(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0067799
(43) 공개일자 2025년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/44 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/44 (2013.01)
A61P 37/02 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7004090
(22) 출원일자(국제) 2023년09월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월07일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2023/050903
(87) 국제공개번호 WO 2024/059900
국제공개일자 2024년03월28일
(30) 우선권주장
2022902712 2022년09월20일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인
커러스 바이오로직스 피티와이 엘티디
오스트레일리아, 빅토리아 3000, 멜버른, 31 퀸 스트리트, 레벨 9
(72) 발명자
콥 사만다
오스트레일리아, 빅토리아 3000, 멜버른, 31 퀸 스트리트, 씨/오 레벨 9
(74) 대리인
특허법인한얼

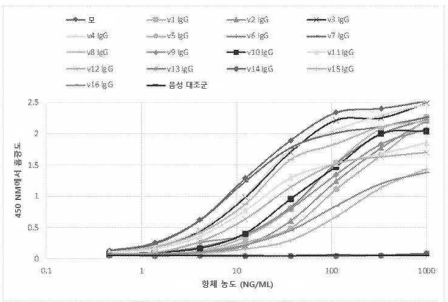
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **항-FLAG 항체**

(57) 요 약

본 발명은 FLAG 태그에 결합시키기 위한 항원 결합 단백질 및 이의 관련된 단편, 상기 항원 결합 단백질 및 단편의 생산 및 상기 항체 및 단편의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

FLAG 태그(tag)에 결합시키기 위한 항원 결합 단백질(antigen binding protein)로서, 상기 단백질이 서열 번호: 2 내지 5 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 가변 중쇄(VH)를 갖는 항원 결합 도메인의 CDRH1, CDRH2 및/또는 CDRH3, 및 서열 번호: 7 내지 10 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 가변 경쇄(VL)의 CDRL1, CDRL2 및/또는 CDRL3을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 단백질이 서열 번호: 11 또는 29 내지 44 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 FLAG 태그 또는 이의 변이체에 특이적으로 결합할 수 있는, 항원 결합 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단백질이 아미노산 서열 DYKDDDDK(서열 번호: 30)를 포함하거나 또는 이로 이루어진 펩타이드에 특이적으로 결합하기 위한 것인, 항원 결합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 재조합 또는 치료학적 단백질, 세포 면역치료제, 세포 면역치료제 상에 존재하는 수용체 내에 또는 상에 포함된 FLAG 태그에 특이적으로 결합하기 위한 것인, 항원 결합 단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이

- 서열 번호: 1에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 6에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는

VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 5 및 서열 번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

- 서열 번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나; 또는

- 서열 번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체의 FLAG 태그에 대한 결합을 경쟁적으로 억제하는, 항원 결합 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이:

A. 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역(complementary determining region; CDR) 1; 서열 번호: 13의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 14의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH, 및 서열 번호: 21의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역(CDR) 1; 서열 번호: 22의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

및 다음의 B., C., D., E., F., F., G., H., I., J., K., L., M., N., O., P., Q., R. 중 어느 하나를 포함하는, 항원 결합 단백질:

B. 참고 서열(reference sequence)에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(framework region; FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 65, 66, 67 및 68 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 16, 18 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 16, 18 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 84, 85, 86 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약

93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 16, 18 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 26, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

F. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 16, 18 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 25, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

G. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 17, 19 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

H. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 17, 19 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 84, 85, 86 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

I. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 17, 19 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 26, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

J. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 17, 19 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 25, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

K. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 16, 82 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

L. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 16, 82 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 84, 85, 86 및 28 각각에

제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

M. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 16, 82 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 26, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

N. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 16, 82 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 25, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

O. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 81, 83 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

P. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 81, 83 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 84, 85, 86 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

Q. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 81, 83 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 26, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

R. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 81, 83 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 25, 27 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이:

A. 서열 번호: 42 또는 43의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 44의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH, 및 서열 번호: 51의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

및 다음의 B., C., D. 또는 E. 중 어느 하나를 포함하는, 항원 결합 단백질:

B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 47, 49 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 47, 49 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 48, 50 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 48, 50 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이:

