윈도우"는 인접한 뉴클레오타이드 위치, 예를 들어, 20개 이상의 뉴클레오타이드 위치의 개념적 절편을 지칭하며, 여기서 폴리뉴클레오타이드 서열은 적어도 동일한 수의 인접한 뉴클레오타이드의 참조 서열과 비교될 수 있으며, 비교 윈도우 내의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 2개 서열의 최적 정렬을 위해 (부가 또는 결실을 포함하지 않는) 참조 서열과 비교하여 20% 이하의 부가 또는 결실 (즉, 캡)을 포함할 수 있다. 비교 윈도우를 정렬하기 위한 서열들의 최적 정렬은 국소 상동성 알고리즘 [Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482]에 의해, 상동성 정렬 알고리즘 [Needlemen and Wuncsch *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970)]에 의해, 유사성 방법의 조사 [Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85: 2444 (1988)]에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 실행 [GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.]에 의해, 또는 검사에 의해 수행될 수 있고, 다양한 방법에 의해 생성되는 최적 정렬 (즉, 비교 윈도우에 대해 가장 높은 백분율의 상동성을 나타냄)이 선택된다.

[0024]

본원에서 사용되는 용어 "상보성-결정 영역" 및 "CDR"은 카벳 (Kabat) 및 초티아 (Chothia)에 의해 예시되는 바와 같은 기술-인식 (art-recognized) 용어를 지칭한다. 또한, CDR 정의는 과가변 영역 또는 초가변 루프로도 알려져 있다 [Chothia and Leks, 1987; Chothia et al., 1989; Kabat et al., 1987; and Tramontano et al., 1990]. 보다 짧거나 긴 가변 도메인도 단일쇄 항체를 형성하는데 적합하긴 하지만, 가변 영역 도메인은 전형적으로 천연 발생 면역글로불린 쇄의 아미노-말단 약 105 내지 115개 아미노산 (예: 아미노산 1 내지 110)를 포함한다. CDR은 면역글로불린 분자의 특이성을 결정하는 부분이고 특정 리간드와 접촉된다. CDR은 면역글로불린 분자의 최대 가변부이며, 이러한 분자의 다양성의 원인이 된다. 각각의 V 도메인에 3개의 CDR 영역인 CDR1, CDR2 및 CDR3이 있다. CDR-H는 가변 중쇄의 CDR 영역을 나타내고, CDR-L은 가변 경쇄의 CDR 영역에 관한 것이다. H는 가변 중쇄를 의미하고, L은 가변 경쇄를 의미한다. Ig-유도된 영역의 CDR 영역은 문헌 [Kabat (1991). *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services, Chothia (1987). *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 and Chothia (1989) *Nature*, 342, 877-883]에 기술되는 바와 같이 결정될 수 있다.

[0025]

"보존적 아미노산 치환"은 유사한 측쇄를 갖는 잔기의 상호교환가능성을 지칭한다. 예를 들어, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 글리신, 알라닌, 발린, 루이신 및 이소루이신이고, 지방족-하이드록실 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 세린 및 트레오닌이고, 아미드-포함 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 아스파라긴 및 글루타민이고, 방향족 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토파인이고, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 리신, 아르기닌 및 히스티딘이고, 황-포함 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 시스테인 및 메티오닌이다. 바람직한 보존적 아미노산 치환 그룹은 발린-루이신-이소루이신, 페닐알라닌-타이로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린 및 아스파라긴-글루타민이다.

[0026]

본원에서 사용되는 용어 "탈면역화 (deimmunization)"은, 템플레이트 결합 분자의 변이체를 사람에서 비-면역원성이 되게 하거나 덜 면역원성이 되게 함으로써 최초 야생형 분자와 비교하여 변형되는, 템플레이트 결합 분자의 변이체 생성에 관한 것이다. 본 발명에 따른 탈면역화된 분자는 비-사람 기원의 항체 또는 이의 일부 (예: 프레임워크 및/또는 CDR)에 관한 것이다. 상응하는 예는 US 4,361,549에 기술되는 바와 같은 항체 또는 이의 단편이다. 용어 "탈면역화된"은 또한 T 세포 에피토프 생성에 대해 감소된 경향을 나타내는 분자에 관한 것이다. 본 발명에 따라, "T 세포 에피토프 대해 감소된 경향"은 특정 T-세포 활성화를 이끄는 T-세포 에피토프의 제거에 관한 것이다.

[0027]

또한, T 세포 에피토프 생성에 대한 감소된 경향은 T 세포 에피토프 형성의 원인이 되는 아미노산의 치환, 즉 T 세포 에피토프를 형성하는데 필수적인 아미노산의 치환을 의미한다. 달리, T 세포 에피토프 생성에 대한 감소된 경향은 항원 독립적 T 세포 증식 유도에 대한 감소된 면역원성 또는 감소된 능력에 관한 것이다. 또한, T 세포 에피토프 생성에 대한 감소된 경향은 항원 독립적 T 세포 증식을 유도하는 아미노산 서열의 잠재적 T 세포 에피토프의 상실 또는 감소를 의미하는 탈면역화에 관한 것이다.

[0028]

본원에서 사용되는 용어 "T 세포 에피토프"는 세포 내에서 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 분해 동안 방출된 후 T 세포의 활성화를 유도하기 위해 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 의해 제시될 수 있는 짧은 펩타이드 서열에 관한 것이다 [참조: WO 02/066514]. MHC 제II류에 의해 제시되는 펩타이드에 대해, T 세포의 이러한 활성화는 이어서 B 세포가 항체를 생성하도록 직접적으로 자극함으로써 항체 반응을 유도할 수 있다.

[0029]

DNA의 "분해"는 DNA 내의 특정 서열에서만 작용하는 제한 효소를 사용하는 DNA의 촉매적 절단을 지칭한다. 본원에서 사용되는 다양한 제한 효소가 상업적으로 이용가능하며 이들의 반응 조건, 보조인자 및 다른 조건들은

당업자에게 알려진 바와 같이 이용되었다. 분석 목적을 위해, 전형적으로 1  $\mu$ g의 플라스미드 또는 DNA 단편이 약 20  $\mu$ l의 완충 용액 중의 약 2 단위의 효소와 함께 사용된다. 플라스미드 작제를 위한 DNA 단편의 분리 목적을 위해, 전형적으로 5 내지 50  $\mu$ g의 DNA가 보다 큰 용적 중의 20 내지 250 단위의 효소로 분해된다. 특정 제한 효소를 위한 적합한 완충액 및 기질 양은 제조자에 의해 구체화된다. 37°C에서 약 1시간의 항온처리 시간이 통상 이용되나, 공급자의 지침에 따라 다양할 수 있다. 분해 후, 반응물은 목적하는 단편을 분리하기 위해 젤 상에서 직접적으로 전기영동된다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 용어 "에피토프"는 항체의 파라토프가 결합하는 항원 상의 항원성 결정자를 지칭한다. 항원성 결정자는 일반적으로 분자의 화학적 활성 표면 그룹핑, 예를 들어, 아미노산 또는 슈가 측쇄로 이루어지며, 특정한 3차원 구조 특성 및 특정한 하전 특성을 가질 수 있다. 본원에서 사용되는 "에피토프"는 항체의 가변 영역 결합체와 상호작용하는 결합 상호작용물을 형성할 수 있는 항원 또는 다른 마크로분자의 부분을 지칭한다. 전형적으로, 이러한 결합 상호작용은 CDR의 하나 이상의 아미노산 잔기와의 분자간 접촉으로 증명된다.

[0031] 본원에서 사용되는 용어 "진화 (evolution)"는, 바람직한 특성을 위해 생물학적 분자를 실험적으로 변형시키는 공정인, 지향적 (directed) 진화 또는 분자적 진화의 공정을 지칭하며, 하나 이상의 모 분자 템플레이트를 돌연변이시키고 자손 (progeny) 분자 중에서 임의의 바람직한 분자를 확인함으로써 달성될 수 있으며; 부위 지향적 돌연변이유발, 오류 빈발 PCR, 부위 포화 방법 및 다른 랜덤 (random) 및 비-랜덤 방법을 포함하는 많은 진화 (지향적 진화) 방법이 당해 분야에 공지되고 공개되어 있다. 이들 방법들 중 임의의 방법이 본 발명의 방법에 이용될 수 있다.

[0032] 용어 "단편", "유도체" 및 "유사체"는, 참조 폴리펩타이드를 언급하는 경우, 참조 폴리펩타이드의 생물학적 기능 또는 활성과 적어도 본질적으로 동일한 적어도 하나의 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 포함한다. 또한, 용어 "단편", "유도체" 또는 "유사체"는 "프로-형태" 분자, 예를 들어, 상당히 높은 활성을 갖는 성숙 효소를 생성하도록 절단에 의해 변형될 수 있는 낮은 활성 프로단백질로 예시된다.

[0033] "전체 범위의 단일 아미노산 치환"이 각각의 아미노산 위치에서 제시되는 일 세트의 자손 폴리펩타이드를 템플레이트 폴리펩타이드로부터 생성하는 방법이 본원에 제공된다. 본원에서 사용되는 "전체 범위의 단일 아미노산 치환"은 본원에서 기술되는 바와 같이 천연적으로 암호화되는 20개의 폴리펩타이드-형성 알파-아미노산과 관련된다.

[0034] 용어 "유전자"는 폴리펩타이드 쇄를 생성하는데 관여되는 DNA의 절편을 의미하며, 이는 암호화 영역 전 및 후의 영역 (리더 및 트레일러) 및 개별 암호화 절편 (액손) 사이의 계재 서열 (인트론)을 포함한다.

[0035] 용어 "이종"은 하나의 단일-가닥 핵산 서열이 또 다른 단일-가닥 핵산 서열 또는 이의 상보물에 하이브리드화 할 수 없다는 것을 의미한다. 따라서, 이종성 부위는, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 부위가 또 다른 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화될 수 있는 부위 또는 영역을 이들의 서열 내에 있는 갖는다는 것을 의미한다.

[0036] 용어 "상동"은 하나의 단일-가닥 핵산 서열이 상보적 단일-가닥 핵산 서열에 하이브리드화할 수 있다는 것을 의미한다. 하이브리드화 정도는 후술되는 바와 같지 서열간의 동일성의 양 및 하이브리드화 조건, 예를 들어, 온도 및 염 농도를 포함하는 다수의 요인에 의존적일 수 있다. 바람직하게는, 동일성 영역은 약 5 bp 초과, 더욱 바람직하게는 10 bp 초과이다.

[0037] 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 가변 영역은 CDR으로도 불리는 3개의 초가변 영역으로 단절되는 "프레임워크" 영역으로 이루어진다. 프레임워크 및 CDR의 범위는 정확히 정의되었다 [참조: "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat et al., 1987]. 상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 종 내에서 상대적으로 보존된다. 본원에서 사용되는 "사람 프레임워크 영역"은 천연 발생 사람 면역글로불린의 프레임워크와 실질적으로 동일한 (약 85 이상, 일반적으로 90 내지 95 이상) 프레임워크 영역이다. 구성적 경쇄 및 중쇄의 조합된 프레임워크 영역인 항체의 프레임워크 영역은 CDR을 위치시키고 정렬하는데 도움이 된다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합을 담당한다. 본 발명에 따라, 프레임워크 영역은 항원과 접촉되는 초가변 상보성 결정 영역 (CDR)에 대한 단백질 스캐폴드를 제공하는 면역글로불린의 V 도메인(VH 또는 VL 도메인) 내의 영역에 관한 것이다. 각각의 V 도메인에 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 지정된 4개의 프레임워크 영역이 있다. 프레임워크 1은 V 도메인의 N-말단부터 CDR1이 개시될 때까지의 영역을 포함하고, 프레임워크 2는 CDR1과 CDR2 사이의 영역에 관련되고, 프레임워크 3은 CDR2와 CDR3 사이의 영역을 포함하고, 프레임워크 4는 CDR3의 끝부터 V 도메인의 C-말단까지의 영역을 의미한다 [참조: 특히 Janeway, Immunobiology, Garland Publishing, 2001, 5th

ed]. 따라서, 프레임워크 영역은 VH 또는 VL 도메인 내의 CDR 영역 밖의 모든 영역을 포함한다.

[0038] 당업자는 소정의 서열로부터 프레임워크 영역 및 CDR을 쉽게 유추할 수 있다 [참조: Kabat (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services, Chothia (1987). J. Mol. Biol. 196, 901-917 and Chothia (1989) Nature, 342, 877-883].

[0039] 용어 "동일한" 또는 "동일성"은 2개의 핵산 서열이 동일한 서열 또는 상보적 서열을 갖는다는 것을 의미한다. 따라서, "동일성 부위"는 폴리뉴클레오타이드의 영역 또는 부위 또는 전체 폴리뉴클레오타이드가 또 다른 폴리뉴클레오타이드의 부위 또는 그 폴리뉴클레오타이드와 동일하거나 이에 상보적이라는 것을 의미한다.

[0040] 용어 "분리된"은 물질이 최초 환경 (예를 들어, 천연적으로 발생하는 경우, 자연 환경)으로부터 떼어낸다는 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 천연-발생 폴리뉴클레오타이드 또는 효소는 분리되지 않았으나, 자연계 중의 공존 물질 중 일부 또는 전체로부터 구분된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 효소는 분리된다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부일 수 있었으며/있었거나 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 효소는 조성물의 일부일 수 있었으며, 이러한 벡터 또는 조성물이 이의 자연 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 분리된다.

[0041] "분리된 핵산"은 핵산이 유도되는 유기체의 천연 발생 계놈에 존재하는 경우 일반적으로 바로 인접하는 5' 및 3' 플랭킹 서열이 바로 인접하지 않은 핵산, 예를 들어, DNA 또는 RNA 분자를 의미한다. 따라서, 이 용어는, 예를 들어, 벡터로 삽입되는 핵산, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터; 이종 세포의 계놈으로 삽입되는 (또는 동종 세포의 계놈으로 삽입되나 천연적으로 발생하는 위치와는 다른 위치에서 삽입되는) 핵산; 및 별개의 분자로서 존재하는 핵산, 예를 들어, PCR 증폭 또는 제한 효소 분해에 의해 생성되는 DNA 단편 또는 시험관내 전사에 의해 생성되는 RNA 분자를 기술한다. 또한, 이 용어는, 예를 들어, 융합 단백질의 생성에 사용될 수 있는 추가의 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 하이브리드 유전자의 일부를 형성하는 재조합 핵산을 기술한다.

[0042] 본원에서 사용되는 "리간드"는 특정 수용체에 의해 인식되는 분자, 예를 들어, 랜덤 펩타이드 또는 다양한 철편 서열을 지칭한다. 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 분자 (또는 마크로분자 복합체)는 수용체 및 리간드일 수 있다. 일반적으로, 소분자량을 갖는 결합 파트너는 리간드로 지칭되고, 대분자량을 갖는 결합 파트너는 수용체로 지칭된다.

[0043] "결합"은 2개의 이중 가닥 핵산 단편 사이의 포스포디에스테르 결합 형성 과정을 지칭한다 [Maniatis et al, 1982, p. 146]. 달리 제공되지 않는 한, 결합은 공지된 완충액 및 조건을 사용하여 0.5  $\mu$ g의 결합될 DNA 단편의 대략적 등물량 당 10 단위의 T4 DNA 리가제 ("리가제")를 사용하여 달성될 수 있다.

[0044] 본원에서 사용되는 "링커" 또는 "스페이서"는 2개의 분자를 연결하는 분자 또는 분자들의 그룹, 예를 들어, DNA 결합 단백질 및 랜덤 펩타이드를 지칭하며, 예를 들어, 랜덤 펩타이드가 DNA 결합 단백질로부터 최소한의 입체 장애를 가지면서 수용체에 결합할 수 있도록, 2개의 분자를 바람직한 배열로 배치하는 것을 돋는다.

[0045] 본원에서 사용되는 "진화될 속성 (property to be evolved)"은 폴리뉴클레오타이드 서열로 구성된 분자, 폴리펩타이드 서열로 구성된 분자 및 일부 폴리뉴클레오타이드 서열 및 일부 폴리펩타이드 서열로 구성된 분자에 대한 언급을 포함한다. 진화될 속성에 대한 특별히 관련된 비제한적 예는 온도; 염도; 압력; pH; 글리세롤, DMAO, 세제 및/또는 반응 환경 내에서 접촉되게 되는 임의의 다른 종과 관련되는 조건과 같은 특정 조건에서의 결합 친화도, 특이성 및 활성을 포함한다. 진화될 속성에 대한 추가의 특별히 관련된 비제한적 예는 안정성, 예를 들어, 특정 환경에 특정 노출 시간 후 존재하는 잔류 특성의 양을 포함한다.

