(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월04일
(11) 등록번호 10-2382304
(24) 등록일자 2022년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) *C07K 16/12* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *C07K 16/26* (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/468 (2013.01)
C07K 16/1278 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7011173(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년04월19일
심사청구일자 2020년04월17일
(85) 번역문제출일자 2020년04월17일
(65) 공개번호 10-2020-0047724
(43) 공개일자 2020년05월07일
(62) 원출원 특허 10-2014-7032231
원출원일자(국제) 2013년04월19일
심사청구일자 2018년02월06일
(86) 국제출원번호 PCT/NL2013/050293
(87) 국제공개번호 WO 2013/157953
국제공개일자 2013년10월24일
(30) 우선권주장
61/635,935 2012년04월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2009089004 A1*
WO2011143545 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메뤼스 엔.페.
네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 에일르랜 62
(72) 발명자
데 크루이프, 코르네리스 아드리안
네덜란드, 엔엘-3584 세하 위트레흐트, 파뒤알란 8 (포스트파크 133), 메뤼스 베.페. 내
헨드리크스, 린다 조한나 엘리다
네덜란드, 엔엘-3584 세하 위트레흐트, 파뒤알란 8 (포스트파크 133), 메뤼스 베.페. 내
로그텐베가, 톤
네덜란드, 엔엘-3584 세하 위트레흐트, 파뒤알란 8 (포스트파크133), 메뤼스 베.페. 내
(74) 대리인
특허법인충현

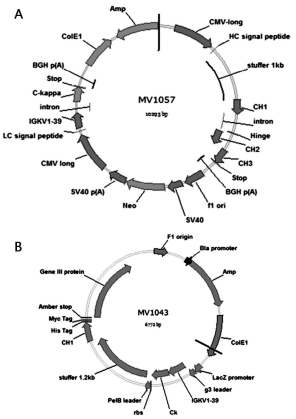
전체 청구항 수 : 총 43 항 심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 **Ig-유사 분자의 제조방법 및 제조수단**

(57) 요 약

본 발명은 단일 숙주 세포 내에서 하나 또는 그 이상의 Ig-유사 분자들을 제조하는 수단 및 방법을 제공한다. 또한, 관심대상이 되는 단일특이적 및/또는 이중특이적 Ig-유사 분자들의 제조를 가능케 하는 신규의 CH3 돌연변이들이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
C07K 16/26 (2013.01)
C07K 16/36 (2013.01)
C12P 21/005 (2013.01)
C07K 2317/14 (2013.01)
C07K 2317/526 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

단일 숙주 세포로부터 헤테로다이머 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 항체는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고,

상기 방법은 상기 숙주 세포 내부로 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산, 및 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산을 도입하여 형질전환시키는 단계를 포함하며,

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366K 아미노산 치환 및 L351K 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351D 아미노산 치환 및 L368E 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366이 양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351D 아미노산 치환 또는 L351E 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366K 아미노산 치환 또는 T366R 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351이 음으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하는 것;이며,

상기 방법은 상기 숙주 세포를 배양하여 상기 2개의 핵산들이 발현될 수 있게 하고, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 항체를 수득하는 단계를 더 포함하는, 단일 숙주 세포로부터 헤테로다이머 항체를 제조하는 방법.

청구항 2

단일 숙주 세포로부터 헤테로다이머 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 항체는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고,

상기 방법은 상기 숙주 세포 내부로 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산, 및 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산을 도입하여 형질전환시키는 단계를 포함하며,

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366이 음으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351R 아미노산 치환 또는 L351K 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366D 아미노산 치환 또는 T366E 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351이 양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하는 것;이며,

상기 방법은 상기 숙주 세포를 배양하여 상기 2개의 핵산들이 발현될 수 있게 하고, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 항체를 수득하는 단계를 더 포함하는, 단일 숙주 세포로부터 헤테로다이머 항체를 제조하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 숙주 세포 내부로, 공통된 경사슬을 암호화하는 핵산을 도입하여 형질전환시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 366번째 위치의 아미노산에 라이신(K) 잔기를 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 351번째 위치의 아미노산에 아스파르트산(D) 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 351번째 위치의 아미노산에 라이신(K) 잔기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 349번째 위치의 아미노산에 글루탐산(E) 잔기 또는 아스파르트산(D) 잔기, 또는 368번째 위치의 아미노산에 글루탐산(E) 잔기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 368번째 위치의 아미노산에 글루탐산(E) 잔기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 및 제7항 중에서 선택되는 어느 한 항에 있어서, 오염성 호모다이머들은 5 % 미만으로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 오염성 호모다이머들은 2 % 미만으로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 오염성 호모다이머들은 1 % 미만으로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 오염성 호모다이머들은 본질적으로 존재하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 및 제7항 중에서 선택되는 어느 한 항에 있어서, 상기 암호화된 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들 각각이 에피토프를 인식하는 가변 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 2개의 가변 영역들 각각이 다른 에피토프들을 인식하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 다른 에피토프들은 동일한 표적 상에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 표적은 가용성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 표적은 막-결합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 다른 에피토프들은 다른 표적 상에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 다른 표적들은 동일한 세포들 상에서 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 다른 표적들은 다른 세포들 상에서 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 다른 표적들은 가용성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, 하나의 표적은 가용성인 반면, 두번째 표적은 막-결합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제12항에 있어서, 상기 에피토프들 중 적어도 하나가 종양 세포 상에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제12항에 있어서, 상기 에피토프들 중 적어도 하나가 효과기 세포 상에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 효과기 세포가 NK 세포, T 세포, B 세포, 단구 (monocyte), 대식세포 (macrophage), 수지상 세포 (dendritic cell) 또는 호중성 과립구 (neutrophilic granulocyte)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 에피토프가 CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D 또는 NKp46 분자 상에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 및 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 인간 IgG1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제3항에 있어서, 상기 공통된 경사슬은 생식계열 경사슬인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 공통된 경사슬은 재배열된 생식계열 인간 카파 경사슬 IgVκ1-39/Jκ 또는 IgVκ3-20/Jκ인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 및 제7항 중에서 선택되는 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득될 수 있는 헤테로다이머 항체.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 헤테로다이머 항체는 동일 항원 상의 다른 에피토프들에 결합하거나 또는 다른 항원들의 다른 에피토프들에 결합하는 것을 특징으로 하는 헤테로다이머 항체.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 항체는 인간 IgG1인 것을 특징으로 하는 헤테로다이머 항체.

청구항 32

두 개의 인간 IgG CH3 도메인들을 포함하는 헤테로다이머 항체로서,

- 하나의 인간 IgG CH3 도메인은 T366K 아미노산 치환 및 L351K 아미노산 치환을 포함하고, 나머지 하나의 인간

IgG CH3 도메인은 L351D 아미노산 치환 및 L368E 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 하나의 인간 IgG CH3 도메인은 T366이 양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하고, 나머지 하나의 인간 IgG CH3 도메인은 L351D 아미노산 치환 또는 L351E 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 하나의 인간 IgG CH3 도메인은 T366K 아미노산 치환 또는 T366R 아미노산 치환을 포함하고, 나머지 하나의 인간 IgG CH3 도메인은 L351이 음으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하는 것;인 헤테로다이머 항체.

청구항 33

두 개의 인간 IgG CH3 도메인들을 포함하는 헤테로다이머 항체로서,

- 하나의 인간 IgG CH3 도메인은 T366이 음으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351R 아미노산 치환 또는 L351K 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366D 아미노산 치환 또는 T366E 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351이 양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하는 것;인 헤테로다이머 항체.

청구항 34

적어도 제1 및 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 하나 또는 그 이상의 핵산을 포함하는 재조합 숙주 세포로서,

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366K 아미노산 치환 및 L351K 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351D 아미노산 치환 및 L368E 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366이 양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351D 아미노산 치환 또는 L351E 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366K 아미노산 치환 또는 T366R 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351이 음으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하는 것;인 재조합 숙주 세포.

청구항 35

적어도 제1 및 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 하나 또는 그 이상의 핵산을 포함하는 재조합 숙주 세포로서,

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366이 음으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351R 아미노산 치환 또는 L351K 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366D 아미노산 치환 또는 T366E 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351이 양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하는 것;인 재조합 숙주 세포.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 숙주 세포는 공통된 경사슬을 암호화하는 핵산을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 숙주 세포.

청구항 37

제32항 또는 제33항에 따른 헤테로다이머 항체, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 암 또는 감염 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 헤테로다이머 항체는 제34항에 따른 재조합 숙주 세포에 의해서 제조된 것을 특징으로 하는 암 또는 감염 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 39

헤테로다이머 항체의 제조를 위한 숙주 세포의 제조방법으로서,

상기 방법은 상기 숙주 세포 내부로, 적어도 제1 및 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 하나 또는 그 이상의 핵산을 도입하는 단계를 포함하고,

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366K 아미노산 치환 및 L351K 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351D 아미노산 치환 및 L368E 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366이 양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351D 아미노산 치환 또는 L351E 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366K 아미노산 치환 또는 T366R 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351이 음으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하는 것;인 재조합 숙주 세포의 제조방법.

청구항 40

헤테로다이머 항체의 제조를 위한 숙주 세포의 제조방법으로서,

상기 방법은 상기 숙주 세포 내부로, 적어도 제1 및 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 하나 또는 그 이상의 핵산을 도입하는 단계를 포함하고, 상기 제1 및 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 인간 IgG CH2 도메인을 더 포함하고,

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366이 음으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351R 아미노산 치환 또는 L351K 아미노산 치환을 포함하는 것; 또는

- 상기 제1 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 T366D 아미노산 치환 또는 T366E 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 인간 IgG CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 L351이 양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 치환을 포함하는 것;인 재조합 숙주 세포의 제조방법.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 숙주 세포에 공통된 경사슬을 암호화하는 핵산을 도입하여 형질전환시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 숙주 세포의 제조방법.

청구항 42

제34항 또는 제35항에 따른 재조합 숙주 세포의 배양물, 또는 제39항 또는 제40항에 따른 방법에 의해서 제조된 재조합 숙주 세포의 배양물로서, 헤테로다이머 항체를 생산하는 재조합 숙주 세포의 배양물.

청구항 43

제37항에 있어서, 상기 헤테로다이머 항체는 제35항에 따른 재조합 숙주 세포에 의해서 제조된 것을 특징으로 하는 암 또는 감염 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 분자생물학, 약학 및 생물학적 치료법 분야에 속하는 것이다. 특히, 본 발명은 다양한 질환들을 치

료하기 위한 치료 항체 분야에 속하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재 사용되는 많은 생물학적 치료제들은 분리된 재조합, 인간 또는 인간화 단클론 항체들로서, 이들은 생체 면역 시스템의 능력을 강화시킴으로써 질병 과정에 관여하는 세포들 및/또는 분자들을 중화 또는 제거하거나, 또는 침입 병원균들 또는 감염원들을 제거한다. 단클론 항체들은 항원의 단일 특정 영역, 또는 에피토프(epitope)에 결합하며, 치료용으로 사용되기 위해서, 예를 들어 종양세포 사멸, 수용체-리간드 상호작용의 차단 또는 바이러스 중화와 같은 원하는 기능적 특성들을 수행하기 위해서 종종 선택된다. 최근에, 약 30가지의 FDA 승인된 단클론 항체들이 존재하며, 이는 통상적으로 대량으로 생산되고, 조절 수용가능성 (regulatory acceptability)을 높이는 배치-투-배치 (batch-to-batch) 일관성을 보장하기 위해서 생물리적 및 생화학적 특성들에 대해서 상세히 분석될 수 있다. 이러한 바람직한 특성들에도 불구하고, 단클론 항체들은 몇몇 단점들을 갖는 바, 이들 중 일부는 단클론 항체들의 단일특이성 (monospecificity) 및 질병들의 복잡성과 관련이 있다. 질병 과정들은 종종 여러 가지 인자에 의해서 영향을 받으며, 질병 매개체들의 여분적 또는 상승적 작용 또는 다른 수용체들의 상승-조절을 포함하는 바, 이에는 그 신호 네트워크 사이의 교차작용 (crosstalk)을 포함한다. 결과적으로, 병리증상에 관여하는 다중의, 다양한 인자들을 봉쇄함으로써 개선된 치료적 효과를 도출해낼 수 있다. 그 단일특이성으로 인해서, 단클론 항체들은 복잡한 질병 과정들 중에서 단일 단계만 방해할 수 있으며, 이로 인해서 종종 최적의 효과가 도출되지는 않는다. 질병 과정의 다중적 국면들에 충분히 관여하지 못한다는 점에 더해서, 단일 세포 또는 가용성 단백질 또는 질병원 상의 단일 에피토프를 표적화하는 것은 종종 질병을 효과적으로 치료하는데 충분하지 않을 것이라는 점이 명백한데, 이는 단클론 항체가 결합하고 원하는 효과를 나타내는 표적 에피토프가 더 이상 존재하지 않을 수도 있기 때문이다. 예를 들어, 종양 세포들은 종종 하강-조절 (down-regulation), 돌연변이 또는 성장 인자 수용체 상에 존재하는 표적 에피토프의 차폐에 의해서 단클론 항체 치료법을 회피한다. 대안적인 수용체들 및/또는 리간드들을 활성화시킴으로써, 종양세포들은 다른 경로를 택할 수 있고, 이를 통해서 지속적인 성장 및 전이를 도모할 수 있다. 유사하게, 바이러스들 및 다른 병원균들도 종종 돌연변이화하고, 표적 에피토프의 상실 또는 차폐를 통해서, 단클론 항체 치료법을 회피한다. 단일 에피토프에 결합하는 단클론 항체들은 종종 다클론 항체들에 의해서 유발되는 효과기 메카니즘 (effector mechanism)을 완전히 발휘할 수 없으며, 이러한 메카니즘에는, 다른 것들 중에서도, 옵소닌작용 (opsonization) (항원의 식세포작용 (phagocytosis) 강화), 입체 장해 (steric hindrance) (항체들에 의해서 코팅된 항원들은 숙주 세포 또는 점막 표면에 부착하는 것이 방지됨), 독소 중성화, 응집 또는 침전 (여러 가용성 항원들에 결합하는 항체들은 응집되고 연이어 제거됨), 보체 활성화 및 항체-의존성 세포 독성 (항체가 자연 살해 세포 (natural killer cells) 및 호중구 (neutrophils)에 의한 표적 세포들의 사멸을 가능하게 함)이 포함된다.

[0003] 치료적 응용을 위한 다클론 항체들은 인간 혼주혈청 (pooled human serum)으로부터 얻을 수 있다. 이러한 혈청-유도 치료적 다클론 항체들은, 예를 들어, 광견병 바이러스 (rabies virus), 거대세포 바이러스 (cytomegalovirus) 및 호흡기 세포융합 바이러스 (respiratory syncytial virus)와 같은 바이러스들에 의해서 야기되는 감염들을 치료 또는 예방하고, 파상풍 독소 (tetanus toxin) 및 보툴리눔 독소 (botulinum toxin)와 같은 독소들을 중화하거나, 또는 레서스 D 동종이식 면역화 (Rhesus D allograft immunization)를 방지하는데 사용될 수 있다. 혈청-유도된 다클론 항체 제제를 더욱 폭넓게 사용하는 데에는 한계가 있었는데, 이는 원천 혈장이 감염성 질병들 및 독소들과 같은 한정된 범위의 표적들에 대해서만 사용가능하다는 점 때문이다. 더 나아가, 제품들이, 양적 및 적합성 관점 모두에서, 공여체 혈액 구입가능성에 매우 크게 의존하는 바, 이로 인해서 배치들 (batches) 사이에 상당한 변이가 존재한다. 부가적으로, 스크리닝 기술들이 지속적으로 진화하는 바이러스들을 따라잡지 못하며, 따라서 면역글로불린 제품들은 감염성 질환의 전파라는 잠재적 위험성을 내포하고 있다. 마지막으로, 혈액 채취, 스크리닝 및 면역글로불린 정제라는 긴 과정은 혈장-유도된 면역글로불린들이 생산하기에 고가라는 점을 의미한다.

[0004] 단클론 항체들의 혼합물은 단클론 항체들의 효율성을 개선하면서도, 혈청-유도된 다클론 항체들과 관련된 제한점들을 회피할 수도 있다. 종래에, 두 가지 인간 또는 인간화된 단클론 항체들의 조합들 (예를 들어, HER2 수용체에 대한 두 가지 단클론 항체들의 혼합물, EGFR 수용체에 대한 두 가지 항체들의 혼합물, 및 광견병 바이러스에 대한 두 가지 단클론 항체들의 혼합물)이 전임상 모델 및 임상 실험들에서 테스트된 바 있다.

[0005] 종래에, 두 가지 단클론 항체들을 조합함으로써, 어느 항체 하나 만에 관련되지 않은 부가적 또는 상승적 효과와, 동원 효과기 (recruit effector) 메카니즘을 유발할 수 있다는 점이 밝혀졌다. 예를 들어, EGFR 또는 HER2에 대한 두 가지 단클론 항체들의 혼합물이, 향상된 수용체 내부화 (receptor internalization), 수용체 하류에

서 개선된 신호 경로의 봉쇄, 및 향상된 면역 효과기-매개 세포독성을 포함하는 활성들의 조합에 기반해서, 종양 세포들을 더욱 높은 효능으로 사멸시킬 수 있다는 점이 밝혀졌다. 두 가지 단클론 항체들에 기반한 조합 치료법의 경우, 구성성분 항체들은 개별적으로 생산될 수 있으며, 단백질 수준에서 조합될 수 있다. 이러한 접근법의 단점은, 두 가지 항체들을 임상 실험에서 개별적으로 개발하여야 하고, (부분적으로) 그러한 과정을 조합에 대해서도 반복하여야 하는 점에서 초래되는 막대한 비용이다. 이는 항체 조합에 기반한 치료법이 수용할 수 없을 정도로 고가가 되게 하는 요인이다. 다른 대안으로서, 구성성분 단클론 항체들을 생산하는 두 가지 재조합 세포주들을 발효기 내에서 혼합하고, 결과물인 항체 혼합물을 단일 제제로서 정제할 수도 있다 (WO 2004/061104). 이러한 접근법의 단점은 조성에 대한 조절이 힘들어지고, 따라서 결과물인 재조합 다클론 항체 제제의 재현가능성을 조절하기가 힘들어진다는 점이며, 이는 특히 세포들이 배양됨에 따라서 시간에 걸쳐서 그러한 조성이 변화할 수 있다는 점을 고려하면 더욱 그러하다.

[0006] 과거 10년 동안, 두 가지 항체들의 조합을 사용하는 것에 대한 대안으로서 이중특이성을 갖는 항체들이 개발되었다. 두 가지 항체들의 조합이, 동일하거나 다른 표적들 상의 다른 에피토프들에 결합하는 두 가지 다른 면역글로불린 분자들의 혼합물임에 반해서, 이중특이적 항체에서는, 이러한 사항이 단일 면역글로불린 분자를 통해서 달성된다. 동일 또는 상이한 표적들 상의 두 가지의 에피토프들에 결합함으로써, 이중특이적 항체들은 동일한 에피토프에 결합하는 두 가지의 항체들의 조합과 비교할 때 유사한 효과를 나타낼 수 있다. 더 나아가, IgG 형태의 이중특이적 항체들은 단일 분자 내에 두 가지의 다른 1가 결합 영역들을 조합한 것이며, 두 가지의 IgG 항체들의 혼합물은 단일 제제 내에 두 가지의 다른 2가 결합 분자들을 조합한 것이므로, 이러한 형태들의 다른 효과들 역시 함께 관찰된다. 기술적 및 조절적 관점에서, 이는 단일 이중특이적 항체를 개발하는 편이 덜 복잡하다는 것을 의미하는데, 이는 제조, 전임상 및 임상 테스트가 단일 분자를 포함하기 때문이다. 따라서, 단일 이중특이적 항체에 기반한 치료법들은 덜 복잡하고 비용효율적인 약물 개발 과정에 의해서 달성되면서도, 더욱 효과적인 항체 치료법들을 제공할 수 있다.

[0007] 두 개의 중 및 경사슬들로 구성되는 IgG 형태에 기반한 이중특이적 항체들은 다양한 방법들에 의해서 생산되어 왔다. 예를 들어, 이중특이적 항체들은 두 가지 항체-분비 세포주들을 융합시켜서 새로운 세포주를 제조하거나, 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 단일 세포 중에서 두 가지 항체들을 발현함으로써 생산될 수 있다. 이러한 접근법들은 다중 항체 종들을 야기할 수 있는데, 이는 각 항체로부터의 각각의 중사슬들이 단일특이적 다이머들을 형성할 수도 있고 (호모다이머로 불리우기도 함), 이는 동일한 특이성을 갖는 두 개의 동일한 쌍을 이룬 중사슬들을 포함하며, 이중특이적 다이머들을 형성할 수도 있는데 (헤테로다이머로 불리우기도 함), 이는 다른 특이성을 갖는 두 개의 다른 쌍을 이룬 중사슬들을 포함한다. 또한, 각 항체로부터의 경사슬들 및 중사슬들은 무작위적으로 쌍을 이루어 부적당한, 비기능적 조합들을 형성하기도 한다. 이러한 문제점은, 중 및 경사슬 오류-쌍 (heavy and light chain miss-pairings)으로 알려져 있으며, 이중특이적 발현을 위해서 공통의 경사슬을 공유하는 항체들을 선택함으로써 해결될 수 있다. 그러나, 공통의 경사슬이 사용되는 경우라 하더라도, 단일 세포에서 두 개의 중사슬들 및 하나의 공통적인 경사슬을 발현하는 것은 3가지 다른 항체 종들을 야기할 수 있는 바, 즉 두 개의 단일특이적 '부계 (parental)' 항체들과 이중특이적 항체이고, 이는 관심 대상이 되는 이중특이적 항체를 결과물인 항체 혼합물로부터 정제할 필요성을 초래한다. 비록 부계 및 이중특이적 항체들의 혼합물에서 이중특이적 항체들의 백분율을 더욱 증가시키고, 오류-쌍을 이룬 중 및 경사슬들의 백분율을 감소시키기 위한 기술들이 개발되었지만, 전술한 단점들 중 일부를 완전히 제거하거나 또는 최소화하는 이중특이적 형태에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

[0008] 요약하면, 종래기술에서는 단클론 항체들, 이중특이적 항체들, 단클론 항체들의 혼합물, 또는 단일특이적 및 이중특이적 항체들의 혼합물을 제조하기 위한 다양한 기술들 및 방법들을 제공하고 있으며, 결과물들은 환자에서 치료적 적용을 위해 사용될 수 있다. 그러나, 전술한 바와 같이, 이러한 기존의 기술들 및 방법들 각각은 그 단점들 및 한계점들을 내포하고 있다.

[0009] 따라서, 혼합물들의 형태로 생물학적 치료제들을 제조하기 위한 개선되고 대안적인 기술들, 또는 복수의 질병-변형 분자들을 표적화하기 위한 이중특이적 접근방법들에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 혼합물들의 형태로 생물학적 치료제들을 제조하기 위한 개선되고 대안적인 기술들, 또는 복수의 질병-변형 분자들을 표적화하기 위한 이중특이적 접근방법들을 위한 방법 및 수단을 제공하며, 또한 이러한 방법 및

수단들로부터 야기되는 산물들 및 용도들을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 종래에, 관심 대상이 되는 특정 이중특이적 항체의 형성을 촉진하기 위한 다양한 접근방법들이 서술된 바 있으며, 이에 의해서 결과물인 혼합물 중에서 원치 않는 항체들의 함량을 낮추고자 하였다.

[0012] 항체의 경우, CH3-CH3 상호작용이 Fc 다이머화를 위한 주된 인자라는 점이 잘 알려져 있다 (Ellerson JR., et al., J. Immunol 1976 (116) 510-517; Deisenhofer J. biochemistry 1981 (20) 2361-2370). 더 나아가, 두 개의 CH3 도메인들이 서로 상호작용하는 경우, 그들은 "접촉" 잔기들을 포함하는 단백질-단백질 계면에서 만난다는 점 또한 잘 알려져 있다 (이는 접촉 아미노산들, 계면 잔기들 또는 계면 아미노산들로도 불리움). 제1 CH3 도메인의 접촉 아미노산들은 제2 CH3 도메인의 하나 이상의 아미노산들과 상호작용한다. 접촉 아미노산들은 통상적으로 항체의 3차원 구조 중에서 서로에 대해서 5.5 Å (바람직하게는 4.5 Å) 이내에 존재한다. 하나의 CH3 도메인으로부터의 접촉 잔기들과 다른 CH3 도메인으로부터의 접촉 잔기들 사이의 상호작용은 예를 들어 반 데르 발스력, 수소 결합, 물-매개 수소 결합, 염 다리 또는 다른 정전기력, 방향족 곁사슬들 사이의 인력, 이황화 결합, 또는 통상의 기술자에 공지된 다른 힘들을 통해서 이루어질 수 있다. 인간 IgG1 CH3 도메인 계면에서의 접촉 아미노산 곁사슬들 중 대략 3 분의 1이 도메인 폴딩 및 결합의 대부분에 기여할 수 있다는 점이 기존에 알려진 바 있다. 또한, 다른 (인접) 아미노산 잔기들이 단백질-단백질 계면에서 상호작용들에 영향을 줄 수 있다는 점을 상정해 볼 수도 있다.

[0013] 종래에, 항체 중사슬들의 다이머화를 방해하는 방법들이 제시된 바 있다. 호모다이머화에 비해서 헤테로다이머화가 선호될 수 있도록 CH3 도메인들 중에 특정 가공을 가하기도 한다. CH3-CH3 계면에 대한 이러한 가공의 예들에는, '노브-인투-홀 (knob-into-hole)'로도 알려진, 상보적 돌기 및 공동 돌연변이 (complementary protuberance and cavity mutations)의 도입이 포함되며, 이는 예를 들어 WO1998/050431, Ridgeway et al., 1996 및 Merchant et al. 1998에 서술되어 있다.

[0014] 일반적으로, 상기 방법은 제1 폴리펩타이드의 계면에 돌기를 도입하고, 제2 폴리펩타이드의 계면에 대응되는 공동을 도입함으로써, 상기 돌기가 상기 공동 내에 위치할 수 있도록 하여, 헤테로멀티머 형성의 촉진 및 호모멀티머 형성의 방해를 야기하는 것을 포함한다. "돌기" 또는 "노브"는 제1 폴리펩타이드 계면으로부터의 작은 아미노산 곁사슬들을 더 큰 곁사슬들 (예를 들어, 타이로신 또는 트립토판)로 치환함으로써 생성된다. 상기 돌기들과 동일 또는 유사한 크기를 갖는 상보적인 "공동" 또는 "홀"은 제2 폴리펩타이드의 계면에서 더 큰 아미노산 곁사슬들을 더 작은 것들 (예를 들어, 알라닌 또는 쓰레오닌)로 치환함으로써 생성된다. 상기 돌기 및 공동은 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 변화시키거나 또는 펩타이드 합성과 같은 합성 수단들에 의해서 제조될 수 있다.

[0015] 노브-인투-홀 기술만을 사용할 경우, 관심 대상이 되는 이중특이적 항체는 두 가지 부계 항체들 및 이중특이적 항체들의 혼합물 중 최대 87%의 비율을 차지한다. Merchant 등은 상기 혼합물 중 이중특이적 항체들의 비율을 95%까지 끌어올리는데 성공하였는데, 이는 CH3-CH3 계면 내의 두 개의 CH3 도메인들 사이에서 부가적인 이황화 결합을 도입함으로써 이루어졌다. 그럼에도 불구하고, 이러한 이중특이적 항체를 약제로서 사용하기 위해서는, 상기 이중특이적 항체를 호모다이머들로부터 정제 (분리)한 다음 약학적으로 허용가능한 희석제 또는 부형제 내로 제형화하여야 한다. 이러한 혼합물들로부터 헤테로다이머들을 정제하는 것은 매우 어려운 작업인 바, 이는 호모다이머들과 헤테로다이머들의 물리-화학적 특성들이 유사하기 때문이다. 본 발명의 일 목적은, 혼합물 중 이중특이적 항체가 더욱 높은 비율로 존재하도록, 단일 세포 클론 중에서 이중특이적 항체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다. 따라서, 본 발명에 따르면, 노브-인투-홀 기술이 수단 중 하나로서, 단독으로 또는 다른 수단들과 함께, 혼합물 중에서 이중특이적 항체의 비율을 더욱 높이기 위해서 사용될 수 있다.

[0016] CH3-CH3 계면을 생성하는 기술의 또 다른 예는 헤테로다이머 Fc 기술에 의해서 제공되는데, 이는 가닥-교환 가공된 도메인 (strand-exchange engineered domain, SEED) CH3 헤테로다이머를 고안하여 이중특이적이고 비대칭적인 융합 단백질을 디자인함으로써 이루어진다. 이러한 SEED CH3 헤테로다이머들은 인간 IgA 및 IgG의 교대 세그먼트들로 구성되는 인간 IgG 및 IgA CH3 도메인들의 유도체들이다.

[0017] CH3 서열들은 상보적인 인간 SEED CH3 헤테로다이머들의 쌍을 이루며, 이른바 SEED-체들 (SEED-bodies)로 불리운다 (Davis JH. Et al., Protein Engineering, Design & Selection 2010(23)195-202; WO2007/110205).

[0018] 관심 대상이 되는 소정 이중특이적 항체를 제조하는 또 다른 방법은 천연적으로 대전된 CH3-CH3 계면 내에서 접촉 잔기들을 정전기적으로 가공하는 기술에 기반하며, 예를 들어 EP01870459 또는 US2010/0015133,

WO2007/147901, WO2010/129304, Gunasekaran 등 (2010) 및 WO 2009/089004에 서술되어 있다. 이러한 문헌들은 중사슬의 CH3 도메인들 중에서의 돌연변이들을 서술하고 있으며, 천연적으로 발생되는 대전된 아미노산 접촉 잔기들이 반대 전하를 갖는 아미노산 잔기들로 치환된다 (즉, 전하 역전 기술). 이는 Fc 다이머 계면을 가로질러서 교차 대전 극성을 발생시킴으로써, 정전기적으로 매칭된 Fc 사슬들의 공동발현이 우호적인 인력 상호작용을 보조하고, 이에 의해서 원하는 Fc 다이머 형성을 촉진하며, 반면에 비우호적인 반발 대전 상호작용은 원치 않는 Fc 호모다이머 형성을 억제한다.

[0019] CH3-CH3 계면 내에는 4개의 독특한 대전 잔기 쌍들이 도메인-도메인 상호작용에 관여하는 것으로 서술되어 있다. 이들은 D356/K439', E357/K370', K392/D399' 및 D399/K409'이다 (Kabat (1991)에 따른 넘버링이며, 첫 번째 사슬 중의 잔기들은 두 번째 사슬 중의 잔기들로부터 '/'에 의해서 분리되고, 프라임 (')은 제2 사슬 중의 잔기 넘버링을 나타냄). CH3-CH3 계면이 2-폴드 대칭성을 나타내기 때문에, 각각의 독특한 대전 쌍은 온전한 IgG에서 2회 표시된다 (즉, K439/D356', K370/E357', D399/K392' 및 K409/D399' 대전 상호작용 역시 계면에 존재한다). 이러한 2-폴드 대칭성을 활용하여, 단일 전하 역전, 예를 들어 제1 사슬 중의 K409D, 또는 제2 사슬 중의 D399'이, 동일한 전하들 사이의 반발력으로 인해서, 감소된 호모다이머 형성을 야기하는 것으로 밝혀졌다. 다른 전하 역전들을 조합함으로써 이러한 반발 효과가 더욱 향상되었다. 다른, 상보적인 전하 역전들을 포함하는, 다른 CH3 도메인들의 발현이 헤테로다이머화를 유도함으로써, 혼합물 중에서 이중특이적 종들의 비율을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0020] 전술한 접근방법을 사용하여, 약 76% 내지 약 96% 범위의 비율로, 단일 세포 내에서 이중특이적 항체를 제조하는 것이 가능하다. 본 발명의 목적은, 원하는 이중특이적 항체들이 더욱 높은 비율로 존재하도록, 단일 세포 내에서 이중특이적 항체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명에 따르면, 정전기적 가공 기술이, 단독으로 또는 다른 수단들, 예를 들어 노브-인투-홀 방법과 조합되어, 일 수단으로 사용됨으로써, 원하는 (이중특이적) 항체들을 더욱 높은 비율로 제조할 수 있다.

[0021] 일 태양에서, 본 발명은 단일 숙주 세포로부터 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 두 가지의 Ig-유사 분자들 각각은 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 상기 세포 내에,

[0022] a) 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자,

[0023] b) 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자,

[0024] c) 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제3 핵산 분자, 및

[0025] d) 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제4 핵산 분자를 제공하며,

[0026] 상기 핵산 분자들 중 적어도 두 가지에는 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬과 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬의 선호적 쌍 이룸과, 상기 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬과 상기 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단이 제공되고, 상기 방법은 상기 숙주 세포를 배양하여 상기 적어도 4개의 핵산 분자들이 발현될 수 있게 하고 배양물로부터 상기 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들을 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0027] 종종, 예를 들어 질병 과정에 관여하는 복수의 생물학적 경로들 또는 병원균의 침입, 복제 및/또는 번식을 더욱 효과적으로 방해하기 위해서, 하나 이상의 (이중특이적) 항체를 제조하는 것이 바람직하다.

[0028] 또한, 하나 이상의 이중특이적 항체의 혼합물은 특정 질병들의 치료에 특히 유용하다. 예를 들어, 종양 세포들은 항체들 또는 작은 분자 약물들을 사용하는 치료 도중에 내성을 보유하기 위한 많은 다른 전략들을 사용한다. 내성에는 복수의 세포 표면 수용체들 및 가용성 분자들이 관여할 수 있으며, 이러한 복수의 질병- 및 도피-관련 분자들을 동시에 다룰 수 있는 암 치료용 항체-기반 치료법들을 개발하는 것이 바람직한 것으로 여겨진다. 이러한 2개 이상의 질병- 및 도피-관련 표적 분자들이 관여하는 경우, 이중특이적 항체들의 혼합물은 혁신적이고 매력적인 치료 형태를 제공한다. 바람직하게는, 상기 이중특이적 항체들의 혼합물들은 단일 세포에 의해서 생산됨으로써 약물 개발 과정을 용이하게 할 수 있는데, 이는 조절 관점에서는 덜 복잡하고, 약물 생산 및 임상 개발 관점에서는 비용 효율적이고 현실적이다. 단일 세포 기반 접근방법에서는, 이중특이적 항체들을 조절성 있고 효율적으로 생산할 수 있는 방법들을 사용하는 것이 바람직하며, 따라서 원하는 이중특이적 IgG 분자들을 원치 않는 단일특이적 IgG 분자들로부터 분리할 필요성을 감소시키거나 또는 완전히 없앨 수 있는 방법들을 사용하는 것이 바람직하다. 종래기술에서도, 단일특이적 및 이중특이적 항체들의 혼합물들이 단일 세포에 의해서 생산되었지만 (WO2004/009618), 이러한 혼합물들은 여러 다른 이중특이적 및 단일특이적 항체 종들의 복잡한 혼

합물들이었다. 본 발명의 다른 목적은 단일 세포들 내에서 이중특이적 항체들의 한정된 혼합물들을 제조하기 위한 수단 및 방법을 제공하는 것이다. 하기에 서술된 바와 같이, 바람직하게는, 모노머 부산물의 함량에 관계없이, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 심지어 적어도 99% 이상의 다이머 IgG 분자들의 비율을 갖는 (이중특이적) 항체들의 혼합물이 제조되는 방법이 제공된다. 통상적으로, 복수의 온전한 IgG 분자들이 생산되는 세포에서는, 절반 분자들 (모노머 부산물들)이 존재할 수 있으며, 이들은 당업계에 공지된 크기 배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography)에 의해서 간단하게 제거될 수 있다.

[0029] 일 구현에에서, 본 발명은, 관심 대상이 되는 단일 (이중특이적) 항체 대신에, 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들의 한정된 혼합물을 단일 세포들 내에서 제조하기 위한 방법들을 제공하며, 이때 원치 않는 다른 다이머 항체 종들의 생산은 감소 또는 심지어 방지된다. 결과물인 혼합물은 잘 한정된 것으로서, 그 조성은 CH3 도메인 돌연변이들의 디자인에 의해서 조절된다. 더 나아가, 별현 수준 및/또는 발현을 위해서 사용된 다른 트랜스펙션 (transfection) 비율들의 조절은 혼합물의 조성에 영향을 준다. 본 발명에 따른 방법에서, 제1 핵산 분자는 제2 핵산 분자에 의해서 암호화되는 CH3 도메인과 선호적으로 쌍을 이루는 CH3 도메인을 암호화하고, 제3 핵산 분자는 제4 핵산 분자에 의해서 암호화되는 CH3 도메인과 선호적으로 쌍을 이루는 CH3 도메인을 암호화한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해서 얻어질 수 있는 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들의 혼합물들을 제공한다.

[0030] 본 발명에서, "제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸"이라는 용어는 근본적으로 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 및/또는 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드를 포함하는 모든 다이머 결과물들이, 하나의 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드가 하나의 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 쌍을 이루어 구성되는 다이머들을 의미한다. 유사하게, "제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸"이라는 용어는 근본적으로 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 및/또는 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드를 포함하는 모든 다이머 결과물들이, 하나의 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드가 하나의 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 쌍을 이루어 구성되는 다이머들을 의미한다. 결과적으로, 네 개의 다른 (A, B, C, D) CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들을 암호화하는 핵산 분자들이 단일 세포 내로 도입되면, 10 가지의 다른 Ig-유사 다이머들의 혼합물 대신에 (AA, AB, AC, AD, BB, BC, BD, CC, CD 및 DD), 주로 두 가지의 특정 Ig-유사 분자들의 혼합물이 제조된다.

[0031] 하기 본 명세서에서 더욱 상세하게 설명된 바와 같이, 바람직한 일구현예에서, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 T366K를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 사슬은 아미노산 치환 L351D를 포함한다. 이러한 아미노산 변화들은 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 선호적 쌍 이룸을 위한 바람직한 수단이다. 바람직하게는, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 또한 L351K 아미노산 치환을 더 포함한다. 더 나아가, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 또한 Y349E, Y349D 및 L368E로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 치환, 가장 바람직하게는 L368E 아미노산 치환을 더 포함한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 E356K 및 D399K를 포함하며, 상기 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 K392D 및 K409D를 포함한다.

[0032] 본 발명에 따른 방법에서, 각각의 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들은 바람직하게는 표적 에피토프를 인식하는 가변 영역을 더 포함한다. 상기 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 일부인 상기 가변 영역들은 바람직하게는 공통된 경사슬을 공유한다. 이 경우, 가변 영역들 중의 VH들만 다를 뿐, 모든 가변 영역들의 VL은 근본적으로 동일하다. 따라서, 본 발명의 바람직한 태양에서는, 상기 숙주 세포에 공통된 경사슬을 암호화하는 핵산 분자를 제공하는 것을 더 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 4개의 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 상기 4개의 가변 영역들 각각은 다른 표적 에피토프를 인식한다. 예를 들어, 만약 제1 핵산 분자가, 항원 A에 대한 특이성을 갖는 가변 도메인을 더 포함하는 중사슬을 암호화한다면, 제2 핵산 분자는 항원 B에 대한 특이성을 갖는 가변 도메인을 더 포함하는 중사슬을 암호화하고, 제3 핵산 분자는 항원 C에 대한 특이성을 갖는 가변 도메인을 더 포함하는 중사슬을 암호화하며, 제4 핵산 분자는 항원 D에 대한 특이성을 갖는 가변 도메인을 더 포함하는 중사슬을 암호화함으로써, AB에 대해서 특이적인 이중특이적 Ig-유사 분자들 및 CD에 대해서 특이적인 이중특이적 Ig-유사 분자들을 포함하는 혼합물이 제조될 것이다. 단일특이적 항체들 (AA, BB, CC 또는 DD 특이성을 갖는) 또는 AC, AD, BC 또는 BD에 대한 특이성을 갖는 이중특이적 항체들의 생성은 낮아지거나 또는 심지어 존재하지 않는데, 이는 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들과 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단에 기인한 것이다. 물론, 둘 보다 더 많은 다른 Ig-유사 분자들을 포함하는 한정된 혼합물들을 제조하기 위해서, 또 다른 핵산 분자들, 예를 들어 제5 및 제6 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자들을 사용하는 것도 가능하다.

[0033] 물론, 본 발명에 따른 방법에서 사용된 핵산 분자들의 비율이 1:1:1:1일 필요는 없으며, 결과물인 Ig-유사 분자들의 비율이 1:1일 필요는 없다. 최적화된 비율을 갖는 항체들의 혼합물들을 제조하기 위해서 당업계에 공지된 수단들을 사용하는 것이 가능하다. 예를 들어, 핵산 분자들의 발현 수준, 따라서 제조된 결과물인 Ig-유사 분자들의 비율은 프로모터 (promoters), 인핸서 (enhancers) 및 리프레서 (repressors)와 같은 다른 유전적 요소들을 사용하거나 또는 항체들을 암호화하는 DNA 구조물들의 카피 수의 게놈 통합 부위를 조절함으로써 조절될 수 있다.

