



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0035558
(43) 공개일자 2024년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/18 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/18 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2024-7005067

(22) 출원일자(국제) 2022년07월13일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년02월14일

(86) 국제출원번호 PCT/CA2022/051093

(87) 국제공개번호 WO 2023/283736

국제공개일자 2023년01월19일

(30) 우선권주장

63/221,686 2021년07월14일 미국(US)

(71) 출원인

피엑스라디아 맵 테크놀로지스 인코퍼레이티드

캐나다 브리티시 컬럼비아 브이6이 4브이2 밴쿠버
알베르니 스트리트 3505 - 1111

(72) 발명자

모르간 알톤 시.

캐나다 브리티시 컬럼비아 브이6이 4브이2 밴쿠버
알베르니 스트리트 3505 - 1111

(74) 대리인

특허법인와이에스장

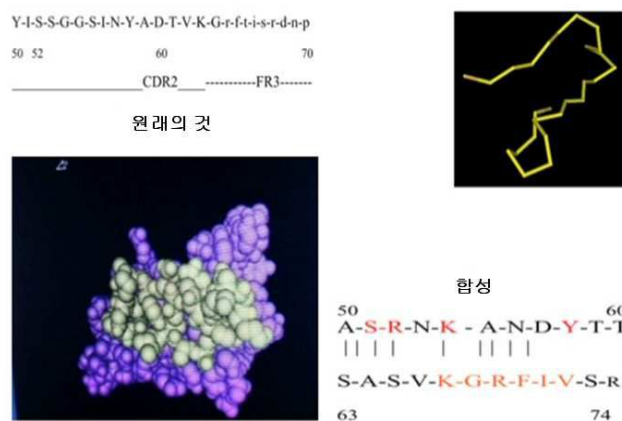
전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 발명의 명칭 상동성 이량체화 펩타이드 및 그것을 포함하는 항체

(57) 요약

개선된 자체 결합을 갖는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드가 기술된다. HD 펩타이드는 상응하는 자연 발생적인 HD 펩타이드에 비교하여 역 구성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 하나 이상의 친수성 치환이 있는 자연 발생적인 HD 펩타이드의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 나아가 HD 펩타이드의 이량체가 또한 기술된다. 상기 HD 펩타이드 또는 HD 이량체를 포함하는 항체가 또한 개시되며, 또한 상기 항체의 제조 방법 및 용도가 개시된다.

대표도



도 1

(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/06 (2018.01)

A61P 9/00 (2018.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C07K 16/22 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 16/2887 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

상응하는 자연 발생적인 HD 펩타이드, 또는 그것의 보존적 변이체에 비교하여 역 구성의 아미노산 서열을 포함하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상응하는 자연 발생적인 HD 펩타이드는 T15 HD 펩타이드 또는 R24 HD 펩타이드인 것을 특징으로 하는 HD 펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, HD 펩타이드는 서열 번호 4, 서열 번호 6 또는 서열 번호: 18에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 HD 펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 가지며 하나 또는 하나 이상의 치환은 HD 펩타이드의 소수도를 증가시키는 것을 특징으로 하는 HD 펩타이드.

청구항 5

하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드로서 하나 또는 하나 이상의 치환은 HD 펩타이드의 소수도를 증가시키는, HD 펩타이드.

청구항 6

제5항에 있어서, HD 펩타이드는 위치 4, 7, 및 18에 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는, 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 HD 펩타이드.

청구항 7

제6항에 있어서, 위치 4에서 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환은 K 또는 K의 보존된 치환이고, 위치 7에서 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환은 R 또는 R의 보존된 치환이며 위치 18에서 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환은 H 또는 H의 보존된 치환인 것을 특징으로 하는 HD 펩타이드.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, HD 펩타이드는 서열 번호: 8, 9 또는 10에 대해 80%-100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 HD 펩타이드.

청구항 9

제1 HD 펩타이드 및 제2 HD 펩타이드를 포함하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드 이량체로서, 제1 및 제2 HD 펩타이드는 자연 발생적인 HD 펩타이드로부터 유래되거나 또는 제1 및 제2 HD 펩타이드는 자연 발생적인 HD 펩타이드의 역서열로부터 유래되는, 상동성 이량체화(HD) 펩타이드 이량체.

청구항 10

제9항에 있어서, 제1 및/또는 제2 HD는 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드 이량체.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 이량체의 제1 및 제2 HD 펩타이드는 링커에 의해 연결되는 것을 특징으로 하는 HD

펩타이드 이량체.

청구항 12

제11항에 있어서, 링커는 gly-gly인 것을 특징으로 하는 HD 펩타이드 이량체.

청구항 13

제9항에 있어서, HD 펩타이드 이량체는 서열 번호: 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 17 또는 19에 대해 80-100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드 이량체.

청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 또는 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 이량체를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 15

제14항에 있어서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간화된 IgG인 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 16

제16항에 있어서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간화된 IgG1, 인간화된 IgG4 또는 인간화된 IgG3인 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체 또는 항원 결합 단편의 뉴클레오타이드 친화성 부위에 융합되는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 18

제17항에 있어서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 리신, 시스테인 또는 탄수화물을 통해 융합되는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 CDR3 바로 뒤에 위치하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 20

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체의 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 C-말단 바로 뒤에 위치하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 21

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체의 중쇄 가변 영역 바로 뒤에 위치하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 22

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체의 Fc 영역의 C-말단 바로 뒤에 위치하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 23

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체에 콘주게이션되는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 24

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 키메라 재조합 항체인 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 25

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 스페이서가 앞에 있는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 26

제25항에 있어서, 스페이서는 gly-gly인 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 27

제14항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 단일 사슬 항체(scFv), 이중특이적 항체(BsAb) 또는 항체 유사 펩타이드인 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 28

제14항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간화된 단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 29

제14항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 Her-2neu 항체(예컨대 허셉틴), CD-20 항체(예컨대 리툭신), 혈관 내피 성장 인자 항체(예컨대 아바스틴)이거나 또는 체크포인트 억제 항체(예컨대 PD-L1)인 것을 특징으로 하는 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 30

제14항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따르는 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편, 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 또는 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 이량체를 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 32

제31항에 있어서, 제1 및 제2 핵산 서열이 발현된 HD 펩타이드이고 항체 또는 항원 결합 단편은 융합 단백질로서 발현되도록 항체 또는 항원 결합 단편을 암호화하는 제2 핵산 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 33

상동성 이량체화(HD) 항체를 생성하는 방법으로서, 숙주 세포에서 제32항의 발현 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

제31항 또는 제32항의 발현 벡터로 형질전환된 분리된 숙주 세포.

청구항 35

항체의 결합 및/또는 효능을 향상시키는 방법으로서,

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 또는 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항의 HD 이량체를 항체에 콘주게이션시키는 단계; 또는

HD 펩타이드를 포함하는 키메라 항체를 재조합적으로 발현시키는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 36

질환 또는 병태를 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 제14항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따르는 항체 또는 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 질환 또는 병태는 암, 자가면역 장애, 염증성 장애, 신경퇴행성 질환, 심혈관 질환, 생식 또는 이식 거부반응으로 이루어지는 목록으로부터 선택된 것인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

샘플 중의 분석물을 검출하는 방법으로서,

분석물을 분석물에 대해 지시된 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계로서, 항체 또는 항원 결합 단편은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 또는 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 이량체에 융합되는 것인 단계; 및

분석물 및 HD 펩타이드에 융합된 항체에 의해 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 39

샘플 중의 분석물을 검출하기 위한 키트로서,

분석물에 대해 지시된 항체 또는 항원 결합 단편, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 또는 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 이량체에 융합된 항체 또는 항원 결합 단편; 및

분석물을 검출하는데 사용하기 위한 지침을 포함하는 키트.

청구항 40

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따르는 HD 펩타이드, 또는 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항의 HD 펩타이드 이량체에 연결된 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 파지 디스플레이 라이브러리.

청구항 41

제14항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따르는 항체의 치료법에서의 용도.

청구항 42

치료법에 사용하기 위한 제14항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따르는 항체.

청구항 43

제14항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체의 진단 테스트에서의 용도.

청구항 44

진단 테스트에 사용하기 위한 제14항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따르는 항체.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 상동성 이량체화 펩타이드, 상기 상동성 이량체화 펩타이드를 포함하는 항체, 및 그것의 방법 및 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 항체는 질환에 대해서는 "마법의 총알"로서 칭송을 받아왔고 만성 질환, 예컨대 암 및 자가면역 장애의 치료를 위한 주요 치료 도구로서 부상하였다. 괄목할만한 성공 스토리에는 유방암(breast cancer) 치료에서 허셉틴(Herceptin)® 및 비호지킨성 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)의 치료에서 리툭산®이 포함된다. 질환 치료에서 항체의 중요한 장점은 신체의 건강한 조직 및 정상 생성물은 보존하면서 질환 유발 세포 또는 분자를 표적으로 하는 능력에 있다.
- [0003] 현재 16개의 FDA 승인 단클론성 항체가 연간 620억 달러의 매출을 차지하고 있다. 이것은 2025년에는 연간 1200억 달러의 매출을 생성할 70개의 승인 제품으로 성장할 것으로 예상된다. 더욱이, 지난 10년간 가장 새롭고 가장 성공적인 암 요법인, PD-L1과 같은 암 세포 표면 상의 억제 분자를 겨냥한 단클론성 항체(mAb)가 암 환자의 면역 체계에 대한 브레이크를 해제할 수 있어서 이전에는 전통적인 화학요법에 의해 잘 치료되지 않은 암에서 높은 치료 활성을 초래할 수 있는 것으로 증명되었다. 이런 표적은 단독으로 2025년까지 350억 달러의 연간 매출액을 생성할 것으로 예상된다.
- [0004] 그러나, 실험실 연구에서 원하는 특이성을 나타내는 항체가 전임상 및 임상 평가에서는 비효율적인 표적화, 낮은 생물학적 활성, 낮은 치료 효능, 및/또는 허용될 수 없는 부작용으로 인해 자주 그렇지 못하다. 이것은 부분적으로는 항체가 면역 방어의 한개의 아암(arm)만을 나타내며, T 세포는 면역 방어에서 다른 전략을 제공한다는 사실로 인한 것이다.
- [0005] 항체는 표적화 및 전달 장치를 위한 이상적인 플랫폼이다. 항체는 여러 생물학적 활성 분자, 예컨대, 독소, 약물 및 사이토카인에 대한 전달 장치로서 사용되어 왔다(ADC). 일부 경우에 항체 단편, 항원 결합 단편(Fab) 또는 단일 사슬 가변 단편(scFv)이 더 나은 조직 침투 때문에 바람직하다. 이제 여러 개의 승인된 ADC가 있다는 사실에도 불구하고, 그것의 개발에는 긴 승인 시간이 필요하여 매우 많은 비용이 들었다.
- [0006] 바람직한 치료 mAb 형태는 인간(또는 인간화된) IgG1으로, mAb 치료 활성은 그것의 결합(작용물질, 길항물질성) 또는 이펙터 기능[보체 매개 세포독성(C'MC), 항체 의존성 세포 매개 독성(ADCC) 또는 세포자멸사의 촉발]에 의해 부여된다. mAb는 이미 혈액에서 장기 생존을 위해 적응되고, 혈관 및 조직 침투를 돕는 부위를 가지며 선천성 면역의 많은 방어 메커니즘과 기능적으로 연결된다.
- [0007] 치료 항체가 그들의 표적 세포에 대해 효과적이게 되는 주요 메커니즘은 세포 사멸, 즉, 항체 유도 세포자멸사를 유도함에 의한 것으로 알려져 있다. 그러한 유도된 세포자멸사는 전형적으로 세포의 세포자멸사 신호 경로의 일부분인 수용체를 교차 결합시킴으로써 촉발된다. 예를 들어, B 세포 항원 수용체를 항체에 의해 교차 결합시키는 것은 B 세포 종양에서의 세포자멸사를 유도한다(Ghetie M., et al., 1997). 세포 수용체의 교차 결합은 또한 항체의 표적 항원에 대한 항체의 결합 능력을 증가시키고, 그로써 모든 세포 표면 의존성 치료 메커니즘, 예컨대 보체 매개 사멸 및 보체 의존성 옵소닌화 및 식세포작용, 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC), 뿐만 아니라 세포 수용체에 대해 표적화된 항체를 사용할 때 세포 내에서 세포 수용체에 대한 결합의 증가 및 세포 수용체의 차단을 통한 대사 경로에서의 세포 성장 또는 변경의 향상된 억제를 증가시킬 가능성이 있다.
- [0008] 항체의 치료 특성은 천연 항체의 "친화"를 목표로 하는 Fab 라이브러리를 사용함으로써 표적 항원에 대한 친화성과 관련하여 향상될 수 있다. 이것은 때로 100배 내지 1000배 정도로 많은 친화도의 증가를 초래할 수 있다. 그러나, 이것은 단클론성 항체의 결합의 기본적인 성질을 극복하지는 못한다. 단백질 에피토프와 관련하여, 단클론성 항체는 전형적으로 한 개의 아암으로 단일 에피토프에 결합한다 - mAb가 그것의 표적으로부터 분리될 때 다음 표적은 전형적으로 mAb가 재결합하기에는 너무 멀리 떨어져 있다. 그러한 핸디캡은 mAb가 에피토프 사이의 거리에 걸쳐 있을 수 있는 표적 시스템을 사용함으로써 극복될 수 있다; 이것은 전형적으로 막 상에 모이는 매우 높은 항원 밀도를 필요로 한다. 한 예는 B 세포 상의 세포 표면 면역글로불린이다. 유감스럽게도 이런 성질의 치료 표적은 거의 없다.
- [0009] 항원 결합은 mAb가 그것의 표적과 교차 결합할 기회를 증가시키고, 인접한 표적 항원에 대해 동시에 맞물림으로써 향상될 수 있다. 많은 표적과의 이런 교차결합은 세포자멸사를 촉발시킬 유능한 수단이다. 교차 결합에 대한 잠재력은 오량체(pentamer) IgM 항체를 사용하는 것과 같이 항체의 결합가를 증가시킴으로써 향상될 수 있다. 이것은 또한 IgG로부터 다량체 면역글로불린 분자를 생성하는 재조합 수단을 통해 실시될 수 있다(Xiao-Yun Liu, Laurentiu M. Pop, Lydia Tsai, Ilidora V. Pop and Ellen S. Vitetta, Int. J. Cancer 129, 497-506 (2011)). 그러나 대부분의 치료 표적을 사용해서는, 교차 결합은 면역글로불린 분자의 결합가 및 크기의 증가로 도 이루어질 수 없다.

[0010] 결합가 및 결합력은 "자가친화성 항체(autophilic antibody)" 또는 "자가항체(autobody)"로서 다양하게 알려져 있는 자가 결합 또는 동종친화성 항체(homophilic antibody)의 희귀한 부류에서 증가되며, 자연계에서 확인되었다(Kang, C. Y., Cheng, H. L., Rudikoff, S. and Kohler, H. J. Exp. Med. 165:1332, (1987); Xiyun, A. N., Evans, S. V., Kaminski, M. J., Fillies, S. F. D., Reisfeld, R. A., Noughton, A. N. and Chapman, P. B. J. Immunol. 157: 1582-1588 (1996)). 이것은 (항원 결합에 대한) 이차 상호작용의 결과로서 기원하며 다중 IgG를 포함할 수 있고 표적 간 세포 표면에서 임의의 거리에 걸쳐 있을 수 있다. 이것들은 자기자신과의 비공유 상호작용을 통해 이량체 및/또는 중합체를 형성할 수 있다. 자가친화성 항체의 한 예는 TEPC-15(T15)로, 이것은 세포자멸성 세포와 죽상동맥경화증 병변(atherosclerotic lesion) 상의 포스포틸콜린의 일반적으로 비밀 결정기(cryptic determinant)를 표적으로 한다(Binder, J., et al., 2003; Kang, C-Y, et al., 1988). 이량체화 또는 다량체화는 변형된 항체가 그것의 세포 표면 표적에 부착한 후에만 유도될 수 있다, 즉, "차등 올리고머화". 용액에서, 자가친화성 항체는 그것의 단량체와 이량체 형태 사이에서 평형 상태로 있을 수 있다(Kaveri S., et al., 1990). 유감스럽게도, 자연에서 생성되는 이들 유형의 항체는 거의 없고 그것들은 제한된 수의 표적에 대한 것이다.

[0011] TEPC-15(T15) 항체의 중쇄 영역의 펩타이드는 자체 결합하여 항체에 더 높은 치료 활성을 부여하는 것으로 확인되었다(Kang, C. Y. Brunck, T. K., Kieber-Emmons, T., Blalock, J. E. and Kohler, H., Science, 240: 1034-1036, 1988). 그러한 펩타이드는 "자가친화성 펩타이드" 또는 "상동성 이량체화(HD) 펩타이드"로서 알려진다. 이 펩타이드 서열 및 항체의 자체 회합을 유도하는 유사한 능력을 가진 다른 서열의 설명은 상이한 항원을 표적으로 하는 다른 항체에 대한 동일한 자체 회합 특성을 부여할 기회를 제공하였다. 보다 최근에 자체 결합의 성질이 탐색되었고 이차 및 삼차 특징을 형성하는 펩타이드의 합성 형태에 대한 선호도가 추론되었다(Bost KL, Blalock JE. Viral Immunol. 2(4), 229-238 (1989); Kohler, H, Immunotherapy (2013) 5(3), 235-246).

