

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0027055 (43) 공개일자 2012년03월20일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 16/06 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-7001344 (22) 출원일자(국제) 2010년06월25일 심사청구일자 2012년02월03일 (85) 번역문제출일자 2012년01월17일 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/040028 (87) 국제공개번호 WO 2010/151792 국제공개일자 2010년12월29일 (30) 우선권주장 61/220,687 2009년06월26일 미국(US)		(71) 출원인 리제네론 파라마슈티칼스 인코포레이티드 미합중국, 뉴욕주 10591, 타리타운, 올드 소우 밀 리버 로드 777 (72) 발명자 데이비스 사무엘 미국 뉴욕 10024 뉴욕 아파트먼트 비2 웨스트 88 스트리트 332 스미스 에릭 미국 뉴욕 10016 뉴욕 아파트먼트 4이 렉싱턴 애 비뉴 310 (뒷면에 계속) (74) 대리인 송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 천연 면역글로블린 포맷을 가지는 용이하게 분리된 이중특이성 항체

(57) 요약

CH3 도메인에서 다르게 변형된 면역글로블린 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 다른 변형은 CH3 변형에 대해 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이고, 변형 중 적어도 하나는 단백질 A와 같은 친화성 시약에 대해 이중특이성 항체에 대한 다른 친화도를 초래하고, 이중특이성 항체는 분열된 세포, 배지, 또는 단백질 A에 대한 친화도를 기반으로 한 항체들의 혼합물로부터 분리할 수 있는, 각각의 분리를 제공하는 이중특이성 항체가 제공된다.

(72) 발명자

맥도날드 더글라스

미국 뉴욕 10023 뉴욕 아파트먼트 10씨 웨스트 엔드 애비뉴 260

울슨 카라 루이즈

미국 뉴욕 10605 화이트 플레인 #4이-이 브라이언트 애비뉴 90

특허청구의 범위

청구항 1

- a. N-말단 내지 C-말단, 제1 에피토프에 선택적으로 결합하는 제1 에피토프-결합 영역, IgG1, IgG2 및 IgG4로부터 선택되는 인간 IgG의 제1 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 불변 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및
- b. N-말단 내지 C-말단, 제2 에피토프에 선택적으로 결합하는 제2 에피토프-결합 영역, IgG1, IgG2, 및 IgG4로부터 선택되는 인간 IgG의 제2 CH3 영역을 포함하며, 제2 CH3 영역은 단백질 A에 제2 CH3 도메인의 결합을 감소 또는 제거하는 변형을 포함하는 제2 폴리펩티드
- 를 포함하는 헤테로다имер 이중특이성 항원-결합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 인간 IgG 중쇄인 것을 특징으로 하는 이중특이성 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 면역글로불린 경쇄를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 면역글로불린 경쇄는 인간 면역글로불린 경쇄인 것을 특징으로 하는 이중특이성 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 각각의 인간 IgG1 중쇄인 것을 특징으로 하는 이중특이성 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 변형은 IMGT 엑손 넘버링 시스템에서 (a) 95R, 및 (b) 95R 및 96F, 또는 EU 넘버링 시스템에서 (a') 435R, 및 (b') 435R 및 436F로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 이중특이성 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, IMGT 엑손 넘버링 시스템에서 16E, 18M, 44S, 52N, 57M, 및 82I, 또는 EU 넘버링 시스템에서 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 및 422I로 구성되는 군으로부터 선택되는 1 내지 5개의 변형을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 단백질.

청구항 8

제6항에 있어서, 이중특이성 항체의 CH3 도메인은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성인 것을 특징으로 하는 이중특이성 단백질.

청구항 9

제7항에 있어서, 이중특이성 항체의 CH3 도메인은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성인 것을 특징으로 하는 이중특이성 단백질.

청구항 10

- 제1 에피토프를 인식하는 제1 가변 도메인을 포함하는 제1 면역글로불린 중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 얻는 단계로서, 제1 면역글로불린 중쇄는 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 이소형 불변 도메인을 포함하는 것인 단계,
- b. 제2 에피토프를 인식하는 제2 가변 도메인을 포함하는 제2 면역글로불린 중쇄를 암호화하는 제2 핵산 서열을 얻는 단계로서, 제2 면역글로불린 중쇄는 단백질 A에 결합을 근절 또는 감소시키는 CH3 도메인에서 변형을 포함하는 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 이소형 불변 도메인을 포함하는 것인 단계;
- c. 제1 및 제2 면역글로불린 중쇄와 짝짓는 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 제3 핵산 서열을 얻는 단계;
- d. 제1, 제2 및 제3 핵산 서열을 포유동물 세포에 도입하는 단계;

- e. 세포를 이중특이성 항체로 발현시키는 단계; 및
- f. 단백질 A와 결합하는 이중특이성 항체의 능력을 기반으로 이중특이성 항체를 분리하는 단계를 포함하는 이중특이성 항체의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 변형은 IMGT 엑손 넘버링 시스템에서 (a) 95R, 및 (b) 95R 및 96F, 또는 EU 넘버링 시스템에서 (a') 435R, 및 (b') 435R 및 436F로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, IMGT 엑손 넘버링 시스템에서 16E, 18M, 44S, 52N, 57M, 및 82I, 또는 EU 넘버링 시스템에서 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 및 422I로 구성되는 군으로부터 선택되는 1 내지 5개의 변형을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 이중특이성 항체의 CH3 도메인은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 이중특이성 항체의 CH3 도메인은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 이중특이성 항체는 단백질 A를 포함하는 고체 지지체 상에서 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 고체 지지체는 단백질 A 친화성 컬럼을 포함하고, 이중특이성 항체는 pH 구배를 사용하여 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, pH 구배는 pH 3과 pH 5 사이에서 하나 이상의 pH 단계를 포함하는 단계 구배인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

파쇄된 세포 또는 항체들의 혼합물로부터 다르게 변형된 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 CH3 도메인을 가지는 이중특이성 항체를 분리하는 단계를 포함하며, 다르게 변형된 CH3 도메인은 인간에서 비-면역원성이거나 또는 실질적으로 비-면역원성이고, 변형은 모노머가 단백질 A에 대해 다른 친화도를 가지는 헤테로다이머 중쇄 불변 영역이 있는 이중특이성 항체를 초래하고, 이중특이성 항체는 단백질 A에 대한 친화도에 기반하여 파쇄된 세포 또는 혼합물로부터 분리되는, 이중특이성 항체를 분리하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 헤테로다이머 중쇄 불변 영역의 한 모노머는 인간 IgG1이고, 헤테로다이머 중쇄 불변 영역의 다른 모노머는 IMGT 엑손 넘버링 시스템에서 (a) H95R, 및 (b) H95R 및 Y96F, 또는 EU 넘버링 시스템에서 (a') H435R, 및 (b') H435R 및 Y436F로 구성되는 군으로부터 선택되는 변형을 포함하는 변형된 인간 IgG1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 변형된 인간 IgG1은 IMGT 엑손 넘버링 시스템에서 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, 및 V82I, 또는 EU 넘버링 시스템에서 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, 및 V422I로 구성되는 군으로부터 선택되는 변

형을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 중쇄, 즉, 적어도 하나의 아미노산에 의해 차이가 생기는 2개의 면역글로불린 중쇄의 헤테로다имер를 가지며, 면역글로불린 중쇄와 변형 또는 돌연변이된 면역글로불린의 다른 친화도를 기반으로 친화성 시약에 대해 항원-결합 단백질을 분리시키는 항원-결합 단백질 또는 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단백질 A에 IgG 영역의 다른 결합으로써 빨리 분리시키는, 단백질 A에 대해 다른 친화도를 가지는 IgG CH2 및 CH3 영역을 가지는 항원-결합 단백질(이중특이성 항체를 포함)에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 항체들은 표적 항원에 대해 독특한 결합 특이성뿐만 아니라 항원-의존적인 메커니즘을 통해 면역계와 상호작용하는 능력을 전달하는 다기능성 분자이다. 암에 대해 현재 사용되는 다수의 생물학적 치료제는 표적 암 세포에서 일반적으로 과발현된 항원에 대해 지시된 단클론성 항체들이다. 이러한 항체들이 종양 세포들에 결합할 때, 그것들은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 촉발시킨다. 불행하게도, 암 세포들은 종종 이 정상 면역 반응을 억제하는 메커니즘을 발현시킨다.
- [0003] 최근에, 하나 이상의 항원 결합 특이성, 예를 들어, 이중특이성 항체를 가지는 항체-유사 치료제를 개발하기 위한 노력이 진행 중이다. 암 치료의 경우에, 다중-특이적 포맷은, 예를 들어 분자를 종양 세포 항원에 대해 표적화하는 하나의 특이성, 면역계에서 정상적으로 이용가능하지 않은 반응을 촉발시키는 다른 특이성을 사용하는 가능성을 허용할 수 있었다. 또한 이중특이성 항체가 2개의 구성요소에 결합하고 합쳐질 때, 그것의 천연 리간드에 의해 정상적으로 활성화된 2-구성요소 헤테로다имер 수용체 시스템에 대한 대리 리간드로서 용도를 발견할 수 있다.
- [0004] 수많은 포맷들이 다중 결합 특이성을 가지는 분자들에 의해 얻어진 치료 기회들을 다루는 기술분야에서 개발되었다. 이상적으로, 이러한 분자들은 바람직한 생체내 특성, 예를 들어, 의도된 목적에 대해 적절한 약물동태학, 최소의 면역원성, 및 원한다면 통상적인 항체의 이펙터 작용을 만들고, 정제하고 소유하는데 용이한 제대로 거동하는 단백질이어야 한다.
- [0005] 이중특이성 항체(단일 세포에서 2개의 별개의 항체들을 발현시킴)를 만드는 가장 간단한 방법은, 각각의 중쇄가 호모- 및 헤테로다имер 둘 다를 형성하기 때문에 다수의 종이 생기게 하는 것이지만, 단지 헤테로다имер만 요망된다. 또한, 경쇄와 중쇄는 부적합하게 짝지을 수 있다. 이 문제들을 다른 방법으로 처리하도록 시도하는 포맷의 몇몇 예가 하기에서 설명된다.
- [0006] 이중특이성 T 세포 인게이지(Bispecific T cell Engager, BiTE) 분자에 대해 사용된 한 포맷(예를 들어, Wolf, E. et al. (2005) Drug Discovery Today 10:1237-1244) 참조)은 단일 사슬 가변 단편(scFv) 모듈을 기반으로 한다. 유연한 링커를 통해 융합된 항체의 경쇄와 중쇄 가변 영역을 구성하는 scFv는 일반적으로 적절하게 접힐 수 있고, 따라서 영역들은 동족항원을 결합할 수 있다. BiTE는 단일 사슬 상에서 세로 일렬로 다른 특이성의 두 scFv를 연결한다(도 1A 참조). 이 배치는 동일한 중쇄 가변 영역의 2 복제물을 가지는 분자의 생성을 방해한다. 게다가, 링커 배치는 각각의 경쇄 및 중쇄의 정확한 짝지음을 보장하도록 설계된다.
- [0007] BiTE 포맷은 몇몇 단점을 가진다. 우선, scFv 분자들은 덩어리화하는 경향으로 악명 높다. 그리고 평판에 의하면 scFv 링커의 면역원성이 낮지만, BiTE에 대해 항체를 생성하는 가능성이 제외될 수 없다. BiTE 포맷에서 Fc 부분의 부재는 또한 그것의 혈청 반감기를 매우 짧게 만들고, 이것은 빈번한 반복 투여 또는 펌프를 통한 지속적인 주입의 복잡화를 필요로 한다. 최종적으로, Fc의 부재는 또한 Fc-매개 이펙터 기능이 없음을 암시하는데, 이것은 일부 상황에서 유리할 수 있다.
- [0008] 제2 포맷(도 1B)은 마우스와 래트 단클론성 항체의 혼성체이고, 통상적인 단백질 A 친화도 크로마토그래피의 변형에 의존한다(예를 들어, Lindhofer, H. et al. (1995) J. Immunol. 155:219-225) 참조). 이 포맷에서, 마우스 IgG2a 및 래트 IgG2b 항체는 동일 세포 중에서 함께 만들어진(예를 들어, 두 하이브리도마의 항체생산융합 세포(quadroma)로서, 또는 유전자 조작된(engineered) CHO 세포에서). 각 항체의 경쇄가 바람직하게는 그것의 동일계통 종류의 중쇄와 결합되기 때문에, 항체의 단지 3개의 별개의 종: 2개의 모 항체, 및 Fc 부분을 통해 결

합하는 각각 하나의 중쇄/경쇄 쌍을 포함하는 두 항체들의 헤테로다имер가 조립될 수 있다. 원하는 헤테로다имер은 이 혼합물로부터 용이하게 정제될 수 있는데, 단백질 A에서 그것의 결합 특성이 모 항체의 특성과 다르기 때문이다: 래트 IgG2b는 단백질 A에 결합하지 않는 반면, 마우스 IgG2a는 결합한다. 결과적으로, 마우스-래트 헤테로다имер은 단백질 A에 결합하지만, 마우스 IgG2a 호모다имер보다 더 높은 pH에서 용리하고, 이는 이중특이성 헤테로다имер의 선택적인 정제를 가능하게 한다. BiTE 포맷과 같이, 이 혼성체 포맷은 2개의 1가 항원 결합 자리를 가진다.

[0009] 마우스/래트 혼성체의 단점은 그것이 비-인간이라는 점인데, 그것은 해로운 부작용을 가지고(예를 들어, "HAMA" 또는 "HARA" 반응), 및/또는 치료제를 중화할 수 있는 면역 반응을 환자에게서 유발할 가능성이 있다.

[0010] "노브-인투-홀(knobs-into-holes)" (도 1C)로서 언급되는 제3 포맷은 이중특이성 항체의 생성에 잠재적으로 유용한 선행기술로서 논의되었다(미국 특허 번호 7,183,076). 이 전략에서, 2 항체들의 Fc 부분은 유전자 조작되어 하나의 돌출된 "노브(knob)"를 제공하고, 나머지는 상보적인 "홀(hole)"을 제공한다. 동일 세포에서 만들어진 때, 유전자조작된 "노브"와 유전자조작된 "홀"의 결합에 의해 중쇄는 호모다имер보다 헤테로다имер을 우선적으로 형성하는 것으로 언급된다. 정확한 경-중쇄 짝지움의 문제는 다른 특이성을 가지지만 동일한 경쇄를 사용하는 항체들을 선택함으로써 처리된다.

[0011] 이 포맷의 단점은 "노브-인투-홀" 전략이 상당한 양의 원치않는 호모다имер의 생성을 초래할 수 있고, 따라서 추가 정제 단계를 필요로 한다는 것이다. 이 어려움은 오염 종들이 다수의 그것의 특성들에서 요망되는 종들과 거의 동일하다는 사실에 의해 악화된다. 유전자 조작된 형태는 또한 잠재적으로 면역원성일 수 있는데, "노브" 및 "홀"을 만드는 돌연변이가 외래 서열을 도입하기 때문이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 특히 치료 용도를 위해 상기 언급된 단점들의 일부 또는 모두를 최소화하는 이중특이성 항체 포맷에 대한 필요가 남아있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 이중특이성 항원-결합 단백질에서 적어도 하나의 아미노산에 의해 차이가 생기는 2개의 면역글로불린 CH3 중쇄 불변 영역 서열을 사용하는 것을 적어도 부분적으로 기반으로 한다. 적어도 하나의 아미노산 차이는 단백질을 분리하는 개선된 능력을 초래하는데, 차이가 친화성 약제에 결합하는 CH3 도메인 서열의 다른 능력을 야기하기 때문이다.

[0014] 한 양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 단백질이 제공되며, 제1 폴리펩티드는 N-말단 내지 C-말단, 제1 항원에 선택적으로 결합하는 제1 항원-결합 영역, 그 다음에 IgG1 (SEQ ID NO:1), IgG2 (SEQ ID NO:3), IgG4 (SEQ ID NO:5), 및 그것의 조합으로부터 선택된 인간 IgG의 제1 CH3 영역을 포함하는 불변 영역을 포함하고; 제2 폴리펩티드는 N-말단 내지 C-말단, 제2 항원에 선택적으로 결합하는 제2 항원-결합 영역, 그 다음에 IgG1, IgG2, IgG4, 및 그것의 조합으로부터 선택되는 인간 IgG의 제2 CH3 영역을 포함하며, 제2 CH3 영역은 단백질 A에서 제2 CH3 도메인의 결합을 감소 또는 제거하는 변형을 포함한다.

[0015] 한 구체예에서, 제2 CH3 영역은 95R 변형(IMG T 엑손 넘버링에 의해; EU 넘버링에 의해 435R)을 포함한다. 다른 구체예에서, 제2 CH3 영역은 96F 변형(IMG T; EU에 의해 436F)을 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 제2 CH3 영역은 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, 및 SEQ ID NO:6으로부터 선택된다.

[0016] 한 구체예에서, 제2 CH3 영역은 변형은 인간 IgG1 (SEQ ID NO:2)로부터 나오고, D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, 및 V82I (IMG T; EU에 의해 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, 및 V422I)로 구성되는 군으로부터 선택되는 변형을 추가로 포함한다.

