(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월04일
(11) 등록번호 10-1866623
(24) 등록일자 2018년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 51/10* (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 51/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7008574(분할)
(22) 출원일자(국제) 2006년11월28일
심사청구일자 2015년04월30일
(85) 번역문제출일자 2015년04월02일
(65) 공개번호 10-2015-0041197
(43) 공개일자 2015년04월15일
(62) 원출원 특허 10-2008-7015774
원출원일자(국제) 2006년11월28일
심사청구일자 2011년11월28일
(86) 국제출원번호 PCT/DK2006/000669
(87) 국제공개번호 WO 2007/059782
국제공개일자 2007년05월31일
(30) 우선권주장
60/740,403 2005년11월28일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Molecular Immunology, Vol. 38, pp. 1-8 (2001.01.31.)
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 16 항

(73) 특허권자
젠맵 에이/에스
덴마크 1560 코펜하겐 브이 칼베보드 브뤼게 43
(72) 발명자
파렌, 파울
네덜란드 3984 페에르 오디직 베르도르퍼바르트 17
슈르만, 야닌
네덜란드 1098 에스페 암스테르담 아보가드로스트라트 11-3
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

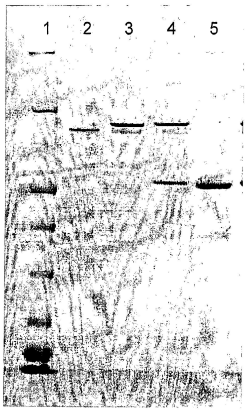
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **재조합 1가 항체 및 그의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 생체내 투여될 때 긴 반감기를 갖는 1가 항체, 상기 1가 항체를 제조하는 방법, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 및 1가 항체의 용도를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 16/16 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)

(72) 발명자
빈크, 톰
네덜란드 2406 데베 알펜 안 덴 리진 새프만스트라트 25
블리커, 빌렘, 카렐
네덜란드 1017 에베 암스테르담 카이저스그라흐트 704
반 데 빈켈, 얀, 제.예.
네덜란드 3707 쎄카 자이스트 베를렝데 슬로틀란 80
반 버켈, 패트릭
네덜란드 3544 엔하 우트레흐트 베스터파클란 3213에
뵈르스켄스, 프랑크
네덜란드 3523 엑스케 우트레흐트 율리아나베크 310

(56) 선행기술조사문헌
WO2005063816 A3
US05334708 A
Mol Immunol. 24(8): 821-829(1987.08.)
Biotechnol. Appl. Biochem. 40(Pt 3): 261-269(2004.12.)
J. Immunol. 150(12): 5400-5407(1993.06.15.)

(30) 우선권주장
60/852,479 2006년10월17일 미국(US)
60/852,611 2006년10월18일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 디술파이드 결합 또는 아미드 결합으로 서로 연결된 경쇄 및 중쇄를 포함하고,

a) 상기 경쇄는 Ig의 불변 (C_L) 영역의 아미노산 서열에 연결된, 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_L) 영역의 아미노산 서열을 포함하며,

b) 상기 중쇄는 상기 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_H) 영역의 아미노산 서열 및 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄의 아미노산 서열은 중쇄가 서열 14의 아미노산 잔기 99 내지 110에 대응하는 아미노산 잔기가 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된 것인,

폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 인간에게 투여되었을 때 1가 형태로 존재하는 1가 항체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, C_L 영역이 인간 IgG의 카파 경쇄의 불변 영역인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, C_L 영역이 인간 IgG의 람다 경쇄의 불변 영역인 제약 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄와 중쇄가 하나 이상의 디술파이드 결합으로 서로 연결된 제약 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 전체 힌지 영역이 결실된 것인 제약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄가 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 1가 항체가 VEGF, cMet, CD20, CD38, IL-8, CD25, CD74, FcαRI, FcεRI, 아세틸 콜린 수용체, fas, fasL, TRAIL, 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스의 외피 E2, 조직 인자, 조직 인자와 인자 VII의 복합체, EGFr, CD4, 및 CD28로부터 선택된 표적에 결합하는 것인 제약 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 1가 항체가 펩티드 합성 항원 (Tyr, Glu)-Ala-Lys에 특이적으로 결합하지 않는 것인 제약 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 생산된 1가 항체가 인간 항체인 제약 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 1가 항체를 발현하기에 적합하고, i) 선택된 항원 특이적 항체의 가변

(V_L) 영역을 코딩하는 핵산 서열, ii) 인간 IgG의 카파 또는 람다 사슬의 불변 (C_L) 영역을 코딩하는 핵산 서열, iii) 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_H) 영역을 코딩하는 핵산 서열, 및 iv) IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열, 또는 (v) 그에 대한 상보성 서열을 포함하며, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 중쇄가 서열 14의 아미노산 잔기 99 내지 110에 대응하는 아미노산 잔기가 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된 것인 핵산 구성체를 포함하고,

여기서 상기 1가 항체는 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 인간에게 투여되었을 때 1가 형태로 존재하는 것인 제약 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열 또는 그에 대한 상보성 서열에 작동가능하게 연결된 것인 제약 조성물.

청구항 12

치료 잔기에 컨쥬게이팅된 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 1가 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트를 포함하는 제약 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 암, 세포 증식 질환, 자가면역 질환, 염증 질환 또는 혈관신생 질환의 치료에 사용하기 위한 것으로서, 항체가 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프에 대한 항체의 결합은 상기 질환을 치료하는데 효과적인 제약 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 1가 항체가 VEGF, cMet, CD20, CD38, IL-8, CD25, CD74, FcαRI, FcεRI, 아세틸 콜린 수용체, fas, fasL, TRAIL, 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스의 외피 E2, 조직 인자, 조직 인자와 인자 VII의 복합체, EGFr, CD4, 및 CD28로부터 선택된 표적에 결합하는 것인 제약 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 16

하나 이상의 디술파이드 결합 또는 아미드 결합으로 서로 연결된 경쇄 및 중쇄를 포함하고,

a) 상기 경쇄는 Ig의 불변 (C_L) 영역의 아미노산 서열에 연결된, 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_L) 영역의 아미노산 서열을 포함하며,

b) 상기 중쇄는 상기 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_H) 영역의 아미노산 서열 및 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄의 아미노산 서열은 중쇄가 서열 14의 아미노산 잔기 99 내지 110에 대응하는 아미노산 잔기가 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된 것인,

폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 인간에게 투여되었을 때 1가 형태로 존재하는 1가 항체를, 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체와 제제화하는 것을 포함하는, 상기 1가 항체를 포함하는 제약 조성물의 제조 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 치료 용도로 사용될 수 있는 1가 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 1가 항체를 제조하는 방법, 상기 1가 항체를 포함하는 제약 조성물 및 상이한 치료 용도를 위한 그의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 천연 항체 및 면역글로불린은 보통 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디술파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 디술파이드 연결의 수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄 사이에서 상이하다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역 (본원에서 C_L로 약칭함)로 이루어진다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 3개의 도메인, 즉 C_H1, C_H2 및 C_H3으로 이루어지는 중쇄 불변 영역 (C_H)으로 이루어진다. 중쇄의 C_H1 및 C_H2는 소위 힌지 (hinge) 영역에 의해 서로 분리된다. 힌지 영역은 정상적으로 항체 분자에서 다른 중쇄의 힌지 영역의 시스테인 잔기와 디술파이드 다리를 형성할 수 있는 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함한다.

[0003] 최근에, 항체는 치료 용도를 위해 관심이 집중되는 분야가 되고 있고, 많은 항체 약물 제품이 치료 약물로서 사용이 승인되었거나 승인 절차가 진행되고 있다. 치료 항체의 목적하는 특성은 치료할 특정 병태에 따라 상이할 수 있다. 일부 적응증을 위해, 예를 들어 항체의 치료 효과가 그렇지 않으면 항원에 결합할 수 있는 하나 이상의 특이적 분자와 항원 사이의 상호작용을 차단하는 경우에 항원 결합만이 필요하다. 상기 적응증에서, 유일한 기능이 항원에 결합하는 것인 Fab 단편의 사용이 바람직할 수 있다. 다른 적응증의 경우에는, 예를 들어 보체 활성화를 유도하는 능력 및/또는 예를 들어 Fc 수용체에 결합하여 이화로부터 보호하고 면역 세포를 동원하는 능력 등과 같은 추가의 효과가 필요할 수 있다. 상기 용도에서, 항체 분자의 다른 부분, 예를 들어 Fc 영역이 요구될 수 있다. 일부 전장 항체는 항체가 Fab 단편으로서 사용될 때 길항제로서 작용하는 경우에도 표적 항원에 대한 결합시에 아고니스트 효과 (바람직하지 않은 것으로 간주될 수 있는)를 보일 수 있다. 일부 경우에, 상기 효과는 특히 표적이 수용체일 때 표적 이량체화를 촉진하여 활성화를 유도할 수 있는, 2가 항체의 "가교결합"에 의한 것일 수 있다. 가용성 항원의 경우에, 이량체화는 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있다.

[0004] 일부 경우에, FcαRI의 경우에서와 같이 항원에 대한 1가 결합은 세포자멸 (apoptotic) 시그날을 유도할 수 있다 (Kanamura et al, Blood published on line September 25, 2006)

[0005] 따라서, 일부 적응증에서, 1가 항체가 바람직할 수 있다. 현재 이용가능한 Fab 단편은 신장에서의 여과에 의한 그의 작은 크기 및 Brambell 수용체 FcRn과 상호작용할 수 있는 능력의 결여 때문에 열등한 약동학을 보이고 (Junghans RP et al., Proc Natl Acad Sci USA 93(11), 5512-6 (1996)), 따라서 생체 내에서 불안정하고 투여 후에 매우 신속하게 소실된다.

[0006] Fc 영역이 2개의 Fc 폴리펩티드를 포함하는 이량체 1가 항체 (Fab/c)도 문헌에 기재되어 있다 (WO0200563816 (Genentech) 및 Parham P, J Immunol. 131.(6), 2895-902 (1983).

[0007] 따라서, 치료제로서 사용하기 위한 안정한 1가 항체에 대한 필요성이 존재한다.

[0008] 예를 들어, 디술파이드 다리의 형성을 위해 또는 항체에서 비-공유 중쇄간 접촉을 제공하기 위해 필요한 아미노산 잔기를 포함하는 영역을 포함하는, 전장 항체의 하나 이상의 도메인의 결실이 1가 항체를 제조하는 한 방법이다.

[0009] 이가라쉬 (Igarashi) 등 (Igarashi, TM. et al., Biochemistry 29, 5727 (1990))은 전체 C_H1 도메인은 결실되었지만, 힌지 영역은 무손상 상태인 마우스 IgG2a 분자의 구조를 설명한 바 있다. C_H1 결실된 항체는 비교적 작은 힌지 각으로 연신된 구조로서 존재하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 분자는 IgG에 대해 예상된 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 이루어진 규칙적인 사량체 입체 형태를 보유하였고, 따라서 계속 2가 항체이었고, C_H1 결실은 돌연변이된 항체의 친화도에 영향을 주지 않았다.

[0010] 라르손 (Larson) 등 (Larson, SB. et al., J Mol Biol 348, 1177 (2005))은 C_H2 도메인이 결실된 인간화 IgG1 항체의 구조를 설명하였다. 상기 항체는 형태 A 및 형태 B로 불리는 2개의 분자 형태로 존재한다. 형태 A는 2개의 사슬간 디술파이드 결합을 힌지에 포함하지만, 형태 B는 사슬간 디술파이드 결합을 포함하지 않는다. 형태 B는 C_H3 도메인 내에 비-공유 상호작용에 의해 함께 유지되는 것으로 보이는 ~122 kDa 분자로서 존재한다. 항체는 FcRn 수용체에 결합하여 재순환되는 능력이 없기 때문에 신속한 혈청 소실을 보인다.

[0011] 이량체 입체 형태가 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄만으로 구성된 Ig 1/2 분자는 인간 및 뮤린 형질세포종에서 매우 드문 결실의 결과로서 설명되었다. 골수외 연조직 형질세포종, 발덴스트롬 (Waldenstrom) 마크로글로불린혈증, 혈장 세포 백혈병 및 다발성 골수종으로 고통받는 복수의 환자는 IgG 1/2 분자를 그의 소변에 분비하였다. 1/2 분자는 또한 그의 혈청에도 존재하는 것으로 밝혀졌다. 상기 1/2 분자의 생화학적 특성에 대한 연구는 이들이, 중쇄 C_H1, 힌지 및 C_H2 영역은 정상으로 나타나지만 C_H3 영역에 결실이 존재하는 IgG1 분자로 구성됨을 보여주었다. 스피겔버그 (Spiegelberg)에 의해 분석된, IgG1 1/2 분자에서 C_H3 불변 도메인 상의 결실은 5,000-8,000 달톤을 포함하는 것으로 밝혀졌고, 힌지 펩티드 서열은 야생형 IgG1과 동일하였다. 돌연변이는 C_H3에 위치하는 것으로 보였고, 힌지 펩티드는 정상인 것으로 보였다 (Hobbs, JR et al., Clin Exp Immunol 5, 199 (1969); Hobbs, JR, Br Med J 2, 67 (1971); Spiegelberg, HL et al., Blood 45, 305 (1975); Spiegelberg, HL et al., Biochemistry 14, 2157 (1975); Seligmann ME et al., Ann Immunol (Paris) 129C, 855-870 (1978); Gallango, ML et al., Blut 48, 91 (1983)). 또한, 상기 인간 IgG1 1/2 분자는 신속하게 이화되고 (사람에서 반감기는 4.3일임), 단량체 형태에서 인간 림프구, 단핵구 또는 호중구 상의 C1q 또는 Fc 수용체에 결합할 수 없음이 밝혀졌다 (Spiegelberg, HL. J Clin Invest 56, 588 (1975)). 상기 연구로부터, IgG1 1/2 분자에는 분자를 탈안정화시키는 IgG 중쇄의 Fc 부분에 특징적인 비-공유 상호작용이 결여되고, IgG 중쇄 사이의 상호작용 유지에 C_H3 도메인이 특히 중요하다고 결론을 내릴 수 있었다.

[0012] 체세포 돌연변이에 의해 생성된 뮤린 IgA 1/2 분자도 문헌에 기재되어 있다 (Mushinski, JF, J Immunol 106, 41 (1971); Mushinski, JF et al., J Immunol 117, 1668 (1976); Potter, M et al., J Mol Biol 93, 537 (1964); Robinson, EA et al., J Biol Chem 249, 6605 (1974); Zack, DJ et al., J Exp Med 154, 1554 (1981)). 상기 분자는 C_H3 도메인의 결실 또는 C_H2-C_H3 경계에서의 돌연변이를 모두 포함하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 인간 IgA 1/2 분자가 다발성 골수종 환자에서 검출되었다. 상기 분자는 C_H3 영역에도 결실을 갖는 것으로 밝혀졌다 (Spiegelberg, HL et al., J Clin Invest 58, 1259 (1976); Kawai, T. et al., Ann Acad Med Singapore 9, 50 (1980); Sakurabayashi, I. et al., Blood 53, 269 (1979); Biewenga, J. et al., Clin Exp Immunol 51, 395 (1983)).

[0013] 힌지 결실이 있는 인간 IgG1 돌연변이체가 문헌에서 설명되고 구체화되었다 (Saphire, EO. et al., J Mol Biol 319, 95 (2002)). Dob 및 Meg은 힌지 영역의 결실을 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 인간 골수종 단백질이다. 상기 힌지 결실된 IgG1 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄로 구성된 구조와 안정한 Ig을 형성하고, 이것은 항체의 전형적인 이종사량체 구조이지만, 경쇄 사이에 사슬간 디술파이드 결합을 형성하여 입체형태적으로 크게 제한되고 효과기 기능을 거의 또는 전혀 보이지 않는 분자를 생성시킨다 (Burton DR et al., J Mol Biol 319, 9 (2002); Steiner, A et al., Biochemistry 18, 4068 (1979); Silverton, EW et al., Proc Natl Acad Sci USA 74, 5140 (1977); Rajan, SS et al., Mol Immunol 20 787 (1983); Guddat, W et al. Proc Natl Acad Sci USA 90, 4271 (1993); Sarma, R.et al., J. Applied Cryst. 15, 476 (1982); Klein, M., et al., Proc Natl Acad Sci USA 78, 524 (1981)).

[0014] 상부 및 중앙 힌지 영역 또는 전체 힌지 영역이 결실된 IgG3 분자가 디자인되었다 (Brekke, OH et al., Nature 363, 628 (1993); Brekke, OH et al., Nature 383, 103 (1996)). 완전한 힌지가 결실된 분자는 비-환원성 SDS-PAGE로 분석시에 1/2 분자의 존재를 보였다. 완전한 상부 및 보다 하부의 IgG3 힌지가 단일 시스테인으로 대체되고 보다 하부의 IgG3 힌지가 단일 Ala 결실을 포함하는 제2의 힌지 결실된 분자도 SDS-PAGE로 분석시에 1/2 분자를 포함하였다. 그러나, 결과는 생리학적 조건 하에서 2개의 중쇄-경쇄 1/2 분자가 IgG3 C_H3 도메인 사이에서 비-공유 상호작용에 의해 함께 유지되고; 따라서 무손상 IgG 분자가 형성됨을 보여준다.

[0015] 또한, 키메라 IgG1 및 IgG4 항체의 일치된 세트가 제조되었다 (Horgan, C. et al. J Immunol 150, 5400 (1993)). 항원에 대한 항체 결합에서 IgG 힌지 영역의 역할을 조사하기 위해서, 힌지 영역이 결여된 IgG1 및 IgG4의 돌연변이체를 모두 제조하였다. 돌연변이체는 IgG1 및 IgG4 중쇄 유전자로부터 힌지 영역 엑손을 결실

시켜 DNA 수준에서 생성시켰다. IgG1 및 IgG4 힌지-결실된 분자는 모두 2가이고, 따라서 전형적인 이종사량체 구조를 갖는다고 보고되었다. 이를 지지하여, 힌지-결실된 IgG4의 기능적인 친화도는 야생형 IgG4보다 항원에 대한 보다 우수한 결합을 보였고, 이것은 힌지-결실된 분자의 결합력이 상기와 같이 생성된 힌지 결실에 의해 영향받지 않음을 나타낸다.

[0016] 인간 IgG4 분자는 힌지 영역에 위치하는 중쇄간 디술파이드 결합의 부재 또는 존재에 의해 상이한 다양한 분자 형태로 존재한다. 따라서, 중쇄간 디술파이드 결합이 2개 또는 1개 형성되거나 형성되지 않은 IgG4 분자가 존재한다 (Schuurman, J. et al., Mol Immunol 38, 1 (2001)). 생리학적 조건 하에서, IgG4의 상기 분자 형태는 서로 평형 상태로 존재할 수 있다. 인간 IgG4는 상기 사슬간 디술파이드 결합의 존재 여부에 무관하게 면역글로불린 G 분자에 통상적인 2개의 Ig 중쇄 및 2개의 경쇄로 구성된, 용액 중의 사량체로서 존재한다 (Schuurman 2001 상기 문헌; Gregory, L. et al. Mol Immunol 24, 821 (1987)). 비-환원 조건 하에서의 변성시에, 2개의 비-공유 회합된 1/2 분자는 크기-결정 분석, 예를 들어 SDS-PAGE에 의해 입증되는 바와 같이 해리된다 (Schuurman, J. et al. Mol Immunol 38, 1 (2001); Deng, L. et al. Biotechnol Appl Biochem 40, 261 (2004)). 사슬간 디술파이드 결합 형성 또는 힌지 영역의 결실에 관련되는 힌지 영역의 잔기의 돌연변이는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성된 사량체 분자로 구성된, 용액 중의 IgG4 분자의 균질한 풀 (pool)을 생성시키는 것으로 밝혀졌다 (Schuurman, J. et al. Mol Immunol 38, 1 (2001); Horgan, C. et al. J Immunol 150, 5400 (1993)). 또한, IgG4 힌지-결실된 및 돌연변이된 항체도 천연 IgG4 분자에 비해 개선된 항원 가교결합 능력을 보였다 (Horgan, C. (1993) 상기 문헌).

[0017] 현재 많은 연구는 IgG 불변 영역 도메인 C_H1 및 C_H2의 돌연변이 또는 결실이 IgG 분자가 그들의 천연 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄 이종사량체 입체 형태로 조립되는 것에 영향을 주지 않음을 보여주었다. 중쇄의 그의 불변 영역에 상이한 결실을 포함하는 재조합 항체 분자는 그의 효과기 기능이 영향을 받는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 이 분자는 보체 활성화 능력이 없지만, 그의 항원 가교결합 능력을 계속 보유한다. 또한, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 포함하는 항체 1/2 분자는 생체 내에서 안정하지 않고/않거나 생체 내 반감기가 감소함이 밝혀졌다. C_H3 영역 내의 결실 및 상기 영역의 결실은 신속하게 대사되어 그 분자를 대부분의 치료 목적에 부적합하게 만드는 1/2 분자를 제시한다.

[0018] 따라서, 항원-매개 활성의 차단이 1가 항체 결합 (가교결합의 부재)을 필요로 하는, 치료 용도에 적합한 안정한 1가 항체의 생산을 위한 간단한 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0019] <발명의 개요>

[0020] 본 발명은 1가 항체를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은

[0021] A) i) 상기 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 Ig의 불변 C_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 상기 Ig의 C_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 함께 작동가능하게 연결되고, IgG1 서브타입의 경우에, C_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 C_L 영역이, 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 동물 또는 인간에게 투여할 때 C_L 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디술파이드 결합 또는 공유 결합을 형성할 수 있는 임의의 아미노산을 포함하지 않도록 변형되고;

[0022] ii) 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 Ig의 불변 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 힌지 영역에 대응하는 영역 및 Ig 서브타입에서 요구되는 바에 따라 C_H 영역의 다른 영역, 예를 들어 C_H3 영역이, 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 동물 또는 인간에게 투여할 때 인간 Ig의 C_H 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디술파이드 결합 또는 공유 또는 안정한 비-공유 중쇄간 결합의 형성에 참여하는 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형되고, 상기 Ig의 상기 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 상기 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 함께 작동가능하게 연결되고;

[0023] iii) 상기 1가 항체를 생산하기 위한 세포 발현계를 제공하고;

[0024] iv) (i) 및 (ii)의 핵산 구성체를 (iii)의 세포 발현계의 세포에서 동시 발현시켜 상기 1가 항체를 생산하는 것

[0025] 을 포함한다.

[0026] 상기 방법의 한 실시태양에서, 인간 Ig는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 또는 IgD 항체, 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG4 항체이다.

[0027] B) 또한, 인간 Ig가 서열 19에 제시된 아미노산 C_H 영역을 갖는 IgG1이고, C_H3 영역이, 위치 238에서 Arg (R)이 Gln (Q)으로 교체되고; 위치 239에서 Asp (D)가 Glu (E)로 교체되고; 위치 292에서 Lys (K)가 Arg (R)로 교체되고; 위치 302에서 Gln (Q)가 Glu (E)로 교체되고; 위치 328에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체되는 아미노산 치환 중 하나 이상이 이루어지도록 변형되는 방법이 제공된다.

[0028] B)에 따른 한 방법에서, 위치 238에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체된다.

[0029] B)에 따른 한 방법에서, 위치 238에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체되고, 위치 328에서 Pro (P)가 Leu (L)으로 교체된다.

[0030] B)에 따른 한 방법에서, 상기 5개의 치환이 모두 이루어진다.

[0031] C) 방법은 A) 또는 B)에 따른 방법으로서, 인간 Ig는 IgG1이고, C_L 영역은 서열 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 카파 경쇄 C_L이고, C_L 영역이, 위치 106에서 말단 시스테인 잔기가 또다른 아미노산 잔기로 교체되거나 결실되도록 변형된 방법이다.

[0032] D) 방법은 A) 또는 B)에 따른 방법으로서, 인간 Ig는 IgG1이고, C_L 영역은 서열 17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 람다 경쇄 C_L이고, C_L 영역이, 위치 104에서 시스테인 잔기가 또다른 아미노산 잔기로 교체되거나 결실되도록 변형된 방법이다.

[0033] F) 방법은 A) 또는 B), C) 또는 D)에 따른 방법으로서, 인간 Ig는 서열 19에 제시된 아미노산 C_H 영역을 갖는 IgG1이고, C_H1 영역이, 위치 14에서 Ser (S)가 시스테인 잔기로 교체되도록 변형된 방법이다.

[0034] G) A)에 따른 방법으로서, 인간 Ig는 서열 20에 제시된 아미노산 C_H 영역을 갖는 IgG2이고, C_H3 영역이, 위치 234에서 Arg (R)가 Gln (Q)로 교체되고; 위치 276에서 Met (M)이 Val (V)로 교체되고; 위치 288에서 Lys (K)가 Arg (R)로 교체되고; 위치 298에서 Gln (Q)가 Glu (E)로 교체되고; 위치 324에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체되는 아미노산 치환 중 하나 이상이 이루어지도록 변형된 방법이다.

[0035] G)에 따른 한 방법에서, 위치 234에서 Arg (R)가 Gln (Q)로 교체된다.

[0036] G)에 따른 한 방법에서, 위치 234에서 Arg (R)가 Gln (Q)로 교체되고; 위치 324에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체된 것인 방법.

[0037] G)에 따른 한 방법에서, 5개의 치환이 모두 이루어진다.

[0038] H) A)에 따른 방법으로서, 인간 Ig가 서열 21에 제시된 아미노산 C_H 영역을 갖는 IgG3이고, C_H3 영역이, 위치 285에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체되고; 위치 314에서 Ser (S)가 Asn (N)으로 교체되고; 위치 322에서 Asn (N)이 Lys (K)로 교체되고; 위치 327에서 Met (M)이 Val (V)로 교체되고; 위치 339에서 Lys (K)가 Arg (R)로 교체되고; 위치 349에서 Gln (Q)가 Glu (E)로 교체되고; 위치 352에서 Ile (I)이 Val (V)로 교체되고; 위치 365에서 Arg (R)이 His (H)로 교체되고; 위치 366에서 Phe (F)가 Tyr (Y)로 교체되고; 위치 375에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체되는 아미노산 치환 중 하나 이상이 이루어지도록 변형된 방법이다.

[0039] H)에 따른 한 방법에서, 위치 285에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체된다.

[0040] H)에 따른 한 방법에서, 위치 285에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체되고; 위치 375에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체된다.

[0041] H)에 따른 한 방법에서, 10개의 치환이 모두 이루어진다.

[0042] 본 발명은 또한 1가 항체를 생산하는 방법을 제공하고, 상기 방법은

[0043] i) 상기 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 Ig의 불변 (C_L) 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 상기 Ig의 C_L 영역을 코딩하는 핵산 서열이 함께 작동가능하게 연결되고;

[0044] ii) 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산을 포함하고, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 중쇄의 힌지 영역에 대응하는 영역이 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형되고, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산 및 상기 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산이 함께 작동가능하게 연결되고;

[0045] iii) 상기 항체를 생산하기 위한 세포 발현계를 제공하고;

[0046] iv) (i) 및 (ii)의 핵산 구성체를 (iii)의 세포 발현계의 세포에서 동시 발현시켜 상기 1가 항체를 생산하는 것

[0047] 을 포함한다.

[0048] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법을 사용하여 수득된 1가 항체를 제공한다.

[0049] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법을 사용하여 수득가능한 1가 항체를 제공한다.

[0050] 본 발명은 또한 경쇄 및 중쇄를 포함하는 1가 항체를 제공하고,

[0051] a) 상기 경쇄는 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_L) 영역의 아미노산 서열 및 Ig의 불변 (C_L) 영역의 아미노산 서열을 포함하고,

[0052] b) 상기 중쇄는 상기 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_H) 영역의 아미노산 서열 및 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄의 아미노산 서열은, 힌지 영역에 대응하는 영역에 존재하는 임의의 아미노산 잔기도 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 없도록 변형된다.

[0053] 본 발명은 또한

[0054] a) 1가 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하고;

[0055] b) 1가 항체를 숙주 세포 배양액으로부터 회수하는 단계

[0056] 를 포함하는, 본 발명에 따른 1가 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0057] 본 발명은 또한 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은, 상기 C_H 영역 내의 힌지 영역에 대응하는 영역이 상기 C_H 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열, 또는 그의 상보성 서열을 포함하는 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형된다.

[0058] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 구성체를 포함하고, 상기 핵산 구성체가 상기 항체의 경쇄를 코딩하지 않을 경우에는 상기 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성체도 포함하는 숙주 세포를 배양하여 폴리펩티드를 발현시키고, 1가 항체를 세포 배양액으로부터 회수하는 것을 포함하는, 본 발명에 따른 1가 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0059] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 1가 항체의 생산을 위한 본 발명에 따른 핵산 구성체의 용도를 제공한다.

[0060] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0061] 본 발명은 또한 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 본 발명에 따른 숙주 세포를 배양하여 폴리펩티드를 발현시키고, 세포 배양액으로부터 1가 항체를 회수하는 것을 포함하는, 본 발명에 따른 1가 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0062] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 1가 항체의 생산을 위한 본 발명에 따른 숙주 세포의 용도를 제공한다.

[0063] 본 발명은 또한 치료 잔기에 컨쥬게이팅된 본 발명에 따른 1가 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트를 제공한다.

[0064] 본 발명은 또한 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 1가 항체를 제공한다.

[0065] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 1가 항체의 의약으로서의 용도를 제공한다.

[0066] 본 발명은 또한 암, 세포 증식 질환, (자가)면역 질환, 염증 질환, 알레르기 질환 (천식) 및/또는 혈관신생 질환 치료용 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프에 대한 항체의 결합은 상기 질병을 치료하는데 효과적이다.

[0067] 본 발명은 또한 특정 표적에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료가능한 질병 또는 질환 치료용 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도를 제공하고, 여기서 면역계-매개 활성의 관여가 항체의 투여 효과를 달성하기 위해 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않고, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다.

[0068] 본 발명은 또한 가용성 항원의 차단 또는 억제에 의해 치료가능한 질병 또는 질환 치료용 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도를 제공하고, 여기서 상기 항원의 다량체화는 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있고, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다.

[0069] 본 발명은 또한 세포막 결합 수용체의 차단 또는 억제에 의해 치료가능한 질병 또는 질환 치료용 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도를 제공하고, 상기 수용체는 상기 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있고, 상기 항체는 상기 수용체에 특이적으로 결합한다.

[0070] 본 발명은 또한 대상에서 항원 활성이 억제되도록 대상에게 항원에 특이적으로 결합하는 본 발명에 따른 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 본 발명에 따른 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함하는, 항원의 활성이 바람직하지 않은 질병 또는 질환으로 고통받는 대상에서 항원을 억제하는 방법을 제공한다.

[0071] 또한, 본 발명은 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 본 발명에 따른 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함하는, 질병 또는 질환의 치료 방법을 제공한다

[0072] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 1가 항체를 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0073] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 구성체를 포함하는 유전자 도입 동물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1: CD20-특이적 항체 7D8-IgG1, 7D8-IgG4 및 7D8-HG를 비-환원성 SDS-PAGE로 평가하였다.

레인 1: 마커 SeuBlue plus2 예비염색 (인비트로겐 비브이 (Invitrogen BV), 네덜란드), 레인 2: 내부 대조군, 레인 3: 7D8-IgG1, 레인 4: 7D8-IgG4, 및 레인 5: 7D8-HG.

도 2: 7D8-HG의 환원 CNBr/트립신에 의한 소화시에 39.3분 TIC 시간에서 용출시킨 [M+3H]3+ 및 [M+2H]2+ 이온에 대해 추출된 이온 크로마토그램 (각각 m/z 676.4 및 1014.1).

도 3: 7D8-HG의 환원 CNBr/트립신에 의한 소화에 의한 아미노산 잔기 220 내지 238 (^{220}VAPEFLGGPSVFLFPPKPK^{238})을 포함하는 펩티드에 일치하는 m/z 시그날의 나노스프레이-MS/MS 분석으로 얻은 원 데이타.

도 4A 및 B: 7D8-HG의 환원 CNBr/트립신에 의한 소화에 의한 아미노산 잔기 220 내지 238 (^{220}VAPEFLGGPSVFLFPPKPK^{238})을 포함하는 펩티드에 일치하는 m/z 시그날의 나노스프레이-MS/MS 분석으로 얻은 원 데이타의 해석.

도 5: CD20-특이적 항체 7D8-IgG1, 7D8-IgG4 및 7D8-HG를 그의 CD20 형질감염된 세포에 대한 결합에 대해 평가하였다.

도 6: CD20-특이적 항체 7D8-IgG1, 7D8-IgG4 및 7D8-HG를 ELISA 플레이트에 코팅하였다 (농도 범위를 x-축 상에 표시). C1q 결합 (2 ㎍/ml)을 평가하였다.

도 7: A) Daudi 세포를 일정 농도 범위의 CD20-특이적 항체와 함께 10분 동안 예비 인큐베이팅한 후, NHS를 첨가하였다. CDC 유도 45분 후에, 세포를 PI 용액에 재현탁시켰다. 세포 용해액 (PI-양성 세포의 수)을 유동 세포 측정법으로 측정하였다. 데이타는 PI-양성 (사멸) 세포의 평균 형광 강도를 보여준다.

B) 측정된 용해액 내의 보체의 역할을 평가하기 위해서, 열-불활성화된 혈청 (혈청 ΔT)을 10 ㎍ 안티스토프(antistof)와 함께 인큐베이팅된 세포에 첨가하였다. 데이타는 PI-양성 (사멸) 세포의 평균 형광 강도를 보여준다.

도 8: Betv1에 대해 작용하는 힌지가 없는 (hingeless) IgG4 항체 (Betv1-HG)를 비-환원성 SDS-PAGE로 시험하였다.

레인 1: 마커 SeaBlue plus2 예비염색 (인비트로겐 비브이), 레인 2: 내부 대조군, 레인 3: BetV1-HG, 레인 4: IgG1 대조군.

도 9: Betv1-HG (힌지가 없는 IgG4 항-Betv1)의 겔 여과.

힌지가 없는 rIgG4 Betv1-HG를 포함하는 HEK 세포로부터 조건화된 배지를 Superdex200 컬럼으로 분획화하였다. 총 1 ㎍의 Betv1-HG를 컬럼에 적용하였다. 분획에서, Betv1 특이적인 IgG (·)는 Betv1 결합 시험에서 10 ㎕의 각각의 분획을 인큐베이팅하여 측정하였다. 그 결과는 첨가된 양에 대한 방사성 표지된 Betv1 결합 비율로서 표현된다. 파선 곡선은 214 nm에서의 흡광도 (A214nm) 측정에 의한, HPLC로 정제된 Betv1-IgG4 (10 ㎍)의 용출을 나타낸다.

도 10: Betv1-IgG1, Betv1-IgG4 및 Betv1-HG의 결합을 방사성 면역 분석으로 조사하였다. 단백질 G 세파로스에 결합된 항체의 계열 희석액에 대한 ^{125}I-표지된 Betv1의 결합을 조사하였다.

도 11: 세파로스 결합된 Betv1을 방사성 표지된 Betv1에 가교결합시키는 Betv1-IgG1, Betv1-IgG4 및 Betv1-HG의 능력을 방사성 면역 분석으로 조사하였다. Betv1 세파로스에 결합된 항체의 계열 희석액에 대한 ^{125}I-표지된 Betv1의 결합을 조사하였다.

도 12: 마우스 당 100 ㎍을 정맥 내로 투여한 후에 정상적인 7D8-IgG4, 무손상 7D8-IgG1, 7D8-IgG1, F(ab')2 및 7D8-IgG1 Fab 단편과 비교한 7D8-HG의 마우스 혈장 농도의 반대수 (semilogarithmic) 그래프.

도 13: 농도-시간 곡선으로부터 계산된 투여량/곡선하 면적 (D/AUC)으로서의 혈장 소실율의 대수 그래프. 데이타는 개별적인 마우스를 나타내고, ml · 일$^{-1}$ · kg^{-1}로 표현된다.

도 14: 2F8-IgG4 및 2F8-Fab 단편과 비교하여, 항-EGFr mAb 2F8-HG에 의한 A431 세포에서의 EGF-유도 EGFr 인산화 억제를 보여주는 투여량-반응 곡선. 상부 패널은 혈청 고갈된 배지에서의 억제 곡선을 보여주고, 중간 및 하부 패널은 IVIG가 배지에 각각 100 ㎍/ml 및 1000 ㎍/ml의 농도로 첨가될 때의 억제를 보여준다. y축은 항-포스포-타이로신 mAb를 사용하여 검출한 인산화된 EGFr을 나타내고, 시분해 형광 단위 (TRF 단위)로 표현된다. x-축 상에서, mAb 농도가 ㎍/ml로 표시된다. 데이타점은 4회 반복 시험의 평균 및 SEM이다.

도 15: 시간에 대한 농도의 반대수 그래프. 초기 혈장 농도는 모두 대략 100 ㎍/ml이었고, 이것은 마우스의 혈장 구획 내로의 초기 분포와 일치하는 것이다. 힌지가 없는 IgG4 변이체의 소실은 정상 IgG4에 비해 단지 경미하게 더 빨랐다. 중요한 사실은, 힌지가 없는 변이체의 소실은 대등한 분자 크기를 갖는 $F(ab')_2$ 단편보다 훨씬 더 느렸다는 것이다.

상기 실험은 Fc-부분이 정상적인 면역계를 갖는 마우스에서 혈장 체류 시간에 대한 유리한 효과를 갖고 내인성 IgG의 존재 하에서도 신생아 Fc 수용체 (FcRn)와 기능적인 상호작용을 나타냄을 보여준다.

도 16: 2F8-HG의 EGFr 단백질의 코트에 대한 결합을 폴리클로날 인간 IgG (IVIG)의 존재 하에 100 ㎍/ml의 농도에서 2F8-IgG4, 2F8-IgG1 및 2F8-IgG1의 Fab 단편과 ELISA로 비교하였다.

도 17: 2F8-HG에 의한 ADCC의 유도를 2F8-IgG1 및 2F8-IgG4와 비교하였다. A431 세포를 표적 세포로, 인간 말초혈 단핵구 세포를 효과기 세포로 사용하였다.

도 18: 실시예에서 사용된 프라이머의 서열.

도 19: 실시예에서 사용된 프라이머의 서열.

도 20: IVIG 보충된 SCID 마우스에서 7D8 변이체의 소실. 이 도면은 상부 패널에서 시간에 따른 mAb 7D8 변이체 농도의 반대수 그래프 및 하부 패널에서 총 인간 IgG 농도의 반대수 그래프를 보여준다.

도 21: FcRn -/- 마우스 대 야생형 마우스에서 7D8 변이체의 소실. 도면은 시간에 따른 농도의 반대수 그래프를 보여준다. 초기 혈장 농도는 모두 대략 100 ㎍/ml이었고, 이것은 마우스의 혈장 구획에서의 초기 분포와 일치한다. 힌지가 없는 IgG4 변이체 (7D8-HG), 정상적인 인간 IgG4 (7D8-IgG4) 및 7D8 IgG1의 $F(ab')_2$ 단편 (7D8-G1-$F(ab')_2$)을 모델에서 비교하였다.

도 22: DU-145 세포를 배양하여 (A) cMet-Fab, cMet-Fab 및 IVIG, cMet-Fab 및 HGF, cMet-Fab 및 IVIG 및 HGF, (B) cMet-HG, cMet-HG 및 IVIG, cMet-HG 및 HGF, cMet-HG 및 IVIG 및 HGF의 계열 희석액과 함께 인큐베이팅하였다. 산란 (scattering)이 48 h 후에 현미경으로 이중맹검으로 (double-blinded) 관찰되었고 (14명에 의해 평가됨), 평균 스코어±SEM을 플로팅하였다.

도 23: DU-145 세포를 배양하여 10 ㎍/ml의 (A) cMet-Fab, cMet-Fab 및 IVIG, cMet-Fab 및 HGF, cMet-Fab 및 IVIG 및 HGF, (B) cMet-HG, cMet-HG 및 IVIG, cMet-HG 및 HGF, cMet-HG 및 IVIG 및 HGF와 함께 인큐베이팅하였다. 산란(scatter)을 48 h 후에 현미경으로 이중맹검으로 관찰하였다 (14명에 의해 평가됨).

IVIG가 존재하거나 존재하지 않는 cMet-Fab 및 IVIG와 함께 예비 인큐베이팅된 cMet-HG는 HGF 유도 산란을 유의하게 억제하였다. 통계학적 분석을 위해, 양쪽 꼬리 윌콕슨 부호순위 (two-tailed Wilcoxon signed ranked) 시험을 중간값을 3 (최대 산란)으로 하여 수행하였다.

도 24: cMet-HG (레인 1), cMet-HG 및 IVIG (레인 2), cMet-HG 및 HGF (레인 3), cMet-HG, IVIG 및 HGF (레인 4), cMet-IgG1 (레인 5), cMet-IgG1 및 IVIG (레인 6)과 함께 인큐베이팅한 A549 세포로부터 제조한 추출물을 4-20% Tris-HCl Criterion Precast 겔 상에서의 SDS-PAGE 및 니트로셀룰로스 막 상에서의 웨스턴 블로팅에 의해 분리하였다. 막을 항-포스포-Met(pYpYpY 1230 1234 1235)-토끼 IgG (아빔 (Abeam), ab5662)와 함께 4℃에서 철야 인큐베이팅하였다. TBST로 세척한 후, 차단 시약 중의 2차 항체인 염소-항-토끼-HRP (셀 시그날링 (Cell Signalling), 7074)를 롤러 뱅크 (roller bank)로 60분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 막을 TBST로 6회 세척하였다. 마지막으로, 루미놀 인핸서 (Luminol Enhancer) 정지 용액으로 밴드를 현상하고, Lumiimager로 분석하였다. 웨스턴 블로트는 169 Kd 밴드를 보여주고, 이것은 포스포-Met(pYpYpY 1230 1234 1235)를 나타낸다.

도 25: 시험관 내 HIV-1 중화 분석에 첨가할 때 HuMax-CD4 또는 HuMax-CD4의 Fab 단편의 출발 농도. HuMax-CD4 및 HuMax-CD4의 Fab 단편에 의한 억제의 IC50 값은 4 파라미터 로지스틱 곡선 피트 (logistic curve fit)로 계산하고, 각각의 바이러스 구성체에 대해 나타내었다.

도 26: HuMax-CD4로 복강내 처리된 개별적인 PBMC 재구성 마우스, IgG 대조군 또는 처리되지 않은 마우스를 HIV-1로 감염시킨 경우의 % 인간 T 세포, % 뮤린 세포, 및 % CD4 및 % CD8 세포, 및 비율 CD4/CD8.

도 27: 루시퍼라제 활성 (3회 측정의 평균)에 의해 측정한, CD4-CCR5 또는 CD4-CXCR4 양성 세포의 복수의 HIV-1 균주 감염에 대한 HuMax-CD4 및 HuMax-CD4의 Fab 단편의 억제 곡선.

도 28: HuMax-CD4로 복강내 처리되거나 처리되지 않고 HIV-1로 감염시킨 개별적인 PBMC 재구성 마우스의 시간에 따른 혈장 HuMax-CD4 농도.

도 29: HuMax-CD4로 복강내 처리된 개별적인 PBMC 재구성 마우스, IgG 대조군 또는 처리되지 않은 마우스를 HIV-1로 감염시킨 경우의 시간에 따른 측정된 HIV-1 RNA 카피.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] <서열 목록의 상세한 설명>

[0076] 서열 1: 인간 Ig의 C_L 카파의 핵산 서열

[0077] 서열 2: 인간 Ig의 카파 경쇄의 아미노산 서열

[0078] 서열 3: 인간 Ig의 C_L 람다의 핵산 서열

[0079] 서열 4: 인간 Ig의 람다 경쇄의 아미노산 서열

[0080] 서열 5: HuMab-7D8의 V_H 영역의 핵산 서열

[0081] 서열 6: HuMab-7D8의 V_H 영역의 아미노산 서열

[0082] 서열 7: 마우스 항-Betv-1의 V_H 영역의 핵산 서열

[0083] 서열 8: 마우스 항-Betv-1의 V_H 영역의 아미노산 서열

[0084] 서열 9: HuMab-7D8의 V_L 영역의 핵산 서열

[0085] 서열 10: HuMab-7D8의 V_L 영역의 아미노산 서열

[0086] 서열 11: 마우스 항-Betv1의 V_L 영역의 핵산 서열

[0087] 서열 12: 마우스 항-Betv1의 V_L 영역의 아미노산 서열

[0088] 서열 13: 인간 IgG4의 야생형 C_H 영역의 핵산 서열

[0089] 서열 14: 인간 IgG4의 야생형 C_H 영역의 아미노산 서열

[0090] 서열 15: 위치 714 및 722에서 돌연변이된 인간 IgG4의 C_H 영역 (서열 13)의 핵산 서열

[0091] 서열 16: 서열 15의 핵산 서열의 발현에 의해 생성된 인간 IgG4의 C_H 영역의 아미노산 서열

[0092] 서열 17: 인간의 람다 사슬 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 S25751)

[0093] 서열 18: 인간의 카파 사슬 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 P01834)

[0094] 서열 19: IgG1 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 P01857)

[0095] 서열 20: IgG2 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 P01859)

[0096] 서열 21: IgG3 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 A23511)

[0097] 본 발명을 보다 용이하게 이해할 수 있도록 하기 위해, 특정 용어들을 먼저 정의한다. 추가의 정의는 상세한 설명 전체에 걸쳐 제시된다.

[0098] 본원에서 언급되는 용어 "항체"는 전체 항체 분자, 그의 항원 결합 단편, 1가 항체, 및 단일쇄를 포함한다. 항체 분자는 그의 기본적인 빌딩 블록 (building block), 면역글로불린 폴드 (fold) 또는 도메인이 면역계 및 다른 생물학적 인식 시스템의 많은 분자에 다양한 형태로 사용되는 면역글로불린으로 불리는 혈장 단백질의 패밀리에 속한다. 천연 항체 및 면역글로불린은 보통 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디술파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디술파이드 연결의 수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄 사이에 상이하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 사슬내 디술파이드 다리를 보유할 수 있다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역 (본원에서 C_L로 약칭함)으로 이루어진다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 3개의 도메인, 즉 C_H1, C_H2 및 C_H3으로 구성된 중쇄 불변 영역 (C_H), 및 힌지 영역으로 이루어진다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1)과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬되어 "Fab 단편"을 형성한다. 중쇄의 C_H1 및 C_H2는 항체 분자의 Fab "아암 (arm)"이 어느 정도로 흔들리도록 하는, 소위 힌지 영역에 의해 서로 분리된 형태이다. 힌지 영역은 정상적으로 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하고, 이것은 항체 분자의 다른 중소의 힌지 영역의 시스테인 잔기와 디술파이드 다리를 형성할 수 있다.

[0099] 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예를 들어 효과기 세포) 및 전통적인 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 포함하여 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0100] 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 클래스로 분류될 수 있다. 면역글로

불린의 적어도 5개의 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이중 복수의 클래스는 다시 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4; IgA1 및 IgA2로 세분될 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 대응하는 중쇄 불변 도메인의 유전자는 각각 알파 (α), 델타 (δ), 엡실론 (ε), 감마 (γ) 및 뮤 (μ)로 언급된다. 면역글로불린 서브클래스는 상이한 유전자, 예를 들어 γ1, γ2, γ3 및 γ4에 의해 코딩된다. 항체의 경쇄를 위한 유전자는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 두개의 분명하게 구분되는 종류의 하나로 분류된다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 입체 형태는 공지되어 있다. 면역글로불린의 별개의 동종이인자형 (allotype), 예를 들어 IgG1 중쇄에 대해 G1m(a), G1m(x), G1m(f) 및 G1m(z) 및 카파 경쇄에 대해 Km1, Km1,2 및 Km3이 인간 집단 내에 존재한다. 상기 동종이인자형은 불변 영역을 코딩하는 그의 영역 내의 별개의 아미노산에서 상이하다.

[0101] 용어 항체는 또한 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성에 유의하게 영향을 주거나 변경시키지 않으면서 하나 이상의 아미노산 잔기가 예를 들어 아실화 또는 글리코실화에 의해 유도체화된 항체의 "유도체"를 포함한다.

[0102] 본 발명의 문맥에서, 1가 항체의 유도체는 예를 들어 1가 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기가 화학적으로 변형되거나 (예를 들어 알킬화, 아실화, 에스테르 형성, 또는 아미드 형성에 의해) 또는 하나 이상의 비-아미노산 유기 및/또는 무기 원자 또는 분자 치환체 (예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 기, 친지질성 치환체 (스페이서 잔기 또는 기, 예를 들어 β-알라닌, γ-아미노부티르산 (GABA), L/D-글루탐산, 숙신산 등에 의해 임의로 펩티드의 아미노산 서열에 연결될 수 있음), 형광단, 비오틴, 방사성 핵종 등)와 회합된 1가 항체일 수 있고, 추가로 또는 별법으로 달리 언급되거나 문맥적으로 모순되지 않는 한, 비-필수적인, 자연에서 발생하지 않는 및/또는 비-L 아미노산 잔기를 포함할 수 있다 (그러나, 이같은 유도체가 자체적으로 및 스스로 본 발명의 독립적인 특징으로 간주될 수 있고, 네이키드 (naked) 펩티드와 상기 유도체 간의 어떠한 종류의 등가성을 부여하기보다는 본 발명의 설명을 위해 편의상 상기 분자가 펩티드의 의미 내에 포함된다는 것을 인식하여야 한다). 이같은 아미노산 잔기의 비제한적인 예는 예를 들어 2-아미노아디프산, 3-아미노아디프산, β-알라닌, β-아미노프로피온산, 2-아미노부티르산, 4-아미노부티르산, 6-아미노카르로산, 2-아미노헵타논산, 2-아미노이소부티르산, 3-아미노이소부티르산, 2-아미노피멜산, 2,4-디아미노부티르산, 데스모신, 2,2'-디아미노피멜산, 2,3-디아미노프로피온산, N-에틸글라이신, N-에틸아스파라긴, 히드록시리신, 알로히드록시리신, 3-히드록시프롤린, 4-히드록시프롤린, 이소데스모신, 알로이소류신, N-메틸글라이신, N-메틸이소류신, 6-N-메틸리신, N-메틸발린, 노르발린, 노르류신, 오르니틴, 및 스타틴 할로겐화된 아미노산을 포함한다.