[0012] 공지 항체의 항원 검출 및/또는 치료 효능을 향상시키려는 노력으로, 두 개의 구별되는 공유 연결된 도메인을 포함하는 하이브리드 분자가 제안되었다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 제2003/0103984호(Kohler) 및 미국 특허 공개 번호 제2004/0185039호(Kohler)는 항체와 펩타이드 도메인을 포함하는 융합 단백질을 개시하며 여기서 펩타이드 도메인은 자가친화성 활성을 가질 수 있다. WO 2009/002939에는 자가친화성 펩타이드에 융합된 CD-20 항원에 대한 결합 친화성을 갖는 면역글로불린 구성요소가 개시된다. WO 2009/108803에는 자가친화성 펩타이드에 콘주게이션된 항체를 사용하여 샘플에서 분석물을 검출하는 방법 및 키트가 개시된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 그러나, 여전히 질환의 검출, 예방 및/또는 치료를 위해 항체의 민감성 및 효능을 개선시킬 필요가 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 자가 회합 또는 상동성 이량체화의 개선된 생물학적 활성을 갖는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드에 관한 것이다. 발명은 또한 상기 HD 펩타이드를 포함하는 융합 단백질(예컨대 화학적으로 콘주게이션되거나 재조합 항체)에 관한 것이다. 면역글로불린 구성요소 또는 항체 및 HD 펩타이드를 포함하는 융합 단백질은 재조합체일 수 있거나 항원 결합을 파괴하지 않고 HD 펩타이드 서열에서 바람직한 형태적 변화를 허용함으로써 이량체화 활성을 부여하는 방식으로 HD 펩타이드가 그것에 콘주게이션될 수 있다. 본원에 개시된 HD 펩타이드는 치료 항체의 효능을 향상시키기 위하여 또는 진단과 같은 다른 적용을 위해 결합 민감도 및/또는 결합력을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0015] 한 측면으로 상응하는 자연 발생적인 HD 펩타이드와 비교하여 역구성의 아미노산 서열을 포함하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드, 또는 그것의 보존적 변이체가 제공된다. 일부 구체예에서, 상응하는 자연 발생적인 HD 펩타이드는 T15 HD 펩타이드 또는 R24 HD 펩타이드일 수 있다.

[0016] 일부 구체예에서, HD 펩타이드는 RSVIFRGKVSASYETTYDNAKNRSA(서열 번호: 4) 또는 AYNISSGGSSIIYAY(서열 번호 6)에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 즉 T15 및 R24 HD 펩타이드의 역아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0017] 추가 측면은 개선된 자체 결합 특성을 부여하는 하나 또는 하나 이상의 치환을 포함하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드, 또는 그것의 보존적 변이체가 제공되는 것이다. 하나 또는 하나 이상의 치환은 친수성 치환일 수 있

다. 따라서 본원에 기술된 HD 펩타이드는 하나 또는 하나 이상의 치환이 HD 펩타이드의 소수도(hydrophathy)를 증가시키는 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

- [0018] 일부 구체예에서, 상동성 이량체화(HD) 펩타이드는 뉴클레오타이드 위치 4, 7, 및 18에 하나 이상의 치환을 갖는 아미노산 서열 ASRNKANDYTTEYSASVKGRIIVSR(서열 번호: 1)을 포함할 수 있다. 위치 4에서의 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환은 K 또는 K의 보존된 치환일 수 있고, 위치 7에서의 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환은 R 또는 R의 보존된 치환일 수 있으며 위치 18에서의 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환은 H 또는 H의 보존된 치환일 수 있다.
- [0019] 일부 구체예에서, 하나 또는 하나 이상의 치환은 N4K, N7R 및/또는 K18H일 수 있다.
- [0020] 일부 구체예에서, HD 펩타이드는 서열 번호: 8, 9 또는 10에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0021] 또 다른 측면으로 위에서 기술된 HD 펩타이드를 포함하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드 이량체가 제공된다. 이량체의 HD 펩타이드는 링커에 의해 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 링커는 gly-gly일 수 있다.
- [0022] 추가로 제1 HD 펩타이드 및 제2 HD 펩타이드를 포함하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드 이량체가 제공되며, 제1 및 제2 HD 펩타이드는 자연 발생적인 HD 펩타이드로부터 유래되거나 또는 제1 및 제2 HD 펩타이드는 자연 발생적인 HD 펩타이드의 역서열로부터 유래된다.
- [0023] 일부 구체예에서, HD 펩타이드 이량체는 서열 번호 5 또는 7에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 즉 gly-gly 링커에 의해 연결된 T15 또는 R24 HD 펩타이드의 이량체를 포함할 수 있다.
- [0024] 또 다른 구체예에서, HD 펩타이드 이량체는 서열 번호 11, 12, 13, 14 또는 15에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 한 구체예에서 HD 펩타이드 이량체는 서열 번호: 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 17 또는 19에 대해 80-100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0025] 발명은 본원에 기술된 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체와 융합되어 있는 항체 또는 항원 결합 단편을 추가로 제공한다. 본원에 기술된 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체를 갖는 항체는 개선된 결합 및 치료 특성을 부여하는 것으로 나타났다.
- [0026] 일부 구체예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간화된 IgG이다. 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편은 인간화된 IgG1, 인간화된 IgG4 또는 인간화된 IgG3일 수 있다.
- [0027] HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체의 적절한 부위에 위치할 수 있다. 일부 구체예에서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체 또는 항원 결합 단편의 뉴클레오타이드 친화성 부위에 융합될 수 있다. 예를 들어, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 리신, 시스테인 또는 탄수화물을 통해 융합될 수 있다.
- [0028] 일부 구체예에서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 바로 뒤에 위치한다. 대안적인 구체예에서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체의 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 C 말단의 바로 뒤에 위치한다. 대안적인 구체예에서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체의 중쇄 가변 영역의 바로 뒤에 위치한다. 대안적인 구체예에서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항체의 Fc 영역의 C 말단에 바로 위치한다.
- [0029] 본원에 기술된 항체는 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체를 그것에 콘주게이션함으로써 생성될 수 있다. 대안적으로, 항체는 재조합 항체에 의해 생성될 수 있다. 본 발명은 또한 재조합 항체 및 격자를 형성하고 그것의 표적 항원을 교차 연결시키는 자체 회합 능력을 갖는 펩타이드를 생성하는 방법에 관한 것이다. 그러한 교차 결합은 나중에 세포 신호전달, 향상된 수용체 차단, 항원/항체 복합체의 내재화 및 심지어 세포자멸사의 유도로 이어질 수 있다.
- [0030] 일부 구체예에서, HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체의 항체와의 부착 위치의 앞에는 스페이서, 예컨대 gly-gly가 선행될 수 있다.
- [0031] 항체 또는 항원 결합 단편(Fab)은 단일 사슬 항체(scFv), 이중특이적 항체(BsAbs) 또는 항체 유사 펩타이드일 수 있다.
- [0032] 일부 구체예에서, 항체는 인간화된 단클론성 항체이다. 항체는 Her-2neu 항체, 예컨대 허셉틴일 수 있다. 항체는 CD-20 항체, 예컨대 리투신(Rituxin)일 수 있다. 항체는 혈관 내피 성장 인자 항체, 예컨대 아바스틴

(Avastin)일 수 있다. 항체는 체크포인트 억제 항체, 예컨대 PD-L1일 수 있다.

- [0033] 본원에 기술된 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편, 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 추가로 제공된다.
- [0034] 본원에 기술된 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체를 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터가 추가로 제공된다. 일부 구체예에서, 발현 벡터는 항체 또는 항원 결합 단편을 암호화하는 제2 핵산 서열을 추가로 포함하여서, 제1 및 제2 핵산 서열이 발현될 때 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체 및 항체 또는 항원 결합 단편이 융합 단백질로서 발현된다.
- [0035] 본원에 기술된 발현 벡터를 숙주 세포에서 발현시키는 단계를 포함하는 상동성 이량체화(HD) 항체를 생성하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 숙주 세포는 동물 세포, 효모 세포 또는 식물 세포일 수 있다.
- [0036] 본원에 기술된 발현 벡터로 형질전환된 분리된 숙주 세포가 제공된다.
- [0037] 본원에 기술된 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체를 항체에 콘주게이션시키는 단계; 또는 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체를 가진 항체를 재조합적으로 발현시키는 단계를 포함하는, 항체의 결합 및/또는 효능을 향상시키는 방법이 제공된다.
- [0038] 본원에 기술된 항체 또는 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는, 질환 또는 병태를 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이 제공된다. 질환 또는 병태는 암(cancer), 자가면역 장애(auto-immune disorder), 염증성 장애(inflammatory disorder), 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 생착(graft) 또는 이식 거부반응으로 이루어지는 목록으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0039] 분석물을 분석물에 대해 지시된 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계로, 항체 또는 항원 결합 단편이 본원에 기술된 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체에 융합되는 것인 단계; 및 분석물 및 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체에 융합된 항체에 의해 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 샘플 중의 분석물을 검출하는 방법이 제공된다.
- [0040] 분석물에 대해 지시된 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기술된 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체에 융합된 항체 또는 항원 결합 단편; 및 분석물 검출에 사용하기 위한 지침을 포함하는, 샘플 중의 분석물을 검출하기 위한 키트가 제공된다.
- [0041] 본원에 기술된 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체에 연결된 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 파지 디스플레이 라이브러리가 제공된다.
- [0042] 본원에 기술된 항체는 치료법, 예를 들어, 질환의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 본원에 기술된 항체는 또한 진단, 예를 들어, 시험관내 진단 검정에 사용될 수 있다.
- [0043] 발명의 이 요약은 반드시 발명의 모든 특징을 기술하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 발명의 이들 및 다른 특징은 첨부된 도면을 참조하여 다음의 설명으로부터 더 분명해질 것이다:

도 1은 (좌측에서 우측으로): (A) CDR2 및 프레임워크 3을 나타내는, T15 항체의 동종친화성 도메인의 아미노산 서열(aa 50-70); (B) MPC 603 Fab 구조의 접힌 부분의 T15 서열 aa 50-70의 탄소 배경 추적; (C) T15 aa 50-70 MPC603 구조의 볼 표현; (D) 소수성(hydrophobic) 상호작용을 보여주는 T15 펩타이드의 정렬을 도시한다;

도 2는 7개 잔기의 창이 있는 Kyte-Doolittle 알고리즘을 사용하는 T15 HD 펩타이드(T15) 및 그것의 역서열(rs-T15)의 소수성 프로파일을 도시한다;

도 3은 도 2에서 프로파일링된 T15 펩타이드 및 그것의 역서열(rs-T15)의 소수성 정렬을 도시한다;

도 4는 소수성 분석, HD 활성이 없거나, 거의 없거나 또는 높은 Mopc 항체의 중쇄 CDR2/프레임워크3으로부터 유래된 3개의 생식선 서열에서의 T15 펩타이드의 아미노산에 의한 아미노산을 도시한다. **상단 펩타이드**: 회색조로 예시된 자체 결합에 기여하는 아미노산이 있는 T15 펩타이드. 개별 아미노산의 소수성 점수가 위 또는 아래에 표시된다. **중간 펩타이드**: 낮은 HD 결합, 회색조로 예시된 T15로부터의 아미노산 치환. **하단 펩타이드**: HD 결합 없음(Mpc 167), 회색조로 예시된 T15로부터의 아미노산 치환;

도 5는 비생리적 조건 하에서 4°C 및 37°C에서 G11, S107 및 G9 항체에 대한 온도 의존성 자체 회합을 도시한다

(Bryan, J.A. and Kohler, H. Physical and Biological Properties of Homophilic therapeutic Antibodies, Cancer Immunology Immunotherapy, 60: 507, 2010). 메니스커스가 위에서 아래로 수평 이동한 후 평형에 도달하는 데 필요한 시간이 측정되었다. 오차 막대는 2회 실행의 퍼센트 편차를 나타낸다;

도 6은 유동 세포분석에 의해 검출된 리톡신 및 HD-리톡신의 결합이 있는 인간 림프종 세포를 도시한다. 리톡신은 암 세포의 2개의 일차 집단을 확인하는데, 한 집단은 낮은 항원 밀도의 것이며(두 번째 화살표) 두 번째는 더 높은 밀도의 것이다(세 번째 화살표);

도 7은 리톡신 및 HD-리톡신의 보체 의존성 세포독성을 도시한다. 리톡신은 3개의 상이한 세포주(Raji, Ramon 및 JOK1)에 대한 C'MC를 상이한 항원 밀도로 매개할 수 있다(밝은 색 막대). HD-리톡신에 의한 C'MC는 상당히 향상되어 더 낮은 항체 농도에서 더 높은 수준의 사멸을 입증한다(진한 색 막대). 항체 의존성 세포 매개 세포의 세포독성(ADCC)이 또한 HD-항체로 향상된다(유사한 결과가 HD-허셉틴으로 얻어짐, 데이터 미도시).

도 8은 종양 주사 후 7일 후, 저항원 발현 유방암(MCF-7)의 누드 마우스 모델에서 허셉틴 및 HD-허셉틴의 효능을 도시한다;

도 9는 항체 R24로부터의 HD 펩타이드 서열을 도시한다. 자체 결합을 초래하는 헤어핀 루프 내에서의 아미노산의 상호작용이 또한 예시된다;

도 10은 Kyte-Doolittle 알고리즘을 사용하는 R24 HD 펩타이드(R24)의 소수성 프로파일을 도시한다;

도 11은 전자-화학발광을 사용하는(예컨대 진단용) PSA 항체의 검출을 도시한다. 그래프는 비변형 항체 대비 HD 기술에 의해 변형된 항-PSA 항체로 생성된 신호를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

다음의 설명은 바람직한 구체예에 대한 설명이다.

본 개시는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시는 인공 또는 합성 상동성 이량체화(HD) 펩타이드에 관한 것이다. 본 개시의 HD 펩타이드는 자체 회합 또는 상동성 이량체화의 개선된 생물학적 활성을 가진다.

한 측면으로 HD 펩타이드는 자연 발생적인 HD 펩타이드 또는 그것의 보존적 변이체로부터 유래되는 인공 또는 합성 HD 펩타이드일 수 있다. 예를 들어 HD 펩타이드는 상응하는 자연 발생적인 HD 펩타이드, 또는 그것의 보존적 변이체에 비해 역구성의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 한 구체예에서 인공 또는 합성 HD 펩타이드는 T15 HD 펩타이드 또는 R24 HD 펩타이드의 서열과 반대인 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

추가 측면은 개선된 자체 결합 특성을 부여하는 하나 또는 하나 이상의 치환을 포함하는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드, 또는 그것의 보존적 변이체를 제공하는 것이다. 하나 또는 하나 이상의 치환은 친수성 치환일 수 있다. 상동성 이량체화(HD) 펩타이드는 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있고 하나 또는 하나 이상의 치환은 HD 펩타이드의 소수도를 증가시킨다.

일부 구체예에서, 상동성 이량체화(HD) 펩타이드는 뉴클레오타이드 위치 4, 7, 및 18에 하나 이상의 치환을 가지는 아미노산 서열 ASRNKANDYTTTEYSASVKGRFIVSR (서열 번호: 1)을 포함할 수 있다. 위치 4의 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환은 K 또는 K의 보존된 치환일 수 있고, 위치 7의 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환은 R 또는 R의 보존된 치환일 수 있으며 위치 18의 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환은 H 또는 H의 보존된 치환일 수 있다. HD 펩타이드는 서열 번호: 8, 9 또는 10에 대해 80%-100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

또한 자연 발생적인 HD 펩타이드의 이량체, 자연 발생적인 HD 펩타이드 또는 그것의 보존적 변이체의 역서열의 이량체를 포함할 수 있는 인공 또는 합성 HD 펩타이드 이량체가 제공된다. 상동성 이량체화(HD) 펩타이드 이량체는 제1 HD 펩타이드 및 제2 HD 펩타이드를 포함할 수 있고, 제1 및 제2 HD 펩타이드는 자연 발생적인 HD 펩타이드로부터 유래되거나 또는 제1 및 제2 HD 펩타이드는 자연 발생적인 HD 펩타이드의 역서열로부터 유래된다. 이량체의 제1 및 제2 HD 펩타이드는 링커에 의해 연결될 수 있다. 이량체의 HD 펩타이드는 본원에 기술된 하나 또는 하나 이상의 치환을 추가로 포함할 수 있다. 상동성 이량체화(HD) 펩타이드 이량체는 서열 번호: 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 17 또는 19에 대해 80%-100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0052] 따라서, 인공 또는 합성 HD 이량체는 제1 HD 펩타이드 및 제2 HD 펩타이드를 포함할 수 있고, 제1, 제2 또는 제1 및 제2 HD 펩타이드는 자연 발생적인 HD 펩타이드 또는 그것의 보존적 변이체로부터 유래된다. 나아가, 인공 또는 합성 HD는 HD 이량체일 수 있고 제1 HD 펩타이드 및 제2 HD 펩타이드를 포함하며, 제1, 제2 또는 제1 및 제2 HD 펩타이드는 자연 발생적인 HD 펩타이드, 또는 그것의 보존적 변이체의 역서열로부터 유래된다. 예를 들어, 제1 및 제2 HD 펩타이드는 T15 HD 펩타이드, R24 HD 펩타이드, 역 T15 HD 펩타이드, 역 R24 HD 펩타이드 또는 이것들의 보존된 변이체로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 이량체의 제1 및 제2 HD 펩타이드는 서열 번호 5, 7, 11, 12 또는 13에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0053] 이량체 내 HD 펩타이드는 링커에 의해 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 링커는 gly-gly일 수 있다.
- [0054] 본 개시는 본원에 기술된 HD 펩타이드 및/또는 HD 이량체를 포함하는 융합 단백질(예컨대 화학적으로 콘주게이션되거나 재조합된 항체)을 추가로 제공한다. 융합 단백질은 면역글로불린 구성요소 또는 항체를 포함할 수 있고 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 재조합체이거나 또는 HD 펩타이드 또는 HD 펩타이드 이량체는 항원 결합을 파괴하지 않고 HD 펩타이드 서열에서 바람직한 형태적 변화를 허용함으로써 이량체화 활성을 부여하는 방식으로 그것에 콘주게이션될 수 있다. 본원에 개시된 HD 펩타이드 및 HD 펩타이드 이량체는 치료 항체의 효능을 향상시키거나 진단과 같은 다른 적용을 위해 결합 민감도 및/또는 결합력을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0055] "자가친화성"으로도 언급되는 용어 "상동성 이량체화"는 자체 회합하는 실체를 기술하는 것이다. 예를 들어, "동종이량체화 항체" 또는 "자가친화성 항체"는 자체 결합하는 항체이다. 용어 "상동성 이량체화(HD) 펩타이드" 또는 "자가친화성 펩타이드"는 예컨대 항체 또는 다른 면역글로불린의 자체 회합 또는 자체 결합을 가능하게 하는 펩타이드이다.
- [0056] 용어 "자연 발생적인 HD 펩타이드" 또는 "천연 HD 펩타이드"는 자연에서 발견되는 HD 펩타이드를 지칭한다. 예를 들어, "T15"는 항-포스포틸콜린 항체를 지칭하며 T15 HD 펩타이드는 아미노산 서열 SRNKANDYTTSEYASVKGRIIVSR (서열 번호 1)을 갖는 T15 항체에서 발견되는 HD 펩타이드를 지칭한다. "R24"는 다 이시알로강글리오시드 GD3(J. Biol. Chem 374: 5597-55604, 1999)를 인식하는 항체를 지칭하며 R24 HD 펩타이드는 아미노산 서열 VAYISSGGSSINYA (서열 번호 3)를 갖는 R24 항체에서 발견되는 HD 펩타이드를 지칭한다.
- [0057] HD 펩타이드 서열과 관련하여 용어 "역 구성" 또는 "역서열"은 자연 발생적인 HD 펩타이드의 아미노산 서열이 역 순서로 있는, 즉 N-말단이 C-말단이 되고 C-말단이 N-말단이 되는 것을 의미한다. 역서열은 펩타이드 또는 단백질 서열을 역으로 읽음으로써 얻어질 수 있다. 역으로 읽힌 서열(레트로 서열)은 새로운 펩타이드(레트로 펩타이드) 또는 단백질 서열(레트로 단백질)이다.
- [0058] 용어 "항체"는 일반적으로 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 분자 또는 임의의 기능성 조합 또는 항원 결합 부위를 함유하는 그것의 단편, 예컨대 항원 결합 단편(Fab)을 지칭한다. 항체는 바람직하게는 단백질, 당단백질, 다당 또는 탄수화물과 같은 막 구조, 및 정상 세포 또는 종양 세포 상에 있는 세포 수용체에 대해 특이적이다. 항체는 전장 면역글로불린 분자이거나 항체의 가변 도메인 단편일 수 있다. 용어 "항체"는 나노바디, 이중특이적 항체 및 디아바디, Fv 및 Fab, F(ab)₂, 낙타과 및 다른 항원 결합 스캐폴드를 아우른다.
- [0059] 용어 "키메릭"은 상이한 유전적 공급원 또는 종으로부터의 구성요소의 조합을 지칭한다. 예를 들어 본 개시에 따르는 키메릭 항체는 하나의 항체로부터의 면역글로불린 부분 및 본원에 기술된 HD 펩타이드를 포함할 수 있다. 키메릭 항체에는 또한 둘 이상의 공급원으로부터 유래된 면역글로불린 부분 및 HD 펩타이드가 포함될 수 있다.
- [0060] 아미노산 서열과 관련하여 "보존적 변이체"는 하나 이상의 보존적 치환이 있는 아미노산 서열의 변이체를 지칭한다.
- [0061] 본원에서 사용되는 바, 용어 "보존된 치환" 또는 "보존적 치환" 및 이것의 문법적 변용은 기술된 치환 또는 기술된 잔기와 상이하지만 기술된 치환 또는 기술된 잔기와 동일한 부류의 아미노산에 있는 HD 펩타이드의 서열의 아미노산 잔기의 존재를 지칭한다(즉, 비극성 잔기를 대체하는 비극성 잔기, 방향족 잔기를 대체하는 방향족 잔기, 극성 비전하 잔기를 대체하는 극성 비전하 잔기, 대전된 잔기를 대체하는 대전된 잔기). 더불어, 보존적 치환은 야생형 잔기를 대체하는 잔기와 동일한 기호 및 일반적으로 유사한 크기의 계면 소수도 값을 갖는 잔기를 포함할 수 있다.
- [0062] 본원에서 사용되는 바, 용어 "비극성 잔기"는 글리신(G, Gly), 알라닌(A, Ala), 발린(V, Val), 류신(L, Leu),