[0017] 한 구체예에서, 제2 CH3 영역은 변형된 인간 IgG2 (SEQ ID NO:4)로부터 나오고, N44S, K52N, 및 V82I(EU에 의해 IMG T; N384S, K392N, 및 V422I)로 구성되는 군으로부터 선택되는 변형을 추가로 포함한다.

[0018] 한 구체예에서, 제2 CH3 영역은 변형된 인간 IgG4 (SEQ ID NO:6)으로부터 나오고, Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, 및 V82I (EU에 의해 IMG T; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, 및 V422I)로 구성되는 군으로부터 선택되는 변형을 추가로 포함한다.

- [0019] 한 구체예에서, CH3 도메인은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 및 인간 IgG4 중 2이상의 서열을 포함하는 키메라 도메인이다.
- [0020] 한 구체예에서 CH3 도메인은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 또는 인간 IgG4으로부터 나오고, 항원-결합 단백질은 CH1 도메인 및 CH2 도메인을 추가로 포함하며, CH1 도메인 및 CH2 도메인은 인간 IgG1 CH1 또는 CH2 도메인, 인간 IgG2 CH1 또는 CH2 도메인, 또는 키메라 인간/인간 IgG1/IgG2 또는 키메라 인간/인간 IgG1/IgG3 또는 키메라 인간/인간 IgG2/IgG3 도메인 또는 키메라 인간/인간 IgG1/IgG4 또는 키메라 IgG3/IgG4 또는 키메라 IgG2/IgG4 도메인으로 구성되는 군으로부터 독립적으로 선택된다. 특정 구체예에서, 키메라 IgG1/IgG2, IgG1/IgG3, IgG2/IgG3, IgG1/IgG4, IgG3/IgG4, 및 IgG2/IgG4 도메인은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이다.
- [0021] 한 구체예에서, 항원-결합 단백질은 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함한다. 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄는 인간 람다 및 인간 카파 경쇄로부터 선택된다.
- [0022] 한 구체예에서, 제1 및 제2 항원-결합 영역 각각은 적어도 하나의 CDR(complementarity determining region)을 포함하고, 다른 구체예에서, 적어도 2개의 CDR 각각은 3개의 CDR을 포함한다. 특정 구체예에서, CDR은 면역글로불린 중쇄로부터 나온다. 다른 특정 구체예에서, 중쇄는 인간 중쇄이다.
- [0023] 한 구체예에서, 제1 항원-결합 영역은 제1 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 제2 항원-결합 영역은 제2 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0024] 한 구체예에서, 제1 및 제2 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 유인원 및 인간 도메인으로부터 독립적으로 선택된다.
- [0025] 한 구체예에서, 제1 및 제2 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 인간 CDR, 마우스 CDR, 래트 CDR, 토끼 CDR, 원숭이 CDR, 유인원 CDR, 및 인간화된 CDR을 독립적으로 포함한다. 한 구체예에서, CDR은 인간이고, 체세포 돌연변이된다.
- [0026] 한 구체예에서, 제1 및 제2 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 인간 골격 영역(FR)을 포함한다. 한 구체예에서, 인간 FR은 체세포 돌연변이된 인간 FR이다.
- [0027] 한 구체예에서, 제1 및/또는 제2 항원-결합 영역은 관심의 항원에 대해 각각 항체 가변 영역을 포함하는 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻어진다. 다른 구체예에서, 제1 및/또는 제2 항원-결합 영역은 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 또는 유인원과 같은 비-인간 동물을 관심의 항원으로 면역화하고, 관심의 항원에 대해 특이적인 가변 영역을 암호화하는 항체 가변 영역 핵산 서열을 확인함으로써 얻어진다. 특정 구체예에서, 비-인간 동물은 하나 이상의 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 하나 이상의 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자는 내인성 면역글로불린 좌위에서 치환체로서, 또는 비-인간 동물의 게놈으로 무작위로 통합된 전이유전자(transgene)로서 비-인간 동물 염색체 외에서 존재한다. 한 구체예에서, 제1 및/또는 제2 항원-결합 영역은 하이브리도마 또는 항체생산융합세포로부터 얻어지고, 다른 구체예에서, 세포 선별(cell sorting)을 사용하여 면역화된 비-인간 동물의 면역 세포를 스크리닝하는 것으로부터 얻어진다.
- [0028] 한 구체예에서, 항원-결합 단백질은 이중특이성 항체이다. 한 구체예에서, 이중특이성 항체는 완전한 인간 이중특이성 항체이고, 독립적으로 마이크로몰, 나노몰, 또는 피코몰 범위에서 각 에피토프에 대한 친화도를 가진다.
- [0029] 한 구체예에서, 항원-결합 단백질은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이다. 특정 구체예에서, 항원-결합 단백질은 비-천연 인간 T-세포 에피토프가 없다. 한 구체예에서, CH3 영역의 변형은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이다. 특정 구체예에서, CH3 영역의 변형은 비-천연 인간 T-세포 에피토프를 초래하지 않는다.
- [0030] 한 구체예에서, 항원-결합 단백질은 중쇄를 포함하며, 중쇄는 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이다. 한 구체예에서, 중쇄는 비-천연 T-세포 에피토프를 함유하지 않는 아미노산 서열을 가진다. 한 구체예에서, 중쇄는 아미노산 서열을 포함하는데, 이것의 단백질 분해는 인간에서 면역원성인 약 9개의 아미노산의 아미노산 서열을 형성할 수 없다. 특정 구체예에서, 인간은 항원-결합 단백질로 처리된 인간이다. 한 구체예에서, 중쇄는 아미노산 서열을 포함하는데, 이것의 단백질 분해는 인간에서 면역원성인 약 13 내지 약 17개의 아미노산의 아미노산 서열을 형성할 수 없다. 특정 구체예에서, 인간은 항원-결합 단백질로 처리된 인간이다.
- [0031] 한 양태에서, 본원에서 설명되는 바와 같은 CH2 및/또는 CH3를 포함하는 이중특이성 결합 단백질이 제공되며, 이중특이성 결합 단백질은 B 세포 상에서 항원을 특이적으로 인식하는 제1 결합 모이어티, 및 T 세포 상에서 항

원을 특이적으로 인식하는 제2 결합 모이어티를 포함한다.

- [0032] 한 구체예에서, 결합 단백질은 이중특이성 항체이다. 특정 구체예에서, 이중특이성 항체는 인간 IgG1 중쇄 및 인간 IgG1 Δ Adp 중쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 제1 결합 모이어티는 CD20을 특이적으로 인식하는 인간 중쇄 가변 도메인이다. 한 구체예에서, 제2 결합 모이어티는 CD3를 특이적으로 인식하는 인간 중쇄 가변 도메인이다. 한 구체예에서, 이중특이성 항체는 약 $2.8-3.2 \times 10^{-12}$ M, 또는 약 $2.8-3.0 \times 10^{-12}$ M의 Raji 사멸 분석에서 EC50을 나타내고, 방관자 세포 사멸 분석에서 단지 약 1-10%, 또는 1-5%의 방관자 사멸을 나타내며, 방관자 세포는 CD20 에피토프를 포함하지 않는다. 특정 구체예에서, 방관자 세포는 293 세포이다. 다른 특정 구체예에서, 분석에서 방관자 세포 사멸은 약 10^{-8} M 내지 약 10^{-14} M의 이중특이성 항체의 농도에 걸쳐 측정된다.
- [0033] 한 양태에서, 이중특이성 항체를 만드는 방법이 제공되며, 다음을 포함한다: 제1 에피토프를 인식하는 제1 가변 도메인을 포함하는 제1 면역글로불린 중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 얻는 단계, 제1 면역글로불린 중쇄는 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 이소형 불변 도메인, 또는 그것의 키메라 이소형 불변 도메인을 포함한다; 제2 에피토프를 인식하는 제2 가변 도메인을 포함하는 제2 면역글로불린 중쇄를 암호화하는 제2 핵산 서열을 얻는 단계, 제2 면역글로불린 중쇄는 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 이소형 불변 도메인, 또는 그것의 키메라 이소형 불변 도메인을 포함하며, 단백질 A에 결합을 근절 또는 감소시키는 그것의 CH3 도메인의 변형을 포함한다; 제1 및 제2 면역글로불린 중쇄와 짝짓는 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 제3 핵산 서열을 얻는 단계; 제1, 제2 및 제3 핵산 서열을 포유동물 세포에 도입하는 단계; 세포를 면역글로불린으로 발현시키는 단계, 및 단백질 A를 사용하여 면역글로불린을 분리하는 단계.
- [0034] 한 구체예에서, 세포는 바이러스 핵산 서열을 발현시키는 CHO, COS, 293, HeLa, 및 망막세포로부터 선택된다(예를 들어, PERC.6TM 세포).
- [0035] 한 양태에서, 이중특이성 항원-결합 단백질은 항원에 결합하는 제1 특이성 및 수용체를 활성화하는 제2 특이성을 포함하여 제공되며, 이중특이성 항원-결합 단백질은 단백질 A-결합 결정소를 포함하는 제1 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 CH3 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 단백질 A-결합 결정소가 없는 제2 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함한다.
- [0036] 한 구체예에서, 제2 특이성은 수용체가 물, 밀리몰, 마이크로몰, 나노몰, 또는 피코몰 범위에 있는 K_D 를 가지는 수용체와 결합하는 것을 활성화한다.
- [0037] 한 구체예에서, 제2 특이성은 G-단백질 커플링된 수용체, 수용체 티로신 키나아제, 인테그린, 및 톨-유사 수용체(toll-like receptor)로부터 선택되는 수용체에 결합한다.
- [0038] 한 구체예에서, 제2 특이성은 수용체와 접촉하고, 세린, 트레오닌, 또는 티로신의 포스포릴화를 책임지는 그것과 물리적으로 결합된 수용체 또는 서브유닛 또는 단백질을 야기하고; 뉴클레오티드의 고리화(예를 들어, cAMP, cADP, 또는 cGMP)를 야기하고; 포스포타이딘이노시톨 또는 그것의 유도체(예를 들어, IP3 또는 PIP3)의 생성을 야기하고; 지질 제2 메신저(예를 들어, 디아실글리세롤, 세라마이드, 리소포스파티드산, 에이코사노이드)의 생성을 야기하고; 탈인산화를 야기하고(예를 들어, 포스포타아제 활성); 지질의 인산화를 야기하여 제2 메신저를 형성하고; 제2 메신저의 가수분해를 야기하고; 단백질 분해를 야기하고; 산화환원 신호전달을 야기하고; 세포소기관(예를 들어, 핵)에 단백질의 전좌를 야기하고; (그 자체로) 응집하여 호모-를 형성하거나 또는 (다른 수용체와 함께) 응집하여 헤테로멀티머를 형성하는 수용체를 야기하고; 또는 막관통 채널의 열림 또는 닫힘을 야기한다.
- [0039] 한 양태에서, 이중특이성 항체를 만드는 방법이 제공되며, 하기를 포함한다: 항체생산융합세포로부터 관심의 이중특이성 항체를 분리하는 단계, 관심의 이중특이성 항체는 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 이소형인 제1 중쇄, 단백질 A에 결합을 근절 또는 감소시키는 그것의 CH3 도메인에서 변형을 포함하는 불변 도메인을 가지는 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 이소형인 제2 중쇄를 포함하며, 관심의 이중특이성 항체는 단백질 A를 사용하여 분리된다.
- [0040] 한 양태에서, 이중특이성 항체를 만드는 방법이 제공되며, 과쇄된 세포 또는 항체들의 혼합물로부터 다르게 변형된 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 CH3 도메인을 가지는 이중특이성 항체를 분리하는 단계를 포함하고, 다르게 변형된 CH3 도메인은 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이고, 변형은 모노머가 단백질 A에 대해 다른 친화도를 가지는 헤테로다имер 중쇄가 있는 이중특이성 항체를 초래하고, 이중특이성 항체는 단백질 A를 사용하여 과쇄된 세포 또는 혼합물로부터 분리된다.
- [0041] 한 구체예에서, 이중특이성 항체는 단백질 A 친화성 지지체를 사용하여 분리되며, 이중특이성 항체는 약 3.9 내

지 약 4.4, 약 4.0 내지 약 4.3, 약 4.1 내지 약 4.2, 또는 약 pH 4.2의 pH에서 용리한다. 한 구체예에서, 이 중특이성 항체는 약 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 또는 4.5의 pH에서 용리한다.

[0042] 한 구체예에서, 이중특이성 항체는 단백질 A 친화성 지지체 및 pH 구배 또는 단계를 사용하여 분리되며, pH 구배 또는 단계는 이온 변경제를 포함한다. 특정 구체예에서, 이온 변경제는 약 0.5 내지 약 1.0 몰의 농도에서 존재한다. 특정 구체예에서, 이온 변경제는 염이다. 한 구체예에서, 이온 변경제는 아세트산베틸륨, 아세트산리튬, 아세트산나트륨, 및 아세트산칼륨; 탄산수소나트륨 및 탄산수소칼륨; 탄산리튬, 탄산나트륨, 탄산칼륨 및 탄산세슘; 염화리튬, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화세슘, 및 염화마그네슘; 플루오르화나트륨 및 플루오르화칼륨; 질산나트륨, 질산칼륨 및 질산칼슘; 인산나트륨 및 인산칼륨; 및 황산칼슘 및 황산마그네슘으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 이온 변경제는 알칼리금속 또는 알칼리토금속의 할로겐화물 염이다. 특정 구체예에서, 이온 변경제는 염화나트륨이다.

[0043] 한 양태에서, 결합 단백질을 Fc를 포함하며, Fc는 본원에서 설명되는 바와 같이 변형되는 제1 CH3 도메인 및 비변형 제2 CH3를 포함하여, 헤테로다имер Fc를 형성하고, 다른 변형은 다른 변형이 없는 대응하는 결합 단백질보다 더 높은 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.3, 또는 1.4 pH 단위(들)에서 단백질 A 친화성 물질로부터 용리하는 결합 단백질을 초래한다.

[0044] 한 구체예에서, 다르게 변형하는 결합 단백질은 약 4.2의 pH에서 용리하는 반면, 비변형 결합 단백질은 약 3의 pH에서 용리한다. 한 구체예에서, 다르게 변형된 결합 단백질은 약 4.5의 pH에서 용리하는 반면, 비변형 결합 단백질은 약 3.5의 pH에서 용리한다. 한 구체예에서, 다르게 변형된 결합 단백질은 약 4의 pH에서 용리하는 반면, 변형된 결합 단백질은 약 2.8-3.5, 2.8-3.2, 또는 2.8-3의 pH에서 용리한다. 한 구체예에서, 다르게 변형된 결합 단백질은 약 4.2의 pH에서 용리하는 반면, 비변형 결합 단백질은 약 2.8의 pH에서 용리한다. 한 구체예에서, 다르게 변형된 결합 단백질은 약 4.4의 pH에서 용리하는 반면, 비변형 결합 단백질은 약 3.6의 pH에서 용리한다. 이 구체예에서, "비변형"은 CH3 도메인 둘 다에서 435 (EU 넘버링)에서 변형이 없거나, 또는 435 및 436 (EU 넘버링)에서 변형이 없는 것을 말한다.

[0045] 본원에서 설명되는 임의의 구체예 및 양태는 달리 표시되거나 또는 문맥으로부터 명백하지 않다면 서로 함께 사용될 수 있다. 다른 구체예는 다음의 설명의 검토로부터 당업자에게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 3개의 이중특이성 항체 포맷을 도시한다: (A) 이중특이성 T 세포 인게이지(BiTE); (B) 마우스-랫 혼성체; 및, (C) 통상의 경쇄를 갖는 노브-인트루-홀.

도 2는 Fc Δ Adp 변형을 도시한다: (A) 박스포시의 Fc Δ Adp 변형을 나타내는 인간 IgG1 (SEQ ID NO:1) 및 IgG3 (SEQ ID NO:3)의 Fc 영역의 정렬; (B) Fc Δ Adp 이중특이성 항체의 도식적 표시.

도 3은 IgG3뿐만 아니라 Δ Adp 디펩티드 변형이 있는 IgG1, IgG2, 및 IgG4 및 Δ Adp 디펩티드 변형이 없는 IgG1, IgG2, 및 IgG4의 인간 CH3 도메인의 정렬(IMG T 엑손 넘버링 및 EU 넘버링을 사용)을 도시한다.

도 4는 단계 구배를 이용하는 용리 프로필을 나타내는, 이중특이성 항체의 분리를 위한 단백질 A 컬럼 추적을 나타낸다.

도 5는 도 4에서 나타난 크로마토그래피 분리로부터 용리된 컬럼 분획의 IL4-Ra 및 IL-6Ra BIACORE™ 결합 프로필을 나타낸다. 분획 중의 항체들을 고정된 항-Fc 항체로 포획한 다음, 가용성 IL-4Ra 또는 IL-6Ra를 포획 항체들에 결합을 위해 분석하였다.

도 6은 Fc Δ Adp 이중특이성 항체(IL-6R Δ /IL-4R), Fc Δ Adp 호모다имер(IL-6R Δ /IL-6R Δ), 야생형 CH3 서열을 갖는 IgG1 항체(IL-4R/IL-4R), 및 대조군 단일특이성 항체의 약물 동력학 프로필을 나타낸다.

