



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월23일
(11) 등록번호 10-1941514
(24) 등록일자 2019년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7019148
(22) 출원일자(국제) 2011년12월22일
심사청구일자 2016년12월22일
(85) 번역문제출일자 2013년07월19일
(65) 공개번호 10-2014-0003494
(43) 공개일자 2014년01월09일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2011/001662
(87) 국제공개번호 WO 2012/083370
국제공개일자 2012년06월28일
(30) 우선권주장
61/425,858 2010년12월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2010070346 A2*
US20100278839 A1
WO2008134046 A1
WO2010085682 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
테바 파마슈티컬즈 오스트레일리아 퍼티와이 엘티
디
오스트레일리아 2113 뉴 사우스 웨일스주 맥쿼리
파크 에핑 로드 37 레벨 2
(72) 발명자
윌슨, 데이비드
미국, 캘리포니아주 94536, 프리몬트, 알렌 코트
36929
타우라, 테츠야
미국, 캘리포니아주 94306, 팔로 알토, 드리스콜
플레이스 514
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 11 항

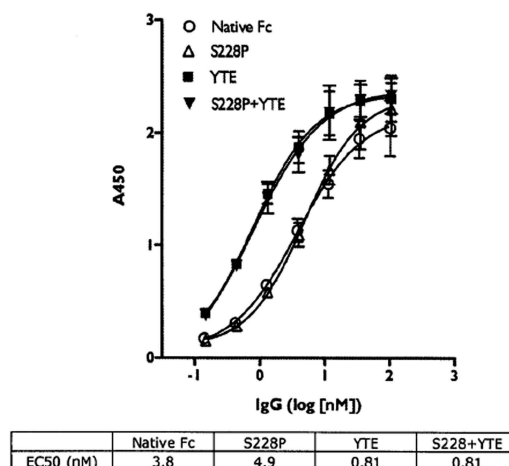
심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 개선된 반감기를 가지는 변형된 항체

(57) 요약

본 발명은 항체, 면역글로불린 컨스트럭트(immunoglobulin construct) 또는 면역글로불린 IgG4 융합(fusion) 단백질에 관한 것으로, 이의 생체 내 반감기(in vivo half-lives)는 (i) 변형된 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인 및 (ii) 변형된 IgG4 힌지(hinge) 영역 서열의 조합에 의해 증가한다.

대표도 - 도4



명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는, 인터루킨 5(interleukin 5; IL-5)에 특이적으로 결합하는 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트(immunoglobulin construct) 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질:

(i) 해당 비변형된 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여, 카바트(Kabat)에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인; 및

(ii) 카바트에서와 같이 EU 지수에 따라 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지(hinge) 영역 서열;

여기에서 변형된 항-IL-5 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 생체 내 반감기(*in vivo* half-life)는 (i) 또는 (ii)를 단독으로 가지는 해당 비변형된 항-IL-5 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질과 비교하여 증가하고, M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환의 조합은 반감기의 상승적 영향(supra-additive)의 연장을 초래함.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린은 융합의(chimeric), 인간의, 인간화된(humanized), 영장류화된(primatized), 슈퍼휴머니즈드[®](superhumanised[®]), 디이뮤니즈(de-immunised) 또는 베니어드(veneered) 항체인 것을 특징으로 하는 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 6으로 기재된 중쇄(heavy chain) 불변(constant) 영역 서열 및 서열번호 7로 기재된 중쇄 가변(variable) 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 8로 기재되는 가변 및 불변 영역 서열을 포함하는 경쇄(light chain)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질.

청구항 5

제1항에 따른 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 포함하는, 개체의 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물로서,

상기 질환은 아토피성 천식(atopic asthma), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 비알레르기성 비염(non-allergic rhinitis), 천식(asthma), 심각한(severe) 천식, 만성 호산구성 폐렴(chronic eosinophilic pneumonia), 알레르기성 기관지 폐아스페르질루스증(allergic bronchopulmonary aspergillosis), 소아 지방변증(celiac disease), 처그-스트라우스증후군(Churg-Strauss syndrome), 호산성 근육통 증후군(eosinophilic myalgia syndrome), 과호산구 증후군(hypereosinophilic syndrome), 일시적 혈관부종(episodic angioedema)을 포함하는 부종성 반응(edematous reactions), 기생충 감염(helminth infections), 온코세르카 피부염(onchocercal dermatitis), 호산성 식도염(eosinophilic oesophagitis), 호산성 위염

(eosinophilic gastritis), 호산성 위장염(eosinophilic gastroenteritis), 호산성 장염(eosinophilic enteritis), 호산성 대장염(eosinophilic colitis), 비 마이크로폴립증(nasal micropolyposis), 비 폴립증(nasal polyposis), 아스피린 불내성 천식(aspirin intolerance asthma), 수면 무호흡증(obstructive sleep apnoea), 만성 천식(chronic asthma), 크론씨 병(Crohn's disease), 경피증(scleroderma) 및 심내막심근섬유증(endomyocardial fibrosis)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

하기를 포함하는, IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인 및 IgG4 힌지 영역을 포함하는, IL-5에 특이적으로 결합하는 인간 또는 인간화된 IgG4 이소타입(isotype) 항체 또는 면역글로불린 컨스트럭트의 생체 내 반감기를 상승적으로(synergistically) 증가시키는 방법:

- (i) 항체의 중쇄 불변 영역을, 카바테서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 불변 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인과 대체(replacing)하는 단계, 및
- (ii) 카바테서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을, 상기 인간 또는 인간화된 IgG4 이소타입 항체 또는 면역글로불린 컨스트럭트의 코어 힌지 영역 서열에 도입하는 단계.

청구항 7

하기를 포함하는, 비 IgG4 항체의 이펙터(effector) 기능을 감소시키는 방법:

- (i) 비-IgG4 항체의 중쇄 불변 영역을, 카바테서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 불변 영역 또는 이의 FcRn-결합 도메인과 대체하는 단계; 및
- (ii) 비-IgG4 항체의 힌지 영역을, 카바테서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 가지는 IgG4 힌지 영역과 대체하는 단계.

청구항 8

제1항의 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 암호화하는 핵산(nucleic acid).

청구항 9

제1항의 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 발현하는 형질전환된(transformed) 세포.

청구항 10

제1항의 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 형질전환된 세포.

청구항 11

약학적으로 허용 가능한 첨가제(excipient)와 함께 약학적 조성물에 제공되는, 제1항의 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련된 출원(Related Applications)**

[0002] 본 문서는 USSN 61/425,858을 우선권 주장하고, 그 전체 내용은 참조로서 본 명세서에 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 항체, 면역글로불린 컨스트럭트(immunoglobulin construct) 또는 면역글로불린 IgG4 융합(fusion) 단백질에 관한 것으로 이의 생체 내 반감기(in vivo half-lives)는 (i) 변형된 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn

결합 도메인 및 (ii) 변형된 IgG4 힌지(hinge) 영역 서열의 조합에 의해 증가한다.

배경 기술

- [0005] IgG는 인간 및 포유류에서 가장 일반적인 면역글로불린(immunoglobulin) 종류(class)이고 다양한 종류의 면역치료법 및 진단 절차에서 이용된다. 이러한 치료법에서 하나의 중요한 주제는 순환에서 면역글로불린의 지속(persistence) 기간이다. 투여된 면역글로불린의 제거 속도는 면역글로불린 복용량(dosage)의 양 및 빈도에 직접적으로 영향을 미친다. IgG 이화작용(catabolism)에 대한 연구는 IgG 물질대사를 조절하는 IgG 불변 도메인의 부분을 확인하였고, FcRn(Fc receptor neonate)와의 상호작용을 통해 혈청에서 IgG 분해 속도를 포함한다. FcRn에 대한 증가한 결합 친화성은 IgG의 순환(또는 혈청) 반감기를 증가시킨다(예를 들어, Kim et al., Eur J Immunol., 24:2429 (1994) 참조). 반감기가 FcRn-결합 폴리펩티드를 분자들로 도입함으로써 변형된 생리학적 으로 유효한 분자들을 수득하는 방법들은 예를 들어 WO 97/43316, US 5,869,046, US 5,747,035, WO 96/32478에 기술되어 있다. 상기 분자들을 항체 또는 이의 FcRn-결합 도메인 단편에 연결하기 위한 방법들은 WO 99/43713에 예로 기술되어 있다. 그러나, 상기 문헌들은 반감기에 영향을 미치는 IgG 불변 도메인에 특이적인 돌연변이를 공개하지 않는다.
- [0006] FcRn 친화성을 증가 또는 감소시키기 위해서 아미노산 치환, 첨가 또는 결실에 의한 IgG 분자들의 변형은 WO 98/23289에 공개되어 있고, 하지만 이 문헌은 더 길거나 짧은 생체 내 반감기 중 어느 하나를 나타내는 어떠한 특이적인 돌연변이도 열거하지 않는다.
- [0007] 순환 반감기를 증가시키도록 제시되어온 마우스 IgG1의 한 돌연변이는 WO 97/34631의 예로 기술된 Thr252Ala, Thr254Ser 및 Thr256Phe의 프리플(triple) 돌연변이이다. MedImmune(US 7,083,784)은, 인간 IgG1의 맥락에서, CH2 도메인 내의 251-256, 285-290, 및 308-314 아미노산 잔기 및 385-389 및 428-436 아미노산 잔기의 하나 또는 그 이상의 변형이 FcRn에 대한 불변 도메인의 친화성을 증가시킬 수 있고 그래서 순환 반감기를 증가시킬 수 있음을 증명해왔다.
- [0008] 특히, 인간 IgG1 이소타입(isotype) 항체의 Fc에 "YTE"로 지정된, M252Y, S254T 및 T256E 트리플 돌연변이는 비-인간 영장류에서 항체의 순환 반감기를 약 2-3 배 증가시킬 수 있다.
- [0009] *IgG4 이소타입 항체의 특징*
- [0010] IgG4는 환원 조건 하의 SDS-PAGE에서, 테트라머릭(tetrameric) IgG(H2L2, 즉, 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄)가 있는 주요(major) 중 및 단일 중쇄 및 단일 경쇄(HL)를 가지는"반 면역글로불린(half immunoglobulin)이 있는 두 번째 마이너(minor) 중, 두 단백질 종이 관찰된다는 점에서 다른 인간 IgG4 이소타입과 다르다. 이러한 발견은 힌지(hinge) 영역에서 두 중쇄 사이의 이황화(disulphide) 결합 형성의 이종(heterogeneity)을 나타낸다. 더욱이, 다른 항체-결합 특이성을 가진 다른 인간 IgG4들이 함께 혼합될 때, 각각의 IgG4 분자들이 반 면역글로불린으로 분리될 수 있고 이는 그리고 나서 다시 두 개의 다른 항체(이중특이 항체)와 결합하는 테트라머릭 IgG(H2L2)를 형성하기 위해 결합된다. HL 중은 IgG4 어셈블리(assembly)에서 주요 중간생성물질이라고 여겨진다. 인간 IgG 중쇄의 힌지 서열 분석은 IgG4의(Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest 4판. 워싱턴 DC 미국 보건 사회 복지부의 번호 시스템을 따라) 잔기 228에 세린(serine)의 존재(또한 어떤 간행물에서는 잔기 241로 제시되고; 의문을 회피하기 위해, 본 발명은 IgG4 힌지 영역 서열 CPSCP(서열번호:1)의 중앙에 있는 세린을 지칭한다)는 이종의 이유가 될 수 있다. IgG4에서 상기 잔기가 세린에서 프롤린으로 변형될 때, 길어진 혈청 반감기를 가지는 균질(homogenous) 항체의 생산을 초래한다(Angal S et al., Molecular Immunology vol 30, no 1:105-108 (1993); Labrijn et al, Nature Biotechnology vol 27, no 8:767-771; Schuurman J et al., Molecular Immunology 38 (2001) 1-8).
- [0011] 향상된 순환 반감기와 같은, 향상된 특성을 가진 치료법상의 목표를 위한 항체를 생성하고자 하는 진행 중의 필요가 존재한다.

발명의 내용

- [0012] **발명의 요약**
- [0013] 본 발명은 분자, 특히 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질과 관련된 것이고 이의 생체 내 반감기는 (i) 변형되어온 IgG4 이소타입(isotype) 서열을 포함하는 Fc 영역 또는 FcRn 결합 도메인 영역, 및 (ii) 변형된 IgG4 힌지 영역 서열의 조합에 의해 증가된다. 특히적으로, 이러한 분자는 돌연변이와 같은, 변이를 가지고, 이는 the Fc 또는 FcRn을 위한 중쇄 CH2 및 CH3 불변 영역 및 이런 이유로 개체에서 이의 순환 반감기에 대한 친화성을 증가시킨다. 더욱이, 상기 분자는 IgG4 이소타입 항체에 전형적인(typical) 혼합된 헤테로다이머(heterodimer)의 형성을 폐지(abrogate)하는 변형된 IgG4 힌지 영역 서열을 포함한다.
- [0014] 본 발명은 변형의 상기 조합이 이의 야생형 비변형된 대응물(counterpart)과 비교하여 Fc 영역 변형(들) 또는 힌지 영역 변형 단독 중 어느 하나보다 상당히 길게 분자의 순환 반감기를 증가시킨다는 놀라운 발견을 기초로 한다. 더욱이, 변형의 조합은 반감기의 상승적 영향(supra-additive)의 연장을 초래한다. 인간 단백질-기반 약물(인간 항체 불변 영역을 포함하는 단백질 포함)에서의 어떠한 변형이 환자에서 항-약물 면역 반응을 유도하는 위험을 증가시키기 때문에, 약물에 대한 이러한 면역 반응을 유도하는 것에 대하여 이러한 돌연변이가 각각의 있음직하게 추가적으로 증가된 위험성을 제한하는 것은 일반적으로 이러한 돌연변이의 수를 제한하도록 권할 만 하다. 그러나, 두 종류의 변형(Fc 변형 및 힌지 변형)의 조합이 IgG4 항체의 순환 반감기를 증가시키는 상승적 영향(supra-additive) 효과를 결과로 가져오는 여기에서 기재된 놀라운 결과 때문에, IgG4 항체의 순환 반감기를 증가시키는 상승적 영향 효과의 결과를 가져온다. 결과적으로, 이 조합은 항-약물 면역 반응을 촉진하는 발생을 증가시키는 것과 관련된 이론상 불이익을 극복할 수 있는 기대치않은 장점을 제공한다. 분자의 증가한 반감기의 이점은 즉시 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 장점은 개체에게 부정적인 사건의 위험성을 낮추고 비용을 절감하는 낮은 복용 및/또는 투여 빈도를 포함한다. 따라서, 증가된 반감기를 가지는 이러한 면역글로불린은 상당히 약학적으로 중요하다.
- [0015] 더욱이, 분자가 IgG4 이소타입 불변 도메인 및 IgG4 힌지 영역을 포함하기 때문에, 상기 분자가 생체 내 이펙터 기능을 제시하지 않거나 또는 최소로 제시한다.
- [0016] 따라서, 한 실시예에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 증가된 생체 내 반감기(*in vivo* half-life)를 가지는 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트(immunoglobulin construct) 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 제공한다:
- [0017] (i) 해당 비변형된 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧(Kabat)에서와 같이 EU 지수(EU index)에 따라 번호 매겨진 251-256번째 아미노산 잔기 중 하나 또는 그 이상의 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인; 및
- [0018] (ii) CPSCP(서열번호: 1) 아미노산 서열에 있는 세린(serine) 잔기의 프롤린(proline)으로의 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어(core) 힌지(hinge) 영역 서열;
- [0019] 여기에서 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 상기 생체 내 반감기는 해당 비변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질과 비교하여 증가한다.
- [0020] 상기 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 증가된 생체 내 반감기는 상기 돌연변이가 없는 해당 인간 IgG4 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 반감기를 참조하여 결정된다.
- [0021] 본 발명은 또한 하기를 포함하는, 증가된 생체 내 반감기를 가지는 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 제공한다:
- [0022] (i) 해당 비변형된 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인; 및
- [0023] (ii) 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열;
- [0024] 여기에서 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 상기 생체 내 반감기는 해당 비변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질과 비교하여 증가한다.
- [0025] 본 발명에 따른 상기 항체는 융합(chimeric) 항체, 인간 항체, 인간화된(humanized) 항체, 슈퍼휴머니즈드[®](superhumanised[®]) 항체, 디이뮤니즈(de-immunized) 항체 또는 베니어드(veneered) 항체일 수 있다.

- [0026] 한 실시예에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 증가된 생체 내 반감기를 가지는 분리된 항체를 제공한다:
- [0027] (i) 인간 또는 인간화된(humanised) Fab,
- [0028] (ii) 해당 비변형된 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 251-256번째 아미노산 잔기 중 하나 또는 그 이상의 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인; 및
- [0029] (iii) 또한 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 S228P 치환과 같이 기재되는 CPSCP(서열번호: 1) 아미노산 서열에 있는 세린 잔기의 프롤린으로의 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열;
- [0030] 여기에서 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 상기 생체 내 반감기는 해당 비변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질과 비교하여 증가한다.
- [0031] 명세서를 통틀어, 면역글로불린 중쇄에서 잔기의 수는 EU 지수 또는 카밧의 수 체계의 것이다(Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th Ed., Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1991, National Institutes of Health, Bethesda. 상기 "EU index as Kabat(카밧과 같은 EU 지수)"는 인간 IgG1 EU 항체의 수를 지칭한다(Edelman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85, 1969). IgG2, IgG3 및 IgG4 이소타입의 아미노산 서열은 같은 위치에서, IgG1 서열과 중쇄 사이 S-S 결합을 형성하는, 대표적 힌지 영역의 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 배치함으로써, 얼라인(aligned)된다.
- [0032] 카밧에서 처럼 EU 지수에 따른 251-256번째 아미노산 잔기는 Fc 영역의 면역글로불린 중쇄 CH2 도메인 내에 위치한다. 이러한 잔기는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합에 연관되고 이런 이유로 항체 반감기의 변경에 연관된다.
- [0033] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 증가된 생체 내 반감기를 가지는 분리된 면역글로불린 컨스트럭트를 제공한다:
- [0034] (i) 항체 단편,
- [0035] (ii) 해당 비변형된 CH2 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 251-256번째 아미노산 잔기 중 하나 또는 그 이상의 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 CH2 도메인; 및
- [0036] (iii) 또한 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 S228P 치환과 같이 기재되는 CPSCP(서열번호: 1) 아미노산 서열에 있는 세린 잔기의 프롤린으로의 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열;
- [0037] 여기에서 변형된 면역글로불린 컨스트럭트의 상기 생체 내 반감기는 해당 비변형된 면역글로불린 컨스트럭트와 비교하여 증가한다.
- [0038] 한 실시예에서, 상기 분리된 면역글로불린 컨스트럭트는 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인을 포함한다.
- [0039] 바람직하게, 상기 분리된 면역글로불린 컨스트럭트는 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 치환을 포함한다.
- [0040] 특이적 항체 단편은 (i) Fab 단편 (ii) Fd 단편, (iii) Fv 단편, (iv) dAb 단편, (v) 분리된 CDR 영역, (vi) F(ab')₂ 단편, (vii) 단일쇄 Fv 분자(single chain Fv 분자; scFv), (viii) 이중특이(bispecific) 단일쇄 Fv, 및 (ix) 디아바디(diabody) (x) 트리아바디(triobody) 및 (xi) 테트라바디(tetrabody)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 본 발명은 또한 (i) 해당 비변형된 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인, 및 (ii) 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 코어 힌지 영역 서열에서 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4를 포함하도록 재조합하여 결합 또는 화학적으로 융합 또는 변형된 생물체에 작용하는(bioactive) 분자를 포함하는, 증가된 생체 내 반감기를 가지는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 제공한다.
- [0042] 상기 생물체에 작용하는 분자는 단백질 또는 비단백질 제제(agent) 또는 비면역글로불린 단백질을 포함할 수 있다.
- [0043] 한 실시예에서, 상기 생물체에 작용하는 분자는 폴리펩타이드이다.
- [0044] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 증가된 생체 내 반감기를 가지는 면역글로불린 IgG4 융합 단

백질을 포함한다:

- [0045] (i) 생물체에 작용하는 분자;
- [0046] (ii) IgG4 CH2 도메인에 관하여 카뎀에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 251-256번째 아미노산 잔기 중 하나 또는 그 이상의 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 CH2 도메인; 및
- [0047] (iii) 카뎀에서와 같이 EU 지수에 따라 S228P 치환으로 또한 설명되는 CPSCP(서열번호: 1) 아미노산 서열에 있는 세린 잔기의 프롤린으로의 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열;
- [0048] 여기에서 변형된 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 상기 생체 내 반감기는 해당 비변형된 면역글로불린 IgG4 융합 단백질과 비교하여 증가한다.
- [0049] 바람직하게, 상기 분리된 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 카뎀에서 처럼 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 치환을 포함한다.
- [0050] 본 발명에 따른 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열은 카뎀에서 처럼 EU 지수에 따른 S228P 치환을 포함한다. 상기 치환은 또한 카뎀 등((1987 Sequences of proteins of immunological interest. United States Department of Health and Human Services, Washington DC))에 따른 S228P 치환을 포함한다. 상기 치환은 상기 힌지 영역의 코어 서열을 야생형 IgG1 또는 IgG2 이소타입 항체의 것과 동일한 것으로 만드는 효과를 가진다. IgG4 이소타입 항체에 관하여, IgG4 항체의 상동(homogenous) 형태의 생산을 초래하고 이런 이유로 헤테로다имер IgG4 항체의 생산을 종종 초래하는 중쇄의 해리(dissociation) 및 재결합(reassociation)을 폐지한다.
- [0051] 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 분자는 카뎀에서 처럼 EU 지수에 따른 아미노산 252, 254 및 256번째 잔기의 하나 또는 그 이상에서의 치환을 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인을 포함한다. 특정 실시예에서, 본 발명에 따른 상기 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 Fc 영역의 아미노산 252, 254 또는 256번째 잔기 중 어느 하나의 단일 치환을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 Fc 영역의 252 및 254번째 잔기, 또는 254 및 256번째 잔기 또는 252 및 256번째 잔기의 치환을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 인간 IgG4 Fc 영역 서열의 252, 254 및 256번째 잔기 각각의 치환을 포함한다.
- [0052] 본 발명의 특정 실시예에서, 252번째 잔기는 타이로신(tyrosine), 페닐알라닌(phenylalanine), 세린, 트립토판(tryptophan) 또는 트레오닌(threonine)으로 치환되고, 254번째 잔기는 트레오닌 또는 세린으로 치환되고, 256번째 잔기는 세린, 아르기닌(arginine), 글루타민(glutamine), 글루타민산(glutamic acid), 아스파르트산(aspartic acid), 알라닌(alanine), 아스파라긴(asparagine) 또는 트레오닌으로 치환된다. 특정 실시예에서, 252번째 잔기는 타이로신(M252Y)으로 치환되고, 254번째 잔기는 트레오닌(S254T)으로 치환되고 256번째 잔기는 글루타민산(T256E)으로 치환된다. 이러한 치환들은 "YTE modification(YTE 변형)"으로 총괄하여 지칭된다.
- [0053] 또 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 항체 또는 면역글로불린 컨스트럭트는 더욱이 부분(moiety)을 함유하도록 재조합하여 융합(fused), 화학적으로 접합 (conjugated) 또는 변형될(engineered) 수 있다. 본 발명에 따른 상기 부분은 직접적으로 또는 간접적으로 항체에 결합할 수 있는 치료용 제제, 세포 독소(cytotoxin), 방사성 동위원소, 면역중재(immunomodulatory) 제제, 항-혈관신생(angiogenic) 제제, 항-신혈관 형성(neovascularization) 및/또는 다른 혈관신생(vascularization) 제제, 독소, 항증식성(anti-proliferative) 제제, 세포자멸-전(pro-apoptotic) 제제, 화학요법용 제제 및 치료용 핵산으로부터 선택될 수 있다.
- [0054] 한 실시예에서, 본 발명에 따라 변형된 항체는 인간 IL-5에 특이적으로 결합하는 항체이다. 또 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 변형된 항체는 인간 CD33에 특이적으로 결합할 수 ldT는 항체이다.
- [0055] 따라서, 한 실시예에서, 본 발명은 또한 하기을 포함하는, IL-5에 특이적으로 결합하는 분리된 항체를 제공한다:
- [0056] (i) 해당 비변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카뎀에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인, 및
- [0057] (ii) 카뎀에서와 같이 EU 지수에 따라 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열,
- [0058] 여기에서 변형된 항체의 생체 내 반감기는 해당 비변형된 항체의 반감기와 비교하여 증가한다.