아이소류신(I, Ile), 및 프롤린(P, Pro)을 지칭하며; 용어 "방향족 잔기"는 페닐알라닌(F, Phe), 티로신(Y, Tyr), 및 트립토판(W, Trp)을 지칭하고; 용어 "극성 비전하 잔기"는 세린(S, Ser), 트레오닌(T, Thr), 시스테인(C, Cys), 메티오닌(M, Met), 아스파라긴(N, Asn) 및 글루타민(Q, Gln)을 지칭하며; 용어 "대전된 잔기"는 음전하의 아미노산인 아스파르트산(D, Asp) 및 글루탐산(E, Glu), 뿐만 아니라 양전하의 아미노산인 리신(K, Lys), 아르기닌(R, Arg), 및 히스티딘(H, His)을 지칭한다. 아미노산의 다른 분류는 다음과 같을 수 있다:

- [0063] 소수성 측쇄를 가진 아미노산(지방족): 알라닌(A, Ala), 아이소류신(I, Ile), 류신(L, Leu), 메티오닌(M, Met) 및 발린(V, Val);
- [0064] 소수성 측쇄를 가진 아미노산(방향족): 페닐알라닌(F, Phe), 트립토판(W, Trp), 티로신(Y, Tyr);
- [0065] 극성 중성 측쇄를 가진 아미노산: 아스파라긴(N, Asn), 시스테인(C, Cys), 글루타민(Q, Gln), 세린(S, Ser) 및 트레오닌(T, Thr);
- [0066] 전기적으로 대전된 측쇄를 가진 아미노산(산성): 아스파르트산(D, Asp), 글루탐산(E, Glu);
- [0067] 전기적으로 대전된 측쇄를 가진 아미노산(염기성): 아르기닌(R, Arg); 히스티딘(H, His); 리신(K, Lys), 글리신(G, Gly) 및 프롤린(P, Pro).
- [0068] 보존적 아미노산 치환은 결과적으로 생성된 HA 단백질 변이체 또는 변형된 HA 단백질의 활성에 원래의 치환 또는 변형과 유사한 효과를 나타낼 가능성이 있다. 보존적 치환에 대한 추가 정보는, 예를 들어, 참고문헌[Ben Bassat et al. (J. Bacteriol, 169:751-757, 1987), O'Regan et al. (Gene, 77:237-251, 1989), Sahin-Toth et al. (Protein Sci, 3:240-247, 1994), Hochuli et al (Bio/Technology, 6:1321-1325, 1988)] 및 널리 사용되는 유전학 및 분자 생물학 교재에서 찾아볼 수 있다.
- [0069] 블로섬 매트릭스는 일반적으로 폴리펩타이드 서열의 관련성을 결정하기 위해 사용된다. 블로섬 매트릭스는 신뢰할 수 있는 정렬의 대규모 데이터베이스(BLOCKS 데이터베이스)를 사용하여 생성되었고, 일부 한계값 백분율 동일성 미만으로 관련된 쌍별 서열 정렬이 계수되었다(Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919, 1992). BLOSUM90 매트릭스의 고도로 보존된 표적 빈도에 대해 90% 동일성의 한계값이 사용되었다. BLOSUM65 매트릭스에 대해서는 65% 동일성의 한계값이 사용되었다. 블로섬 매트릭스에서 0 및 0을 초과하는 점수는 선택된 백분율 동일성에서 "보존적 치환"으로 간주된다. 다음의 표는 예시의 보존적 아미노산 치환을 보여준다: 표 1.

표 1

예시의 보존적 아미노산 치환.

원래의 잔기	매우 고도로 보존된 치환	고도로 보존된 치환 (Blosum90 매트릭스로부터)	보존된 치환 (Blosum65 매트릭스로부터)
Ala	Ser	Gly, Ser, Thr	Cys, Gly, Ser, Thr, Val
Arg	Lys	Gln, His, Lys	Asn, Gln, Glu, His, Lys
Asn	Gln; His	Asp, Gln, His, Lys, Ser, Thr	Arg, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr
Asp	Glu	Asn, Glu	Asn, Gln, Glu, Ser
Cys	Ser	None	Ala
Gln	Asn	Arg, Asn, Glu, His, Lys, Met	Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser
Glu	Asp	Asp, Gln, Lys	Arg, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Ser
Gly	Pro	Ala	Ala, Ser
His	Asn; Gln	Arg, Asn, Gln, Tyr	Arg, Asn, Gln, Glu, Tyr
Ile	Leu; Val	Leu, Met, Val	Leu, Met, Phe, Val
Leu	Ile; Val	Ile, Met, Phe, Val	Ile, Met, Phe, Val
Lys	Arg; Gln; Glu	Arg, Asn, Gln, Glu	Arg, Asn, Gln, Glu, Ser,
Met	Leu; Ile	Gln, Ile, Leu, Val	Gln, Ile, Leu, Phe, Val
Phe	Met; Leu; Tyr	Leu, Trp, Tyr	Ile, Leu, Met, Trp, Tyr
Ser	Thr	Ala, Asn, Thr	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Lys, Thr
Thr	Ser	Ala, Asn, Ser	Ala, Asn, Ser, Val
Trp	Tyr	Phe, Tyr	Phe, Tyr
Tyr	Trp; Phe	His, Phe, Trp	His, Phe, Trp
Val	Ile; Leu	Ile, Leu, Met	Ala, Ile, Leu, Met, Thr

- [0070]
- [0071] 이론에 얽매이지 않고, 소수도를 증가시키으로써(개별 아미노산에 대해 소수성 지수를 사용함으로써) 결합 수준

이 증가될 것인 반면, 소수도의 감소를 자체 결합을 감소시킬 것으로 여겨진다.

[0072] 일부 구체예에서, HD 펩타이드 서열은 본원에 기술된 HD 항체의 교차 결합 잠재력을 향상시키기 위해 변형될 수 있다. 한 구체예에서, 그러한 기능적으로 향상된 펩타이드는 주형 서열 내의 각 아미노산 위치에서의 치환이 있는 일련의 합성 펩타이드를 생성한 후 이 펩타이드 라이브러리를 자가친화성 결합 또는 원래의 펩타이드 서열에 대한 결합에 대해 테스트함으로써 결정된다. 원래의 서열에 대해 월등하게 결합하는 그런 펩타이드는 그런 후 면역글로불린에 콘주게이션되고 결과적으로 생성된 콘주게이트는 효능, 특이성, 및 원치 않는 응집 유도 능력에 대해 테스트된다. 한 특정 구체예에서, T15 펩타이드 서열은 변경되고 변형된 서열은 향상된 기능을 위해 선택된다. 발명의 또 다른 구체예에서, 펩타이드의 자체 결합 잠재력은, 예컨대 미국 특허 제 4,863,857호(Blalock 등에게 발행됨)에서 기술된 것과 같이 서열의 상보성을 증가시킴으로써 향상될 수 있다. 펩타이드의 자체 결합 잠재력 및/또는 내성은 또한 비인간 동물로부터 유래된 자체 결합 펩타이드 서열을 인간화함으로써 향상될 수 있다. 펩타이드 서열을 인간화하는 것은 인간에서 발현 또는 기능을 위해 서열을 최적화하는 것을 포함한다. 펩타이드 및 단백질을 인간화하는 예 및 방법은 다른 곳에서 기술되었다(Roque-Navarro et al., 2003; Caldas et al., 2003; Leger et al., 1997; Isaacs and Waldmann, 1994; Miles et al. 1989; Veeraraghavan et al., 2004; Dean et al., 2004; Hakenberg et al., 2003; Gonzales et al., 2004; 및 H. Schellekens, 2002).

[0073] 용어 "발현 구성물"은 발현될 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함한 재조합 핵산 서열을 지칭한다. 발현될 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 핵산은 발현될 펩타이드 또는 단백질의 발현을 용이하게 하는 하나 이상의 조절 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 핵산 서열은 그것이 기능적인 관계에 있을 때 작동 가능하게 연결된다. 조절 핵산 서열은 예시적으로 프로모터, 인핸서, DNA 및/또는 RNA 중합효소 결합 부위, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 신호, 전사 시작 부위, 전사 종결 부위 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)이다. 발현 구성물은 벡터, 예컨대 발현 벡터 및/또는 클로닝 벡터에 통합될 수 있다. 용어 "벡터"는 핵산의 전달을 위한 재조합 핵산 비히클을 지칭한다. 예시의 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지이다. 특정 벡터가 기술분야에 알려져 있고 기술분야에 숙련된 사람은 특정 목적에 적절한 벡터를 인지할 것이다.

[0074] 상동성 이량체화(HD) 펩타이드

[0075] 본 출원은 자체 결합이 개선된 상동성 이량체화(HD) 펩타이드를 기술하며 T15 및 R24 HD 펩타이드로 예시된다(실시예 1 참고). T15 펩타이드 및 다른 HD 펩타이드의 자체 결합 및 소수성 특성의 분석으로 개선된 자체 결합으로 이어질 수 있는 아미노산 치환을 예측하는데 유용한 모티프가 생성되었다.

[0076] 본원에 기술된 예시의 상동성 이량체화 펩타이드를 아래의 표 2에 요약한다.

표 2

자가친화성/상동성 이량체화(HD) 서열

서열 번호	HD 펩타이드 명칭	유래	서열
1	T15	T15 항-포스포릴 콜린	ASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSR*
2	항바이러스 펩타이드	CR3014 항-SARS	RIRNQAYSYTEYAASVKGRFTISR**
3	R24(짧은)	R24 항-다이시알로강글리 오시드	VAYISSGGSSINYA
4	rs-T15	T15 항-포스포릴 콜린	RSVIFRGKVSASYETTYDNAKNRSA
5	rs-T15 이량체(rs-GG-rs)	T15 항-포스포릴 콜린	RSVIFRGKVSASYETTYDNAKNRSAAGRSVIFRGKVSASYETTYDNAKNRSA
6	rs-R24	R24 항-다이시알로강글리 오시드	AYNISSGGSSIYAY
7	rs-R24 이량체(rs-GG-rs)	R24 항-다이시알로강글리 오시드	AYNISSGGSSIYAYGGAYNISSGGSSIYAY
8	T15-var1	T15 항-포스포릴 콜린	ASRKKANDYTTEYSASVKGRFIVSR
9	T15-var2	T15 항-포스포릴 콜린	ASRNKARDYTTEYSASVKGRFIVSR
10	T15-var3	T15 항-포스포릴 콜린	ASRNKANDYTTEYSASVHGRFIVSR
11	T15-var1 이량체	T15 항-포스포릴 콜린	ASRKKANDYTTEYSASVKGRFIVSRGGASRKKANDYTTEYSASVKGRFIVSR
12	T15-var2 이량체	T15 항-포스포릴 콜린	ASRNKARDYTTEYSASVKGRFIVSRGGASRNKARDYTTEYSASVKGRFIVSR
13	T15-var3 이량체	T15 항-포스포릴 콜린	ASRNKANDYTTEYSASVHGRFIVSRGGASRNKANDYTTEYSASVHGRFIVSR
14	T15 이량체		ASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSRGGASRNKANDYTTEYSASVKGRFIVSR
15	R24 이량체(짧은)		VAYISSGGSSINYAGGVAYISSGGSSINYA
16	R24(긴)		GAAYISSGGSSINYA
17	R24 이량체(긴)		GAAYISSGGSSINYAGGAAYISSGGSSINYA
18	rs-R24(긴)		AYNISSGGSSIYAVAAG
19	Rs-R24 이량체(긴)		AYNISSGGSSIYAVAAGGAYNISSGGSSIYAVAAG

[0077]

[0078] *YTTEY(서열 번호: 1에서 진한 글씨)는 잠재적 힌지 영역을 나타낸다

[0079] **서열 번호 2는 추정되는 자연적인 자체 결합 항체이다. 서열은 본 개시에서 개시된 것과 같이 소수도 모티프에 의해 향상될 수 있다.

[0080] 면역글로불린 구성요소의 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 본 발명의 특정 구체예에서 본원에 개시된 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 및 보다 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 % 동일한 아미노산 서열을 가지며, 실질적으로 동일한 단백질은 그것과 실질적으로 동일한 참조 단백질에 비교하여 실질적으로 유사하거나 더 나은 기능을 유지한다. 기술분야에 숙련된 사람이 인지하게 되는 것과 같이, 유전자 코드의 축퇴성은 하나 이상의 핵산이 특정 면역글로불린 구성요소를 암호화할 것이고 이들 대체 서열이 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주되도록 하는 것이다.

[0081] 서열 번호 4 및 8-10의 25량체에 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 확인된 자가친화성 아미노산 서열의 20개 이상의 연속 아미노산에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 및 보다 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 적어도 20개의 연속 아미노산, 보다 바람직하게는 적어도 22개의 연속 아미노산을 가진다. 서열 번호 3 및 6의 14량체에 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 확인된 자가친화성 아미노산 서열의 10개 이상의 연속 아미노산에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 및 보다 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 적어도 10개의 연속 아미노산, 보다 바람직하게는 적어도 8개의 연속 아미노산을 가진다. 동일한 내용이 예컨대 서열 번호 5, 7 11, 12 및 13의 HD-이량체의 각각의 아미노산 서열에 적용된다. 링커는 반드시 gly-gly일 필요는 없고 임의의 다른 적당한 링커일 수 있다.

[0082] 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19의 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 및 보다 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 또는 그 사이의 임의의 양의 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 가지는 아미노산 서열.