[0046] 용어 "다중-특이적 항체"는 2개 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 항체를 의미하며, 다중-특이적 항체는 2개의 항원에 결합하는 능력을 갖는 항체인 이-특이적 항체를 포함한다.

[0047] 용어 "돌연변이"는 야생형 핵산 서열의 서열 내 변화 또는 펩타이드 서열 내 변화를 의미한다. 이러한 돌연변이는 포인트 돌연변이, 예를 들어, 전이 또는 트랜스버전일 수 있다. 돌연변이는 결실, 삽입 또는 중복일 수 있다.

[0048] 본원에서 사용되는 축퇴된 "N,N,G/T" 뉴클레오타이드 서열은 32개의 가능한 삼중자를 나타내며, "N"은 A, C, G 또는 T일 수 있다.

[0049] 본원에서 사용되는 축퇴된 "N,N,N" 뉴클레오타이드 서열은 64개의 가능한 삼중자를 나타내며, "N"은 A, C, G 또

는 T일 수 있다.

[0050] 물체에 대해 적용되는 본원에서 사용되는 "천연-발생"은 물체가 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 언급한다. 예를 들어, 자연의 공급원으로부터 분리될 수 있고 실험실에서 사람에 의해 의도적으로 변형되지 않았던 유기체에 존재하는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열은 천연 발생이다. 일반적으로, 용어 천연 발생은 종들에 대해 전형적일 수 있는 비-병리학적 (질병에 걸리 않은) 개체에 존재하는 물체를 언급한다.

[0051] 본원에서 사용되는 "핵산 분자"는, 각각 단일-가닥 또는 이중-가닥인지에 따라 적어도 하나의 염기 또는 하나의 염기쌍으로 구성된다. 또한, 핵산 분자는 배타적으로 또는 상상적으로 뉴클레오타이드-포함 분자의 임의의 그룹에 속할 수 있으며, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 하기 그룹의 핵산 분자가 있다: RNA, DNA, 게놈성 핵산, 비-게놈성 핵산, 천연 발생 및 비천연 발생 핵산, 및 합성적 핵산. 이는 비제한적 예시로써 임의의 소기관, 예를 들어, 미토콘드리아와 관련된 핵산, 리보솜 RNA, 및 천연 발생 성분과 함께 천연적으로는 발생하지 않는 하나 이상의 성분으로 상상적으로 구성되는 핵산 분자를 포함한다.

[0052] 또한, "핵산 분자"는, 아미노산 및 슈가로 예시되고 이로 제한되지 않는, 하나 이상의 비-뉴클레오타이드-기반 성분을 일부 포함할 수 있다. 따라서, 예시로써, 이로 제한됨이 없이, 일부 뉴클레오타이드-기반이고 일부 단백질-기반인 리보자임이 "핵산 분자"로 고려된다.

[0053] 또한, 예시로서, 제한 없이, 검출가능한 모이어티, 예를 들어, 방사성 또는 달리 비방사성 표지물로 표지되지 핵산 분자도 마찬가지로 "핵산 분자"로 고려된다.

[0054] 용어 특정 효소를 "암호화하는 핵산 서열" 또는 특정 효소의 "DNA 암호화 서열" 또는 특정 서열을 "암호화하는 뉴클레오타이드 서열" 및 다른 뜻이 같은 용어는 적합한 조절 서열의 조절 하에 위치되는 경우 효소로 전사 및 해독되는 DNA 서열을 지칭한다. "프로모터 서열"은 세포 내에서 RNA 폴리머라제에 결합하고 하류 (3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역이다. 프로모터는 DNA 서열의 일부이다. 이러한 서열 영역은 이의 3' 말단에 출발 코돈을 갖는다. 프로모터 서열은 배경 이상의 검출가능한 수준으로 전사를 개시하는데 필요한 최소수의 염기를 포함한다. 그러나, RNA 폴리머라제가 서열에 결합하고 전사가 출발 코돈 (프로모터를 갖는 3' 말단)에서 개시된 후, 전사는 3' 방향으로 하류로 진행한다. 프로모터 서열 내에서 전사 개시 부위 (편리하게는 뉴클레아제 SI로의 매핑에 의해 정의됨) 및 RNA 폴리머라제의 결합을 담당하는 단백질 결합 도메인 (컨센서스 서열)을 발견할 것이다.

[0055] 용어 "효소 (단백질)을 암호화하는 핵산" 또는 "효소 (단백질)을 암호화하는 DNA" 또는 "효소 (단백질)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드" 및 다른 같은 뜻의 용어는 효소에 대한 암호화 서열만을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 및 추가의 암호화 및/또는 비-Cq3 암호화 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0056] 하나의 바람직한 실시형태에서, "특정 핵산 분자 종"은 이의 화학적 구조로 정의되며, 비제한적으로 이의 일차 서열로 예시된다. 또 다른 바람직한 양태에서, 특정한 "핵산 분자 종"은 핵산 종의 기능 또는 핵산 종으로부터 유도되는 생성물의 기능으로 정의된다. 따라서, 비제한적 예시로써, "특정한 핵산 분자 종"은, 이의 발현 생성물에 기인할 수 있는 활성 또는 특성을 포함한, 이에 기인할 수 있는 하나 이상의 활성 또는 특성에 의해 정의될 수 있다.

[0057] "작업중인 핵산 분자 샘플의 핵산 라이브러리로의 어셈블링"에 대한 즉각적 정의는 핵산 샘플의 벡터-기반 수집물로의 삽입, 예를 들어, 결합에 의한 벡터로의 삽입 및 숙주의 형질전환 과정을 포함한다. 관련 벡터, 호스트 및 다른 시약 및 이의 특정한 비제한적 예에 대한 기술이 하기에 제공된다. 또한, "작업중인 핵산 분자 샘플의 핵산 라이브러리로의 어셈블링"에 대한 즉각적 정의는 핵산 샘플의, 예를 들어, 어댑터로의 결합에 의한 비-벡터-기반 수집물로의 삽입 과정을 포함한다. 바람직하게는, PCR에 의한 증폭을 촉진하기 위해 어댑터가 PCR 프라이머에 어닐링될 수 있다.

[0058] 따라서, 비제한적 실시형태에서, "핵산 라이브러리"는 하나 이상의 핵산 분자의 벡터-기반 수집물로 구성된다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, "핵산 라이브러리"는 핵산 분자의 비-벡터-기반 수집물로 구성된다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, "핵산 라이브러리"는 일부 벡터-기반이고 일부 비-벡터-기반인 핵산 분자의 조합된 수집물로 구성된다. 바람직하게는, 라이브러리를 포함하는 분자들의 수집물은 검색가능하고 각각의 핵산 분자 종에 따라 분리가능하다.

[0059] 본 발명은 "핵산 작제물" 또는 달리 "뉴클레오타이드 작제물" 또는 달리 "DNA 작제물"을 제공한다. 용어 "작제물"은 본원에서 임의로 하나 이상의 추가의 분자, 예를 들어, 벡터 또는 벡터의 일부에 화학적으로 결합될 수 있는 분자, 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드를 기술하기 위해 사용된다. 구체적이지만 비제한적 양태에서, 뉴클

레오타이드 작제물은 호스트 세포의 형질전환에 적합한 DNA 발현 작제물로 예시된다.

[0060] "올리고뉴클레오타이드" (또는 동의어로 "올리고")는 화학적으로 합성될 수 있는 단일 가닥 폴리데옥시뉴클레오타이드 또는 2개의 상보적 폴리데옥시뉴클레오타이드 가닥을 지칭한다. 이러한 합성적 올리고뉴클레오타이드는 5' 포스페이트를 갖거나 갖지 않을 수 있다. 5' 포스페이트를 갖지 않는 것들은 키나제의 존재 하에서 ATP와 함께 포스페이트를 첨가하지 않고는 또 다른 올리고뉴클레오타이드를 결합할 수 없을 것이다. 합성적 올리고뉴클레오타이드는 탈포스포릴화되지 않았던 단편에 결합할 것이다. 폴리머라제-기반 증폭을 (예를 들어, PCR로) 달성하기 위해서, "연속해서 적어도 제1의 상동 서열, 축퇴된 N,N,G/T 및 제2의 상동 서열로 구성되는 32-폴드 축퇴된 올리고뉴클레오타이드"가 언급된다. 이와 관여하여 사용되는 "상동"은 폴리머라제에 기초하여 증폭되는 올리고와 모 폴리뉴클레오타이드 간의 상동성과 관련된다.

[0061] 본원에서 사용되는 용어 "작동적으로 연결된"은 폴리뉴클레오타이드 요소들의 기능적으로 상호관련된 결합을 지칭한다. 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적으로 상호관련되게 위치되는 경우 "작동적으로 연결"된다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 암호화 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 암호화 서열에 작동적으로 연결된다. 작동적으로 연결된다는 것은 연결되는 DNA 서열이 전형적으로 인접하다는 것을 의미하고, 2개의 단백질 암호화 서열을 결합하는 것이 필요한 경우, 인접하고 판독 프레임 내에 있다는 것을 의미한다.

[0062] 암호화 서열은 RNA 폴리머라제가 2개의 암호화 서열을 단일 mRNA로 전사하는 경우 또 다른 암호화 서열에 "작동적으로 연결"되며, 이어서 암호화 서열 모두로부터 유도되는 아미노산을 갖는 단일 폴리펩타이드로 해독된다. 암호화 서열은 발현된 서열이 궁극적으로 목적하는 단백질을 생성하도록 프로세싱되는 한 서로 인접할 필요는 없다.

[0063] 본원에서 사용되는 용어 "생리학적 조건"은 생육가능한 유기체화 양립가능하고/하거나 전형적으로 생육가능한 배양된 효모 세포 또는 포유동물 세포에 세포내적으로 존재하는 온도, pH, 이온 세기, 점도 및 다른 생화학적 변수를 지칭한다. 예를 들어, 전형의 실험실 배양 조건 하에서 성장된 효모 세포에서의 세포내 조건이 생리학적 조건이다. 시험관내 전사 각테일을 위한 적합한 시험관내 반응 조건은 일반적으로 생리학적 조건이다. 일반적으로, 시험관내 생리학적 조건은 50 내지 200 mM NaCl 또는 KCl, pH 6.5 내지 8.5, 20 내지 45°C, 및 0.001 내지 10 mM 이가 양이온 (예: Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>); 바람직하게는 약 150 mM NaCl 또는 KCl, pH 7.2 내지 7.6, 5 mM 이가 양이온을 포함하고, 종종 0.01 내지 1.0% 비특이적 단백질 (예: BSA)을 포함한다. 비-이온성 세제 (트윈, NP-40, 트리톤 X-100)는 종종 일반적으로 약 0.001 내지 2%, 전형적으로 0.05 내지 0.2% (v/v)로 존재할 수 있다. 특정 수성 조건은 통상의 방법에 따라 실시자에 의해 선택될 수 있다. 일반적 교시에 따라, 10 내지 250 mM NaCl, 5 내지 50 mM 트리스 HCl, pH 5 내지 8의 완충 수성 조건이 적용가능할 수 있으며, 임의로 이가 양이온(들) 및/또는 금속 칼레이터 및/또는 비-이온성 세제 및/또는 막 분획물 및/또는 소포제 및/또는 섬광제가 추가될 수 있다.

[0064] 본원에서 사용되는 용어 "집단"은 폴리뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드의 부분 또는 단백질과 같은 성분들의 수집물을 의미한다. "혼합된 집단"은 동일한 패밀리의 핵산 또는 단백질에 속하지만 (즉, 관련되지만) 서열은 상이한 (즉, 동일하지 않은) 따라서 생물학적 활성은 상이한 성분들의 수집물을 의미한다.

[0065] "프로-형태"를 갖는 분자는 참조 프로-형태 분자와 비교하여 특성 차이 (예: 활성 증가)를 갖는 보다 성숙된 분자 형태를 수득하는 과정 중의 하나 이상의 공유 및 비공유 화학적 변형 (예: 글리코실화, 단백질분해적 절단, 이량체화 또는 올리고머화, 온도-유도된 또는 pH-유도된 구조적 변화, 보조인자와의 화합 등)의 임의의 조합을 겪는 분자를 지칭한다. 2개 이상의 화학적 변형 (예: 2개의 단백질분해적 절단 또는 단백질분해적 절단 및 탈글리코실화)이 성숙한 분자의 생성 도중에 감지될 수 있는 경우, 참조 전구체 분자는 "프리-프로-형태" 분자로 불릴 수 있다.

[0066] 본원에서 사용되는 용어 "슈도랜덤"은, 예를 들어, 임의의 슈도랜덤 위치가 아닌 또 다른 위치에서의 잔기 가변도가 어느 정도의 잔기 변화는 갖되 억제되도록 제한된 가변성을 갖는 일 세트의 서열을 지칭한다.

[0067] 본원에서 사용되는 "랜덤 웨타이드 라이브러리"는 일 세트의 웨타이드들을 암호화하는 일 세트의 폴리뉴클레오타이드 서열들, 및 이들 폴리뉴클레오타이드 서열들에 의해 암호화되는 일 세트의 웨타이드들 및 이들 웨타이드 웨타이드들을 포함하는 일 세트의 융합 단백질들을 지칭한다.

[0068] 본원에서 사용되는 "랜덤 웨타이드 서열"은 2개 이상의 아미노산 단량체로 구성되고 확률적 또는 랜덤 과정에 의해 작제되는 아미노산 서열을 지칭한다. 웨타이드 웨타이드는 불변 서열을 포함할 수 있는 프레임워크 또는 스캐폴딩 모티프를 포함할 수 있다.