[0034] 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단은 바람직하게는 가공된 상보적 노브-인투-홀 돌연변이, 이황화 가교, 전하 역전 돌연변이를 포함하는 대전 돌연변이, 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 통상의 기술자라면 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단이 소정 유형의 돌연변이들 내에서 선택될 수 있으며, 즉 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들을 암호화하는 모든 4개의 핵산 분자들이 예를 들어 선호적 쌍 이룸을 위한 수단으로서 대전 돌연변이를 포함할 수 있다는 점을 이해할 것이다. 부가적으로, 비가공된 야생형 CH3도 소정의 경우에는 두 가지의 야생형 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 선호적 쌍 이룸을 위해서 사용될 수도 있다. 특히, 바람직한 구현예에서, 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단은, 본 명세서 중 다른 부분들에서 서술된 바와 같이, 표 B로부터 선택된 적어도 하나의 CH3 돌연변이를 포함한다. 따라서, 바람직한 일 구현예는 본 발명에 따라서, 상기 4개의 핵산 분자들 모두에 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸과, 상기 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단이 제공되며, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단은, 상기 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단과는 다른 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명의 일 태양은, 본 발명에 따라서, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단은, 상기 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단과는 다른 방법을 제공한다. 여기에서, '다른'이라는 용어는 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단이, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸을 선호하도록 디자인된 것을 의미한다. 상기 디자인은 근본적으로 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제3 및/또는 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬 사이의 상호작용이 발생하지 않도록 한다. 달리 말하면, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제3 또는 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬 사이의 다이머화가 근본적으로 0 등으로 감소한다. 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드는 야생형이거나 또는 상기 제1 및 제2 CH3 도메인들의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단과는 다른 선호적 쌍 이룸을 위한 수단을 포함할 수 있다. 현재의 연구들은, 예를 들어 노브-인투-홀 기술 또는 CH3 도메인들 중에 존재하는 대전된 접촉 아미노산들의 돌연변이 (역전)를 사용하여 단일 이중특이적 항체를 제조하는 것에 초점이 맞추어져 왔다. 그러나, 본 발명 이전에는, 다른 다이머 부산물들이 상당량 함께 생산되지 않도록 하면서, 적어도 두 가지의 (이중특이적) Ig-유사 분자들의 한정된 혼합물을 제조하는 것은 실현된 바가 없다.

[0036] 본 발명은, 혼합물 중에서 이중특이적 분자들의 비율을 높게 유지하면서, 잘 한정된 Ig-유사 분자들의 혼합물을 효율적으로 조절되게 제조하는 방법을 제공한다. 두 가지 이중특이적 분자들을 얻고자 하는 경우, 심지어 (두 가지) 이중특이적 분자들이 적어도 95%, 적어도 97% 또는 그 이상의 비율로 얻어진다. 이는, 단지 기껏해야 5%, 최대 3% 또는 그 미만의 단일특이적 이가 부산물들이 얻어진다는 것을 의미한다. 물론, 모노머 부산물들, 즉 절반 분자들의 함량은 덜 중요한데, 이는 이러한 절반 분자들이 그들의 크기 차이를 사용해서 다이머들로부터 용이하게 분리되기 때문이다.

[0037] 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들은 다른 표적 에피토프들을 인식함에 반해서, 상기 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들은 동일한 표적 에피토프들을 인식한다. 이에 의해서, 한 종류의 이중특이적 Ig-유사 분자 및 한 종류의 단일특이적 Ig-유사 분자가 주로 생산된다. 예를 들어, 만약 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들이 다른 표적 에피토프들을 인식하고, 상기 제3 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드와 상기 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들이 모두 상기 제1 및 제2 CH3 도메인들에 의해서 인식되는 표적 에피토프들과는 다른 것으로서 동일한 표적 에피토프를 인식하게 된다면, AB 또는 CC에 대한 특이성을 갖는 Ig-유사 분자들의 혼합물이 생성될 것이다. 따라서, 본 발명에 따르면, 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들에 의해서 인식되는 표적 에피토프가 동일하지만, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩

타이드 사슬들의 가변 영역들에 의해서 인식되는 표적 에피토프와는 다른 방법을 제공한다.

[0038] 다른 대안으로서, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들이 다른 표적 에피토프들을 인식하고, 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들이 모두 상기 제1 또는 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들이 인식하는 표적 에피토프와 동일한 에피토프를 인식하는 경우, AB 및 AA에 대한 특이성, 또는 AB 및 BB에 대한 특이성을 갖는 Ig-유사 분자들의 혼합물이 생성될 것이다. 따라서, 본 발명에 따르면, 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들에 의해서 인식되는 표적 에피토프가, 상기 제1 또는 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬의 가변 영역에 의해서 인식되는 표적 에피토프와 동일한 방법이 또한 제공된다.

[0039] 본 발명의 또 다른 목적은 단일 세포 배양물 중에서 이중특이적 항체들 및 단일특이적 항체들의 한정된 혼합물을 제조하는 수단 및 방법을 제공하는 것이다. 이와 같이 잘 한정된 혼합물에 대한 비제한적인 예는 특이성 AB를 갖는 이중특이적 항체들과 특이성 AA를 갖는 단일특이적 항체들의 혼합물이다. 다른 예는, 특이성 AB를 갖는 이중특이적 항체들과 특이성 BB를 갖는 단일특이적 항체들의 혼합물이다. 또 다른 예는 특이성 AB를 갖는 이중특이적 항체들과 특이성 CC를 갖는 단일특이적 항체들의 혼합물이다. 마찬가지로, 바람직하게는 원하는 항체들의 비율이 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 적어도 97% 또는 99% 이상인 관심 대상 항체들의 혼합물을 제공하는 수단 및 방법들이 제공된다.

[0040] 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따르면, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들이 동일한 표적 에피토프를 인식하는 반면에, 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들은 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 가변 영역들에 의해서 인식되는 표적 에피토프와는 다른 제2 표적 에피토프를 인식하는 방법이 제공된다. 이에 의해서, AA에 대한 특이성 또는 BB에 대한 특이성을 갖는 단일특이적 Ig-유사 분자들이 주로 제조된다. 이중특이적 Ig-유사 분자들의 형성은 감소하거나 또는 심지어 방지된다. 몇몇 구현예들에서는, 이중특이적 항체들의 혼합물 보다는, 단일 세포 내에서 단일특이적 항체들의 혼합물을 제조하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 두 가지의 동일한 표적 분자들의 가교결합을 원하는 경우, 또는 두 가지의 표적들이 서로에 대해서 너무 멀리 떨어져 있어서 단일 이중특이적 항체에 의해서 결합될 수 없는 경우에 그러하다. 또한, 단일 세포 내에서 단일특이적 항체들의 혼합물을 제조하는 것이 유리할 수 있는데, 이는 혼합물이 단일 치료 제품으로 간주될 수 있기 때문이다. 종래에, 다양한 단일특이적 항체들의 치료적 효율성 및 안전성이 이미 입증되었으며, 판매 허가 역시 내려진 바 있다. 따라서, 단일특이적 항체들의 혼합물들을 단일 세포 내에서 제조하게 되면, 이러한 혼합물들 중 몇몇에 대한 효율성 및 안전성을 테스트하는 것을 용이하게 할 것이며, 법적 허가 및 생산에 대한 노력과 비용을 감소시킬 것이다. 그러나, 현재는 단일 세포 내에서 단일특이적 항체들의 특정 혼합들로서, 이중특이적 부산물들의 형성이 5% 미만으로 감소된 혼합물들을 제조하기 위한 방법이 존재하지 않는다. 본 발명의 또 다른 목적은 단일 세포 내에서 이와 같이 잘 한정된 호모다이머 항체 혼합물들을 제조하되, 이중특이적 항체들의 형성이 5% 미만으로 감소되게 하는 수단 및 방법을 제공하는 것이다.

[0041] 따라서, 본 발명에 따른 방법은 이중특이적 및/또는 단일특이적 Ig-유사 분자들의 임의의 원하는 혼합물을 제조하는데 적합하다. 또한, 부가적인 핵산 분자들을 사용하는 것도 가능한데, 예를 들어 두 가지 이상의 다른 Ig-유사 분자들을 포함하는 한정된 혼합물들을 제조하기 위해서, 제5 및 제6 (또한, 제7 및 제8 등) CH3 도메인-포함 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자들을 사용하는 것도 가능하다.

[0042] 바람직하게는, 본 발명에 따른 방법에서는, 본 발명에 의해서 제공되는 돌연변이들 조합 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 두 가지의 CH3 도메인들이 사용된다. 이러한 돌연변이들을 통해서 두 개의 CH3 도메인들 사이에서 신규한 특정 상호작용들이 형성된다. 본 발명에 따른 이러한 돌연변이들은 하기에 더욱 상세하게 서술된다.

[0043] 본 발명에서 'Ig-유사 분자'라는 용어는 적어도 하나의 면역글로불린 (Ig) 도메인을 보유하는 단백질성 분자를 의미한다. 상기 Ig-유사 분자는 적어도 면역글로불린 CH3 도메인의 기능을 포함하는 서열, 바람직하게는 IgG1 CH3 도메인을 포함하는 서열을 포함한다. 적어도 CH3 도메인을 보유한 단백질성 분자들은 특정 결합 부위들 (binding moieties)을 더 포함할 수 있다. 따라서, 선호적 쌍 이룸을 위한 수단을 포함하는 본 발명의 CH3 도메인들은, 원하는 헤테로다이머 결합 분자들 또는 결합 분자들의 혼합물을 디자인하기 위해서, 두 개의 CH3 도메인-포함 단백질성 분자들이 선호적으로 쌍을 이루게 하는데 사용될 수 있다. CH3 도메인-포함 단백질성 분자들에 가공될 수 있는 결합 부위들은 임의의 결합제 (binding agent)일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단일 사슬 Fvs, 단일 사슬 또는 탠덤 2가 항체 절편 (diabodies) (TandAb®), VHHs, Anticalins®,

Nanobodies®, BiTE®, Fab, 앙키린 반복 단백질 (ankyrin repeat proteins) 또는 DARPINs®, Avimers®, DART, TCR-유사 항체, Adnectins®, Affilins®, Trans-bodies®, Affibodies®, TrimerX®, MicroProteins, Fynomers®, Centyrins® 또는 KALBITOR®를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 결합 부위는 항체 가변 영역들 (즉, VH/VL 조합들)이다. CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 일부인 가변 영역들은 바람직하게는 공통된 경사슬을 공유한다. 이 경우, 가변 영역들의 VH들은 달라지는 반면에, 모든 가변 영역들의 VL은 근본적으로 동일하다.

[0044] 다른 한편으로, 또는 부가적으로, 다른 분자들이 본 발명의 CH3 도메인들에 가공될 수 있으며, 이에는 싸이토카인, 호르몬, 가용성 리간드, 수용체 및/또는 펩타이드가 포함된다.

[0045] 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 Ig-유사 분자는 전장 Fc 백본 (backbone)을 포함한다. 가장 바람직한 구현예에서, 상기 Ig-유사 분자들은 항체들이다. 이러한 항체들의 가변 영역들은 바람직하게는 공통된 경사슬을 포함하지만, VH 영역들에서 차이가 날 수 있다. 본 발명에서 '항체 (antibody)'라는 용어는 단백질의 면역글로불린 계열에 속하는 단백질성 분자로서, 항원 상의 에피토프에 결합하는 하나 또는 그 이상의 도메인들을 포함하고, 이러한 도메인들은 항체의 가변 영역으로부터 유도되거나 또는 이와 서열 상동성을 공유한다. 항체들은 당업계에 공지되어 있으며, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, 및 IgM과 같은 여러 이소타입들 (isotypes)을 포함한다. 본 발명에 따른 항체는 이러한 이소타입들 중 어느 하나이거나, 또는 그 기능적 유도체 및/또는 단편일 수 있다. 바람직한 구현예에서, IgG 이소타입의 항체인 Ig-유사 분자들이 제조되는데, 이는, 예를 들어 IgG 항체들이 다른 이소타입들의 항체들에 비해서 더 긴 반감기를 갖기 때문이다.

[0046] 본 발명에 따른 방법으로 제조된 항체들은 임의의 기원의 서열들을 가질 수 있는데, 이에는 쥐과 및 인간 서열들이 포함된다. 항체들은 한 가지 기원, 예를 들어 오로지 인간 항체들로부터의 서열들만으로 구성되거나, 또는 하나 이상의 기원의 서열들을 가질 수도 있으며, 이 경우, 예를 들어 키메릭 또는 인간화된 항체들이 야기된다. 치료적 용도를 위한 항체들은 바람직하게는 치료 대상의 천연 항체와 가능한 한 근접한 것이다 (예를 들어, 인간 대상인 경우 인간 항체). 항체 결합은 특이성 및 친화성의 관점에서 표현될 수 있다. 특이성은, 어떠한 항원 또는 에피토프가 결합 도메인에 의해서 결합될 것인가를 결정한다. 친화성은 특정 항원 또는 에피토프에 대한 결합의 강도를 측정하는 것이다. 특이적 결합은 적어도 $1x10^{-5}$ M, 바람직하게는 $1x10^{-7}$ M, 더욱 바람직하게는 $1x10^{-9}$M 보다 높은 친화도 (K_D)로 결합하는 것을 의미한다. 통상적으로, 치료적 적용을 위한 단클론 항체들은 $1x10^{-10}$ M 정도까지, 또는 더 높은 친화도를 갖는다. 본 발명에서 '항원 (antigen)'이라는 용어는, 체내에 도입되는 경우, 면역 체계에 의해서 항체의 생산을 유발하는 물질 또는 분자를 의미한다. 항원은, 다른 것들 중에서도, 병원성 유기체, 종양 세포들 또는 다른 비정상 세포들로부터 유도되거나, 합텐 (hapten)으로부터, 또는 심지어 다른 자가 구조들로부터도 유도될 수 있다. 분자 수준에서, 항원은 항체의 항원-결합 부위에 의해서 결합될 수 있는 능력을 갖는다는 특징을 갖는다. 또한, 항원들의 혼합물도 '항원'으로 간주될 수 있는 바, 즉 통상의 기술자라면 때로는 종양 세포들의 용해물 (lysate), 또는 바이러스성 입자들도 '항원'으로 표시될 수 있는데, 반면에 이러한 종양 세포 용해물 또는 바이러스성 입자는 많은 항원성 결정원들로 존재한다. 항원은 적어도 하나, 때로는 종종 더 많은 에피토프들을 포함한다. 본 발명에서 '에피토프'라는 용어는 면역 체계, 특히 항체들, B 세포들, 또는 T 세포들에 의해서 인식되는 항원의 일부를 의미한다. 비록 에피토프들이 일반적으로 비-자가 단백질들로부터 유래되는 것으로 생각되지만, 숙주로부터 유래된 서열들로서 인식가능한 것들 역시 에피토프로 분류된다.

[0047] 'CH3 도메인'이라는 용어는 당업계에 잘 알려져 있다. IgG 구조는 네 개의 사슬들을 갖는 바, 두 개의 경사슬 및 두 개의 중사슬이고; 각각의 경사슬은 두 개의 도메인들을 갖는 바, 이는 가변 및 불변 경사슬 (VL 및 CL)이고, 각각의 중사슬은 네 개의 도메인들을 갖는 바, 이는 가변 중사슬 (VH) 및 세 개의 불변 중사슬 도메인들 (CH1, CH2, CH3)이다. 중사슬의 CH2 및 CH3 도메인 영역은 Fc (결정화 가능한 단편 (Fragment crystallizable)) 부위, Fc 단편, Fc 백본 또는 단순히 Fc로 불리운다. IgG 분자는 힌지 영역에서 이황화 결합들 (-S-S-)에 의해서 함께 고정되는 두 개의 중사슬들 및 두 개의 경사슬들을 갖는 헤테로테트라머이다. 중사슬들은 CH3-CH3 도메인 계면에서의 상호작용 및 힌지 영역에서의 상호작용을 통해서 다이머화한다. 힌지 이황화 결합들의 개수는 면역글로불린 서브클래스에 따라서 변화한다 (Papadea 및 Check 1989). 면역글로불린 분자의 Fc 단편은 중사슬의 두 개의 C-말단 불변 영역들, 즉 CH2 및 CH3 도메인들의 다이머이다. 그 생리적 기능들에는, 보체계 (complement system)와의 상호작용 및 다양한 세포들의 표면 상의 특정 수용체들과의 상호작용이 포함된다. 두 개의 개별적인 중사슬들의 CH3 도메인들 사이의 상호작용은 중사슬 다이머화를 유도하는데 중요

한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, CH3 도메인들은 항체 중사슬들의 결합을 지휘하며, CH3 도메인들 사이의 계면은 각 사슬로부터 20개 이상의 접촉 잔기들을 포함하여, 이러한 잔기들이 CH3-CH3 상호작용에 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Deisenhofer J., Biochemistry 1981(20)2361-2370; Miller S., J. Mol. Biol. 1990(216)965-973; Padlan, Advances in Protein Chemistry 1996 (49) 57-133). 따라서, 본 발명의 CH3 변이체들은 다른 항체 도메인들과 연계하여 이중특이적 또는 단일특이적 특성을 갖는 전장 항체들을 형성하는데 사용될 수 있다. VH/VL 조합으로 정의되는 항체의 특이성은 통상적으로 CH3 도메인들에 의해서 유도되는 중사슬 다이머화 특성에는 영향을 미치지 않는다.

[0048] 본 발명에서 '접촉 잔기', '접촉 아미노산', '계면 잔기' 및 '계면 아미노산'이라는 용어는 통상적으로 도메인 간 접촉에 관여될 수 있는 CH3 도메인 중에 존재하는 임의의 아미노산 잔기를 의미하며, 이는 당업계에 공지된 기술들에 의해서 계산될 수 있는 것으로서, 이러한 기술들에 포함되는 것으로는, 제2 사슬의 존재 및 부존재 하에서 CH3 도메인 잔기들의 용매 접근가능 표면 영역 (accessible surface area (ASA))을 계산하여 (Lee and Richards J. Mol. Biol.1971(55)379), ASA에서 두 계산값들 사이에서 차이를 나타내는 잔기들 (> 1 $Å^2$)을 접촉 잔기들로 규정하는 방법이 있다. 확인된 접촉 잔기들에는, EU 넘버링 시스템을 따를 경우, 347, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 360, 364, 366, 368, 370, 390, 392, 394, 395, 397, 399, 400, 405, 407, 409, 439 위치의 잔기들이 포함된다 (표 A).

[0049] 표 A: CH3 도메인 계면 잔기들의 리스트

사슬 A 중의 계면 잔기들	사슬 B 중의 접촉 잔기들
Q347	K360
Y349	S354, D356, E357, K360
T350	S354, R355
L351	L351, P352, P353, S354, T366
S354	Y349, T350, L351
R355	T350
D356	Y349, K439
E357	Y349, K370
K360	Q347, Y349
S364	L368, K370
T366	L351, Y407
L368	S364, K409
K370	E357, S364
N390	S400
K392	L398, D399, S400, F405
T394	T394, V397, F405, Y407
P395	V397
V397	T394, P395
D399	K392, K409
S400	N390, K392
F405	K392, T394, K409
Y407	T366, T394, Y407, K409
K409	L368, D399, F405, Y407
K439	D356

[0050]

[0051] CH3-CH3 계면 내의 접촉 잔기들은 대전된 아미노산이거나, 또는 중성 아미노산 잔기들일 수 있다. 본 발명에서 '대전된 아미노산 잔기 (charged amino acid residue)' 또는 '대전된 잔기 (charged residue)'라는 용어는 전기적으로 대전된 곁사슬들을 갖는 아미노산 잔기들을 의미한다. 이러한 것들은 아르기닌 (Arg, R), 히스티딘 (His, H) 및 라이신 (Lys, K)에 존재하는 것과 같이 양으로 대전된 곁사슬들이거나 또는 아스파르트산 (Asp, D) 및 글루탐산 (Glu, E)에 존재하는 것과 같이 음으로 대전된 곁사슬들일 수 있다. 본 발명에서 '중성 아미노산 잔기 (neutral amino acid residue)' 또는 중성 잔기라는 용어는 전기적으로 대전된 곁사슬들을 보유하지 않는 모든 다른 아미노산들을 의미한다. 이러한 중성 잔기들은 세린 (Ser, S), 쓰레오닌 (Thr, T), 아스파라긴 (Asn, N), 글루타민 (GLu, Q), 시스테인 (Cys, C), 글라이신 (Gly, G), 프롤린 (Pro, P), 알라닌 (Ala, A), 발린 (Val, V), 이소류신 (Ile, I), 류신 (Leu, L), 메티오닌 (Met, M), 페닐알라닌 (Phe, F), 타이로신 (Tyr, Y), 및 트립토판 (Trp, T)을 포함한다.

[0052] 본 발명에서 'CH3-CH3 도메인 계면', 또는 'CH3 계면', 'CH3-CH3 쌍 이룸', '도메인 계면', 또는 단순히 '계면'이라는 용어는 분리된 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 두 개의 CH3 도메인들 사이의 결합을 의미하며, 이는 상호작용하는 아미노산 잔기들의 결과물, 즉 제1 CH3 도메인의 아미노산과 제2 CH3 도메인의 아미노산 사이의 적어도 하나의 상호작용의 결과물이다. 이러한 상호작용은, 예를 들어 반 데르 발스력, 수소 결합, 물-매개 수소 결합, 염 다리 또는 다른 정전기력, 방향족 곁사슬들 사이의 인력, 이황화 결합의 형성, 또는 당업계에

공지된 다른 힘들을 통해서 이루어질 수 있다.

[0053] 본 발명에서, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들 및 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단들은 당업계에 공지된 임의의 수단들일 수 있다. 일 구현예에서, 적어도 하나의 핵산 분자는 접촉 잔기 위치에, 예를 들어 R, F, Y, W, I 또는 L과 같은 큰 아미노산 잔기 (즉, "노브" 또는 "돌기")를 포함하는 CH3 도메인을 암호화하는 반면에, 적어도 하나의 다른 핵산 분자는 상보적인 접촉 잔기 위치에, 예를 들어 G, A, S, T 또는 V와 같은 작은 아미노산 잔기 (즉, "홀" 또는 "공동")를 포함하는 CH3 도메인을 암호화한다. 결과물인 CH3 도메인들은, 상기 접촉 아미노산들의 입체적 형태로 인해서, 서로에 대해서 선호적으로 쌍 이룸을 이루게 된다. 노브-인투-홀 기술에 대해서는 상세하게 전술한 바 있다. 본 발명의 다른 구현예에서, 적어도 하나의 핵산 분자는 천연적으로 대전된 접촉 잔기 위치에, 즉 천연적으로 발생되는 K, H, R, D 또는 E에, 야생형과 비교하여 반대 전하를 보유하는 아미노산을 포함하는 CH3 도메인을 암호화하는 반면에, 적어도 하나의 다른 핵산 분자는 천연적으로 대전된 상보적인 접촉 잔기 위치에, 야생형과 비교하여 반대 전하를 보유하는 아미노산을 포함하는 CH3 도메인을 암호화한다. 결과적으로 가공된 CH3 도메인들은, 상기 접촉 아미노산들의 반대 전하들로 인해서, 서로에 대해서 선호적으로 쌍을 이루는 반면에, 동일한 CH3 도메인들의 쌍 이룸은 정전기적 반발로 인해서 감소하게 된다. 일 구현예에서, EP01870459, WO 2009/089004, Gunasekaran 등 (2010)에 서술된 돌연변이들이 사용된다. 일 구현예에서, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단은 "노브" 및 "홀" 아미노산 잔기들이고, 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단은 전하-가공된 아미노산들이다. 바람직하게는, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단과, 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단은 양자 모두 전하-가공된 아미노산들이다. 일 구현예에서, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위해서 가공된 아미노산 잔기들과, 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위해서 가공된 아미노산 잔기들은 서로 다르다. 특히 바람직한 구현예에서, 적어도 제1 및 제2 핵산 분자들은 본 발명에 의해서 제공된 바와 같은 신규한 돌연변이들을 갖는 CH3 도메인들을 암호화한다. 하기에서 더욱 상세하게 서술된 바와 같이, 본 발명은, 많은 양의 원치 않는 (다이머) 부산물들을 생성시키지 않으면서, 관심 대상이 되는 특정 이중특이적 Ig-유사 분자들의 제조를 가능하게 하는 신규한 CH3 돌연변이들을 제공한다. 본 발명은 또한 많은 양의 원치 않는 (다이머) 부산물들을 생성시키지 않으면서, 관심 대상이 되는 특정 단일특이적 Ig-유사 분자들의 제조를 가능하게 하는 신규한 CH3 돌연변이들을 제공한다. 따라서, 본 발명에 따른 이러한 CH3 돌연변이들 중의 적어도 하나를 사용하는 것이 바람직하다.

[0054] 본 발명에서 '폴리펩타이드', '폴리펩타이드 분자' 또는 '폴리펩타이드 사슬'이라는 용어는 펩타이드 결합들을 통해서 서로 공유결합된 아미노산들의 사슬을 의미한다. 단백질들은 통상적으로 하나 또는 그 이상의 폴리펩타이드 분자들로 구성된다. 모든 폴리펩타이드의 일 말단, 즉 아미노 말단 또는 N-말단은 자유 아미노기를 갖는다. 자유 카르복실기를 갖는 다른 말단은 카르복실 말단 또는 C-말단으로 불리운다. 본 발명에 따른 폴리펩타이드들은 번역 후 변형 과정 (post-translational modification)을 거친 것일 수도 있으며, 예를 들어 글리코실화된 것일 수도 있다. 따라서, 본 발명의 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들은 적어도 Ig CH3 도메인을 포함하고, 번역 후 변형 과정을 거칠 수도 있는 폴리펩타이드 사슬들을 의미한다.

[0055] 본 발명에서 "핵산 분자"라는 용어는 뉴클레오티드의 사슬, 더욱 바람직하게는 DNA 및/또는 RNA를 포함하는 분자로서 정의된다. 일 구현예에서, 이중 가닥 RNA가 사용된다. 다른 구현예들에서, 본 발명의 핵산 분자는 다른 종류의 핵산 구조들을 포함하며, 예를 들어 DNA/RNA 헬릭스, 펩타이드 핵산 (PNA), 록킹된 핵산 (locked necleic acid, LNA) 및/또는 리보자임과 같은 구조들을 포함한다. 따라서, "핵산 분자"라는 용어는 또한 비천연 뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 및/또는 천연 뉴클레오티드와 동일한 기능을 나타내는 비-뉴클레오티드 구축 블럭들도 포함한다.

[0056] 본 발명은 또한 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들을 제조하기 위한 숙주 세포의 제조방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 숙주 세포에 적어도 제1, 제2, 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 핵산 서열들을 도입하는 단계를 포함하고, 상기 핵산 서열들 중 적어도 두 가지에는 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸 및 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단이 제공되며, 상기 핵산 서열들은 연속적으로 또는 동시에 도입된다.

[0057] 본 발명의 다른 태양은 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하기 위한 숙주 세포의 제조방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 숙주 세포에 적어도 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 핵산 서열들을 도입하는 단계를 포함하고, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 중성 아미노산 잔기가 양으로 대전된

아미노산 잔기에 의해서 치환된 적어도 하나의 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 중성 아미노산 잔기가 음으로 대전된 아미노산 잔기에 의해서 치환된 적어도 하나의 치환을 포함하며, 상기 핵산 서열들은 연속적으로 또는 동시에 도입된다. 상기 숙주 세포들을 제조하기 위한 상기 방법들은 바람직하게는 상기 숙주 세포에 공통된 경사슬을 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 단계를 더 포함한다.

[0058] 또한, 본 발명은 적어도 제1, 제2, 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 핵산 서열들을 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공하며, 상기 핵산 서열들 중 적어도 두 가지에는 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸 및 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단이 제공된다.

[0059] 또한, 본 발명은 적어도 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 핵산 서열들을 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공하며, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 중성 아미노산 잔기가 양으로 대전된 아미노산 잔기에 의해서 치환된 적어도 하나의 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 중성 아미노산 잔기가 음으로 대전된 아미노산 잔기에 의해서 치환된 적어도 하나의 치환을 포함한다.

[0060] 본 발명에 따른 재조합 숙주 세포는 바람직하게는 공통된 경사슬을 암호화하는 핵산 서열을 더 포함한다.

[0061] 본 발명에 따른 "숙주 세포"는 재조합 DNA 분자들을 발현할 수 있는 임의의 숙주 세포일 수 있으며, 이에는 예를 들어 *Escherichia* (예를 들어, *E. coli*), *Enterobacter, Salmonalla, Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces*와 같은 박테리아, *S. cerevisiae, K. lactis, P. pastoris, Candida*, 또는 *Yarrowia*와 같은 효모, *Neurospora, Aspergillus oryzae, Aspergillus nidulans* 및 *Aspergillus niger*와 같은 사상균, *Spodoptera frugiperda* SF-9 또는 SF-21 세포들과 같은 곤충 세포들이 포함되며, 바람직하게는 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary, CHO) 세포, BHK 세포, SP2/0 세포 및 NS-0 골수종 세포를 포함하는 마우스 세포와 같은 포유류 세포, COS 및 Vero 세포와 같은 영장류 세포, MDCK 세포, BRL 3A 세포, 하이브리도마, 종양 세포, 불멸화된 1차 세포 (immortalized primary cells), W138, HepG2, HeLa, HEK293, HT1080과 같은 인간 세포, PER. C6와 같은 배아 망막 세포 등이 포함된다. 종종, 선택된 발현 시스템은 포유류 세포 발현 벡터 및 호스트를 포함함으로써, 항체들이 적절하게 글리코실화된다. 인간 세포주, 바람직하게는 PER. C6는 완전하게 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체들을 얻을 수 있다는 점에서 유리하게 사용될 수 있다. 세포들을 성장 또는 복제하기 위한 조건들 (예를 들어, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973)를 참조) 및 재조합 산물을 발현시키기 위한 조건들은 다소 상이할 수 있으며, 통상 과정의 최적화를 수행함으로써 산물 비율 및/또는 서로에 대한 세포들의 성장을 증가시킬 수 있고, 이는 통상의 기술자에게 일반적으로 공지된 방법들에 따를 수 있다. 일반적으로, 포유류 세포 배양물의 생산성을 최대화하기 위한 원칙, 프로토콜 및 실제 기술들은 Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach (M. Butler, ed., IRL Press, 1991)를 참조할 수 있다. 재조합 숙주 세포들에서 항체의 발현은 종래에 폭넓게 서술된 바 있다 (예를 들어, EP0120694; EP0314161; EP0481790; EP0523949; US patent 4,816,567; WO 00/63403 참조). 경 및 중사슬들을 암호화하는 핵산 분자들은 염색체 외 카피 (extrachromosomal copies) 및/또는 숙주 세포의 염색체 내에 안정적으로 통합되어 존재할 수 있으며, 후자가 선호된다.

[0062] 본 발명의 다른 태양은 본 발명에 따른 재조합 숙주 세포들의 배양물, 또는 본 발명에 따른 방법에 의해서 획득 가능하거나 또는 획득된 재조합 숙주 세포들의 배양물을 제공하는 것이며, 상기 배양물은 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들 또는 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 생산한다.

[0063] CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들을 암호화하는 핵산 서열들의 발현을 달성하기 위해서, 이러한 발현을 유발할 수 있는 서열들이 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들을 암호화하는 핵산 서열들에 기능적으로 연결될 수 있다는 점은 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 기능적으로 연결되었다는 의미는 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들 또는 그 전구체들을 암호화하는 핵산 서열들이 발현을 유발할 수 있는 서열들에 연결됨으로써 이러한 서열들이 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들 또는 그 전구체들의 발현을 유발할 수 있는 것을 의미한다. 유용한 발현 벡터들은 당업계에서 구입가능한 바, 예를 들어 Invitrogen의 pcDNA 벡터 계열들이 있다. 관심 대상이 되는 폴리펩타이드를 암호화하는 서열이 암호화된 폴리펩타이드의 전사 및 번역을 지배하는 서열들에 대해서 적당하게 삽입된 경우에는, 결과물인 발현 카세트는 관심 대상이 되는 폴리펩타이드를 생산, 즉 발현하는데 유용하다. 발현을 유발하는 서열들은 프로모터, 인핸서 등 및 그 조합을 포함할 수 있다. 이들은 숙주 세포 내에서 기능함으로써, 그들에 기능적으로 연결된 핵산 서열들의 발현을 유발할 수 있어야 한다. 프로모터는 구성적이거나 (constitutive) 또는 조절될 수 있으며, 바이러스, 원핵, 또는 진핵 근원, 또는 인공적으로 디자인된 것들을 포함하는 다양한 근원들로부터 얻어질 수 있다. 관심 대상이 되는 핵산들의 발현은 천연 프로모터 또는 그 유도

체로부터 또는 전체적으로 이형인 (heterologous) 프로모터로부터 수행될 수 있다. 일부 잘 알려져 있고 자주 사용되는 진핵 세포들에서의 발현용 프로모터들은 아데노바이러스와 같은 바이러스로부터 유래된 프로모터들, 예를 들어 E1A 프로모터, 거대세포바이러스 (CMV)로부터 유래된 프로모터들, 예를 들어 CMV 극초기 프로모터 (CMV immediate early (IE) promoter), 시미안 바이러스 40 (Simian Virus 40 (SV40))로부터 유래된 프로모터들 등을 포함한다. 적당한 프로모터들은 진핵 세포들로부터도 유래될 수 있는 바, 메탈로티오네인 (methallothionein, MT)프로모터들, 신장 인자 (enlongation factor) 1α (EF-1α) 프로모터, 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 히트 쇼크 프로모터 등이 있다. 숙주 세포 내에서 관심 대상이 되는 서열의 발현을 구동시킬 수 있는 임의의 프로모터 또는 인핸서/프로모터가 본 발명에서 적당하다. 일 구현예에서, 발현을 구동시킬 수 있는 서열은 CMV 프로모터로부터의 영역, 바람직하게는 CMV 극초기 유전자 인핸서/프로모터의 뉴클레오티드 -735 내지 +95를 포함하는 영역이다. 통상의 기술자라면 본 발명에서 사용된 발현 서열들이 발현을 안정화 또는 강화할 수 있는 요소들과 적당하게 조합될 수 있다는 점을 인식할 것이며, 이러한 요소들에는 인슐레이터 (insulators), 매트릭스 부착 영역들, STAR 요소들 (WO 03/004704) 등이 있다. 이는 발현의 안정성 및/또는 수준을 향상시킬 수 있다.

[0064] 재조합 숙주 세포들에서의 단백질 생산은 폭넓게 서술된 바 있으며, 예를 들어, Current Protocols in Protein Science, 1995, Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8; Bendig, 1988에 서술된 바 있다. 세포를 배양하는 것은 세포가 대사 및/또는 성장 및/또는 분화 및/또는 관심 대상이 되는 재조합 단백질들을 생산하는 것을 가능하게 하기 위함이다. 이는 통상의 기술자에게 잘 알려진 방법들에 의해서 달성될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 세포에 영양분을 공급하는 것을 포함한다. 상기 방법은 표면에 대한 성장 부착, 현탁액 중에서의 성장, 또는 그 조합을 포함한다. 몇몇 배양 조건들이 당업계에 잘 알려진 방법들에 의해서 최적화됨으로써, 단백질 생산 수율을 최적화할 수 있다. 배양은 예를 들어, 접시, 롤러 병 (roller bottles) 또는 생반응기 중에서, 배치 (batch), 유입-배치 (fed-batch), 연속 시스템, 중공 화이버, 등을 사용하여 수행될 수 있다. 세포 배양을 통해서 재조합 단백질들을 대량 (연속) 생산하기 위해서는, 현탁액 중에서 성장할 수 있는 세포들을 보유하는 것이 바람직하고, 동물- 또는 인간-유래 혈청 또는 동물- 또는 인간-유래 혈청 성분들의 부존재 하에서 배양될 수 있는 세포들을 보유하는 것이 바람직하다. 따라서, 배양 배지로부터 유래된 부가적인 동물 또는 인간 단백질들의 부존재로 인해서, 정제가 더욱 용이해지고, 안전성이 향상되는 반면에, 시스템 또한 매우 신뢰성을 갖추게 되는데, 이는 합성 배지가 재현성 면에서 최선이기 때문이다.

[0065] Ig-유사 분자들은 숙주 세포들에서 발현되며, 일반적으로 통상의 기술자에게 공지된 방법들에 의해서, 세포들로부터, 또는 바람직하게는 세포 배양 배지로부터 수득된다. 수득 이후에, 이러한 Ig-유사 분자들은 당업계에 공지된 방법들을 사용하여 정제될 수 있다. 그러한 방법들은, 침전, 원심분리, 여과, 크기-배제 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 양이온 및/또는 음이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 등을 포함할 수 있다. IgG 분자들, 단백질 A 또는 단백질 G를 포함하는 항체들의 혼합물에 대해서는, 친화도 크로마토그래피가 적당하게 사용될 수 있다 (예를 들어, US patents 4,801,687 및 5,151,504 참조).

[0066] 본 발명에 따른 방법에 의해서 제조된 Ig-유사 분자들, 및/또는 그 혼합물들은 바람직하게는 공통된 경사슬을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 또 다른 방법으로서, 상기 숙주 세포에 공통된 경사슬을 암호화하는 핵산 분자를 제공하는 단계를 더 포함하는 방법이 제공된다. 이는 적어도 두 개의 다른 중사슬들과 쌍 이룸이 가능한 경사슬로서, 이러한 쌍 이룸에 의해서 기능적 항원 결합 도메인들이 형성된다. 기능적 항원 결합 도메인은 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 갖는다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 방법으로 제조된 모든 중사슬들과 쌍을 이룰 수 있는 공통된 경사슬이 사용됨으로써, 기능적 항원 결합 도메인들을 형성하게 되고, 매칭되지 않은 중사슬 및 경사슬들의 오류 쌍 이룸이 방지된다. 일 태양에서는, 하나의 동일한 아미노산 서열만을 갖는 공통된 경사슬이 사용된다. 다른 한편으로, 당업자라면 "공통된"이라는 용어는 또한 아미노산 서열이 동일하지 않은 경사슬의 기능적 균등물들도 역시 의미함을 이해할 것이다. 상기 경사슬의 많은 변이체들이 존재하며, 이때 기능적 결합 영역의 형성에 중대한 영향을 주지 않는 돌연변이들 (결실, 치환, 부가)이 존재한다. 따라서, 상기 변이체들은 또한 다른 중사슬들에 결합할 수 있고, 기능적 항원 결합 도메인들을 형성할 수 있다. 본 발명에서 '공통된 경사슬'이라는 용어는 따라서 동일하거나 또는 일부 아미노산 서열 차이를 갖지만 중사슬과 쌍을 이룬 이후에 결과물인 항체의 결합 특이성을 보유하는 경사슬들을 의미한다. 예를 들어, 동일하지는 않지만 여전히 기능적으로는 균등물인 경사슬들을 제조 또는 발견하는 것이 가능하며, 이는 예를 들어, 보존적 아미노산 변화들, 및/또는 중사슬과 쌍을 이루었을 때 결합 특이성에 기여하지 않거나 또는 오직 부분적으로만 기여하는 아미노산 변화들을 도입하는 등에 의해서 가능하다. 특정 공통된 경사슬 및 상기 기능적 균등 변이체들의 조합은 "공통된 경사슬"이라는 용어 내에 포괄된다. 공통된 경사슬들의 사용에 대한 상세한 서술은 WO

2004/009618을 참조할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 공통된 경사슬은 생식계열-유사(germline-like) 경사슬, 더욱 바람직하게는 생식계열 경사슬이며, 바람직하게는 재배열된 생식계열 인간 카파 경사슬, 가장 바람직하게는 재배열된 생식계열 인간 카파 경사슬 IgVκ1-39/Jκ 또는 IgVκ3-20/Jκ이다.

[0067] 다른 한편으로, 통상의 기술자라면 공통된 경사슬을 사용하고 매칭되지 않은 중 및 경사슬들의 오류 쌍 이룸을 방지하기 위한 대안적인 수단으로서, 중 및 경사슬의 강제 쌍 이룸을 위한 수단을 선택할 수도 있으며, 예를 들어 WO2009/080251, WO2009/080252 및/또는 WO2009/080253에 서술된 수단을 선택할 수도 있다.