[0103] 항체의 생체내 반감기는 예를 들어 분자가 무손상 C_H2 도메인 또는 무손상 Ig Fc 영역을 포함하지 않도록 Ig 불변 도메인 또는 Ig-유사 불변 도메인의 샐비지 (salvage) 수용체 에피토프를 변형시킴으로써 개선될 수 있다 (US 6121022 및 US 6194551 참조). Fc 영역 내에 돌연변이를 형성시킴으로써, 예를 들어 무손상 항체 분자의 위치 252에 대응하는 위치의 류신을 트레오닌으로, 무손상 항체 분자의 위치 254에 대응하는 위치의 세린을 트레오닌으로, 또는 무손상 항체 분자의 위치 256에 대응하는 위치의 페닐알라닌을 트레오닌으로 치환함으로써 생체내 반감기가 더욱 증가될 수 있다 (US 6277375 참조).

[0104] 또한, 항체, 및 특히 Fab 또는 다른 단편은 peg화(pegylation)되어 반감기를 증가시킬 수 있다. 이것은 예를 들어 문헌 [Focus on Growth Factors 3, 4-10 (1992), EP 154 316 및 EP 401 384]에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 peg화 반응에 의해 수행할 수 있다.

[0105] 또한, 돌연변이는 예를 들어 포화 돌연변이 유발에 의해 항체 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있고, 생성되는 변형된 항체는 결합 활성 및/또는 다른 특성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0106] 용어 "항체 유도체"는 항체의 임의의 변형된 형태, 예를 들어 항체 및 또다른 물 또는 항체의 컨쥬게이트를 의미한다.

[0107] 본원에서 사용되는 용어인 항체, 예를 들어 1가 항체의 "항원 결합 부분" 또는 "항원 결합 도메인"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 용어 항체의 "항원 결합 부분" 내에 포함되는 결합 단편의 예는 다음을 포함한다:

[0108] (i) V_L, V_H, C_L 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 또는 Fab' 단편;

[0109] (ii) 힌지 영역에서 디술파이드 다리에 의해 연결된 두 개의 Fab' 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편;

[0110] (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 필수적으로 구성된 Fd 단편;

[0111] (iv) 항체의 한쪽 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 본질적으로 구성된 Fv 단편;

[0112] (v) V_H 도메인으로 필수적으로 구성된 dAb 단편 (Ward et al., Nature 341:544-546 (1989));

[0113] (vi) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR); 및

[0114] (vii) 합성 링커에 의해 임의로 연결될 수 있는 2개 이상의 단리된 CDR의 조합물.

[0115] 또한, Fv 단편의 두 도메인인 V_L 및 V_H가 별개의 유전자에 의해 코딩되더라도, 재조합 방법을 사용하여, V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루어 1가 분자 (단일쇄 항체 또는 단일쇄 Fv (scFv)로 공지됨)를 형성한 단일 단백질 사슬로 만들어지도록 할 수 있는 합성 링커로 두 도메인을 연결시킬 수 있다 (예를 들어 문헌 [Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)] 및 [Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)] 참조). 이같은 단일쇄 항체는 달리 언급되거나 문맥적으로 명백하게 지시되지 않는 한 용어 항체 내에 포함된다.

[0116] 추가의 예는

[0117] (i) 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드,

[0118] (ii) 힌지 영역에 융합된 면역글로불린 중쇄 C_H2 불변 영역, 및

[0119] (iii) C_H2 불변 영역에 융합된 면역글로불린 중쇄 C_H3 불변 영역

[0120] 에 융합된 항원 결합 도메인 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질이다.

[0121] 항원 결합 도메인 폴리펩티드는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역, scFv 또는 임의의 다른 폴리펩티드일 수 있다. 상기 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질은 US 2003/0118592 및 US 2003/0133939에 추가로 개시되어 있다. 상기 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 수득하고, 단편을 무손상 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝한다.

[0122] 용어 "항체 1/2 분자"는 상기한 바와 같지만 단지 하나의 경쇄 및 단지 하나의 중쇄를 포함하고, 상기 단일 경쇄 및 단일 중쇄의 이종이량체 (heterodimer)로서 수용액에 존재하는 항체 분자를 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 상기 항체는 단지 하나의 항원 결합 부분만이 존재하기 때문에 본래 1가이다.

[0123] 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 맥락에서 용어 "보존적 서열 변형"은 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되거나 또는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성에 유의하게 영향을 주거나 변경시키지 않는 각각의 뉴클레오티드(들) 및 아미노산(들)의 변형이다. 상기 보존적 서열 변형은 뉴클레오티드 및 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 당업계에 공지된 표준 기술, 예를 들어 부위 지정 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이 유발에 의해 서열 내에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것을 포함한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 규정되어 있다. 상기 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄 (예를 들어 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지된 측쇄 (예를 들어 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 특정 항원에 대해 특이적인 인간 항체 내의 예상된 비필수 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 또다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있다.

[0124] 본원에서 사용되는 바와 같이, 인간 항체는 항체가 예를 들어 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 유전자 도입된 (유전자 도입된) 마우스를 면역처리하거나 또는 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 스크리닝함으로써 인간 면역글로불린 서열을 사용하는 시스템으로부터 얻는 경우, 특정 생식선 서열로부터 "유도"되고, 여기서 선택된 인간 항체의 가변 유전자 코딩 영역 (중쇄 또는 경쇄 CDR3 불포함)은 생식선 면역글로불린 유전자에 대해 핵산 서열이 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 일반적으로, 특정 인간 생식선 서열로부터 유도된 인간 항체는 생식선 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 10개 이하의 아미노산 차이, 보다 바람직하게는 5개 이하, 또는 훨씬 더 바람직하게는 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 보일 것이다.

[0125] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정자를 의미한다. 에피토프는 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자들의 화학적으로 활성인 표면 군으로 일반적으로 구성되고, 일반적으로 특이적인 3차원 구조 특성뿐만 아니라 특이적인 전하 특성을 갖는다. 입체형태적 및 비-입체형태적 에피토프는 변성 용매의 존재하에 입체형태적 에피토프에 대한 결합은 손실되지만 비-입체형태적 에피토프에 대해서는 손실되지 않는다는 점에서 구별된다.

[0126] 본원에서 사용되는 용어 "비연속적 에피토프"는 단백질의 1차 서열 내의 적어도 2개의 별개의 영역으로부터 형성되는 단백질 항원 상의 입체형태적 에피토프를 의미한다.

[0127] 뉴클레오티드 및 아미노산 서열에 대해, 용어 "상동성"은 적절하게 삽입하거나 결실시켜 최적으로 정렬하고 비교했을 때 2개의 핵산 또는 아미노산 서열의 동일성의 정도를 나타낸다. 별법으로, 실질적인 상동성은 선택적인 혼성화 조건 하에서 가닥의 상보체에 혼성화할 때 존재한다.

[0128] 두 서열 간의 동일성 비율은 갭 (gap)의 수 및 각 갭의 길이를 고려하여 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 서열로 나눈, 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, % 상동성 = 동일한 위치의 #/ 위치의 총 # x 100). 서열의 비교 및 두 서열 간의 동일성 비율의 결정은 다음에 기재된 바와 같이 수학적인 알고리즘을 이용하여 달성할 수 있다.

[0129] 두 뉴클레오티드 서열 간의 동일성 %는 NWSgapdna CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 가중치, 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (http://www.gcg.com에서 이용가능함) 중의 GAP 프로그램으로 결정할 수 있다. 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간의 동일성 %는 PAM120 가중치 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 사용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 포함된 이. 마이어스 및 더블유. 밀러의 알고리즘 (E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))으로 결정할 수도 있다. 또한, 두 아미노산 서열 간의 동일성 %는 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치, 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (http://www.gcg.com에서 이용가능함) 중의 GAP 프로그램 내에 포함된 니들만 및 분쉬 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) 알고리즘으로 결정할 수 있다.

[0130] 본원에서 사용된 용어 "숙주 세포" (또는 "재조합 숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하도록 의도된다. 이같은 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 이같은 세포의 자손체도 지칭하도록 의도된다는 것을 이해하여야 한다. 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이 같은 자손체가 실제로는 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 여전히 포함된다. 재조합 숙주 세포는 예를 들어 트랜스펙토마 (transfectoma), 예를 들어 형질감염된 CHO 세포, NS/0 세포, 및 림프구 세포를 포함한다. 단수 형태의 용어 "숙주 세포"는 특정 종류의 숙주 세포의 배양액도 나타낼 수 있다.

[0131] 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하도록 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식선으로부터 유래된 CDR1 또는 CDR2 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프팅된 항체를 포함하도록 의도되지 않는다.

[0132] 본원에서 사용되는 용어 "K_D" (M)는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 의미한다.

[0133] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일한 분자 조성의 항체 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화성을 보인다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는, 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 말한다.

[0134] 용어 "1가 항체"는 본 문맥에서 항체 분자가 항원의 단일 분자에 결합할 수 있어서, 항원 가교결합능이 없음을 의미한다.

[0135] 본원에서 사용되는 용어 "핵산", 핵산 구성체" 또는 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함한는 의미이다. 핵산 분자는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있다.

[0136] 항체를 코딩하는 핵산, 또는 그의 단편에 대해 본원에서 사용되는 용어 "단리된 핵산", "단리된 핵산 구성체"

또는 "단리된 핵산 분자"는 무손상 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편에 다른 뉴클레오티드 서열이 존재하지 않는 핵산 분자를 의미하고자 의도한 것이다. 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴드화(banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 젤 전기영동 및 당업계에 공지된 기타 기술이 포함되는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 다른 오염물질, 예를 들어 다른 세포성 핵산 또는 단백질로부터 정제되었을 때 단리된 또는 실질적으로 순수하게 된 것일 수 있다 (예를 들어 F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

[0137] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적인 관계로 위치할 때 "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 줄 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 스위치 서열의 경우, 작동가능하게 연결된은 서열이 스위치 재조합을 수행할 수 있음을 나타내다.

[0138] "생리학적 조건"은 생체 내에, 유기체 내에 존재하는 조건 또는 상기 생체 내 조건을 완전히 또는 부분적으로 모방함으로써 재생성시킨 생체 내 조건, 예를 들어 혈액과 동등한 삼투값을 갖는 수용액을 의미한다.

[0139] 본원에서 사용되는 용어 "재조합 인간 항체"는 예를 들어 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체, 예를 들어 (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자 도입된 또는 염색체 도입된(transchromosomal) 동물 (예를 들어 마우스), 또는 이로부터 제조된 하이브리도마로부터 단리된 항체, (b) 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어 트랜스펙토마로부터 단리된 항체, (c) 조합형 재조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱시키는 것을 수반하는 임의의 기타 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 포함한다. 이같은 재조합 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 상기 재조합 인간 항체에 대해 시험관내 돌연변이 유발 (또는 인간 Ig 서열에 대한 유전자 도입된 동물이 사용된 경우에는, 생체내 체세포 돌연변이 유발)이 이루어질 수 있고, 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식선 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되고 이와 관련되지만 생체 내에서 인간 항체 생식선 레파토리 (repertoire) 내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0140] 본원에서 사용되는 바와 같이, "특이적 결합"은 소정의 항원에 대한 항체, 또는 그의 항원 결합 단편의 결합을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 예를 들어 BIAcore에서 술폰 플라즈몬 공명을 사용하여 또는 FACS 또는 ELISA에서 IC_{50} 값을 기초로 한 외관상 친화도로서 결정하는 경우 약 10^{-7} M 이하, 예를 들어 약 10^{-8} M 이하, 예를 들어 약 10^{-9} M 이하, 약 10^{-10} M 이하, 또는 약 10^{-11} M 이하의 K_D에 대응하는 친화도로 결합하고, 소정의 항원에 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 다른 비-특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카세인)에 대한 결합 친화도보다 적어도 10배 더 낮은, 예를 들어 적어도 100배 더 낮은, 예를 들어 적어도 1000배 더 낮은, 예를 들어 적어도 10,000배 더 낮은, 예를 들어 적어도 100,000배 더 낮은 K_D에 대응하는 친화도로 결합한다. 친화도가 더 낮은 양은 항원 결합 펩티드의 K_D에 의존적이어서, 항원 결합 펩티드의 K_D가 매우 낮으면 (즉, 항원 결합 펩티드가 고도로 특이적이면), 항원에 대한 친화도가 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 낮은 양은 적어도 10,000배일 수 있다.

[0141] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상"은 임의의 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비-포유동물, 예를 들어 비-인간 영장류, 양, 염소, 개, 소, 마우스, 래트, 토끼, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.

[0142] "치료상" 유효 투여량 또는 "치료 유효량"은 특정 기간에 걸쳐 목적하는 치료 결과를 달성하기에 효과적인 투여량 또는 양을 의미하는 것이다. 본 발명의 1가 항체의 치료상 유효 투여량은 물론 항체의 표적에 따라 상이할 것이고, 예를 들어 개체의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 요인, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 1가 항체의 능력에 따라 상이할 수 있다. 치료상 유효 투여량 또는 양은 또한 1가 항체의 임의의 독성 또는 유해한 효과가 치료상 유익한 효과보다 작은 것일 수 있다.

[0143] 용어 "유전자 도입된 비-인간 동물"은 하나 이상의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 도입유전자 또는 도입염색체(transchromosome) (동물의 천연 게놈 DNA 내로 통합되거나 통합되지 않음)를 포함하는 게놈을 갖고 인간 항체를 발현할 수 있는 비-인간 동물을 지칭한다. 예를 들어, 유전자 도입된 마우스는 항원 및/또는 항원을 발현하는 세포로 면역화되는 경우 마우스가 인간 항체를 생산하도록, 인간 경쇄 도입유전자, 및 인간 중쇄 도입유전자 또는 인간 중쇄 도입염색체를 가질 수 있다. 인간 중쇄 도입유전자는 유전자 도입된 마우스, 예를 들어 HuMAb 마우스, 예를 들어 HCo7 또는 HCo12 마우스의 경우에서와 같이 마우스의 염색체 DNA 내로 통합될 수 있거나, 또

는 인간 중쇄 도입유전자는 WO 02/43478에 기술된 염색체 도입된 KM 마우스의 경우에서와 같이 염색체 외부에 유지될 수 있다. 이같은 유전자 도입된 및 염색체 도입된 마우스는 V-D-J 재조합 및 이소형 스위칭을 거침으로써 소정의 항원에 대한 다수의 클래스 및 이소형의 1가 항체 (예를 들어 IgG, IgA, IgM, IgD 및/또는 IgE)를 생산할 수 있다.

[0144] 본원에서 사용되는 용어 "트랜스펙토마"는 항체를 발현하는 재조합 진핵 숙주 세포, 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, NS/0 세포, HEK293 세포, 식물 세포, 또는 효모 세포를 포함하는 진균을 포함한다.

[0145] 용어 "치료" 또는 "치료하는" 또는 "치료하다"는 증상 또는 질병 상태의 진정, 개선 또는 근절 (치유)를 의미한다.

[0146] 용어 "항체 결합가"는 항체가 반응할 수 있는 항원 결정자의 최대 수를 의미한다. 예를 들어, IgG 항체는 2개의 Fab 영역을 함유하고, 항원의 두 분자 또는 동일한 입자 상의 2개의 동일한 부위에 결합할 수 있고, 따라서 2의 결합가를 갖는다.

[0147] 본원에서 사용되는 용어 "벡터"는 자신이 연결된 또다른 핵산을 전달하여 복제를 유도할 수 있는 핵산 분자를 지칭하도록 의도된다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"이고, 이는 추가의 DNA 세그먼트가 그 내부에 라이게이션될 수 있는 환상의 이중가닥 DNA 루프이다. 또다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이고, 이때 추가의 DNA 또는 RNA 세그먼트는 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 자신이 도입된 숙주 세포 내에서 자가 복제될 수 있다 (예를 들어 세균 복제 기점을 갖는 세균 벡터 및 에피솜형 포유동물 벡터). 기타 벡터 (예를 들어 비-에피솜형 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입 시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 따라서 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 벡터가 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이같은 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 사용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 벡터의 형태이므로 서로 교환가능하게 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터 (예를 들어, 복제 결함성 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)를 포함하도록 의도된다.

[0148] 수용액 또는 생리학적 조건에 대해 본원에서 자주 언급된다. "수용액"은 물 중의 임의의 화학 물질의 용액, 예를 들어 염 용액, 예를 들어 인산염 완충 염수 (PBS)를 의미한다. 수용액은 상기 목적을 위해 디자인될 수 있고 많은 상이한 화학 물질을 포함하거나, 또는 천연적인 체액, 예를 들어 혈액일 수 있다.

[0149] 5가지의 상이한 클래스의 면역글로불린, 즉 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE가 존재하고, 이들 클래스는 그의 C 영역에 의해 구분될 수 있다.

[0150] 항체의 IgG 클래스 내에는 복수의 서브클래스, 즉 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4가 존재한다 (Jefferis, R. 1990. Molecular structure of human IgG subclasses. In The human IgG subclasses. F. Shakib, ed. Pergamon Press, Oxford, p. 15). 각각의 IgG 중쇄는 구별되는 유전자 세그먼트 또는 엑손에 의해 코딩되는 구조적으로 관련된 펩티드 서열 (즉, 가변 및 불변 영역 도메인)으로 이루어진다. C_H1 및 C_H2 도메인을 연결하는 힌지 영역은 별개의 엑손에 의해 코딩된다. 각각의 4개의 IgG 서브클래스 중쇄는 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 카파 또는 람다 경쇄로 이루어진 필수적으로 대칭인 분자를 생성시키도록 카파 또는 람다 경쇄와 조합되어 발현될 수 있다. 중쇄 내에서의 비교는 C_H1, C_H2 및 C_H3 상동성 영역을 규정한다. 각각의 4개의 서브클래스의 유사한 상동성 영역 사이의 비교에 의해 >95% 서열 동일성이 밝혀졌다 (Jefferis, R. 1990. F. Shakib, ed. Pergamon Press, Oxford, p. 15). C_H1과 C_H2 도메인 사이의 서열은 분자의 유연성 (flexibility)을 가능하게 하기 때문에 힌지 영역으로 언급된다. C_H3 도메인은 페어링되고, 비-공유 상호작용은 IgG 분자가 온건한 조건 하에 중쇄간 디술파이드 다리의 환원 후에 그의 구조적 통합성을 유지하기에 충분하다. C_H3 도메인 페어링은 치밀하고, 두 도메인 사이에 거의 정확한 한쌍을 갖는 Fab의 페어링과 유사하다 (Saphire, et al., 2002. J Mol Biol 319:9). 이것은 긴밀하게 회합하지 않고 그의 접촉이 주로 Asn297 잔기에 부착된 두개의 탄수화물 사슬에 의해 매개되는 C_H2 도메인과 대조적이다 (Saphire, et al., 2002. J Mol Biol 319:9).

[0151] 따라서, 2개의 중쇄-경쇄 이종이량체가 연결된 특징적인 IgG 구조는 힌지 영역의 중쇄간 디술파이드 다리 및 C_H3 도메인의 비-공유 상호작용에 의해 유지된다.

[0152] C_H3 영역 내에서 상호작용은 IgG1에 중요한 것으로 밝혀졌다. 단지 하나의 경쇄 및 단지 하나의 중쇄로 이루어

진 이량체 입체 형태를 갖는 Ig 1/2 분자는 인간 및 뮤린 형질세포종에서 매우 드문 결실의 결과로서 설명된 바 있다. 골수외 연조직 형질세포종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 혈장 세포 백혈병 및 다발성 골수종으로 고통받는 복수의 환자는 IgG 1/2 분자를 그의 소변 내로 배출하였다. 또한, 1/2 분자는 그의 혈청에도 존재하는 것으로 밝혀졌다. 상기 1/2 분자의 생화학적 특성에 대한 연구를 통해 이 분자가 중쇄 C_H1, 힌지 및 C_H2 영역은 정상으로 보이지만, C_H3 영역에 결실이 존재하는 IgG1 분자로 구성됨이 밝혀졌다 (본원 명세서 4면 참조).

[0153] 본 발명자들은 본원에서 IgG4의 힌지 영역의 제거가 2개의 중쇄-경쇄 이종이량체 사이의 연결이 없어지거나 감소된 1가 항체를 형성시킴을 밝혀내었다. 따라서, 다른 IgG 서브클래스의 힌지 영역 디술파이드 다리의 변경은 그 단독으로 또는 C_H3 도메인 상호작용과 조합하여 상기 다른 서브클래스에 대한 1가 항체를 또한 형성시킬 수 있다. 당업자는 경쇄 상호작용을 방지하기 위해 아미노산을 선택하고 선택된 아미노산을 변경하기 위해 Ig 서브클래스의 구조에 대한 상세한 지식 및 본 발명에서 제시되는 지식을 용이하게 이용할 수 있다.

[0154] 따라서, 한 실시태양에서, 본 발명은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 1가 항체에 관한 것으로서,

[0155] 여기서 a) 상기 경쇄는 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_L) 영역의 아미노산 서열 및 Ig의 불변 (C_L) 영역의 아미노산 서열을 포함하고,

[0156] b) 상기 중쇄는 상기 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_H) 영역의 아미노산 서열 및 인간 Ig의 불변 (C_H) 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄의 아미노산 서열은 힌지 영역에 대응하는 영역에 존재하는 임의의 아미노산 잔기도 인간 Ig의 불변 (C_H) 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 없도록 변형되고,

[0157] c) 상기 중쇄 또는 경쇄는 Ig 이소형에 따라 항체의 연결을 유도할 수 있는 임의의 아미노산, 즉 시스테인을 제거 또는 변경시키기 위해 점 돌연변이 또는 결실에 의해 변경되거나, 또는 디술파이드 결합을 형성하거나 또는 분자를 이량체를 형성하는 그의 대응물과 공유 연결시키는 능력에 있어서 중쇄 불변 영역을 IgG4와 유사하게 만들기 위해 점 돌연변이 또는 결실의 형태로 변형된다.

[0158] 본 발명의 1가 항체의 경쇄의 아미노산 서열은 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_L) 영역 및 면역글로불린의 불변 영역 (C_L)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0159] 본 발명에 따르면, 1가 항체의 V_L 영역의 아미노산 서열은 본 발명의 목적하는 상기 항체 분자의 분자 특성, 특히 1가 항체의 이종사량체 형성능 결여 ("정상" 항체)에 작용하지 않고, 따라서 본 발명은 V_L 영역의 임의의 특정 아미노산 서열로 제한되지 않는다. V_L 영역의 아미노산 서열은 당업자에게 공지된 많은 임의의 방식으로 생성된 임의의 항원 특이적 항체의 아미노산 서열로부터 유도될 수 있다.

[0160] 본 발명에 따르면, 1가 항체의 V_H 영역의 아미노산 서열은 본 발명의 목적하는 상기 항체 분자의 분자 특성, 특히 1가 항체의 이종사량체 형성능 결여 ("정상" 항체)에 작용하지 않고, 따라서 본 발명은 V_H 영역의 임의의 특정 아미노산 서열로 제한되지 않는다. V_H 영역의 아미노산 서열은 당업자에게 공지된 많은 임의의 방식으로 생성된 임의의 항원 특이적 항체의 아미노산 서열로부터 유도될 수 있다.

[0161] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 합성 항원 (Tyr, Glu), Ala, Lys에 결합하지 않는다 (Pincus et al. 1985, Molecular Immunolog, vol 22, 4; pp. 455-461).

[0162] 다른 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다.

[0163] 다른 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 항체를 기초로 한 것이다.

[0164] 한 실시태양에서, 본 발명은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 1가 항체에 관한 것으로서,

[0165] 여기서 a) 상기 경쇄는 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_L) 영역의 아미노산 서열 및 Ig의 불변 (C_L) 영역의 아미노산 서열을 포함하고,

[0166] b) 상기 중쇄는 상기 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_H) 영역의 아미노산 서열 및 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄의 아미노산 서열은 힌지 영역에 대응하는 영역에 존재하는 임의의 아미노

산 잔기도 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 없도록 변형된다.

[0167] 본 발명의 1가 항체의 경쇄의 아미노산 서열은 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_L) 영역 및 면역글로불린의 불변 영역 (C_L)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0168] 본 발명에 따르면, 1가 항체의 V_L 영역의 아미노산 서열은 본 발명의 목적하는 상기 항체 분자의 분자 특성, 특히 1가 항체의 이종사량체 형성능 결여 ("정상" 항체)에 작용하지 않고, 따라서 본 발명은 V_L 영역의 임의의 특정 아미노산 서열로 제한되지 않는다. V_L 영역의 아미노산 서열은 당업자에게 공지된 많은 임의의 방식으로 생성된 임의의 항원 특이적 항체의 아미노산 서열로부터 유도될 수 있다.

[0169] 본 발명에 따르면, 1가 항체의 V_H 영역의 아미노산 서열은 본 발명의 목적하는 상기 항체 분자의 분자 특성, 특히 1가 항체의 이종사량체 형성능 결여 ("정상" 항체)에 작용하지 않고, 따라서 본 발명은 V_H 영역의 임의의 특정 아미노산 서열로 제한되지 않는다. V_H 영역의 아미노산 서열은 당업자에게 공지된 많은 임의의 방식으로 생성된 임의의 항원 특이적 항체의 아미노산 서열로부터 유도될 수 있다.

[0170] 본 발명은 1) 서열 6으로서 확인된 HuMab-7D8의 V_H 영역의 아미노산 서열 및 서열 16으로서 확인된 IgG4의 힌지가 없는 C_H를 코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함하는 1가 항체 (상기 서열들은 함께 작동가능하게 연결됨), 및 2) 서열 8로서 확인된 마우스 항-Betv-1의 V_H 영역의 아미노산 서열 및 서열 16으로서 확인된 IgG4의 힌지가 없는 C_H를 코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함하는 1가 항체 (상기 서열들은 함께 작동가능하게 연결됨)의 예를 제공한다.

[0171] 한 실시태양에서, 본 발명의 항체 분자의 V_H 및 V_L 영역은 동일한 항원 특이적 항체로부터 유도된다.

[0172] 본 발명에 따르면, 항체 분자의 경쇄의 C_L 영역의 서열은 면역글로불린의 C_L 영역의 서열로부터 유도될 수 있다. 한 실시태양에서, C_L 영역은 인간 IgG의 카파 경쇄의 불변 영역이다. 한 실시태양에서, C_L 영역은 서열 2의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, C_L 영역은 인간 IgG의 람다 경쇄의 불변 영역이다. 한 실시태양에서, C_L 영역은 서열 4의 아미노산 서열을 포함한다.

[0173] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체의 경쇄 및 중쇄는 하나 이상의 디술파이드 결합을 통해 서로 연결된다. 상기 디술파이드 결합에 대해, 디술파이드 결합의 어느 결합 파트너도 힌지 영역에 대응하는 영역에 존재하지 않음이 분명하다.

[0174] 한 실시태양에서, 경쇄 및 중쇄는 예를 들어 단일쇄 Fv에서 볼 수 있는 바와 같이 아미드 결합을 통해 서로 연결된다.

[0175] 힌지 영역은 중쇄의 불변 도메인의 C_H1과 C_H2 영역 사이에 위치한 항체의 영역이다. 힌지 영역의 범위는 힌지 영역을 코딩하는 별개의 엑손에 의해 결정된다. 힌지 영역은 정상적으로 중쇄의 하나의 힌지 영역 내의 하나 이상의 시스테인 잔기와 다른 중쇄의 힌지 영역 내의 하나 이상의 시스테인 잔기 사이의 디술파이드 결합, 또는 다리의 형성을 통해 항체의 4개의 펩티드 사슬을 전통적인 사량체 형태로 정확하게 조립하는 것을 보장하기 위해 참여한다. 따라서, 힌지 영역 내의 어떤 아미노산 잔기도 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 없도록 힌지 영역을 변형하는 것은 예를 들어 비변형된 힌지 영역에 존재하는 시스테인 잔기의 결실 및/또는 치환을 포함할 수 있다. 힌지 영역에 대응하는 영역은 본원의 목적을 위해 항체의 중쇄의 영역 C_H1과 C_H2 사이의 영역을 의미하는 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 문맥에서, 상기 영역은 또한 아미노산 잔기를 포함하지 않을 수 있고, 이것은 임의의 아미노산 잔기가 그 사이에 존재하지 않으면서 C_H1 및 C_H2 영역이 서로 연결되도록 유도하는 힌지 영역의 결실에 대응한다. 또한, 상기 영역은 본래의 힌지 영역의 N- 또는 C-말단에 존재하는 아미노산 잔기일 필요가 없는 하나 또는 수개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0176] 디술파이드 결합은 특정 단백질, 예를 들어 한 시스테인 잔기가 단백질의 동일한 사슬 (사슬내 디술파이드 결합) 또는 다른 사슬 (사슬간 디술파이드 결합) 상의 또다른 시스테인 잔기와 디술파이드 결합을 형성하는 항체의 공지의 특징이다. 제시된 단백질 내에 상기 디술파이드 결합이 다수 존재할 수 있다. 항체의 경우, 사슬

내 및 사슬간 디술파이드 결합의 형성은 모두 완전히 성숙한 야생형 항체의 정확한 조립에 중요한 요소이고, 디술파이드 결합은 정상적으로 적어도 부분적으로 매우 규칙적이고 일정한 항체의 형태 및 항체의 안정성을 책임진다. 본 발명의 1가 항체에서, 힌지 영역의 어떤 아미노산도 상기 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 없다.

[0177] 힌지 영역의 아미노산 서열의 변형은 당업계에 공지되고 본원의 다른 부분에서 설명되고 실시예에서 예시되는 바와 같이 핵산의 결실 및/또는 치환에 의해 발현된 단백질에서 아미노산의 결실 및/또는 치환을 가능하게 하는 재조합 기술을 사용하여 DNA 수준에서 수행할 수 있다.

[0178] 또한, 변형은 예를 들어 힌지 영역 내의 디술파이드 결합을 형성할 수 있는 아미노산 잔기를 유도체화하여 비-변형된 핵산으로부터 발현된 항체에 대해 수행할 수 있다. 다른 시스테인 잔기와 디술파이드 결합을 형성하는 것을 차단하는 상기 시스테인 잔기의 유도체화는 당업계에 공지된 바와 같이 수행할 수 있다.

[0179] 또한, 변형은 시스테인 이외의 다른 아미노산 잔기, 예를 들어 시스테인 잔기 대신에 자연에서 발생하는 아미노산 또는 자연에서 발생하지 않는 아미노산, 예를 들어 유도체화된 시스테인을 사용하여 합성 방식으로 항체의 사슬을 제조함으로써 수행할 수 있다.

[0180] 또한, 본 발명의 IgG4 1가 항체는 IgG4 변이체일 수 있다. 상기 변이체 항체는 하나의 변이체 항체에서 예를 들어 불변 도메인, 및/또는 가변 영역 (또는 그의 임의의 하나 이상의 CDR) 내의 하나 이상의 적합한 아미노산 잔기 변경, 즉 치환, 결실, 삽입, 또는 말단 서열 부가에 의해 IgG4 항체와 상이한 항체이다. 일반적으로, 아미노산 서열 변경, 예를 들어 보존적 치환 변이는 바람직하게는 모 서열의 구조적 특성을 실질적으로 변경시키지 않지만 (예를 들어, 대체 아미노산은 모 서열의 기능상의 특징을 보여주는 2차 구조를 붕괴시키지 않아야 함), 유리한 특성, 예를 들어 항체의 기능적 또는 약동학적 특성의 변경, 예를 들어 반감기 증가, 면역원성 변경, 다른 분자에 대한 공유 또는 비-공유 결합 부위의 제공, 단백질 분해에 대한 감수성 저하, 산화에 대한 감수성 저하, 또는 글리코실화 패턴의 변경과 연관될 수 있다. 항체의 상기 아미노산 서열 변이체는 힌지 영역에 대응하는 영역의 변경에 대해 상기 설명한 바와 같이 얻을 수 있다.

[0181] 한 실시태양에서, 중쇄의 아미노산 서열은 힌지 영역에 대응하는 영역이 임의의 시스테인 잔기를 포함하지 않도록 변형된다.

[0182] 한 실시태양에서, 중쇄의 아미노산 서열은 임의의 시스테인 잔기를 포함하여 힌지 영역에 대응하는 영역의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 결실되고/되거나 다른 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된다. 따라서, 본 발명의 항체의 힌지 영역은 본 발명의 변이체 IgG4 항체에 대해 상기한 바와 같이 임의의 시스테인 잔기가 정상적으로 존재하는 위치 이외의 다른 위치에서 변형될 수 있다. 상기 변형은 상기 설명한 바와 같이 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 수단에 의해 수행할 수 있다.

[0183] 본 발명의 문맥에서, 힌지 영역에 대응하는 영역의 시스테인 잔기는 시스테인 이외의 다른 임의의 자연에서 발생하는 또는 자연에서 발생하지 않는, 및/또는 비-L 아미노산 잔기로 또는 시스테인 잔기의 유도체를 포함하는 상기 아미노산 잔기의 유도체 (유도체화된 시스테인 잔기는 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 없다)로 치환될 수 있다.

[0184] 한 실시태양에서, 중쇄의 아미노산 서열은 중쇄가 서열 14의 서열의 아미노산 106 및 109에 대응하는 아미노산이 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된다. 서열 14는 인간 IgG4의 야생형 C_H 영역의 아미노산 서열을 보여주고, 위치 106 및 109는 2개의 시스테인 잔기의 위치이다.

[0185] 한 실시태양에서, 중쇄의 아미노산 서열은 중쇄가 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 내지 109에 대응하는 아미노산 잔기가 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된다.

[0186] 한 실시태양에서, 중쇄의 아미노산 서열은 중쇄가 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 99 내지 110에 대응하는 아미노산 잔기가 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된다.

[0187] 한 실시태양에서, 중쇄는 서열 16의 아미노산 서열을 포함한다. 서열 16은 위치 714 및 722에 치환 돌연변이가 존재하는 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열 (서열 13)인 서열 15의 서열을 포함하는 핵산의 발현에 의해 생성된 인간 IgG4의 C_H 영역의 아미노산 서열이다. 핵산 서열의 스플라이스 공여자 부위에서의 상기 치환은 힌지 영역을 코딩하는 엑손을 수반하는 스플라이싱이 적절하게 수행되지 않아 엑손에 의해 코딩되는 아미노산 잔기가 없는 중쇄를 생성시키는 효과를 갖는다.

[0188] 한 실시태양에서, C_H 영역의 전체 힌지 영역이 결실된다. 이것은 C_H 영역의 힌지 영역을 코딩하는 엑손에 의해 코딩되는 아미노산이 중쇄에 존재하지 않는 것이다. 서열 14에 제시된 IgG4의 경우에, 이것은 서열 16의 아미노산 서열을 갖는 C_H 영역에 대응할 것이다.

[0189] 한 실시태양에서, 중쇄의 아미노산 서열은 중쇄가 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산 잔기가 시스테인과 상이한 아미노산 잔기로 치환된 C_H 영역을 포함하도록 변형된다.

[0190] 한 실시태양에서, 중쇄의 아미노산 서열은 중쇄가 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산 잔기 중의 하나가 시스테인과 상이한 아미노산 잔기로 치환되고 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산 잔기 중의 다른 하나는 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된다. 추가의 실시태양에서, 시스테인과 상이한 아미노산 잔기로 치환되는 잔기는 아미노산 잔기 106에 대응하는 아미노산 잔기이고, 결실되는 아미노산 잔기는 아미노산 잔기 109에 대응하는 아미노산 잔기이다. 또다른 추가의 실시태양에서, 결실되는 아미노산 잔기는 아미노산 잔기 106에 대응하는 아미노산 잔기이고, 시스테인과 상이한 아미노산 잔기로 치환되는 잔기는 아미노산 잔기 109에 대응하는 아미노산 잔기이다.

[0191] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 본원의 다른 부분에서 설명되는 바와 같이 시험관 내에서 세포 발현계에서 항체의 재조합 발현을 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0192] 한 실시태양에서, 상기 방법은

[0193] i) 상기 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 Ig의 C_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고,

[0194] ii) 상기 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 Ig4의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 힌지 영역에 대응하는 영역이 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형되고,

[0195] iii) 상기 1가 항체를 생산하기 위한 세포 발현계를 제공하고;

[0196] iv) (iii)의 세포 발현계의 세포에서 상기 핵산 구성체를 동시 발현시켜 (i)의 핵산 구성체에 의해 코딩되는 경쇄 및 (ii)의 핵산 구성체에 의해 코딩되는 중쇄를 포함하는 상기 1가 항체를 생산하는 것

[0197] 을 포함한다.

[0198] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체의 혈장 농도는 SCID 마우스에서의 약동학 연구에서 측정된 바와 같이 (예를 들어 실시예 32에 제시된 바와 같은), 4 mg/kg의 용량으로 생체 내로 투여될 때 7일 초과의 기간 동안 10 ㎍/ml 이상이다. 본 발명의 1가 항체의 소실율은 당업계에 공지된 바와 같은 약동학 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 항체는 예를 들어 인간 또는 동물에서 정맥 내로 주사될 수 있고 (다른 경로, 예를 들어 i.p. 또는 i.m.도 사용할 수 있다), 이후에 혈액 샘플을 복수의 시점, 예를 들어 초기 주사 후 1시간, 4시간, 24시간, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일에 정맥천자에 의해 채취한다. 혈청 내의 항체의 농도는 ELISA와 같은 적절한 분석에 의해 결정된다. 약동학적 분석은 당업계에 공지되고 실시예 32에 설명된 바와 같이 수행한다. 본 발명의 1가 항체는 예를 들어 1가 항체로서 종종 사용되는 Fab 단편의 혈장 체류 시간보다 100배 더 긴 오랜 혈장 체류 시간을 가질 수 있다.

[0199] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체의 혈장 소실은 대등한 분자 크기를 갖는 $F(ab')_2$ 단편의 혈장 소실보다 10배 초과의 속도로 더 느리다. 이것은 본 발명의 항체가 FcRn에 결합하는 능력을 나타낼 수 있다. FcRn은 주조직 적합 복합체 클래스 I-관련 수용체이고, 면역글로불린 (Ig)G의 모체로부터 자손체로의 수동 전달에서 및 세포내 분해로부터 IgG의 보호에 의한 혈청 IgG 수준의 조절에서 일정한 기능을 수행한다 (Ghetie V et al., Annu Rev Immunol. 18, 739-66 (2000)). 한 실시태양에서, $F(ab')_2$ 단편은 본 발명의 1가 항체와 동일한 항원에 대해 작용한다. 한 실시태양에서, $F(ab')_2$ 단편은 본 발명의 1가 항체와 동일한 에피토프에 대해 작용한다. 한 실시태양에서, $F(ab')_2$ 단편의 V_H 영역 및 V_L 영역은 본 발명의 1가 항체의 V_H 영역 및 V_L 영역과 동일하다.

[0200] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 생체내 투여될 때 반감기가 적어도 5일이다. 본 발명의 1가 항체의 반

감기는 예를 들어 상기 설명한 바와 같이 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0201] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 생체내 투여될 때 반감기가 적어도 5일 내지 14일 이내이다.

[0202] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 생체내 투여될 때 반감기가 적어도 5일 내지 21일 이내이다.

[0203] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 FcRn에 결합할 수 있다. 상기 결합은 당업계에 공지된 결합 측정 방법, 예를 들어 ELISA 분석에 의해 측정할 수 있다. 본 발명의 1가 항체의 FcRn에 대한 결합은 예를 들어 $F(ab')_2$ 단편 ($F(ab')_2$ 단편은 본 발명의 1가 항체의 V_H 영역 및 V_L 영역과 동일한 V_H 영역 및 V_L 영역을 갖는다)의 FcRn에 대한 결합에 대해 동일한 분석으로 비교할 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체의 FcRn에 대한 결합은 $F(ab')_2$ 단편의 FcRn에 대한 결합보다 10배를 초과하는 수준으로 더 강하다.

[0204] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 종양 항원에 특이적으로 결합한다. 특정 종양 항원으로 제한되지 않지만, 상기 종양 항원의 예는 cMet 및 VEGF-R일 수 있다.

[0205] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 수용체 이량체화시에 활성화되는 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 1가 항체와 같은 1가 항체는 수용체 활성화가 바람직하지 않은 질병 또는 질환의 치료에 종종 유용할 수 있고, 그 이유는 본 발명의 항체 분자가 그의 1가 특성 때문에 상기 이량체화 및 이에 의한 상기 활성화를 유도할 수 없기 때문이다. 특정 수용체에 제한되지 않지만, 상기 수용체의 예는 erb-B1, erb-B2, erb-B3, erb-B4 및 에프린의 멤버 및 에프린 수용체, 예를 들어 에프린-A1 내지 A6, ephA1 내지 A8, 에프린 B1 내지 B3 및 eph-B1 내지 eph-B6일 수 있다.

[0206] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 표적 분자에 결합할 때 표적 분자 다량체화 (예를 들어 이량체화)를 억제한다. 다시, 본 발명의 1가 항체와 같은 1가 항체는 표적 항원의 다량체화가 바람직하지 않은 질병 또는 질환의 치료에 종종 유용할 수 있고, 그 이유는 본 발명의 항체 분자가 그의 1가 특성 때문에 상기 다량체화를 유도할 수 없기 때문이다. 가용형 항원의 경우에, 다량체화는 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있다. 특정 표적에 제한되지 않지만, 상기 표적의 예는 Toll-유사 수용체, 예를 들어 TLR-3 및 TLR-9, 또는 안지오포이에틴-1, 또는 안지오포이에틴-2, 또는 TNF 수용체 패밀리 멤버, 예를 들어 CD30, CD40 및 CD95일 수 있다.

[0207] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 TNF-α의 억제제이다. 본 발명의 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 1가 형태의 아달리무맙, 에타네르셉트 또는 인플릭시맙이다.

[0208] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 효과기 결합능이 없다. 본원에서 표현 "효과기 결합능 부재" 또는 "효과기 결합 불능"은 본 발명의 IgG4 1가 항체가 보체 (C1)의 제1 성분의 C1q 성분에 결합할 수 없고 따라서 전통적인 경로의 보체 매개 세포독성을 활성화할 수 없음을 의미한다. 또한, 본 발명의 1가 항체는 Fc 수용체와 상호작용할 수 없고, 따라서 Fc 수용체-매개 효과기 기능, 예를 들어 포식작용, 세포 활성화, 시토킨 방출의 유도를 촉발할 수 없다.

[0209] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다. 항체는 재조합 진핵 숙주 세포, 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, NS/0 세포, HEK293 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 또는 효모 세포를 포함하는 진균을 사용하여 생산할 수 있다. 안정한 및 일시적 시스템 모두를 상기 목적을 위해 사용할 수 있다. 형질감염은 많은 확립된 방법, 예를 들어 전기천공, 리포펙션 (lipofection) 또는 뉴클레오펙션 (nucleofection)에 의해 플라스미드 발현 벡터를 사용하여 수행할 수 있다. 별법으로, 재조합 바이러스, 예를 들어 아데노, 우두 또는 바큘로바이러스에 의해 코딩되는 단백질을 발현하기 위해 감염이 사용될 수 있다. 항체 생산을 위해 유전자 도입된 동물을 사용하는 다른 방법을 사용할 수 있다.

[0210] 항체를 코딩하는 DNA 서열은 확립된 표준 방법, 예를 들어 문헌 [Beaucage et al., Tetrahedron Lett. 22, 1859-1869 (1981)]에 기재된 포스포아미딘 방법, 또는 문헌 [Matthes et al., EMBO J. 3, 801-805 (1984)]에 기재된 방법에 의해 합성 방식으로 제조할 수 있다. 포스포아미딘 방법에 따라, 올리고뉴클레오티드가 예를 들어 자동화 DNA 합성기로 합성되어 정제되고, 어닐링되고, 라이게이션되고, 적합한 벡터에 클로닝된다.

[0211] 또한, 항체를 코딩하는 DNA 서열은 게놈 또는 cDNA에서 유래할 수 있고, 예를 들어 표준 기술에 따라 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 제조하고 합성 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용한 혼성화에 의해 항체의 전부 또는 일부를 코딩하는 DNA 서열에 대해 스크리닝함으로써 얻을 수 있다 (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989 참조). 또한, DNA 서열은 예를 들어 US 4683202 또는 문헌 [Saiki et al. Science 239, 487-491 (1988)]에 기재된 바와 같이 특이적인 프라이머를 사용하여 중합효

소 연쇄 반응에 의해 제조할 수 있다.

[0212] 이어서, DNA 서열은 재조합 DNA 과정에 편리하게 적용될 수 있는 임의의 벡터일 수 있는 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 벡터의 선택은 종종 벡터가 도입되는 숙주 세포에 따라 결정될 것이다. 따라서, 벡터는 자가 복제 벡터, 즉 그 복제가 염색체 복제와 무관한, 염색체 외부에 존재하는 벡터, 예를 들어 플라스미드일 수 있다. 별법으로, 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고 숙주 세포 게놈 내로 통합되어 통합된 염색체(들)과 함께 복제되는 것일 수 있다.

[0213] 벡터 내에서, 항체를 코딩하는 DNA 서열은 적합한 프로모터 서열에 작동가능하게 연결되어야 한다. 프로모터는 선택된 숙주 세포에서 전사 활성을 보이고 숙주 세포에 상동성 또는 이종성인 단백질을 코딩하는 유전자로부터 유도될 수 있는 임의의 DNA 서열일 수 있다. 포유동물 세포에서 코딩 DNA 서열의 전사를 지시하기 위한 적합한 프로모터의 예는 CMV 프로모터, SV40 프로모터, MT-1 (메탈로티오네인 유전자) 프로모터 또는 아데노바이러스 2 주요 후기 프로모터이다. 다른 적합한 프로모터는 당업계에 공지되어 있다. 곤충 세포에서 사용하기에 적합한 프로모터는 예를 들어 폴리헤드린 프로모터이다. 효모 숙주 세포에서 사용하기에 적합한 프로모터는 효모 해당 유전자 또는 알콜 데히드로게나제 유전자의 프로모터, 또는 TPI1 또는 ADH2-4c 프로모터를 포함한다. 필라멘트성 진균 숙주 세포에 사용하기 적합한 프로모터는 예를 들어 ADH3 프로모터 또는 tpiA 프로모터이다.

[0214] 코딩 DNA 서열은 또한 적합한 터미네이터, 예를 들어 인간 성장 호르몬 터미네이터 또는 (진균 숙주의 경우) TPI1 또는 ADH3 터미네이터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 다른 적합한 터미네이터는 당업계에 공지되어 있다. 벡터는 폴리아데닐화 시그날 (예를 들어 SV40 또는 아데노바이러스 5 EIb 영역의), 전사 인핸서 서열 (예를 들어 SV40 인핸서) 및 번역 인핸서 서열 (예를 들어 아데노바이러스 VA RNA를 코딩하는 서열)과 같은 성분을 추가로 포함할 수 있다. 다른 상기 시그날 및 인핸서는 당업계에 공지되어 있다.

[0215] 재조합 발현 벡터는 관심있는 숙주 세포에서 벡터가 복제될 수 있도록 만드는 DNA 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 서열의 예 (숙주 세포가 포유동물 세포인 경우)는 SV40 복제 기점이다. 다른 복제 기점은 당업계에 공지되어 있다. 벡터는 또한 선택가능 마커, 예를 들어 그의 산물이 숙주 세포의 결함을 보완하는 유전자, 예를 들어 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR), 글루타민 합성효소 (GS) 또는 약물, 예를 들어 네오마이신, 히드로마이신 또는 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 것을 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 다른 선택가능 마커가 당업계에 공지되어 있다.

[0216] 펩티드 또는 전장 단백질을 코딩하는 DNA 서열, 프로모터 및 터미네이터를 각각 라이게이션하고 이들을 복제에 필요한 정보를 포함하는 적합한 벡터 내로 삽입하기 위한 절차는 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어, Sambrook et al., 상기 문헌. 참조).

[0217] 본 발명의 재조합 1가 항체를 얻기 위해, 항체의 폴리펩티드 사슬(들)의 상이한 부분을 코딩하는 DNA 서열은 숙주 세포에서 개별적으로 발현될 수 있거나, 또는 융합 폴리펩티드, 예를 들어 경쇄 및 중쇄를 모두 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 구성체를 형성하도록 융합되어 재조합 발현 벡터 내로 삽입되고 숙주 세포에서 발현될 수 있다.

[0218] 발현 벡터가 도입될 수 있는 숙주 세포는 전장 단백질을 발현할 수 있는 임의의 세포일 수 있고, 예를 들어 진핵 세포, 예를 들어 무척추동물 (곤충) 세포 또는 척추동물 세포, 예를 들어 제노퍼스 래비스 (*Xenopus laevis*) 난모세포 또는 포유동물 세포, 예를 들어 곤충 및 포유동물 세포일 수 있다. 적합한 포유동물 세포주의 예는 HEK293 (ATCC CRL-1573), COS (ATCC CRL-1650), BHK (ATCC CRL-1632, ATCC CCL-10), NS/0 (ECACC 85110503) 또는 CHO (ATCC CCL-61) 세포주이다. 다른 적합한 세포주는 당업계에 공지되어 있다. 한 실시태양에서, 발현계는 포유동물 발현계, 예를 들어 HEK293 세포의 다양한 클론 변이를 포함하는 포유동물 세포 발현계이다.

[0219] 포유동물 세포을 형질감염시키고 세포에 도입된 DNA 서열을 발현하는 방법은 예를 들어 문헌에 기재되어 있다 [Kaufman et al., J. Mol. Biol. 159, 601-621 (1982); Southern et al., J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341 (1982); Loyter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 422-426 (1982); Wigler et al., Cell 14, 725 (1978); Corsaro et al., Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981); Graham et al., Virol. 52, 456 (1973); 및 Neumann et al., EMBO J. 1, 841-845 (1982)]. 본 발명의 1가 항체를 수득하기 위해, 발현계의 숙주 세포는 한 실시태양에서 두개의 발현 벡터로 동시에 형질감염될 수 있고, 여기서 상기 두 발현 벡터 중 제1 벡터는 항체의 중쇄를 코딩하는 DNA 서열을 포함하고, 제2 벡터는 항체의 경쇄를 코딩하는 DNA 서열을 포함한다. 2개의 서열은 또한 동일한 발현 벡터에 존재할 수 있거나, 또는 융합 폴리펩티드, 예를 들어 경쇄 및 중쇄를 모두 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 구성체를 형성하도록 융합될 수 있다.

