



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년05월29일
(11) 등록번호 10-1266659
(24) 등록일자 2013년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. C1..)
C07K 16/46 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7013774
(22) 출원일자(국제) 2008년12월16일
 심사청구일자 2010년06월21일
(85) 번역문제출일자 2010년06월21일
(65) 공개번호 10-2010-0087397
(43) 공개일자 2010년08월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/010705
(87) 국제공개번호 WO 2009/080254
 국제공개일자 2009년07월02일

(30) 우선권주장
07024866.1 2007년12월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌
WO2006106905 A1*
J Immunol. 2000, Vol.165, pp.7050-7057.*
Molecular Immunology. 2004, Vol.41,
pp.527-538.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 3 항

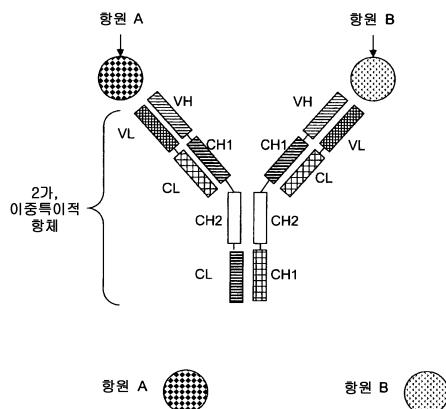
심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 2가, 이중특이적 항체

(57) 요 약

본 발명은 신규한, 도메인 교환된 2가, 이중특이적 항체, 이의 제조 및 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

하기 a) 및 b)를 포함하고,

제 1 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 항체, 또는 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 항체의 경쇄 및 중쇄가, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교체되거나, 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 교체되거나, 또는 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교체되고 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 교체되는 것에 의해 변경되는 것을 특징으로 하는 2가, 이중특이적 항체:

a) 불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체되는, 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄;

b) 불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체되는, 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄.

청구항 2

삭제

청구항 3

하기 단계를 포함하는, 제 1 항에 따른 2가, 이중특이적 항체의 제조 방법:

a) 숙주 세포를 하기로 형질전환하는 단계;

- 불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체되는, 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터; 및

- 불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체되는, 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터;

b) 상기 항체 분자의 합성이 가능한 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

c) 단계 b)에서 배양된 숙주 세포로부터 상기 항체 분자를 회수하는 단계.

청구항 4

하기를 포함하는 숙주 세포:

- 불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체되는, 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터; 및

- 불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체되는, 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 2가, 이중특이적 항체, 이의 제조 및 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 둘 이상의 항원에 결합할 수 있는 이중- 또는 다중특이적 항체와 같은 조작된 단백질은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 다중특이적 결합 단백질은 세포 융합, 화학적 접합 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성될 수 있다.

[0003] 다양한 재조합 이중특이적 항체 형태, 예를 들어 IgG 항체 형태 및 단일 사슬 도메인의 융합에 의한 4가 이중특이적 항체가 지난 최근 개발되었다 (예를 들어 Coloma, M.J., 등, *Nature Biotech.* 15 (1997) 159-163; WO 2001077342; 및 Morrison, S., L., *Nature Biotech.* 25 (2007) 1233-1234 참조).

[0004] 또한, 항체 코어 구조 (IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM)가 더 이상 유지되지 않는 여러 기타 새로운 형태, 예컨대 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 디아-, 트리아- 또는 테트라바디, 미니바디, 여러 단일 사슬 형태 (scFv, Bis-scFv)가 개발되어 왔다 (Holliger, P., 등, *Nature Biotech* 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., Leger O., *Pathobiology* 74 (2007) 3-14; Shen, J., 등, *Journal of Immunological Methods* 318 (2007) 65-74; Wu, C., 등, *Nature Biotech* 25 (2007) 1290-1297).

[0005] 모든 이러한 형태는 항체 코어 (IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM)를 추가의 결합 단백질 (예를 들어, scFv)에 융합 시키거나, 예를 들어, 2개의 Fab 절편 또는 scFv에 융합시키기 위한 링커를 사용한다 (Fischer N., Leger O., *Pathobiology* 74 (2007) 3-14). 링커가 이중특이적 항체의 조작에 유리하다는 것이 명백하지만, 이들은 또한 치료적 세팅에 문제를 일으킬 수 있다. 실제로, 이러한 외래 펩티드는 링커 그 자체 또는 단백질과 링커 사이의 연결 지점에 대해 면역 반응을 도출할 수 있다. 게다가, 이러한 펩티드의 유연한 특성이 이들을 열악한 항체 안정성, 융집 및 증가된 면역원성을 잠재적으로 야기하는 단백질분해 분할에 더욱 노출되게 한다. 또한 자연 발생적 항체에 대해 고도의 유사성을 유지함으로써, Fc 부분을 통해 매개되는 보체-의존성 세포독성 (CDC) 또는 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)과 같은 효과기 작용을 유지하기를 원할 수 있다.

[0006] 따라서 이상적이게는, 인간 서열과 최소의 편차를 가지면서 자연 발생적 항체 (IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM)와 일반적으로 구조가 매우 유사한 이중특이적 항체를 개발하려는 것을 목적으로 해야만 한다.

[0007] 하나의 접근법에서, 자연적 항체와 매우 유사한 이중특이적 항체는 이중특이적 항체의 바람직한 특이성을 갖는 쥐과 단클론 항체를 발현하는 2개의 상이한 하이브리도마 세포주의 체세포 융합에 근거한 콰드로마 (quadroma) 기술 (Milstein, C. and A.C. Cuello, *Nature*, 305 (1983) 537-40 참조)을 사용하여 생성되었다. 생성되는 잡종-하이브리도마 (또는 콰드로마) 세포주 내의 2개의 상이한 항체 중쇄 및 경쇄의 랜덤 짹짓기 때문에, 10개 이하의 상이한 항체 종이, 이 중 오직 하나만이 바람직한, 기능적 이중특이적 항체로 생성된다. 잘못 짹지워진 부산물의 존재, 및 유의하게 감소된 생산 수율로 인해, 이는 정교한 정제 절차가 필요하다는 것을 의미한다 (예를 들어 Morrison, S.L., *Nature Biotech* 25 (2007) 1233-1234 참조). 일반적으로, 재조합 발현 기술이 사용된다면 잘못 짹지워진 부산물에 대한 동일한 문제가 남아있다.

[0008] '놉-인투-홀 (knobs-into-holes)'로 알려진, 잘못 짹지워진 부산물의 문제를 피하기 위한 접근법은, 접촉 경계면을 개질하기 위해 CH3 도메인 내에 돌연변이를 도입함으로써 2개의 상이한 항체 중쇄의 짹짓기를 유도하는 것을 목표로 한다. 하나의 사슬 상의 벌기한 아미노산을 짧은 측쇄를 갖는 아미노산으로 교체하여 '홀'을 제작한다. 반대로, 긴 측쇄를 갖는 아미노산을 다른 CH3 도메인 내에 도입하여, '놉'을 제작한다. 이러한 2개의 중쇄 (및 모든 중쇄에 대해 적합해야만 하는 2개의 동일한 경쇄)를 공동 발현시킴으로써, 고수율로 이중이량체 형성 ('놉-홀') 대 동종이량체 형성 ('홀-홀' 또는 '놉-놉')을 관찰하였다 (Ridgway, J.B., Presta LG, Carter P; 및 WO 1996027011). 이중이량체의 %는 파지 디스플레이 접근법을 사용하는 2개의 CH3 도메인의 상호작용 표면 리모델링 및 이중이량체를 안정화시키기 위한 이황화물 가교의 도입에 의해 추가로 증가될 수 있을 것이다 (Merchant, A.M., 등, *Nature Biotech* 16 (1998) 677-681; Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter, P., *J Mol Biol* 270 (1997) 26-35). 놈-인투-홀 기술에 대한 새로운 접근법은 예를 들어, EP 1870459A1 호에 기재되어 있다. 이러한 형태가 매우 매력적으로 보이지만, 현재 이용가능한, 임상적으로 진보를 보이는 것으로 기술되는 데이터는 없다. 이러한 전략의 하나의 중요한 제약은, 2개의 모 항체의 경쇄가 비활성 분자의 잘못 짹지워짐 및 형성을 방지하기 위해 일치해야만 한다는 것이다. 따라서 상기 기술은 이러한 항체의 중쇄 및/또는 일치하는 경쇄가 최적화되어야만 하므로, 제 1 및 제 2 항원에 대한 2개의 항체

로부터 시작되는 2개의 항원에 대한 재조합, 2가, 이중특이적 항체를 쉽게 개발하기에는 적합하지 않다.

[0009] WO 99/37791은 다목적 항체 유도체를 기재한다.

발명의 내용

발명의 요약

[0011] 본 발명은 하기를 포함하는 2가, 이중특이적 항체에 관한 것이다:

[0012] a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨); 및

[0013] b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨).

[0014] 본 발명의 추가적인 구현예는 하기 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 2가, 이중특이적 항체의 제조 방법이다:

[0015] a) 숙주 세포를 하기로 형질전환하는 단계;

[0016] - 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨);

[0017] - 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨);

[0018] b) 상기 항체 분자의 합성이 가능한 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0019] c) 상기 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수하는 단계.

[0020] 본 발명의 추가적인 구현예는 하기를 포함하는 숙주 세포이다:

[0021] - 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨); 및

[0022] - 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨).

[0023] 본 발명의 추가적인 구현예는 본 발명에 따른 항체의 조성물, 바람직하게는 약학 또는 진단 조성물이다.

[0024] 본 발명의 추가적인 구현예는 본 발명에 따른 항체, 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물이다.

[0025] 본 발명의 추가적인 구현예는 본 발명에 따른 항체의 치료적 유효량을 환자에게 투여하는 것을 특징으로 하는, 치료요법이 필요한 환자의 치료 방법이다.

발명의 상세한 설명

[0027] 본 발명은 하기를 포함하는 2가, 이중특이적 항체에 관한 것이다:

[0028] a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨);

[0029] b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨).

[0030] 그러므로 상기 2가, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다:

[0031] a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제 1 경쇄 및 제 1 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨);

[0032] b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제 2 경쇄 및 제 2 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨).