[0068] 본 발명은 CH3 돌연변이들의 신규한 조합들 뿐만 아니라, 신규의 가공된 CH3 도메인들을 제공한다. 본 발명 이전에는, CH3-CH3 쌍 이룸에 관여하는 것으로 알려진 CH3 도메인들의 대전된 접촉 아미노산들은 반대 전하를 갖는 아미노산들에 의해서 치환됨으로써 (전하 역전), CH3-CH3 쌍 이룸에 영향을 미쳤다. 본 발명에 따른 돌연변이들은 이러한 접근법에 대한 진보적 대안이라 할 수 있는데, 이는 본 발명에서는 야생형 CH3에서 비대전된 또는 중성인 CH3 아미노산들이 대전된 잔기들로 치환되기 때문이다. 이러한 구현예에서 본 발명은 대전된 접촉 아미노산들을 반대 전하의 아미노산들로 변화시키는 것이 아니라, 비대전된 CH3 아미노산들을 대전된 것들로 치환하는 것이다. 본 발명에 따른 방법은 CH3 도메인들의 다이머화를 효과적으로 유도하는 방법일 뿐만 아니라, CH3 계면 중에서 적어도 하나의 부가적인 전하-전하 상호작용이 생성된다는 장점을 갖는다. CH3-CH3 계면에 존재하는 기존의 전하-쌍들에 더해서 이러한 부가적인 전하-전하 상호작용이 존재한다는 점을 고려할 때, 본 발명에 따른 다이머들은 야생형 다이머들에 비해서 일반적으로 더욱 안정적이다 (그 부계 호모다이머들 (AA 또는 AB)과는 대조적으로, 야생형 다이머는 CH3 가공이 없는 이중특이적 IgG (AB)로 정의된다). 더욱이, 놀랍게도, 혼합물 중에서 관심 대상이 되는 하나 또는 그 이상의 Ig-유사 분자들의 비율을 더욱 증가시키는 것이 가능해졌다. 전술한 바와 같이, 이중특이적 항체의 선호적 생산을 위한 종래 공지된 방법들은 통상적으로 일부 원치않는 다이머 부산물들의 생산을 수반하였다. 예를 들어, 노브-인투-홀 기술을 사용할 경우 관심 대상이 되는 이중특이적 항체의 비율은 기껏해야 87%이고, 대전된 접촉 아미노산들이 반대 전하를 갖는 아미노산들에 의해서 치환되는 정전기적 가공 방법도 최대 96%의 비율을 갖는다 (예를 들어, 실시예 11 참조). 대단히 놀랍게도, 본 발명자들은 혼합물 중에서 관심 대상이 되는 Ig-유사 분자의 비율을 더욱 높이는 돌연변이들을 도입하는데 성공하였다. 예를 들어, 실시예 17은 본 발명에 따른 돌연변이들을 사용한 방법을 개시하고 있으며, 여기에서 관심 대상이 되는 이중특이적 항체의 비율은 결과물인 혼합물 중에서 다이머 부산물이 전혀 검출되지 않는 정도까지 상승하였다. 혼합물 중에는 오직 공통된 경사슬과 쌍을 이룬 단일 중사슬로만 구성된 쌍을 이루지 않은 절반-분자들이 일부 존재하였지만, 이들은 중사슬들의 불균형 발현의 결과물이며, 크기 배제 크로마토그래피에 의해서 혼합물로부터 용이하게 분리될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 이러한 돌연변이들을 사용하여, 단일 세포 내에서 이중특이적 Ig-유사 분자가 높은 비율로 생산될 수 있으며, 이는 근본적으로 어떠한 오염성 다이머 부산물들도 포함하지 않고, 따라서 약학적 조성물의 제조에 특히 적합하다.

[0069] 따라서, 본 발명의 바람직한 일 구현예는 단일 세포로부터 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 Ig-유사 분자는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 상기 방법은 상기 세포에,

[0070] a. 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자,

[0071] b. 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0072] 를 제공하는 단계를 포함하고,

[0073] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 중성 아미노산 잔기가 양으로 대전된 아미노산 잔기에 의해서 치환된 적어도 하나의 치환을 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 중성 아미노산 잔기가 음으로 대전된 아미노산 잔기에 의해서 치환된 적어도 하나의 치환을 포함하며, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0074] 상기 방법은 바람직하게는 상기 숙주 세포에 공통된 경사슬을 암호화하는 핵산 분자를 제공하는 단계를 더 포함하며, 이는 전술한 바와 같은 장점들을 갖는다.

[0075] 하나의 CH3 도메인 중 366번 위치 및 제2의 CH3 도메인 중 351번 위치의 아미노산들은 CH3-CH3 계면 중 접촉 잔기들의 쌍이 되는 것으로 보고된 바 있으며, 이는 그들이 서로에 대해서 상호작용할 수 있도록 하기 위해서 결과물인 Ig-유사 분자의 3차원 형태에서 서로에 대해서 충분히 가깝게 위치한다는 것을 의미한다. 따라서, 상기 제1 CH3 도메인은 바람직하게는 상기 제2 CH3 도메인과 쌍을 이룬다.

[0076] 일 구현예에서, 제1 CH3 도메인 중 366번 위치의 쓰레오닌 (T)은 제1 대전된 아미노산에 의해서 치환되고, 제2 CH3 도메인 중 351번 위치의 류신 (L)은 제2 대전된 아미노산에 의해서 치환되며, 상기 제1 및 제2 대전된 아미노산들은 반대되는 전하를 갖는다. 만약 366번 위치에 대전된 잔기를 보유하는 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드가 항원 A에 대한 특이성을 갖는 가변 도메인을 더 포함하고, 351번 위치에 반대로 대전된 잔기를 보유하는 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드가 항원 B에 대한 특이성을 갖는 가변 도메인을 더 포함하는 경우에는, AB 특이성을 갖는 이중특이적 Ig-유사 분자들이 주로 생성된다. 따라서, 본 발명에서 또한 제공되는 방법에서는, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단 또는 상기 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단이 상기 제1 또는 제3 CH3 도메인의 366번 위치 쓰레오닌의 제1 대전된 아미노산에 의한 치환 및 상기 제2 또는 제4 CH3 도메인의 351번 위치 류신의 제2 대전된 아미노산에 의한 치환이며, 상기 제1 및 제2 대전된 아미노산들은 반대되는 전하를 갖는다.

[0077] 본 발명에 따른 돌연변이들의 일 바람직한 조합은 (예를 들어 A에 대한 특이성을 갖는) 가변 도메인을 더 포함하는 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 366번 위치 쓰레오닌 (T)이 라이신 (K)에 의해서 치환되고, (예를 들어 B에 대한 특이성을 갖는) 가변 도메인을 더 포함하는 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 351번 위치 류신 (L)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되는 것이다. 이는 T366K/L351'D 쌍 돌연변이로 표시된다. 전술한 바와 같이, 하나의 CH3 도메인 중 366번 위치와 제2 CH3 도메인 중 351번 위치 아미노산들이 CH3-CH3 계면 중 접촉 잔기들의 쌍이 되는 것으로 보고된 바 있다. 366번 위치에 도입된 라이신 및 351번 위치에 도입된 아스파르트산이 반대되는 전하들을 가짐으로써, 이러한 아미노산들이 서로에 대해서 정전기적으로 끌어당기게 된다. 따라서, 상기 제1 CH3 도메인은 상기 제2 CH3 도메인을 선호적으로 끌어당기게 되고, 366번 위치에 라이신을 포함하는 제1 CH3 도메인이 351번 위치에 아스파르트산을 포함하는 제2 CH3 도메인과 쌍을 이루어 포함되는 Ig-유사 분자들이 주로 형성된다. 만약 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드가 항원 A에 대한 특이성을 갖고, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드가 항원 B에 대한 특이성을 갖는다면, 'AB' 특이성을 갖는 이중특이적 Ig-유사 분자들이 주로 형성된다. 주목할 만하게도, 일부 구현예들에서는, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들 모두의 가변 도메인들의 특이성이 동일할 수도 있는데, 이 경우에는 단일특이적 Ig-유사 분자들이 형성된다 (예를 들어, 'AA' 특이성). 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 돌연변이들의 일 장점은, 기존의 대전된 아미노산 상호작용들을 치환하는 대신에, 새로이 도입된 대전된 아미노산들의 쌍들 사이에 신규한 상호작용이 발생한다는 점이다. 이러한 사항에 대해서는 기존에 전혀 개시되거나 또는 암시된 바가 없다. 따라서, 본 발명의 일 태양은 단일 숙주 세포로부터 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 T366K를 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L351D를 포함한다. 일 구현예는 단일 세포로부터 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 Ig-유사 분자는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 상기 방법은 상기 세포에:

[0078] - 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자, 및

[0079] - 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0080] 를 제공하고,

[0081] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 T366K를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L351D를 포함하고, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0082] 전술한 본 발명에 따른 아미노산 치환들을 사용하여, 단일 세포로부터 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 것이 가능해졌으며, 이에 의해서 오염성 헤테로다이머들의 함량이 5% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 더욱 바람직하게는 1% 미만, 또는 가장 바람직하게는, 근본적으로 존재하지 않도록 할 수 있다. 따라서, 일 구현예는, 단일 세포로부터 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 Ig-유사 분자는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 오염성 호모다이머들의 함량이 5% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 더욱 바람직하게는 1% 미만, 또는 가장 바람직하게는, 본질적으로 존재하지 않으며, 상기 세포에:

[0083] - 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자, 및

[0084] - 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0085] 를 제공하고,

[0086] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 T366K를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L351D를 포함하고, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0087] 바람직하게는, 본 발명에 따르면 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들을 제조하는 방법, 또는 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L351K를 더 포함한다. 또한, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 Y349E, Y349D 및 L368E로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 더 포함하는 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L368E를 더 포함한다.

[0088] 따라서, 바람직한 구현예에서 본 발명에 따른 전술한 T366K/L351'D 돌연변이는 제2 CH3 도메인의 368번 위치에서 류신 (L)의 글루탐산 (E)에 의한 치환과 더욱 조합된다. 이는, 예를 들어, T366K/L351'D,L368'E 돌연변이로 표시된다 (다만, 다른 방식의 표시도 가능하며, T336K/L351D-L368E 또는 T366K/L351D,L368E 또는 T366K - L351D,L368E로 표시할 수도 있다). 실시예 17에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 이러한 돌연변이를 항원 A에 대한 특이성을 갖는 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 및 항원 B에 대한 특이성을 갖는 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드에 도입하게 되면, 이중 AB 특이성을 갖는 이중특이적 Ig-유사 분자들의 비율이 특히 좋아진다. 이러한 돌연변이 쌍을 사용하여, 생성된 호모다이머들의 함량이 검출가능할 정도로 존재하지 않는 이중특이적 항체를 얻는 것이 가능해졌다. 따라서, 특히 바람직한 구현예는, 단일 세포로부터 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 Ig-유사 분자는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 오염성 호모다이머들의 함량은 5% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 더욱 바람직하게는 1% 미만, 가장 바람직하게는 본질적으로 존재하지 않으며, 상기 세포에:

[0089] - 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자, 및

[0090] - 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0091] 를 제공하고,

[0092] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 T366K를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L351D 및 L368E를 포함하고, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0093] 또 다른 바람직한 구현예에서는, 제1 CH3 도메인의 366번 위치에서 쓰레오닌 (T)이 라이신 (K)에 의해서 치환되고, 제2 CH3 도메인의 351번 위치에서 류신 (L)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되며, 상기 제2 CH3 도메인의 349번 위치에서 타이로신 (Y)이 글루탐산 (E)에 의해서 치환된다. 이는 예를 들어 T366K/L351'D,Y349'E 돌연변이로 표시되지만, 이러한 돌연변이를 다른 방식으로 표현하는 것도 가능하며, 예를 들어 T366K - L351D:Y349E, 또는 T366K/L351D,Y349E 또는 단순히 T366K/L351DY349E로 표시할 수도 있다. 잔기 Y349는 다이머 상호작용에 기여할 수 있는 351번 위치의 잔기에 인접하는 잔기이다. 실리코 데이터 (silico data)에 따르면, Y349E는 헤테로다이머의 안정화에 기여하고 (더 낮은 실리코 점수), 모노머의 불안정화에 기여하며 (더 높은 실리코 점수), 349번 위치의 글루탐산 (E)이 아스파르트산 (D)보다 더 바람직하다. 따라서, 이미 351번 위치에 아미노산 치환을 포함하는, 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드에 제2 아미노산 치환을 도입함으로써, 헤테로다이머화를 더욱 촉진시킬 수 있다.

[0094] 따라서, 특히 바람직한 구현예는 단일 세포로부터 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 Ig-유사 분자는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 오염성 호모다이머들의 함량은 5% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 더욱 바람직하게는 1% 미만, 가장 바람직하게는 본질적으로 존재하지 않으며, 상기 세포에:

[0095] - 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자, 및

[0096] - 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0097] 를 제공하고,

[0098] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 T366K를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L351D 및 Y349E를 포함하고, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0099] 또 다른 바람직한 구현예에서는, 제1 CH3 도메인의 366번 위치에서 쓰레오닌 (T)이 라이신 (K)에 의해서 치환되고, 제2 CH3 도메인의 351번 위치에서 류신 (L)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되며, 상기 제2 CH3 도메인의 349번 위치에서 타이로신 (Y)이 글루탐산 (E)에 의해서 치환되고, 상기 제2 CH3 도메인의 368번 위치에서 류신 (L)이 글루탐산 (E)에 의해서 치환된다. 이는 T366K,L351'D,Y349'E,L368'E 돌연변이로 표시된다. 두 개의 잔기들 Y349E 및 L368은 다이머 상호작용에 기여할 수 있다. 실리코 데이터 (silico data)에 따르면, Y349E 및 L368E는 헤테로다이머의 안정화에 기여하고 (더 낮은 실리코 점수), BB 다이머의 불안정화에 기여하며 (더 높은 실리코 점수), 349번 및 368번 위치의 글루탐산 (E)이 아스파르트산 (D)보다 더 바람직하다. 따라서, 이미 351번 위치에 아미노산 치환을 포함하고 있는 B-사슬 중에 제2 및 제3 아미노산 치환을 도입함으로써, 헤테로다이머화가 더욱 촉진된다. 따라서, 특히 바람직한 구현예는 단일 세포로부터 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 Ig-유사 분자는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 오염성 호모다이머들의 함량은 5% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 더욱 바람직하게는 1% 미만, 가장 바람직하게는 본질적으로 존재하지 않으며, 상기 세포에:

[0100] - 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자, 및

[0101] - 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0102] 를 제공하고,

[0103] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 T366K를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L351D, Y349E 및 L368E를 포함하고, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0104] 또 다른 바람직한 구현예에서, 제1 CH3 도메인의 366번 위치에서 쓰레오닌 (T)이 라이신 (K)에 의해서 치환되고, 상기 제1 CH3 도메인의 351번 위치에서 류신 (L)이 라이신 (K)에 의해서 치환되며, 제2 CH3 도메인의 351번 위치에서 류신 (L)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되고, 상기 제2 CH3 도메인의 366번 위치에서 류신 (L)이 글루탐산 (E)에 의해서 치환된다. 이는 T366K,L351K/L351'D,L368'E 돌연변이로 표시된다. 이러한 돌연변이 또한, 실시예에서 보여지는 바와 같이, 관심 대상이 되는 (이중특이적) 항체의 비율을 증가시킨다. 또한, 이러한 돌연변이에 의해서, 생성된 호모다이머들의 함량이 검출가능할 정도로 존재하지 않는 이중특이적 항체를 얻는 것이 가능해졌다. 따라서, 본 발명에서는 단일 세포로부터 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 Ig-유사 분자는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 오염성 호모다이머들의 함량은 5% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 더욱 바람직하게는 1% 미만, 가장 바람직하게는 본질적으로 존재하지 않으며, 상기 세포에:

[0105] - 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자, 및

[0106] - 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0107] 를 제공하고,

[0108] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 T366K 및 L351K를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L351D 및 L368E를 포함하고, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0109] 또 다른 바람직한 구현예에서, 제1 CH3 도메인의 366번 위치에서 쓰레오닌 (T)이 라이신 (K)에 의해서 치환되고, 상기 제1 CH3 도메인의 351번 위치에서 류신 (L)이 라이신 (K)에 의해서 치환되며, 제2 CH3 도메인의 351번 위치에서 류신 (L)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되고, 상기 제2 CH3 도메인의 349번 위치에서 타이로신 (Y)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되며, 상기 제2 CH3 도메인의 355번 위치에서 아르기닌 (R)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환된다. 이는 T366K,L351K/L351'D,Y349'D,R355'D 돌연변이로 표시된다. T366K-L351K/L351'D-Y349'D 쌍은 B 사슬 중의 R355'D 돌연변이에 의해서 더욱 개선될 수 있으며, 이는 더 높은 BB-인 실리코 점수를 야기할 뿐만 아니라, AB 인 실리코 점수 역시 약간 더 높게 한다. 따라서, 또한 본 발명에서는 단일 세포로부터 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 Ig-유사 분자는 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 오염성 호모다이머들의 함량은 5% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 더욱 바람직하게는 1% 미만, 가장 바람직하게는 본질적으로 존재하지 않으며, 상기 세포에:

[0110] - 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자, 및

[0111] - 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0112] 를 제공하고,

[0113] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 T366K 및 L351K를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 아미노산 치환 L351D 및 Y349D 및 R355D를 포함하고, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0114] 하기 표 B는 헤테로다이머 또는 호모다이머를 생성하기 위한 선호적 쌍 이룸에 채택되는 바람직한 수단들로서, CH3 도메인들에 도입될 수 있는 돌연변이들을 요약한 것이다.

[0115] 표 B

CH3 중 아미노산 치환들	구조물 #	선호적 쌍 이룸의 대상
- (야생형)	-	야생형
E356K, D399K	1	구조물 2 또는 3
K392D, K409D	2	구조물 1
K392D, K409D, K439D	3	구조물 1
K392D, D399K, K409D	4	구조물 4
E356K, E357K, K439D, K370D	5	구조물 5
T366W	6	구조물 7
T366S, L368A, Y407V	7	구조물 6
T366K	43	구조물 63, 69, 70, 71, 73
L351D	63	구조물 43, 68
T366K, L351K	68	구조물 63, 69, 70, 71, 72, 75
L351D, L368E	69	구조물 43, 68
L351E, Y349E	70	구조물 43, 68
L351D, Y349E	71	구조물 43, 68
L351D, R355D	72	구조물 43, 68
L351D, Y349E, L368E	73	구조물 43
L351D, Y349D, R355D	75	구조물 68

[0116]

[0117] 따라서, 적어도 두 가지의 Ig-유사 분자들을 제조하는 본 발명에 따른 방법, 또는 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 본 발명에 따른 방법이 제공되며, 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단 및/또는 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 상기 수단은 표 B에 도시된 돌연변이들의 적어도 하나의 조합을 포함한다. 바람직하게는, 상기 제1 및 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단 및 제3 및 제4 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드들의 선호적 쌍 이룸을 위한 수단은 표 B에 도시된 돌연변이들의 적어도 두 가지의 조합을 포함한다.

[0118] 본 발명은 또한 CH3 돌연변이들의 신규한 조합들을 제공하며, 이를 통해서 단일 세포 내에서 적어도 두 가지의 단일특이적 Ig-유사 분자들의 혼합물을 제조하는 것이 가능하고, 오염성 이중특이적 Ig-유사 분자들의 함량은 5% 미만, 바람직하게는 2% 미만, 더욱 바람직하게는 1% 미만, 가장 바람직하게는 심지어 본질적으로 존재하지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 이러한 돌연변이들은 단일특이적 항체들의 혼합물을 제조하는데 특히 적합하며, 이는 예를 들어, 두 개의 동일한 표적 분자들의 가교화가 높은 수준으로 이루어지는 것이 바람직할 때, 종양 세포의 보체-매개 용균 (complement-mediated lysis)과 같은 특정 효과기 기능들을 동원하기 위해서 표적 세포들에 대한 항체들의 밀도가 충분히 높아야 할 필요가 있을 때, 또는 두 개의 표적들이 서로에 대해서 너무 멀리 떨어져 있어서 단일 이중특이적 항체에 의해서 결합될 수 없을 때, 또는 법적 승인 과정들을 단순화하기 위해서 유리하다. 그러한 경우들에서, 종종 상기 단일특이적 항체들을 생산하기 위한 생산 플랫폼을 최적화하는 것이 바람직하다. 실시예 10에 설명된 바와 같이, 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 (예를 들어, 특이성 A를 갖는)의 392번 위치에서 라이신 (K)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되고, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 399번 위치에서 아스파르트산 (D)이 라이신 (K)에 의해서 치환되고, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 409번 위치에서 라이신 (K)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되는 경우, 단일 세포 내에서, 특이성 AA를 갖는 단일특이적 Ig-유사 분자들을 포함하는, 적어도 두 가지의 서로 다른 단일특이적 Ig-유사 분자들의 혼합물을 제조하는 것이 가능하며, 이때 이중특이적 부산물들 (이중특이적 Ig-유사 분자들)의 생성이 5% 미만, 더 나아가 3% 미만, 심지어 본질적으로 전혀 검출가능하지 않은 정도로까지 감소한다는 점이 본 발명에서 제시된다. 따라서, 전술한 돌연변이들 (본 발명에서 K392D, D399K, K409D로 표시)의 조합은 단일특이적 Ig-유사 분자들의 혼합물 제조에 특히 바람직하다. 통상의 기술자라면 그 기능적 변이체들, 즉 K392E, D399R, K409E도 유사한 효과들을 야기할 수 있다는 점을 이해할 수 있을 것이다. 부가적으로, D399K 및 K409D를 포함하는 이중 돌연변이들, 또는 K392D 및 K409D, D399R 및 K409E 등과 같은 다른 기능적 변이체들도 유사한 효과들을 야기할

수 있다.

[0119] 동일한 사항이, 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 356번 위치에서 글루탐산 (E)이 라이신 (K)에 의해서 치환되고, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 357번 위치에서 글루탐산 (E)이 라이신 (K)에 의해서 치환되고, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 439번 위치에서 라이신 (K)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되고, 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드의 370번 위치에서 라이신 (K)이 아스파르트산 (D)에 의해서 치환되는 돌연변이들의 조합에 대해서도 적용된다. 이러한 돌연변이들 (E356K, E357K, K439D, K370D로 표시)의 조합은 또한 단일특이적 Ig-유사 분자들의 혼합물의 생산에도 특히 바람직하다. 통상의 기술자라면 그 기능적 변이체들, 즉, E356R, E357R, K439E, K370E도 유사한 효과들을 야기할 수 있다는 점을 이해할 것이다. 부가적으로, E356K 및 K439D, 및 E357K 및 K370D 치환들을 포함하는 삼중 또는 이중 돌연변이들, 또는 다른 기능적 변이체들도 유사한 효과를 야기할 수 있다. 따라서, 또 다른 구현예는 단일 숙주 세포로부터 적어도 두 가지의 다른 단일특이적 Ig-유사 분자들을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 두 가지의 Ig-유사 분자들 각각은 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 상기 세포에,

[0120] - 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자, 및

[0121] - 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0122] 를 제공하고,

[0123] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 K392D, D399K, K409D 돌연변이를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 야생형 CH3 도메인 또는 E356K, E357K, K439D, K370D 돌연변이를 포함하고, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들을 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0124] 대안적인 구현예에서는, 단일 숙주 세포로부터 적어도 두 가지의 다른 단일특이적 Ig-유사 분자들을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 두 가지의 Ig-유사 분자들 각각은 계면을 형성할 수 있는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하고, 상기 세포에,

[0125] - 특이성 A를 갖는 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제1 핵산 분자, 및

[0126] - 특이성 B를 갖는 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 제2 핵산 분자

[0127] 를 제공하고,

[0128] 상기 제1 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 야생형 CH3 도메인 또는 K392D, D399K, K409D 돌연변이를 포함하며, 상기 제2 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬은 E356K, E357K, K439D, K370D 돌연변이를 포함하고, 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 가지 핵산 분자들을 발현시킨 다음, 배양물로부터 상기 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들을 수득하는 단계를 더 포함한다.

[0129] 실시예 10에 설명된 바와 같이, 두 가지의 단일특이적 Ig-유사 분자들은 단일 세포 내에서 생산될 수 있으며, 이중특이적 Ig-유사 분자들의 생성은 본질적으로 검출가능하지 않다. 통상의 기술자라면, 상기 숙주 세포에 제공할 야생형 또는 가공된 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드를 암호화하는 제3 핵산 분자를 선택함으로써, 3 가지의 단일 특이적 항체들의 혼합물을 제조하는 등의 방법을 고려해 볼 수 있다.

[0130] 일 태양에서, 본 발명은 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들 또는 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하기 위한 방법을 제공하며, 상기 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들 각각은 다른 표적 에피토프를 인식하는 가변 영역을 더 포함하며, 상기 표적 에피토프들은 동일한 분자 상에 위치한다. 이는 종종 하나의 에피토프만이 표적화되는 상황과 비교할 때에, 상기 표적 분자의 (생물학적) 기능에 더욱 효과적으로 대응하는 것을 가능케 한다. 예를 들어, 헤테로다이머 Ig-유사 분자는, 예를 들어 종양 세포들이 번식하는데 필수적인 성장 인자 수용체들 또는 가용성 분자들 상에 존재하는 2개의 에피토프들에 동시에 결합할 수 있으며, 이에 의해서 비조절된 번식으로 이어지는 몇몇 독립적인 신호전달 경로들을 효과적으로 차단할 수 있고, 적어도 두 가지의 Ig-유사 분자들의 임의의 조합은 그러한 성장 인자 수용체들 또는 가용성 분자들 상에 존재하는 2, 심지어 3 또는 4개의 에피토프들에 동시에 결합할 수 있다.

[0131] 바람직한 구현예에서, 상기 표적 분자는 가용성 분자이다. 다른 바람직한 구현예에서, 상기 표적 분자는 막-결합 분자이다.

[0132] 본 발명의 다른 태양에서는, 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들 또는 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하

기 위한 방법을 제공하며, 상기 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들 각각은 표적 에피토프를 인식하는 가변 영역을 더 포함하며, 상기 표적 에피토프는 다른 분자들 상에 위치한다. 이 경우, 다른 표적 분자들 각각은 가용성 분자 또는 막-결합 분자일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 다른 표적 분자들은 가용성 분자들이다. 다른 한편으로, 하나의 표적 분자는 가용성 분자인 반면, 제2의 표적 분자는 막 결합 분자이다. 또 다른 대안으로서, 표적 분자들 모두는 막 결합 분자들이다. 일 구현예에서, 상기 다른 표적 분자들은 동일한 세포들 상에서 발현되는 반면, 다른 구현예들에서는, 상기 다른 표적 분자들은 다른 세포들 상에서 발현된다. 비제한적인 예로서, 임의의 헤테로다이머 Ig-유사 분자 또는 적어도 두 가지의 Ig-유사 분자들의 임의의 조합이 복수의 막-결합 수용체들을 동시에 차단하거나, 종양 세포들에 대한 시토카인들 또는 성장 인자들과 같은 복수의 가용성 분자들을 중화하거나, 또는 다른 바이러스 항원형 (viral serotypes) 또는 바이러스 균주들을 중화하는데 적합할 수 있다.

[0133] 본 발명의 바람직한 일 구현예에서는, 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들 또는 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하기 위한 방법을 제공하며, 상기 표적 에피토프들 중의 적어도 하나는 종양 세포 상에 위치한다. 다른 한편으로, 또는 부가적으로, 상기 표적 에피토프들 중 적어도 하나는 효과기 세포의 표면 상에 위치한다. 이는, 예를 들어 종양 세포 사멸을 위해서 T 세포들 또는 NK 세포들의 동원에 적합하다. 예를 들어, 본 발명에 따른 방법에 의해서, 면역 효과기 세포들 상에 위치하는 표적 분자에 특이적으로 결합함으로써, 면역 효과기 세포들, 바람직하게는 인간 면역 효과기 세포들을 동원할 수 있는 적어도 하나의 Ig-유사 분자가 제조된다. 또 다른 구현예에서, 상기 면역 효과기 세포는 상기 Ig-유사 분자가 상기 표적 분자에 결합함으로써 활성화된다. 효과기 메카니즘의 동원은, 예를 들어, T 세포 수용체 또는 Fc 감마 수용체와 같은 세포독성 촉발 분자에 결합할 수 있는, 본 발명에 따른 방법에 의해서 제조된 Ig-유사 분자를 투여함으로써, 면역 조절된 세포독성의 방향을 재설정하는 것을 포함하며, 이에 의해서 하류 면역 효과기 경로들을 활성화할 수 있다. 본 발명에서, '면역 효과기 세포 (immune effector cell)' 또는 '효과기 세포'라는 용어는 포유류 면역계 중의 천연 세포들로서, 활성화되어 표적 세포의 생존성에 영향을 줄 수 있는 세포를 의미한다. 면역 효과기 세포들에는, 천연 킬러 (NK) 세포들과 같은 림프성 계통의 세포들, 세포독성 T 세포들을 포함하는 T 세포들, 또는 B 세포들을 포함할 뿐만 아니라, 단구 (monocytes) 또는 대식세포들 (macrophages), 수지상 세포들 및 호중성 과립구들 (neutrophilic granulocytes)과 같은 골수성 계통의 세포들 또한 포함된다. 따라서, 상기 효과기 세포는 바람직하게는 NK 세포, T 세포, B 세포, 단구, 대식세포, 수지상 세포 또는 호중성 과립구이다.

[0134] 면역 효과기 세포들 상에 존재하는 표적 항원들에는 CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D 및 NKp46이 포함될 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들 또는 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하기 위한 방법을 제공하며, 상기 표적 에피토프는 CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D 또는 NKp46 분자 상에 위치한다.

[0135] 표적 세포의 생존성은 세포 생존, 번식 및/또는 다른 세포들과의 상호작용을 포함할 수 있는 것으로 해석된다.

[0136] 따라서, 일 태양에서, 본 발명은 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들 각각은 표적 에피토프를 인식하는 가변 영역을 더 포함한다. 일 구현예에서, 상기 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 두 가지의 가변 영역들 각각은 동일한 표적 에피토프를 인식하지만, 다른 친화도를 갖는다. 다른 구현예에서, 상기 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들의 두 가지의 가변 영역들 각각은 다른 표적 에피토프를 인식한다. 또 다른 구현예에서, 상기 다른 표적 에피토프들은 동일한 분자 상에 위치하며, 이는 막-결합 분자 또는 가용성 분자일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 다른 표적 에피토프들은 다른 표적 분자들 상에 위치하며, 이는 동일한 세포들 상에서 또는 다른 세포들 상에서 발현될 수 있다. 다른 한편으로, 상기 다른 표적 분자들은 가용성 분자들이거나, 또는 하나의 표적 분자는 가용성 분자인 반면에 제2의 표적 분자는 막 결합 분자일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자의 표적 분자들 중 적어도 하나는 종양 세포 상에 위치한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자의 표적 분자들 중 적어도 하나는 효과기 세포 상에 위치할 수 있다 (즉, NK 세포, T 세포, B 세포, 단구, 대식세포, 수지상 세포 또는 호중성 과립구이고, 상기 표적 에피토프는 CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D 또는 NKp46 분자 상에 위치할 수 있다).

[0137] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들 또는 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 전술한 바와 같이, 상기 적어도 두 가지의 다른 Ig-유사 분자들은 항체들, 바람직하게는 IgG 이소타입의 항체들, 더더욱 바람직하게는 IgG1 이소타입의 항체들이다.

[0138] 또한, 본 발명은, 본 발명에 따른 방법에 의해서 제조가능한, Ig-유사 분자, 헤테로다이머 Ig-유사 분자, 또는

적어도 두 가지의 Ig-유사 분자들의 혼합물을 제공한다. 상기 (헤테로다이머) Ig-유사 분자 또는 Ig-유사 분자들의 혼합물은, 바람직하게는 표 B에 열거된 CH3 돌연변이 중 적어도 하나를 포함한다. 따라서, 표 B에 열거된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 (헤테로다이머) Ig-유사 분자 또는 적어도 두 가지의 Ig-유사 분자들의 혼합물이 또한 본 발명에서 제공되며, 더 나아가 본 발명에 따르면 적어도 하나의 Ig-유사 분자, 또는 적어도 두 가지의 Ig-유사 분자들의 혼합물을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 일 구현예에서, 상기 Ig-유사 분자는 이중특이적 항체와 같은 이중특이적 Ig-유사 분자이다. 다른 구현예에서, 상기 Ig-유사 분자는 단일특이적 항체와 같은 단일특이적 Ig-유사 분자이다. 일 바람직한 구현예는 본 발명에 따른 방법에 의해서 제조가능한 적어도 두 가지 다른 Ig-유사 분자들의 혼합물을 제공하며, 상기 적어도 두 가지 다른 Ig-유사 분자들은 동일 항원 상의 다른 에피토프들 및/또는 다른 항원들 상의 다른 에피토프들에 결합한다. 또한, 본 발명에서는 본 발명에 따른 방법에 의해서 제조가능한 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 제공하며, 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자는 동일 항원 상의 다른 에피토프들 및/또는 다른 항원들 상의 다른 에피토프들에 결합한다. 상기 혼합물들 및 항체들의 장점 및 바람직한 용도들에 대해서는 전술한 바 있다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 의해서 제조가능한 적어도 두 가지 다른 Ig-유사 분자들의 혼합물을 제공하며, 상기 적어도 두 가지 다른 Ig-유사 분자들은 적어도 하나의 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 적어도 두 가지 다른 Ig-유사 분자들 중 두 가지는 헤테로다이머 Ig-유사 분자들이다. 또한 바람직한 구현예는 두 개의 CH3 도메인들을 포함하는 헤테로다이머 항체를 제공하며, 상기 두 개의 CH3 도메인들 중 하나는 아미노산 치환 L351D 및 L368E를 포함하고, 상기 두 개의 CH3 도메인들 중 다른 하나는 아미노산 치환 T366K 및 L351K를 포함한다. 이러한 아미노산 치환들은, 전술한 바와 같이, 상기 두 개의 CH3 도메인들의 선호적 쌍 이룸을 위한 바람직한 수단이다. 상기 두 개의 CH3 도메인들 중 하나의 아미노산 치환 L351D 및 L368E, 및 상기 두 개의 CH3 도메인들 중 다른 하나의 아미노산 치환 T366K 및 L351K는 함께 '돌연변이의 DEKK 조합', 'DEKK 변이체', 'DEKK 쌍', 'DEKK 가공된 CH3 도메인들', 'DEKK' 또는 DEKK를 지칭하는 다른 이름들로 별칭된다. 또한, 아미노산 치환 L351D 및 L368E를 보유하는 CH3 도메인은 'DE 쪽'으로, 아미노산 치환 T366K 및 L351K를 보유하는 CH3 도메인은 'KK 쪽'으로 별칭된다.

[0139] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 의해서 제조가능한 (헤테로다이머) Ig-유사 분자, 또는 적어도 두 가지의 Ig-유사 분자들의 혼합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 상기 (헤테로다이머) Ig-유사 분자, 또는 상기 적어도 두 가지 Ig-유사 분자들은 바람직하게는 항체/항체들이다. 상기 약학적 조성물은 상기 (헤테로다이머) Ig-유사 분자, 단일특이적 또는 이중특이적 Ig-유사 분자들을 포함하는 혼합물, 또는 단일특이적 및 이중특이적 Ig-유사 분자들의 조합을 포함할 수 있다. 부가하여, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본 발명에서 상기 '약학적으로 허용가능한 담체'는 생리학적으로 적합한 임의의 및 모든 용매들, 염들, 분산 매체, 코팅, 항생제 및 항진균제, 등장 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 투여 경로에 따라서 (예를 들어, 정맥내, 피하, 관절내 등), 상기 Ig-유사 분자들은 상기 Ig-유사 분자들을, 상기 Ig-유사 분자들을 불활성화시킬 수도 있는 산 및 다른 천연 조건들의 작용으로부터 보호하는 물질 중에 코팅될 수도 있다. 일 태양에서는, 본 발명에 따른 방법에 의해서 제조가능한 적어도 두 가지 Ig-유사 분자들의 혼합물을 포함하는 약학적 조성물이 제공되며, 상기 적어도 두 가지 다른 Ig-유사 분자들은 본 발명에 따른 재조합 숙주 세포들에 의해서 제조된다. 더 나아가, 본 발명에 따른 방법에 의해서 제조가능한 헤테로다이머 Ig-유사 분자를 포함하는 약학적 조성물이 제공되며, 상기 헤테로다이머 Ig-유사 분자는 본 발명에 따른 재조합 숙주 세포들에 의해서 제조된다.

[0140] 또한, 본 발명에서는 표 B에 열거된 돌연변이들 중 적어도 하나를 포함하는 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며, 더 나아가 표 B에 열거된 돌연변이들 중 적어도 하나를 포함하는 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 적어도 하나의 핵산 분자를 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0141] 도 1: A) 구조물 벡터 MV1057에 대한 개요도. 스터퍼 영역 (stuffer region)은 항체 VH 영역이 클로닝되는 영역이다. B) 파지 디스플레이 벡터 MV1043에 대한 개요도.

도 2: 구조물 벡터 MV1057 중에 존재하는 야생형 IgG1 Fc의 아미노산 서열 (EU 넘버링 규칙 적용).

도 3: 다양한 구조물 내로 클로닝하는데 사용되는 VH 영역들의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들.

도 4: 트랜스펙션 (transfections) A, G 및 H의 질량 스펙트럼 데이터.

도 5: 트랜스펙션 M 및 U의 질량 스펙트럼 데이터.

도 6: 트랜스펙션 0의 질량 스펙트럼 데이터.

도 7: 중성 아미노산을 대전된 아미노산으로 치환함에 따른 호모다이머화의 방지.

도 8: 트랜스펙션 샘플 Z0 (T366K/L351'D)의 천연 MS 스펙트럼 (A) 및 트랜스펙션 샘플 Z0 (T366K/L351'D)의 나선형 MS 스펙트럼 (Convoluted MS spectrum). 제2/메인 피크는 이중특이적 분자 (B)를 나타낸다.

도 9: 실험적으로 검증된 돌연변이 쌍들의 HADDOCK 점수.

도 10: CH3-CH3 계면에서의 상호작용 도면; A) K409D:K392D/D399'K:E356'K, B) D399K:E356K/D399'K:E356'K, C) K409D:K392D/ K409'D:K392'D.

도 11: 다양한 366/351' 대전 돌연변이들에 대한 HADDOCK 점수.

도 12: CH3-CH3 계면에서의 상호작용 도면; A) L351D/L351'D, B) L351D:S354A:R355D/ L351'D:S354'A:R355'D.

도 13: L351번 위치 주변의 부가적인 대전 돌연변이들에 대한 HADDOCK 점수들.

도 14: 사슬 A 중의 T366번 위치 및 사슬 B 중의 L351번 위치 주변의 부가적인 대전 돌연변이들에 대한 HADDOCK 점수.

도 15: CH3-CH3 계면에서의 상호작용 도면.

도 16: T366/L351 주변의 변이체들에 대한 HADDOCK 점수.

도 17: T366/L351 주변의 부가적인 변이체들에 대한 HADDOCK 점수.

도 18: 구조물 T366K,L351K를 구조물 L351D (좌측 패널) 또는 L351D,Y349E (우측 패널)와 함께 공동-배양한 이후, 전체 IgG (절반체는 미도시)의 단일 대전 상태에서 확대한 이중특이적 IgG에 대한 nMS 스펙트럼 예들.

도 19: A) AA, AB, BB, A 및 B의 상대적 풍부함을 보여주는 천연 MS 결과들 (모든 종들의 전체 합은 100%; 원치 않는 종들인 AA, BB, A 및 B에 대해서 더욱 상세히 검토하기 위해서 AB를 제외하고 표시한 결과.

도 20: 열적안정성 분석 결과. 사각형: 야생형; 삼각형: 전하 역전 쌍 E356K:D399K/K392D:K409D; 원: 상기 각각의 그래프에서 표시된 돌연변이 CH3 조합들.

도 21: 10x 동결-해동 실험의 결과들. 1122= 제1 부계 항체 BB; 1337= 제2 부계 항체 AA; 야생형=AA, AB, BB; CR= 전하 역전 쌍 E356K:D399K/K392D:K409D의 이중특이; 3-6 및 9-12= 표 15로부터의 3-6 및 9-12 조합들로부터의 이중특이적 분자들.

도 22: 피브리노겐을 코팅 항원으로 사용한 ELISA에 의해서 측정된 혈청 안정성 결과들. A) 0.5 ㎍/ml로 희석된 IgG 샘플들로 얻어진 ELISA 데이터; B) 0.05 ㎍/ml로 희석된 IgG 샘플들로 얻어진 ELISA 데이터. 결과들은 T=0 시간 포인트 (100%)에 대해서 정규화되었다. 1337= 제2 부계 항체 AA; 야생형=AA, AB, BB; CR= 전하 역전 쌍 E356K:D399K/K392D:K409D의 이중특이; 3-6 및 9-12= 표 15로부터의 3-6 및 9-12 조합들로부터의 이중특이적 분자들.