- [0059] 특정 실시예에서, 상기 해당 비변형된 항-IL-5 항체는 hu39D10이다.
- [0060] 또 다른 실시예에서, 상기 분리된 항체의 Fab 서열은 메폴리주마브(mepolizumab)의 경쇄 및 중쇄 가변 영역에 해당될 수 있다.
- [0061] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 IL-5에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하고, 상기 항체는 서열번호: 6으로 기재된 불변(불변) 중쇄(heavy chain) 서열 및 서열번호: 7으로 기재된 중쇄 가변(variable) 영역을 포함한다. 또 다른 실시예에서, IL-5에 특이적으로 결합하는 항체는, 서열번호: 8에 기재되는 가변 및 불변 영역 서열을 포함하는 경쇄(light chain)를 추가적으로 포함한다.
- [0062] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 CD33에 특이적으로 결합하는 분리된 항체를 제공한다:
- [0063] (i) 해당 비변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인; 및
- [0064] (ii) 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열;
- [0065] 여기에서 변형된 항체의 생체 내 반감기는 해당 비변형된 항체의 반감기와 비교하여 증가한다.
- [0066] 특정 실시예에서, 본 발명에 따라 변형된 항 CD33 항체는 항체 huMab195이다.
- [0067] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 CD33에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하고, 상기 항체는 서열번호: 11로 기재되는 중쇄 서열 및 서열번호: 12로 기재되는 경쇄 서열을 포함한다.
- [0068] 본 발명은 또한 하기를 포함하는, 증가된 생체 내 반감기를 가지는 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 용도를 제공한다:
- [0069] (i) 해당 비변형된 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 251-256번째 아미노산 잔기 중 하나 또는 그 이상의 치환으로 구성되도록 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 비변형된 FcRn 결합 도메인; 및
- [0070] (ii) CPSCP 아미노산 서열에 있는 세린 잔기의 프롤린으로의 치환(서열번호: 1) 또는 카밧에서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 치환으로 구성된 인간 IgG4 코어(core) 힌지 영역 서열;
- [0071] 의약품(medicine)에서.
- [0072] 바람직하게, 상기 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 치환을 포함한다.
- [0073] 본 발명은 또한 질병을 치료 또는 예방하기 위한 약제(medicament)의 제조에 있어서 본 발명에 따라 변형된 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 용도를 제공한다.
- [0074] 본 발명은 하기를 포함하는 증가된 생체 내 반감기를 가지는 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 용도를 제공한다:
- [0075] (i) 해당 비변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E 아미노산 치환으로 구성되도록 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 비변형된 FcRn 결합 도메인, 및
- [0076] (ii) 카밧에서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열,
- [0077] 개체의 질병을 치료 또는 예방하기 위한 약제 제조에 있어서.
- [0078] 본 발명은 또한 본 발명의 변형된 항 IL-5 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 과도한 호산성 백혈구(eosinophil) 생산을 특징으로 하는 개체의 질병을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.
- [0079] 본 발명은 또한 하기를 포함하는 IL-5에 특이적으로 결합하는 분리된 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 과도한 호산성 백혈구 생산을 특징으로 하는 개체의 질병을 치료하기 위한 방법을 제공한다:
- [0080] (i) 해당 비변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E 아미노산 치환으로 구성되도록 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 비변형된 FcRn 결합 도메인, 및

- [0081] (ii) 카밧에서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열,
- [0082] 여기에서 변형된 항체의 생체 내 반감기는 해당 비변형된 항체의 반감기와 비교하여 증가한다.
- [0083] 본 발명은 또한 과도한 호산성 백혈구 생산을 특징으로 하는 개체의 질병을 치료 또는 예방하는데 있어 이러한 변형된 항체의 용도 및 과도한 호산성 백혈구 생산을 특징으로하는 질병을 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서 상기 변형된 항체의 용도까지 영향을 미친다.
- [0084] 한 실시예에서, 하기를 포함하는, IL-5에 특이적으로 결합하는 증가한 생체 내 반감기를 가지는 분리된 항체의 용도를 제공한다:
- [0085] (i) 해당 비변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E 아미노산 치환으로 구성되도록 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인, 및
- [0086] (ii) 카밧에서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열,
- [0087] 개체에서 과도한 호산성 백혈구 생산에 의해 특징되는 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약품 제조에서.
- [0088] 한 실시예에서, 상기 질병은 과도한 호산성 백혈구 생산(eosinophilia)에 의해 특징된다.
- [0089] 한 실시예에서, 상기 질병은 아토피성 천식(atopic asthma), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 비알레르기성 비염(non-allergic rhinitis), 천식(asthma), 심각한(severe) 천식, 만성 호산구성 폐렴(chronic eosinophilic pneumonia), 알레르기성 기관지 폐아스페르질루스증(allergic bronchopulmonary aspergillosis), 소아 지방변증(celiac disease), 처그-스트라우스증후군(Churg-Strauss syndrome), 호산성 근육통 증후군(eosinophilic myalgia syndrome), 과호산구 증후군(hypereosinophilic syndrome), 일시적 혈관부종(episodic angioedema)을 포함하는 부종성 반응(edematous reactions), 기생충 감염(helminth infections), 온코세르카 피부염(onchocercal dermatitis), 호산성 식도염(eosinophilic oesophagitis), 호산성 위염(eosinophilic gastritis), 호산성 위장염(eosinophilic gastroenteritis), 호산성 장염(eosinophilic enteritis), 호산성 대장염(eosinophilic colitis), 비 마이크로폴립증(nasal micropolyposis), 비 폴립증(nasal polyposis), 아스피린 불내성 천식(aspirin intolerance asthma), 수면 무호흡증(obstructive sleep apnea), 만성 천식(chronic asthma), 크론씨 병(Crohn's disease), 경피증(scleroderma) 및 심내막심근섬유증(endomyocardial fibrosis)로부터 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0090] 또 다른 실시예에서, 상기 질병은 자가 면역(autoimmune) 질환이다.
- [0091] 본 발명에 따라 변형된 항-IL-5 항체는 과도한 호산성 백혈구 생산에 의해 특징되는 질환과 관련되는 예방 또는 진단 방법에 사용될 수 있는 또한 바람직하다.
- [0092] 본 발명은 또한 본 발명에 따라 변형된 항 CD33 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 암 질환(disorder)을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0093] 본 발명은 또한 하기로 구성되는, CD33에 특이적으로 결합하는 분리된 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 암 질환을 치료하는 방법을 제공한다:
- [0094] (i) 해당 비변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E 치환을 포함하도록 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인, 및
- [0095] (ii) 카밧에서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열,
- [0096] 여기에서 상기 변형된 항체의 생체 내 반감기는 해당 비변형된 항체의 반감기와 비교하여 증가한다.
- [0097] 본 발명은 또한 암 질환의 치료 또는 예방에서 이러한 변형된 항체의 용도 및 암 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조에서 상기 변형된 항체의 용도까지 영향을 미친다.
- [0098] 특정 실시예에서, 상기 암 질환은 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)이다.
- [0099] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 하기로 구성되는, CD33에 특이적으로 결합하는 증가된 생체 내 반감기를 가지는 분리된 항체의 용도를 제공한다:
- [0100] (i) 해당 비변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 관하여 카밧에서와 같이 EU 지수에 따라

번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E 아미노산 치환을 포함하도록 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인, 및

- [0101] (ii) 카바테서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 포함하는 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열,
- [0102] 개체에서 암 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조에서.
- [0103] 특정 실시예에서, 상기 암 질환은 급성 골수성 백혈병이다.
- [0104] 본 발명은 또한 하기를 포함하는 방법으로, IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인 및 IgG4 힌지 영역을 포함하는 인간 또는 인간화된 IgG4 이소타입(isotype) 항체 또는 면역글로불린 컨스트럭트의 생체 내 반감기를 증가시키는 방법을 제공한다:
- [0105] (i) 카바테서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환을 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인으로 도입하는 단계, 및
- [0106] (ii) 카바테서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 코어 힌지 영역 서열에 도입하는 단계.
- [0107] 특정 실시예에서, 상기 방법은 항 CD33 항체의 반감기를 증가하기 위해 사용될 수 있다.
- [0108] 더욱 특정 실시예에서, 상기 방법은 항 IL-5 항체, 특히 hu39D10의 반감기를 증가하기 위해 사용될 수 있다.
- [0109] 본 발명은 또한 하기를 포함하는 방법, IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인 및 IgG4 힌지 영역을 포함하는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 생체 내 반감기를 증가시키는 방법을 제공한다:
- [0110] (i) 카바테서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환을 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인으로 도입하는 단계; 및
- [0111] (ii) 카바테서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열에 도입하는 단계.
- [0112] 본 발명은 또한 서열번호: 14를 포함하는 융합 단백질처럼 단백질을 변형함으로써 단백질의 생체 내 반감기를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0113] 본 발명은 또한 서열번호: 14를 포함하는 융합(fusion) 단백질을 제공한다.
- [0114] 한 실시예에서 상기 융합 단백질은 더욱이 서열번호: 14의 C-말단 바로 옆에(immediately C-terminal) 첨가된 단일 라이신(lysine)을 추가적으로 포함한다.
- [0115] 본 발명은 또한 하기를 포함하는 방법, 비 IgG4 항체의 이펙터(effector) 기능을 감소시키는 방법을 제공한다:
- [0116] (i) 카바테서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환을 포함하는 변형된, 비-IgG4 항체의 중쇄 불변 영역을 인간 IgG4 불변 영역 또는 이의 FcRn-결합 도메인과 대체하는 단계; 및
- [0117] (ii) 비-IgG4 항체의 힌지 영역을 카바테서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 가지는 IgG4 힌지 영역과 대체하는 단계.
- [0118] 본 발명은 또한 하기를 포함하는 방법, 비-인간 IgG4 항체의 생체 내 반감기를 증가시키는 방법을 제공한다:
- [0119] (i) 카바테서와 같이 EU 지수에 따라 번호 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E의 아미노산 치환을 포함하는 변형된, 비-인간-IgG4 항체의 중쇄 불변 영역을 인간 IgG4 불변 영역 또는 이의 FcRn-결합 도메인과 대체하는 단계; 및
- [0120] (ii) 비-인간 IgG4 항체의 힌지 영역을 카바테서와 같이 EU 지수에 따른 S228P 아미노산 치환을 가지는 IgG4 힌지 영역과 대체하는 단계.
- [0121] 본 발명은 또한 어떤 전형에 따른 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 암호화하는 핵산(nucleic acid)을 제공한다.
- [0122] 본 발명은 또한 어떤 전형에 따른 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 발현하는 형질전환된(transformed) 세포를 제공한다.
- [0123] 본 발명은 또한 여기에서 기재되듯이 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0124] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질로 약학적으로 수용가능한 첨가제(excipient)를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 바람직하게,

상기 조성물은 치료법적으로 효과적인 양 또는 상기 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0125] **도 1**은 변이 도메인 및 IgG4 불변 도메인, 상기 불변 도메인의 서열(천연적 IgG4 이소타입) 또는 S228P 돌연변이를 가지는 IgG4 불변 도메인, "YTE" 돌연변이 또는 S228P 및 YTE 돌연변이의 조합을 포함하는, relizumab 중쇄의 서열을 나타내고; 또한 hu39D10 중쇄 변이 도메인 및 hu39D10 경쇄의 서열을 나타낸다.

도 2는 인간 FcRn 세포의 도메인의 서열을 나타낸다.

도 3은 인간 베타2 마이크로글로불린(beta2 microglobulin)의 성숙 부분(mature portion)의 서열을 나타낸다.

도 4는 the affinity of 인간 FcRn f또는 hu39D10 containing a 천연(natural) IgG4 Fc 도메인, S228P 돌연변이, YTE 돌연변이, 또는 S228P 및 YTE 돌연변이 둘 다를 수반하는 IgG4 Fc 도메인을 포함하는 hu39D10에 대한 인간 FcRn의 친화성을 측정하는 ELISA-기반 검사를 나타낸다.

도 5는 인간화된 FcRn를 가지는 마우스, 즉, 내재성(endogenous) FcRn 유전자는 제거되었으나 인간 대응물(counterpart)이 엑토픽(ectopic)하게 발현되는 마우스에서의 PK 연구를 나타낸다. 0 일째에, 마우스는 hu39D10 또는 YTE 치환 단독, 힌지 치환(S228P) 단독 또는 둘 다 치환 중 어느 하나를 포함하는 변이를 받았다. 각 마우스의 레트로 오비탈(retro orbital) 부비강(sinus)에서 2, 12, 24 시간 및 2, 4, 7, 10, 14, 18, 21 및 28 일에 혈액을 채취하였다. 항체 수준은 동일한 마우스에서 24 시간 시점의 퍼센트 수준처럼 발현하였다.

도 6은 Fc 도메인이 S228P 및 TYE 변이를 포함하는 IgG4 이소타입인 CD33 항체 huMab195의 서열을 나타내고; 또한 huMab195의 경쇄를 나타낸다.

도 7은 인간 CD33 세포의 도메인-Fc 결합 단백질의 서열을 나타낸다.

도 8은 인간화된 FcRn를 가지는 마우스, 즉, 내재성 FcRn 유전자는 제거되었으나 인간 대응물이 엑토픽하게 발현되는 마우스에서의 PK 연구를 나타낸다. 0 일째에, 마우스는 천연 IgG4 Fc 도메인을 가지는 huMab195 또는 YTE 치환 단독, 힌지 치환(S228P) 단독 또는 둘 다 치환 중 어느 하나를 포함하는 변이를 받았다. 각 마우스의 레트로 오비탈 부비강에서 2, 12, 24 시간 및 2, 4, 7, 10 및 14 일에 혈액을 채취하였다. 항체 수준은 동일한 마우스에서 24 시간 시점의 퍼센트 수준처럼 발현하였다.

도 9는 천연 인간 IgG4 중쇄의 힌지-Fc 부분 서열 및 S228P 및 YTE 돌연변이를 가지고 C-말단(terminal) 라이신(lysine)이 제거된 인간 IgG4 중쇄의 힌지-Fc 부분 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0126] 일반

[0127] 용어 "및/또는(and/or)", 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y" 둘 중 하나를 의미하도록 이해될 수 있어야 하고 둘 다의 의미에 대한 또는 둘 중 하나의 의미에 대한 분명한 지원을 제공하기 위해 동원되어야 한다.

[0128] 본 명세서 전반에 걸쳐, 다르게 특이적으로 언급되거나 또는 문맥상 다르게 요구하지 않는 한, 단일 단계의 참조, 물질(matter)의 구성요소(composition), 단계들의 그룹 또는 물질의 구성요소들의 그룹은 이들 단계들, 물질의 구성요소, 단계들의 그룹 또는 물질의 구성요소들의 그룹의 하나 및 복수(즉, 하나 또는 그 이상)를 포함하도록 해야한다. 따라서, 여기에서 사용하듯이, 문맥상 분명히 다른 것을 가리키지 않는 한 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 복수 관점을 포함한다. 예를 들어, "a"에 대한 언급은 하나뿐만 아니라 둘 또는 그 이상을 포함하고; "an"에 대한 언급은 하나뿐만 아니라 둘 또는 그 이상을 포함하고; "the"에 대한 언급은 하나뿐만 아니라 둘 또는 그 이상 등을 포함한다.

[0129] 공개의 각 예시는 특이적으로 다르게 언급되지 않는 한 각 및 모든 다른 실시예(embodiment)에 준용하여(*mutatis mutandis*) 적용되어야한다.

[0130] 당업자들은 여기에서의 공개가 특이적으로 기재된 것들보다 변이(variations) 및 변형(modifications)에 민감하다고 인정할 것이다. 상기 공개는 모든 이러한 변이 및 변형을 포함하는 것으로 이해되어야할 것이다. 상기

공개는 또한 본 명세서에서 지칭하거나 나타낸 모든 단계, 특징, 구성요소 및 화합물, 및 어떤 및 모든 조합 또는 어느 두 또는 그 이상의 상기 단계 및 특징을 포함한다.

[0131] 본 공개는 여기에서 기재된 특이적인 실시예에 의한 범위에 한정하지 않으며, 이는 오직 예시의 목적을 의미한다. 기능적으로 동등한 산물, 구성요소 및 방법은 분명히 공개의 범위 내에 있다.

[0132] 여기에서 기재된 물질 및 방법의 구성요소는 다른 언급이 없는 한, 분자생물학, 미생물학, 바이러스학, 재조합 DNA 기술, 용액 내 펩티드 합성, 고체상 펩티드 합성, 및 면역학의 통상적인 기술을 사용하여, 부당 실험 없이 생산 또는 수행된다. 예를 들어, 이러한 절차는 Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, 2 판 (1989), I, II, 및 III 권 전체; Benny K.C.Lo, *Antibody Engineering: Methods 및 Protocols*, (2004) Humana Press, 248 권; *DNA Cloning: A Practical Approach*, I 및 II 권(D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, 문서 전체; *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*(M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, 문서 전체, 및 특히 Gait, pp 1-22; Atkinson *et al*, pp 35-81; Sproat *et al*, pp 83-115; 및 Wu *et al*, pp 135-151에 의한 논문 내; 4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, 문서 전체; *Immobilized Cells 및 Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, 문서 전체; Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods In Enzymology* (S. Colowick 및 N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), 시리즈 전체; J. F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R. L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342; Merrifield, R. B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154; Barany, G. 및 Merrifield, R. B. (1979) in *The Peptides* (Gross, E. 및 Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wunsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Muler, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 및 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474; *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir 및 C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); 및 *Animal Cell Culture: Practical Approach*, 3 판(John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, 문서 전체에 기재되어 있다.

[0133] 본 명세서를 통틀어서 단어 "포함하다(comprise)", 또는 "comprises" 또는 "comprising"와 같은 변이들은, 언급된 요소(element), 정수(integer) 또는 단계들, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹을 포함하나, 어떤 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 단계들, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹을 제외하지 않는 것으로 이해될 것이다.

[0134] 정의

[0135] 여기에서 사용되듯이 용어 "해당(corresponding)" 비변형된 항체는 여기에서 기재한 아미노산, 특히 Fc 및 힌지(hinge) 영역의 변화는 없는, 변형된 항체처럼 동일한 서열의 항체를 의미한다.

[0136] 용어 "에피토프(epitope)"는 항체가 생산되도록 하고 상기 항체가 결합할 항원성(antigenic) 분자의 부분을 지칭하도록 의도한다. 상기 용어 "에피토프"는, 여기에서 사용되듯이, 동물, 바람직하게 척추동물(vertebrate), 더욱 바람직하게 포유류, 및 가장 바람직하게 인간 또는 인간 면역 시스템의 관련 요소(component)를 발현하는 형질전환된 동물에서 항원성 또는 면역원성(immunogenic) 활성을 가지는 펩티드의 (한) 부분(들)을 지칭한다. 에피토프들은 단백질, 단백질 단편, 펩티드, 탄수화물, 지질, 및 다른 분자들로 구성될 수 있으나, 본 발명의 목적을 위해 가장 일반적으로는 짧은 올리고뉴클레오타이드이다. 상기 용어 "에피토프"는 "면역원성 에피토프", "항원성 에피토프", 또는 "항원 에피토프"를 포함하도록 의도된다.

[0137] 용어 "항체(antibody)"는 여기에서 사용되듯이 면역글로불린(면역글로불린) 분자의 가변 영역에 위치한, 적어도 하나의 에피토프 인지 부위를 통해 타겟에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다. 용어 면역글로불린 및 항체는 본 명세서 전반에서 상호교환하여(interchangeably) 사용될 수 있다. 면역글로불린 또는 항체 분자는 네 개의쇄 항체(예를 들어, 두 개의 경쇄 및 두 개의 중쇄), 재조합 또는 변형된 항체(예를 들어, 키메릭(chimeric) 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, CDR-접합된(grafted) 항체, 영장류화된 항체, 탈-이문화된(de-immunized) 항체, 수

퍼인간화된[®] 항체, 반 항체, 이중특이 항체)를 포함한다. 항체는 일반적으로 불변 도메인을 포함하고, 이는 불변 영역 또는 불변 단편 또는 Fc(fragment crystallisable)로 변형될 수 있다. 항체의 예시적인 형태는 기본 단위로서 네 개 쇠로 구성된다. 전장의 항체는 공유결합으로 연결된 두 중쇄(~50-70 kD) 및 두 경쇄(~23 kD)로 구성된다. 각 중쇄 및 경쇄는 가변 영역 및 불변 도메인으로 구성된다. 경쇄는 일반적으로 가변 영역(존재한다면) 및 불변 도메인으로 구성되고 포유류에서 κ 경쇄 또는 λ 경쇄 중 어느 하나이다. 중쇄는 일반적으로 가변 영역 및 힌지 영역이 추가적인 불변 도메인(들)에 연결된 하나 또는 두 개의 불변 도메인(들)로 구성된다. 포유류의 중쇄는 하기종류 α , δ , ϵ , γ , 또는 μ 의 하나로 구성된다. 각 경쇄는 또한 하나의 중쇄와 공유결합으로 연결된다. 예를 들어, 두 중쇄 및 중쇄 및 경쇄는 상호-쇄 이황화 결합(inter-chain disulfide bonds)에 의해 및 비공유결합 상호작용에 의해 함께 연결되어 있다. 상호-쇄 이황화 결합의 수는 다른 종류의 항체들 중 다양할 수 있다. 각 쇠는 N-말단 가변 영역(V_H 또는 V_L 에서 각각은 ~110 아미노산 길이이다) 및 하나 또는 그 이상의 불변 도메인을 C-말단에 가진다. 경쇄의 불변 도메인은(~110 아미노산 길이인 C_L) 중쇄의 첫번째 불변 도메인(330-440 아미노산 길이인 C_H1)에 나란히 위치하고(aligned) 이황화 결합으로 결합되어 있다. 경쇄 가변 영역은 중쇄의 중쇄의 가변 영역과 나란히 위치한다. 항체 중쇄는 2 또는 그 이상의 추가적인 C_H 도메인(C_H2 , C_H3 및 유사한 것과 같은)과 나란히 위치하고 C_H1 및 C_H2 불변 도메인 사이의 힌지 영역으로 구성될 수 있다. 비변형된 항체는 어떤 종류(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 하위클래스(subclass)든지 될 수 있다.

[0138] 용어 "면역글로불린 컨스트럭트(immunoglobulin construct)"는 여기에서 사용되듯이 최소 영장류 또는 인간 IgG4 항체로부터의 CH2 중쇄 불변 도메인 및 힌지 영역으로 구성된 컨스트럭트를 지칭한다. 바람직하게, 상기 용어는 최소 영장류 또는 인간 IgG4 항체로부터의 경쇄 및 중쇄 불변 도메인 및 힌지 영역으로 구성된 컨스트럭트를 지칭한다.