[0220] 한 실시태양에서, 진균 세포 (효모 세포 포함)가 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 적합한 효모 세포의 예는 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 종 또는 쉬조사카로마이세스 (*Schizosaccharomyces*) 종, 특히 사카로마이세스 세레비지아에 (*S. cerevisiae*) 균주의 세포를 포함한다. 다른 진균 세포의 예는 필라멘트성 진균, 예를 들어 아스퍼길루스 (*Aspergillus*) 종 또는 뉴로스포라 (*Neurospora*) 종, 특히 아스퍼길루스 오리재 (*oryzae*) 또는 아스퍼길루스 니게르 (*niger*) 균주의 세포이다. 단백질 발현을 위한 아스퍼길루스 종의 사용은 예를 들어 EP 238 023에 기재되어 있다.

[0221] 세포를 배양하기 위해 사용되는 배지는 포유동물 세포 성장에 적합한 임의의 통상적인 배지, 예를 들어 적절한 보충제를 함유하는 혈청-함유 또는 무혈청 배지, 또는 곤충, 효모 또는 진균 세포 성장에 적합한 배지일 수 있다. 적합한 배지는 시판 회사로부터 입수가능하거나 또는 문헌에 제시된 방법에 따라 제조할 수 있다 (예를 들어 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (American Type Culture Collection)의 카탈로그 참조).

[0222] 이어서, 재조합 생산된 1가 항체는 원심분리 또는 여과에 의한 배지로부터 숙주 세포의 분리, 염, 예를 들어 황산암모늄에 의한 상등액 또는 여액의 단백질 성분의 침전, 다양한 크로마토그래피 과정, 예를 들어 HPLC, 이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 단백질 A 크로마토그래피, 단백질 G 크로마토그래피 등에 의한 정제를 포함하는 통상적인 절차에 의해 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

[0223] 본 발명은 또한 본 발명의 1가 항체의 제조 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은

[0224] (a) 상기 1가 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하고,

[0225] (b) 1가 항체를 숙주 세포 배양액으로부터 회수하는 것

[0226] 을 포함한다.

[0227] 한 실시태양에서, 상기 숙주 세포는 원핵 숙주 세포이다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 이. 콜라이 (*E. coli*) 세포이다. 한 실시태양에서, 이. 콜라이 세포는 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주이다.

[0228] 한 실시태양에서, 상기 숙주 세포는 진핵 세포이다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 HEK-293F 세포이다. 다른 실시태양에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다.

[0229] 한 실시태양에서, 1가 항체는 배양 배지로부터 회수된다. 다른 실시태양에서, 1가 항체는 세포 용해물로부터 회수된다.

[0230] 본 발명의 항체는 긴 생체내 반감기를 갖는 잇점을 갖고, 따라서 예를 들어 상당히 더 짧은 생체내 반감기를 갖는 동일한 항체의 FAB 단편에 비해 보다 긴 치료 지속 시간 범위 (therapeutic window)를 갖는다.

[0231] 또한, 긴 반감기와 작은 크기로 인해, 본 발명의 1가 항체는 예를 들어 고형 종양을 투과할 수 있음으로써 생체내에서 보다 우수한 분포를 보일 가능성을 가질 것이다. 따라서, 본 발명의 항체가 표적 분자를 억제하기 위해 또는 질병을 치료하는 다른 약물의 표적 특이적인 전달 메카니즘으로서 사용될 수 있기 때문에, 본 발명의 1가 항체는 예를 들어 암 치료를 위한 큰 유용성을 보일 수 있다.

[0232] 본 발명의 1가 항체에 의해 면역계 활성화가 발생하지 않기 때문에, 본 발명의 항체는 표적 세포 억제성이지만, 표적 세포를 치사시키지는 않는다. 이것은 세포를 치사시키지 않으면서 메카니즘의 억제가 필요한 다양한 질병의 치료를 고려할 때 유리할 수 있다.

[0233] 한 실시태양에서, 항-VEGF 1가 항체가 AMD (급성 황반 변성), 및 다른 질병의 치료에 사용된다.

[0234] 한 실시태양에서, 사용되는 항-VEGF 1가 항체는 1가 형태의 베바치주맙 (아바스틴 (Avastin))이다.

[0235] 본 발명의 항체는 1가이고, 생리학적 조건 하에 안정하고, 보체를 활성화시킬 수 없고, 따라서 다가 항체, 예를 들어 2가 항체의 사용이 불필요하거나 불리한, 또는 보체의 활성화가 불필요하거나 불리한 질병 또는 질환의 치료에 사용하기 적합하다. 본 발명의 1가 항체는 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄로 구성된 이종이량체에 의해 수용액 중에 제시될 수 있다.

[0236] 본원에서 표현 "생리학적 조건 하에 안정한" 또는 "생리학적 조건 하의 안정성"은 1가 항체가 대상에게 1 내지 10 mg/kg의 용량으로 생체 내에 투여된 후에 1주 초과의 기간 동안 그의 주요한 구조적 및 기능적 특성이 변하지 않으면서 치료상 유의한 농도로 존재함을 의미한다. 5 ㎍/ml의 혈장 농도는 항체가 이 수준에서 표적 결합의 포화를 보일 수 있기 때문에 대부분의 치료 항체에 대해 유의한 것으로 간주된다. 7일의 시간 간격은 이러한 맥락에서 비교적 긴 것으로 간주된다.

[0237] 면역-결핍 및 면역-적격 마우스 모두에서, 힌지가 없는 변이체의 소실은 대등한 분자 크기를 갖는 $F(ab')_2$ 단편보다 훨씬 더 느리다. 이것은 Fc-부분이 혈장 체류 시간에 대해 유리한 효과를 보유함을 나타내고, 세포내 이입된 IgG를 세포내 분해로부터 보호하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)와의 기능적인 상호작용의 존재를 제시한다. 힌지가 없는 변이체의 소실율은 Fab 단편보다 약 300배 더 낮고, 이것은 동등한 지속성 혈장 농도를 얻기 위해 300배 더 낮은 용량으로 투여될 수 있음을 나타낸다.

[0238] 본 발명은 또한 본 발명의 1가 항체의 면역컨쥬게이트에 관한 것이다. 본 발명은 특히 치료 잔기, 예를 들어 세포독소, 화학치료 약물, 면역억제제 또는 방사성 동위원소에 컨쥬게이팅된 본 발명의 1가 항체를 특징으로 한다. 상기 컨쥬게이트는 본원에서 "면역컨쥬게이트"로 언급된다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 (예를 들어 치사시키는) 임의의 물질을 포함한다. 그 예는 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티듐 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 푸로마이신 및 그의 유사체 또는 상동체를 포함한다.

[0239] 본 발명의 면역컨쥬게이트 형성에 적합한 화학치료제는 항대사체 (예를 들어 메토트렉세이트, 6-머캅토푸린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 히드록시우레아, 아자티프린, 겜시타빈 및 클라드리빈), 알킬화제 (예를 들어 메클로르에타민, 티오에파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린 (예를 들어 다우노루비신 (이전에 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어 닥티노마이신 (이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 및 항-유사분열제 (예를 들어 빈크리스틴, 빈블라스틴, 도세탁셀, 파클리탁셀 및 비노렐빈)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0240] 적합한 방사성 동위원소는 예를 들어 요오드-131, 이트륨-90 또는 인듐-111이다. 치료 잔기의 추가의 예는 목적하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 상기 단백질은 예를 들어 효소에 의해 활성 독소, 또는 그의 활성 단편, 예를 들어 아브린, 리신 A, 녹농균 외독소, 또는 디프테리아 독소; 종양 괴사 인자 또는 인터페론-γ와 같은 단백질; 또는 생물학적 반응 변경제, 예를 들어 림포킨, 인터루킨-1 (IL-1), 인터루킨-2 (IL-2), 인터루킨-6 (IL-6), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 또는 다른 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0241] 한 실시태양에서, 치료 잔기는 독소루비신, 시스플라틴, 블레오마이신, 카르무스틴, 클로람부실, 시클로포스파미드 또는 리신 A이다.

[0242] 상기 치료 잔기를 항체에 컨쥬게이팅시키는 기술은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies 1984: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982) 참조).

[0243] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 항체가 방사성 동위원소에 컨쥬게이팅되는 것을 가능하게 하는 링커-킬레이터, 예를 들어 티욱세탄에 부착된다.

[0244] 한 실시태양에서, 본 발명은 본 발명의 1가 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 제약 조성물은 통상적인 기술, 예를 들어 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에 개시된 기술에 따라 제약상 허용되는 담체 또는 희석제 및 임의의 다른 공지의 어쥬번트 및 부형제와 함께 제제화될 수 있다.

[0245] 제약 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식으로 투여될 수 있다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 투여 경

로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 결정될 것이다.

[0246] 본 발명의 제약 조성물은 경구, 비내, 국소 (구강 및 설하 포함), 직장, 질내 및/또는 비경구 투여에 적합한 것을 포함한다.

[0247] 질내 투여에 적합한 본 발명의 제제는 적절한 것으로 당업계에 공지된 담체를 포함하는 질좌제, 탐폰, 크림, 겔, 페이스트, 포움 또는 스프레이 제제를 포함한다. 본 발명의 조성물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 형태는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다.

[0248] 한 실시태양에서, 제약 조성물은 비경구 투여에 적합하다.

[0249] 본원에서 사용되는 구문 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여된"은 소화관내 및 국소 투여 이외의 다른 투여 방식, 대체로 주사를 의미하고, 정맥내, 근내, 정맥내, 경막내, 낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관내, 피하, 표피하, 관절내, 낭하, 거미막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0250] 한 실시태양에서, 제약 조성물은 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입에 의해 투여된다.

[0251] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 결정 형태로 피하 주사에 의해 투여된다 [Yang et al. PNAS, 100(12), 6934-6939 (2003) 참조].

[0252] 선택된 투여 경로에 무관하게, 제약상 허용되는 염 형태로 또는 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 1가 항체 및/또는 본 발명의 제약 조성물은 당업자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 제약상 허용되는 투여 형태로 제제화된다.

[0253] 본원에서 사용되는 바와 같이, "제약상 허용되는 담체"는 생리학적으로 상용성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장화제, 항산화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.

[0254] 제약상 허용되는 담체는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수성 용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 상기 매질 및 제약 활성 물질용 물질은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 물질이 1가 항체에 비상용성인 것을 제외하고, 본 발명의 제약 조성물에서 그의 용도가 고려된다.

[0255] 한 실시태양에서, 담체는 비경구 투여, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입에 적합하다.

[0256] 제약 조성물은 통상적으로 무균성이어야 하며, 제조 및 저장 조건하에 안정해야 한다. 조성물은 용액, 미세에멀젼, 리포좀, 또는 높은 약물 농도에 대해 적합한 다른 규칙적인 구조물로서 제제화될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어 올리브유, 및 주사가능 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트를 포함한다. 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 물질을 이용하고, 분산액의 경우 필요한 입지 크기를 유지하며, 계면활성제를 사용함으로써 적절한 유동성을 유지할 수 있다.

[0257] 제약 조성물은 또한 어쥬번트, 예를 들어 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 포함할 수 있다. 미생물의 존재의 방지는 멸균 과정 및 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산 등의 첨가에 의해 보장될 수 있다. 또한, 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예를 들어 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 제약상 허용되는 항산화제, 예를 들어 (1) 수용성 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 시스테인 염산염, 나트륨 비술페이트, 나트륨 메타비술파이트, 나트륨 술파이트 등; (2) 유용성 (oil-soluble) 항산화제, 예를 들어 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이팅제, 예를 들어 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등이 포함될 수 있다.

[0258] 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 주사가능 조성물의 흡수를 연장시킬 수 있다.

[0259] 적절한 용매 중에 필요량의 1가 항체를 예를 들어 상기 언급한 성분들 중 필요한 하나의 성분 또는 성분들의 조합물과 함께 혼입시킨 다음 멸균 미세여과하여, 멸균 주사가능 용액을 제조할 수 있다. 일반적으로, 염기성 분산 매질 및 예를 들어 상기 언급한 것 중 요구되는 다른 성분을 포함하는 멸균 비히클에 1가 항체를 혼입시켜 분산액을 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법의 예는 활성 성분, 및 미리

멸균-여과한 그의 용액으로부터의 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성하는 진공건조 및 동결건조(lyophilization)이다.

[0260] 적절한 경우, 1가 항체는 적합한 수화된 형태 또는 제약상 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있다. "제약상 허용되는 염"은 모 화합물의 목적하는 생물학적 활성을 보유하면서 임의의 목적하지 않은 독성 효과를 보이지 않는 염을 의미한다 (예를 들어 Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19 참조). 상기 염의 예는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 무독성 무기산, 예를 들어 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 인 등으로부터 유도된 것, 및 무독성 유기산, 예를 들어 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환된 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등으로부터 유도된 것을 포함한다. 염기 부가염은 알칼리 토금속, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등으로부터 유도된 것, 및 무독성 유기 아민, 예를 들어 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸-글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유도된 것을 포함한다.

[0261] 투여 경로에 따라, 1가 항체는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산의 작용 및 다른 자연적인 조건으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅될 수 있다. 예를 들어, 화합물을 적절한 담체, 예를 들어 리포좀에 넣어 대상에게 투여할 수 있다. 리포좀은 통상의 리포좀뿐만 아니라 수중유중수 (water-in-oil-in-water) CGF 에멀젼을 포함한다 (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

[0262] 1가 항체는 급속한 방출에 대하여 1가 항체를 보호하는 담체와 함께, 예를 들어 임플란트, 경피 패치 및 미세캡슐화 (microencapsulated) 전달 시스템을 비롯한 조절 방출 제제로 제조될 수 있다. 생분해성 및 생체적합성 중합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 다가 무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 이러한 제제를 제조하는 방법들은 통상적으로 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978] 참조).

[0263] 제약 조성물을 당업계에 공지된 의료 장치로 투여할 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 치료 조성물은 바늘 없는 피하 주사 장치, 예를 들어 US 5399163; US 5383851; US 5312335; US 5064413; US 4941880; US 4790824; 또는 US 4596556에 개시된 장치로 투여할 수 있다. 본 발명에 유용한 잘 알려진 임플란트 및 모듈의 예로는 US 4487603 (조절된 속도로 약물을 분배하는 이식가능한 미세-주입 펌프를 개시함); US 4486194 (피부를 통해 약물을 투여하는 치료 장치를 개시함); US 4447233 (정확한 주입 속도로 약물을 전달하는 약물 주입 펌프를 개시함); US 4447224 (약물을 지속적으로 전달하기 위한 가변 유량의 이식가능한 주입 장치를 개시함); US 4439196 (멀티-챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시함); 및 US 4475196 (삼투성 약물 전달 시스템을 개시함)를 들 수 있다. 다수의 다른 임플란트, 전달 시스템 및 모듈은 당업자에게 공지되어 있다.

[0264] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 예를 들어 리포좀을 사용하여 생체 내에서 적절히 분포되도록 제제화할 수 있다. 리포좀의 제조 방법에 대하여는 예를 들어 US 4522811; US 5374548; 및 US 5399331을 참조한다. 리포좀은 특정 세포 또는 장기 내로 선택적으로 운반되는 하나 이상의 잔기를 포함할 수 있으므로, 표적화된 약물 전달을 향상시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [V. V. Ranade (1989) J Clin. Pharmacol. 29:685] 참조). 표적화 잔기의 예로서 폴레이트 또는 비오틴 (예를 들어, US 5416016 참조); 만노시드 (Umezawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038 (1988)); 다른 항체 (Bloeman et al., FEBS Lett. 357, 140 (1995); Owais et al., Antimicrob. Agents Chemother. 39, 180 (1995)); 계면활성제 단백질 A 수용체 (Briscoe et al., Am. J. Physiol. 1233, 134 (1995)) (그의 여러 종은 본 발명의 제제뿐만 아니라 본 발명의 분자 성분을 포함할 수 있음); p120 (Schreier et al., J. Biol. Chem. 269, 9090 (1994))이 포함된다 (또한, 문헌 [Keinanen et al., FEBS Lett. 346, 123 (1994); Killion et al., Immunomethods 4, 273 (1994)] 참조. 조성물은 주사 투여가 용이할 정도로 유동성이어야 한다. 조성물은 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 하며, 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보호되어야 한다.

[0265] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 태반을 통해 전달되는 것을 예방 또는 감소시키기 위해 제제화될 수 있다. 이는 당 분야에 공지된 방법, 예를 들어 1가 항체의 PEG화에 의해 수행할 수 있다. 또한, 문헌 [Cunningham-Rundles et al., J Immunol Methods. 152, 177-190 (1992); 및 Landor et al., Ann. Allergy Asthma Immunol. 74, 279-283 (1995)]을 참고할 수 있다.

[0266] 투여 요법을 조절하여 최적의 목적하는 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공한다. 예를 들어, 치료 상황의 요건에 따라 지시되는 바와 같이, 단일 볼러스를 투여하거나, 여러 번으로 나누어 시간에 걸쳐 투여하거나, 또는 투여량을 비례적으로 감소 또는 증가시킬 수 있다. 투여를 용이하게 하고 투여량을 일정하게 하기 위해 비경구

조성물을 단위 투여 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용된 단위 투여 형태는 치료 대상에 대하여 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미하며, 각 단위는 필요한 제약 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 나타내도록 계산된 소정량의 1가 항체를 포함한다. 본 발명의 단위 투여 형태에 대한 세부사항은 (a) 1가 항체의 특유한 특성 및 달성하고자 하는 특정 치료 효과, 및 (b) 개체에서의 감수성 치료를 위해 상기 1가 항체를 배합하는 기술에 있어서의 고유한 제한에 의해 지시되며, 이들에 직접적으로 의존한다.

[0267] 본 발명의 제약 조성물 내의 1가 항체의 실제 투여 수준을 변화시켜, 특정 환자에서 목적하는 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양, 조성 및 투여 방식을 결정할 수 있다. 선택된 투여 수준은 사용된 본 발명의 특정 1가 항체의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 1가 항체의 배출 속도, 치료 지속 기간, 사용된 특정 조성물과 함께 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전체적인 건강 및 기존의 병력, 및 의료분야에 잘 알려진 인자 등을 비롯하여 다양한 약동학적 인자에 따라 달라질 것이다.

[0268] 당업계의 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사라면 필요한 제약 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 제약 조성물에 사용되는 본 발명의 화합물의 투여량을, 목적하는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 양보다 더 낮은 수준에서 출발하여, 목적하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 제약 조성물의 적합한 투여량은 치료 효과를 나타내는 데 효과적인 최저 투여량에 해당하는 1가 항체의 양일 것이다. 이러한 효과적인 투여량은 일반적으로 상기 설명한 인자에 따라 좌우될 것이다. 또다른 예로서, 의사 또는 수의사는 치료상 유효 투여량을 신속하게 확립하기 위해 고로딩 투여량으로 출발한 후 보다 낮은 투여량을 반복 투여하고, 보다 오랜 기간에 걸쳐 유지할 수 있다.

[0269] 본 발명의 제약 조성물은 본 발명의 상이한 1가 항체 중의 하나 또는 조합물을 포함할 수 있다. 따라서, 추가의 실시태양에서, 제약 조성물은 상이한 메카니즘에 의해 작용하는 다수의 (예를 들어 2 이상의) 본 발명의 1가 항체의 조합물을 포함한다. 따라서, 1가 항체는 또한 2가 항체와 조합될 수 있다.

[0270] 본 발명은 또한 본 발명의 1가 항체의 중쇄의 C_H 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 구성체에 관한 것이다.

[0271] 한 실시태양에서, 본 발명은 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 상기 C_H 영역 내의 힌지 영역에 대응하는 영역이 상기 C_H 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열, 또는 그의 상보성 서열을 포함하는 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형된다.

[0272] 본 발명의 1가 항체의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 구성체는 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산으로부터 유도될 수 있다. IgG4의 C_H 영역의 전장 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 구성체는 본원에서, 예를 들어 실시예에서 논의되는 임의의 방법 또는 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 제조할 수 있다. 재조합 DNA 서열을 사용한 조작 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 본 명세서에 설명된 바와 같은 부위 지정 돌연변이 유발을 사용하여 수행할 수 있다. 그러나, 부위 지정 돌연변이 유발은 적용될 수 있는 기술의 비제한적인 예 중의 하나일 뿐이다.

[0273] C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열의 변형은 본 발명의 1가 항체의 제작에 대해 상기 설명된 바와 같이 수행할 수 있다.

[0274] 한 실시태양에서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 힌지 영역에 대응하는 영역이 임의의 시스테인 잔기를 포함하지 않도록 변형된다.

[0275] 한 실시태양에서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 임의의 시스테인 잔기를 포함하여 힌지 영역에 대응하는 영역의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 결실되고/되거나 다른 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된다.

[0276] 한 실시태양에서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 서열 14의 서열의 아미노산 106 및 109에 대응하는 아미노산이 결실되도록 변형된다.

[0277] 한 실시태양에서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 내지 109에 대응하는 아미노산 잔기가 결실되도록 변형된다.

[0278] 한 실시태양에서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 99 내지 110에 대응

하는 아미노산 잔기가 결실되도록 변형된다.

[0279] 한 실시태양에서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 전체 힌지 영역이 결실되도록 변형된다.

[0280] 한 실시태양에서, 본원에서 서열 13으로 확인된 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 서열에서 힌지 영역의 스플라이스 공여자 부위에 대응하는 뉴클레오티드의 돌연변이 (치환)는 IgG4의 힌지가 없는 C_H 영역을 포함하는 폴리펩티드의 발현을 야기한다.

[0281] 따라서, 한 실시태양에서, 본 발명의 핵산 구성체는 힌지 영역을 코딩하는 핵산 서열의 스플라이스 공여자 부위의 적어도 하나의 뉴클레오티드가 본래 그 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드로 치환되도록 변형된다.

[0282] 한 실시태양에서, 서열 13의 서열의 위치 714 및 722의 뉴클레오티드에 대응하는 뉴클레오티드는 서열 13에서 그 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드로 치환되도록 변형된다.

[0283] 한 실시태양에서, 본 발명의 핵산 구성체의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 서열 13의 서열을 포함하고, 여기서 서열 13의 서열의 뉴클레오티드 714 및 722는 서열 13에서 그 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드로 치환된 것이다.

[0284] 한 실시태양에서, 본 발명의 핵산 구성체의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 서열 15의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0285] 한 실시태양에서, 본 발명의 핵산 구성체의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산 잔기가 시스테인과 상이한 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된다.

[0286] 한 실시태양에서, 본 발명의 핵산 구성체의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열의 치환된 뉴클레오티드는 부위 지정 돌연변이 유발을 사용하여 치환된다.

[0287] 한 실시태양에서, 힌지 영역에 대응하는 영역이 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형된, IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성체가 본 발명의 1가 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산과 융합된다.

[0288] 따라서, 한 실시태양에서, 핵산 구성체는 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열, 또는 그의 상보성 서열을 포함한다.

[0289] 한 실시태양에서, 핵산 구성체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열, 또는 그의 상보성 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0290] 한 실시태양에서, 핵산 구성체는 본 발명의 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0291] 이것은 2개의 상이한 코딩 서열이 함께 작동가능하게 연결된 핵산 구성체를 얻기 위해 공지의 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 본 발명의 1가 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열은 임의의 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산으로부터 유도될 수 있다. 한 실시태양에서, V_H 영역은 1가 항체의 V_L 영역이 그로부터 유도되는 동일한 항체로부터 유도된다. 본 발명은

[0292] 1) 서열 5로서 확인된 HuMab-7D8의 V_H를 코딩하는 핵산 서열 및 서열 15로서 확인된 IgG4의 힌지가 없는 C_H를 코딩하는 핵산 서열 (상기 서열은 함께 작동가능하게 연결됨), 및

[0293] 2) 서열 7로서 확인된 마우스 항-Betv-1의 V_H를 코딩하는 핵산 서열 및 서열 15로서 확인된 IgG4의 힌지가 없는 C_H를 코딩하는 핵산 서열 (상기 서열은 함께 작동가능하게 연결됨)

[0294] 을 포함하는 핵산 구성체의 제조 방법의 예를 제공한다.

[0295] 상이한 특이적 항원에 결합할 수 있는 1가 항체를 코딩하는 많은 상이한 핵산 구성체를 상기 설명한 본 발명의 방법을 사용하여 생성시킬 수 있고, 따라서 특정 1가 항체의 예는 본원에 기재된 항체의 예로 제한되지 않는다.

[0296] 한 실시태양에서, 본 발명의 핵산 구성체는 또한 본 발명의 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0297] 한 실시태양에서, 본 발명의 핵산 구성체는 본 발명의 1가 항체의 V_L 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0298] 한 실시태양에서, 본 발명의 핵산 구성체는 본 발명의 1가 항체의 C_L 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 한 실시태양에서, C_L 영역은 Ig 경쇄 카파의 C_L 영역이다. 한 실시태양에서, C_L 영역은 서열 1의 서열을 갖는다. 다른 실시태양에서, C_L 영역은 Ig 경쇄 카파의 C_L 영역이다. 한 실시태양에서, C_L 영역은 서열 3의 서열을 갖는다.

[0299] 상기 핵산 구성체는 본원에서 논의된 임의의 공지된 재조합 기술에 의해 제조하거나, 또는 본원에서 실시예에 기재된 절차에 따라 제조할 수 있다.

[0300] 본 발명의 1가 항체의 V_L 영역을 코딩하는 핵산 서열은 임의의 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산으로부터 유도될 수 있다. 한 실시태양에서, V_L 영역은 1가 항체의 V_H 영역이 그로부터 유도되는 동일한 항체로부터 유도된다. 본 발명은

[0301] 1) 서열 9로서 확인된 HuMab-7D8의 V_L을 코딩하는 핵산 서열 및 서열 1로서 확인된 Ig의 C_L 카파를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성체 (상기 서열은 함께 작동가능하게 연결됨), 및

[0302] 2) 서열 11로서 확인된 마우스 항-Betv-1의 V_L을 코딩하는 핵산 서열 및 서열 1로서 확인된 Ig의 C_L 카파를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성체 (상기 서열은 함께 작동가능하게 연결됨)

[0303] 의 제조 방법의 예를 제공한다.

[0304] 핵산은 전체 세포에, 세포 용해물에, 또는 부분적으로 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다.

[0305] cDNA, 게놈 또는 이들의 혼합물로부터의 본 발명의 핵산 구성체는 종종 천연 서열로 존재하지만 (변형된 제한 부위 등을 제외한), 유전자 서열을 제공하기 위해 표준 기술에 따라 돌연변이될 수 있다. 코딩 서열에 대해, 상기 돌연변이는 목적하는 아미노산 서열에 영향을 줄 수 있다. 특히, 천연 V, D, J, 불변, 스위치 변이체 및 본원에 기재된 다른 서열에 실질적으로 상동성이거나 이들 서열로부터 유도된 DNA 서열이 고려된다 ("유도된"은 서열이 또다른 서열과 동일하거나 이로부터 변형됨을 나타낸다).

[0306] 한 실시태양에서, 핵산 구성체는 DNA 구성체이다. 한 실시태양에서, 핵산 구성체는 이중가닥 DNA 구성체이다.

[0307] 한 실시태양에서, 핵산 구성체는 RNA 구성체이다.

[0308] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 상기한 핵산 구성체를 세포에서 발현시킴으로써 제조한다.

[0309] 따라서, 본 발명은 발현 벡터인 상기한 핵산 구성체에 관한 것이다. 한 실시태양에서, 발현 벡터는 원핵세포 발현 벡터이다. 한 실시태양에서, 발현 벡터는 진핵세포 발현 벡터이다. 한 실시태양에서, 발현 벡터는 포유동물 발현 벡터이다. 본 발명에 사용될 수 있는 상이한 발현 벡터의 예는 본원의 다른 부분에서 논의되고, 특정 예가 실시예에서 설명된다.

[0310] 본 발명은 본 발명의 핵산 구성체를 포함하고 상기 핵산 구성체가 상기 항체의 경쇄를 코딩하지 않을 경우에는 폴리펩티드가 발현되도록 상기 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성체도 포함하는 숙주 세포를 배양하고, 세포 배양액으로부터 1가 항체를 회수하는 것을 포함하는, 본 발명의 1가 항체의 제조 방법을 제공한다. 한 실시태양에서, 1가 항체는 세포 용해물로부터 회수된다. 다른 실시태양에서, 1가 항체는 세포 배양 배지로부터 회수된다.

[0311] 본 발명은 또한 본 발명의 1가 항체의 생산을 위한 본 발명의 핵산 구성체의 용도를 제공한다. 한 실시태양에서, 상기 생산은 아래에서 보다 상세히 설명되는 방법의 사용을 포함한다.

[0312] 따라서, 본 발명의 1가 항체는 예를 들어 본 발명의 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터 및 본 발명의 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터, 또는 두 핵산 서열을 모두 포함하는 발현 벡터를 숙주 세포에서 발현시킴으로써 제조할 수 있다. 숙주 세포는 본원의 다른 부분에서 설명되는 바와 같이 외래 단백질의 발현에 적합한 임의의 세포, 예를 들어 포유동물 세포로부터 선택될 수 있다. 본 발명은 생체 내 및 시험관 내 발현 모두에 관한 것이다.

[0313] 일시적 시험관 내 발현을 위해 포유동물 HEK293 세포를 사용할 수 있다. 상기 경우에, 배양 중의 세포는 당업계에 공지된 임의의 적합한 세포 형질감염 방법에 의해 상기 발현 벡터로 형질감염시킬 수 있다. 예를 들어,

적합한 세포 형질감염 키트는 시판 회사, 예를 들어 스트라타젠 (Stratagene) 또는 인비트로겐으로부터 구입할 수 있다. 생체 내 발현을 위해, 발현 벡터는 상기 목적으로 개발된 임의의 적합한 투여 방법에 의해 생체 내로 투여된다. 생체 내에서 발현 벡터를 투여하는 방법도 당업계에 공지되어 있다.

[0314] 따라서, 본 발명은 상기한 핵산 구성체를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 이. 콜라이 세포이다. 다른 실시태양에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 한 실시태양에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 다른 실시태양에서, 숙주 세포는 HEK-293F 세포이다.

[0315] 본 발명은 폴리펩티드가 발현되도록 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 서열 및 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 본 발명의 숙주 세포를 배양하고, 세포 배양액으로부터 1가 항체를 회수하는 것을 포함하는, 본 발명의 1가 항체의 제조 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 1가 항체의 생산을 위한 본 발명의 숙주 세포의 용도를 제공한다. 한 실시태양에서, 상기 생산은 아래에서 보다 상세히 설명하는 방법의 사용을 포함한다. 핵산 서열은 중쇄를 코딩하는 핵산 서열과 동일한 핵산 구성체에 존재하거나 또는 별개의 핵산 구성체에 존재할 수 있다. 한 실시태양에서, 1가 항체는 세포 용해물로부터 회수된다. 다른 실시태양에서, 1가 항체는 세포 배양 배지로부터 회수된다.

[0316] 본 발명은 또한 상기한 핵산 구성체를 포함하는 유전자 도입 동물을 제공한다.

[0317] 본 발명은 1가 항체의 재조합 생산 방법을 제공하고, 상기 방법은

[0318] i) 상기 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 Ig의 불변 (C_L) 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 상기 Ig의 C_L 영역을 코딩하는 핵산 서열이 함께 작동가능하게 연결되고;

[0319] ii) 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산을 포함하고, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 중쇄의 힌지 영역에 대응하는 영역이 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형되고, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산 및 상기 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산이 함께 작동가능하게 연결되고;

[0320] iii) 상기 항체를 생산하기 위한 세포 발현계를 제공하고;

[0321] iv) (i) 및 (ii)의 핵산 구성체를 (iii)의 세포 발현계의 세포에서 동시 발현시켜 상기 1가 항체를 생산하는 것

[0322] 을 포함한다.

[0323] 단계 (iv) 후에, 1가 항체를 정제하여 목적하는 형태로 제제화할 수 있다.

[0324] 한 실시태양에서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열은 중쇄의 힌지 영역에 대응하는 영역이 상기한 바와 같이 임의의 시스테인 잔기를 포함하지 않도록 변형된다.

[0325] 한 실시태양에서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열은 임의의 시스테인 잔기를 포함하여 힌지 영역에 대응하는 영역의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 상기한 바와 같이 결실되고/되거나 다른 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된다.

[0326] 한 실시태양에서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열은 중쇄가 서열 14의 서열의 아미노산 106 및 109에 대응하는 아미노산이 상기한 바와 같이 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된다.

[0327] 한 실시태양에서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열은 중쇄가 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 내지 109에 대응하는 아미노산 잔기가 상기한 바와 같이 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된다.

[0328] 한 실시태양에서, 중쇄의 핵산 서열은 중쇄가 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 99 내지 110에 대응하는 아미노산 잔기가 상기한 바와 같이 결실된 C_H 영역을 포함하도록 변형된다.

[0329] 한 실시태양에서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열은 전체 힌지 영역이 상기한 바와 같이 결실되도록 변형된다.

[0330] 한 실시태양에서, 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체는 힌지 영역을 코딩하는 핵산 서열의 스플라이스 공여자 부위의 적어도 하나의 뉴클레오티드가 상기한 바와 같이 또다른 뉴클레오티드로 치환된 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0331] 한 실시태양에서, 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체는 서열 13의 서열의 위치 714 및 722의 뉴클레오티드에 대응하는 뉴클레오티드가 상기한 바와 같이 서열 13에서 그 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드로 치환된 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0332] 한 실시태양에서, 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체는 서열 13의 서열의 위치 714 및 722의 뉴클레오티드가 상기한 바와 같이 서열 13에서 그 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드로 치환된 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0333] 한 실시태양에서, 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체는 상기한 바와 같이 서열 15의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0334] 한 실시태양에서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열은 중쇄가 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산 잔기가 상기한 바와 같이 시스테인과 상이한 아미노산 잔기로 치환된 C_H 영역을 포함하도록 변형된다.

[0335] 한 실시태양에서, C_H 영역의 힌지 영역을 코딩하는 핵산 서열의 치환된 뉴클레오티드는 상기한 바와 같이 부위 지정 돌연변이 유발을 사용하여 치환된다.

[0336] 한 실시태양에서, 상기 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체는 상기한 바와 같이 인간 IgG의 카파 사슬의 C_L 영역을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0337] 한 실시태양에서, 핵산 구성체는 상기한 바와 같이 서열 1의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0338] 한 실시태양에서, 상기 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체는 상기한 바와 같이 인간 IgG의 람다 사슬의 C_L 영역을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0339] 한 실시태양에서, 핵산 구성체는 상기한 바와 같이 서열 3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0340] 한 실시태양에서, 핵산 구성체는 상기한 바와 같이 DNA 구성체이다. 한 실시태양에서, (i), (ii), (iii) 및/또는 (iv)의 핵산 구성체는 상기 설명된 원핵 발현 벡터이다. 추가의 실시태양에서, 세포 발현계는 상기 설명된 원핵 세포 발현계이다. 추가의 실시태양에서, 원핵 세포 발현계는 상기 설명된 이. 콜라이 세포를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 이. 콜라이 세포는 상기한 바와 같이 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주이다.

[0341] 한 실시태양에서, (i), (ii), (iii) 및/또는 (iv)의 핵산 구성체는 상기 설명된 진핵 발현 벡터이다. 추가의 실시태양에서, 세포 발현계는 상기 설명된 진핵 세포 발현계이다. 추가의 실시태양에서, 세포 발현계는 상기 설명된 포유동물 세포 발현계이다. 추가의 실시태양에서, 포유동물 세포 발현계는 상기 설명된 CHO 세포를 포함한다. 또다른 추가의 실시태양에서, 포유동물 세포 발현계는 상기 설명된 HEK-293F 세포를 포함한다.

[0342] 본 발명은 또한 본 발명의 방법을 사용하여 얻을 수 있는 1가 항체를 제공한다.

[0343] 본 발명은 또한 본 발명의 방법을 사용하여 얻은 1가 항체를 제공한다.

[0344] 본 발명에 따라, 본 발명의 임의의 항원 특이적 1가 항체는 상기한 바와 같은 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

[0345] 본 발명의 1가 항체는 항체가 인식하여 결합할 수 있는 항원을 발현하는 세포를 수반하는 질환의 진단 및 치료를 포함하는 많은 시험관 내 및 생체 내 진단 및 치료상의 유용성을 갖는다. 본 발명에 따라 본 명세서에 설명된 1가 항체가 임의의 특이적 항원에 대해 제조될 수 있기 때문에, 본 발명은 임의의 특이적 항원에 대해 작용하는 1가 항체에 관한 것이 아니다. 본 발명은 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 2개의 상이한 1가 항체, 즉 7D8-HG (HuMab 7D8, 또는 간단히 7D8은 WO04/035607에 기재된 항-CD20 항체이고, HuMab 7D8-HG, 또는 간단히 7D8-HG는 서열 16의 아미노산 서열로 구성된 C_H 영역을 포함하는 IgG4 중쇄를 갖는 동일한 항체이다) 및 항-Betv1-HG (항-Betv1은 문헌 (Akkerdaas JH et al., Allergy 50(3), 215-20 (1995))에 기재된 바와 같이 클론 2H8에 의해 발현된 마우스 항체이고, 항-Betv1-HG는 서열 16의 아미노산 서열로 구성된 C_H 영역을 포함하는 IgG4 중쇄를 갖는 동일한 항체이다)를 개시한다. 그러나, 본 발명은 상기 2개의 1가 항체로 제한되지 않는다. 한 실시태양에서, 본 발명에 따른 CD20 1가 항체는 WO2005/103081에 개시된 항체의 1가 항체이다.

[0346] 특정 생리학적 조건에서, 1가 항체를 이용하는 것이 필요하고/하거나 바람직하다. 또한, 일부 경우에, 치료 항체가 면역계-매개 활성, 예를 들어 효과기 기능, ADCC, 포식작용 및 CDC를 수반하지 않으면서 그의 치료 작용을 보이는 것이 바람직하다. 상기 상황에서, 상기 활성이 실질적으로 감소되거나 제거된 항체 형태를 생성시키는 것이 바람직하다. 또한, 항체가 효율적으로 고수율로 제조될 수 있는 형태인 것이 유리하다. 본 발명은 다양한 목적을 위해, 예를 들어 치료제, 예방제 및 진단제로서 사용될 수 있는 상기 항체를 제공한다.

[0347] 본 발명의 1가 항체의 특정 유용성은 항체의 특이적 표적에 의해 결정된다. 본 발명의 1가 항체가 치료제, 예방제 및 진단제로서 유용한 항체가 되도록 하는 표적은 표적에 특이적인 또는 표적 상의 제시된 에피토프에 특이적인 항체 투여시의 치료적인 가치 (상기 정보는 상이한 표적의 숙주에 대해 당업계에 잘 알려져 있다) 및 특이적인 표적에 대한 안정한 1가 항체의 사용시의 잇점을 기초로 하여 선택할 수 있다. 이러한 고려 사항은 당업자가 잘 판단할 수 있다.

[0348] 본 발명의 1가 항체는 시험관 내에서, 생체 외에서 및/또는 생체 내에서 특이적 항원 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하는 길항제로서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 1가 항체는 동일한 에피토프를 공유하는 상이한 항원에 의해 야기되는 가교결합에 의해 다른 종으로부터의 항원 활성을 중화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 1가 항체는 예를 들어 항원을 포함하는 세포 배양액에서, 인간 대상에서 또는 본 발명의 항체가 교차반응하는 항원을 갖는 다른 포유동물 대상 (예를 들어 침팬지, 비비, 명주원숭이, 사이노몰거스 및 붉은털 원숭이, 돼지 또는 마우스)에서 특이적인 항원 활성을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 항원 활성이 억제되도록 항체를 항원과 접촉시킴으로써 항원 활성을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 항원은 인간 단백질 분자이다.

[0349] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 리간드 항원에 특이적이고, 리간드 항원을 수반하는 리간드-수용체 상호작용을 차단하거나 방해하여 대응하는 시그날 경로 및 다른 분자 또는 세포 사건을 억제함으로써 항원 활성을 억제한다.

[0350] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 리간드와 접촉시에 활성화될 수 있는 수용체 항원에 특이적이고, 리간드-수용체 상호작용을 차단하거나 방해하여 대응하는 시그날 경로 및 다른 분자 또는 세포 사건을 억제함으로써 항원 활성을 억제한다.

[0351] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 CD74에 대해 작용하고, MIF-유도 시그날 전달을 억제하지만, Fc-매개 효과기 기능은 결여되어 있다.

[0352] 본 발명은 또한 반드시 리간드 결합을 억제하는 것은 아니지만 수용체 활성화를 방해하여 정상적으로는 리간드 결합에 의해 개시되는 임의의 반응을 억제하는 수용체-특이적 1가 항체를 특징으로 한다. 본 발명은 또한 바람직하게는 또는 배타적으로 리간드-수용체 복합체에 결합하는 1가 항체를 포함한다.

[0353] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 특정 항원 수용체의 아고니스트로서 작용하여, 리간드-매개 수용체 활성화의 모든 또는 부분적 활성을 증가시키거나 향상시키거나 활성화시킬 수 있다.

[0354] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 바이러스 또는 다른 병원체의 그의 수용체에 대한 결합, 예를 들어 HIV의 CD4 또는 공수용체, 예를 들어 CCR5 또는 CXCR4에 대한 결합을 억제할 수 있다.

[0355] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 예를 들어 악성 및 양성 종양; 비-백혈병 및 림프계 악성 종양; 신경세포성, 아교세포, 성상세포, 시상하부 및 다른 선 (glandular), 포식세포, 상피, 간질 및 포배강 질환; 및 염증성, 혈관형성 및 면역학적 질환을 포함하고 이로 제한되지 않는, 하나 이상의 항원 분자의 비정상적인 발현 및/또는 활성과 관련된 질병, 질환 또는 병태의 진행을 치료, 억제, 지연시키거나, 그 재발을 억제/지연시키거나, 질병 등을 개선시키거나 억제하기 위해 사용될 수 있다.

[0356] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 예를 들어 암, 세포 증식 질환, (자가-) 면역 질환, 염증 질환 및/또는 혈관신생 질환과 같은 질병, 질환 또는 병태를 치료, 예를 들어 그의 진행을 억제, 지연시키거나, 그 재발을 억제/지연시키거나, 질병 등을 개선시키거나 억제하기 위해 사용될 수 있다. 이것은 그의 항원 특이성을 통해 세포 증식, 세포 성장, 세포 생존성, 세포자멸, 괴사, 세포-세포 상호작용, 세포-매트릭스 상호작용, 세포 신호전달, 세포-표면 분자 발현, 세포-표면 분자 상호작용, 리간드-수용체 상호작용을 방해할 수 있는 1가 항체에 의해 결정될 것이다.

[0357] 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본 발명의 1가 항체를 제공한다.

[0358] 본 발명은 암, 세포 증식 질환, (자가-)면역 질환, 염증 질환 및/또는 혈관신생 질환을 치료하기 위한 의약으로

서 사용하기 위한 본 발명의 1가 항체를 제공하고, 여기서 항체는 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프에 대한 항체의 결합은 상기 질병을 치료하는데 효과적이다.

[0359] 본 발명은 항원의 다량체화 (예를 들어 이량체화)가 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있는, 가용성 항원의 차단 또는 억제에 의해 치료가능한 질병 또는 질환을 치료하기 위한 의약으로서 사용하기 위한 본 발명의 1가 항체를 제공하고, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다.

[0360] 본 발명은 면역계-매개 활성의 관여가 항체의 투여 효과를 달성하기 위해 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않은, 특정 표적에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료가능한 질병 또는 질환을 치료하기 위한 의약으로서 사용하기 위한 본 발명의 1가 항체를 제공하고, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다.

[0361] 본 발명은 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있는 세포막 결합 수용체를 차단하거나 억제함으로써 치료할 수 있는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 의약으로서 사용하기 위한 본 발명의 1가 항체를 제공하고, 상기 항체는 상기 수용체에 특이적으로 결합한다.

[0362] 본 발명은 의약으로서의 본 발명의 1가 항체의 용도를 제공한다.

[0363] 본 발명은 암, 세포 증식 질환, (자가-)면역 질환, 염증 질환 및/또는 혈관신생 질환을 치료하기 위한 의약으로서의 본 발명의 1가 항체의 용도를 제공하고, 상기 항체는 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프에 대한 항체의 결합은 상기 질병을 치료하는데 효과적이다.

[0364] 본 발명은 항원의 다량체화 (예를 들어 이량체화)가 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있는, 가용성 항원의 차단 또는 억제에 의해 치료가능한 질병 또는 질환을 치료하기 위한 의약으로서의 본 발명의 1가 항체의 용도를 제공한다.

[0365] 본 발명은 면역계-매개 활성의 관여가 항체의 투여 효과를 달성하기 위해 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않은, 특정 표적에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료가능한 질병 또는 질환을 치료하기 위한 의약으로서의 본 발명의 1가 항체의 용도를 제공하고, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다.

[0366] 본 발명은 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있는 세포막 결합 수용체를 차단하거나 억제함으로써 치료할 수 있는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 의약으로서의 본 발명의 1가 항체의 용도를 제공하고, 상기 항체는 상기 수용체에 특이적으로 결합한다.

[0367] 본 발명은 암, 세포 증식 질환, (자가-)면역 질환, 염증 질환 및/또는 혈관신생 질환을 치료하기 위한 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명의 1가 항체의 용도를 제공하고, 상기 항체는 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프에 대한 항체의 결합은 상기 질병을 치료하는데 효과적이다.

[0368] 본 발명은 항원의 다량체화 (예를 들어 이량체화)가 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있는, 가용성 항원의 차단 또는 억제에 의해 치료가능한 질병 또는 질환을 치료하기 위한 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명의 1가 항체의 용도를 제공한다.

[0369] 본 발명은 면역계-매개 활성의 관여가 항체의 투여 효과를 달성하기 위해 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않은, 특정 표적에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료가능한 질병 또는 질환을 치료하기 위한 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명의 1가 항체의 용도를 제공하고, 상기 항체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다.

[0370] 본 발명은 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있는 세포막 결합 수용체를 차단하거나 억제함으로써 치료할 수 있는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명의 1가 항체의 용도를 제공하고, 상기 항체는 상기 수용체에 특이적으로 결합한다.

[0371] 본 발명은 치료가 필요한 대상에게 본 발명의 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 본 발명의 핵산 구성체를 투여하여 질병 또는 질환을 치료하는 것을 포함하는, 질병 또는 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0372] 본 발명은 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 항원에 특이적으로 결합하는 본 발명의 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 본 발명의 핵산 구성체를 투여하여 대상에서 항원 활성을 억제하는 것을 포함하는, 항원의 활성이 바람직하지 않은 질병 또는 질환으로 고통받는 대상에서 항원을 억제하는 방법을 제공한다.

[0373] 본 발명은 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 본 발명의 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상

기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 본 발명의 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함하는, 암, 세포 증식 질환, (자가)면역 질환, 염증 질환 및/또는 혈관신생 질환의 치료 방법을 제공하고, 여기서 항체는 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프에 대한 항체의 결합은 상기 질병을 치료하는데 효과적이다.

[0374] 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 상기 항원의 다량체화 (예를 들어 이량체화)가 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있는 가용성 항원의 차단 또는 억제에 의해 치료가능한 질병 또는 질환이고, 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 상기 항원에 대해 작용하는 본 발명의 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 본 발명의 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함한다.

[0375] 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 면역계-매개 활성의 관여가 항체의 투여 효과를 달성하기 위해 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않은, 특정 표적에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료가능한 질병 또는 질환이고, 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 상기 항원에 특이적으로 결합하는 본 발명의 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 본 발명의 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함한다.

[0376] 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있는 세포막 결합 수용체를 차단하거나 억제함으로써 치료할 수 있는 질병 또는 질환이고, 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 본 발명의 상기 수용체에 특이적으로 결합하는 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 본 발명의 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함한다.

[0377] 표적, 또는 상기 표적의 특이적인 에피토프에 대한 항체의 결합이 치료 효과를 갖는 것으로 밝혀졌거나 가질 것으로 예상되는 표적의 예를 개시하는 많은 학술 문헌이 존재한다. 본 명세서의 교시 내용을 참고하여 본원의 다른 부분에서 설명되는 바와 같이, 당업자는 상기 표적에 대한 1가 항체, 예를 들어 본 발명의 1가 항체의 사용이 치료 효과를 생성시킬 것으로 예상됨을 알 수 있을 것이다. 다음에서, 상기 표적의 복수의 예를 제시한다. 그러나, 상기 예는 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0378] 본 발명의 1가 항체는 가용성 항원에 특이적으로 결합하고, 상기 항원의 다량체화 (예를 들어 이량체화)는 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성시킬 수 있고, 예를 들어 가용성 항원이 다수의 동일한 서브유닛으로 이루어진 경우에 응집을 야기할 수 있다.

[0379] 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있는 수용체에 특이적으로 결합하는 본 발명의 1가 항체는 예를 들어 cmet, FcεRI, 아세틸 콜린 수용체, fas 또는 fasL, TRAIL, 또는 VEGF 수용체에 대해 작용할 수 있다.

[0380] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 FcαRI를 통한 세포 활성화의 방해에 의해, FcαRI 기능의 방해에 의해, 후속적인 FcαRI 활성화된 IgE 매개 반응의 억제에 의해, 또는 가용성 FcαRI의 결합에 의해 치료가능하다. 본 발명의 한 실시태양에서, 1가 항체는 FcαRI에 대해 작용하고, FcαRI 발현 세포의 세포자멸을 유도한다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 알레르기성 천식 또는 다른 알레르기성 질병, 예를 들어 알레르기성 비염, 계절성/통년성 알레르기, 고초열, 비내 알레르기, 아토피 피부염, 습진, 두드러기, 두드러기, 접촉성 알레르기, 알레르기성 결막염, 눈 알레르기, 음식 및 약물 알레르기, 라텍스 알레르기, 또는 곤충 알레르기, 또는 IgA 신장병증, 예를 들어 IgA 천포창일 수 있다. 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 FcαRI에 대해 작용한다. 상기 1가 항체는 또한 샘플 또는 환자에서 FcαRI에 대한 시험관 내 또는 생체 내 스크리닝을 위해 또는 상기 질병 및 질환을 치료하기 위한 면역독소 또는 방사성 표지 방법에 사용될 수 있다.