도 23: 트랜스펙션 비율 1:5 내지 5:1의 비율 실험들에 대한 nMS 결과들. A) DE-쪽에 대해서 'A' 특이성을 갖고, KK-쪽에 대해서 'B' 특이성을 갖는 돌연변이들의 DEKK 조합; B) DE-쪽에 대해서 'C' 특이성을 갖고, KK-쪽에 대해서 'B' 특이성을 갖는 돌연변이들의 DEKK 조합; C) E356K:D399K-쪽에 대해서 'A' 특이성을 갖고, K392D:K409D-쪽에 대해서 'B' 특이성을 갖는 돌연변이들의 전하 역전 조합.

도 24: 표 20으로부터의 트랜스펙션들 # 1-11의 nMS 결과들.

도 25: 다른 CH3 가공된 벡터들을 갖는 다이머들에 대한 HADDOCK 점수들. 회색 막대들: 원하는 종 AB 및 CD; 검정색 막대들: 원치 않는 종 AA, BB, CC, DD, AC, BC, AD, BD.

도 26: 표 20으로부터의 트랜스펙션들 # 1-11의 SDS-PAGE. 대조군 샘플들 DE/KK, DE/DE 및 KK/KK 또한 포함됨.

도 27: 트랜스펙션들 # 9 (A) 및 # 11 (B)의 nMS.

도 28: 겔 여과된 샘플들 1516:1516 (A), 1337:1337 (B) 및 1516:1337 (C)의 nMS.

도 29: DEKK 가공된 항체 및 그 두 가지 부계 항체 샘플들의 혈청 수준 (pK 스터디).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0142] 본 발명은 하기 실시예들에 의해서 더욱 상세하게 설명된다. 하기 실시예들은 본 발명을 제한하는 것은 아니며, 단지 본 발명을 명확하게 하기 위한 것이다.

[0143] 실시예

[0144] **실시예 1: 다양한 CH3 도메인들을 제조하기 위한 아미노산 치환들**

[0145] CH3 도메인들에 있어서 차이를 보임으로써 CH3 도메인-포함 Ig-유사 분자들의 쌍 이룸이 선호적으로 촉진되거나 또는 저해되는 다양한 Ig-유사 분자들을 얻기 위해서, 기존에 헤테로다이머 형성을 촉진하는 것으로 알려진 몇몇 아미노산 치환, 및 기존에 보고되지 않고 테스트되지도 않았지만 호모다이머 형성을 촉진하는 것으로 선택된 몇몇 대안적인 아미노산 치환들을 구조물 벡터 내로 도입하였다 (구조물 벡터 MV1057; 도 1A). 구조물 벡터 MV1057은, 도 2에 도시된 바와 같이, 정상적인 야생형 IgG1 Fc 부분을 암호화하는 핵산 서열들을 포함한다. 표 1은 이러한 야생형 Fc에 도입된 아미노산 치환들을 열거하고 있으며, 일련의 7개 구조물들이 열거되어 있다. 모든 구조물들은 Geneart에서 제조되었다. 구조물 1, 2 및 3, 또는 그 대체물들은 이전에 헤테로다이머를 유발하는 것으로 서술된 바 있으며 (EP01870459, WO2009/089004), 구조물 6 및 7 (WO98/50431)도 유사하다. 구조물 4 및 5는 신규한 것이며, 호모다이머화를 촉진하도록 디자인되었다.

표 1

[0146]

CH3에서의 AA 치환	구조물 #	대응 쌍 구조물	보고된 이중특이적 산물 %
- (야생형)	-	- (야생형)	~50%
E356K, D399K	1	구조물 2 또는 3	~100%
K392D, K409D	2	구조물 1	~100%
K392D, K409D, K439D	3	구조물 1	~100%
K392D, D399K, K409D	4	구조물 4	
E356K, E357K, K439D, K370D	5	구조물 5	
T366W	6	구조물 7	~86.7%
T366S, L368A, Y407V	7	구조물 6	~86.7%

[0147] **실시예 2: VH를 CH3 돌연변이들을 갖는 구조물들 내로 클로닝**알려진 특이성을 갖고, 인간 IGKV1-39 경사슬과 쌍을 이룰 수 있는 능력을 갖는 것으로 알려진 몇몇 항체 VH 영역들을 이러한 구조물들 내로 클로닝하는데 사용하였다.

[0148] 전술한 바와 같이, 모든 CH3 변이체들은 다른 항체 도메인들과 결합하는데 사용되어 이중특이적 또는 단일특이적 전장 항체들을 생성하는데 사용될 수 있다. VH/피 조합들에 의해서 정해지는 항체의 특이성은 CH3 도메인들에 의해서 유도되는 중사슬 다이머화 양상에 영향을 미치지 않는다. 전반적으로, 모델 VH/VL 조합들을 사용하였으며, 여기에서 모든 VL들은 생식세포 계열 인간 IGKV1-39에 기반한 것들이고, VH들은 변화한다. 도 3은 사용된 항체 VH 영역들의 전장 서열들 및 특이성들을 도시한 것이다. MF 코딩은 다양한 VH들에 대한 내부 메루스 (Merus) 표지를 지칭하는 것으로서, 예를 들어 VH MF1337은 파상풍 톡소이드 (tetanus toxoid)에 대한 특이성을, MF1025는 돼지 틸로글로불린 (porcine thyroglobulin)에 대한 특이성을, MF1122는 소과 피브리노겐 (bovine fibrinogen)에 대한 특이성을 갖는다.

[0149] 파지 디스플레이 벡터 MV1043 (도 1B)에 존재하는 VH 영역들을 제한 효소 SfiI 및 BstEII (제조자 사용지침서에 따른 New England Biolabs/ cat# R0123L 및 R0162L/)로 절단함으로써, 이러한 벡터로부터 VH 단편을 얻었다. 벡터 MV1057은 표준 과정에 따라서 SfiI 및 BstEII로 절단하였다 (제조자 사용지침서에 따름). 단편들 및 벡터를 겔 (제조자 사용지침서에 따른 Promega/ cat# V3125/) 상에서 정제하여 절단 벡터 및 VH 유전자 인써어트들을 분리하였다. 양자를 접합 (litigation)에 의해서 접합시킨 다음, 접합물을 E. coli DH5α (제조자 사용지침서에 따른 Invitrogen/ cat# 12297-016/) 내로 형질전환시켰다. 밤새 선택 과정을 거쳐서, 단일 콜로니를 수득하고, 올바른 인써어트를 갖는 벡터들을 서열분석에 의해서 동정하였다.

[0150] **실시예 3: HEK293T 세포들 내에서 전장 IgG의 트랜스펙션 및 발현**

[0151] 표준 방법에 따라서, 재클로닝된 VH 변이체들을 암호화하고, 또한 공통된 경사슬 huIGKV1-39를 암호화하는 다양

한 플라스미드들을 HEK293T 세포들에 트랜스펙션시킴으로써, IgG가 발현될 수 있도록 하였다 (de Kruif etal Biotech Bioeng. 2010). 트랜스펙션 이후에, 상등액에서 IgG 발현 수준들을 ForteBIO Octet-QK 시스템을 사용하여 측정하였으며, 이는 Bio-Layer Interferometry (BLI)에 기초한 것이며, 생분자 상호작용을 실시간으로 정향화하고 동역학적으로 특성화하는 것을 가능케 한다; 세부사항은 www.fortebio.com 참조. 5 ㎍/ml를 초과하는 발현 수준들이 측정되는 경우, Protein A 친화도 정제를 사용하여 IgG를 정제하였다.

[0152] **실시예 4: IgG의 정제**

[0153] protein A 컬럼 (제조자 사용지침서에 따른 GE Healthcare/ cat# 11-0034-95/)을 사용하여 배양물 상등액을 정제하였으며, 0,1 M 시트레이트 버퍼 (citrate) pH 3.0에서 용출시키고, 동일한 부피의 1,0 M Tris-HCL pH 8.0 중에서 즉시 중화시키거나, 또는 탈염 컬럼을 사용하여 PBS로 직접 재완충시켰다. 대안으로서, protein A beads (sepharose beads CL-4B, GE healthcare cat #170780-01)를 사용하여 IgG를 정제할 수도 있다.

[0154] **실시예 5: 항원-특이적 ELISA's**

[0155] 항원에 대한 결합 활성을 확립하기 위해서 항원 특이적 ELISA를 수행하였으며, 이중특이적 항체들의 결합 활성을 나타내기 위해서 캡처 ELISA를 수행하였다. 복합체의 검출을 위해서는 비오틴화된 제2 항원을 사용하였다 (de Kruif etal Biotech Bioeng. 2010).

[0156] **실시예 6: SDS-PAGE**

[0157] 표준 방법에 따라서, 정제된 IgG 혼합물들을, 환원되고 비환원성인 조건 하에서 SDS-PAGE (NuPAGE® 4-12% bis-tris gel/ Invitrogen/ cat# NP0323BOX)에 의해서 분석하였으며, 겔 중의 단백질들의 염색은 콜로이달 블루를 사용하여 수행하였다 (PageBlue™ protein staining solution/ Fermentas/ cat# RO571).

[0158] **실시예 7: IgG1의 효소적 탈글리코실화**

[0159] IgG들의 글리코실화에는 불균일성이 존재하므로, 질량 스펙트럼 분석에 적당한 구별되는 질량을 갖는 단일 산물을 제조하기 위해서, 단백질들을 탈글리코실화하였다. IgG1 10 ㎍ 당 N-글리코시다아제 F (PNGase F; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 1 유닛을, 37℃에서 밤새도록 배양하였다. 10 kDa MWCO 원심분리 필터 컬럼 (Millipore)을 사용하여 완충용액 교환을 수행함으로써, 원래의 정제 완충용액 (0,1 M 시트레이트 완충용액 pH 3.0 / 1,0 M Tris-HCL pH 8.0)을 제거하고, PBS로 재완충시켰다. 유사한 완충용액 교환 과정을 수행함으로써, 떨어져 나온 글리칸 사슬들을 제거하고, 완충용액을 150 mM 암모늄 아세테이트 pH 7.5로 변화시켰다. 필터들은 200 ㎕ 150 mM 암모늄 아세테이트 pH 7.5로, 12분 동안 11,000 rpm 및 4℃로 세척하였다. 세척 이후에, 50 ㎕의 탈글리코실화된 IgG를 필터 상에 로딩하고, 450 ㎕ 150 mM 암모늄 아세테이트 pH 7.5를 첨가한 다음, 추가적인 원심분리를 12분 동안, 11,000 rpm, 4℃에서 수행하였다. 합해서 원심분리는 5회 반복하였으며, 매번 신선한 150 mM 암모늄 아세테이트 pH 7.5 완충용액을 총 부피 500 ㎕에 첨가하였다. 최종 원심분리 단계 이후에, 잔류하는 완충용액 교환된 탈글리코실화 IgG1, 대략 25 ㎕를 수득하였고, 질량 스펙트럼 분석을 위해서 준비된 에펜도르프 튜브로 옮겼다.

[0160] **실시예 8: 천연 질량 스펙트럼 분석**

[0161] 정제된 IgG 혼합물들 중에서 다른 IgG 종들을 확인하고, 어떠한 비율로 이러한 IgG 종들이 존재하는지 결정하기 위해서 질량 스펙트럼을 사용하였다. 요약하면, 150 mM 암모늄 아세테이트 pH 7.5 중의 1 μM 농도의 2-3 ㎕의 IgG들을, LCT 1 질량 스펙트로미터 (Waters Corp., Milford, MA, USA)에서의 분석용으로서, 고질량 검출에 최적 성능을 갖도록 조절된 (Tahallah et al., RCM 2001), 내부제조된 금-도금된 보로실리케이트 모세관들 (Sutter P-97 풀러 (puller) [Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA] 및 Edwards Scancoat 6 스퍼터-코터 (sputter-coater) [Edwards Laboratories, Milpitas, CA, USA]를 사용) 내로 로딩하였다. 모세관 전압 1300 V를 사용하였으며, 샘플링 콘 (sampling cone) 전압 200 V로 세팅하였다; 그러나, 이러한 세팅들은, 더 높은 해상도의 '신호-대-노이즈' 비율이 요구되는 경우에는 조절하였다. 충돌성 냉각 (collisional cooling)을 촉진하기 위해서 소스 백킹 압력 (source backing pressure)을 대략 7.5 mbar로 상승시켰다. 변성 조건 (denaturing conditions) 하에서 IgG1을 측정하기 위해서, 단백질들을 5% 포름산 중의 1 μM 농도에서 분무하였다.

[0162] **실시예 9: 데이터 처리 및 정량**

[0163] 얻어진 데이터의 처리는 MassLynx 4.1 소프트웨어 (Waters Corp., Milford, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. 최소 스무딩 (minimal smoothing)을 사용하였으며, 이후 스펙트럼을 중앙화하였다. 종들의 질량은 일련의 각

전하 상태를 사용하여 계산하였다. 각 전하 상태에 대응되는 강도들을 MassLynx에 의해서 할당하고 합하였다. 이러한 접근방법에 의해서 샘플 중의 모든 종들을 상대적으로 정량화하는 것이 가능하였다. 대안으로서, 공지된 곡선-하-면적 (area-under-the-curve, AUC) 방법을 사용하여 피크들의 정량화를 수행하였다. 모든 분석들은 3회 반복함으로써, IgG의 질량들 및 그들의 상대적 풍부함 양자 모두에 대한 표준편차들을 계산하였다.

[0164] **실시예 10: 단일 세포로부터의 2 또는 3 단일특이적 항체들의 혼합물**

[0165] 공지된 특이성 및 인간 IGKV1-39 경사슬과의 공지된 쌍 이룸 능력을 갖는 몇몇 항체 VH 영역들을 (도 3), 야생형 구조물 벡터 MV1057, 또는 표 1의 구조물 4 또는 구조물 5 내로 재클로닝하는데 사용하였으며, 결과물로서 벡터들 I-III (표 2)을 얻었다. 결과물 벡터들 I, II 및 III 각각은 각각 공통된 인간 경사슬, 및 다른 CH 영역 및 다른 VH 특이성을 갖는 Ig 중사슬을 암호화하는 핵산 서열들을 포함하고, 이후 세포들 내로 트랜스펙션되는 바, 이는 온전한 단일특이적 항체들만의 형성을 보여주기 위해서 단독으로 트랜스펙션되거나, 또는 2 또는 3 가지 단일특이적 항체들의 혼합물들을 얻기 위해서 하나 또는 두 가지의 다른 구조물 벡터들과 조합되어 트랜스펙션된다. 표 3은 트랜스펙션 일정 및 결과들을 열거하고 있다.

표 2

[0166] **다양한 구조물들 내에 삽입된 VH 특이성**

벡터	VH 유전자	항원 특이성	VH 질량 (Da)	메루스 표시	클로닝되는 구조물 #
I	IGHV 1.08	파상풍 (A)	13703	MF1337	wildtype
II	IGHV 3.23	틸로글로불린 (B)	12472	MF1025	4
III	IGHV 3.30	피브리노겐 (C)	12794	MF1122	5

표 3

[0167] **트랜스펙션 일정 및 결과들**

# 제조된 다양한 단일특이체	트랜스펙션된 벡터	트랜스펙션 코드 및 비율	예상종	계산된 질량-2LYS	실험적 질량	발견된 AA (%)	발견된 BB (%)	발견된 CC (%)	다른 분자들 (%)
1	벡터 I 단독	A	AA	146521	146503	100			
1	벡터 II 단독	G	BB	144032	144087		100		
1	벡터 III 단독	H	CC	144647	144656			100	
2	벡터 I 및 II	M (I:II=1:1)	AA BB	146521 144032	146518 144030	51	45		4
2	벡터 I 및 III	N (I:III=1:1)	AA CC	146521 144647	146509 144633	88		9	3
		U (I:III=1:5)	AA CC	146521 144647	146522 144643	47		48	5
2	벡터 II 및 III	nd	BB CC						
3	벡터 I, II 및 III	O (I:II:III=1:1:1)	AA BB CC	146521 144032 144647	146525 144032 144650	66	4	30	
		V (I:II:III=1:1:10)	AA BB CC	146521 144032 144647	146531 144043 144654	8	81	9	2

[0168] nd = 미수행실험 결과, 트랜스펙션 A, G 및 H는 호모다이머들만 생성되는 것으로 나타났으며, 이가 단일특이체 AA, BB 또는 CC 중 100%가 벡터 I, II 또는 III 중 어느 하나로 트랜스펙션된 세포들로부터 회수되었다 (도 4). 비록 이러한 사실은 트랜스펙션 A에 대해서는 이전에 이미 예상되고 보고된 바이지만, 구조물 4의 3중 아미노산 치환 (즉, K392D, D399K, K409D) 또는 구조물 5의 4중 아미노산 치환 (즉, E356K, E357K, K439D, K370D)을 포함하는 CH3-가공된 Ig 중사슬들의 호모다이머화에 대해서는 최초로 보고되는 것이다 (트랜스펙션 G 및 H).

[0169] 다음으로, 단일 세포 내에서 두 가지 벡터들의 공동 발현 실험들을 수행하였다. 흥미롭게도, 트랜스펙션 M 및 N은 야생형 및 CH3 가공된 Ig 중사슬들이 공통의 경사슬과 함께 단일 세포 내에서 공동 발현됨으로써, 원치 않는 이중특이적 항체들이 존재하지 않는 두 가지 종들의 단일특이적 항체들의 혼합물을 야기하며, 4-5% 정도로 낮은 오염성 '다른 분자들'이 혼합물 중에 존재한다는 것을 보여준다. '다른 분자들'이라 함은, 온전한 IgG의 질량을 갖지 않는 모든 분자들을 의미하며, 이는 단일 중사슬 및 경사슬 쌍으로 구성되는 절반 분자들도 포함한다. 중요하게는, '다른'이라는 의미는 이중특이적 산물을 포함하지 않는다. 트랜스펙션 M에서는, 동일한 비율들의 벡터 DNA를 트랜스펙션시켰을 때, AA:BB의 비율이 1:1에 근접하였다. 그러나, 트랜스펙션 N은 AA:CC가 거의 10:1 비율이었다. 그러므로, 이러한 트랜스펙션은 DNA의 비율을 조절하여 반복하였다 (트랜스펙션 U). 실제로, 1:5 비율의 벡터 DNA I:III은 혼합물 중에서 AA:CC 항체 산물의 비율을 거의 1:1 비율에 동일하게 하였다. 따라서, 트랜스펙션 M 및 U는, 원치 않는 부산물 없이 (즉, AC 또는 절반 분자들인 A 또는 C가 과다하게 존재하지 않고), 두 가지의 다른, 본질적으로 순수한, 단일특이적 항체들을 단일 세포 내에서 발현시킬 수 있다는 점을 보여준다 (도 5). 구조물 4 및 5의 신규한 CH3 변형들은 야생형 CH3와는 실질적으로 다르며, 따라서 야생형 및 4 또는 야생형 및 5 사이의 헤테로다이머화가 발생되지 않고, 이로 인해서 단일 세포들로부터 단일특이적 항체들의 혼합물을 대량 생산하는데 적용하기에 유리하다.

[0170] 이러한 결과들과 유사하게, 두 가지 다른 CH3 가공된 Ig 중사슬들 (구조물 4 및 5)의 트랜스펙션 또한, 원치 않는 종들이 존재하지 않으면서, 두 가지 다른 단일특이적 항체들만의 혼합물들을 야기할 것으로 기대된다. 구조물 4의 CH3 변형은 구조물 5의 CH3 변형과 실질적으로 다르며, 따라서 헤테로다이머화가 발생되지 않는다. 이 경우, 구조물 4 및 5의 CH3-가공된 중사슬들과 함께, 야생형 CH3 중사슬들을 단일 세포 내에서 공동-발현시키게 되면, 3가지 단일특이적 항체들만이 생성된다.

[0171] 실제로, 헤테로다이머에 비해서 호모다이머를 형성하도록 디자인된 3가지 다른 Ig 중사슬들을, 단일 세포 내에서 공통된 경사슬과 함께 발현시킴으로써, 혼합물 중에 오염원들이 존재함이 없이, 3가지 순수한 단일특이적 항체들의 혼합물이 얻어진다는 점을 관찰할 수 있었다 (트랜스펙션 O) (도 6). 표 3으로부터 명백한 바와 같이, 트랜스펙션 O 동안 벡터 DNA를 동일한 비율로 사용함으로써, 어떠한 1:1:1 비율의 AA:BB:CC 항체들도 얻어지지 않았다. 변형된 벡터 DNA 비율로 트랜스펙션시킴으로써 (1:1:10, 트랜스펙션 V), 혼합물 중의 AA:BB:CC의 비율이 원하는 비율로 조절될 수 있었다.

[0172] 종합하면, 상기 실험들은 원치 않는 부산물들 없이, 단일 세포 내에서 둘 또는 세 가지의 본질적으로 순수한 단일특이적 항체들이 발현될 수 있으며, 이는 치료적 단일특이적 항체들의 혼합물을 대규모로 생산할 수 있다는 장점을 제공한다.

[0173] **실시예 11: 단일 세포로부터 두 가지 이중특이적 항체들의 혼합물**

[0174] 단일 이중특이적 항체들의 제조를 위한 CH3-가공된 중사슬들의 사용이 다른 실시예에서 서술된 반면에, 본 실시예는 두 가지 다른 이중특이적 항체들의 혼합물들을 단일 세포로부터 제조하는 것이 가능한지 알아보기 위해서 디자인되었다.

[0175] 공지된 특이성들을 갖고, 인간 IGKV1-39 경사슬과 쌍을 이룰 수 있는 공지된 능력을 갖는 항체 VH 영역들 (도 3)을 표 1의 구조물 1-3 또는 6-7을 포함하는 벡터들 내로 재클로닝하는데 사용함으로써, 벡터 IV-X (표 4)를 제조하였다. 각각 공통된 인간 경사슬 및 다른 CH3 영역 및 다른 VH 특이성을 갖는 Ig 중사슬을 암호화하는 아미노산 서열들을 포함하는 벡터 IV-X을 세포들 내로 트랜스펙션시킴으로써, 단독으로는 온전한 단일특이적 항체들의 생성이 억제되는지 여부를 설명하고자 하였으며, 다른 구조물 벡터와 조합해서는 이중특이적 항체들 또는 두 가지 이중특이적 항체들의 혼합물을 얻고자 하였다. 표 5는 트랜스펙션 스케줄 및 결과들을 나타낸다.

표 4

[0176] **다른 구조물들에 삽입된 VH specificity**

벡터	VH 유전자	항원 특이성	VH 질량 (Da)	클론된 구조물 #
IV	IGHV 3.23	티로글로불린 (B)	12472	1
V	IGHV 3.30	피브리노겐 (C)	12794	2
VI	IGHV 1.08	파상풍 (A)	13703	2
VII	IGHV 3.30	피브리노겐 (C)	12794	3
VIII	IGHV 1.08	파상풍 (A)	13703	3
IX	IGHV 1.08	파상풍 (A)	13703	6

X	IGHV 3.23	티로글로불린 (B)	12472	7

표 5

[0177]

생산된 다른 이중특이체 #	트랜스펙션되는 벡터들	트랜스펙션 코드 및 비율	예상되는 종들	계산된 질량-2LYS	실험적 질량	측정되는 절반 분자들 (%)	측정되는 전장 IgG (%)	측정되는 이중특이체 (%)	다른 분자들 (%)
0	벡터 IV	B	Half B	144082	144066	40	60		
0	벡터 V	C	Half C	144651	144622	77	23		
0	벡터 VI	D	Half A	146469	146459	23	77		
0	벡터 VII	E	Half C	144625	144643	76	24		
0	벡터 VIII	F	Half A	146443	146468	64	36		
0	벡터 IX	P	Half A	146691	146677	82	18		
0	벡터 X	Q	Half B	143818	143844	58	42		
1	벡터 IV 및 V	I (1:1)	BC	144367	144352			96	4
1	벡터 IV 및 VII	J (1:1)	BC	144354	144382			96	4
2	벡터 IV, V 및 VI	K(1:1:1)	BC + AB	144367 + 145276	144351+ 145260			38 + 47	15 (A + C)
		S(2:1:1)	BC + AB	144367 + 145276	144371 + 145277			42 + 55	3 (BB)
2	벡터 IV, VII 및 VIII	L (1:1:1)	BC + AB	144354 + 145263	144346 + 145255			16 + 60	24 (A + C)
		T (2:1:1)	BC + AB	144354 + 145263	144385 + 145292			58 + 39	3 (BB)

[0178] 기존에, 구조물 1 및 2에 의해서 암호화되는 CH3-가공된 Ig 중사슬들이 단일 세포들 내에서 단독으로 발현되는 경우에 여전히 호모다이머들을 생성할 수 있는 것으로 보고된 바 있다 (WO2009/089004). 그러나, WO2009/089004는 또한, 구조물 3에 제시된 바와 같이 삼중 전하 쌍 돌연변이들을 포함하도록 가공된 CH3 도메인들은 단독으로 발현되는 경우 호모다이머들을 형성할 수 있는 능력을 갖지 않는 것으로 보고하고 있다.본 발명에서는, 이러한 사실들 중 일부만 확인하고 있다. 실제로, 트랜스펙션 B, C 및 D의 결과들은 전체 IgG들의 존재만 보여주고 있으며, 더 나아가 쌍을 이루지 않은 절반 분자들이 높은 비율로 존재하는 것을 보여주고, 이는 구조물 1 및 2에 의해서 암호화되는 일부 CH3 도메인들의 호모다이머화를 보여준다. 트랜스펙션 E 및 F 또한 쌍을 이루지 않은 절반 분자들에 대해서 전체 IgG들의 생산을 야기하였으며, 이는 구조물 3의 삼중 전하 돌연변이들이 호모다이머화를 완전히 저해하지 않는다는 것을 의미한다.

[0179] 또한, 구조물 6 및 7의 '노브' 및 '홀' CH3 변이체들도 호모다이머들을 형성하는 것으로 밝혀졌다 ('노브-노브' 호모다이머들에 대해서 18%, '홀-홀' 호모다이머들에 대해서 42%).

[0180] 단독으로 발현되었을 때 전적으로 호모다이머화를 방지하는 CH3 변이체들이 바람직한데, 이는 헤테로다이머화를 위한 제2 CH3 변이체와 함께 공동-발현시키는 경우 원치 않는 부산물들 (호모다이머들)을 방지하거나 최소화하기 위함이다.

[0181] 흥미롭게도, 본 실시예에서는 최초로 단일 세포들 내에서 혼합물 중에 거의 호모다이머들이 존재하지 않도록 이중특이적 항체들의 혼합물을 발현시킬 수 있다는 점을 밝혔다. 트랜스펙션 K 및 L은 예상된 이중특이적 종들인 BC + AB가 실제로 얻어진다는 점을 명확히 보여준다 (트랜스펙션 K에서는 38% + 47%, 또한 트랜스펙션 L에서는 16% + 60%). 두 가지 트랜스펙션들 모두에서, 상대적으로 높은 비율의 원치 않는 절반 분자들이 관찰되었다 (트랜스펙션 K에 있어서 15% 절반 분자 A + 절반 분자 C, 또한 트랜스펙션 L에 있어서 24% 절반 분자 A + 절반 분자 C). 상대적으로 높은 비율의 절반 분자들이 여전히 존재한다는 점은, 매칭된 쌍에 있어서 중사슬들이 불균형적으로 발현됨으로 인해서, 벡터 IV의 매칭된 중사슬들의 함량이 낮다는 사실에 기인한다. 따라서, 트랜스

펙션 S 및 T에 있어서는, 2:1:1의 조절된 벡터 DNA의 비율로 트랜스펙션들을 반복하였다. 이렇게 해서, 매칭된 쌍을 구성하는 IgG 중사슬들의 동일한 함량이 얻어졌으며, 또한 절반 IgG 분자들이 존재하지 않고 낮게는 3% 정도의 호모다이머 BB가 존재하는 이중특이적 IgG의 순수한 혼합물들이 얻어졌다. 이상적으로는, 이렇게 낮은 오염성 단일특이적 산물의 비율은 본질적으로 0으로 감소되어야 한다. 따라서, 최소한의 오염성 단일특이적 항체들이 존재하는 이중특이적 항체들의 혼합물을 생산해낼 수 있는 부가적인 CH3-돌연변이들을 찾아내는 것이 바람직하다.

[0182] 본 발명에서는 최초로, 혼합물 중에 단일특이적 항체들의 존재가 최소화되면서, 세 가지 다른 타겟 에피토프들을 인식하는 두 가지 이중특이적 항체들의 본질적으로 순수한 혼합물들이 제조될 수 있다는 점을 입증하였다.

[0183] **실시예 12: 혼합물들의 변이체들**

[0184] 단일 세포로부터 세 가지 에피토프들을 인식하는 두 가지 이중특이적 항체들의 혼합물들을 제조하거나, 또는 단일 세포로부터 두 가지 또는 세 가지 단일특이적 항체들의 혼합물을 제조하는 것이 기술적으로 가능하다는 사실이 밝혀진 바, 다음으로 본 발명에서는 다양한 다른 혼합물들을 조절적으로 제조할 수 있는 가능성을 연구하였다. 공지된 특이성을 갖고 인간 IGKV1-39 경사슬과 쌍을 이룰 수 있는 공지된 능력을 갖는 네 번째 항체 VH 영역을 사용하여, 표 1의 구조물 1-3 또는 7을 포함하는 벡터들 내로 재클로닝하였으며, 그 결과 벡터 I', II', III' 또는 X'을 제조하였다 ('은 대응되는 벡터 번호들에 비해서 다른 특이성을 갖는 것을 의미함). 결과물인 벡터들 I'-III', X' 및 IV-IX는 각각 공통된 인간 경사슬을 암호화하는 핵산 서열들 뿐만 아니라, 다른 CH3 영역 및 다른 VH 특이성을 갖는 Ig 중사슬을 암호화하는 핵산 서열들을 포함하고, 이어서 이들을 다른 구조물 벡터들과 함께 조합하여 세포들 내로 트랜스펙션시킴으로써 이중특이적 및/또는 단일특이적 항체들의 다양한 혼합물을 제조하였다. 제조되는 다양한 혼합물들은, 단일 세포로부터, 네 가지 에피토프들을 인식하는 두 가지 이중특이적 항체들, 두 가지 이중특이적 항체들 및 한 가지 단일특이적 항체, 또는 한 가지 이중특이적 항체 및 한 가지 단일특이적 항체의 혼합물들을 포함한다. 표 6은 트랜스펙션 스케줄 및 예상되는 결과들을 열거하고 있다.

표 6

[0185]

다양한 혼합물	트랜스펙션되는 벡터	트랜스펙션 코드 및 비율	예상되는 종들	예상되는 단일특이적 IgG의 %	예상되는 이중특이적 IgG의 %
2 BsAbs, 4 epitopes	IV+V+IX+X*	ZA (1:1:1:1)	BC + AD	0	50 + 50
2 BsAbs, 4 epitopes	IV+VII+IX+X*	ZB (1:1:1:1)	BC + AD	0	50 + 50
2 bsAbs + 1 mAb	IV+V+VI+wt*	ZC (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
2 bsAbs + 1 mAb	IV+V+VI+II*	ZD (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
2 bsAbs + 1 mAb	IV+V+VI+III*	ZE (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
1 bsAb + 1 mAb	IV+V+wt*	ZF (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+V+II*	ZG(1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+V+III*	ZH(1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+VII+wt*	ZI (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+VII+II*	ZJ (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+VII+III*	ZK (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IX+X+wt*	ZL (1:1:2)	AB + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IX+X+II*	ZM (1:1:2)	AB + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IX+X+III*	ZN (1:1:2)	AB + DD	50	50

[0186] 비록, 이론적으로는, 모든 혼합물들의 제조가 가능하여야 하지만, 기존의 다른 연구진들에 의한 연구들로부터, 전통적인 노브-인투-홀 변이체들을 대량으로 제조하는 것은 불안정성 문제들로 인해서 어려움을 겪게 된다는 사실이 알려져 있다. 따라서, ZA, ZB, ZL, ZM 및 ZN 트랜스펙션들로부터 야기되는 혼합물들은 더 큰 생산 규모로 옮겨지면 문제를 낳을 것으로 예상된다.

[0187] 따라서, 표 1에 제시된 구조물들의 세트로는 단일 세포들로부터 모든 이론적인 혼합물들을 더 큰 규모로 생산하는 것이 불가능한데, 이는 노브-인투-홀 변이체들이 불안정한 것으로 보고된 바 있고, '노브' 또는 '홀'을 포함

하는 CH3 도메인들이 전하 변이체들 또는 야생형 CH3 도메인들과 다이머화할 가능성을 배제할 수 없기 때문이다. 따라서, 호모다이머들 또는 헤테로다이머들만을 선호적으로 형성하되, 표 1의 구조물 1-5와 호모다이머화 또는 헤테로다이머화하여 단일 세포들 내에서 공동-발현되지 않도록 가공된 새로운 CH3-변이체들을 디자인하는 것이 바람직하다.

[0188] **실시예 13: 신규 전하 쌍 돌연변이들의 확인**

[0189] 본 발명의 목적은 단일 세포 내에서 다양한 IgG 중사슬들의 혼합 발현에 있어서, 오직 헤테로다이머들 또는 호모다이머들의 생산만을 야기하는 IgG CH3 영역을 가공하는 것이었으며, 이때 신규 가공된 CH3 도메인들은 공지된 가공 CH3 도메인들 또는 야생형 CH3 도메인들과 호모다이머화 또는 헤테로다이머화하지 않도록 하는 것이다. 따라서, 상기 기준을 만족하는 신규 가공된 CH3 도메인들을 확인하는 첫 번째 단계로서, IgG CH3 도메인 중의 많은 경계 접촉 잔기들을 하나씩 또는 그룹으로 스캐닝하여, 정전기적 상호작용을 통해서 동일한 중사슬들의 반발-즉, 감소된 호모다이머 형성-을 야기하는 치환들을 검색하였다. 이는, 대전된 잔기에 의해서 치환되는 경우에, 동일한 사슬들의 반발을 야기하는 잔기들의 리스트를 얻고자 함이며, 이러한 돌연변이들을 사용하여 다양한 IgG 중사슬들의 혼합 발현 시에 호모- 및/또는 헤테로다이머 형성을 유도하고, 이에 의해서 얻어진 전장 IgG들이 안정적이고 높은 비율로 생성되게 한다. 다음 단계로서, 확인된 치환들을 사용하여 하나 또는 그 이상의 IgG 중사슬들에서 CH3 돌연변이들의 매칭된 쌍들-CH3 영역들-을 가공함으로써 이중특이적 항체들 또는 이중특이적 또는 단일특이적 항체들의 혼합물들을 제조한다. 부가적으로, 새로이 확인된 전하 돌연변이 쌍들을 기존의 쌍들과 조합시킴으로써, 다양한 중사슬들로서, 모두 다르고, CH3 돌연변이들을 보충하는, 다양한 중사슬들을 암호화하는 복수의 핵산 분자들을 세포 내에서의 발현을 위해서 사용할 수 있으며, 이에 의해서 단일특이적 항체들만의 혼합물들, 또는 이중특이적 항체들만의 혼합물들, 또는 정해진 양의 단일특이적 및 이중특이적 항체들의 혼합물들을 선호적으로 제조할 수 있다. 본 발명에서 테스트될 잔기들은 기존에 알려진 바와 같이 접촉 잔기들이다 (Deisenhofer J., 1981; Miller S., 1990; Padlan, 1996, Gunasekaran, 2010). 이러한 방법을 사용하는 이유는, 반발 전하들이 접촉 잔기들 각각의 이용가능한 쌍 내로 가공되기 때문이다. 이어서, 샘플들을 비환원성 SDS-PAGE 상에서 분석하여 다이머 형성이 감소되는 쌍들을 확인하는 바, 이는 대략 72 kD의 밴드 존재를 시각화함으로써 확인한다. 모든 가능한 쌍들은 단일 돌연변이들로서 또는 단일의 다른 돌연변이와 조합하여 스크리닝하게 되는데, 이는 하나의 비-매칭 쌍 사이의 반발성 정전기적 상호작용이 이러한 방법으로 검출할 수 있는 반-분자들이 충분한 함량으로 존재하도록 하는데 충분하거나 또는 충분하지 않을 수 있기 때문이며, 돌연변이들 또한 조합된다.

[0190] 아미노산 돌연변이들은 Geneart에 의해서 표 7에 따라서 구조물 벡터 MV1057 내에 도입되었으며, 구조물들의 발현은 표준 과정에 따라서 HEK293T 세포들 내에서의 트랜스펙션에 의해서 수행되었다. IgG 발현 수준들은 Octet 내에서 측정되었다. 생산이 2회 실패할 경우, 돌연변이들이 발현에 해가 되는 것으로 판단하였으며, 더 이상 돌연변이를 수행하지 않았다.

표 7

[0191] 제조된 다양한 구조물들 내의 아미노산 치환 리스트 (EU 넘버링)

CH3 중 AA 치환	**구조물 #**	**호모다이머 생성에 대한 효과 (- = 효과 없음; +++ = 최대 저해; NT= 겔 상에서 테스트되지 않음)**
Q347K	8	-
Y349D	9	+-
Y349K	10	+-
T350K	11	-
T350K, S354K	12	+-
L351K, S354K	13	+-
L351K, T366K	14	++
L351K, P352K	15	+-
L351K, P353K	16	++
S354K, Y349K	17	++
D356K	18	-
E357K	19	-
S364K	20	++
T366K, L351K	21	++

T366K, Y407K	22	+++
L368K	23	NT
L368K, S364K	24	++
N390K, S400K	25	+-
T394K, V397K	26	+
T394K, F405K	27	+++
T394K, Y407K	28	+++
P395K, V397K	29	+-
S400K	30	-
F405K	31	+++
Y407K	32	++
Q347K, V397K, T394K	33	+
Y349D, P395K, V397K	34	+
T350K, T394K, V397K	35	NT
L351K, S354K, S400K	36	+
S354K, Y349K, Y407K	37	+-
T350K, N390K, S400K	38	+-
L368K, F405K	39	++
D356K, T366K, L351K	40	+++
Q347K, S364K	41	+++
L368D, Y407F	42	+
T366K	43	+
L351K, S354K, T366K	44	+
Y349D, Y407D	45	+
Y349D, S364K, Y407D	46	+
Y349D, S364K, S400K, T407D	47	+
D399K	48	+-
D399R	49	+-
D399H	50	+-
K392D	51	+-
K392E	52	+-
K409D	53	+

[0192] ≥ 5 μg/ml의 IgG를 함유하는 상등액들을 SDS-PAGE에서 분석하였으며, 단백질 A를 사용하여 IgG를 정제하였다. 콜로이달 블루를 사용하여 단백질들을 염색하였다. 호모다이머들은 대략 150 kD의 밴드로서 나타났다. 대략 75 kD의 더 작은 밴드들은 절반 분자들의 존재를 나타낸다 (음대조군 참조: K392D, K409D). 블랏들은 도 7에 도시하였다.SDS-PAGE 겔의 결과들을 분석하였으며, 표 7의 오른쪽 컬럼에 제시된 바와 같이 점수화하였다. 몇몇 잔기들이 조합하여 더욱 테스트될 필요성이 있는 것으로 판단되었는 바, 이는 잔기 Q347, S354, Y349, L351, K360, T366, T394, 및 V397을 포함한다. 호모다이머들의 형성을 억제하는데 높은 점수를 보이는 것들과, 다른 비-상보적 전하들과 같은 문제들 없이 변형될 수 있는 접촉 잔기들의 이용가능성을 조합하여 선택하였다. 예를 들어, 잔기 F405 및 Y407은 CH3-CH3 계면에서 여러 상호작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 이는 이미 대전된 잔기들과의 상호작용을 포함하고, 이러한 상호작용은 이러한 상호작용 잔기들 중에 복수의 전하 돌연변이들을 도입한 후 문제를 야기할 수도 있다 (표 A 참조). 새로운 구조물들은 벡터 MV1057 내에 제조되었으며 (표 8), 공지된 특이성 및 인간 IGKV1-39 경사슬과 공지된 쌍 이룸 능력을 갖는 항체 VH 영역들을 이러한 구조물들을 포함하는 벡터들 내에 재클로닝하는데 사용함으로써 (표 9 참조), 조합들을 더 테스트할 수 있었다. 표 10에는 트랜스펙션 스케줄 및 결과들을 나타내었다.