[0033] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "항체"는 전체의, 단클론 항체를 나타낸다. 이러한 전체 항체는 "경쇄"

(LC) 및 "중쇄" (HC) (이러한 경쇄 (LC)/중쇄 (HC) 쌍은 본원에서 LC/HC로서 축약됨)의 2개 쌍으로 이루어진다. 이러한 항체의 경쇄 및 중쇄는 여러 도메인으로 이루어진 폴리펩티드이다. 전체 항체에서, 각각의 중쇄는 중쇄 가변 부위 (본원에서 HCVR 또는 VH로서 축약됨) 및 중쇄 불변 부위를 포함한다. 중쇄 불변 부위는 중쇄 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3 (항체 부류 IgA, IgD 및 IgG) 및 임의로 중쇄 불변 도메인 CH4 (항체 부류 IgE 및 IgM)를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 도메인 VL 및 경쇄 불변 도메인 CL을 포함한다. 하나의 자연 발생적 전체 항체인 IgG 항체의 구조는 예를 들어 도 1에 제시되어 있다. 가변 도메인 VH 및 VL은 보다 보존된, 골격 부위 (FR)라 불리는 부위 내에 산재된 상보성 결정 부위 (CDR)라 불리는 과가변성 부위로 보다 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로, 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 배열된 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 구성되어 있다 (Janeway, C.A., Jr. 등 (2001). Immunobiology., 5th ed., Garland Publishing; and Woof, J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99). 중쇄 및 경쇄의 2개의 쌍 (HC/LC)은 동일한 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서 상기 전체 항체는 2가, 단일특이성 항체이다. 이러한 "항체"에는, 예를 들어 그 특성이 보존되는 한, 마우스 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 유전 조작 항체 (변이체 또는 돌연변이체 항체)가 포함된다. 특히 바람직한 것은 특히 재조합 인간 또는 인간화 항체로서의 인간 또는 인간화 항체이다.

[0034] 그리스 문자: α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 표시된 5가지 유형의 포유류 항체 중쇄가 존재한다 (Janeway, C.A., Jr., 등, (2001). Immunobiology., 5th ed., Garland Publishing). 존재하는 중쇄의 유형이 항체의 부류를 정의한다; 이러한 사슬은 각각 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 항체에서 발견된다 (Rhoades R.A., Pflanzer RG (2002). Human Physiology, 4th ed., Thomson Learning). 구별되는 중쇄는 크기 및 조성이 상이하다; α 및 γ 는 대략 450개의 아미노산을 함유하는 한편, μ 및 ϵ 는 대략 550 개의 아미노산을 갖는다.

[0035] 각각의 중쇄는 불변 부위과 가변 부위인 2개의 부위를 갖는다. 불변 부위는 동일한 동형의 모든 항체에서 일치하나, 상이한 동형의 항체에서 상이하다. 중쇄 γ , α 및 δ 는 3개의 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3 (일렬로)으로 구성된 불변 도메인, 및 유연성을 더하기 위한 헌지 부위를 갖고 (Woof, J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99); 중쇄 μ 및 ϵ 는 4개의 불변 도메인 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 구성된 불변 부위를 갖는다 (Janeway, C.A., Jr., 등, (2001). Immunobiology., 5th ed., Garland Publishing). 중쇄의 가변 부위는 상이한 B 세포에 의해 생성되는 항체에서는 상이하나, 단일 B 세포 또는 B 세포 클론에 의해 생성되는 모든 항체에 대해서는 동일하다. 각각의 중쇄의 가변 부위는 대략 110개의 아미노산 길이이고, 단일 항체 도메인으로 구성된다.

[0036] 포유류에는 람다 (λ) 및 카파 (κ)로 불리는 오직 2가지 종류의 경쇄가 존재한다. 경쇄는 1개의 불변 도메인 CL 및 1개의 가변 도메인 VL의 2개의 연속 도메인을 갖는다. 경쇄의 대략적인 길이는 211 내지 217개의 아미노산이다.

[0037] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "단클론 항체" 또는 "단클론 항체 조성물"은 단일 아미노산 조성의 항체 분자 제조물을 나타낸다.

[0038] 본 발명에 따른 "항체"는 임의의 부류 (예를 들어 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 바람직하게는 IgG 또는 IgE), 또는 하위부류 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2, 바람직하게는 IgG1)일 수 있으며, 본 발명에 따른 2가, 이중특이적 항체가 유래되는 모든 항체는 동일한 하위부류 (예를 들어 IgG1, IgG4 등, 바람직하게는 IgG1)의, 바람직하게는 동일한 동종이형 (예를 들어 코카시안종)의 것이다.

[0039] "항체의 Fc 부분"은 당업자에게 잘 공지된 용어이고, 항체의 파파인 소화에 근거하여 정의된다. 본 발명에 따른 항체는 Fc 부분, 바람직하게는 인간 기원 유래의 Fc 부분 및 바람직하게는 인간 불변 부위의 모든 기타 부분을 함유한다. 항체의 Fc 부분은 보체 활성화, C1q 결합, C3 활성화 및 Fc 수용체 결합에 직접적으로 관여한다. 보체계에 대한 항체의 영향이 특정 조건에 따라 다른 한편, C1q에 대한 결합은 Fc 부분 내의 정의된 결합 부위에 의해 야기된다. 이러한 결합 위치는 당업계에 공지되며, 예를 들어 문헌 [Lukas, T.J., 등, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., 등, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., 등, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., 등, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., 등, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., 등, Immunology 86 (1995) 319-324; 및 EP 0307 434]에 기재된다. 이러한 결합 위치는 예를 들어 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 및 P329 (Kabat의 EU 인덱스에 따른 번호화, 하기 참조)이다. 하위부류 IgG1, IgG2 및 IgG3의 항체는 통상 보체 활성화, C1q 결합 및 C3 활성화를 나타내는 반면, IgG4는 보체계를 활성화시키지 않고, C1q에 결합하지 않으며 C3을 활성화시키지 않는다. 바람직

하계는 Fc 부분은 인간 Fc 부분이다.

[0040] 용어 "키메라 항체"는 통상적으로 재조합 DNA 기술에 의해 제조되는, 하나의 원천 또는 종으로부터의 가변 부위, 즉 결합 부위, 및 상이한 원천 또는 종 유래의 불변 부위의 적어도 일부를 포함하는 항체를 나타낸다. 쥐과 가변 부위 및 인간 불변 부위를 포함하는 키메라 항체가 바람직하다. 본 발명에 포함되는 "키메라 항체"의 기타 바람직한 형태는 불변 부위가 본래 항체의 불변 부위로부터 개질되거나 변화되어, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체 (FcR) 결합과 관련된 본 발명에 따른 특성을 발생시키는 형태들이다. 이러한 키메라 항체는 또한 "부류-전환 항체"로서 언급된다. 키메라 항체는 면역글로불린 가변 부위를 인코딩하는 DNA 조각 및 면역글로불린 불변 부위를 인코딩하는 DNA 조각을 포함하는 발현된 면역글로불린 유전자의 산물이다. 키메라 항체의 생성 방법에는 통상적인 재조합 DNA 및 유전자 트랜스펙션 기술이 포함되고, 이는 당업계에 잘 공지된다. 예를 들어, [Morrison, S.L., 등., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855]; US 5,202,238 호 및 US 5,204,244 호를 참조한다.

[0041] 용어 "인간화 항체"는 골격 또는 "상보성 결정 부위" (CDR)가 모 면역글로불린의 것과 비교하여 상이한 특이성의 면역글로불린의 CDR을 포함하도록 개질된 항체를 나타낸다. 바람직한 구현예에서, 쥐과 CDR을 인간 항체의 골격 부위 내에 그래프트시켜 "인간화 항체"를 생성시킨다. 예를 들어, [Riechmann, L., 등., Nature 332 (1988) 323-327; 및 Neuberger, M.S., 등., Nature 314 (1985) 268-270]을 참조한다. 특히 바람직한 CDR은 키메라 항체에 대해 상기 주목된 항원을 인지하는 서열을 나타내는 것에 상응한다. 본 발명에 포함되는 "인간화 항체"의 기타 형태는 불변 부위가 본래 항체의 불변 부위로부터 추가적으로 개질되거나 변화되어, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체 (FcR) 결합과 관련된 본 발명에 따른 특성을 발생시키는 형태들이다.

[0042] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "인간 항체"는, 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 부위를 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 인간 항체는 당업계에 잘 공지된다 (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). 인간 항체는 또한 면역화 시, 내생 면역글로불린 생성 부재시에도 인간 항체의 전체 목록 또는 선정물을 생성할 수 있는 유전자 도입 동물 (예를 들어 마우스)에서 생성될 수 있다. 이러한 생식선 돌연변이체 마우스에서의 인간 생식선 면역글로불린 유전자 어레이의 이동은 항원 접촉시 인간 항체의 생성을 야기할 것이다 (예를 들어 Jakobovits, A., 등., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., 등., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., 등., Year Immunol. 7 (1993) 33-40 참조). 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리에서 생성될 수 있다 (Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., 등., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). [Cole 등. 및 Boerner 등.]의 기술은 또한 인간 단클론 항체의 생성에 이용 가능하다 (Cole, 등., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); 및 Boerner, P., 등., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). 본 발명에 따른 키메라 및 인간화 항체에 대해 이미 언급된 바와 같이, 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "인간 항체"는 또한 불변 부위에 개질이 일어나, 예를 들어 "부류 전환", 즉 Fc 부분의 변화 또는 돌연변이 (예를 들어 IgG1에서 IgG4 및/또는 IgG1/IgG4 돌연변이로)에 의해, 특히 C1q 결합 및/또는 FcR 결합과 관련된 본 발명에 따른 특성을 발생시키는 그러한 항체를 포함한다.

[0043] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 생성되고, 발현되고, 제작되거나 단리되는 모든 인간 항체, 예컨대 NSO 또는 CHO 세포와 같은 숙주 세포로부터, 또는 숙주 세포 내로 트랜스펙션된 재조합 발현 백터를 사용하여 발현된 인간 면역글로불린 유전자 또는 항체에 대해 유전자 도입된 동물 (예를 들어 마우스)로부터 단리된 항체가 포함되는 것으로 의도된다. 이러한 재조합 인간 항체는 가변 및 불변 부위를 재배열된 형태로 갖는다. 본 발명에 따른 재조합 인간 항체는 생체 내 체세포 과돌연변이된다. 따라서, 재조합 항체의 VH 및 VL 부위의 아미노산 서열은 인간 생식선 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이와 관련되는 서열인 반면, 생체 내 인간 항체 생식선 목록 내에 자연적으로 존재할 수 없는 서열이다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같은 "가변 도메인" (경쇄 (VL)의 가변 도메인, 중쇄 (VH)의 가변 부위)은 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하는 경쇄 및 중쇄의 각각의 쌍을 나타낸다. 가변 인간 경쇄 및 중쇄의 도메인은 동일한 일반적 구조를 가지며, 각각의 도메인은 3개의 "과가변 부위" (또는 상보성 결정 부위, CDR)에 의해 연결된, 그 서열이 광범위하게 보존되는 4개의 골격 (FR) 부위를 포함한다. 골격 부위는 β -시트 형태를 취하며, CDR은 β -시트 구조와 연결되는 루프를 형성할 수 있다. 각각의 사슬 내의 CDR은 골격 부위에 의해 그들의 3차원 구조를 유지하며, 다른 사슬로부터의 CDR과 함께 항원 결합 위치를 형성한다. 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 부위는 본 발명에 따른 항체의 결합 특이성/친화성에 특히 중요한 역할을 하므로, 본 발명의 추가적인 목적을 제공한다.