도 7은 Raji 세포 사멸 분석에서 CD20xCD3 Δ Adp 이중특이성 항체의 효능을 도시한다.

도 8은 CD20xCD3 Δ Adp 이중특이성 항체에 의한 방관자 세포(bystander cell)(293) 사멸 분석을 도시한다.

도 9는 다른 mFc 헤테로다имер를 사용하는 발현 실험에 대한 결과를 나타낸다. 패널 A: 호모다имер mIgG2a 및 호모다имер IgG2aPTTTK로부터 헤테로다имер mIgG2a/mIgG2aPTTTK의 pH 분리의 웨스턴 블롯; 패널 B: 호모다имер mIgG2a 및 호모다имер IgG2aTTTK로부터 헤테로다имер mIgG2a/mIgG2aTTTK의 pH 분리의 웨스턴 블롯; IP = 투입(input); FT = 플로우 스루(flow through); W2 = 제2 세척(1x PBS pH 7.2); E1 = 제1 용리(20 mM Na 시트레이트, 1 M NaCl pH 5.5); E2 = 제2 용리(20 mM Na 시트레이트, 1 M NaCl; 57% pH 5.5 + 43% pH 2.6); E3 = 제3

용리 (20 mM Na 시트레이트, 1 M NaCl pH 2.6).

도 10은 4:1의 IFNAR1 구성체:IFNAR2 구성체 비율을 사용하여 혼합된 이소형(예를 들어, mIgG2a 및 mIgG1)의 헤테로다имер의 형성 이상의 돌연변이 IgG2a의 헤테로다имер의 우선적인 형성을 도시한다. 레인 1: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG1; 레인 2: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG2aTTT; 레인 3: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG2aTTTK; 레인 4: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG2aPTTTK; 레인 5: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG2aRF.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 본 발명의 특정 방법, 및 이러한 방법으로서 설명된 실험 조건에 제한되지 않고, 조건은 다를 수 있다. 또한 본 발명의 범주는 특허청구범위에 의해 정의되기 때문에, 본원에서 사용되는 전문용어는 단지 특정 구체예를 설명하는 목적으로 이해되어야 하고, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0048] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학적 용어는 본 발명의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에서 설명되는 것과 유사 또는 동일한 어떤 방법 및 재료가 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 특정 방법 및 재료는 현재 설명된다. 언급된 모든 간행물은 참고로써 여기에 포함된다.
- [0049] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 이황화결합에 의해 서로-연결된 4개의 폴리펩티드 쇠, 2개의 중(H)쇄와 2개의 경(L)쇄를 포함하는 면역글로불린 분자를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 VH로서 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 VL로서 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL을 포함한다. VH 및 VL 영역은 상보적 결정 영역(CDR)으로 칭해지는 과변이 영역으로 더 세분되고, 골격 영역(FR)로 칭해지는 더 보존된 영역들과 함께 배치될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 하기 순서로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 정렬된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3로서 약칭될 수 있고; 경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3로서 약칭될 수 있다). 용어 "고 친화성" 항체는 그것의 표적에서 적어도 10^{-9} M, 적어도 10^{-10} M; 적어도 10^{-11} M; 또는 표면 플라스몬 공명, 예를 들어 BIACORE™ 또는 용해-친화도 ELISA에 의해 측정되는 바와 같이 적어도 10^{-12} M의 결합 친화도를 가지는 항체들을 말한다.
- [0050] 어구 "항원-결합 단백질"은 적어도 하나의 CDR을 가지는 단백질 및 선택적으로 항원을 인식할 수 있는, 즉 적어도 마이크로몰 범위에 있는 K_D 를 가지는 항원에 결합할 수 있는 것을 포함한다. 치료용 항원-결합 단백질(예를 들어, 치료용 항체들)은 나노몰 또는 피코몰 범위에 있는 K_D 를 빈번하게 요구한다. "항원-결합 단백질"은 또한 본원에서 설명되는 바와 같은 제1 및 제2 CH3를 포함하는 단백질 및 제1 단백질 또는 리간드 인식 도메인 및 제2 단백질 또는 리간드 인식 도메인을 포함하며, 제1 단백질 또는 리간드 인식 도메인 및 제2 단백질 또는 리간드 인식 도메인 각각은 독립적으로 동일한 단백질 또는 리간드를 인식하고, 또는 함께 동일한 단백질 또는 리간드를 인식하고, 또는 각각 독립적으로 다른 단백질 또는 리간드를 인식한다. 이러한 단백질의 한 예는 융합 단백질(헤테로- 또는 호모-) 다имер를 포함하는 면역부착소이며, 다имер의 폴리펩티드는 수용체 구성요소 또는 리간드 구성요소를 포함하는 융합 폴리펩티드이고, 리간드 구성요소는 수용체와 결합하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0051] 어구 "이중특이성 항체"는 2이상의 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 항체를 포함한다. 이중특이성 항체는 일반적으로 2개의 다른 중쇄를 포함하는데, 각각의 중쇄는 2개의 다른 분자(예를 들어, 항원) 상에서 또는 동일한 분자(예를 들어, 동일한 항원) 상에서 다른 에피토프와 특이적으로 결합한다. 이중특이성 항원이 2개의 다른 에피토프(제1 에피토프 및 제2 에피토프)에 선택적으로 결합할 수 있다면, 제1 에피토프에 대한 제1 중쇄의 친화도는 일반적으로 제2 에피토프에 대한 제1 중쇄의 친화도, 및 그 반대의 경우보다 더 낮은 적어도 10^2 또는 10^3 또는 10^4 일 것이다. 이중특이성 항체에 의해 인식된 에피토프는 동일 또는 다른 표적에 있을 수 있다(예를 들어, 동일 또는 다른 단백질). 이중특이성 항체는, 예를 들어 동일 항원의 다른 에피토프를 인식하는 중쇄를 함함으로써 만들어질 수 있다. 예를 들어, 동일 항원의 다른 에피토프를 인식하는 중쇄 가변 서열을 암호화하는 핵산 서열은 다른 중쇄 불변 영역을 암호화하는 핵산 서열에 융합될 수 있고, 이러한 서열들은 면역글로불린 경쇄를 발현시키는 세포에서 발현될 수 있다. 전형적인 이중특이성 항체는 2개의 중쇄를 가지는데 각각은 3개의 중쇄 CDR을 가지고, 이어서(N-말단에서 C-말단으로) CH1 도메인, 힌지, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 가지며, 면역글로불린 경쇄를 가지는데, 면역글로불린 경쇄는 항원-결합 특이성을 부여하지 않지만 각각의 중쇄

에 연결될 수 있고, 또는 각각의 중쇄에 연결될 수 있고 중쇄 항원-결합 영역에 의해 결합된 하나 이상의 에피토프를 결합할 수 있거나, 또는 중쇄에 연결될 수 있고 하나 또는 둘 다의 에피토프에 중쇄 중 하나 또는 둘 다를 결합할 수 있다.

[0052] 용어 "세포"는 재조합 핵산 서열을 발현시키는데 적당한 임의의 세포이다. 세포는 원핵 및 진핵세포(단일-세포 또는 다중-세포), 박테리아 세포(예를 들어, *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, 등의 균주), 마이코 박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포(예를 들어, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, 등), 식물 세포, 곤충 세포(예를 들어, SF-9, SF-21, 바콜로바이러스-감염 곤충 세포, *Trichoplusia ni* 등), 비-인간 동물 세포, 인간 세포, 또는 예를 들어, 하이브리도마 또는 항체생산융합세포와 같은 세포 융합의 세포 들을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 래트, 또는 마우스 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 진핵세포이고, 다음의 세포들로부터 선택된다: CHO (예를 들어, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (예를 들어, COS-7), 망막세포, 베토, CV1, 신장(예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (예를 들어, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidermal), CV-1, U937, 3T3, L cell, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, 세르톨리 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수세포, 종양 세포, 및 앞서 언급한 세포로부터 유래된 셀라인. 일부 구체예에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예를 들어, 바이러스 유전자를 발현시키는 망막세포를 포함한다(예를 들어, PER.C6™ 세포).

[0053] 어구 "상보적 결정 영역" 또는 용어 "CDR"은 유기체의 면역글로불린 유전자의 핵산 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하며, 이는 보통(즉, 야생형 동물에서) 면역글로불린 분자의 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역(예를 들어, 항체 또는 T 세포 수용체)에서 2개의 골격 영역 사이에서 나타난다. CDR은, 예를 들어 생식세포 서열 또는 재배열된 서열 또는 재배열되지 않은 서열에 의해, 그리고 예를 들어, 천연 또는 성숙 B 세포 또는 T 세포에 의해 암호화될 수 있다. 일부 환경에서(예를 들어, CDR3에 대해), 예를 들어 서열의 스플라이싱 또는 접합의 결과로서(예를 들어, V-D-J 재조합으로 중쇄 CDR3을 형성), CDR은 연속적이지 않지만(예를 들어, 재배열되지 않은 핵산 서열에서) B 세포 핵산 서열에서 연속적인 2 이상의 서열에 의해 암호화될 수 있다.

[0054] 어구 "중쇄" 또는 "면역글로불린 중쇄"는 임의의 유기체로부터 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하고, 달리 특정되지 않는다면 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 달리 특정되지 않는다면 중쇄 가변 도메인은 3개의 중쇄 CDR과 4개의 FR 영역을 포함한다. 중쇄의 단편은 CDR, CDR 및 FR, 및 그것의 조합을 포함한다. 전형적인 중쇄는 다음의 가변 도메인(N-말단으로부터 C-말단), CH1 도메인, 힌지, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 가진다. 중쇄의 기능적 단편은 항원을 특이적으로 인식할 수 있고(예를 들어, 마이크로물, 나노물, 또는 피코물 범위에서 K_D 를 가지는 항원을 인식), 즉, 세포로부터 발현 및 분비될 수 있고, 적어도 하나의 CDR을 포함하는 단편을 포함한다.

[0055] 어구 "Fc-함유 단백질"은 항체, 이중특이성 항체, 면역부착소, 및 면역글로불린 CH2 및 CH3 영역의 최소한의 기능적 부분을 포함하는 다른 결합 단백질을 포함한다. "기능적 부분"은 Fc 수용체와 결합할 수 있고(예를 들어, Fc γ R; 또는 FcRn, 즉, 신생아 Fc 수용체), 및/또는 상보체의 활성화에 참여할 수 있는 CH2 및 CH3 영역에 관한 것이다. CH2 및 CH3 영역이 임의의 Fc 수용체와 결합할 수 없도록 하고, 또한 상보체를 활성화 시킬 수 없도록 하는 결실, 치환, 및/또는 삽입 또는 다른 변형을 함유한다면, CH2 및 CH3 영역은 기능적이지 않다.

[0056] Fc-함유 단백질은 면역글로불린 도메인의 변형들을 포함할 수 있으며, 변형은 결합 단백질의 하나 이상의 이펙터 기능에 영향을 미치는 것을 포함한다(예를 들어, Fc γ R 결합, FcRn 결합에 영향을 미치고 따라서 반감기, 및/또는 CDC 활성화에 영향을 미치는 변형). 이러한 변형은, 제한되는 것은 아니지만, 면역글로불린 불변 영역의 EU 넘버링에 대해 하기의 변형 및 그것의 조합을 포함한다: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, 및 439.

[0057] 예를 들어, 제한하지 않고, 결합 단백질은 Fc-함유 단백질이고, (열거된 변형(들) 없이 동일한 Fc-함유 단백질과 비교하여) 향상된 혈청 반감기를 나타내고, 위치 250 (예를 들어, E 또는 Q); 250 및 428 (예를 들어, L 또는 F)에서 변형; 252 (예를 들어, L/Y/F/W 또는 T), 254 (예를 들어, S 또는 T), 및 256 (예를 들어, S/R/Q/E/D 또는 T); 또는 428 및/또는 433 (예를 들어, L/R/SI/P/Q 또는 K) 및/또는 434 (예를 들어, H/F 또는 Y)에서 변형; 또는 250 및/또는 428에서 변형; 또는 307 또는 308 (예를 들어, 308F, V308F), 및 434에서 변형을 가진다. 다른 예에서, 변형은 428L (예를 들어, M428L) 및 434S (예를 들어, N434S) 변형; 428L, 259I (예

를 들어, V259I), 및 308F (예를 들어, V308F) 변형; 433K (예를 들어, H433K) 및 434 (예를 들어, 434Y) 변형; 252, 254, 및 256 (예를 들어, 252Y, 254T, 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예를 들어, T250Q 및 M428L); 307 및/또는 308 변형(예를 들어, 308F 또는 308P)를 포함할 수 있다.

[0058] 어구 "이온 변경제"는 단백질 사이의 비-특이적(즉, 비-친화성) 이온 상호작용의 효과를 감소시키거나 또는 비-특이적 이온 상호작용을 방해하는 모이어티를 포함한다. "이온 변경제"는 예를 들어, I족과 II족 금속과 아세트산염, 중탄산염, 탄산염, 할로젠(예를 들어, 염소 또는 불소), 질산염, 인산염 또는 황산염의 염, 이온성 조합을 포함한다. "이온 변경제"의 비-제한적 예시 열거는 아세트산베릴륨, 아세트산리튬, 아세트산나트륨, 및 아세트산칼륨; 탄산수소나트륨 및 탄산수소칼륨; 탄산리튬, 탄산나트륨, 탄산칼륨 및 탄산세슘; 염화리튬, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화세슘, 및 염화마그네슘; 플루오르화나트륨 및 플루오르화칼륨; 질산나트륨, 질산칼륨 및 질산세슘; 인산나트륨 및 인산칼륨; 및 황산칼륨 및 황산마그네슘을 포함한다. "이온 변경제"는 pH 구배 또는 단계에 첨가 시, 또는 "이온성 변경제"에서 단백질 A 지지체의 평형화 및 pH 단계 또는 구배의 적용시, 이온성 상호작용에 영향을 미쳐서, 호모다이머 IgG와 헤테로다이머 IgG(예를 들어, 본원에서 설명되는 CH3 도메인의 하나 이상의 변형을 함유하는 야생형 IgG 및 동일한 IgG)의 용리 사이의 pH 단위 거리의 넓어짐을 초래하는 모이어티를 포함한다. "이온 변경제"의 적당한 농도는 최대 pH 거리가 주어진 pH 단계 또는 pH 구배에 도달될 때까지 "이온 변경제"의 농도를 증가시키면서 동일한 컬럼, pH 단계 또는 구배를 사용하는 그것의 농도에 의해 결정될 수 있다.

[0059] 어구 "경쇄"는 임의의 유기체로부터 면역글로불린 경쇄 불변영역을 포함하고, 달리 특정되지 않는다면 인간 카파 및 람다 경쇄를 포함한다. 달리 특정되지 않는다면 경쇄 가변(VL) 도메인은 전형적으로 3개의 경쇄 CDR 및 4개의 골격(FR) 영역을 포함한다. 일반적으로 전장 경쇄는 아미노 말단으로부터 카르복실 말단까지 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 포함하는 VL 도메인 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 본 발명과 함께 사용될 수 있는 경쇄는, 예를 들어 항원-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 제1 또는 제2 항원 중 하나와 선택적으로 결합하지 않는 것을 포함한다. 적당한 경쇄는 존재하는 항체 라이브러리에서 가장 흔히 사용된 경쇄에 대해 스크리닝함으로써 확인될 수 있는 것을 포함하며, 경쇄는 항원-결합 단백질의 항원-결합 도메인의 친화도 및/또는 선택성을 실질적으로 방해하지 않는다. 적당한 경쇄는 항원-결합 단백질의 항원-결합 영역에 의해 결합된 에피토프 중 하나 또는 둘 다와 결합할 수 있는 것을 포함한다.

[0060] 어구 "마이크로몰 범위"는 1-999 마이크로몰을 의미하는 것으로 의도되고; 어구 "나노몰 범위"는 1-999 나노몰을 의미하는 것으로 의도되고; 어구 "피코몰 범위"는 1-999 피코몰을 의미하는 것으로 의도된다.

[0061] 어구 "체세포 돌연변이된"은 종류 변환(class-switching)을 받은 B 세포로부터의 핵산 서열에 대한 기준을 포함하며, 종류 변환된 B 세포에서 면역글로불린 가변 영역의 핵산 서열은(예를 들어, 중쇄 가변 도메인 또는 중쇄 CDR 또는 FR 서열을 포함하는 것), 예를 들어 종류 변환을 받지 않은 B 세포와 종류 변환을 받은 B 세포 사이의 CDR 또는 골격 핵산 서열의 차이와 같이, 종류 변환 전 B 세포에서 핵산 서열과 동일하지 않다. "체세포 돌연변이된"은 친화도-성숙되지 않은 B 세포에서 대응하는 서열(즉, 생식세포 세포의 게놈 중의 서열)과 동일하지 않은 친화도-성숙된 B 세포로부터의 핵산 서열에 대한 기준을 포함한다. 어구 "체세포 돌연변이된"은 또한 관심의 항원에 B 세포의 노출 후 B 세포로부터 핵산 서열에 대한 기준을 포함하며, 핵산 서열은 관심의 항원에 B 세포의 노출 전 대응하는 핵산 서열과 다르다. 어구 "체세포 돌연변이된"은 동물, 예를 들어 항원 시험감염에 응하여, 인간 면역글로불린 가변 영역 핵산 서열을 가지는 마우스에서 발생되고, 이러한 동물에서 선천적으로 작동하는 선택 과정을 초래하는 항체로부터의 서열을 말한다.