- [0083] 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 하나 이상의 보존적 치환을 포함할 수 있고 보존적 변이체로서 언급될 수 있다. 본원에 기술된 HD 펩타이드에 실질적으로 동일한 펩타이드는 그것과 실질적으로 동일한 참조 자가친화성 펩타이드와 비교하여 실질적으로 유사한 또는 더 나은 자가친화성 기능을 유지한다.
- [0084] 동중이량체화 항체(또한 자가친화성, 자체 결합 항체 또는 HD 항체로도 언급됨)
- [0085] 본 개시는 상응하는 항원에 대한 항체 특이성을 변경하지 않으면서 항체의 생물학적 및 면역학적 활성을 향상시키는 항체-펩타이드 융합 단백질의 생성을 기술한다. 구체적으로, 본 개시는 T15로부터 유래된 완전한 또는 부분적인 자가친화성 24량체 펩타이드 또는 R24로부터 유래된 17량체 펩타이드를 함유하는 항체 융합 단백질의 생성을 제공한다. HD 펩타이드는 이량체로서 또는 친수성 치환이 있는 역 구성으로 제공될 수 있다.
- [0086] 임의의 항체로부터의 CDR은 여기에 기술된 펩타이드/항체 복합체에 사용될 수 있다. 바람직한 항체는 면역 조절 또는 체크포인트 억제제에 결합하는 것이다. 예를 들어 CDR 서열은 PD-1/PD-1L 또는 CTLA-4에 특이적인 항체를 암호화하고 T 세포 활성화에 대한 활성을 발현할 수 있다. 펩타이드 길이에 대한 임의의 제한은 펩타이드 합성과 관련된 실제적인 제한이며 개시의 방법의 실시와 관련된 제한은 아니다. 다른 바람직한 CDR 서열은 리톡신, 허셉틴 및/또는 아바스틴과 같은 FDA 승인 항체로부터 기원한다.
- [0087] 재조합 단클론성 항체는 면역원성을 감소시킬 일차 목적으로 인간 항체 프레임워크에 삽입된 비인간 중(전형적으로 마우스)의 CDR(항원 결합 서열)에 대한 유전자로 생성되었다. 비록 이들 재조합 항체가 이펙터 세포 및 인간 보체와 상호작용하는 능력을 갖지만, 있다면 치료 활성은 보통 항원/항체 상호작용의 본질로 인해 원래의 CDR 서열로부터 부여된다.
- [0088] 항체에 부착된 HD 펩타이드는 표적에 결합된 항체뿐만 아니라 다른 표적 결합 항체와 상호작용하는 자체 결합에 의해서만 결합된 항체 둘 다를 포함한 세포 표면에서 격자의 형성을 허용한다. 이것은 세포 표면 항원의 격자 형성 및 교차 결합을 허용할뿐만 아니라 항원 에피토프에 결합된 항체의 전형적인 1:1 비율보다 더 높은 비율을 허용한다. 유세포 분석 분석을 기반으로 하여 이 비율은, 적어도 일부 항원-항체 시스템에서는, 50-100배 정도로 높을 수 있다. 실제로, 이것은 HD 변형 항체의 결합을 크게 증가시켰고, HD 항체의 특징이며 재조합 및 화학적으로 콘주게이션된 항체의 평가를 위한 초기 검정으로서 사용된다.
- [0089] 항체가 자체 회합하고, 격자를 형성하며 표적 항원과 교차 결합하는 것을 허용하는 상동성 이량체화 서열(HD)의 발견은 항원 결합 CDR 서열과 무관한 재조합 단클론성 항체에 대한 치료 활성을 부여하는 기회를 제공하며 그러므로 많은 항원/항체 시스템에 적용할 수 있다. 그러한 펩타이드 서열은 이전에 뉴클레오타이드 결합 부위를 통해 항체에 화학적으로 콘주게이션되었고 융합 단백질의 Fc 영역의 C-말단에 삽입되었다. 전자의 방법론은 부위 특정 방식으로 HD 펩타이드의 항체로의 삽입을 허용하지만 확장 가능한 제조 공정은 아니다. 후자의 접근법은 대조적으로 확장 가능하지만 최적의 활성을 허용하지는 않는다. 항체에서의 최적 HD 활성을 위해, 펩타이드는 인접한 항체 상의 HD 펩타이드와 다중 아미노산 위치에서 상호작용할 필요가 있다. 이런 자체 결합은 HD 펩타이드의 C-말단 근처에서 펩타이드가 헤어핀 구조를 형성하려는 경향에 의해 감소될 수 있다. 예상치 못하게, 예컨대 HD 펩타이드에서 아미노산의 순서를 반전시킴으로써, 펩타이드의 위치와 관련하여 세심한 선택에 의해 HD 펩타이드 서열은 항원 결합의 손실 또는 이펙터 기능의 감소 없이 또는 부위 특정 콘주게이션에 의해 재조합 항체에 또는 부위 특정 콘주게이션에 의해 삽입될 수 있는 것으로 나타났다. Fc 영역의 C-말단 상으로의 삽입시 HD 활성의 손실 문제인 이전의 재조합 항체 접근법은 HD 펩타이드의 C-말단이 그것의 바람직한 헤어핀 구조를 형성하는 것을 허용하지 않는 정상 서열 순서(N-말단에서 C-말단 쪽으로)를 반전시킴으로써 극복되었다. 유사한 결과가 또한 HD 펩타이드를 정방향 또는 역방향 구성으로 이량체화하고, 2개의 HD 펩타이드를 gly-gly와 같은 링 커로 연결함으로써 이루어질 수 있었다.
- [0090] HD 기술을 원형적 인간 또는 인간화된 IgG1 항체 형태 이외의 다른 항체 형태에 통합시키는 것은 크게 향상된 결합으로 인해 그것의 치료 또는 진단 활성을 개선시킬 것이다. 그러한 항체 형태에는 한정하는 것은 아니지만 나노바디, 이중특이적 항체 및 디아바디, Fv 및 Fab, F(ab)₂, 낙타과 및 다른 항원 결합 스캐폴드가 포함된다 (Reviewed in: Hoglan Yu, Abhishek Saxena, Sachdev S. Sidhu, Donghui Wu, Frontiers of Immunology 8: Article 38, 2017).
- [0091] 혈청 반감기, 항체 의존성 세포의 세포독성, 보체 결합 또는 보체 매개 사멸을 증가 또는 감소시키기 위하여 Fc 영역 내에서 변형된 재조합 항체 형태의 그룹은 또한 HD 기술을 통해 증가된 항원 결합이 치료 또는 진단 활성을 향상시킬 수 있는 항체 형태를 나타낸다(Reviewed in: Abhishek Saxena & Donghui Wu, Frontiers in Immunology, 7: Article 580, 2016). 본 발명의 재조합 항체 형태는 이들 참조된 형태에 의해 제한되지

않는다.

[0092] 본 발명에 따르는 항체는 그것의 표적 항원에 대한 첫 번째 결합 후에만 자발적으로 자체 결합할 수 있다. 본 발명의 동중이량체화 항체는 그것의 표적 항원(들), 보통 세포 표면, 경막 수용체(들)에 결합할 때 다른 그러한 콘주게이션된 항체와 바람직하게 비공유적으로 결합한다.

[0093] 본 발명의 동중이량체화 항체는 HD 펩타이드 서열을 갖는 하나 이상의 펩타이드와 콘주게이션된 항체를 전형적으로 포함한다. 발명의 동중이량체화 항체는 실제로 임의의 면역글로불린을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 항체는 질환 또는 장애에 포함된 표적에 결합하며, 표적의 결합은 질환 또는 장애에 대해 치료 효과를 가진다. 표적 항원에는 경막 수용체를 포함하여 세포 표면 항원이 포함될 수 있다. 특정 구체예에서, 항체의 Ig 구성 요소는 단클론성 항체를 포함할 수 있다.

[0094] 본 발명은 회귀하고, 자연 발생적이며, 자가친화성 항체의 자체 결합 특성을 모방하는 자체 결합 특성을 갖는 항체를 제공한다. 발명은 그로써 항체의 치료 잠재력을 향상시키기 위해 지정된 공유 이량체화 및 다른 조작 접근법에 대한 간단하고 매력적인 대안을 제공한다.

[0095] 발현 시스템

[0096] 발명은 항원 결합 도메인 및 HD 펩타이드를 가지는 면역글로불린 중쇄를 암호화하는 발현 벡터로 형질전환된 분리된 숙주 세포를 제공한다. 특정 구체예에서, 분리된 숙주 세포는 또한 항원 결합 도메인을 갖는 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 발현 벡터로 형질전환되고 면역글로불린 중쇄의 항원 결합 도메인 및 면역글로불린 경쇄의 항원 결합 도메인은 함께 항원 결합 부위를 형성한다. 본 발명의 재조합 자가친화성 항체를 생성하기 위한 분리된 숙주 세포는 시험관내에 있을 수 있다. HD 항체 발현을 위한 발현 시스템에는 예시적으로: 포유류 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 효모, 및 양서류 세포와 같은 진핵 세포; 및 박테리아와 같은 원핵 발현 시스템이 포함된다. 기술분야에 숙련된 사람은 재조합 HD 항체를 생성하는데 사용하기 위한 특정 발현 시스템을 선택할 수 있다.

[0097] HD 펩타이드의 위치

[0098] US 특허 공보 제20030103984호에서 알 수 있는 것과 같이, 이전에는 Fc 영역의 c-말단 상에 HD 펩타이드 서열을 삽입하는 것만이 실용적인 것으로 여겨졌다. 이것은 mAb의 다른 영역에 HD 펩타이드의 삽입이 항원 결합 또는 ADCC 또는 보체 결합과 같은 잠재적 치료 활성을 감소 또는 파괴시킬 것이라는 문제로 인한 것이었다. 실제로, 공개된 데이터는 합성되고 검정될 때 T15 항체로부터 유래된 24량체 HD 서열이 3차원 형태를 발현하는 것을 나타낸다; 그것을 항체에 암호화하는 것은 펩타이드의 그 3D 구조를 무효화할뿐만 아니라 근처의 CDR의 항원 결합을 손상시킬 수 있다. 비록 Fc 말단 구성물에서 자체 회합 활성이 뉴클레오타이드 친화성 부위 화학적 콘주게이트와 비교하여 기술되었지만(Kohler, H, Rector, K & Amick J., Hybridoma 2012 (6): 395-402), 활성은 감소되었다(데이터 미도시).

[0099] 발명의 바람직한 구체예에서, HD 펩타이드는 항체, 예컨대 IgG 내의 3개 위치 중 하나에 국지화된다.

[0100] 첫 번째는 중쇄 또는 경쇄의 CDR3 바로 뒤이다. 이 형태에서, Ig 분자는 gly-gly 또는 유사한 스페이스가 앞에 있는 가장 c-말단 부분에서 본원에 기술된 임의의 최적화된 구성에 암호화된 HD 펩타이드가 있는 단일 사슬 Fv로서 발현될 수 있다. 항체의 항원 결합 부분의 근접성에도 불구하고 이 위치는 항원 결합의 감소 없이 최대 자체 회합을 부여할 수 있다. 이 위치에서 항원 결합의 보유는 전체적으로 예상하지 못했던 것인데, 원기술의 발명자인 우리는 이것을 불가능한 것으로 간주하여 실제로 이전에 서열을 전체 IgG의 Fc 영역의 c-말단에 연결하였고 - 이것은 우리가 항원 결합을 자체 회합으로부터 분리할 수 있었던 가장 먼 곳이었기 때문이다.

[0101] 제2 부위는 gly-gly 스페이스가 앞에 있는 중쇄 또는 경쇄 불변 영역에 대해 바로 c-말단에 있다. 이 형태에서, Fab는 또한 표적 항원에 대한 결합에 대해 검정된 나이브 또는 면역화된 파지 발현 라이브러리의 일부분일 수 있다. HD 펩타이드를 사용하면 심지어 저친화성 항체의 향상된 결합 및 확인이 허용될 것이다.

[0102] 제3 부위는 HD 서열이 gly-gly 또는 다른 스페이스가 앞에 있는 Fc 영역의 c-말단 상에 클로닝되는 부위이다. HD 펩타이드가 정상적인 또는 역 구성의 HD 펩타이드의 이량체인 구체예에서, gly-gly 또는 대체 스페이스에 의한 2개의 HD 펩타이드의 분리는 입체적인 역제를 극복하기 위해 항체 c-말단 구성물과 특히 관련이 있다. 초기 테스트에서 HD 펩타이드의 이 형태는 상호작용에 대해 더 높은 열망을 가진다.

[0103] 동중이량체화(자가친화성) 항체의 제조 방법

- [0104] 다양한 부위 특정 화학적 콘주게이션 방법에 의해 생성된 HD 펩타이드 변형 항체는 또한 전체 활성, 자체 결합 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. HD 펩타이드를 항체 분자에 부착하기 위한 수많은 방법이 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려질 것이다. 한 방법은 화학적 교차결합을 사용하는 것으로, 예컨대 미국 특허 공보 제 20040185039호에서 기술된 친화성-교차결합 방법이다. 그러한 방법은 Fab의 중쇄 단부에 국지화된 항체의 뉴클레오타이드 결합 부위에 펩타이드를 연결할 수 있다는 사실로 인해 초기에 채택되었다. 이 친화성 부위는 결합 친화성을 감소시키지 않으면서 펩타이드의 삽입을 허용하고 펩타이드의 자체 회합 활성을 유지한다. HD-펩타이드의 탄수화물에 대한 콘주게이션과 비교할 때, 항원 결합 영역 근처의 그러한 부위 특정 콘주게이트는, 탄수화물을 통한 콘주게이션이 더 많은 펩타이드가 항체에 결합하는 것을 초래했을지라도 더 활성이었다(J. Immunol Methods: (2005) 304: 100-106, Photo-activated affinity-site cross-linking of 항체 using tryptophan containing peptides, Mike Russ, Dingyuan Lou, Heinz Kohler). 그러나, 방법론의 요소, 즉 광활성화 단계로 인해, 이 방법에 대한 결합에 대한 제조 공정은 확장되지 못하고 소량의 콘주게이트를 생성하는데에만 유용하다.
- [0105] 부위 특정 콘주게이션의 두 번째 방법은 항체-약물 콘주게이트(ADC)와 함께 사용하기 위해, 즉 Smartag 기술을 위해 개발되었다(Wu, P., et al., Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using for genetically encoded aldehyde tag. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(9): p. 3000-5.). HD 펩타이드와 함께 그러한 기술 또는 유사한 부위 특정 기술의 사용은 확장성의 문제를 극복할 수 있었다.
- [0106] 대안적으로, 제조합 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체를 암호화하는 핵산 서열 및 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 융합 유전자가 제조될 수 있고, 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열은 항체를 암호화하는 핵산 서열 내부에서, 융합이 발현될 때 그로써 생성되는 융합 단백질이 항체와 펩타이드를 포함하는 부위에 위치하며, 펩타이드는 항체의 항원 결합, 및 융합 유전자가 융합 단백질을 생성하는 발현을 간섭하지 않는 부위에서 항체에 연결된다. 특히, 융합 단백질은 항체를 암호화하는 유전자를 제공함으로써 생성될 수 있고, 유전자는 제한 부위를 함유하도록 돌연변이되며, 제한 부위는 항체의 CDR3에 대해 바로 C-말단이거나, 또는 중쇄 가변 영역에 대해 바로 c-말단 또는 항체의 c-말단 상에 위치한다. 마우스 또는 다른 인간 또는 비인간 공급원과 HD-펩타이드를 암호화하는 인간 IgG 프레임워크와의 CDR 스와핑에 의해 생성된 인간화된 항체는 융합 유전자에 의해 발현될 수 있다.
- [0107] 융합 단백질을 생성하는 방법은, 예를 들어, 다음의 미국 특허에서 기술된다: Mascarenhas 등에 부여된 미국 특허 제 5,563,046호; Fell, Jr.에 부여된 미국 특허 제 5,645,835호; Murphy에 부여된 미국 특허 제 5,668,225호; Nemazee에 부여된 미국 특허 제 5,698,679호; Whitlow 등에 부여된 미국 특허 제 5,763,733호; Quertermous 등에 부여된 미국 특허 제 5,811,265호; Chang 등에 부여된 미국 특허 제 5,908,626호; Bona 등에 부여된 미국 특허 제 5,969,109호; Epstein 등에 부여된 미국 특허 제 6,008,319호; Seed에 부여된 미국 특허 제 6,117,656호; Whitlow 등에 부여된 미국 특허 제 6,121,424호; Ledbetter 등에 부여된 미국 특허 제 6,132,992호; Huston 등에 부여된 미국 특허 제 6,207,804호; 및 Segal에 부여된 미국 특허 제 6,224,870호. Methods of creating Ig 융합 단백질을 생성하는 방법은, 예를 들어, 문헌[Antibody Engineering, 2nd Edition. ed.: Carl A. K. Borrebaeck, Oxford University Press 1995, 및 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Ed., Cold Spring Harbor Press, 1989]에서 기술된다.
- [0108] 특정 구체예에서, 본원에 기술된 HD 펩타이드, 또는 실질적으로 동일한 HD 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 면역글로불린 중쇄 및/또는 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 DNA와 한 프레임에 삽입된다. DNA 서열로부터 발현된 융합 단백질(또는 HD 항체)은 상기 HD 펩타이드를 갖는 면역글로불린 중쇄 및/또는 면역글로불린 경쇄를 함유한다.
- [0109] 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 핵산은 잘 알려져 있고 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 핵산 중 임의의 것이 본 발명의 제조합 키메라 HD 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 인간 불변 중쇄 및/또는 인간 불변 경쇄, 특히 인간 감마 불변 중쇄 및 인간 카파 불변 경쇄를 암호화하는 특정 핵산이 본원에 기술된다. 인간 감마 불변 중쇄 및/또는 인간 카파 불변 경쇄를 암호화하는 핵산, 예컨대 벡터 pAc-k-CH3은 상업적 공급원으로부터, Progen Biotechnik GmbH로부터 얻어질 수 있다. 인간 감마 불변 중쇄 및/또는 인간 카파 불변 경쇄를 포함하는, 본원에 기술된 단백질 및/또는 펩타이드를 암호화하는 핵산은 클로닝 또는 합성에 의해서와 같이 제조합 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 특정 면역글로불린 불변 중쇄 및/또는 면역글로불린 카파 불변 경쇄가, 예를 들어, 미국 특허 제 5,736,137호 및 제 6,194,551호에서 기술된다.

[0110] IgG 융합 단백질

[0111] Ig 융합 단백질은 항체 조합 특이성 및/또는 항체 이펙터 기능을 독특한 특성에 기여하는 분자와 연결시키는 장점을 가진다. 이런 단백질 패밀리를 생성하는 능력은 먼저 c-myc가 항체 분자의 Fc에 대해 치환되었을 때 입증되었지만(Neuberger M S, Williams G T and Fox R O. Nature 125:604, 1984), 현재는 많은 예가 존재한다. Ab 융합 단백질은 여러 상이한 방식으로 이루어질 수 있다. 한 접근법에서 비-Ig 서열이 가변 영역에 대해 치환되고; V 영역을 대체하는 분자는 이펙터 기능 및 개선된 약동학과 같은 특성에 기여하는 항체를 사용하여 표적화하는 특이성을 제공한다. 예로는 IL-2 및 CD4를 들 수 있다. 대안적으로, 비-Ig 서열은 불변 영역에 대해 치환되거나 불변 영역에 부착될 수 있다. 결과적으로 생성된 분자는 원래의 항체의 결합 특이성을 유지하지만 부착된 단백질로부터의 특징을 획득한다. 치환 위치에 따라, 상이한 항체 관련 이펙터 기능 및 생물학적 특성이 유지될 것이다.

[0112] IgG 융합 단백질의 구성을 위한 벡터

[0113] 항체 분자 내의 상이한 위치에서 단백질의 융합을 허용함으로써, 상이한 특성을 가진 융합 단백질의 구성을 용이하게 하는 일련의 벡터가 제조되었다. 이들 벡터를 사용하면 분자량, 원자가가 상이하고, 항체 분자의 기능적 특성의 상이한 하위세트를 가지는 분자를 가진 융합 단백질 패밀리를 제조하는 것이 가능하다.