표 8

[0193]

CH3 중 AA 치환들	구조물 #
L351K	61
T394K	62
L351D	63
T366D	64
S354D, Y349D	65

V397D	66
K360D	67

표 9

[0194] 다양한 구조물들에 삽입된 VH 특이성

벡터	VH 유전자	항원 특이성	VH 질량 (Da)	클로닝된 구조물 #
XI	IGHV 1.08	파상풍 (A)	13703	8
XII	IGHV 1.08	파상풍 (A)	13703	17
XIII	IGHV 1.08	파상풍 (A)	13703	43
XIV	IGHV 1.08	파상풍 (A)	13703	61
XV	IGHV 1.08	파상풍 (A)	13703	62
XVI	IGHV 3.30	피브리노겐 (C)	12794	63
XVII	IGHV 3.30	피브리노겐 (C)	12794	64
XVIII	IGHV 3.30	피브리노겐 (C)	12794	65
XIX	IGHV 3.30	피브리노겐 (C)	12794	66
XX	IGHV 3.30	피브리노겐 (C)	12794	67

표 10

[0195]

트랜스펙션되는 벡터	트랜스펙션 코드 (비율)	예상되는 종들	측정된 AA (%)	측정된 AC (%)	측정된 CC (%)	측정된 절반 A (%)	측정된 절반 C (%)	기타 (%)
XIII + XVI	ZO (1:1)	AC	0	69	7	24	0	0
	ZT (3:1)	AC	10	45	16	27	0	0
	ZU (1:1)	AC	5	61	10	13	0	0
	ZV (1:3)	AC	3	61	23	13	0	0
	ZW (1:1)	AC	0	88.3	2.4	7	0	2.3
XIV + XVII	ZP	AC	30	52	13	0	0	5
XII + XVIII	ZQ	AC	4	51	33	2	1	8
XV + XIX	ZR	AC	20	42	11	0	1	26
XI + XX	ZS	AC	34	41	15	0	0	10

[0196] CH3 변이체들의 조합들을 발현시키고, SDS-PAGE (데이터 미도시)에서 분석하고, 천연 질량 스펙트로메트리 (MS)에서 분석하였다. 결과들은 표 10에 요약하였다. ZO 트랜스펙션이 혼합물들 중에서 가장 높은 비율의 헤테로다이머를 야기하였다 (69% AC). 흥미롭게도, ZO 트랜스펙션에서, AA 호모다이머는 존재하지 않는 반면에, CC 호모다이머는 작은 비율을 차지하였다 (7%). 질량 스펙트럼 분석을 통해서 혼합물 중의 나머지 단백질이 절반 A 분자들로 구성되며, 이는 아마도 A 및 C 중사슬들이 동일하지 않게 발현되기 때문일 것이다. 트랜스펙션 샘플 ZO로부터의 미가공 MS 데이터를 도 8에 도시하였다. 놀랍게도, 트랜스펙션 ZO는 상당량의 이중특이적 산물을 야기하였으나, 역전 전하 쌍인 트랜스펙션 ZP (ZO의 T366K/L351'D에 비해서 L351K/T366'D)는 유사한 결과를 야기하지 않았으며, 단지 52%의 이중특이적 산물만 관찰되었고, 상당량의 두 가지 호모다이머들이 존재하였다 (30% AA 및 13% CC). 이는, 음으로 대전된 D가 구조적으로 T와 매우 유사하고, 따라서 T366D가 자기 자신을 반발할 정도로 충분한 능력을 갖지 않으며, 결과적으로 T366D가 여전히 호모다이머들을 형성하기 때문일 것으로 설명된다.

[0197] 새로이 발견된 T366K/L351'D 쌍의 미세한 변이체들 (예를 들어, 새로운 구조물들인 T366R 및 L351E를 포함하는 모든 순열들을 테스트함으로써)도 유사한 백분율의 BsAbs를 생산할 것이라는 점을 예상할 수 있다.

[0198] **실시예 14: 효과적인 헤테로다이머화를 유도하기 위한 새로운 CH3 돌연변이의 디자인을 위한 HADDOCK.**

[0199] 실시예 13에서 서술된 바와 같이, 새로이 발견된 전하 쌍 T366K/L351'D는 혼합물 중에서 헤테로다이머들의 비율을 증가시켰으며 (69 %), 작은 비율의 원치 않는 CC 호모다이머들 (7%) (L351D/L351'D)과, 상당한 비율의 절반 A 분자들 (24%)이 혼합물을 '오염'시켰다. 본 실시예에서는, CH3 계면 상호작용들에 관여하는 아미노산 잔기들에 대해서 더욱 검토하고, 마주 보는 CH3 영역들에서 상보적인 치환들을 테스트하며, 효과적인 헤테로다이머화

를 더욱 증가시키면서도 두 가지 중사슬들의 호모다이머 형성을 효과적으로 방지하는 새로운 CH3 쌍들을 찾아내기 위해서 인 실리코 (in silico) 접근법을 사용하였다.

[0200] HADDOCK (High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing)은 생분자 복합체들의 모델링을 위한 정보-기반의 유연적인 도킹 접근법이다. HADDOCK은 초기 도킹 방법 (ab-initio docking methods)과는 구별되는데, 이는 전자의 경우 도킹 과정을 유도하기 위해서 불분명한 계면 제약들 (ambiguous interaction restraints, AIRs) 중의 확인 또는 예측된 단백질 계면들로부터 정보를 암호화하기 때문이다 (de Vries et al., 2010).

[0201] HADDOCK 웹 서버에 대한 입력 정보는 결정 구조일 수도 있는 단백질 구조 파일, NMR 구조 클러스터 또는 모델링된 구조로 구성된다. 도킹 또는 정제 (refinement) 이후에, HADDOCK은 소위 HADDOCK 점수를 산출해내는데, 이는 반데르발스 에너지, 정전기적 에너지, 매립된 표면 영역 및 탈용매화 에너지의 가중 평균값이다. HADDOCK 점수는, 비록 실험적 데이터로 직접 번역하는 것은 종종 달성하기 어려운 문제라 하더라도, 결합 에너지 또는 친화도의 지표로서 해석될 수 있다. 이에 더해서, HADDOCK은 도킹 런 (docking run)으로부터 야기된 '탑 포 (top four)' 구조들에 대한 구조 파일들을 제공한다. 이러한 구조 파일들은 다운로드 및 시각화될 수 있으며, 개별적인 잔기들의 상호작용을 상세하게 분석하는 것을 가능케 한다.

[0202] 본 실시예에서는, IgG1 중사슬들의 CH3-도메인들 사이의 상호작용들을 연구하였다. IgG의 Fc 부분의 고해상도 결정 구조를 (구조 1L6X) 출발 구조로 사용하였다 (http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1l6x; Idusogie, E.E. et al., J.I. 2000(164)4178-4184).

[0203] 실시예 13에서, 벡터 VIII 및 XVI를 공동 트랜스펙션시키게 되면 CC 호모다이머 오염물이 생성된다는 점이 밝혀진 바 있다 (표 10). HADDOCK을 사용하여 호모다이머화를 방지하는 T366K/L351'D 쌍에 대한 부가적인 돌연변이들을 검색하였다.

[0204] HADDOCK 출력값은 계산된 에너지들의 세트, HADDOCK 점수 (에너지들의 가중 평균값) 및 프로그램에 의해서 발견되는 네 가지 가장 낮은 에너지 구조들에 대응되는 네 가지 구조 파일들로 구성된다. HADDOCK-점수들은 다른 구조들을 비교하는데 사용된다; 다른 에너지들은 단순히 구조들 내에서 무엇이 일어나고 있는지에 대한 지시를 얻는데 사용된다 (예를 들어, 우수한 정전기적 상호작용들, 더 작은 매립 표면, 높은 반데르발스 에너지). HADDOCK 점수가 낮을수록, 더 양호하다. 각각의 돌연변이 쌍들에 대해서, AA, AB 및 BB 다이머들에 대한 점수들을 계산하였다.

[0205] 실시예 12로부터의 돌연변이 쌍 세트들을 HADDOCK에서 가동시켜서 계산된 에너지들이 실험 데이터들에 대응되는지 여부를 살펴보았다. 표 11은 모든 이론적인 에너지들을 나타내며, 이는 도 9에 시각화되어 있다.

표 11

[0206]

구조물 조합들	HADDOCK 점수	VdW 에너지	정전기적 에너지	탈용매화 에너지	매립 표면
야생형-야생형	-208.2	-62.8	-773	9.2	2505.8
1-2 (E356KD399 - K392DK409D)	-225.8	-56.4	-862	3	2458.3
2-2 (K392DK409D - K392DK409D)	-180.3	-67.9	-562.1	0.1	2312.5
1-1 (E356KD399K - E356KD399K)	-176.7	-75.5	-469.3	-7.3	2349.6
1-3 (E356KD399K - K392DK409DK439D)	-220.6	-67.9	-793.8	6.1	2499.8
3-3 (K392DK409DK439D - K392DK409DK439D)	-150.1	-76.6	-387.6	4.1	2261.2
6-7 (T366W - T366SL368AY407V)	-221.3	-65.8	-735.5	-8.3	2509.0
6-6 (T366W - T366W)	1916.9*	2072.3	-681.3	-19.2	2499.9
7-7 (T366SL368AY407V - T366SL368AY407V)	-191.9	-55.0	-683.2	-0.2	2427.2
43-63 (T366K - L351D)	-210.6	-64	-758.4	5.1	2456.5
43-43 (T366K - T366K)	-191.7	-71.2	-634.1	6.3	2533.5
63-63 (L351D - L351D)	-212.5	-60.4	-774	2.6	2445.6

[0207] *이러한 수치는 비정상적으로 높은데, 이는 높은 반데르발스 에너지 점수에 기인한 것이며, 아마도 T366W/T366'W의 입체적 충돌에 기인한 것으로 추측된다.2 가지 야생형 CH3 도메인들에서, HADDOCK 점수들은 AA, AB 및 BB에 대해서 동일한데, 이는 A 및 B CH3 영역들이 동일하기 때문이다. 다른 대부분의 경우들에서, AB 쌍

이 가장 낮은 점수를 갖는데, 이는 예상한 바이다. T366K/L351D 쌍의 경우, BB 점수는 AB 점수보다 약간 더 좋지만 (-210.6 대 -212.5), 이러한 차이는 계산 오차값 범위 내이다. HADDOCK을 사용하여, 이러한 쌍들의 헤테로다이머들의 구조들을 시각화하였다. 예를 들어, 구조물 조합 1-2, 1-1 및 2-2는 도 10에 도시되어 있다. 이러한 시각화를 통해서, 헤테로다이머 내에 염 다리들이 생성된다는 점이 명백한 반면에 (도 10A *왼편 패널*), 정전기적 반발은 동일한 사슬들의 잔기들 사이에서 발생한다 (도 10B 및 C, *중간 및 오른편 패널*). 따라서, 호모다이머들에 대한 더 높은 HADDOCK 점수들은 돌연변이된 계면 잔기들의 정전기적 반발에 의해서 설명될 수 있다. 이러한 잔기들은 서로로부터 멀리 굽어져야 하며, 다른 사슬 상의 잔기들과 상호작용을 하지 않고, 친화도 하락을 야기한다.

[0208] 표 11 및 도 9는 실시예 13에서 관찰된 바를 확인해준다. T366K/L351'D AC 헤테로다이머 및 L351D/L351'D CC 호모다이머는 유사한 에너지로 형성되는 바, 혼합물 중에 헤테로다이머 및 호모다이머 양자가 존재한다는 점을 설명해준다. 반면에, 비록 T366K 절반 A 분자들은 존재하지만, T366K/T366'K AA 호모다이머는 혼합물 중에서 거의 검출되지 않는다. 표 11 및 도 9는 실제로 T366K/T366'K AA 호모다이머에 대한 HADDOCK 점수가 AC 헤테로다이머에 대한 점수보다 높다는 사실을 보여주며; 따라서 이러한 호모다이머의 형성이 에너지면에서 덜 선호된다는 점을 보여준다.

[0209] **실시예 15: 366/351 변이체들**

[0210] 실시예 13에서, 혼합물 중에서 이중특이적 항체들의 백분율이라는 관점에서 유사한 결과들을 야기하도록 T366K/L351'D 돌연변이 전하 쌍에 대한 대안을 세울 수 있다는 점을 가정해볼 수 있다. 대안들은 치환 T366R, T366D, T366E, L351E, L351K 및 L351R을 포함할 수 있다. L351D/L351'D의 CC 호모다이머들의 비율은 366/351 쌍의 변이체들을 생성함으로써 감소될 수 있다. 모든 가능한 돌연변이 쌍들은 HADDOCK에서 가동하였으며, 결과 점수들을 표 12에 열거하고, 도 11에 시각화하였다.

표 12

[0211]

구조물 조합들	HADDOCK 점수	VdW 에너지	정전기적 에너지	탈용매화 에너지	매립 표면 영역
T366K - L351D	-210.6	-64	-758.4	5.1	2456.5
T366K - T366K	-191.7	-71.2	-634.1	6.3	2533.5
L351D - L351D	-212.5	-60.4	-774	2.6	2445.6
T366K - L351E	-216.9	-55.7	-854.7	9.8	2532.7
L351E - L351E	-217.9	-65.5	-802.2	8	2532
T366R - L351D	-210.5	-68.8	-760.8	10.4	2514.5
T366R - T366R	-201.8	-77.4	-626.4	0.9	2608
T366R - L351E	-225.8	-56.2	-874.8	5.4	2579.2
T366D - L351R	-211.2	-71.3	-723.6	4.8	2455.6
T366D - T366D	-198.1	-58.1	-713.4	2.1	2477
L351R - L351R	-220.7	-75.5	-806.5	16.1	2552.2
T366D - L351K	-223.9	-62.1	-810.1	0.3	2487.8
L351K - L351K	-224.4	-75.6	-812.1	13.6	204.5
T366E - L351R	-222.3	-69	-783	3.4	2557.2
T366E - T366E	-201.9	-57.6	-741	4	2487.5
T366E - L351K	-215.9	-58.4	-808.9	4.3	2486

[0212] HADDOCK 점수들을 살펴보면, 일부 돌연변이들은 T366K/L351'D와 비교하였을 때, 유사한 '패턴'을 갖는다. 대부분의 순열들에 대해서, AA 호모다이머가 AB 헤테로다이머에 비해서 더 높은 HADDOCK 점수를 갖는 것으로 나타났지만, BB 호모다이머는 AB 헤테로다이머만큼 선호적인 것으로 나타났다. 비록 351번 잔기는 다른 사슬 상의 자기 자신에 대해서 '인접 (neighbor)'하는 것으로 알려져 있지만, 즉 사슬 A의 351번 잔기가 CH3-CH3 계면에서 사슬 B의 351번 잔기와 쌍을 이루지만, BB 다이머가 형성되는 경우에는 동일한 전하들의 부정적인 영향이 거의 존재하지 않는다. L351D/L351'D 구조를 살펴보면, 이는 아스파르트산들이 서로에 대해서 멀리 굽어지는 점, 적어도 천연적으로 발생되는 355번 위치 아르기닌의 안정화 효과, 및 천연적으로 발생되는 354번 위치 세린에 의한 음전하의 일부 안정화에 의해서 설명된다 (도 12A). 이러한 잔기들 (S354A 및 R355D)의 돌연변이에 의해서는 거의 개선이 야기되지 않는다. 도 12B로부터, A354의 백본-수소가 호모다이머의 안정화를 야기한다는 점을 명백히 알 수 있다. 일련의 것들로부터, T366R/L351'E 쌍이 가장 선호되며, 이중특이적 분자에 대한 가장 낮은

HADDOCK 점수를 갖는다.**실시예 16: T366K/351'D 주변의 돌연변이들**

[0213] 본 실시예의 일련의 HADDOCK 분석들에서, T366K/L351'D 또는 T366K/L351'E 쌍을 출발 구조로 선택하였다. 이러한 A 및 B 사슬들의 이중특이체의 예상 비율을 더욱 높이는 부가적인 돌연변이들을 확인하기 위해서, B-사슬 상의 부가적인 돌연변이들을 사용하여 HADDOCK 점수들 및 에너지들을 계산하였다. 분자 수준에서 단백질 구조들의 시각화를 위한 뷰어를 사용하여 CH3 도메인의 구조를 연구하였을 때 (YASARA, www.yasara.org), 개별적인 잔기들 사이의 거리들을 계산할 수 있다. 이를 수행하는 도중, 두 개의 잔기들 Y349 및 L368이 인접하는 잔기들이며, 다이머 상호작용에 긍정적 또는 부정적으로 기여할 수 있고, 이들이 본 실시예에서-L351D 돌연변이에 더해서-돌연변이화됨으로써 호모- 및 헤테로다이머들의 다이머 형성에 대한 결과를 조사하였다 (도 13 참조). 두 개의 잔기들 모두가 헤테로다이머의 안정성에 기여하는 것으로 보이며 (더 낮은 HADDOCK 점수들), BB 다이머의 불안정화에 기여하는 것으로 보인다 (더 높은 HADDOCK 점수들). 349번 및 368번 위치의 글루탐산들 (E)은 아스파르트산 (D)보다 더 선호되는 것으로 보인다. 따라서, 이미 351번 위치에 아미노산 치환을 포함하고 있는 B-사슬 중에 제2 아미노산 치환을 도입하는 것은 더욱 헤테로다이머화를 촉진하는 것으로 판단된다.

[0214] 다음 세트의 HADDOCK 분석들에서는, T366K/L351'D 쌍을 다시 출발 구조로서 선택하였다. 헤테로다이머화를 더욱 증가시키는 B 사슬 중의 치환에 더해서 (즉, Y349D/E 및 L368E), 부가적인 돌연변이들을, 이미 T366K 치환을 포함하는 A-사슬에 더하였다. 도 14에 도시된 바와 같이, 이중특이적 헤테로다이머들의 형성을 촉진하는 것으로 보이는 몇몇 돌연변이 쌍들이 존재한다. T366K-L351K/L351'D-Y349'D 쌍에서, 네 가지 모든 돌연변이된 잔기들은 헤테로다이머 쌍 이룸에 관여하며, 이러한 사항은 T366K-L351K/L351'E-L368'E에는 해당사항이 없는데, 이 경우에는 K351이 결합에 직접적으로 관여하지 않는다. 그러나, 이러한 후자의 헤테로다이머에 대한 HADDOCK-점수는 -228.9이며; 이는 T366K/ L351'E-L368'E에 대한 -214.2보다 현저하게 낮은 것인데, 이는 351번 위치에서 K의 수소 결합 상호작용들에 의해서 설명될 수 있다 (도 15 참조). T366K-L351K/L351'D-Y349'D 쌍은 B-사슬 중의 R355'D 돌연변이에 의해서 더욱 개선될 수 있는 바, 더 높은 BB-HADDOCK 점수를 야기하고, 또한 AB HADDOCK 점수도 약간 더 높아진다. 전반적으로, 부가적인 L351K는 A 사슬 중의 T366K 돌연변이 단독과 비교하였을 때, 더 낮은 AB 점수들을 야기하고, 유사한 AA 및 BB 점수들을 야기한다. 이론적으로, 이러한 사항은 샘플들 중에서 더 높은 함량의 이중특이적 헤테로다이머들을 야기한다.

[0215] 도 11로부터 명백한 바와 같이, 366번 위치에 K 대신 R을 보유하는 것이 헤테로다이머화를 유도하는데 있어서 더욱 효과적일 수 있다. 따라서, 도 13에 도시된 HADDOCK 분석들 중 일부는 A-사슬 중에 T366K 대신에 T366R로 반복되었다. 사슬 A 중의 R366을 사슬 B 중의 이중 돌연변이들과 조합하는 것은 바람직하지 않은 것으로 나타났다 (도 16). 이는, 비록 구조 내에 R366과의 모든 기대되는 염-다리들이 존재함에도 불구하고, 이러한 잔기의 크기가 커서 다른 계면 상호작용들을 방해하기 때문일 수 있다. 또한, AA 호모다이머에 대한 HADDOCK 점수는 K366에 대한 것보다 R366에 대한 것이 더 낮고, 이 역시 헤테로다이머 형성에 우호적으로 기여하지 않는다. 따라서, 계면 중에서 R366을 사용한 HADDOCK 분석들은 더 이상 수행하지 않았다.

[0216] HADDOCK 예측에 따라서, 총 14 쌍의 최선 성능 쌍들이 선택되었다 (표 13 및 도 17 참조). 일부 쌍들에서는, R355D 치환을 포함시킴으로써, L351/L351'D 상호작용에 대한 천연 발생 R355의 안정화 효과를 제거하였다.

표 13

[0217]

구조물 조합들	HADDOCK 점수 AB	HADDOCK 점수 AA	HADDOCK 점수 BB
야생형-야생형	-208.2	-208.2	-208.2
T366K - L351D	-210.6	-191.7	-212.5
T366K - L351E	-216.9	-191.7	-217.9
T366R - L351E	-225.8	-201.8	-217.9
T366E - L351R	-222.3	-201.9	-220.3
T366K - L351DY349E	-215.9	-191.7	-190
T366K - L351DL368E	-223.3	-191.7	-198.9
T366K - L351EY349E	-214.5	-191.7	-187.5
T366KL351K - L351D	-233.2	-205	-212.5
T366K - L351DY349EL368E	-207.5	-191.7	-179.5
T366KL351K - L351DY349D	-255.2	-205	-204.3
T366KL351K - L351DY349E	-227.2	-205	-190
T366KL351K - L351DL368E	-243.9	-205	-198.9
T366KL351K - L351DR355D	-233.6	-205	-211.9

T366KL351K - L351DY349DR355D	-242.8	-205	-183.5
T366D - L351KY349K	-237.9	-198.1	-228.4

[0218] **실시예 17: HADDOCK 예측들에 기초한 CH3 돌연변이들을 사용한 이중특이체들의 인 비트로 발현**실시예 16의 분석은 T366K/L351'D 쌍 주변의 부가적인 돌연변이들을 갖는 일부 CH3 변이체들이 더 높은 비율의 이중특이체 성분 및 잠재적으로는 더 낮은 비율의 호모다이머 성분을 갖는 혼합물들을 야기할 것이라는 점을 암시한다. 이러한 최선 성능 쌍들을 제조용 및 추가 분석용으로 선택하였다. 더 나아가, 구조물 T366R 및 L351E도 제조하였다. 표 14는 제조된 구조물들로서, 공지된 특이성들 및 인간 IGKV1-39 경사슬과 쌍을 이룰 수 있는 공지된 능력을 갖는 항체 VH 영역들을 재클로닝하기 위해서 사용된 구조물들을 열거하고 있다. 개별적 구조물들을 포함하는 IgG들의 발현은 실시예 13에서 이미 보고된 바 있으며, 표 14에 열거된 구조물들에 대해서 반복되었다. 이는, 어떠한 구조물들이 부합되는 헤테로다이머화 파트너 없이도 호모다이머화할 수 있는지를 분석하기 위함이다. 이상적으로는, 높은 비율의 절반 분자들 및 낮은 비율의 호모다이머들이 형성될 것이다. 또한, 대조군으로서, 기존에 보고된 바 있는 전하 돌연변이들을 포함하는 구조물들 및 기존에 보고된 바 있는 노브-인-홀 돌연변이들을 포함하는 구조물들을 사용하여 재조합 세포들에 의해서 전체 IgG를 발현시켰다. 단백질 A 정제된 상등액을 SDS-PAGE 중에서 분석하고; 결과들을 분석한 다음, 표 14에 기재된 바와 같이 점수를 매겼다.

표 14

[0219]

CH3 중의 AA 치환	구조물 #	% IgG	% 절반 분자
E356K, D399K	1	64.2	35.8
K392D, K409D	2	30.9	69.1
K392D, K409D, K439D	3	24.5	75.5
T366W	6	27.6	72.4
T366S, L368A, Y407V	7	58.6	41.4
T366K	43	32.9	67.1
L351D	63	89.8	10.2
T366D	64	89.6	10.4
T366K, L351K	68	34.7	65.3
L351D, L368E	69	83.7	16.3
L351E, Y349E	70	67.8	32.2
L351D, Y349E	71	79.7	20.3
L351D, R355D	72	100	-
L351D, Y349E, L368E	73	79.3	20.7
L351D, Y349D	74	88.6	11.4
L351D, Y349D, R355D	75	89.9	10.1
L351K, L368K	76	56.6	43.4
L351R	77	100	-
T366E	78	44.4	55.6
T366R	79	29.6	70.4
L351E	80	100	-

[0220] 공통된 경사슬 및 표 14에 표시된 구조물들의 아미노산 치환들을 보유하거나 또는 기존 구조물들의 아미노산 치환들을 보유한 두 가지 다른 중사슬들의 공동-발현 결과들을 표 15에 제시하였다. 아미노산 치환 T366K 및 L351'D:L368'E을 각각 포함하는 두 가지 다른 중사슬들의 발현에 의해서는, 혼합물 중에서 대략 87%의 이중특이적 AB 헤테로다이머가 야기되었으며, AA 또는 BB 호모다이머들은 존재하지 않았다 (표 15의 조합 번호 3). T366K 치환을 포함하는 약 12%의 절반 분자들 (절반 A)이 관찰되었다. 더 나아가, 제1 중사슬 중에 부가적인 아미노산 치환 L351K가 도입되는 경우에는 이중특이적 AB 헤테로다이머의 비율이 증가하는 것으로 관찰되었다. 예를 들어, 각각 아미노산 치환들 T366K:L351K 및 L351'D:L368'를 포함하는 두 가지 다른 중사슬들의 공동-발현에 의해서는, 대략 92%의 이중특이적 AB 헤테로다이머가 생성됨에 반해서, 혼합물 중에 AA 및 BB 호모다이머들은 본질적으로 부존재하였다 (표 15의 조합 번호 12). 또한, 조합 10 및 11에 의해서도 높은 비율의 헤테로다이머들이 우호적으로 분포하면서 사실상 호모다이머들이 부존재하는 결과가 야기되었다. 호모다이머들이 부존재하는 점은 장점이 되는데, 이는 온전한 IgG 분자들을 포함하는 분획은 AB 헤테로다이머만으로 구성되기 때문이다. 정제 및 후속 치료적 응용을 위해서, 절반 분자들은 크기 배제 크로마토그래피와 같은 표준 접근법들에

의해서 제거될 수 있다. 따라서, 이중특이적 항체들을 제조하기 위한 생산 과정 중에 이러한 새로이 확인된 전하 돌연변이들을 적용함으로써, 공지된 전하 돌연변이들 및 노브-인투-홀 돌연변이들에 비해서 장점을 제공할 수 있는데, 이는 공지 돌연변이들의 경우 '오염성' 호모다이머 항체들의 존재가 배제되지 않기 때문이다. 부가하여, T366K/L351'D:L368'E 및 T366K:L351K/ L351'D:L368'E 대전 쌍들은 이전에 서술된 E356K:D399K/K392'D:K409'D 및 E356K:D399K/K392'D:K409'D:K439'D 전하 역전 쌍들에 비해서 부가적인 장점을 갖는데, 이는 이전에 서술된 전하 변이체들은 CH3-CH3 계면 내의 기존 전하들의 역전에 기초함에 반해서, 새로이 확인된 전하 변이체들은 CH3-CH3 계면에 부가적인 전하 쌍들 (전하-전하 상호작용)을 부가하고 있기 때문이다. CH3-CH3 계면 내에 부가적인 전하 쌍들을 도입하는 것은 계면의 안정성을 더욱 증가시킴으로써 온전한 항체의 안정성을 증가시킬 수 있다. 동일한 사항이 조합 번호 4, 5, 6, 9, 10, 및 11에 사용된 돌연변이들에 대해서도 적용되는데, 이들 역시 이중특이적 헤테로다이머의 비율이 선호되게 하고, 혼합물 중에 AA 및 BB 호모다이머들이 극히 낮은 비율로 존재하게 한다.

표 15

[0221]

2 가지 다른 중사슬들의 조합	사슬 A* / 돌연변이들 (구조물 #)	사슬 B**/ 돌연변이들 (구조물 #)	측정된 % AA	측정된 % AB	측정된 % BB	측정된 % 절반 A	측정된 % 절반 B
1	T366E (78)	L351R (77)	3	81	2	13	0
2	T366K (43)	L351D (63)	0	88	3	9	0
3	T366K (43)	L351D,L368E (69)	0	87	0	12	0
4	T366K (43)	L351E,Y349E (70)	2	85	0	11	0
5	T366K (43)	L351D,Y349E (71)	2	92	1	5	0
6	T366K (43)	L351D,Y349E,L368E (73)	0	96	1	4	0
7	T366K,L351K (68)	L351D (63)	0	77	12	10	1
8	T366K,L351K (68)	L351D,R355D (72)	0	79	8	10	1
9	T366K,L351K (68)	L351D,Y349D,R355D (75)	1	93	2	4	1
10	T366K,L351K (68)	L351D,Y349D (74)	1	95	1	3	0
11	T366K,L351K (68)	L351D,Y349E (71)	1	95	0	3	1
12	T366K,L351K (68)	L351D,L368E (69)	0	92	0	8	0
13	T366K (43)	L351E (80)	0	70	10	18	2
14	T366R (79)	L351E (80)	4	38	36	21	1
15	T366D (64)	L351K, L368K (76)	3	92	2,5	2,5	0
16	T366D (64)	L351R (77)	30	69	1	0	0

[0222] * 사슬 A는 MF1337 (=파상풍 톡소이드)의 특이성을 보유; ** 사슬 B는 MF1122 (=피브리노겐)의 특이성을 보유**천연 MS**

[0223] 모든 이중특이체 샘플들에 대해서 천연 MS를 수행하였다. 존재하는 종들의 상대적인 비율들을 결정하기 위해서 얻어진 그래프들을 두 가지 방향으로 분석하였다: 피크 높이 및 피크 면적. 피크 면적이 과학적으로 더욱 정확한 분석 방법이지만, 다른 연구들에 대한 모든 기존의 분석들이 피크 높이에 기초하여 수행되었기 때문에, 비교를 위해서 두 가지 방법들 모두를 분석에 포함시켰다. 방법들 사이의 차이는 측정 오차 범위 이내였으며, 따라서 이후 측정용으로는 피크 면적 수치들만을 사용하였다. 두 가지 전형적인 스펙트럼들이 도 18에 도시되어 있다. 결과들의 개요가 도 19에 그래프화되어 있으며, 수치 값들은 표 15에 열거되어 있다. 대략 샘플들 중 절반에서, 단일특이적 IgG의 총 오염은 5% 미만이었으며, 단지 3 가지 사례들에서만 > 10%이었고, 반면에 야생형 IgG에 대해서는 혼합물 중에 약 50%의 단일특이적 IgG가 측정되었다.

[0224] 두 가지 다른 중사슬들의 10개 조합들로 이루어진 패널을 표 15로부터 선택하여 더욱 분석하였다. 이러한 10개 조합들은 조합 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 및 12 (표 15)를 포함한다. 이러한 10개 조합들의 선택은 nMS에 의해서 측정된 혼합물 중에 존재하는 호모다이머들의 백분율이 낮은 것들을 선택하였지만, 또한 CH3 도메인 중

에 존재하는 돌연변이들의 개수 뿐만 아니라 생산 수율, SDS-PAGE를 포함하는, 그들의 전반적인 이화학적 특성들도 고려하였다.

[0225] **실시예 18: IgG 안정성 분석**

[0226] 본 실시예에서는, 온전한 IgG 분획 중에서 이중특이적 헤테로다이머들의 비율이 높고 부계 IgG들의 함량이 매우 낮은 (<5%) 일련의 CH3 돌연변이 쌍들에 대해서, IgG 분자의 Fc 부분의 안정성에 대해서 더욱 분석하였다. 중사슬들의 헤테로다이머화를 촉진하는데 사용된 돌연변이된 CH3 도메인들은 IgG의 Fc 영역에 대해서 예기치 못한 불안정화 효과를 가질 수도 있으며, 이는 인 비보 반감기의 감소, 효과기 기능의 감소 및/또는 면역원성의 증가와 같은 바람직하지 않은 특성들을 야기할 수도 있다. 새로이 확인된 전하 쌍들을 야생형 이중특이체들 및 기존에 확인된 전하 돌연변이들 (구조물 1을 포함하는 사슬 A 및 구조물 2를 포함하는 사슬 B)을 포함하는 이중특이체와 비교하였다. 본 실시예에서의 모든 이중특이체들은 동일한 중 및 경사슬 가변 영역들을 포함함으로써, 관찰된 효과들이 분자의 Fc-부분 중 돌연변이들에 의해서 야기되고, 가변 영역들에서의 변이에 의해서 야기되는 것은 아님을 보장하도록 하였다.

[0227] 이러한 이중특이체들에 대해서 일련의 안정성 연구들을 수행하였다. 이러한 연구들은 스펙트로스코피 (UV-Vis 흡광, 형광 및 광-산란) 및 마이크로스코피 (광 및 Nile Red 염색에 의한 형광 마이크로스코피) 분석들을 포함하며, 이는 CH3 변이체들의 응집 상태에 대한 정보를 제공한다.

[0228] UV-Vis 흡수 스펙트럼은 25℃에서, 더블 빔, 두 개의 단색광기 (monochromators) Cary 300 Bio 스펙트로포토미터를 사용하여 기록하였다. 스펙트럼은 경로 길이 1 cm를 사용하여 250 내지 400 nm 사이에서 모니터링하였다. 320 nm 및 그 이상의 파장에서 흡광도는 IgG의 응집 상태에 대한 정보를 제공한다.

[0229] 고유 형광 스펙트럼은 25℃에서 FluoroMax 스펙트로플루오리미터를 사용하여 모니터링하였다. 형광 방법은 최적화하였다. 형광 발광은 형태 및 응집 특성들에 대한 정보를 제공한다.

[0230] 90° 광-산란 스펙트럼은, 통합 시간 0.01s로, 400 nm 내지 750 nm에서 동기식 스캔 (synchronous scan) (λ_{em} = λ_{ex})을 구동함으로써 FluoroMax 스펙트로플루오리미터를 사용하여 25℃에서 모니터링하였다. 여기 및 발광 슬릿들은 최적화하였다. 예를 들어, 직각 광-산란은 다이머를 포함하지 않는 샘플과 5% 다이머를 포함하는 샘플을 구별할 수 있다.

[0231] Nile Red 염색을 사용한 형광 스펙트로스코피는, 측정 바로 직전에, 샘플에 에탄올 중의 Nile Red를 첨가해 주었다. 샘플들을 마이크로스코피 슬라이드에 채우고, 형광 마이크로스코피에 의해서 분석하였다. 입자들을 계수하였다. 형광 마이크로스코피에 의해서 관측할 수 있는 입자들의 크기 하한값은 대략 0.5 ㎛이다.

[0232] 온도, pH, 기계적 응력 또는 변성제 (denaturants)와 같은 스트레스들을 단백질에 가해주는 경우, 형태 변화 (예를 들어, 언폴딩) 및/또는 응집을 야기할 수도 있다. 기존 보고에 따르면, 전하-가공된 이중특이적 항체들은 변형된 CH3의 용융점을 감소시키는 바 (Gunasekaran 2010), 본 실시예에서는 본 발명의 신규한 전하 돌연변이들과 기존의 공지된 전하 돌연변이들을 구별하고자 한다.

[0233] 열적-안정성에 대한 실험은 Octet을 사용하여 수행하였는 바, Protein A 바이오센서 및 IgG에 결합하는 FcRn 양자 모두를 사용하였다. CH3-가공된 IgG들의 열적 안정성을 검사하기 위해서, 4, 50, 55, 60, 65, 70 및 75℃에서, 1 시간 동안, PCR 장치를 사용하여 (PBS 중) 100 ㎍/ml의 농도로 배양하였다. 이어서, 샘플들을 15 분 동안 25℃까지 서서히 냉각시켰으며, 이러한 온도에서 2 시간 동안 유지하고, 다음으로 4℃에서 밤새도록 저장하였다. 응집된 항체들을 원심분리에 의해서 제거하고, 이어서 가용성 항체들의 총 IgG 농도를, Octet에 의해서 Protein A 바이오센서 (PBS 중 1/10 희석)를 사용하여 측정하였다. Octet을 사용하여 CH3 가공된 IgG가 FcRn에 결합하는 것을 측정하는 분석을 수행하였다. 단백질 L 바이오센서를 사용하여 IgG의 경사슬을 센서에 결합시킨 다음 용액 중에서 FcRn과 함께 배양하거나, 또는 항-펜타-HIS 바이오센서를 사용하여 His-태그된 FcRn 단백질에 결합시킨 다음, 관심 대상이 되는 IgG와 함께 배양하였다. 이러한 방법들은 단백질 A 바이오센서를 사용하는 것보다 더욱 민감하며, 열적 안정성 실험을 위해서도 사용될 수 있다.

[0234] 또한, 모든 샘플들에 대해서는 혈청 안정성을 분석하였다. 요약하면, (가공된) IgG 샘플들을 37℃ 인간 혈청 중에서 배양하고, 대조군 샘플들을 4℃에서 보관하였다. 1, 2, 3 및 4 주 후에, 샘플들을 원심분리하여 침전된 IgG를 제거하였다. 이어서, 샘플을 항원-특이적 ELISA 중에서 적정하여 기능성 IgG의 상대적 함량을 측정하였다. 인간 혈청 중에서 신선하게 스파이킹된 (spiked) 정제된 대조군 항체를 참고 물질로서 사용하였다.

[0235] **실시예 19: 안정성 분석**

[0236] 이전 실시예들에서, CH3 돌연변이들을 포함하는 두 가지 다른 중사슬들, 및 공통된 경사슬을 공동-발현시킴으로써, 이중특이적 항체들이 높은 비율로 얻어졌다 (실시예 17).

[0237] 두 가지 다른 중사슬들의 8가지 조합들로 이루어진 패널을 표 15로부터 선택하여 더욱 분석하였다. 이러한 8가지 조합들은 조합 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 및 12를 포함한다 (표 15). 본 실시예에서는, 이러한 8가지 조합들을 분석하되, IgG의 Fc 부분의 안정성에 집중적으로 초점을 맞추어 분석하였다. 대조군으로서, 야생형 이중특이체들 (즉, CH3 돌연변이들이 없는 것들) 및/또는 기존에 보고된 CH3 전하 돌연변이들에 기초한 이중특이체들을 포함시켰다. 유의할 점은, 야생형 이중특이체들에 대해서는, 두 가지 중사슬들 및 공통된 경사슬이, 헤테로다이머를 선호하는 수단 없이, 공동-발현된다는 점이다. 이러한 '야생형 이중특이체들'은 따라서 AA, AB 및 BB의 혼합을 의미한다. 본 실시예 중의 모든 이중특이체들은 동일한 VH/VL-조합들을 보유하도록 디자인됨으로써, 관찰된 효과들이 분자의 Fc-부분 중 돌연변이들에 의해서 야기되고, Fab 부분들에서의 변이(들)에 의해서 야기되는 것은 아님을 보장하도록 하였다.

[0238] 두 가지 다른 중사슬들의 헤테로다이머 쌍 이룸을 촉진하는데 사용된 돌연변이 쌍들은, IgG의 Fc 영역에 대한 예기치 않은 구조적 또는 다른 탈안정화 효과들과 관련될 수 있을 것으로 추측된다. 이어서, 이는 추후 임상적 진전을 방해하는 원치 않는 문제들을 야기할 수 있는 바, 이러한 돌연변이들의 존재로 인해서, 인 비보 반감기의 감소, 감소된 효과기 기능 및/또는 증가된 면역원성이 야기될 수 있다.

[0239] **열적 안정성**

[0240] 온도의 증가 또는 감소와 같은 스트레스의 적용은 형태 변화 (예를 들어, 언폴딩) 및/또는 단백질의 응집을 야기할 수도 있다. CH3-가공된 IgG들의 열적 안정성을 검사하기 위해서, 조합 3-6 및 9-12 (표 15)로부터의 이중특이적 분자들, 또한 야생형 이중특이체들 및 구조물 1 및 2 (E356K:D399K/ K392D':K409D' 조합, '전하 역전 쌍'으로도 불리움)를 사용하여 얻어진 이중특이적 분자들을, 4, 60, 62.5, 65, 67.5, 70 및 72.5℃에서, 1 시간 동안, PCR 장치를 사용하여 (PBS 중) 100 ㎍/ml의 농도로 배양하였다. 이어서, 샘플들을 15 분 동안 서서히 25℃까지 냉각시키고, 이러한 온도를 2 시간 동안 유지한 다음, 4℃에서 밤새도록 보관하였다. 다음날, 침전된 항체들을 원심분리 (18,000 rpm; 4℃, 20 min)에 의해서 제거하고, 다음으로 가용성 항체들의 총 IgG 농도를, Octet에 의해서 Protein A 바이오센서 (PBS 중 1/10 희석)를 사용하여 측정하였다. 결과들은 도 20에 도시하였다. 대조군의 CH3 가공된 이중특이적 항체 (전하 역전 E356K:D399K/ K392D':K409D' 조합 (삼각형))는 야생형 이중특이체 (사각형)에 비해서 열적 안정성이 감소된 것으로 나타났다. 조합 3-6 및 9-12 (다이아몬드)로부터의 이중특이적 분자들 또한 야생형에 비해서 감소된 열적 안정성을 나타내었다. 그러나, 놀랍게도, 3 가지 조합들은 대조군 CH3 가공된 이중특이적 항체에 비해서 향상된 안정성을 나타내었다. 조합 9, 10 및 11의 이중특이체들은, 측정된 가장 높은 온도에서, 다른 CH3 가공된 이중특이체들 (전하 역전)에 비해서 현저하게 더욱 안정적이었으며, 야생형 이중특이체들만큼 안정적이었다.