- [0045] 본원에서 사용되는 경우 용어 "과가변 부위" 또는 "항체의 항원-결합 부분"은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 나타낸다. 과가변 부위는 "상보성 결정 부위" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. "골격" 또는 "FR" 부위는 본원에 정의된 바와 같은 과가변 부위 잔기 이외의 가변 도메인 부위이다. 그러므로, 항체의 경쇄 및 중쇄는 N-에서 C-말단까지 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 사슬 상의 CDR은 이러한 골격 아미노산에 의해 분리된다. 특히, 중쇄의 CDR3은 항원 결합에 가장 기여하는 부위이다. CDR 및 FR 부위는 [Kabat 등., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]의 표준 정의에 따라 결정된다.
- [0046] 중쇄 및 경쇄의 "불변 도메인"은 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 관여하지 않으나, 다양한 효과기 기능을 나타낸다. 중쇄의 불변 부위의 아미노산 서열에 따라, 항체 또는 면역글로불린은 다음 부류로 나뉜다:
- [0047] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "2가, 이중특이적 항체"는, 중쇄 및 경쇄의 2개 쌍 (HC/LC) 각각이 상이한 항원에 특이적으로 결합하여, 즉 제 1 중쇄 및 제 1 경쇄 (제 1 항원에 대한 항체로부터 기원함)가 제 1 항원에 함께 특이적으로 결합하고, 제 2 중쇄 및 제 2 경쇄 (제 2 항원에 대한 항체로부터 기원함)가 제 2 항원에 함께 특이적으로 결합하는 (도 2에 도식화된 바와 같이) 상기 기재된 바와 같은 항체를 나타내고; 이러한 2가, 이중 특이적 항체는 2개의 상이한 항원에 동시에 특이적으로 결합할 수 있고, 2개 초파의 항원에는 결합할 수 없으나, 이와 대조적으로 한편으로는 오직 하나의 항원에만 결합할 수 있는 단일특이성 항체, 다른 한편으로는, 예를 들어 4개의 항원 분자에 동시에 결합할 수 있는 4가, 사중특이적 항체가 있다.
- [0048] 본 발명에 따르면, 원치않는 부산물에 대한 바람직한 2가, 이중특이적 항체의 비율은 두 중쇄의 CH3 도메인을 교체하여 개선될 수 있다. 따라서, 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄, 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄는 하기 교체에 의해 변경된다:
- [0049] - 제 1 중쇄: 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 항체의 불변 중쇄 도메인 CH1에 의한 불변 중쇄 도메인 CH3의 교체, 및
- [0050] - 제 2 중쇄: 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 항체의 불변 경쇄 도메인 CL에 의한 불변 중쇄 도메인 CH3의 교체.
- [0051] 따라서 수득되는 2가, 이중특이적 항체는 하기를 포함하는 인공 항체이다:
- [0052] a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 {상기 중쇄는 (불변 중쇄 도메인 CH3의 위치에서) 불변 중쇄 도메인 CH3 대신 (제 2) 불변 중쇄 도메인 CH1을 함유함}, 및
- [0053] b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (상기 중쇄는 불변 중쇄 도메인 CH3 대신 불변 경쇄 도메인 CL을 함유함).
- [0054] 중쇄 도메인 CH3이 교체되는 불변 중쇄 도메인 CH1은 임의의 Ig 부류 (예를 들어 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM) 또는 하위부류 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)의 것일 수 있다.
- [0055] 중쇄 도메인 CH3이 교체되는 불변 경쇄 도메인 CL은 람다 (λ) 또는 카파 (κ) 유형, 바람직하게는 카파 (κ) 유형의 것일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 부가적인 측면에서, 원치않는 부산물에 대한 바람직한 2가, 이중특이적 항체의 향상된 비율은 하기 3 가지 대안 중 하나에 의해, 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 항체의 경쇄 및 중쇄의 추가적인 교체에 의해 추가로 개선될 수 있다:
- [0057] A) 제 1 대안 (도 3 참조):
- [0058] 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항체, 또는 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항체의 경쇄 및 중쇄는 가변 도메인 VL 및 VH이 서로 교체되는 것에 의해 변경된다.
- [0059] 또는
- [0060] B) 제 2 대안 (도 4 참조):
- [0061] 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항체, 또는 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항체의 경쇄 및 중쇄는 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 교체되는 것에 의해 변경된다.

- [0062] 또는
- [0063] C) 제 3 대안 (도 5 참조):
- [0064] 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항체, 또는 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항체의 경쇄 및 중쇄는, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교체되고 가변 도메인 CL 및 CH1이 서로 교체되는 것에 의해 변경된다.
- [0065] 따라서 본 발명의 한 바람직한 구현예는 하기를 포함하는 2가, 이중특이적 항체이며:
- [0066] a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CH1로 교체됨);
- [0067] b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨),
- [0068] 임의로는, 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항체, 또는 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항체의 경쇄 및 중쇄가, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교체되고/되거나 가변 도메인 CL 및 CH1이 서로 교체되는 것에 의해 변경된다.
- [0069] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "항원" 또는 "항원 분자"는 상호교환가능하게 사용되며, 항체에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 모든 분자를 나타낸다. 2가, 이중특이적 항체는 제 1 항원 및 별개의 제 2 항원에 특이적으로 결합한다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "항원"은 예를 들어 단백질, 단백질에 대한 상이한 에피토프 (본 발명의 의미 내에서 상이한 항원으로서) 및 다당류를 포함한다. 이는 세균, 바이러스 및 기타 미생물의 일부 요소 (코트, 캡슐, 세포벽, 편모, 섬모 및 독소)를 주로 포함한다. 지질 및 핵산은 오직 단백질 및 다당류와 조합될 때만 항원성이다. 비-미생물 외생 (비-자체성) 항원은 꽃가루, 달걀 흰자, 및 이식된 조직 및 기관으로부터의, 또는 수혈된 혈액 세포의 표면 상의 단백질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 항원은 사이토카인, 세포 표면 단백질, 효소 및 수용체로 이루어지는 군에서 선택된다.
- [0070] 종양 항원은 종양 세포의 표면 상에서 MHC I 또는 MHC II 분자에 의해 제시되는 항원이다. 이들 항원은 때때로 종양 세포에 의해 제시될 수 있으며 결코 정상 세포에 의해 제시되지 않는다. 이러한 경우, 이는 종양-특이적 항원 (TSA)으로 지칭되며, 전형적으로 특이적 돌연변이로부터 야기된다. 보다 통상적인 것은 종양 세포 및 정상 세포에 의해 제시되는 항원이며, 이는 종양-관련 항원 (TAA)으로 지칭된다. 이들 항원을 인지하는 세포독성 T 림프구는 이의 증식 또는 전이 전에 종양 세포를 파괴할 수 있다. 종양 항원은 또한, 예를 들어 돌연변이된 수용체의 형태로 종양의 표면 상에 있을 수 있는데, 이러한 경우 이는 B 세포에 의해 인지될 것이다.
- [0071] 한 바람직한 구현예에서는 2가, 이중특이적 항체가 특이적으로 결합하는 두 가지 상이한 항원 (제 1 및 제 2 항원) 중 하나 이상이 종양 항원이다.
- [0072] 또 다른 바람직한 구현예에서는 2가, 이중특이적 항체가 특이적으로 결합하는 두 가지 상이한 항원 (제 1 및 제 2 항원) 모두가 종양 항원이며; 이러한 경우 제 1 및 제 2 항원은 또한 동일한 종양 특이적 단백질에서의 두 가지 상이한 에피토프일 수 있다.
- [0073] 또 다른 바람직한 구현예에서는 2가, 이중특이적 항체가 특이적으로 결합하는 두 가지 상이한 항원 (제 1 및 제 2 항원) 중 하나가 종양 항원이며, 다른 것은 T-세포 수용체, CD3, CD16 등과 같은 효과기 세포 항원이다.
- [0074] 또 다른 바람직한 구현예에서 2가, 이중특이적 항체가 특이적으로 결합하는 두 가지 상이한 항원 (제 1 및 제 2 항원) 중 하나가 종양 항원이며, 다른 것은 독소 또는 키나아제 억제제와 같은 항암 물질이다.
- [0075] 본원에서 사용되는 바와 같이, "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적으로 결합한다"는 항체가 항원에 특이적으로 결합한다는 것을 나타낸다. 바람직하게는 이러한 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 결합 친화성은 10^{-9} mol/l 이하 (예를 들어 10^{-10} mol/l)의 KD-값, 바람직하게는 10^{-10} mol/l 이하 (예를 들어 10^{-12} mol/l)의 KD-값이다. 결합 친화성은 표면 플라스몬 공명 기술 (Biacore[®])과 같은 표준 결합 검정법으로 측정된다.
- [0076] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 폴리펩티드 결정자를 포함한다. 특정 구현예에서는, 에피토프 결정자는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설포닐과 같은 분자의 화학적 활성 표면 분류를 포함하며, 특정 구현예에서는 특이적 3차원 구조 특징 및/또는 특이적 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프

는 항체에 의해 결합되는 항원의 부위이다. 특정 구현예에서는, 바람직하게는 단백질 및/또는 거대분자의 복합적 혼합물에서의 표적 항원을 인지하는 경우 상기 항체가 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 언급된다.

[0077] 본 발명의 추가적인 구현예는 하기 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 2가, 이중특이적 항체의 제조 방법이다:

a) 숙주 세포를 하기로 형질전환하는 단계;

- 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CH1로 교체됨);

- 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨);

b) 상기 항체 분자의 합성이 가능한 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

c) 상기 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수하는 단계.

[0083] 일반적으로 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 두 벡터, 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 추가적인 두 벡터가 존재한다. 두 벡터 중 하나는 각각의 경쇄를 인코딩하며, 두 벡터 중 다른 것은 각각의 중쇄를 인코딩한다. 그러나 본 발명에 따른 2가, 이중특이적 항체의 대안적 제조 방법에서는 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 오직 하나의 제 1 벡터, 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 오직 하나의 제 2 벡터가 숙주 세포를 형질전환하는데 사용될 수 있다.

[0084] 본 발명은 상기 항체 분자의 합성이 가능한 조건 하에서 상응하는 숙주 세포를 배양하고, 예를 들어 하기를 발현시켜 상기 배양물로부터 상기 항체를 회수하는 것을 포함하는, 항체의 제조 방법을 포함한다:

- 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산 서열;

- 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 항체의 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산 서열 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CH1로 교체됨);

- 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄를 인코딩하는 제 3 핵산 서열; 및

- 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 항체의 중쇄를 인코딩하는 제 4 핵산 서열 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨).

[0089] 본 발명의 추가적인 구현예는 하기를 포함하는 숙주 세포이다:

- 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CH1로 교체됨); 및

- 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨).

[0092] 본 발명의 추가적인 구현예는 하기를 포함하는 숙주 세포이다:

a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터, 및 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CH1로 교체됨); 및

b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터, 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨).

[0095] 본 발명의 추가적인 구현예는 본 발명에 따른 2가, 이중특이적 항체의 조성물, 바람직하게는 약학 또는 진단 조성물이다.

[0096] 본 발명의 추가적인 구현예는 본 발명에 따른 2가, 이중특이적 항체, 및 하나 이상의 약학적으로 혜용가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물이다.

[0097] 본 발명의 추가적인 구현예는, 본 발명에 따른 2가, 이중특이적 항체의 치료적 유효량을 환자에게 투여하는 것을 특징으로 하는, 치료요법이 필요한 환자의 치료 방법이다.