[0381] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 FcεR1 또는 Fcγ 수용체를 통한 Fc 수용체 γ-사슬 매개 시그날 전달을 하향조절시켜 치료가능하다. 항체의 FcαRI에 대한 단량체 결합은 상기 억제를 유도하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 1가 항체는 Fcγ, Fcα 및 Fcε 수용체를 포함하는 Fc 수용체를 통한 면역 활성화를 억제하기 위해 사용될 수 있다.

[0382] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 활성화된 T 세포 또는 CD25를 발현하는 세포의 직접적 또는 간접적 차단을 통해 CD25를 발현하는 세포의 활성 및/또는 성장 (예를 들어 증식)을 억제, 치사 및/또는 조절함으로써 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 다음 질병일 수 있다.

[0383] 이식 거부, 예를 들어 장기 또는 조직 이식, 예를 들어 심장, 폐, 복합 심장-폐, 기관, 신장, 간, 췌장, 식도, 장, 피부, 사지, 탯줄, 줄기 세포, 섬세포 이식 등을 실시하고 있거나 실시한 환자에서 동종이식편 및 이종이식편 거부: 본 발명의 1가 항체는 동종이식편 및 이종이식편 거부의 예방제로서 사용될 수 있거나, 또는 급성 동

종이식편 또는 이종이식편 거부 반응을 역전시키거나, 치료하거나 개선시키기 위해 사용될 수 있다,

[0384] 이식편-대-숙주 질병, 예를 들어 혈액 수혈 이식편-대-숙주 질병 및 골수 이식편-대-숙주 질병,

[0385] 염증성, 면역 또는 자가면역 질병, 예를 들어 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 1형 당뇨병, 인슐린 요구형 2형 당뇨병, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스, 중증 근무력증, 염증성 장 질환, 크론 질병, 궤양 대장염, 피부 다발근염, 쇼그렌 증후군, 동맥염, 예를 들어 거대 세포 동맥염, 재생물량성 빈혈, 천식, 공피증, 및 포도막염,

[0386] 염증 또는 과증식성 피부 질환, 예를 들어 건선, 예를 들어 반상 건선, 수장족저 농포증 (PPP), 미란성 편평 태선, 수포성 천포창, 수포성 표피박리증, 접촉 피부염 및 아토피성 피부염,

[0387] 림프계 신생물, 예를 들어 T 세포 백혈병, 호지킨 질병, 털세포 백혈병, 또는 피부 T 세포 림프종, 예를 들어 균상식육종, 및 세자리 증후군,

[0388] 악성 종양, 예를 들어 위암, 식도암, 악성 흑색종, 직결장암, 췌장암, 유방암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 자궁경부암, 난소암, 및 신장 세포 암종,

[0389] 혈액학적 질환, 예를 들어 성인 T 세포 백혈병/림프종, 재생불량성 대세포 림프종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL)/소림프구 림프종 (SLL), 말초 T 세포 림프종, 및 속발성 아밀로이드증,

[0390] 피부 질환, 예를 들어 괴저농피증, 환상육아종, 알레르기성 접촉 피부염, 반흔성 유천포창, 및 임신성 포진,

[0391] 간-위장관 질환, 예를 들어 콜라겐 대장염, 경화성 담관염, 만성 활성 간염, 루포이드 간염, 자가면역 간염, 알콜성 간염, 만성 췌장염, 및 급성 췌장염,

[0392] 심장 질환, 예를 들어 심근염 및 심장막염,

[0393] 혈관 질환, 예를 들어 동맥경화증, 거대 세포 관절염/류마티스성 다발성 근육통, 다까야스 동맥염, 결절성 다발성 동맥염, 카와사키 증후군, 베게너 육아종증, 현미경적 다발성 혈관염, 척-스트라우스 증후군, 백혈구 파괴성 혈관염, 및 2차 백혈구 파괴성 혈관염,

[0394] 신장 질환, 예를 들어 급성 사구체신염, 만성 사구체신염, 최소 변화 신염, 및 굳파스튜어 증후군,

[0395] 폐 질환, 예를 들어 폐포염, 폐쇄성 세기관지염, 규폐증, 및 베릴륨 중독증,

[0396] 신경학적 질환, 예를 들어 다발성 경화증, 알츠하이머병, 중증 근무력증, 만성 탈수초성 다발신경병증, 및 다발성 신경근염, 예를 들어 길랑-바레 증후군,

[0397] 결합 조직 질환, 예를 들어 재발성 다발성 연골염, 사코이드증, 전신 홍반성 루푸스, CNS 루푸스, 원반상 루푸스, 루푸스 신염, 만성 피로 증후군, 및 섬유근육통,

[0398] 내분비 질환, 예를 들어 그레이브스 질병, 하시모토 갑상선염, 및 아급성 갑상선염 또는

[0399] 바이러스 감염, 예를 들어 HIV-1/AIDS 및 열대성 경직 하반신 마비.

[0400] 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 CD25에 대해 작용한다. 상기 1가 항체는 또한 샘플 또는 환자에서 CD25에 대한 시험관 내 또는 생체 내 스크리닝을 위해 또는 상기 질병 및 질환을 치료하기 위한 면역독소 또는 방사성 표지 방법에 사용될 수 있다.

[0401] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 IL-15 또는 IL15 수용체 기능을 길항 및/또는 억제함으로써 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 관절염증, 통풍, 결합, 신경, 위장관, 간, 알레르기성, 혈액, 피부, 폐, 악성, 내분비, 혈관, 감염성, 신장, 심장, 순환, 대사, 뼈, 및 근육 질환일 수 있다. 그러한 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 IL-15에 대해 작용한다. 상기 1가 항체는 또한 샘플 또는 환자에서 IL-15에 대한 시험관 내 또는 생체 내 스크리닝을 위해 또는 상기 질병 및 질환을 치료하기 위한 면역독소 또는 방사성 표지 방법에 사용될 수 있다.

[0402] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 그의 수용체에 대한 IL-8 결합을 억제하거나, 또는 IL-8 기능을 차단함으로써 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 다음과 같은 질병 또는 질환일 수 있다:

[0403] 수장 족저 농포증 (PPP), 건선, 또는 다른 피부 질병,

[0404] 염증성, 자가면역 및 면역 질환, 예를 들어 건선성 관절염, 전신 공피증 및 경화증, 염증성 장 질환 (IBD), 크론 질병, 궤양 대장염, 급성 폐 손상, 예를 들어 급성 호흡 곤란 증후군 또는 성인 호흡 곤란 증후군, 수막염, 뇌염, 포도막염, 다발성 골수종, 사구체신염, 신염, 천식, 죽상 경화증, 백혈구 부착 결핍증, 다발성 경화증, 레이노드 증후군, 쇼그렌 증후군, 소아 발병형 당뇨병, 레이터병, 베체트병, 면역 복합체 신염, IgA 신장병증, IgM 다발성 신경병증, 면역-매개 혈소판감소증, 예를 들어 급성 특발성 혈소판 감소성 자색반 및 만성 특발성 혈소판 감소성 자색반, 용혈성 빈혈, 중증 근무력증, 루푸스 신염, 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염 (RA), 강직성 척추염, 천포창, 그레이브스 질병, 하시모토 갑상선염, 소혈관 혈관염, 예를 들어 베게너 육아종증, 오멘 증후군, 만성 신부전, 자가면역 갑상선 질병, 급성 감염성 단핵구증, HIV, 헤르페스 바이러스 연관 질병, 인간 바이러스 감염, 예를 들어 인간 리노 바이러스, 코로나 바이러스, 다른 장바이러스, 헤르페스 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스 또는 아데노바이러스 감염에 의해 발생하는 통상적인 감기, 세균성 폐렴, 상처, 패혈증, 뇌졸중/뇌부종, 허혈-재관류 손상 및 C형 간염,

[0405] 알콜성 간염 및 급성 췌장염,

[0406] IL-8 매개 혈관신생을 수반하는 질병, 예를 들어 종양 및 암, 예를 들어 흑색종, 갑상선 암종, 이행세포 암종, 모종, 편평 세포 암종 및 유방암.

[0407] 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 IL-8에 대해 작용한다. 상기 1가 항체는 또한 샘플 또는 환자에서 IL-8에 대한 시험관 내 또는 생체 내 스크리닝을 위해 또는 상기 질병 및 질환을 치료하기 위한 면역독소 또는 방사성 표지 방법에 사용될 수 있다.

[0408] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 예를 들어 면역독소 또는 방사성 표지 방법을 통해 CD20 활성을 방해하거나, B 세포를 고갈시키거나, B 세포 성장 및/또는 증식을 방해함으로써 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 류마티스성 관절염, (자가)면역 및 염증성 질환 (IL-8 관련 질병 및 질환에 대해 상기 설명한 바와 같은), 비-호지킨 림프종, B-CLL, 림프계 신생물, 악성 종양 및 혈액학적 질환, 감염성 질병 및 결합, 신경, 위장관, 간, 알레르기성, 혈액, 피부, 폐, 악성, 내분비, 혈관, 감염성, 신장, 심장, 순환, 대사, 뼈 및 근육 질환, 및 면역 매개 혈구감소증일 수 있다.

[0409] 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 CD20에 대해 작용한다. 상기 1가 항체는 또한 샘플 또는 환자에서 CD20에 대한 시험관 내 또는 생체 내 스크리닝을 위해 사용될 수 있다.

[0410] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 예를 들어 면역독소 또는 방사성 표지 방법을 통해 CD38 활성을 방해하거나, CD38 발현 세포를 고갈시키거나, $CD38^+$ 세포 성장 및/또는 증식을 방해함으로써 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 다음과 같은 질병 또는 질환일 수 있다:

[0411] 종양 형성 질환, 예를 들어 B 세포 림프종, 혈장 세포 악성 종양, T/NK 세포 림프종 및 골수성 악성 종양,

[0412] CD38 발현 B 세포, 형질 세포, 단핵구 및 T 세포가 수반되는 면역 질환, 예를 들어 자가면역 질환, 예를 들어 건선, 건선성 관절염, 피부염, 전신성 경피증 및 경화증, 염증성 장질환 (IBD), 크론병, 궤양성 대장염, 호흡곤란 증후군, 수막염, 뇌염, 포도막염, 사구체신염, 습진, 천식, 죽상경화증, 백혈구 부착 결핍증, 다발성 경화증, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 소아 발병형 당뇨병, 레이터병, 베체트병, 면역 복합체 신염, IgA 신장병증, IgM 다발성 신경병증, 면역-매개 혈소판감소증, 예를 들어 급성 특발성 혈소판 감소성 자색반 및 만성 특발성 혈소판 감소성 자색반, 용혈성 빈혈, 중증 근무력증, 루푸스 신염, 전신성 홍반성 루푸스, 류머티스성 관절염 (RA), 아토피성 피부염, 천포창, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 베게너 육아종증, 오멘 증후군, 만성 신부전, 급성 감염성 단핵구증, HIV, 및 헤르페스 바이러스 관련 질환,

[0413] 급성 호흡곤란 증후군 및 맥락망막염,

[0414] 엡스타인-바 바이러스 (EBV)와 같은 바이러스에 의한 B-세포의 감염에 의해 야기되거나 매개되는 것과 같은 질병 및 질환,

[0415] 류마티스성 관절염,

[0416] 자가항체 및/또는 과도한 B 및 T 림프구 활성이 우세한 염증, 면역 및/또는 자가면역 질환, 예를 들어 혈관염 및 기타 혈관 질환, 예를 들어 현미경적 다발성 혈관염, 척-스트라우스 증후군, 및 기타 ANCA-관련 혈관염, 결절성 다발성 동맥염, 본태성 한랭글로불린혈증 혈관염, 피부 백혈구 파괴성 혈관염, 카와사키병, 다까야스 동맥염, 거대 세포 관절염, 헤노흐-쉔라인 자색반, 원발성 또는 단리된 대뇌 혈관염, 결절성 홍반, 폐쇄성 혈전혈관

염, 혈전성 혈소판 감소성 자색반 (용혈성 요독 증후군 포함), 및 피부 백혈구 파괴성 혈관염을 포함하는 2차 혈관염 (예를 들어, B형 간염, C형 간염, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, B-세포 신생물, 류머티스성 관절염, 쇼그렌 증후군 또는 전신성 홍반성 루푸스에 대해 2차적임); 추가적인 예는 결절 홍반, 알레르기성 혈관염, 지방층염, 베버-크리스티안병, 고글로불린혈 자색반, 및 버거병임;

[0417] 피부 질환, 예를 들어 접촉성 피부염, 선형 IgA 피부병, 백반증, 괴저성 농피증, 후천성 수포성 표피박리증, 심상성 천포창 (반흔성 천포창 및 수포성 천포창 포함), 원형 탈모증 (범발성 탈모증 및 전두 탈모증 포함), 포진성 피부염, 다형 홍반, 및 만성 자가면역 두드러기 (혈관 신경성 부종 및 두드러기성 혈관염 포함);

[0418] 면역-매개 혈구감소증, 예를 들어 자가면역 호중구감소증 및 적혈구계 무형성증;

[0419] 결합 조직 질환, 예를 들어 CNS 루푸스, 원판상 홍반성 루푸스, CREST 증후군, 혼합형 결합 조직 질환, 다발성 근염/피부근염, 봉입체 근염, 2차 아밀로이드증, 제I형 및 제II형 한랭글로불린혈증, 섬유근육통, 인지질 항체 증후군, 2차 혈우병, 재발성 다연골염, 사르코이드증, 근육 강직 증후군, 및 류마티스 열; 추가적인 예는 호산구성 근막염임;

[0420] 관절염, 예를 들어 강직성 척추염, 소아형 만성 관절염, 성인 스틸병, 및 SAPHO 증후군; 추가적인 예는 천장골염, 반응성 관절염, 스틸병 및 통풍임;

[0421] 혈액학적 질환, 예를 들어 재생불량성 빈혈, 원발성 용혈성 빈혈 (한랭 응집소 증후군 포함), CLL 또는 전신성 홍반성 루푸스에 2차적인 용혈성 빈혈; POEMS 증후군, 악성 빈혈, 및 발덴스트롬 고글로불린혈증 자색반; 추가적인 예는 과립구결핍증, 자가면역 호중구감소증, 프랭클린병, 셀리그만병, 감마-사슬 질환, 흉선종 및 림프종에 2차적인 부신생물성 증후군, 및 인자 VIII 억제제 형성임;

[0422] 내분비병증, 예를 들어 다발성 내분비병증, 및 애디슨병; 추가적인 예는 자가면역 저혈당증, 자가면역 갑상선기능 저하증, 자가면역 인슐린 증후군, 드 퀘르뱅 갑상선염, 및 인슐린 수용체 항체-매개 인슐린 내성임;

[0423] 간-위장관 질환, 예를 들어 복강 질환, 휘플병, 원발성 담즙성 간경변, 만성 활동성 간염, 및 원발성 경화성 담관염; 추가적인 예는 자가면역 위염임;

[0424] 신장병증, 예를 들어 급속 진행성 사구체신염, 연쇄상구균 감염후 신염, 굳파스튜어 증후군, 막성 사구체신염, 및 한랭글로불린혈증성 신염; 추가적인 예는 미세변화 질환임;

[0425] 신경학적 질환, 예를 들어 자가면역 신경병증, 다발성 단신경염, 램버트-이튼 근무력 증후군, 시든햄 무도병, 척수 배면근 위축, 및 길랑-바레 증후군; 추가적인 예는 척수병증/열대 경직성 대부전마비, 중증 근무력증, 급성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 및 만성 염증성 탈수초성 신경병증임; 다발성 경화증; HIV-유도 치매임,

[0426] 심장 및 폐 질환, 예를 들어 COPD, 섬유성 폐포염, 폐쇄성 세기관지염, 알레르기성 아스페르길루스증, 낭포성 섬유증, 뢰플러 증후군, 심근염, 및 심막염; 추가적인 예는 과민성 폐렴, 및 폐암에 2차적인 부신생물성 증후군임;

[0427] 알레르기 질환, 예를 들어 기관지 천식 및 과다-IgE 증후군; 추가적인 예는 일과성 흑내장임;

[0428] 안과 질환, 예를 들어 특발성 맥락망막염;

[0429] 감염성 질환, 예를 들어 파르보바이러스 B 감염 (수족(hands and socks) 증후군 포함);

[0430] 산부인과 질환, 예를 들어 재발성 유산, 재발성 태아 상실, 및 자궁내 성장 지체; 추가적인 예는 부인과 신생물에 2차적인 부신생물성 증후군임;

[0431] 남성 생식기 질환, 예를 들어 고환 신생물에 2차적인 부신생물성 증후군; 및

[0432] 이식-유래 질환, 예를 들어 동종이식편 및 이종이식편 거부반응, 및 이식편-대-숙주 질병.

[0433] 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 CD38에 작용한다. 상기 1가 항체는 샘플 또는 환자에서 CD38에 대한 시험관 내 또는 생체 내 스크리닝을 위해 사용될 수 있다.

[0434] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 예를 들어 면역독소 또는 방사성 표지 방법을 통해 리간드-EGFr 상호작용을 차단하거나, EGFr 기능을 차단하거나, EGFr 발현 세포를 고갈시키거나 EGFr+ 세포 성장 및/또는 증식을 방해함으로써 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 다음과 같은 질병 또는 질환일 수 있다:

[0435] EGFr을 (과다)발현하는 암, 예를 들어 방광, 유방, 결장, 신장, 난소, 전립선, 신장 세포, 편평 세포, 폐 (비-소세포), 및 두경부 암, 및 신경아교종,

[0436] 다른 EGFr 관련 질병, 예를 들어 자가면역 질병, 건선, 염증성 관절염.

[0437] 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 EGFr에 대해 작용한다. 상기 1가 항체는 또한 샘플 또는 환자에서 EGFr에 대한 시험관 내 또는 생체 내 스크리닝을 위해 사용될 수 있다.

[0438] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 예를 들어 면역독소 또는 방사성 표지 방법을 통해 CD4 기능을 방해하거나, CD4 발현 세포를 고갈시키거나, CD4+ 세포 성장 및/또는 증식을 방해함으로써 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 류마티스성 관절염, (자가)면역 및 염증성 질환 (IL-8 관련 질병 및 질환에 대해 상기 설명한 바와 같은), 피부 T 세포 림프종, 비-피부 T 세포 림프종, 림프계 신생물, 악성 종양 및 혈액학적 질환, 감염성 질병, 및 결합, 신경, 위장관, 간, 알레르기성, 혈액, 피부, 폐, 악성, 내분비, 혈관, 감염성, 신장, 심장, 순환, 대사, 뼈, 및 근육 질환, 및 면역 매개 혈구감소증일 수 있다.

[0439] 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 CD4에 대해 작용한다. 상기 1가 항체는 또한 샘플 또는 환자에서 CD4에 대한 시험관 내 또는 생체 내 스크리닝을 위해 사용될 수 있다.

[0440] 본 발명의 한 실시태양에서, CD4에 대해 작용하는 1가 항체는 HIV 감염의 치료, 또는 AIDS 치료를 위해 사용된다.

[0441] 본 발명의 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 WO97/13852에 개시된 CD4 항체의 1가 항체이다.

[0442] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 CD28 기능의 길항 및/또는 억제, 예를 들어 T 세포 활성화에 필요한 동시 자극 시그날의 억제에 의해 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은, 예를 들어 상기 언급한 염증성, 자가면역 및 면역 질환일 수 있다. 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 CD28에 대해 작용한다.

[0443] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 조직 인자 기능의 변경, 예를 들어 응고의 변경 또는 조직 인자 시그날 전달의 억제에 의해 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 혈관 질병, 예를 들어 심근 혈관 질병, 뇌혈관 질병, 망막병증 및 황반 변성, 및 상기 나타낸 바와 같은 염증성 질환일 수 있다.

[0444] 본 발명의 한 실시태양에서, 1가 항체는 조직 인자에 대해 또는 인자 VII과 조직 인자의 복합체에 대해 작용한다.

[0445] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 C형 간염 바이러스 (HCV) 감염을 방해함으로써 치료가능하다. 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 HCV 또는 HCV 수용체, 예를 들어 CD81에 대해 작용한다.

[0446] 본 발명의 한 실시태양에서, 1가 항체는 WO2000/05266에 개시된 항체의 본 발명에 따른 1가 항체이다.

[0447] 본 발명의 한 실시태양에서, 치료할 질병 또는 질환은 IgE-감수성 (sensitized) 비만 세포에 대한 알레르겐의 결합을 방지함으로써 치료가능하다. 한 실시태양에서, 상기 질병 또는 질환은 예를 들어 알레르기성 질병, 예를 들어 천식, 알레르기성 비염, 계절성/통년성 알레르기, 고초열, 비내 알레르기, 아토피성 피부염, 습진, 두드러기, 두드러기, 접촉성 알레르기, 알레르기성 결막염, 눈 알레르기, 식품 및 약물 알레르기, 라텍스 알레르기, 및 곤충 알레르기일 수 있다.

[0448] 상기 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체(들)은 알레르겐(들)에 대해 작용하는 IgG4 힌지가 없는 항체이다.

[0449] 특정 실시태양에서, 세포독성제와 컨쥬게이팅된 1가 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트가 환자에게 투여된다. 일부 실시태양에서, 면역컨쥬게이트 및/또는 면역컨쥬게이트가 결합된 항원은 세포에 의해 내재화되고, 이에 따라 면역컨쥬게이트가 결합된 표적 세포를 치사시키는 면역컨쥬게이트의 치료 효능이 증가된다. 한 실시태양에서, 세포독성제는 표적 세포 내의 핵산을 표적으로 하거나 이 핵산을 방해한다.

[0450] 상기 세포독성제의 예는 본원에서 제시된 임의의 화학치료제 (예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신), 방사성 동위원소, 또는 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 포함한다.

[0451] 한 실시태양에서, 항원은 인간 단백질 분자이고, 대상은 인간 대상이다. 한 실시태양에서, 대상은 본 발명의

항체가 결합하는 항원을 발현하는 비-인간 포유동물일 수 있다. 한 실시태양에서, 대상은 항원이 그 내부에 도입된 (예를 들어 항원의 투여 또는 항원 도입유전자의 발현에 의해) 포유동물일 수 있다. 또한, 본 발명의 1가 항체는 수의학적 목적을 위해 또는 인간 질병의 동물 모델로서 면역글로불린이 그와 함께 교차반응하는 비-인간 포유동물 (예를 들어 영장류, 돼지 또는 마우스)에게 투여될 수 있다. 후자의 경우에, 상기 동물 모델은 본 발명의 항체의 치료 효능의 평가 (예를 들어 투여량 및 투여 시간 경로)에 유용할 수 있다.

[0452] 본 발명의 1가 항체는 단독으로 또는 다른 조성물과 조합되어 요법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 1가 항체는 치료할 질병 또는 병태에 따라 하나 이상의 다른 항체, 예를 들어 본 발명의 1가 항체, 하나 이상의 화학치료제(들) (화학치료제들의 칵테일 (cocktail) 포함), 하나 이상의 다른 세포독성제(들), 하나 이상의 항-혈관형성제(들), 하나 이상의 시토킨, 하나 이상의 성장 억제제(들), 하나 이상의 소염제(들), 하나 이상의 질병 변경 항류마티스 약물(들) (DMARD), 또는 하나 이상의 면역억제제(들)과 함께 동시에 투여될 수 있다. 본 발명의 1가 항체가 종양 성장을 억제하는 경우에, 항체를 종양 성장을 억제하는 하나 이상의 다른 치료제(들)과 조합하는 것이 특히 바람직할 수 있다. 예를 들어, VEGF 활성을 차단하는 항-VEGF 항체는 전이성 유방암의 치료시에 항-ErbB 항체 (예를 들어 트라추주맙 (Herceptin), 항-HER2 항체)와 조합될 수 있다. 별법으로, 또는 추가로, 환자에게 조합 방사선 조사 요법 (예를 들어 외부 방사선 조사 또는 방사성 표지된 물질, 예를 들어 항체를 사용한 요법)을 시행할 수 있다. 상기한 바와 같은 조합 요법은 조합 투여 (2 이상의 물질이 동일하거나 별개의 제제에 포함됨), 및 별개의 투여를 포함하고, 이 경우에 본 발명의 항체는 보조 요법 또는 요법들의 시행 전 및/또는 후에 투여할 수 있다.

[0453] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 Her2 양성 암의 치료를 위한 1가 형태의 트라추주맙이다.

[0454] 본 발명의 1가 항체 조성물은 우수한 의료 실무에 일치하는 방식으로 제제화되고, 계량되어 투여될 수 있다. 이러한 측면에서 고려할 사항은 치료되는 특정 질환, 치료되는 특정 포유동물, 개별적인 환자의 임상 상태, 질환의 원인, 물질의 전달 부위, 투여 방법, 투여 계획, 및 의사에게 알려진 다른 인자를 포함한다. 한 실시태양에서, 1가 항체는 해당 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 하나 이상의 물질과 함께 동시에 제제화될 수 있다. 상기 다른 물질의 유효량은 제제에 존재하는 본 발명의 1가 항체의 양, 질환 또는 치료의 종류 및 상기 논의된 다른 요인에 의해 결정된다.

[0455] 본 발명의 1가 항체 (및 보조 치료제)는 임의의 적합한 수단, 예를 들어 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내, 및 국소 치료가 필요한 경우 병변내 투여에 의해 투여될 수 있다. 비경구적 주입은 근내, 정맥내, 정맥내, 복강내, 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, 1가 항체는 펄스 (pulse) 주입에 의해, 특히 감소하는 투여량의 1가 항체를 사용하여 적합하게 투여될 수 있다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사에 의해 수행할 수 있고, 이것은 부분적으로는 투여가 단기간에 이루어지는지 또는 만성적으로 이루어지는지에 따라 결정된다.

[0456] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 1가 항체 (단독으로 또는 다른 물질, 예를 들어 화학치료제와 조합하여 사용시에)의 적절한 투여량은 치료할 질병의 종류, 항체의 종류, 질병의 심도 및 경로, 1가 항체가 예방, 치료 또는 진단 목적으로 투여되는지의 여부, 이전에 시행된 요법, 환자 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 의사의 판단에 따라 결정될 것이다. 1가 항체는 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여될 수 있다.

[0457] 상기 투여량은 간헐적으로, 예를 들어 1주마다 또는 3주마다 (예를 들어 환자에게 약 2 내지 약 20회, 예를 들어 약 6회 용량의 1가 항체를 투여하도록) 투여될 수 있다. 초기의 보다 높은 로딩 투여량을, 이어서 하나 이상의 보다 낮은 투여량을 투여할 수 있다. 예시적인 투여 요법은 약 4 mg/kg의 초기 투여량, 이어서 약 2 mg/kg의 1주 유지 투여량의 1가 항체의 투여를 포함한다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 50 mg 내지 4000 mg, 예를 들어 250 mg 내지 2000 mg, 예를 들어 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg 또는 2000 mg의 1주 투여량으로, 8회 이하, 예를 들어 4 내지 6회 투여된다. 1주 투여량은 2 또는 3회의 하위 투여량으로 분할되어 2일 이상에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, 300 mg의 투여량은 1일차에 100 mg, 2일차에 200 mg으로 2일에 걸쳐 투여될 수 있다. 500 mg의 투여량은 1일차에 100 mg, 2일차에 200 mg, 3일차에 200 mg으로 3일에 걸쳐 투여될 수 있고, 700 mg의 투여량은 1일차에 100 mg, 2일차에 300 mg, 3일차에 300 mg으로 3일에 걸쳐 투여될 수 있다. 요법은 필요한 경우, 예를 들어 6개월 또는 12개월 후에 1회 이상 반복될 수 있다.

[0458] 투여량은 예를 들어 본 발명의 1가 항체를 표적으로 하는 항-개별특이형 항체를 사용하여 생물학적 샘플에 투여시에 순환하는 본 발명의 1가 항체의 양을 측정하여 결정하거나 조정할 수 있다. 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 유지 요법에 의해, 예를 들어 6개월 이상의 기간 동안 1주 1회 투여될 수 있다.

[0459] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 본 발명의 1가 항체의 1회 주입, 이어서 방사성 동위원소에 컨쥬게이팅된 동일한 1가 항체의 주입을 포함하는 요법에 의해 투여될 수 있다. 요법은 예를 들어 7 내지 9일 후에 반복될 수 있다.

[0460] 상기 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 모니터링될 수 있다.

[0461] 본 발명은 상기 기재된 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품을 제공한다. 본 발명의 제조품은 용기 및 용기 위의 또는 용기와 연합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 조성물을 단독으로 보유하거나 또는 질환을 치료하고/하거나, 예방하고/하거나 진단하는데 효과적인 다른 조성물과 조합된 상태로 보유하고, 멸균 유입 포트가 존재할 수 있다 (예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘이 관통할 수 있는 마개가 존재하는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 1가 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택 질환, 예를 들어 암의 치료에 사용됨을 나타낸다. 또한, 제조품은 (a) 본 발명의 1가 항체를 포함하는 조성물이 존재하는 제1 용기; 및 (b) 추가의 세포독성제를 포함하는 조성물이 존재하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 실시태양에서의 제조품은 제1 및 제2 조성물이 특정 병태, 예를 들어 암 치료에 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 별법으로, 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 버퍼, 예를 들어 주사용 정균수 (BWFI), 인산염 완충 염수, 링거 용액 및 덱스트로스 용액이 존재하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제조품은 다른 버퍼, 희석제, 필터, 바늘, 및 주사기를 포함하여 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0462] 하나 이상의 본 발명의 1가 항체를 포함하는 본 발명의 제약 조성물 및 사용설명서를 포함하는 키트가 본 발명의 범위에 포함된다. 키트는 하나 이상의 추가의 물질, 예를 들어 치료할 질병 또는 질환에 따라 면역억제 시약, 세포독성제 또는 방사선독제, 또는 하나 이상의 추가의 본 발명의 1가 항체 (예를 들어 보완적인 활성을 갖는 1가 항체)를 추가로 포함할 수 있다.

[0463] 한 실시태양에서, 본 발명은 항체 또는 그의 일부와 특이적 항원 사이의 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에서 샘플 및 대조 샘플을 상기 항원에 특이적으로 결합하는 1가 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 샘플에서 1가 항체가 결합하는 특이적 항원의 존재를 검출하는 방법, 또는 상기 특이적 항원의 양을 측정하는 방법을 제공한다. 이어서, 복합체의 형성이 검출되고, 여기서 대조군 샘플과 비교할 때 샘플에서 상이한 복합체 형성은 샘플에 상기 항원이 존재함을 나타낸다.

[0464] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 1가 항체가 결합하는 순환하는 특이적 항원의 수준, 또는 상기 특이적 항원을 그의 막 표면에 포함하는 세포의 수준을 검출하기 위해 사용될 수 있고, 상기 수준은 특정 질병 증상에 연결시킬 수 있다. 별법으로, 항체는 상기 항원을 발현하는 세포의 기능을 고갈시키거나 상호작용하기 위해 사용될 수 있고, 이에 의해 상기 세포를 중요한 질병 매개자로서 관련시킬 수 있다. 이것은 항체와 상기 특이적 항원 사이에 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에서 샘플 및 대조 샘플을 1가 항체와 접촉시킴으로써 달성할 수 있다. 항체와 상기 항원 사이에 형성된 임의의 복합체를 검출하여 샘플 및 대조군에서 비교한다.

[0465] 한 실시태양에서, 본 발명은 1가 항체가 결합하는 특이적 항원을 발현하는 세포존재를 검출하거나, 세포의 양을 생체 내에서 또는 시험관 내에서 정량하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 검출가능한 마커에 컨쥬게이팅된 본 발명의 1가 항체를 대상에게 투여하고; (ii) 상기 항원을 발현하는 세포를 포함하는 영역을 확인하기 위해 상기 검출가능한 마커를 검출하기 위한 수단에 대상을 노출시키는 것을 포함한다.

[0466] 한 실시태양에서, 본 발명의 1가 항체는 표적 화합물 (예를 들어 치료제, 표지, 세포독소, 방사성 독소 면역억제제 등)을 1가 항체에 연결시킴으로써 표적 화합물을 1가 항체가 결합하는, 세포의 표면에 발현된 특이적 항원을 갖는 세포에 대해 표적화시키기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 상기 항원을 발현하는 세포, 예를 들어 Reed-Sternberg 세포를 생체 외에서 또는 시험관 내에서 (예를 들어 검출가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소, 형광성 화합물, 효소, 또는 효소 보조인자를 사용하여) 국재화시키는 방법을 제공한다.

[0467] 다음은 본 발명의 선택된 실시태양을 나열한 것이다.

[0468] 실시태양 1:

[0469] i) 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 Ig의 불변 C_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 선택

된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 상기 Ig의 C_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 함께 작동가능하게 연결되고, IgG1 서브타입의 경우에, C_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 C_L 영역이, C_L 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디술파이드 결합 또는 공유 결합을 형성할 수 있는 임의의 아미노산을 포함하지 않도록 변형되고;

[0470] ii) 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 Ig의 불변 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 힌지 영역에 대응하는 영역 및 Ig 서브타입에서 요구되는 바에 따라 C_H 영역의 다른 영역, 예를 들어 C_H3 영역이, 인간 Ig의 C_H 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디술파이드 결합 또는 공유 또는 비-공유 중쇄간 결합의 형성에 참여하는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형되고, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 상기 Ig의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 함께 작동가능하게 연결되고;

[0471] iii) 1가 항체를 생산하기 위한 세포 발현계를 제공하고;

[0472] iv) (i) 및 (ii)의 핵산 구성체를 (iii)의 세포 발현계의 세포에서 동시 발현시켜 1가 항체를 생산하는 것

[0473] 을 포함하는, 1가 항체를 생산하는 방법.

[0474] 실시태양 2: 실시태양 1에 있어서, 인간 Ig가 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgA 또는 IgD 항체, 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG4 항체인 방법.

[0475] 실시태양 3: 실시태양 1에 있어서, 인간 Ig가 서열 19에 제시된 아미노산 C_H 영역을 갖는 IgG1이고, C_H3 영역이, 위치 238에서 Arg (R)이 Gln (Q)으로 교체되고; 위치 239에서 Asp (D)가 Glu (E)로 교체되고; 위치 292에서 Lys (K)가 Arg (R)로 교체되고; 위치 302에서 Gln (Q)가 Glu (E)로 교체되고; 위치 328에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체되는 아미노산 치환 중 하나 이상이 이루어지도록 변형되는 것인 방법.

[0476] 실시태양 4: 실시태양 3에 있어서, 위치 238에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체된 것인 방법.

[0477] 실시태양 5: 실시태양 3에 있어서, 위치 238에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체되고, 위치 328에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체된 것인 방법.

[0478] 실시태양 6: 실시태양 3에 있어서, 5개의 치환이 모두 이루어지는 것인 방법.

[0479] 실시태양 7: 실시태양 1 또는 3에 있어서, 인간 Ig가 IgG1이고, C_L 영역이 서열 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 카파 경쇄 C_L이고, C_L 영역이, 위치 106에서 말단 시스테인 잔기가 또다른 아미노산 잔기로 교체되거나 결실되도록 변형된 방법. 한 실시태양에서, 말단 시스테인 잔기는 결실된다.

[0480] 실시태양 8: 실시태양 1 또는 3에 있어서, 인간 Ig가 IgG1이고, C_L 영역이 서열 17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 람다 경쇄 C_L이고, C_L 영역이, 위치 104에서 시스테인 잔기가 또다른 아미노산 잔기로 교체되거나 결실되도록 변형된 방법. 한 실시태양에서, 시스테인 잔기가 결실된다.

[0481] 실시태양 9: 실시태양 1, 3, 7 또는 8에 있어서, 인간 Ig가 서열 19에 제시된 아미노산 C_H 영역을 갖는 IgG1이고, C_H1 영역이, 위치 14에서 Ser (S)이 시스테인 잔기로 교체되도록 변형된 방법.

[0482] 실시태양 10: 실시태양 1에 있어서, 인간 Ig가 서열 20에 제시된 아미노산 C_H 영역을 갖는 IgG2이고, C_H3 영역이, 위치 234에서 Arg (R)가 Gln (Q)로 교체되고; 위치 276에서 Met (M)이 Val (V)로 교체되고; 위치 288에서 Lys (K)가 Arg (R)로 교체되고; 위치 298에서 Gln (Q)가 Glu (E)로 교체되고; 위치 324에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체되는 아미노산 치환 중 하나 이상이 이루어지도록 변형된 방법.

[0483] 실시태양 11: 실시태양 10에 있어서, 위치 234에서 Arg (R)가 Gln (Q)로 교체된 것인 방법.

[0484] 실시태양 12: 실시태양 10에 있어서, 위치 234에서 Arg (R)가 Gln (Q)로 교체되고; 위치 324에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체되는 것인 방법.

[0485] 실시태양 13: 실시태양 10에 있어서, 5개의 치환이 모두 이루어지는 것인 방법.

[0486] 실시태양 14: 실시태양 1에 있어서, 인간 Ig가 서열 21에 제시된 아미노산 C_H 영역을 갖는 IgG3이고, C_H3 영역이, 위치 285에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체되고; 위치 314에서 Ser (S)가 Asn (N)으로 교체되고; 위치 322에서 Asn (N)이 Lys (K)로 교체되고; 위치 327에서 Met (M)이 Val (V)로 교체되고; 위치 339에서 Lys (K)가 Arg (R)로 교체되고; 위치 349에서 Gln (Q)가 Glu (E)로 교체되고; 위치 352에서 Ile (I)이 Val (V)로 교체되고; 위치 365에서 Arg (R)이 His (H)로 교체되고; 위치 366에서 Phe (F)가 Tyr (Y)로 교체되고; 위치 375에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체되는 아미노산 치환 중 하나 이상이 이루어지도록 변형된 방법.

[0487] 실시태양 15: 실시태양 14에 있어서, 위치 285에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체된 것인 방법.

[0488] 실시태양 16: 실시태양 14에 있어서, 위치 285에서 Arg (R)이 Gln (Q)로 교체되고; 위치 375에서 Pro (P)가 Leu (L)로 교체된 것인 방법.

[0489] 실시태양 17: 실시태양 14에 있어서, 10개의 치환이 모두 이루어지는 것인 방법.

[0490] 실시태양 18:

[0491] i) 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 Ig의 불변 (C_L) 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 상기 Ig의 C_L 영역을 코딩하는 핵산 서열이 함께 작동가능하게 연결되고;

[0492] ii) 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산을 포함하고, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 중쇄의 힌지 영역에 대응하는 영역이 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형되고, 상기 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산 및 상기 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산이 함께 작동가능하게 연결되고;

[0493] iii) 상기 항체를 생산하기 위한 세포 발현계를 제공하고;

[0494] iv) (i) 및 (ii)의 핵산 구성체를 (iii)의 세포 발현계의 세포에서 동시 발현시켜 상기 1가 항체를 생산하는 것

[0495] 을 포함하는, 1가 항체를 생산하는 방법.

[0496] 실시태양 19: 실시태양 1 내지 18 중 어느 한 실시태양에 있어서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 중쇄의 힌지 영역에 대응하는 영역이 임의의 시스테인 잔기를 포함하지 않도록 변형된 것인 방법.

[0497] 실시태양 20: 실시태양 1 내지 19 중 어느 한 실시태양에 있어서, 생산된 1가 항체가 인간 항체인 방법.

[0498] 실시태양 21: 실시태양 1 내지 20 중 어느 한 실시태양에 있어서, 생산된 1가 항체가 합성 항원 (Tyr, Glu)-Ala-Lys에 결합하지 않는 것인 방법.

[0499] 실시태양 22: 실시태양 1 내지 21 중 어느 한 실시태양에 있어서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 임의의 시스테인 잔기를 포함하여 힌지 영역에 대응하는 영역의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 결실되고/되거나 다른 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된 것인 방법.

[0500] 실시태양 23: 실시태양 22에 있어서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 힌지 영역의 시스테인 잔기가 비하전 극성 측쇄, 또는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된 것인 방법.

[0501] 실시태양 24: 실시태양 22 또는 23에 있어서, 비하전 극성 측쇄를 갖는 아미노산이 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 트립토판으로부터 독립적으로 선택되고, 비극성 측쇄를 갖는 아미노산이 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌으로부터 독립적으로 선택되는 것인 방법.

[0502] 실시태양 25: 실시태양 22에 있어서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 중쇄가 IgG4 C_H 영역을 포함하도록 변형되고, 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산이 결실된 것인 방법.

[0503] 실시태양 26: 실시태양 22 또는 실시태양 25에 있어서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 중쇄가 IgG4 C_H 영역을 포함하도록 변형되고, 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 내지 109에 대응하는 아미노산이 결실된 것인 방법.

[0504] 실시태양 27: 실시태양 22 내지 26 중 어느 한 실시태양에 있어서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 중쇄가 C_H 영역을 포함하도록 변형되고, 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 99 내지 110에 대응하는 아미노산 잔기가 결실된 것인 방법.

[0505] 실시태양 28: 실시태양 22 내지 27 중 어느 한 실시태양에 있어서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 전체 힌지 영역이 결실되도록 변형된 것인 방법.

[0506] 실시태양 29: 실시태양 1 내지 28 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체가 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 힌지 영역을 코딩하는 핵산 서열의 스플라이스 공여자 부위의 적어도 하나의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 것인 방법.

[0507] 실시태양 30: 실시태양 29에 있어서, 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체가 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 서열 13의 서열의 위치 714 및 722의 뉴클레오티드에 대응하는 뉴클레오티드가 서열 13에서 그 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드로 치환된 것인 방법.

[0508] 실시태양 31: 실시태양 30에 있어서, 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체가 서열 13의 서열을 포함하는 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 서열 13의 서열의 위치 714 및 722가 서열 13에서 그 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드로 치환된 것인 방법.

[0509] 실시태양 32: 실시태양 31에 있어서, 상기 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체가 서열 15의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

[0510] 실시태양 33: 실시태양 22에 있어서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이, 중쇄가 C_H 영역을 포함하도록 변형되고, 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산 잔기가 시스테인과 상이한 아미노산 잔기로 치환된 것인 방법.

[0511] 실시태양 34: 실시태양 29 내지 33 중 어느 한 실시태양에 있어서, C_H 영역의 힌지 영역을 코딩하는 핵산 서열의 치환된 뉴클레오티드가 부위 지정 돌연변이 유발을 사용하여 치환되는 것인 방법.

[0512] 실시태양 35: 실시태양 1 내지 34 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체가 인간 IgG의 카파 사슬의 C_L 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

[0513] 실시태양 36: 실시태양 35에 있어서, 핵산 구성체가 서열 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

[0514] 실시태양 37: 실시태양 1 내지 34 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체가 인간 IgG의 람다 사슬의 C_L 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

[0515] 실시태양 38: 실시태양 37에 있어서, 핵산 구성체가 서열 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

[0516] 실시태양 39: 실시태양 1 내지 38 중 어느 한 실시태양에 있어서, 핵산 구성체가 DNA 구성체인 방법.

[0517] 실시태양 40: 실시태양 1 내지 39 중 어느 한 실시태양에 있어서, (i), (ii), (iii) 및/또는 (iv)의 핵산 구성체가 원핵세포 발현 벡터인 방법.

[0518] 실시태양 41: 실시태양 1 내지 40 중 어느 한 실시태양에 있어서, 세포 발현계가 원핵 세포 발현계인 방법.

[0519] 실시태양 42: 실시태양 41, 원핵 세포 발현계가 이. 콜라이 세포를 포함하는 것인 방법.

[0520] 실시태양 43: 실시태양 42에 있어서, 이. 콜라이 세포가 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주인 방법.

[0521] 실시태양 44: 실시태양 1 내지 39 중 어느 한 실시태양에 있어서, (i), (ii), (iii) 및/또는 (iv)의 핵산 구성체가 진핵세포 발현 벡터인 방법.

[0522] 실시태양 45: 실시태양 44에 있어서, 세포 발현계가 진핵 세포 발현계인 방법.

[0523] 실시태양 46: 실시태양 45에 있어서, 세포 발현계가 포유동물 세포 발현계인 방법.

[0524] 실시태양 47: 실시태양 46에 있어서, 포유동물 세포 발현계가 CHO 세포를 포함하는 것인 방법.

[0525] 실시태양 48: 실시태양 46에 있어서, 포유동물 세포 발현계가 HEK-293F 세포를 포함하는 것인 방법.

[0526] 실시태양 49: 실시태양 1 내지 39 중 어느 한 실시태양에 있어서, 발현계의 i) 및 ii)가 유전자 요법에 적합한 DNA 구성체를 포함하는 것인 방법.

[0527] 실시태양 50: 실시태양 1-39 중 어느 한 실시태양에 있어서, 발현계의 i) 및 ii)가 유전자 요법에 적합한 바이러스 구성체인 방법.

[0528] 실시태양 51: 실시태양 1-39 중 어느 한 실시태양에 있어서, 포유동물 세포 발현계의 iii)이 i) 및 ii)를 포함하는 인간 세포이고, 생산된 1가 항체를 사용한 요법을 필요로 하는 환자에게 이식하기에 적합한 것인 방법.

[0529] 실시태양 52: 실시태양 51에 있어서, 인간 세포가 환자로부터 유래하는 것인 방법.

[0530] 실시태양 53: 실시태양 1 내지 51 중 어느 한 실시태양에 있어서, 생산된 1가 항체가 제약 용도를 위한 것인 방법.

[0531] 실시태양 53a: 실시태양 1-53 중 어느 한 실시태양에 있어서, i) 및 ii)의 핵산 구성체가 동일한 플라스미드에 존재하는 것인 방법.

[0532] 실시태양 53b: 실시태양 1-53 중 어느 한 실시태양에 있어서, 항체가 2가지의 상이한 세포주에서 생산되고, 항체가 시험관 내에서 발현 후에 조립되는 것인 방법.

[0533] 실시태양 54: 실시태양 1 내지 50 및 53 중 어느 한 실시태양에 따른 방법의 사용에 의해 얻은 1가 항체.

[0534] 실시태양 55: 실시태양 1 내지 50 및 53 중 어느 한 실시태양에 따른 방법의 사용에 의해 얻을 수 있는 1가 항체.

[0535] 실시태양 56: 경쇄 및 중쇄를 포함하는 1가 항체로서,

[0536] a) 상기 경쇄는 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_L) 영역의 아미노산 서열 및 Ig의 불변 (C_L) 영역의 아미노산 서열을 포함하고, IgG1 서브타입의 경우에, 불변 (C_L) 영역의 아미노산 서열은 이 서열이 Ig의 불변 (C_L) 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디술파이드 결합 또는 공유 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산을 포함하지 않도록 변형되고,

[0537] b) 상기 중쇄는 상기 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_H) 영역의 아미노산 서열 및 인간 Ig의 불변 (C_H) 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 불변 (C_H) 영역의 아미노산 서열은, 힌지 영역 및 Ig 서브타입에 의해 요구되는 바에 따라 C_H 영역의 다른 영역, 예를 들어 C_H3 영역이, 인간 Ig의 불변 (C_H) 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디술파이드 결합 또는 공유 또는 비-공유 중쇄간 결합의 형성에 참여하는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형되는 것인 1가 항체.

[0538] 실시태양 57: 실시태양 56에 있어서, 인간 Ig이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgGA 항체, 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG4 항체인 1가 항체.

[0539] 실시태양 58: 경쇄 및 중쇄를 포함하는 1가 항체로서,

[0540] a) 상기 경쇄가 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_L) 영역의 아미노산 서열 및 Ig의 불변 (C_L) 영역의 아미노산 서열을 포함하고,

[0541] b) 상기 중쇄는 상기 선택된 항원 특이적 항체의 가변 (V_H) 영역의 아미노산 서열 및 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄의 아미노산 서열은 힌지 영역에 대응하는 영역에 존재하는 임의의 아미노산 잔기도 인간 IgG4의 불변 (C_H) 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 없도록 변형되는 것인 1가 항체.

[0542] 실시태양 59: 실시태양 54 내지 58 중 어느 한 실시태양에 있어서, C_L 영역이 인간 IgG의 카파 경쇄의 불변 영역인 1가 항체.

[0543] 실시태양 60: 실시태양 59에 있어서, C_L 영역이 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인 1가 항체.

[0544] 실시태양 61: 실시태양 54 내지 58 중 어느 한 실시태양에 있어서, C_L 영역이 인간 IgG의 람다 경쇄의 불변 영역인 1가 항체.

[0545] 실시태양 62: 실시태양 61에 있어서, C_L 영역이 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인 1가 항체.

[0546] 실시태양 63: 실시태양 54 내지 62 중 어느 한 실시태양에 있어서, 경쇄 및 중쇄가 하나 이상의 디술파이드 결합을 통해 서로 연결되는 것인 1가 항체.

[0547] 실시태양 64: 실시태양 54 내지 63 중 어느 한 실시태양에 있어서, 경쇄 및 중쇄가 아미드 결합을 통해 서로 연결되는 것인 1가 항체.

[0548] 실시태양 65: 실시태양 54 내지 64 중 어느 한 실시태양에 있어서, 중쇄의 아미노산 서열이, 힌지 영역에 대응하는 영역이 임의의 시스테인 잔기를 포함하지 않도록 변형된 것인 1가 항체.

[0549] 실시태양 66: 실시태양 54 내지 65 중 어느 한 실시태양에 있어서, 중쇄의 아미노산 서열이, 임의의 시스테인 잔기를 포함하여 힌지 영역에 대응하는 영역의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 결실되고/되거나 다른 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된 것인 1가 항체.

[0550] 실시태양 67: 실시태양 54 내지 66 중 어느 한 실시태양에 있어서, 힌지 영역의 시스테인 잔기가 비하전 극성 측쇄, 또는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되는 것인 1가 항체.

[0551] 실시태양 68: 실시태양 67에 있어서, 비하전 극성 측쇄를 갖는 아미노산이 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 트립토판으로부터 독립적으로 선택되고, 비극성 측쇄를 갖는 아미노산이 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌으로부터 독립적으로 선택되는 것인 1가 항체.

[0552] 실시태양 69: 실시태양 68에 있어서, 중쇄의 아미노산 서열이, 중쇄가 C_H 영역을 포함하도록 변형되고, 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산이 결실된 것인 1가 항체.

[0553] 실시태양 70: 실시태양 66 또는 실시태양 69에 있어서, 중쇄의 아미노산 서열이, 중쇄가 IgG4 C_H 영역을 포함하도록 변형되고, 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 내지 109에 대응하는 아미노산 잔기가 결실된 것인 1가 항체.