- [0069] 본원에서 사용되는 "수용체"는 소정의 리간드에 대해 친화성을 갖는 분자를 지칭한다. 수용체는 천연 발생 또는 합성 분자일 수 있다. 수용체는 변형되지 않는 상태로 또는 다른 종파의 접합체로서 사용될 수 있다. 수용체는 직접적으로 또는 특정 결합 물질을 통해 결합 구성원에 공유적으로 또는 비-공유적으로 부착될 수 있다. 수용체의 예는, 이로 제한됨이 없이, 특정한 항원성 결정자 (예: 바이러스, 세포 또는 다른 물질)과 반응적인 모노클로날 항체 및 항혈청을 포함한 항체, 세포막 수용체, 복합 탄수화물 및 당단백질, 효소 및 호르몬 수용체를 포함한다.
- [0070] "재조합" 효소는 재조합 DNA 기술에 의해 생성되는, 즉 목적하는 효소를 암호화하는 외인성 DNA 작제물에 의해 형질전환된 세포로부터 생성되는 효소를 지칭한다. "합성적" 효소는 화학적 합성에 의해 제조되는 것들이다.
- [0071] 용어 "관련된 폴리뉴클레오타이드"는 폴리뉴클레오타이드의 영역 또는 부위가 동일하고 폴리뉴클레오타이드의 영역 또는 부위가 이종이라는 것을 의미한다.
- [0072] 본원에서 사용되는 "환원적 재편성 (reductive reassortment)"는 반복된 서열에 의해 매개되는 결실 (및/또는 삽입) 이벤트를 통해 발생하는 분자 다양성 증가를 지칭한다.
- [0073] 하기 용어들이 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드 사이의 서열 관련성을 기술하는데 사용된다: "참조 서열", "비교 윈도우", "서열 동일성", "서열 동일성 비율 (%)" 및 "실질적 동일".
- [0074] "참조 서열"은 서열 비교의 기준으로서 사용되는 규정된 서열이다: 참조 서열은, 예를 들어, 전체 길이 cDNA 또는 서열 목록에 제시된 유전자 서열의 절편으로서의 큰 서열의 서브세트일 수 있거나, 완전한 cDNA 또는 유전자 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 참조 서열의 길이는 적어도 20개 뉴클레오타이드, 빈번히 적어도 25개 뉴클레오타이드, 종종 적어도 50개 뉴클레오타이드이다. 2개의 폴리뉴클레오타이드는 각각 (1) 2개의 폴리뉴클레오타이드 간에 유사한 서열 (즉, 완전한 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부)를 포함할 수 있고 (2) 2개의 폴리뉴클레오타이드 사이에서 벗어나는 서열을 추가로 포함할 수 있으므로, 2개 (또는 그 이상)의 폴리뉴클레오타이드 사이의 서열 비교는 전형적으로 서열 유사성을 갖는 국소 영역을 확인하고 비교하기 위해 "비교 윈도우"에 걸쳐 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열을 비교함으로써 수행된다.
- [0075] "서열 동일성"은 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열이 비교 윈도우에 걸쳐 동일하다 (즉, 뉴클레오타이드 하나를 기준으로 동일하다)는 것을 의미한다. 용어 "서열 동일성 비율 (%)"은, 비교 윈도우에 걸쳐 2개의 최적 정렬 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기 (예: A, T, C, G, U 또는 I)가 두 서열 모두에서 나타나는 위치의 수를 측정하여 매칭되는 위치의 수를 수득하고, 매칭되는 위치의 수를 비교 윈도우 내 위치의 총수 (즉, 윈도우 크기)로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 비율 (%)을 수득함으로써 계산된다. 본원에서 사용되는 "실질적 동일"은, 폴리뉴클레오타이드가 적어도 25 내지 50개 뉴클레오타이드의 비교 윈도우의 참조 서열과 비교하여 적어도 80% 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 85% 서열 동일성, 종종 90 내지 95% 서열 동일성, 가장 일반적으로 적어도 99% 서열 동일성을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 서열의 특성을 나타내며, 서열 동일성의 비율 (%)은 참조 서열을 비교 윈도우에 걸쳐 참조 서열의 총 20% 이하의 결실 또는 부가를 포함할 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열과 비교함으로써 계산된다.
- [0076] 당해 분야에 알려져 있는 바와 같이, 2개의 효소 사이의 "유사성"은 하나의 효소의 아미노산 서열 및 이의 보존된 아미노산 치환을 제2의 효소의 서열과 비교함으로써 결정된다. 유사성은 당해 분야의 잘 알려진 절차, 예를 들어, BLAST 프로그램 (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information)에 의해 결정될 수 있다.
- [0077] 본원에서 사용되는 "단일쇄 항체"는 폴리펩타이드 결합물 내에 일반적으로 스페이서 펩타이드 (예를 들어,  $[Gly-Gly-Gly-Ser]_x$ )를 통해 연결되는 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭하며, 아미노- 및/또는 카복시-말단에 추가의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단일쇄 항체는 암호화 폴리뉴클레오타이드를 연결하기 위한 테더 (tether) 절편을 포함할 수 있다. 예를 들어, scFv는 단일쇄 항체이다. 단일쇄 항체는 일반적으로 면역글로불린 슈퍼페밀리의 유전자에 의해 실질적으로 암호화되는 (예를 들어, 문헌 [Williams and Barclay, 1989, pp. 361-368, 본원에 참조로 포함됨] 참조), 매우 흔하게는 설치류, 비-사람 영장류, 조류, 돼지, 소, 양, 염소 또는 사람 중쇄 또는 경쇄 유전자 서열에 의해 암호화되는, 적어도 10개의 인접한 아미노산의 하나 이상의 폴리펩타이드 절편으로 이루어진 단백질이다. 기능성 단일쇄 항체는 일반적으로 특정한 표적물 분자, 전형적으로 수용체 또는 항원 (에피토프)에 결합하는 특성을 보유하도록 면역글로불린 슈퍼페밀리 유전자 생성물의 충분한 부분을 포함한다.
- [0078] 한쌍의 분자 (예: 항체-항원 쌍 또는 핵산 쌍)의 구성원들은, 이들이 다른 비-특정한 분자보다 서로에게 보다

큰 친화도로 결합하는 경우, 서로에 대해 "특이적으로 결합"한다고 한다. 예를 들어, 비특이적 단백질보다 항원에 대해 더욱 효과적으로 결합하는 항체는 항원에 대해 특이적을 결합한다고 기술될 수 있다. (유사하게, 핵산 프로브가 염기쌍 상호작용에 의해 표적물과 특정한 이중구조물을 형성하는 경우 핵산 표적물에 특이적으로 결합되는 것으로 기술될 수 있다 (상기 참조).)

[0079] 본원에서 "특정한 하이브리드화"는 제1 폴리뉴클레오타이드와 제2 폴리뉴클레오타이드 (예를 들어, 제1 폴리뉴클레오타이드와 구별되나 실질적으로 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드) 사이의 하이브리드의 형성으로 정의되며, 실질적으로 관련되지 않은 폴리뉴클레오타이드 서열은 혼합물에서 하이브리드를 형성하지 않는다.

[0080] 용어 "특정한 폴리뉴클레오타이드"는 특정 종점 및 특정 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 하나의 폴리뉴클레오타이드가 제2의 폴리뉴클레오타이드의 일부분과 동일한 서열을 가지나 상이한 말단을 갖는 2개의 폴리뉴클레오타이드는 2개의 상이한 특정한 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0081] "엄격한 하이브리드화 조건"은 단지 서열들 간에 적어도 90% 동일성, 바람직하게는 적어도 95% 동일성, 가장 바람직하게는 적어도 97%의 동일성이 있는 경우에만 하이브리드화가 발생하는 것을 의미한다 [참조: Sambrook et al, 1989, 이의 전문이 본원에 참조로 포함됨].

[0082] "실질적으로 동일한" 아미노산 서열은 단지 보전적 아미노산 치환, 예를 들어, 하나의 아미노산을 동일한 부류의 또 다른 아미노산으로 치환 (예: 하나의 소수성 아미노산, 예를 들어, 이소루이신, 발린, 루이신 또는 메티오닌의 또 다른 소수성 아미노산으로의 치환, 또는 하나의 극성 아미노산의 또 다른 극성 아미노산으로의 치환, 예를 들어, 아르기닌의 리신으로의 치환, 글루탐산의 아스파트산으로의 치환, 또는 글루타민의 아스파라긴으로의 치환)에 의해서만 참조 서열과 상이한 서열이다.

[0083] 추가로 "실질적으로 동일한" 아미노산 서열은, 참조 서열과 상이하거나 하나 이상의 비-보존적 치환, 결실 또는 삽입에 의해 상이하고, 특히 이러한 치환이 활성 부위가 아닌 부위에서 일어나며, 단 폴리펩타이드가 본질적으로 이의 거동 특성을 보유하는 서열이다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 폴리펩타이드로부터 결실되어 이의 생물학적 활성을 유의하게 변화시키지 않으면서 폴리펩타이드의 구조를 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성에 요구되지 않는 아미노- 또는 카복실-말단 아미노산이 제거될 수 있다. 이러한 변형은 보다 작은 활성 폴리펩타이드를 발생시킬 수 있다.

[0084] 본원에서 사용되는 "실질적으로 순수한"은 대상 종이 존재하는 지배적인 종이라는 것을 의미하며 (즉, 몰 기준으로 조성물 중의 임의의 다른 개별적 마크로분자 종보다 풍부하다는 것을 의미하며), 바람직하게는 실질적으로 정제된 분획은 대상 종이 존재하는 모든 마크로분자 종의 적어도 약 50% (몰 기준)를 차지하는 조성물이다. 일반적으로, 실질적으로 순수한 조성물은 조성물 중에 존재하는 모든 마크로분자 종을 약 80% 또는 90% 초과로 포함할 것이다. 가장 바람직하게는, 대상 종은 본질적으로 균질하게 정제되고 (오염 종들이 통상의 검출 방법에 의해 조성물 중에서 검출될 수 없고) 이때 조성물은 필수적으로 단일 마크로분자 종으로 이루어진다. 용매 종, 소분자 (<500 달톤) 및 원소적 이온 종은 마크로분자 종으로 고려되지 않는다.

[0085] 본원에서 사용되는 "동계 (sygenic)"는 유전적으로 동일하거나 충분히 동일하고 면역학적으로 적합하다는 것을 의미한다.

[0086] 본원에서 사용되는 "템플레이트", "템플레이트 항체" 또는 "모 항체"는 본 발명의 다중-기능성 항체가 제조되는 단백질(들)을 의미한다. 당업자가 알 수 있는 바와 같이, 임의의 수의 템플레이트가 본 발명에 사용된다. 구체적으로, 효소적 도메인, 결합 도메인 등과 같은 기증성 도메인 및 턴 (turn) 또는 루프 등과 같은 보다 작은 단편을 포함한 공지된 단백질의 단편 및 도메인이 "단백질" 또는 "올리고펩타이드"의 정의 내에 포함된다. 즉, 단백질의 부분들이 또한 사용될 수 있다. 또한, 본원에서 사용되는 바와 같은 "단백질"은 단백질, 올리고펩타이드 및 펩타이드를 포함한다. 또한, 단백질 변이체, 즉 비-천연 발생 단백질 유사체 구조물이 사용될 수 있다.

[0087] 적합한 단백질은, 이로 제한됨이 없이, 세포 표면 수용체, 항원, 항체, 사이토킨, 호르몬, 전사 인자, 시그널 모듈, 세포골격 단백질 및 효소를 포함한 약제학적 단백질을 포함한다. 적합한 단백질 골격은, 이로 제한됨이 없이, RCSB (Research CoUaboratory for Structural Bioinformatics, 이전에는 브룩하вен 네셔널 랩)에 의해 작성되고 서비스되는 것들 모두를 포함한다.

[0088] 본원에서 사용되는 용어 "가변 절편"은 랜덤, 슈도랜덤 또는 규정된 핵심 서열을 포함하는 신생 (nascent) 펩타이드의 일부를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "가변 절편"은 랜덤, 슈도랜덤 또는 규정된 핵심 서열을 포함하는 신생 펩타이드의 일부를 지칭한다. 가변 절편은 가변 및 불변 잔기 위치 모두를 포함할 수 있고, 가변

잔기 위치에서의 잔기의 변화의 정도는 제한될 수 있다: 두 선택 모두 실시자의 재량대로 선택된다. 가변 절편은 보다 길 수 있으나, 전형적으로 약 5 내지 20개 아미노산 잔기 길이 (예: 8 내지 10개)이고, 항체의 일부 또는 수용체 단백질, 예를 들어, 항체 단편, 핵산 결합 단백질, 수용체 단백질 등을 포함할 수 있다.

[0089] 용어 "야생형"은 폴리뉴클레오타이드가 어떠한 돌연변이도 포함하지 않는다는 것을 의미한다. "야생형" 단백질은 이 단백질이 자연에서 발견되는 활성 수준에서 활성이 있을 것이고 자연에서 발견되는 아미노산 서열을 포함할 것이라는 것을 의미한다.

#### [0090] 본 발명의 다중-기능성 항체의 생성

[0091] 완전 사람 항체, 사람 및 비-사람 성분을 갖는 키메릭 항체, Fab 항체 및 다른 항체 구조를 포함한 상이한 특성 (예를 들어, 개선된 친화도, 결합력 및 약동학)을 갖는 항체가 분자 생물학 기술, 예를 들어, 클로닝, 파아지 디스플레이, 유전자전이 (transgenic) 마우스 및 돌연변이유발을 이용하여 실험실에서 작제되었다. 본 발명의 다중-기능성 항체는 출발 분자 또는 템플레이트로서 사용되는 항체로부터 생성될 수 있다. 모 항체는 완전 사람 항체, 설치류, 토끼, 개, 소, 우제류, 어류, 연골어류 키메릭 항체, 사람화된 항체, 부분 사람 항체 또는 다른 항체일 수 있다. 이러한 항체를 생성하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 많은 정보가 공개되었으며, 모노클로날 항체 및 연구, 진단 및 암을 포함한 다수의 질환의 치료에서의 이들의 사용이 알려져 있다. 예를 들어, 다수의 모노클로날 항체가 환자에서의 치료적 사용에 대해 정부의 규제 승인을 받았다.

[0092] 사람 게놈의 해독은 치료제로서 사용될 수 있는 완전 사람 항체를 제조하기 위한 새로운 기회를 제공하였다. 사람 면역계는 제한된 수의 점라인 (germline) 항체 유전자로부터 모든 면역원성 분자에 대한 항체를 생성할 수 있다. 다양성은 V, D 및 J 단편 (중쇄) 및 V 및 J 단편 (경쇄)의 유동성 (유연성) 재조합에 의해 생성된다. 생성된 가변 항체 도메인은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR) 및 4개의 프레임워크 영역으로 이루어진다. 프레임워크는 CDR 루프에 항원에 대한 최적 결합을 위한 적당한 공간적 배향을 제공하기 위한 스케폴드를 제공한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 당해 분야에 잘 알려진 방법에 따라 본 발명을 위한 템플레이트를 확인하기 위해 완전 사람의 새로운 (de novo) 항체 라이브러리가 생성되고 스크리닝된다.

[0093] 또한, 본 발명의 분자를 위한 모 항체로서 사용될 수 있는 모노클로날 항체가 표적 항원으로의 설치류 또는 다른 호스트 동물의 면역화 및 이어서 당해 분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 하이브리도마 세포주를 생성함으로써 생성될 수 있다.

[0094] 본 발명의 방법에서는, 또한 하나 이상의 표적물 (공지 또는 미지)에 대한 에피토프에 결합하는 임의의 항체가 또한 하나 이상의 표적물 상의 제2 또는 제3 또는 다수의 에피토프에 결합하도록 진화될 수 있다는 것을 계획한다. 따라서, 모 항체는 하나 이상의 항체일 수 있다.

[0095] 또한, 하나 이상의 모 항체를 생성하기 위한 항체 라이브러리는 다양한 공지된 방법, 예를 들어, 본원에 기술되는 방법들을 이용하여 스크리닝될 수 있다.

[0096] 부위-지향적 돌연변이유발 및 보다 최근의 분자적 진화를 통한 단백질 조작이 항체에서 치료적 특성을 개선하는데 성공적으로 이용되어 왔다. 열안정성, 특이성, 결합 친화성과 같은 특성 및 다른 특성들 모두가 항체를 특정 목적에 더욱 적합하도록 하기 위해 변형되어 왔다.

[0097] 이러한 시작 이후로, 표적 단백질의 특성을 개선하기 위한 분자적 진화를 위한 많은 상이한 방법들이 기술되고 적용되었다. 때때로 중장 돌연변이체를 위한 단일 포인트 돌연변이 세트가 생성되고 스크리닝된다. 이러한 경우, 표적 분자의 목적하는 특성을 더욱 최적화시키기 위한 유리한 단일 아미노산 치환이 재조합되고 스크리닝될 수 있다.

[0098] 본 발명에서는, 이전에 확인된 이중 결합의 다중-특이적 항체 (또는 경우에 따라 단일-기능성 항체)의 템플레이트 폴리펩타이드(들)로부터 또는 이에 기초하여 형성되는 돌연변이체 폴리펩타이드를 확인하기 위한 진화 방법이 이용된다.

[0099] 예를 들어, 이들 폴리펩타이드를 진화시키기 위한 하나의 방법은 본원에서 포괄적 위치상 진화 (Comprehensive Positional Evolution: CPE) 및 임의로 이에 이은 조합적 단백질 합성 (Combinatorial Protein Synthesis: CPS)으로 언급된다. 다른 방법은 포괄적 위치상 삽입 진화 (comprehensive positional insertion evolution: CPI), 포괄적 위치상 결실 진화 (CPD); 포괄적 위치상 결실 진화 (comprehensive positional deletion evolution: CPD)에 이은 조합적 단백질 합성 (CPS); 또는 포괄적 위치상 결실 진화 (CPD)에 이은 조합적 단백질 합성 (CPS)을 포함한다. 이러한 방법들은 특히 공개 WO2012/009026 (제목: 단백질 진화의 신규 방법, 이의 전

문이 본원에 참조로 포함됨)에 상세히 기술되어 있다.

[0100] 진화는 단백질-단백질 응집을 감소시키고, 단백질 용해도를 개선하고, 글리코실화를 통한 약동학을 최적화시키고, 단백질 2차 및 3차 구조를 최적화시키고, 돌연변이 세트를 통해 직접적으로 또는 글리코실화 마스킹 (masking)을 통해 간접적으로 항원성 부위를 탈면역화시키기 위해 본 발명의 다중-특이적 항체에 이용될 수 있다.

[0101] 또한, 진화는 기능을 유지하면서 면역원성을 제거시키기 위한 탈면역화 (deimmunization)를 위해 이용될 수 있다. 진화 탈면역화는 면역원성을 글리코실화로 마스킹하고, 기능을 유지하면서 면역원성을 제거시킬 수 있는 사람 초신체 (hypersomatic) 돌연변이 스펙트럼 아미노산 치환을 확인하며, 비-표면 아미노산 잔기 변화를 최소화함으로써 수행될 수 있다. 또한, 면역원성 데이터베이스 및 알고리즘을 잠재적 MHC 결합 에피토프를 확인하고 대체하는데 사용할 수 있다.