- [0098] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "핵산 또는 핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으나, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다.
- [0099] 본원에서 사용되는 바와 같이, 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환가능하게 사용되며 상기 모든 지정은 자손을 포함한다. 따라서, 단어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 1차 대상 세포, 및 이동의 수를 고려하지 않고 그로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한, 계획적 또는 부주의 돌연변이로 인해 모든 자손이 DNA 함량에 있어서 정확히 동일하지 않을 수 있다는 것이 이해된다. 본래 형질전환된 세포에서 스크리닝되는 바와 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손이 포함된다. 별개의 지정이 의도되는 경우, 이는 문맥으로부터 명백할 것이다.
- [0100] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "형질전환"은 벡터/핵산을 숙주 세포에 이동시키는 방법을 나타낸다. 강력한 세포 벽 방해물이 없는 세포가 숙주 세포로서 사용된다면, 예를 들어 [Graham, F.L., 및 van der Eb, A., J. Virology 52 (1978) 546-467]에 기재된 바와 같이 인산 칼슘 침전법에 의해 트랜스펙션을 실행한다. 그러나 핵 주입 또는 원형질체 융합에 의한 것과 같은, 세포에 DNA를 도입하기 위한 다른 방법이 또한 사용될 수 있다. 원핵 세포 또는 실질적인 세포벽 구조를 포함하는 세포가 사용된다면, 예를 들어 트랜스펙션의 한 방법은 [Cohen, S., N., 등, PNAS. 69 (1972) 2110-2114]에서 기재된 바와 같은 염화 칼슘을 사용하는 칼슘 처리법이다.
- [0101] 형질전환을 사용하는, 항체의 재조합체 생성은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어 [Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., 등, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., 등, Arzneimittelforschung 48 (1998) 870-880]의 개관 논문에서 뿐 아니라 US 6,331,415 및 US 4,816,567에서 기재된다.
- [0102] 본원에서 사용되는 바와 같은 "발현"은, 핵산이 mRNA로 전사되는 방법 및/또는 전사된 mRNA (또한 전사체로서 나타냄)가 이후 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 방법을 나타낸다. 전사체 및 인코딩된 폴리펩티드를 총체적으로 유전자 생성물로서 나타낸다. 폴리뉴클레오티드가 게놈 DNA에서 유래한다면, 진핵 세포에서의 발현은 mRNA의 스플라이싱 (splicing)을 포함할 수 있다.
- [0103] "벡터"는 핵산 분자, 특히 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포에 및/또는 숙주 세포 사이에 이동시키는 자체-스플라이싱하는 핵산 분자이다. 상기 용어는, 주로 DNA 또는 RNA를 세포에 삽입 (예를 들어 염색체 통합)하는 기능을 하는 벡터, 주로 DNA 또는 RNA를 복제하는 기능을 하는 복제 벡터, 및 DNA 또는 RNA의 전사 및/또는 번역을 위한 기능을 하는 발현 벡터를 포함한다. 기재한 바와 같은 기능 중 하나 이상을 제공하는 벡터가 또한 포함된다.
- [0104] "발현 벡터"는 적절한 숙주 세포에 도입되는 경우 폴리펩티드로 전사 및 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드이다. "발현 시스템"은 통상 원하는 발현 생성물이 수득되도록 기능할 수 있는 발현 벡터를 포함하는 적합한 숙주 세포를 나타낸다.
- [0105] 본 발명에 따른 2가, 이중특이적 항체는 바람직하게는 재조합 수단에 의해 생성된다. 이러한 방법은 당업계에 널리 공지되며, 항체 폴리펩티드가 후속적으로 단리되는 원핵 및 진핵 세포에서의 단백질 발현, 및 통상적으로는 약학적으로 허용가능한 순도로의 정제를 포함한다. 단백질 발현을 위해, 경쇄 및 중쇄 또는 이의 절편을 인코딩하는 핵산이 표준 방법으로 발현 벡터에 삽입된다. 발현은 CHO 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, 효모 또는 대장균 (*E. coli*) 세포와 같은 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 수행되며, 항체는 세포로부터 회수된다 (용해 후 상청액 또는 세포). 2가, 이중특이적 항체는 전체 세포, 세포 용해물, 또는 일부 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태에 존재할 수 있다. 기타 세포 성분 또는 기타 오염물 (예를 들어 기타 세포 핵산 또는 단백질)을 제거하기 위해, 알칼리/SDS 처리, 컬럼 크로마토그래피 및 기타 당업계에 잘 공지된 방법을 포함하는 표준 기술로써 정제를 수행한다. [Ausubel, F., 등, ed., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)]을 참조한다.
- [0106] NS0 세포에서의 발현은, 예를 들어 [Barnes, L.M., 등, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; 및 Barnes, L.M., 등, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270]에 의해 기재된다. 일시적 발현은, 예를 들어 [Durocher, Y., 등, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9]에 의해 기재된다. 가변 도메인의 클로닝은 [Orlandi, R., 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837]; [Carter, P., 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289]; 및 [Norderhaug, L., 등, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87]에 의해 기재된다. 바람직한 일시

적 발현 시스템 (HEK 293)은 [Schlaeger, E.-J., 및 Christensen, K., in Cytotechnology 30 (1999) 71-83] 및 [Schlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199]에 의해 기재된다.

[0107] 원핵 생물에 적합한 조절 서열은 예를 들어 프로모터, 임의로는 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 위치를 포함한다. 진핵 생물 세포는 프로모터, 인핸서 및 폴리아데닐화 신호를 이용하는 것으로 공지되어 있다.

[0108] 핵산은 또 다른 핵산 서열과의 기능적 관계에 놓이는 경우 "작동적으로 연결된다". 예를 들어, 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비단백질로서 발현된다면 예비서열 또는 분비 리더에 대한 DNA는 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동적으로 연결되고; 서열의 전사에 영향을 준다면 프로모터 또는 인핸서는 코딩 서열에 작동적으로 연결되거나; 또는 번역이 촉진되도록 배치된다면 리보솜 결합 위치는 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결되는"은 연결되는 DNA 서열이 연속적이고, 분비 리더의 경우 연속적이고 판독 프레임 내에 있는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 연속적일 필요가 없다. 연결은 통상적 제한 위치에서의 라이제이션에 의해 성취된다. 이러한 위치가 존재하지 않는다면, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 통상적 실행에 따라 사용된다.

[0109] 2가, 이중특이적 항체는 단백질 A-세파로오스, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 매질로부터 적절히 분리된다. 단클론 항체를 인코딩하는 DNA 및 RNA는 통상적 절차를 사용하여 쉽게 단리되고 서열분석된다. 하이브리도 마 세포는 이러한 DNA 및 RNA의 원천으로서 역할할 수 있다. 단리되고 나면, DNA는 발현 벡터에 삽입될 수 있고, 이는 이후 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 HEK 293 세포, CHO 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포에 트랜스펙션되어, 숙주 세포에서 재조합 단클론 항체가 합성된다.

[0110] 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 DNA에 도입하거나, 또는 뉴클레오티드를 합성하여 2가, 이중특이적 항체의 아미노산 서열 변이체 (또는 돌연변이체)를 제조한다. 이러한 개질이 수행될 수 있으나, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이 오직 매우 한정된 범위에서만 수행될 수 있다. 예를 들어, 개질은 IgG 동형 및 항원 결합과 같은 상기 언급한 항체 특징을 변경시키지 않으나, 재조합 생성 수율, 단백질 안정성 또는 정제 촉진을 개선시킬 수 있다.

[0111] 하기의 실시예, 서열 목록 및 도면을 제공하여 본 발명의 이해를 돋고자하며, 본 발명의 진정한 범주를 첨부된 청구항에서 설명한다. 본 발명의 취지를 벗어나지 않고 절차 내에서 변형이 만들어질 수 있음이 이해된다.

서열 목록

[0113] SEQ ID NO:1 - 야생형 <IGF-1R> 항체 중쇄의 아미노산 서열

[0114] SEQ ID NO:2 - 야생형 <IGF-1R> 항체 경쇄의 아미노산 서열

[0115] SEQ ID NO:3 - <IGF-1R> HC# 항체 중쇄#의 아미노산 서열 (중쇄 도메인 CH3은 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨)

[0116] SEQ ID NO:4 - 야생형 안지오포이에틴-2 <ANGPT2> 항체 중쇄의 아미노산 서열

[0117] SEQ ID NO:5 - 야생형 안지오포이에틴-2 <ANGPT2> 항체 경쇄의 아미노산 서열

[0118] SEQ ID NO:6 - <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 교환 항체의 중쇄* (HC*)의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:4 및 SEQ ID NO:5를 기초로 하여, 중쇄 도메인 VH가 경쇄 도메인 VL로 교체되고, 중쇄 도메인 CH1이 경쇄 도메인 CL로 교체됨)

[0119] SEQ ID NO:7 - <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 교환 항체의 경쇄* (LC*)의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:4 및 SEQ ID NO:5를 기초로 하여, 경쇄 도메인 VL이 중쇄 도메인 VH로 교체되고, 경쇄 도메인 CL이 중쇄 도메인 CH1로 교체됨)

[0120] SEQ ID NO:8 - VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> HC## 항체 중쇄 ##의 아미노산 서열 (중쇄 도메인 VH가 경쇄 도메인 VL로 교체되고, 중쇄 도메인 CH1이 경쇄 도메인 CL로 교체되며 불변 중쇄 도메인 CH3이 C-말단 시스테인 잔기를 갖지 않는 카파 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨) (리더 서열 포함)

[0121] SEQ ID NO:9 - VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> HC## 항체 중쇄 ##의 아미노산 서열 (중쇄 도메인 VH가 경쇄 도메인 VL로 교체되고, 중쇄 도메인 CH1이 경쇄 도메인 CL로 교체되며 불변 중쇄 도메인 CH3이 C-말단 시스테인 잔기를 갖는 카파 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨) (리더 서열 포함); SEQ ID NO:8에 상응하는 서열

도면의 간단한 설명

[0122] 도 1 - 전형적 순서로 가변 및 불변 도메인을 포함하는 두 쌍의 중쇄 및 경쇄를 갖는 한 항원에 특이적인, 자연

적으로 발생하는 전체 항체인 IgG의 도식적 도면

도 2 - 하기를 포함하는 2가, 이중특이적 항체의 도식적 도면: a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨); b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체됨)

도 3 - 하기를 포함하는 2가, 이중특이적 항체의 도식적 도면: a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨); b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체되며, 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항체, 또는 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항체의 경쇄 및 중쇄는, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교체되는 것에 의해 변경됨)

도 4 - 하기를 포함하는 2가, 이중특이적 항체의 도식적 도면: a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨); b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체되며, 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항체, 또는 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항체의 경쇄 및 중쇄는, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교체되는 것에 의해 변경됨)

도 5 - 하기를 포함하는 2가, 이중특이적 항체의 도식적 도면: a) 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체됨); b) 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL로 교체되며, 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항체, 또는 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항체의 경쇄 및 중쇄는, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교체되고 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 교체되는 것에 의해 변경됨)