[0114] 융합된 유전자의 구성을 용이하게 하는 방법의 구체적인 예로서, 부위 지정 돌연변이생성이 인간 IgG3 중쇄 유전자에서 독특한 제한 효소 부위를 생성하기 위해 사용되었다. 이 특정 예에서, 제한 부위는 CH2 엑손의 5' 단부에 있는 힌지 바로 뒤의 CH1 엑손의 3' 단부, 및 CH3 엑손의 3' 단부에서 생성되었다. 그렇게 생성된 제한 부위는 TtGGTg를 TacGTa로 대체함으로써 CH1의 단부에 SnaB I, CACCTG를 CAGCTG로 대체함으로써 CH2의 시작 부위에서 PvuII, 및 AATgag를 AATatt로 대체함으로써 CH3 단부에 SspI이었다. 이들 조작은 이들 위치에서 독특한 평활 단부 클로닝을 제공하였다. 모든 경우에 제한 부위는 절단 후에 Ig가 코돈의 제1 염기에 기여하도록 위치가 정해졌다. 62개 아미노산의 연장된 힌지 영역을 가진 인간 IgG3이 면역글로불린으로서 사용하기 위해 선택되었다; 존재할 때 이 힌지는 간격 및 유연성을 제공함으로써 항원 및 수용체 동시 결합을 용이하게 하여야 한다. EcoR I 부위가 또한 IgG3 유전자의 3'에 도입되어 3' 클로닝 부위 및 폴리A 추가 신호를 제공한다. 비록 성장 인자와 함께 사용하기 위해 초기에 설계되었지만, 이들 제한 부위는 항체의 규정된 위치에 임의의 신규 서열을 위치시키기 위해 사용될 수 있다. 또한, 이들 클로닝 카세트를 사용하면 가변 영역이 쉽게 변화될 수 있다. 유사한 기법이 다른 항체 유전자에서 적합한 제한 부위를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0115] 융합 유전자의 제조

[0116] 융합 단백질의 제조의 제1 단계로서, 평활 단부 제한 부위가 융합될 유전자의 5' 단부로 원하는 위치에서 도입되어야 한다. 정확한 리딩 프레임을 유지하기 위하여, 부위는 절단 후에 그것이 코돈에 두 염기를 기여하게 되도록 위치가 정해져야 한다. 만약 목적이 완전한 분자를 가진 융합 단백질을 제조하는 것이라면, 제한 부위는 보통 임의의 번역 후 프로세싱의 위치에, 예컨대 리더 서열 뒤에 도입된다. 대안적으로, 만약 목적이 단백질의 부분만을 사용하는 것이라면, 평활 단부 부위가 유전자 내 임의의 위치에 도입될 수 있지만, 언제나 정확한 리딩 프레임을 유지하기 위해 주의를 기울여야 한다. 추가적으로, 만약 융합 단백질의 카복실 말단 번역 후 프로세싱이 있다면, 이 프로세싱 부위에 중단 코돈을 도입하는 것이 자주 바람직하다.

[0117] 융합 단백질을 제조할 때 주요 관심사는 모든 구성요소의 생물학적 활성을 유지하는 것이다. 항체와의 융합 단백질의 제조는 항체의 도메인 구조에 의해 용이하게 되고, 모든 클로닝 부위는 온전한 도메인 바로 뒤에 위치하였다. 이런 구성에서 면역글로불린의 정확한 접힘이 보장되어야 한다. 부착된 단백질의 접힘은 그것의 구조 및 융합되는 장소에 좌우된다. 구조적 정보가 이용 가능할 때는 언제나, 부착된 단백질의 구조적 무결성을 유지할 위치에서 융합을 생성하는 것이 바람직하다.

[0118] 기능적 분석에 충분한 양의 단백질을 제조하기 위하여, 단백질이 배지로 분비되는 것이 바람직하다. 지금까지 보고된 예에서 조립된 융합 단백질이 조립되고 분비되었지만, 이것은 추가적인 융합 단백질을 설계할 때 문제로 남아 있다.

[0119] 생물학적으로 활성인 펩타이드를 중쇄 또는 경쇄 유전자의 일부로서 함유하는 융합 유전자를 설계하는 방법은 확립된 항체 조작 프로토콜을 사용할 수 있다(Antibody Engineering, 2nd Edition. ed.: Carl A. K. Borrebaeck, Oxford University Press 1995. Chapter 9, pages 267-293). 펩타이드는 H 또는 L 사슬의 N-말단 잔기 또는 C-말단 잔기에 융합될 수 있다. 그러한 융합 유전자의 발현은 전형적으로 포유류 세포주에서 실시되지만, 다른 발현 시스템, 예컨대, 예를 들어, 박테리아 또는 효모 발현 시스템이 사용될 수 있다.

- [0120] 제약학적 조성물
- [0121] 발명은 또한 발명의 동종이량체화 항체 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0122] 발명의 항체는 인간 및 동물에게 적합한 양의 활성 성분을 함유하는 단위 투여 형태, 멸균 용액 또는 현탁액, 멸균 비-비경구 용액 또는 현탁액, 경구 용액 또는 현탁액, 수중유 또는 유중수 에멀션 등으로 전신성 투여를 위한 제약학적 조성물에 유용하다. 국소 적용은 연고, 크림, 로션, 젤리, 스프레이, 주입액, 등의 형태일 수 있다. 조성물은 약 1 내지 20% 및 바람직하게는 약 5 내지 15%의, 조성물 중의 담체 또는 비히클과 활성 성분의 제약학적 조성(중량%)으로 유용하다.
- [0123] 위의 비경구 용액 또는 현탁액은 경피적으로 투여될 수 있고, 원한다면 더 농축된 서방성 형태가 투여될 수 있다. 발명의 용합 단백질은 정맥내로, 근육내로, 복강내로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 따라서, 서방성 매트릭스에 활성 화합물을 통합시키는 것이 경피적으로 투여하기 위해 실행될 수 있다. 본 발명의 목적에 대해 허용 가능한 제약학적 담체는 약물, 숙주, 또는 약물 전달 장치를 포함하는 물질에 해로운 영향을 미치지 않는 기술분야에 공지된 담체이다. 담체는 또한 본 발명의 침투 강화제와 함께 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제 등을 함유할 수 있다. 포유류를 위한 유효 투여량은 연령, 중량 활성 수준 또는 치료되는 대상체의 상태와 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따르는 화합물의 유효 투여량은 적어도 1일 1회 용액으로 투여될 때 약 10 내지 500 mg이다. 투여는 적합한 간격으로 반복될 수 있다.
- [0124] 콘주게이트 자가친화성 항체는 그것의 표적 항원(들)에 결합될 때 다른 자가친화성 항체와 비공유적으로 결합할 수 있다. 그러나, 항체의 이량체 또는 다량체의 조기 형성은, 예컨대 정제 및 농축 중에 제조의 어려움뿐만 아니라 부작용으로 이어질 수 있는 투여시 단점으로 이어질 수 있다. 그렇기 때문에, 용액 상태에서 및 투여 전에 이런 이량체화 잠재력을 감소시키고 단량체 특성을 최대화하기 위해 발명의 자가친화성 항체-펩타이드 콘주게이트를 함유하는 조성물이 제제화된다. 예를 들어, 고장성 조성물을 사용함으로써 용액 이량체화가 감소되거나 완화되는 것으로 나타났다. 일부 구체예에서, 0.5 M 이상의 염 농도, 저 수준의 SDS 또는 음이온 성질의 계면활성제와 같은 다른 다양한 계면활성제(미국 특허 제 5,151,266호 참고; 본원에 참조로 포함됨), 또는 예를 들어 숙시닐 무수물의 사용을 통한 등전점을 감소시키기 위한 항체의 변형(미국 특허 제 5,322,678호 참고; 본원에 참조로 포함됨)이 조성물을 제제화하기 위해 사용될 수 있다.
- [0125] 면역검정
- [0126] 생물학적 또는 환경적 샘플 중의 분석물을 자가친화성 펩타이드에 콘주게이션된 항체와 접촉시키는 단계가 포함되는 면역검정이 본 발명에 따라 제공된다. 분석물과 자가친화성 펩타이드에 콘주게이션된 항체에 의해 형성된 복합체가 그런 다음 검출된다.
- [0127] 특정 구체예에서, 본 발명의 검정은, 예컨대 세포 표면에서, 자연적으로 자가친화성 펩타이드를 함유하는 항체를 사용하거나 자가친화성 펩타이드의 항체에의 콘주게이션에 의해 저수준으로 발현된 항원의 검출을 특징으로 한다.
- [0128] 고도로 특이적인 항체의 사용은 많은 진단 적용에서 일반적이다. 상기 항체의 결합은 많은 수단에 의해 직접적으로 검출될 수 있거나 또는, 대안적으로, 2차 항체가 신호 향상 및 검출에 필요하다. 이전에는, 신호 검출이 결합된, 표적에 단일 또는 이가로 결합된 항체의 양과 직접적으로 관련되었다. 본 발명에서는, 향상된 신호 강도가 표적 분석물에 결합된 자가친화성 펩타이드-콘주게이션된 항체의 다가 결합 상호작용으로부터 비롯된다.
- [0129] 직접적으로 검출되든 또는 간접적으로 검출되든간에, 자가친화성 펩타이드-콘주게이션된 항체는 격자 형성 및 표적을 둘러싼 더 많은 항체로 인해 신호 검출을 크게 향상시킨다. 그러므로, 자연 발생적인 자가친화성 항체 및 비-자연 발생적인 자가친화성 펩타이드-콘주게이션된 항체는 면역검정에서 향상된 신호를 제공하는 검출 가능한 표지로 직접 표지화될 수 있다. 유사하게, 간접 표지화, 예컨대 2차 항체의 표지화는 2차 항체가 일차 자가친화성 펩타이드-콘주게이션된 항체에 증가된 수로 결합할 것이기 때문에 면역검정에서 증가된 신호를 유발한다.
- [0130] 본 발명의 검정의 구체예에서, 자연적으로 발생하는 자가친화성 항체 또는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드에 콘주게이션된 항체는 ELISA와 같은 검정에서 기관, 예컨대 플라스틱 상에 고정된 항원의 신호 검출을 향상시키는 데 사용된다.
- [0131] 본 발명의 검정의 구체예에서, 자연적으로 발생하는 자가친화성 항체 또는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드에 콘주게이션된 항체는 중합체 칩에 코팅되거나 결합되고 표면 플라즈몬 공명에 의해 검출된 항원의 "오프 레이트"

를 향상시키거나 결합력을 증가시키기 위해 사용된다.

- [0132] 본 발명의 검정의 구체예에서, 자연적으로 발생하는 자가친화성 항체 또는 상동성 이량체화(HD) 펩타이드에 콘쥬게이션된 항체는, 예컨대 이중이식 종양 동물 모델에서, 형광 또는 다른 신호 검출 방법에 의해, 생체내에서 표적에 결합된 항체의 결합 및 국지화 검출을 향상시키기 위해 사용된다.
- [0133] 본 발명의 구체예에 따르는 검정에는 분석물의 향상된 검출을 위해 실제로 하나 이상의 상동성 이량체화(HD) 펩타이드와 콘쥬게이션된 임의의 면역글로불린이 포함될 수 있다.
- [0134] 용어 "분석물"은 자가친화성 펩타이드에 콘쥬게이션된 항체에 의해 특이적으로 인식되는 임의의 분자 또는 화합물을 지칭하며, 예시적으로 단백질, 펩타이드, 합텐, 탄수화물, 지질, 강글리오시드 및 이것들의 조합을 포함한다. 특정 구체예에서, 분석물은 포유류 분석물일 수 있고, 예시적으로 정상 또는 비정상 포유류 세포에 의해 생성된 단백질, 펩타이드, 합텐, 탄수화물, 지질, 강글리오시드 및 이것들의 조합을 포함한다.
- [0135] 추가의 특정 구체예에서, 분석물은 비포유류 분석물, 예컨대 미생물, 예컨대 박테리움 또는 바이러스에 의해 생성된 단백질, 펩타이드, 합텐, 탄수화물, 지질, 강글리오시드 및 이것들의 조합일 수 있다. 그러므로, 본 발명의 특정 검정이 미생물 및/또는 미생물의 생성물의 검출을 위해 제공된다. 미생물 및/또는 미생물의 생성물의 검출을 위한 검정은 인간 또는 비인간 동물로부터 얻어진 샘플을 검정하기 위해, 예를 들어 감염을 검출하기 위해 사용된다. 추가의 구체예에서, 미생물 및/또는 미생물의 생성물의 검출을 위한 검정은 미생물 및/또는 미생물의 생성물로의 오염에 대해 테스트될 환경 또는 대상물로부터 얻어진 샘플을 검정하기 위해 사용된다.
- [0136] 본 발명의 검정의 구체예에서, 표적 분석물은 B 세포 수용체, CD20, Her2, 강글리오시드 GM2, 글리콜산 강글리오시드 GM3, GD3 강글리오시드, 카스파제, 산화된 저밀도 리포단백질, 포스포콜린, EGFR, CD32B, HLADR1, CD19, EpCAM, PSA 및 스태필로코쿠스 항원과 같은 박테리아 항원이다.
- [0137] 본 발명의 일부 구체예에서, 진단 및 예측용 면역검정이 제공된다. 용어 "진단용 면역검정"은 동물 또는 인간 대상체에서 질환 또는 병리적 상태를 나타내는 분석물의 존재 또는 양의 결정을 허용하는 면역검정을 지칭한다. 용어 "예측용 면역검정"은 동물 또는 인간 대상체에서 질환 또는 병리적 상태의 진행을 나타내는 분석물의 존재 또는 양의 결정을 허용하는 면역검정을 지칭한다.
- [0138] 키트
- [0139] 본 발명의 구체예에서, 항체-상동성 이량체화(HD) 펩타이드 콘쥬게이트를 사용하는 검정을 수행하는데 사용하기 위한 키트가 제공된다. 특정 구체예에서, 키트에는 항체-상동성 이량체화(HD) 펩타이드 콘쥬게이트 및 샘플 중의 분석물을 검출하는데 사용하기 위한 지침이 포함된다.
- [0140] 치료 방법
- [0141] 발명의 상동성 이량체화(HD)-항체 또는 상동성 이량체화(HD)-항체를 포함하는 조성물을 사용하는, 세포자멸사, 보체 고정, 표적의 이펙터 세포 매개 사멸, 또는 질환 상태의 발생의 방지 또는 증강을 향상시키는 방법이 또한 고려된다. 한 구체예에서, 발명의 자가친화성 콘쥬게이트, 또는 발명의 자가친화성 콘쥬게이트를 함유하는 조성물이 대상체에게 투여된다. 투여된 후에는, 항체는 표적 세포에 결합하고 세포자멸사, 보체 고정, 표적의 이펙터 세포 매개 사멸을 향상시키거나, 또는 표적 항원 또는 세포가 질환 상태의 발생, 또는 추가의 증강을 자극하는 것을 방지한다. 추가 구체예에서, 자가친화성 콘쥬게이트가 표적 세포에 결합하여 세포자멸사, 보체 고정, 표적의 이펙터 세포 매개 사멸을 향상시키거나, 또는 표적 항원 또는 세포가 질환 상태의 추가의 증강을 방지하고 자가친화성 콘쥬게이트가 정상 조직으로부터 정화되기 위한 시간을 허용하는 제2 항-자가친화성 펩타이드 항체가 투여될 수 있다.
- [0142] 일부 측면으로, 쇠약하게 하거나 잠재적으로 생명을 위협하는 질환 또는 병태를 앓고 있는 환자에게 적어도 하나의 대상체 상동성 이량체화(HD) 항체가 질환 또는 병태의 증상을 완화시키기에 효과적인 양으로 투여된다. 발명의 항체에 의한 치료에 대해 고려되는 질환 또는 병태는 악성 종양(malignancy), 신생물(neoplasm), 암, 자가면역 장애, 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 또는 다른 신경 퇴행성 병태, 또는 생착 또는 이식 거부반응일 수 있다.
- [0143] 일부 측면으로, 환자의 표적화된 세포의 세포자멸사를 강화시키는 방법은 제1 상동성 이량체화(HD) 항체-펩타이드 콘쥬게이트 및 콘쥬게이트의 펩타이드 도메인을 인식하는 제2 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 이 구체예에서, 항체-펩타이드 콘쥬게이트는 표적 세포의 경막 수용체의 세포의 영역을 인식한다. 동종이량체화 특성으로 인해, 항체-펩타이드 콘쥬게이트는 자체 결합 펩타이드 도메인이 없음 상응하는 항체보다 더 많이 강하게 표적

에 결합할 수 있다. 더욱이, 자가친화성 항체가 둘 이상의 수용체에 결합할 때는 언제나, 항체의 자체 결합 특성으로 인해 매우 근접하게 되는 그런 수용체로 인해, 세포 내에서 세포자멸사 신호가 촉발될 수 있다. 그런 경우에, 콘주게이트의 펩타이드 도메인이 노출된 에피토프를 나타낼 때, 자가친화성 펩타이드에 특이적인 제2 항체가 투여되고, 변형된 항체에 결합하고, 교차 결합의 과정을 향상시키며 심지어 표적 항원의 일시적 정화를 유발할 수 있다. 만약 표적 항원이 수용체라면, 세포 표면으로부터의 정화, 세포내이입, 및 분해가 후속해서 새로운 수용체 단백질의 합성을 필요로 할 것이며, 이것은 수용체의 생물학적 기능이 단순한 차단 항체 또는 소분자 억제제를 사용하는 것보다 더 긴 기간 동안 보다 효과적으로 억제될 것임을 의미한다. 대안적으로, 제2 항체는 방사성 표지 또는 다른 잠재적으로 치료적인 물질을 포함할 수 있어서, 투여될 때 표적화된 세포를 공격할 수 있다. 이런 제2 항체의 사용 핵심은 그 항체의 특이성이다. 상동성 이량체화(HD) 펩타이드는, 자연 발생적이더라도 소수의 쥐과 면역글로불린에만 존재한다. 그러므로, 이 펩타이드에 특이적인 항체는 생체내에서 사용되는 데 필요한 선택성을 가질 것이다.

[0144] 질환

[0145] 발명의 항체에 의한 치료에 대해 고려되는 질환 또는 병태는 악성 종양, 신생물, 암, 죽상동맥경화증, 자가면역 장애, 알츠하이머병 또는 다른 신경 퇴행성 병태, 생착 또는 이식 거부반응, 또는 항체 요법에 반응적인 임의의 다른 질환 또는 병태일 수 있다.