[0102] T-세포 에피토프 생성에 대한 감소된 경향 및/또는 탈면역화는 당해 분야에 공지된 기술로 측정될 수 있다. 바람직하게는, 단백질의 탈면역화는 시험관내에서 T 세포 증식 검정에 의해 시험될 수 있다. 이러한 검정에서, 세계적으로 HLA-DR 대립유전자의 80% 초과를 나타내는 공여자로부터의 PBMC가 야생형 또는 탈면역화된 웨타이드에 반응한 증식에 대해 스크리닝된다. 이상적으로, 세포 증식은 단지 야생형 웨타이드를 갖는 항원-제시 세포의 로딩시에만 검출된다. 탈면역화를 위한 추가의 검정은 사람 시험관내 PBMC 재자극 검정, 예를 들어, 인터페론 감마 (TH1) 또는 IL4 (TH2) ELISA를 포함한다. 달리, 하나의 검정은 모든 주조직적합항원염색체 (haplotype)를 대표하는 HLA-DR 사량체를 발현시킴으로써 탈면역화를 시험할 수 있다. 탈면역화된 웨타이드가 HLA-DR 주조직적합항원염색체 상에 제시되는지의 여부를 시험하기 위해서, 예를 들어, PBMC 상의 형광-표지된 웨타이드의 결합이 측정될 수 있다. 표적 항원 (예: 인터페론 감마 또는 IL4)에 대한 반응에 대해 HLA 제I류 및 제II류 유전자전이 마우스를 측정한다. 달리, PBMC 및/또는 유전자전이 마우스 검정으로부터 단련된 T 세포 (MHC I 9mer; MHC II 20mer)로 에피토프 라이브러리 스크리닝을 한다. 또한, 탈면역화는 탈면역화된 분자에 대한 항체가 환자에 투여한 후 생성되는 지의 여부를 측정함으로써 입증될 수 있다.

[0103] 또한, 진화 기술은 발현 최적화를 위해 이용될 수 있다. 하나의 양태에서, 본 발명은 포유동물 세포에서 개선된 발현을 갖는 침묵 코돈 최적화된 Fc 변이체를 개발하기 위해 단백질 조작 방법을 이용하는 것을 기술한다. 침묵 돌연변이는 DNA 서열의 변이에도 단백질의 아미노산 서열에 변화가 없는 돌연변이이다. 하나의 양태에서, 코돈 돌연변이유발은 포유동물 세포 발현의 최적화를 위해 불변 영역에서 수행된다. 이펙터 기능을 중재하는 능력을 보유하면서 개선된 발현 특성을 갖는 코돈 최적화된 Fc 변이체는 치료 항체의 생산을 개선한다. 이러한 양태에서, 예를 들어, 항체 분자의 불변 영역이 상이한 발현 호스트에서의 스크리닝, 예를 들어, CHO, HEK293 및 COS-7을 사용하는 포유동물 세포주 발현 스크리닝을 위해 진화될 수 있다.

[0104] 용어 템플레이트는 기본 폴리웨타이드 또는 이러한 폴리웨타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭할 수 있다. 당업자라면 알 수 있는 바와 같이, 임의의 템플레이트가 본 발명의 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 돌연변이되어 진화될 수 있는 템플레이트가 본 발명에서 기술되는 바와 같은 또 다른 폴리웨타이드 또는 폴리웨타이드의 라이브러리의 합성을 이끄는데 사용될 수 있다. 본원에서 보다 상세히 기술되는 바와 같이, 진화가능한 템플레이트는 폴리웨타이드의 합성을 암호화하며, 나중에 폴리웨타이드의 합성 히스토리를 탈암호화하고/하거나, 폴리웨타이드를 간접적으로 증폭시키고/시키거나, 폴리웨타이드를 진화 (즉, 다양화, 선별 및 증폭)시키는데 사용될 수 있다. 진화가능한 템플레이트는 특정 실시형태에서 핵산이다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 템플레이트는 핵산에 기초한다. 다른 실시형태에서, 템플레이트는 폴리웨타이드이다.

[0105] 본 발명에서 사용되는 핵산 템플레이트는 DNA, RNA, DNA와 RNA의 하이브리드, 또는 DNA와 RNA의 유도체로 제조되며, 단일- 또는 이중-가닥일 수 있다. 템플레이트의 서열은 폴리웨타이드, 바람직하게는 핵산 또는 핵산 유사체 (예: 비천연 중합체 또는 소분자)이거나 이와 유사하지 않은 화합물의 합성을 암호화하는데 사용된다. 특정한 비천연 중합체의 경우, 핵산 템플레이트는, 단량체 단위들이 중합체에서 보여질 순서로 이들을 정렬하고 이들을 템플레이트를 따라 인접한 단량체 단위와 매우 근접하게 하여 반응하고 공유 결합으로 연결되게 하는데 사용된다. 특정한 다른 실시형태에서, 템플레이트는 뉴클레오타이드의 랜덤 영역으로 이루어진 합성적 DNA 템플레이트 라이브러리의 PCR 증폭에 의해 비-천연 중합체를 생성하는데 사용될 수 있다.

[0106] 템플레이트가 염기의 수에 있어 매우 다양할 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 템플레이트는 10 내지 10,000개 염기 길이, 바람직하게는 10 내지 1,500개 염기 길이, 더욱 바람직하게는 10 내지 1,000개 염기 길이일 수 있다. 템플레이트의 길이는 당연히 코돈의 길이, 라이브러리의 복잡성, 합성될 비천연 중합체의 길이, 합성될 소분자의 복잡성, 공간 서열의 사용 등에 의존적일 것이다. 핵산 서열은 이

를 제조하기 위해 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 이들 방법은 PCR, 플라스미드 제조, 엔도뉴클레아제 분해, 고체상 합성, 시험관내 전사, 가닥 분리 등을 포함하는 생체내 및 시험관내 방법 모두를 포함한다. 또한, 핵산 템플레이트는 자동화된 DNA 합성기를 사용하여 합성될 수 있다.

[0107] 19개 아미노산 치환 모두가 단일 잔기에서 생성될 수 있는 높은 효율 때문에, 독립적으로 또는 단백질 내 다른 돌연변이와 함께, 관심물의 다수의 잔기 상에서 포화 돌연변이유발을 수행할 수 있다. 본원에서 사용되는 "완전한 포화" 돌연변이유발은 단백질 내의 소정의 아미노산이 다른 19개의 천연 발생 아미노산으로 대체되는 것으로 정의된다. 예를 들어, 단백질 서열을 따라 최소한으로 모든 가능한 아미노산 치환을 체계적으로 연구하는 유전자 부위 포화 돌연변이유발이 문헌 [Kretz et al, Methods in Enzymology, 2004, 388:3- 11, Short U.S. Patent No. 6,171,820, 및 Short U.S. Patent No. 6,562,594, 각각이 참조로 본원에 포함됨]에 기재되어 있다.

[0108] 모든 범위의 단일 아미노산 치환이 각각의 아미노산 위치에서 나타나는 일 세트의 자손 폴리펩타이드가 생성되도록 하기 위해, 코돈 프라이며 (축퇴성 N,N,G/T 서열 포함)가 폴리뉴클레오타이드 내로 포인트 돌연변이를 도입하는데 사용될 수 있다 [참조: U.S. Patent No. 6,171,820; U.S. Patent No. 5,677,149, 각각 참조로 본원에 포함됨]. 사용되는 올리고는 제1 상동성 서열, 축퇴성 N,N,G/T 서열 및, 바람직하게는, 반드시는 아니라, 제2 상동성 서열로 인접하게 구성된다. 이러한 올리고의 사용으로부터의 다운스트림 자손 해독 생성물은 폴리펩타이드를 따라 각각의 아미노산 부위에서 모든 가능한 아미노산 변화를 포함하며, 이는 N,N,G/T 서열의 축퇴가 20 개 아미노산 모두에 대한 코돈을 포함하기 때문이다.

[0109] 코돈 사용은 포유동물 유전자 발현에서 중요한 인자 중의 하나이다. 상이한 코돈이 사용되는 빈도는 상이한 호스트 사이 및 동일한 유기체 내에서 높거나 낮은 수준으로 발현되는 단백질 사이에서 상당히 다르다. 이러한 차이에 대한 가장 그럴듯한 이유는 바람직한 코돈이 세포 내에서 이용가능한 풍부한 코그네이트 (cognate) tRNA 와 연관된다는 것이다. 코돈 사용 및 tRNA 수용체가 함께 진화되고 이러한 공동-진화를 위한 선택압이 저수준으로 발현되는 유전자보다 높게 발현되는 유전자에 대해 더욱 두드러지는 것이 가능하다.

[0110] 하나의 이러한 축퇴된 올리고 (하나의 축퇴성 N,N,G/T 카세트로 구성됨)가 모 폴리뉴클레오타이드 템플레이트 내의 각각의 최초 코돈을 전범위의 코돈 치환을 받게 하는데 사용될 수 있다. 또한, 적어도 2개의 축퇴성 N,N,G/T 카세트가 -- 동일한 올리고 내 또는 동일하지 않은 올리고 내에서 -- 모 폴리뉴클레오타이드 템플레이트 내의 적어도 2개의 최초 코돈을 전범위의 코돈 치환을 받게 하는데 사용될 수 있다. 따라서, 하나 초과의 N,N,G/T 서열이 하나 초과의 위치에서 아미노산 돌연변이를 도입하기 위해 하나의 올리고 내에 포함될 수 있다. 이러한 복수의 N,N,G/T 서열은 직접적으로 인접하거나 하나 초과의 추가의 뉴클레오타이드 서열(들)에 의해 분리될 수 있다. 또한, 부가 및 결실을 도입하기 위해 제공가능한 올리고는 단독으로 사용되거나 N,N,G/T 서열을 포함하는 코돈과 함께 사용되어 아미노산 부가, 결실 및/또는 치환의 임의의 조합 또는 과변이 (permutation)를 도입할 수 있다.

[0111] 이트 폴리펩타이드는 임의의 단백질일 수 있으나, 촉매 활성 또는 리간드 결합과 같은 활성에 대한 간편한 검정을 갖는 단백질이 바람직하다. 본원에서 사용되는 리간드는 상이한 문자, 예를 들어, 단백질에 결합하는 소분자에 특이적으로 결합하는 임의의 문자이다. 표적물 상호작용의 대표적인 예는 촉매작용, 효소-기질 상호작용, 단백질-핵산 상호작용, 수용체-리간드 상호작용, 단백질-금속 상호작용 및 항체-항원 상호작용을 포함한다. 대표적인 표적물 단백질은 효소, 항체, 사이토kin, 수용체, DNA 결합 단백질, 킬레이트화제 및 호르몬을 포함한다.

[0112] 템플레이트는 항체 라이브러리를 생성하고 스크리닝함으로써 알아낼 수 있다. 항체 라이브러리의 생성 및 스크리닝을 위한 다양한 방법이 지시되는 바와 같이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 완전 사람 항체 디스플레이 라이브러리가 사용될 수 있다. 이러한 경우 "라이브러리"는 호스트 세포(들)의 표면 상에 디스플레이되는 일군의 항체이다. 바람직하게는, 항체 라이브러리는, 다양한 항원에 대해 광범위한 결합능을 갖는 항체들의 사람 레퍼토리를 나타낸다. 또한, 라이브러리는 바람직하게는 디스플레이되는 많은 이가 항체를 갖는다. 항체들이 세포 표면 상에 디스플레이되기 때문에, 라이브러리 내의 각각의 항체의 (결합력에 의한) 유효 친화도가 증가된다. 스크리닝 및 확인 목적 상 항체 결합력이 덜 바람직한 파아지 디스플레이 라이브러리와 같은 다른 일반적 라이브러리 유형과 달리, 본 발명에서는 세포 표면 디스플레이에 의해 제공되는 강력한 결합력이 바람직하다. 세포 표면 디스플레이 라이브러리는 낮은 결합 친화도, 중간 결합 친화도 및 높은 결합 친화도 항체의 확인을 가능하게 하고, 또한 스크리닝 또는 선별 단계에서 비-면역원성 에피토프 및 약한 에피토프의 확인을 가능하게 한다. 임의의 화학적 합성 또는 재조합 돌연변이유발 방법을 이용하여 돌연변이체 폴리펩타이드군을 생성할 수 있다. 본 발명의 실시는, 달리 지시되지 않는 한, 당해 기술에 속하는 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 유전자전이 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 통상의 기술을 이용할 수 있다. 예를 들어, 하

기 문헌을 참조한다: Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Patent No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Cabs eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymnology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

[0113] 바람직한 실시형태에서, 템플레이트 폴리펩타이드는 항체이다. 항체는, 예를 들어, CDR 내의 어떤 위치가 결합 친화도를 초래하는지를 매핑하고 이해하기 위해 본원에서 기술되는 방법에 이용된다. 다양한 항체-기반 작제물 및 단편을 제조하고 사용하기 위한 기술들이 당해 분야에 잘 알려져 있다. 본 발명의 중요한 양태는 관심 상호 작용 (예: 항원-항체 상호작용, 금속 퀄레이트화, 수용체 결합, 기질 결합 등)에서 역할을 하는 또는 역할을 할 것 같은 잔기의 확인이다. 임의의 항체 또는 항체 단편이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 항체의 특이성은 경쇄 가변 영역 (VL) 및 중쇄 가변 영역 (VH) 내의 상보성 결정 영역 (CDR)에 의해 결정된다. 완전한 항체의 약 1/3 크기인 Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 완전한 경쇄 불변 영역 및 중쇄 불변 영역의 일부를 포함한다. Fab 문자는 불변 영역 서열의 기여 때문에 안정하고 잘 화합한다. 그러나, 세균 시스템에서 발현되는 기능성 Fab의 수율은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역만을 포함하는 보다 작은 Fv 단편의 수율보다 낮다. Fv 단편은 기능적 항원 결합 부위를 여전히 보유하는 항체의 가장 작은 부분이다. Fv 단편은 Fab와 동일한 결합 특성을 갖지만, 불변 영역에 의해 부여되는 안정성이 없는 Fv의 2개의 쇄는 회색 조건에서 비교적 쉽게 해리될 수 있다.

[0114] 이러한 문제점을 극복하기 위해서, VH 및 VL 영역은 폴리펩타이드 링커를 통해 융합됨으로써 [Huston et al., 1991] 항원 결합 부위를 안정화시킬 수 있다. 이러한 단일 폴리펩타이드 Fv 단편은 단일쇄 항체 (scFv)로 알려져 있다. 먼저 어느 하나의 도메인을 갖는 VH 및 VL이 정렬될 수 있다. 링커는 제1 쇄의 카복시 말단을 제2 쇄의 아미노 말단에 연결시킨다.

[0115] 당업자는 중쇄 또는 경쇄 Fv 또는 Fab 단편이 이러한 시스템에 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 중쇄 또는 경쇄의 돌연변이후 상보적 쇄가 용액에 부가될 수 있다. 이어서, 2개의 쇄는 조합되고 기능성 항체 단편을 형성한다. 랜덤 비-특이적 경쇄 또는 중쇄 서열의 부가는 다양한 구성원의 라이브러리를 생성하기 위한 조합적 시스템을 생성한다.

[0116] 일반적으로, 단일쇄 발현 폴리뉴클레오타이드가 생성된다. 이러한 발현 폴리뉴클레오타이드는 하기를 포함한다: (1) 단일쇄 항체를 암호화하도록 작동적으로 연결되는  $V_H$  도메인, 스페이서 웨პ타이드 및  $V_L$  도메인으로 이루어진 단일쇄 항체 카세트, (2) 단일쇄 항체를 암호화하는 mRNA를 형성하는 단일쇄 항체 카세트의 시험관내 전사를 확실히 하도록 작동적으로 연결된 시험관내 전사에 적합한 프로모터 (예: T7 프로모터, SP6 프로모터 등); 및 (3) 시험관내 전사 반응에서 기능하는데 적합한 전사 종결 서열. 임의로, 발현 폴리뉴클레오타이드는 또한 복제 기원 및/또는 선별 마커를 포함할 수 있다. 적합한 발현 폴리뉴클레오타이드의 예는 pLM166이다.