도 6 - CH3-CH3에 대한 CH1-CL 교환 <IGF-1R> HC#의 단백질 서열 도식

도 7 - CH3-CH3에 대한 CH1-CL 교환 <ANGPT2> HC## (카파 불변 경쇄 도메인 CL을 가짐)의 단백질 서열 도식

도 8 - CH3-CH3에 대한 CH1-Ck 교환 <IGF-1R> HC# 발현 벡터 pUC-HC#-IGF-1R 및 각각의 pUC <IGF-1R> LC 발현 벡터 pUC-LC-IGF-1R, 및 CH3-CH3에 대한 CH1-Ck 교환 <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 교환 HC## 발현 벡터 pUC-HC##-ANGPT2 및 각각의 <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 교환 LC 발현 벡터 pUC-LC##-ANGPT2의 플라스미드 지도

도 9 - HEK293-F 시스템을 사용하는 플라스미드 pUC-HC#-IGF-1R 및 pUC-HC##-ANGPT2와 함께 <IGF-1R> 야생형 경쇄 (SEQ ID NO:2) 및 VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> 경쇄 (SEQ ID NO:8)에 대한 각각의 경쇄 벡터의 공동-발현의 SDS-PAGE

도 10 - 기능적 이중특이적 <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH 교환 항체의 존재를 검출하기 위한 I24 IGF-1R 발현 세포 상에서의 세포 FACS IGF-1R-ANGPT2 가교 검정의 검정 원리

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0123] **재료 & 일반적 방법**

인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 대한 일반적 정보가 하기에 주어진다: Kabat, E.A., 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). EU 번호화 (EU numbering)에 따라 항체 사슬의 아미노산에 번호가 매겨지고 참조된다 (Edelman, G.M., 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).

[0125] **재조합 DNA 기술**

[0126] [Sambrook, J. 등, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에 기재되는 바와 같이 표준 방법을 사용하여 DNA를 조작하였다. 제조사의 지시 사항에 따라 분자 생물학 시약을 사용하였다.

[0127] **유전자 합성**

바람직한 유전자 조각을 화학 합성에 의해 제조된 올리고뉴클레오티드로부터 제조하였다. 단수 제한 엔도뉴클레아제 분할 위치에 의해 플랭킹된 600~1800 bp 길이의 유전자 조각을, PCR 증폭을 비롯한 올리고뉴클레오티

드의 어닐링 및 라이게이션에 의해 어셈블링한 후, 표시된 제한 위치, 예를 들어 KpnI/SacI 또는 AscI/PacI을 통해 pGA4 클로닝 벡터에 기초를 둔 pPCRScript (Stratagene) 내로 클로닝하였다. 서브클로닝된 유전자 절편의 DNA 서열을 DNA 서열분석으로 확인하였다. 유전자 합성 절편은 Geneart (Regensburg, Germany)에서 제시된 설명서에 따라 주문하였다.

[0129] **DNA 서열 결정**

[0130] DNA 서열을 MediGenomix GmbH (Martinsried, Germany) 또는 Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Germany)에서 수행된 이중 가닥 서열분석에 의해 결정하였다.

[0131] **DNA 및 단백질 서열 분석 및 서열 데이터 관리**

[0132] GCG's (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) 소프트웨어 패키지 버전 10.2 및 Infomax's Vector NT1 Advance 슈트 버전 8.0을 서열 생성, 맵핑, 분석, 주석 및 실례에 사용하였다.

[0133] **발현 벡터**

[0134] 기재된 항체 변이체의 발현을 위해, CMV-인트론 A 프로모터를 가진 cDNA 구성 또는 CMV 프로모터를 가진 게놈 구성에 기초한 일시적 발현 (예를 들어 HEK293 EBNA 또는 HEK293-F) 세포에 대한 발현 플라스미드를 적용하였다.

[0135] 항체 발현 카세트 외에, 벡터는 하기를 포함한다:

[0136] - 상기 플라스미드가 대장균에서 복제될 수 있게 하는 복제 기원, 및

[0137] - 대장균에 암피실린 내성을 부여하는 β -락타마아제 유전자.

[0138] 항체 유전자의 전사 단위는 하기 요소로 이루어진다:

[0139] - 5' 말단에서의 고유한 위치(들),

[0140] - 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 즉시 초기 인핸서 및 프로모터,

[0141] - 이후 cDNA 구성의 경우 인트론 A 서열,

[0142] - 인간 항체 유전자의 5'-미번역된 부위,

[0143] - 면역글로불린 중쇄 신호 서열,

[0144] - 면역글로불린 엑손-인트론 구성을 갖는 게놈 구성 또는 cDNA로서의 인간 항체 사슬 (야생형 또는 도메인 교환을 가짐)

[0145] - 폴리아데닐화 신호 서열을 갖는 3'-미번역된 부위, 및

[0146] - 3' 말단에서의 고유한 제한 위치(들).

[0147] 하기에 기재되는 바와 같은 기재된 항체 사슬을 포함하는 융합 유전자는 PCR 및/또는 유전자 합성에 의해 생성되고, 예를 들어, 각각의 벡터 내에 고유한 제한 위치를 사용하는 핵산 조각에 따른 연결에 의한 공지된 재조합 방법 및 기술로 어셈블링된다. 서브클로닝된 핵산 서열은 DNA 서열분석에 의해 입증되었다. 일시적 트랜스펙션의 경우에는, 형질전환된 대장균 배양물로부터의 플라스미드 제조에 의해 더 많은 양의 플라스미드를 제조하였다 (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

[0148] **세포 배양 기술**

[0149] [Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.]에 기재되는 바와 같은 표준 세포 배양 기술을 사용하였다.

[0150] 하기에 기재되는 바와 같이 점착 성장하는 HEK293-EBNA 또는 부유 성장하는 HEK293-F 세포에서 각각의 발현 플라스미드의 일시적 공동-트랜스펙션에 의해 이중특이적 항체를 발현시켰다.

[0151] **HEK293-EBNA 시스템에서의 일시적 트랜스펙션**

[0152] 10% 극저 (Ultra Low) IgG FCS (송아지 태아 혈청, Gibco), 2 mM L-글루타민 (Gibco), 및 250 μ g/ml 제네티신 (Geneticin) (Gibco)이 보충된 DMEM (둘베코 개질 이글 배지: Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)에

서 배양된, 점착 성장하는 HEK293-EBNA 세포 (엡스테인-바-바이러스 (Epstein-Barr-Virus) 핵 항원을 발현하는 인간 배아 신장 세포주 293; 미국 미생물 보존 센터 (American type culture collection) 수탁 번호 ATCC # CRL-10852, 롯트. 959 218)에서 각각의 발현 플라스미드 (예를 들어, 중쇄 및 개질된 중쇄 뿐 아니라, 상응하는 경쇄 및 개질된 경쇄를 인코딩하는)의 일시적 공동-트랜스펙션에 의해 이중특이적 항체를 발현시켰다. 트랜스펙션을 위해, FuGENETM 6 트랜스펙션 시약 (Roche Molecular Biochemicals)을 4:1 (3:1 내지 6:1의 범위)의 FuGENETM 시약 (μ l) 대 DNA (μ g)의 비율로 사용하였다. 단백질을, 각각 1:2 내지 2:1 범위의 1:1 (등몰)의 (개질형 및 야생형) 경쇄 대 중쇄 인코딩 플라스미드의 몰 비율로 사용하여 각각의 플라스미드로부터 발현시켰다. 합하여 4 mM이 되는 L-글루타민, 글루코오스 [Sigma] 및 NAA [Gibco]를 3일에 세포에 공급하였다. 이중특이적 항체를 함유하는 세포 배양 상청액을 트랜스펙션 5일 내지 11일 후에 원심분리로 채취하고, -20°C에서 보관하였다. 예를 들어 HEK293 세포에서의 인간 면역글로불린의 재조합 발현에 관한 일반적인 정보가 하기에 주어진다: Meissner, P. 등., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

[0153] HEK293-F 시스템에서의 일시적 트랜스펙션

[0154] 제조자의 지시 사항에 따라 HEK293-F 시스템 (Invitrogen)을 사용하여 각각의 플라스미드 (예를 들어 중쇄 및 개질된 중쇄 뿐 아니라, 상응하는 경쇄 및 개질된 경쇄를 인코딩하는)의 일시적 트랜스펙션에 의해 이중특이적 항체를 생성시켰다. 간략하게는, 진탕 플라스크 또는 교반 발효기에서, 무혈청 FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에서 부유 성장하는 HEK293-F 세포 (Invitrogen)를 4개의 발현 플라스미드 및 293펙틴 (fектин) 또는 펙틴 (fектин) (Invitrogen)의 혼합물로 트랜스펙션하였다. 2 L 진탕 플라스크 (Corning)의 경우, HEK293-F 세포를 600 mL 중 1.0E*6 세포/mL의 밀도로 과종하고, 120 rpm, 8% CO₂에서 인큐베이션하였다. 하루 후, 세포를 약 1.5E*6 세포/mL의 세포 밀도에서 A) 등몰 비율로, 중쇄 또는 개질된 중쇄를 각각, 및 상응하는 경쇄를 인코딩하는 600 μ g 총 플라스미드 DNA (1 μ g/mL)를 함유하는 20 mL Opti-MEM (Invitrogen) 및 B) 20 mL Opti-MEM + 1.2 mL 293 펙틴 또는 펙틴 (2 μ l/mL)의 약 42 mL 혼합물로 트랜스펙션시켰다. 글루코오스 소비에 따라, 글루코오스 용액을 발효 과정 동안 첨가하였다. 분비된 항체를 함유하는 상청액을 5~10일 후에 채취하고, 항체를 상청액으로부터 직접 정제하거나 상청액을 동결 및 보관하였다.

[0155] 단백질 측정

[0156] [Pace 등., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423]에 따라 아미노산 서열에 근거하여 계산된 몰 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도 (OD)를 측정함으로써, 정제된 항체 및 유도체의 단백질 농도를 측정하였다.

[0157] 상청액 중의 항체 농도 측정

[0158] 세포 배양 상청액 중의 항체 및 유도체의 농도를 단백질 A 아가로오스-비즈 (Protein A Agarose-beads) (Roche)로의 면역침전에 의해 추정하였다. 60 μ l 단백질 A 아가로오스 비즈를 TBS-NP40 (50 mM 트리스, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40)으로 3회 세척하였다. 이후 1~15 mL 세포 배양 상청액을 TBS-NP40으로 예비평형화된 단백질 A 아가로오스 비즈에 적용하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 비즈를 Ultrafree-MC-필터 컬럼 (Amicon) 상에서 0.5 mL TBS-NP40으로 1회, 0.5 mL 2x 인산염 완충 생리식염수 (2xPBS, Roche)로 2회, 및 0.5 mL 100 mM Na-시트레이트 (pH 5.0)로 간단히 4회 세척하였다. 결합된 항체를 35 μ l NuPAGE[®] LDS 샘플 완충액 (Invitrogen)을 첨가하여 용리하였다. 샘플의 절반을 각각 NuPAGE[®] 샘플 환원제와 조합하거나, 또는 비환원된 상태로 두고, 70°C에서 10분 동안 가열하였다. 그 결과로서, 5~30 μ l를 4~12% NuPAGE[®] 비스-트리스 SDS-PAGE (Invitrogen) (비환원된 SDS-PAGE에 대해서는 MOPS 완충액을 사용하고, 환원된 SDS-PAGE에 대해서는 NuPAGE[®] 항산화제 영동 완충액 첨가제 (Invitrogen)를 갖는 MES 완충액을 사용)에 적용하고, 쿠마시 블루 (Coomassie Blue)로 염색하였다.