A. 서열 번호: 42 또는 43의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 44의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH, 및 서열 번호: 64의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

및 다음의 B., C., D., 또는 E. 중 어느 하나를 포함하는, 항원 결합 단백질:

B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 47, 49 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 47, 49 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 92, 93, 94 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 48, 50 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 48, 50 및 20에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 92, 93, 94 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이:

A. 서열 번호: 42 또는 87의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 88의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH, 및 서열 번호: 51의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

및 다음의 B., C., D., 또는 E 중 어느 하나를 포함하는, 항원 결합 단백질:

B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 47, 90 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 47, 90 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 48, 91 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 48, 91 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이:

A. 서열 번호: 42 또는 87의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 88의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH, 및 서열 번호: 64의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

및 다음의 B., C., D., 또는 E. 중 어느 하나를 포함하는, 항원 결합 단백질:

B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 47, 90 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 47, 90 및 20에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 92, 93, 94 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 48, 91 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 48, 91 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 92, 93, 94 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이:

A. 서열 번호: 57의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 58의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH, 및 서열 번호: 51의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

및 다음의 B., C., D., E., F., G., H., 또는 I. 중 어느 하나를 포함하는, 항원 결합 단백질:

B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 59, 61 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약

93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 59, 61 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 60, 62 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 60, 62 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

F. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 59, 97 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

G. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 59, 97 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

H. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 96, 98 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

I. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 96, 98 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이:

A. 서열 번호: 57의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 58의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH,

및 서열 번호: 64의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

및 다음의 B., C., D., E., F., G., H., 또는 I. 중 어느 하나를 포함하는, 항원 결합 단백질:

B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 59, 61 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 59, 61 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 99, 100, 101 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 60, 62 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 60, 62 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 99, 100, 101 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

F. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 59, 97 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

G. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 59, 97 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 99, 100, 101 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

H. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 96, 98 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

I. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 96, 98 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 99, 100, 101 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

[청구항 12]

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 다음을 포함하는, 항원 결합 단백질:

A. 상기 (o) 중 어느 것에서 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 (p) 중 어느 것에서 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL, 및 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 72, 73, 74 및 68 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

또는

B. 상기 (q) 중 어느 것에서 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 (r) 중 어느 것에서 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL 및 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 78, 79 및 68 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 서열 번호: 2 내지 5 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 및 서열 번호: 7 내지 10 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄를 포함하는, 항원 결합 도메인.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이:

(i) 단일 도메인 항체(single domain antibody; sdAb);

(ii) 단일 쇄 Fv 단편(single chain Fv fragment; scFv);

(iii) 이량체성(dimeric) scFv(di-scFv);

(iv) 항체, Fc 또는 중쇄 불변 도메인(CH) 2 및/또는 CH3에 연결된 (ii) 또는 (iii) 중 하나;

(v) 면역 효과기 세포(immune effector cell)에 결합하는 단백질에 연결된 (i) 내지 (iv) 중 하나;

(vi) 변형된 T 세포 수용체와 같은 변형된 면역 세포 수용체에 연결된 (i) 내지 (iv) 중 하나; 또는

(vii) 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR) 또는 변이체 T 세포 수용체의 맥락에서 (i) 내지 (iv) 중 하나의 형태인, 항원 결합 단백질.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이:

(i) 디아보디(diabody);

(ii) 트리아보디(triabody);

(iii) 테트라보디(tetrabody);

(iv) Fab;

(v) F(ab')2;

(vi) Fv;

(vii) 이중특이적 항체(bispecific antibody), 또는 다른 형태의 다중특이적 항체;

(viii) 항체의 불변 영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인(CH) 2 및/또는 CH3에 연결된 (i) 내지 (vii) 중 하나; 또는

(ix) 면역 효과기 세포에 결합하는 단백질에 연결된 (i) 내지 (vii) 중 하나;

(x) 면역 효과기 세포에 결합하는 단백질에 연결된 (i) 내지 (vii) 중 하나;