[0117]  $V_H$  및  $V_L$  서열은 V 유전자 패밀리-특이적 프라이머 또는 V 유전자-특이적 프라이머를 사용하여 PCR 증폭에 의해 생성되는  $V_H$  및  $V_L$  서열의 라이브러리로부터 편리하게 수득될 수 있거나 [Nicholls et al. (1993) J. Immunol. Meth. 165: 81; WO93/12227], 이용가능한 서열 정보에 기초하는 표준 기술-공지 방법에 따라 디자인된다. 전형적으로, 마우스 또는 사람  $V_H$  및  $V_L$  서열이 분리되었다. 이어서,  $V_H$  및  $V_L$  서열은 통상적으로 (예를 들어, 프레임내 유연성 웨პ타이드 스페이서를 암호화하는) 개재성 스페이서 서열로 연결되어 단일쇄 항체를 암호화하는 카세트를 형성한다. 전형적으로, 다수의  $V_H$  및  $V_L$  서열을 포함하는 라이브러리가 (때때로 또한 제시되는 다수의 스페이서 웨პ타이드 종파 함께) 사용되며, 상기 라이브러리는, 특히 CDR 잔기, 때때로는 프레임워크 잔기에서 서열 다양성을 증가시키기 위해 돌연변이된 하나 이상의  $V_H$  및  $V_L$  서열과 함께 작게된다. V 영역 서열은 편리하게는 면역글로불린-발현 세포를 위한 cDNA 또는 PCR 증폭 생성물로서 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 사람 하이브리도마, 림포마 또는 세포 표면 또는 분비되는 면역글로불린을 합성하는 다른 세포주가 폴리

A+ RNA를 분리하는데 사용될 수 있다. 이어서, RNA는 역전사효소를 사용하여 올리고 dT 프라이밍된 cDNA를 합성하는데 사용된다 (일반적 방법을 위해 문헌 [Goodspeed et al. (1989) Gene 76: 1; Dunn et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 13057]을 참조한다). 일단 V-영역 cDNA 또는 PCR 생성물이 분리되면, 이는 단일쇄 항체 카세트를 형성하기 위한 벡터에 클로닝된다.

[0118] 항체 및 항체 단편 작제를 위해, 암호화 유전자가 분리되고 확인된다. 유전자는 발현 벡터로의 클로닝 또는 시험관내 전사/해독이 가능하도록 변형될 수 있다. 비록 하이브리도마 cDNA로부터 VH 및 VL에 대한 DNA를 탐침하거나 [Maniatis et al., 1982] VH 및 VL에 대한 합성 유전자를 작제하는 [Barbas et al., 1992] 방법들이 이용될 수 있지만, 편리한 모드는 항체 서열을 증폭시키기 위해 템플레이트 지향적 방법을 이용하는 것이다. 항체 유전자의 다양한 집단이 프레임워크로 알려진 가변 영역의 3' 및 5' 말단의 보존된 서열 또는 항체의 불변 여역에 대한 프라이머를 디자인함으로써 템플레이트 샘플로부터 증폭될 수 있다 [Iverson et al., 1989]. 프라이머 내에 제한 부위가 위치되어 발현 벡터로의 클로닝을 용이하게 할 수 있다. 프라이머가 이들 보존 영역에 대해 제조되게 함으로써 항체군의 다양성이 유지되어 다양한 라이브러리의 작제가 가능해진다. 특정 종 및 부류의 항체가 문헌 [Kabat et al., 1987, 본원에 참조로 포함됨]에서 기재되는 모든 유형의 항체에 대한 다수의 서열로 예시되는 바와 같이 프라이머 서열의 선택에 의해 정의될 수 있다.

[0119] 동물의 비장 또는 말초 혈액으로부터의 전령 RNA가 또한 항체 라이브러리의 증폭을 위한 템플레이트로 사용될 수 있다. 특정 상황에서, 세포 표면 상에 항체 단편의 균질군을 디스플레이하는 것이 바람직한 경우, mRNA는 일군의 모노클로날 항체로부터 분리될 수 있다. 어느 하나의 공급원으로부터의 전령 RNA는 표준 방법으로 제조되고 직접적으로 또는 cDNA 템플레이트의 제조를 위해 사용될 수 있다. 클로닝 항체를 위한 mRNA의 생성은 항체 제조 및 특성화를 위한 잘 알려진 절차에 따라 쉽게 달성된다 [참조: Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, 본원에 참조로 포함됨].

[0120] 모노클로날 항체 (MAb)의 생성은 일반적으로 폴리클로날 항체를 제조하는 절차와 동일한 절차를 따른다. 간단히 설명하면, 폴리클로날 항체는 포유동물을 면역원성 조성물로 면역화시키고 이 면역화된 동물로부터 항혈청을 수집함으로써 제조된다. 다양한 동물종이 항혈청 생성에 사용될 수 있다. 전형적으로, 항혈청의 생성에 사용되는 동물은 토끼, 마우스, 래트, 햄스터, 기니아 피그 또는 염소이다. 토끼의 비교적 큰 혈액 부피 때문에, 폴리클로날 항체의 생성에 토끼가 일반적으로 선호된다.

[0121] 면역원성 조성물은 종종 면역원성이 다양하다. 따라서, 웨타이드 또는 폴리웨타이드 면역원을 캐리어에 커플링 함으로써 달성될 수 있는 바와 같이, 호스트 면역계를 부스팅하는 것이 종종 필요하다. 예시적인 바람직한 캐리어는 키홀 림펫 혈모시아닌 (KLH) 및 소 혈청 알부민 (BSA)이다. 다른 알부민, 예를 들어, 오브알브민, 마우스 혈청 알부민 또는 토끼 혈청 알부민이 또한 캐리어로서 사용될 수 있다. 폴리웨타이드를 캐리어 단백질에 접합시키기 위한 공지된 수단이 잘 알려져 있으며, 글루타르알데하이드, m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스테르, 카보디이미드 및 비스-디아조화 벤지딘을 포함한다.

[0122] 특정 면역원 조성물의 면역원성은 애주번트로 알려진 면역 반응의 비-특이적 자극제의 사용에 의해 증진될 수 있다. 예시적인 바람직한 애주번트는 완전 프로인트 애주번트 (사멸된 미코박테리움 투베르쿨로시스를 포함하는 면역 반응의 비-특이적 자극제), 불완전 프로인트 애주번트 및 수산화알루미늄 애주번트를 포함한다.

[0123] 폴리클로날 항체의 생성에 사용되는 면역원 조성물의 양은 면역화를 위해 사용되는 동물 및 면역원의 특성에 따라 다양한다. 다양한 경로 (피하, 근육내, 피내, 정맥내 및 복강내)가 면역원을 투여하는데 이용될 수 있다. 폴리클로날 항체의 생성은 면역화 후 다양한 시점에서 면역화된 동물의 혈액을 샘플링함으로써 모니터링될 수 있다. 또한, 제2의 부스터 주사가 수행될 수 있다. 적합한 역가에 도달될 때까지 부스팅 및 역가측정 과정이 반복된다. 목적하는 수준의 면역원성이 수득되는 경우, 면역화된 동물의 피를 뽑고, 혈청을 분리하고, 저장하며, 비장을 폴리클로날 반응으로부터의 mRNA를 분리하기 위해 수거하거나, 동물을 균질한 항체군으로부터의 mRNA의 분리를 위한 Mab를 생성하는데 사용할 수 있다.

[0124] Mab는 잘 알려진 기술, 예를 들어, 미국 특허 번호 4,196,265 (본원에 참조로 포함됨)에 예시되는 기술을 통해 쉽게 제조될 수 있다. 전형적으로, 이러한 기술은 적합한 동물을 선택된 면역원 조성물, 예를 들어, 캐리어에 접합된 소분자 합텐, 정제되거나 부분적으로 정제된 단백질, 폴리웨타이드 또는 웨타이드로 면역화하는 것을 포함한다. 면역화 조성물은 항체 생성 세포를 자극하기에 효과적인 방식으로 투여된다. 설치류, 예를 들어, 마우스 및 래트가 흔히 사용되는 동물이나, 토끼, 쉬프 프로그 (sheep frog) 세포의 이용도 가능하다. 래트의 사용이 다소의 이점을 제공할 수 있으나 [Goding, pp. 60-61, 1986], 마우스, 특히, 가장 통상적으로 사용되고 일반적으로 높은 백분율의 안정한 융합을 제공하기 때문에 BALB/c 마우스가 바람직하다.

- [0125] 면역화 후, 항체 생성 포텐셜을 갖는 체세포, 특히 B 림프구 (B 세포)가 MAb 생성 프로토콜에 사용하기 위해 선택된다. 이를 세포는 생체 검사되는 비장, 편도선 또는 림프절로부터 또는 혈액 샘플로부터 수득될 수 있다. 비장 세포 및 혈액 세포가 바람직하며, 비장 세포는 분열하는 형질아세포 단계에 있는 항체-생성 세포의 풍부한 공급원이고, 혈액 세포는 혈액이 쉽게 접근가능하기 때문이다. 종종, 일 단의 동물들을 면역화시킨 후 가장 높은 항체 역가를 갖는 동물의 비장을 떼어내어 비장을 주사기로 분쇄함으로써 비장 림프구를 수득한다. 전형적으로, 면역화된 마우스로부터의 비장은 약 5 x 10<sup>7</sup> 내지 2 x 10<sup>8</sup>개의 림프구를 포함한다.
- [0126] 이어서, 면역화된 동물로부터의 항체-생성 B 림프구는 불멸의 골수종 세포, 일반적으로 면역화된 동물과 동일한 종의 골수종 세포와 융합된다. 하이브리도마-생성 융합 절차에 사용하기에 적합한 골수종 세포주는 바람직하게는 비-항체-생성 세포주이고, 높은 융합 효율을 가지며, 단지 바람직한 융합된 세포 (하이브리도마)만의 성장을 지지하는 특정한 선별 배지에서 성장할 수 있게 하는 효소 결핍을 갖는다.
- [0127] 당해 분야에 공지된 다수의 골수종 세포 중 임의의 것이 사용될 수 있다(Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, 1984). 예를 들어, 면역화되는 동물이 마우스인 경우, P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, F0, NS0/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 및 S194/5XXO Bui를 사용할 수 있고; 래트인 경우, R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210을 사용할 수 있고; 사람 세포 융합에 대해서는 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 및 UC729-6이 유용하다.
- [0128] 하나의 쥐과 골수종 세포는 세포주 저장 번호 GM3573로 신청하여 NIGMS 휴먼 지네티κ 뮤坦트 셀 레포지터리 (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository)로부터 쉽게 입수가능한 NS-1 골수종 세포주 (또한 P3-NS-1-Ag4-1으로도 지칭됨)이다. 사용될 수 있는 또 다른 마우스 골수종 세포주는 8-아자구아닌-내성 마우스 쥐과 골수종 SP2/0 비-생산자 세포주이다.
- [0129] 항체-생성 비장 또는 림프절 세포와 골수종 세포의 하이브리드를 생성하는 방법은 일반적으로 세포막의 융합을 촉진하는 (화학적 또는 전기적) 작용제 또는 작용제들의 존재 하에서, 비록 체세포와 골수종 세포의 혼합 비율이 20:1 내지 약 1:1로 다양할 수 있지만, 체세포를 골수종 세포와 2:1의 비율로 혼합하는 것을 포함한다. 센다이 바이러스를 사용하는 융합 방법이 문헌 [Kohler & Milstein (1975; 1976)]에 기술되어 있으며, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 예를 들어, 37% (v/v) PEG를 사용하는 방법이 문헌 [Gefter et al, 1977]에 기술되어 있다. 또한, 전기적으로 유도되는 융합 방법의 이용도 적합하다 [Goding pp. 71-74, 1986].
- [0130] 융합 절차는 일반적으로 낮은 빈도, 약 1 x 10<sup>-6</sup> 내지 1 x 10<sup>-8</sup>로 생육가능한 하이브리드를 생성한다. 그러나, 생육가능한 융합된 하이브리드는 선별 배지에서 배양함으로써 모의 비융합된 세포 (특히 정상적으로는 무한적으로 분열을 계속할 비융합된 골수종 세포)로부터 구별될 수 있기 때문에, 낮은 빈도가 문제가 되지는 않는다. 선별 배지는 일반적으로 조직 배양 배지 중 뉴클레오타이드의 드 노보 (de novo) 합성을 차단하는 작용제를 포함하는 것이다. 예시적인 바람직한 작용제는 아미노프테린, 메토트렉세이트 및 아자세린이다. 아미노프테린 및 메토트렉세이트는 퓨린 및 피리미딘 모두의 드 노보 합성을 차단하고, 아자세린은 단지 퓨린 합성을 차단한다. 아미노프테린 또는 메토트렉세이트가 사용되는 경우, 배지는 하이포크산틴 및 티미딘이 뉴클레오타이드의 공급원으로 보충된다 (HAT 배지) 아자세린이 사용되는 경우, 배지는 하이포크산틴으로 보충된다.
- [0131] 바람직한 선별 배지는 HAT이다. 뉴클레오타이드 구조 경로를 작동시킬 수 있는 세포만이 HAT 배지에서 생존할 수 있다. 골수종 세포는 구조 경로의 주요 효소, 예를 들어, 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HPRT)가 결여되어 생존할 수 없다. B 세포는 이 경로를 작동시킬 수 있으나, 배양물 중에서 제한된 수명을 가지며 일반적으로 약 2주 내에 죽는다. 따라서, 선별 배지에서 생존할 수 있는 유일한 세포는 골수종 및 B 세포로부터 형성된 하이드리브이다.
- [0132] 이러한 배양은 특정 하이브리도마가 선별되는 일 군의 하이브리도마를 제공한다. 전형적으로, 하이브리도마의 선별은 세포들을 미세역가 플레이트에서 단일-클론 희석으로 배양한 후, 개별 클론 상등액을 (약 2 내지 3주 후) 목적하는 반응성에 대해 시험함으로써 수행된다. 단순하고 신속한 검정은 방사선면역검정, 효소 면역검정, 세포독성 검정, 플라크 검정, 도트 면역결합 검정 등을 포함한다.
- [0133] 선별된 하이브리도마는 일련의 희석 후, 개별적 항체-생성 세포주로 클론화되며, 이어서 클론은 무한히 증식되어 MAb를 생성할 수 있다. 세포주는 MAb 생성을 위해 2가지 기본 방식으로 사용될 수 있다. 하이브리도마 샘플은 최초 융합물을 위한 체세포 및 골수종 세포를 제공하는데 사용되었던 유형의 조직적합성 동물로 (종종 복강으로) 주사될 수 있다. 주사된 동물은 융합 세포 하이브리드에 의해 생성되는 특이적 모노클로날 항체를 분비하는 종양을 발달시킨다. 이 동물로부터의 체액, 예를 들어, 혈청 또는 복수는 천자되어 MAb를 고농도로 제

공할 수 있다. 개별 세포주는 또한 시험관 내에서 배양되어, MAb가 배양 배지로 자연적으로 분비되고, 이로부터 MAb가 고농도로 쉽게 수득될 수 있다. 어느 하나의 수단에 의해 생성되는 MAb는, 필요한 경우, 여과, 원심 분리 및 다양한 크로마토그래피 방법, 예를 들어, HPLC 또는 친화성 크로마토그래피를 이용하여 더욱 정제될 수 있다.

[0134] 목적하는 모노클로날 항체의 분리 및 특성화 후, mRNA는 당해 분야에 잘 알려진 기술을 이용하여 분리되고 표적 서열의 증폭을 위한 템플레이트로서 사용될 수 있다.

[0135] 다수의 템플레이트 의존적 과정이 돌연변이유발 전 및 후에 표적 서열을 증폭시키는데 이용가능한다. 예를 들어, 가장 잘 알려진 증폭 방법 중의 하나는 문헌 [U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,683,202 and 4,800,159, 및 Innis et al. (1990), 각각 본원에 전문이 참조로 포함됨]에 상세히 기재되어 있는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR로 지칭됨)이다. 간단히 설명하면, PCR에서, 표적 서열의 맞은편 상보적 가닥 상의 영역에 상보적인 2개의 프라이머 서열이 제조된다. 과량의 데옥시뉴클레오사이드 트리포스페이트가 DNA 폴리머라제, 예를 들어, Taq 폴리머라제와 함께 반응 혼합물에 첨가된다. 표적 서열이 샘플 중에 존재하는 경우, 프라이머는 표적물에 결합하고 폴리머라제는 프라이머가 뉴클레오타이드의 첨가에 의해 표적 서열을 따라 연장되도록 할 것이다. 반응 혼합물의 온도를 높이고 낮춤으로써 연장된 프라이머는 표적물로부터 해리되어 반응 생성물을 형성하고, 과량의 프라이머는 표적물 및 반응 생성물에 결합할 것이며, 이 과정이 반복된다. 바람직하게는, 역전사효소 PCR 증폭 절차는 증폭되는 표적물의 양을 정량화하도록 수행될 수 있다. 폴리머라제 연쇄 반응 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 효소적 증폭 기술, 예를 들어, PCR을 이용함으로써, 목적하는 조절 요소가 프라이머 내로 디자인될 수 있으며, 이에 따라 DNA 생성물에 도입될 것이다.