[0159] 세포 배양 상청액 중의 항체 및 유도체의 농도를 친화성 HPLC 크로마토그래피에 의해 정량적으로 측정하였다. 간략하게는, 단백질 A에 결합하는 항체 및 유도체를 함유하는 세포 배양 상청액을 200 mM KH₂PO₄, 100 mM 나트륨 시트레이트 (pH 7.4) 중의 Applied Biosystems Poros A/20 컬럼에 적용하고, Agilent HPLC 1100 시스템 상의 200 mM NaCl, 100 mM 시트르산 (pH 2.5)으로 매트릭스로부터 용리하였다. 용리된 단백질을 UV 흡수 및 피크 영역 통합에 의해 정량화하였다. 정제된 표준 IgG1 항체는 표준으로서 역할하였다.

[0160] 대안적으로는, 세포 배양 상청액 중의 항체 및 유도체의 농도를 샌드위치-IgG-ELISA로 측정하였다. 간략하게는, StreptaWell1 High Bind 스트렙타비딘 A-96 웰 마이크로타이터 플레이트 (Roche)를, 0.1 μ g/mL에서의 바

이오티닐화 항-인간 IgG 포획 분자 F(ab')2_h-Fc γ > BI (Dianova) 100 μl/웰로 실온에서 1시간 동안 또는 대안적으로는 4°C에서 하룻밤 동안 코팅한 후, 200 μl/웰 PBS, 0.05% 트윈 (PBST, Sigma)으로 3회 세척하였다. 각각의 항체 함유 세포 배양 상청액의 PBS (Sigma)에서의 연속 희석물 100 μl/웰을 웰에 첨가하고, 마이크로타이터 플레이트 진탕기에서 실온에서 1~2시간 동안 인큐베이션하였다. 200 μl/웰 PBST로 웰을 3회 세척하고, 결합된 항체를 마이크로타이터 플레이트 진탕기에서 실온에서 1~2시간 동안 검출 항체로서 0.1 μg/mL에서의 F(ab')2_h-Fc γ >POD (Dianova) 100 μl로 검출하였다. 미결합된 검출 항체를 200 μl/웰 PBST로 3회 세척하여 제거하고, 결합된 검출 항체는 100 μl ABTS/웰을 첨가하여 검출하였다. 405 nm의 측정 파장 (참조 파장 492 nm)에서 Tecan Fluor 분광계로 흡광도를 측정하였다.

[0161] 단백질 정제

[0162] 표준 프로토콜을 참조하여 여과된 세포 배양 상청액으로부터 단백질을 정제하였다. 간략하게는, 단백질 A 세파로오스 컬럼 (Protein A Sepharose column) (GE healthcare)에 항체를 적용하고 PBS로 세척하였다. pH 2.8에서 항체를 용리한 후 샘플을 즉각적으로 중화하였다. 응집된 단백질을 PBS 또는 20 mM 히스티딘, 150 mM NaCl (pH 6.0)에서 크기 배제 크로마토그래피 (Superdex 200, GE Healthcare)에 의해 단량체적 항체로부터 분리하였다. 단량체적 항체 분획을 모으고, 필요한 경우 예를 들어 MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) 원심분리 농축기를 사용하여 농축하고, -20°C 또는 -80°C에서 동결 및 보관하였다. 샘플 일부를 후속 단백질 분석 및 분석적 특성화 예를 들어, SDS-PAGE, 크기 배제 크로마토그래피 또는 질량 분석에 제공하였다.

[0163] SDS-PAGE

[0164] NuPAGE® Pre-Cast 젤 시스템 (Invitrogen)을 제조자의 지시 사항에 따라 사용하였다. 특히, 10% 또는 4~12% NuPAGE® Novex® 비스-트리스 Pre-Cast 젤 (pH 6.4) 및 NuPAGE® MES (환원젤, NuPAGE® 항산화제 영동 완충액 첨가제 가짐) 또는 MOPS (비환원젤) 영동 완충액을 사용하였다.

[0165] 분석적 크기 배제 크로마토그래피

[0166] 항체의 응집 및 올리고머성 상태의 측정을 위한 크기 배제 크로마토그래피를 HPLC 크로마토그래피에 의해 수행하였다. 간략하게는, 단백질 A로 정제된 항체를 Agilent HPLC 1100 시스템 상의 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.5)에서의 Tosoh TSKgel G3000SW 컬럼, 또는 Dionex HPLC-System 상의 2 x PBS에서의 Superdex 200 컬럼 (GE Healthcare)에 적용하였다. 용리된 단백질을 UV 흡광도 및 피크 영역 통합에 의해 정량화하였다. BioRad Gel Filtration Standard 151-1901이 표준으로서 역할하였다.

[0167] 질량 분석

[0168] 교차 항체의 총 탈글리코실화 질량을 전기분사 이온화 질량 분석 (ESI-MS)을 통해 측정하고 확인하였다. 간략하게는, 100 μg의 정제된 항체를 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7) 중의 50 mU N-Glycosidase F (PNGaseF, Prozyme)로, 37°C에서 12~24시간 동안 2 mg/ml 이하의 단백질 농도에서 탈글리코실화시킨 후, Sephadex G25 컬럼 (GE Healthcare) 상에서 HPLC를 통해 탈염시켰다. 탈글리코실화 및 환원 후 각각의 중쇄 및 경쇄의 질량을 ESI-MS로 측정하였다. 간략하게는, 115 μl 중의 50 μg 항체를 60 μl 1M TCEP 및 50 μl 8M 구아니딘-하이드로클로라이드로 인큐베이션한 후 탈염시켰다. 총 질량 및 환원된 중쇄 및 경쇄의 질량을 NanoMate 공급원이 장착된 Q-Star Elite MS 시스템 상의 ESI-MS를 통해 측정하였다.

[0169] 실시예 1

[0170] <IGF-1R> 항체 부분의 중쇄에서 중쇄 도메인 CH3이 불변 중쇄 도메인 CH1로 교체되고, VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> 항체의 중쇄에서 중쇄 도메인 CH3이 카파 불변 경쇄 도메인 Ck로 교체되는 2가, 이중특이적 <IGF-1R-ANGPT2> 항체의 생성, 발현, 정제 및 분석 (본원에서 <IGF-1R-ANGPT2> CH3-CH1/CH3-Ck 교환 항체로서 축약됨)

[0171] 실시예 1A

[0172] CH3-CH3에 대한 CH1-Ck 교환을 갖는 개질된 Fc 부위를 위한 발현 플라스미드의 생성

[0173] CH3-CH3에 대한 CH1-Ck 교환이 각각의 Fc 부위의 이종이량체화의 유도를 통해 이중특이적 항체의 생성에 적용될 수 있다는 것을 나타내기 위해, 도 5에 따른 항체 구성물을 생성시켰다. 이를 위해, IGF-1R에 대한 야생형 <IGF-1R> 항체, 및 안지오포이에틴-2에 대한 VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> 항체의 공동-발현을 위한 플라스미드를 야생형 <IGF-1R> 항체에서의 CH3 도메인을 CH1 도메인으로, VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> 항체에서의 CH3 도

메인을 CL (Ck) 도메인으로 교환함으로써 개질시켰다. 이후, 상응하는 네 개의 플라스미드를 공동-발현시키고 생성된 항체를 정제하였다.

[0174] CH3-CH1 교환을 갖는 야생형 <IGF-1R> 항체 중쇄 HC#의 각각의 리더 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인에 대한 서열은 WO 2005/005635에서 기재된 인간 <IGF-1R> 항체 중쇄 (SEQ ID NO:1)에서 유래하며, 중쇄 및 경쇄 불변 도메인은 인간 항체 (C-카파 및 IgG1)에서 유래한다. 야생형 <IGF-1R> 항체 경쇄 LC (SEQ ID NO:2)에 대한 서열은 WO 2005/005635에서 기재된다.

[0175] CL (Ck) 도메인을 함유하는 상이한 중쇄로 이종이량체화를 유도하기 위해, <IGF-1R> 항체 리더 서열, 중쇄 가변 도메인 (VH), 중쇄 불변 도메인 1 (CH1), 힌지 및 불변 도메인 CH2 (VH-CH1-힌지-CH2)를 인코딩하는 유전자 조각을 중쇄 불변 도메인 3 (CH3) 대신 중쇄 불변 도메인 1 (CH1)의 5'-말단에 연결하고 융합시켰다. 링커 서열은 최적화되었고, 자연적 서열과 상이하였다. CH1 도메인에 의한 CH3 도메인의 교환 (CH3-CH1 교환)에서 야기되는 각각의 융합 단백질을 코딩하는 DNA는 유전자 합성에 의해 생성되었으며, 하기에서 <IGF-1R> HC# (SEQ ID NO:3)로 나타내었다.

[0176] 상기 실시예에서 기재된 각각의 리더 서열을 포함하는 안지오포이에틴-2 <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 교환 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대한 서열은 WO 2006/045049에서 기재된 인간 야생형 <ANGPT2> 항체 중쇄 (SEQ ID NO:4) 및 경쇄 (SEQ ID NO:5)에서 유래하고, 중쇄 및 경쇄 불변 도메인은 인간 항체 (C-카파 및 IgG1)에서 유래한다. 각각의 <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 교환 항체를 수득하기 위해, 하기의 구성물을 생성시켰다:

[0177] <ANGPT2> 항체 리더 서열, 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 인간 카파-경쇄 불변 도메인 (CL)을 인코딩하는 유전자 조각을 인간 γ1-중쇄 불변 도메인의 Fc 도메인의 5'-말단 (힌지-CH2-CH3)에 연결하고 융합시켰다. VL 및 CL 도메인에 의한 VH 및 CH1 도메인의 교환에서 야기되는 각각의 융합 단백질을 코딩하는 DNA를 유전자 합성에 의해 생성하였으며, 하기에서 VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> HC* (중쇄*) (SEQ ID NO:6)로 나타내었다.

[0178] <ANGPT2> 항체 리더 서열, 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 인간 γ1-중쇄 불변 도메인 (CH1)에 대한 유전자 조각을 독립적 사슬로서 연결하였다. VH 및 CH1 도메인에 의한 VL 및 CL 도메인의 교환에서 야기되는 각각의 융합 단백질을 코딩하는 DNA를 유전자 합성에 의해 생성하였으며, 하기에서 VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> LC* (경쇄*) (SEQ ID NO:7)로 나타내었다.