[0062] 어구 "가변 도메인"은 N-말단으로부터 C-말단의 서열에서(달리 지시되지 않는다면), 다음의 아미노산 영역을 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄(원하는 대로 변형)의 아미노산 서열을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. "가변 도메인"은 이중의 베타 시트 구조를 가지는 표준이 되는 도메인(VH 또는 VL)으로 폴딩될 수 있는 아미노산 서열을 포함하며, 베타 시트는 제1 베�타 시트와 제2 베타 시트 사이의 이황화 결합에 의해 연결된다.

[0063] **변형된 IgG CH3 영역을 가지는 이중특이성 항체들**

[0064] 본 발명자들은 인간 항체 구성요소와 함께 사용될 수 있는 선택적인 단백질 정제 계획을 통상의 경쇄 전략과 조합하는 새로운 포맷을 개발하였다.

[0065] 이것은 이전부터 주목되었는데(Lindhofer, H. et al. (1995) J. Immunol. 155:219-225)), 인간 IgG3가 단백질 A에 결합하지 않고, 잠재적으로 마우스-랫트 혼성체에 대해 사용된 것과 유사한 정제 전략에서 다른 3가지의 인

간 IgG 하위분류 중 어떤 것과 함께 사용될 수 있기 때문이다. 그러나, 모든 4가지의 인간 IgG 하위분류의 서열이 매우 상동성이지만, 용이하게 IgG1, IgG2, 및 IgG4의 Fc 부분이 IgG3와 헤테로다이머를 형성하는 법은 알려져 있지 않았고; 단지 호모다이머의 우선적인 형성조차도 특정 환경하에서(예를 들어, 항체생산융합세포로부터의 분리) 요망되는 헤테로다이머의 전체 수율에 부정적인 영향을 가졌다. 추가적인 변형이 또한 IgG3의 힌지 영역과 다른 하위분류의 영역 사이의 차이점을 보상하는데 필요할 수 있다. 또한, 일부 환경에서, 이펙터 작용에서 잠재적인 충격 때문에 완전한 IgG3 Fc의 존재를 필요로 하지 않는 것이 바람직하다.

[0066] 따라서 본 발명자들은 우연히 단백질 A 결합의 간단한 결정소를 이용하는 "최소의" 포맷을 고안하였다. 이것은 단백질 A에 결합하기 위한 IgG3의 불능이 단일 아미노산 잔기, Arg435 (EU 넘버링; IMGT에 의해 Arg95)에 의해 결정되고, 다른 IgG 하위분류에서 대응하는 위치는 히스티딘 잔기에 의해 점유된다는 것을 보고하였다 (Jendeborg, L. et al. (1997) J. Immunological Meth. 201:25-34)). 그러므로, IgG3 대신 His435가 Arg으로 돌연변이된 IgG1 서열을 사용하는 것이 가능하다. 따라서, IgG1에서 하나의 점 돌연변이는 새로운 정제 계획을 처리할 수 있는 다른 결합 친화도를 만들기 위해 충분해야 한다. 이 변형은 단백질 A에 결합하는 그것의 불능을 나타내는 IgG1 Δ A로서 언급될 것이다(유사하게 IgG2 Δ A 및 IgG4 Δ A - 또는 더 일반적으로, Fc Δ A).

[0067] 그러나, 특정된 점 돌연변이는 잠재적으로 면역원성일 수 있는 돌연변이를 가로지르는 새로운 펩티드 서열을 도입한다. 점 돌연변이는, 이론적으로 MHC 클래스 II 분자에 부하되고, T 세포에서 존재할 수 있고, 결과적으로 면역 반응을 일으킬 수 있다. 이 위험을 피하기 위해, 디펩티드 돌연변이, H435R/Y436F (EU 넘버링; IMGT에 의해 H95R/Y96F)가 사용될 수 있다. 변경 근처에서 결과 서열은 IgG3와 동일하고(도 2A 참조), 따라서 면역적으로 "보이지 않는" 것으로 기대되는데, T 세포에 대한 제공방식을 위해 이용가능한 비-천연의 짧은 펩티드가 아니기 때문이다. 이 이중 돌연변이체는 여전히 단백질 A와 결합하지 않는 것으로 보고되었다(Jendeborg, L. et al. (1997) J. Immunological Meth. 201:25-34). 최종적으로, 디펩티드 돌연변이는 Fc 다이머 계면을 형성하는 임의의 잔기를 포함하지 않고, 따라서 헤테로다이머의 형성과 상호작용할 가능성이 없다. 이 디펩티드 돌연변이는 "IgG1 Δ Adp" (및, 유사하게는 IgG2 Δ Adp, IgG4 Δ Adp, 및 Fc Δ Adp)로서 지정된다. IgG1, IgG2, 및 IgG4에서 디펩티드 변형의 배치는 IMGT 엑손 넘버링 및 EU 넘버링을 나타내는, hIgG3뿐만 아니라 야생형 인간 IgG CH3 도메인 서열을 나타낸 IgG1 Δ Adp, IgG2 Δ Adp, 및 IgG4 Δ Adp를 의미하는 서열로 도 3에서 표시된다.

[0068] Fc Δ Adp 변형은 Fc 다이머 계면을 형성하는 것으로 믿어지는 임의의 잔기를 포함하지 않고, 따라서 Fc Δ Adp 변형은 헤테로다이머의 형성을 방해할 가능성이 없다. Fc Δ Adp이 매우 적기 때문에, 다른 유전자 조작된 Fc 형태에도 마찬가지로 포함될 수 있다. IgG2 Δ Adp 및 IgG4 Δ Adp는 각각의 후자와 연결된 이펙터 작용이 요망되는(또는 그것이 없는) 상황에서 유리할 수 있다.

[0069] 요약해서, 상기 설명한 이중특이성 항체 포맷은 동일한 경쇄를 사용하는 다른 특이성의 2 항체를 포함하며, 그것들 중 하나의 Fc 영역은 Fc Δ Adp 포맷으로 변형된다(도 2B 참조). 그것의 배치는 천연 인간 항체의 배치이고, 따라서 낮은 응집 경향, 생체내 안정성, 최소의 면역원성, 항체와 유사한 생체 내 분포 특성, 양호한 약물동력학, 및 선택적으로 이펙터 작용을 포함하는 그것의 유리한 특성을 공유하여야 한다. 이러한 이중특이성 항체를 분리하는 방법은 실행에서 상대적으로 빠르고 단순하게 제공된다.

[0070] **변형된 마우스 IgG CH 영역을 가지는 이중특이성 결합 단백질**

[0071] 본 발명자들은 CH3 도메인에서 하나 이상의 아미노산에 대해 헤테로다이머인 면역글로불린 중쇄(또는 그것의 기능성 CH2 및 CH3-함유 단편)를 포함하는 결합 단백질을 용이하게 분리하는 방법을 고안하였다. 마우스 IgG CH 도메인의 변형의 주의깊은 선택 및 특정 분리 기술의 적용은 변형을 함유하지 않는 호모다이머 및 헤테로다이머로부터 2가지의 다르게 변형된 마우스 CH 영역을 포함하는 결합 단백질을 용이하게 분리하는 능력을 부여한다.

[0072] 247에서 프롤린, 252, 254, 및 256에서 트레오닌, 및 258에서 리신을 함유하는 마우스 IgG1은 단지 단백질 A와 약하게 결합한다. 그러나 마우스 IgG2a 및 IgG2b는 그 위치에서 다른 잔기들을 함유하고(IgG2b 위치 256 및 258은 제외), 마우스 IgG2a 및 2b는 단백질 A에 잘 결합한다. 중쇄에 대해 헤테로다이머인 항체를 만드는 방법에서 2개의 마우스 IgG의 CH 영역을 다르게 변형시키는 것은 이러한 항체에서 다른 단백질 A 결합 특성을 부여한다. 이런 방법으로, 다른 단백질 A 분리 계획은, IgG1의 호모다이머(단백질 A에 단지 매우 약하게 결합한다 해도) 또는 마우스 IgG2a의 호모다이머, 마우스 IgG2b의 호모다이머, 또는 IgG2a/IgG2b의 헤테로다이머이든 아니든, 임의의 마우스 IgG 호모다이머로부터 변형된 헤테로다이머의 용이한 분리를 허용하도록 고안되었다. 예를 들어, 2개의 다른 중쇄 가변 도메인을 가지지만 동일한 이소형, 예를 들어 IgG2a를 가지는 이중특이성 항체는 중쇄 서열을 사용하는 적당한 발현 시스템에서 발현될 수 있으며, IgG2a CH 영역 중 하나만이 단백질 A 결합 결정소를 감소 또는 제거하기 위해 변형된다. 이 방법에서, IgG2a CH 영역 중 단지 하나는 단백질 A에 대해 실질적인 친

화도를 나타낼 것이고, 비변형 IgG2a 및 변형 IgG2a의 다이머로부터 형성된 어떤 항체는 변형된 헤테로다이머로부터 용이하게 분리될 것이다.

[0073] 다양한 구체예에서, 항체에서 Fc 다이머의 하나의 CH 영역이 변형된 CH 영역을 포함하는 반면, Fc 다이머의 나머지 CH는 그것들이 없다. 마우스 IgG CH 영역은 252T, 254T, 및 256T; 252T, 254T, 256T, 및 258K; 247P, 252T, 254T, 256T, 및 258K; 435R 및 436F; 252T, 254T, 256T, 435R, 및 436F; 252T, 254T, 256T, 258K, 435R, 및 436F; 24tP, 252T, 254T, 256T, 258K, 435R, 및 436F; 및 435R로 구성되는 군으로부터 선택되는 특정 위치(EU 넘버링)에서 특정 아미노산을 포함하도록 변형된다. 특정 구체예에서, 변형의 특정 기는 M252T, S254T, S256T; M252T, S254T, S256T, I258K; I247P, M252T, S254T, S256T, I258K; H435R, H436F; M252T, S254T, S256T, H435R, H436F; M252T, S254T, S256T, I258K, H435R, H436F; I247P, M252T, S254T, S256T, I258K, H435R, H436F; 및 H435R로 구성되는 군으로부터 선택되어 만들어진다.

[0074] 헤테로다이머 마우스 IgG-기반 결합 단백질은 다양한 용도를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 그것들은 마우스 불변 도메인을 가지는 이중특이성 항체들을 분리하는 방법을 허용하며, 변형들은 하나 이상의 마우스 Fc 수용체에 항체의 결합을 방해하지 않거나 또는 실질적으로 방해하지 않아서, 항체는 예를 들어 ADCC 또는 CDC에 참여할 수 있고, 또는 동일 또는 다른 표적에서 2 이상의 에피토프와 결합할 수 있다.

[0075] 한 양태에서, 결합 단백질을 분리하는 방법은 제1 마우스 IgG CH 영역 및 제2 마우스 IgG CH 영역을 포함하며, 제1 IgG CH 영역은 제1 마우스 IgG CH 영역의 단백질 A 결합 친화도를 감소 또는 제거하기 위해 변형되지만, 제2 마우스 IgG CH 영역은 그렇지 않고, 결합 단백질은 제1 에피토프에 결합하는 제1 결합 모이어티 및 제2 에피토프에 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함한다.

[0076] 한 구체예에서, 변형은 Fc 수용체에서 결합 단백질의 결합 친화도를 변경하지 않거나 또는 실질적으로 변경하지 않는다. 한 구체예에서, 결합 단백질은 결합 단백질의 Fc 수용체에 대한 친화도를 증가 또는 감소시키는 변형을 포함한다.

[0077] 한 구체예에서, 변형이 없는 대응하는 결합 단백질과 비교하여, 변형은 천연 마우스 Fc γ R 수용체 및/또는 천연 마우스 FcRn을 포함하는 마우스에서 결합 단백질의 혈청 반감기를 변경하지 않거나 또는 실질적으로 변경하지 않는다.

[0078] 한 구체예에서, 변형이 없는 대응하는 결합 단백질과 비교하여, 변형은 천연 마우스 고친화도 및 저친화도 Fc γ R 수용체 및/또는 FcRn 수용체의 치환을 포함하는 마우스에서 결합 단백질의 청 반감기를 변경하지 않거나 또는 실질적으로 변경하지 않는다.

[0079] 한 구체예에서, 제1 및 제2 에피토프는 다르고, 다른 세포 상 또는 다른 단백질 상에 있다. 한 구체예에서, 제1 에피토프 및 제2 에피토프는 다르고, 동일 세포 또는 동일 단백질 상에 있다.

[0080] 한 구체예에서, Fc 수용체는 고친화도 Fc 수용체, 저친화도 Fc 수용체, 및 FcRn으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, Fc 수용체는 마우스 FcRn, 마우스 Fc γ R, 마우스 Fc γ RIIB, 마우스 Fc γ RIII, 마우스 Fc γ RIV, 및 그것의 조합 중 하나 이상으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, Fc 수용체는 인간 FcRn, 인간 Fc γ R, 인간 Fc γ RIIB, 인간 Fc γ RIIC, 인간 Fc γ RIIIB, 인간 Fc γ RIIA, 인간 Fc γ RIIA, 및 그것의 조합 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0081] 면역원성

[0082] 본 발명의 많은 구체예 중 하나의 이점은 단백질 A에 다른 결합을 기반으로 용이하게 분리가 가능하고, 또한 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성인 이중특이성 항체를 만드는 변형(들)을 사용하는 능력이다. 이 특징은 이러한 구체예들을 인간 치료 용도를 위한 이중특이성 항체를 만들고, 예를 들어, 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성인 면역부작소를 만드는데 특히 유용하다(인간 결합 모이어티, 즉 인간 수용체 구성요소 및/또는 인간 리간드를 사용). 이 특징은 IgG1, IgG2, 및 IgG3의 H95R/Y96F (IMGT 넘버링) 변형이 있는 CH3 도메인, 및 다른 IgG 이소형의 야생형 서열을 반영하여 변형된 위치를 초래하는 추가 변형을 함유하는 CH3 도메인을 가지는 이중특이성 항체와 관련된다. 따라서, 변형이 특정 IgG 이소형과 사실상 관련되는 것이 발견되지 않았지만, 변형된 서열은 다른 IgG 이소형의 야생형과 국소적으로 동일하고, 변형은 면역원성 또는 실질적으로 면역원성이 될 것으로 기대되지 않는다. 또한 변형은 그것의 서열인 임의의 천연 서열과 국소적으로 동일하지 않을지라도 비-면역원성일 수 있고; 이러한 변형은 동일하게 유용하다. 따라서 비-면역원성이라면, 최소의 점 돌연변이 H95R (IMGT 넘버링)은 본 발명의 적당한 구체예가 된다.