(xi) 변형된 T 세포 수용체와 같은 변형된 면역 세포 수용체에 연결된 (i) 내지 (vii) 중 하나; 또는

(xiii) 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 변이체 T 세포 수용체(예를 들면, 표적 세포의 표면 상의 항원을 결합하기 위한 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩타이드와 함께 사용하기 위한 공통의(universal) CAR 시스템의 맥락에서)의 형태인, 항원 결합 도메인.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 (N 내지 C 말단 또는 C 내지 N 말단의 순서로) 다음의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어지는, 항원 결합 단백질:

서열 번호: 2 및 10;

서열 번호: 3 및 9;

서열 번호: 2 및 9;

서열 번호: 2 및 7;

서열 번호: 2 및 8;

서열 번호: 3 및 7;

서열 번호: 3 및 8;

서열 번호: 3 및 10;

서열 번호: 4 및 7;

서열 번호: 4 및 8;

서열 번호: 4 및 9;

서열 번호: 4 및 10;

서열 번호: 5 및 7;

서열 번호: 5 및 8;

서열 번호: 5 및 9; 또는

서열 번호: 5 및 10.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질을 포함하는 융합 단백질(fusion protein).

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질, 또는 제17항에 따른 융합 단백질을 포함하는 키메라 항원 수용체 또는 변이체 T 세포 수용체.

청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질을 포함하는 접합체(conjugate).

청구항 20

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질 또는 제17항에 따른 융합 단백질을 암호화(encoding)하는 핵산.

청구항 21

제20항에 따른 핵산을 포함하는 벡터 작제물(vector construct).

청구항 22

제20항에 따른 핵산 또는 제21항에 따른 벡터 작제물을 포함하는 세포.

청구항 23

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질, 제17항에 따른 융합 단백질, 또는 제19항에 따른 접합체 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항원 결합 단백질, 제17항에 따른 융합 단백질, 또는 제19항에 따른 접합체 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 진단 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간화된 항원 결합 단백질(humanised antigen binding protein) 및 이의 관련된 단편(fragment)을 포함하는, FLAG 태그(tag)에 결합시키기 위한 항원 결합 단백질 및 이의 관련된 단편, 상기 항원 결합 단백질 및 이의 단편의 생산, 및 상기 항체 및 이의 단편의 용도에 관한 것이다.

[0002] **관련된 출원**

[0003] 본 출원은 오스트레일리아 가 특허원 제AU 2022902712호로부터의 우선권을 주장하며, 이의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0004] "FLAG" 태그(또한 FLAG 에피토프(epitope)로서 알려짐)는 표적 단백질의 검출 및/또는 친화성 정제(affinity purification)를 용이하게 하기 위하여 단백질 내에 흔히 포함되는 인공 항원 펩타이드 태그이다. 이는 전세계적으로 실험실에서 가장 일반적으로 사용된 단백질 태그 중 하나이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] FLAG 태그에 결합시키기 위한 항체는 알려져 있지만 마우스 또는 다른 설치류에서 생성되어 왔던 이러한 항체는 임상 용도로 적합하지 않다. 마우스 항-FLAG 항체의 사용은 시험관 내(*in vitro*) 시스템에서 재조합 단백질의 검출 또는 정제를 위해 흔히 허용될 수 있지만, 마우스 항체의 사용은 생체 내(*in vivo*) 시스템에서 FLAG 태그의 검출 또는 이에 대한 결합에 항상 적절하지는 않다.

[0006] 결과적으로, 신규하고/하거나 개선된 항-FLAG 항체에 대한 필요성이 존재한다.

[0007] 본 명세서에서 어떠한 선행 기술에 대한 참조도 이러한 선행 기술이 특정 관할권에서 일반적인 상식의 부분을 형성하거나 이러한 선행 기술이 이해되어야 하는 것으로 충분히 예측될 수 있고/있거나, 관련된 것으로 이해되

고/되거나, 고려되고/되거나, 당해 분야의 기술자에 의해 선행 기술의 다른 일부와 조합될 수 있다는 것을 인식하거나 제시하는 것이 아니다.

과제의 해결 수단

[0008] **발명의 요약**

[0009] 본 발명은 FLAG 태그에 결합시키기 위한 항원 결합 도메인(domain)을 포함하는 항원 결합 단백질에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인간화된 항-FLAG 항체, 및 이의 FLAG-결합 단편에 관한 것이다.