[0554] 실시태양 71: 실시태양 66 내지 70 중 어느 한 실시태양에 있어서, 중쇄의 아미노산 서열이, 중쇄가 IgG4 C_H 영역을 포함하도록 변형되고, 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 99 내지 110에 대응하는 아미노산 잔기가 결실된 것인 1가 항체.

[0555] 실시태양 72: 실시태양 66 내지 71 중 어느 한 실시태양에 있어서, 전체 힌지 영역이 결실된 것인 1가 항체.

[0556] 실시태양 73: 실시태양 66 내지 72 중 어느 한 실시태양에 있어서, 중쇄가 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 것인 1가 항체.

[0557] 실시태양 74: 실시태양 66에 있어서, 중쇄의 아미노산 서열이, 중쇄가 IgG4 C_H 영역을 포함하도록 변형되고, 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산 잔기가 시스테인과 상이한 아미노산 잔기로 치환된 것인 1가 항체.

[0558] 실시태양 75: 실시태양 66에 있어서, 중쇄의 아미노산 서열이, 중쇄가 C_H 영역을 포함하도록 변형되고, 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산 잔기의 하나가 시스테인과 상이한 아미노산 잔기, 예를 들어 실시태양 67 또는 68에 개시된 아미노산 잔기로 치환되고, 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 다른 아미노산 잔기가 결실된 것인 1가 항체.

[0559] 실시태양 76: 실시태양 75에 있어서, 아미노산 잔기 106에 대응하는 아미노산 잔기가 시스테인과 상이한 아미노산 잔기, 예를 들어 실시태양 67 또는 68에 개시된 아미노산 잔기로 치환되고, 아미노산 잔기 109에 대응하는 아미노산 잔기가 결실된 것인 1가 항체.

[0560] 실시태양 77: 실시태양 75에 있어서, 아미노산 잔기 106에 대응하는 아미노산 잔기가 결실되고, 아미노산 잔기 109에 대응하는 아미노산 잔기가 시스테인과 상이한 아미노산 잔기, 예를 들어 실시태양 67 또는 68에 개시된

아미노산 잔기로 치환된 것인 1가 항체.

[0561] 실시태양 78: 실시태양 54 내지 77 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 항체가 시험관 내에서 세포 발현계에서의 항체의 재조합 발현을 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있는 것인 1가 항체.

[0562] 실시태양 79: 실시태양 78에 있어서, 방법이

[0563] i) 상기 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 IgG의 C_L 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고,

[0564] ii) 상기 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 힌지 영역에 대응하는 영역이 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형되고,

[0565] iii) 상기 1가 항체를 생산하기 위한 세포 발현계를 제공하고;

[0566] iv) (iii)의 세포 발현계의 세포에서 상기 핵산 구성체를 동시 발현시켜 (i)의 핵산 구성체에 의해 코딩되는 경쇄 및 (ii)의 핵산 구성체에 의해 코딩되는 중쇄를 포함하는 상기 1가 항체를 생산하는 것

[0567] 을 포함하는 것인 1가 항체.

[0568] 실시태양 80: 실시태양 79에 있어서, 인간 Ig가 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgGA 항체, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG4 항체인 1가 항체.

[0569] 실시태양 81: 실시태양 78에 있어서, 방법이

[0570] i) 상기 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 IgG의 C_L 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고,

[0571] ii) 상기 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구성체를 제공하고, 여기서 상기 구성체는 선택된 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 힌지 영역에 대응하는 영역이 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형되고,

[0572] iii) 상기 1가 항체를 생산하기 위한 세포 발현계를 제공하고;

[0573] iv) (iii)의 세포 발현계의 세포에서 상기 핵산 구성체를 동시 발현시켜 (i)의 핵산 구성체에 의해 코딩되는 경쇄 및 (ii)의 핵산 구성체에 의해 코딩되는 중쇄를 포함하는 상기 1가 항체를 생산하는 것

[0574] 을 포함하는 것인 1가 항체.

[0575] 실시태양 82: 실시태양 54 내지 81 중 어느 한 실시태양에 있어서, 4 mg/kg의 투여량으로 생체 내에 투여될 때 1가 항체의 혈장 농도가 7일 초과의 기간 동안 10 ㎍/ml를 초과하는 것인 1가 항체.

[0576] 실시태양 83: 실시태양 82에 있어서, SCID 마우스에서 4 mg/kg의 투여량으로 생체 내에 투여될 때 1가 항체의 혈장 농도가 7일 초과의 기간 동안 10 ㎍/ml를 초과하는 것인 1가 항체.

[0577] 실시태양 84: 실시태양 54 내지 83 중 어느 한 실시태양에 있어서, 1가 항체의 혈장 소실이 $F(ab')_2$ 단편의 혈장 소실보다 10배 초과의 속도로 더 느린 1가 항체.

[0578] 실시태양 85: 실시태양 84에 있어서, $F(ab')_2$ 단편의 서열이 1가 항체의 대응하는 영역의 서열과 동일한 것인 1가 항체.

[0579] 실시태양 86: 실시태양 84에 있어서, 혈장 소실이 SCID 마우스를 사용하여 측정되는 것인 1가 항체.

[0580] 실시태양 87: 실시태양 86에 있어서, $F(ab')_2$ 단편의 V_H 영역 및 V_L 영역이 1가 항체의 V_H 영역 및 V_L 영역과 동일한 것인 1가 항체.

[0581] 실시태양 88: 실시태양 54 내지 87 중 어느 한 실시태양에 있어서, 생체내 투여될 때 상기 1가 항체의 반감기가

적어도 5일인 1가 항체.

[0582] 실시태양 89: 실시태양 54 내지 87 중 어느 한 실시태양에 있어서, 생체내 투여될 때 상기 1가 항체의 반감기가 적어도 5일 내지 21일 이내인 1가 항체.

[0583] 실시태양 90: 실시태양 54 내지 87 중 어느 한 실시태양에 있어서, 생체내 투여될 때 상기 1가 항체의 반감기가 적어도 5일 내지 14일 이내인 1가 항체.

[0584] 실시태양 91: 실시태양 54 내지 87 중 어느 한 실시태양에 있어서, 생체내 투여될 때 상기 1가 항체의 반감기가 적어도 14일인 1가 항체.

[0585] 실시태양 92: 실시태양 54 내지 87 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 1가 항체의 반감기가 적어도 21일인 1가 항체.

[0586] 실시태양 93: 실시태양 88에 있어서, SCID 마우스에서 생체내 투여될 때 상기 1가 항체의 반감기가 적어도 5일인 1가 항체.

[0587] 실시태양 94: 실시태양 54 내지 93 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 항체가 FcRn에 결합할 수 있는 것인 1가 항체.

[0588] 실시태양 95: 실시태양 54 내지 94 중 어느 한 실시태양에 있어서, 종양 항원에 특이적으로 결합하는 1가 항체.

[0589] 실시태양 96: 실시태양 54 내지 95 중 어느 한 실시태양에 있어서, 수용체 이량체화시에 활성화되는 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 1가 항체.

[0590] 실시태양 97: 실시태양 54 내지 96 중 어느 한 실시태양에 있어서, 1가 항체가 표적 분자에 결합될 때 표적 분자 다량체화 및/또는 응집을 억제하는 것인 1가 항체.

[0591] 실시태양 98: 실시태양 54 내지 97 중 어느 한 실시태양에 있어서, 1가 항체가 VEGF, cMet, CD20, CD38, IL-8, CD25, FcαRI, FcεRI, 아세틸 콜린 수용체, fas, fasL, TRAIL, 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 조직 인자, 조직 인자와 인자 VII의 복합체, EGFr, CD4, 및 CD28로부터 선택된 표적에 결합하는 것인 1가 항체.

[0592] 실시태양 99: 실시태양 54 내지 97 중 어느 한 실시태양에 있어서, 1가 항체가 VEGF, cMet, CD20, CD38, IL-8, CD25, FcαRI, FcεRI, 아세틸 콜린 수용체, fas, fasL, TRAIL, 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 조직 인자, 조직 인자와 인자 VII의 복합체, EGFr, CD4 및 CD28로부터 선택되는 표적에 특이적으로 결합하는 것인 1가 항체.

[0593] 실시태양 100: 실시태양 56 내지 97 중 어느 한 실시태양에 있어서, 1가 IgG4 항-cMet 항체인 1가 항체.

[0594] 실시태양 101: 실시태양 54 내지 100 중 어느 한 실시태양에 있어서, 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 1가 형태인 1가 항체.

[0595] 실시태양 102: 실시태양 54 내지 100 중 어느 한 실시태양에 있어서, 인간에 투여될 때 1가 형태로 존재하는 것인 1가 항체.

[0596] 실시태양 103: 실시태양 54 내지 100 중 어느 한 실시태양에 있어서, 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 해리되어 1가 형태로 존재하는 것인 1가 항체.

[0597] 실시태양 104: 실시태양 54 내지 100 중 어느 한 실시태양에 있어서, 인간에 투여될 때 해리되어 1가 형태로 존재하는 것인 1가 항체.

[0598] 실시태양 105: 실시태양 56 내지 104 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 항체가 효과기에 결합할 수 없는 것인 1가 항체.

[0599] 실시태양 106: 실시태양 54 내지 104 중 어느 한 실시태양에 있어서, 항체가 제약 용도를 위해 제조되는 것인 1가 항체.

[0600] 실시태양 107: a) 1가 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하고,

[0601] b) 숙주 세포 배양액으로부터 1가 항체를 회수하는 것

[0602] 을 포함하는, 실시태양 54 내지 104 중 어느 한 실시태양의 1가 항체의 제조 방법.

[0603] 실시태양 108: 실시태양 107에 있어서, 상기 숙주 세포가 원핵세포인 방법.

[0604] 실시태양 109: 실시태양 108에 있어서, 숙주 세포가 이. 콜라이 세포인 방법.

[0605] 실시태양 110: 실시태양 109에 있어서, 이. 콜라이 세포가 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주인 방법.

[0606] 실시태양 111: 실시태양 107에 있어서, 상기 숙주 세포가 진핵세포인 방법.

[0607] 실시태양 112: 실시태양 111에 있어서, 숙주 세포가 HEK-293F 세포인 방법.

[0608] 실시태양 113: 실시태양 111에 있어서, 숙주 세포가 CHO 세포인 방법.

[0609] 실시태양 114: 실시태양 111에 있어서, 숙주 세포가 인간 세포인 방법.

[0610] 실시태양 115: 실시태양 107 내지 114 중 어느 한 실시태양에 있어서, 1가 항체가 배양 배지로부터 회수되는 것인 방법.

[0611] 실시태양 116: 실시태양 107 내지 114 중 어느 한 실시태양에 있어서, 1가 항체가 세포 용해물로부터 회수되는 것인 방법.

[0612] 실시태양 117: IgG4의 C_H 영역 내의 힌지 영역에 대응하는 영역이 상기 C_H 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열, 또는 그의 상보성 서열을 포함하는 펩티드와의 디술파이드 결합의 형성에 참여할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형된 IgG4의 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성체.

[0613] 실시태양 118: 실시태양 117에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 힌지 영역에 대응하는 영역이 임의의 시스테인 잔기를 포함하지 않도록 변형된 것인 핵산 구성체.

[0614] 실시태양 119: 실시태양 117 또는 실시태양 118에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 임의의 시스테인 잔기를 포함하여 힌지 영역에 대응하는 영역의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 결실되고/되거나 다른 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된 것인 핵산 구성체.

[0615] 실시태양 120: 실시태양 119에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 및 109에 대응하는 아미노산이 결실되도록 변형된 것인 핵산 구성체.

[0616] 실시태양 121: 실시태양 119 또는 실시태양 120에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106 내지 109에 대응하는 아미노산 잔기가 결실되도록 변형된 것인 핵산 구성체.

[0617] 실시태양 122: 실시태양 119 내지 121 중 어느 한 실시태양에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 적어도 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 99 내지 110에 대응하는 아미노산 잔기가 결실되도록 변형된 것인 핵산 구성체.

[0618] 실시태양 123: 실시태양 119 내지 122 중 어느 한 실시태양에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 전체 힌지 영역이 결실되도록 변형된 것인 핵산 구성체.

[0619] 실시태양 124: 실시태양 117 내지 123 중 어느 한 실시태양에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 힌지 영역을 코딩하는 핵산 서열의 스플라이스 공여자 부위의 적어도 하나의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환되도록 변형된 것인 핵산 구성체.

[0620] 실시태양 125: 실시태양 124에 있어서, 서열 13의 서열의 위치 714 및 722의 뉴클레오티드에 대응하는 뉴클레오티드가 서열 13에서 그 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드로 치환된 것인 핵산 구성체.

[0621] 실시태양 126: 실시태양 125, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이 서열 13의 서열을 포함하고, 서열 13의 서열의 위치 714 및 722가 서열 13에서 그 위치에 존재하는 뉴클레오티드와 상이한 뉴클레오티드로 치환된 것인 핵산 구성체.

[0622] 실시태양 127: 실시태양 126에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이 서열 15의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 핵산 구성체.

[0623] 실시태양 128: 실시태양 119에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이, 서열 14의 서열의 아미노산 잔기 106

및 109에 대응하는 아미노산 잔기가 시스테인과 상이한 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된 것인 핵산 구성체.

[0624] 실시태양 129: 실시태양 124 내지 128 중 어느 한 실시태양에 있어서, C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열의 치환된 뉴클레오티드가 부위 지정 돌연변이 유발을 사용하여 치환되는 것인 핵산 구성체.

[0625] 실시태양 130: 실시태양 117 내지 129 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 구성체가 항원 특이적 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열, 또는 그의 상보성 서열을 포함하는 것인 핵산 구성체.

[0626] 실시태양 131: 실시태양 130에 있어서, V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열이 C_H 영역을 코딩하는 핵산 서열, 또는 그의 상보성 서열에 작동가능하게 연결되는 것인 핵산 구성체.

[0627] 실시태양 132: 실시태양 117 내지 131 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 구성체가 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체의 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 핵산 구성체.

[0628] 실시태양 133: 실시태양 132에 있어서, 상기 구성체가 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체의 V_L 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것인 핵산 구성체.

[0629] 실시태양 134: 실시태양 133에 있어서, 상기 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체가 인간 IgG의 카파 사슬의 C_L 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 핵산 구성체.

[0630] 실시태양 135: 실시태양 134에 있어서, 핵산 구성체가 서열 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 핵산 구성체.

[0631] 실시태양 136: 실시태양 133에 있어서, 상기 1가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구성체가 인간 IgG의 람다 사슬의 C_L 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 핵산 구성체.

[0632] 실시태양 137: 실시태양 136에 있어서, 핵산 구성체가 서열 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 핵산 구성체.

[0633] 실시태양 138: 실시태양 117 내지 137 중 어느 한 실시태양에 있어서, 핵산 구성체가 DNA 구성체인 핵산 구성체.

[0634] 실시태양 139: 실시태양 117 내지 138 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 핵산 구성체가 발현 벡터인 핵산 구성체.

[0635] 실시태양 140: 실시태양 139에 있어서, 상기 발현 벡터가 원핵세포 발현 벡터인 핵산 구성체.

[0636] 실시태양 141: 실시태양 139에 있어서, 상기 발현 벡터가 진핵세포 발현 벡터인 핵산 구성체.

[0637] 실시태양 142: 실시태양 141에 있어서, 상기 발현 벡터가 포유동물 발현 벡터인 핵산 구성체.

[0638] 실시태양 143: 실시태양 142에 있어서, 상기 발현 벡터가 인간의 유전자 요법에 적합한 것인 핵산 구성체.

[0639] 실시태양 144: 실시태양 139에 있어서, 상기 발현 벡터가 인간의 유전자 요법에 적합한 바이러스 벡터인 핵산 구성체.

[0640] 실시태양 145: 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산 구성체를 포함하고, 상기 핵산 구성체가 상기 항체의 경쇄를 코딩하지 않을 경우에는 상기 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성체도 포함하는 숙주 세포를 배양하여 폴리펩티드를 발현시키고, 1가 항체를 세포 배양액으로부터 회수하는 것을 포함하는, 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체의 제조 방법.

[0641] 실시태양 146: 실시태양 145에 있어서, 1가 항체가 세포 용해물로부터 회수되는 것인 방법.

[0642] 실시태양 147: 실시태양 145에 있어서, 1가 항체가 세포 배양 배지로부터 회수되는 것인 방법.

[0643] 실시태양 148: 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체의 생산을 위한, 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산 구성체의 용도.

[0644] 실시태양 149: 실시태양 148 또는 170에 있어서, 1가 항체의 생산이 실시태양 1 내지 53 중 어느 한 실시태양에 따른 방법의 사용을 포함하는 것인 용도.

[0645] 실시태양 150: 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포.

[0646] 실시태양 151: 실시태양 150에 있어서, 숙주 세포가 원핵 세포인 숙주 세포.

[0647] 실시태양 152: 실시태양 151에 있어서, 숙주 세포가 이. 콜라이 세포인 숙주 세포.

[0648] 실시태양 153: 실시태양 150에 있어서, 숙주 세포가 진핵 세포인 숙주 세포.

[0649] 실시태양 154: 실시태양 153에 있어서, 숙주 세포가 포유동물 세포인 숙주 세포.

[0650] 실시태양 155: 실시태양 154에 있어서, 숙주 세포가 CHO 세포인 숙주 세포.

[0651] 실시태양 156: 실시태양 154에 있어서, 숙주 세포가 HEK-293F 세포인 숙주 세포.

[0652] 실시태양 157: 실시태양 154에 있어서, 숙주 세포가 인간 세포인 숙주 세포.

[0653] 실시태양 158: 실시태양 154에 있어서, 숙주 세포가 환자로부터 유도된 인간 세포인 숙주 세포.

[0654] 실시태양 159: 실시태양 154에 있어서, 숙주 세포가 환자의 인간 세포인 숙주 세포.

[0655] 실시태양 160: 실시태양 132 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포.

[0656] 실시태양 161: 실시태양 160에 있어서, 숙주 세포가 원핵 세포인 숙주 세포.

[0657] 실시태양 162: 실시태양 161에 있어서, 숙주 세포가 이. 콜라이 세포인 숙주 세포.

[0658] 실시태양 163: 실시태양 162에 있어서, 숙주 세포가 진핵 세포인 숙주 세포.

[0659] 실시태양 164: 실시태양 163에 있어서, 숙주 세포가 포유동물 세포인 숙주 세포.

[0660] 실시태양 165: 실시태양 164에 있어서, 숙주 세포가 CHO 세포인 숙주 세포.

[0661] 실시태양 166: 실시태양 164에 있어서, 숙주 세포가 HEK-293F 세포인 숙주 세포.

[0662] 실시태양 167: 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 실시태양 160 내지 166 중 어느 한 실시태양에 따른 숙주 세포를 배양하여 폴리펩티드를 발현시키고, 1가 항체를 세포 배양액으로부터 회수하는 것을 포함하는, 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체의 제조 방법.

[0663] 실시태양 168: 실시태양 167에 있어서, 1가 항체가 세포 용해물로부터 회수되는 것인 방법.

[0664] 실시태양 169: 실시태양 167에 있어서, 1가 항체가 세포 배양 배지로부터 회수되는 것인 방법.

[0665] 실시태양 170: 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체의 생산을 위한, 실시태양 150 내지 159 중 어느 한 실시태양에 따른 숙주 세포의 용도.

[0666] 실시태양 171: 실시태양 170에 있어서, 1가 항체의 생산이 실시태양 1 내지 53 중 어느 한 실시태양에 따른 방법의 사용을 포함하는 것인 용도.

[0667] 실시태양 172: 치료 잔기에 컨쥬게이팅된 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트.

[0668] 실시태양 173: 실시태양 172에 있어서, 치료 잔기가 세포독소, 화학치료 약물, 면역억제제 또는 방사성 동위원소인 면역컨쥬게이트.

[0669] 실시태양 174: 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 것인 1가 항체.

[0670] 실시태양 175: 실시태양 174에 있어서, 항체가 암, 세포 증식 질환, (자가)면역 질환, 염증 질환 및/또는 혈관신생 질환을 치료하기 위한 의약으로서 사용하기 위한 것이고, 여기서 항체가 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프에 대한 항체의 결합은 상기 질병을 치료하는데 효과적인 1가 항체.

[0671] 실시태양 176: 실시태양 174 또는 실시태양 175에 있어서, 항체가, 면역계-매개 활성의 관여가 항체의 투여 효과를 달성하기 위해 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않은, 특정 표적에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료가능한 질병 또는 질환을 치료하기 위한 의약으로서 사용하기 위한 것이고, 상기 항체가 상기 항원에 특이적으로 결합하는 것인 1가 항체.

[0672] 실시태양 177: 실시태양 174 내지 176 중 어느 한 실시태양에 있어서, 항체가, 항원의 다량체화가 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있는, 가용성 항원의 차단 또는 억제에 의해 치료가능한 질병 또는 질환을 치료

하기 위한 의약으로서 사용하기 위한 것이고, 상기 항체가 상기 항원에 특이적으로 결합하는 것인 1가 항체.

[0673] 실시태양 178: 실시태양 174 내지 176 중 어느 한 실시태양에 있어서, 항체가, 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있는 세포막 결합 수용체를 차단하거나 억제함으로써 치료할 수 있는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 의약으로서 사용하기 위한 것이고, 상기 항체가 상기 수용체에 특이적으로 결합하는 것인 1가 항체.

[0674] 실시태양 179: 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체의 의약으로서의 용도.

[0675] 실시태양 180: 실시태양 179에 있어서, 의약이 암, 세포 증식 질환, (자가)면역 질환, 염증 질환 및/또는 혈관신생 질환의 치료에 유용하고, 항체가 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프에 대한 항체의 결합이 상기 질병을 치료하는데 효과적인 용도.

[0676] 실시태양 181: 실시태양 179 또는 실시태양 180에 있어서, 의약이 면역계-매개 활성의 관여가 항체의 투여 효과를 달성하기 위해 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않은, 특정 표적에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료가능한 질병 또는 질환의 치료에 유용하고, 상기 항체가 상기 항원에 특이적으로 결합하는 것인 용도.

[0677] 실시태양 182: 실시태양 179 내지 181 중 어느 한 실시태양에 있어서, 의약이 항원의 다량체화가 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있는, 가용성 항원의 차단 또는 억제에 의해 치료가능한 질병 또는 질환의 치료에 유용하고, 상기 항체가 상기 항원에 특이적으로 결합하는 것인 용도.

[0678] 실시태양 183: 실시태양 179 내지 181 중 어느 한 실시태양에 있어서, 의약이 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있는 세포막 결합 수용체를 차단하거나 억제함으로써 치료할 수 있는 질병 또는 질환의 치료에 유용하고, 상기 항체가 상기 수용체에 특이적으로 결합하는 것인 용도.

[0679] 실시태양 184: 항체가 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프에 대한 항체의 결합이 상기 질병을 치료하는데 효과적인, 암, 세포 증식 질환, (자가)면역 질환, 염증 질환 및/또는 혈관신생 질환을 치료하기 위한 제약 조성물의 제조를 위한, 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 항체의 용도.

[0680] 실시태양 185: 면역계-매개 활성의 관여가 항체의 투여 효과를 달성하기 위해 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않고 항체가 항원에 특이적으로 결합하는, 특정 표적에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료가능한 질병 또는 질환을 치료하기 위한 제약 조성물의 제조를 위한, 실시태양 54 내지 106 또는 실시태양 184 중 어느 한 실시태양에 따른 항체의 용도.

[0681] 실시태양 186: 항원의 다량체화가 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있고 항체가 상기 항원에 특이적으로 결합하는, 가용성 항원의 차단 또는 억제에 의해 치료가능한 질병 또는 질환의 치료를 위한 제약 조성물의 제조를 위한, 실시태양 54 내지 106 또는 실시태양 184 또는 실시태양 185 중 어느 한 실시태양에 따른 항체의 용도.

[0682] 실시태양 187: 항체가 특이적으로 결합하는 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있는 세포막 결합 수용체를 차단하거나 억제함으로써 치료할 수 있는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 제약 조성물의 제조를 위한, 실시태양 54 내지 106 또는 실시태양 184 또는 실시태양 185 중 어느 한 실시태양에 따른 항체의 용도.

[0683] 실시태양 188: 대상에서 항원 활성이 억제되도록 대상에게 항원에 특이적으로 결합하는 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함하는, 항원의 활성이 바람직하지 않은 질병 또는 질환으로 고통받는 대상에서 항원을 억제하는 방법.

[0684] 실시태양 189: 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산 구성체를 투여하여 질병 또는 질환을 치료하는 것을 포함하는, 질병 또는 질환의 치료 방법.

[0685] 실시태양 190: 실시태양 189에 있어서, 상기 질병 또는 질환이 암, 세포 증식 질환, (자가)면역 질환, 염증 질환 및/또는 혈관신생 질환이고, 상기 방법이 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 항원에 특이적으로 결합하는 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함하고, 항체가 주어진 표적 또는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 표적 또는 표적 에피토프

에 대한 항체의 결합이 상기 질병을 치료하는데 효과적인 방법.

[0686] 실시태양 191: 실시태양 189 또는 실시태양 190에 있어서, 상기 질병 또는 질환이 특정 표적에 대해 작용하는 항체의 투여에 의해 치료가능하고, 면역계-매개 활성의 관여가 항체의 투여 효과를 달성하기 위해 필요하지 않거나 또는 바람직하지 않고, 상기 방법이 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 수용체에 특이적으로 결합하는 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

[0687] 실시태양 192: 실시태양 189 내지 191 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 질병 또는 질환이 가용성 항원의 차단 또는 억제에 의해 치료가능하고, 상기 항원의 다량체화는 바람직하지 않은 면역 복합체를 형성할 수 있고, 상기 방법이 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 항원에 특이적으로 결합하는 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

[0688] 실시태양 193: 실시태양 189 내지 191 중 어느 한 실시태양에 있어서, 상기 질병 또는 질환이 수용체의 이량체화에 의해 활성화될 수 있는 세포막 결합 수용체를 차단하거나 억제함으로써 치료할 수 있고, 상기 방법이 치료가 필요한 대상에게 치료 유효량의 수용체에 특이적으로 결합하는 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 상기 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트, 또는 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산 구성체를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

[0689] 실시태양 194: 실시태양 189 내지 193 중 어느 한 실시태양에 있어서, 하나 이상의 추가의 치료제를 대상에게 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

[0690] 실시태양 195: 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체를 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 제약 조성물.

[0691] 실시태양 196: 실시태양 117 내지 144 중 어느 한 실시태양에 따른 핵산 구성체를 포함하는 유전자 도입 동물.

[0692] 실시태양 197: 실시태양 54 내지 106 중 어느 한 실시태양에 따른 1가 항체의 진단제로서의 용도.

[0693] 실시태양 198: 소실에 대한 FcRn에 의한 보호에 대해 1가 항체 또는 항체 단편을 시험하는, 반감기가 긴 1가 항체 또는 1가 항체 단편을 확인하는 방법.

[0694] 실시태양 199: FcRn에 의해 소실로부터 보호되는 1가 항체 또는 1가 항체 단편.

[0695] 실시태양 200: 실시태양 199에 있어서, 생체내 투여될 때 상기 1가 항체 또는 1가 항체 단편의 반감기가 적어도 5일인 1가 항체 또는 1가 항체 단편.

[0696] 실시태양 201: 실시태양 199에 있어서, 생체내 투여될 때 상기 1가 항체 또는 1가 항체 단편의 반감기가 적어도 5일 내지 21일 이내인 1가 항체 또는 1가 항체 단편.

[0697] 실시태양 202: 실시태양 199에 있어서, 생체내 투여될 때 상기 1가 항체 또는 1가 항체 단편의 반감기가 적어도 5일 내지 14일 이내인 1가 항체 또는 1가 항체 단편.

[0698] 실시태양 203: 실시태양 199에 있어서, 상기 1가 항체 또는 1가 항체 단편의 반감기가 적어도 14일인 1가 항체 또는 1가 항체 단편.

[0699] 실시태양 204: 실시태양 199에 있어서, 상기 1가 항체 또는 1가 항체 단편의 반감기가 적어도 21일인 1가 항체 또는 1가 항체 단편.

[0700] 실시태양 205: 실시태양 199에 있어서, SCID 마우스에서 생체내 투여될 때 상기 1가 항체 또는 1가 항체 단편의 반감기가 적어도 5일인 1가 항체 또는 1가 항체 단편.

[0701] 실시태양 206: 실시태양 199에 있어서, 상기 1가 항체 또는 1가 항체 단편이 FcRn에 결합할 수 있는 것인 1가 항체 또는 1가 항체 단편.

[0702] 본 발명은 하기 실시예에 의해 더욱 예시되고, 실시예는 추가로 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0703] [실시예]

[0704] **실시예 1**

[0705] 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 PCR 증폭

[0706] 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이소겐 바이오사이언스 (Isogen Bioscience, 네덜란드 마르센)에서 합성하고 정량하였다. 프라이머를 H_2O에 100 pmol/㎕로 용해시키고 -20℃에서 저장하였다. 모든 PCR 및 서열결정 프라이머의 요약을 표로 작성한다 (도 1). PCR을 위해, PfuTurbo(등록상표) Hotstart DNA 중합효소 (스트라타젠, 네덜란드 암스테르담)를 제조사의 지시에 따라 사용하였다. 각각의 반응 혼합물은 200 μM 혼합 dNTP (로슈 다이어그노스틱스 (Roche Diagnostics, 네덜란드 알메레)), 6.7 pmol의 전방향 및 역방향 프라이머, 100 ng의 게놈 DNA 또는 1 ng의 플라스미드 DNA, 및 1 단위의 PfuTurbo(등록상표) Hotstart DNA 중합효소를 PCR 반응 버퍼 (중합효소를 보충한) 내에 총 부피 20 ㎕로 함유하였다. PCR 반응을 TGradient Thermocycler 96 (와트만 비오메트라 (Whatman Biometra, 독일 괴팅엔))을 사용하여 32-사이클 프로그램을 이용하여 수행하였다: 95℃에서 2 min 동안 변성; 95℃에서 30초, 60-70℃ 구배 (또는 또다른 특정한 어닐링 온도)에서 30초, 및 72℃에서 3분의 30 사이클; 72℃에서 10분 동안 최종 연장. 적절한 경우, PCR 혼합물은 추가의 분석 또는 처리까지 4℃에서 저장하였다.

[0707] **실시예 2**

[0708] 아가로스 겔 전기영동

[0709] 아가로스 겔 전기영동을 샘브룩 (Sambrook) (Sambrook J. and Russel, D.V. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3nd Ed., Cold Spring Harbor, 2000)에 따라 1 x Tris 아세테이트 EDTA 버퍼 중 50 ml의 겔을 사용하여 수행하였다. DNA를 겔 내에 에티듐 브로마이드를 포함시키고 UV광 하에 관찰하여 가시화하였다. 겔 이미지를 CCD 카메라 및 영상 분석 시스템 (GeneGnome; 신젠 (Syngene), 웨스트버그 비.브이. (Westburg B.V., 네덜란드 로이스덴)을 통해)으로 기록하였다.

[0710] **실시예 3**

[0711] PCR 산물 및 효소에 의한 소화 산물의 분석 및 정제

[0712] 목적하는 PCR 단편의 정제를 MinElute PCR 정제 키트 (퀴아겐 (Qiagen, 네덜란드 로이스덴 베스트부르크); 제품 번호 28006)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 단리된 DNA를 UV 분광법으로 정량하고, 품질을 아가로스 겔 전기영동으로 평가하였다.

[0713] 별법으로, PCR 또는 소화 산물을 1% Tris 아세테이트 EDTA 아가로스 겔을 사용하여 아가로스 겔 전기영동 (예를 들어, 다수의 단편이 존재할 때)에 의해 분리하였다. 목적하는 단편을 겔로부터 절개하고 QIAEX II 겔 추출 키트 (퀴아겐; 제품 번호 20051)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 회수하였다.

[0714] **실시예 4**

[0715] UV 분광법에 의한 DNA의 정량

[0716] 핵산의 광학 밀도를 NanoDrop ND-1000 분광광도계 (이소겐 라이프 사이언스 (Isogen Life Science, 네덜란드 마르센))를 사용하여 제조사의 지시에 따라 결정하였다. DNA 농도는 260 nm에서 광학 밀도 (OD)의 분석에 의해 측정하였다 (1 OD_{260nm} 단위 = 50 ㎍/ml). 모든 샘플에 대해, 핵산이 용해되는 버퍼를 참조용으로 사용하였다.

[0717] **실시예 5**

[0718] 제한 효소 소화

[0719] 제한 효소 및 보충물을 뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs, 미국 매사추세츠주 비벌리) 또는 페르메타스 (Fermetas, 리투아니아 빌니우스)로부터 입수하고 제조사의 지시에 따라 사용하였다.

[0720] DNA (100 ng)를 적절한 버퍼 중에서 5 단위의 효소(들)로 10 ㎕의 최종 부피 (반응 부피는 적절하게 확대하였다)에서 소화시켰다. 소화물을 권장 온도에서 최소 60분 동안 인큐베이팅하였다. 부적합한 버퍼 또는 온도 요건을 포함하는 제한 효소를 사용하는 이중 소화를 필요로 하는 단편에 대해, 소화를 순차적으로 수행하였다. 필요하면, 소화 산물을 아가로스 겔 전기영동 및 겔 추출에 의해 정제하였다.

[0721] **실시예 6**

[0722] DNA 단편의 라이게이션

[0723] DNA 단편의 라이게이션을 Quick 라이게이션 키트 (뉴 잉글랜드 바이오랩스)를 사용하여 제조사의 지시에 따라

수행하였다. 각각의 라이게이션을 위해, 벡터 DNA를 약 3배 몰 과량의 삽입체 DNA과 혼합하였다.

[0724] **실시예 7**

[0725] 이. 콜라이의 형질전환

[0726] 플라스미드 DNA (1-5 ㎕의 DNA 용액, 대개 2 ㎕의 DNA 라이게이션 혼합물)를 열-충격 방법을 이용하여 제조사의 지시에 따라 One Shot DH5α-T1^{R} 또는 MACH-1 T1^{R} 전능성 이. 콜라이 세포 (인비트로겐, 네덜란드 브레다; 제품 번호 12297-016) 내로 형질전환시켰다. 이어서, 세포를 50 ㎍/ml 암피실린을 함유하는 Luria-Bertani (LB) 아가 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 세균 콜로니가 명백해질 때까지 16-18시간 동안 37℃에서 인큐베이팅하였다.

[0727] **실시예 8**

[0728] PCR에 의한 세균 콜로니의 스크리닝

[0729] 세균 콜로니를 HotStarTaq Master Mix 키트 (퀴아겐; 제품 번호 203445) 및 적절한 전방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 콜로니 PCR을 통해 목적하는 서열을 함유하는 벡터의 존재에 대해 스크리닝하였다. 선택된 콜로니를 20 ㎕ 피펫 팁으로 가볍게 건드리고, 소규모 배양을 위한 2 ml LB에 짧게 건드린 후, PCR 혼합물에 재현탁시켰다. PCR은 TGradient Thermocycler 96으로 35-사이클 프로그램을 이용하여 수행하였다: 95℃에서 15 min 변성; 94℃에서 30초, 55℃에서 30초 및 72℃에서 2 min의 35 사이클; 이어서, 72℃에서 10분의 최종 연장 단계. 적절한 경우, PCR 혼합물을 아가로스 겔 전기영동으로 분석할 때까지 4℃에서 저장하였다.

[0730] **실시예 9**

[0731] 이. 콜라이 배양액으로부터 플라스미드 DNA 단리

[0732] 플라스미드 DNA를 퀴아겐의 다음 키트를 사용하여 제조사의 지시에 따라 이. 콜라이 배양액으로부터 단리하였다. 벌크 플라스미드 제제 (50-150 ml 배양액)에 대해, HiSpeed Plasmid Maxi 키트 (제품 번호 12663) 또는 HiSpeed Plasmid Midi 키트 (제품 번호 12643)을 사용하였다. 소규모 플라스미드 제제 (± 2 ml 배양액)에 대해, Qiaprep Spin Miniprep 키트 (제품 번호 27106)를 사용하고, DNA를 50 ㎕ 용출 버퍼 (키트와 함께 제공됨) 중에 용출시켰다.

[0733] **실시예 10**

[0734] 부위 지정 돌연변이 유발

[0735] 부위 지정 돌연변이 유발은 QuickChange II XL 부위 지정 돌연변이 유발 키트 (스트라타젠)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 상기 방법은 성공적인 돌연변이 유발에 대해 스크리닝하기 위해 침묵 엑스트라 (extra) X*mal* 부위의 도입을 포함하였다. 간단히 설명하면, 5 ㎕ 10x 반응 버퍼, 1 ㎕ 올리고뉴클레오티드 IgG4S228Pf (P16) (100 pmol/㎕), 1 ㎕ 올리고뉴클레오티드 IgG4S228Pr (P17)(100 pmol/㎕), 1 ㎕ dNTP 혼합물, 3 ㎕ Quick 용액, 1 ㎕ 플라스미드 pTomG4Tom7D8 (실시예 16 참조) (50 ng/㎕) 및 1 ㎕ PfuUltra HF DNA 중합효소를 총 부피 50 ㎕로 혼합하고, TGradient Thermocycler 96 (와트만 비오메트라; 제품 번호 050-801)로 18-사이클 프로그램을 사용하여 증폭시켰다: 95℃에서 1 min 변성; 95℃에서 50초, 60℃에서 50초, 및 68℃에서 10분의 18 사이클. PCR 혼합물을 추가의 처리까지 4℃에서 저장하였다. 이어서, pTomG47D8 벡터를 소화하기 위해 PCR 혼합물을 1 ㎕ D*pnI*와 함께 60분 동안 37℃에서 인큐베이팅하고, 추가의 처리까지 4℃에서 저장하였다. 반응 혼합물을 5 ㎕ sM NaAc 및 125 ㎕ 에탄올로 침전시키고, 20분 동안 -20℃에서 인큐베이팅하고, 20분 동안 4℃에서 14000xg에서 원심분리하였다. DNA 펠렛을 70% 에탄올로 세척하고, 건조시키고, 4 ㎕ 물에 용해시켰다. 총 4 ㎕ 반응 부피를 One Shot Top 10 전능성 이. 콜라이 세포 (인비트로겐) 내로 제조사의 지시에 따라 (인비트로겐) 형질전환시켰다. 이어서, 세포를 50 ㎍/ml 암피실린을 함유하는 Luria-Bertani (LB) 아가 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 세균 콜로니가 명백해질 때까지 16-18시간 동안 37℃에서 인큐베이팅하였다.

[0736] **실시예 11**

[0737] DNA 서열결정

[0738] 플라스미드 DNA 샘플을 서열 분석을 위해 AGOWA (독일 베를린)로 보냈다. 서열을 Vector NTI 어드밴스트 (advanced) 소프트웨어 (인포맥스 (Informax, 영국 옥스포드))를 사용하여 분석하였다.

[0739] **실시예 12**

[0740] HEK-293F 세포 내에서 일시 발현

[0741] 프리스타일(Freestyle)™ 293-F (현탁액 성장 및 화학적으로 규정된 프리스타일 배지에 적용된 HEK-293 서브클론, 예를 들어 HEK-293F) 세포를 인비트로겐으로부터 입수하고, 제조자의 프로토콜에 따라 293fectin (인비트로겐)을 사용하여 형질감염시켰다.

[0742] **실시예 13**

[0743] pConG1fA77의 제작: A77-IgG1의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0744] 마우스 항-FcαRI 항체 A77의 V_H 코딩 영역을 상기 항체의 VH 및 VL 코딩 영역을 함유하는 scFv 파지 벡터로부터 이중 오버랩 (double overlap) 연장 PCR에 의해 증폭시켰다. 이를 포유동물 시그널 펩티드, 이상적인 Kozak 서열 및 pConG1f에서 클로닝을 위한 적합한 제한 부위를 포함시키기 위해 사용하였다. 주형으로서 scFv 파지 벡터를 사용하여 제1 PCR을 프라이머 A77VHfor1 및 A77VHrev를 사용하여 수행하였다. 상기 제1 PCR의 일부를 A77VHfor2 및 A77VHrev를 사용하는 제2 PCR에서 사용하였다. VH 단편을 겔 정제하고 pConG1f0.4 내로 클로닝하였다. 이를 위해, pConG1f0.4 벡터 및 VH 단편을 HindIII 및 ApaI로 소화시키고 정제하였다. V_H 단편 및 pConG1f0.4HindIII-ApaI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-$T1^R$ 세포 내로 형질전환시켰다. 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 서열을 확정하고 pConG1fA77로 명명하였다.

[0745] **실시예 14**

[0746] pConKA77의 제작: A77 항체의 경쇄의 생산을 위한 벡터

[0747] 마우스 항-FcαRI 항체 A77의 V_L 코딩 영역을 상기 항체의 V_H 및 V_L 코딩 영역을 함유하는 scFv 파지 벡터로부터 이중 오버랩 연장 PCR에 의해 증폭시켰다. 이를 포유동물 시그널 펩티드, 이상적인 Kozak 서열 및 pConKappa0.4에서 클로닝을 위한 적합한 제한 부위를 포함시키기 위해 사용하였다. 주형으로서 scFv 파지 벡터를 사용하여 제1 PCR을 프라이머 A77VLfor1 및 A77VLrev를 사용하여 수행하였다. 상기 제1 PCR의 일부를 A77VLfor2 및 A77VLrev를 사용하는 제2 PCR에서 사용하였다. PCR 산물 및pConKappa0.4 벡터를 HindIII 및 Pfl23II로 소화시키고 정제하였다. V_L 단편 및 pConKappa0.4HindIII-Pfl23II 소화시킨 벡터를 라이게이션시키고, 전능성 DH5α-$T1^R$ 이. 콜라이 내로 형질전환시켰다.

[0748] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 서열을 확정하였다. 상기 플라스미드를 pConKA77로 명명하였다.

[0749] **실시예 15**

[0750] pTomG4A77의 제작: A77-IgG4의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0751] A77-IgG4의 발현을 위한 벡터를 구성하기 위해, A77의 V_H 영역을 pTomG4 내로 클로닝하였다.

[0752] 이를 위해, pTomG4 및 pConG1fA77을 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0753] A77 V_H 단편 및 pTomG4HindIII-ApaI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-$T1^R$ 세포 내로 형질전환시켰다.

[0754] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하였다. 상기 플라스미드를 pTomG4A77로 명명하였다.

[0755] **실시예 16**

[0756] pTomG4A77HG의 제작: A77-HG의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0757] A77-HG의 발현을 위한 구성체를 제조하기 위해, A77의 V_H 영역을 pTomG47D8HG 내에 VH 7D8 영역을 대체하여 클로닝하였다.

[0758] 이를 위해, pTomG47D8HG 및 pConG1fA77을 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0759] A77 V_H 단편 및 pTomG47D8HGHindIII-ApaI 소화시킨 벡터 단편을 라이게이션하고 전능성 DH5α-$T1^R$ 세포 내로 형

질전환시켰다.

[0760] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하였다. 상기 플라스미드를 pTomG4A77HG로 명명하였다.

[0761] **실시예 17**

[0762] pEE6.4A77Fab의 제작: A77-Fab의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0763] A77-Fab의 발현을 위한 구성체를 제조하기 위해, A77의 V_H 영역을 pEE6.42F8Fab 내에 VH 2F8 영역을 대체하여 클로닝하였다.

[0764] 이를 위해, pEE6.42F8Fab 및 pConG1fA77을 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0765] A77 V_H 단편 및 pEE6.42F8Fab HindIII-ApaI 소화시킨 벡터 단편을 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다.

[0766] 정확한 삽입체를 함유하는 클론을 선택하였다. 상기 플라스미드를 pEE6.4A77Fab로 명명하였다.

[0767] **실시예 18**

[0768] 인간 항-cMet 항체의 가변 영역의 클로닝

[0769] 총 RNA를 1x10^6 마우스 하이브리도마 세포로부터 RNeasy 키트 (퀴아겐)을 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 제조하였다.

[0770] 5'-RACE-RNA의 상보성 DNA (cDNA)를 60 ng 총 RNA로부터 SMART RACE cDNA 증폭 키트 (비디 바이오사이언시즈 클론텍 (BD Biosciences Clontech, 미국 캘리포니아주 마운튼 뷰))를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 제조하였다. cMet 항체의 VL 및 V_H 영역을 PCR에 의해 증폭하였다. 이를 위해, Pfu-Turbo(등록상표) Hotstart DNA 중합효소 (스트라타젠)를 제조사의 지시에 따라 사용하였다. 각각의 반응 혼합물은 5 ㎕ 10x BD Advantage 2 PCR 버퍼 (클론텍), 200 μM 혼합 dNTP (로슈 다이어그노스틱스), 12 pmol의 역방향 프라이머 (V_H 영역에 대해 RACEG1A1 및 V_L 영역에 대해 RACEKA1), 7.2 pmol UPM-Mix (UPM-Mix: 2 μM ShortUPMH3 및 0.4 μM LongUPMH3 올리고뉴클레오티드), 1 ㎕의 상기 설명된 5'RACE cDNA 주형, 및 1 ㎕ 50X BD Advantage 2 중합효소 혼합물 (클론텍)을 50 ㎕의 총 부피로 함유하였다.

[0771] PCR 반응을 TGradient Thermocycler 96 (와트만 비오메트라)을 사용하여 35-사이클 프로그램을 사용하여 수행하였다: 95℃에서 1 min 동안 변성; 95℃에서 30초, 68℃에서 60초의 35 사이클.

[0772] 반응 산물을 1% TAE 아가로스 겔 상의 아가로스 겔 전기영동에 의해 분리하고, 에티듐 브로마이드로 염색하였다. 정확한 크기의 밴드를 겔로부터 절단하고, DNA를 아가로스로부터 Qiagen Minelute Reaction Cleanup 키트 (퀴아겐)를 사용하여 단리하였다.

[0773] 겔 단리된 PCR 단편을 pCR4Blunt-TOPO 벡터 (인비트로겐) 내로 서열분석을 위한 Zero Blunt(등록상표) TOPO(등록상표) PCRCIoning 키트 (인비트로겐)를 제조자의 프로토콜에 따라 사용하여 클로닝하였다. 5 ㎕의 라이게이션 혼합물을 OneShot DH5αT1^R 전능성 이. 콜라이 (인비트로겐) 내로 형질전환시키고, LB/암피실린 플레이트 상에 플레이팅하였다.

[0774] 삽입체를 함유하는 6개의 클론으로부터 VL 서열을 결정하였고, 삽입체를 함유하는 5개의 클론으로부터 VH 서열을 결정하였다.

[0775] **실시예 19**

[0776] pConG1fcMet의 제작: cMet-IgG1의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0777] 인간 항-cMet 항체의 V_H 코딩 영역을 상기 영역을 함유하는 플라스미드로부터 HindIII 및 ApaI을 사용하여 절단하였다. VH 단편을 겔 정제하고 pConG1f0.4 내로 클로닝하였다. 이를 위해, pConG1f0.4 벡터를 HindIII 및 ApaI로 소화시키고 정제하였다. V_H 단편 및 pConG1f0.4HindIII-ApaI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다.

[0778] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 단리하고, pConG1fcMet로 명명하였다.

[0779] **실시예 20**

[0780] pConKcMet의 제작: cMet 항체의 경쇄의 생산을 위한 벡터

[0781] 인간 항-cMet 항체의 V_L 코딩 영역을 상기 영역을 함유하는 플라스미드로부터, 클로닝을 위한 적합한 제한 부위를 pConK0.4 내로 도입시키는 프라이머 shortUPMH3 및 RACEVLBsiWI를 사용하여 증폭시켰다.

[0782] PCR 산물 및 pConKappa0.4 벡터를 HindIII 및 Pfl23II로 소화시키고 정제하였다. V_L 단편 및 pConKappa0.4HindIII-Pfl23ll 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 이. 콜라이 내로 형질전환시켰다.

[0783] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 서열을 확정하였다. 상기 플라스미드를 pConKcMet로 명명하였다.

[0784] **실시예 21**

[0785] pTomG4cMet의 제작: cMet-IgG4의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0786] cMet-IgG4의 발현을 위한 벡터를 제조하기 위해, cMet 항체의 V_H 영역을 pTomG4 내에 클로닝하였다.

[0787] 이를 위해, pTomG42F8 및 pConG1fcMet를 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0788] cMet V_H 단편 및 pTomG42F8HindIII-ApaI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다.

[0789] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하였다. 상기 플라스미드를 pTomG4cMet로 명명하였다.

[0790] **실시예 22**

[0791] pTomG4cMetHG의 제작: cMet-HG의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0792] cMet-HG의 발현을 위한 구성체를 제조하기 위해, cMet의 V_H 영역을 pTomG42F8HG 내에 VH 2F8 영역을 대체하여 클로닝하였다.

[0793] 이를 위해, pTomG42F8HG 및 pConG1fcMet를 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0794] cMet V_H 단편 및 pTomG42F8HGHindIII-ApaI 소화시킨 벡터 단편을 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다.

[0795] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하였다. 상기 플라스미드를 pTomG4cMetHG로 명명하였다.

[0796] **실시예 23**

[0797] pEE6.4cMetFab의 제작: cMet-Fab의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0798] cMet-Fab의 발현을 위한 구성체를 제조하기 위해, cMet의 V_H 영역을 pEE6.42F8Fab 내에 VH 2F8 영역을 대체하여 클로닝하였다.

[0799] 이를 위해, pEE6.42F8Fab 및 pConG1fcMet를 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0800] cMet V_H 단편 및 pEE6.42F8Fab HindIII-ApaI 소화시킨 벡터 단편을 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다.

[0801] 정확한 삽입체를 함유하는 클론을 선택하였다. 상기 플라스미드를 pEE6.4cMetFab로 명명하였다.

[0802] **실시예 24**

[0803] pConG1f2F8의 제작: 2F8-IgG1의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0804] 2F8의 V_H 코딩 영역 (WO 2002/100348)을 PCR에 의해 pIESRα2F8 (메다렉스 (Medarex))로부터, 프라이머

2f8HCexfor 및 2f8HCexrev를 사용하여 증폭시키고, PCRscriptCam (스트라타젠) 내에 서브클로닝하였다. VH 단편을 후속적으로 pCONg1f0.4 내에 클로닝하였다.

[0805] 이를 위해, pConG1f0.4 및 pCRScriptCAMVH2F8 벡터를 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 정제하였다.