[0139] 용어 "불변 영역(constant region)" 또는 "불변 단편(constant fragment)"은 면역글로불린 또는 항체의 다른 부분과 비교하여 핵심(core) 보존된 아미노산 서열을 가지는 면역글로불린 또는 항체 분자의 부분을 지칭하고, 가변 영역으로 불리며, 이는 항원 결합 부위를 포함한다. 중쇄에서, 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0140] 용어 "Fc 영역(Fc region)"은 여기에서 사용되듯이 IgG 분자의 파파인(papain) 소화에 의해 수득되는 결정화되는 단편(crystallisable fragment)과 연관성이 있는 항체 또는 면역글로불린 분자의 부분을 지칭한다. 상기 Fc 영역은 이황화 결합으로 연결된 IgG 분자의 두 개의 중쇄의 C-말단의 약 절반으로 구성된 IgG 중쇄의 C-말단 영역으로 구성된다. 경쇄가 약간 다를 수 있음에도 불구하고(어떤 경우에 힌지 부분을 포함한다), 카바트(Kabat)의 EU 지수에 따라 번호 매겨지듯이, 상기 Fc 영역은 아미노산 231 내지 아미노산 447에 걸쳐있다. IgG의 상기 Fc 영역은 CH2 및 CH3, 두 불변 도메인으로 구성된다. 인간 IgG Fc 영역의 CH2 도메인은 보통 카바트의 EU 지수에 따라 아미노산 231 내지 아미노산 341에 걸쳐있다. 인간 IgG Fc 영역의 CH3 도메인은 보통 카바트의 EU 지수에 따라 아미노산 342 내지 아미노산 447에 걸쳐있다. 상기 Fc 영역은 항원 결합 활성이 없지만 탄수화물 일부(moiety) 및 신생 Fc 수용체(neonatal Fc receptor; FcRn)를 포함하는, Fc 수용체에 대한 결합 부위를 포함한다.

[0141] 용어 "이의 FcRn 결합 도메인(FcRn fusion domain thereof)"은 여기에서 사용되듯이 FcRn에 결합할 수 있는 Fc 영역의 부분을 지칭한다. 본 발명의 문맥상, 적어도 CH2 도메인을 포함하는 Fc 영역 서열의 단편을 지칭하는 것으로 또한 의도된다.

[0142] 용어 "FcRn 수용체(FcRn receptor)"는 여기에서 사용되듯이 Fc 수용체(신생을 가리키는 "n")를 지칭하고 이는 모계 IgG들의 인간 또는 영장류 태반을 통한 태아(foetus)로의 또는 작은 창자(intestine)를 통한 초유(colostrum)로부터 신생아(neonate)로의 이동과 연관되어 있다. 상기 FcRn는 또한 IgG 분자들과 결합 및 이들을 혈청으로 재활용함으로써 일정한 혈청 IgG 수준의 유지와 관련되어있다. FcRn의 IgG 분자에 대한 결합은 pH 6.0에서 최적 결합하여 절대적으로 pH 의존적이다. 상기 FcRn는 전형적으로 베타(beta)2 마이크로글로불린(microglobulin)과 복합체를 구성한다.

[0143] 상기 "힌지 영역(hinge region)"은 여기에서 사용되듯이 항체 분자의 두 Fab 팔(arm)에 유동성(mobility)을 부여(confer)하는 Fc 및 Fab 영역 사이의 면역글로불린 중쇄의 프롤린(proline)이 풍부한 부분을 지칭한다. 이는 중쇄의 첫 번째 및 두 번째 불변 도메인 사이에 위치한다. 상기 힌지 영역은 시스테인(cysteine) 잔기를 포함하고 이는 상호-중쇄 이황화 결합에 관여한다. 이는 일반적으로 카바트의 EU 번호 시스템에 따른 인간 IgG1의

Glu216 내지 Pro230(또는 카바트의 수 체계에 따른 Glu226 내지 Pro243)에 걸쳐 정의된다. 다른 IgG 이소타입의 힌지 영역은 상호-중쇄 이황화(S-S) 결합을 형성하는 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 위치함으로써 IgG1 서열과 나란히 위치할 수 있다(예를 들어 WO 2010/080538 참고). 상기 힌지 영역은 상호-중쇄 이황화 결합과 관련된 시스테인 잔기를 포함한다.

- [0144] 용어 "핵심 힌지 영역 서열(core hinge region sequence)"은 여기에서 사용되듯이 IgG4에 존재하고 카바트의 EU 지수에 따른 아미노산 226 내지 230에 걸친 아미노산 서열 CPSCP(서열번호:1)을 지칭하도록 의도된다. 상기 핵심 힌지 영역은 인간 IgG4에 서열 ESKYGPP인 상위 힌지 영역과 구별된다.
- [0145] 용어 "가변 영역(variable region)"은 여기에서 사용되듯이 " 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 여기에서 정의되듯이 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 부분을 지칭하고, 상보적 결정 영역(complementarity determining regions; CDRs); 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 프레임워크 영역(framework regions; FRs)의 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 상기 가변 영역은 세 CDRs을 함께 가지는 세 개 또는 네 개의 FRs(예를 들어, FR1, FR2, FR3 및 선택적으로 FR4)으로 구성된다. IgNAR로부터 유래된 단백질의 경우, 상기 단백질은 CDR2가 부족할 수 있다. V_H 는 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. V_L 는 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.
- [0146] 용어 "Fab"는 여기에서 사용되듯이 각 중쇄 및 경쇄(1가(monovalent) 항원 결합 단편)의 하나의 불변 및 하나의 변이 도메인으로 구성된 항체 영역을 지칭하도록 의도되나, 여기에서 상기 중쇄는 CH2 및 CH3 도메인(즉 V_H , CH1, V_L , 및 CL)이 제거된 것처럼 줄여졌고(truncate), 또한 일부 또는 전체 힌지 영역이 부족하다. 효소 과파인으로 전체 항체의 소화에 의해 생산될 수 있다. Fab는 분리 시 이 영역, 또한 전장의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 Fab 결합 단백질의 문맥상 이 영역을 지칭할 수 있다.
- [0147] 용어 "Fab'"는 여기에서 사용되듯이 온전한(intact) 경쇄 및 V_H 및 단일 불변 도메인으로 구성된 중쇄의 부분으로 구성된 분자를 생산하기 위해, 감소(reduction)에 의해 수반되고, 펩신(pepsin)으로 전체 항체를 처리함으로써 수득될 수 있다. 두 Fab' 단편은 이 방법으로 처리되는 항체마다 수득된다.
- [0148] "scFv"에 있어서 항체의 V_H 및 V_L 도메인으로 구성된 항체 단편을 의미하고, 여기에서 이러한 도메인들은 단일 폴리펩티드 내에 존재한다. 예를 들어, 미국 특허 제 4,946,778호, 5,260,203호, 5,455,030호, 및 5,856,456호 참고. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 더욱이 상기 scFv가 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는 V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 연결자(linker)를 구성한다. scFv의 리뷰에 대gks Pluckthun (1994) The Pharmacology of Monoclonal Antibodies vol 113 ed. Rosenberg and Moore (Springer-Verlag, NewYork) pp 269-315를 참조. Fv 단편의 V_H 및 V_L 도메인 복합체는 이황화 결합에 의해 또한 안정화될 수 있다(미국 특허 제 5,747,654호).
- [0149] "무 또는 최소 이펙터 기능(no or minimal effector function)"에 있어서 상보적 고정(complement fixation) 또는 항체-의존적 세포-매개의 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC)과 같은 IgG1 종류 항체에 정상적으로 기인할 수 있는 특정 활성을 의미한다.
- [0150] 용어 "분리된(isolated)"은 여기에서 사용되듯이 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 이의 천연 환경으로부터 제거된 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 지칭한다. 따라서, 재조합 숙주에 의해 생산된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 결합 단백질은 본 발명의 목적을 위해 분리된 것으로 여겨진다. 바람직하게, 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 상당히 정제된다.
- [0151] "상당히 정제된(substantially purified)"에 있어서 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 세포 또는 조직원으로부터 유래된 세포 물질 또는 다른 오염발생 단백질이 상당히 없거나, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구물(precursor) 또는 다른 화학물질이 상당히 없는 것을 의미한다. 이 표현은 세포로부터 분리되거나 또는 재조합하여 생산된 세포 구성물질로부터 분리된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 준비를 포함한다. 따라서, 세포 물질이 상당히 제거된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 오염유발 단백질 및 배양 배지의 약 30%, 20%, 10% 또는 5%(전조 중량에 의한)보다 적게 가지는 준비를 포함한다.
- [0152] 용어 "면역글로불린 IgG4 융합 단백질(면역글로불린 IgG4 fusion protein)"은 변형된 인간 IgG4 힌지 영역 및 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 및/또는 이의 FcRn 결합 도메인에 연결 또는 부착된 생물작용 분자를 지칭한다. 결합 단백질은 후에 더욱 자세히 논할 것이다.
- [0153] 용어 "생체 내 반감기(*in vivo* half-life)"는 여기에 사용되듯이 특히 주어진 동물의 순환에서 Fc 영역 및/또는

이의 FcRn 결합 도메인을 포함하는 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 순환 반감기를 지칭하고 동물에 투여된 양의 반이 순환으로부터 제거될 것으로 요구되는 시간에 의해 대표된다. 본 발명에 따른 주어진 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 제거 곡선이 시간의 함수로 만들어질 때 상기 곡선은 보통 혈관 내외의 공간 사이에 주입된 IgG 분자의 평형을 나타내고 부분적으로 분자의 크기로 결정되는 빠른 알파 상(rapid alpha phase), 및 혈관 내 공간의 IgG 분자의 이화작용(catabolism)을 나타내는 더 긴 베타 상(longer beta phase)을 가지는 2상이다. 상기 용어 "생체 내 반감기"는 사실상 변형되거나 비변형된 IgG4 면역글로불린 또는 베타 상의 결합 단백질에 해당한다.

[0154] 용어 "증가된 생체 내 반감기(increased *in vivo* half-life)"는 여기에서 사용되듯이 본 발명에 따라 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 혈청 또는 혈장에서 더 큰 지속력을 가짐을 및/또는 동일한 치환을 포함하지 않는 같은 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질과 관련된 최대 측정 혈청 또는 혈장 농도가 반으로 감소하는 시간의 더 긴 주기를 의미한다.

[0155] 용어 "재조합된(recombinant)"은 인공적인 유전적 재조합의 산물을 의미하기 위해 이해되어야 한다. 따라서, 항체 항원 결합 도메인으로 구성된 재조합 단백질의 문맥상, 이 용어는 B 세포 성숙 과정에서 발생하는 천연적 재조합의 산물인 개체의 신체 내에서 천연적으로 발생하는 항체를 포함하지 않는다. 그러나, 만약 이러한 항체가 분리된다면, 항체 가변 영역으로 구성된 분리된 단백질이 고려될 것이다. 유사하게, 만약 단백질을 암호화하는 핵산이 분리되고 재조합 방법을 사용하여 발현된다면, 결과 단백질은 항체 항원 결합 도메인으로 구성된 재조합 단백질이다. 용어 재조합은 예를 들어 발현되는 세포, 조직 또는 개체 내에 존재할 때, 인공적인 재조합 방법에 의해 발현되는 또한 항체, 면역글로불린 또는 결합 단백질을 또한 포함한다.

[0156] 용어 "특이적으로 결합(specifically binds)"은 특이적으로 또는 바람직하게 항원(예를 들어, 에피토프 또는 면역 복합체)에 결합하고 예를 들어, 다른 구조적으로 또는 기능적으로 관련된 단백질, 또는 서열 유사성을 지닌 단백질과 같은, 항원에 특이적으로 결합(즉, 상호-반응)하지 않는 분자(예를 들어, 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질)를 지칭한다. 항원에 특이적으로 결합하는 분자는 예를 들어, 면역학적 검정(immunoassay), BIAcore, 또는 다른 당업계에 알려진 검사에 의해 결정되듯이 더 낮은 친화성을 가지는 다른 펩티드 또는 폴리펩티드와 결합할 수 있다. 바람직하게, 특이적으로 항원에 결합하는 분자는 다른 단백질들과 상호반응하지 않는다. 특이적으로 항원에 결합하는 분자들은 예를 들어, 면역학적 검정, BIAcore, 또는 다른 당업자에게 알려진 기술에 의해 동정될 수 있다. 비제한적인 예시의 방법에 의해, 만약 또 다른 항원에 대해 항체의 해리 상수(K_D)보다 작은 K_D 를 가지는 상기 항원에 결합한다면 항체는 바람직하게 항원에 결합되도록 고려될 수 있다. 또 다른 비제한적 예시에서, 항체는 만약 상기 첫 번째 항원에 두 번째 항원에 대한 항원의 K_D 보다 적은 등급(magnitude)의 적어도 일순인 친화성을 가지고 결합한다면 바람직하게 첫 번째 항원에 결합되도록 고려될 수 있다. 또 다른 비제한적 예시에서, 항체는 만약 상기 첫 번째 항원에 두 번째 항원에 대한 항원의 K_D 보다 적은 등급의 적어도 이순인 친화성을 가지고 결합한다면 바람직하게 첫 번째 항원에 결합되도록 고려될 수 있다.

[0157] 용어 "치료하는(treating)" 또는 "치료하다(treat)"는 여기에서 사용되듯이 명시된 질병 또는 상태(condition)의 적어도 하나의 증상을 감소 또는 제거시키기 위해 충분한 본 발명에 따른 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 결합 단백질의 "치료법적으로 효율적인 양(therapeutically effective amount)"을 투여하는 단계를 지칭한다.

[0158] 용어 "예방하다(prevent)" 또는 "예방(preventing)"은 여기에서 사용되듯이 명시된 질병 또는 상태의 발달을 중지하거나 막기 위해 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 IgG4 결합 단백질의 치료법적으로 효율적인 양의 투여하는 단계를 지칭한다.

[0159] 여기에서 사용되듯이, 용어 "치료법적으로 효율적인 양(therapeutically effective amount)"은 임상 질병에 대한 임상적으로 진단 또는 임상적으로 특징을 관찰 및 허용하여 수준이 낮도록 그 질병에 대한 하나 또는 그 이상의 증상을 감소 또는 억제하기 위해 충분한 양의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 의미하는 것을 취할 수 있다. 당업자는 이러한 양이 예를 들어, 투여된 특이적 항체(들), 면역글로불린 컨스트럭트(들) 및/또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질(들) 및/또는 특이적 개체 및/또는 질병의 종류 또는 심각성 또는 수준에 의존하여 다양할 것을 인지할 것이다. 따라서, 상기 용어는 본 발명이 특정 양(quantity), 예를 들어, 무게 또는 양(amount)에 제한되는 것으로 해석되지 않을 것이고 오히려 본 발명은 개체에서 언급된 결과를 성취하기에 충분한 항체(들), 면역글로불린 컨스트럭트(들) 및/또는 면역글로불린 IgG4 융

합 단백질(들)의 약간의 양을 포함한다.

[0160] 용어 "약학적으로 허용가능한(pharmaceutically acceptable)"는 여기에서 사용되듯이 연방(federal) 또는 국가 정부(state government)의 관리 기관에 의해 승인된 또는 미국 약전(US Pharmacopeia) 또는 인간에게 사용되도록 다른 일반적으로 인식된 약전에 나열된 것을 의미한다.

[0161] 여기에서 사용되듯이, 용어 "개체(subject)"는 인간 또는 비인간 영장류, 또는 인간 FcRn를 가진 비영장류 포유류를 의미하는 것을 취할 수 있다.

[0162]

[0163] 아미노산 치환

[0164] 아미노산 치환 방법은 당업계에 잘 알려져있다. 예를 들어, 아미노산 치환은 부위 특이적 돌연변이화에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, Zoller 및 Smith Nucl. Acids Res. 10:6487 (1982)). 돌연변이화는 변형 될 항체의 불변 도메인의 서열 내에 하나 또는 그 이상의 변형을 가지는 올리고뉴클레오타이드를 합성함으로써 수행될 수 있다. 부위 특이적 돌연변이화는 양쪽 가로질러질 삭제 교차로의 양쪽에 있는 안정한 듀플렉스(duplex)을 형성하는 프라이머 서열의 충분한 크기 및 서열 복잡성을 제공하기 위한 인접 올리고뉴클레오타이드의 충분한 수뿐만 아니라, 바람직한 돌연변이의 DNA 서열을 암호화하는 특이적 올리고뉴클레오타이드 서열의 사용을 통해 돌연변이의 생산을 허용한다. 전형적으로, 변경될 서열의 교차로의 두 끝(side)에 있는 약 10 내지 약 25 또는 그 이상의 잔기를 가지는, 약 17 내지 약 75 뉴클레오타이드의 프라이머 또는 길이가 더 긴 것이 바람직하다. 하나 또는 그 이상의 지점에서 다양한 다른 돌연변이를 도입하는 이러한 많은 프라이머는 돌연변이 라이브러리를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0165] 부위 특이적 돌연변이화 기술은 당업계에 잘 알려져있다(예를 들어, Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154:367-82, 1987 참고). 일반적으로, 부위 특이적 돌연변이화는 단일 가닥 벡터를 처음 수득 또는 바람직한 펩티드를 암호화하는 DNA 서열을 이 서열 내에 포함하는 이중 나선 벡터의 두 가닥을 해리함으로써 실시된다. 일반적으로 합성하여, 원하는 돌연변이화된 서열을 만드는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 준비한다. 그런 다음 이 프라이머는 단일 가닥 벡터로 어닐링(anneal)하고, 돌연변이를 가지는 가닥의 합성을 완성시키기 위해 T7 DNA 폴리머라아제와 같은 DNA 폴리머화(polymerizing) 효소를 처리하였다. 따라서, 헤테로듀플렉스(heteroduplex)는 하나의 서열은 원래의 비돌연변이화된 서열을 암호화하고 두 번째 가닥은 원하는 돌연변이를 가지고 있도록 형성된다. 이 헤테로듀플렉스 벡터는 그런 다음 대장균 세포와 같은, 적당한 세포에 형질전환 또는 형질감염하기 위해 사용되고, 돌연변이화된 서열 배열을 가지고 있는 재조합 벡터를 포함하는 클론이 선택된다. 인정될 수 있도록, 상기 기술은 전형적으로 단일 가닥 및 이중 가닥 형태 둘 다로 존재하는 파지(phage) 벡터를 사용한다. 부위 특이적 돌연변이화에서 유용한 전형적인 벡터들은 M13 파지와 같은 벡터들을 포함한다. 이러한 파지는 쉽게 상업적으로 이용가능하고 이들의 사용은 일반적으로 당업계에 잘 알려져 있다. 이중 나선의 플라스미드는 또한 통상적으로 플라스미드를 파지로 관심 유전자를 전달하는 단계를 제거하는 부위 특이적 돌연변이화에 사용된다. 부위 특이적 돌연변이화는 또한 Kim Jin-Kyoo et al., (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:542-548)에 기재된 것처럼 쥐과(murine) IgG1 힌지-Fc 단편의 혈장 청소(plasma clearance)에 영향을 미치는 아미노산 잔기를 확인하기 위해 사용되고 있다.

[0166] 그 대신에, 택(Taq) DNA 폴리머라아제와 같은 상업적으로 이용가능한 내열성(thermostable) 효소로 PCR의 사용은 그런 다음 적합한 클로닝 또는 발현 벡터로 클로닝될 수 있는 증폭된 DNA 단편으로 돌연변이화 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 통합하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, PCR-매개 돌연변이화 절차에 대해 Tomic et al., *Nucleic Acids Res.*, 18(6):1656, 1987, 및 Upender et al., *Biotechniques*, 18(1):29-30, 32, 1995 참조. 내열성 폴리머라아제 뿐만 아니라 내열성 리가아제를 사용하는 PCR은 또한 인산화된 돌연변이화된 올리고뉴클레오타이드를 증폭된 DNA 단편으로 통합시키기 위해 사용될 수 있고 이는 그런 다음 적합한 클로닝 또는 발현 벡터로 클로닝 될 수 있다(예를 들어, Michael, *Biotechniques*, 16(3):410-2, 1994 참조).

[0167] 항체의 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인의 서열 변이를 생산하는 당업자에게 알려진 다른 방법들은 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 단편의 도메인의 아미노산 서열을 암호화하는 재조합 벡터들은 서열 변이를 얻기 위해, 수산화아민(hydroxylamine)과 같은, 돌연변이화 제제로 처리될 수 있다.

[0168] FcRn에 대한 증가된 친화성 또는 증가된 생체 내 반감기를 초래하는 돌연변이는 후에 기재될 것들과 같은 통상적인 검사를 사용하여 스크리닝될(screen) 수 있다.

[0169] 예시적인 아미노산 치환은 EU 카뎃 수 체계에 따른 T250Q 및/또는 M428L 또는 T252A, T254S 및 T266F 또는

M252Y, S254T 및 T256E 또는 H433K 및 N434F 를 포함한다. 추가적 또는 대안적 아미노산 치환은 예를 들어 US20070135620 또는 US7083784에 기재된다.

[0170]

[0171] 본 발명의 항체

[0172] 본 발명에 따른 항체 또는 면역글로불린은 항원에 결합하고(특이적 항원-항체 결합을 검사하기 위한 당업계에 알려진 면역학적 검정에 의해 결정되듯이) Fc 영역 또는 FcRn 결합 도메인을 포함하는 어떤 면역글로불린 분자 또는 항체든지 포함한다. 항체는 폴리클로날(polyclonal), 모노클로날(monoclonal) 또는 단일특이적(monospecific), 이중특이적(항체의 다양한 형성의 맥락에서), 인간, 인간화된, 키메라, 슈퍼휴머니즈®(superhumanised®), 연장류화된 또는 디이뮤니즈(deimmunised)될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 본 발명의 항체는 단일특이적, (또는 이중특이적, 삼중특이적 또는 다양한 형태가 존재한다면 더욱 다중특이적)이다.

[0173] 특히, 항체는 단일특이적 테트라머(tetramer)이다.

[0174] 항체(및 여기에서 기재된 다른 면역글로불린 컨스트럭트 또는 융합 단백질)는 어떤 동물 기원이 될 수 있다. 바람직하게, 항체는 인간 또는 인간화된 것이다. 여기에서 사용되듯이 용어 "인간(human)" 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 가지는 항체를 포함하고 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 또는 하나 또는 그 이상의 인간 면역글로불린을 위한 형질전환된 동물로부터 분리된 항체를 포함하고 이는 US 5,939,598에서 예를 들어 기재되듯이, 내재성 면역글로불린을 발현하지 않는다.

[0175] 본 발명의 항체(들)은 안정화된 IgG4 힌지 영역으로 구성된다. 용어 "안정화된 IgG4 힌지 영역(stabilized IgG4 hinge region)"은 Fab 팔 교환 또는 Fab 팔 교환 또는 반-항체의 형성을 겪을 경향(propensity) 또는 항체 반을 형성할 경향을 감소시키도록 변형된 IgG4 힌지 영역을 의미하도록 이해될 것이다. "Fab 팔 교환(Fab arm exchange)"은 인간 IgG4에 대한 단백질 변형의 종류를 지칭하고, 여기에서 IgG4 중쇄 및 부착된 경쇄(반-분자(half-molecule))는 중쇄 짝(pair)으로 교환(swap)된다. 따라서, IgG4 분자는 두 별개의 항원(이중특이적 분자를 야기하는)을 인지하는 두 별개의 Fab 팔을 획득할 수 있다. Fab 팔 교환은 천연적으로 생체 내에서 발생하고 감소한 글루타티온(glutathione)과 같은 생체 외에서 정제된 혈액 세포 또는 환원제에 의해 유도될 수 있다. "반 항체(half antibody)"는 IgG4 항체가 단일 중쇄 및 단일 경쇄를 각각 포함하는 두 분자를 형성하기 위해 분리될 때 형성된다.