[0010] 본 발명은 FLAG 태그에 결합시키기 위한 항원 결합 단백질을 제공하고, 이러한 항원 결합 단백질은 다음을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하고:

[0011] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4, 및

[0012] FR1a - CDR1a - FR2a - CDR2a - FR3a - CDR3a - FR4a,

[0013] 여기서:

[0014] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 골격(framework) 영역이고;

[0015] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역(complementarity determining region)이고;

[0016] FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 각각 골격 영역(framework region)이고;

[0017] CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 각각 상보성 결정 영역(complementary determining region)이고;

[0018] 여기서 골격 영역 및/또는 상보성 결정 영역 중 어느 것의 서열도 본원에 기술된 바와 같고, 바람직하게는 하기 표 1에 기술된 바와 같다.

[0019] 임의의 실시양태에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 항체의 가변 중쇄(VH)로부터의 상보성 결정 영역이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 항체의 가변 경쇄(VL)로부터의 상보성 결정 영역이거나, 또는 여기서 CDR1, CDR2 및 CDR3은 VL로부터의 상보성 결정 영역이고, CDR1a, CDR2a 및 CDR3a는 VH로부터의 상보성 결정 영역이다. 이러한 예에서, CDR은 경우에 따라 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로서 지칭될 수 있다.

[0020] 임의의 실시양태에서, 본 발명의 항원-결합 단백질은 FLAG 태그 또는 이의 변이체(예를 들면, 서열 번호: 11 및 29에 정의된 바와 같거나 본원에 달리 정의된 바와 같다)에 특이적으로 결합할 수 있다. 본 발명의 항원 결합 단백질은 바람직하게는 다수의 FLAG 태그 서열(예컨대, 2 x FLAG, 3 x FLAG 등)을 포함하는 단백질 도메인에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0021] 임의의 실시양태에서, 본 발명의 항원-결합 단백질은 서열 DYK, 바람직하게는 서열 DYKD(서열 번호: 11)를 함유하거나 이로 이루어진 펩타이드 태그에 특이적으로 결합시키기 위한 것이다. 이러한 서열 외에도, 다른 아미노산, 바람직하게는 친수성 아미노산, 예를 들면, R(Arg), D(Asp), E(Glu) 및 K(Lys) 및/또는 방향족 측쇄를 지닌 아미노산, 예를 들면, Y(Tyr), F(Phe), H(His) 및 W(Trp)가 존재할 수 있다.

[0022] 바람직한 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 서열 GDYKDDDDKG(서열 번호: 29), DYKDDDDK(서열 번호: 30), MDYKDDDDK(서열 번호: 31), DFKDDDK(서열 번호: 32), DYKAFDNL(서열 번호: 33), DYKDHDG(서열 번호: 34), MDFKDDDDK(서열 번호: 35), MDYKAFDNL(서열 번호: 36), DYKDHDI(서열 번호: 37), DYKDH(서열 번호: 38), DYKDD(서열 번호: 39), DYKDHD(서열 번호: 40) 및/또는 DYKDDD(서열 번호: 41)를 함유하거나 이로 이루어진 FALG-태그에 특이적으로 결합될 수 있다. 가장 바람직한 서열은 DYKDDDDK(서열 번호: 30)이다.

[0023] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 FLAG-태그는 또한 아미노산 삽입, 결실 또는 치환에 의해, 상술된 FLAG-태그로부터 유래된, 변형된 FLAG-태그, 특히 서열 DYKDDDDK를 지닌 서열을 지칭한다.

[0024] FLAG 태그 "에 결합하는" 단백질 또는 항체에 대한 본원의 참조는 FLAG 태그 "에 특이적으로 결합"하거나 또는 "특이적으로 이에 결합"하는 단백질 또는 항체에 대한 문헌 뒷받침을 제공한다.