[0806] V_H 단편 및 pConG1f0.4HindIII-ApaI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다. 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 서열을 확정하고, 벡터를 pConG1f2F8로 명명하였다.

[0807] **실시예 25**

[0808] pConK2F8의 제작: 2F8 항체의 경쇄의 생산을 위한 벡터

[0809] pIESRα2F8을 HindIII 및 BsiWI로 소화시키고, 2F8 (항-EGFr)의 V_L 코딩 영역을 겔로부터 단리하였다. pConKappa0.4 벡터를 HindIII 및 BsiWI로 소화시키고 정제하였다. V_L 단편 및 pConKappa0.4HindIII-BsiWI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 이. 콜라이 내로 형질전환시켰다.

[0810] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 서열을 확정하였다. 상기 플라스미드를 pConK2F8로 명명하였다.

[0811] **실시예 26**

[0812] pTomG42F8의 제작: 2F8-IgG4의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0813] 2F8-IgG4의 발현을 위한 벡터를 구성하기 위해, 2F8의 V_H 영역을 pTomG4 내에 클로닝하였다.

[0814] 이를 위해, pTomG4 및 pConG1f2F8을 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0815] 2F8 V_H 단편 및 TomG4HindIII-ApaI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다.

[0816] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하였다. 상기 플라스미드를 pTomG42F8로 명명하였다.

[0817] **실시예 27**

[0818] pTomG42F8HG의 제작: 2F8-HG의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0819] 2F8-HG의 발현을 위한 구성체를 제조하기 위해, 2F8의 V_H 영역을 pTomG47D8HG 내에 VH 7D8 영역을 대체하여 클로닝하였다.

[0820] 이를 위해, pTomG47D8HG 및 pConG1f2F8을 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0821] 2F8 V_H 단편 및 pTomG47D8HGHindIII-ApaI 소화시킨 벡터 단편을 라이게이션하고, 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다.

[0822] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하였다. 상기 플라스미드를 pTomG42F8HG로 명명하였다.

[0823] **실시예 28**

[0824] pEE6.42F8Fab의 제작: 2F8-Fab의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0825] Fab 코딩 영역을 벡터 pConG1f2F8로부터 PCR에 의해, 적합한 클로닝 제한 부위 및 C-말단 his 태그 코딩 서열을 도입시키는 프라이머 pConG1seq1 및 2F8fabrev2를 사용하여 증폭시켰다. PCR 단편을 정제하고 PEE6.4 내에 클로닝하였다.

[0826] 이를 위해, pEE6.4 및 PCR 단편을 HindIII 및 EcoRI으로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0827] 2F8 Fab 단편 및 pEE6.4HindIII-EcoRI 소화시킨 벡터 단편을 라이게이션하고, 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다.

[0828] 정확한 삽입체를 함유하는 클론을 선택하고, 서열을 DNA 서열결정에 의해 확인하였다. 상기 플라스미드를 pEE6.42F8Fab로 명명하였다.

[0829] **실시예 29**

[0830] pConG1f7D8의 제작: 7D8-IgG1의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0831] CD20 특이적인 HuMab-7D8의 V_H 코딩 영역 (WO 04/035607)을 PCR에 의해 상기 영역을 함유하는 pGemT (프로메가 (Promega, 미국 매디슨)) 벡터로부터, 클로닝을 위한 적합한 제한 부위를 pConG1f0.4 (론자 바이올로지스 (Lonza Biologies, 영국 슬라우)) (인간 IgG1의 게놈 불변 영역 (동종이인자형 f), 및 이상적인 Kozak 서열 (GCCGCCACC (Kozak M et al., Gene 234(2), 187-208 (1999))을 함유하는 포유동물 발현 벡터) 내로 도입시키는 프라이머 7D8VHexfor (P8) 및 2F8HCexrev (P13) (도 14)를 사용하여 증폭하였다. PCR 단편을 pPCR-Script CAM (스트라타젠) 내에 PCR-Script(등록상표) Cam 클로닝 키트 (스트라타젠)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 클로닝하였다. 복수의 클론을 서열결정하고, 예상된 서열을 함유하는 클론을 추가의 사용을 위해 선택하였다.

[0832] V_H 단편을 겔 정제하고 pConG1f0.4 내로 클로닝하였다. 이를 위해, VH 단편을 pPCR-Script CAM 벡터로부터 HindIII 및 ApaI로 소화시키고 겔 정제한 후 단리하였다.

[0833] pConG1f0.4 벡터를 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 벡터 단편을 겔로부터 단리한 후, 새우 알칼린 포스파타제 (Shrimp Alkaline Phosphatase) (뉴 잉글랜드 바이오랩스)로 탈인산화하였다. V_H 단편 및 pConG1f0.4HindIII-ApaI 탈인산화된 단편을 라이게이션하고, 전능성 DH5α-T1^R 세포 (인비트로겐) 내로 형질전환시켰다. 8개의 콜로니를 콜로니 PCR (프라이머 pConG1seq1 (P10) 및 HCseq5 (P11) (도 14)을 사용하는)에 의해 검토하였고, 모든 콜로니가 정확한 삽입물 크기를 함유하는 것으로 밝혀졌다.

[0834] 추가의 연구를 위해 클론을 선택하고, pConG1f7D8로 명명하였다.

[0835] **실시예 30**

[0836] pConK7D8의 제작: 7D8-IgG1, 7D8-IgG4 및 7D8-HG의 경쇄의 생산을 위한 벡터

[0837] CD20 특이적 HuMab-7D8의 V_L 코딩 영역 (WO 04/035607)을 상기 영역을 함유하는 플라스미드로부터, 클로닝을 위한 적합한 제한 부위를 pConKappa0.4 (론자 바이올로지스) (인간 IgG의 불변 카파 경쇄 영역 (동종이인자형 km3), 및 이상적인 Kozak 서열을 함유하는 포유동물 발현 벡터) 내로 도입시키는 프라이머 7D8VLexfor (P7) 및 7D8VLexrev (P6) (도 14)를 사용하여 증폭시켰다.

[0838] PCR 산물 및 pConKappa0.4 벡터를 HindIII 및 BsiWI로 소화시켰다. 벡터 및 V_L 단편을 정제하고, 벡터를 새우 알칼린 포스파타제로 탈인산화시켰다. V_L 단편 및 pConKappa0.4HindIII-BsiWI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α T1^R 이. 콜라이 내로 형질전환시켰다. 10개의 콜로니를 콜로니 PCR (프라이머 pConKseqi (P9) 및 LCseq3 (P5) (도 14)를 사용하는)에 의해 검토하였고, 9개의 콜로니가 정확한 삽입물 크기를 함유하는 것으로 밝혀졌다.

[0839] 4개의 클론으로부터, 플라스미드 DNA를 단리하였고, V_L 영역을 서열결정하였다. 3개의 클론이 예상된 서열을 함유하였고, 추가의 사용을 위해 하나의 클론을 선택하여 pConK7D8로 명명하였다.

[0840] **실시예 31**

[0841] pTomG4의 제작: 인간 IgG4의 불변 영역을 갖는 인간 IgG의 가변 중쇄 영역의 발현을 위한 벡터

[0842] 게놈 DNA를 지원자의 혈액 샘플로부터 단리하고, IgG4의 중쇄의 완전 게놈 불변 영역을 증폭시키고 포유동물 발현 벡터 pEE6.4 (론자 바이올로지스) 내로 클로닝을 위한 적합한 제한 부위를 도입시키는 프라이머 IgG4gene2f (P15) 및 IgG4gene2r (P14) (도 14)를 사용하는 PCR에서 주형으로서 사용하였다. PCR 단편을 정제하고 pEE6.4 내로 클로닝하였다. 이를 위해, PCR 산물을 HindIII 및 EcoRI로 소화시킨 후, 제한 효소를 열 불활성화시켰다. pEE6.4 벡터를 HindIII 및 EcoRI로 소화시킨 후, 제한 효소를 열 불활성화시키고 벡터 단편을 새우 알칼린 포스파타제로 탈인산화한 후, 포스파타제를 열 불활성화시켰다. IgG4 단편 및 pEE6.4HindIII/EcoRI 탈인산화된 벡터를 라이게이션하고 전능성 MACH-T1^R 세포 (인비트로겐) 내로 형질전환시켰다. 3개의 클론을 LB에서 성장시키고, 적은 배양액 (1.5 ml)으로부터 플라스미드 DNA를 단리하였다. 제한효소 소화는 pEE6.4 벡터 내에 IgG4 단편의 클로닝과 일치하는 패턴을 밝혔다. 2개의 클론으로부터의 플라스미드 DNA를 DH5α-T1^R 이. 콜라이 내에 형질전환시키고, 플라스미드 DNA를 단리하고, 구성체를 삽입체의 서열 분석에 의해 검토하였고, 하나의 클론이

인트론 내의 일부 사소한 차이 외에는 Genbank 데이타베이스의 게놈 IgG4 클론과 동일한 것으로 밝혀졌다. 서열 13은 pTomG4 내의 IgG4 영역의 서열을 보여준다. 상기 차이는 아마도 Genbank 서열 내의 다형성 또는 서열 폴트 (fault)이다. 플라스미드를 pTomG4로 명명하였다.

[0843] **실시예 32**

[0844] pTomG47D8의 제작: 7D8-IgG4의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0845] pConG1f7D8로부터의 플라스미드 DNA를 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, V_H 단편을 겔 정제하였다. pTomG4 벡터를 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 벡터 단편을 겔로부터 단리하였다. V_H 단편 및 pTomG4HindIII-ApaI 단편을 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다. 4개의 콜로니를 콜로니 PCR (프라이머 pConKseq1 (P9) 및 HCseq11 (P12)을 사용하는)로 검토하였고, 2개가 정확한 삽입물 크기를 함유하는 것으로 밝혀졌고, pTomG4 백본의 존재를 콜로니 PCR 단편에 대해 MspI를 사용하는 소화에 의해 확인하였다. 클론 중 하나를 추가 사용을 위해 선택하였다. 상기 플라스미드를 pTomG47D8로 명명하였다.

[0846] **실시예 33**

[0847] pTomG47D8HG의 제작; 7D8-HG의 중쇄의 발현을 위한 벡터

[0848] 부위 지정 돌연변이 유발을 사용하여 pTomG47D8 플라스미드 내에서 IgG4의 힌지 엑손의 스플라이스 공여자 부위를 파괴하였다. 부위 지정 돌연변이 유발 반응은 프라이머 IgG4S228Pf (P16) 및 IgG4S228Pr (P17)을 사용하는 QuickChange XL 부위 지정 돌연변이 유발 방법에 따라 수행되었다. 24개의 콜로니를 콜로니 PCR 및 XmaI 소화 (과잉의 XmaI 부위가 돌연변이 유발 동안 도입되었다)에 의해 스크리닝하였고, 모든 콜로니가 정확한 뉴클레오티드 변화를 함유하는 것으로 밝혀졌다. 2개의 양성 콜로니를 철야 배양하고, 플라스미드 DNA를 단리하고 서열결정하여 정확한 돌연변이가 도입되었음을 확인하였다. 둘 모두 정확한 서열을 함유하였고, 추가의 증식을 위해 하나를 선택하여 pTomG47D8HG로 명명하였다. 돌연변이 유발 과정 동안 추가의 돌연변이의 도입을 배제하기 위해, pTomG47D8HG의 전체 IgG4 코딩 영역을 재서열결정하였고, 추가의 돌연변이는 발견되지 않았다. 최종 벡터를 pTomG47D8HG로 명명하였다.

[0849] **실시예 34**

[0850] 마우스 항-Betv1 항체의 가변 영역의 클로닝

[0851] 총 RNA를 $0.3x10^5$ 마우스 하이브리도마 세포 (참조문 [Akkerdaas JH et al., Allergy 50(3), 215-20 (1995)]의 클론 2H8)로부터 RNeasy 키트 (퀴아겐)를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 제조하였다.

[0852] 5'-RACE-RNA의 상보성 DNA (cDNA)를 112 ng 총 RNA로부터 SMART RACE cDNA 증폭 키트 (비디 바이오사이언시즈 클론텍)를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 제조하였다.

[0853] Betv1 항체의 V_L 및 V_H 영역을 PCR에 의해 증폭하였다. 이를 위해, PfuTurbo(등록상표) Hotstart DNA 중합효소 (스트라타젠)를 제조사의 지시에 따라 사용하였다. 각각의 반응 혼합물은 200 μM 혼합 dNTP (로슈 다이어그노스틱스), 12 pmol의 역방향 프라이머 (V_H 영역에 대해 RACEG1mm1 (P19) 및 V_L 영역에 대해 RACEKmm1 (P18)), 7.2 pmol UPM-Mix (UPM-Mix: 2 μM ShortUPMH3 (P20) 및 0.4 μM LongUPMH3 (P21) 올리고뉴클레오티드 (도 14)), 0.6 ㎕의 상기 설명된 5'RACE cDNA 주형, 및 1.5 단위의 PfuTurbo(등록상표) Hotstart DNA 중합효소를 PCR 반응 버퍼 (중합효소를 보충한) 내에 30 ㎕의 총 부피로 함유하였다.

[0854] PCR 반응은 TGradient Thermocycler 96 (와트만 비오메트라)으로 35-사이클 프로그램을 사용하여 수행하였다: 95℃에서 2 min 동안 변성; 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 및 72℃에서 1.5 min의 35 사이클; 72℃에서 10분 동안 최종 연장.

[0855] 반응 산물을 1% TAE 아가로스 겔 상의 아가로스 겔 전기영동에 의해 분리하고, 에티듐 브로마이드로 염색하였다. 정확한 크기의 밴드를 겔로부터 절단하고, DNA를 아가로스로부터 Qiaexll 겔 추출 키트 (퀴아겐)을 사용하여 단리하였다.

[0856] 겔 단리된 PCR 단편을 200 μM dATP 및 2.5 단위 Amplitaq (퍼킨 엘머 (Perkin Elmer))과 함께 10분 동안 72℃에서의 인큐베이션에 의해 A 테일링하고, 미니일루트 (minielute) 컬럼 (퀴아겐)을 사용하여 정제하였다. A-테일링된 PCR 단편을 pGEMTeasy 벡터 (프로메가) 내로 pGEMT 이지 벡터 시스템 II 키트 (프로메가)를 사용하여 제

조자의 프로토콜에 따라 클로닝하였다. 2 ㎕의 라이게이션 혼합물을 OneShot DH5αT1R 전능성 이. 콜라이 (인비트로겐) 내로 형질전환시키고 LB/Amp/IPTG/Xgal 플레이트 상에 플레이팅하였다.

[0857] V_H 및 V_L 서열에 대해 각각 4개의, 삽입체를 함유하는 백색 콜로니를 집어 삽입체를 서열결정하였다. Betv1의 V_H 및 V_L의 추론 아미노산 서열을 각각 서열 8 및 서열 12로서 나타냈다.

[0858] **실시예 35**

[0859] pConG1fBetV1의 제작: Betv1-IgG1의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0860] 마우스 항-BetV1 항체의 V_H 코딩 영역을 PCR에 의해 상기 영역을 함유하는 플라스미드 (실시예 18)로부터, pConG1f0.4 내로 클로닝을 위한 적합한 제한 부위를 도입시키는 프라이머 VHexbetv1for (P4) 및 VHexbetv1rev (P3) 및 이상적인 Kozak 서열을 사용하여 증폭하였다.

[0861] V_H 단편을 겔 정제하고 pConG1f0.4 내로 클로닝하였다. 이를 위해, PCR 산물 및 pConKappa0.4 벡터를 HindIII 및 ApaI로 소화시키고 정제하였다.

[0862] V_H 단편 및 pConG1f0.4HindIII-ApaI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-$T1^R$ 세포 내로 형질전환시켰다.

[0863] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 정확한 서열을 확정하였다. 상기 플라스미드를 pConG1fBetv1로 명명하였다.

[0864] **실시예 36**

[0865] pConKBetv1의 제작: Betv1의 경쇄의 생산을 위한 벡터

[0866] 마우스 항-BetV1 항체의 V_L 코딩 영역을 상기 영역을 함유하는 플라스미드 (실시예 18)로부터, pConK0.4 내로 클로닝을 위한 적합한 제한 부위를 도입시키는 프라이머 VLexbetv1for (P2) 및 VLexbetv1rev (P1) 및 이상적인 Kozak 서열을 사용하여 증폭시켰다.

[0867] PCR 산물 및 pConKappa0.4 벡터를 HindIII 및 BsiWI로 소화시키고 정제하였다. V_L 단편 및 pConKappa0.4HindIII-BsiWI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α $T1^R$ 이. 콜라이 내로 형질전환시켰다.

[0868] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 서열을 확정하였다. 상기 플라스미드를 pConKBetv1로 명명하였다.

[0869] **실시예 37**

[0870] pTomG4Betv1의 제작: Betv1-IgG4의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0871] Betv1-IgG4의 발현을 위한 벡터를 구성하기 위해, BetV1의 V_H 영역을 pTomG4 내에 클로닝하였다.

[0872] 이를 위해, pTomG4 및 pConG1fBetv1을 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0873] Betv1 V_H 단편 및 pTomG4HindIII-ApaI 소화시킨 벡터를 라이게이션하고 전능성 DH5α-$T1^R$ 세포 내로 형질전환시켰다.

[0874] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 서열을 확정하였다. 상기 플라스미드를 pTomG4Betv1로 명명하였다.

[0875] **실시예 38**

[0876] pTomG4Betv1HG의 제작; Betv1-HG의 중쇄의 생산을 위한 벡터

[0877] Betv1-HG의 발현을 위한 구성체를 제조하기 위해, Betv1의 V_H 영역을 pTomG47D8HG 내에 V_H 7D8 영역을 대체하여 클로닝하였다.

[0878] 이를 위해, pTomG47D8HG 및 pConG1fBetv1을 HindIII 및 ApaI로 소화시키고, 관련 단편을 단리하였다.

[0879] Betv1 V_H 단편 및 pTomG47D8HGHindIII-ApaI 소화시킨 벡터 단편을 라이게이션하고 전능성 DH5α-T1^R 세포 내로 형질전환시켰다.

[0880] 정확한 삽입물 크기를 함유하는 클론을 선택하고, 서열을 확정하였다. 상기 플라스미드를 pTomG4Betv1HG로 명명하였다.

[0881] **실시예 39**

[0882] Hek-293F 세포 내에서 일시적 발현에 의한 7D8-IgG1, 7D8-IgG4, 7D8-HG, Betv1-IgG1, Betv1-IgG4, Betv1-HG, 2F8-IgG1, 2F8-IgG4, 2F8-HG, 2F8-Fab, A77-IgG1, A77-IgG4, A77-HG, A77-Fab, cMet-IgG1, cMet-IgG4, cMet-HG 및 cMet-Fab의 생산

[0883] 제조사의 지시에 따라 293fectin을 사용하여 HEK-293F 세포 내에서 관련 중쇄 및 경쇄 벡터를 동시형질감염시킴으로써, 모든 구성체의 항체를 생산하였다. 7D8-IgG1에 대해, pConG1f7D8 및 pConK7D8이 동시발현되었다. 7D8-IgG4에 대해, pTomG47D8 및 pConK7D8이 동시발현되었다. 7D8-HG에 대해, pTomG47D8HG 및 pConK7D8이 동시발현되었다. Betv1-IgG1에 대해, pConG1Betv1 및 pConKBetv1이 동시발현되었다. Betv1-IgG4에 대해, pTomG4Betv1 및 pConKBetv1이 동시발현되었다. Betv1-HG에 대해, pTomG4Betv1HG 및 pConKBetv1이 동시발현되었다.

[0884] 2F8-IgG1에 대해, pConG1f2F8 및 pConK2F8이 동시발현되었다. 2F8-IgG4에 대해, pTomG42F8 및 pConK2F8이 동시발현되었다. 2F8-HG에 대해, pTomG42F8HG 및 pConK2F8이 동시발현되었다. 2F8-Fab에 대해, pEE6.42F8-Fab 및 pConK2F8이 동시발현되었다.

[0885] cMet-IgG1에 대해, pConGifcMet 및 pConKcMet가 동시발현되었다. cMet-IgG4에 대해, pTomG4cMet 및 pConKcMet가 동시발현되었다. cMet-HG에 대해, pTomG4cMetHG 및 pConKcMet가 동시발현되었다. cMet-Fab에 대해, pEE6.4cMet-Fab 및 pConKcMet가 동시발현되었다.

[0886] A77-IgG1에 대해, pConG1fA77 및 pConKA77이 동시발현되었다. A77-IgG4에 대해, pTomG4A77 및 pConKA77이 동시발현되었다. A77-HG에 대해, pTomG4A77HG 및 pConKA77이 동시발현되었다. A77-Fab에 대해, pEE6.4A77-Fab 및 pConKA77이 동시발현되었다.

[0887] **실시예 40**

[0888] IgG1, IgG4 및 IgG4-힌지가 없는 항체의 정제

[0889] 모든 IgG1, IgG4 및 힌지가 없는 항체를 정제하였다. 먼저, 상등액을 0.20 μM 폐쇄 단부 (dead-end) 필터 상에서 여과하였다. 이어서, 상등액을 5 ml 단백질 A 컬럼 (rProtein A FF, 애머샴 바이오사이언시스 (Amersham Bioscience)) 상에 로딩하고, 0.1 M 시트르산-NaOH (pH 3)로 용출하였다. 용출물을 2 M Tris-HCl (pH 9)로 즉시 중화시키고, 12.6 mM 인산나트륨, 140 mM NaCl, pH 7.4 (비. 브라운 (B. Braun, 네덜란드 오스)) 내로 철야 투석하였다. 투석 후, 샘플을 0.20 μM 폐쇄 단부 필터 상에서 멸균 여과하였다.

[0890] 항체를 1 단위 PNgase F (로슈)/㎍ 항체와 함께 37℃에서 철야 인큐베이션에 의해 탈글리코실화한 후, 단백질 A 상에서 정제하였다.

[0891] 샘플을 비탁법 및 280 nm에서 흡광도에 의해 IgG의 농도에 대해 분석하였다.

[0892] **실시예 41**

[0893] 금속 친화도 크로마토그래피에 의한 재조합 Fab 항체의 정제

[0894] Talon 비드 (클론텍)를 A77-Fab, 2F8-Fab 및 cMet-Fab 항체의 정제를 위해 사용하였다.

[0895] 사용하기 전에, 비드를 1x 평형/세척 버퍼 pH 7.0 (50 mM 인산나트륨 및 300 mM NaCl)로 평형화시킨 후, Fab 항체를 함유하는 배양 상등액과 함께 인큐베이팅하였다. 비드를 1x 평형/세척 버퍼로 세척하여 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하고, His-태깅된 (tagged) 단백질을 pH 5.0에서 1x 용출 버퍼 (50 mM 인산나트륨, 300 mM NaCl 및 150 mM 이미다졸)로 용출하였다. 인큐베이션은 배치식으로 수행하는 반면, 세척 및 용출은 충전된 컬럼에서 원심분리 (700 g에서 2분)를 이용하여 수행하였다. 용출된 단백질을 PD-10 컬럼 상에서 PBS에 교환시킴으로써 탈염시켰다. 정제된 단백질의 수율은 아미노산 서열로부터 계산된 이론적 흡수 계수를 이용하여 280

nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분석하였고, 단백질은 예상 크기에서 하나의 밴드로서 이동하였다.

[0896] **실시예 42**

[0897] 7D8-IgG4 및 7D8-HG 항체의 비-환원성 SDS-PAGE 분석

[0898] 정제 후, CD20 특이적 항체 7D8-IgG1 (IgG1 항-CD20), 7D8-IgG4 (IgG4 항-CD20) 및 7D8-HG (힌지가 없는 IgG4 항-CD20)를 비-환원성 SDS-PAGE 상에서 분석하였다.

[0899] 사용된 Bis-Tris 전기영동 방법은 래믈리 (Laemmli) 방법 (Laemmli UK, Nature 227, 6801 (1970))의 변형이고, 여기서 샘플을 중성 pH에서 실행하였다. SDS-PAGE 겔을 쿠마지 (Coomassie)로 염색하고, GeneGenius (시놉틱스 (Synoptics, 영국 캠브리지))를 사용하여 디지탈 영상화하였다.

[0900] 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 7D8-IgG1은 전장 사량체 (2개의 중쇄 및 2개의 경쇄) 7D8 IgG1 분자임을 나타내는 1개의 주요 결합을 보였다. 7D8-IgG4는 사량체 IgG4 분자임을 나타내는 주요 밴드 외에, 문헌에 설명된 바와 같이 실질적인 양의 1/2 분자 (즉, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄)를 갖는 것을 보여준다 (Schuurman J et. al., Mol Immunol 38, 1(2001); Angal S et al., Mol Immunol 30, 105(1993); Colcher D et al., Cancer Res 49, 1738(1989); King DJ et al., Biochem J 281(Pt 2), 317(1992); Petersen J G et al., J Biol Chem 249, 5633 (1974)). 힌지가 없는 IgG4 분자 7D8-HG는 유일한 1/2 분자인 것으로 나타났다.

[0901] **실시예 43**

[0902] 7D8-HG의 질량 분광법

[0903] 나노스프레이 (Nanospray) 기술에 의한 질량 분광법을 위해, Millipore Microcon YM-30 농축기를 사용하여 샘플을 농축시키고 버퍼를 20 mM 인산나트륨, pH 7.2로 교환하였다. 이어서, 약 100 ㎍ IgG를 16시간 동안 37℃에서 1 U N-글리코시다제 F (로슈, cat. no. 1365177)를 사용하여 소화시켜 N-연결된 글리칸을 방출시켰다.

[0904] 샘플을 C4 마이크로트랩 (microtrap) 카트리지를 사용하여 오프라인 탈염시키고, 30% 프로판올/5% 아세트산 내에 용출시켰다. 분자량 분석은 Q-TOF를 사용하는 나노스프레이 Electrospray-MS (워터스 (Waters, 네덜란드 알메레))를 사용하여 수행하였다. 기기는 글루-피브리노 (glu-fibrino)펩티드를 사용하여 검정하였다. 얻어진 다중-충전된 데이타를 풀어내기 위하여 Masslynx 4.0 소프트웨어를 사용하였다.

[0905] 샘플의 추가의 분취액을 디티오트레이톨을 사용하여 환원시켰다. 환원 생성물을 C4 마이크로트랩을 사용하여 오프라인 탈염시키고 상기한 바와 같이 분석하였다. 환원 조건 하에 7D8-HG의 MS 분석은 23440 달톤의 경쇄 질량을 보여주었고, 이는 23440 달톤의 예측 경쇄 질량과 일치한다. 아마도 중쇄의 침전 때문에, 중쇄의 질량은 검출되지 않았다.

[0906] 비-환원 조건 하에 MS 분석은 71520 달톤의 주된 질량을 보여주었고, 이는 힌지를 잃은 1/2 분자 (하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 합한)의 예측된 질량 (71522 달톤)과 상호관련된다. 질량이 143041 달톤인 미량의 생성물이 관찰되었고, 이는 아마도 힌지가 없는 중쇄를 갖는 사량체 분자를 나타낸다.

[0907] **실시예 44**

[0908] 7D8-HG의 질량 분광학적 펩티드 맵핑 (mapping)

[0909] 7D8-HG의 분취액 (25 ㎍)을 CNBr로 5시간 동안 실온에서 소화시켰다. CNBr 소화시킨 샘플을 동결 건조시킨 후, 10% 수성 암모니아로 pH 8.4로 조정한 50 mM 중탄산암모늄 버퍼 내에 재용해시키고, TPCK-처리된 트립신으로 5시간 동안 37℃에서 소화시켰다. 소화 생성물을 동결건조시키고, 소화시킨 동결건조된 샘플에 대해 pH 8.5에서 Tris-아세테이트 버퍼에서 20배 몰 과량의 디티오트레이톨 (DTT)을 사용하여 환원을 수행하였다. 반응 생성물을 C18 컬럼을 사용하여 온-라인 LC/ES-MS에 의해 분석하였다. 수성 포름산 및 아세토니트릴 구배를 사용하여 용출을 수행하였다. 질량의 검출은 m/z 250 내지 3000 범위에 걸쳐 검정된 LCT Premier Electrospray 질량 분광기를 사용하여 이루어졌다.

[0910] 힌지가 없는 특이적 펩티드 220 VAPEFLGGPSVFLFPPKPK 238의 이론적 질량에 대응하는, 질량이 2026.2 Da인 트립신 분해 펩티드가 검출되었다 (도 2). 상기 펩티드의 동일성을 나노스프레이 MS 및 MS/MS (도 3 및 4)에 의해 확인하였다.

[0911] 상기 결과는 7D8-HG 항체가 힌지 영역을 함유하지 않음을 보여준다.

[0912] **실시예 45**

[0913] 7D8-HG의 분석용 초원심분리 (AUC) 실험에 의한 침강 속도로부터 분자 질량 분포.

[0914] PBS 중 7D8-HG의 1 mg/ml 샘플을 AUC 분석을 위해 나노리틱스 (Nanolytics (독일 달가우))에 보냈다. 속도가 6.7 S (95%)인 7D8-HG 침강물의 주된 집단을 확인하였다. 구별되는 응집물이 11.5 S (2%)에서 발견되었다. 나머지 물질은 보다 고차 응집물로 발견되었다.

[0915] 주요 분획의 침강 계수는 PBS 중의 7D8-HG가 주로 마찰비가 1.4인 이량체로서 발견됨을 나타낸다.

[0916] 명백하게, 7D8-HG는 아마도 CH3 영역에서 저친화도 비-공유 상호작용에 의해 이량체를 형성한다 (Saphire, Stanfield et al., 2002). 상기 이량체화 과정은 과잉의 무관한 항체의 존재 하에 HG 분자를 사용함으로써 억제될 수 있다 (실시예 54 참조) (Saphire, E. O., R. L. Stanfield, et al. (2002). "Contrasting IgG structures reveal extreme asymmetry and flexibility." J Mol Biol 319(1): 9-18).

[0917] **실시예 46**

[0918] 7D8-IgG1, 7D8-IgG4 및 7D8-HG 항체의 기능적 분석

[0919] 상기 CD20 특이적 항체의 CD20 항원에 대한 결합을 유동 세포 측정법에 의해 검사하였다. NSO/CD20 형질감염된 세포 (50,000 세포/50 ㎕)를 FACS 버퍼 (FB: PBS, 0.05% BSA, 0.02% NaN_3)에서 세척하고, V자형 96웰 플레이트에서 시험 항체 (50 ㎕, 4℃에서 30분 동안)와 함께 인큐베이팅하였다. 세척한 후, PE로 표지된 염소 $F(ab)_2$ 항-인간 IgG-카파 (서던 바이오테크놀로지 (Southern Biotechnology), cat No: 2062-09, www.southernbiotech.com)를 세포에 첨가하였다. 세포를 FB에서 세척하고, 세포를 FACS관 내에 150 ㎕의 총 부피로 수집하였다. 샘플을 FACScalibur™ (벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson, 미국 캘리포니아주 샌디에고))을 사용하여 측정하고 분석하였다.

[0920] 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 3가지 항체가 모두 항원 특이적이고, CD20에 우수한 결합을 보였다.

[0921] C1q (전통적 보체 케스케이드의 제1 성분)의 7D1-IgG1, 7D8-IgG4 및 7D8-HG에 대한 결합을 결정하기 위해, ELISA를 수행하였다. 짧게 설명하면, 마이크로타이터 ELISA 플레이트 (그라이너 (Greiner, 독일))를 RT에서 PBS 내에 10 ㎍/ml 내지 0.06 ㎍/ml로 계열 희석시킨 시험 항체로 철야 코팅하였다. 플레이트를 비우고, 웰을 200 ㎕ ELISA-희석제/웰 (0.1M $NaPO_4$, 0.1M NaCl, 0.1% 젤라틴 및 0.05% Tween-20)로 RT에서 30분 동안 차단하였다. 후속적으로, 플레이트를 비우고, 웰을 C1q 버퍼 (0.1% w/v 젤라틴 및 0.05% v/v Tween-20을 보충한 PBS, 100 ㎕/웰, 37℃, 1시간) 내에서 2 ㎍/ml 인간 C1q (퀴델 (Quidel), 로트 #900848)와 함께 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 웰을 C1q 버퍼 (100 ㎕/웰, RT, 1 h) 내에 희석시킨 토끼 항-인간 C1q (다코 (DAKO), A0136)과 함께 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST로 세척한 후 (3x), 웰을 ELISA 희석제 (1:2500, 100 ㎕/웰, RT, 1시간) 내에 희석시킨 HRP-컨쥬게이팅된 돼지 항-토끼 IgG-Fc (다코, P0300, 로트 #069)와 함께 인큐베이팅하였다. 이후에, 플레이트를 3회 세척하고, 분석물을 새로 제조된 1 mg/ml ABTS 용액 (ABTS: 2,2'-아지노-비스[3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산]); 10 ml ABTS 버퍼 중 2개의 5 mg의 정제, 뵈링거 만하임 (Boehringer Mannheim, 독일 인겔하임))를 사용하여 RT에서 암소에서 30분 동안 현상하였다. 흡광도를 405 nm에서 ELISA 플레이트 판독기 (바이오테크 인스트루먼츠 인크. (Biotek Instruments Inc., 미국 위누스키))에서 측정하였다.

[0922] 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, C1q는 7D8-IgG4 및 7D8-HG에 모두 결합하지 않았다. 대조군으로서, 7D8-IgG1에 대한 C1q 결합을 평가하였고, 이는 C1q의 농도 의존적 결합을 보였다.

[0923] CD20-특이적 항체의 보체 특성을 추가로 연구하기 위해, 보체-의존 세포 독성을 검사하였다. 회수한 후, Daudi 세포 (ATCC, www.ATCC.org)를 PBS 내에 3회 세척하고, 1% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA; 로슈, 스위스 바젤)을 보충한 RPMI 1640 중에 2 x 10^6 세포/ml로 재현탁하였다. 이어서, 세포를 96웰 환저 플레이트 내에 1.0 x 10^5 세포/웰로 50 ㎕의 부피 내에 넣었다. 동일한 부피의 항체 (최고 농도 10 ㎍/ml, RPMI 1640 및 1% BSA 내에 희석시킴)를 웰에 첨가하고, 15분 동안 실온 (RT)에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 25 ㎕ 정상 인간 혈청 (NHS)을 첨가하고, 세포를 37℃에서 45분 동안 인큐베이팅하였다. 열-불활성화 혈청 (혈청 ΔT)은 10분 동안 56℃에서 인큐베이팅한 NHS이다. 45분 동안 인큐베이팅한 후, 세포를 재현탁하고, FACS관 (그라이너)에 옮겼다. 이어서, 10 ㎕ 프로피듐 요오다이드 (PI; 시그마-알드리치 케미 비.브이. (Sigma-Aldrich Chemie B.V.))를 상기 현탁액에 첨가하였다 (10 ㎍/ml 용액). 용해물을 죽은 세포 (PI-양성 세포)의 수의 측정치에 의해 유동 세

포 측정법 (FACScaliburTM, 벡톤 디킨슨)에 의해 검출하였다.

[0924] 도 7A에서 볼 수 있는 바와 같이, 7D8-IgG1은 daudi 세포의 우수한 용해를 보인 반면에, 7D8-IgG4 및 7D8-HG는 모두 Daudi 세포의 용해 감소를 보였다.

[0925] 혈청의 역할을 평가하기 위해, 열-불활성화 혈청 (혈청 ΔT)을 10 ㎍ 안티스토프와 함께 인큐베이팅한 세포에 첨가하였다. 도 7B는 용해 유도가 보체-활성 혈청에 의존적이고, 열-불활성화 혈청을 첨가하면 용해가 발생하지 않았음을 보여주었다.

[0926] **실시예 47**

[0927] Betv1-HG 항체의 비-환원성 SDS-PAGE 분석

[0928] 정제 후, Betv1-HG (힌지가 없는 IgG4 항-Betv1)를 비-환원성 SDS-PAGE에서 분석하였다. 사용된 Bis-Tris 전기영동 방법은 래믈리 방법의 변형고, 샘플을 중성 pH에서 실행시켰다. SDS-PAGE 겔을 쿠마지로 염색하고, GeneGenius (시놉틱스)를 사용하여 디지탈 영상화하였다.

[0929] 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, Betv1-HG는 1/2 분자 (즉, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄)를 나타내는 1개의 주요 밴드를 보였다.

[0930] **실시예 48**

[0931] Betv1-HG 항체의 겔 여과

[0932] Betv1-HG를 상기 돌연변이체가 1/2 분자로서 또는 무손상 이량체로서 용출할 것인지 조사하기 위해 겔 여과하였다. 샘플 (100 ㎕)을 애머샴 바이오사이언시스 (Amersham Biosciences, 스웨덴 웁살라)의 HPLC 시스템 (AKTA 익스플로러)에 연결된 Superdex 200 HR 10/30 컬럼 (애머샴 바이오사이언시스)에 적용하였다. 컬럼을 먼저 PBS 중에 평형화시켰다. 250 ㎕의 분획을 모았고, 여기에서 Betv1 특이적 IgG를 항원 결합 분석을 이용하여 측정하였다. 샘플을 또한 214 nm에서 흡수를 측정하였다.

[0933] Betv1 특이적 항체의 항원 결합을 시험하기 위해, 희석된 항체의 샘플을 실온에서 750 ㎕ PBS/AT (0.3% BSA, 0.1% Tween-20, 0.05% NaN3을 보충한 PBS) 중에서 0.75 mg Protein-G 세파로스 (애머샴 바이오사이언시스)와 함께, 50 ㎕의 희석된 ^{125}I-표지된 Betv1 또는 ^{125}I-표지된 Fel d 1과 함께 철야 인큐베이팅하였다. Betv1을 문헌 [Aalberse et al. (Serological aspects of IgG4 antibodies. 1983. 130:722-726)에 설명된 바와 같이 담체 없는 ^{125}I (애머샴 바이오사이언시스)를 사용하는 클로라민-T 방법에 의해 요오드화하였다. 세파로스 현탁액을 PBS-T (0.1% Tween-20을 보충한 PBS)로 세척한 후, 결합된 방사성을 측정하였다. 결과를 첨가된 양에 비한 방사성의 양으로서 표현하였다.

[0934] 힌지가 없는 Betv1-HG의 Betv1 결합 활성은 하나의 피크로 용출되었고, 이는 무손상 힌지를 함유하는 정제된 Betv1-IgG4 (IgG4 항 Betv1)의 용출 피크보다 더 많이 보유되었다 (도 9). 구상 단백질을 사용하는 상기 컬럼의 검정은 Betv1-HG가 분자 크기가 ~70 kD인 단백질에 대응하는 분획에서 용출되었음을 보여주었다 (데이타 미제시). 상기 데이타는 힌지가 없는 IgG4는 1/2 분자로서 존재하고, 보고된 힌지가 없는 IgG1 및 IgG4 분자 (Silverton EW et al., Proc Natl Acad Sci USA 74, 5140 (1977); Rajan SS et al., Mol Immunol 20, 787 (1983); Horgan C et al., J Immunol 150, 5400 (1993))와는 반대로 비-공유 상호작용을 통해 사량체 분자로 회합하지 않는다는 본 발명자들의 관찰을 지지한다.

[0935] **실시예 49**

[0936] Betv1-IgG4 및 Betv1-HG 항체의 기능적 특성화

[0937] 이전에, 혈청-유래된 항원 특이적 IgG4와 대조적으로, 시험관내 생산된 모노클로날 IgG4 항체는 항원 유사 IgG1 항체에 가교결합할 수 있고, 따라서 2가 항체인 것으로 나타났다 (Schuurman J et al., Immunology 97, 693 (1999); Aalberse R C et al., Immunology 105, 9 (2002)). Betv1-IgG1, Betv1-IgG4 및 Betv1-HG의 항원에 가교결합하는 능력은 세파로스 결합된 Betv1 및 ^{125}I 표지된 항원을 사용하는 방사성 면역 분석법으로 결정하였다. 따라서, 자작나무 (Birch) 화분 세파로스를 제조하였다. 간단히 설명하면, 자작나무 화분 추출물 (알레르곤 (Allergon, 스웨덴 앙겔홀름))을 제조자의 지시에 따라 CNBr-활성화된 세파로스 4B (애머샴 바이오사이언시스)에 커플링하였다. 후속적으로, 세파로스를 0.3% BSA, 0.1% Tween-20, 0.05% NaN_3을 보충한 PBS 내에 재현탁

하였다.

[0938] 세파로스 결합된 항원을 ^{125}I 표지된 항원에 가교결합시키는 항체의 능력을 검사하기 위해, 50 ㎕의 희석된 항체를 실온에서 PBS/AT 중 750 ㎕ 세파로스와 함께 철야 인큐베이팅하였다. 이어서, 세파로스 현탁액을 PBS-T로 세척하고, 그 후 현탁액을 실온에서 50 ㎕의 희석된 ^{125}I 표지된 Betv1과 함께 750 ㎕ PBS/AT의 총 부피 내에서 철야 인큐베이팅하였다. 마지막으로, 세파로스를 PBS-T로 세척하고, 결합된 방사성을 측정하였다. 결과를 첨가된 방사성 표지의 양에 비한 결합된 방사성의 양으로서 표현하였다.

[0939] 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 3개의 모든 항체가 항원 특이적이고, 방사성 표지된 Betv1에 우수한 결합을 보였다.

[0940] 도 11에서는 Betv1-IgG1 및 Betv1-IgG4가 세파로스-결합된 Betv1을 방사성 표지된 Betv1에 가교결합시킬 수 있음을 보여준다. IgG1 및 IgG4 항체는 2가 항체로서 거동한다. Betv1-HG 항체는 Betv1 항원에 가교결합할 수 없었고, 따라서 1가 결합을 나타냈다.

[0941] **실시예 50**

[0942] 정상 IgG1, IgG4 및 IgG1 단편에 비교한, IgG4 힌지가 없는 돌연변이체 항체의 약동학적 평가.

[0943] 25마리의 체중 24 내지 27 g의 SCID 마우스 (C.B-17/IcrCrl-scid-BR, 찰스-리버 (Charles-River))를 실험에 사용하였다. 마우스를 중앙 실험 동물 시설 (Central Laboratory Animal Facility; 네덜란드 우트레히트)의 사육실에 수용하고, 필터-탑 (filter-top) 케이지 내에 물과 음식을 자유롭게 제공하면서 유지하였다. 모든 실험은 우트레히트 대학 동물 윤리 위원회 (Utrecht University Animals ethics committee)에서 승인되었다.

[0944] 모노클로날 항체를 꼬리 정맥을 통해 정맥내 투여하였다. 50㎕의 혈액 샘플을 투여 1시간, 4시간, 24시간, 3일, 7일, 14일, 21일 및 28일 후에 복재 정맥으로부터 수집하였다. 혈액을 헤파린 함유 바이알 내에 모으고, 5분 동안 10,000 g에서 원심분리하였다. mAb 농도 결정을 위해 혈장을 -20℃에서 저장하였다.

[0945] 본 실험에서, 힌지가 없는 IgG4 변이체 (7D8-HG, 로트 570-003-EP)의 소실을 정상적인 인간 IgG4 (7D8-IgG4, 로트 570-002-EP), IgG1 변이체 (7D8-IgG1, 로트 793-001-EP), F(ab')$_2$ (7D8-G1-F(ab')2, 로트 815-004-XX) 및 마지막 mAb의 Fab 단편 (7D8-G1-Fab, 815-003-X)과 비교하였다. 각각의 항체를 5마리의 마우스에 마우스당 200 ㎕ 중 0.1 mg의 투여량으로 투여하였다.

[0946] 인간 IgG 농도는 샌드위치 ELISA를 이용하여 결정하였다. 100 ng/웰의 농도로 96웰 Microlon ELISA 플레이트 (그라이너)에 코팅된 마우스 mAb 항-인간 IgG-카파 클론 MH19-1 (#M1272, 시엘비 산퀸 (CLB Sanquin), 네덜란드)을 포획 항체로서 사용하였다. 플레이트를 2% 닭 혈청을 보충한 PBS로 차단한 후, 샘플을 첨가하고, ELISA 버퍼 (0.05% Tween 20 및 2% 닭 혈청을 보충한 PBS) 내에 계열 희석시키고, 플레이트 진탕기 상에서 1 h 동안 실온 (RT)에서 인큐베이팅하였다. 후속적으로, 플레이트를 염소 항-인간 IgG 면역글로불린의 퍼옥시다제-표지된 F(ab')$_2$ 단편 (#109-035-097, 잭슨 (Jackson, 미국 펜실베니아주 웨스트 그레이스))과 함께 인큐베이팅하고, 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)로 현상하였다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (바이오테크)에서 405 nm에서 측정하였다.

[0947] SCID 마우스는 혈장 IgG 농도가 낮고, 따라서 IgG의 소실이 비교적 느리기 때문에 선택되었다. 이는 Fcγ-부분의 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 감소된 결합으로 인한 가속된 소실을 검출하기 위해 매우 민감한 PK 모델을 제공한다.

[0948] 약동학적 분석은 꼬리 보정 (tail correction)하면서 농도-시간 곡선으로부터 곡선하 면적 (AUC)을 결정함으로써 수행하였다. 혈장 소실율은 용량/AUC (ml/일)로서 계산하였다. 통계학적 시험은 GraphPad PRISM vs. 4 (그래프패드 소프트웨어 (Graphpad Software))를 사용하여 수행할 수 있다.

[0949] 도 12는 시간에 따른 농도의 반대수 그래프를 보여준다. 초기 혈장 농도는 힌지가 없는 변이체를 포함한 모든 무손상 mAb에 대해 동일한 순서로 85 - 105 ㎍/ml이었다. 상기 초기 농도는 약 1 ml의 중심 분포 부피에 대응하고, 이는 마우스의 혈장 구획 내로 분포와 일치한다. F(ab')2 및 Fab 단편의 경우에, 각각 75 및 4 ㎍/ml의 보다 낮은 초기 농도가 관찰되었다. Fab 단편의 경우에는, 이는 투여 후 처음 1시간 내의 신속한 혈관외 분포 때문일 것이다.

[0950] 도 13은 개별적인 마우스에 대해 계산된 소실율을 보여준다. 힌지가 없는 변이체의 소실율은 정상 IgG1 및

IgG4보다 3 내지 4배 더 높았다. 그러나, 상기 소실율은 F(ab')2 단편의 소실보다 10배 초과의 속도로 더 느리고, Fab 단편의 소실보다 200배 초과의 속도로 더 느렸다.

[0951] **실시예 51**

[0952] 면역-적격 마우스에서 정상 IgG4 및 IgG1 F(ab)2 단편에 비교한 IgG4 힌지가 없는 돌연변이체 항체의 약동학적 평가

[0953] 12마리의 8주령 Balb/c 마우스 (Balb/CAnNCrl, 찰스-리버)를 실험에 사용하였다. 마우스를 중앙 실험 동물 시설 (네덜란드 우트레히트)의 사육실 내에 수용하고, 멸균 조건 하에 필터-탑 케이지 내에 물과 음식을 자유롭게 제공하면서 유지하였다. 모든 실험은 우트레히트 대학 동물 윤리 위원회에서 승인되었다.

[0954] 모노클로날 항체를 꼬리 정맥을 통해 정맥내 투여하였다. 50 ㎕의 혈액 샘플을 투여 1시간, 4시간, 24시간, 3일, 7일 및 10일 후에 복재 정맥으로부터 수집하였다. 혈액을 헤파린 함유 바이알 내로 모으고, 5분 동안 10,000 g에서 원심분리하였다. mAb 농도 결정을 위해 혈장을 -20℃에서 저장하였다.

[0955] 본 실험에서, 힌지가 없는 IgG4 변이체 (7D8-HG, 로트 570-003-EP)의 혈장 소실율을 정상적인 인간 IgG4 (7D8-IgG4, 로트 570-002-EP), 7D8 IgG1로부터의 $F(ab')_2$ 단편 (7D8-G1-$F(ab')_2$, 로트 815-004-XX)와 비교하였다. 각각의 항체를 4마리의 마우스에 4 mg/kg 체중의 투여량에 대응하는, 마우스당 200 ㎕ 중 0.1 mg의 투여량으로 투여하였다.

[0956] 인간 IgG 혈장 농도는 샌드위치 ELISA를 이용하여 결정하였다. 100 ng/웰의 농도로 96웰 Microlon ELISA 플레이트 (그라이너)에 코팅된 마우스 mAb 항-인간 IgG-카파 클론 MH19-1 (#M1272, 시엘비 산퀸)을 포획 항체로서 사용하였다. 플레이트를 2% 닭 혈청을 보충한 PBS로 차단한 후, 샘플을 첨가하고, ELISA 버퍼 (0.05% Tween 20 및 2% 닭 혈청을 보충한 PBS) 내에 계열 희석시키고, 플레이트 진탕기 상에서 1 h 동안 실온 (RT)에서 인큐베이팅하였다. 세척한 후, 후속적으로, 플레이트를 염소 항-인간 IgG 면역글로불린 (#109-035-097, 잭슨)의 퍼옥시다제-표지된 $F(ab')_2$ 단편과 함께 인큐베이팅하고, 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)로 현상하였다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (바이오테크)에서 405 nm에서 측정하였다.

[0957] Balb/c 마우스는 정상적인 IgG 생산을 갖고, 따라서 SCID 마우스보다 IgG의 소실이 더 빠르기 때문에 선택되었다. 이는 투여된 항체가 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합에 대해 내인성 마우스 IgG와 경쟁할 마우스 모델을 제공한다.

[0958] 도 15는 시간에 따른 농도의 반대수 그래프를 보여준다. 초기 혈장 농도는 모두 대략 100 ㎍/ml이었고, 이는 마우스의 혈장 구획 내로 초기 분포와 일치한다. 힌지가 없는 IgG4 변이체의 소실은 정상 IgG4보다 단지 근소하게 더 빨랐다. 중요하게는, 힌지가 없는 변이체의 소실은 분자 크기가 대등한 $F(ab')_2$ 단편의 소실보다 훨씬 더 느렸다.

[0959] 상기 실험은 Fc-부분이 정상적인 면역계를 갖는 마우스에서 혈장 체류 시간에 유리한 효과를 갖는 것을 나타내고, 또한 내인성 IgG의 존재 하에 신생아 Fc 수용체 (FcRn)와 기능적인 상호작용의 표시를 제공한다.