[0176] 안정화된 IgG4 힌지 영역은 카밧의 EU 수 체계에 따른 228 위치에서 세린의 프롤린으로의 치환으로 구성되고(Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and 인간 Services, 2001 및 Edelman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85, 1969), 이는 카밧의 EU 수 체계에 따른 241 위치에서의 세린의 프롤린으로의 치환에 상응한다(Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and 인간 Services, 1987 및/또는 1991). 의심할 여지를 없애기 위해, 이는 IgG4 힌지 영역 서열 CPSCP(서열번호: 1)의 중앙의 세린을 지칭한다. 세린을 프롤린으로의 치환을 따라, IgG4 힌지 영역은 서열 CPPCP를 구성한다. 이 점에 있어서, 당업자는 "힌지 영역(hinge region)"이 항체의 두 Fab 팔의 유동성을 수반하는 Fc 및 Fab 영역을 연결하는 항체 중쇄 불변 영역의 프롤린-풍부 영역임을 알게 될 것이다.

[0177] 한 실시예에서, 본 발명의 항체는 다양한 형태가 될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 항체 다이머, 트리머, 또는 모노머의 면역글로불린 분자의 높은 단계의 다량체(multimer) 형태를 취할 수 있다. 전체 면역글로불린 분자의 또는 F(ab')₂ 단편의 다이머는 사원자(tetravalent)이고, 반면 Fab 단편의 다이머 또는 scFv 분자는 이원자(bivalent)이다. 항체 다량체 내의 개별 모노머는 동일하거나 다를 수 있고, 즉, 이들은 헤테로머릭(heteromeric) 또는 호모머릭(homomeric) 항체 다량체가 될 수 있다. 예를 들어, 다량체 내의 개별 항체들은 같거나 다른 결합 특이성을 가질 수 있다.

[0178] 항체의 다량체화(multimerization)는 항체의 천연적 집합(aggregation)을 통해 또는 화학적 또는 당업자에게 알려진 재조합 연결 기술을 통해 성취될 수 있다. 예를 들어, 정제된 항체 준비의 일부 비율은 항체 호모다이머, 및 다른 높은 단계의 항체 다량체를 함유하는 단백질 집합체(aggregates)를 자발적으로 형성할 수 있다. 그 대신에, 항체 호모다이머는 당업계에 알려진 화학적 연결 기술을 통해 형성될 수 있다. 비제한적인 실시예로서, 헤테로이기능적(heterobifunctional) 가교제(crosslinking agents)는 SMCC(succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) 및 SATA(N-succinimidyl S-acetylthio-acetate)(예를 들어,

Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, 111.)로부터 이용가능)를 포함하나, 이에 한정되지 않고, 항체 다량체를 형성하기 위해 사용될 수 있다. 항체 호모다имер의 형성을 위한 예시적인 절차는 Ghetie MA *et al.* Antibody homodimers can be converted to F(ab')₂ homodimers through digestion with pepsin에 제시된다. 항체 호모다имер을 형성하기 위한 또 다른 방법은 Zhao Y & Kohler H J. Immunother (1997) 25(5):396-404에 기재된 오토필릭(autophilic) T1 5 펩티드의 사용을 통하는 것이다.

[0179] 그 대신에, 항체는 천연적으로 또는 재조합 DNA 기술을 통해 다량체화되도록 생성될 수 있다. ScFv 다имер은 또한 당업계에 알려진 재조합 기술을 통해 형성될 수 있다; scFv 다имер의 생성의 예는 Goel A *et al.* Cancer Research 60(24):6964-6971에 제시된다. 항체 다량체는 당업계에 알려진 어떤 적합한 방법, 예를 들어 크기 배제(exclusion) 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0180]

[0181] 항체 유도체(derivatives)

[0182] 본 발명은 또한 포함하거나, 또는 그 대신에, 여기에서 기재된 항체 분자(예를 들어 V_H 도메인 및/또는 V_L 도메인)의 변이(유도체 포함)를 포함하는 항체를 제공하고, 이 항체는 특이적으로 항원 펩타이드(예를 들어, IL-5 항원 또는 CD33 항원)에 결합한다. 당업자에게 알려진 표준 기술은 본 발명의 분자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 돌연변이를 유도하기 위해 사용될 수 있고, 예를 들어, 아미노산 치환을 야기하는 부위 특이적 돌연변이화 및 PCR-매개 돌연변이화를 포함한다.

[0183] 본 발명에 따른 항체 유도체는 또한 면역글로불린 V_L 및/또는 V_H 영역으로의 보존적 아미노산 치환을 포함한다. "보존적 아미노산 치환(conservative amino acid substitution)"은 아미노산 잔기가 유사 전하를 띠는 측쇄를 가지는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사 전하를 띠는 측쇄(side chain)를 가지는 아미노산 잔기의 패밀리를(families)는 당업계에서 정의되었다. 이러한 패밀리는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루타민산), 비하전된 극성(uncharged polar) 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타 가지(beta-branched) 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향성(aromatic) 측쇄(예를 들어, 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가지는 아미노산을 포함한다. 그 대신에, 돌연변이들은 포화(saturation) 돌연변이화에 의한 것과 같이, 서열의 전체 또는 일부에 임의로 도입될 수 있고, 그 결과로 생긴(resultant) 돌연변이는 활성(예를 들어, 본 발명의 항원 펩타이드에 결합하는 능력)을 보유하는 돌연변이를 동정하기 위해 생물학적 활성으로 스크리닝할 수 있다.

[0184] 용어 "보존적 치환"은 표 1에 제시되는 아미노산 치환을 의미하도록 취할 수 있다.

표 1

치환의 예시

[0185]

원래의(Original) 잔기	예시적(Exemplary) 치환
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro; ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly

Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

- [0186] 예를 들어, 오직 프레임워크 영역 또는 오직 항체 분자의 CDR 영역에 돌연변이를 도입하는 것이 가능하다. 도입된 돌연변이는 침묵(silent) 또는 중립된 미스센스(neutral missense) 돌연변이가 될 수 있고, 즉 항원에 결합하는 항체의 활성에 대한 효과가 없거나, 또는 거의 없다. 돌연변이의 이러한 종류들은 코돈 사용을 최적화하거나, 또는 세포주로부터 항체 생산을 향상시키는 데에 유용할 수 있다.
- [0187] 그 대신에, 비-중립된 미스센스 돌연변이는 항원에 결합하는 항체의 능력을 변화시킬 수 있다. 당업자는 항원 결합 활성의 무변화 또는 결합 활성의 변화와 같은 바람직한 특성(예를 들어, 항원 결합 활성의 향상 또는 항체 특이성의 변화)을 가진 돌연변이 분자를 고안 및 검사할 수 있을 것이다. 돌연변이화 이후, 암호화된 단백질은 통상적으로 발현될 수 있고 암호화된 단백질의 기능적 및/또는 생물학적 활성(예를 들어, 본 발명의 항원 펩타이드에 특이적으로 결합하는 활성)은, 여기에서 기재한 기술 또는 당업계에 알려진 통상적으로 변형된 기술을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0188] 본 발명의 항체는 어떤 종류의 분자든지 항체에 공유결합으로 부착함으로써 다르게 변형 유도체를 포함하고 이러한 공유결합으로 부착은 항체가 항원에 결합하는 것을 방해하지 않는다. 예를 들어, 항체 유도체는 예를 들어, 세포 리간드(ligand) 또는 다른 단백질 등에 당화(glycosylation), 아세틸화(acetylation), 페길화(pegylation), 인산화(phosphorylation), 아마이드화(amidation), 에방/블라킹 그룹으로 알려진 유도체화(derivatisation), 단백질 분해(proteolytic cleavage), 결합(linkage)에 의한 변형된 항체를 포함한다. 어떤 많은 화학적 변형이든 특이적 화학 결합, 아세틸화, 포르밀화(formylation), 투니카마이신(tunicamycin)의 대사 합성 등을 포함하는, 당업계에 알려진 기술에 의해 수행될 수 있다. 게다가, 유도체는 하나 또는 그 이상의 비고전적(non-classical) 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0189] 게다가, 본 발명의 항체는 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 일부 단백질에 해당하는 펩타이드는 펩타이드 합성기(synthesizer)의 사용으로 합성될 수 있다. 더욱, 바람직하게, 비고전적 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체(analogs)는 복합체 폴리펩티드의 하나, 일부, 둘, 여러 또는 모든 서열의 치환 및/또는 추가로 도입될 수 있다.
- [0190] 비고전적 아미노산은 일반 아미노산의 D-이성체(isomers), 플루오르(fluoro)-아미노산, 베타-메틸 아미노산과 같은 디자이너(designer) 아미노산, C 감마-메틸(gamma-methyl) 아미노산, N 감마-메틸 아미노산, 및, 및 일반적인 아미노산 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0191] 본 발명 또한 별개의(distinct) 부분(moiety) 예를 들어 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 결합하는 치료용 제제에 접합되는 본 발명의 항체 또는 면역글로불린 컨트랙트(contract)를 포함하는 면역접합체(immunoconjugates)를 제공한다. 다른 부분들의 예들은 세포 독소(cytotoxin), 방사성 동위 원소(예를 들어, 요오드(iodine)-131, 이트륨(yttrium)-90 또는 인듐(indium)-111), 면역조절성(immunomodulatory) 제제, 항 혈관신생(anti-angiogenic) 제제, 항 신혈관 형성(anti-neovascularization) 및/또는 다른 혈관 신생(vascularization) 제제, 독성, 항 증식성(anti-proliferative) 제제, 전-세포사멸(pro-apoptotic) 제제, 화학 요법(chemotherapeutic) 제제 및 치료용 핵산을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0192] 세포독소는 세포에 해로운(예를 들어, 사멸시키는) 어떤 제제든지 포함한다. 당업계에 알려진 약물들의 이러한 종류(classes) 및 활성의 기전에 대해 설명하기 위해, Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8 판, Macmillan Publishing Co., 1990 Additional techniques relevant to the preparation of antibody immunotoxins are provided in for instance Vitetta (1993) 및 US 5,194,594 참고. 예시적인 독소는 디프테리아(diphtheria) A 쉘, 디프테리아 독소의 비결합 활성(nonbinding active) 단편, 균체외독소(exotoxin) A 쉘(녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신(ricin) A 쉘, 애브린(abrin) A 쉘, 모데신(modeccin) A 쉘, 알파-사르신(alpha-sarcin), 유동(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 파이토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 큐르신(curcin), 크로틴(croton), 사파오나리아 오피시날리스(*Sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌(gelonin), 미토겔린(mitogellin), 레스트릭토신(restrictocin), 페

노마이신(phenomycin), 에노마이신(enomycin) 및 트리코테센(tricothecene)을 포함한다. 예를 들어, WO93/21232 참고.

[0193] 본 발명의 면역접합체를 형성하기 위한 적합한 치료용 제제는 탁솔(taxol), 시토칼라신(cytochalasin) B, 그라미시딘(gramicidin) D, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide), 에메틴(emetine), 마이토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 콜히친(colchicin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 2개의 수산기를 가진(dihydroxy) 안드라신 디온(anthracin dione), 미토산트론(mitoxantrone), 미스라마이신(mithramycin), 악티노마이신(actinomycin) D, 1-디히드로테스토스테론(dehydrotestosterone), 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 프로카인(procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로프라놀롤(propranolol), 및 퓨로마이신(puromycin), 항대사성물질(antimetabolites)(메토크사트(methotrexate), 6-메르캅토피린(mercaptapurine), 6-티오구아닌(thioguanine), 사이타라빈(cytarabine), 플루다라빈(fludarabin), 5-플루러유리실(fluorouracil), 데카바진(decabazine), 히도록시우레아(hydroxyurea), 아스파라기나제(asparaginase), 겔시타빈(gemcitabine), 클라드리빈(cladribine)과 같은), 알킬화제(alkylating agents)(메클로레타민(mechlorethamine), 티오에파(thioepa), 클로람부실(chlorambucil), 멜팔란(melphalan), BSNU(carmustine), CCNU(lomustine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 부설판(busulfan), 디브로모마니톨(dibromomannitol), 스트렙토조토신(streptozotocin), DTIC(dacarbazine), 프로카르바진(procarbazine), 마이토마이신 C, 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin)과 같은 다른 백금(platinum) 유도체와 같은), 항생제(such as 닥티노마이신(dactinomycin)(이전 액티노마이신(actinomycin)), 블레오마이신(bleomycin), 다우노루비신(Daunorubicin) (이전 다우노마이신(daunomycin)), 독소루비신(doxorubicin), 이다루비신(idarubicin), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 마이토잔트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), AMC(anthracycline)과 같은)를 포함한다.

[0194] 다양한 방사성핵종(radionuclide)은 방사접합(radioconjugated) 항체의 생산에 이용될 수 있다. 예시는 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{90}Y , 및 ^{186}Re 를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0195] 항체 및 치료용 제제의 접합체(Conjugates)는 4-(4'아세틸페녹시)부탄산(4-(4'acetylphenoxy)butanoic acid; AcBut), 3-아세틸페닐 산성 산(3-acetylphenyl acidic acid; AcPac), 4-메르캅토-4-메틸-펜탄산(4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid; Amide), N-숙신이미딜-3-피리딜디티올 프로피온산(2-(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate; SPDP), 이미노티올레인(iminothiolane; IT), 이미도에스테르(imidoesters)의 이중기능 유도체(디메틸(dimethyl) 아디피미데이트(adipimide) HCL과 같은), 활성(active) 에스테르(이숙신이미딜(isuccinimidyl) 수베르산염(suberate)과 같은), 알데히드(aldehydes)(글루트알데히드(gluteraldehyde)와 같은), 비스-아지도 화합물(bis-azido compounds)(비스 (p-아지도벤조일) 헥사디아민(bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine)과 같은), 비스-디아조늄(bis-diazonium) 유도체 (비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민(bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine)과 같은), 디이소시아네이트(diisocyanates)(톨루엔 2,6-디이소시아네이트(toluene 2,6-diisocyanate)와 같은), 및 비스-활성 불소 화합물(bis-active fluorine compounds)(1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠(1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene)과 같은), 및 이들의 유도체와 같은, 하지만 이에 한정되지 않는 다양한 이중기능 단백질-커플링 제제를 이용하여 생산된다. 예를 들어, 리신(ricin) 항체독소(immunotoxin)는 Vitetta *et al.*(1987)에 기재되듯이 준비될 수 있다. 14번 탄소가 표지된 MX-DTPA(Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminopentaacetic acid)는 항체에 방사성뉴클레오타이드(radionucleotide)의 접합(conjugation)을 위한 모범적인 킬레이트 시약(chelating agent)이다(WO 94/11026).

[0196]

[0197] 본 발명의 면역글로불린 컨스트럭트

[0198] 여기에서 사용되듯이, 용어 "면역글로불린 컨스트럭트(immunoglobulin construct)"는 항체 단편에 결합하는 항원이 본 발명에 따른 변형된 인간 IgG4 힌지 영역 및 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인에 연결된 컨스트럭트를 지칭하도록 의도된다.

[0199] Fc영역, Fc 융합 및 중쇄의 불변 영역(CH1-힌지-CH2-CH3)을 포함하는 면역글로불린 컨스트럭트가 특히 바람직하다.

[0200] 특이적 항체 단편은 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인을 포함하는 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인을 포함하는

Fd 단편, (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인을 포함하는 Fv 단편, (iv) 단일 가변 영역을 포함하는 dAb 단편 (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546) (v) 분리된 CDR 영역들 (vi) Fab 단편 두 개로 구성된 이가 (bivalent) 단편인, F(ab')₂ 단편, (vii) VH 도메인 및 VL 도메인은 두 도메인에 항원 결합 부위를 형성하도록 연관되는 펩타이드 링커로 연결되는, 단일쇄 Fv 분자(single chain Fv; scFv)들(Bird et al., (1988) Science 242:423-426, Huston et al., (1989) Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-5883), (viii) 이중특이적 단일 쇠 Fv(WO 03/11161), 및 (ix) 디아바디(diabodies) 및 트리아바디(triabodies) 또는 테트라바디(tetrabodies)(Tomlinson et al., (2000) Methods Enzymol 326:461-479; WO 94/13804; Hollinger et al., (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 분자는 VH 및 VL 도메인에 연결된 이황화 결합(disulphide bridges)의 혼성(incorporation)에 의해 안정화될 수 있다(Reiter et al., (1996) nature Biotech 14:1239-1245).

[0201] 상기에 기재된 단편(이는 힌지 영역을 포함하지 않는)은 힌지가 링커로 작용하는 힌지-Fc 영역에 결합될 수 있다고 평가될 것이다.

[0202] 또 다른 실시예에서, 항체 단편은 scFV-CH3 및 힌지 영역 서열을 포함하는 플렉스 미니바디(flex minibody)가 될 수 있다(Hu, Shi-zhen et al., (1996) Cancer Research 56:3055-3061에 기재되었듯이).

[0203] 항체 제조

[0204] 항체는 하이브리도마(hybridoma), 재조합(recombinant) 및 파지(phage) 디스플레이 기술 또는 이들의 조합을 포함하는 당업계에서 알려진 넓고 다양한 기술(technique)을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어 단일클론 항체는 당업계 및 예를 들면 Harlow 등의 항체: 실험실 설명서(A laboratory Manual)에 기재된 바(Cold Spring Harbor Laboratory Press 2nd Edn 1988)를 포함하는 하이브리도마 기술을 이용하여 제작될 수 있다.

[0205] 본 발명에 사용된 용어 "단일클론 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체로 제한되지 않는다. 상기 용어는 항체가 생산된 방법이 아닌 어떠한 원핵(prokaryotic), 진핵(eukaryotic) 및 파지 클론을 포함하는 단일 클론(single clone)으로부터 유도된 어떠한 항체와도 관련된다.

[0206] 하이브리도마 기술을 통한 생산 방법 및 특정 항체의 선별(screening)은 당업계에서 일반적(routine)이다. 예를 들어, 마우스들(mice)은 관심이 있는(interest) 항원 또는 항원과 같은 세포를 발현하여 면역화된다. 면역 반응이 검출되면, 마우스 비장(spleen)을 수득하여 지라세포(splenocytes)를 분리한다. 그런 다음, 지라세포는 골수 세포(myeloma cells)로 융합시킨다. 하이브리도마를 선택하고 한계 희석(limiting dilution)을 통해 복제한다. 그런 다음 클론은 항원에 결합 가능할 수 있는 항체를 분비하는 세포로 당업계에 알려진 방법에 의해 측정된다. 일반적으로 높은 수준의 항체를 포함하는 복수(ascites fluid)는 접종된 마우스들에서 양성 하이브리도마 클론을 가지면서 복강 내(intraperitoneally)에서 만들어질 수 있다.

[0207] 특정 에피토프(epitopes)를 인식하는 항체 단편은 일반적 기술에 의해 만들어질 수 있다. 예를 들어, Fab 및 F(ab')₂ 단편은 파파인(papain; Fab 단편을 만들기 위해서) 또는 펩신(pepsin; F(ab')₂ 단편을 만들기 위해서)과 같은 효소를 사용하여 면역글로불린(immunoglobulin) 분자의 단백질 가수분해의(proteolytic) 절단(cleavage)에 의해 만들어질 수 있다. F(ab')₂ 단편은 완전한 경쇄(light chain), 가변 영역(variable region), CH1 영역 및 중쇄(heavy chain)의 힌지 영역(hinge region)을 포함한다.

[0208] 항체는 또한 다양한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 만들어질 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인(domains)은 그들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide) 서열을 운반하는 파지 입자(particles)의 표면에 나타내진다. 구체적인 실시예에서, 이러한 파지는 Fab 및 Fv 또는 목록(repertoire) 또는 조합의 항체 라이브러리(library)(예를 들면, 인간 또는 쥐과 동물(murine))로부터 발현된 이황화-결합(disulfide-bond)으로 안정된 Fv과 같은 항원 결합 도메인을 나타내어(display) 사용될 수 있다. 관심있는 항원과 결합하는 항원 결합 부위를 발현하는 파지는, 예를 들면 표지된 항원 또는 고체 표면 또는 비드(bead)에 결합 또는 포획(capture)된 항원을 사용하는 항원으로 선별 또는 식별화 될 수 있다. 상기 방법에서 사용되는 파지는 일반적으로 fd 및 M13를 포함하는 사상(filamentous) 파지이다. 항원 결합 도메인은 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질 중에서 둘 중에 하나로 융합된 단백질로 재조합되어 발현된다. 대체적으로, 또한 본 발명의 면역글로불린의 변형된(modified) 신생아 Fc 수용체(Neonatal Fc receptor; FcRn) 결합 부분은 파지 디스플레이 시스템에서 발현될 수 있다. 본 발명의 면역글로불린, 또는 이들의 단편을 만들기 위해 사용될 수 있

는 파지 디스플레이 방법의 예는 Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 182:41-50, 1995; Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 184:177-186, 1995; Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958, 1994; Persic *et al.*, *Gene*, 187:9-18, 1997; Burton *et al.*, *Advances in Immunology*, 57: 191-280, 1994; PCT 출원 번호 PCT/GB91/01134; PCT 국제공개번호 WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; 및 미국특허번호 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 및 5,969,108에 기재된 바를 포함한다.

[0209] 파지 선별 후, 항체 암호 영역(coding regions)은 파지로부터 분리되어 인간 항체, 또는 어떤 다른 요구되는 단편을 포함하는 전체 항체를 만들기 위해 사용되고, 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 미생물을 포함하는 어떠한 원하는 숙주 내에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 재조합하여 Fab, Fab', F(ab')₂ 단편을 만드는 기술은 PCT 공개번호WO92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques*, 12(6):864-869, 1992; 및 Sawai *et al.*, *AJRI*, 34:26-34, 1995; 및 Better *et al.*, *Science*, 240:1041-1043, 1988에 기재된 바와 같이 당업계에 알려진 방법을 사용하여 수행할 수 있고, 단일-사슬 Fvs 및 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있는 기술의 예는 미국특허번호 4,946,778 및 5,258,498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology*, 203: 46-88, 1991; Shu *et al.*, *PNAS*, 90:7995-7999, 1993; 및 Skerra *et al.*, *Science*, 240:1038-1040, 1988에 기재된 바를 포함한다.

[0210] 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 IgG4 융합 단백질 면역글로불린의 재조합 생산

[0211] 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 IgG4 융합 단백질 면역글로불린은 재조합되어 생산될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체를 암호화하는 DNA, 면역글로불린 컨스트럭트 및 IgG4 융합 단백질 면역글로불린은 손쉽게 분리하여 관습적인 방법(conventional procedures)을 사용하여 서열화(sequenced)되었다(예를 들면, 구체적으로 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브(probes)를 사용하여). 하이브리도마 세포는 항체를 위한 상기 DNA의 바람직한 재료로서 제공된다. 분리되면, DNA는 발현 벡터 내에 배치되어 질 수 있으며, 그런 다음 재조합 숙주 세포 내에서 단일클론 항체의 합성을 수행하기 위해, 대장균(*E. coli*) 세포, 원숭이(simian) COS 세포, 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary; CHO) 세포, 또는 골수종(myeloma) 세포와 같은 항체 단백질을 생산하는 다른 방법을 가지지 않는 숙주 세포 내로 형질감염된다. 항체를 암호화하는 DNA를 미생물 내로 재조합 발현하는 리뷰 논문(review paper)은 Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) 및 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)에 포함된다. 상기 목적(ends)을 달성하기 위한 분자 클로닝 기술은 당업계에 알려져 있다. 다양한 종류의 클로닝 및 시험관 내 증폭 방법이 재조합 핵산의 컨스트럭트에 적합하다. 많은 클로닝 실험을 통해 직접적인 당업자에 적합한 상기 기술 및 설명(instructions)의 예들은 Berger 및 Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, *Methods in Enzymology* volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif (Berger); Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nded.) Vol.13, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (Sambrook); 및 *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement)(Ausubel)에서 찾을 수 있다. 재조합 면역글로불린 생산 방법 또한 당업계에 알려져 있다. Cabilly, 미국특허번호 4,816,567; 및 Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029 10033를 참고.