[0025] 본 발명의 항원 결합 단백질은 특히 재조합 또는 치료학적 단백질(예를 들면, 치료제에서 사용하기 위한 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 또는 이의 단편 또는 단백질), 또는 FLAG 태그를 포함하는 세포-기반 치료요법(유전적으로 변형된 세포를 포함하는 세포 면역치료요법)의 맥락에서, FLAG 태그에 특이적으로 결합시키기 위한 것이다. 특정의 예에서, 항원 결합 단백질은 키메라 항원 수용체에 포함된 FLAG 태그, 및 세포

면역치료제(예컨대, 세포독성 T 세포에 의한 발현을 위해 CAR에 포함됨)에 의한 발현을 위한 관련된 재조합 수용체에 결합시키기 위한 것이다.

[0026] 임의의 실시양태에서, FLAG 태그는 N-말단에, C-말단에, 또는 이것이 결합하는 것으로 의도된 단백질 내에 존재한다.

[0027] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 FLAG 태그에 결합시키기 위한 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 단백질은:

[0028] - 서열 번호: 1에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 6에 제시된 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0029] - 서열 번호: 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0030] - 서열 번호: 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0031] - 서열 번호: 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0032] - 서열 번호: 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0033] - 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0034] - 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0035] - 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0036] - 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0037] - 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0038] - 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0039] - 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0040] - 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0041] - 서열 번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0042] - 서열 번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나;

[0043] - 서열 번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하거나; 또는

[0044] - 서열 번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체의 FLAG 태그에 대한 결합을 경쟁적으로 억제한다.

[0045] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호: 2 내지 5 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 가변 중쇄를 갖는 항원 결합 도메인의 CDRH1, CDRH2 및/또는 CDRH3을 지닌 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0046] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호: 7 내지 10 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 가변 경쇄를 갖는 항원 결합 도메인의 CDRL1, CDRL2 및/또는 CDRL3을 지닌 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0047] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호: 2 내지 5 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 가변 중쇄를 갖는 항원 결합 도메인의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3, 및 서열 번호: 7 내지 10 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 가변 경쇄를 갖는 항원 결합 도메인의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0048] 하나의 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0049] (a) 및 (b):

[0050] (a) 서열 번호: 12의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 13의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 14의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0051] (b) 서열 번호: 21의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 (CDR) 1; 서열 번호: 22의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0052] 또는 (c) 및 (d):

[0053] (c) 서열 번호: 42 또는 43에 대해 동일한 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 상보성 결정 영역을 포함하는 VH 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR1; 서열 번호: 44의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0054] (d) 서열 번호: 51의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0055] 또는 (e) 및 (f):

[0056] (e) 서열 번호: 42 또는 43의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어

도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 44의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 서열에 대해 동일한 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0057] (f) 서열 번호: 64의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 서열에 대해 동일한 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 서열에 대해 동일한 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0058] 또는 (g) 및 (h):

[0059] (g) 서열 번호: 42 또는 87의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 88의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0060] (h) 서열 번호: 51의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0061] 또는 (i) 및 (j):

[0062] (i) 서열 번호: 42 또는 87의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 88의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0063] (j) 서열 번호: 64의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적

어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0064] 또는 (k) 및 (l):

[0065] (k) 서열 번호: 57의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 58의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0066] (l) 서열 번호: 51의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0067] 또는 (m) 및 (n):

[0068] (m) 서열 번호: 57의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 58의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0069] (n) 서열 번호: 64의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0070] 또는 (o) 및 (p):

[0071] (o) 서열 번호: 42의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약

92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 63의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0072] (p) 서열 번호: 64의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 상보성 결정 영역 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR1; 서열 번호: 52의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0073] 또는 (q) 및 (r):

[0074] (q) 서열 번호: 57의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 상보성 결정 영역 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR1; 서열 번호: 58의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0075] (r) 서열 번호: 64의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 상보성 결정 영역 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR1; 서열 번호: 52의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL.