[0146] 용량

[0147] 본원에 기술된 상동성 이량체화(HD) 항체는 비변형 항체에 대해 실시 가능한 것과 실질적으로 동일하거나 더 적은 하나 이상의 투여량으로 투여될 수 있다.

표 3

서열 번호: 및 서열의 설명

서열 번호:	서열의 설명
1	T15
2	CR3014 항-SARS
3	R24(짧은)
4	rs-T15
5	rs-T15 이량체
6	rs-R24
7	rs-R24 이량체
8	T15-var1
9	T15-var2
10	T15-var3
11	T15-var1 이량체
12	T15-var2 이량체
13	T15-var3 이량체
14	T15 이량체
15	R24 이량체(짧은)
16	R24(긴)
17	R24 이량체(긴)
18	Rs-R24(긴)
19	Rs-R24 이량체(긴)
20	리톡시맙 중쇄
21	리톡시맙 경쇄
22	허셉틴 경쇄(1 및 2)
23	허셉틴 중쇄(1 및 2)
24	베바시주맙 경쇄
25	베바시주맙 중쇄
26	아테졸리주맙(항-PD-L1 mAb) 중쇄
27	아테졸리주맙(항-PD-L1 mAb) 경쇄

[0148]

[0149] 다음의 실시예는 발명의 특정 측면을 예시하기 위해 제공되며, 발명의 범주를 제한하려는 의도는 아니다.

[0150] 본 발명은 다음의 실시예에서 한층 더 예시될 것이다.

[0151] 실시예

[0152] 실시예 1 - 최적화된 자체 결합에 대한 잠재력을 가진 HD 펩타이드

[0153] T15로부터 유래된 24량체 펩타이드 서열을 분석하고 비-면역글로불린 단백질로 정상적으로 사용된 단백질 분석 방법인 개별 아미노산의 소수성 점수 및 전체적인 펩타이드 소수성 플롯(Kyte-Doolittle)을 사용하여 제한된 HD 활성을 가지거나 HD 활성이 없는 동일한 생식선 구성의 다른 항-포스포틸콜린 항체와 비교하였다.

[0154] 도 1에서 나타난 것과 같이, T15 펩타이드는 C-말단에서 헤어핀 구조를 형성하려는 선호성을 가지며, 그것은 자체 결합 능력을 손상시킬 것이다(도 1B). 원래의 HD 항체(T15)에서, HD 서열을 CDR3의 후자 부분 및 이차 형태를 허용하지 않는 위치인 CH1의 제1 부분에 삽입하였다. 본 발명자들은 항체의 c-말단에 삽입된 HD 펩타이드를 가진 항체의 재조합 형태에서, 그 HD 펩타이드가 헤어핀 구조를 형성할 수 없어서 자체 결합 및 격자 형성을 통해 항체의 치료적 활성을 강화하는 능력이 감소된다는 가설을 세웠다. 유사하게, 항체에 화학적으로 콘주게이션된 T15 펩타이드는, 정상적인 N에서 C-말단 방향 구성에서, 또한 자체 결합이 감소된 이차 형태를 형성하는 능력을 가질 것이다. 더불어, 작은 HD 펩타이드 서열은, 큰 항체 단백질의 맥락에서, 자체 결합하기에는 입체적인 제한을 가질 것이다.

[0155] 제1 비교는 정상적인 또는 역 순서의 공지된 T15 펩타이드 구성의 비교였다(도 2 및 3 참고). 원래의 T15 서열의 조사(도 2의 좌측 패널)는 자체 결합이 펩타이드의 서열 소수도 플롯과 상관이 있음을 보여준다. 펩타이드의 첫 번째 절반을 항체의 CDR2로부터 도출한 한편 두 번째 절반을 CDR 사이의 프레임워크로부터 도출하였다. 그러면 첫 번째 절반은 자체 결합을 부여하고 생식선 서열로부터 변경된 아미노산을 함유할 것이다; 중요한 것은 두 번째 절반의 더 소수성인 잔기가 첫 번째 절반의 덜 소수성인 잔기에 결합하여 자체 결합 과정을 개시하는 작용을 한다는 것이다. 놀랍게도 본 발명자들이 역서열의 24량체 펩타이드(도 2의 우측 패널)를 조사했을 때, c-말단에서 헤어핀 구조의 존재에도 불구하고 필요한 자체 결합 구성을 또한 가정할 수 있었다. 이것은 다음에 항체의 c-말단(현재 n-말단)을 통해 펩타이드를 보다 중요한, 자체 결합을 결정하는 펩타이드의 첫 번째 절반과 테더링을 허용하여, 항체로부터 더 멀리 테더링되고 다른 펩타이드/항체 콘주게이트에서 상응하는 자체 결합 서열을 더 많이 찾을 수 있게 한다.

[0156] 최적 모티프를 구성하기 위하여 자체 결합하는데 대한 개별 아미노산의 소수성 기여도를 확인하는 것은 HD 활성이 없거나, 거의 없거나 높은 Mopc 항체의 중쇄 CDR2/프레임워크3로부터 도출한 3개의 생식선 서열의 아미노산 차이를 비교함으로써 실시하였다. 아미노산의 개별 아미노산 소수성 점수(<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/aminoacidscores.htm>에서 이용 가능함)를 자체 결합에 관여하는 아미노산의 알려진 위치에 대해 플롯화하였다(도 4 참고). 도식된 것과 같이, 자체 결합을 가능하게 하는 T15 펩타이드(높은 HD 활성)의 아미노산 변화는 치환된 아미노산, 즉 전형적으로 보다 소수성인 프레임워크 영역에 대한 자체 결합을 허용하는 보다 친수성인 치환의 소수성 점수의 뚜렷한 변화와 연관이 있다. 이것은 다른 아미노산의 T15 펩타이드의 이전 CDR2 영역으로의 치환이 개별 아미노산의 소수성 특징을 보존할 것을 필요로 하는 것을 당업자가 예측하는 것을 허용한다. 또한 T15 펩타이드의 이전 CDR2 영역 내에서의 추가적인 친수성 치환은 펩타이드의 보다 소수성인 이전 프레임워크 부분과의 잠재적 결합을 증가시킬 수 있고 그 역도 마찬가지이다; 보다 소수성인 아미노산의 프레임워크3 부분으로의 치환은 T15 펩타이드의 더 많은 친수성 부분에 대한 더 많은 자체 결합을 허용할 것이다. 이런 소수성-친수성 상호작용은 자체 결합 과정을 개시하는 작용을 하며 나중에는 자체 결합에 관여하는 특정 아미노산을 초래하여, 다른 비공유 상호작용을 형성하는 작용을 한다. 전체적인 과정은 자체 결합 과정의 상대적 친화성을 제공한다. 일부 예시적인 단일 아미노산, 보존적 치환을 표 2에 제공한다(예컨대 T15-var1, T15-var2 및 T15-var3).

[0157] 이론에 얽매이지 않고, (예를 들어 아미노산의 치환에 의해) HD 펩타이드의 소수도를 증가시킴으로써 HD 펩타이드의 결합 특성이 조절될 수 있고, 예를 들어 HD 펩타이드의 결합 특성이 증가될 수 있다고 여겨진다. 추가로 자체 결합에 대한 친화도는 항체의 표적에의 결합 전에 항체 이량체의 형성을 피하기 위해 최적화될 수 있는 것으로 여겨진다. 그러므로, HD 펩타이드의 친화도는 자연 발생 HD 펩타이드에 비교하여 증가될 수 있지만, 여전히 항체의 표적에 대한 결합 친화도보다는 적을 수 있다. 예를 들어 HD 펩타이드의 결합 친화도는 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 또는 10^{-8} 일 수 있다.

- [0158] 자체 결합의 잠재적 증가는 수소 원자를 중수소로 표지화한 후 고정된 T15 펩타이드에 대한 결합을 측정하는 단일 아미노산 변이체의 합성 펩타이드 합성에 의해 쉽게 측정될 수 있다. 단일 아미노산 치환된 펩타이드에 대한 양전하는 이중 또는 삼중 아미노산 변화로서 통합될 수 있다. 최종 결과는 더 높은 자체 결합 친화도를 갖지만 항체의 응집을 유발할 정도는 아닌 자체 결합 펩타이드인 것에 주목하여야 한다.
- [0159] T15는 유일한 자연 발생적인 HD 항체 및 HD 펩타이드의 공급원이 아니다. 잘 연구되어 있는 예는 다이시알로강 글리오시드 GD3에 대해 지시된 R24의 예이다. T15를 사용할 때와 같이, 원래의 쥐과 항체의 증가된 효능은 치료적 효능을 증가시키는 세포 표면에서의 격자 형성을 허용한 자체 결합 펩타이드의 존재와 관련이 있었다. 도 9에서 나타난 것과 같이, 격자 형성을 담당하는 R24 서열이 역평행 방식으로 자체 결합할 것이다. T15를 사용할 때와 같이, R24 펩타이드는 비록 T15보다 짧지만 펩타이드의 한 단부가 다른 것보다 더 친수성인 상응하는 소수성 플롯을 나타낸다(도 10 참고). 플롯은 기본적으로 높은 곳에서 낮은 곳으로 가는 대신 소수도가 낮은 곳에서 높은 곳으로 가는 T15의 역이다. 서열의 반전을 통해 자체 결합을 촉진하기 위한 동일한 원리로서, 이량체의 형성 및 변경된 소수성 특성을 가진 단일한, 보존적 아미노산 치환을 만드는 것은 자체 결합을 증가시키는 역할을 한다.
- [0160] **실시예 2 - 자가친화성/상동성 이량체화(HD) 활성을 가진 항체의 확인**
- [0161] 다음 방법은 항체 제조에서 또는 scFv 또는 Fab의 파지 라이브러리에서 HD 활성을 테스트하기 위하여 HD 펩타이드를 통합시키는 항체의 특정 생물물리학적 특성을 사용한다. 방법은 또한 HD 항체에 대한 품질 보증(QA) 방법 감정으로 사용될 수 있다.
- [0162] **항체 점도**
- [0163] 미세회석 튜브(USA Scientific, Ocala, FL, HPC G9 또는 HPC G11을 PBS에 1 mg/ml로 함유함)를 표준 현미경 슬라이드에 장착하였다. 그것들 4°, 20°, 및 37°C에서 평형화하고, 밀봉한 후 수직으로 세웠다가 수평으로 세운 후 각 온도에서 사진촬영을 하였다.
- [0164] **점도 평형의 시간 경과 측정**
- [0165] 항체를 PBS에 1 mg/ml로 함유하고 있는 미세회석 튜브를 4 또는 37°C에서 평형화하였다. 튜브를 수직으로 3초 동안 세운 후 수평으로 놓고 촬영하였다. 메니스커스가 움직임을 멈추는데 필요한 시간을 스톱워치를 사용하여 측정하였다.
- [0166] **결과**
- [0167] 동종 이량체의 온도 의존성 평형: HPC G9/HPC G11은 IgG 항-포스포콜린 항체의 동형(isoform)으로 HPC G11은 TEPC-15의 CDR2/FR3과 이디오타입 및 서열을 공유한다. 따라서, HPC G11은 동종친화성이며 HPC G9는 아니다. 온도가 항체를 포함한 단백질의 물리적 특성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에, HPC G9 및 HPC G11의 거동을 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 4, 20, 및 37°C에서 비교하였다. 배제 칼럼 내에서 용출된 항체의 양을 포함 부피의 양과 비교하였다.
- [0168] 상이한 온도에서 배제된/포함된 HPC G11의 비율. 4, 20, 및 37°C에서 HPC G9로 배제된 단백질의 비율에는 유의할만한 변화가 없었지만(데이터 미도시), HPC G11에 대한 비율은 온도에 따라 증가하였다. 이들 발견은 용액에서 동종친화성 G11의 이량체화 정도가 비생리적 온도에서보다 생리적 온도에서 더 높다는 개념을 지지한다.
- [0169] **점도 차이**
- [0170] HPC G9 및 HPC G11의 점도를 또한 상이한 온도에서 비교하였다. 각 항체의 500 ml의 부피를 랙 튜브에 배치하고 4, 20, 및 37°C에서 30분 동안 수평 위치에서 평형화되도록 하였다. 그런 후 튜브를 위로, 수직 위치로 1초 동안 움직인 후 수평 위치로 복귀시키고 사진을 촬영하였다. 메니스커스의 위치를 측정하고 이들 측정의 비율을 HPC G9 또는 HPC G11로 계산하였다. 4°C에서의 비율은 1.45였고, 20°C에서는 0.92였으며, 37°C에서는 0.54였다. 평형 후 튜브의 기울어짐을 반전시켰다(즉 튜브의 바닥을 수직으로 1초 동안 들어올린 후 수평 위치로 복귀시키고 사진을 촬영하였다). HPC G9의 HPC G11에 대한 비율은 4°C에서 1.5, 20°C에서 1.41, 그리고 37°C에서 2.06이었다.
- [0171] G11의 점도가 독특할 가능성을 배제하기 위하여, 동종친화성인 것으로 알려져 있는 S107 쥐과 단클론성 IgA 항체를 테스트하였다. 비교를 위해, 또 다른 쥐과 항체 G9를 점도 분석에 포함시켰다. 튜브를 먼저 바닥이 위로 오도록 3초 동안 배치한 후 수평 위치로 복귀시켰다. 메니스커스가 움직임을 중단하는데 필요한 시간을 각 항체

에 대해 측정하였다. 도 5에서, 본 발명자들은 4 및 37℃에서 이들 항체의 메니스커스가 움직임을 중단하는데 기록된 초를 보여준다. 움직임을 중단하는데 필요한 시간이 많을수록 용액의 점도는 더 높다. 도 5에서 도시된 것과 같이 두 온도에서 기록된 시간 차이는 G9에 대한 것보다 G11 및 S 107에 대해 더 작다. G11, S 107, 및 1F7에 대해 37℃에서의 시간으로 나눈 4℃에서의 시간의 비율은 동일하지만, G9에 대한 비율은 2배 이상 더 크다. G11 및 S107은 선택적인 동중친화성 중합체이지만, 1F7 IgM은 공유 오량체이다. 동중친화성 중합체 및 공유 IgM 중합체가 유사하지만 단량체 G9 이가 항체와 상이한 점도를 갖는 것을 주목하는 것은 흥미롭다. 동중친화성 항체의 이런 독특한 점도는 Ig 부류와는 무관하며 월등한 표적화에 기여하는 독특한 이량체화 잠재력의 일부일 것이다.

[0172] 실시예 3 - 역 구성을 가진 재조합 치료 HD 항체(리툽시맵)의 제조 및 특성화

[0173] 다음의 실시예는 역서열 HD 항체의 제조 및 천연 항체와 비교하여 항체의 재조합 HD 형태의 치료적 특성의 변화를 예시한다. HD 펩타이드의 능력을 테스트하기 위하여, 분자 생물학적 기법을 사용하여 리툽시맵 항체의 키메라 버전(chRituximab), 및 중쇄의 각각의 가변 영역의 C-말단에 HD 펩타이드(rs-T15)가 첨가된 것을 제외하고 chRituximab에 동일한 키메라 HD 항체를 생성하였다.

[0174] 물질 및 방법

[0175] 세포주

[0176] JOK-1 세포는 Affimed Inc.사의 선물이었다. JOK-1 세포를 10% FBS-프리미엄-HI(Aleken Biologicals), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)이 보충된 Glutamax(Gibco)가 첨가된 RPMI-1640에서 성장시켰다. Raji, 및 Ramos 세포를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)으로부터 얻었고, 각각 번호 HB-9645, CCL-86, CRL-1596, 및 TIB-152였다. Raji 및 Ramos 세포를 10% FBS-프리미엄-HI(Aleken Biologicals), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)이 보충된 HEPES(ATCC)가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 유지하였다. 리툽시맵 세포를 10% FBS-낮은-IgG(Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco), 및 0.5% Glutamax(Gibco)가 보충된 HEPES(ATCC)가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 유지하였다. Invitrogen으로부터 구매한 CHO-S 세포를 1% HT 보충제(Gibco), 2% Glutamax(Gibco), 및 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)이 보충된 CD CHO 배지에서 성장시켰다. 벡터 DNA의 도입 후, CHO-S 세포를 선택을 위해 1.2 mg/ml 418(Invivogen)을 첨가하여 위와 같이 성장시켰다. 모든 세포를 37℃ 및 5% CO₂에서 유지하였다.