[0241] **동결-해동 안정성**

[0242] 반복된 동결 및 해동에 있어서 CH3-가공된 IgG들의 안정성을 검사하기 위해서, 조합 3-6 및 9-12로부터의 이중특이적 분자들 (표 15)과, 야생형 이중특이체들, 그리고 구조물 1 및 2 (E356K:D399K/ K392D':K409D' 조합 (전하 역전 쌍))를 사용하여 얻어진 이중특이적 분자들을, 샘플들이 완전히 동결될 때까지 적어도 15 분 동안 -80℃에 보관함으로써, 10회의 후속 동결-해동 사이클들에 노출시켰다. 이후에, 샘플들을 실온에서 해동시켰다. 샘플들이 완전히 해동되었을 때, 동결-해동 사이클을 반복하였다. 10회의 동결-해동 사이클들 이후에, 침전된 항체들을 원심분리에 의해서 제거하고 (18,000 rpm; 4℃, 20 min), 이후 가용성 항체들의 총 IgG 농도를, Octet에 의해서 Protein A 바이오센서 (PBS 중 1/10 희석)를 사용하여 측정하였다. 동결-해동 안정성 테스트는 3회 반복하였다. 결과들을 도 21에 도시하였다. 대조군의 전하 역전 CH3 가공된 이중특이적 항체는 야생형 이중특이체에 비해서 약간 감소된 안정성을 갖는 것으로 나타났다. 이와는 대조적으로, 조합 3, 4 및 9로부터의 이중특이적 분자들은 야생형 이중특이체들에 비해서 약간 향상된 안정성을 갖는 것으로 관찰되었다. 전반적으로, 엄격한 조건의 동결-해동 사이클들은 CH3 가공된 변이체들에 대해서 주된 안정성 문제들을 야기하지는 않는 것으로 결론지을 수 있다.

[0243] **인 비트로 혈청 안정성**

[0244] 37℃에서 혈청 중에 보관된 CH3-가공된 IgG들의 안정성을 검사하기 위해서, 조합 3-6 및 9-12 (표 15)로부터의 이중특이적 분자들과, 야생형 이중특이체들 및 전하 역전 이중특이적 분자들을 37℃, 10% 인간 혈청 중에서 배

양하였다. 대조군 샘플들을 4℃, 인간 혈청 중에서 배양하였다. 1, 2 또는 5일 이후에, 침전된 항체들을 원심분리에 의해서 제거하였다. 그 이후, 샘플들을 피브리노겐-특이적 ELISA 중에서 적정함으로써, 기능성 IgG의 상대적 함량을 결정하였다. 인간 혈청 중에서 신선하게 스파이킹된 정제된 대조군 항체를 참고물질로서 사용하였다.

[0245] 피브리노겐 ELISA 데이터는 모든 샘플들이 37℃, 10% 인간 혈청 중에서 5일 동안 상당히 안정적이라는 점을 보여준다. 더 낮은 IgG 농도에서는, 조합 4 및 5로부터의 이중특이적 분자들이 약간 덜 안정적인 것으로 나타났는 바, 특히 T=1 및 T=2에서 그러하였지만, 실험 종료지점에서는 차이가 단지 미미하였다 (도 22 참조).

[0246] **실시예 20: 부가적인 안정성 테스트들**

[0247] 변이체 IgG들의 안정성을 분석하기 위해서, 부가적인 일련의 분석 방법들을 사용하였다. 조합 3-6 및 9-12 (표 15)로부터의 이중특이적 분자들과, 야생형 이중특이체들 (AA, AB, BB), 개별적인 부계 항체들 (AA 및 BB) 및 구조물 1 및 2 (E356K:D399K/ K392D':K409D' 조합 (전하 역전 쌍))를 사용하여 얻어진 이중특이적 분자들을, 이러한 안정성 분석들에서 샘플들로 사용하였다. 모든 IgG들은 0.2 mg/ml로 희석하였으며, 몇몇 스트레스 조건들 (50℃에서 2일, 40℃에서 2주, 5회 동결-해동)을 가하여, 다른 샘플들을 서로 구별할 수 있도록 하였다. 주목할 점은, 이러한 높은 스트레스 수준들로 인해서, 모든 이중특이체들에서 사용된 부계 항체들 중 하나 (BB 부계, 두 개의 1122 Fab들을 보유)가 불안정해지는 환경이 야기되었다는 점이다. 50℃에서 2일 후, 이러한 단백질의 응집을 UV 흡광도에 의해서 검출하였다. 이는, 이러한 스트레스 조건이 Fab 및 이중특이체 중의 CH3의 불안정성을 구별할 수 없을 수도 있다는 것을 의미하며, 50℃ 배양으로부터 얻어진 데이터는 주의 깊게 사용되어야 한다는 것을 의미한다.

[0248] 결과들은 표 16에 요약되어 있다. 사용된 분석방법들에는 하기 방법들이 포함된다:

[0249] - Nile Red (표 16의 'Nile Red 입자들')를 사용한 형광 마이크로스코피; Nile Red 염료의 첨가 이후 > 0.5 ㎛ 입자들의 함량을 관찰하기 위함.

[0250] - 350 nm에서의 UV 스펙트로메트리 ('UV 350 nm'); 파장 > 320 nm에서의 흡광도 변화는 단백질의 응집 상태에 대한 정보를 제공.

[0251] - 400 nm에서의 90° 광 산란 ('LS 400 nm'); 단백질 응집에 있어서의 변화, 예를 들어 IgG의 모노머들 및 다이머들 사이의 차이를 관찰하기 위한 민감한 기술.

[0252] - 고유 형광; 환경 변화에 따른 단백질 변화 (예를 들어, 언폴딩)에서 방향족 잔기들의 형광 파장 최대값 및 강도.

[0253] - 1,8-ANS 형광 스펙트로스코피; 1,8-ANS는 정전기적 상호작용을 통해서 이온 쌍을 형성함으로써 양이온기에 결합하며, 단백질 구조 및/또는 형태에 있어서의 변화가 검출될 수 있음.

[0254] **UV-VIS 스펙트로스코피**

[0255] UV-Vis 흡광도 스펙트럼은 25℃에서, Varian으로부터의 더블 빔, 두 개의 단색광기 Cary 300 Bio 스펙트로포토미터를 사용하여 다른 쿼츠 큐벳들 (예를 들어, 1.0 cm의 경로 길이를 갖는 흑색 저부피 Hellma 큐벳들 및 0.2 cm x 1.0 cm의 투명 Hellma 큐벳들) 중에서 측정하였다. 스펙트럼은 경로 길이 1.0 cm를 사용하여 220 내지 450 nm에서 모니터링하였다. 280 nm 주변의 흡광도는 단백질 농도에 대한 정보를 제공한다. 320 nm 내지 450 nm의 영역은 샘플들의 응집 상태에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0256] **90° 광-산란**

[0257] 90° 광-산란 스펙트럼 방법은 단백질 응집을 연구하기 위해서 개발된 것이며, Cappelle, 2005; Demeule, 2007a에 서술된 바와 같이 수행하였다. 90° 광-산란 스펙트럼은 통합 시간 0.01s로, 400 nm 내지 750 nm에서 동기식 스캔 ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$)을 구동함으로써 FluoroMax 스펙트로플루오리미터 (Spex, Instruments S.A., Inc. U.K.)를 사용하여 25℃에서 모니터링하였다. 최적 조건들을 발견하기 위해서 다른 슬릿 세팅들을 테스트하였다. 최적화 이후에, 동일한 슬릿 세팅들을 모든 측정들에 대해서 사용하였다.

[0258] **정상-상태 (steady-state) 형광 발광**

[0259] 트립토판, 타이로신 및 페닐알라닌 잔기들의 형광 발광은 이러한 형광원들의 국소적 환경에 대한 정보를 제공한다. 소수성 및/또는 경도에 있어서의 변화 또는 차이들이 측정된다. 통상적으로, 더욱 소수성이고 경성인 환

경은 형광 강도에 있어서의 증가 및 발광 최대값의 청색 편이를 야기한다. 고유 형광 스펙트로스코피는 단백질의 현재 상태에 대한 정보를 제공할 수 있고, 물리적 및 화학적 특성들의 변화를 모니터링할 수 있게 한다. 타이로신 및 트립토판의 형광에 대한 더 많은 정보는 Lakowicz [Lakowicz, 2006]의 문헌을 참고할 수 있다.

[0260] 형광 발광 및 여기 스펙트럼은 다른 쿼츠 큐벳들 중에서 25℃에서 기록하였다. 샘플들은 다른 파장들에서 여기되었다. 통합 시간 및 슬릿 세팅은 최적화하였다. 최적화 이후에, 동일한 통합 시간 및 슬릿 세팅을 모든 샘플들에 대해서 적용하였다.

[0261] **Nile Red 염색을 사용한 형광 마이크로스코피**

[0262] Nile Red 염색 방법은 단백질 응집체를 가시화하기 위해서 개발되었으며, Demeule et al., 2007b에 서술된 바와 같이 수행하였다.

[0263] 마이크로스코피 관찰은 Leica DM RXE 현미경 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)상에서 수행하였으며, 이에는 수은 램프가 구비되어 있다. 영상들은 Sony NEX-5 카메라 및 그 펌웨어로 획득하였다. 배율은 10x, 20x 및 40x로 하였다. 마이크로스코피 관찰을 위해서, 슬라이드와 커버 글라스 사이의 고정 거리가 0.1 mm인 슬라이드를 사용하였다. 4x4 격자들의 크기는 1 mm x 1 mm이었고, 이는 0.1 μl에 해당한다.

[0264] **1,8-ANS 형광 스펙트로스코피**

[0265] 1-아닐리노나프탈렌-8-술폰산 (1,8-ANS)은 비대전된 작은 소수성 형광 프로브로서 (Mw 299.34 Da), 막 표면 및 단백질들을 연구하는데 사용된다.

[0266] 1,8-ANS는 본질적으로 물에서 비형광성이며, 막 (양자 수율 ~0.25) 또는 단백질 (양자 수율 ~0.7)에 결합되는 때에만 구별가능할 정도로 형광성을 나타낸다. 1,8-ANS의 이러한 특성으로 인해서, 이는 단백질 폴딩, 형태 변화 및 프로브의 물에 대한 노출도를 변형시키는 다른 과정들에 대한 민감한 표지자가 된다. 1,8-ANS에 대한 참고문헌들은 인터넷 홈 페이지 Molecular Probes, www.probes.com에서 검색할 수 있다.

[0267] 1,8-ANS의 형광 발광 스펙트럼은 FluoroMax 스펙트로미터를 사용하여 기록하였다. IgG들 사이의 1,8-ANS 형광에 대한 직접적 비교는 수행하지 않았다. 각각의 IgG는 다른 개수의 1,8-ANS 결합 부위를 가질 수 있으며, 따라서 비교가능하지 않다. 이론적으로, 1,8-ANS의 형광이 낮을수록, 더 적은 수의 1,8-ANS 분자들이 항체에 결합한다. 스트레스로 인한 1,8-ANS 형광 강도 및 발광 파장의 변화를 평가하였다.

표 16

단백질 샘플	스트레스	Nile red 입자들	UV 350 nm	LS 400 nm (10^7 cps)	고유 형광		1,8-ANS 형광		
					fluo.int. (10^6cps)	λ Max. (nm)	1,8-ANS int. (10^6cps)	λ Max. (nm)	Shift (nm)
BB	2d4°C	0-10	0.001	0.7	4.2	335			
	2d50°C	0-10	0.013	0.8	4.2	335			
AA	2d4°C	10-20	0	1.2	5.7	338			
	2d50°C	10-20	0.002	1.0	5.5	338			
야생형 이중특이체 (AA AB BB)	2d4°C	30-50	0.003	0.9	5.1	336	7.1	507	
	2d50°C	>10000**	0.007	0.9	5.0	336	7.1	507	
	2w4°C		0	0.9	5.0	336			
	2w40°C	>2000**	0	0.8	5.0	336			
	T0		0.001	0.8	5.0	336			
	5FT	>2000**	0.009	1.2	4.8	336			
전하역전 이중특이체 (E356K,D399K/ K392D,K409D)	2d4°C	10-20	0.001	1.3	5.9	336	7.0	507	
	2d50°C	10-20	0.002	1.2	5.7	336	7.0	507	
	2w4°C	>2000**	0	1.1	5.5	336			
	2w40°C	>2000**	0.002	1.1	5.5	336			
	T0		0.001	1.3	5.7	336			
	5FT	30-50	0.007	1.8	5.5	336			
조합. # 3*	2d4°C	30-50	0	0.9	5.0	337			
	2d50°C	30-50	0.001	0.8	4.9	337			
조합. # 4	2d4°C	20-30	0	1.0	6.2	337	7.5	505	
	2d50°C	>3000**	0.001	1.0	6.2	337	7.5	505	
	2w4°C		0.001	1.0	6.3	337			
	2w40°C	>2000**	0.003	0.9	6.3	337			
	T0		0.002	1.1	6.3	337			
	5FT	>2000**	0.003	1.2	6.0	337			
조합. # 5	2d4°C	>2000**	0.001	1.1	4.9	337			
	2d50°C	>10000**	0.001	0.9	5.0	337			
조합. # 6	2d4°C	10-20	0	0.7	4.3	337			
	2d50°C	20-30	0.001	0.7	4.3	337			
조합. # 9	2d4°C	30-50	0	1.0	5.5	337	7.5	507	
	2d50°C	50-100	0	1.0	5.5	337	8.1	500	-7

[0268]

	2w4°C	>2000**	0	0.9	5.1	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.9	5.2	337			
	T0		0.002	0.8	5.1	337			
	5FT	>2000**	0.007	1.4	4.9	337			
조합. # 10	2d4°C	30-50	0.002	1.0	5.6	337	7.0	505	
	2d50°C	150-200	0.001	1.1	5.9	337	8.7	499	-6
	2w4°C	>2000**	0	0.9	5.2	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.9	5.4	337			
	T0		0.005	1.0	5.3	337			
	5FT	20-30	0.004	1.1	5.4	337			
조합. # 11	2d4°C	20-30	0	0.9	4.9	337			
	2d50°C	30-50	0.002	0.9	5.1	337			
	2w4°C	>2000**	0	0.8	5.0	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.8	5.1	337			
	T0		0.004	1.1	5.0	337			
	5FT	>2000**	0.002	1.2	5.0	337			
조합. # 12	2d4°C	10-20	0.001	0.8	3.8	337	6.2	511	
	2d50°C	10-20	0.002	0.7	3.8	337	6.5	508	-3
	2w4°C	>2000**	0.003	0.6	3.6	337			
	2w40°C	>2000**	0.001	0.5	3.5	337			
	T0		0.005	0.6	3.7	337			
	5FT		0.004	0.7	3.6	337			

[0269]

[0270] 0.2 mg/ml로 희석 후 다양한 IgG 샘플들에 대한 다른 강제 열화 (forced degradation) 결과들 요약. 칸들의 색상은 T=0와 스트레스 이후의 변화를 나타내며: 짙은 회색 = 큰 변화, 옅은 회색 = 작은 변화 및 무색 = 변화 없음 (=안정적).

[0271] * '조합 #'는 표 15에 열거된 돌연변이들의 조합을 의미하며; ** 형광 마이크로스코피에 의한 매우 작은 입자들, 이러한 입자들의 관련성은 알려진 바 없음; 2d4℃= 4℃에서 2일; 2d50℃= 50℃에서 2일; 2w4℃= 4℃에서 2주; 2w40℃= 40℃에서 2주; T0= 실험 개시; 5FT=5회 동결 해동 사이클.

[0272] 종합하면, 이러한 데이터들은 다양한 IgG 샘플들이 놀랍게 안정적이라는 점을 의미한다. 테스트된 샘플들 사이에서 측정가능한 차이점을 유발시키기 위해서는 가혹한 스트레스 조건들 (예를 들어, 50℃에서 2일)이 필요했다. 이러한 조건들 하에서, 조합 # 9 및 # 10 샘플들이 다른 샘플들에 비해서 더욱 응집되는 것으로 보인다.

[0273] 단백질들 사이에서 안정화면에서 가장 차별화되는 인자들은 동결-해동 사이클 및 증가된 온도였다. 50℃에서 배양이라는 매우 엄격한 스트레스 인자를 고려하면, T366K/L351E,Y349E (조합 #4) 및 T366K,L351K/L351D,Y349E (조합 #11) 변이체들이 패널 중에서 가장 안정적인 두 가지 단백질들이었으며, 이어서 T366K,L351K/L351D,Y349D (조합 #10) 및 T366K,L351K/L351D,L368E (조합 #12)가 가깝게 뒤를 이었다.

[0274] **실시예 21: 비율 실험들에 대한 천연 MS; 트랜스펙션 비율은 1:5 내지 5:1**

[0275] 왜곡된 트랜스펙션 혼합물들 중에서 CH3 돌연변이화된 IgG들의 행동 양상에 대한 더욱 심화된 정보를 얻기 위해서, 특히 T366K:L351K/L351D':L368E' 조합 (이하, KK/DE 또는 DEKK로 약칭)를 알아보기 위해서, 더욱 정교한 비율 실험을 수행하였다.

[0276] 공통된 경사슬 IGKV1-39와 쌍을 이룰 수 있는 공지된 능력을 갖는, 이전에 사용된 항체 VH 영역들을 구조물 1, 2, 68 및 69 내로 재클로닝하는데 사용함으로써, 표 17의 벡터 I-V를 제조하였다. 벡터 I-V는 각각 공통된 인간 경사슬과, 다른 CH3 영역 및 다른 항원 특이성을 갖는 Ig 중사슬을 암호화하는 핵산 서열들을 포함하며, 이들을 표 18에 열거된 바와 같이 다른 트랜스펙션 비율들로 세포들 내에 트랜스펙션시켰다. 결과들은 도 23에

도시하였다.

표 17

[0277]

벡터	VH 유전자	항원 특이성	VH 질량 (Da)	Merus 표시	클로닝된 구조물 #
I	IGHV 3.30	피브리노겐 (A)	12794	MF1122	69 (L351D, L368E)
II	IGHV 3.23	RSV (C)	13941	MF2729	69 (L351D, L368E)
III	IGHV 1.08	파상풍 (B)	13703	MF1337	68 (T366K, L351K)
IV	IGHV 3.30	피브리노겐 (A)	12794	MF1122	1 (E356K, D399K)
V	IGHV 1.08	파상풍 (B)	13703	MF1337	2 (K392D, K409D)

표 18

[0278]

트랜스젝션 번호	벡터	비율
1	I 및 III	5:1
2	I 및 III	3:1
3	I 및 III	1:1
4	I 및 III	1:3
5	I 및 III	1:5
6	II 및 III	5:1
7	II 및 III	3:1*
8	II 및 III	1:1
9	II 및 III	1:3
10	II 및 III	1:5
11	IV 및 V	5:1
12	IV 및 V	3:1
13	IV 및 V	1:1
14	IV 및 V	1:3
15	IV 및 V	1:5

[0279] * 기술적 오류로 인해서, 본 샘플은 측정되지 않았음.

[0280] 도 23A 및 B는, 돌연변이들의 DEKK 조합의 경우, 과량의 A 또는 C가 존재하는 경우에는 (A 또는 C는 'DE 쪽'에 존재하고, B는 'KK 쪽'에 존재함), AB 또는 BC가 생성되지만, 과량의 A 또는 C는 모든 경우에 있어서 호모다이머들 및 절반체들의 혼합물로 존재한다는 사실을 보여준다. 그러나, 과량의 B가 존재하는 경우에는 (B는 'KK 쪽'에 존재하고, A 또는 C는 'DE 쪽'에 존재함), 명백한 차이점이 존재한다. AB 또는 BC는 여전히 생성되지만, 과량의 B는 호모다이머로는 본질적으로 존재하지 않고, 단지 절반체들만 생성된다. 백분율은 재차 피크 높이에 의해서 측정되었다. 주의할 점은: 2% 이하의 범위에서 검출된 피크들은 적용된 nMS 기술이 정확히 측정할 수 있는 하한값 미만이라는 점이다. 따라서, <2%의 측정값들은 분석의 노이즈 수준으로 간주되는 바, 무시될 수 있다. 과량의 B가 높은 백분율의 절반체 B만을 야기하였다는 점은 놀라운 사실이다. 특히, A:B의 비율이 1:3 및 1:5에서, 호모다이머 BB의 부존재 하에서, 높은 백분율의 절반체 B가 관찰되었는 바 (도 23A 및 23B), KK 쪽의 CH3 돌연변이들은 호모다이머화를 선호하지 않는다는 점을 의미한다. 호모다이머가 존재하지 않는다는 사실은 결정적인 장점을 제공하는데, DEKK 조합의 'KK 쪽'이, 호모다이머로 존재하는 경우에는 알려진 부작용 효과들을 가질 수 있는 특이성을 도입하는데 선택될 수 있기 때문이다 (예를 들어, cMET 또는 CD3 항체들은 치료적 조성물들 중에서 이가 호모다이머들로서 존재하는 경우에는 바람직하지 않은 부작용 효과들을 갖는 것으로 알려져 있다).

[0281] 다른 비율의 DE:KK에 대해서 관찰된 결과들은 벡터 IV 및 V에서의 대조군 전하 역전 CH3 돌연변이들과 대조되는 것이다. 도 23C는 E356K:D399K/K392D':K409D'의 돌연변이 조합의 경우, 과량의 A가 존재하는 경우 (A는 'K392D:K409D 쪽'에 위치), 과량의 A는 모든 경우에 있어서 호모다이머들 및 절반체들의 혼합물로서 존재한다는 것을 보여주지만, 또한 과량의 B가 존재하는 경우에도 (B는 'E356K:D399K 쪽'에 위치), 과량의 B는 모든 경우에 있어서 호모다이머들 및 절반체들의 혼합물로서 존재한다는 것을 보여준다. 더 높은 비율인 1:3 및 1:5의 경우에도, 비록 호모다이머들은 존재하지만 어떠한 절반체 B도 관찰되지 않으며, 이는 E356K:D399K 쪽이 DEKK 조합의 KK-쪽 만큼 호모다이머화를 비선호하지 않는다는 사실을 의미한다.

[0282] 종합하면, 돌연변이의 DEKK 조합은 전하 역전 CH3 돌연변이들에 비해서 명백한 혜택을 제공하는 바, 이는 헤테로다이머의 사슬들 중 하나가 호모다이머들을 형성하지 않기 때문이다.

[0283] **실시예 22: DEKK 조합을 사용한 다양한 혼합물들**

[0284] 돌연변이들의 DEKK 조합이 높은 순도로 이중특이적 IgG ('AB')의 형성을 유도한다는 사실이 밝혀졌으므로, 다음 단계로는 하나의 세포로부터 'AB 및 AA' 또는 'AB 및 AC' 혼합물들과 같은 더욱 복잡한 항체 혼합물들을 조절적으로 제조할 수 있는 가능성을 조사하였다. 이전에 사용된 모델 Fab들을 'DE 구조물' 또는 'KK 구조물'DMF 포함하는 벡터들에 통합하였으며, 이러한 벡터들의 다양한 조합들을 공동-발현시킴으로써 혼합물들을 생성하고, 이를 통해서 기술의 유용성을 입증하였다. 모델 Fab들인 MF1337 (파상풍 톡소이드), MF1122 (피브리노겐) 및 MF1025 (티로글로불린)을, 전반적인 안정적 행동, 우수한 발현 수준 및 이러한 Fab들을 포함하는 IgG들 사이의 질량 차이에 기초하여 선택하였다 (표 19 참조).

표 19

[0285]

특이성	Fab 명칭	IgG 질량	Δ-질량 MF1122
파상풍 (A)	(MF)*1337	146747.03	+1842.05
피브리노겐 (B)	(MF)1122	144904.98	0
티로글로불린 (C)	(MF)1025	144259.87	-645.11

[0286] * MF=Merus Fab, MF1337 및 1337와 같은 표시들은 상호 호환 사용된다.

표 20

[0288] 트랜스펙션 스케줄:

Tr. #	중사슬 1	중사슬 2	중사슬 3	Tr. 비율	예상 종들 (%)	관찰된 종들 (%)
1	1337-KK	1122-DE	1025-DE	2:1:1	AB (50%) AC (50%)	AB (43%) AC (57%)
2	1337-DE	1122-KK	1025-KK	2:1:1	AB (50%) AC (50%)	AB (40%) AC (54%) AA (6%)
3	1337-KK	1122-DE	1025-KK	1:2:1	AB (50%) BC (50%)	AB (54%) BC (46%)
4	1337-KK	1122-KK	1025-DE	1:1:2	AC (50%) BC (50%)	AC (66%) BC (33%) CC (1%)
5	1337-KK	1337-DE	1122-DE	2:1:1	AA (50%) AB (50%)	AA (57%) AB (43%)
6	1337-KK	1122-KK	1122-DE	1:1:2	AB (50%) BB (50%)	AB (75%) BB (25%)
7	1337-KK	1337-DE	1025-DE	2:1:1	AA (50%) AC (50%)	AA (46%) AC (54%)
8	1337-KK	1025-KK	1025-DE	1:1:2	AC (50%) CC (50%)	AC (60%) CC (40%)
9	1337-KK	1122-DE		1:1	AB (100%)	AB (>98%)
10	1337-KK	1025-DE		1:1	AC (100%)	AC (>98%)
11	1122-KK	1025-DE		1:1	BC (100%)	AC (>98%)

[0289] SDS-PAGE 분석에 의해서, 대부분의 샘플들이 주로 전장 IgG들로 구성되며, 일부 경우들에서 절반체들이 낮은 백분율로 존재하는 것으로 나타났다. 더 나아가, 샘플들 중 많은 개수들이 비환원된 겔 상의 약 150 kDa에서 두 개의 밴드들을 나타내었으며, 이는 샘플들 중에 두 개의 구별되는 IgG 종들이 존재한다는 사실을 반영한다. 또한, 환원된 겔들 상에서, 일부 샘플들에서는 두 개의 중사슬 밴드들이 나타났다 (데이터 미도시).모든 샘플들에 대해서 천연 MS를 수행하였으며, 관찰된 종들의 백분율들을 피크 높이에 기초하여 계산하였다 (표 20 중 관찰된 종들의 %). 결과들은 도 24에 도시하였다. 3 가지 중사슬들이 공동-발현되는 모든 8 가지 샘플들에서, 두 개의 주된 피크들이 관찰되었으며, 이는 예상된 종들에 대응되는 것들이다. 이러한 샘플들 중 두 가지 (트랜스펙션 2 및 4), 그리고 트랜스펙션 11에서, 소량의 오염성 DE-DE 호모다이머가 관찰되었다. 대부분의 샘플들에서 절반체는 매우 소량으로 검출되었으며 (2% 미만), 이는 문제를 일으킬 소지가 없는 바, 이들은 전술한 바와 같이 전장 IgG 분획으로부터 용이하게 분리될 수 있기 때문이다. nMS 이후, 샘플 11 중의 IgG의 관측된 질량이 예상된 것과는 다른 종들에 해당하는 것으로 나타났으며, 이는 트랜스펙션 에러, 즉 샘플 11에서 1025-DE가 1122-KK 대신에 1337-KK와 함께 공동-트랜스펙션되었기 때문으로 결론지을 수 있었다.

[0290] 샌드위치 ELISA를 통해서 IgG 샘플들을 더욱 테스트함으로써, 원하는 특이성들의 기능적 존재를 확인하였다. ELISA 플레이트들의 코팅은 피브리노겐 또는 티로글로불린으로 수행하였으며, 검출은 플루오레세인-표지된 티로글로불린 또는 -파상풍 톡소이드로 수행하였다. 검출 항원은 제조사 사용지침에 따라서 플루오레세인 (Pierce NHS-fluorescin Antibody Labeling kit, cat. # 53029)으로 표지하였다. 이어서, 플루오레세인-표지된 항원들은 FITC-접합 항-플루오레세인 항체 (Roche diagnostics, cat. # 11426346910)에 의해서 검출할 수 있었다.

[0291] 이중특이적 ELISA의 결과들 (OD450 수치)을 표 21에 요약하였다. 회색 칸들은 각 트랜스펙션에 대해서 예상된 종들을 나타낸다. 일반적으로, 결과들은 이탤릭체 또는 굵은 글씨체로 표시된 몇몇 예외들을 제외하고는 예상된 결과와 부합하였다. 트랜스펙션 1-3에서는, 종 BC (tr. #1 및 2) 또는 AC (tr. #3)에 대한 '네거티브' 웰로 예상되는 것들이 현저한 배경 신호를 보였다. 기존 연구들로부터, 이중특이적 ELISA들은 높은 수준의 배경 문제를 보유할 수 있다고 보고된 바 있다. 이러한 배경 수준들 또한 샘플 중의 절반체들의 잠재적 존재에 의해서 야기될 수 있다. 주목할 점은, 이중특이적 ELISA의 결과들이, 실제로 트랜스펙션 #11에서 BC 대신에 종 AC (굵은 글씨체 수치)가 검출된 점으로부터, 에러가 발생되었다는 사실을 확인해 주었다는 점이다.

표 21

[0292]

	검출된 IgG 종들		
Tr. #	AB (Tet-Fib)	AC (Tet-Thyr)	BC (Fib-thyr)
1	0.989	1.792	*0.438*
2	1.085	1.852	*0.418*
3	1.419	*0.775*	1.547
4	0.205	1.795	1.22
5	1.367	0.047	0.057
6	1.359	0.043	0.06
7	0.054	1.779	0054
8	0.04	1.338	0.052
9	1.588	0.048	0.051
10	0.044	1.805	0.055
11	0.043	**1.821**	0.056

[0293] 이중특이적 ELISA로부터의 OD450 수치들

[0294] **실시예 23: 단일 세포로부터의 4 가지 다른 에피토프들 (AB 및 CD)을 인식하는 두 가지 이중특이적 항체들의 개선된 혼합물**

[0295] 실시예 12에서, 트랜스펙션 ZA 또는 ZB로부터 생성되는 혼합물들은 대규모 생산으로 전환되는 경우에는 문제를 야기할 것으로 가설을 세운 바 있는데, 이는 노브-인투-홀 변이체들은 불안정한 것으로 보고된 바 있고, '노브' 또는 '홀'을 포함하는 CH3 도메인들이 전하-가공된 CH3 도메인들과 다이머화할 가능성을 배제할 수 없기 때문이다. 상기 실시예들에서 서술된 바와 같이, 신규한 전하 쌍 돌연변이들은 호모다이머들을 거의 형성시키지 않으면서 헤테로다이머화를 선호적으로 유도하는 것으로 밝혀진 바 있으며, 이러한 신규 전하 쌍 돌연변이들을 포함하는 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들은 세포들 중에서 기존의 공지된 전하-가공된 CH3 도메인-포함 폴리펩타이드 사슬들 또는 잠재적으로는 SEED 체들과 함께 발현될 수 있고, 두 가지 이중특이적 분자들만의 선호적 형성을 야기할 수 있다.

[0296] 상기 실시예들로부터, 돌연변이들의 DEKK 조합은 하나의 이중특이체 (AB) 또는 두 가지의 이중특이체들 (AB 더하기 AC)을 클론 세포들에 의해서 생산하는데 탁월한 것이 분명하며, 이때 중사슬들의 다이머화는 CH3 도메인들에 의해서 유도된다. 그러나, 상보적 CH3 돌연변이들의 한 가지 벡터 세트만을 사용하는 것은 생산될 수 있는 혼합물-다양성의 가능성을 수적으로 제한하게 된다. 만약, 제2의 '무관한 (orthogonal)' 벡터 세트가 DEKK와 조합되어 사용될 수 있다면, 예를 들어 'AB 및 CD' 또는 'AB 및 CC' 혼합물들과 같은, IgG들 및/또는 이중특이

체들의 더욱 복잡한 혼합물들을 생산하는 것이 가능할 것이다. 두 가지 벡터 세트들을 조합하는 경우 중요한 요건은, CH3 가공된 벡터들의 두 가지 다른 세트들로부터 발현된 중사슬들은 '교차된 (crossed)' 다이머들을 형성할 수 없으며, 이는 하나의 벡터 세트에 의해서 생산된 중사슬들은 다른 벡터 세트에 의해서 발현된 중사슬들을 포함하는 전장 IgG 내로만 다이머화된다는 점이다.

[0297] 상기 '교차된' 다이머들의 잠재적인 형성을 테스트하기 위해서, HADDOCK를 사용하여 인 실리코 분석을 수행하였으며, 이를 통해서 야생형 CH3 도메인들과 DE- 또는 KK-돌연변이들을 포함하는 CH3 도메인들 사이의 가능한 쌍 이룸이 발생하는지 에 대한 더욱 많은 정보를 얻고자 하였다. 유사하게, 야생형 CH3 도메인들과 E356K,D399K 또는 K392D,K409D 돌연변이들을 포함하는 CH3 도메인들 사이의 잠재적인 쌍 이룸을 분석하였으며, 더 나아가 야생형 CH3 도메인들과 노브-인투-홀 돌연변이들을 포함하는 CH3 도메인들 사이의 잠재적인 쌍 이룸, 또한 상기 서술한 것들의 임의의 조합에 대해서도 분석하였다. HADDOCK에서 분석된 CH3-돌연변이들의 조합을 표 22에 열거하였으며, 결과물인 HADDOCK 점수들을 도 25에 요약하였다.

표 22

[0298] HADDOCK에서 분석된 CH3 변이체들로서, 중사슬을 보유하는 각각의 CH3-변이체에 대해서 1 문자 코드가 할당됨. *야생형 사슬들은 일관성을 위해서 'C' 및 'D'로 표시됨; **전하 역전 변이체들은 노브-인투-홀 변이체들과 조합되는 경우에는 'A 및 B'로, DE/KK 변이체들과 조합되는 경우에는 'C 및 D'로 표시됨.

CH3 조합	돌연변이들	HADDOCK에서의 1 문자 코드
DEKK	사슬 1: T366K,L351K	A
	사슬 2: L351D,L368E	B
야생형 (WT)	사슬 1: 없음	C*
	사슬 2: 없음	D*
전하 역전 (CR)	사슬 1: K392D,K409D	A/C**
	사슬 2: E356K,D399K	B/D**
노브-인투-홀 (KIH)	사슬 1: T366W	C
	사슬 2: T366S,L368A,Y407V	D

[0299] 도 25를 참조하면, 이러한 HADDOCK 예측에 기초할 때, DEKK의 CH3 조합들을 전하 역전 CH3 조합들과 조합하는 경우에, 단일 세포 중에서 공동-트랜스펙션되면, 오염성 부산물들의 존재 없이 (특히, AC, AD, BC, BD), 두 가지 이중특이체들의 원하는 조합 (AB 및 CD)을 형성하는데 가장 성공할 가능성이 있다는 점을 알 수 있다. 도 25로부터 알 수 있는 바와 같이, 이러한 원치 않는 이중특이체 종들 AC, AD, BC, 및 BD는 상대적으로 높은 HADDOCK 점수들을 갖는 반면에, 원하는 AB 및 CD 종들은 가장 낮은 HADDOCK 점수들을 갖는다. 물론, DEKK 또는 전하 역전의 CH3 조합들이 동일한 특이성 (예를 들어, DE-쪽의 'C', KK-쪽의 'C', E356K,D399K-쪽의 'A' 및 E356K,D399K-쪽의 'B', 또는 DE-쪽의 'A', KK-쪽의 'B', E356K,D399K-쪽의 'C' 및 E356K,D399K-쪽의 'C')을 보유한 구조물 내로 도입되는 경우, 이는 단일 세포 내에서 공동-발현시 주로 CC 및 AB의 생산을 야기한다.이와는 대조적으로, DEKK와 야생형의 공동-발현에 대한 예측을 살펴보면, AC 및 AD에 대한 HADDOCK 점수는 CD에 대한 HADDOCK 점수보다 낮다는 것을 알 수 있고, 이는 DEKK의 CH3 조합을 암호화하는 벡터들과 함께 야생형 CH3를 암호화하는 벡터들을 공동-발현시킴으로써 AB 및 CD의 혼합물을 제조하고자 하는 경우, AC 및 AD가 오염물질일 확률이 매우 높다는 것을 의미한다. 마지막으로, DEKK 또는 전하 역전 변이체들과 함께 노브-인투-홀 변이체들을 공동-발현시키는 경우에 대한 예측은 상대적으로 낮은 HADDOCK 점수들을 갖는 원치 않는 이중특이적 변이체들을 야기하였는 바, 즉 이러한 원치 않는 종들이 공동-발현시에 제조될 확률이 매우 높다는 것을 의미한다.

[0300] 따라서, DEKK의 CH3 조합들을 전하 역전 CH3 조합들 (E356K,D399K/K392'D,K409D')과 조합하는 것은, 본질적으로 순수한 'AB 및 CD' 및/또는 'AB 및 CC' 항체들의 혼합물을 얻는데 이상적으로 적합하다고 결론지을 수 있다.

[0301] 다음으로, 4 가지 표적들/에피토프들 (AB 및 CD)을 인식하는 2 가지 이중특이체들의 혼합들과, 3 가지 표적들/에피토프들 (AB 및 CC)을 인식하는 1 가지 이중특이체 및 1 가지 단일특이체 항체의 혼합물들을 상기와 같이 수행함으로써 제조하였다. 이러한 혼합물들은 모두 공통된 경사슬 IGVK1-39과 쌍을 이룰 수 있는 능력을 갖는 4 가지 다른 VH들로서, 개별적인 VH/VL 조합들은 모두 다른 특이성들을 갖는 것들을 사용하여 제조하였다. 천연 MS 분석을 가능케하기 위해서, (예상되는) 종들 사이의 질량 차이는 충분한 정도, 즉 > 190 Da이어야 한다. 4 가지 개별적인 VH들을 선택하였으며, 이들의 질량들은 공동-발현시에 예상되는 종들이 nMS에 의해서 동정 및 분

리될 수 있는 것이어야 한다. 더 나아가, 4 가지 선택된 VH들 사이의 질량 차이 또한 충분히 커서 혼합물 중의 가능한 대부분의 오염물질들뿐만 아니라 두 가지 원하는 종들을 확인할 수 있는 것이어야 한다. 선택된 VH들은 표 23에 열거되어 있다.

표 23

[0302]

VH (표적)	야생형 IgG로서의 질량
A (RTK1)	146736.78
B (파상풍 톡소이드)	146106.20
C (피브리노겐)	144904.98
D (RTK2)	145421.37

[0303] 4 가지 다른 VH들을 'DE' 또는 'KK' 구조물들 또는 전하 역전 구조물들을 포함하는 벡터들 내로 클로닝하였으며, 표 24에 기재된 바와 같이 몇몇 공동-발현들을 수행하였다. 마찬가지로, 모든 벡터들은 또한 공통된 경사슬 IGKV1-39를 암호화하는 핵산을 포함하였다. 전술한 바와 같이, 두 가지 벡터 세트들을 조합하는 경우, 중요한 요건은 CH3 가공된 벡터들의 두 가지 다른 세트들로부터 발현된 중사슬들은 '교차된' 다이머들을 형성할 수 없다는 점이며, 이는 하나의 벡터 세트들에 의해서 제조된 중사슬들은 다른 벡터 세트에 의해서 발현된 전장 IgG와 다이머화한다는 점이다. 이와 같이 전하 역전 돌연변이들을 포함하는 중사슬들과 DE 또는 KK 돌연변이들을 포함하는 중사슬들 사이의 '교차된' 다이머들의 잠재적인 생성을 테스트하기 위해서, 대조군 트랜스펙션을 수행하였다.

표 24

[0305]

Tr. #	제1 VH / 구조물 #	제2 VH / 구조물 #	예상되는 종들
1	D / 68	A / 68	'KK'와 'KK'의 오류 쌍 이룸; 대부분 절반체들이 예상됨
2	D / 68	A / 69	'KK'와 'DE'의 쌍 이룸; AD 산물이 예상됨
3	D / 68	A / 1	'KK'와 'E356K:D399K'의 예상되는 오류 쌍 이룸
4	D / 68	A / 2	'KK'와 'K392D:K409D'의 예상되는 오류 쌍 이룸
5	D / 69	A / 68	'DE'와 'KK'의 쌍 이룸: AD 산물이 예상됨
6	D / 69	A / 69	'DE'와 'DE'의 오류 쌍 이룸; 절반체들, AA, AD 및 DD의 혼합물이 예상됨
7	D / 69	A / 1	'DE'와 'E356K:D399K'의 예상되는 오류 쌍 이룸
8	D / 69	A / 2	'DE'와 'K392D:K409D'의 예상되는 오류 쌍 이룸

Tr. #	제1 VH / 구조물 #	제2 VH / 구조물 #	제3 VH / 구조물 #	제4 VH / 구조물 #	예상되는 종들
9	A / 68	B / 69	C / 1	D / 2	AB 및 CD
10	A / 68	A / 69	C / 1	D / 2	AA 및 CD
11	A / 68	B / 69	C / 1	C / 2	AB 및 CC

[0306] 표 25는 예상되는 종들의 질량들, 및 표 24의 트랜스펙션 # 9-11의 가능한 오염물질들에 대한 요약을 기재한 것이다.