[0076] 하기 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0077] (a) 및 (b):

[0078] (a) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역(CDR) 1; 서열 번호: 13의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0079] (b) 서열 번호: 21의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역(CDR) 1; 서열 번호: 22의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0080] 또는 (c) 및 (d):

[0081] (c) 서열 번호: 42 또는 43의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역(CDR) 1; 서열 번호: 44의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진

CDR3을 포함하는 VH; 및

[0082] (d) 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0083] 또는 (e) 및 (f):

[0084] (e) 서열 번호: 42 또는 43의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 44의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0085] (f) 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0086] 또는 (g) 및 (h):

[0087] (g) 서열 번호: 42 또는 87의 상보성 결정 영역 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR1; 서열 번호: 88의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0088] (h) 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0089] 또는 (i) 및 (j):

[0090] (i) 서열 번호: 42 또는 87의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 88의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0091] (j) 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0092] 또는 (k) 및 (l):

[0093] (k) 서열 번호: 57의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 58의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3 45를 포함하는 VH; 및

[0094] (l) 서열 번호: 51의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0095] 또는 (m) 및 (n):

[0096] (m) 서열 번호: 57의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 58의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0097] (n)서열 번호: 64의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0098] 또는 (o) 및 (p):

[0099] (o) 서열 번호: 42의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 63의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0100] (p) 서열 번호: 64의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산

을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL,

[0101] 또는 (q) 및 (r):

[0102] (q) 서열 번호: 57의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 58의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 45의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VH; 및

[0103] (r) 서열 번호: 64의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 상보성 결정 영역 CDR1; 서열 번호: 52의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR2; 서열 번호: 23의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 CDR3을 포함하는 VL.

[0104] 임의의 실시양태에서, FR1, FR2, FR3 및 FR4는 항체의 가변 중쇄(VH)로부터의 골격 영역을 지칭할 수 있고, FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 항체의 가변 경쇄(VL)로부터의 골격 영역을 지칭할 수 있거나, 또는 FR1, FR2, FR3 및 FR4가 VL로부터의 골격 영역인 경우, FR1a, FR2a, FR3a 및 FR4a는 VH로부터의 골격 영역이다. 이러한 예에서, FR은 존재할 수 있는 경우 FR H1, FR H2, FR H3, FR H4, FR L1, FR L2, FR L3 및 FR L4로서 지칭될 수 있다.

[0105] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 인간 배선(human germline)으로부터의 FR H1, FR H2, FR H3 및/또는 FR H4를 지닌 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 인간 배선은 IGHV1-46*01 또는 IGHV7-4-1*02이다.

[0106] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 인간 배선으로부터의 FR L1, FR L2, FR L3 및/또는 FR L4를 지닌 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 인간 배선은 IGKV2-30*01 또는 IGKV4-1*01이다.

[0107] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 인간 배선으로부터의 FR H1, FR H2, FR H3 및/또는 FR H4(여기서 인간 배선은 IGHV1-46*01 또는 IGHV7-4-1*02이다) 및 인간 배선으로부터의 FR L1, FR L2, FR L3 및/또는 FR L4(여기서 인간 배선은 IGKV2-30*01 또는 IGKV4-1*01이다)를 지닌 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0108] 임의의 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 인간에 대해 80%, 81%, 82%, 8%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92% 초과의 동일성을 갖고 바람직하게는 인간에 대한 동일성 %가 실시예 12에 기술된 바와 같은 VH, 및/또는 인간에 대해 80%, 81%, 82%, 8%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92% 초과의 동일성을 갖고, 바람직하게는 인간에 대한 동일성%가 실시예 1에 기술된 바와 같은 VL을 포함한다.

[0109] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호: 2 내지 5 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 가변 중쇄를 갖는 항원 결합 도메인의 FR H1, FR H2, FR H3 및/또는 FR H4를 지닌 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0110] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호: 7 내지 10 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 가변 경쇄를 갖는 항원 결합 도메인의 FR L1, FR L2, FR L3 및/또는 FR L4를 지닌 항원 결합 도메인을 제공한다.

[0111] 임의의 실시양태에서, 본 발명은 서열 번호: 2 내지 5 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 항원 결합 도메인의 FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4를 포함하는 항원 결합 단백질, 및 서열 번호: 7 내지 10 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 가변 경쇄를 갖는 항원 결합 도메인의 FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4를 지닌 항원 결합 도메인을 제공한다.