- [0083] 따라서 이종특이성 항체는 그것의 중쇄 불변 도메인에 대해 인간에서 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이지만, 친화성 시약(예를 들어 단백질 A)에 대해 중쇄 불변 도메인의 다른 친화도를 초래하는 변형을 포함하는 중쇄 불변 도메인의 하나 이상의 다른 변형을 함유한다. 변형은 본원에서 개시되는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, CH3 도메인에 대해 인간에서 비-면역원성이거나 또는 실질적으로 비-면역원성이며, 다르게 변형된 중쇄를 가지는 이종특이성 항체는 다음의 변형들 중 하나를 포함하는 CH3 도메인을 포함하는 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4이다(또는 다른 구체예에서, 본질적으로 다음의 변형들 중 하나로 구성된다): H95R, 또는 H95R 및 Y96F (IMGT 넘버링).
- [0084] 이종특이성 항체들은 인간에 대해 비-면역원성 또는 실질적으로 비-면역원성이 되는 것으로 기대되며, 인간 IgG1, IgG2, 및 IgG4 이소형태에 대한 내성은 어떤 상당한 정도로 파괴되지 않았다.
- [0085] 특히, Fc Δ Adp 변형은 면역적으로 "보이지 않는" 것으로 예상되는데, MHC 클래스 II 분자의 결합 그루브가 T 세포 수용체의 가변 루프에 의해 인식되는 주 결정소를 포함하는 9-mer를 수용하고, 따라서 임의의 천연 9-mer 하위서열이 없는 펩티드는 면역 반응을 유발할 가능성이 없기 때문이다. 그러나, 9-mer보다 긴 펩티드(보통 약 13- 내지 17mer)는 MHC 클래스 II에 의해 결합되고, 돌출 세그먼트는 잠재적으로 결합에 영향을 미칠 가능성이 있다. 따라서, 더 긴 비-천연 서열을 제거하는 (Fc Δ Adp 변형 이상의) 추가 변형은 면역원성에 대한 가능성을 추가로 감소시킬 수 있다. 한 특정 예는 변형 V422I (EU; IMGT 넘버링에 의해 V82I)이며, 이는 IgG1 Δ Adp에서, 그리고 유사하게 한정된 IgG2 Δ Adp의 43 잔기에서 14 내지 39의 최소의 비-천연 펩티드의 길이로 연장한다. 다른 예는 IgG4 Δ Adp에서 변형 L445P (EU; IMGT 넘버링에 의해 L105P)이며, 이는 10 내지 14개의 잔기의 길이로 연장한다.
- [0086] **약물동력학**
- [0087] 단백질 A에 대한 결합 자리는 신생아 Fc 수용체, FcRN에 대한 결합 자리와 중복되는데, 이것은 면역글로불린에 연장된 혈청 반감기를 부여하는 것을 초래하는 것으로 생각된다. 따라서 단백질 A 결합 자리의 부근의 변형은 본원에서 제안된 포맷이 IgG1, 2, 및 4의 혈청 반감기보다 더 짧은 혈청 반감기를 가질 수 있었다는 가능성을 만들며, 인간 IgG3는 다른 IgG 하위분류(약 21일)보다 더 짧은 혈청 반감기(약 7일)를 가지도록 주어진다. His435에 영향을 미치는 일부 Fc 돌연변이체는 FcRN에 결합하지 않고, 마우스에서 더 짧은 반감기를 가지는 것으로 나타났다. 그러나, 약물동력학 분석은 IgG1 Δ A/IgG1 헤테로다이머의 혈청 반감기가 IgG1 호모다이머의 혈청반감기와 눈에 띄게 다르지 않다는 것을 나타내었다(실시예 2 참조). 따라서, IgG1 Δ Adp 돌연변이는 단백질 A 결합을 제거하는 한편, 여전히 IgG1의 더 긴 반감기를 보존하는 이점을 가진다.
- [0088] 따라서, 한 구체예에서, 이종특이성 항원-결합 단백질은 본원에서 설명한 바와 같은 CH3 도메인의 변형을 포함하도록 제공되며, 항원-결합 단백질은 CH3 도메인에서 변형이 없는 동일한 이종특이성 항원-결합 단백질과 동일한 약물동력학 프로파일을 나타낸다. 한 구체예에서, 이종특이성 항체는 IgG1 Δ A/IgG1 헤테로다이머 Fc를 포함하는 것으로 제공되며, 이종특이성 항체는 다른 것은 동일하지만 IgG3 CH3 도메인을 포함하는 이종특이성 항체보다 약 1.5-배, 약 2-배, 약 2.5-배, 또는 약 3 배 더 큰 혈청 반감기를 가진다. 한 구체예에서, 이종특이성 항체는 IgG1 Δ A/IgG1 헤테로다이머 Fc를 포함하여 제공되며, 이종특이성 항체는 IgG1 Δ A 변형이 없는 이종특이성 항체(즉, IgG1 호모다이머 이종특이성 항체)의 혈청 반감기와 거의 동일한 혈청 반감기를 나타낸다.
- [0089] **면역글로불린 중쇄**
- [0090] 요망되는 특성들(예를 들어, 요망되는 특이성, 요망되는 친화도, 요망되는 기능성, 예를 들어, 차단, 비-차단, 억제, 활성화 등)을 가지는 이종특이성 항체를 만드는데 사용될 수 있는 면역글로불린 중쇄 가변 영역은 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 만들어질 수 있다. 요망되는 중쇄는 그 다음에 본원에서 설명되는 요망되는 중쇄 불변 영역을 가지는 구성체에서 가변 영역을 함유하는 핵산 서열을 클로닝함으로써 수행될 구성될 수 있다.
- [0091] 한 구체예에서, 제1 중쇄는 제1 항원으로 면역화된 제1 동물의 성숙 B 세포의 게놈으로부터 유래된 핵산에 의해 암호화되는 가변 영역을 포함하고, 제1 중쇄는 제1 항원을 특이적으로 인식한다. 특정 구체예에서, 제2 중쇄는 제2 항원으로 면역화된 제2 동물의 성숙 B 세포의 게놈으로부터 유래된 핵산에 의해 암호화되는 가변 영역을 포함하고, 제2 중쇄는 제2 항원을 특이적으로 인식한다.
- [0092] 한 구체예에서, 제1 동물 및/또는 제2 동물은 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 유전적으로 변형된 동물이다. 한 구체예에서, 제1 동물 및/또는 제2 동물은 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 포함하는 유전적으로 변형된 동물이다. 한 구체예에서, 제1

동물 및/또는 제2 동물은 재배열되지 않은 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 유전적으로 변형된 마우스이다.

[0093] 면역글로불린 중쇄 가변 영역 서열은 당업계에 알려진 임의의 다른 방법, 예를 들어 파지 디스플레이에 의해 얻어질 수 있고, 이에 의해 얻은 서열은 핵산 구성체를 만드는데 사용되어 임의의 적당한 중쇄, 예를 들어 본원에서 설명하는 바와 같은 변형된 CH3 도메인이 있는 중쇄를 암호화하는 핵산과 결합되고, 발현 구성체 중에 위치되고, 예를 들어 적당한 경쇄의 존재하에서 중쇄를 만들 수 있는 세포에 운반될 수 있다.

[0094] 면역글로불린 경쇄

[0095] 2개의 다른 에피토프(또는 2개의 다른 항원들)를 인식하는 2개의 중쇄를 포함하는 이중특이성 항체는 더 용이하게 분리되며, 그것들은 동일한 경쇄와 짝지을 수 있다(즉, 동일한 가변 및 불변 도메인을 가지는 경쇄). 다른 특이성의 2 중쇄와 짝지을 수 있지만 그것의 표적 항원과 중쇄 가변 도메인의 선택성 및/또는 친화도를 방해하지 않거나 실질적으로 방해하지 않는, 경쇄를 만들기 위한 다양한 방법이 당업계에 알려져 있다.

[0096] 접근에서, 경쇄는 모든 경쇄 가변 도메인에 대한 사용 통계를 조사하고, 인간 항체에서 가장 빈번하게 사용된 경쇄를 확인하고, 다른 특이성의 2 중쇄를 가지는 경쇄를 짝지음으로써 선택될 수 있다.

[0097] 다른 접근에서, 경쇄는 파지 디스플레이에서 경쇄 서열을 관찰하고, 가장 흔히 사용된 경쇄 가변영역을 라이브러리(예를 들어, 인간 경쇄 가변 서열을 포함하는 파지 디스플레이 라이브러리, 예를 들어 인간 ScFv 라이브러리)로부터 선택함으로써 선택될 수 있다.

[0098] 다른 접근에서, 경쇄는 프로브로서 중쇄 둘 다의 중쇄 가변 서열을 사용하여 경쇄 가변 서열의 파지 디스플레이 라이브러리를 분석함으로써 선택될 수 있다. 중쇄 가변 서열과 결합하는 경쇄는 중쇄에 대해 경쇄로서 선택되고, 에피토프 둘 다에 대해 결합 및/또는 활성화를 허용한다.

[0099] 다른 접근에서, 경쇄는 요망되는 중쇄와 알려진 경쇄를 합하고, 결합 특이성, 친화도, 및/또는 활성화 능력을 위한 결과 이중특이성 항체를 분석함으로써 선택될 수 있다.

[0100] 어려움이 경쇄를 선택하기 위한 임의의 접근과 만난다는 점에서(예를 들어, 경쇄는 항원과 중쇄 중 하나 또는 둘 다의 결합을 방해하고, 또는 경쇄는 중쇄 중 하나 또는 둘 다와 만족스럽게 결합하지 못한다), 경쇄는 중쇄의 동족 경쇄와 함께 정렬될 수 있고, 변형은 두 중쇄의 동족 경쇄와 공통인 서열 특성들을 더 가깝게 매칭하는 경쇄에서 만들어진다. 면역원성의 기회가 최소로 될 필요가 있다면, 변형은 바람직하게는 알려진 인간 경쇄 서열에 존재하는 서열들을 야기하여서, 단백질 분해 처리는 면역원성의 가능성을 평가하기 위해 당업계에 알려진 변수 및 방법(인실리코 및 습식 분석)을 기반으로 한 T 세포 에피토프를 만들 수 없다.

[0101] 항체 및 결합 단백질

[0102] 본 조성물 및 방법은 인간 이중특이성 항체, 즉 인간 불변 및 가변 도메인을 포함하는 이중특이성 항체를 만드는데 특히 유용하다. 일부 구체예에서, 인간 항체들은 인간 생식세포 면역글로불린 서열로부터 유래되고, 일부 구체예에서 (예를 들어, 인간 면역글로불린 유전자 서열을 포함하는 동물에서 생성된) 체세포 돌연변이된 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 중쇄 가변 및 중쇄 불변 도메인을 가지는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 인간 가변 및/또는 불변 영역은 인간 생식세포 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 또는 예를 들어 CDR 및 특정 CDR3에서 재조합 및/또는 스플라이싱의 결과로서 암호화된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 인간 항체들은 CDR 서열이 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식세포로부터 유래되고, 인간 골격 서열에 접합된 항체들을 포함하는 것으로 의도되지 않는다. 그 항체들은 인간화된 또는 키메라 항체들로서 언급된다. 인간 항체들은 예를 들어 무작위 또는 자리-특이적 돌연변이로 시험관내에 도입된 돌연변이를 포함하지만, 돌연변이는 바람직하게는 인간에서 비-면역원성이다.

[0103] 본 방법 및 조성물은 바람직하게는 인간에서 비-면역원성 또는 낮은 면역원성의 키메라 항체들을 만드는데 사용될 수 있다. 키메라 항체들은 중쇄 가변 영역 또는 골격 또는 CDR 또는 중쇄 불변 영역 또는 도메인 중 하나가 다른 종으로부터 나오는 항체들이다(예를 들어, 인간과 마우스, 또는 인간과 영장류). 일부 구체예에서, 키메라 항체들은 비-인간 기원의 중쇄 가변 영역(예를 들어, 마우스) 및 인간 기원의 중쇄 불변 영역을 가지는 항체들을 포함한다. 일부 구체예에서, 키메라 항체들은 인간 기원의 중쇄 가변 영역 및 비-인간(예를 들어, 마우스) 기원의 중쇄 불변 영역을 가지는 항체들을 포함한다. 다양한 구체예에서, 마우스 기원의 영역은 체세포 초돌연변이가 있거나 없는 마우스 면역글로불린 생식세포 서열과 동일하거나 또는 실질적으로 동일하다. 키메라 항체들은 또한 인간 면역글로불린 생식세포 서열 및 비-인간(예를 들어, 마우스) 중쇄 또는 키메라 인간/비인간 중

쇄와 동일한 또는 실질적으로 동일한 경쇄 불변 영역을 가지는 항체들을 포함한다. 키메라 항체들은 비-인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린 생식세포 서열 및 인간 또는 키메라 비인간/인간 중쇄와 동일 또는 실질적으로 동일한 경쇄 불변 도메인을 가지는 항체들을 포함한다.

[0104] 일부 구체예에서, 본 조성물 및 방법은 친화도-성숙된 항체를 만들기 위한 것이다. 일부 구체예에서, 친화도-성숙된 항체는 변형(들)이 없는 실질적으로 동일한 항체와 비교하여 그것의 표적 항원에 대한 항체의 더 높은 친화도(나노몰 또는 피코몰 범위에서 K_D)를 초래하는 하나 이상의 CDR에서 하나 이상의 변형을 포함한다. 친화도-성숙된 항체들은 예를 들어 CDR 및/또는 골격 영역의 무작위 또는 자리-지정 돌연변이에 이어서 친화도 스크리닝, VH 도메인 서플링 등으로써 당업계에 알려진 임의의 적당한 방법에 의해 만들어질 수 있다.

[0105] 일부 구체예에서, 항체는 중화 항체이다. 중화항체는 항원의 생물학적 활성을 중화, 억제 또는 방지할 수 있는 항체를 포함한다. 중화 항체는 항원에 결합 시, 생체 내 및 시험관 내 항원의 천연 표적 상에서 작용하는 항원의 능력을 방지 또는 감소시키는 것을 포함한다. 중화 항체의 예는 리간드가 수용체와 결합하는 것을 방지하는 생물학적 수용체의 단백질 리간드에 대한 항체, 수용체가 그것의 리간드와 결합하는 것을 방지하는 생물학적 수용체에 대한 항체를 포함하며, 항체가 없는 리간드 결합은 수용체가 세포 내 변화를 초래하도록 야기한다. 항체가 중화항체인지를 결정하는 것은, 일반적으로 항원의 생물학적 활성에서 항체의 효과가 측정되는 작용 분석을 수행하는 것을 수반한다.

[0106] 본 발명의 방법 및 조성물은 또한 항체 및 다른 결합 단백질의 다양한 용도에서 유용하다. 일부 유용한 용도의 간략한 설명이 본원에서 제공된다.

[0107] 종양 항원 및 T-세포 항원에 대한 결합 특이성을 포함하는 이중특이성 결합 단백질은 세포 상의 항원, 예를 들어 CD20을 표적으로 하고, 또한 T-세포 상의 항원, 예를 들어 CD3를 표적으로 하여 만들어질 수 있다. 이런 방법으로, 환자에서 관심의 세포(예를 들어, CD20 결합을 통해 림프종 환자에서 B 세포)뿐 아니라 환자의 T-세포를 표적화한다. 다양한 구체예에서 이중특이성 항체는 CD3와 결합시 T-세포를 활성화하도록 설계되고, 따라서 특이적인, 선택된 종양 세포에서 T-세포 활성화와 커플링한다.

[0108] 동일 세포의 표면 상에서 결합 상대에 각각 지시된(즉, 각각 다른 표적으로 지시됨) 2개의 결합 모이어티를 포함하는 이중특이성 결합 단백질이 또한 만들어질 수 있다. 이 설계는 동일 세포의 표면상에서 표적들을 둘 다 발현시키는 특이적 세포 또는 세포 종류들을 표적으로 하기에 특히 적합하다. 표적들이 다른 세포에서 개별적으로 나타날 수도 있지만, 이 결합 단백질의 결합 모이어티는 각각의 결합 모이어티가 상대적으로 낮은 친화도를 가지는 그것의 표적과 결합하도록 선택된다(예를 들어, 낮은 마이크로몰, 또는 높은 마이크로몰 - 예를 들어, 100 나노몰 K_D 이상, 예를 들어, 500, 600, 700, 800 나노몰). 이 방법에서, 연장된 표적 결합은 2개의 표적이 동일 세포에서 근접해 있는 상황에서만 선호된다.

[0109] 동일 표적의 다른 에피토프에서 각각 동일 표적에 결합하는 두 개의 결합 모이어티를 포함하는 이중특이성 결합 단백질이 만들어질 수 있다. 이 설계는 결합 단백질이 있는 표적을 성공적으로 차단하는 확률을 최대화하는데 특히 적합하다. 예를 들어 막관통 채널 또는 세포 표면 수용체의 다수의 세포막 루프는 동일한 이중특이성 결합 분자에 의해 표적화될 수 있다.

[0110] 면역 억제를 초래하는 면역 신호의 부정적 조절자를 클러스터링하고 활성화하는 2개의 결합 모이어티를 포함하는 이중특이성 결합 단백질이 만들어질 수 있다. 표적들이 동일 세포 상에 있는 시스에서 리프레션(Repression)이 달성될 수 있고; 표적들이 다른 세포 상에 있는 트랜스에서 리프레션이 달성될 수 있다. 시스에서 리프레션은, 예를 들어 항-IgGRIIb 결합 모이어티 및 항-FcγR1 결합 모이어티를 가지는 이중특이성 결합 단백질에 의해 달성될 수 있는데, IgGRIIb는 FcγR1에 대한 면역 반응을 하향-조절하기 위해서 FcγR1의 존재하에서만 클러스터링된다. 트랜스에서 리프레션은, 예를 들어 항-BTLA 결합 모이어티 및 관심의 조직-특이적 항원과 특이적으로 결합하는 결합 모이어티를 가지는 이중특이성 결합 단백질에 의해 달성될 수 있는데, 억제 BTLA 분자의 클러스터링은 잠재적으로 자가 면역 질환을 다루는 선택된 표적 조직에서만 일어난다.

[0111] 복수의 구성요소 수용체를 활성화하는 이중특이성 결합 단백질이 만들어질 수 있다. 이 설계에서, 수용체 결합의 두 구성요소에 지시된 2개의 결합 모이어티는 수용체와 교차 결합하고, 수용체로부터의 신호전달을 활성화한다. 이것은, 예를 들어 IFNAR1과 결합하는 결합 모이어티 및 IFNAR2와 결합하는 결합 모이어티를 가지는 이중특이성 결합 단백질을 사용하여 행해질 수 있으며, 결합은 수용체와 교차 결합이다. 이러한 이중특이성 결합 단백질은 인터페론 치료에 대한 대안을 제공할 수 있다.