[0212] 재조합 생산에서, 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 IgG4 융합 단백질 면역글로불린을 암호화하는 핵산은 분리되어 추가적인 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제 가능한 벡터 내에 삽입되는 것이 바람직하다. 항체 또는 융합 단백질을 암호화하는 DNA는 손쉽게 분리하거나 종래의 방법을 사용하여 합성하였다(예를 들면, 구체적으로 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여). 많은 벡터가 사용가능하다. 벡터 구성은 일반적으로 하기의 하나 또는 그 이상을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 신호 서열(signal sequence), 본 발명의 항체 또는 이들의 단편을 암호화하는 서열(예를 들어, 본 발명에서 제공되는 정보로부터 유래된), 증폭자(enhancer) 요소, 촉진제(promoter), 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence).

[0213] (i) 신호 서열 요소. 본 발명의 항체는 재조합되어 직접적으로 생산될 뿐 아니라, 이종(heterologous) 폴리펩티드와 함께 융합 폴리펩티드로도 생산될 수 있으며, 상기 이종 폴리펩티드는 성숙한(mature) 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특정 단편 위치를 가지는 신호 서열 또는 다른 폴리펩티드인 것이 바람직하다. 이종 신호 서

열은 숙주 세포에 의해 인식되어 가공되는(processed) 것이 바람직하다. 천연(native) 항체 신호 서열을 인식 및 가공되지 않는 원핵 숙주 세포에서는, 신호 서열은 예를 들어, 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase), 페니실리네이스(penicillinase), Ipp 또는 열-안정적인 엔테로톡신 II(enterotoxin II) 선도 서열(leaders)의 군으로부터 선택되는, 원핵 세포의 신호 서열로 치환된다. 효모 분비에서 천연 신호 서열은 예를 들면, 효모 전환 효소(invertase) 선도 서열, 인자(factor) 선도 서열, 또는 산성 인산가수분해효소(acid phosphatase) 선도 서열, 칸디다 알비칸스(Candida albicans) 글루코아밀라제 선도 서열, 또는 W090/13646에 기재된 선도 서열로 치환될 수 있다. 포유류 세포 발현에서, 포유류 신호 서열 뿐만 아니라, 예를 들면, 단순포진(herpes simplex) gD 신호와 같은 바이러스의 분비 선도서열을 사용할 수 있다. 상기 전구체 지역(cursor region)의 DNA는 항체를 암호화하는 DNA의 해독틀(reading frame)에 삽입될 수 있다.

[0214] (ii) 촉진제 요소. 발현 및 클로닝 벡터는 대개 숙주 생물체(organism)를 인식하고 항체 핵산으로 작동될 수 있도록(operably) 연결된 촉진제를 포함한다. 원핵세포 숙주에서 사용에 적합한 촉진제는 phoA 촉진제, β -락타마제(β -lactamase) 및 락토오스(lactose) 촉진제 시스템, 알칼리 포스파타아제, 트립토판(tryptophan; trp) 촉진제 시스템, 및 택(tac) 촉진제와 같은 하이브리드 촉진제를 포함한다. 그러나, 다른 알려진 촉진제도 적합하다. 미생물 시스템에서 사용하기 위한 촉진제는 또한 항체를 암호화하는 DNA에 연결되어 작동할 수 있는 샤인-달가노(Shine-Dalgarno; S.D.) 서열을 포함할 것이다.

[0215] 진핵 세포의 촉진제가 알려져 있다. 사실상 모든 진핵 세포 유전자는 전사가 개시되는 위치로부터 약 25 내지 30 베이스 위에 위치하는 AT가 풍부한 지역을 가진다. 많은 유전자의 전사 시작으로부터 70 내지 80 베이스 윗 부분에 발견된 다른 서열은 CNCAAT 지역이며, N은 어떠한 뉴클레오티드일 수 있다. 대부분의 진핵 세포 유전자의 3' 말단은 암호화 지역의 3' 말단에 폴리 A 꼬리가 첨가된 신호가 될 수 있는 AATAAA 서열이다. 상기 서열 전부는 진핵 세포의 발현 벡터 내에 알맞게 삽입되어있다. 효모 숙주에서 사용되는 적합한 촉진제 서열의 예는 3-포스포글리세르산 인산화효소(3-phosphoglycerate kinase)의 촉진제 또는 에놀라제(enolase), 글리세르알데하이드-3-인산화 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 헥소키나아제(hexokinase), 피루브산 탈탄산효소(pyruvate decarboxylase), 포스포프рук토키나아제(phosphofructokinase), 포도당-6-인산 이성화효소(glucose-6-phosphate isomerase), 3-포스포글리세르산 뮤타아제(3-phosphoglycerate mutase), 피루브산 인산화효소(pyruvate kinase), 삼탄당인산 이성화효소(triosephosphate isomerase), 인산화포도당 이성화효소(phosphoglucose isomerase), 및 글루코키나아제(glucokinase)와 같은 다른 당분해 효소(glycolytic enzymes)를 포함한다. 생장 조건에 의해서 조절되는 전사의 추가적인 이점을 가지는 유도적인 촉진제인, 다른 효모 촉진제는 촉진제 지역 for 알코올 탈수소효소 2(alcohol dehydrogenase 2), 아이소사이토크롬 C(isocytochrome C), 산성 인산가수분해효소(acid phosphatase), 질소 대사, 메탈로티오네인(metallothionein)과 연관된 분해 효소(degradative enzymes), 글리세르알데하이드-3-인산화 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 및 말토오스(maltose) 및 갈락토오스(galactose) 이용과 연관된 효소의 촉진제 지역이다. 효모 발현에 사용하기 위한 적합한 벡터 및 촉진제는 추가적으로 EP 73,657에 기재되어 있다. 또한 효모 증폭자를 효모 촉진제와 이점을 가지도록 함께 사용한다.

[0216] 포유류 숙주 세포에서 벡터로부터 항체 전사는 예를 들어, 폴리오마 바이러스(polyoma virus), 계두바이러스(fowlpox virus), 아데노바이러스(adenovirus)(아데노바이러스 2와 같은)와 같은 바이러스 게놈으로부터 수득된 촉진제에 의해 조절된다. CMV, 소유두종바이러스(bovine papilloma virus), 조류육종바이러스(avian sarcoma virus), 거대세포바이러스(cytomegalovirus), 레트로바이러스(retrovirus), B형 간염바이러스(hepatitis-B virus) 및 가장 선호되는 유인원바이러스 40(Simian Virus 40; SV40), 예를 들면, 액틴(actin) 촉진제 또는 면역글로불린 촉진제와 같은 열-충격(heat-shock) 촉진제의 이종 포유류(heterologous mammalian) 촉진제의 상기 촉진제는 숙주 세포 시스템에 적합하다.

[0217] (iii) 증폭자 구성 요소. 고등 원핵 세포에 의한 본 발명의 항체를 암호화하는 DNA의 전사는 벡터 내에 증폭자 서열을 삽입함으로써 종종 증가된다. 다양한 증폭자 서열이 포유류 유전자(글로빈(globin), 엘라스타제(elastase), 알부민(albumin), 알파-페토탄백질(α -fetoprotein), 및 인슐린(insulin))에서 알려져 있다. 전형적으로, 그러나, 원핵 세포 바이러스로부터 유래된 증폭자를 사용할 수 있다. 예시는 복제 기원점(100 내지 270 베이스페어)의 후반부(late side)의 SV40 증폭자, 거대세포바이러스의 초기 촉진제 증폭자, 복제 기원점의 후반부의 폴리오마 증폭자, 및 아데노바이러스 증폭자를 포함한다. 또한 진핵 세포 촉진제의 활성화를 위한 촉진 요소들은 Yaniv (1982) Nature 297: 17-18을 참고한다. 증폭자는 항체- 암호 서열의 5' 또는 3' 위치에 벡터 내에 연결될 수 있으나, 촉진제로부터 5' 위치에 위치하는 것이 선호된다.

[0218] (iv) 전사 종결 요소. 진핵 숙주 세포(효모, 곰팡이(fungi), 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 생물

로부터 유래한 유핵(nucleated) 세포)에서 사용하는 발현 벡터는 또한 전사의 종결 및 mRNA를 안정화하는데 필요한 서열을 포함할 것이다. 상기 서열은 일반적으로 진핵 세포 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 비번역 지역의 5' 말단 및, 때때로 3'에 사용 가능하다. 상기 지역은 항체를 암호화하는 mRNA의 비번역 부위 내의 폴리아데닐화된(polyadenylated) 단편으로 전사된 뉴클레오티드 단편을 포함한다. 유용한 전사 종결 요소는 소 성장 호르몬(bovine growth hormone) 폴리아데닐화된 지역이다. W094/1 1026 및 본 발명에 기재된 발현 벡터를 참고한다.

[0219] (v) 숙주 세포의 선별 및 형질 전환(transformation). 본 발명의 벡터 내의 DNA를 클로닝 또는 발현하는 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵 세포, 효모 또는 고등한 진핵 세포이다. 상기 목적에 적합한 원핵 세포는 예를 들어, 예를 들면 대장균(*E.coli*)의 대장균속(*Escherichia*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르비니아(*Erwinia*), 클라브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 예를 들면 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)의 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들면 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*)의 세라티아(*Serratia*) 및 시겔라(*Shigella*)와 같은 장내세균(*Enterobacteriaceae*) 뿐만 아니라 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 바실러스 리체니포르미스(*B.licheniformis*)와 같은 바실러스(*Bacilli*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)와 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*), 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)와 같은 그람-음성 또는 그람-양성 생물체와 같은 진정세균(*eubacteria*)을 포함한다. 가장 선호되는 대장균 숙주 세포는 *E.coli* 294(ATCC31,446)이나, *E.coli* B, *E.coli* X1776(ATCC31,537), 및 *E.coli* W3110(ATCC27,325)와 같은 다른 균주들도 적합하다. 상기 예로 제한하지 않으며 실제적인 예이다.

[0220] 원핵세포에 추가하여, 섬사상(filamentous) 곰팡이 또는 효모와 같은 진핵 세포 미생물은 항체-암호화 벡터에서 클로닝 또는 발현 숙주로 적합하다. 사카로마이스스 세레비시아에(*saccharomyces cerevisiae*), 또는 일반적인 빵 효모(baker's yeast),는 하위 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 몇몇의 다른 속들(*genera*), 종들(*species*), 및 균주들도 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), *K. 프라질리스*(*K. fragilis*; ATCC 12,424), *K. 불가리쿠스*(*K. bulgaricus*; ATCC 16,045), *K. 윌커라미*(*K. wickeramii*; ATCC 24,178), *K. 왈티*(*K. waltii*; ATCC 56,500), *K. 드로소필라룸*(*K. drosophilum*; ATCC 36,906), *K. 터모톨러란스*(*K. thermotolerans*), 및 *K. 마르시아누스*(*K. marxianus*)와 같은 클루이베로마이세스 숙주; 예로이아(*Yarrowia*; EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*; EP 183,070); 캔디다(*Candida*); 트리코데르마 레에시아(*Trichoderma reesia*; EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 쉬완니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*)와 같은 쉬완니오마이세스; 및 예를 들어, 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*)와 같은 사상류 곰팡이, 및 아스퍼길러스 니들란스(*Aspergillus nidulans*) 니들란스 및 *A. 나이거*(*A. niger*)와 같은 아스퍼길러스 숙주와 같이, 일반적으로 본 발명에서 사용 가능하고 유용하다.

[0221] 당화된(glycosylated) 항체의 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 다세포 생물체로부터 유래된다. 무척추 동물(invertebrate) 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*; 애벌레), 아에데스 아에기프티(*Aedes aegypti*; 모기), 아에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*; 모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*; 초파리), 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터 다양한 바큘로바이러스(baculoviral) 균주 및 변이체 및 연관되어 허용 가능한(permissive) 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 예를 들면, 아우토그라파 칼리포니카 NPV(*Autographa californica* NPV)의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주와 같이 형질 감염(transfection)을 위해 다양한 바이러스 균주가 공지되어 사용 가능하며, 상기 바이러스는 본 발명에 따르는 바이러스로서 구체적으로, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질 감염에 구체적으로 사용될 수 있다.

[0222] 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1(monkey kidney CV1) 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장(embryonic kidney) 세포주 (혼탁 배양으로 성장하면서 계대배양된 293 또는 293 세포; Graham *et al.* (1977) Gen Virol. 36:59); 햄스터 새끼 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary; CHO) 세포(Urlaub *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216); 마우스 세르톨리(Sertoli) 세포(TM4; Mather (1980) Biol. Reprod. 23:243-251); 원숭이 신장 세포(CV1; ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(VERO-76; ATCC CRL- 1587); 인간 경부암(cervical carcinoma) 세포(HELA; ATCC CCL 2); 개(canine) 신장 세포(MDCK; ATCC CCL 34); 버팔로 랫트(buffalo rat) 간 세포(BRL 3A; ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138; ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2; HB 8065); 마우스 유방암(mammary tumor)(MMT 060562; ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather *et al.* (1982) Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 PER.C6™(CruCell NV)이다.

- [0223] 숙주 세포는 항체 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질 생산을 위해 상기-기술된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질 전환되며 촉진제, 형질전환체 선택제, 또는 원하는 서열을 암호화하는 유전자의 증폭제를 적절하게 포함하도록 변형된 종래의 영양 배지 내에서 배양된다.
- [0224] (vii) 숙주 세포의 배양. 본 발명의 항체를 생산하기 위해 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 햄의 F10(Ham's F10; Sigma), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium; MEM; Sigma), RPMI-1640(Sigma), 및 돌백코의 변형된 이글의 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM; Sigma)와 같은 상업적으로 가능한 배지는 숙주 세포의 배양에 적합하다. 덧붙여, Ham *et al.* (1979) Meth. Enz. 58:44, Barnes *et al.* (1980) Anal. Biochem.102:255, U.S. Pat. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; or 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 U.S. Patent Re. 30,985에 기재된 어떠한 배지를 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용할 수 있다. 어떠한 상기 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(인슐린, 트랜스페린(transferrin) 또는 표피(epidermal) 성장 인자와 같은), 염(염화나트륨(sodium chloride), 칼슘(calcium), 마그네슘(magnesium), 및 인산염(phosphate)과 같은), 완충용액(HEPES와 같은), 뉴클레오티드(아데노신(adenosine) 및 티민(thymidine)과 같은), 항생제(antibiotics; GENTAMYCIN™ 약물과 같은), 미량 원소(trace elements; 최종 농도가 마이크로몰(micromolar) 범위인 무기 화합물로 정의됨), 및 포도당 또는 동등한(equivalent) 에너지원이 첨가될 수 있다. 어떠한 다른 필수 첨가제는 또한 당업계 숙련자에게 알려져 있는 적당한 농도로 포함될 수 있다. 온도, pH, 및 유사한 것과 같은 배양 조건은 발현을 위해서 선택된 숙주 세포에서 이전에 사용된 바이며, 숙련된 당업자에게 일반적으로 자명할 수 있다.
- [0225] 키메라 항체(Chimeric antibodies)
- [0226] 본 발명에 따르는 항체는 키메라 항체일 수 있다. 키메라 항체는 가변 경쇄 및 중쇄(VL 및 VH)가 결합되는 재조합 도구로 만들어지며, 다른 종에서 유래한 불변 경쇄 및 중쇄 지역을 가지는 한 종의 세포로 만들어진 항체로부터 획득된다. 일반적으로 키메라 항체는 분명하게 사람의 도메인을 가지는 항체를 생산하기 위해서 설치류(rodent) 또는 토끼의 가변 영역 및 사람의 불변 영역을 이용한다. 예를 들면, 키메라 항체는 사람의 불변 영역에 융합된 마우스 항체의 가변 영역을 포함한다. 상기 키메라 항체의 생산은 당업계에 알려져 있으며, 표준 도구들을 사용하여 수행될 수 있다(예시로, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies *et al.*, (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567 및 4,816,397에 기재됨).
- [0227] 영장류화된(Primatized) 항체
- [0228] 용어 "영장류화된 항체(primatized antibody)"는 원숭이의 가변영역 및 인간의 불변영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 영장류화된 항체를 생산하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 미국특허번호 5,658,570; 5,681,722; 및 5,693,780을 참고.
- [0229] 인간화(Humanized) 및 인간 항체
- [0230] 본 발명의 범위 내에 포함되는 탈-면역된 항체는 예를 들어, 특허공개번호 EP0983303, WO 00/34317 및 WO 98/52976에 기재된 방법을 사용하여 생산되는 서열 변이체이다.
- [0231] 용어 "인간(Human)" 항체는 사람의 면역글로불린의 아미노산 서열을 가지는 항체 및 인간 면역글로불린 라이브러리 유래 또는 미국특허번호 5,939,598에 기재된 바와 같이 하나 또는 그 이상의 인간 면역글로불린에 형질도입(transgenic)된 동물로부터 유래되어 분리된 항체를 포함한다. 인간 항체는 당업계에 알려진 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하는 파지 디스플레이를 포함하는 다양한 방법에 의해서 만들어질 수 있다. WO 98/46645, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741를 참고.
- [0232] 본 발명의 항체는 인간화된 항체일 수 있다. 비-인간(예를 들면 쥐과) 항체가 인간화된 형태는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 포함하는 이들의 단편(such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른-항원-결합 보조서열)이다. 인간화된 항체는 수용자(recipient)의 상보적 결정 부위(complementary determining region; CDR)의 잔기는 바람직한 특이성

(specificity), 친화력(affinity) 및 수용능(capacity)을 가지는 마우스, 랫트 또는 토끼와 같은 비-인간 항체(공여자(donor) 항체)의 CDR로부터 유래된 잔기로 치환된 인간 면역글로불린(수용자 항체)을 포함한다. 어떤 경우에, 인간 면역글로불린의 하나 또는 그 이상의 Fv 프레임워크(framework) 잔기는 연관된 비-인간 잔기로 치환된다. 인간화된 항체는 또한 수용자 항체뿐만 아니라 외래 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 찾아지지 않은 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 대체적으로 적어도 하나의, 및 일반적으로 두개의, 모든 가변 영역을 포함할 수 있으며, 모든 또는 대부분 모든 CDR 영역은 그들의 비-인간 면역글로불린과 연관이 있고 모든 또는 대부분 모든 FR 지역은 그들의 인간 면역글로불린의 공통 서열(consensus sequence)과 연관된다. 인간화된 항체는 적어도 하나의 면역글로불린 불변영역(Fc)의 부분, 일반적으로 인간 면역글로불린의 불변영역 부분을 선택적으로 또한 포함할 수 있다(Jones et al. (1986) Nature, 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature, 332:323-329; 및 Presta (1992) Curr Op Struct Biol, 2:593-59).

[0233] 인간화된 비-인간 항체를 위한 방법은 기본적으로 Winter 및 동역자의 방법(Jones PT et al (1986) Nature 321(6069):522; Riechmann L et al (1988) Nature 332(6162):323-327; Verhoeyen M et al (1988) Science 239(4847):1534-1536)에 따라 수행되었다. 일반적으로, 인간화된 항체는 비-인간의 자원으로부터 유래된 잔기가 도입된 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 상기 비-인간 아미노산 잔기는 일반적으로 "외래" 가변 영역에서 유래되어 얻어진 "외래(import)" 잔기로서 종종 나타난다. 따라서, 상기 "인간화된" 항체는 키메라 항체이며, 상기 항체는 대체로 온전한(intact) 인간 가변영역보다 적은 부분이 비-인간 종에서 유래된 상응하는 서열로 치환되었다. 구체적으로, 인간화된 항체는 몇몇의 CDR 잔기 및 가능하게는 몇몇의 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한(analogous) 위치로부터 얻어진 잔기로 치환된 일반적인 인간 항체이다.

[0234] 항체는 예를 들어 CDR-이식(grafting)(EP 239400; PCT 공개번호 WO 91/09967; 미국특허 Nos 5,225,539; 5,530,101; 및 5,585,089), 베니어링(veneering) 또는 재포장(resurfacing)(EP 592106; EP519596; Padlan EA et al (1991) Mol Immunol 28(4-5):489; Studnicka GM et al (1994) Protein Eng 7(6):805-14) 및 사슬 셔플(chain shuffling)(미국특허 5,565,332)을 포함하는, 당업계에 알려진 다양한 기술을 사용하여 인간화될 수 있다.

[0235] 하나 또는 그 이상의 다양한 인간면역글로불린 지역의 프레임워크 부위 내의 몇몇의 특정 잔기에서 비-인간 잔기에 해당하도록 배치되었다(예를 들어, Queen 미국특허 5,585,089; 미국특허 5,693,761; 5,693,762 및 6,180,370 참고).

[0236] 본 발명은 또한 US 6,881,557 및 7,732,578에 기재된 슈퍼휴머니제이션[®](Superhumanization[®])으로서 나타나는 방법에 따른 인간화된 항체까지 확장한다. 간단하게, 인간화된 항체를 위한 상기 방법은 비-인간 항체의 가변 영역 CDR 서열의 기본적(canonical) CDR 구조 형식과 인간 항체 서열의 라이브러리와 상응되는 CDR의 기본적 CDR 구조 형식을 비교하여 인간 항체 유전자로부터 얻어진 가변 영역 프레임워크 서열의 선별에 기반한다. 비-인간 CDR에서 유사한 기본적 CDR 구조 형식을 가지는 인간 항체의 가변 영역은 인간 프레임워크 서열에서 선택된 구성원 인간 항체 서열의 부분 집합(subset)을 형성한다.

[0237] 또한 본 발명의 목적에 따라 베니어드 항체(veneered antibodies)를 포함한다. 용어 베니어드 항체는 대체로 모든 천연 프레임워크 영역의 접합 구조를 유지하는 항원-결합 부위를 포함하는 이종발생의(xenogenic) 분자를 제공하기 위한 인간 프레임워크 영역 잔기를 가지는 프레임워크 영역 잔기의 선택적인 배치를 나타낸다. 베니어링 기술은 항원-결합 부위의 리간드-결합 특성이 일차적으로 중쇄 및 경쇄 CDR 조합의 구조 및 항원-결합 표면 내의 상대적인 성질(disposition)에 의해서 결정된다는 조건에 기반한다. 베니어링 기술을 사용함으로써, 순조롭게 면역 시스템에 마주치는 외부(exterior; 예를 들면 용매에 가까운) 프레임워크 지역의 잔기는 약하게 면역화되거나, 또는 대체로 비-면역화된 베니어드 표면 중 어느 하나에 비교해서 하이브리도마 분자를 제공하기 위해서 인간 잔기에 선택적으로 배치된다.

[0238] 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리(Hoogenboom and Winter (1991) J Mol Biol, 227:381; Marks et al. (1991) J Mol Biol, 222:581)를 포함하는, 당업계에 알려진 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. Cole et al. 및 Boerner et al.의 기술은 인간 모노클로날 항체의 제조에 적합하다(Cole et al., Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner et al. (1991) J Immunol, 147:86-95). 유사하게, 인간 항체는 인간면역글로불린 위치들(loci)이 예를 들어 내인성(endogenous) 면역글로불린 유전자를 부분적 또는 완전하게 불활성화한 마우스와 같은 형질도입 동물에 도입됨으로써 만들어질 수 있다. 다양한 시도들이, 유전자 재배치(rearrangement), 조립(assembly) 및 항체 레파토리를 포함하는 모든 양상 내의 인간에서 보이는 밀접하게 연관되는 인간 항체 생산이 수행되었다. 상기 시도들은 예를 들어, 미국특허번호

5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016에 기재되었다.

[0239] 또 다른 실시예에서, 전체 인간 항체가 면역화된 형질도입 마우스에 의해 수득되었다. 하나의 상기 마우스는 XenoMouseTM 기술(Abgenix; Fremont, Calif)를 사용하여 수득되었으며 미국특허 Nos 6,075,181; 6,091,001 및 6,114,598에 기재되어 있다. 전체 인간 항체는 마우스 또는 마우스-유래의 모노클로날 항체에 내체된 면역성(immunogenic) 및 알러지 반응을 최소화하여 주입된 항체의 효율성 및 안전성이 증가할 것으로 예상된다.