표 25

[0308]

트랜스펙션# 9		
종들*	**질량**	**질량 차이**
C	72464,62	
D	72684,53	219,90
B	73070,99	386,47
A	73410,46	339,47
CC	144929,2	71518,78
CD	145149,2	219,90
DD	145369,1	219,90
BC	145535,6	*166,56*
BD	145755,5	219,90
AC	145875,1	*119,57*
AD	146095	219,90
BB	146142	*47,00*
AB	146481,5	339,47
AA	146820,9	339,47
트랜스펙션 # 10		
종들	**질량**	**질량 차이**
C	72464,62	
D	72684,53	219,90
A	73410,46	725,94
CC	144929,2	71518,78
CD	145149,2	219,90
DD	145369,1	219,90
AC	145875,1	506,03
AD	146095	219,90
AA	146820,9	725,94
트랜스펙션 # 11		
종들	**질량**	**질량 차이**
C	72464,62	
B	73070,99	606,37
A	73410,46	339,47
CC	144890,95	71480,49
BC	145535,61	644,66
AC	145875,08	339,47
BB	146141,98	266,90
AB	146481,45	339,47
AA	146820,92	339,47

[0309] # 9-11의 트랜스펙션 각각에 대해서, 종들을 질량에 의해서 분류하였으며, 전술한 질량과의 질량 차이들을 계산하였다. 회색 칸들: 예상되는 (그리고 원하는) 종들; 이탤릭체: 질량 차이가 nMS 분석에서 분리하기에는 너무 작음.

[0310] *종들: 단일 문자는 절반체들을 나타냄; 2 문자는 온전한 IgG를 나타냄.

[0311] 트랜스펙션 # 1-11로부터 얻어진 모든 정제된 단백질 샘플들은 SDS-PAGE 상에서 분석하였으며, 3 가지 대조군 샘플들을 포함시켰다 (도 26). 부가적으로, 트랜스펙션 # 9-11로부터의 단백질 샘플들에 대해서 nMS 분석을 수행함으로써, 샘플 중에서 모든 종들을 확인하였다. 도 26으로부터 알 수 있는 바와 같이, 트랜스펙션 # 3 및 # 4에 의해서 'KK' 구조물과 'E356K:D399K' 또는 'K392D:K409D' 사이에 예상되는 오류 쌍 이룸이 야기되었으며, 이러한 트랜스펙션들로부터의 단백질 샘플들 중 절반체들의 함량은 전장 IgG 분자들의 함량을 초과하였다. 트랜스펙션 # 7 및 # 8에 의해서는, 절반체들과 전장 IgG가 대략 동일한 함량으로 존재하는 단백질 샘플이 야기되었다. 그러나, SDS-PAGE로부터는, 전장 IgG가 DE/DE 다이머인지, DE/E356K:D399K 다이머인지, 또는 DE/K392D:K409D 다이머인지를 추론할 수 없었다. 놀랍게도, 트랜스펙션 # 9-11로부터의 샘플들에서는 절반체들이 거의 관찰되지 않았다.

[0312] 도 27에는, 트랜스펙션 # 9 및 # 11에 대한 nMS 분석이 도시되어 있다. 예상되는 종들과 오염성 종들의 백분율들은 피크 높이에 의해서 계산되었다. 트랜스펙션 # 9의 경우에는, 예상되는 종들인 'AB 및 CD'가 혼합물 중 97% 존재하였지만 (30% AB 및 67% CD), 오염성 BD는 약 3% 정도의 소량으로 존재하였다 (도 27A). 트랜스펙션

11의 경우에는, 예상되는 종들인 'AB 및 CC'는 혼합물 중에서 94%를 차지하였지만 (33% AB 및 61% CC), 오염성 BC (4.1%) 및 AC (1.8%)는 대략 6% 정도로 작게 존재하였다 (도 27B). 이러한 데이터는, 만약, 제2의 '무관한 (orthogonal)' 벡터 세트가 DEKK와 조합되어 사용된다면, 예를 들어 'AB 및 CD' 또는 'AB 및 CC' 혼합물들과 같은, IgG들 및/또는 이중특이체들의 더욱 복잡한 혼합물들을 제조하는 것이 실제로 가능하다는 것을 보여준다. 전하 역전 구조물들과 함께 DEKK 구조물들을 조합하게 되면 '교차된' 다이머들이 매우 제한적으로 형성된다. 트랜스펙션 비율을 조절함으로써, 이러한 오염성 부산물들의 낮은 비율들이 더욱 감소될 수도 있을 것으로 예상된다.

[0313] **실시예 24: 마우스에서 단일 투여량 약물동력학 연구**

[0314] 그 CH3 영역들 중에 돌연변이들의 DEKK 조합을 보유한 이중특이적 항체들의 약물동력학 (pharmacokinetic, pK) 특성을 알아보기 위해서, 본 실시예에서는 3 가지 다른 IgG 배치들 (batches)에 대한 pK 패러미터들을 측정하고 비교하였다.

[0315] 3 가지 IgG 배치들은 1) 야생형 항-파상풍 톡소이드 부계 항체 1337:1337 (야생형 Fc 백본 상의 두 개의 MF1337 Fab들); 2) 야생형 항-파상풍 톡소이드 부계 항체 1516:1516 (야생형 Fc 백본 상의 두 개의 MF1516 Fab들); 3) 그 Fc 영역 중에 돌연변이들의 DEKK 조합을 보유하는, CH3 가공된 이중특이적 항-파상풍 톡소이드 항체 1516:1337 (DE-쪽에 MF1516 Fab, KK-쪽에 MF1337 Fab)였다.

[0316] 부계 항체들 1337:1337 및 1516:1516이 DEKK-이중특이체 산물들 중에 특이성을 포함시키기 위해서 선택되었는바, 기존 연구들로부터, 몇몇 마우스주들에서 이러한 항체들에 대한 어떠한 투여 전 혈청 반응 (pre-dose serum response)도 존재하지 않는 것으로 알려진 바 있기 때문이다. 유의사항: 투여 전 혈청 반응의 존재는 물론 실험 자체를 무효화시킬 수 있다. 이에 더해서, 부계 항체들 사이에 충분한 질량 차이가 존재하기 때문에, 1337:1337 (wt Fc), 1516:1337 (DEKK Fc) 및 1516:1516 (wt Fc) 종들을 nMS에 의해서 확인할 수 있다. 전술한 바와 같이 3 가지 IgG 배치들을 준비하였지만, 트랜스펙션에 사용된 DNA는 엔도-프리 맥시프렙 키트 (endo-free maxiprep kit)를 사용하여 제조함으로써 엔도톡신의 함량이 가능한 한 적게 하였다. 이어서, 배치들에 대해서 단백질 농도, 응집체 수준, 엔도톡신 수준 및 이중특이적 산물의 백분율을 테스트하였다. 그 결과, pK 연구에서 IgG 배치의 사용에 대해서 요구되는 허용 기준을 충족한 것으로 나타난 바, 겔 여과 이후의 IgG 농도는 >0.3 mg/ml, 응집체 수준은 <5%, 엔도톡신 수준은 <3 EU/mg 단백질이었고, DEKK 배치는 > 90% 이중특이적 IgG를 포함하였다.

[0317] 겔 여과된 샘플들의 천연 질량 스펙트로메트리 결과, 예상되는 종들이 높은 백분율로 존재하는 것으로 확인되었다. 샘플 1516:1337에서는 소량의 DE:DE 호모다이머가 검출된 바, 대략 2%로 측정되었다 (도 28). 결론적으로, 3 가지 IgG 배치들은 pK 연구에 사용되기에 적합하였다.

[0318] 3 가지 배치들 사이의 pK 패러미터들을 비교하기 위해서, 3 그룹의 암컷 C57BL/6J 마우스 (Harlan, The Netherlands)에 1 mg/kg 인간 IgG (5 ml/kg 면역글로불린 용액/kg 체중)를 투여하였다. 투여시에, 동물들은 7-8 주령이었으며, 대략 18-20 그램의 체중이었다. 혈액 샘플들을 투여 전 및 투여 후 15분, 60분, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간, 96시간, 168시간, 268시간 및 368시간 경과 시점에서 수집하였다. 혈청 샘플들을 준비하여 분석 전까지 < -20 ℃에서 보관하였다. 각각의 그룹은 4 마리로 된 3 개의 서브그룹들, 즉 그룹 당 12 마리 마우스로 구성되었다. 각각의 마우스로부터, 6개의 시간 지점들을 샘플링하였다. 마우스들의 사육 환경은 유럽 연합의 실험 중 동물 사용을 감독하는 일반적 지침들 (Directive 86/609/EEC) 및 네덜란드 법률 (The Experiments on Animals Act, 1997)에 부합되게 유지하였다. 본 실험은 또한 미국 국립보건원 (U.S. National Institutes of Health)의 실험실 동물 복지청 (Office of Laboratory Animal Welfare)에 의해서 발행번호 45859-01 (만료일자: 2015년 4월 30일)로 발행된 인간 보호 및 실험실 동물들의 사용에 대한 기준 (Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals)에 부합되게 수행되었다.

[0319] 그룹 1의 마우스들에는 전장 단일특이적 IgG 1516:1516 항체를 투여하였고 (삼각형); 그룹 2의 마우스들에는 전장 단일특이적 IgG 1337:1337 항체를 투여하였으며 (사각형); 그룹 3의 마우스들에는, DEKK 가공된 CH3 영역들을 포함하는 (DE-쪽에 1516 및 KK-쪽에 1337) 전장 이중특이적 IgG 1516:1337 항체를 투여하였다 (다이아몬드).

[0320] 마우스 혈청 중 단클론 인간 항체들의 정량적 분석을 위해서, 정량적 인간 IgG ELISA (ZeptoMetrix, NY USA; ELISA kit nr. 0801182)를 사용하여 ELISA 분석을 수행하였다. 요약하면, 상기 ELISA 분석은 인간 단클론 항체가 96-웰 ELISA 플레이트 내에 코팅된 항-인간 IgG에 결합한다는 원리에 기반한 것이다. 이어서, 결합된 항체는 고추냉이 과산화효소 (horseradish peroxidase, HRP)에 접합된 다클론 항인간 IgG 항체를 사용하여 시각화

하였다. 각 웰의 광학 밀도 (OD)는 혈청 샘플 중의 항체의 함량에 직접적으로 비례한다. 결과들을 도 29에 도시하였으며, 돌연변이들의 DEKK 조합을 보유하는 이중특이적 전장 IgG 항체 및 그 부계 단일특이적 항체들의 혈청 수준들은 놀랍게도 유사한 것으로 관찰되었다. 결론적으로, DEKK-이중특이적 항체 중에 존재하는 CH3 돌연변이들은 안정성 뿐만 아니라 반감기도 변화시키지 않으며, 상기 DEKK 변이체는 야생형 IgG와 같이 행동한다.

[0321] 참고문헌

[0322] Deisenhofer J., Biochemistry 1981(20)2361-2370;

[0323] Miller S., J. Mol. Biol. 1990(216)965-973;

[0324] Padlan, Advances in Protein Chemistry 1996 (49) 57-133

[0325] Ellerson JR., et al., J. Immunol 1976 (116) 510-517;

[0326] Lee and Richards J. Mol. Biol. 1971(55)379.

[0327] Gunasekaran et al J.Biol.Chem. 2010(285)19637-19646

[0328] De Vries Nature Protocols 2010(5)883

[0329] Kabat et al, (1991)

[0330] Mammalian Cell Biotechnology : a Practical Approach (M. Butler, ed., IRL Press, 1991

[0331] Merchant Nature biotechnology 1998(16)677

[0332] Ridgeway Protein Engineering 1996(9)617-621.

[0333] Davis JH. Et al., Protein Engineering, Design & Selection 2010(23)195-202

[0334] Papadea and Check. Crit Rev Clin Lab Sci. 1989;27(1):27-58.

[0335] Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973)

[0336] Ionescu et al., J. Pharm. Sci. 2008 (97)1414

[0337] Current protocols in Protein Science 1995, coligan JE et al., Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8, Bendig 1988.

[0338] Capelle, M.A.H., Brugger, P., Arvinte, T.*Vaccine* 23 (2005), 1686-1694.

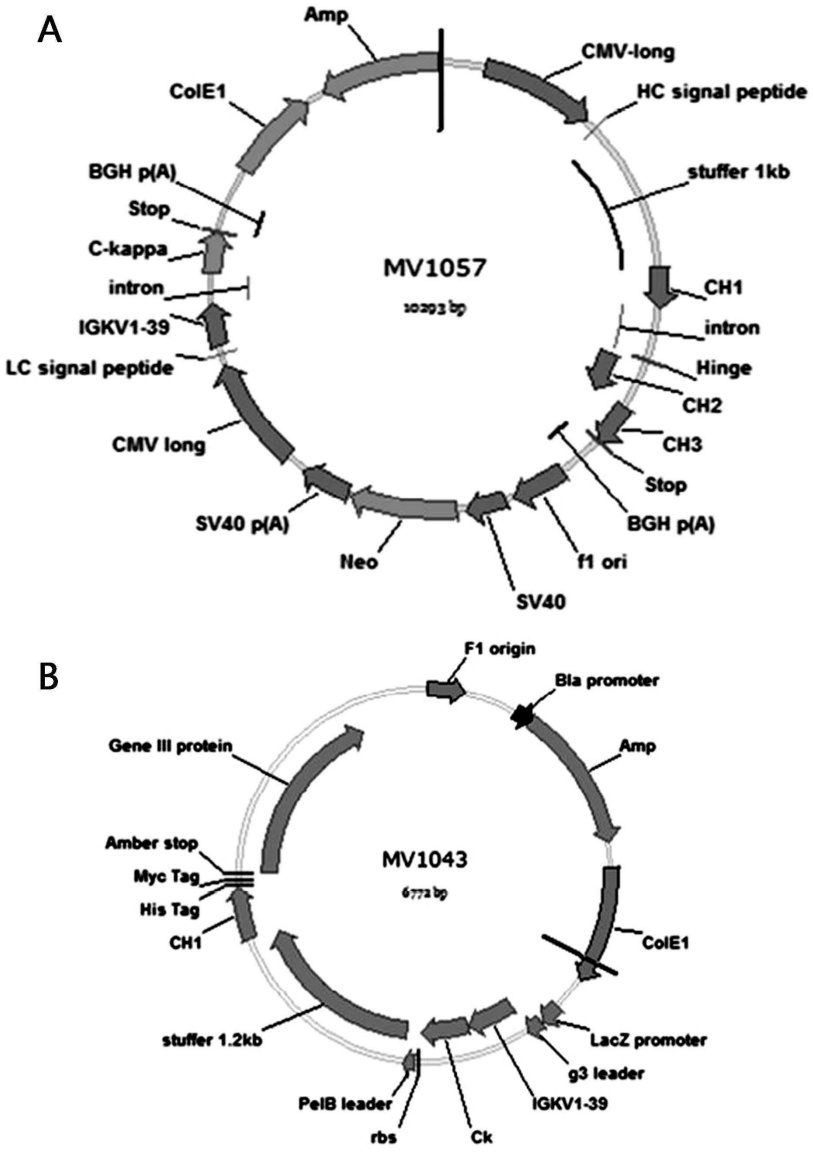
[0339] Demeule, B., Lawrence, M.J., Drake, A.F., Gurny, R., Arvinte, T. Biochim. Biophys. Acta 1774 (2007a), 146-153.

[0340] Demeule, B., Gurny, R., Arvinte, T., Int. J. Pharm 329 (2007b), 37-45.

[0341] Lakowicz, J.R., Principles of fluorescence spectroscopy; Second Edition Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, (2006) ISBN 0-306-46093-9.

도면

도면1


A
Amp
CMV-long
HC signal peptide
stuffer 1kb
CH1
intron
Hinge
CH2
CH3
Stop
BGH p(A)
f1 ori
SV40
Neo
SV40 p(A)
CMV long
LC signal peptide
IGKV1-39
intron
C-kappa
Stop
BGH p(A)
ColE1
MV1057
10293 bp
B
F1 origin
Bla promoter
Amp
ColE1
LacZ promoter
g3 leader
IGKV1-39
Ck
rbs
PelB leader
stuffer 1.2kb
CH1
His Tag
Myc Tag
Amber stop
Gene III protein
MV1043
6772 bp

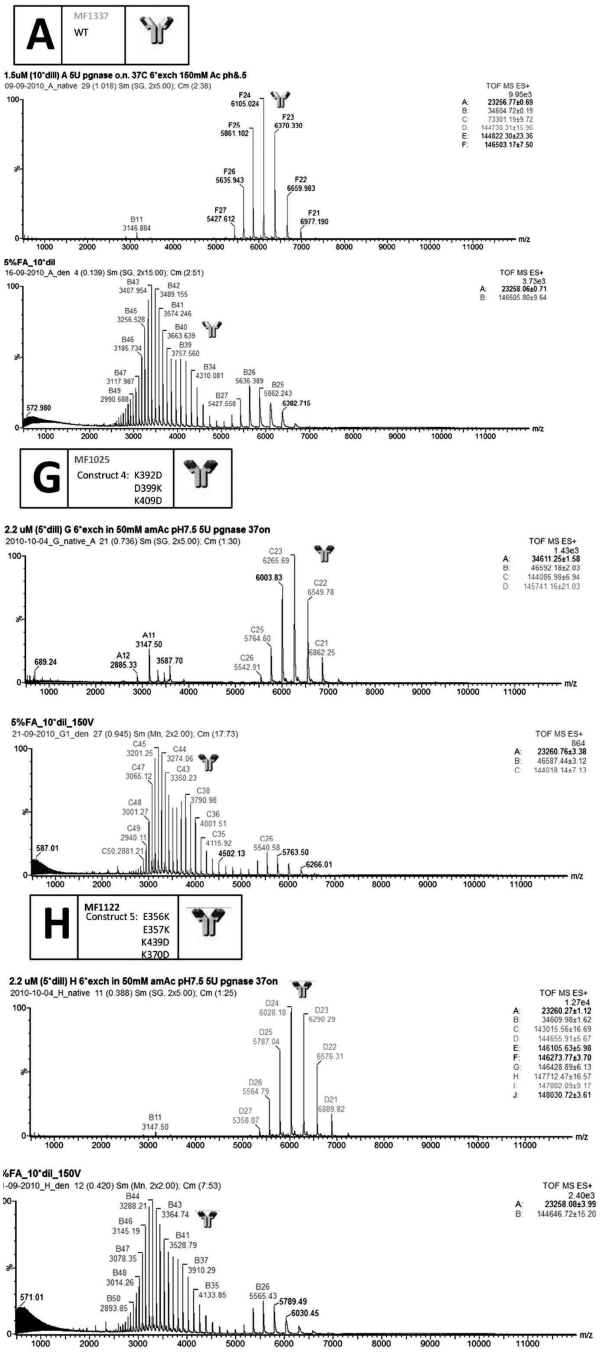
도면2

```
131         141         151         161         171         181

SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS

191         201         211         221         231         241

SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT

251         261         271         281         291         301

LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH

311         321         331         341         351         361

QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK

371         381         391         401         411         421

GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

431         441

ALHNHYTQKS LSLSPGK
```

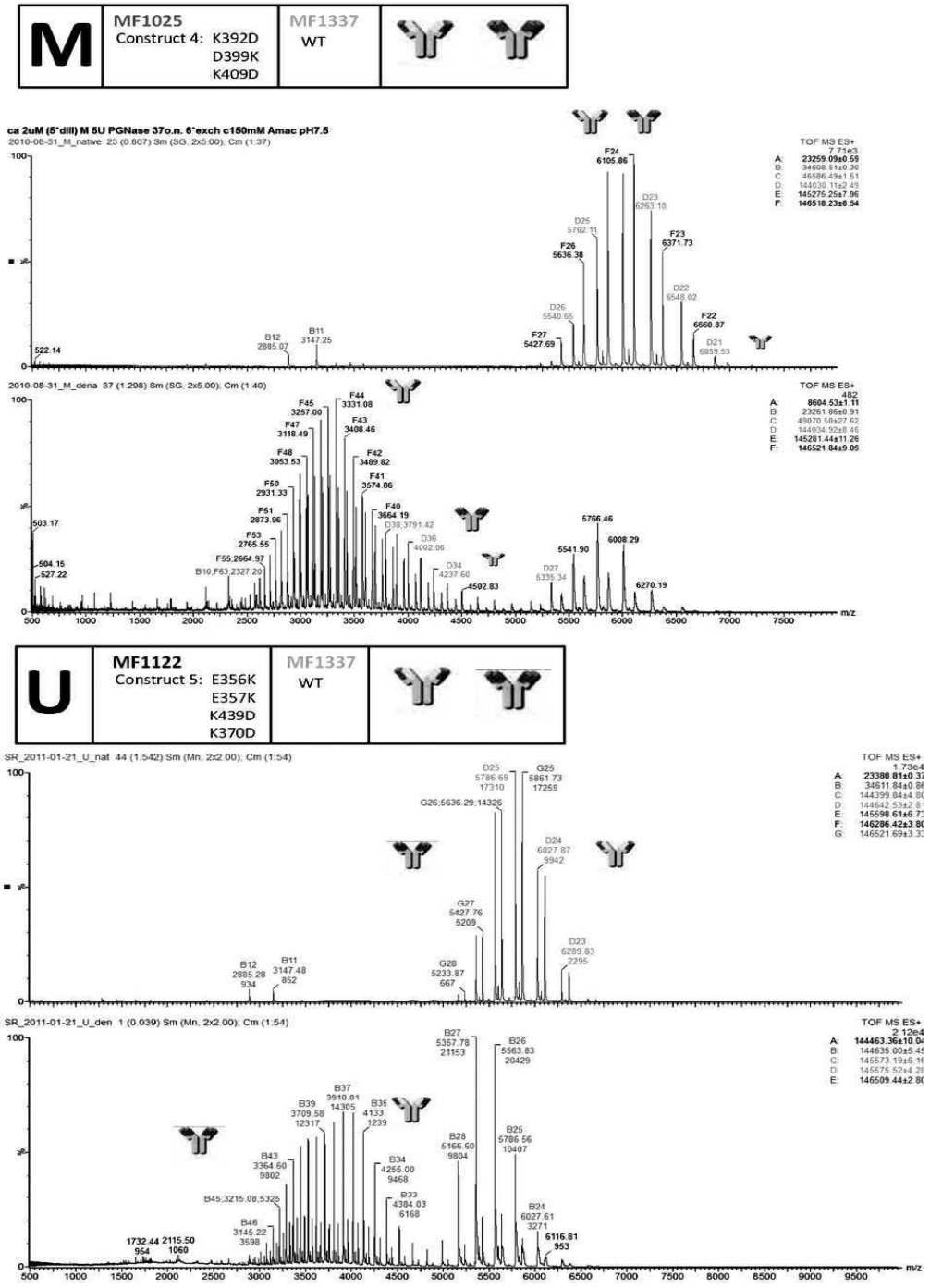
도면3

```
MF1025_VH
gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctcctgtgcag
cctctggattcacctttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtg
ggtctcagctattagtggtagtggtggtagcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatc
tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgt
attactgtgcaagggccgattggtgggcgacttttgactactggggccaaggtaccctggtcacc

MF1025_VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADWWATFDYWGQGTLVT

MF1122_VH
gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcag
cctctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtg
ggtggcagttatatcatatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatc
tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaagagccctcttcacgaccatcgccatggactattggggccaaggtaccctggtcacc

MF1122_VH
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALFTTIAMDYWGQGTLVT

MF1337 VH
gaggtgcagctggtggagactggggctgaggtgaagaagccgggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttct
gactacatcttcaccaaatatgacatcaactgggtgcgccaggcccctggacaagggcttgaatggatgggatgg
atgagcgctaacactggaaacacgggctatgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccagggacacgtcc
ataaacacagcctacatggagctgagcagcctgacatctggtgacacggccgtttatttctgtgcgaggagtagt
cttttcaagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggacgtctggggccaagggaccacggtcacc

MF1337
VHEVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYAQKFQGRVTMTRD
TSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTTVT
```

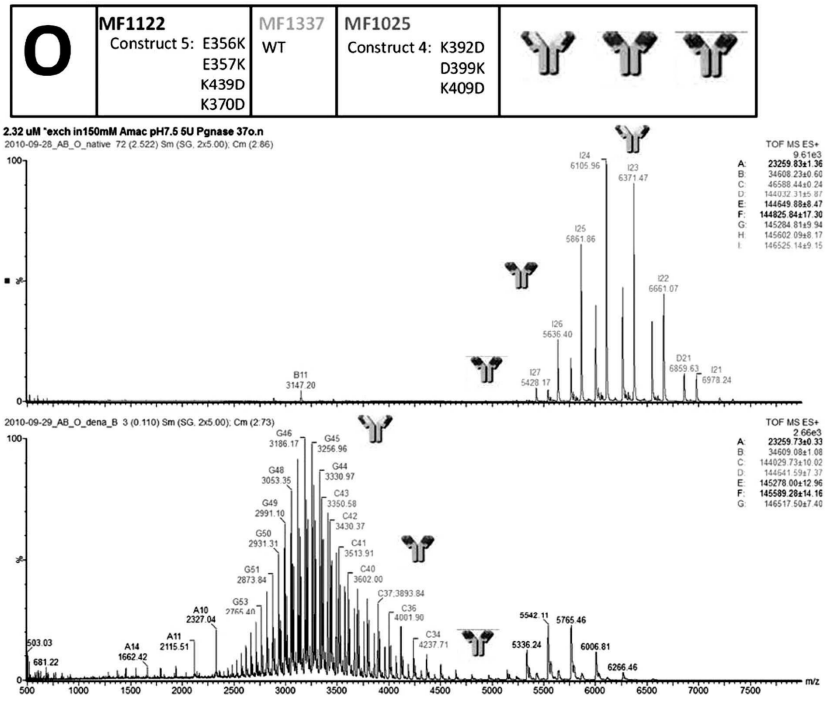
도면4


A
MF1337
WT
1.5uM (10*dil) A 5U pgnase o.n. 37C 6*exch 150mM Ac ph5.5
09-09-2010_A_native 29 (1.018) Sm (SG, 2x5.00); Cm (2:38)
TOF MS ES+
9.95e3
A: 23256.77±0.69
B: 34604.72±0.19
C: 73301.19±9.72
D: 144730.31±15.36
E: 144822.30±23.36
F: 146503.17±7.50
F24 6105.024
F23 6370.330
F25 5861.102
F26 5635.943
F22 6609.983
F27 5427.612
F21 6977.190
B11 3146.884
5%FA_10*dil
16-09-2010_A_den 4 (0.139) Sm (SG, 2x15.00); Cm (2:51)
TOF MS ES+
3.73e3
A: 23258.06±0.71
B: 146505.80±9.64
B43 3407.954
B42 3489.155
B41 3574.246
B45 3256.528
B40 3663.639
B46 3186.734
B39 3757.560
B47 3117.987
B34 4310.081
B49 2990.686
B26 5636.389
B25 5862.243
B27 5427.558
572.980
G
MF1025
Construct 4: K392D
D399K
K409D
2.2 uM (5*dill) G 6*exch in 50mM amAc pH7.5 5U pgnase 37on
2010-10-04_G_native_A 21 (0.736) Sm (SG, 2x5.00); Cm (1:30)
TOF MS ES+
1.43e3
A: 34611.25±1.58
B: 46932.19±2.83
C: 144086.98±6.94
D: 145741.16±21.03
C23 6265.69
6003.83
C22 6549.78
A11 3147.50
C25 5764.60
C21 6862.25
A12 2885.33
3587.70
C26 5542.91
689.24
5%FA_10*dil_150V
21-09-2010_G1_den 27 (0.945) Sm (Mn, 2x2.00); Cm (17:73)
TOF MS ES+
964
A: 23260.76±3.38
B: 46587.44±3.12
C: 144018.14±7.13
C45 3201.25
C44 3274.06
C47 3065.12
C43 3350.23
C38 3790.98
C48 3001.27
C36 4001.51
C49 2940.12
C35 4115.92
C50 2881.22
C26 5540.58
4502.13
5763.50
6266.01
587.01
H
MF1122
Construct 5: E356K
E357K
K439D
K370D
2.2 uM (5*dill) H 6*exch in 50mM amAc pH7.5 5U pgnase 37on
2010-10-04_H_native 11 (0.388) Sm (SG, 2x5.00); Cm (1:25)
TOF MS ES+
1.27e4
A: 23260.27±1.12
B: 34609.98±1.62
C: 143015.56±16.69
D: 144655.91±5.67
E: 146105.63±5.98
F: 146273.77±3.70
G: 146428.89±6.13
H: 147712.47±16.57
I: 147892.09±9.17
J: 148030.72±3.61
D24 6028.18
D23 6290.29
D25 5787.04
D22 6576.31
D26 5564.79
D21 6889.82
D27 5358.87
B11 3147.50
%FA_10*dil_150V
-09-2010_H_den 12 (0.420) Sm (Mn, 2x2.00); Cm (7:53)
TOF MS ES+
2.40e3
A: 23258.08±3.99
B: 144646.72±15.20
B44 3288.21
B43 3364.74
B46 3145.19
B41 3528.79
B47 3078.35
B37 3910.29
B48 3014.26
B35 4133.85
B26 5565.43
5789.49
B50 2893.85
6030.45
571.01

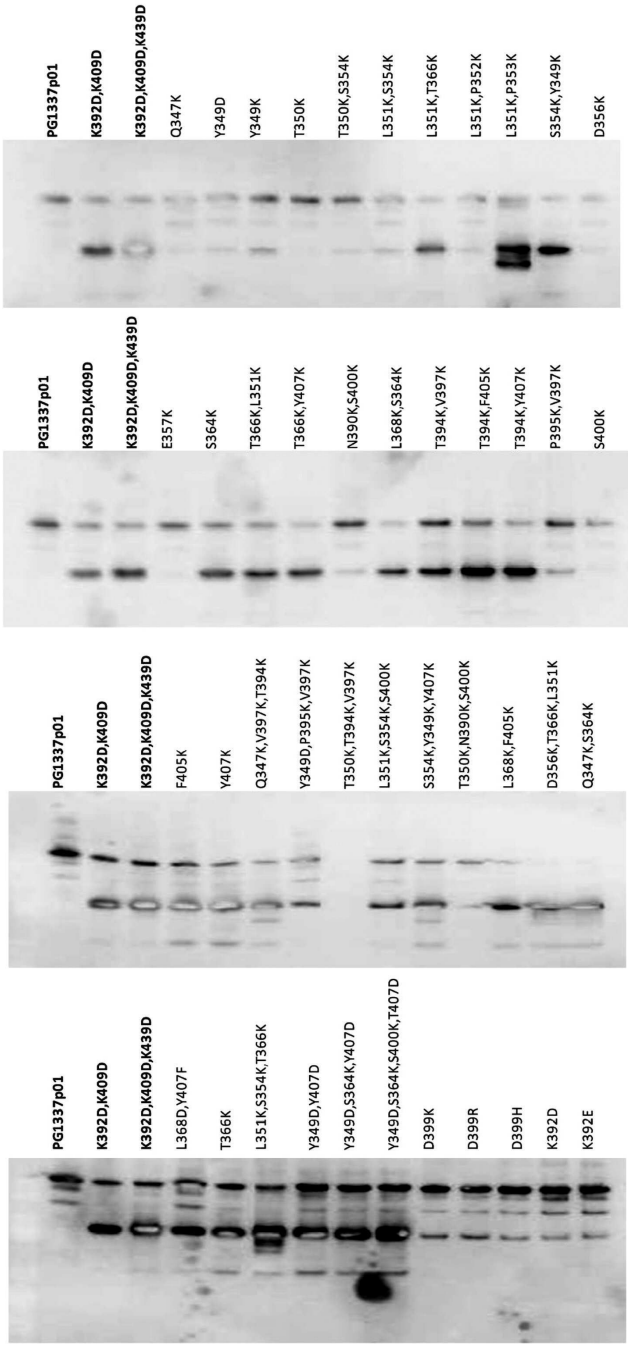
도면5


M
MF1025
Construct 4: K392D
D399K
K409D
MF1337
WT
ca 2uM (5*dill) M 5U PGNase 37o.n. 6*exch c150mM Amac pH7.5
2010-08-31_M_native 23 (0.807) Sm (SG, 2x5.00); Cm (1:37)
TOF MS ES+
2010-08-31_M_dena 37 (1.298) Sm (SG, 2x5.00); Cm (1:40)
TOF MS ES+
U
MF1122
Construct 5: E356K
E357K
K439D
K370D
MF1337
WT
SR_2011-01-21_U_nat 44 (1.542) Sm (Mn, 2x2.00); Cm (1:54)
TOF MS ES+
SR_2011-01-21_U_den 1 (0.039) Sm (Mn, 2x2.00); Cm (1:54)
TOF MS ES+
m/z

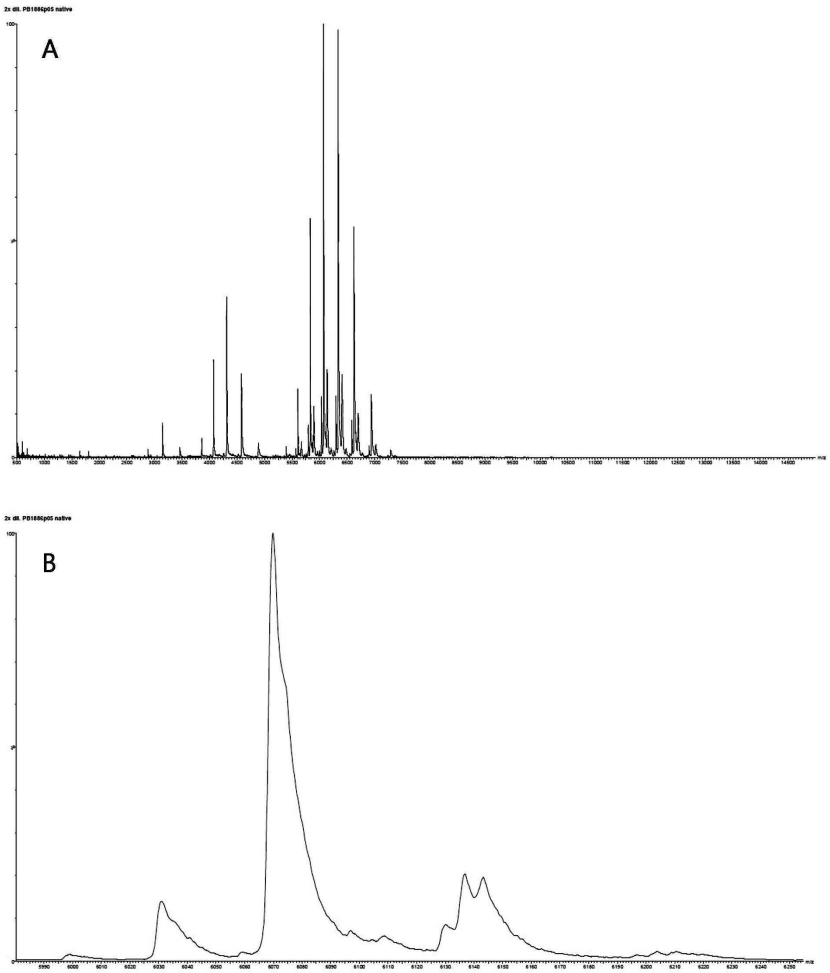
도면6


O
MF1122
Construct 5: E356K
E357K
K439D
K370D
MF1337
WT
MF1025
Construct 4: K392D
D399K
K409D
2.32 uM *exch in150mM Amac pH7.5 5U Pgnase 37o.n
2010-09-28_AB_O_native 72 (2.522) Sm (SG, 2x5.00); Cm (2:86)
TOF MS ES+
9.61e3
A: 23259.83±1.36
B: 34608.23±0.66
C: 46588.44±0.24
D: 144022.31±5.87
E: 144549.88±8.47
F: 144825.84±17.30
G: 145284.81±9.94
H: 145602.09±8.17
I: 146525.14±9.15
I24 6105.96
I23 6371.47
I25 5861.86
I22 6661.07
I26 5636.40
D21 6859.63
I21 6978.24
I27 5428.17
B11 3147.20
2010-09-29_AB_O_dena_B 3 (0.110) Sm (SG, 2x5.00); Cm (2:73)
TOF MS ES+
2.66e3
A: 23259.73±0.33
B: 34609.08±1.08
C: 144029.73±10.02
D: 144941.59±7.37
E: 145278.00±12.96
F: 145589.28±14.16
G: 146517.50±7.40
G46 3186.17
G45 3256.96
G48 3053.35
G44 3330.97
G49 2991.19
C43 3350.58
G50 2931.31
C42 3430.37
C41 3513.91
G51 2873.84
C40 3602.00
C37 3893.84
G53 2764.40
C36 4001.90
A10 2327.04
C34 4237.71
A11 2115.51
5542.11
5765.46
503.03
A14 1662.42
5336.24
6006.81
681.22
6266.46
m/z

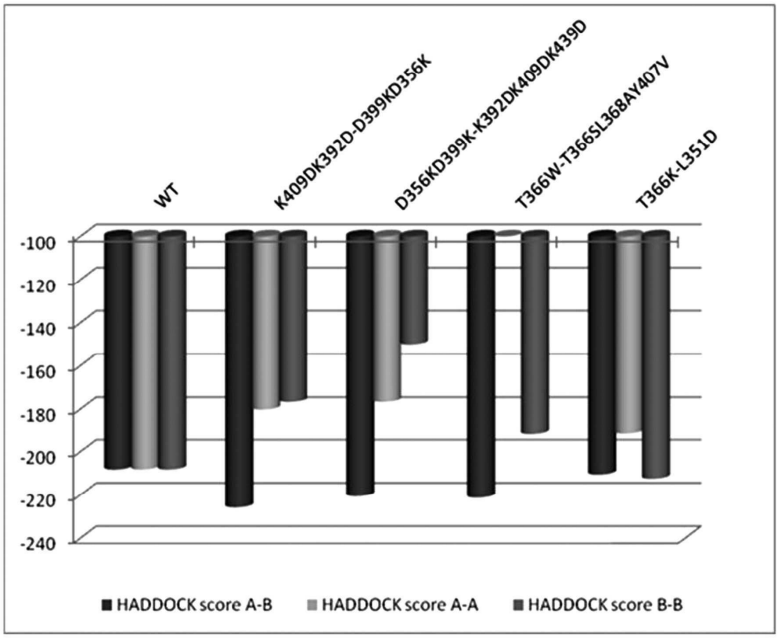
도면7


PG1337p01
K392D,K409D
K392D,K409D,K439D
Q347K
Y349D
Y349K
T350K
T350K,S354K
L351K,S354K
L351K,T366K
L351K,P352K
L351K,P353K
S354K,Y349K
D356K
PG1337p01
K392D,K409D
K392D,K409D,K439D
E357K
S364K
T366K,L351K
T366K,Y407K
N390K,S400K
L368K,S364K
T394K,V397K
T394K,F405K
T394K,Y407K
P395K,V397K
S400K
PG1337p01
K392D,K409D
K392D,K409D,K439D
F405K
Y407K
Q347K,V397K,T394K
Y349D,P395K,V397K
T350K,T394K,V397K
L351K,S354K,S400K
S354K,Y349K,Y407K
T350K,N390K,S400K
L368K,F405K
D356K,T366K,L351K
Q347K,S364K
PG1337p01
K392D,K409D
K392D,K409D,K439D
L368D,Y407F
T366K
L351K,S354K,T366K
Y349D,Y407D
Y349D,S364K,Y407D
Y349D,S364K,S400K,T407D
D399K
D399R
D399H
K392D
K392E

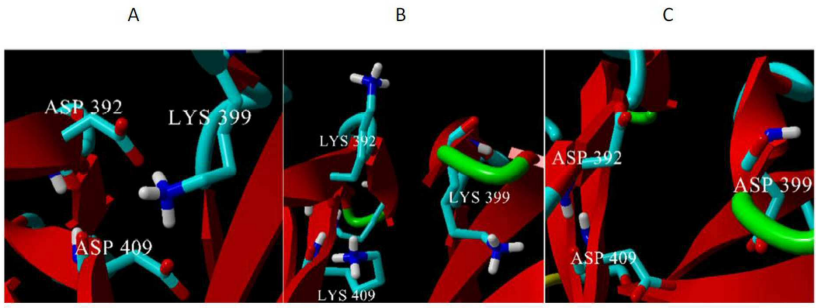
도면8


A
B

도면9


WT
K409DK392D-D399KD356K
D356KD399K-K392DK409DK439D
T366W-T366SL368AY407V
T366K-L351D
-100
-120
-140
-160
-180
-200
-220
-240
HADDOCK score A-B
HADDOCK score A-A
HADDOCK score B-B