[0136] 많은 다른 증폭 방법이 당해 분야에 공지되어 있다.

[0137] 유전자 합성의 고체상 방법에 대한 하나의 이점은 조합적 합성 기술을 이용하여 돌연변이유발 기회를 갖는 것이다. 조합적 합성 기술은 상이한 빌딩 블럭을 연속적으로 연결함으로써 화합물들의 커다란 컬렉션 또는 라이브러리를 동시에 생성하는 기술로 정의된다. 라이브러리는 용액 중에 유리된 화합물을 이용하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 화합물은 고체 지지체, 예를 들어, 비드, 고체 입자에 연결되거나 심지어는 미생물 표면 상에 디스플레이된다.

[0138] 스플릿 (split) 합성법 또는 병행 (parallel) 합성법을 포함한 수개의 방법이 조합적 합성법에 대해 존재한다 [Holmes et al., 1995; Burbaum et al., 1995; Martin et al., 1995; Freier et al., 1995; Pei et al., 1991; Bruce et al., 1995; Ohlmeyer et al., 1993]. 달리, 병행 합성법으로 알려진 기술은 고체상 또는 용액상으로 수행될 수 있다. 조합적 방법을 이용하여 많은 돌연변이체 유전자 템플레이트가 합성될 수 있다.

[0139] 또한, 돌연변이체 유전자는 당해 분야에 공지된 반합성 방법에 의해 생성될 수 있다 [Barbas et al., 1992]. 항체 단편의 보존된 영역을 프레임워크로서 사용함으로써, 가변 영역이, 랜덤 조합으로 한번 이상 동시에 항체 단편의 특이성을 변화시키고 새로운 결합 부위를 생성하기 위해, 특히 독성 또는 불안정 화합물과 같은 면역화를 유도하지 않는 항원에 대한 항체의 생성 시, 삽입될 수 있다. 같은 방식으로, 공지의 항체 서열이 랜덤 또는 비-랜덤 방식의 돌연변이 도입에 의해 변화될 수 있다.

[0140] 단백질 생성을 위한 원핵생물 시험관내 기술이 이용된 최초의 기술이었다 [Zubay et al., 1970]. 이어서, 맥아 [Roberts, 1973] 및 토끼 망상 적혈구 [Pelham, 1976]를 사용하는 진핵생물계가 개발되었다. 수개의 새로운 개발이 이들 기술의 효율을 증가시켰다. 그 예는, 선형 DNA 템플레이트를 사용하여 결과를 개선하기 위한 이. 콜라이의 뉴클레아제 결핍 균주의 개발 [Yang, 1980] 및 시스템으로부터 임의의 배경 발현을 낮추기 위한 마이크로구균 뉴클레아제를 사용한 망상 적혈구 용해물 처리를 포함한다.

[0141] 시험관내 전사/해독을 위해 개발된 가장 최근의 시스템은 SP6 및 SP7을 포함하는 파아지 RNA 폴리머라제에 의한 전사에 기초한다 [Krieg, 1987, Studier, 1990]. T7 프로모터 요소의 조절 하에 놓인 DNA는 T7 RNA 폴리머라제에 의한 시험관내 전사를 위한 템플레이트 또는 원핵생물 또는 진핵생물 단백질 합성 시스템에 첨가되는 폴리머라제를 사용하는 완전한 시험관내 전사/해독을 위한 템플레이트로서 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 임의의 시험관내 전사/해독 시스템과 함께 이용될 수 있으나, T7 시스템이 전사에 바람직하며, 원핵생물 해독 시스템의 사용이 어려운 RNA 캡핑도 필요하지 않기 때문에 바람직하다.

[0142] 해독을 위한 시험관내 방법을 이용함으로써, 아미노산 유도체는 유도체화된 아미노산의 단백질 합성 시스템 혼합물에의 첨가에 의해 단백질로 삽입될 수 있다. 정상적 아미노산에 대해 유도체의 농도를 달리함으로써, 혼합군을 생성하고 상대적 효과를 측정할 수 있다.G. 특성감별

- [0143] 본 발명에 의해 생성되는 돌연변이체 폴리펩타이드는 다양한 기술을 이용하여 특성화될 수 있다. 일반적으로, 단백질 생성물은 SDS-PAGE를 사용하여 정확한 겉보기 분자량에 대해 분석될 수 있다. 이는 폴리펩타이드가 실제로 합성되었던 초기 상태 (indication)를 제공한다. 천연 분자와 비교하는 경우, 이는 또한 정상적 접힘 또는 프로세싱이 돌연변이체에서 일어나고 있는지의 여부를 나타낸다. 이에 대해, 폴리펩타이드를 표지하는 것이 유용할 수 있다. 달리, 폴리펩타이드는 겔 염색에 의해 확인될 수 있다.
- [0144] 단백질은, 단순 합성을 넘어, 다양한 특성 및 광범위한 기능에 따라 특성화될 수 있다. 특성은 등전점, 열적 안정성, 침전율 및 접힘을 포함한다. 접힘을 조사하는 하나의 방식은 코그네이트 결합 파트너에 의해 인식되는 능력이다. 이러한 기능의 제1 예는 항체-항원 상호작용이다. 다양한 상이한 면역검정 포맷이 이러한 목적에 이용하능하고 당해 분야에 잘 알려져 있다. 원칙적으로, 친화성 또는 특이성의 변화는 단백질이 특정 리간드 또는 관련된 리간드의 패널들과 접촉될 때 측정될 수 있다.
- [0145] 면역검정은 일반적으로 2가지 유형으로 분류될 수 있다: 다수의 분리 단계를 필요로 하는 이질 검정 및 직접적으로 수행되는 균질 검정. 이질 면역검정은 일반적으로 고체 매트릭스에 고정된 리간드 또는 항체를 수반한다. 리간드 포함 샘플은 고정된 항체와 접촉되고 매트릭스 지지체 상에 형성된 복합체의 양은 부착된 라벨로부터 직접적으로 측정되거나 고정된 복합체에 대해 간접적으로 측정된다. 본 발명과 관련하여 사용되는 바와 같이, 리간드는 동일하지 않은 문자와 상호작용하여 견고하게 결합된 안정한 복합체를 형성하는 종으로 정의된다. 실제로, 결합 친화도는 일반적으로 약  $10^6 \text{ M}^{-1}$ 을 초과하고, 바람직하게는  $10^9$  내지  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ 의 범위이다. 리간드는 지환식 탄화수소, 다핵 방향족, 할로겐화된 화합물, 벤제노이드, 다핵 탄화수소, 질소 혼합로사이클, 황 혼합로사이클, 산소 혼합로사이클, 및 알칸, 알렌, 알킨 탄화수소 등을 포함한 여러 유형의 유기 문자 중 임의의 것일 수 있다. 아미노산, 펩타이드, 단백질, 지질, 사카라이드, 핵산 및 이의 배합물을 포함하는 생물학적 문자가 특히 중요하다. 물론, 이들은 단지 예시를 위한 것이며, 관심 리간드와 결합하는 항체를 수득할 수 있는 한, 매우 다양한 범위의 화합물의 검출에 임의의 의도되는 면역검정 방법이 적용가능하다는 것을 알 수 있을 것이다.
- [0146] 이종 면역검정은 관심 문자가 이와 고친화도로 특이적으로 결합하는 고정된 항체와 반응하는 샌드위치 검정으로 수행될 수 있다. 제2 단계에서, 항원에 대한 동일하거나 상이한 항체 및 마커 문자로부터 형성된 접합체가 고정화 매트릭스 상의 항원-항체 복합체와 반응된다. 과량의 유리 마커 접합체를 제거한 후, 샘플 중의 리간드 양에 비례하는 결합된 마커 접합체를 측정한다.
- [0147] 면역복합체 형성 검출은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 다수의 접근법을 적용하여 달성될 수 있다. 이들 접근법은 전형적으로 표지물 또는 마커, 예를 들어, 당해 분야에 공지된 방사성, 형광, 화학발광, 전기화학발광, 생물학적 또는 효소적 태그 또는 표지물을 검출하는 것에 근거한다. 이러한 표지물의 사용에 대한 미국 특허는 미국 특허 번호 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 및 4,366,241 (각각 참조로 본원에 포함됨)을 포함한다. 물론, 당해 분야에 알려져 있는 바와 같이, 제2 항체 또는 바이오틴/아비딘 리간드 결합 정렬과 같은 제2 결합 리간드의 사용을 통한 추가의 이점을 찾을 수 있다.
- [0148] 검출에 바람직한 방법은 방사면역검정 (RIA) 또는 효소-결합된 면역흡착 검정 (ELISA)를 포함하고, 일반적으로 증가된 민감도 때문에 ELISA가 가장 바람직하다. ELISA는 생명공학 적용에, 특히 다양한 항원성 물질에 대한 면역검정에 널리 사용된다. ELISA의 민감도는 시그널의 효소적 증폭에 근거한다.
- [0149] 본 발명에 따라 사용하기 위해 고려되는 다른 바람직한 단백질은 활성에 대해 편리한 검정을 갖는 것들이다. 표적 상호작용의 대표적인 예는 촉매작용, 효소-기질 상호작용, 단백질-핵산 상호작용, 수용체-리간드 상호작용 및 단백질-금속 상호작용을 포함한다. 이를 검정에서, 돌연변이체 단백질은 앞서의 기능 중 임의의 것을 수행하는 능력의 변화에 대해 야생형 단백질과 비교될 수 있다.
- [0150] 본원에서 사용되는 용어 "접촉"은 목적하는 상호작용이 일어나도록 반응 성분들이 서로 충분히 근접하게 되는 것으로 정의된다. 접촉은, 예를 들어, 성분들을 용액 중에서 혼합하거나, 불균질 상호작용, 예를 들어, 성분들 중 하나의 성분에 결합된 컬럼 또는 고정화 매트릭스를 통한 유동 접촉에 의해 달성될 수 있다.
- [0151] 촉매 활성을 갖는 돌연변이체 단백질에 대해, 적합한 반응은 촉매반응 속도의 변화 또는 특이성 변화로 모니터링될 수 있다.
- [0152] DNA 발현 작제물은 전형적으로 천연적으로-결합되거나 이종인 프로모터 영역을 포함하여 암호화 서열에 작동적으로 연결된 발현 조절 DNA 서열을 포함할 것이다. 바람직하게는, 발현 조절 서열은 진핵생물 호스트 세포를 형질전환하거나 트랜스펙션할 수 있는 벡터 중의 진핵생물 프로모터 시스템일 것이다. 일단 벡터가 적합한 호

스트에 삽입되면, 호스트는 뉴클레오타이드 서열의 고수준 발현 및 돌연변이된 "조작된" 항체의 수집 및 정제에 적합한 조건 하에서 유지된다.

[0153] DNA 서열은 서열들이 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된 후 (즉, 구조 유전자의 전사 및 해독을 확실히 하도록 위치된 후) 호스트에서 발현될 것이다. 이들 발현 벡터들은 전형적으로 에피좀으로서 또는 호스트 염색체 DNA의 통합부로서 호스트 유기체 내에서 복제될 수 있다. 보통, 발현 벡터는 목적하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출이 가능하도록 선별 마커, 예를 들어, 테트라사이클린 또는 네오마이신을 포함할 것이다 [참조: 미국 특허 번호 No. 4,704,362, 본원에 참조로 포함됨].

[0154] 효모와 같은 진핵생물 미생물에 추가하여, 포유동물 조직 세포 배양물도 또한 본 발명의 폴리펩타이드를 생성하는데 사용될 수 있다 [참조: Winnacker, "From Genes to Clones," VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987), 본원에 참조로 포함됨]. 온전한 면역글로불린을 분비할 수 있는 다수의 적합한 호스트 세포가 당해 분야에서 개발되었기 때문에, 진핵생물 세포가 바람직하고, CHO 세포주, 다양한 COS 세포주, HeLa 세포, 골수종 세포주 등을 포함하나, 형질전환된 B-세포 또는 하이브리도마가 바람직하다. 이들 세포를 위한 발현 벡터는 발현 조절 서열, 예를 들어, 복제 기원, 프로모터, 인핸서 [Queen et al. (1986) Immunol. Rev. 89: 49] 및 필요한 프로세싱 정보 부위, 예를 들어, 리보좀 결합 부위, RNA 스플라이싱 부위, 폴리아데닐화 부위, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 발현 조절 서열은 면역글로불린 유전자, 시토메갈로바이러스, SV40, 아데노바이러스, 소 유두종 바이러스 등으로부터 유도되는 프로모터이다.

[0155] 진핵생물 DNA 전사는 벡터 내로 인핸서 서열을 삽입함으로써 증가될 수 있다. 인핸서는 프로모터에 의한 전사를 증가시키는 10 내지 30 obp의 시스-작용 서열이다. 인핸서는 전사 단위에 대해 5' 또는 3'인 경우 전사를 효과적으로 증가시킬 수 있다. 이들은 또한 인트론 내 또는 암호화 서열 자체 내에 위치되는 경우 효과적이다. 전형적으로, SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 인핸서, 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함하는 바이러스 인핸서가 사용된다. 마우스 면역글로불린 중쇄 인핸서와 같은 포유동물계로부터의 인핸서 서열도 일반적으로 사용된다.

[0156] 또한, 포유동물 발현 벡터 시스템은 전형적으로 선별 마커 유전자를 포함한다. 적합한 마커의 예는 디하이드로 폴레이트 리덕타제 유전자 (DHFR), 티미딘 키나제 유전자 (TK) 또는 약물 내성을 부여하는 원핵생물 유전자를 포함한다. 처음 2개의 마커 유전자는 성장 배지에 티미딘 첨가 없이 성장하는 능력이 결여된 돌연변이체 세포주 이용을 선호한다. 이어서, 형질전환된 세포는 비-보충된 배지에서 성장하는 능력에 의해 확인될 수 있다. 마커로서 유용한 원핵생물 약물 내성 유전자의 예는 G418, 미코페놀산 및 하이그로마이신에 대해 내성을 부여하는 유전자를 포함한다.

[0157] 목적하는 DNA 절편을 포함하는 벡터는 세포 호스트의 유형에 따라 잘 알려진 방법으로 호스트 세포로 전달될 수 있다. 예를 들어, 원핵생물 세포에 대해서는 염화칼슘 트랜스펙션이 보통 이용되는 반면, 다른 세포 호스트에 대해서는 인산칼슘 처리, 리포펙션 또는 전기천공이 이용될 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환하는데 사용되는 다른 방법은 폴리브렌, 원형질체 융합, 리포좀, 전기천공 및 마이크로주입을 이용하는 것을 포함한다 (일반적으로, 문헌 [Sambrook et al, 상기 참조]을 참조).

[0158] 일단 발현되면, 본 발명의 항체, 개별 돌연변이된 면역글로불린 쇄, 돌연변이된 항체 단편 및 다른 면역글로불린 폴리펩타이드는, 황산암모늄 침전, 분획 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 당해 분야의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다 (일반적으로, 문헌 [Scopes, R., Protein Purification, Springer- Verlag, N.Y. (1982)]을 참조). 일단 목적하는 바와 같이 부분적으로 또는 균질하게 정제되면, 폴리펩타이드는 치료학적으로 사용되거나 검정 절차, 면역형광 염색 등을 개발하고 수행하는데 사용될 수 있다 (일반적으로, 문헌 [Immunological Methods, Vols. I and II, Eds. Lefkovits and Pernis, Academic Press, N.Y. N.Y. (1979 and 1981)] 참조).