[0240] 선택된 에피토프를 인식하는 완전한 인간 항체는 또한 "지침 선별(guided selection)"로서 나타나는 기술을 사용하여 발생할 수 있다. 상기 시도에서 선별된, 예를 들면 마우스 항체와 같은, 비-인간 모노클로날 항체는 동일한 에피토프를 인지하는 완전한 인간 항체를 선별하는 지침으로 사용된다(Jespersen et al, Bio/technology 12:899-903 (1988)).

[0241] 항체는 또한 알려진 선별법 및/또는 당업계에 알려진 돌연변이화(mutagenesis) 방법을 사용하여 친화력 숙성(affinity matured)을 가질 수 있다. 바람직하게 친화력 숙성된 항체는 준비된 성숙한 항체로부터 시작된 항체(설치류에서 발생하여 인간화되거나 인간 항체)보다 5 배의, 더욱 바람직하게는 10 배, 심지어 더욱 바람직하게는 20 또는 30 배 높은 친화력을 가진다.

[0242] "친화력 숙성된"항체는 다른 변화를 수행하지 않은 모항체와 비교하였을 때 IL-5에 대한 항체의 친화력이 개선됨이 결과된 하나 또는 그 이상의 CDR에서 하나 또는 그 이상의 변화를 가지는 것이다. Marks et al (1991) J Mol Biol 222:581-597은 VH 및 VL 도메인 서플에 의한 친화력 숙성을 기재하였다.

[0243] 항체 결합

[0244] 본 발명의 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법을 사용하는 특이 결합을 사용하여 측정될 수 있다. 면역분석은 바이오코어 분석(BIAcore analysis), 유세포 분석(Fluorescent Activated Cell Sorter; FACS), 면역형광법(immunofluorescence), 면역세포화학법(immunocytochemistry), 웨스턴 블롯(western blots), 표지면역검정분석법(radioimmunoassays), ELISA, 샌드위치 면역분석법(sandwich immunoassays), 면역침강 분석법(immunoprecipitation assays), 침강소 반응(precipitin reactions), 젤 확산 침강소 반응(gel diffusion precipitin reactions), 면역확산 분석법(immunodiffusion assays), 응집반응 분석법(agglutination assays), 보체-결합 분석법(complement-fixation assays), 면역방사계측 분석법(immunoradiometric assays), 형광면역분석법(fluorescent immunoassays), 단백질 A 면역분석법(protein A immunoassays) 등과 같은 기술을 사용하는 경쟁적(competitive) 및 비-경쟁적 측정 시스템을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0245] 면역글로불린 IgG4 융합 단백질

[0246] 본 발명을 또한 본 발명의 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 FcRn 결합 도메인 및 변형된 인간 IgG4 중심(core) 힌지 영역 서열에 재조합형(recombinantly) 융합되거나 또는 화학적으로 접합된(conjugated)(공유 접합 또는 비-공유접합을 포함) 생물활성 분자를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 용어 융합 단백질은 종종 용어 "면역접합체(immunoadhesin)"와 밀접하다. 이론에 기반한 예상한 바와 달리, 면역글로불린 IgG4 융합 단백질 변이는 힌지 영역 및 인간 FcRn에 대한 친화력이 상승된 Fc 영역의 변이에 안정화하다고 여겨진다. 구체적인 실시예에서, 융합 단백질은 서열 번호:14의 아미노산 서열, 또는 이들에서 C-말단의 아미노산(라이신)이 결여된 변이체를 포함한다.

[0247] 어떠한 폴리펩티드 또는 합성된 약물일 수 있는 생물활성 분자는 당업계의 기술로 알려져 있다. 적합한 폴리펩티드의 예는 사이토카인(cytokines), 세포 부착 분자(cell adhesion molecules)(예를 들어, CTLA4, CD2 및 CD28), 리간드(예를 들어 TNF-알파(TNF-alpha), TNF-베타(TNF-beta) 및 항-혈관신생 인자(anti-angiogenic factor)), 수용체(receptors) 및 성장 인자(growth factors)(예를 들면 PDGF, EGF, NGF 및 KGF), 효소, 케모카인(chemokine)을 포함한다,

[0248] 융합될 수 있는 생물 활성 분자는 또한 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 또는 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol)과 같은 비단백질성(nonproteinaceous) 중합체일 수 있다.

[0249] 본 발명의 생물활성 분자 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 생산하는 방법은 표준적인 재조합 기술 또는 예를 들면 자동 단백질 합성기와 같은 단백질 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 생물활성 분자를

암호화하는 핵산 분자는 자동적 DNA 합성기(synthesisers)를 포함하는 종래의 기술에 의해 합성될 수 있다. 그 대신에, 유전자 단편의 PCR 증폭은 이후에 키메라 유전자 서열을 만들기 위해서 어닐링(annealed) 및 재증폭(reamplified)될 수 있는, 두 연속된(consecutive) 유전자 단편 사이로 완전하게 걸리도록(overhangs) 한 앵커(anchor) 프라이머를 사용하여 수행될 수 있다. 더욱이, Fc 영역 또는 이들의 FcRn 결합 도메인의 틀에 연결된 분자를 암호화하는 핵산 서열은 Fc 영역 또는 이들의 FcRn 결합 도메인을 포함하는 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다.

[0250] 항체의 불변 영역으로 융합 또는 접합된 폴리펩티드를 위한 방법은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, US 5,336,603, US 5,622,929, US 5,359,046, US 5,349,053, US 5,447,851, US 5,723,125, US 5,783,181, US 5,908,626, US 5,844,096, US 5,112,946, US7,955,590를 참고).

[0251] 생물활성 분자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 유전자은행(Genbank)으로부터 예시로 수득될 수 있으며, 불변 도메인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 본 발명에 기재된 기술을 사용하여 생산된 변이체의 서열 분석을 통해서 결정될 수 있다. 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 적절한 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다.

[0252] 폴리뉴클레오타이드

[0253] 본 발명은 또한 본 발명의 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 이에 매우 엄격하게(stringency) 하이브리드된(hybridise) 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0254] 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 반감기 측정

[0255] 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 반감기는 Kim *et al.*, Eur J of Immunol 24: 542(1994)에 기재된 방법에 따라 약동학 연구(pharmacokinetic studies; PK)를 통해 측정하였다. 상기 방법에 따라 방사능 표지되어(radiolabelled) 변형된 면역글로불린은 정맥주사로(intravenously) 마우스로 주사되었으며 이의 혈장 농도는 정기적으로, 예를 들면 주입 후 72 시간까지 3 분에 시간 함수로서 측정되었다. 그런 다음 얻어진 제거 곡선(clearance curve)은 이상성(biphasic), 즉, 알파상(alpha phase) 및 베타상(beta phase)이었다. 본 발명의 변형된 면역글로불린 또는 융합 단백질의 체내 반감기를 측정하기 위해서, 베타상의 제거 속도를 계산하여 야생형 또는 비변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 것과 비교하였다. 상기 기재된 바와 같은 PK 연구는 설치류 내인성 FcRn가 녹아웃(knocked out)되고 인간 FcRn이 Petkova SB *et al.*, (2006) International Immunology 18(12):1759-1769에 기재된 바에 따라 발현된(knocked in) 인간화된 FcRn 마우스 모델에서 수행될 수 있다.

[0256] 이는 증강된 항체 반감기는 생체 내 활성이 향상된 것과 연관될 수 있는 것으로 최근 보고되었다(Zalovsky J *et al.*, (2010) nature Biotechnology 28(2):157-159).

[0257] 변형된 항체의 능력을 비교하기 위해서, IgG₄ 힌지 영역 변형 및 중쇄 불변 영역 변형, 및 야생형 IgG₄를 포함하는 야생형-IgG₄, 변형된 IgG₄ 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 가지는 FcRn에 결합하는 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 방사능-표지하여 실험관 내에서 FcRn-발현 세포와 반응할 수 있다. 그리고 세포에 결합된 분획(fractions)의 방사능활성(radioactivity)은 계수되어 비교될 수 있다.

[0258] 상기 분석에서 사용되는 FcRn를 발현하는 세포는 B10.DBA/2 마우스의 폐에서 유래된 마우스 폐 모세혈관 내피 세포(pulmonary capillary endothelial cells; B10, D2.PCE) 및 C3H/HeJ 마우스에서 유래된 SV40 형질 전환된 내피 세포(SV40 transformed endothelial cells; SVEC) (Kim *et al.*, J. Immunol., 40:457-465, (1994))를 포함하는 내피세포 세포주가 바람직하다. 그러나, 10 내지 14일령 젖먹이(suckling) 마우스에서 분리된 창자 브러쉬 보더(intestinal brush borders)와 같은 충분한 수의 FcRn를 발현하는 다른 세포 종류 또한 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 선택한 종의 재조합 FcRn을 발현하는 포유류 세포 또한 사용될 수 있다. 변형된 면역글로불린 또는 융합 단백질 결합 부분(bound fraction) 방사능 활성(radioactivity) 또는 야생형 IgG₄의 것의 계수 후, 결합 분자는 그 후에 계면활성제(detergent)로 추출될 수 있으며 세포 수 단위(unit) 당 분비된 백분율을 계산하여 비교할 수 있다.

- [0259] FcRn을 위한 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 친화력은 예를 들면, 기재된 바(출처로 포함되어있는 Popov et al., Mol Immunol., 33:493-502 (1996); Karlsson et al., J. Immunol. Methods, 145:229-240 (1991))로서 비아코어 2000 (BIAcore, Inc)를 사용하는 표면 플라즈몬 공명 (surface Plasmon resonance; SPR) 측정을 통해 측정될 수 있다. 상기 방법에서, FcRn 분자는 비아코어 센서 칩(예를 들어, Pharmacia 사의 Cm5 칩)에 연결되며 고정된 FcRn로 변형된 면역글로불린 또는 융합 단백질의 결합이 변형된 항체, 면역글로블린 컨스트럭트 또는 면역글로블린 IgG4 융합 단백질의 유입(on-) 및 유출 속도(off rates)가 계산될 수 있는 것에 기반하여, 비아 평가 2.1 소프트웨어(BIA evaluation 2.1 software)를 사용한 센서그램(sensorgrams)을 획득하기 위해 어떠한 유속(flow rate)에서 측정된다.
- [0260] 변형된 항체, 면역글로블린 컨스트럭트 또는 면역글로블린 IgG4 융합 단백질의 상대적인 친화력 및 FcRn의 야생형 IgG₄는 또한 간단한 경쟁(competition) 결합 분석을 통해 측정될 수 있다. 비표지된 변형된 항체/면역글로블린 컨스트럭트/면역글로블린 IgG4 융합 단백질 또는 야생형 IgG₄는 FcRn가 고정된 96 웰 플레이트의 웰에 다양한 양으로 첨가되었다. 그런 다음 방사능-표지된 야생형 IgG₄의 지속적인 양이 각 웰에 첨가되었다. 결합 부분의 방사능활성 백분율은 비표지된 변형된 면역글로블린 /융합 단백질 또는 야생형 IgG₄의 양에 대응하여 구상되었으며 변형된 항체/면역글로블린 컨스트럭트/면역글로블린 IgG4 융합 단백질의 상대적 친화력은 곡선의 기울기로부터 계산될 수 있다.
- [0261] 추가적으로, 변형된 항체/면역글로블린 컨스트럭트/면역글로블린 IgG4 융합 단백질의 친화력, 및 FcRn의 야생형 IgG₄는 또한 포화도(saturation) 실험 및 스캐차드(Scatchard) 분석을 통해 측정될 수 있다.
- [0262] 변형된 항체/면역글로블린 컨스트럭트/면역글로블린 IgG4 융합 단백질 및 FcRn의 야생형 IgG₄의 이동은 시험관 내에서 이동 분석(transfer assay)에 의해 방사능 표지된 IgG₄ 및 FcRn 발현 세포를 사용하고 세포 단일층(monolayer)의 한쪽면의 방사능활성을 다른 쪽과 비교하여 측정할 수 있다. 그 대신에, 이러한 이동은 생체 내에서 방사능 표지되고 변형된 항체/면역글로블린 컨스트럭트/면역글로블린 IgG4 융합 단백질과 함께 10 내지 14 일령 젓먹이 마우스를 사육하여 순환되는 내장(intestine)(또는 어떠한 다른 표적 조직)을 통하여 IgG₄의 이동을 지시하는 혈액 시료 내의 방사능 활성을 주기적으로 계측함으로써 측정될 수 있다. 거위(gut)를 통해 IgG 이동의 복용량(dose)-의존적인 억제(inhibition)를 측정하기 위해서, 특정 비율에서 방사능표지 및 비표지된 IgG₄의 혼합물이 마우스에 주어져서 혈액의 방사능활성은 주기적으로 측정될 수 있다(Kim et al, Eur J of Immunol 24:542 (1994)).
- [0263] 약학적 조성물 및 투여 방식(mode)
- [0264] 본 발명의 항체, 면역글로블린 컨스트럭트 또는 면역글로블린 IgG4 융합 단백질은 비경구(parenteral), 국소마취(topical), 경구(oral), 또는 국소(local)용 투여, 에어로졸(aerosol) 투여, 또는 경피(transdermal) 투여, 예방용(prophylactic), 또는 치료용 처치(treatment)에 유용하다. 약학적 조성물은 투여 방식에 의존하여 다양한 단위 복용량 형태(unit dosage forms)로 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여에 적합한 단위 복용량 형태는 분말, 태블릿(tablets), 정제(pills), 캡슐 및 마름모(lozenges)를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은, 경구 투여될 때, 소화되는 것을 방지하여야 함을 인지한다. 이는 전형적으로 산성 및 효소성 가수분해(hydrolysis)에 저항성을 갖도록 하는 조성물을 포함하는 단백질을 조성(complexing)함으로써 또는 리포솜(liposome)과 같은 적당하게 저항성 있는 담체(carrier)에 단백질을 포장(packaging)함으로써 중 어느 하나에 의해 성취될 수 있다. 소화로부터 단백질을 보호하는 방법은 당업계에 알려져있다.
- [0265] 본 발명의 약학적 조성물은 정맥주사(intravenous) 투여 또는 기관(organ) 또는 관절(joint)의 체강(body cavity) 또는 루멘(lumen)에 투여와 같은, 비경구 투여에 특히 유용하다. 투여를 위한 조성물은 일반적으로 약학적으로 수용가능한 담체, 바람직하게 수용성 담체가 용해되어 있는 본 발명의 항체, 면역글로블린 컨스트럭트 또는 면역글로블린 IgG4 융합 단백질의 용액을 포함할 것이다. 다양한 수용성 담체는 예를 들어, 완충용 염(saline) 및 유사한 것으로 사용될 수 있다. 이러한 용액은 살균(sterile)되고 일반적으로 바람직하지 않은 물질이 없다. 이러한 조성물은 관용적으로, 잘 알려진 살균 기술에 의해 살균될 수 있다. 조성물은 예를 들어 초산나트륨(sodium acetate), 염화나트륨(sodium chloride), 염화칼륨(potassium chloride), 염화칼슘(calcium chloride), 젖산나트륨(sodium lactate) 및 유사한 것과 같은 pH 조정 및 완충용 제제, 독성 조절 제제 및 유사

한 것과 같은 적합한 생리적 조건을 요구하기 때문에 약학적으로 수용가능한 보조(auxiliary) 물질을 포함할 수 있다. 이러한 제형(formulation)에서 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 농도는 상당히 다양할 수 있고 선택된 특정 투여 방법 및 개체의 요구에 따른 액체 부피, 점도(viscosities), 체중 및 유사한 것에 주로 기초하여 선택될 것이다.

[0266] 예를 들어, 비경구 투여의 경우 개체 항체는 약학적으로 수용가능한 비경구 비이클(vehicle)과 공동으로 단위 복용량 주입가능 형태(용액, 현탁액(suspension), 유화액(emulsion))로 제형화될 수 있다. 이러한 비이클의 예는 물, 염, 링거액(Ringer's solution), 텍스트로오스 용액(dextrose solution), 및 5% 인간 혈청 알부민이다. 혼합 오일 및 올레인산 에틸(ethyl oleate)과 같은 비수용성 비이클도 또한 사용될 수 있다. 리포솜(Liposome)은 또한 담체로 사용될 수 있다. 비이클은 등장성(isotonicity) 및 화학적 안정성, 예를 들어, 완충용액 및 보존료(preservatives)를 향상시키는 첨가제의 적은 양을 포함할 수 있다.

[0267] 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 비경구 투여용으로 제형화될 수 있고, 예를 들어, 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 피하(sub-cutaneous), 경피(transdermal), 또는 다른 이러한 경로, 연동(peristaltic) 투여 및 direct instillation into 종양 또는 질병 부위에 대한 직접 점적(instillation) (intracavity administration)을 통해 주입용으로 제형화될 수 있다. 일반적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액 둘 중 어느 하나로서, 주입가능하게 준비될 수 있고; 주입 이전 액체가 첨가된 용액 또는 현탁액을 준비하기 위해 사용 적합한 고체 형태 또한 준비될 수 있고; 및 그 준비는 또한 멸전화될 수 있다.

[0268] 주입가능 용도에 적합한 약학적 형태는 살균 수용성 용액 또는 분산(dispersions); 세삼 오일(sesame oil), 땅콩 기름(peanut oil) 또는 수용성 프로필렌 글리콜(aqueous propylene glycol)을 포함하는 제형; 및 살균한 주입가능한 용액 또는 분산의 즉석(extemporaneous) 준비를 위한 살균한 분말을 포함한다. 모든 경우, 형태는 상승효과가 존재하는 정도로 살균되고 유효적이어야 한다. 이는 제조 및 저장의 조건 하에 안정적이어야 하고 박테리아 및 곰팡이와 같은, 미생물의 오염유발 작용에 대해 보존되어야 한다.

[0269] 조성물은 중성 또는 염 형태에서 살균된 수용성 조성물로 제형화될 수 있다. 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 염기가 제거된 용액 또는 약물학적으로(pharmacologically) 수용가능한 염은 하이드록시프로필셀룰로스(hydroxypropylcellulose)와 같은, 계면활성제(surfactant)로 적합하게 혼합된 물로 준비될 수 있다. 약학적으로 수용가능한 염은, 산이 추가된 염(아미노 그룹이 제거된 단백질로 형성됨), 예를 들어, 염산(hydrochloric) 또는 인산(phosphoric acids)과 같은 비유기산, 또는 이러한 아세트(acetic), 트리플루오로아세트(trifluoroacetic), 옥살릭(oxalic), 주석의(tartaric), 만델릭(mandelic) 같은 유기산, 및 유사한 것으로 형성된 것들을 포함한다. 카복실 그룹이 없는 채로 형성된 염은 또한 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화철(ferric hydroxides)과 같은 비유기성 염기, 및 이소프로필아민(isopropylamine), 트리메틸아민(trimethylamine), 히스티딘(histidine), 프로카인(procaine)과 같은 이러한 유기성 염기 및 유사한 것로부터 유래될 수 있다.

[0270] 적합한 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(polyol)(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 프로필렌 글리콜, 및 유사한 것), 이의 적합한 혼합물, 및 식물성 기름을 함유하는 용매 및 분산 배지를 포함한다. 많은 경우, 예를 들어, 설탕 또는 염화나트륨의 등장성(isotonic) 체제를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 적절한 유효성은 예를 들어, 레시틴(lecithin)과 같은, 코팅의 사용에 의해, 분산의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및/또는 계면활성제(surfactants)의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0271] 저장 및 사용의 일반적인 조건 하에서, 이러한 모든 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위해 방부제(preservative)를 포함할 수 있다. 미생물의 활동 방지는 다양한 항생 및 항진균 제제, 예를 들어, 파라벤(parabens), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀(phenol), 소르브산(sorbic acid), 티메로살(thimerosal), 및 유사한 것에 의해 야기될 수 있다. 주입가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수 지연용 제제, 예를 들어, 스테아린산 알루미늄(aluminum monostearate) 및 젤라틴(gelatin)의 조성물을 사용함으로써 야기될 수 있다.

[0272] 제형화 이전 또는 중, 상기 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 적당한 곳에서, 바람직하지 않은 작은 분자의 분자 무게를 제거하기 위해 회석(dialyzed), 및/또는 바람직한 비이클로의 제형화를 위해 더 준비되도록 동결건조(lyophilized) 된다. 살균된 주입가능한 용액은 다양한 상기에 열거된(enumerated) 다른 성분을 가지는 적당한 용매의 필요량으로 활성 성분을 결합함으로써 준비되고, 바람직하게, 다음에 여과 살균한다. 일반적으로, 분산은 염기성 분산 배지를 함유하는 살균 비이클로의 다양한 살균된 활성 성분 및 상기 열거된 것들과 다른 필요 성분을 결합함으로써 준비된다.