[0179] CH1 도메인을 함유하는 제 2 중쇄로 이종이량체화를 유도하기 위해, 개질된 VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> 항체 중쇄* HC* (SEQ ID NO:6)에 대한 서열을 Ck 도메인에 의한 CH3 도메인의 교환 (CH3-Ck 교환)으로 개질하였다. 이러한 목적을 위해, SEQ ID NO:6으로부터의 <ANGPT2> 항체 리더 서열, 경쇄 가변 도메인 (VL), 경쇄 불변 도메인 1 (CL), 힌지 및 불변 도메인 CH2 (VL-CL-힌지-CH2)를 인코딩하는 유전자 조각을 중쇄 불변 도메인 3 (CH3) 대신 카파 경쇄 불변 도메인 (Ck)의 5'-말단에 연결하고 융합시켰다. 링커 서열은 최적화되었고, 자연적 서열과 상이하였다. C-말단 시스테인 없이 종결되거나 (SEQ ID NO:8) C-말단 시스테인을 갖고 종결되는 (SEQ ID NO:9) 두 가지 서열을 평가하였다. 카파 CL 도메인에 의한 CH3 도메인의 교환 (CH3-CL 교환)에서 야기되는 각각의 융합 단백질을 코딩하는 DNA를 유전자 합성에 의해 생성하였으며, 하기에서 <ANGPT2> HC## (SEQ ID NO:8 및 NO:9)로 나타내었다.

[0180] 도 6 및 도 7은 개질된 <IGF-1R> 중쇄 HC# 및 개질된 VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> 항체 중쇄 HC## (각각의 이중특이적 항체의 이종이량체화를 책임지는 C-말단 시스테인을 갖거나 갖지 않는)의 단백질 서열의 도식적 일람을 나타낸다. 도 8은 이중특이적 항체를 생성하기 위해 적용된 4개 벡터의 개관을 나타낸다 (4-벡터 시스템).

실시예 1B

[0182] 개질된 Fc 부위를 갖는 이중특이적 <IGF-1R-ANGPT2> CH3-CH1/CH3-Ck 교환 항체의 일시적 발현 및 정제

[0183] 하기에서, 개질된 <IGF-1R> 중쇄 HC# (pUC-HC#-IGF-1R) (SEQ ID NO:3) 및 개질된 VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> 항체 중쇄 HC## (pUC-HC##-ANGPT2) (시스테인 잔기를 갖지 않는 SEQ ID NO:8, 또는 시스테인 잔기를 갖는 SEQ ID NO:9)를 코딩하는 네 개의 플라스미드를, 각각 상기 기재된 바와 같이 (도 8) <IGF-1R> 야생형 경쇄 LC (pUC-LC-IGF-1R) (SEQ ID NO:2) 및 개질된 VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> 항체 경쇄 LC* (pUC-LC*-ANGPT2) (SEQ ID: 7)에 대한 각각의 경쇄 벡터와 함께 등을 비율로 일시적으로 공동-발현시켰다. 상기 기재된 바와 같이 이중특이적 항체를 단백질 A, 이후 크기 배제 크로마토그래피를 통해 후속적으로 정제하였다. 도 9는 C-말단 시스테인을 갖지 않거나 또는 갖는, 개질된 VL-VH/CL-CH1 교환 <ANGPT2> 항체 중쇄 HC##를 코딩하는 플라스미드를 갖는 두 발현물로부터 정제된 단백질의 SDS-PAGE를 나타낸다. SDS-PAGE는 정제된 항체에서 실제로,

바람직한 기능적 이중특이적 <IGF-1R-ANGPT2> CH3-CH1/CH3-Ck 교환 항체로부터의 4개의 상이한 단백질이 유사한 비율로 존재한다는 것을 나타내었다.

[0184] 실시예 1E

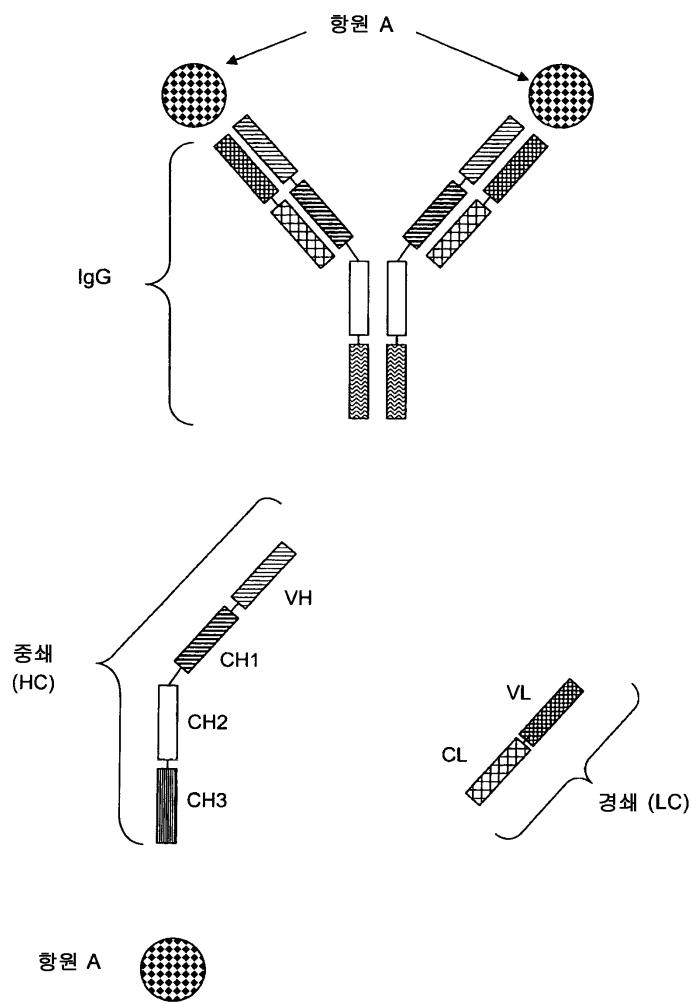
[0185] I24 IGF-1R 발현 세포 상에서의 세포 FACS 가교 검정에서의, CH3-CH1/CH3-Ck 교환을 갖는 개질된 Fc 부위를 갖는 기능적 이중특이적 <IGF-1R-ANGPT2> CH3-CH1/CH3-Ck 교환 항체의 검출

[0186] CH3-CH3에 대한 CH1-Ck 교환을 갖는 개질된 Fc 부위를 갖는 기능적 이중특이적 <IGF-1R-ANGPT2> CH3-CH1/CH3-Ck 교환 항체의 존재를 확인하기 위해, I24 세포 (재조합 인간 IGF-1R을 발현하는 NIH3T3 세포, Roche)에서 세포 FACS IGF-1R-ANGPT2 가교 검정을 수행하였다. 검정 원리를 도 10에 나타내었다. 정제된 항체 혼합물에 각각 존재하는 이중특이적 <IGF-1R-ANGPT2>는 I24 세포에서 IGF-1R에 결합할 수 있고, 동시에 ANGPT2에 결합할 수 있으며; 따라서 이의 두 표적 항원이 두 반대 Fab 부위와 연결될 것이다.

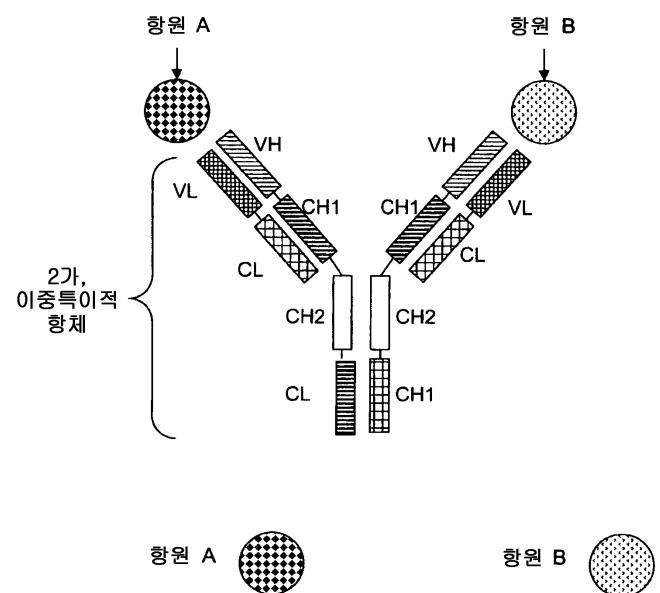
[0187] 요약하여, FACS 튜브 당 5x10E5 I24 세포를 총 정제된 항체 혼합물로 인큐베이션하고, 1시간 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 각각의 정제된 항체를 I24 세포에 적용하였다. 비결합된 항체를 4 mL 얼음 냉각된 PBS (Gibco) + 2% FCS (Gibco)로 세척하여 제거하고 세포를 원심분리 (400 g에서 5분)하고, 결합된 이중특이적 항체를 50 μ L의 2 μ g/mL 인간 안지오포이에틴-2 (R&D Systems)로 1시간 동안 얼음 상에서 검출하였다. 이후, 비결합된 안지오포이에틴-2를 4 mL 얼음 냉각된 PBS (Gibco) + 2% FCS (Gibco)로 1회 또는 2회 세척하여 제거하고 세포를 원심분리 (400 g에서 5분)하고, 결합된 안지오포이에틴-2를 50 μ L의 5 μ g/mL <Ang-2>mIgG1-바이오틴 항체 (BAM0981, R&D Systems)로 45분 동안 얼음 상에서 검출하고; 대안적으로는, 세포를 50 μ L의 5 μ g/mL mIgG1-바이오틴-동형 대조군 (R&D Systems)으로 인큐베이션하였다. 비결합된 검출 항체를 4 mL 얼음 냉각된 PBS (Gibco) + 2% FCS (Gibco)로 세척하여 제거하고 세포를 원심분리 (400 g에서 5분)하고, 결합된 검출 항체를 50 μ L 1:400 스트렙타비딘-PE 접합체 (Invitrogen/Zymed)로, 차광하여 45분 동안 얼음 상에서 검출하였다. 비결합된 스트렙타비딘-PE 접합체를 4 mL 얼음 냉각된 PBS + 2% FCS로 세척하여 제거하였다. 이후, 세포를 원심분리 (400 g에서 5분)하고 300~500 μ L PBS에서 재현탁하고, 결합된 스트렙타비딘-PE 접합체를 FACS Calibur 또는 FACS Canto (BD (FL2 채널, 획득량 당 10,000 세포) 상에서 정량화하였다. 상기 실험 동안 각각의 동형 대조군을 포함시켜, 임의 비특이적 결합 사건을 제외시켰다. 또한, 정제된 단일특이적, 2가 IgG1 항체 <IGF-1R> 및 <ANGPT2>를 대조군으로서 포함시켰다.