[0159] 일단 템플레이트 웹타이드가 매핑되면, 개선된 특성을 갖는 리간드를 제작하기 위해 웹타이드 라이브러리의 템플레이트 또는 구성원들을 다양화하는 다양한 기술들이 이용될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드가, 각 단계에서의 모든 염기를 일차 올리고뉴클레오타이드서열에 대해 약간의 변화가 일어나도록 디자인된 농도로 사용하면서, 이들 웹타이드 서열에 기초하여 합성될 수 있다. 이어서, (약간) 축퇴된 올리고뉴클레오타이드의 이러한 혼합물이 본원에서 기술되는 바와 같은 랜덤 웹타이드 라이브러리 발현 벡터로 클로닝된다. 이러한 방법은 출발 웹타이드 서열의 조직적인 조절된 변화를 초래하지만, 각각의 포지티브 벡터들을 돌연변이유발 전 서열분석하는 것이 필요하다. 이러한 방법은 소수의 회수된 벡터의 다양성을 확대하는데 유용한다.

- [0160] 선택된 랜덤 웨타이드 벡터를 다양화하기 위한 또 다른 접근법은 회수된 벡터의 푸울 또는 서브세트의 돌연변이 유발을 포함한다. 패닝으로부터 회수된 벡터로 형질전환된 재조합 호스트 세포가 푸울링되고 분리된다. 벡터 DNA는 세포를, 예를 들어, 아질산, 포름산, 하이드라진으로 처리함으로써 돌연변이 유발되거나 또는 후술되는 바와 같은 돌연변이 유발자 균주의 사용에 의해 돌연변이 유발된다. 이를 처리는 벡터 DNA에 다양한 돌연변이를 초래한다. 다양한 웨타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 절편은 임의로 가변 영역을 플랭킹하는 부위에 특이적인 제한 뉴클레아제(들)로의 절단에 의해 분리된 후, 순상되지 않은 벡터 DNA로 재클로닝될 수 있다. 달리, 돌연변이 유발된 벡터는 돌연변이 유발된 랜덤 웨타이드 암호화 서열의 재클로닝 없이 사용될 수 있다.
- [0161] 일 세트의 웨타이드 리간드를 다양화하기 위한 제2의 일반적 접근법에서, 추가의 아미노산을 활성적인 것으로 밝혀진 웨타이드 또는 웨타이드들에 첨가하는데 다양한 방법이 이용 가능하다. 하나의 양태에서, 초기 패닝에서 선택된 웨타이드들의 서열들을 개별적으로 결정하고, 올리고뉴클레오타이드 근처에 결정된 서열의 전부 또는 일부를 삽입하고, 인접한 축퇴된 서열을 합성한다. 이어서, 이들을 클로닝하여 제2 라이브러리를 생성한다.
- [0162] 해독 기구에 의한 합성 동안 또는 후에 변형되지 않는 한, 재조합 웨타이드 라이브러리는 20개의 L-아미노산의 서열로 이루어진다. 이러한 라이브러리에 대한 이용 가능한 구조적 다양성이 크지만, 다양한 수단, 예를 들어, 아미노산의 화학적 변형에 의해 추가의 다양성이 도입될 수 있다. 예를 들어, 추가된 다양성의 일 공급원으로서, 본 발명의 웨타이드 라이브러리는 카복시 말단 아미드화될 수 있다. 카복시 말단 아미드화는 많은 천연 발생 생체활성 웨타이드의 활성에 필요하다. 이러한 변형은 웨티딜글리신 알파-아미드화 모노옥시게나제 (PAM) 및 하이드록시글리신 아미노트랜스퍼라제 (HGAT)에 의해 촉매되는 2-단계 반응에서 카복시 말단 Gly 잔기의 N-C 결합의 절단을 통해 생체내에서 일어난다 [참조: Eipper et al, J. Biol. Chem. 266, 7827-7833 (1991); Mizuno et al, Biochem. Biophys. Res. Comm. 137(3), 984-991 (1986); Murthy et al, J. Biol. Chem. 261(4), 1815-1822 (1986); Katopodis et al, Biochemistry 29, 6115-6120 (1990); and Young and Tamburini, J. Am. Chem. Soc. 111, 1933-1934 (1989), 각각이 본원에 참조로 포함됨].
- [0163] 아미드화는 효소, 예를 들어, PAM 및 HGAT를 사용하여 생체내에서 또는 시험관내에서 및 융합 단백질/벡터 복합체의 구조적 통합성 유지에 도움이 되는 조건 하에서 처리함으로써 수행될 수 있다. 본 발명의 랜덤 웨타이드 라이브러리에서, 아미드화는 라이브러리 서브세트, 즉 카복시 말단 Gly를 갖는 웨타이드 상에서 일어날 수 있다. 아미드화를 위해 디자인되는 웨타이드의 라이브러리는 Gly 코돈을 라이브러리의 가변 영역 도메인의 말단에 도입함으로써 작제될 수 있다. 아미드화 후, 농축된 라이브러리는 아미드화된 웨타이드에 우선적으로 결합하는 수용체에 대한 리간드의 매우 효과적인 공급원으로서 사용된다.
- [0164] 추가의 다양성을 제공하고 목적하는 생물학적 활성에 기여하기 위해 천연 발생 웨타이드 및 단백질에서 발견되는 다른 변형이 라이브러리에 도입될 수 있다. 예를 들어, 포스포릴화, 글리코실화, 셀酹이트화, 이소프레닐화 (또는 다른 지질의 추가) 등에 관여되는 아미노산 잔기를 암호화하는 코돈을 갖는 가변 영역 라이브러리가 제공될 수 있다. 천연 발생 효소로 촉매되지 않는 변형이 (비교적 온화한 조건 하에서) 화학적 수단에 의해 또는, 예를 들어, 촉매적 항체 등의 작용을 통해 도입될 수 있다. 대부분의 경우, 라이브러리 작제를 위한 효과적인 전략은 라이브러리의 가변 뉴클레오타이드 영역 내 또는 상기 영역에 인접한 효소 (또는 화학적) 기질 인식 부위를 특정화시켜 라이브러리의 대부분의 구성원들이 변형되도록 하는 것을 포함한다. 추가된 기질 인식 부위는 단순히 단일 잔기 (포스포릴화를 위한 세린) 또는, 필요한 경우, 캄플렉스 컨센서스 서열일 수 있다.
- [0165] 종래의 기술을 이용하여 이특이적 항체를 생성, 생산 또는 제조하는 것에 대한 하나의 단점은, 일반적으로, 단일 세포에서 2개 항체의 발현이 10개의 가능한 LC/HC 항체 조합을 형성하고 (항체 당 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 가짐), 이를 중 단지 하나 만이 목적하는 이특이적 생성물이므로, 목적하는 이특이적 생성물은 혼합물의 단지 적은 분획이고, 시판 규모로의 이특이적 항체의 정제가 매우 어렵다는 것이다. 예를 들어, 제1 항체 (항체 1)가 좌측 LC (1-LC1) 및 좌측 HC (1-HC1) 및 우측 LC (r-LC1) 및 우측 HC (r-HC1)를 갖고, 제2 항체 (항체 2)가 좌측 LC (1-LC2) 및 좌측 HC (1-HC2) 및 우측 LC (r-LC2) 및 우측 HC (r-HC2)를 갖는 경우, 단일 세포에서의 항체 1 및 항체 2의 발현은 하기의 가능한 LC/HC 조합을 형성한다: (1) 1-LC1/1-HC1 + r-LC1/r-HC1; (2) 1-LC1/1-HC1 + r-LC2/r-HC1; (3) 1-LC1/1-HC1 + r-LC1/r-HC2; (4) 1-LC2/1-HC1 + r-LC2/r-HC1; (5) 1-LC2/1-HC2 + r-LC2/r-HC2; (6) 1-LC2/1-HC2 + r-HC2/r-LC1; (7) 1-LC2/1-HC1 + r-HC2/r-LC2; (8) 1-LC1/1-HC2 + r-HC2/r-LC1; (9) 1-LC2/1-HC1 + r-LC2/r-HC2; (10) 1-LC1/1-HC1 + r-LC2/r-HC2. 조합 중 단지 하나 만이 2개의 항원 모두에 결합한다 (1-LC1/1-HC1 + r-LC2/r-HC2). 또한, 원치 않는 LC/HC 페어링의 결합 친화도 및 특이성은 미지이다. 중쇄 CH3 도메인에 대한 변형 (예를 들어, 놉-인-홀 (knob-in-hole) 디자인)은 중쇄 호모-이량체의 형성을 제거시킬 수 있으며, 생성되는 가능한 LC/HC 항체 조합의 수를 4개의 상이한 생성물로 감소시킬 수 있다 (2개의 상이한 경쇄 + 1개의 중쇄 쌍의 공동발현). 예를 들어, 놉-인-홀 디자인에서, 4개의 상이한 생성

물은 (1) 1-LC1/1-HC1 + r-LC2/r-HC2; (2) 1-LC1/1-HC1 + r-LC1/r-HC2; (3) 1-LC2/1-HC1 + r-LC1/r-HC2; (4) 1-LC2/1-HC1 + r-LC2/r-HC2일 것이다.

[0166] 본 발명의 H2L 다중특이적 항체는 이를 생산/제조의 어려움을 극복한다. 본 발명의 H2L 항체는 동일한 경쇄가 특정 항원에 대한 결합 특이성을 변화시키지 않으면서 2개의 중쇄 각각과 어셈블링되게 하는 최적화된 가변 도메인을 갖는다. 경쇄는 중쇄 1과 어셈블링되어 항원 1에 결합하는 Fab-아암을 형성한다. 또한, 경쇄는 중쇄 2와 어셈블링되어 항원 2에 결합하는 Fab-아암을 형성할 수 있다. 중쇄의 Fc 부분은 생체 내에서 HC1-HC2 이량체의 형성만을 가능하게 하는 방식으로 변형된다 (예: 예를 들어, "놉 인 홀" 디자인에 의해 촉진된다). 단지 헤테로-이량체만을 형성하는 2개의 중쇄 및 단일 경쇄의 발현은 단일 생성물 (본 발명의 H2L 다중특이적 항체) 만을 형성한다. 생성되는 각각의 분자는 항원 1에 결합하는 하나의 Fab 및 항원 2에 결합하는 다른 Fab 아암을 갖는다. H2L mAb. 단일 경쇄는 2개의 중쇄 모두를 어셈블링하고 항원 1 또는 항원 2에 결합하는 기능성 Fab-아암을 형성할 수 있도록 본 발명의 방법에 따라 최적화되었다. 본 발명의 H2L 항체는 보통의 IgG와 마찬가지로 당해 분야에 잘 알려진 과정으로 제조 및 정제될 수 있다.

#### H2L mAb의 작제

[0168] 출발 모 항체는 상이한 항원 (예를 들어, 항체 1은 항원 1에 결합하고, 항체 2는 항원 2에 결합한다)에 대한 공지된 바인더 (binder) (예를 들어, 항체 1을 포함하는 LC1/HC1 쌍 및 항체 2를 포함하는 LC2/HC2 쌍)일 수 있으며, 비-사람, 사람화된 또는 완전 사람 항체일 수 있다.

[0169] 제1 단계에서, 두 항체 모두의 2개의 상이한 경쇄 (LC1 및 LC2)가 단일 경쇄 (새로운-LC)로 대체된다. 이러한 과정은 경쇄의 라이브러리로 시작될 수 있다. 본 발명의 잠재적인 새로운 경쇄 (새로운-LC)의 라이브러리는 수 개의 방식으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 모든 기능성 사람 점라인 카파 경쇄 (V<sub>k</sub>) 가변 영역은 공개되어 있으며, 공개적으로 이용가능한 데이터베이스로부터 수득될 수 있다. 다양한 유전자를 라이브러리 작제를 위해 선택할 수 있다. 경쇄 가변 유전자를 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 사람 게놈 DNA로부터 증폭시킬 수 있다. 유전자가 조각조각 증폭되는 경우, 부분적 유전자는, 공개되는 바와 같이, 중첩 PCR에 의해 조합될 수 있다. 또한, 재배열된 카파 및 람다 경쇄는 경쇄 분비 시그널의 5' 말단에 대해 특이적인 전방 프라이머 및 카파 또는 람다 불변 도메인의 3' 말단에 특이적인 후방 프라이머를 사용하여 (예를 들어, 비-면역화된 공여자 푸울의 PBMC로부터 유도되는) 사람 cDNA로부터 증폭될 수 있다. 또한, LC 라이브러리는, 각각의 공지된 모 항체로부터 LC (LC1 및 LC2)를 취하고 본원에서 기재되는 진화 방법 또는 다른 방법에 따라 하나 (또는 둘 모두)를 진화시켜 LC의 집단 또는 라이브러리 (LC1 라이브러리 및 LC2 라이브러리)를 생성하므로써 생성될 수 있다.

[0170] 본 발명의 하나의 방법에서, 항체 1의 HC (HC1)를 사람 LC1 라이브러리, 예를 들어, 본원에서 기술되는 바와 같이 생성되는 LC1 라이브러리와 함께 공동-발현하고, 이어서 이러한 HC1-LC1 라이브러리를 항원 1에 대한 바인더 또는 히트 (hit)에 대해 스크리닝한 후, 바인더 또는 히트의 경쇄를 분리한다. 항체 2의 HC (HC2)를 사람 LC2 라이브러리, 예를 들어, 본원에서 기술되는 바와 같이 생성되는 LC1 라이브러리와 함께 공동-발현하고, 이어서 이러한 HC2-LC2 라이브러리를 항원 2에 대한 바인더 또는 히트에 대해 스크리닝한 후, 바인더 또는 히트의 경쇄를 분리한다. 스크리닝은 FACS (예를 들어, LC/HC 조합이 세포 표면에서 발현되는 경우) 또는 ELISA (분비되거나 세포 표면 결합된 라이브러리를 사용)에 의해 수행될 수 있다.

[0171] HC1-LC1 라이브러리 중의 확인된 히트의 분리된 경쇄를 항체 2로부터의 중쇄 (HC2)와 함께 공동-발현하고, 이러한 HC2-LC1 라이브러리를 항원 2에 대한 바인더 또는 히트에 대해 스크리닝한다. 또한, HC2-LC2 라이브러리 중의 확인된 히트의 분리된 경쇄를 분리하고, 항체 1로부터의 중쇄 (HC1)와 공동-발현한 후, 항원 1에 대한 바인더 또는 히트에 대해 스크리닝한다. 이러한 과정은 HC1 및 HC2 모두를 기능적으로 보완할 수 있는 경쇄를 포함하는 클론의 집단을 확인한다. HC1 및 HC2 모두를 기능적으로 보완할 수 있는 경쇄를 포함하는 이를 클론을 (예를 들어, 야생형 항원 1 또는 항원 2를 사용하는 경쟁적 ELISA에 의해) 추가로 특성화하여 항원 1 및/또는 항원 2, 및 각각의 모 분자 (항체 1 및/또는 항체 2)와 동일한 항원 1 및/또는 항원 2 상의 에피토프에 대한 각각의 클론의 결합 특이성 보존을 입증한다. 또한, 이들 클론의 경쇄를 HC1 및 HC2 모두와 함께 재시험하여 이들이 HC1 및 HC2 모두를 기능적으로 보완하는 능력을 보유한다는 것을 확인할 수 있다.

[0172] 확인된 새로운 경쇄(들)를 (예를 들어, 본원에서 기술되는 진화 방법에 의해) 추가로 진화시켜 모 분자의 결합 친화성에 필적하거나 이를 초과하도록 친화도를 개선하거나, 열안정성, 특이성, 결합 친화성과 같은 특성 및/또는 다른 특성을 변화시킬 수 있다.

[0173] HC1 가변 도메인은, 예를 들어, 본원에서 기술되는 바와 같은 놈-인-홀 기술로 변형된 IgG 불변 도메인과 프레

임 내에 클로닝됨으로써 스스로는 HC1 호모-이량체를 형성하도록 어셈블링될 수 없다. 동시에, HC2 가변 도메인은, 예를 들어, 본원에서 기술되는 바와 같은 놈-인-홀 기술로 변형된 IgG 불변 도메인과 프레임 내에 클로닝됨으로써 스스로는 HC2 호모-이량체를 형성하도록 어셈블링될 수 없다. HC1 및 HC2의 변형은 호모-이량체의 형성은 배제시키나, HC1-HC2 헤테로이량체의 형성은 가능하도록 디자인된다. 놈-인-홀 기술은 문헌 [Ridgway JB, Presta LG, Carter P (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9:617-621]에 상세히 기재되어 있다. 놈-인-홀 기술에서, 다른 중쇄의 CH3 도메인 내의 적절히 디자인된 구멍 (cavity)에 맞는 큰 아미노산 측쇄가 중쇄의 CH3 도메인 내로 도입된다.