[0177] 키메라 항체 유전자의 구성

[0178] 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 공개된 리툽시맵 서열로부터 합성하였다:

[0179] 리툽시맵 중쇄:

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGD
TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
TTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTH
TCPGPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0180]

[0181] (서열 번호:20)

[0182] 리툽시맵 경쇄:

QIVLSQSPAILASAPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGV
PVRFGSGSGSTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0183]

- [0184] (서열 번호:21)
- [0185] 리톡시맵 중쇄 가변 영역을 cDNA 풀(pool)로부터 프라이머 modVH리톡시맵fwd 및 modVH리톡시맵rev를 사용하는 PCR에 의해 증폭시켰다. 모든 올리고를 Operon으로부터 구입하였다. 리톡시맵 경쇄 가변 영역을 cDNA 풀로부터 프라이머 modVL리톡시맵fwd 및 modVL리톡시맵rev를 사용하는 PCR에 의해 증폭시켰다. 중쇄 및 경쇄 PCR 생성물을 벡터 pAc-k-CH3(Progen Biotechnik GmbH)의 XhoI-NheI 및 SacI-HindIII 부위에 각각 클로닝하여 pAc-k-리톡시맵H 및 리톡시맵K를 형성하였다. 클론을 두 양방향으로 서열분석하여 검증하였다. 모든 제한 효소를 Takara 또는 New Engl 및 Biolabs로부터 구입하였다. Taq 중합효소(Promega)를 모든 PCR에 사용하였다. 모든 효소 반응을 제조사의 프로토콜을 사용하여 수행하였다.
- [0186] 항체 발현 벡터의 구성
- [0187] 올리고 LongT15fwd, LongT15rev, 및 프라이머B를 T15 펩타이드의 역서열을 암호화하는 DNA 서열을 구성하기 위하여 증폭된 PCR에 사용하였다. 결과적으로 생성된 PCR 생성물을 pIRES(Clontech)의 MCSB의 SalI-NotI 부위에 클로닝하여 pHD를 형성하였다. pAc-k-리톡시맵H 및 pAc-k-리톡시맵K의 완전한 중쇄 및 경쇄를 프라이머 modVHXfwd 및 modVHXrev, 또는 VKXfwd 및 VKXrev를 각각 사용하여 PCR 증폭시켰다. 경쇄를 벡터 pHD의 MCSA의 NheI-XhoI 부위에 클로닝하였고, 중쇄를 결과적으로 생성된 벡터의 SalI-NotI 부위에 클로닝하여 pch리톡시맵-HD를 형성하였다. 클론을 두 양방향으로 서열분석함으로써 검증하였다. pch리톡시맵(T15 펩타이드가 없는 항-CD20)을 생성하기 위하여, pch리톡시맵-HD 및 pIRES를 NotI 및 ClaI으로 소화시켰다. pch리톡시맵-HD로부터 약 6 Kb, 및 pIRES로부터 약 2.2 Kb의 결과적으로 생성된 DNA 단편을 각각 1% 아가로스 겔로부터 Qiaquick 키트(Qiagen)를 사용하여 겔 정제하고, 함께 결합시켜서 리톡시맵을 형성하였다. 클론을 두 양방향으로 서열분석함으로써 검증하였다. 모든 벡터 구성물을 이. 콜라이(*E. coli*)(XL-10 세포, Stratagene으로부터)에 제공된 열 충격 프로토콜을 사용하여 도입하였다. 플라스미드를 Qiagen 미니프랩 키트를 사용하여 3 ml의 밤새 박테리아 배양물로 정제하였다. 벡터 pch리톡시맵 및 pch리톡시맵-HD를 580 V 및 40 μ s로 설정된 에펜도르프 Multiporator에서 4 mm 갭 큐벳을 사용하여 CHO-S 세포로 전기영동하였다. 선택을 시작하기 전에 2일의 회복을 허용하였다.
- [0188] 제조항체의 정제
- [0189] 세포 배양 상층액을 세포 밀도에 따라 3-5일마다 수득하였다. 세포 현탁액을 7 내지 10분 동안 저속(480-740 x g)으로 원심분리하고, 상층액을 추가 프로세싱 전에 -20°C에서 유지하였다. 37°C에서 급속 해동 후, 상층액을 0.2 μ m 필터(Corning)를 통과시켜 세포 파편을 제거한 후, 여과된 상층액을 HiTrap 단백질 G HP 칼럼(GE Healthcare) 상으로 통과시켰다. 결합된 항체를 0.1 M 글리신 완충액 pH 2.7로 용출하여, 1 mL 분획으로 수집하고, pH를 50 μ L 1 M Tris pH 9로 중화시켰다. 용출 프로파일을 280에서 UV 흡광도를 읽음으로써 결정하였다(테이터 미도시). 그런 후 유의할만한 단백질 함량을 가진 분획을 모으고 Amicon Ultra 원심분리 여과 장치 50,000 MW 컷오프(Millipore)를 사용하여 제조사의 지침을 따라 농축하였다.
- [0190] 세포 표면 결합
- [0191] Raji, Ramos, 또는 JOK-1 세포의 웰당 3×10^5 세포를 24 웰 플레이트에 시딩하고 37°C 및 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 후 세포를 수득하고 PBS로 2회 세척하였다. 세포를 1 mL PBS에 재현탁하고 증가하는 농도(1 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g/mL)의 ch리톡시맵 또는 HD ch리톡시맵과 함께 인큐베이션하고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 2회 세척함으로써 과잉 항체를 제거한 후, 세포를 FITC 콘쥬게이션된 염소 항-인간(Sigma, 1:1000)의 1 mL 용액에 재현탁하고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 2회 세척 후, 세포를 200 μ L의 PBS에 재현탁하고 유세포 분석에 의해 분석하였다(BD FACSCalibur Instrument, BD Bioscience). 비평균 형광 강도를 식을 사용하여 결정하였다: 비MFI = MFI(일차 Ab + 염소 항-인간 FITC) - MFI(염소 항-인간 FITC).
- [0192] 세포자멸사 검정
- [0193] Raji, Ramos, 또는 JOK-1 세포의 웰당 2×10^5 세포를 24 웰 플레이트에 시딩하고 37°C 및 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 후 세포를 증가하는 농도의 Ab로 20시간 동안 37°C에서 처리하였다. 세포를 수득하고, PBS로 1회 세척하고, 세포자멸사 및 세포 사멸을 각각 검출하기 위하여 3 μ L 아넥신 V Alexa Fluor 488 콘쥬게이트(Invitrogen) 및 요오드화 프로피듐(Sigma)을 4 μ g/mL의 최종 농도로 함유하고 있는 100 μ L 1 X 아넥신 결합 완충액으로 재현탁하였다. 37°C에서 20분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 150 μ L의 1 X 아넥신 결합 완충액으로 희석하고 유세포 분석(BD FACSCalibur Instrument, BD Bioscience)에 의해 분석하였다. 미처리 대조군 샘플에서 건강한 집단을 게이팅하고 식을 사용하여 퍼센트 세포자멸 세포를 결정하였다: 퍼센트 세포자멸 세포 =

(1-(살아있는 처리된 표적 세포/살아있는 미처리 표적 세포)) * 100.

[0194] CDC 검정

[0195] 2×10^5 세포를 24 웰 플레이트에 시딩하고 37°C 및 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 후 세포를 증가하는 농도의 Ab로 2시간 동안 37°C에서 토끼 HLA-ABC 보체 풍부화 혈청(Sigma)의 존재 하에 처리하였다. 세포를 수득하고 PBS로 1회 세척하고, 50 nM 칼세인-AM(Biochemica) 및 4 µg/mL 요오드화 프로피움(Sigma)을 함유하고 있는 200 µL의 PBS에 재현탁하였다. 37°C에서 20분 동안 인큐베이션한 후 세포 생존력을 유세포 분석(BD FACSCalibur Instrument, BD Bioscience)에 의해 분석하였다. 퍼센트 사멸을 식에 의해 결정하였다: 퍼센트 죽은 세포 = (1-(살아있는 처리된 표적 세포/살아있는 미처리 표적 세포)) * 100.

[0196] PBMC 분리

[0197] 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 건강한 공여자의 버피 코트(Kentucky Blood Center, Lexington KY)로부터 피콜-하이 파크 밀도 구배 원심분리에 의해 제조하였다. PBMC를 hRPMI(10% FBS, 낮은 IgG) 배양 배지에 6×10^6 세포/mL로 희석하고 최대 3일 동안 유지하였다. PBMC 생존력 및 일별 세포 집단 편차를 실험 전에 유세포 분석(BD FACSCalibur Instrument, BD Bioscience)에 의해 분석하였다.

[0198] ADCC 검정

[0199] 표적 세포(Raji, Ramos, 또는 JOK-1)를 T75 플라스크로부터 수득하고 제조사의 지침을 따라 사용한 400 nM 칼세인-AM(Biochemica) 및 8 µL의 TFL2 염료(OncoImmunin)를 함유한 1 mL의 배지에 재현탁하였다. 표적 세포를 45분 동안 37°C에서 표지화하고, 배지로 2회 세척하고, 6×10^5 세포/mL의 밀도로 재현탁하였다. 그런 후 이펙터 세포(PBMC)를 T75 플라스크로부터 수득하였고 1.2×10^7 세포/mL의 밀도로 재현탁하였다. 표적 세포와 이펙터 세포를 20:1의 E:T 비율로 혼합한 후 250 µL의 세포 혼합물을 개별 5 mL 둥근 바닥 튜브에 분취하고 증가하는 농도의 Ab와 함께 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 표적 세포 생존력을 유세포 분석(BD FACSCalibur Instrument, BD Bioscience)에 의해 분석하였다. 퍼센트 사멸을 식에 의해 결정하였다: 퍼센트 죽은 세포 = (1-(살아있는 처리된 표적 세포/살아있는 미처리 표적 세포)) * 100.

[0200] 결과

[0201] 형광 활성화된 세포 분류(FACS)

[0202] 제조합 ch리투시맵 및 ch리투시맵-HD 항체가 기능적인 것을 검증하기 위하여, 인간 B 세포 JOK-1 라인으로부터의 세포에 결합하는 능력을 형광 활성화된 세포 분류(FACS)를 사용하여 테스트하였다. 도 6에서, 하단 패널은 ch리투시맵-HD 항체로 염색된 평균 형광 강도(MFI)를 보여주는 한편, 하단 패널은 비-HD 항체인 ch리투시맵을 사용하는 염색을 나타낸다. ch리투시맵-HD 항체의 결합은 ch리투시맵의 결합보다 대략 4배 더 높았다.

[0203] 세포자멸사 유도는 수용체 교차 결합에 의존적이다

[0204] HD 항체의 제안된 메커니즘 중 하나는 세포자멸사의 수용체 교차결합된 유도이다. ch리투시맵 및 HD 항체의 세포자멸사의 유도를 3개의 세포주 Raji, Ramos 및 JOK-1에서 비교하였다. 특히 최고 용량의 ch리투시맵의 첨가는 일부 세포주에서 세포의 대략 30%에서 세포자멸사를 유도한다. HD 항체는 비변형 키메릭보다 상당히 더 많은 세포자멸사를 유도한다. 유사하게, HD 항체는 Ramos 세포 및 다른 B 림프종 세포에서 더 강력한 세포자멸사 유도자이다. 표 4는 농도 범위에 걸쳐 리투시맵의 두가지 버전의 세포자멸 효과를 보여준다. Ab의 더 낮은 농도에서 향상된 효과가 훨씬 더 현저한 것을 주목하는 것은 흥미롭다. 예를 들어, Raji 세포를 5 µg/mL의 어느 하나의 항체로 처리한 후, 세포자멸 세포의 퍼센트는 HD 처리 후에 2.5배 더 높지만, 20 µg/mL로의 처리 후에 2배 미만으로 약간 더 높다.

표 4

세포자멸사 유도 비교

세포주	항체 용량 ¹	Ch리톡시맵 ²	HD-ch-리톡시맵
Raji	1	0.83(2.18)	5.06(2.16)
	5	14.90(1.81)	36.91(8.73)
	10	26.73(4.28)	47.40(2.89)
	20	30.05(3.13)	58.37(4.67)
Ramos	1	4.00(0.11)	19.36(2.06)
	5	20.11(2.30)	33.06(7.1)
	10	24.61(0.40)	42.53(4.28)
	20	31.74(1.70)	40.79(1.41)
Jok-1	1	7.85(0.99)	4.39(0.99)
	5	23.77(5.48)	27.19(12.14)
	10	59.43(13.89)	52.13(18.97)
	29	49.44(7.50)	56.87(4.60)

¹상이한 양의 항체를 각 세포주에 20시간 동안 첨가함($\mu\text{g}/\text{ml}$)

²ch리톡시맵에 의해 유도된 퍼센트 세포자멸 세포(괄호 안의 수 = 플러스/마이너스)

³HD-ch리톡시맵에 의해 유도된 퍼센트 세포자멸 세포(괄호 안의 수 = 플러스/마이너스)

보체 의존적 세포독성(CDC)의 비교

ch리톡시맵 및 ch리톡시맵-HD의 CDC 활성을 비교하였다(도 7A-C 참고). CDC는 보체 구성요소의 항체의 Fc 영역에의 결합 후에 유도되며, HD 구성물의 아이소타입인 IgG1 아이소타입에서 강력하다. 증강 효과를 모든 세포주에서 관찰하였다 도 7A에서 알 수 있는 것과 같이, 예를 들어, $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 키메라가 있는 Raji 세포에서 실제로 CDC 활성은 없었지만, 세포의 35%가 HD mAb로 사멸하였다. 이것은 세포자멸사의 유효성의 최고 개선과 상관이 있다. HD 항체의 효능은 Ramos 세포에서 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 안정 수준에 있다는 것을 주목하는 것은 흥미롭다(도 7B). ch리톡시맵은 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 안정 수준을 나타내지만, 테스트된 어떠한 수준에서도 HD Ab의 효능에는 도달하지 못하며, 이것은 더 높은 용량이라도 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ HD Ab의 사멸 용량에 도달하지 못할 것임을 시사한다.

ADCC의 비교

키메라 항체를 항체 의존적 세포의 세포독성(ADCC)을 유도하는 능력에 대해 테스트하였다. HD 항체는 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 및 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 Raji 및 Ramos 세포에서 ch리톡시맵보다 상당히 더 많은 ADCC를 유도한다.

시험관내에서 림프종 성장의 억제

종양 세포에 대한 이들 항-CD20 항체의 생체내 사멸 잠재력에 접근하기 위하여, ch리톡시맵 및 ch리톡시맵-HD의 항증식 효과를 Raji 및 Ramos 세포주에서 테스트하였다. 검정은 핵산에 결합하는 형광 염료의 수준을 측정한다(방법 및 물질 참고). HD 항체는 테스트한 모든 농도에서 두 세포주에서 모두 더 큰 정도로 증식을 억제하였다.

실시예 4 - 역 구성을 가진 HD 항-Her-2 항체(트라스투주맵)의 생체내 특성화

허셉틴의 HD 형태(트라스투주맵)를 실시예 3에서 기술한 것과 같이 제조하였다. CDR 서열을 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로부터 도출하였다:

허셉틴 경쇄(1 및 2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
VPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0219] (서열 번호:22)

[0220] 허셉틴 중쇄(1 및 2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGY
TRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0221]

[0222] (서열 번호:23)

[0223] 관련된 인간 종양 모델에서 효능에 대해 HD-항체를 평가하기 위하여, 치료법을 종양 주사 후 7일 후에 유방암 (MCF-7)을 발현하는 저항원의 누드 마우스 모델에서 시작하였다.

[0224] 도 8에서 나타낸 것과 같이, 허셉틴은 치료 효과를 보이지 않았고, 종양 측정은 대조군과 동일하였다(상단 줄). 대조적으로, HD-허셉틴은 종양 성장을 극적으로 억제하였다(하단 줄). 이 모델에서 허셉틴의 활성의 부족은 저항원 발현 유방암을 인식하지 못하기 때문에 예상되었다. HD-허셉틴으로 처리된 종양의 조직학적 조사시에 생존 가능한 암세포는 거의 발견하지 못한 한편 염증 세포는 풍부하였다.

[0225] 인간 용량으로 외삽하였을 때, HD-허셉틴의 최대 활성 용량은 10 μ g였지만 허셉틴은 100 μ g/용량(75 kg 인간 대상체를 가정하여 기반으로 함)까지 효과를 나타내지 않은 것으로 나타났다.

[0226] **실시예 5 - 역 구성을 가진 HD 항-Vegf(아바스틴) 항체의 특성화**

[0227] 바이오시밀러 베바시주맙 항체를 가변 중쇄 및 경쇄 서열로부터 도출된 CDR을 활용하여 실시예 3에서 기술된 것과 같이 그것의 제조법 HD 형태로 변환하였다:

[0228] 베바시주맙 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0229]

[0230] (서열 번호: 24)

[0231] 베바시주맙 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGE
PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0232]

[0233] (서열 번호: 25)

[0234] VEGF를 건강한 세포 및 신생물 세포에 의해 제조한다. 그것의 활성은 2개의 수용체 티로신 키나제에 의해 매개 된다. VEGF 신호전달은 자주 생리적 및 병리적 혈관신생에서 속도 제한 단계이다. 베바시주맙을 III 및 IV기 결

장암 환자에서 단일 작용제로서 및 화학요법과 병용하여 항혈관신생 암 치료제로서 연구하였다.

[0235] HD 베바시주맵의 생체내 종양 모델 평가의 요약:

[0236] a) 종양 성장을 억제한다(신장 세포 암종 및 전립선암에서);

[0237] b) 종양을 퇴행시킨다(결장 암종에서);

[0238] c) 종양 재발을 방지한다;

[0239] d) 전이를 감소/방지한다(신장 및 결장 전이 모두에서);

[0240] e) A498 인간 신장 암종 세포의 성장을 감소시킨다.

[0241] 생체내 평가는 다른 유형의 암이 HD 항-Vegf으로 치료될 수 있고 그것은 증식을 억제할뿐만 아니라 암을 퇴행시키는 것을 나타낸다.

[0242] **실시예 6 - Characterization of an HD 항-PD-L1 항체 with T15 이량체 구성**

[0243] 아테졸리주맵(항-PD-L1 mAb)의 아래의 가변 중쇄 및 경쇄 서열로부터의 CDR을 사용하여 T15 이량체의 역 구성(표 2 참고)을 항체의 Fc 단부에 통합시킨 인간화된 IgG1을 구성하였다(실시예 3에서 기술한 것과 같음).

[0244] 중쇄:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGS
 TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0245] (서열 번호:26)

[0247] 경쇄:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0249] (서열 번호: 27)

[0250] HD-아테졸리주맵을 PD-L1 항원을 내포한 흑색종 세포에 대한 모 항체에 대비하여 테스트하였다. 인간 PD-L1의 발현을 유세포 분석에 의해 평가하였다. 간단히 설명하면, 흑색종 세포 현탁액을 준비하여 2% 태아 소 혈청을 함유한 인산염 완충 식염수(PBS; pH 7.2)로 이루어진 형광 활성화된 세포 분류 완충액으로 세척하였다. 세포를 항-PD-L1 항체(2 µg/mL), 또는 마우스 IgG1 아이소타입 대조군(2 µg/mL)과 함께 60분 동안 4℃에서 인큐베이션하고, 3회 세척하고, FITC-표지된 이차 항체(BD PharMingen, San Jose, CA)와 함께 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 그런 후 세포를 PBS로 추가로 3회 세척하고, 2% 포르말린에 고정시키고, 형광에 대해 평가하였다(FACScalibur 유세포 분석기; BD Bioscience, San Diego, CA).

[0251] 결과를 평균 형광 지수(MFI) 또는 결합의 배수 증가(배경을 뺀)로서 표시하였다 - 아래의 표 5 참고.

표 5

FITC(배경)	아테졸리주맵	HD-아테졸리주맵	배수 변화
5	27	2498	113

[0252]

[0253]

결과는 세포 표면 PD-L1과 항체의 HD 형태와의 결합에서 100배를 초과하는 증가를 나타낸다. 이것은 필연적으로 종양 세포 매개된 T 세포 억제를 차단하는 능력의 증가를 초래할 것이다.

[0254]

실시예 7- 시험관내 진단 적용을 위한 HD 기술

[0255]

PSA에 대한 단클론성 항체를 재조합 기술에 의해 HD 변형시킨 후 전자-화학발광 검출을 위해 표지화하고 항원 검출 검정에서 활용하였다(Anal. Sci. 2009, May 25(5): 587-97). 비변형 항체를 T15 펩타이드를 항체의 경쇄의 단부에 연결시킨 HD 변형 항체와 비교하였다.