- [0112] 반투과성 장벽, 예를 들어 혈액-뇌 장벽을 가로질러서 결합 모이어티를 운반하는 이중특이성 결합 단백질이 만들어질 수 있다. 이 설계에서, 한 결합 모이어티는 특정의 선택적 장벽을 통과할 수 있는 표적과 결합할 수 있고; 다른 결합 모이어티는 치료적 활성이 있는 분자를 표적으로 하며, 치료 활성이 있는 표적 분자는 보통 장벽을 가로지를 수 없다. 이런 이중특이성 결합 단백질의 종류는 치료제가 다른 방법으로 도달하지 않는 조직에 대한 치료에 유용하다. 일부 예는 치료제를 장 또는 폐에 운반하기 위한 pIGR 수용체를 표적화하고, 또는 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 치료제를 운반하기 위한 트랜스페린 수용체를 표적화하는 것을 포함한다.
- [0113] 특이적 세포 또는 세포 종류에 결합 모이어티를 운반하는 이중특이성 결합 단백질이 만들어질 수 있다. 이 설계에서, 한 결합 모이어티는 세포에 용이하게 내재된 세포 표면 단백질(예를 들어, 수용체)을 표적화한다. 다른 결합 모이어티는 세포내 단백질을 표적화하며, 세포내 단백질의 결합은 치료적 효과를 초래한다.
- [0114] 식세포 면역 세포의 표면 수용체 및 감염성 병원체(예를 들어, 효모 또는 박테리아)의 표면 분자와 결합하는 이중특이성 결합 단백질은 식세포 면역 세포의 부근에 감염성 병원체를 가져오고, 병원체의 식세포 작용을 용이하게 한다. 이러한 설계의 예는 CD64 또는 CD89 분자 및 또한 병원체를 표적화하는 이중특이성 항체이다.
- [0115] 이중특이성 결합 단백질은 한 결합 모이어티로서 항체 가변 영역을 가지고, 제2 결합 모이어티로서 비-Ig 모이어티를 가진다. 항체 가변 영역은 표적화를 달성하는 반면, 비-Ig 모이어티는 이펙터 또는 Fc와 연결된 독소이다. 이 방법에서, 리간드(예를 들어, 이펙터 또는 독소)는 항체 가변영역에 의해 결합되는 표적에 전달된다.
- [0116] 이중특이성 결합 단백질은 Ig 영역에 각각 결합하는 2개의 모이어티를 가지며(예를 들어, CH2 및 CH3 영역을 함유하는 Ig 서열), 임의의 두 단백질 모이어티는 Fc에 대해서 서로의 부근에 도입될 수 있다. 이 설계의 예는 트랩, 예를 들어, 호모- 또는 헤테로다이머 트랩 분자를 포함한다.
- [0117] **핵산**
- [0118] 단클론성 항체들을 암호화하는 핵산 서열은 당업계에 공지된 임의의 적당한 방법에 의해 얻어질 수 있다. 단클론성 항체(및 그것의 핵산 서열)를 얻기 위한 적당한 방법의 예는, 예를 들어 하이브리도마 방법(예를 들어, Kohler et al. (1975) Nature 256:495-497 참조) 또는 파지 항체 라이브러리(예를 들어, Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628 참조)를 포함한다.
- [0119] 다양한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 유전적으로 변형된 동물 또는 유전자 이식 동물의 핵산 서열로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 영역은 인간 면역글로불린 미니로커스(minilocus)를 포함하는 동물로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 영역은 면역글로불린 서열을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 하나 이상의 염색체의 핵산을 포함하는 마우스로부터 유래된다. 다양한 구체예에서, 동물은 하나 이상의 재배열되지 않는 인간 면역글로불린 핵산 서열을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 동물은 인간 경쇄 가변영역 핵산 서열, 일부 구체예에서 인간 중쇄 가변 서열, 일부 구체예에서 중쇄와 경쇄 가변 서열을 둘 다 포함하고, 일부 구체예에서 인간 불변 영역 서열을 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 핵산 서열은 내인성 마우스 중쇄 가변 유전자 절편 및 경쇄 가변 유전자 절편이 인간 중쇄 가변 유전자 절편 및 경쇄 가변 유전자 절편으로 치환된 마우스로부터 유래된다.
- [0120] 일부 구체예에서, 핵산 서열은 이러한 동물의 나이브(naive) B 또는 T 세포로부터 유래된다. 다른 구체예에서, 핵산 서열은 관심의 항원으로 면역화된 동물의 B 또는 T 세포로부터 유래된다.
- [0121] 다양한 구체예에서, 핵산 서열은 그것들을, 예를 들어 퇴화 프라이머의 세트를 포함하는 프라이머로 증폭함으로써 세포로부터 유래되며, 하나 이상의 FR, 결합, 또는 불변 서열을 포함한다.
- [0122] 다양한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄 가변 도메인은 관심의 항원으로 면역화된 동물의 핵산으로부터 유래된다. 예를 들어 비-인간 유전자이식 또는 유전적으로 변형된 동물은 관심의 항원으로 면역화되며(예를 들어, 동물을 항원 또는 항원을 함유하는 세포 또는 항원의 발현가능한 형태를 암호화하는 핵산에 노출), 동물이 면역반응을 받도록 하고, 면역 세포를 동물로부터 분리하고, 선택적으로 세포를 불멸화하고, 항원과의 반응성을 확인하기 위한 세포를 스크리닝하고 및/또는 항체에 대해 배치될 때 항원을 인식할 수 있는 면역글로불린 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 확인 및/또는 분리한다. 일부 구체예에서, 세포는 B 세포이다. 일부 구체예에서, 면역화된 동물의 B 세포는 하이브리도마를 만드는데 사용될 수 있고, 항원의 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체를 발현하는 B 세포가 확인되고, 에피토프를 인식하는 가변 영역 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열이 확인되고 및/또는 분리된다.
- [0123] 일부 구체예에서, 핵산은 인간, 비-인간 영장류(예를 들어, 침팬지와 같은 유인원), 원숭이(예를 들어, 시노모

로고스(cynomologous) 또는 레소스(rhesus)), 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터), 당나귀, 염소, 양 등으로부터 유래된다.

[0124] 일부 구체예에서, 중쇄는 인간 세포로부터 유래된 서열을 포함한다. 예를 들어, 인간 태아 세포는 시험관내에서 항원에 노출되고, 적당한 숙주 동물에 위치된다(예를 들어, SCID 마우스).

[0125] 일부 구체예에서, 핵산은 벡터를 사용하여 세포에 도입된다. 벡터는, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 레트로 바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 식물 바이러스, YAC, BAC, EBV-유래 에피솜을 포함한다.

[0126] 일부 구체예에서, 핵산은 발현 벡터 또는 발현 구성체 중에서 존재한다. 일부 구체예에서, 발현 벡터 또는 구성체는 관심의 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유하여, 관심의 핵산 서열은 적당한 세포 내에서 적당한 조건 하에 발현될 수 있다. 발현 벡터 또는 구성체는 전사 또는 번역, 전사 정지 서열, 스플라이싱 서열, 전사-촉진 인트론, IRES 요소, 마커 유전자, 선택 서열, 재조합효소 인식 자리, 상동성 암(arm), 바이러스 서열, 오퍼레이터(예를 들어, 원핵세포 오퍼레이터) 등을 향상시키는 리더 서열, 인핸서, 프로모터 요소를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 발현 벡터는 유도성 발현을 허용하는 요소, 예를 들어 진핵 프로모터에 작동가능하게 연결된 원핵세포 오퍼레이터를 포함한다. 일부 구체예에서, 발현은 발현 인두서의 첨가시 유발된다. 다른 구체예에서, 발현은 발현 억제제의 제거 시 유발된다. 일부 구체예에서, 발현은 온도 변화에 의해 유발된다.

[0127] 일부 구체예에서, 하나 이상의 중쇄 뉴클레오티드 서열은 동일한 벡터 상에 있다. 일부 구체예에서, 본원의 중쇄 핵산 서열 및 경쇄 핵산 서열은 동일한 벡터 상에 있다. 한 구체예에서, 두 중쇄 핵산 서열 및 경쇄 핵산 서열은 동일한 벡터 상에 있다.

[0128] 일부 구체예에서, 핵산은 바이러스로부터 하나 이상의 핵산을 포함하는 세포 중에서 발현된다. 특정 구체예에서, 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, SV-40, 엡스테인-바르 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 바쿨로바이러스, 코로나바이러스, 단순포진바이러스, 폴리오바이러스, 쉘리키삼립열바이러스, 신드비스 바이러스 및 백시니아 바이러스로부터 선택된다.

[0129] 숙주 세포는 관심의 핵산을 발현하도록 형질변환될 수 있는 세포이다. 다양한 구체예에서, 형질변환은 세포의 핵산 함량을 변화시키는 것을 포함하는데, 이는 외인성 핵산(예를 들어, 천연에서 세포 중에서 발견되지 않는 핵산, 또는 천연에서 세포 중에서 발견되는 핵산 서열과 대응하는 핵산의 하나 이상의 추가적인 복제물)을 함유한다. 세포의 핵산 함량은 당업계에 알려진 임의의 적당한 방법에 의해, 예를 들어 세포의 게놈에 핵산을 통합함으로써 또는 염색체 외 또는 게놈 외 형태로 세포 중에 그것을 위치시킴으로써 변화될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포의 핵산 함량은 세포가 일시적으로 관심의 핵산을 발현시키도록 변화될 수 있고, 또는 핵산 함량은 세포가 관심의 핵산을 안정하게 발현시키도록 변화될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포의 유전적 함량의 변화는 세포가 분할될 때 이어진다.

[0130] 이종특이성 항원-결합 단백질의 분리

[0131] 일단 적당한 세트의 변형이 본원의 정보를 기반으로 선택되었다면, 당업계에 알려진 방법을 사용하여 이종특이성 항원-결합 단백질을 분리하도록 시도되었다. 단지 공개된 방법을 적용하는 것은, 모든 상황에서 만족스러운 분리를 제공하지 않았다.

[0132] Lindhofer 등은 단백질 A (마우스 IgG)와 결합한 하나의 중쇄 및 (래트 IgG)가 아닌 하나의 중쇄를 가지는 헤테로다이머 중쇄를 가지는 이종특이성 항체를 만들었고, 마우스/마우스 및 래트/래트 다이머의 항체생산물합세포 혼합물로부터 래트/마우스 헤테로다이머 이종특이성 항체를 중성 내지 pH 5.8의 pH 단계 구배로 분리하여 헤테로다이머를 용리한 다음, 5.8 내지 3.5의 pH 단계로 마우스/마우스 호모다이머를 용리하였다. (Lindhofer et al. (1995) Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas: Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. J. Immunol. 155(1):219-225. 참조)

[0133] Lindhofer 접근은 2개의 IgG1 중쇄를 가지는 IgG1 헤테로다이머로부터 IgG1 호모다이머를 분리하는 것에 적용될 때 실패하였는데, 이는 IgG1 CH3 도메인 중 하나가 H435R/Y436F 디펩티드 변형을 함유하였다는 사실을 제외하고 동일하였다. 본 발명자들은 선행 pH 구배에서, 디펩티드-변형된 IgG1이 약 pH 3.9에서 용리된 반면, IgG1 호모다이머가 약 pH 3.7에서 용리되었다는 것을 발견하였다. 이 pH 차이는 Lindhofer 방법을 사용하여 호모다이머로부터 헤테로다이머의 만족스러운 분리를 달성하기에 불충분한 것으로 생각되었다. 이 차이는 예측가능한 방법으

로 재생될 수 없었다.

[0134] 크로마토그래피 거동의 변화는 특정 pH 단계 또는 구배를 유지하는데 필요로되는 버퍼 강도에 의해 원인이 되는 비교적 실질적인 이온 강도를 사용한 크로마토그래피 실행에서 관찰되었다. 그러나 유기 변경제(1-프로판올)를 첨가하는 것에 의해 만족스러운 분리는 수행되지 않았다. 대신, 다소 놀랍게도 일부 크로마토그래피 실행에 대해 호모다이머 IgG1 및 헤테로다이머 IgG1의 극적이고 예상치못하게 개선된 분리를 0.5 몰 내지 1.0 몰 이온 변경제(예를 들어, NaCl)의 첨가로 수행한다. 이온 변경제 첨가는 용리를 위한 pH 범위를 넓혀서(이온 변경제에 의해 1.2 pH 단위이지만, 이온 변경제가 없으면 0.2 pH), pH 단계 구배는 2종류를 성공적으로 분리할 수 있었다. 그러나 다른 실행에서, 만족스러운 분리는 단지 약 150 mM의 NaCl 농도로 달성되었다(실시예 4 참조). 만족스러운 분리가 달성될 수 있도록 보장하기 위해서, 한 구체예에서 이중특이성 항체-결합 단백질의 분리는 약 0.5 내지 약 1.0 몰 이온 변경제의 존재하에서 만들어진다.

[0135] 따라서, 한 구체예에서, 본원에서 설명되는 변형을 포함하는 하나의쇄를 가지는 헤테로다이머 IgG를 포함하는 이중특이성 항원-결합 단백질을 분리하는 방법은 이온 변경제의 존재하에서 pH 구배를 사용하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 이온 변경제는 IgG 호모다이머의 단백질 A 지지체로부터 용리와 본원에서 설명되는 IgG 헤테로다이머(즉, CH3 변형(들)) 사이의 pH 차이를 최대화하기에 충분한 농도에서 존재한다. 특정 구체예에서, 이온 변경제는 약 0.5 내지 약 1.0 몰의 농도에서 존재한다. 다른 특정 구체예에서, 이온 변경제는 약 0.15 내지 약 0.5 몰의 농도에서 존재한다.

[0136] 한 구체예에서, 이온 변경제는 염이다. 한 구체예에서, 이온 변경제는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 및 할로겐의 염이다. 특정 구체예에서, 염은 알칼리금속 또는 알칼리 토금속의 염소염, 예를 들어, NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂이다. 특정 구체예에서, 염은 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 또는 1.0의 몰농도로 존재한다.

[0137] 한 구체예에서, pH 구배는 약 pH 3.9 내지 약 pH 4.5, 다른 구체예에서, 약 pH 4.0 내지 약 pH 4.4., 및 다른 구체예에서 약 pH 4.1 내지 약 pH 4.3이다. 특정 구체예에서, 구배는 선형 구배이다.

[0138] 한 구체예에서, pH 구배는 단계 구배이다. 한 구체예에서, 본 방법은 평형화된 단백질 A 컬럼(예를 들어, PBS 또는 다른 적당한 버퍼 또는 액체 중에서 평형화됨)에 약 pH 3.9, 약 pH 4.0, 약 pH 4.1, 약 pH 4.2, 약 pH 4.3, 또는 약 pH 4.4의 단계를 적용하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 단계는 약 pH 4.2이다.

[0139] 한 구체예에서, 헤테로다이머 IgG CH3 도메인을 포함하는 이중특이성 항체는 비-헤테로다이머 IgG가 실질적으로 없는 하나 이상의 분획에서 단백질 A 지지체로부터 용리한다. 특정 구체예에서, 용리된 이중특이성 항체 분획(들)은 비-헤테로다이머 항체인 총 단백질의 약 1중량%, 0.5중량%, 또는 0.1중량% 미만을 포함한다.

[0140] 실시예

[0141] 하기 실시예는 본 발명의 조성물을 만들고 사용하는 방법을 당업자에게 설명하기 위한 목적이고, 본 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 사용한 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)에 대해 정확성을 보장하기 위한 노력이 있었지만, 일부 실험적 오류 및 편차는 설명되어야 한다. 달리 지시되지 않는다면, 부분은 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨이고, 압력은 대기압 또는 대기압 근처이다.

[0142] 실시예 1: 이중특이성 IL-4Ra/IL-6Ra 항원-결합 단백질

[0143] 인간 IgG1 이소형의 2개의 알려진 항체, IL-4Ra에 대해 하나 및 IL-6Ra에 대해 하나는 단지 4개의 아미노산에 의해 차이가 있는 경쇄를 가진다는 것을 발견하였다. 공동-발현 실험은 항-IL-4Ra 항체의 경쇄가 IL-6Ra의 경쇄로 치환되고, 여전히 IL-4Ra에 높은 친화도를 유지하고, 따라서 항-IL-4Ra 중쇄 및 항-IL-6Ra 중쇄 및 동일한 경쇄를 사용하여 이중특이성 항체를 만들 수 있게 하는 것으로 나타났다. 따라서, IL-6Ra 항체의 중쇄는 Fc△Adp 형태로 변형시켰다(즉, IMGT 엑손 넘버링에 의한 CH3 디펩티드 변형 H95R/Y96F).

[0144] 항-IL-6Ra 경쇄를 이어서 CHO 세포 중에서 항-IL4Ra/Fc 및 항-IL6Ra/Fc△Adp 중쇄와 함께 공동발현시켰고, 이 세포들로부터의 조정배지를 단백질 A 크로마토그래피 하였다. 호모-와 헤테로다이머의 혼합물을 함유하는 세포상청액이 있는 단백질 A 컬럼을 장악한 후, 2가지 버퍼의 조합을 변화시킴으로써 만들어진 pH 단계 구배로 용리를 수행하여(A: 100 mM Na 시트레이트, 150mM NaCl, pH 6.0, 및 B: 100 mM Na 시트레이트, 150 mM NaCl, pH 3.0; 도 4 참조) pH 6.0, pH 4.2, 및 pH 3.0, 각각에서 3개의 상을 만들었다. 도 4에서, IL-4R은 항-IL-4Ra를 나타내고, IL-6R△는 항-IL-6Ra(IgG1△Adp)를 나타낸다. 표시된 컬럼 분획을 IL-6Ra 및 IL-4Ra 단백질과 결합에 대해 분석하였다(도 5). 단계 용리를 수행하여, pH 4.2에서 용리하는 하나의 피크 및 pH 3.0에서 제2 피크를

생기게 하였다(도 4). BIACORE™ 분석은 예상한 바와 같이 플로우-스루(flow-through) 물질이 가용성 IL-6Ra에 결합할 수 있지만, IL-4Ra에는 결합하지 않는다는 것을 나타내었다(도 5). pH 4.2 피크에 대응하는 분획을 헤테로다имер로 구성되는 대략 동일한 양의 IL-6Ra 및 IL-4Ra에 결합할 수 있었다. pH 3.0에서 용리하는 피크는 단지 IL-4Ra와 결합하지만, 기대된 항-IL-4Ra 호모다имер에 대응하는 IL-6Ra에는 결합하지 않는다. 이것은 헤테로다имер 이중특이성 항체가 간단한 pH 단계 구배로 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 효과적으로 분리될 수 있다는 것을 확립한다.