[0960] **실시예 52**

[0961] 인간 IgG-보충된 SCID 마우스에서 IgG4 힌지가 없는 돌연변이체 항체의 약동학적 평가

[0962] 16마리의 체중 18 내지 22 g의 SCID 마우스 (C.B-17/IcrCrl-scid-BR, 찰스-리버)를 실험에 사용하였다. 마우스를 중앙 실험 동물 시설 (네덜란드 우트레히트)의 사육실 내에 수용하고, 멸균 조건 하에 필터-탑 케이지 내에 물과 음식을 자유롭게 제공하면서 유지하였다. 모든 실험은 우트레히트 대학 동물 윤리 위원회에서 승인되었다.

[0963] 면역결핍 SCID 마우스가 지속 기간이 1주를 초과하는 소실 연구에 영향을 미칠 수 있는 인간 단백질에 대한 항체 반응을 일으키지 않기 때문에 힌지가 없는 IgG4 변이체의 약동학을 연구하기 위해 선택되었다. 생리학적 관련 농도에서 인간 IgG의 존재 하에 힌지가 없는 IgG4 돌연변이체의 소실을 연구하기 위해 상기 IgG-결핍 마우스에게 고용량의 정맥내 면역글로불린 (인간 복수공여자 폴리클로날 IgG)을 보충하였다. 이는 1) 힌지가 없는 IgG4의 2가 형태로의 회합이 IVIG의 존재에 의해 방지되고, 2) 힌지가 없는 IgG4가 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합에 대해 다른 IgG와 경쟁하기 때문에 인간 내에서 상태를 보다 잘 나타내는 마우스 모델을 제공한다 (Bazin R, et al. Use of hu-IgG-SCID mice to evaluate the in vivo stability of human monoclonal IgG antibodies. J Immunol Methods. 1994; 172: 209-17). FcRn에 대한 결합은 IgG를 세포내 이입 후 세포내 분해

로부터 보호하고, 그의 긴 혈장 반감기에 기여한다.

[0964] 상기 모델에서, 인간 CD20 특이적 인간 mAb 클론 7D8으로부터의 변이체의 혈장 소실을 연구하였다. 힌지가 없는 IgG4 변이체 (7D8-HG, 로트 992-001-EP)의 소실율을 정상적인 인간 IgG4 (7D8-IgG4, 로트 992-002-EP), 7D8 IgG1으로부터의 $F(ab')_2$ 단편 (7D8-$F(ab')_2$, 로트 892-020-XX)의 소실율과 비교하였다. 또한, 효소에 의해 탈글리코실화된 힌지가 없는 변이체의 제제 (TH3001-7D8-HG deglyc, 로트 991-004-EP)를 시험하였다. 각각의 항체를 4마리의 마우스에 약 5 mg/kg 체중의 투여량에 대응하는, 200 ㎕ 중 0.1 mg의 투여량으로 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 모노클로날 항체를 정맥내 면역글로불린 (60 mg/ml, 산퀸, JFK108ST, charge# 04H04H443A)과 1:1 혼합물로 투여하였다. 총 주사된 부피는 400 ㎕/마우스로서, 마우스당 12.5 mg의 IVIG 용량을 제공한다.

[0965] 50 ㎕의 혈액 샘플을 투여 15분, 5시간, 24시간, 2일, 3일, 7일 및 10일 후에 복재 정맥으로부터 수집하였다. 혈액을 헤파린 함유 바이알 내로 수집하고, 10분 동안 14,000 g에서 원심분리하였다. mAb 농도 결정을 위해 혈장을 -20℃에서 저장하였다. 7D8 변이체의 혈장 농도는 샌드위치 ELISA를 사용하여 결정하였다. 마우스 mAb 항-7D8-개별특이형 항체 (클론 2F2 SAB 1.1 (LD2), 로트 0347-028-EP)를 포획 항체로서 사용하였다. 플레이트를 0.05% Tween 및 2% 닭 혈청을 보충한 PBS로 차단한 후, 샘플을 첨가하고, ELISA 버퍼 (0.05% Tween 20 및 2% 닭 혈청을 보충한 PBS) 내에 계열 희석시키고, 플레이트 진탕기 상에서 2 h 동안 실온 (RT)에서 인큐베이팅하였다. 주입된 항체를 참조물로서 사용하였다. 세척한 후, 플레이트를 후속적으로 퍼옥시다제-표지된 염소 항-인간 $F(ab')_2$ 특이적 (109-035-097, 잭슨 이뮤노리서치 (Jackson Immunoresearch, 미국 펜실베니아주 웨스트그레이스))과 함께 인큐베이팅하고, 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈)로 현상하였다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (바이오테크)에서 405 nm에서 측정하였다. 총 인간 IgG 혈장 농도는 유사한 ELISA를 이용하여 결정하였다. 마우스 mAb 항-인간 IgG-카파 클론 MH16 (#M1268, 시엘비 산퀸)을 포획 항체로서 사용하였다. 퍼옥시다제-표지된 염소 항-인간 IgG 면역글로불린 (#109-035-098, 잭슨)을 검출을 위해 사용하였다.

[0966] 약동학적 분석은 꼬리 보정하면서 농도-시간 곡선으로부터 곡선하 면적 (AUC)을 결정함으로써 수행하였다. 혈장 소실율은 용량/AUC (ml/일)로서 계산하였다. 통계학적 시험은 GraphPad PRISM vs. 4 (그래프패드 소프트웨어)를 사용하여 수행할 수 있다.

[0967] 도 20은 상부 패널에서 시간에 따른 mAb 7D8 변이체의 농도의 반대수 그래프를 보여주고, 하부 패널에서 총 인간 IgG 농도를 보여준다. 초기 총 인간 IgG 농도는 평균 2.3 mg/ml이었고 10일 후 0.47 mg/ml로 저하되었다. 7D8 IgG4 및 IgG4 HG 변이체의 초기 혈장 농도는 94 내지 180 ㎍/ml이었고, 이는 마우스의 혈장 구획 내로 초기 분포와 일치한다. $F(ab')_2$ 단편의 경우에, 초기 농도는 평균 62 ㎍/ml로 다소 더 낮았다. 상부 패널은 탈글리코실화된 제제를 포함한 힌지가 없는 변이체의 소실이 무손상 IgG4보다 다소 더 빠르지만, $F(ab')_2$ 단편보다는 훨씬 더 느림을 분명하게 보여준다. 하기 표는 농도-시간 곡선으로부터 계산된 소실율을 보여준다. 힌지가 없는 변이체의 소실율은 정상 IgG4의 소실율보다 2 내지 3배 더 높았다. 그러나, $F(ab')_2$ 단편의 소실율보다 거의 10배 더 느렸다. 중요하게는, 탈글리코실화는 힌지가 없는 IgG4 변이체의 소실율에 유의한 효과를 나타내지 않았다.

[0968]

혈장 소실율 (D/AUC) ml/일/kg	IgG1 $F(ab')_2$	IgG4	IgG4 HG	IgG4 HG 탈글리코실화
평균	380	14	39	29
평균의 하부 95% CI	346	12	25	19
평균의 상부 95% CI	415	17	53	38
값의 수	4	4	4	4

[0969] 따라서, 또한 인간 IgG의 존재 하에 생리학적 관련 농도에서, 힌지가 없는 변이체의 소실은 분자 크기가 대등한 $F(ab')_2$ 단편보다 훨씬 더 느리다. 상기 실험은 또한 경쟁하는 인간 IgG의 존재 하에 생리학적 관련 농도에서, 힌지가 없는 IgG4 변이체는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)와 기능적으로 상호작용할 수 있음을 나타낸다. 또한, 상기 실험은 힌지가 없는 IgG4 변이체의 글리코실화가 혈장 소실에 영향을 미치지 않고, 비-글리코실화된 힌지가 없는 IgG4가 완전 글리코실화된 형태와 유사한 생체내 반감기를 갖는 것을 나타낸다.

[0970] **실시예 53**

[0971] FcRn-/- 마우스에서 정상 IgG4 및 IgG1 $F(ab)_2$ 단편과 비교한 IgG4 힌지가 없는 돌연변이체 항체의 약동학적 평가

[0972] 상기 실험은 IgG4 힌지가 없는 돌연변이체가 IgG를 세포내 이입 후 세포내 분해로부터 보호함으로써 IgG의 긴 혈장 반감기에 기여하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)와 상호작용할 수 있는지 여부를 조사하기 위해 수행하였다. B2M 낙아웃 마우스가 FcRn을 발현하지 않기 때문에 본 실험에서 사용하였다.

[0973] 12마리의 암컷 C57BI/6 B2M 낙아웃 마우스 (타코닉 (Taconic) 모델 B2MN12-M, FcRn-/- 마우스로서 칭함), 및 12마리의 암컷 C57BI/6 야생형 대조 마우스 (타코닉, 모델 nr. B6, WT 마우스로서 칭함)를 실험을 위해 사용하였다. 마우스를 중앙 실험 동물 시설 (네덜란드 우트레히트)의 사육실 내에 수용하고, 필터-탑 케이지 내에 물과 음식을 자유롭게 제공하면서 유지하였다. 모든 실험은 우트레히트 대학 동물 윤리 위원회에서 승인되었다.

[0974] 인간 CD20 특이적인 인간 mAb 클론 7D8로부터의 변이체의 혈장 소실을 연구하였다. 힌지가 없는 IgG4 변이체 (7D8-HG, 로트 992-001-EP)의 소실율을 정상적인 인간 IgG4 (7D8-IgG4, 로트 992-002-EP), 7D8-IgG1의 $F(ab')_2$ 단편 (7D8-G1-$F(ab')_2$, 로트 892-020-XX)과 비교하였다.

[0975] 모노클로날 항체를 꼬리 정맥을 통해 정맥내 투여하였다. 각각의 항체를 4마리의 마우스에 5 mg/kg 체중의 투여량에 대응하는, 마우스당 200 ㎕ 중의 0.1 mg의 투여량으로 투여하였다. 50 ㎕의 혈액 샘플을 투여 10분, 5시간, 24시간, 2일, 3일, 7일, 및 10일 후에 복재 정맥으로부터 수집하였다. 혈액을 헤파린 함유 바이알 내로 수집하고, 10분 동안 14,000 g에서 원심분리하였다. mAb 농도 결정을 위해 혈장을 -20℃에서 저장하였다. 인간 IgG 혈장 농도는 100 ng/웰의 농도로 96웰 Microlon ELISA 플레이트 (그라이너)에 코팅된 마우스 mAb 항-인간 IgG-카파 클론 MH19-1 (#M1272, 시엘비 산퀸)을 포획 항체로서 사용하는 샌드위치 ELISA를 사용하여 결정하였다. 플레이트를 ELISA 버퍼 (0.05% Tween 20 및 2% 닭 혈청을 보충한 PBS)로 차단한 후, 샘플을 첨가하고, ELISA 버퍼 내에 계열 희석시켰다. 대응하는 주입된 항체 제제의 계열 희석액을 참조물로서 사용하였다. 인큐베이션 및 세척 후, 플레이트를 퍼옥시다제-표지된 AffiniPure 염소 항-인간 IgG, $F(ab')_2$ 단편 특이적 (#109-035-097, 잭슨 이뮤노리서치)와 함께 인큐베이팅하고, 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈)로 현상하였다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (바이오테크)에서 405 nm에서 측정하였다. 약동학적 분석은 꼬리 보정하면서 농도-시간 곡선으로부터 곡선하 면적 (AUC)을 결정함으로써 수행하였다. 혈장 소실율은 용량/AUC (ml/일)로서 계산하였다. 통계학적 분석은 GraphPad PRISM vs. 4 (그래프패드 소프트웨어)를 사용하여 수행하였다.

[0976] 도 21은 시간에 따른 농도의 반대수 그래프를 보여준다. 초기 혈장 농도는 모두 대략 100 ㎍/ml이었고, 이는 마우스의 혈장 구획 내로 초기 분포와 일치한다. 하기 표는 개별 마우스의 농도-시간 곡선으로부터 계산된 혈장 소실율을 보여준다.

[0977]

혈장 소실율 ml/일/kg	$F(ab')_2$ WT	$F(ab')_2$ FcRn-/-	IgG4 WT	IgG4 FcRn-/-	IgG4 HG WT	IgG4 HG FcRn-/-
평균	183	159	12	45	15	83
표준 편차	19	19	10	3	4	29
값의 수	4	4	4	4	4	4
유의성 차이: P값 (t-테스트)	0.1265 ns		0.0009 ***		0.0033 **	

[0978] F(ab')2 단편에 대하여, 야생형 (WT)과 낙아웃 (FcRn-/-) 마우스 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 반대로, IgG4 및 힌지가 없는 IgG4 변이체에 대하여, FcRn-/- 마우스에 비해 WT 마우스에서 소실율이 3 내지 5배 더 느렸다. 상기 실험은 FcRn의 존재가 힌지가 없는 IgG4의 혈장 체류 시간에 유리한 효과를 가짐을 보여준다. 따라서, 이는 힌지가 없는 IgG4가 생체 내에서 FcRn과 기능적으로 상호작용할 수 있다는 증거를 제공하고, 이는 그의 유리한 혈장 반감기를 설명한다.

[0979] **실시예 54**

[0980] 2F8-HG 항-EGFr mAb의 기능적 분석

[0981] MAb 2F8은 리간드의 결합을 차단함으로써 EGFr 신호전달을 억제할 수 있는 인간 표피 성장 인자 수용체 (EGFr)에 대한 인간 IgG1 모노클로날 항체 (mAb)이다. 상기 mAb로부터, IgG4 변이체, 2F8-IgG4 및 또한 힌지가 없는

변이체, 2F8-HG가 제조된다. 본 실시예에서, 세포에서 리간드-유도된 EGFr 인산화를 시험관 내에서 억제하는 2F8-HG의 효력을 2F8-IgG1 및 2F8-Fab 단편의 효력과 비교하였다. 이는 정맥내 면역글로불린 (IVIG), 모든 IgG 서브클래스를 함유하는 폴리클로날 인간 IgG 제제를 첨가하여, 또한 첨가하지 않고 수행되었다.

[0982] EGFr 인산화의 억제는 표피유사 세포주, A431 (ATCC, 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션, 미국 매나사스)를 사용하는 2-단계 분석으로 측정하였다. 세포를 96웰 플레이트에서 0.5% 인간 알부민 (인간 알부민 20%, 산퀸)을 함유하는 무혈청 배지 내에서 철야 배양하였다. 이어서, mAb를 계열 희석액으로, IVIG (Immunoglobuline I.V. 산퀸)과 함께 또는 단독으로 100 또는 1000 ㎍/ml의 고정된 최종 농도로 첨가하였다. 37℃에서 60분 인큐베이션 후, 50 ng/ml의 재조합 인간 EGF (바이오-소스 (Bio-source))를 첨가하여 비-차단된 EGFr의 활성화를 유도하였다. 추가의 30분 인큐베이션 후, 세포를 용해 버퍼 (셀 시그널링 테크놀로지 (Cell Signaling Technology, 미국 매사추세츠주 베벌리))로 용해시키고, 용해물을 1 ㎍/ml의 마우스 항-EGF-R 항체 (mAb EGFR1, 비디 파밍엔 (BD Pharmingen, 미국 캘리포니아주 샌디에고))로 코팅된 ELISA 플레이트에 옮겼다. RT에서 2시간 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하고, 인산화된 EGF-R의 결합을 인산화 타이로신에 특이적인 유로퓸-표지된 마우스 mAb (mAb Eu-N1 P-Tyr-100, 퍼킨 엘머)를 사용하여 검출하였다. 마지막으로, DEL-FIA 강화 용액을 첨가하고, 315 nm에서 여기시키고 EnVision 플레이트 판독기 (퍼킨 엘머) 상에서 615 nm에서 방출을 측정함으로써 시간-분해 형광을 측정하였다. 비-선형 회귀 (GraphPad Prism 4)를 이용하여 S자형 용량-반응 곡선을 계산하였다.

[0983] 도 14의 상부 패널에서 볼 수 있는 바와 같이, IVIG를 첨가하지 않은 배양 배지가 사용될 때 2F8-HG는 인산화를 억제하는데 있어서 2F8-IgG1과 동등하게 효과적이었다. 두 mAb는 EGFr에 1가 결합하는 2F8-Fab 단편보다 더 강력하였다. 도 14의 중간 및 하부 패널은 IVIG의 첨가가 2F8-IgG4 및 2F8-Fab에 대해서는 무시할 정도의 효과를 가졌음을 보여준다. 그러나, 이는 2F8-HG의 용량-반응 곡선을 현저하게 우측으로 이동시켰고, 이는 결합 특성에서의 변화를 나타내고, 이는 특정 조건 하에 2F8-HG가 2가 항체로서 거동하지만, 폴리클로날 인간 IgG의 존재하에 1가 형태로 해리할 수 있다는 생각과 일치한다.

[0984] **실시예 55**

[0985] 원리 증명: CD89에 대한 IgG4 힌지가 없는 (CD89-HG)는 마우스 모델에서 IgE-매개 천식을 억제한다.

[0986] 문헌 [Pasquier, B et al., Immunity 22, 31 (2005)]에서는 FcαRI (CD89 (Monteiro RC et al., Annu Rev Immunol 21, 177 (2003))가 소염 및 염증유발 역할을 모두 갖는 것을 보였다. FcαRI의 응집은 Syk의 동원 및 SHP-1 결합을 차단하여 세포 활성화를 일으킨다. FcαRI과의 단량체 상호작용은 활성화 반응을 억제한다: SHP-1이 동원되고, Syk, LAT 및 ERK 인산화의 손상이 일어난다.

[0987] 항-CD89 항체의 Fab 단편 (클론 A77)은 인간 단핵구를 이용하는 IgG-매개 포식작용을 억제할 수 있다. 또한, FcαRI 형질감염된 RBL-2H3 세포를 사용하는 시험관 내에서 및 IgE-매개 천식 모델에서 생체 내에서 IgE-매개 반응은 상기 항-CD89 항체의 Fab 단편에 의해 억제되었다. 상기 동물 모델에서, FcαRI-유전자 도입된 마우스 (Launay P et al., J Exp Med 191, 1999 (2000))를 TNP-OVA로 감작시켰다. A77 Fab-단편의 존재 하에 IgE-TNP-OVA 면역 복합체로 비내 시험접종한 마우스는 메타콜린에 대해 감소된 기관지 반응성을 보인 반면, 무관한 Fab-단편은 기관지 과민반응성을 감소시킬 수 있다.

[0988] 항원 특이적, 비-가교결합성의 1가 비-활성화 항체의 시험관내 원리 증명을 다음 실험에서 얻었다. 부착성 PBMC를 무관한 IgG4 (Genmab BV)와 함께 또는 그 없이 24 h 예비 인큐베이팅한 10 ㎍/ml A77-HG (IgG4 힌지가 없는)와 함께 인큐베이팅하거나, 또는 무관한 HG 항체와 함께 30분 동안 37℃에서 인큐베이팅하고, 세척하고, 37℃에서 30분 동안 제조사의 지시에 따라 폴리클로날 토끼 항-이. 콜라이 IgG 항체로 옵소닌화된 (opsonized) 또는 되지 않은 텍사스-레드 (Texas-red)-컨쥬게이팅된 이. 콜라이 (50 세균/세포) (몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes, 미국 오레곤주 유진))와 함께 인큐베이팅하였다. 슬라이드를 탑재하고 공초점 레이저 현미경으로 검사하였다. 옵소닌화된 이. 콜라이 및 A77-HG (무관한 IgG4와 함께 예비 인큐베이팅된)를 받은 PBMC는 이. 콜라이 및 대조-HG 항체를 받은 PMBC에 비해 감소된 이. 콜라이의 포식작용을 보였다.

[0989] FcαRI-유전자 도입된 마우스를 문헌 [Pasquier B et al., Immunity 22, 31 (2005)]에 설명된 바와 같이 TNP-OVA로; 또는 별법으로 문헌 [Deurloo D T et al., Clin Exp Allergy 33, 1297 (2003)]에 설명된 바와 같이 OVA로 감작시킨다. 인간 FcαRI 유전자 도입된 마우스 및 한배 새끼 대조군을 수산화알루미늄 중 TNP-OVA 또는 OVA (시그마)로 복강 내로 0일 및 7일에 2회 면역화시킨다. 마우스를 A77-HG (IgG_4 힌지가 없는) 또는 무관한 힌지가 없는 항체 (대조군-HG)의 존재 하에 20 ㎍ 항-DNP-IgE와 복합체화된 TNP-OVA (Zuberi, R I et al., J Immunol 164, 2667 (2000)) 또는 OVA 에어로졸 (Deurloo D T et al., Clin Exp Allergy 33, 1297 (2003))로

연속하여 수일 동안 비내 시험접종한다.

[0990] 마우스에게 50 ㎍ A77-HG 또는 대조-HG를 2회 (한번은 시험 접종 기간 동안, 다른 한번은 마지막 비내 시험 접종시에) 복강 내 투여한다. 최종 비내 시험 접종 12시간 후, 마우스를 전신 체적변동기록기 (plethysmograph) 챔버 (북스코 일렉트로닉스 (BUXCO Electronics, 미국 코네티컷주 샤론))에 넣고, 300 mM 메타콜린을 투여한다. 메타콜린에 노출된 후 기도 저항을 측정한다. 마우스를 안락사시킨 후 폐 절편에 대해 면역조직학적 평가를 수행한다.

[0991] A77-HG를 투여한 마우스는 대조군-HG 항체를 투여한 마우스에 비해 감소된 과민반응성을 보인다.

[0992] 이는 힌지가 없는 IgG_4 분자가 비-가교결합성의 1가이고 비-활성화 상태이기 때문에, 상기 불활성 항체가 유용할 수 있는 치료 목적, 예를 들어 FcαRI를 통한 염증 반응의 억제에서 유용함을 나타낸다.

[0993] **실시예 56**

[0994] 힌지가 없는 IgG4 cMet (cMet-HG)를 사용하는 개념 증명 연구

[0995] 수용체 티로신 키나제 c-Met는 매우 다양한 상피 세포에서 현저하게 발현된다. 배아형성 동안, cMet 및 간세포 성장 인자/산란 인자 (HGF/SF)는 조직-특이적 분화에 관여하여, 상피 세포, 근육 내피, 및 신경 및 조혈계의 적절한 유기화를 일으킨다. 비정상적인 cMet 신호전달은 종양발생, 특히 침습 및 전이 종양의 발달에 관련된다. 향상된 cMet 활성의 결과로서, 종양 세포는 성장률이 증가되고 세포자멸에 저항성으로 될 수 있어서, 성장 및/또는 생존 잇점을 갖는다. 또한, cMet 활성화는 세포골격 재유기화 및 인테그린 활성화, 및 세포외 매트릭스 분해에 관여되는 단백분해계의 활성화를 일으킬 수 있어서, 침습 및 전이 능력을 증가시킨다. 따라서, HGF/SF-cMet 신호 전달의 억제는 악성 종양의 치료를 위한 중요한 치료 수단을 나타낸다.

[0996] 문헌 [Kong-Beltran et al, Cancer Cell (2004 volume 6, pages 75-84)]에서는 cMet의 세포외 도메인에 대한 항체 (5D5)를 생성시키고 HGF 결합을 억제시켰다. 항-Met 5D5의 Fab 단편은 HGF-유도 cMet 인산화, 세포 운동성, 이동 및 종양 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 이들은 항-cMet-5D5-Fab가 입체 방해에 의해 수용체 이량체화를 차단하는 것으로 추측한다.

[0997] MAb C6은 높은 친화도로 H441 세포에 결합할 수 있고, cMet 인산화를 활성화시키고, DU-145의 산란을 유도하고, ELISA에서 cMet에 대한 HGF 결합을 차단하는, 인간 cMet에 대한 인간 IgG1 모노클로날 항체 (mAb)이다. 상기 mAb로부터, Fab 단편 (cMet-Fab), IgG4 변이체 (cMet-IgG4), 및 또한 힌지가 없는 변이체 (cMet-HG)가 제조되었다.

[0998] cMet에 대한 힌지가 없는 IgG4 (cMet-HG)를 사용하는 개념 증명 연구에서, 상기 1가 항체는 HGF 결합, 수용체 이량체화/활성화, 세포 산란, 및 하류 신호 전달을 억제하였다. 상기 실험은 정맥내 면역글로불린 (IVIG), rHGF를 갖거나 갖지 않고 모든 IgG 서브클래스를 함유하는 폴리클로날 인간 IgG 제제를 첨가하고 또한 첨가하지 않고 수행하였다.

[0999] *DU-145 산란 분석*

[1000] DU-145 (인간 전립선 암종 세포주, ATCC HTB-81) 세포를 DMEM+ (500 ml MEM 둘베코 (Dulbecco) 함유 (DMEM-배지, 글루코스 4.5 g/ml, $NaHCO_3$를 갖는, 글루타민을 갖지 않는, 시그마, D-6546), 50 ml Cosmic 송아지 혈청 (하이클론 (Hyclone) SH30087.03), 5 ml의 200 mM/L L-글루타민 (바이오 휘태커 (Bio Whittaker), BE17-605F), 5 ml 피루브산나트륨 (바이오 휘태커 BE13-115E), 5 ml 페니실린/스트렙타미신 (바이오 휘태커, DE17-603E)) 내에서 배양하고, 부착성 밀집된 세포를 성장시켰다. rhHGF (시그마, H-1404)을 첨가하면, 세포의 이동이 유도되고, 이는 단수화된 세포를 생성시켰다. 상기 과정은 산란으로 불린다. 산란의 유도 또는 억제를 현미경에 의해 관찰하였다.

[1001] 1일: cMet, cMet-HG, cMet-Fab, cMet-IgG4 (30/3.0/0.3/0.03 ㎍/ml)를 IVIG 6 mg/ml을 첨가하거나 첨가하지 않고 철야 인큐베이팅하였다. DU145 세포를 접종하였다 (T75-배양 플라스크 중의 부착 세포). 세포 배양액 상등액을 제거하고, 세포를 10 ml PBS로 1회 세척하였다. 2 ml 트립신/EDTA를 첨가하고 (37℃), 세포를 37℃에서 1-2분 동안 인큐베이팅하였다. 세포를 두드려 배양 플라스크의 표면으로부터 제거하고, 저장된 배양 상등액을 사용하여 트립신/EDTA 반응을 중지시켰다. 세포를 계수하고, 신선한 배양 배지 중에 $1*10^4$ 세포/ml의 현탁액을 제조하고, 50 ㎕/웰을 96웰 플레이트 (멸균 평저 Costar, 3596) (최종 밀도 1000 세포/웰) 내로

플레이팅하였다. 세포를 15-24 h 동안 37℃ 및 5% CO_2에서 인큐베이터 내에서 배양하였다.

[1002] 2일: 배지를 신선한 배지 40 ㎕/웰로 교체하였다. 40 ul의 예비 인큐베이팅된 항체를 세포에 첨가하고, 세포를 37℃에서 인큐베이터 내에서 60분 동안 인큐베이팅한 후, 40 ㎕/웰 배지 또는 60 ng/ml rh-HGF를 첨가하였다 (최종 농도는 10/1.0/0.1/0.01 ㎍/ml Ab, 2 mg/ml IVIG, 20 ng/ml HGF이었다). 세포를 적어도 24 h 동안 인큐베이팅하였다.

[1003] 3일 및 4일: 24 h 후 또는 48 h 후에 산란을 이중맹검법으로 현미경에 의해 관찰하였다. 산란의 형태학상 특성: 표면으로부터 세포 탈착은 방추형 (이동)을 보여주고, 대부분은 클러스터로서가 아니라 단일 세포로 존재하였다.

[1004] 항체에 의한 rh-HGF 유도된 산란 억제의 등급:

[1005] 3: 세포가 최대로 산란함.

[1006] 2: 산란의 적은 억제

[1007] 1: 산란의 억제

[1008] 0: 산란 없음.

[1009] 상기 실험에서, IVIG와 함께 예비 인큐베이팅된 C6-HG는 HGF 유도된 산란을 유의하게 차단하였다.

[1010] *cMet 수용체의 인산화*

[1011] A549 세포를 Ham's F12 배지 내에서 배양하였고, cMet는 정상적인 배양 조건 하에서 인산화되지 않았다. HGF에 의해 활성화시키면, cMet 수용체를 인산화되었다. IVIG의 예비인큐베이션과 함께 cMet-Fab 또는 cMet-HG를 차단하는 cMet를 적용함으로써, 수용체의 HGF 매개 인산화가 억제되었다.

[1012] 1일: cMet-IgG1, cMet-HG (12.5 ㎍/ml)를 IVIG 2.5 mg/ml을 첨가하거나 첨가하지 않고 철야 인큐베이팅하였다. A549 세포 ($1*10^6$ /웰)을 6웰 플레이트 내에서 배양하였다.

[1013] 2일: 배양 배지 (500 ml Ham's F12 (바이오 휘태커 BE12-615F), 50 ml Cosmic 송아지 혈청 (하이클론 SH30087.03), 5 ml의 200 mM/L L-글루타민 (바이오 휘태커, BE17-605F), 5 ml 페니실린/스트렙타미신 (바이오 휘태커, DE17-603E) 함유)를 제거하고, 800 ㎕의 예비 인큐베이팅된 항체를 세포에 첨가하고, 세포를 37℃에서 인큐베이터 내에서 15분 동안 인큐베이팅한 후, 200 ㎕/웰 배지 또는 80 ng/ml rh-HGF를 첨가하였다 (최종 농도는 10 ㎍/ml Ab, 2 mg/ml IVIG, 16 ng/ml HGF이었다). 추가의 15분 인큐베이션 후, 인큐베이션 배지를 제거하고, 세포를 빙냉 PBS로 2회 세척하고, 250 ㎕ RIPA 용해 버퍼 (50 mM Tris, pH 7.5, 0.5% Na 데옥시콜레이트 및 0.1% Nonidet P40, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 2 mM 바나데이트 및 Complete (프로테아제 억제제, 로슈 1836170) 함유)를 첨가하고, 플레이트를 10분 동안 4℃에서 부드럽게 회전시켰다. 용해물을 예냉시킨 튜브 (에펜도르프 (Eppendorf))에 옮기고, 최고 속도에서 30분 동안 4℃에서 원심분리하였다. DNA를 제거하고, 분획을 BCA 단백질 함량 분석 (피어스 (Pierce))을 측정하기 위해 사용한 후 용해물을 N_2 내에서 급속 냉동하였다. 용해물을 웨스턴-블로트에 의한 분석까지 -80℃에서 저장하였다. 10 ㎍의 환원된 샘플을 표준 과정에 따라 4-20% Tris-HCl Criterion Precast 겔 (바이오라드 (Biorad) 345-0033) 상에서 전기영동 및 니트로셀룰로스 막 (바이오라드 162-0114) 상에서 웨스턴 블로팅하였다. 막을 롤러 뱅크 상에서 차단 용액 (TBST (Tris-HCL 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, 0.1% Tween 20) 중의 5% BSA (로슈, 10735086) 함유)으로 1.5시간 동안 실온에서 차단하였다. 막을 항-포스포-Met(pYpYpY 1230 1234 1235)-토끼 IgG (아빔, ab5662)의 1:1000 희석액과 함께 4℃에서 철야 인큐베이팅하였다. TBST로 6회 세척한 후, 차단 시약 중의 2차 항체인 염소-항-토끼-HRP (셀 시그날링, 7074 (1:2000))를 롤러 뱅크 상에서 60분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 막을 TBST로 6회 세척하였다. 마지막으로, 밴드를 루미놀 인핸서 정지 용액 (피어스 1856145)으로 현상하고, Lumiimager 상에서 분석하였다.

[1014] IVIG와 함께 예비 인큐베이팅한 cMet-HG는 수용체의 HGF 매개 인산화를 억제한다.

[1015] 도 22

[1016] DU-145 세포를 배양하고, (A) cMet-Fab, cMet-Fab 및 IVIG, cMet-Fab 및 HGF, cMet-Fab 및 IVIG 및 HGF, (B) cMet-HG, cMet-HG 및 IVIG, cMet-HG 및 HGF, cMet-HG 및 IVIG 및 HGF의 계열 희석액과 함께 인큐베이팅하였다. 산란을 48 h 후 현미경으로 이중맹검으로 관찰하였고, 평균 스코어±SEM을 플로팅하였다.

[1017] IVIG와 함께 또는 그 없이 cMet-Fab (A) 및 IVIG와 함께 예비 인큐베이팅된 cMet-HG (B)는 HGF 유도된 산란 용량을 독립적으로 유의하게 차단하였다.

[1018] 도 23

[1019] DU-145 세포를 배양하고, 10 ㎍/ml의 (A) cMet-Fab, cMet-Fab 및 IVIG, cMet-Fab 및 HGF, cMet-Fab 및 IVIG 및 HGF, (B) cMet-HG, cMet-HG 및 IVIG, cMet-HG 및 HGF, cMet-HG 및 IVIG 및 HGF와 함께 인큐베이팅하였다. 산란을 48 h 후 현미경으로 이중맹검으로 관찰되었다 (14명에 의해 평가됨).

[1020] IVIG와 함께 또는 그 없이 cMet-Fab 및 IVIG와 함께 예비 인큐베이팅된 cMet-HG는 HGF 유도된 산란을 유의하게 억제하였다. 통계학적 분석을 위해, 가설 중간값 3 (최대 산란)을 사용하여 양쪽 꼬리 윌콕슨 부호순위 시험을 수행하였다.

[1021] 도 24

[1022] cMet-HG (레인 1), cMet-HG 및 IVIG (레인 2), cMet-HG 및 HGF (레인 3), cMet-HG, IVIG 및 HGF (레인 4), cMet-IgG1 (레인 5), cMet-IgG1 및 IVIG (레인 6)과 함께 인큐베이팅한 A549 세포로부터 제조한 추출물을 4-20% Tris-HCl Criterion Precast 겔 상의 SDS-PAGE 및 니트로셀룰로스 막 상의 웨스턴 블로팅에 의해 분리하였다. 막을 항-포스포-Met(pYpYpY 1230 1234 1235)-토끼 IgG (아빔, ab5662)와 함께 4℃에서 철야 인큐베이팅하였다. TBST로 세척한 후, 차단 시약 중의 2차 항체인 염소-항-토끼-HRP (셀 시그날링, 7074)를 롤러 뱅크 상에서 60분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 막을 TBST로 6회 세척하였다. 마지막으로, 밴드를 루미놀 인핸서 정지 용액으로 현상하고, Lumiimager로 분석하였다. 웨스턴 블로트는 169 Kd 밴드를 보여주고, 이것은 포스포-Met(pYpYpY 1230 1234 1235)를 나타낸다.

[1023] **실시예 57**

[1024] 표피 성장 인자 수용체 (EGFr)를 표적하는 IgG4 힌지가 없는 돌연변이체 항체의 시험관내 평가: 항체 의존 세포-매개 세포독성 (ADCC)의 결합 친화력 및 유도.

[1025] 상기 실험에서, 표피 성장 인자 수용체 (EGFr)을 표적하는 IgG4 힌지가 없는 돌연변이체 항체인 mAb 2F8-HG를 IgG4 형태, IgG1 형태 및 Fab 단편 (각각 2F8-IgG4, 2F8-IgG1 및 2F8-Fab로 칭함)에 비교하였다. 시험관내 평가는 ELISA에서 EGFr에 대한 결합의 친화력 및 ADCC의 유도를 포함하였다.

[1026] ELISA. 결합 친화도는 ELISA를 사용하여 결정하였고, 여기서 정제된 EGF-R (시그마, 미국 미저리주 세인트루이스)을 96웰 Microlon ELISA 플레이트 (그라이너)에 50 ng/웰로 코팅하였다. 플레이트를 0.05% Tween 20 및 2% 닭 혈청으로 보충한 PBS로 차단하였다. 후속적으로, 100 ㎍/ml 폴리클로날 인간 IgG (정맥내 면역글로불린, IVIG, 산퀸 네덜란드)를 함유하는 버퍼 내에 계열 희석시킨 샘플을 첨가하고, 1 h 동안 실온 (RT)에서 인큐베이팅하였다. 플레이트를 후속적으로 검출 항체로서 퍼옥시다제-컨쥬게이팅된 토끼-항-인간 카파 경쇄 (다코, 덴마크 글로스트럽)와 함께 인큐베이팅하고, 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈)로 현상하였다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (바이오테크)에서 405 nm에서 측정하였다.

[1027] 도 16은 2F8-HG 및 2F8-Fab의 결합 곡선이 포개어질 수 있고 IgG1 및 IgG4의 결합 곡선에 비해 명백하게 우측으로 이동함을 보여준다. EGFr 코트에 대한 친화력에서 상기 차이는 IVIG의 존재 하에, 2F8-HG가 Fab 단편처럼 1가 결합한다는 생각과 일치한다.

[1028] 항체 의존 세포-매개 세포독성 (ADCC). 종양 세포의 효과기 세포-의존 용해를 유도하는 능력을 크롬-51 (^{51}Cr) 방출 분석으로 평가하였다. 표적 A431 세포 (2-5x106 세포)를 100 μCi $Na_2{}^{51}CrO_4$ (애머샴 바이오사이언시스)로 진탕 조건 하에 37℃에서 1 h 동안 표지하였다. 세포를 PBS로 3회 세척하고 배양 배지 내에 $1x10^5$ 세포/ml로 재현탁하였다. 표지된 세포를 96웰 플레이트에 분배하고 ($5x10^3$, 50 ㎕/웰), 20 ㎍/ml 내지 0.02 ng/ml (최종 농도)로 50 ㎕의 배양 배지 중 mAb의 10배 계열 희석액과 함께 예비 인큐베이팅하였다 (RT, 30분). 자연 ^{51}Cr 방출을 결정하기 위해 항체 대신 배양 배지를 첨가하고, 최대 ^{51}Cr 방출을 결정하기 위해 triton X-100 (1% 최종 농도)를 첨가하였다. 이후, PBMC를 웰에 첨가하고 ($5x10^5$/웰), 세포를 37℃에서 철야 인큐베이팅하였다. 이튿날, 상등액을 감마 계수기에서 계수/분 (cpm) 결정에 의해 ^{51}Cr 방출을 측정하기 위해 수집하였다. 세포성 세포독성의 백분율을 다음 식을 이용하여 계산하였다:

[1029] % 특이적 용해 = (실험적 방출 (cpm) - 자연 방출 (cpm))/(최대 방출 (cpm) - 자연 방출 (cpm)) x 100

[1030] 여기서, 최대 ^{51}Cr 방출은 triton X-100을 표적 세포에 첨가하여 결정되고, 자연 방출은 감작 항체 및 효과기 세포의 부재 하에 측정되었다.

[1031] 도 17은 2F8-HG는 2F8-IgG4처럼 ADCC를 유도하지 않은 반면, 2F8-IgG1은 여기에서 매우 강력함을 보여준다.

[1032] **실시예 58**

[1033] AlgoNomics' Epibase(등록상표) 플랫폼을 IgG4 불변 힌지가 없는 1가 항체에 적용하였다. 짧게 설명하면, 플랫폼은 표적 서열로부터 유도된 모든 가능한 10-mer 펩티드의 HLA 결합 특이성을 분석한다 (Desmet et al. 1992, 1997, 2002, 2005). 20 DRB1, 7 DRB3/4/5, 14 DQ 및 7 DP, 즉, 총 48 HLA 클래스 II 수용체에 대한 동종이인자형 수준에서 프로파일링을 수행한다.

[1034] Epibase(등록상표)는 각각의 48 HLA 클래스 II 수용체에 대한 펩티드의 결합의 자유 에너지 ΔGbind의 정량적 추정치를 계산한다. 이어서, 상기 데이타를 다음과 같이 추가 처리한다: 펩티드는 강한 (S), 중등 (M), 약한 및 비 (N) 바인더로 분류된다.

[1035] IgG4 힌지가 없는 1가 항체의 불변 영역 내에 강한 결합 에피토프가 존재하지 않고, 단지 1개의 중등 결합 에피토프가 존재하였다. 상기 하나의 신생-에피토프는 중등 DRB1*0407 바인더를 생성시켰다. DRB1*0407은 백인 집단의 2% 미만에 존재하는 소수 동종이인자형이다. 또한, 중등 강도의 단일 에피토프는 심지어 최소 면역원성 항체의 총 에피토프 숫자에서도 유의하지 않은 것이다.

[1036] 결론적으로, 힌지가 없는 1가 IgG4 항체는 면역원성일 가능성이 매우 낮을 것으로 예측된다.

[1037] **실시예 59**

[1038] 실시예 59 및 60에서 사용되고 Unibody-CD4에 대해 제시된 연구 배경 및 물질

[1039] CD4에 대해 작용하는 인간 모노클로날 항체 (HuMax-CD4)의 HIV-1 감염을 억제하는 능력을 평가하기 위해 시험관내 및 생체내 실험을 수행하였다. 항체는 CD4의 도메인 1에 대해 작용하고, CD4 상의 HIV-1 gp120 결합 부위와 중복된다.

[1040] 본 실시예 (59)는 항-CD4 항체의 Fab 단편이 상이한 1차 단리물 및 T-세포주 적응 (adapted) HIV 바이러스에 의한 CD4-CCR5 세포 또는 CD4-CXCR4 세포의 감염을 억제함을 보여준다. 억제의 IC50 값은 sCD4 및 세포 결합된 CD4에 대한 HuMax-CD4 결합의 EC50 값 범위 내에 있고 (데이타 미제시), 이것은 CD4에 대한 HIV-1 외피 결합의 억제를 억제 메카니즘으로서 제시한다. 일반적으로, HuMax-CD4의 Fab 단편은 Fab와 전체 항체의 친화력의 차이로부터 예상되는 바와 같이 전체 항체보다 10배 더 낮은 효율성으로 억제한다.

[1041] 실시예 60은 HuMax-CD4로 처리된 마우스에서 비교된 CD4/CD8 비가 IgG 대조군 처리군보다 더 적게 감소하는 것이 관찰됨을 보여주고, 이것은 HuMax-CD4가 HIV-1에 의한 CD4 양성 세포의 고갈에 대해 보호함을 나타낸다. 또한, HuMax-CD4 처리는 시간 경과에 따라 혈액 내의 HIV-1 RNA 카피수를 감소시키는 반면에, IgG 대조군 처리는 감소를 유도하지 못한다. 시험관내 데이타는 항-CD4 항체가 HIV-1-유도 CD4 고갈에 대해 보호하고, HIV 감염 규모 및 바이러스 로드를 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

[1042] 노리스 (Norris) 등은 IgG4 서브클래스의 전체 항-CD4 (도메인 2) 항체를 사용한 HIV-1 감염 개체의 치료에 대해 발표하였다.

[1043] - 효능 결과는 1차 종료점에서 유의한 항바이러스 활성을 보였다 (24주차).

[1044] - 지속적인 반응은 TNX-355를 투여한 환자에서 48주차의 결과에 의해 제시되었다.

[1045] - TNX-355 10 mg/kg + OBR은 위약 + OBR의 0.14 log10 감소에 비해 48주차에 기준선으로부터 HIV-RNA의 0.96 log10 감소를 보였다 ($p<0.001$).

[1046] - TNX-355 15 mg/kg + OBR은 위약 + OBR의 0.14 log10 감소에 비해 48주차에 기준선으로부터 HIV-RNA의 0.71 log10 감소를 보였다 ($p<0.009$).

[1047] - TNX-355 + OBR 처리는 위약 증가 (+1 세포)에 비해 10 mg/kg 아암 (arm) (+ 48 세포, $p=0.031$) 및 15 mg/kg (+51 세포, $p=0.016$) 아암 모두에서 48주차에 통계학상 유의하고 임상적으로 의미있는 CD4+ 세포의 증가와 관련

되었다.

[1048] <문헌>

[1049] Zwick M. B., Wang M., Poignard P., Stiegler G., Katinger H., Burton D.R., and Parren P.W.H.I. 2001. Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. J Vir 75:12198.

[1050] Poignard P., Sabbe R., Picchio G. R., Wang M., Gulizia R.J., Katinger H., Parren P.W.H.I., Mosier D.E., and Burton D.R. 1999. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. Immunity 10:431.

[1051] Norris D., Moralis J., Gathe J., Godafsky E., Garcias F., Hardwick R., and Lewis S. 2006. Phase 2 efficacy and safety of the novel virus-entry inhibitor, TNX-355, in combination with optimized background regimen (OBR). XVI International AIDS Conference, Toronto, Canada.

[1052] **HUMAX-CD4 전체 항체 및 HUMAX-CD4 항체의 FAB 단편에 의한 시험관 내에서 HIV-I의** 중화

[1053] 방법은 문헌 [Zwick et al 2001]에 상세히 기재되어 있다. 요약하면, 항체에 의한 바이러스 중화 정도는 루시퍼라제 활성에 의해 측정하였다. 변형된 적절한 바이러스 구성체 (예를 들어, 1차 단리물: JR-CSF, JR-FL, SF162, ADA, YU2, 89.6, US143 및 T 세포주 적응 바이러스: IIIB)를 pSVIIIenv 벡터 및 pNL4-3.lec.R-E-로 동시형질감염시켜 1 라운드의 복제에 대해 전능성인 바이러스를 생성시켰다. 바이러스를 U87.CD4.CCR5 세포 (1차 단리물) 또는 CD4-CXCR4 세포 (IIIB의 경우)에 대한 다양한 양의 항체 (첨가 전에 약 100,000개를 생성시킬 것으로 결정됨)와 함께 예비 인큐베이팅하고, 3일 동안 배양하였다. 웰을 세척하고, 루시퍼라제 세포 배양액 용해 시약과 함께 인큐베이팅하고, 용해액을 불투명한 분석 플레이트로 옮기고, 루시퍼라제 분석 시약을 사용하여 휘도계로 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 중화에 대해, HuMax-CD4 및 HuMax-CD4의 Fab 단편을 시험하였다.

[1054] 상기 설명한 방법에 따라, 바이러스 구성체 YU2, IIIB, ADA, 89.6, US143, JR-FL, JR-CSF, 및 SF 162를 루시퍼라제 분석 발현계를 사용하여 시험관 내 중화 분석에 사용하였다. HIV-1 IIIB는 T-세포주 적응 바이러스이고, 모든 다른 바이러스는 HIV-1의 1차 단리물이다. HuMax-CD4 항체 및 HuMax-CD4의 Fab 단편을 도 25에 나타낸 농도에서 출발하여 1:2 희석 반응물에 첨가하였다. 도 27에서, 4 파라미터 로지스틱 분석으로 피팅한 곡선을 HuMax-CD4 및 HuMax-CD4의 Fab 단편에 대해 제시하고, 도 25에 상기 피트로부터 계산된 IC50을 나타내었다. 데이타는 HuMax-CD4 항체가 시험된 모든 바이러스의 감염을 억제하고, 일반적으로 Fab 단편보다 10배 더 우수한 효율로 억제하였음을 보여준다 (예외: YU2 및 JR-CSF). HuMax-CD4의 sCD4 결합에 대한 EC50은 약 0.3-1 nM로 결정되었다. 억제의 IC50 값은 상기 EC50 값의 범위 내에 존재하고, 이것은 HuMax-CD4에 의한 수용체 점유가 감염 억제 정도와 관련됨을 나타낸다.

[1055] 본 발명자들의 실험은 항-CD4 항체 (즉, Fab 단편)의 1가 결합에 의한, CXCR4 및 CCR5 HIV-1 공수용체 발현 세포의 효과적인 HIV-1 감염 억제에 대한 원리의 증명을 제공한다. 이것은 유사한 억제가 HG 항-CD4 항체에 의해 달성될 수 있다는 증거를 제공한다.

[1056] **실시예 60**

[1057] HIV 감염의 생체 내 hu-PBMC-SCID 마우스 모델에서 CD4+ T 세포 고갈의 보호

[1058] 실험 과정은 문헌 [Poignard et al 1999]에 상세하게 설명되어 있다. 요약하면, CB-17 SCID 마우스를 약 $25x10^6$개의 정상 인간 PBMC (말초 혈액 단핵구 세포)로 재구성하였다. 약 2주 후에, 동물을 HIV-1 ($HIV\text{-}1_{JR\text{-}CSF}$)로 감염시켰다. 3일 후에, 동물을 1 mg/ml HuMax-CD4, 또는 인간 IgG 이소형 대조 항체로 복강 내로 처리하거나, 또는 처리하지 않았다. 혈액 샘플을 주사한 지 1 hr, 6 hr, 1일, 2일, 3일, 6일, 9일, 13일, 및 15일 후에 채취하고, 2주 후에 동물을 안락사시키고, FACS 분석을 수행하여 인간 세포의 % (H2Kd-PE 및 인간 CD3-APC 사용) 및 CD4/CD8 비 (CD4-PE 및 CD8-APC 이중 염색 사용)를 결정하였다. 또한, 혈장 바이러스 로드는 정량적 로슈 RT PCR 분석에 의해 HIV-1 RNA 수준을 측정함으로써 측정하였다. 또한, 직접적인 sCD4 결합 ELISA (플레이트 상의 sCD4의 코트, 및 항-Fc 폴리클로날 항체를 사용한 검출)를 사용하여 혈장 내의 HuMax-CD4의 농도를 결정하였다.

[1059] 도 28에 동물의 혈장 수준이 제공된다. HuMax-CD4 주사는 15일차에도 100 ㎍/ml 이상인 높은 HuMax-CD4 혈장 농도를 야기한다고 결론지을 수 있다. 비처리된 마우스는 배경 이상의 측정가능한 값을 보이지 않았다.

[1060] 도 26에 실험 종료시에 마우스로부터 회수된 세포수가 제공된다. 데이타는 HIV-1 감염이 CD4/CD8 비의 감소로 표시되는 바와 같이 CD4 양성 T 세포를 크게 감소시켰음을 나타낸다. 이것은 감염되지 않은 마우스에서의 일정한 수준에 비해 CD4 양성 T 세포가 HIV-1에 의해 혈액으로부터 빠르게 고갈됨을 보여주는 것이다. HuMax-CD4로 복강내 처리된 마우스는 CD4/CD8 비의 훨씬 더 작은 감소를 나타냈고, 이것은 HuMax-CD4가 HIV-1에 의한 CD4 양성 세포의 고갈에 대해 보호를 제공함을 보여주는 것이다. 도 29에서, 혈액 1 ml 당 HIV-1 RNA 카피가 시간에 대해 제시되고, 상기 데이타는 HuMax-CD4 처리가 시간에 따라 혈액 내의 HIV-1 RNA 카피수를 감소시키는 반면에, 이소형 대조 항체는 감소시키지 않음을 나타낸다.