도면

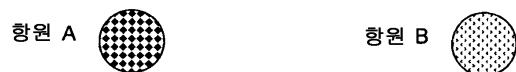
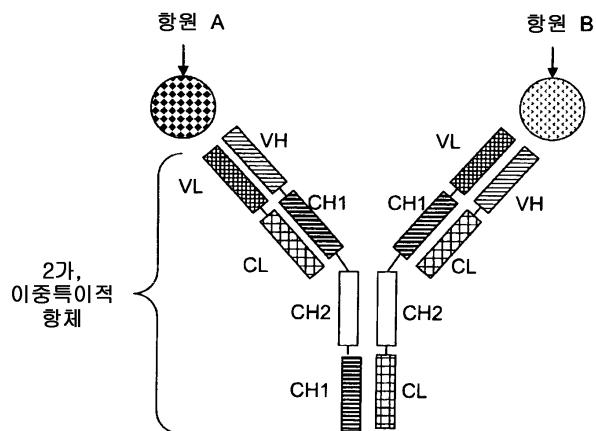
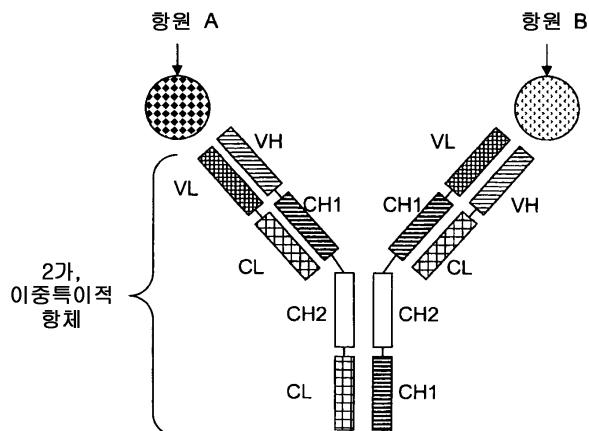
도면1



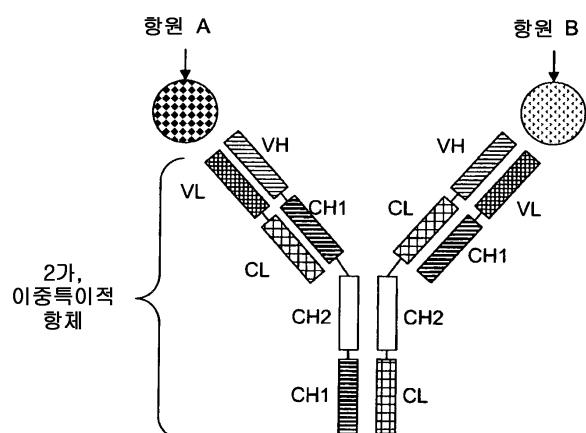
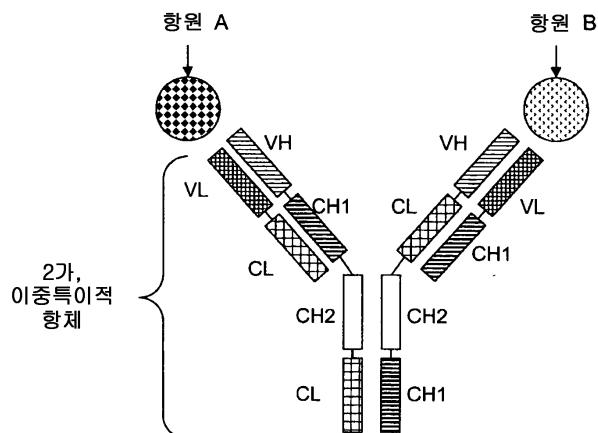
도면2



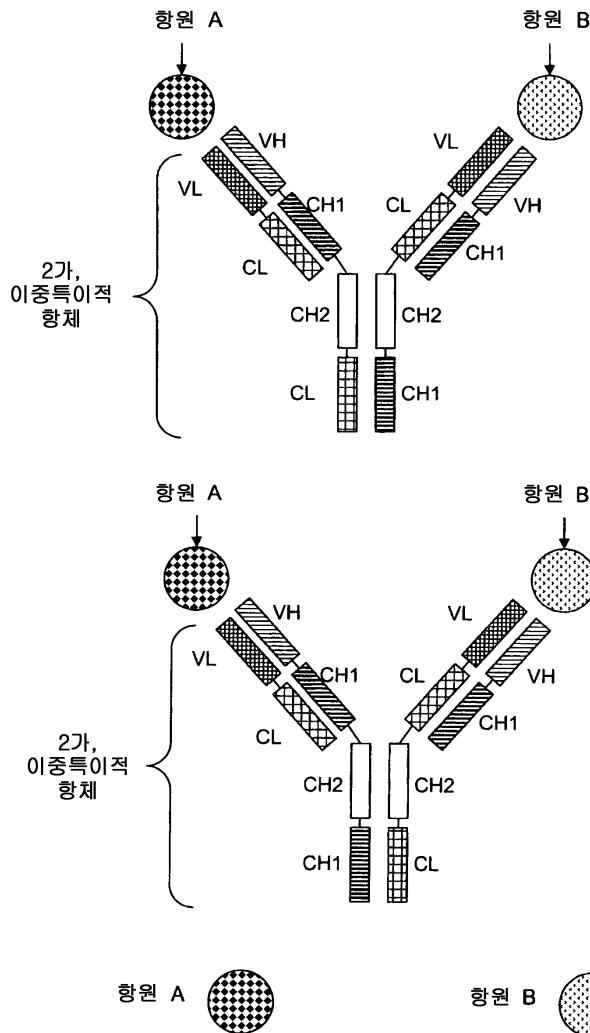
도면3



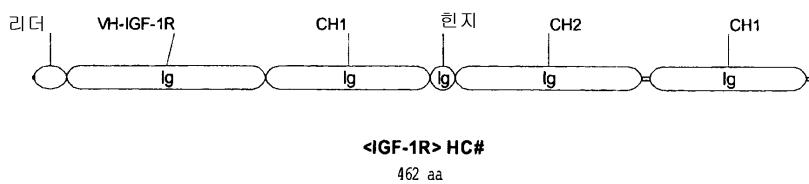
도면4



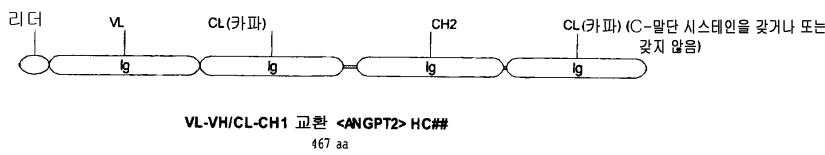
도면5



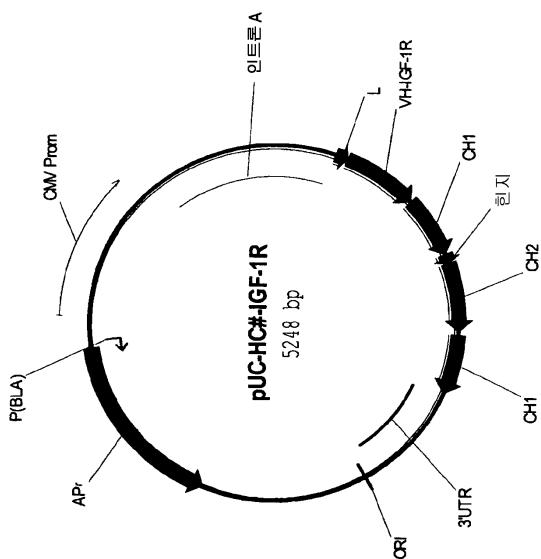
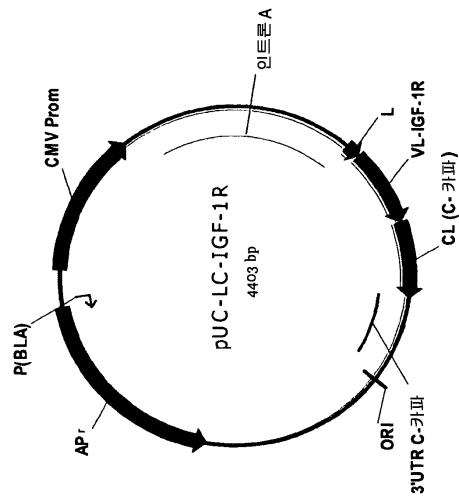
도면6



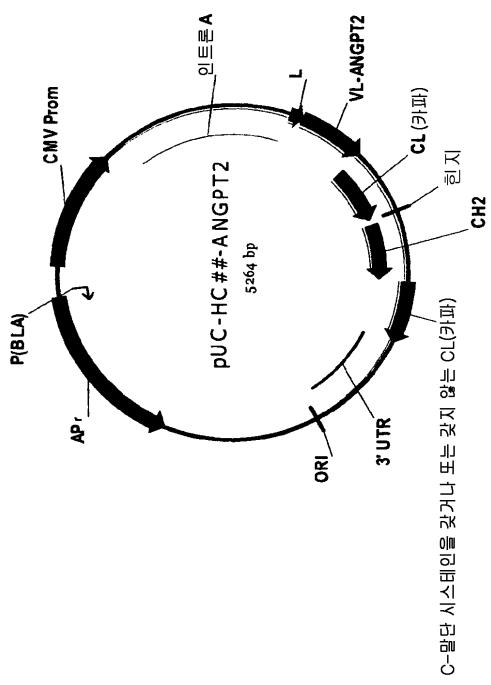
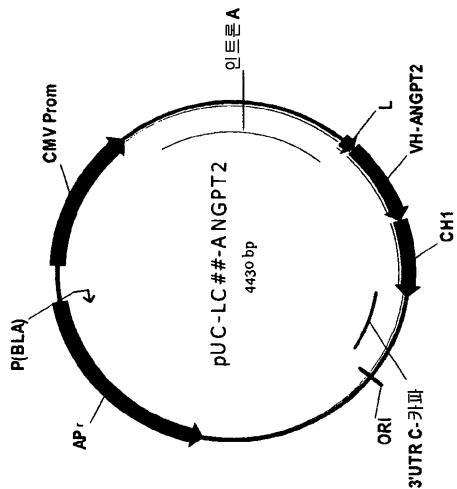
도면7



도면8a

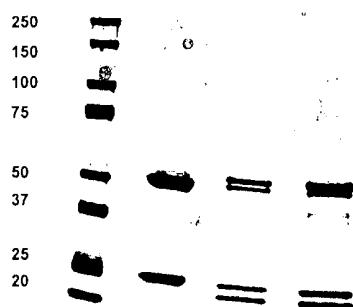


도면8b

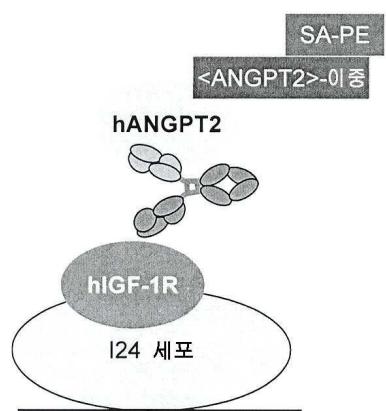


도면9

대조군 흉체
공동발현 SEQ 2,3,7,8
공동발현 SEQ 2,3,7,9



도면10



서 열 목 록

[서열목록 전자파일 첨부](#)