[0145] 실시예 2: Fc△Adp 단백질의 약물동력학

[0146] Fc△Adp 변형이 헤테로다имер Fc/Fc△Adp 함유 분자의 약물동력학에 영향을 미치는지 여부를 시험하기 위해서, 마우스를 상기 설명한 항-IL-4Ra/항-IL-6Ra의 정제된 헤테로다имер 종으로 주사하였고, 혈청 중의 인간 면역글로불린의 농도를 28일의 기간에 걸쳐 측정하였다(도 6; 표 1). 헤테로다имер의 혈청 반감기는 야생형과 유사한 약 10일이었다. 이는 Fc△Adp 변형이 혈청 반감기에서 검출가능한 효과를 가지지 않는다는 것을 확립한다.

표 1

약물동력학 (n = 5)	
약물	시험한 반감기 (D일) (평균±표준편차)
IL-6RD/IL-4R	11.2 ± 1.8
IL-6RD/IL-6RD	10.8 ± 1.9
IL-4R/IL-4R	10.8 ± 1.9
대조군	11.2 ± 1.9

[0148] 실시예 3: 이중특이성 CD20/CD3 항원-결합 단백질

[0149] 알려진(활성화하는) 항-인간 CD3 항체의 경쇄와 함께 공동-발현될 때, 알려진 항-인간 CD20 항체의 중쇄는 여전히 CD20에 결합할 수 있다는 것을 발견하였다. 이어서 항-CD3 경쇄를 항-CD20/Fc 중쇄, 항-CD20/Fc 중쇄, 또는 중쇄 둘다와 함께 공동-발현하였다. 호모- 및 헤테로다имер의 결과의 혼합 모집단을 이어서 생분석에서 사용하여 CD20 발현 표적 세포를 사멸시키는 능력을 결정하였다(도 7). 간략하게, 2×10^7 인간 PBMC 세포를 72 시간 동안 6×10^7 CD3 x CD28 비드(Invitrogen)와 함께 활성화하였다. 이어서 IL-2 (R & D Systems)의 30 유닛을 첨가하였고, 세포를 추가 24시간 동안 인큐베이팅하였다. 이어서 세포를 0.5×10^6 /mL의 농도에서 분할하였고, 추가 30U IL-2를 첨가하였다. 이어서 세포를 추가 48시간동안 인큐베이팅하였고 생분석에서 사용하였다. 표적 세포(Raji)를 발현시키는 생분석 2×10^6 /mL CD20의 날에 8uM calcein-AM (Invitrogen)으로 30분 동안 표지하였다. 세척한 표적 세포를 상청액을 함유하는 항체의 표시량과 함께 200마이크로리터의 총 부피로 표적:이펙터 세포(웰 당 220,000 총 세포)의 1:10 비율에서 활성화된 hPBMC 세포에 첨가하였다. 세포를 2시간 동안 인큐베이팅하였고 상청액을 수집하였고, 형광을 정량화하였다. 세포독성을 최대 형광에 대한 특이적 형광의 비율을 계산함으로써 측정하였다. CD20 항체 단독(항-CD3 경쇄를 사용)도, 항-CD3 항체도 표적 세포의 사멸을 유발할 수 없었고; 심지어 두 시약을 혼합해도 효과는 없었다. 그러나, 3가지 성분 모두를 공동-발현시켰을 때, 상당한 사멸을 관찰하였고, 효과가 헤테로다имер의 이중특이성 중에 기인한다는 것을 나타낸다. 일시적으로 트랜스펙션된 CHO 세포 상청액 중의 이중특이성 항체의 추정량을 기반으로 이 효과에 대한 EC₅₀은 약 15 pM이 되는 것으로 추정하였다.

[0150] 실시예 4: 정제된 이중특이성 CD20/CD3 항원-결합 단백질에 의한 세포 사멸 특이성

[0151] 실시예 3에서 설명한 바와 같은 트랜스펙션으로부터 CHO 세포 상청액을 용리를 위한 단계 구배를 이용하여 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 하였다. 단계 구배를 2개의 버퍼의 조합을 변화시킴으로써 만들어서(A: 20 mM Na 시트레이트, 1M NaCl, pH 5.2; B: 20 mM Na 시트레이트, 1M NaCl, pH 2.7) 각각 pH 5.2, pH 4.2, 및 pH 2.8에서 3 단계를 만들었다. 이어서 pH 4.2에서 피크 용리로부터 단백질을 실시예 3에서 설명한 바와 같은 세포 사멸 분석에서 사용하였다. 표적 세포 사멸을 3 pM의 EC₅₀에서 관찰하였다(도 8). 추가적인 세포독성 분석을 수행하여 관찰한 사멸의 표적 특이성을 시험하였다. 이 실험에서, CD20 (Raji)을 발현시키는 또는 CD20 (293)이 없는 표지된 표적 세포를 활성화한 인간 PBMC로 인큐베이팅하였다. 각 표적 세포 종류를 단독으로 또는 다른 종류의 표

지하지 않은 표적 세포와 조합하여 분석에 첨가하였다. 모든 경우에, CD20 발현 표적 세포를 3 pM의 EC50과 함께 특이적으로 사멸시킨 반면, CD20 네가티브 셀라인은 사멸시킬 수 없었다.

[0152] **실시예 5: 다르게 변형된 hIgG2 Fc의 단백질 A 분리**

[0153] 다르게 변형된 헤테로다이머 인간 IgG2 Fc/ Δ AdpFc 및 비변형 인간 호모다이머 IgG2 Fc/Fc를 우선 단백질 A 컬럼(rProtein A FF, GE)을 통해 결합-및-세척 처리로써 풍부하게 했다. hIgG2 Fc/Fc로부터 hIgG2 Fc/ Δ AdpFc를 추가로 분리하기 위해, 단계-구배 용리를 다음과 같이 SMART™ 시스템(GE)을 사용하여 수행하였다. 용매 시스템은 용매 A(PBS, 1X), 용매 B (20 mM 시트르산나트륨 및 1 M NaCl, pH 5.5) 및 용매 C (20 mM 시트르산나트륨 및 1M NaCl, pH 2.5)로 구성된다. 용리는 처음 20분에 100% A 등용매용리로 시작한 다음 20분에 100% B로 빠르게 전환하였다. 33.5% C 및 66.5% B로 선형 구배를 다음 10분에 걸쳐 개시하였고; C의 33.5%의 농도를 제1 피크의 완전한 용리까지(Fc/ Δ AdpFc) 20분 동안 유지하였다. 33.5 % C 내지 100% C의 선형 구배를 30분 동안 따랐다. 유속을 250마이크로리터/분을 유지하였고, 크로마토그램을 UV 검출기에 의해 280nm에서 검출하였다. hIgG2 Fc/ Δ AdpFc는 pH 4.5에서 용리한 반면, hIgG2는 pH 3.5에서 용리하였다.

[0154] **실시예 6: 다르게 변형된 hIgG4 Fc의 단백질 A 분리**

[0155] 다르게 변형된 헤테로다이머 인간 IgG4 (Fc/ Δ AdpFc) 및 비변형 호모다이머 IgG4 (Fc/Fc)를 우선 단백질 A 컬럼(rProtein A FF, GE)을 통해 결합-및-세척 처리에 의해 풍부하게 하였다. hIgG4 Fc/Fc로부터 hIgG4 Fc/ Δ AdpFc를 추가로 분리하기 위해, 단계-구배 용리를 다음과 같이 SMART™ 시스템을 사용하여 수행하였다. 용매 시스템은 용매 A (PBS, 1X), 용매 B (20 mM 시트르산나트륨 및 1 M NaCl, pH 5.1) 및 용매 C (20 mM 시트르산나트륨 및 1M NaCl, pH 2.8)로 구성된다. 용리는 처음 20분에 100% A로 등용매용리에 의해 시작한 다음 20분에 100% B로 빠르게 전환하였다. 50% C 및 50% B로 선형 구배를 다음 10분에 걸쳐 개시하였고; C의 50%의 농도를 제1 피크의 완전한 용리까지(Fc/ Δ AdpFc) 20분 동안 유지하였다. 유속을 250마이크로리터/분을 유지하였고, 크로마토그램을 UV 검출기에 의해 280nm에서 검출하였다. hIgG4 Fc/ Δ dpFc는 pH 4에서 용리한 반면, 호모다이머는 pH 4 내지 pH 2.8의 구배 동안 용리하였다.

[0156] **실시예 7: 다르게 변형된 hIgG1 CD3xCD20의 단백질 A 분리**

[0157] 다르게 변형된 헤테로다이머 항-hCD3xCD20 IgG1 (Fc/ Δ AdpFc) 및 비변형 호모다이머 항-hCD20를 다음과 같이 1 mL rProtein AFF (GE Biosciences)에서 분리하였다. 용매 시스템은 버퍼 A1 (PBS 1X), 버퍼 A2 (20 mM 시트르산나트륨 및 1 M NaCl pH 5.1), 버퍼 B (20 mM 시트르산나트륨 및 1 M NaCl pH 2.8)이었다. 혼합한 샘플을 결합하였고 PBS 및 버퍼 A2로 세척하였다. 4.2의 pH를 얻기 위한 단계를 사용하고, 이중특이성 CD3*xCD20 IgG1 (Fc/ Δ AdpFc)를 용리한 다음, pH 4.2 내지 pH 2.8의 선형 구배로 호모다이머 항-hCD20 IgG1을 용리하였다.

[0158] **실시예 8: Fc 수용체로 변형된 CH3의 결합 친화도**

[0159] 다양한 인간 Fc 수용체에서 Δ Adp 변형(H435R 및 Y436F, EU 넘버링)을 가지는 인간 IgG1 이소형 이중특이성 항체의 결합 친화도를 Biacore™ 정상상태 평형상태 결합 분석에서 시험하였다.

[0160] 간략하게, 아민-커플링된 항-펜타-his mAb (Qiagen)를 가지는 카르복시메틸화된 텍스트란(CM5) 칩을 인간 Fc 수용체의 다양한 구성체를 포획하기 위해 사용하였다. 다음의 his-태그된 Fc 수용체 엑토도메인을 다른 항-펜타-his-코팅된 CM5 칩의 표면에 결합하였다: Fc γ RI, Fc γ RIIA(R131 다형체), Fc γ RIIB, 및 Fc γ RIIIB (각각 R&D Systems으로부터 얻음); 및 Rc γ RIIA(H131 다형체), Fc γ RIIIA(V176 다형체), 및 Rc γ RIIIA(F176 다형체) (각각 Regeneron에서 만들어짐). 항체들을 고친화도 수용체 Fc γ R1 엑토도메인(25 nM, 50 nM, 및 100 nM)에 대해 3가지의 농도에서, 저친화도 Fc γ R 수용체 엑토도메인에 대해 5 마이크로몰 내지 39 나노몰에서 통과시켰고, 결합 및 해리 속도 상수(k_a 및 k_d) 값을 결정하였고, 항체에 대해 평형해리 상수(K_D)를 계산하기 위해 사용하였다. 결합연구를 pH 7.2에서 HBS-T 버퍼를 사용하여 실온에서 수행하였고, K_D 는 대조군 항체 (hmAb), 항-CD20, 및 항-CD3 Δ dp 변형, 및 CD20xCD3 Δ dp 이중특이성 항체에 대해 결정하였다. 항-CD3 Δ dp 항체에 대한 K_D 값은 비변형 hIgG1 이소형 항체와 비교하여 임의의 Fc 수용체에서 결합에 유의한 차이가 없다는 것을 나타내었다(표 2).

표 2

hFcRn 엑토도메인에 hIgG Abs의 결합을 위한 K_D (nM)				
hFcR	인간 IgG1 호모다이머		인간 IgG1 DAdp	
	hmAb	CD20-hFc	CD3-hFc △Adp 호모다이머	이중특이성 CD20xCD3 △Adp 헤테로다이머
FcγR1	5.00	4.27	3.17	3.61
FcγRIIA(R131)	1,460	739	588	328
FcγRIIA(H131)	915	458	451	222
FcγRIIB	3,400	1,850	1,360	794
FcγRIIIA(V176)	810	430	218	248
FcγRIIIA(F176)	2,500	533	407	267
FcγRIIIB	3,700	1,170	906	520

실시예 9: hFcRn 마우스에서 이중특이성 hIgG1△Adp의 약물동력학

이중특이성 항-hCD3/hCD20 IgG1△Adp 항체 및 그것의 항체 관련 대조군(항-hCD3 IgG 및 항-hCD3 IgG△Adp 호모다이머)의 약물동력학 클리어런스율을 야생형(WT) 마우스 및 마우스 FcRn의 hFcRn 유전자로 치환을 위한 마우스 동형접합성(hFcRn 마우스)에서 결정하였다. 야생형 및 hFcRn 마우스는 C57BL/6 (75%) 및 129Sv (25%)를 함유하는 배경과 함께 품종간 교잡종(cross-bred) 군주로부터 나온다. 이소형의 IgG1 매칭된 대조군 항체를 받은 WT 마우스 중 한 코호트(cohort)의 경우를 제외하고, 코호트는 WT 또는 hFcRn 마우스 중에서 각각 4개를 함유하였다. 마우스는 이소형-매칭된(hIgG1) 대조군, 항-hCD3xCD20 IgG1△Adp 이중특이성, 항-hCD3 IgG1, 또는 항-hCD3 IgG1△Adp△ 호모다이머의 1mg/kg을 받았다. 모든 시험 항목을 피하로 투여하였다. 혈액을 0시간, 6시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 7일, 10일, 14일, 21일, 및 30일에 수집하였다.

인간 항체들의 혈청 수준을 샌드위치 ELISA에 의해 결정하였다. 간략하게, 염소 다클론성 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체(Jackson ImmunoResearch)를 1 마이크로그램/mL의 농도에서 96-웰 플레이트 중에서 코팅하였고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 BSA로 차단한 후, 6-용량 연속 희석으로 혈청 샘플 및 12-용량 연속 희석에서 각 항체의 기준 표준을 플레이트에 첨가하였고, 실온에서 한 시간 동안 인큐베이션하였다. 비결합 항체로 희석 후, 포획한 인간 항체들을 겨자무과산화효소(HRP) (Jackson ImmunoResearch)와 콘쥬게이트한 동일한 염소 다클론성 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체를 사용하여 검출하였고, 제조업자의 추천에 따라서 표준 비색분석 테트라메틸벤지딘(TMB)에 의해 개발하였다. 450 nm에서 흡광도를 플레이트 판독기에서 기록하였고, 혈청 샘플 중의 hIgG의 농도를 샘플 플레이트에서 만들어진 기준 표준 곡선을 사용하여 계산하였다.

시험한 30일의 기간에 걸쳐 4개의 IgG1 항체의 혈청 반감기에서 상당한 차이가 없음을 관찰하였다. 특히, △Adp 변형 및 야생형 IgG1 항체를 가지는 IgG1 항체 사에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 야생형(mFcRn) 마우스 또는 인간화된 FcRn (hFcRn)를 가지는 마우스 중 하나에 의해 항체 사이에 관찰된 차이는 없었다. 예상한 바와 같이, hFcRn 마우스는 야생형 마우스보다 약간 더 빠른 클리어런스를 나타내었다. 결과를 표 3에 나타낸다.