[0174] 본 발명에서, 동일한 세포에서 HC1 및 HC2와 함께 (중쇄 모두를 기능적으로 보완하는) 최적화된 경쇄의 발현은 이-특이적 항체의 직접적 어셈블링을 이끈다.

[0175] 출발 모 항체가 단일 항체인 경우, 모 항체 HC 가변 도메인은 제2 (또는 그 이상의) 표적물에 결합하도록 (본원에서 기술되는 바와 같은 진화 방법과 같은 임의의 진화 방법에 의해) 진화된다. 이어서, 새로운 진화된 HC 중 하나가 모 항체로부터의 최초 HC 중 하나 및 모 항체로부터의 최초 LC와 조합되어 본 발명의 H2L 항체를 형성할 수 있다.

[0176] 또한 전체 길이의 IgG는 높은 조직 투과 및/또는 얇은 반감기가 중요한 특정 적용을 위해 보다 작은 단편 (예: CH2 스키핑 또는 F(ab')2 제조)으로 전환될 수 있다.

[0177] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 유기 모이어티의 공유적 부착에 의해 변형된, 본원에서 기술되는 바와 같은, 다중-기능성 항체 및 항원-결합 단편에 관한 것이다. 이러한 변형은 개선된 약동학적 특성 (예: 증가된 생체내 혈청 반감기)을 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 생성할 수 있다. 유기 모이어티는 선형 또는 분지된 친수성 중합체 그룹, 지방산 그룹 또는 지방산 에스테르 그룹일 수 있다. 특정 실시형태에서, 친수성 중합체 그룹은 약 800 내지 약 120,000 달톤의 분자량을 가질 수 있고, 폴리알칸 글리콜 (예: 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG)), 탄수화물 중합체, 아미노산 중합체 또는 폴리비닐 피롤리돈일 있으며, 지방산 또는 지방산 에스테르 그룹은 약 8개 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0178] 본 발명의 변형된 다중-기능성 항체 및 항원-결합 단편은 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 공유 결합된 하나 이상의 유기 모이어티를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편에 결합되는 각각의 유기 모이어티는 독립적으로 친수성 중합체 그룹, 지방산 그룹 또는 지방산 에스테르 그룹일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "지방산"은 모노-카복실산 및 이-카복실산을 포함한다. 본원에서 사용되는 "친수성 중합체 그룹"은 옥탄 보다는 물 중에서 더욱 가용성인 유기 중합체를 지칭한다. 예를 들어, 폴리리신은 옥탄 보다는 물 중에서 더욱 가용성이다. 따라서, 폴리리신의 공유적 부착에 의해 변형된 항체는 본 발명에 포함된다. 본 발명의 항체를 변형시키는데 적합한 친수성 중합체는 선형 또는 분지될 수 있으며, 예를 들어, 폴리알칸 글리콜 (예: PEG, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 (mPEG), PPG 등), 탄수화물 (예: 텍스트란, 셀룰로즈, 올리고사카라이드, 폴리사카이드 등), 친수성 아미노산의 중합체 (예: 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리아스파테이트 등), 폴리알칸 옥사이드 (예: 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체를 변형시키는 친수성 중합체는 개별적 분자적 실체로서 약 800 내지 약 150,000 달톤의 분자량을 갖는다. 예를 들어, PEG<sub>5000</sub> 및 PEG<sub>20,000</sub> (아랫첨자는 중합체의 평균 분자량 (Dalton)이다)가 사용될 수 있다. 친수성 중합체 그룹은 1 내지 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르 그룹으로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르 그룹으로 치환된 친수성 중합체는 적합한 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 아민 그룹을 포함하는 중합체는 지방산 또는 지방산 에스테르의 카복실레이트에 커플링될 수 있으며, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카복실레이트 (예를 들어, N,N-카보닐 디이미다졸로 활성화됨)는 중합체 상의 하이드록실 그룹에 커플링될 수 있다.

[0179] 본 발명의 다중-기능성 항체를 변형시키는데 적합한 지방산 및 지방산 에스테르는 포화될 수 있거나 하나 이상의 불포화 단위를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체를 변형시키는데 적합한 지방산은, 예를 들어, n-도데카노에이트 (C<sub>12</sub>, 라우레이트), n-테트라데카노에이트 (C<sub>14</sub>, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트 (C<sub>18</sub>, 스테아레이트), n-에이코사노에이트 (C<sub>20</sub>, 아라키데이트), n-도코사노에이트 (C<sub>22</sub>, 베헤네이트), n-트리아콘타노에이트 (C<sub>30</sub>), n-테트라코нт노에이트 (C<sub>40</sub>), 시스-8 9-옥타데카노에이트 (C<sub>18</sub>, 올레이트), 모든 시스-8 5,8,11,14-에이코사테라에노에이트 (C<sub>20</sub>, 아라키도네이트), 옥탄디오산, 테트라데칸디오산, 옥타데칸디오산, 도코산디오산 등을 포함한다. 적합한 지방산 에스테르는 선형 또는 분지된 저급 알킬 그룹을 포함하는 디카복실산의 모노-에스테르를 포함한다. 저급 알킬 그룹은 1 내지 약 12개, 바람직하게는 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0180]

변형된 다중-기능성 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법으로, 예를 들어, 하나 이상의 변형제와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 본원에서 사용되는 "변형제"는 활성화 그룹을 포함하는 적합한 유기 그룹 (예: 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)을 지칭한다. "활성화 그룹"은 적당한 조건 하에서 제2의 화학적 그룹과 반응하여 변형제와 제2의 화학적 그룹 간에 공유 결합을 형성할 수 있는 화학적 모이어티 또는 기능성 그룹이다. 예를 들어, 아민-반응성 활성화 그룹은 친전자성 그룹, 예를 들어, 토실레이트, 메실레이트, 할로 (클로로, 브로모, 플루오로, 요오도), N-하이드록시숙신이미딜 에스테르 (NHS) 등을 포함한다. 티올과 반응할 수 있는 활성화 그룹은, 예를 들어, 말레이미드, 요오도아세틸, 아크릴롤릴, 피리딜 디설파이드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올 (TNB-티올) 등을 포함한다. 알데하이드 기능성 그룹은 아민- 또는 하이드라지드-포함 분자에 커플링될 수 있고, 아지드 그룹은 3가 인 그룹과 반응하여 포스포르아미데이트 또는 포스포르아미드 결합을 형성할 수 있다. 분자에 활성화 그룹을 도입하기 위한 적합한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Hernanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)]을 참조). 활성화 그룹은 유기 그룹 (예: 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에 직접적으로 또는 링커, 예를 들어, 2가  $C_1-C_{12}$  그룹 (여기서, 하나 이상의 탄소 원자는 산소, 질소 또는 황과 같은 혜테로원자에 의해 대체될 수 있다)을 통해 결합될 수 있다. 적합한 링커 모이어티는, 예를 들어, 테트라에틸렌 글리콜,  $--(CH_2)_3--$ ,  $--NH--(CH_2)_6--NH--$ ,  $--(CH_2)_2--NH--$  및  $--CH_2--O--CH_2--CH_2--O--CH_2--CH_2--O--CH--NH--$ 을 포함한다. 링커 모이어티를 포함하는 변형제는, 예를 들어, 모노-Boc-알킬디아민 (예: 모노-Boc-에틸렌디아민, 모노-Boc-디아미노헥산)을 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 (EDC)의 존재 하에서 지방산과 반응시켜 유리 아민과 지방산 카복실레이트 사이에 아미드 결합을 형성함으로써 생성될 수 있다. Boc 보호 그룹은 트리플루오로아세트산 (TFA)를 사용한 처리로 생성물로부터 제거되어 기재되는 바와 같은 또 다른 카복실레이트에 커플링될 수 있는 1급 아민을 노출시킬 수 있거나, 말레산 무수물과 반응되고 생성된 생성물은 지방산의 활성화된 말레이미드 유도체를 생성하도록 폐환화될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Thompson, et al, WO 92/16221, 전문이 본원에 참조로 포함됨]을 참조).

[0181]

본 발명의 변형된 다중-기능성 항체는 다중-기능성 항체 또는 항원-결합 단편을 변형제와 반응시킴으로서 생성될 수 있다. 예를 들어, 유기 모이어티가 아민-반응성 변형제, 예를 들어, PEG의 NHS 에스테르를 사용함으로써 비-위치 특이적 방식으로 항체에 결합될 수 있다. 또한, 변형된 다중-기능성 항체 또는 항원-결합 단편은 항체 또는 항원-결합 단편의 디설파이드 결합 (예: 쇄내 디설파이드 결합)을 환원시킴으로써 제조될 수 있다. 이어서, 환원된 항체 또는 항원-결합 단편은 티올-반응성 변형제와 반응되어 본 발명의 변형된 다중-기능성 항체를 생성할 수 있다. 본 발명의 다중-기능성 항체의 특정 위치에 결합되는 유기 모이어티를 포함하는 변형된 다중-기능성 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법, 예를 들어, 역 단백질분해 [Fisch et al, *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen et al, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran et al, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)] 및 문헌 [G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)]에 기술된 방법을 이용하여 제조될 수 있다.

[0182]

본 발명의 다중-기능성 항체는 진단 및 치료를 위해 사용될 수 있다. 설명을 위한 것이지 제한적인 것이 아닌 것으로서, 다중-기능성 항체는 암, 자가면역 질환 또는 바이러스 감염을 치료하는데 사용될 수 있다. 암을 치료하기 위해, 다중-기능성 항체는 전형적으로 암 세포, 예를 들어, erbB-2, CEA, CD33 상에서 우선적으로 발현되는 항원 및 당해 분야에 잘 알려진 많은 다른 항원에 결합할 것이다. 자가면역 질환을 치료하기 위해서, 항체는 전형적으로 T-세포 상에서 발현되는 항원, 예를 들어, CD4, IL-2 수용체, 다양한 T-세포 항원 수용체 및 당해 분야에 잘 알려진 많은 다른 항원에 결합할 것이다 (예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology, 2nd ed., W. E. Paul, ed., Raven Press: New York, N.Y., 본원에 참조로 포함됨] 참조). 바이러스 감염을 치료하기 위해서, 항체는 전형적으로 특정 바이러스에 의해 감염되는 세포 상에서 발현되는 항원, 예를 들어, 단순 포진 바이러스 및 시토메갈로바이러스의 다양한 당단백질 (예: gB, gD, gE) 및 당업자에게 잘 알려진 많은 다른 항원에 결합될 것이다 (예를 들어, 문헌 [Virology, 2nd ed., B. N. Fields et al, eds., (1990), Raven Press: New York, N.Y.] 참조).

[0183]

본 발명의 다중-기능성 항체는 중추신경계 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 혈액 뇌 장벽을 통과하고 잡재적으로 치료를 위한 뇌 단백질에 결합하는 이특이적 항체가 기술되어 있다 [Yu YJ, et al, "Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target", *Sci Transl Med* 2011 May 25;3(84):84ra44, 본원에 참조로 포함됨]. 본 발명의 방법은 이러한 항체를 제조하는데 특히 유용하다.

[0184]

본 발명의 방법은 계류중인 특허원 PCT/US 10/26611 (제목: Mirac Protein, 본원에 참조로 포함됨)에서 기재되는 바와 같이 조건적으로 활성인 단백질을 생성하는데 사용될 수 있다. 조건적으로 활성인 단백질은 생물학적 단백질, 특히 치료 단백질이며, 야생형의 정상적인 생리학적 조건에서 가역적으로 또는 비가역적으로 불활성화된다. 예를 들어, 조건적으로 활성인 단백질은 체온에서는 바이러스적으로 불활성이나, 보다 낮은 온도에서는 활성이다. 조건적으로 활성인 단백질은 기술되는 바와 같은 다양한 질환을 치료하는데 잠재적으로 유용하다. 본 발명의 방법에서, 조건적으로 활성인 단백질인 다중-특이적 항체가 확인된다. 조건적으로 활성인 이들 다중-특이적 항체는 유기 모이어티로 추가로 변형되어 접합된 조건적으로 활성인 다중-특이적 항체를 생성할 수 있다.

[0185]

본 발명의 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 비경구 투여, 즉 피하, 근육내 또는 정맥내 투여에 유용하다. 비경구 투여용 조성물은 일반적으로 적합한 캐리어, 바람직하게는 수성 캐리어 중에 용해된 항체 또는 이의 각 테일의 용액을 포함할 것이다. 다양한 수성 캐리어, 예를 들어, 물, 완충수, 0.4% 염수, 0.3% 글리신 등이 사용될 수 있다. 이들 용액은 멸균성이며, 일반적으로 미립자 물질이 없다. 이들 조성물은 통상의 잘 알려진 멸균 기술로 멸균될 수 있다. 조성물은 생리학적 조건에 가깝게 하는데 필요한 약제학적으로 허용되는 보조물질, 예를 들어, pH 조절제, 완충제, 독성 조절제 등, 예를 들어, 나트륨 아세테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 나트륨 락테이트 등을 포함할 수 있다. 이들 제형 중의 돌연변이체 항체의 농도는 광범위하게, 즉 약 0.01중량% 미만, 통상적으로 적어도 약 0.1중량% 내지 5중량%로 다양할 수 있고, 선택되는 특정 투여 방식에 따라, 주로 유체 용적, 점도 등에 기초하여 선택될 것이다.

[0186]

따라서, 근육내 주사를 위한 전형적 약제학적 조성물은 1 ml 멸균 완충수 및 약 1 mg의 돌연변이체 항체를 포함하도록 제조될 수 있었다. 정맥내 주입을 위한 전형의 조성물은 250 ml의 멸균 링거 용액 및 10 mg의 돌연변이체 항체를 포함하도록 제조될 수 있다. 비경구 투여 조성물을 제조하기 위한 실제 방법은 당업자에게 공지되거나 명백할 것이며, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 20th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (2000), 본원에 참조로 포함됨]에 더욱 상세히 기재되어 있다.

[0187]

본 발명의 이점은 "산업적 적용" (또는 산업적 과정)으로 확대되며, 상기 용어는 적합한 상업적 산업 (또는 단순히 산업)에서의 적용 및 비-상업적 산업 적용 (예: 비영리적 기관에서의 생체의학 연구)을 포함하도록 사용된다. 관련 적용은 진단, 의약, 농업, 제조 및 학계 분야에서의 적용을 포함한다.

[0188]

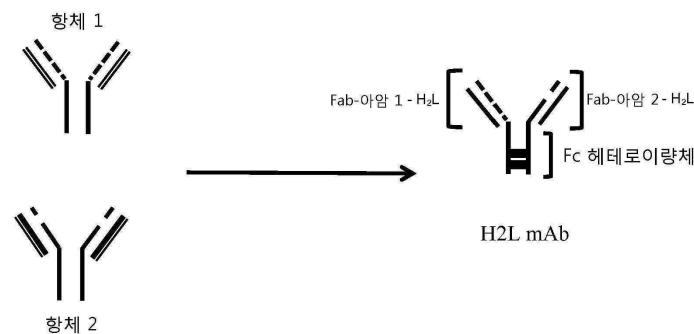
미국 특허 번호 6,171,820 및 미국 특허 번호 5,677,149을 포함하여, 본원에서 인용되는 공개문, 특허 및 특허원을 포함하는 모든 문헌은 참조로 본원에 포함된다.

[0189]

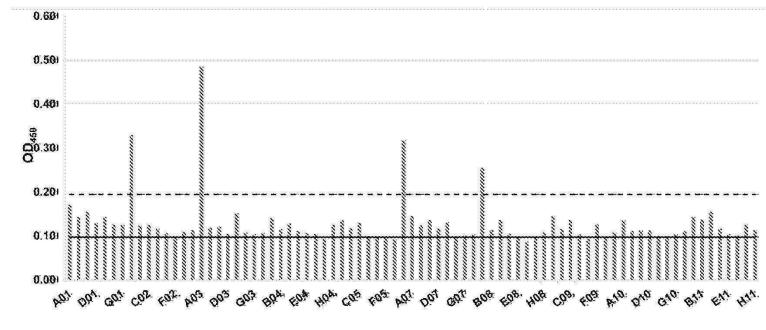
추가의 퇴고 없이도, 당업자는 전술된 기술을 이용하여 본 발명을 완전히 이용할 수 있다고 믿는다. 수반하는 실시예는 설명을 위한 것으로서 결코 본 기술의 나머지 부분을 제한하려는 것이 아니다.

## 도면

### 도면1



## 도면2



## 도면3