도면10

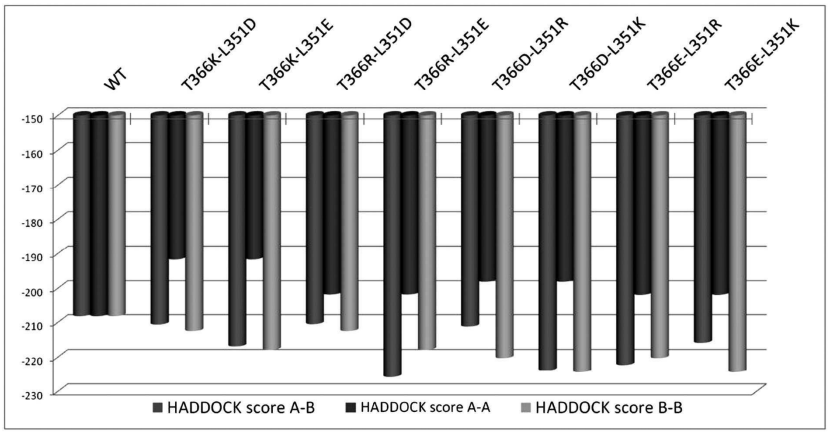


A K409D:K392D/D399'K:E356'K

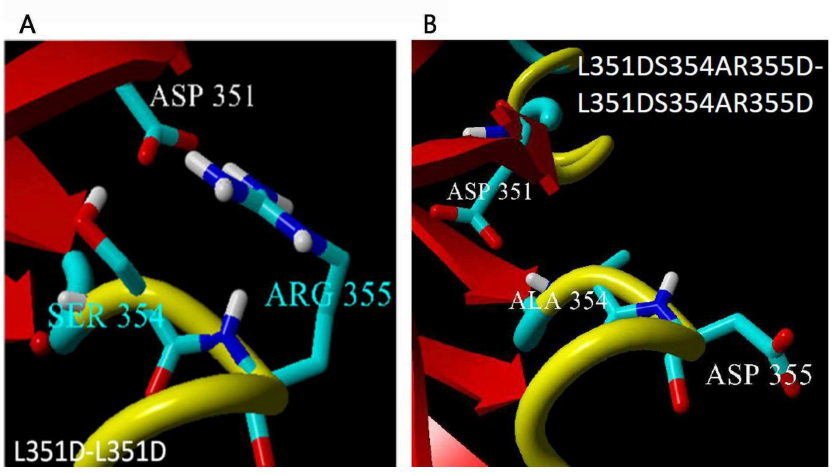
B D399K:E356K/D399'K:E356'K

C K409D:K392D/K409'D:K392'D

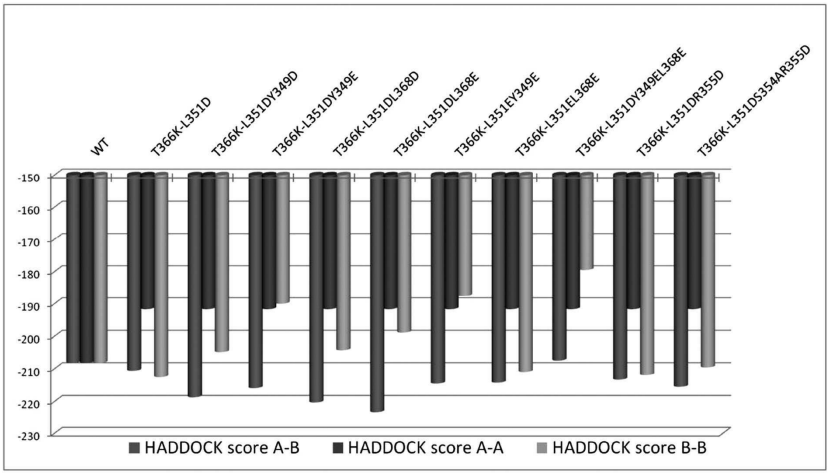
도면11



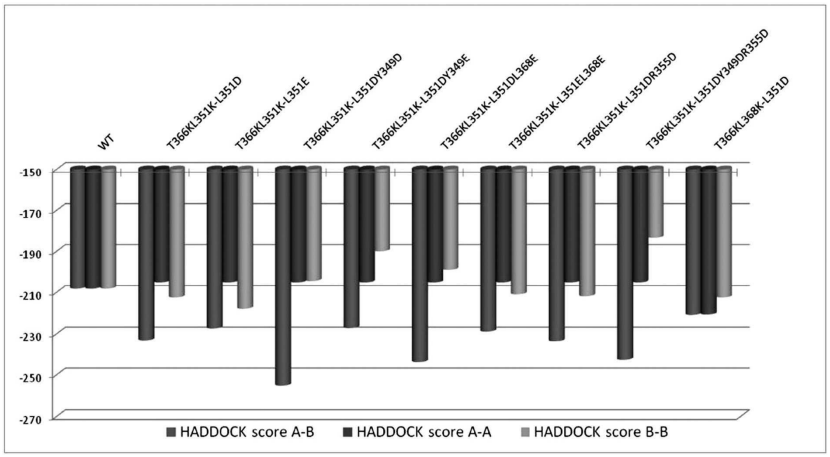
도면12



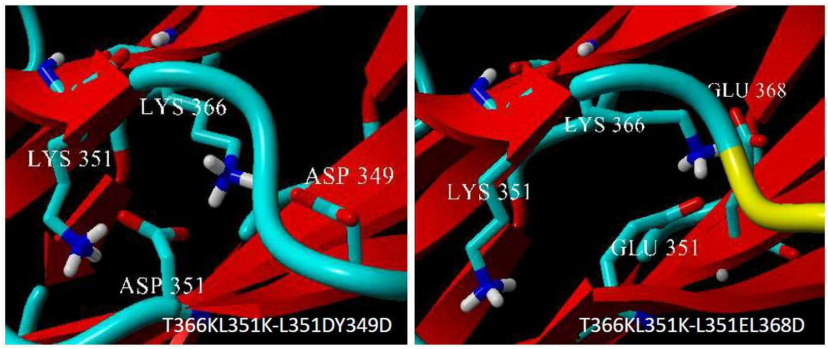
도면13



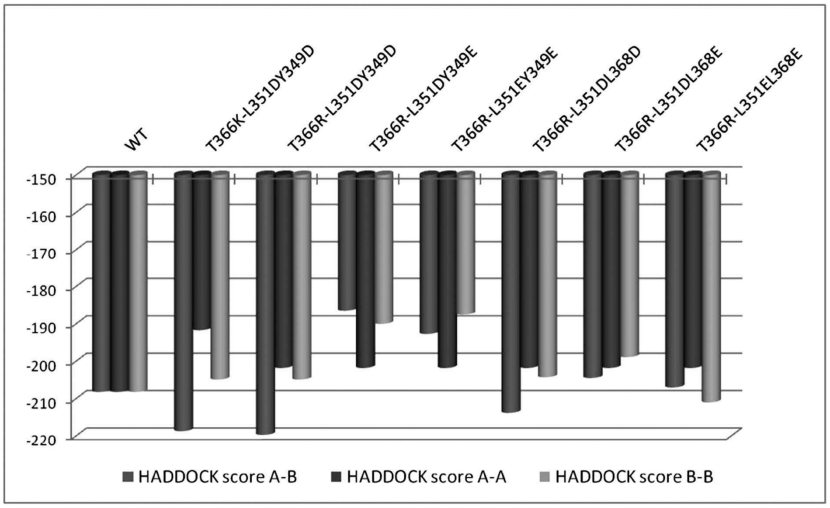
도면14



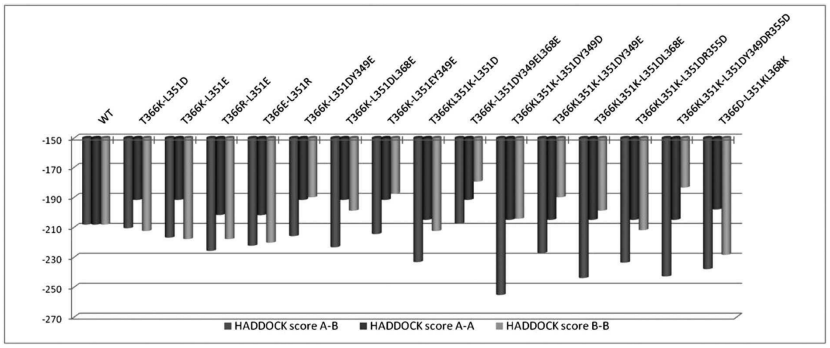
도면15



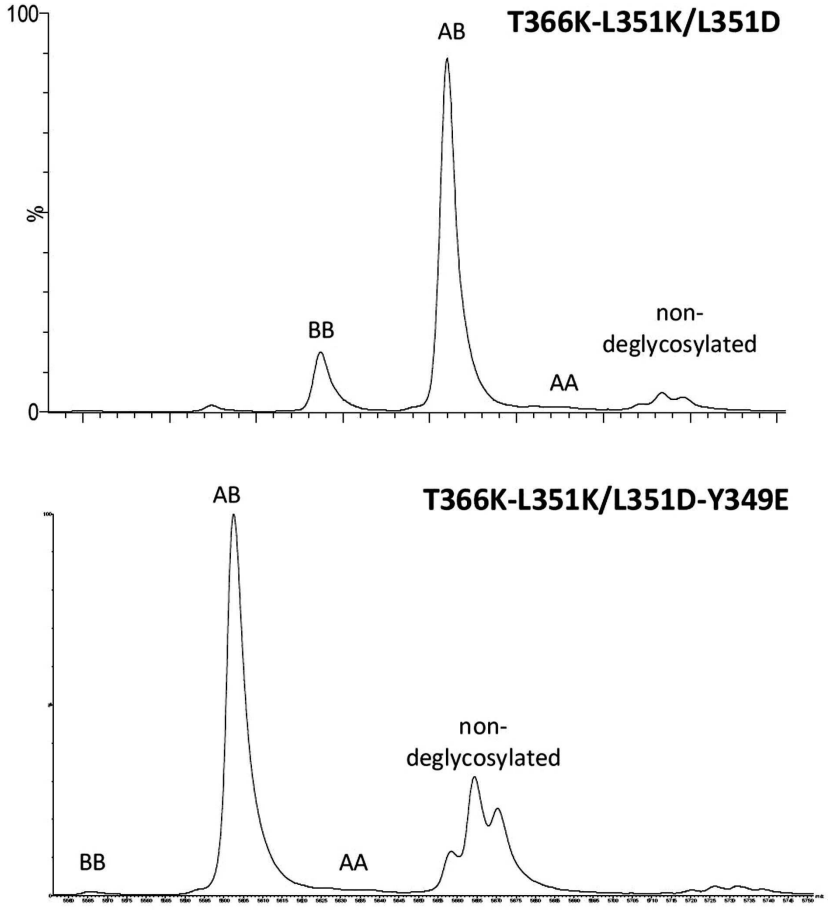
도면16


WT
T366K-L351DY349D
T366R-L351DY349D
T366R-L351DY349E
T366R-L351EY349E
T366R-L351DL368D
T366R-L351DL368E
T366R-L351EL368E
-150
-160
-170
-180
-190
-200
-210
-220
HADDOCK score A-B
HADDOCK score A-A
HADDOCK score B-B

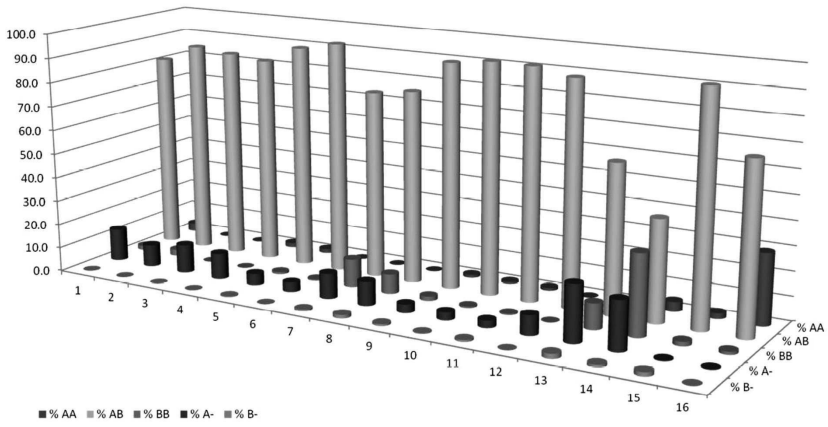
도면17


WT
T366K-L351D
T366K-L351E
T366R-L351E
T366E-L351R
T366K-L351DY349E
T366K-L351DL368E
T366K-L351EY349E
T366KL351K-L351D
T366K-L351DY349EL368E
T366KL351K-L351DY349D
T366KL351K-L351DY349E
T366KL351K-L351DL368E
T366KL351K-L351DR355D
T366KL351K-L351DY349DR355D
T366D-L351KL368K
-150
-170
-190
-210
-230
-250
-270
HADDOCK score A-B
HADDOCK score A-A
HADDOCK score B-B

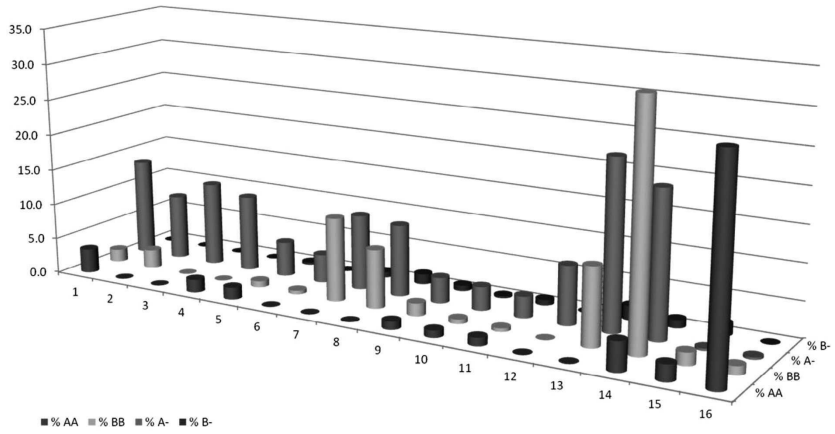
도면18


100
%
0
AB
T366K-L351K/L351D
BB
AA
non-
deglycosylated
AB
T366K-L351K/L351D-Y349E
non-
deglycosylated
BB
AA

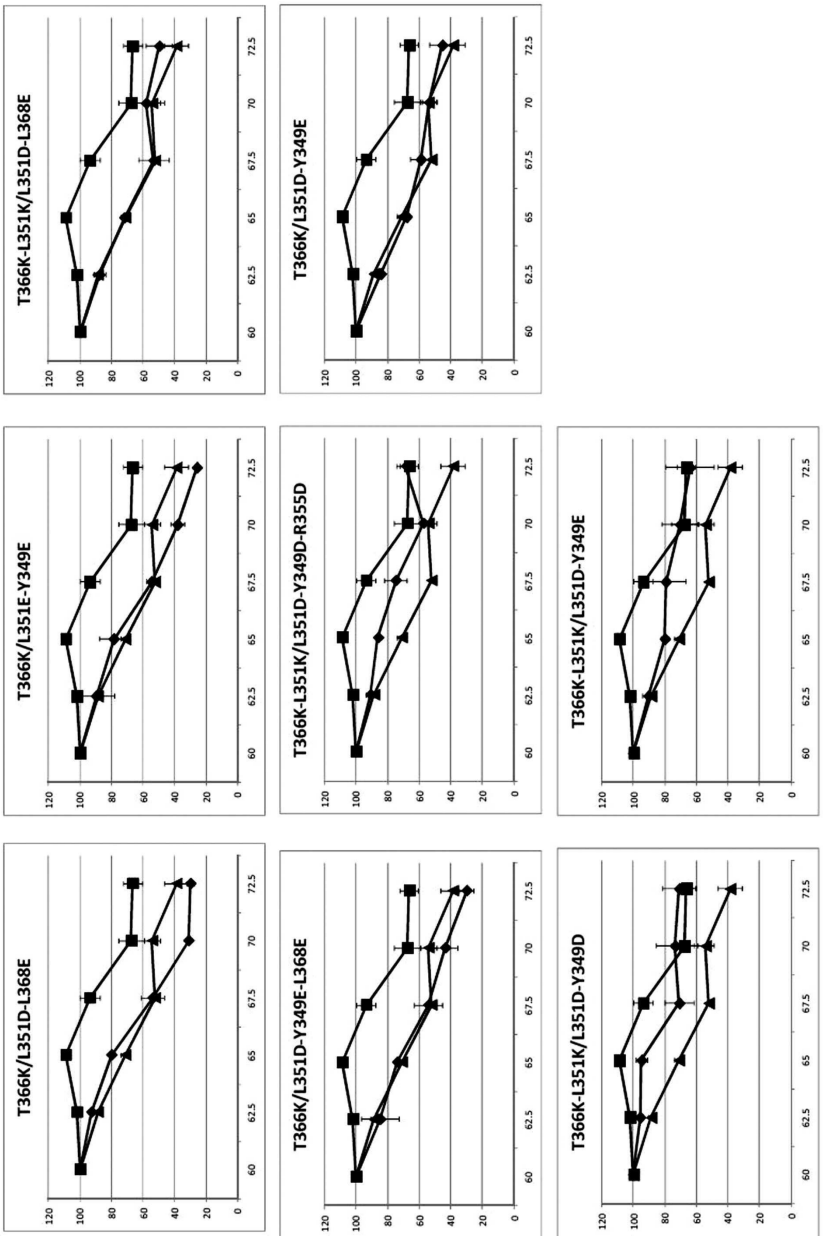
도면19a


100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
% AA
% AB
% BB
% A-
% B-
% AA % AB % BB % A- % B-

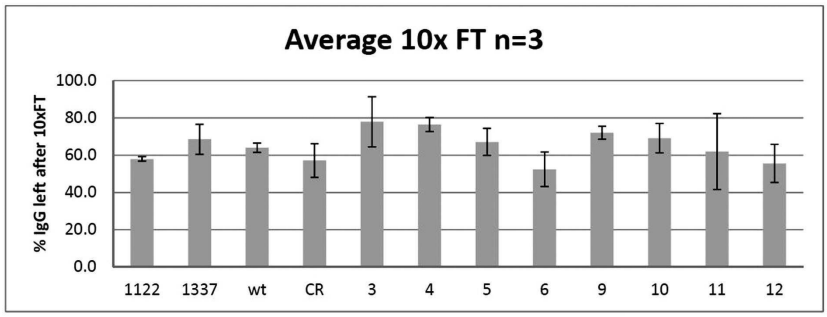
도면19b


35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
% B-
% A-
% BB
% AA
% AA
% BB
% A-
% B-

도면20

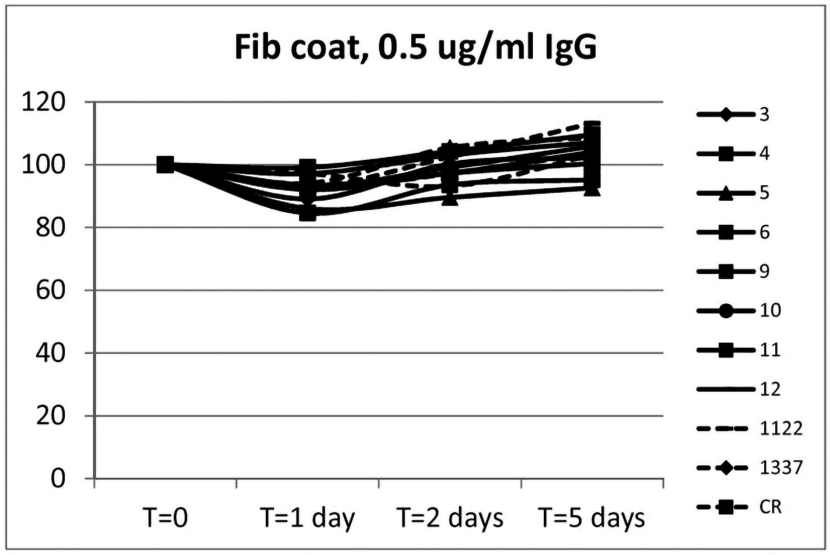

T366K-L351K/L351D-L368E
T366K/L351D-Y349E
T366K/L351E-Y349E
T366K-L351K/L351D-Y349D-R355D
T366K-L351K/L351D-Y349E
T366K/L351D-L368E
T366K/L351D-Y349E-L368E
T366K-L351K/L351D-Y349D

도면21

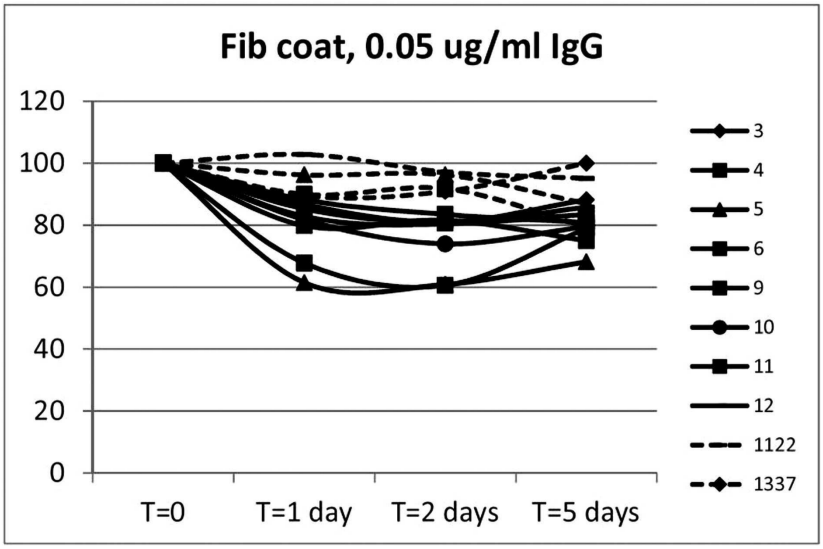

Average 10x FT n=3
% IgG left after 10xFT
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
1122
1337
wt
CR
3
4
5
6
9
10
11
12

도면22

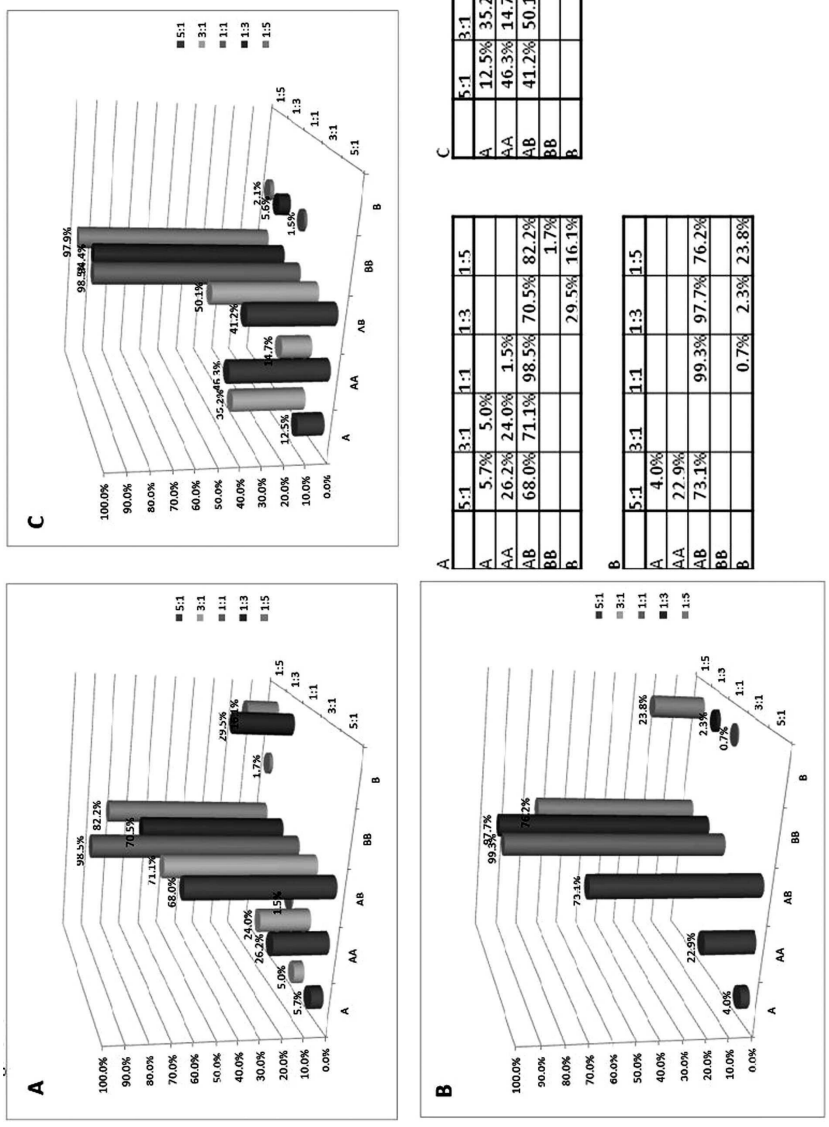
A


Fib coat, 0.5 ug/ml IgG
120
100
80
60
40
20
0
T=0
T=1 day
T=2 days
T=5 days
3
4
5
6
9
10
11
12
1122
1337
CR

B


Fib coat, 0.05 ug/ml IgG
120
100
80
60
40
20
0
T=0
T=1 day
T=2 days
T=5 days
3
4
5
6
9
10
11
12
1122
1337

도면23



A

	5:1	3:1	1:1	1:3	1:5
A	5.7%	5.0%			
AA	26.2%	24.0%	1.5%		
AB	68.0%	71.1%	98.5%	70.5%	82.2%
BB					1.7%
B				29.5%	16.1%

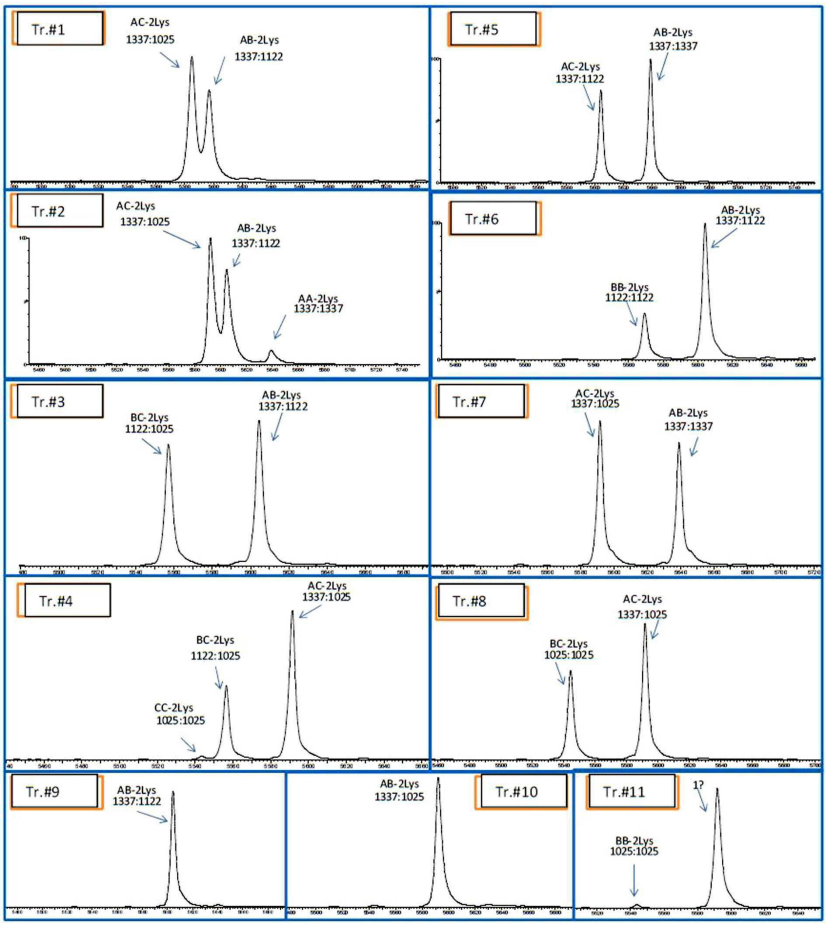
B

	5:1	3:1	1:1	1:3	1:5
A	4.0%				
AA	22.9%				
AB	73.1%		99.3%	97.7%	76.2%
BB					
B			0.7%	2.3%	23.8%

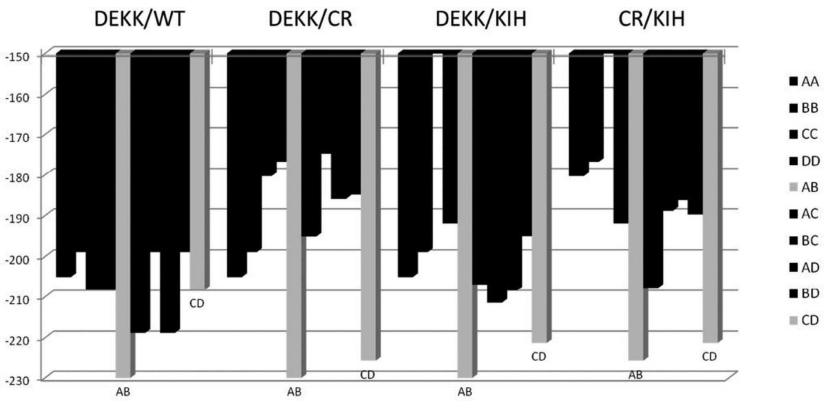
C

	5:1	3:1	1:1	1:3	1:5
A	12.5%	35.2%			
AA	46.3%	14.7%			
AB	41.2%	50.1%	98.5%	94.4%	97.9%
BB			1.5%	5.6%	2.1%
B					

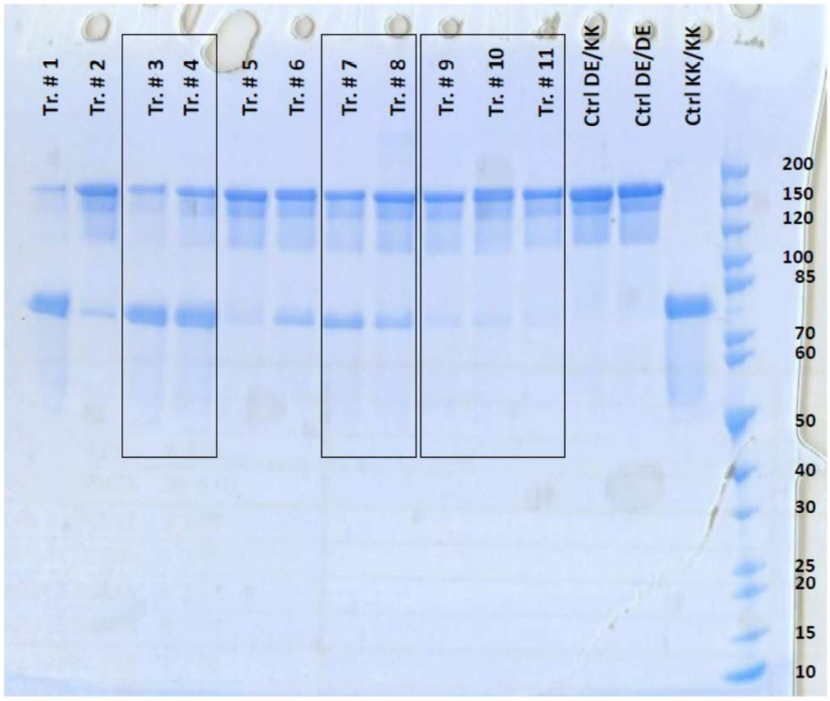
도면24


Tr.#1
AC-2Lys 1337:1025
AB-2Lys 1337:1122
Tr.#5
AB-2Lys 1337:1337
AC-2Lys 1337:1122
Tr.#2
AC-2Lys 1337:1025
AB-2Lys 1337:1122
AA-2Lys 1337:1337
Tr.#6
AB-2Lys 1337:1122
BB-2Lys 1122:1122
Tr.#3
BC-2Lys 1122:1025
AB-2Lys 1337:1122
Tr.#7
AC-2Lys 1337:1025
AB-2Lys 1337:1337
Tr.#4
AC-2Lys 1337:1025
BC-2Lys 1122:1025
CC-2Lys 1025:1025
Tr.#8
AC-2Lys 1337:1025
BC-2Lys 1025:1025
Tr.#9
AB-2Lys 1337:1122
AB-2Lys 1337:1025
Tr.#10
Tr.#11
1?
BB-2Lys 1025:1025

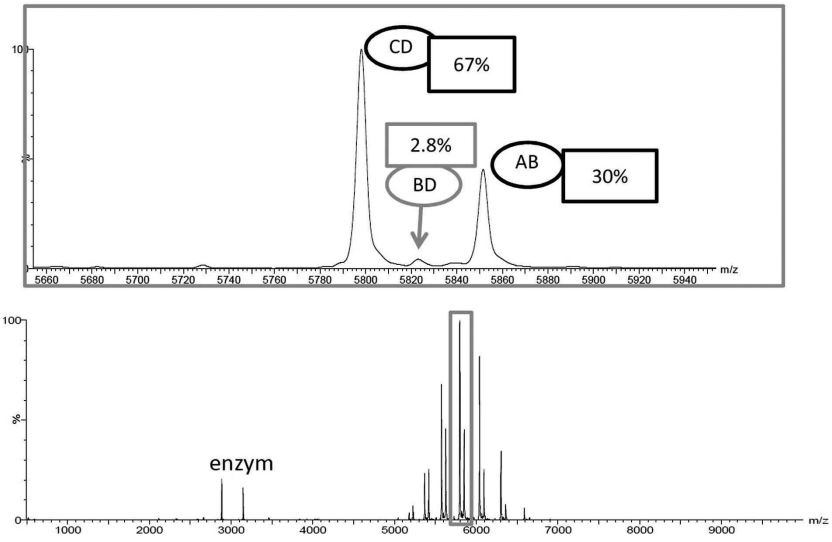
도면25


DEKK/WT
DEKK/CR
DEKK/KIH
CR/KIH
-150
-160
-170
-180
-190
-200
-210
-220
-230
AB
CD
AA
BB
CC
DD
AB
AC
BC
AD
BD
CD

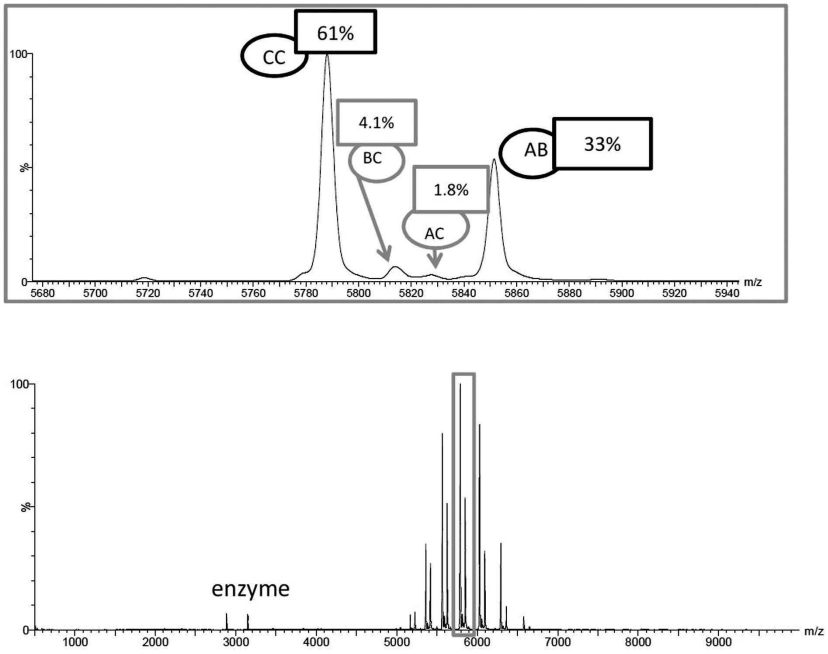
도면26


Tr. # 1
Tr. # 2
Tr. # 3
Tr. # 4
Tr. # 5
Tr. # 6
Tr. # 7
Tr. # 8
Tr. # 9
Tr. # 10
Tr. # 11
Ctrl DE/KK
Ctrl DE/DE
Ctrl KK/KK
200
150
120
100
85
70
60
50
40
30
25
20
15
10

도면27a

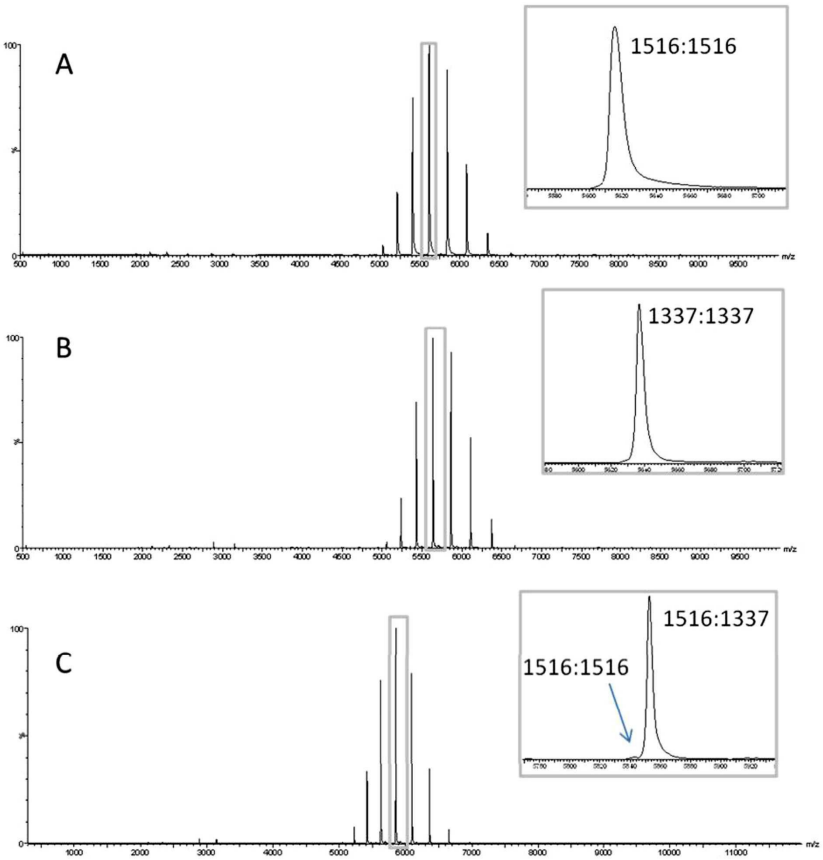

CD
67%
2.8%
BD
AB
30%
m/z
enzym
m/z

도면27b

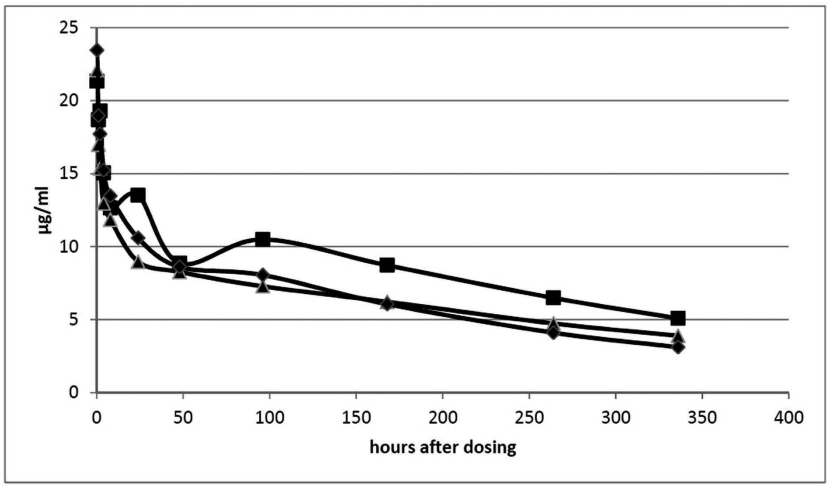

61%
CC
4.1%
BC
1.8%
AC
AB
33%
100
%
0
m/z
5680
5700
5720
5740
5760
5780
5800
5820
5840
5860
5880
5900
5920
5940

100
%
0
enzyme
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000
m/z

도면28


A
1516:1516
B
1337:1337
C
1516:1337
1516:1516

도면29


25
20
15
10
5
0
μg/ml
0
50
100
150
200
250
300
350
400
hours after dosing