[0256]

HD 변형 항체는 비변형 항체보다 훨씬 더 높은 신호 대 노이즈 비율을 제공하여 특히 낮은 항원 농도에서 검정을 보다 민감하게 만들었다(도 11 참고).

[0257]

결과는 HD 변형 항체를 임의의 구성에서, 보다 표준적인 ELISA를 포함한 임의의 검출 방법을 사용할 수 있다(직접 또는 간접 검출). HD 변형 항체를 사용하여 신호를 향상시킬 수 있을뿐만 아니라 더 높은 신호 생성으로 인해 검정을 판독하는 시간을 감소시킬 수 있다.

[0258]

단수를 나타내는 단어의 수식어("a" 또는 "an")의 사용은 본원에서 용어 "포함하는"과 관련하여 사용될 때 "하나"를 의미할 수 있지만, 또한 "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 하나 이상"의 의미와도 일치한다. 단수 형태로 표시된 임의의 요소는 또한 그것의 복수 형태를 아우른다. 복수 형태로 표시된 임의의 요소는 또한 그것의 단수 형태를 아우른다. 본원에서 사용된 용어 "복수"는 하나 이상, 예를 들어, 둘 이상, 3개 이상, 4개 이상, 등을 의미한다.

[0259]

본원에서 사용되는 것과 같이, 용어 "포함하는", "가지는", "포함되는" 및 "함유하는", 및 이것들의 문법적 변용은 포괄적이거나 개방적이며, 인용되지 않은 추가 요소 및/또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 용어 "본질적으로 이루어지는"은 본원에서 조성물, 용도 또는 방법과 관련하여 사용될 때 그 추가 요소, 방법 단계 또는 추가 요소 및 방법 단계 모두가 존재할 수 있지만, 이들 추가는 실질적으로 인용된 조성물, 방법 또는 용도가 기능하는 방식에 영향을 미치지 않는 것을 나타낸다. 용어 "이루어지는"은 본원에서 조성물, 용도 또는 방법과 관련하여 사용될 때 추가 요소 및/또는 방법 단계의 존재를 배제한다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 용어 "약"은 인용된 값을 기술하기 위해 사용될 때 인용된 값의 10% 이내를 의미한다.

[0260]

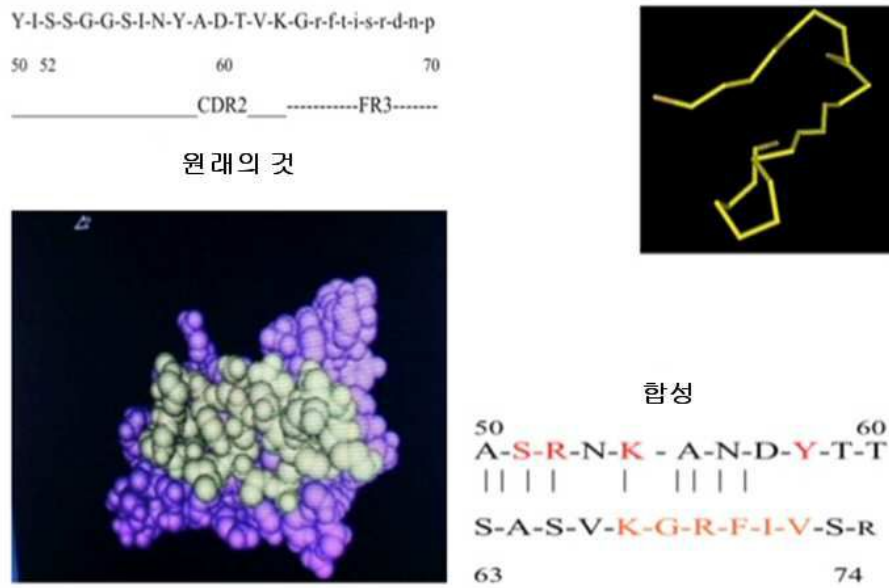
모든 인용은 본원에 참조로 포함된다.

[0261]

본 발명은 하나 이상의 구체예와 관련하여 기술되었다. 그러나, 기술분야에 숙련된 사람에게는 많은 변화 및 변형이 청구범위에서 정의된 발명의 범주로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다는 것이 분명할 것이다. 청구범위의 범주는 실시예에서 제시된 바람직한 구체예에 의해 제한되지 않아야 하며, 전체적으로 설명과 일치하는 가장 넓은 해석이 주어져야 한다.

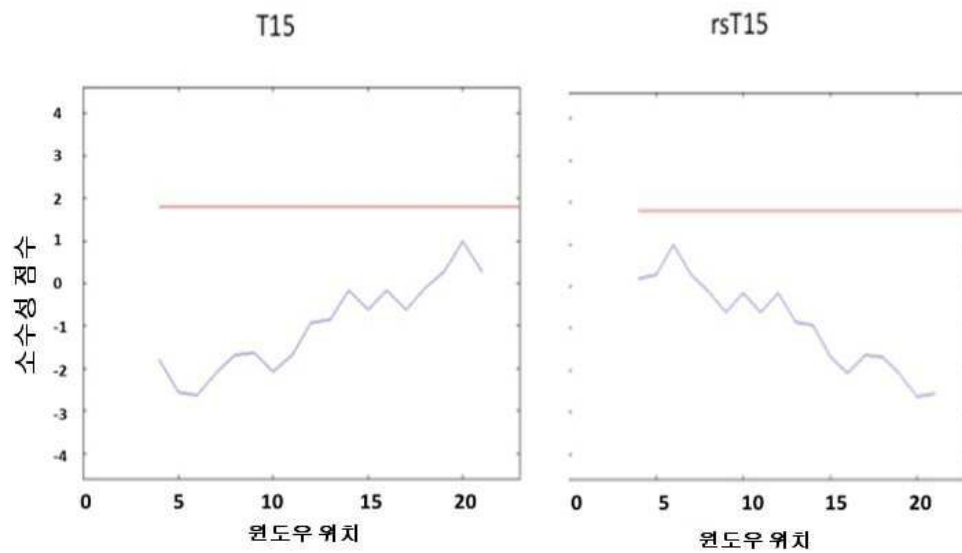
도면

도면1



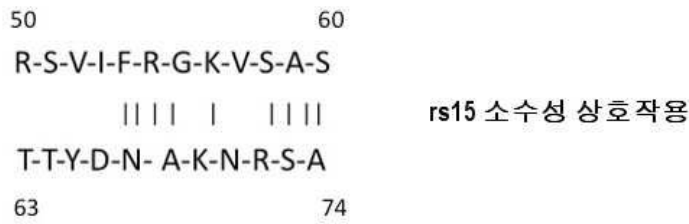
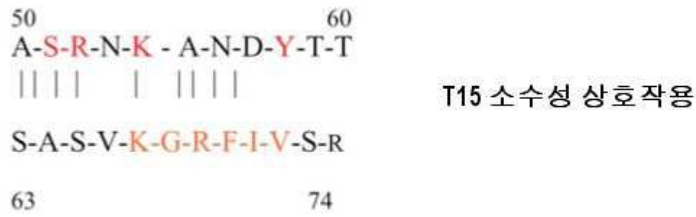
도 1

도면2



도 2

도면3



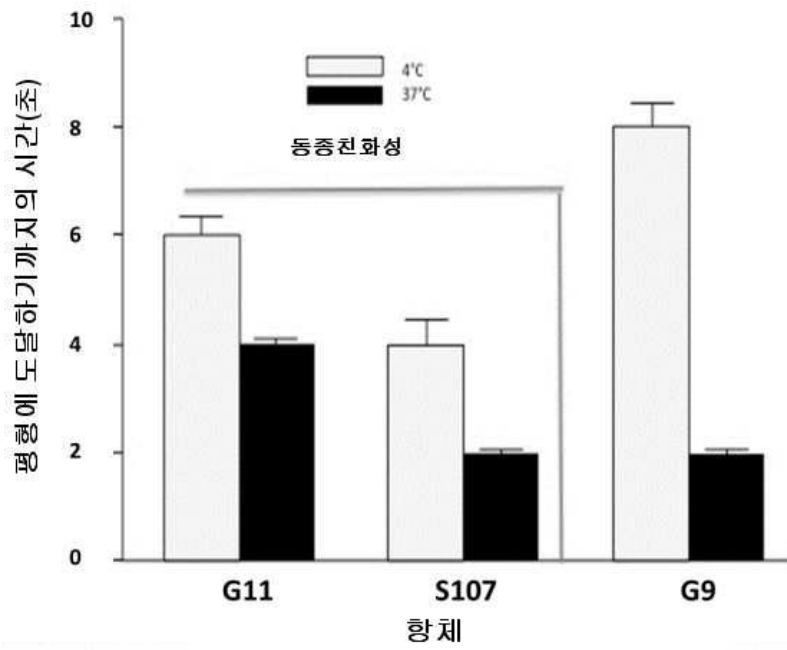
도 3

도면4



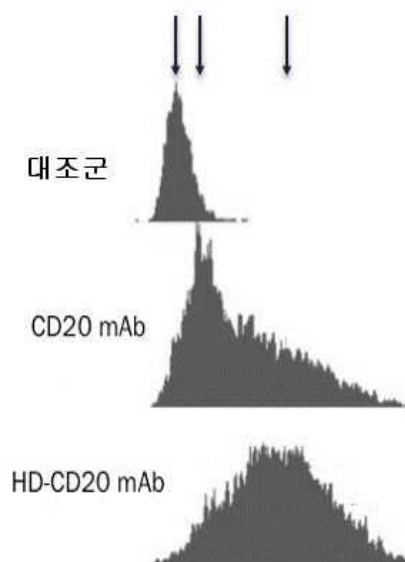
도 4

도면5



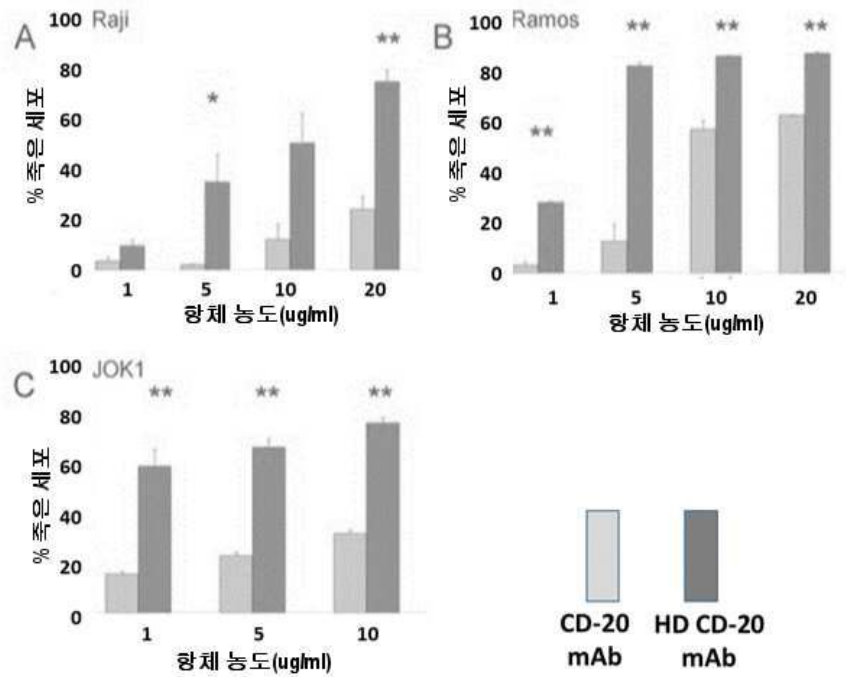
도 5

도면6



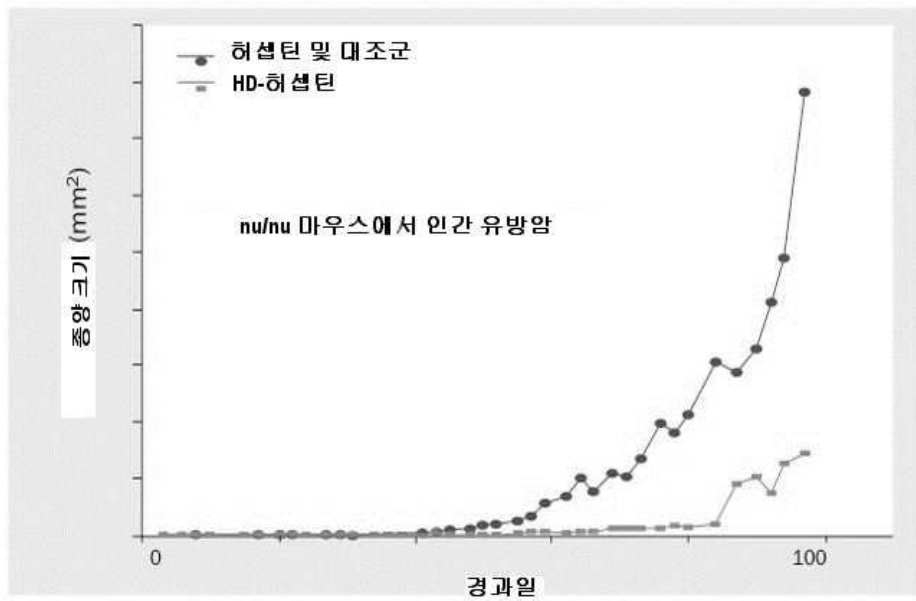
도 6

도면7



도 7

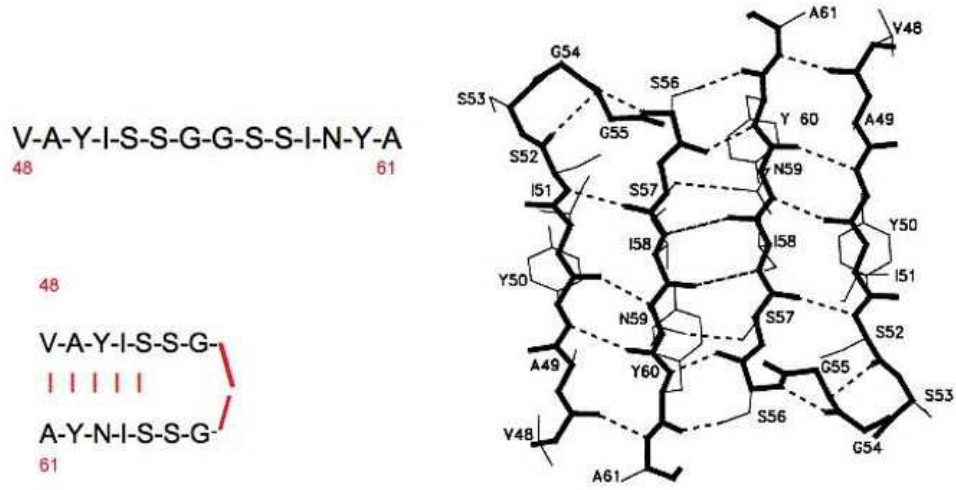
도면8



도 8

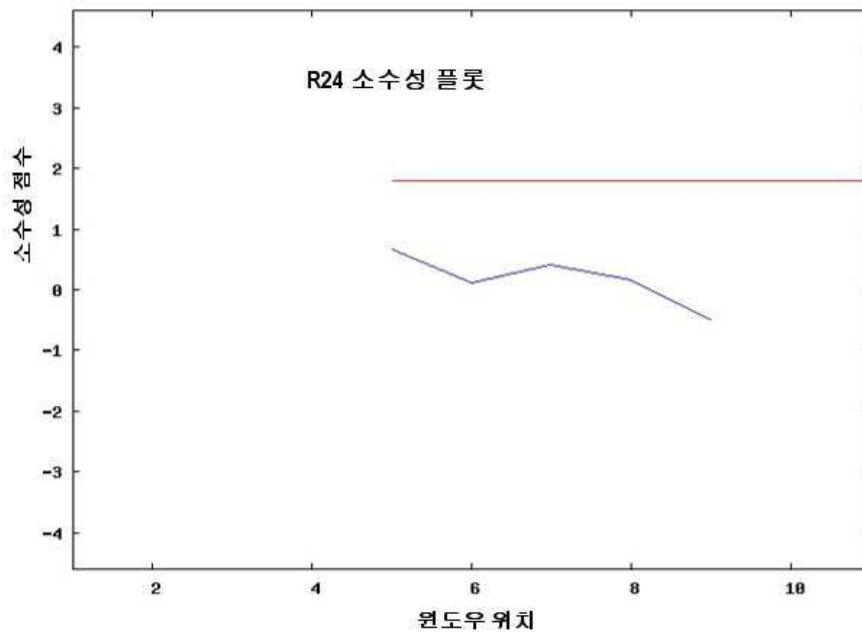
도면9

R24 헤어핀 H2 루프



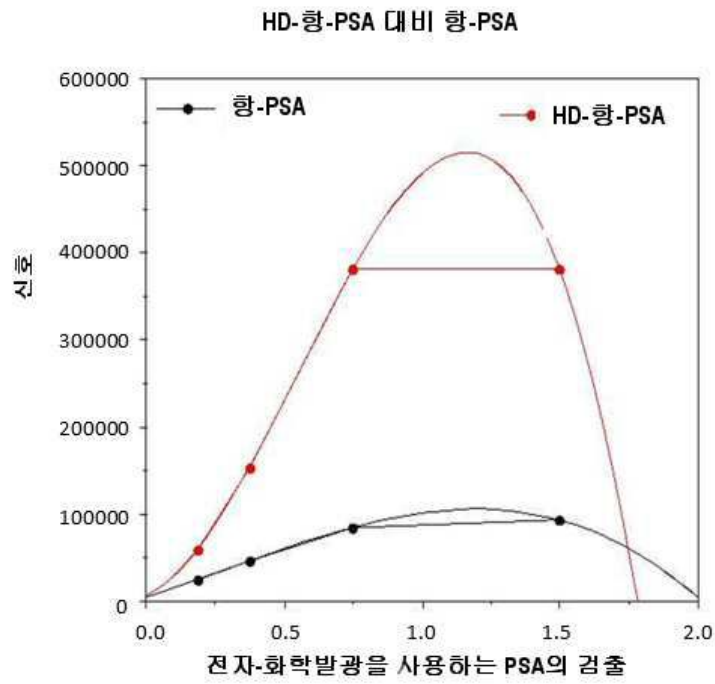
도 9

도면10



도 10

도면11



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.