- [0273] 살균된 주입가능한 용액의 제조를 위한 살균된 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 이의 이전 살균-여과 용액으로부터의 추가적인 바람직한 성분을 어떤 것이든 추가한, 활성 성분의 분말을 수득하기 위한 진공건조 및 동결건조 기술이다.
- [0274] 본 발명과 관련된 적합한 약학적 조성물은 일반적으로 의도된 사용에 의존적인, 최종 농도 범위를 제공하기 위해, 살균된 수용성 용액과 같은, 수용가능한 약학적 희석액(diluent) 또는 첨가제(excipient)가 혼합된 상기 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 양을 포함한다. 제조 기술은 일반적으로 여기에서 참조로서 통합된 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. Mack Publishing Company, 1980에 의해 예시되듯이 당업계에 알려져있다. 내독소(endotoxin) 오염은 최소한으로 안전한 수준, 예를 들어, 단백질 0.5 ng/mg 미만으로, 유지되어야 한다.
- [0275] 제형 동안, 상기 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 복용량 제형에 호환되는 방법으로 및 치료용/예방용으로 효율적인 상기 양으로 투여될 수 있다. 제형은 상기에 기재된 주입가능한 용액 종류와 같은, 다양한 복용량 형태로 쉽게 투여될 수 있지만, 예를 들어, 태블릿(tablets), 정제(pills), 캡슐(capsules)과 같은, 다른 약학적으로 수용가능한 형태 또는 경구 투여, 좌약(suppositories), 질 좌약(pessaries), 비액(nasal solutions) 또는 스프레이, 에어로졸(aerosols), 흡입제(inhalants), 리포솜형(liposomal forms)을 위한 다른 고체 및 유사한 것이 또한 고려된다. 약학적 "지효성(slow release)" 캡슐 또는 조성물이 또한 사용될 수 있다. 지효성 제형은 일반적으로 연장된 기간에 대한 일정한 약물 수준을 제공하기 위해 고안되고 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 운반하기 위해 사용될 수 있다.
- [0276] 어떤 실시예에서, 리포솜 및/또는 나노 입자(nanoparticles)는 또한 활성 성분으로 이용될 수 있다. 리포솜의 제형 및 사용은 일반적으로 당업자에게 알려져있다. 리포솜은 수용성 배지 및 자발적 형성 다중층(multilamellar) 동심원(concentric) 이중층(bilayer) 베시클(vesicles)(MLVs(multilamellar vesicles)로 불리는데)으로 분산된 인지질(phospholipids)로부터 형성될 수 있다. MLVs는 일반적으로 25 nm 내지 4 μ m의 직경(diameter)을 가진다. MLVs의 초음파 분해(Sonication)는 200 내지 500 옹스트롬(angstrom) 범위의 직경을 가지는 SUVs(small unilamellar vesicles)의 제형을 초래하고, 코어(core)에서 수용성 용액을 함유한다. 인지질은 물에 대한 지질의 몰 비율에 의존하여, 물에 분산될 때 리포솜과 다른 다양한 구조를 형성할 수 있다. 낮은 비율에서 상기 리포솜은 바람직한 구조이다. 리포솜의 물리적 특징은 pH, 이온강도(ionic strength) 및 이가 양이온(divalent cations)의 존재에 의존적이다. 리포솜은 이온성(ionic) 및 극성 물질에 낮은 투과성(permeability)을 보일 수 있지만, 높은 온도에서 이들 투과성을 현저하게 변경하는 상 전이(transition)를 겪는다. 상기 상 전이는 젤 상태(gel state)로 알려진, 밀접하게 포장되고(packed) 명령된 구조로부터, 액체 상태로 알려진, 헐겁게 포장되고 명령된 구조로의 변화를 수반한다. 이는 특정한 상-전이 온도에서 발생하고 이온, 당 및 약물의 투과성에 있어서 증가를 야기한다.
- [0277] 나노 입자는 일반적으로 안정하고 재생가능한 방법으로 화합물을 옴아맨다(entrap). 세포 내 중합체의 과적(overloading)으로 인한 부작용을 회피하기 위해, 이러한 초미세(ultrafine) 입자(대략 0.1 μ m 크기)는 생체 내에서 분해될 가능성이 있는 중합체를 사용하여 고안될 수 있다. 이러한 요구를 충족시키는 생분해가 가능한 폴리알킬-시아모아크릴레이트 나노 입자는 본 발명의 용도를 위해 고려되고, 이러한 입자는 쉽게 제조될 수 있다.
- [0278] 국제 공개 제 WO/2002/080967호는 예를 들어, 천식의 치료를 위한 항체를 포함하는 에어로졸화된 조성물을 투여하는 조성물 및 방법을 설명하고, 본 발명의 항체의 투여를 위해 적합하다.
- [0279] 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 복용량은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 그러나, 상기 복용량은 변형된 면역글로불린 또는 융합 단백질의 생체 내 반감기가 증가했을 정도에 의존적일 수 있다. 더욱이, 본 발명에 따른 항체 또는 융합 단백질의 복용량 및 투여 빈도는 또한 예를 들어, 지질화(lipidation)와 같은 변형에 의해 섭취 및 조직 침투(penetration)(예를 들어 폐로)를 향상시킴으로써 감소될 수 있다.
- [0280] 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질을 가지는 치료는 단일 처리 또는 여러 번의 처리를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 일주일에 한번, 일주일에 두 번, 이주마다 한번, 한 달에 한번, 또는 6주마다 한번 투여될 수 있다.
- [0281]

- [0282] 본 발명의 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질의 이용
- [0283] 본 발명의 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 다양한 비-치료용 목적을 위해 사용될 수 있다. 이들은 친화성 정제 제제로서 사용될 수 있다. 이들은 또한 특이적 세포, 조직, 또는 혈청에서 관심있는 항원의 검출용 발현과 같은, 진단 검정에서 유용하게 사용될 수 있다. 진단에 적용하기 위해, 상기 항체는 방사성 동위 원소, 형광물질 표지, 및 다양한 효소 반응물 표지를 포함하는, 검출가능한 부분을 가지고 있어 전형적으로 표지화될 것이다. 상기 항체는 또한 경쟁적 결합 검정, 직접적 및 간접적 샌드위치 검정, 및 면역침강 검정과 같은, 어떤 알려진 방법이든지 이용될 수 있다. 상기 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 또한 생체 내 진단 검정용으로 사용될 수 있다. 일반적으로, 상기 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 방사성 뉴클레오티드를 가지고 표지화될 수 있어서 이를 발현하는 항원 또는 세포의 위치를 면역신티그래피(immunoscintigraphy)를 이용하여 알 수 있다.
- [0284]
- [0285] 치료 중 항-IL-5 항체의 사용
- [0286] 천식 및 다른 만성 알레르기성 질환의 발병(pathogenesis)에서 일반적인 특징은, 특히 폐 기관지의 점막층(bronchial mucosa)에서 산호성백혈구(eosinophils)의 수가 증가되는 것으로 증명되었다. 활성화 시, 산호성백혈구는 염증성 기도(airway) 반응에 활발히 관련된 많은 매개자를 분비한다. 산호성백혈구의 활성화 시, 인터루킨 5(interleukin 5; IL-5)는 중요한 역할을 한다.
- [0287] IL-5는 많은 포유류 중에서 및 다른 종들 중에서 발견되는 사이토카인(cytokine)이고 IL-5에 대한 인간 및 쥐과(murine) 유전자 둘 다를 클로닝하였다. 인간 유전자는 염색체 5에 위치한 3 개의 인트론을 가진 4 개의 엑손으로 구성되고 134 아미노산 N-말단 리더 서열을 암호화한다. 활성화 IL-5는 호모 다이머이고 재조합 hIL-5의 3 차 구조는 X-레이 결정화(crystallography)에 의해 결정되었다. IL-5에 대한 수용체는 주로 산호성백혈구에 존재하고 이는 알파 쇠 및 베타 쇠로 이루어져 있다. 수용체의 알파 쇠는 IL-5에 특이적이고 베타 쇠는 IL-3 및 GM-CSF에 대한 헤테로 다이머 수용체를 가지고 공유되며, 이는 높은 친화성 결합 및 신호 전달을 장담한다(assure).
- [0288] IL-5는 주로 완전히 분화된 Th2 세포, 유방(mast) 세포 및 산호성백혈구에 의해 분비된다. 산호성백혈구, 호염기성 세포(basophils), 세포독성 T 림프구에서 및 쥐과 B 세포에서 활성을 보였다.
- [0289] 산호성백혈구에서 IL-5의 활성화는 주화성(chemotaxis), 향상된 내피세포에 대한 부착, 및 상피 세포에 대한 마지막 분화의 활성화를 포함한다. 더욱이, IL-5는 성숙한 산호성백혈구의 세포사멸(apoptosis)을 방해함을 입증했다. 이러한 발견은 산호성백혈구 분화를 위한 가장 중요한 사이토카인이 될 IL-5의 개념에 기여하였다.
- [0290] 천식을 위한 현재의 치료는 코르티코스테로이드류(corticosteroids)와 관련있는 반면, 산호성백혈구에 의해 매개되는 다른 조건뿐만 아니라 천식의 미래의 치료는 항-IL-5 항체를 포함할 것으로 미래상으로 기대한다(envision). 사이토카인 및 산호성백혈구로부터의 다른 이펙터 또는 분자의 부적합한 분비는 주변 조직의 손상 및 기능장애(dysfunction)를 유발한다. 산호성백혈구 침입 및 활성화의 기관-끝 손상은 아토피성(atopic) 질환 및 과호산구 증후군(hypereosinophilic syndromes; HES)을 포함하는, 여러 질병 상태의 흔한 세균성 구성물질을 대표한다. 인간에서 산호성백혈구 수를 감소시키는 치료에 대한 필요는 명백히 존재한다.
- [0291] 질병의 치료 또는 예방용 항체, 면역글로불린 컨스트럭트, 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질
- [0292] 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 다양한 치료법 적용을 가진다. 상기 변형된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 질병 또는 질환을 겪고 있거나, 겪을 가능성이 있는 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있고, 이는 변형된 항체의 투여로부터 이로울 수 있다. The conditions that can be treated with the 항체를 가지고 치료될 수 있는 질환(condition)은 암; 천식과 같은 염증성 질환; 자가 면역성 질병; 및 바이러스 감염, 등을 포함한다.
- [0293] 여기에서 기재된 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질에 의해 치료될 수 있는 암은 유방암(breast cancer), 편평세포암(squamous cell cancer), 소세포폐암(small cell lung cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer), 위암(gastrointestinal cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 교아종(glioblastoma), 자궁경부암(cervical cancer), 난소암(ovarian cancer), 방광암(bladder cancer), 간종양

(hepatoma), 결장암(colon cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 자궁 내막 종양(endometrial carcinoma), 침샘암(salivary gland carcinoma), 신장암(kidney cancer), 간암(liver cancer), 전립선암(prostate cancer), 외음암(vulval cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 간암종(hepatic carcinoma), 및 다양한 종류의 머리 및 목 암을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0294] 자가 면역 질환(autoimmune diseases)은 애디슨 씨병(Addison's disease, 귀의 자가 면역 질환, 포도막염(uveitis)과 같은 눈의 자가 면역 질환, 자가 면역 간염(autoimmune hepatitis), 크론병(Crohn's disease), 당뇨병(종류 I), 부고환염(epididymitis), 사구체 신염(glomerulonephritis), 그레이브스 병(Graves' disease), 궤양 바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 하시모토병(Hashimoto's disease), 용혈성 빈혈(hemolytic anemia), 전신 홍반성 루프스(systemic lupus erythematosus), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 심상성천포창(pemphigus vulgaris), 건선(psoriasis), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 유육종증(sarcoidosis), 경피증(scleroderma), 쇼그렌증후군(Sjogren's syndrome), 척추관절염(spondyloarthropathies), 갑상선염(thyroiditis), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 및 맥관염(vasculitis)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0295] 본 발명은 또한 호산성 백혈구 증가증(eosinophilia)으로 특징되는 질병을 치료하기 위한 방법을 포함한다. 친식은 독창적인 방법에 대한 주요 타겟일 뿐만 아니라 여러 알레르기, 알레르기성 비염(rhinitis), 및 호산성 백혈구 증가성 식도염(oesophagitis)과 같은 다른 만성 질환은 치료용 적절한 타겟이다. 따라서 본 발명의 방법에 대한 실시예는 호산성 백혈구(eosinophil) 세포의 수가 현저하게 감소하는 정도로 IL-5 활성을 하향 조절하는 항-IL-5 항체의 투여를 포함하는 친식 또는 호산성 백혈구 증가증으로 특징되는 다른 만성 알레르기성 질환을 치료 및/또는 예방 및/또는 개선을 포함한다.

[0296] 본 내용에서 호산성 백혈구 세포 수의 현저한 감소는 이전 기술 치료의 호산성 백혈구 수와 비교하여 적어도 20%이지만, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 및 심지어 적어도 90%와 같은, 더 높은 비율(percentages)이 고려된다. 상기 감소는 체계적(systemic) 또는, 예를 들어 폐와 같이, 더욱 종종 부분적일 수 있다.

[0297] 호산성 백혈구 수는 당업계에 알려진 방법에 의해 결정되고, 전형적으로 적합한 시료 기관지 폐포 세척 세포(bronchoalveolar lavage; BAL) 유체(fluid)의 현미경 관찰 및 현미경 하에서 수동으로 호산성 백혈구 세포의 수를 세는 것을 사용한다. 그 대신에, 호산성 백혈구 수는 호산성 백혈구를 구분 가능한 유동 세포 분석법(flow cytometry)을 이용하여 산출될 수 있다.

[0298] 본 발명의 변형된 항-CD33 항체는 특히 암, 더욱 특히 골수성 백혈병(myeloid leukemia)의 치료에 유용하다. 본 발명은 또한 칼리키아미신(calicheamicin)에 접합되어, 이의 반감기를 증가시키기 위해 본 발명에 따라 변형된 항-CD33을 포함한다(Hamann PR et al., (2002) Bioconj Chem. 13(1):40-6). 항-CD33-칼리키아미신 컨쥬게이트(conjugate)는 급성 골수성 백혈병을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0299]

[0300] 비-면역자극성(non-immunostimulatory) 항체의 유용성(Utility)

[0301] 본 발명의 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 및 면역글로불린 IgG4 융합 단백질은 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 또는 이의 FcRn 결합 도메인 및 변형된 인간 IgG4 코어 힌지 영역 서열을 포함한. 항체 불변 도메인의 이소타입(isotype)이 항체의 이펙터 기능에 영향을 미치는 것은 당업계에 알려져 있다. 다양한 인간 면역글로불린 종류들 중에서, 오직 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgM이 보체(complement)를 활성화하는 것으로 알려져 있고; 인간 IgG1 및 IgG3는 IgG2 및 IgG4 보다 항체 의존적 세포 세포독성(antibody dependent cell cytotoxicity; ADCC)을 더욱 효과적으로 매개한다. 본 발명의 면역글로불린 및 융합 단백질은 IgG4 불변 영역 서열을 포함하기 때문에, 이들은 보체 반응(complement cascade) 또는 ADCC 활성을 활성화할 수 없고 이런 이유로 어떤 바람직하지 않은 NK-세포 또는 T-세포도 활성화할 수 없다. 따라서, 이들은 특히 친식과 같은 알레르기성 질환을 잘 받아들일 수(amenable) 있고 여기에서 오직 이러한 질환을 악화시킬 수 있는 세포의 활성화를 유발하는 것은 바람직하지 않다.

[0302] IgG4 항체는 항-염증 활성에서 다른 IgG 하위 종류(subclass)와 기능적으로 다르고, 이는 C1q(보충의 첫 번째 요소의 q 단편) 및 Fc 감마 수용체에 대한 낮은 친화성 때문에 보충 및 세포 활성을 유도하는 좋지 않은 능력을 포함한다. 결과적으로, IgG4는 면역요법에 대한 바람직한 하위 종류가 될 수 있고, 여기에서 숙주 이펙터 기능의 보충(recruitment)은 바람직하지 않다.

- [0303] 항-IL-5 항체
- [0304] 본 발명은 본 발명에 따라 변형된 인간 IgG4 Fc 영역 및 변형된 인간 IgG4 힌지 영역과 결합된 IL-5 알려진 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역 서열을 포함하는 항체, 면역글로불린 컨스트럭트 또는 면역글로불린 IgG4 융합 단백질까지 미친다. 항-IL-5 항체의 여러 예시는 US 5,683,892, US 5,693,323, US 5,783, 184, US 5,851, 525, US 6,129,913, US 5,096,071, US 6,056,957 및 US 6,451,982에 기재된다. 게다가, 인간화된 항-IL-5 항체 CTIL-5-10gH/-gL6(US RE39,548E에 기재되듯이)는, 여기에서 인간화된 39D10 또는 hu39D10로 지칭되고 메폴리주마브(mepolizumab)는 본 발명에 따른 변형에 특히 적합하다.
- [0305] 당업자는 특이적 실시예로 제시된 본 발명은 넓게 기재되어 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 한 수많은 변이 및/또는 변형될 수 있음을 인지할 것이다. 따라서, 본 실시예들은 예시적이나 제한적이지 않은 모든 관점으로 고려되어야 한다.
- [0306]
- [0307] 치환의 상승효과(Synergistic effect)
- [0308] 본 발명자들은 YTE 치환(즉, IgG4 면역글로불린 또는 항체 Fc 영역에 있는 M252Y, S254T 및 T256E 돌연변이)은, IgG4 항체에 있는 S228P 힌지 영역 돌연변이와 결합될 때, 생체 내 변형된 IgG4 항체의 반감기를 상승효과가 있게 증가함을 발견하였다. 실시예에 기재된 것처럼, 두 다른 항체가 두 개의 다른, 무관한 항원에 결합함이 제시되었다.
- [0309] 특히, 발명자들은 YTE 치환은 인간 FcRn에 대한 변형된 항체의 친화성을 증가시키나, 힌지 영역에 대한 S228P 변형의 추가적 포함은 상기 FcRn에 대한 항체 친화성에 추가적인 영향을 생산하지 않음을 발견하였다. 이는 이 영역이 FcRn과 상호작용하지 않을 것으로 전적으로 기대된다. 그러므로 S228P 치환 및 YTE 치환과 관련하여 어떠한 상승효과도 존재하지 않을 것으로 예견되었다. 인간 단백질 기반의 약물(인간 항체 불변 영역을 포함하는 단백질을 포함)에 있어 어떠한 변형이든 환자에서 항-약물 면역 반응을 유발하는 위험성을 증가시키고, 이러한 관행은 약물에 대한 이러한 면역 반응을 유도하는 것과 관련한 이러한 돌연변이 각각에 대한 있음직하게 추가적으로 증가한 위험성을 제한하기 위해 이러한 돌연변이의 수를 제한할 것이다. 그러나, 두 종류의 변형(Fc 변형 및 힌지 변형)의 조합이 IgG4 항체의 순환 반감기를 증가시키는 상승적 영향(supra-additive) 효과를 결과로 가져오는 여기에서 기재된 놀라운 결과 때문에, 이러한 두 종류의 돌연변이를 결합하는 장점은 항-약물 면역 반응을 촉진하는 발생을 증가시키는 것과 관련된 이론상 불이익을 극복할 수 있다. 분자의 반감기를 증가시키는 장점은 즉각적으로 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 이점은 개체에 부정적 사건의 위험을 낮추고 비용을 절감하는 복용량 및/또는 투여 빈도의 감소를 포함한다. 따라서, 증가된 반감기를 가진 이러한 면역글로불린은 상당히 약학적으로 중요하다.
- [0310] 여기에서 지칭되는 모든 참고문헌 또는 문서는 전체에서 참조로서 통합된다.
- [0311] 본 명세서를 전반에서 단어 "포함한다(comprise)", 또는 이의 "comprises" 또는 "comprising"와 같은 변이형은, 언급된 요소, 정수(integer) 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹을 포함하는 것을 내포하나, 어떤 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹도 제외하지 않는다.
- [0312] 본 명세서에 포함된 어떠한 문서, 법률(act), 재료, 장치, 논문 또는 유사한 것에 대한 논의든지 이 문제들의 일부 또는 모두가 이전 기술 기초의 일부를 형성하거나 본 출원의 각 청구항에 대한 우선권 주장일 이전에 존재했듯이 본 발명과 관련된 분야에서 통상적이고 일반적인 지식이 되었던 것으로 인정되지 않을 것이다.
- [0313]
- [0314] **실시예 1**
- [0315] 재료 및 방법
- [0316] *hu39D10 및 이의 변이 생성*
- [0317] 인간 IgG4 중쇄 불변 영역을 암호화하는 유전자는 Quickclone cDNA Library(Clontech, Mountain View, CA)로부터 분리하였고 pTT5 발현 벡터(Durocher et al, Nucleic Acids Research vol 30, No. 2, pp e9)로 클로닝하였다. Fc 도메인에서 상기에 기재한 돌연변이들을 도입하기 위해, 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가진 상보적

서열의 두 개의 프라이머 세트를 합성하였고 PCR-기반의 부위 특이적 돌연변이 유도(부위 특이적 돌연변이화)를 위해 사용하였다. Ig 카파(kappa) 발현 벡터는 유사한 수단으로 제작되었다. hu39D10 가변 영역을 암호화하는 DNA 단편(도 1)은 공개된 단백질 서열(US RE39,548E)과 반대로 고안되었고, PCR-기반의 유전자-어셈블리에 의한 18(중쇄) 또는 16(경쇄) 올리고뉴클레오타이드를 사용하였다. 상기 단편은 클로닝을 위해 벡터로 통합된 제한 효소 위치를 사용하여 발현 벡터로 클로닝되었다. hu39D10 중쇄 및 경쇄에 대한 마지막 아미노산 서열은 도 1에 제시된다. 상기 도는 또한 4 개의 아미노산 치환을 가지는 hu39D10 서열(YTE+S228P, 서열번호:6)을 제시한다.

[0318] hu39D10 및 변이의 발현 및 정제

[0319] hu39D10 및 이의 변이를 위한 pTT5 발현 벡터는 Durocher et al, Nucleic Acids Research vol 30, No. 2, pp e9에 따라서 HEK293 6E 세포로 형질주입하였다. 형질주입 6 일 후, 배양 배지를 분리한 다음 단백질 G-아가로스 비즈(Protein G-agarose beads, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)를 사용하여 친화성 정제를 하였다.

[0320] FcRn/ β_2 마이크로글로불린 복합체 발현 컨스트럭트의 생성

[0321] 인간 FcRn 및 β_2 마이크로글로불린을 암호화하는 DNA 단편은 Superscript III First-strand Synthesis 키트 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여, 인간 총 RNA 풀인, 인간 유니버설 RNA(BioChain, Hayward, CA)로 합성된 cDNA로부터 분리되었다. FcRn의 세포외 도메인(아미노산 24-290) 및 β_2 마이크로글로불린(아미노산 21-119)의 성숙 부분은 각각 pTT5 발현 벡터로 클로닝되었다. 인간 FcRn 나머지 세포 도메인 및 β_2 마이크로글로불린은 도 2 및 도 4에 각각, 제시된다.

[0322]

[0323] FcRn/ β_2 마이크로글로불린 복합체의 발현 및 정제

[0324] 인간 FcRn 및 β_2 마이크로글로불린을 생산하기 위한 pTT5 발현 벡터는 HEK293 6E 세포로 동시 형질주입되었다. 형질주입 6일 후, 배양 배지는 분리되고 그런 다음 IgG-Sepharose 비즈(GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)를 사용하여 친화성 정제를 실시하였다.

[0325]

[0326] FcRn/ β_2 마이크로글로불린 복합체에 대한 hu39D10 및 변이의 친화성을 측정하기 위한 ELISA

[0327] 맥시솜(Maxisorp) 96-웰 플레이트(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY)는 5 ug/ml 항- β_2 마이크로글로불린 모노클로날(monoclonal) 항체로 코팅되었다. 그런 다음 웰들은 PBS로 세척되었고, Superblock 블락킹 용액(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)로 처리되었다. 그런 다음, the FcRn/ β_2 마이크로글로불린 복합체는 SPBS6T(50 mM 인산 나트륨(sodium phosphate) 완충용액 pH 6.0, 150 mM NaCl, 0.05% 트윈(Tween)-20)에서 5 ug/ml으로 희석되었고 상온에서 60 분 동안 코팅된 항- β_2 마이크로글로불린 항체에 의해 포획(capture)을 허용하기 위해 추가되었다. 웰들은 그런 다음 세척되었고, 그리고 나서 hu39D10 또는 SPBS6T에서 이의 변이에 노출되었고 상온에서 60 분 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션에 의해 형성된 hu39D10/FcRn 복합체는 상온에서 30 분 동안 항-인간 카파 HRP 컨주게이트(conjugate)의 F(ab')₂ 단편으로 탐침화(probed)되었다 (SouthernBiotechnology, Birmingham, AL; SPBS6T에서 1/5000배 희석). SPBS6T로 세척한 다음, 100ul의 TMB(Sigma)는 신호 탐지를 위해 각 웰로 적재(load)되었다. 그런 다음, 50 ul의 2N 황산(sulfuric acid)이 색 발달을 중지시키기 위해 추가되었고, 그런 다음 A450은 Vmax plate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 측정되었다. The affinity of the IgG 변이 to FcRn에 대한 IgG 변이 친화성은 GraphPad 소프트웨어 (LaJolla, CA)에 의해 Prism 소프트웨어를 사용하여 계산 및 플롯화(plot) 하였다.

[0328]

[0329] 결과 및 결론

[0330] 도 4에 나타낸 바와 같이, 인간 FcRn에 대한 hu39D10 친화성(EC₅₀ = 3.8 nM)은 YTE 돌연변이(EC₅₀ = 0.81 nM)

를 생성함으로써 4.7 배까지 증가되었다. S228P 돌연변이를 더 추가함은 FcRn 친화성($EC_{50} = 0.81 \text{ nM}$, YTE 돌연변이를 가진 hu39D10에 대한 것과 동일)에 어떤 영향도 미치지 않았다. 이 결과는 S228P 돌연변이가 FcRn와 상호작용하는 Fc 영역으로부터 멀리 위치하기 때문에 예측되지 않았다. 상기 결과를 기반으로 할 때, 순환 반감기의 YTE 및 S228P 돌연변이 사이의 어떠한 상승효과(synergy)도 예측되지 않을 것이다.