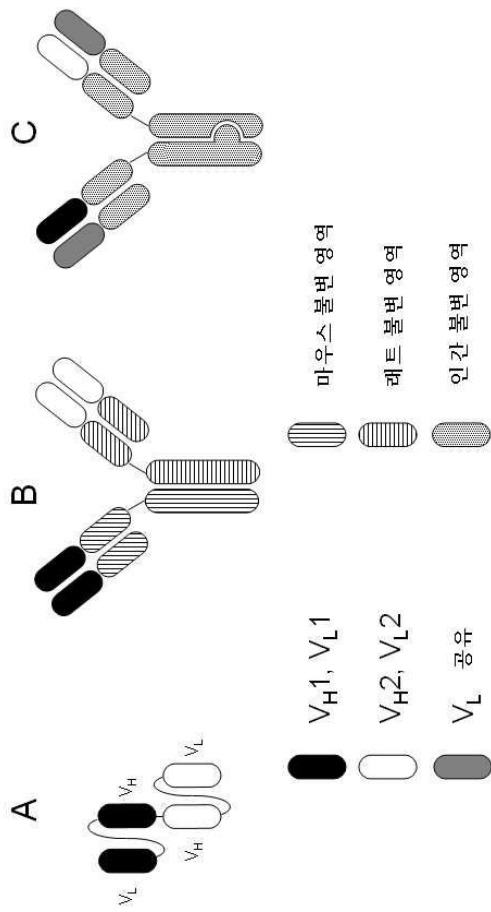
표 3

마우스에서 피하 주입 후 평균 PK 모수추정				
마우스 유전자형	항체	n	C_{max} (mcg/mL)	AUC ((hr)(mcg/mL))
mFcRn	CD3xCD20	4	9.0±2.3	114.3±30.6
	CD3	4	11.1±1.7	175.4±56.4
	CD3DAdpDAdp	4	11.7±1.8	155.3±34.02
	대조군 hIgG	3	15.1±3.01	162.5±27.02
hFcRn	CD3xCD20	4	12.3±0.98	83.2±18.6
	CD3	4	7.7±2.2	65.2±16.5
	CD3DAdpDAdp	4	9.9±1.34	70.4±15.4
	대조군 hIgG	4	16.1±2.7	131.3±20.4

- [0167] **실시예 10: 저-염 버퍼에서 대규모 배양물(large-scale culture) 분리**
- [0168] 이중특이성 CD3xCD20△Adp 항체를 대규모 배양물로부터 본 발명에 따라서 분리하였다. 간략하게, 이중특이성 항-hCD3xCD20△Adp (CD3 중쇄에서 변형) 항체를 발현시키는 CHO-K1 셀라인을 11-리터 생반응기에서 배양하였다. 이중특이성 항체를 함유하는 세포는 약 8.25×10^6 세포/mL의 밀도로 성장하여, 약 250-350 mg 항체/L를 수득하였다. 대조적으로, 대조군 항-hCD3 항체는 약 100-150 mg/L를 수득하였다.
- [0169] 항체를 10mM 인산나트륨, 0.5 M NaCl로 평형상태로 만든 MabSelect SuRe™ 수지(GE) (20 cm bed height, 1 cm ID) 상에서, pH 7.2에서 분리하였고, 19 g/L로 장악한 세포 배양물을 정제하였고, 컬럼을 3 컬럼 부피의 10 mM 인산나트륨, 0.5 M NaCl, pH 7.2로 세척한 다음, 2 컬럼 부피의 20 mM 인산나트륨, pH 7.2 (NaCl 없음)으로 세척하였다. 항체를 40 mM 아세트이트, pH 3.0으로 용리하였다.
- [0170] 단일특이성 항-CD30 항체를 pH 3.6에서 용리한 반면, 이중특이성 항-hCD3xCD20△Adp를 pH 4.4에서 용리하였다.
- [0171] **실시예 11: 약한 pH로 마우스 헤테로다имер의 선택적 단백질 A 용리**
- [0172] CHO-K1 세포를 야생형 또는 돌연변이체(TTTK 또는 PTTK) mIgG2a Fc와 융합된 인간 IFNAR1 (hIFNAR1) 및 인간 IFNAR2 (hIFNAR2) 세포막 도메인에 대한 발현 구성체로 일시적으로 트랜스펙션하였다. hIFNAR1-mFc과 hIFNAR2-mFc 사이의 비율을 2개의 발현 플라스미드의 동일한 양으로 트랜스펙션한 세포에 의해 1:1에서 유지하였다. 배양 배지를 트랜스펙션 4일 후에 수집하였고, 0.2 mL NAB 단백질 A Plus™ 스핀 컬럼(Thermo Scientific/Pierce)을 사용하여 단백질 A 정제를 받게 하였다. 간략하게, 컬럼을 1x PBS, pH 7.2로 평형상태를 유지하였다. 1mL의 CHO-K1 배양물 배지를 실온에서 10분 동안 단백질 A 수지로 인큐베이팅하였다. 이어서 컬럼을 1x PBS, pH 7.2로 3회 세척하였다. 결합 단백질을 1M NaCl을 함유하는 20 mM 시트르산나트륨으로 용리하였다. pH를 감소시키는 0.4 mL의 용리 버퍼를 사용하여 3번의 용리를 수행하였다. 다른 분획의 단백질을 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다.
- [0173] 결과는 pH 구배 용리로, 야생형 mIgG2a의 호모다имер로부터 야생형의 헤테로다имер 및 성형돌연변이체 mIgG2a를 분리할 수 있다는 것을 나타낸다(도 9의 겔에서 분획 E1을 참조).
- [0174] **실시예 12: 이소형 헤테로다имер에 대한 mIgG2a 돌연변이체의 바람직한 헤테로다имер 형성**
- [0175] C-말단 마우스 Fc(mIgG2a 또는 mIgG1)를 가지는 인간형 I 인터페론 수용체(hIFNAR1 및 hIFNAR2)의 세포막 도메인의 포유동물 발현을 위해 DNA 플라스미드를 구성하였다. mIgG2a 서열의 돌연변이를 자리-지정 돌연변이를 사용하여 도입하였다. 돌연변이체는 TTT = M252T, S254T, S256T; TTTK = M252T, S254T, S256T, I258K; PTTK = I247P, M252T, S254T, S256T, I258K; RF = H435R, H436F이다. CHO-K1 세포를 발현 구성체로 일시적으로 트랜스펙션하였다. hIFNAR2-mFc (mIgG1 또는 돌연변이체 mIgG2a)보다 4배 큰 hIFNAR1-mFc 발현 플라스미드(hIFNAR1-mIgG2a)로 세포를 트랜스펙션함으로써, IFNAR1-mFc 및 IFNAR2-mFc 사이의 비율을 4:1에서 유지하였다. 배양물 배지를 트랜스펙션 4일 후에 수집하였고, mFc 단백질을 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다.
- [0176] 결과는 mIgG2a와 mIgG1 사이의 헤테로다имер 형성이 야생형 mIgG2a와 mIgG2a 돌연변이체 사이의 헤테로다имер 형성보다 훨씬 덜 효율적이라는 것을 나타낸다(도 10의 라인 1 내지 라인 2 내지 5와 비교하여). 4:1 IFNAR1 구성체:IFNAR2 구성체의 비율을 실험에서 과량의 야생형 IgG2a 구성체를 유지하기 위해 사용하였다.

도면

도면1



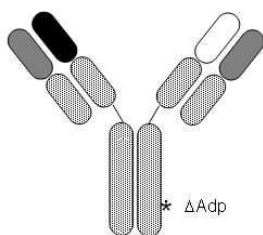
도면2a

IgG1	252	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV	K	F	N	WYVDGVEVHN	AKIKPREEQVNSI	Y	300
IgG3	252	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV	Q	E	K	WYVDGVEVHN	AKIKPREEQVNSI	F	300
IgG1	301	RVVSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISK	A			KGQPREPQVY			349
IgG3	301	RVVSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISK	I			KGQPREPQVY			349
IgG1	350	TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES	N			GQPENNYK	ITTPPV	L	398
IgG3	350	TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES	S			GQPENNYN	ITTPP	M	398
IgG1	398	DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY				ITQKSLSLSPGK			447
IgG3	398	DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRF				ITQKSLSLSPGK			447

ΔAdp

ΔAdp

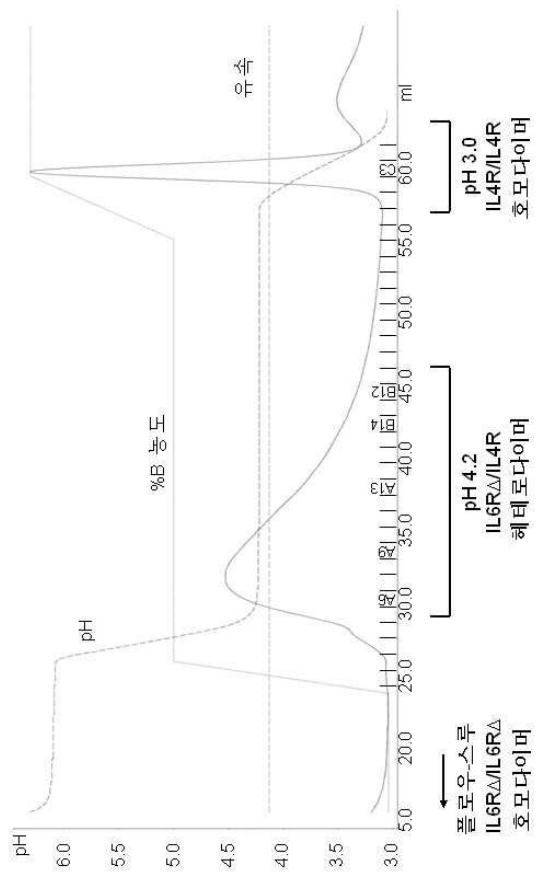
도면2b



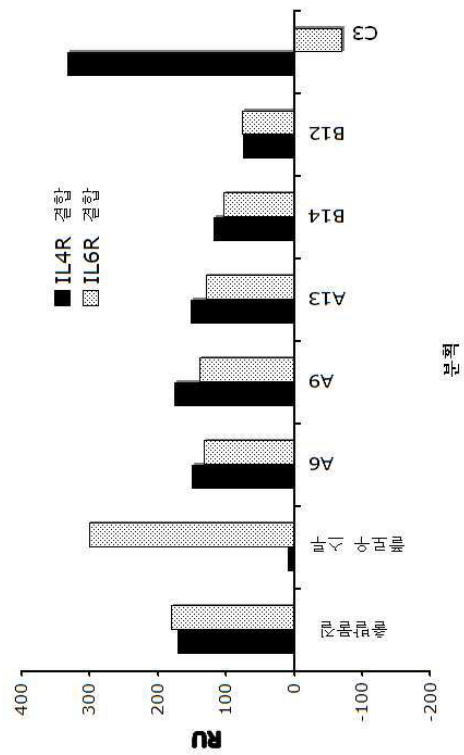
도면3

h1g1	1	10	20	30	40	50	60
EU	341	350	360	370	380	390	400
h1g1	QPREPQVYT	LPPSRDELTK	NOVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	
h1g1Aadp	QPREPQVYT	LPPSRDELTK	NOVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	
h1g2	QPREPQVYT	LPPSRDELTK	NOVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	
h1g2Aadp	QPREPQVYT	LPPSRDELTK	NOVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	
h1g4	QPREPQVYT	LPPSRDELTK	NOVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	
h1g4Aadp	QPREPQVYT	LPPSRDELTK	NOVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	
h1g3	QPREPQVYT	LPPSRDELTK	NOVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	
h1g3	QPREPQVYT	LPPSRDELTK	NOVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	
h1g1	61	70	80	90	100	107	
EU	401	410	420	430	440	447	
h1g1	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVNHE	ALHNHFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:1)	
h1g1Aadp	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVNHE	ALHNHFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:2)	
h1g2	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVNHE	ALHNHFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:3)	
h1g2Aadp	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVNHE	ALHNHFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:4)	
h1g4	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVNHE	ALHNHFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:5)	
h1g4Aadp	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVNHE	ALHNHFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:6)	
h1g3	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVNHE	ALHNHFTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:7)	

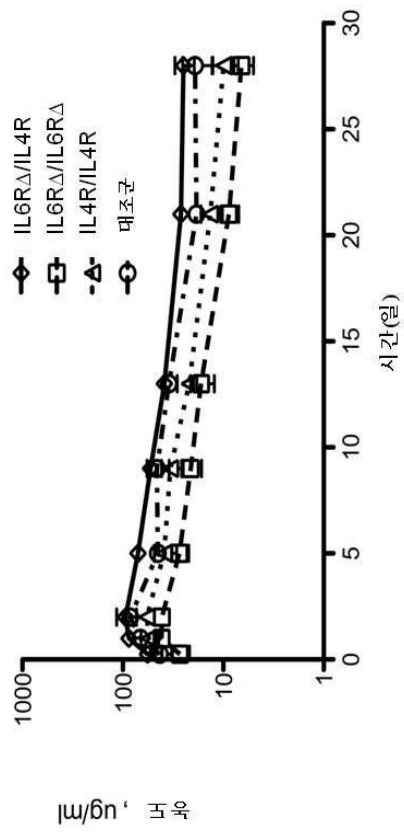
도면4



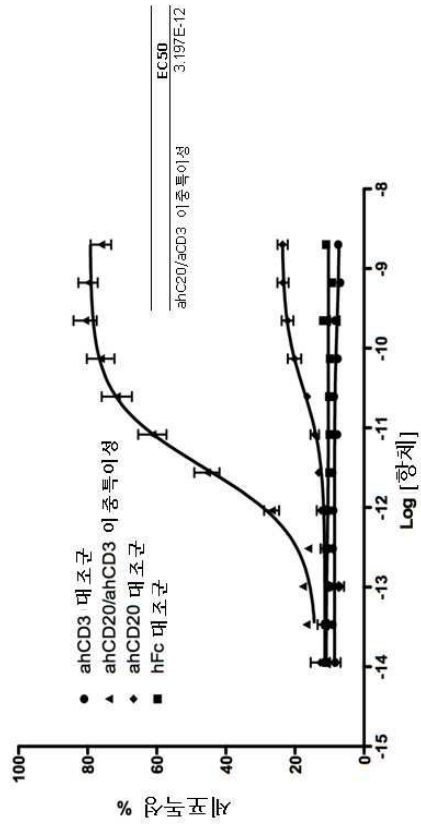
도면5



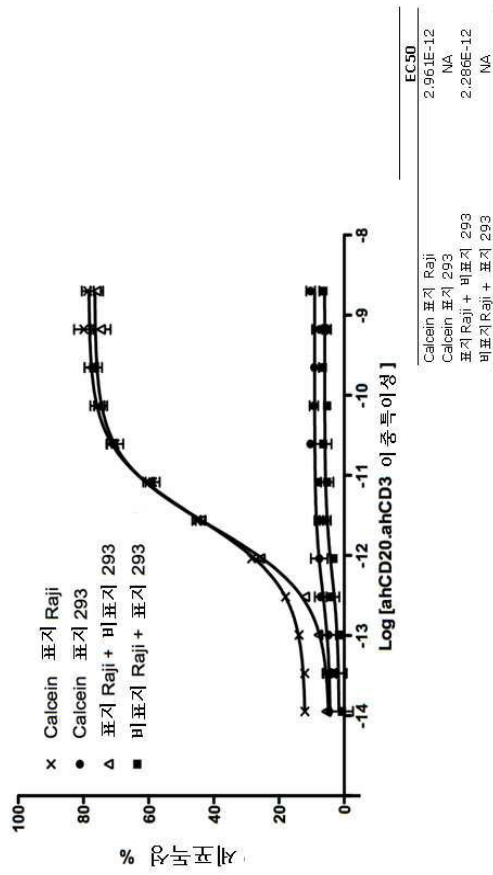
도면6



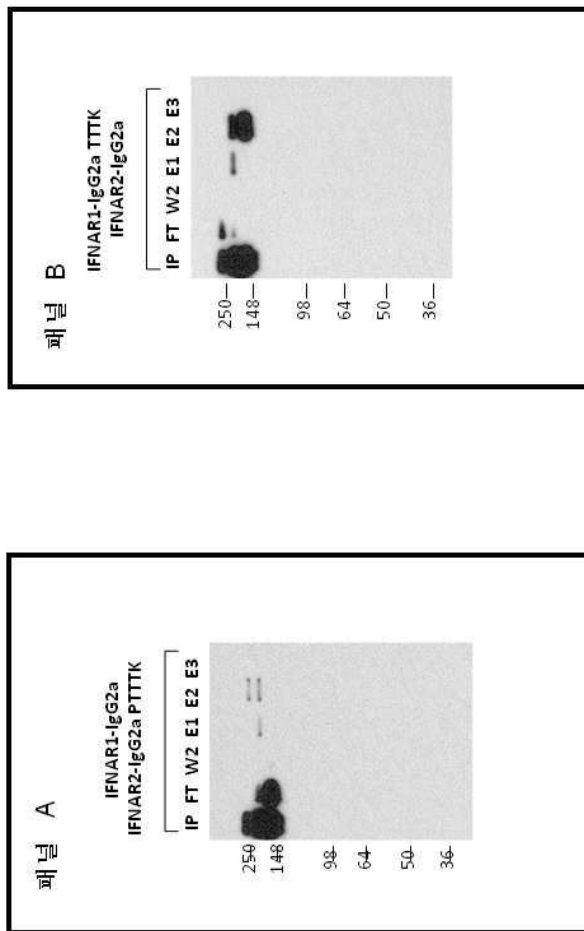
도면7



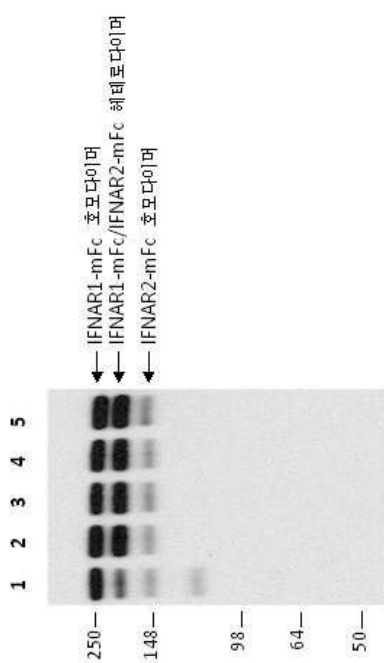
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format

<130> 0890A-WO

<140> To be assigned

<141> Filed herewith

<150> 61/220,687

<151> 2009-06-26

<160> 7

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 100 105

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 100 105

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105