[1061] 본 발명자들의 실험은 생체 내에서 HIV-1 감염시에 CD4 세포 고갈에 대한 보호 원리를 증명하는 것이다. 전체 항-CD4 항체는 그 자체가 CD4 고갈 특성을 가짐에도 불구하고, 고갈에 대한 보호가 관찰된다. 이것은 비-고갈 항-CD4 1가 항체, 예를 들어 항-CD4 HG 항체를 사용한 처리에 의해 HIV-1-유도 T 세포 고갈에 대한 보다 강한 보호가 얻어질 수 있음을 나타낸다. 항-CD4 HG에 의한 HIV-1 중화 및 CD4 고갈에 대한 보호에 대한 원리 증명은 유사한 실험 구성으로 달성할 수 있다. 이것은 긴 생체 내 반감기를 보이는 HuMax-CD4 HG가 HIV-1 감염 및 HIV-1 바이러스 로드를 억제하고 CD4 양성 세포의 고갈로부터 보호할 수 있다는 증거를 제공한다.

[1062] **결과의 요약**

[1063] 실시예에 제시된 데이타는 힌지 엑손의 스플라이스 공여자 부위를 파괴함으로써 힌지가 없는 IgG4 항체를 발현시키면 힌지가 없는 IgG4 1/2 분자 (하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 조합체)가 생성됨을 보여준다. IgG4 힌지가 없는 1/2 분자의 존재는 비-환원 조건 하에서의 SDS-PAGE, 질량 분광법, 크기 배제 크로마토그래피 및 방사성 면역 분석을 통한 가교결합 능력의 부재에 의해 확인한다. 힌지가 없는 항체는 천연 포맷 IgG1 및 IgG4 항체 분자와 동일한 항원 결합 특이성을 보유한다. 이는 상이한 특이성을 갖는 2개의 힌지가 없는 항체, 즉 7D8-HG (B-세포 항원 CD20에 특이적) 및 Betv1-HG (자작나무 화분 항원 Betv1에 특이적)에 대해 밝혀졌다. 7D8-HG의 C1q 결합은 존재하지 않고, 단지 근소한 보체-의존 세포 독성 (ADCC) (천연 포맷 7D8-IgG4 항체와 대등한)이 관찰된다. 힌지가 없는 1/2 분자의 1가성은 Betv1-HG를 사용한 가교결합 실험에서 알 수 있다. IgG1 및 IgG4는 모두 세파로스 결합된 Betv1의 방사성 표지된 Betv1에 대한 가교결합을 보인 반면, 힌지가 없는 분자 Betv1-HG는 가교결합할 수 없다.

[1064] 7D8-HG의 반감기를 마우스 약동학 (PK) 실험으로 생체 내에서 평가하고, 7D8-IgG4와 비교한다. 7D8-HG는 상기 모델에서 정상 IgG4보다 2 내지 3배 더 빠른 소실율을 갖지만, IgG F(ab')$_2$ 단편에 대해 보고된 1일 미만의 반감기보다 유리한 6일의 반감기가 계산된다. 본 발명자들은 유리한 PK-프로필로 인해 IgG4 힌지가 없는 항체는 비-가교결합성의 1가 및 비-보체-활성화 항체가 필요할 때 치료 용도로 유용할 것으로 결론지었다.

[1065] <서열 목록>

[1066] 서열 1: 인간 Ig의 C_L 카파의 핵산 서열

```
  1 CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA
 51 GTTGAAATCT GGAACTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC
101 CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT
151 AACTCCCAGG AGAGTGTCAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG
201 CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG
251 TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG
301 AGCTTCAACA GGGGAGAGTG T
```

[1067]

[1068] 서열 2: 인간 Ig의 C_L 카파의 아미노산 서열

```
  1 RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
 51 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
101 SFNRGEC
```

[1069]

[1070] 서열 3: 인간 Ig의 C_L 람다의 핵산 서열

```
  1 ACCGTCCTAG GTCAGCCCAA GGCTGCCCCC TCGGTCACTC TGTTCCCGCC
 51 CTCCTCTGAG GAGCTTCAAG CCAACAAGGC CACACTGGTG TGTCTCATAA
101 GTGACTTCTA CCCGGGAGCC GTGACAGTGG CCTGGAAGGC AGATAGCAGC
151 CCCGTCAAGG CGGGAGTGGA GACCACCACA CCCTCCAAAC AAAGCAACAA
201 CAAGTACGCG GCCAGCAGCT ACCTGAGCCT GACGCCTGAG CAGTGGAAGT
251 CCCACAGAAG CTACAGCTGC CAGGTCACGC ATGAAGGGAG CACCGTGGAG
301 AAGACAGTGG CCCCTACAGA ATGTTCA
```

[1071]

[1072] 서열 4: 인간 Ig의 C_L 람다 경쇄의 아미노산 서열

```
  1 TVLGQPKAAP SVTLFPPSSE ELQANKATLV CLISDFYPGA VTVAWKADSS
 51 PVKAGVETTT PSKQSNNKYA ASSYLSLTPE QWKSHRSYSC QVTHEGSTVE
101 KTVAPTECS
```

[1073]

[1074] 서열 5: HuMab-7D8의 V_H의 핵산 서열

```
  1 GAAGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGACAGGTC
 51 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTCAT GATTATGCCA
101 TGCACTGGGT CCGGCAAGCT CCAGGGAAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAACT
151 ATTAGTTGGA ATAGTGGTAC CATAGGCTAT GCGGACTCTG TGAAGGGCCG
201 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT CTGCAAATGA
251 ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCCTTGT ATTACTGTGC AAAAGATATA
301 CAGTACGGCA ACTACTACTA CGGTATGGAC GTCTGGGGCC AAGGGACCAC
351 GGTCACCGTC TCCTCA
```

[1075]

[1076] 서열 6: HuMab-7D8의 V_H의 아미노산 서열

```
  1 EVQLVESGGG LVQPDRSLRL SCAASGFTFH DYAMHWVRQA PGKGLEWVST
 51 ISWNSGTIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDI
101 QYGNYYYGMD VWGQGTTVTV SS
```

[1077]

[1078] 서열 7: 마우스 항-Betv-1의 V_H의 핵산 서열

```
  1 GAGGTTCAGC TGCAGCAGTC TGGGGCAGAG CTTGTGAAAC CAGGGGCCTC
 51 AGTCAAGTTG TCCTGCACAG CTTCTGGCTT CAACATTAAA GACACCTATA
101 TCCACTGGGT GAAGCAGAGG CCTGAACAGG GCCTGGAGTG GGTTGGAAGG
151 ATTGATCCTG CGACTGGCAA TACTAGATAT GACCCGAAGT TCCAGGGCAA
201 GGCCACTATA ACAGCTGACA CATCCTCCAA CACAGCCTAC CTGCAACTCA
251 GCAGCCTGAC ATCTGAGGAC ACTGCCGTCT ATTACTGTGC TAGTTTTAGG
301 CCGGGGTATG CTCTGGACTA CTGGGGTCAA GGAACCTCAG TCACCGTCTC
351 CTCA
```

[1079]

[1080] 서열 8: 마우스 항-Betv-1의 V_H의 아미노산 서열

```
  1 EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR PEQGLEWVGR
 51 IDPATGNTRY DPKFQGKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCASFR
101 PGYALDYWGQ GTSVTVSS
```

[1081]

[1082] 서열 9: HuMab-7D8의 V_L의 핵산 서열

```
  1 GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA
 51 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG
101 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT
151 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC
201 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG
251 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCGATCAC CTTCGGCCAA
301 GGGACACGAC TGGAGATTAA A
```

[1083]

[1084] 서열 10: HuMab-7D8의 V_L의 아미노산 서열

```
  1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
 51 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPITFGQ
101 GTRLEIK
```

[1085]

[1086] 서열 11: 마우스 항-Betv1의 V_L의 핵산 서열

```
  1 GACATTGTGA TGACCCAGTC TCACAAATTC ATGTCCACAT CAGTTGGAGA
 51 CAGGGTCAGC TTCACCTGCA AGGCCAGTCA GGATGTGTTT ACTGCTGTAG
101 CCTGGTATCA ACAAAAACCA GGGCAATCTC CTAAACTACT GATTTACTGG
151 GCATCCACCC GGCGCACTGG AGTCCCTGAT CGCTTCACAG GCAGTGGATC
201 TGGGACAGAT TATACTCTCA CCATCAGCAG TGTGCAGGCT GAAGACCTGG
251 CACTTTATTA CTGTCAGCAA CATTTTAGCA CTCCTCCGAC GTTCGGTGGA
301 GGCACCAAGC TGGAAATCAA A
```

[1087]

[1088] 서열 12: 마우스 항-Betv1의 V_L의 아미노산 서열

```
  1 DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS FTCKASQDVF TAVAWYQQKP GQSPKLLIYW
 51 ASTRRTGVPD RFTGSGSGTD YTLTISSVQA EDLALYYCQQ HFSTPPTFGG
101 GTKLEIK
```

[1089]

[1090] 서열 13: 인간 IgG4의 야생형 C_H 영역의 핵산 서열

```
   1 GCTAGCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC CTGGCGCCCT GCTCCAGGAG
  51 CACCTCCGAG AGCACAGCCG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC
 101 CCGAACCGGT GACGGTGTCG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG
 151 CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT CCCTCAGCAG
 201 CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACGAAGACC TACACCTGCA
 251 ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAG AGTTGGTGAG
 301 AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG CTCAGCCCTC
 351 CTGCCTGGAC GCACCCCGGC TGTGCAGCCC CAGCCCAGGG CAGCAAGGCA
 401 TGCCCCATCT GTCTCCTCAC CCGGAGGCCT CTGACCACCC CACTCATGCT
 451 CAGGGAGAGG GTCTTCTGGA TTTTTCCACC AGGCTCCGGG CAGCCACAGG
 501 CTGGATGCCC CTACCCCAGG CCCTGCGCAT ACAGGGGCAG GTGCTGCGCT
 551 CAGACCTGCC AAGAGCCATA TCCGGGAGGA CCCTGCCCCT GACCTAAGCC
 601 CACCCCAAAG GCCAAACTCT CCACTCCCTC AGCTCAGACA CCTTCTCTCC
 651 TCCCAGATCT GAGTAACTCC CAATCTTCTC TCTGCAGAGT CCAAATATGG
 701 TCCCCCATGC CCATCATGCC CAGGTAAGCC AACCCAGGCC TCGCCCTCCA
 751 GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
 801 CCAGCCGGGT GCTGACGCAT CCACCTCCAT CTCTTCCTCA GCACCTGAGT
 851 TCCTGGGGGG ACCATCAGTC TTCCTGTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACT
 901 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGCGTGGTGG TGGACGTGAG
 951 CCAGGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAT GGCGTGGAGG
1001 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTAC
1051 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA
1101 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCGTCC TCCATCGAGA
1151 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC ACGGGGTGCG AGGGCCACAT
1201 GGACAGAGGT CAGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGGGAGTG ACCGCTGTGC
1251 CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AGCCACAGGT GTACACCCTG
1301 CCCCCATCCC AGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
1351 GGTCAAAGGC TTCTACCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
1401 GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
1451 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAGGCTAACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
1501 GGAGGGGAAT GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
1551 ACTACACACA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC TGGGTAAA
```

[1091]

[1092] 서열 14: 인간 IgG4의 야생형 C_H 영역의 아미노산 서열

```
   1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
  51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
 101 KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
 151 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
 251 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 301 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK
```

[1093]

[1094] 서열 15: 위치 714 및 722에서 돌연변이된 인간 IgG4의 C_H 영역 (서열 13)을 코딩하는 핵산 서열

```
   1 GCTAGCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC CTGGCGCCCT GCTCCAGGAG
  51 CACCTCCGAG AGCACAGCCG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC
 101 CCGAACCGGT GACGGTGTCG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG
 151 CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT CCCTCAGCAG
 201 CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACGAAGACC TACACCTGCA
 251 ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAG AGTTGGTGAG
 301 AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG CTCAGCCCTC
 351 CTGCCTGGAC GCACCCCGGC TGTGCAGCCC CAGCCCAGGG CAGCAAGGCA
 401 TGCCCCATCT GTCTCCTCAC CCGGAGGCCT CTGACCACCC CACTCATGCT
 451 CAGGGAGAGG GTCTTCTGGA TTTTTCCACC AGGCTCCGGG CAGCCACAGG
 501 CTGGATGCCC CTACCCCAGG CCCTGCGCAT ACAGGGGCAG GTGCTGCGCT
 551 CAGACCTGCC AAGAGCCATA TCCGGGAGGA CCCTGCCCCT GACCTAAGCC
 601 CACCCCAAAG GCCAAACTCT CCACTCCCTC AGCTCAGACA CCTTCTCTCC
 651 TCCCAGATCT GAGTAACTCC CAATCTTCTC TCTGCAGAGT CCAAATATGG
 701 TCCCCCATGC CCACCATGCC CGGGTAAGCC AACCCAGGCC TCGCCCTCCA
 751 GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
 801 CCAGCCGGGT GCTGACGCAT CCACCTCCAT CTCTTCCTCA GCACCTGAGT
 851 TCCTGGGGGG ACCATCAGTC TTCCTGTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACT
 901 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGCGTGGTGG TGGACGTGAG
 951 CCAGGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAT GGCGTGGAGG
1001 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTAC
1051 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA
1101 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCGTCC TCCATCGAGA
1151 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC ACGGGGTGCG AGGGCCACAT
1201 GGACAGAGGT CAGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGGGAGTG ACCGCTGTGC
1251 CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AGCCACAGGT GTACACCCTG
1301 CCCCCATCCC AGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
1351 GGTCAAAGGC TTCTACCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
1401 GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
1451 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAGGCTAACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
1501 GGAGGGGAAT GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
1551 ACTACACACA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC TGGGTAAA
```

[1095]

[1096] 서열 16: 인간 IgG4의 힌지가 없는 C_H 영역의 아미노산 서열

```
   1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
  51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVAP
 101 EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
 151 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI
 201 EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
 251 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL
 301 HNHYTQKSLS LSLGK
```

[1097]

[1098] 서열 17: 인간의 람다 사슬 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 S25751)

```
  1 qpkaapsvtl fppsseelqa nkatlvclis dfypgavtva wkadsspvka
 51 gvetttpskq snnkyaassy lsltpeqwks hrsyscqvth egstvektva
101 pteCs
```

[1099]

[1100] 서열 18: 인간의 카파 사슬 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 P01834)

```
  1 tvaapsvfif ppsdeqlksg tasvvcllnn fypreakvqw kvdnalqsgn
 51 sqesvteqds kdstyslsst ltlskadyek hkvyacevth qglsspvtks
101 fnrgeC
```

[1101]

[1102] 서열 19: IgG1 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 P01857)

```
  1 astkgpsvfp lapSskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsgaltsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvep
101 kscdkthtcp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs
151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvvsvlt vlhqdwlngk
201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsRDe mtknqvsltc
251 lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly sKltvdksrw
301 qQgnvfscsv mhealhnhyt qkslslsPgk
```

[1103]

[1104] 서열 20: IgG2 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 P01859)

```
  1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsgaltsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssnfgtqt ytcnvdhkps ntkvdktver
101 kccvecppcp appvagpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc vvvdvshedp
151 evqfnwyvdg vevhnaktkp reeqfnstfr vvsvltvvhq dwlngkeykc
201 kvsnkglpap iektisktkg qprepqvytl ppsReemtkn qvsltclvkg
251 fypsdiavew esngqpenny kttppMldsd gsfflysKlt vdksrwqQgn
301 vfscsvmhea lhnhytqksl slsPgk
```

[1105]

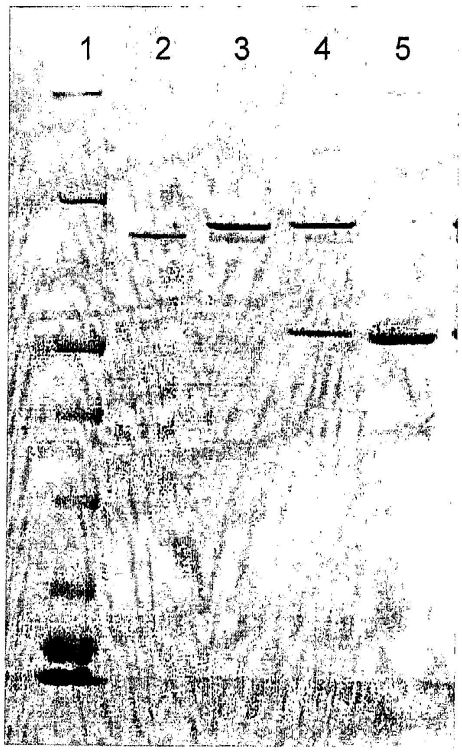
[1106] 서열 21: IgG3 불변 영역의 아미노산 서열 (기탁 번호 A23511)

```
  1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsgaltsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt ytcnvnhkps ntkvdkrvel
101 ktplgdttht cprcpepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcpepksc
151 dtpppcprcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed
201 pevqfkwyvd gvevhnaktk preeqynstf rvvsvltvlh qdwlngkeyk
251 ckvsnkalpa piektisktk gqprepqvyt lppsReemtk nqvsltclvk
301 gfypsdiave wesSgqpenn yNttppMlds dgsfflysKl tvdksrwqQg
351 nIfscsvmhe alhnRFtqks lslsPgk
```

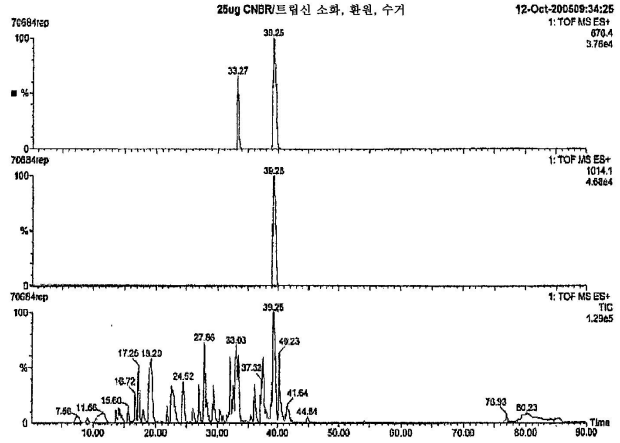
[1107]

도면

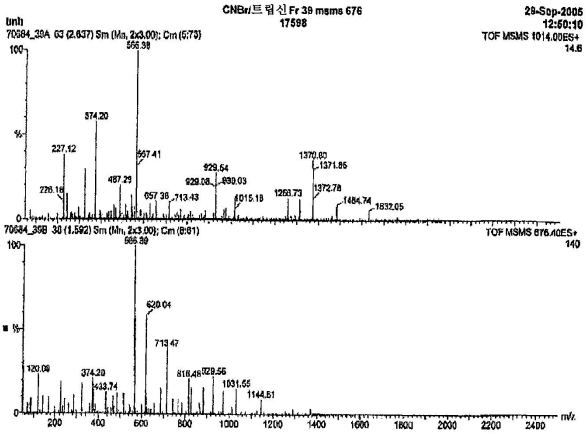
도면1



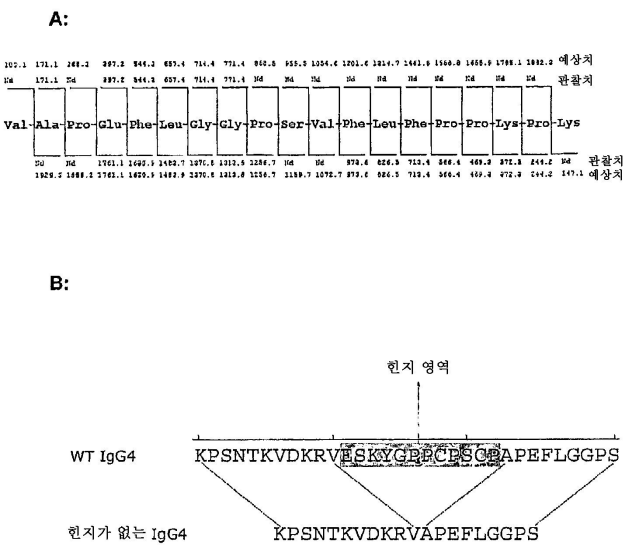
도면2


25ug CNBR/트립신 소화, 환원, 수거
12-Oct-200509:34:25
1: TOF MS ES+
670.4
3.76e4
70684rep
39.25
33.27
1: TOF MS ES+
1014.1
4.68e4
1: TOF MS ES+
TIC
1.29e5
39.25
27.86
33.03
49.23
17.25
19.20
16.72
24.52
37.32
41.64
44.84
7.66
11.66
15.60
70.93
80.23
Time

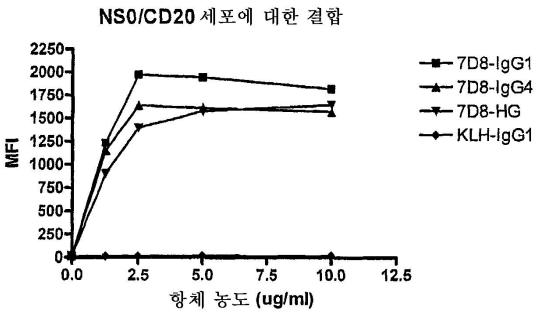
도면3


CNBr/트립신 Fr 39 msms 676
17598
29-Sep-2005
12:50:10
TOF MSMS 1014.00ES+
14.6
70684_39A 63 (2.637) Sm (Mn, 2x3.00); Cm (6:75)
556.39
574.20
227.12
557.41
929.54
1370.80
1371.85
487.29
930.03
1372.78
1484.74
1632.05
1015.18
1260.73
957.36
713.43
70684_39B 30 (1.592) Sm (Mn, 2x3.00); Cm (B:81)
TOF MSMS 676.40ES+
140
556.39
620.04
713.47
374.20
443.74
816.46
928.56
1031.55
1144.61
m/z

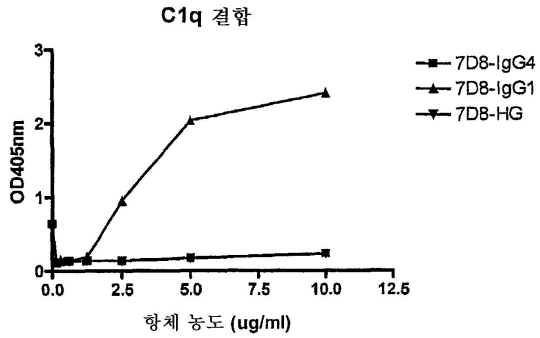
도면4


A:
예상치
관찰치
Val-Ala-Pro-Glu-Phe-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys
관찰치
예상치
B:
힌지 영역
WT IgG4
KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPS
힌지가 없는 IgG4
KPSNTKVDKRVAPEFLGGPS

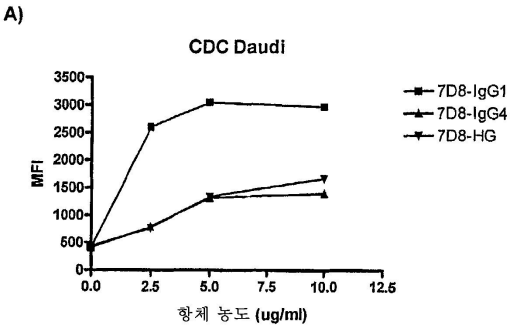
도면5

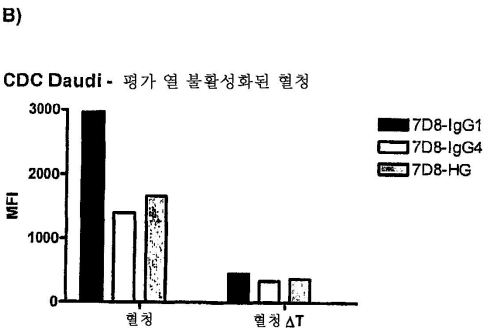

NS0/CD20 세포에 대한 결합
MFI
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
항체 농도 (ug/ml)
7D8-IgG1
7D8-IgG4
7D8-HG
KLH-IgG1

도면6

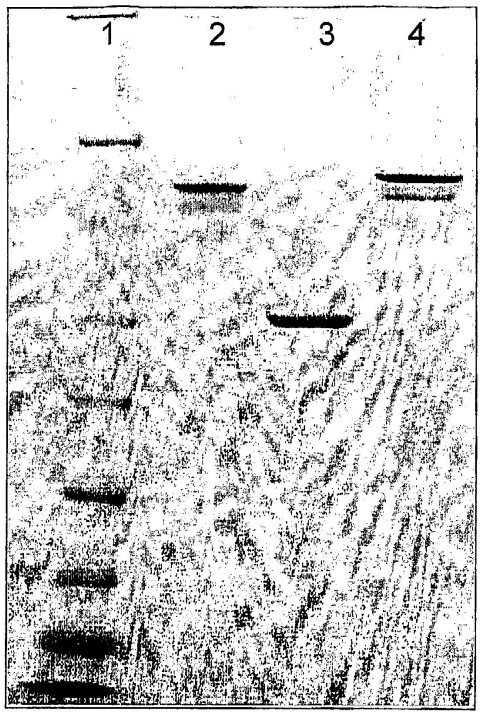

C1q 결합
OD405nm
3
2
1
0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
항체 농도 (ug/ml)
7D8-IgG4
7D8-IgG1
7D8-HG

도면7

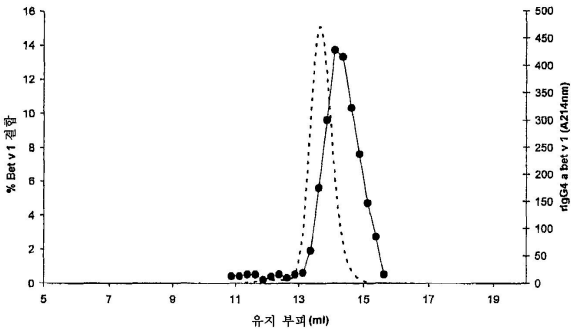

A)
CDC Daudi
MFI
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
항체 농도 (ug/ml)
7D8-IgG1
7D8-IgG4
7D8-HG


B)
CDC Daudi - 평가 열 불활성화된 혈청
MFI
3000
2000
1000
0
혈청
혈청 ΔT
7D8-IgG1
7D8-IgG4
7D8-HG

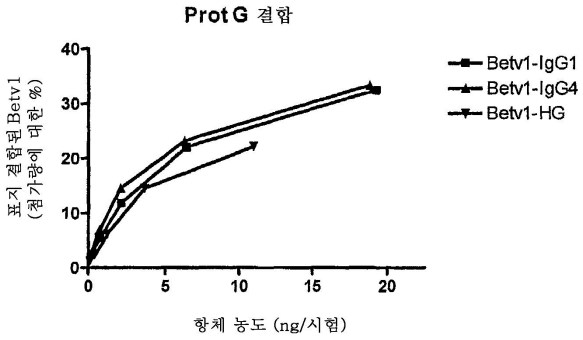
도면8


1
2
3
4

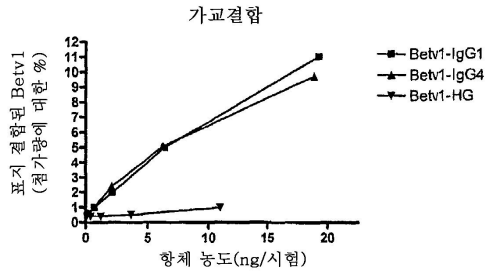
도면9


% Bet v1 결합
rIgG4 a bet v 1 (A214nm)
유지 부피 (ml)

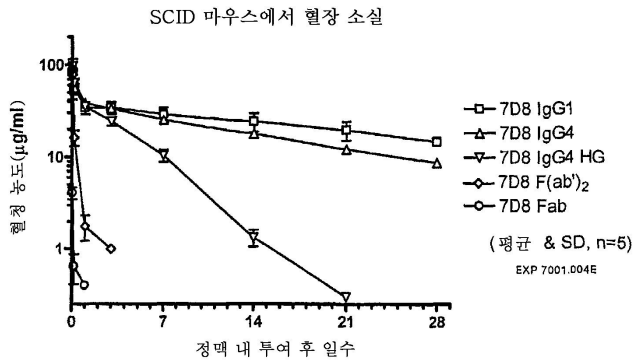
도면10


Prot G 결합
표지 결합된 Betv1 (첨가량에 대한 %)
항체 농도 (ng/시험)
Betv1-IgG1
Betv1-IgG4
Betv1-HG

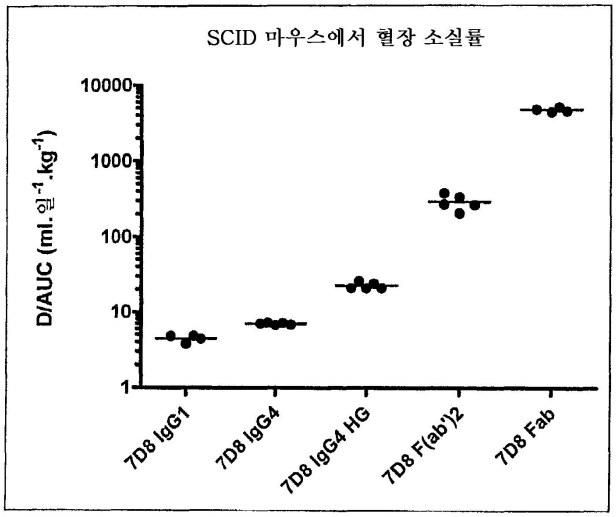
도면11



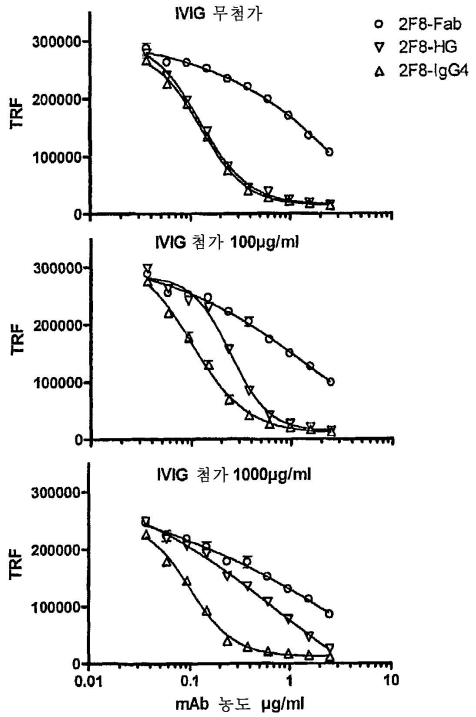
도면12



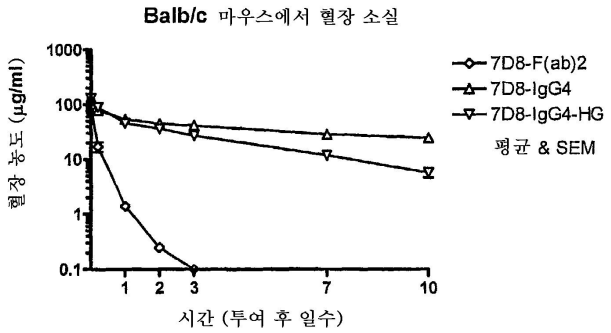
도면13



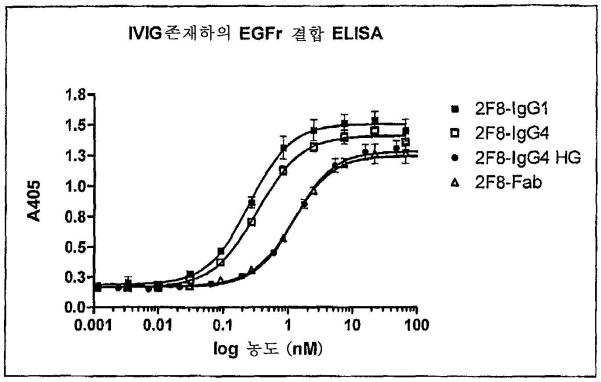
도면14



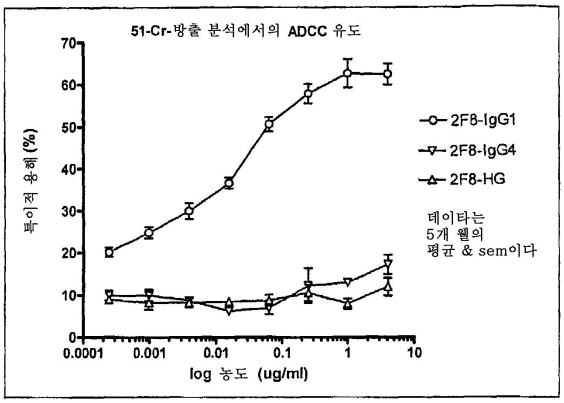
도면15



도면16



도면17



도면18

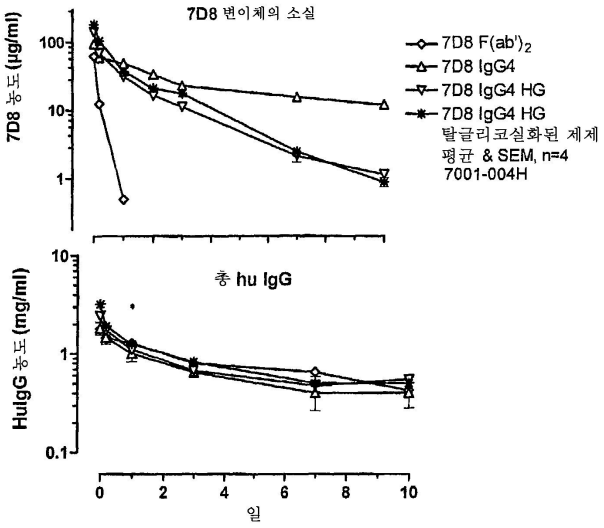
명칭		올리고 서열
VLexbetv1rev	P1	AGCCACCGTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCCTCC
VLex betv1for	P2	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTCACAGATTCAGG CATTT
VHexbetv1rev	P3	CGATGGGCCCTTGGTGCTGGCTGAGGAGACGGTGACTGA GGT
VHexbetv1for	P4	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAATGCAGCTGGGTTAT CTTC
LCseq3	P5	TGTACTTTGGCCTCTCTGGGATA
7D8VLexrev	P6	CTGGAGATTAAACGTACGGTGGCTGCACC
7D8VLexfor	P7	GCGACTAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAG CTTCTC
7D8VHexfor	P8	GCTGAAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTTGGGACTGAGCT GGATT
pConKseq1	P9	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
pConG1seq1	P10	GAAGACTTAAGGCAGCGGCAGAA
HCseq5	P11	GGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG
HCseq11	P12	ATGCAGGCTACTCTAGGGCACCT
2f8HCexrev	P13	GAAGACCGATGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAGGAGAC
IGG4gene2r	P14	TGAGAATTCGGTGGGTGCTTTATTTCCATGCT
IGG4gene2f	P15	GTAGAAGCTTACCATCGCGGATAGACAAGAACC
IGG4S228Pf	P16	GGTCCCCCATGCCCACCATGCCCGGGTAAGCCA
IGG4S228Pr	P17	TGGCTTACCCGGGCATGGTGGGCATGGGGGACC
RACEKmm1	P18	TGTTAACTGCTCACTGGATGGTGGGA
RACEG1mm1	P19	TCCCTGGGCACAATTTTCTTGTCCACC
ShortUPMH3	P20	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGC
LongUPMH3	P21	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG TATCAACGCAGAGT

도면19

명칭	길이	올리고 서열
A77VHfor1	62	TCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAATTCAGAGGTCCAGC TGCAGCAGACTGGA
A77VHfor2	61	GATAAGCTTGCCGCCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCCTG ATGGCAGTGGTTA
A77VHrev	45	GGATGGGCCCTTGGTGCTGGCCGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC
A77VLfor1	64	CCTCATGTCCCTGCTGTTCTGGGTATCTGGTACCTGTGGGGACGTTGT GATGACCCAGACTCCA
A77VLfor2	62	ACGAAGCTTGCCGCCACCATGGAATCACAGACTCAGGTCCTCATGTC CCTGCTGTTCTGGGT
IgG4delfor	44	AACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCC
IgG4delrev	44	GGGCACCTGTCCCGCCTTGAGCTGCAGAGAGAAGATTGGGAGTT
RACEG1A1	22	GGGAGTAGAGTCCTGAGGACTG
RACEKA1	22	TATCCACCTTCCACTGTACTTT
2f8HCexfor	45	CGATGGAAGCTTGCCGCCACCATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTT
2f8HCexrev	36	GAAGACCGATGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAGGAGAC

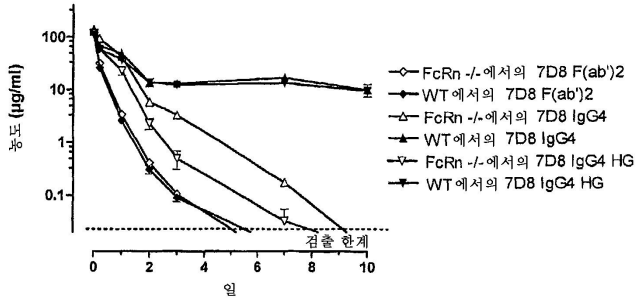
도면20

IVIG 보충된 SCID 마우스에서 7D8 변이체의 소실

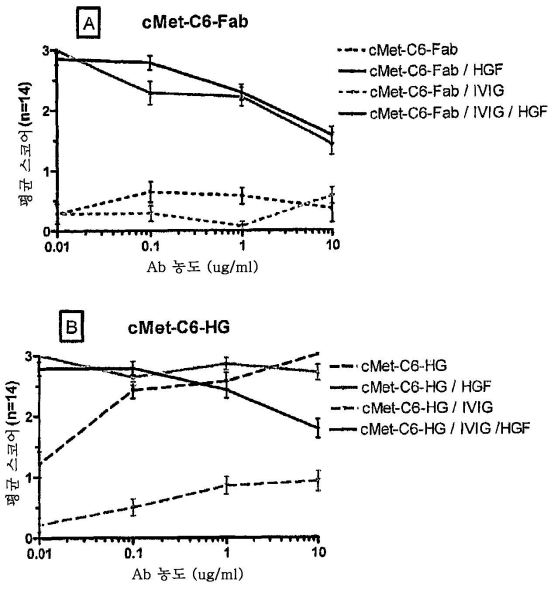


도면21

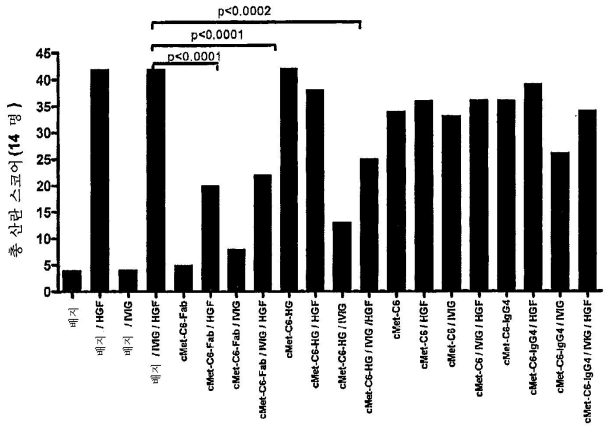
FcRn -/- 마우스 대 WT 마우스에서 7D8 변이체의 소실



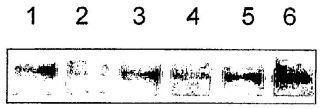
도면22



도면23



도면24



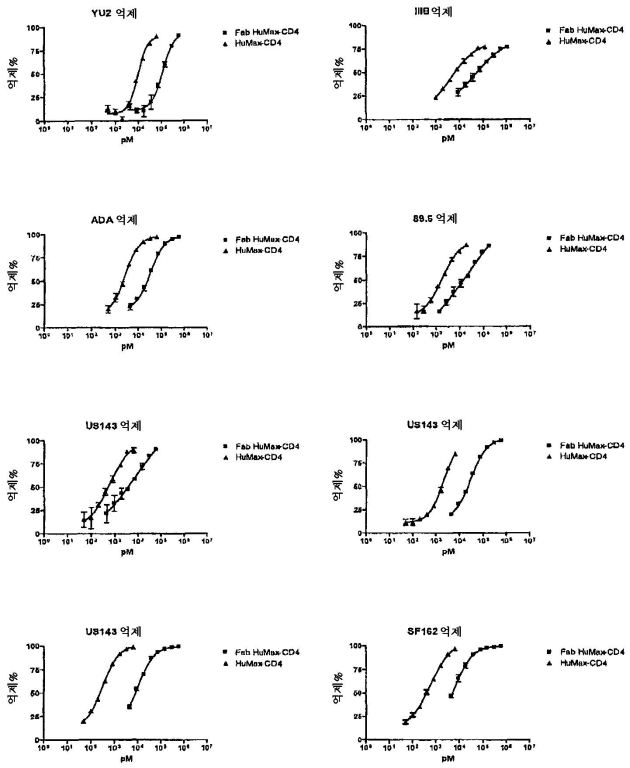
도면25

HIV-1 단리물	HuMax-CD4 출발 농도 (ug/ml)	억제 HuMax-CD4 IC50 (nM)	Fab 단편 출발 농도 (ug/ml)	억제 IC50 (nM)
YU2	10	9.9	30	119.9
IIIB	20	4.7	60	46.4
ADA	10	2.5	30	32.9
89.6	3	1.8	9	17.8
US143	1	0.6	3	11.9
JR-FL	1	2.1	30	29.1
JR-CSF	1	0.3	30	9.5
SF 162	1	0.6	30	6.3

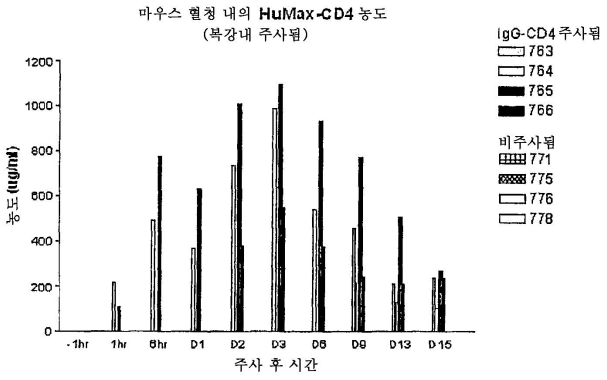
도면26

			재구성일 : 8/11/03		감염일 : 8/26/03			1회 주사일 : 9/08/03				
마우스 번호	i.p. 투여 분자	성별	세포수 (x10⁶)	Vol. (ml)	% 인간 세포	% 뮤린 세포	% CD4 세포	% CD8 세포	CD4/CD8	AVG	SD
754	1mg Ig-CD4	F	1.5	7	0	5.61	0.03	0	0		
757	1mg Ig-CD4	F	1	6	9.53	82.77	1.12	10.5	0.106		
750	1mg Ig-CD4	F	2	7	22.25	69.45	1.82	20.8	0.08	0.1	0.01
759	1mg Ig-CD4	M	3	8	35.44	46.27	2.34	20.53	0.114		
755	1mg Ig-대조군	F	2	6	86.29	10.03	2.46	84.87	0.028		
746	1mg Ig-대조군	F	1	7	83.9	13.14	1.15	82.95	0.013	0.02	0.01
749	1mg Ig-대조군	F	3.2	8	86.48	10.76	1.69	86.08	0.019		
756	비처리	F	3	6	58.88	38.57	1.19	58.7	0.02		
748	비처리	F	4	7	95.52	2.44	0.82	96.3	0.008	0.04	0.04
758	비처리	M	3	6	86.28	10.73	7.37	79.72	0.092		
761	비감염	M	4	8	80.85	17.39	22.94	53.77	0.426	0.48	0.06
762	비감염	M	4	7	48.5	13.2	16.6	30.93	0.536		

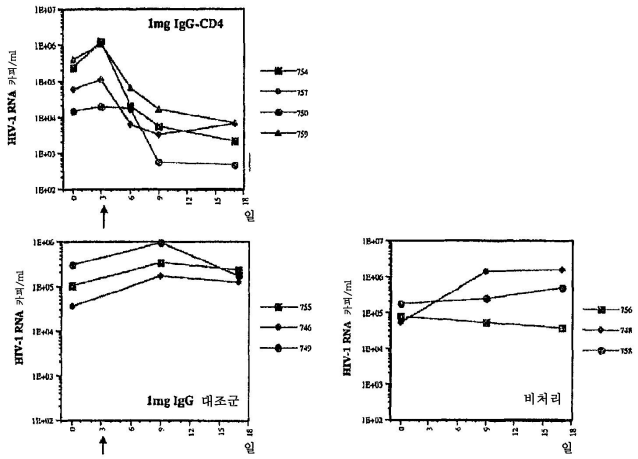
도면27


YU2 억제
IIIB억제
ADA 억제
89.5 억제
US143 억제
US143 억제
US143 억제
SF162 억제
억제%
pM
Fab HuMax-CD4
HuMax-CD4

도면28


마우스 혈청 내의 HuMax-CD4 농도
(복강내 주사됨)
농도 (ug/ml)
주사 후 시간
-1hr
1hr
8hr
D1
D2
D3
D6
D9
D13
D15
IgG-CD4 주사됨
763
764
765
766
비주사됨
771
775
776
778

도면29



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab A/S

<120> Recombinant monovalent antibodies and methods for production thereof

<130> P23-WO

<160> 21

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300

agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 3

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

accgtcctag gtcagcccaa ggctgccccc tcggtcactc tgttcccgcc ctcctctgag 60

gagcttcaag ccaacaaggc cacactggtg tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc 120

gtgacagtgg cctggaaggc agatagcagc cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca 180

ccctccaaac aaagcaacaa caagtacgcg gccagcagct acctgagcct gacgcctgag 240

cagtggaagt cccacagaag ctacagctgc caggtcacgc atgaagggag caccgtggag 300

aagacagtgg cccctacaga atgttca 327

<210> 4

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
1 5 10 15
Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30
Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
35 40 45
Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln

50 55 60
Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
65 70 75 80
Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
85 90 95
Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 5
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgacaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttcat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaact attagttgga atagtggtac cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatata 300
cagtacggca actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
tcctca 366
<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400
> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Asp Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 354

<212>

DNA

<213> Mus

<400> 7

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaaac caggggcctc agtcaagttg 60

tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tccactgggt gaagcagagg 120

cctgaacagg gcctggagtg ggttggaagg attgatcctg cgactggcaa tactagatat 180

gacccgaagt tccagggcaa ggccactata acagctgaca catcctccaa cacagcctac 240

ctgcaactca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagttttagg 300

ccggggtatg ctctggacta ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> mus

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Thr Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Phe Arg Pro Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400

> 9

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcggccaa 300

gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 321

<212> DNA

<213> mus

<400> 11

gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagttggaga cagggtcagc 60

ttcacctgca aggccagtca ggatgtgttt actgctgtag cctggtatca acaaaaacca 120

gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcgcactgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat tatactctca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cactttatta ctgtcagcaa cattttagca ctcctccgac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> mus

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Phe Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Arg Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 13

<211> 1588

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag 300

aggccagcac agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctcagccctc ctgcctggac 360

gcaccccggc tgtgcagccc cagcccaggg cagcaaggca tgccccatct gtctcctcac 420

ccggaggcct ctgaccaccc cactcatgct cagggagagg gtcttctgga tttttccacc 480

aggctccggg cagccacagg ctggatgccc ctaccccagg ccctgcgcat acaggggcag 540

gtgctgcgct cagacctgcc aagagccata tccgggagga ccctgcccct gacctaagcc 600

caccccaaag gccaaactct ccactccctc agctcagaca ccttctctcc tcccagatct 660

gagtaactcc caatcttctc tctgcagagt ccaaatatgg tcccccatgc ccatcatgcc 720

caggtaagcc aacccaggcc tcgccctcca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag 780

cctgcatcca gggacaggcc ccagccgggt gctgacgcat ccacctccat ctcttcctca 840

gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact 900

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac 960

cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1020

ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1080

caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc 1140

tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc acggggtgcg agggccacat 1200

ggacagaggt cagctcggcc caccctctgc cctgggagtg accgctgtgc caacctctgt 1260

ccctacaggg cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat 1320

gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc 1380

cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1440

ggactccgac ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca 1500

ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca 1560

gaagagcctc tccctgtctc tgggtaaa 1588

<210> 14

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 15

<211> 1588

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag 300

aggccagcac agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctcagccctc ctgcctggac 360

gcaccccggc tgtgcagccc cagcccaggg cagcaaggca tgccccatct gtctcctcac 420

ccggaggcct ctgaccaccc cactcatgct cagggagagg gtcttctgga tttttccacc 480

aggctccggg cagccacagg ctggatgccc ctaccccagg ccctgcgcat acaggggcag 540

gtgctgcgct cagacctgcc aagagccata tccgggagga ccctgcccct gacctaagcc 600

caccccaaag gccaaactct ccactccctc agctcagaca ccttctctcc tcccagatct 660

gagtaactcc caatcttctc tctgcagagt ccaaatatgg tcccccatgc ccaccatgcc 720

cgggtaagcc aacccaggcc tcgccctcca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag 780

cctgcatcca gggacaggcc ccagccgggt gctgacgcat ccacctccat ctcttcctca 840

gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact 900

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac 960

cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1020

ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1080

caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc 1140

tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc acggggtgcg agggccacat 1200

ggacagaggt cagctcggcc caccctctgc cctgggagtg accgctgtgc caacctctgt 1260

ccctacaggg cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat 1320

gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc 1380

cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1440

ggactccgac ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca 1500

ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca 1560

gaagagcctc tccctgtctc tgggtaaa 1588

<210> 16

<211> 315

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Arg Val Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
            100                 105                 110
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
        115                 120                 125
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
    130                 135                 140
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
145                 150                 155                 160

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
                165                 170                 175
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
            180                 185                 190
Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
        195                 200                 205
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
    210                 215                 220

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
225                 230                 235                 240
```

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
245 250 255
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
260 265 270
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
275 280 285

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
290 295 300
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
305 310 315

<210> 17
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 18
<211> 106
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 19

<211> 330

<212
> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

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

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 20

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

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

210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

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

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 21

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110
Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

【심사관 직권보정사항】
【직권보정 1】
【보정항목】 청구범위
【보정세부항목】 청구항 13
【변경전】
상기 질병을
【변경후】
상기 질환을