[0331]

[0332] 실시예 2

[0333]

PK 연구

[0334]

마우스 PK 연구는 내재성 FcRn이 녹아웃(knocked out)되었지만 인간 FcRn이 녹인(knocked in)된 마우스를 가지고 Jackson Laboratory-West(Sacramento, CA)의 방법에 따라 수행하였다(Petkova et al, (2006) International Immunology vol. 18, No. 12, pp. 1759-1769에 기재된 4919 Tg276 반접합성(hemizygous) 마우스 모델). 0일째에, 각 그룹 당 일곱 마리 마우스는 hu39D10 또는 이의 변이(200 ug)를 복강 내(intraperitoneally; IP)에 받았다. 각 마우스는 혈장(plasma) 시료를 준비하기 위해 2, 12, 24 시간 및 2, 4, 7, 10, 14, 18, 21 및 28 일에 레트로 오비탈 부비강(retro orbital sinus)으로부터 혈액을 채취하였다.

[0335]

혈장 시료 내 hu39D10 및 변이를 측정하기 위한 ELISA

[0337]

맥시솅 96-웰 플레이트(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY)를 밤새 냉장고에서 2 ug/ml 재조합 IL-5(hu39D10 항체; R&D Systems, Minneapolis, MN)의 PBS로 코팅하였다. 웰들은 그런 다음 PBS로 세척하고 30 분 동안 비특이적 결합을 최소화하기 위해 수퍼 블라킹 용액(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) 200 ul로 블라킹하였다. 그런 다음 혈장 시료를 PBS-Tween 20(PBST)에서 1/50으로 희석하였고, IL-5로 코팅된 웰로 적재하였다. 추가적으로, 재조합 hu39D10 표준은 2% 마우스 혈청(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 포함하는 PBST로 희석하였고 그 양을 표준 곡선을 생성하기 위해 코팅된 웰들로 적재하였다. 상온에서 60 분 인큐베이션 이후, 웰들은 PBST로 세척되었고 그런 다음 항-인간 Fc-HRP 접합체(conjugate)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, PBST에 1/1000 희석)를 추가하고 상온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 웰들을 PBST로 세척하였다. 신호 탐지를 위해, 100 ul의 TMB(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 각 웰에 적재하였다. 그런 다음, 황산 50 ul을 색 발달을 멈추도록 하기 위해 추가하였고, 그런 다음 A450은 Vmax plate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 측정하였다. 혈장에서 hu39D10 및 변이의 농도는 프리즘(Prism, GraphPad Software, LaJolla, CA) 소프트웨어를 이용하고 hu39D10 표준 곡선을 이용하여 계산되었다. 각 마우스에 대해, 1일 째에 측정된 농도와 비교하여 hu39D10의 상대적 농도(100%로 정의된)는 시간의 함수로서 플롯화하였다. 또한 상기 소프트웨어를 이용하여 개별 동물에서 hu39D10 또는 이의 변이의 반감기를 계산하였고, 지수함수형 감쇄(exponential decay) 및 0의 점근선(asymptote)을 추정하였다. 결합된 돌연변이들(S228P + YTE)을 가진 변이의 반감기 계산을 위해, 두 가외치(outlier) 결과들(이는 마우스 두 마리의 결과이다)은, 평균 반감기의 순환에 제외되었다.

[0338]

결과 및 결론

[0340]

도 5에 나타난 바와 같이, S228P 돌연변이를 가지는 hu39D10의 혈청 반감기($t_{1/2} = 6.5$ 일)는 변형되지 않은 Fc($t_{1/2} = 4.6$ 일)을 가지는 hu39D10와 비교하여 42%까지 증가하였다. YTE 돌연변이들은 또한 75%($t_{1/2} = 8.0$ 일)까지 혈청 반감기의 유의적인 증가를 제시한다. 놀랍게도, 결합될 때, S228P 및 YTE 돌연변이는 상승 작용에 의해(synergistically) 순환 반감기를 더욱 길어지게($t_{1/2} = 13.3$ 일 까지) 하였다. YTE 돌연변이들에 S228P 돌연변이의 추가는 YTE 단독과 비교하여 66%(또는 5.3 일까지)까지 순환 반감기로 증가하였으나, 반면 비-YTE 돌연변이화된 IgG4의 맥락에서 S228P의 반감기 증가는 오직 42%(1.9 일) 증가를 야기하였다. S228P 및 YTE 돌연변이 사이의 상승효과(synergy)가 부재한, 상기 S228P 돌연변이는 비 YTE-돌연변이 hu39D10의 맥락에서 처럼 YTE-돌연변이 hu39D10의 맥락에서 반감기의 동일하거나 감소한 비례적 증가를 야기할 수 있고, YTE 및 S228P 돌연변이 둘 다를 가지는 hu39D10에 대해 11 일보다 더 증가하지 않은 반감기를 생산할 수 있다.

[0341]

이 상승효과 때문에, Fc 불변 기억에서 돌연변이의 증가한 수 때문에 항-약물 면역 반응을 촉진시키는 증가한 가능성에도 불구하고, 항체(또한 Fc 결합 단백질) 기반 약물의 아주 긴 반감기를 얻기 위해서 YTE 및 S228P 돌연변이를 동일 분자 내에서 결합하는 것이 바람직하다고 결론지었다.

- [0342] **실시예 3**
- [0343] 재료 및 방법
- [0344] *huMab195 및 이의 Fc 변이 생성*
- [0345] CD33-결합 항체 huMab195 가변 영역을 암호화하는 DNA 단편은(도 6), PCR-기반의 유전자 어셈블리에 의해 18(중쇄) 및 18(경쇄) 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 공개된 단백질 서열(US 5,693,761)로부터 반대로 변형되었다. 중쇄 및 경쇄 영역 단편들은 그런 다음 천연 IgG4 불변 도메인 서열, 또는 S228P 돌연변이를 포함하는 버전, YTE 돌연변이, 또는 S229P 및 YTE 돌연변이 둘 다를 가지는, huMab195의 IgG4/kappa 버전을 생성하기 위해 이전 섹션(section)에 기재된 인간 IgG4(천연 및 변이) 발현 벡터로 클로닝되었다. 경쇄 서열처럼, S228P 및 YTE 돌연변이 둘 다를 가지는 huMab195 IgG4 중쇄 서열은 도 6에 제시된다.
- [0346]
- [0347] *huMab195 및 변이의 발현 및 정제*
- [0348] huMab195 및 이의 변이를 위한 pTT5 발현 벡터는 실시예 2에 기재하였듯이, 다양한 IgG4 단백질을 생산하기 위해 HEK293 6E 세포로 형질주입되었다. 이러한 단백질들은 그런 다음 실시예 2에서 처럼 단백질 G-아가로스 비즈를 사용하여 정제되었다.
- [0349]
- [0350] *인간 CD33 세포외 도메인의 생성*
- [0350] 인간 CD33 세포외 도메인을 암호화하는 DNA 단편(hCD33 ECD 아미노산 1-258, 리더(leader) 서열을 포함)은 Quickclone 인간 cDNA Library(Clontech, Mountain View, CA)로부터 증폭되었다. 트롬빈(thrombin) 절단 부위(Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser)에 의해 따르는 (His)₆ 태그를 암호화하는 DNA는 이러한 서열을 수반하는 프라이머를 사용하여 PCR로 hCD33 ECD 단편의 3' 끝에 추가되었다. his6-태그된 hCD33 ECD-암호화 DNA 단편은 그런 다음 인간 IgG1 Fc-암호화 DNA 단편에 PCR(hCD33 ECD-Fc)에 의해 결합(ligated) 및 pTT5 발현 벡터로 클로닝되었다. hCD33 ECD-Fc의 단백질 서열은 도 7에 제시된다.
- [0351]
- [0352] *인간 CD33 세포외 도메인의 발현 및 정제*
- [0353] hCD33 ECD-Fc 결합 단백질을 암호화하는 pTT5 발현 벡터는 HEK293 6E 세포로 형질주입되었고, 그런 다음 배양 배지는 분리되고 단백질 G-아가로스 비즈(GE Healthcare Sciences, Piscataway, NY)를 사용하여 친화성 정제를 실시하였다. hCD33 EC를 추출하기 위해, 정제된 결합 단백질은 트롬빈(thrombin, EMD Chemicals, San Diego, CA)을 Fc 부분을 제거하기 위해 처리되었다. 그런 다음, hCD33 ECD는 NiNTA-아가로스(Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 친화성 크로마토그래피(chromatography)에 의해 분리되었다.
- [0354]
- [0355] *PK 연구*
- [0356] 마우스 PK 연구는 Jackson Laboratory - West(Sacramento, CA)에 의해 내재성 FcRn 녹아웃되었지만 인간 FcRn이 녹아웃된(Petkova et al, International Immunology vol. 18, No. 12, pp. 1759-1769에 기재된 4919 Tg276 반접합성 마우스 모델) 마우스를 가지고 실시되었다. 0일 째에, 각 그룹 당 일곱 마리 마우스는 hu39D10 또는 이의 변이(200 ug)를 복강 내(intraperitoneally; IP)에 받았다. 투여 후 2, 12, 24 시간 및 2, 4, 7, 10, 14 일에, 혈장 시료를 준비하기 위해 각 마우스의 혈액을 채취하였다.
- [0357]
- [0358] *혈장 시료에서 huMab195 및 변이를 측정하기 위한 ELISA*
- [0359] 맥시솜 96-웰 플레이트(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY)는 2 ug/ml PBS 용액에서 재조합 hCD33 ECD로 코팅되었다. 웰들은 그런 다음 PBS로 세척되고 수퍼블락 블락킹 용액(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)으로 블락킹되었다. 혈장 시료는 PBS-트윈 20(PBST)으로 1/50 희석되었고 그런 다음 hCD33 ECD-

코팅된 웰로 적재되었다. 동시에, 제조함 huMab195 표준의 알려진 농도는 2% 마우스 혈청(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 포함하는 PBST에 희석되었고 양 측정을 위한 표준 곡선을 생성하기 위해 코팅된 웰로 적재되었다. 상온에서 60 분 인큐베이션한 다음, 웰들은 PBST로 세척되었고 그런 다음 항-인간 카파 단편 HRP-접합체 (conjugate)(Invitrogen, Carlsbad, CA; PBST에서 1/2000 희석)를 추가한 다음 30 분 동안 인큐베이션 하였다. 웰들을 세척한 후, 실시예 2에 기재되었듯이 신호를 발생, 측정 및 분석하였다.

[0360]

[0361]

결과 및 결론

[0362]

도 8에 나타난 바와 같이, S228P 돌연변이를 가진 huMab195의 혈청 반감기($t_{1/2}$ = 2.0 일)는 비변형된 Fc($t_{1/2}$ = 1.6 일)를 가지는 huMab195와 비교하여 26%까지 증가하였다. YTE 돌연변이는 또한 110%($t_{1/2}$ = 3.4 일)까지 혈청 반감기의 유의적인 증가를 보여준다. S228P 및 YTE 돌연변이가 결합되었을 때, 반감기는 더욱 14일로 증가, YTE 변이와 비교하여 312% 증가하였다. 상승효과가 부재한 경우, YTE-함유 huMab195에 S228P 돌연변이의 추가로부터 최대 증가는 26%일 수 있고, 4.3 일의 반감기를 초래하고, 이는 관찰된 14일 보다 훨씬 짧다. 이러한 두 번째 예는 인간 IgG4 항체에 대한 S228P 및 YTE 변형은 인간FcRn을 가진 개체에서 IgG4 항체의 순환 반감기를 증가시키는 효과에 대하여 상승효과가 있다는 관찰이 사실임을 보여주었다. 이러한 상승효과는 증가된 면역원성(immunogenicity)에 대한 잠재성에도 불구하고, 동일한 단백질에 대한 이러한 두 변형의 사용이 타당함을 보여줄 수 있다.

도면

도면1

Sequence of hu39D10 heavy chain variable and constant region

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLSTISNVNWIRQAPGKGLVWGLIWSNGDTD
YNSAIKSRFTISRDTSKSTVYLQMNSLRADTAIVYICAREYYGYFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVEISKYGPCCPSCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTIVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPOVYTLF
PSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPFVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:2)

Sequence of native human IgG4 constant region

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVEISKYGPCCPSCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTIVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPOVYTLF
PSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPFVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:3)

Sequence of modified human IgG4 constant region (S228P) (underline and bold: substituted amino acid residues)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVEISKYGPCC**P**CPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTIVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPOVYTLF
PSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPFVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:4)

Sequence of modified human IgG4 constant region (YTE) (underline and bold: substituted amino acid residues)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVEISKYGPCC**P**CPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTL**Y****T**REPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTIVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPOVYTLF
PSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPFVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:5)

Sequence of modified human IgG4 constant region (S228P + YTE) (underline and bold: substituted amino acid residues)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVEISKYGPCC**P**CPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTL**Y****T**REPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTIVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPOVYTLF
PSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPFVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:6)

Sequence of hu39D10 heavy chain variable domain

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLSTISNVNWIRQAPGKGLVWGLIWSNGDTD
YNSAIKSRFTISRDTSKSTVYLQMNSLRADTAIVYICAREYYGYFDYWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO:7)

Sequence of hu39D10 light chain variable and constant domain (constant domain is underlined)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASEGISYLAHWYQKPKAPKLLIYGANSLOTGV
PSRFSGSGSATDYTLTISSLQPEDFATYYCQSYKFPNTFGQGTKVEVKETVAEPEV
IFPPSDEQLKSGTASVCLINNEFYPRAKVKWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:8)

도면2

Sequence of human FcRn extra cellular domain

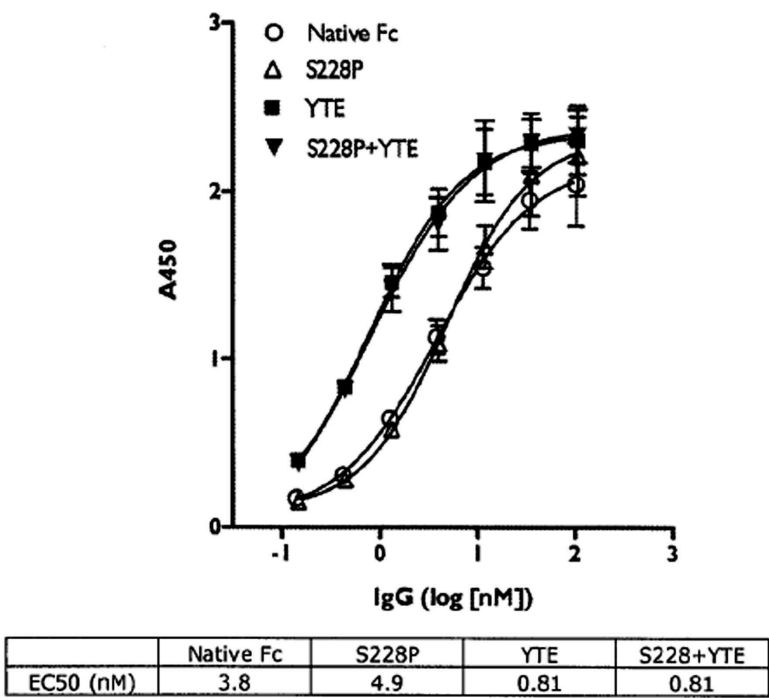
AESHLISLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLSYNSLRGEAEPCGAWVWENQVS
WYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALGCKGPPYTLQGLLGCELGPDNTISVPTAKFALNGEF
FMNFDLKQGTGGDWPEALAIISQRWQQQDKAANKELTFLFSCPHRLREHLERGRGNL
EWKEPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSFYPPELQLRFLRNGLAAGTGQGDGFGPNSDG
SFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVEL (SEQ ID NO:9)

도면3

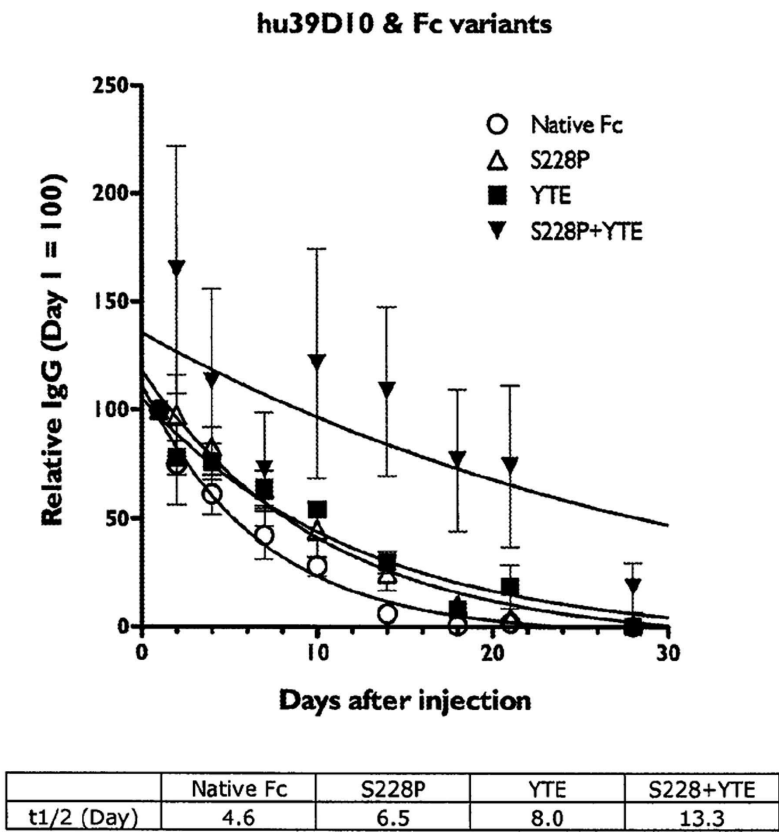
Sequence of human β 2-microglobulin mature domain

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSK
DWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:10)

도면4



도면5



도면6

Sequence of huMab195 heavy chain variable and IgG4 version of constant region with S228P and YTE mutations

(bold and underline: substituted amino acid residues)

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGT
GYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDYAVYYCARGRPAMDYWGQGTILVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDYLYITREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLTP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:11)

Sequence of huMab195 light chain variable and constant domains

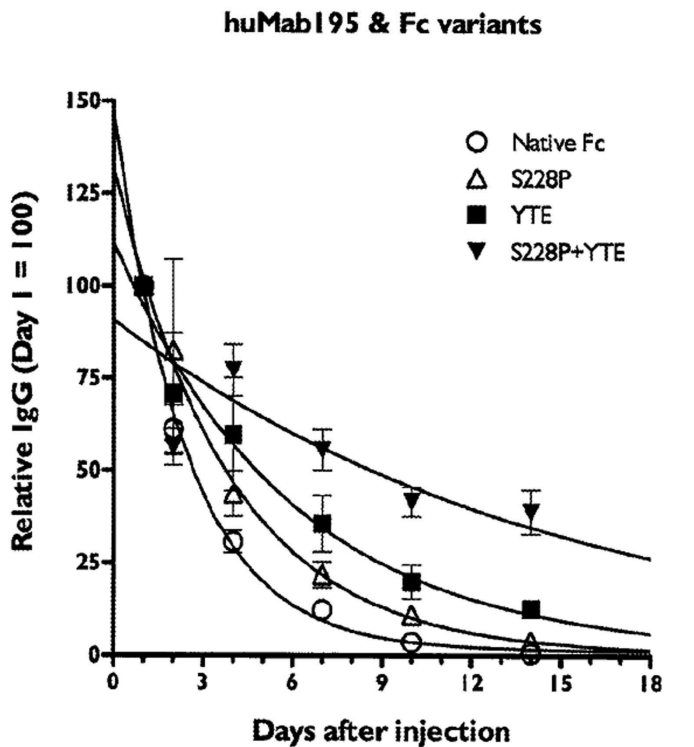
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQ
GSGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPDFFATYYCQQSKKEVPWTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:12)

도면7

Sequence of human CD33 extra cellular domain-Fc fusion

MDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYDKNSPVHGWFREGAIIISRDSPVA
TNKLDQEVQEETQGRFLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMRGSGTKYSYKSP
QLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHKNLTCSVSWACEQGTPIFSWLSAAPTSLGPR
TTHSSVLIITPRQDHGTNLTCQVKFAGAGVTERTIQLNVITYVPQNPTTGIFPGDGS
GKQETRAGVVAGHHHHHLVPRGSTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVME
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

도면8



	Native Fc	S228P	YTE	S228+YTE
t1/2 (Day)	1.6	2.0	3.4	14.1

도면9

Sequence of hinge-Fc portion of native human IgG4 heavy chain

CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLHQLNGLSKPKVSNKGLPSSIEKTIKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID
NO:15)

Sequence of hinge-Fc portion of human IgG4 heavy chain with S228P and YTE mutations and lacking the C-terminal lysine

(bold and underline: substituted amino acid residues)

CP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLHQLNGLSKPKVSNKGLPSSIEKTIKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID
NO:14)

서열 목록

- <110> Cephalon Australia Pty Ltd
- <120> Modified antibody with improved half life
- <130> 13fpi-07-003
- <150> US 61/425858

<151> 2010-12-22

<160> 15

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Cys Pro Ser Cys Pro

1 5

<210> 2

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of hu39D10 heavy chain variable and constant region

<400> 2

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 Val Ser Gly Leu Ser Leu Thr Ser Asn

20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

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

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

435 440

<210> 3

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

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

 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 4
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sequence of modified human IgG4 constant retion

<400> 4
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr

 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

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

 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325
 <210> 5
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sequence of modified human IgG4 constant region
 <400> 5
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
 65 70 75 80

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of modified human IgG4 constant region

<400> 6

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

1	5	10	15
Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr			
65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
	100	105	110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
	115	120	125
Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
	130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
145	150	155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
	165	170	175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
	180	185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
	195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
	210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
225	230	235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
	245	250	255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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 Val Ser Gly Leu Ser Leu Thr Ser Asn
20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Leu Ile Trp Ser Asn Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Ile Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sequence of hu39D10 heavy chain variable domain
 <400> 8
 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 Leu Ala Ser Glu Gly Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Lys Phe Pro Asn
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 9

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys

35 40 45

Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu

50 55 60

Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys

65 70 75 80

Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys

85 90 95

Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu

100 105 110

Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly

115 120 125

Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln

130 135 140

Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro

145 150 155 160

His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp

165 170 175

Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly

180 185 190

Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu

195 200 205

Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
 210 215 220
 Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His

245 250 255
 Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu

260 265

<210> 10

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of human beta-2 microglobulin mature domain

<400> 10

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu

1 5 10 15

Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro

20 25 30

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys

35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu

50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys

65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp

85 90 95

Arg Asp Met

<210> 11

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of huMab195 heavy chain variable and IgG4 modified

constant and hinge region

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro

210 215 220

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

225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

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

 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu

 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 12

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of huMab195 light chain variable and constant domains

<400> 12

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

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

145	150	155	160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
165	170	175	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
180	185	190	
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
195	200	205	
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		

<210> 13

<211> 481

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of human CD33 extracellular domain Fc fusion

<400> 13

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

1 5 10 15

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

20 25 30

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

35 40 45

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln

50 55 60

Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro

65 70 75 80

Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp

85 90 95

Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser

100 105 110

Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg

115 120 125

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

130 135 140

Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile

145 150 155 160

Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr

165 170 175

His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr

180 185 190

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

195 200 205

Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr

210 215 220

Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly
 225 230 235 240
 Val Val Ala Gly His His His His His His Leu Val Pro Arg Gly Ser
 245 250 255
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

 260 265 270
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 275 280 285
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 290 295 300
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 305 310 315 320
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 325 330 335

 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 340 345 350
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 355 360 365
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 370 375 380
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 385 390 395 400
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

 405 410 415
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 420 425 430
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 435 440 445
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 450 455 460
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

465 470 475 480

Lys

<210> 14

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of hinge-Fc portion of human IgG4 heavy chain with S228P
and YTE mutations and lacking the C-terminal lysine

<400> 14

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

1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro

20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu 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 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

180 185 190
Gln Glu 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 Leu Gly

210 215 220

<210> 15

<211> 222

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val

35 40 45
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

50 55 60
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu 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 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

180

185

190

Gln Glu 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 Leu Gly Lys

210

215

220