[0112] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0113] A. 상기 임의의 (a)에 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 임의의 (b)에 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL,

[0114] 및 B., C., D., E., F., G., H., I., J., K., L., M., N., O., P., Q., 또는 R. 중 어느 하나:

[0115] B. 참고 서열(reference sequence)에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 65, 66, 67 및 68 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0116] 또는

[0117] C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR)을 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 16, 18 및 20 각각의 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0118] 또는

[0119] D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 16, 18 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 84, 85, 86 및 28 각각의 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0120] 또는

[0121] E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 16, 18 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 26, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0122] 또는

[0123] F. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 16, 18 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 25, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0124] 또는

[0125] G. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 17, 19 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0126] 또는

[0127] H. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 17, 19 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 84, 85, 86 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0128] 또는

[0129] I. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 17, 19 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 26, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0130] 또는

[0131] J. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약

93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR 참고 서열은 서열 번호: 15, 17, 19 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 25, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0132] 또는

[0133] K. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 16, 82 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0134] 또는

[0135] L. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 16, 82 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 84, 85, 86 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0136] 또는

[0137] M. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 16, 82 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 26, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0138] 또는

[0139] N. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 16, 82 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 25, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0140] 또는

[0141] O. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 81, 83 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 69, 70, 71 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0142] 또는

[0143] P. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 81, 83 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 84, 85, 86 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0144] 또는

[0145] Q. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 81, 83 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 26,

27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0146] 또는

[0147] R. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 80, 81, 83 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 24, 25, 27 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

[0148] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0149] A. 상기 임의의 (c)에 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 임의의 (d)에 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL,

[0150] 및 B., C., D., 또는 E. 중 어느 하나:

[0151] B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 47, 49 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같거나,

[0152] 또는

[0153] C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 47, 49 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같거나,

[0154] 또는

[0155] D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 48, 50 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같거나,

[0156] 또는

[0157] E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 48, 50 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같다.

[0158] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0159] A. 상기 임의의 (e)에 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 임의의 (f)에 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL,

[0160] 및 B., C., D. 또는 E. 중 어느 하나:

[0161] B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 47, 49 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에

제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0162] 또는

[0163] C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 47, 49 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 92, 93, 94 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0164] 또는

[0165] D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 48, 50 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0166] E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 46, 48, 50 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 92, 93, 94 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

[0167] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0168] A. 상기 임의의 (g)에 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 임의의 (h)에 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH,

[0169] 및 B., C., D. 또는 E. 중 어느 하나:

[0170] B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 47, 90 및 20 에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0171] 또는

[0172] C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 47, 90 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0173] 또는

[0174] D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 48, 91 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0175] 또는

[0176] E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고

서열은 서열 번호: 89, 48, 91 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

[0177] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0178] A. 상기 임의의 (i)에 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역 (CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 임의의 (j)에 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL,

[0179] 및 B., C., D. 또는 E. 중 어느 하나:

[0180] B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 47, 90 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0181] 또는

[0182] C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 47, 90 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 92, 93, 94 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0183] 또는

[0184] D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 48, 91 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0185] 또는

[0186] E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 89, 48, 91 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 92, 93, 94 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

[0187] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0188] A. 상기 임의의 (k)에 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역 (CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 임의의 (l)에 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL,

[0189] 및 B., C., D., E., F., G., H. 또는 I. 중 어느 하나:

[0190] B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 59, 61 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0191] 또는

[0192] C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고

서열은 서열 번호: 15, 59, 61 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0193] 또는

[0194] D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 60, 62 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0195] 또는

[0196] E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 60, 62 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0197] 또는

[0198] F. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 59, 97 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0199] 또는

[0200] G. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 59, 97 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0201] 또는

[0202] H. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 96, 98 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 55, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0203] 또는

[0204] I. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 96, 98 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 53, 54, 56 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

[0205] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0206] A. 상기 임의의 (m)에 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 임의의 (n)에 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL,

[0207] 및 B., C., D., E., F., G., H., 또는 I. 중 어느 하나:

[0208] B. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약

93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 59, 61 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0209] 또는

[0210] C. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 59, 61 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 99, 100, 101 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0211] 또는

[0212] D. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 60, 62 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0213] 또는

[0214] E. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 60, 62 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 99, 100, 101 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0215] 또는

[0216] F. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 59, 97 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0217] 또는

[0218] G. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 59, 97 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 99, 100, 101 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0219] 또는

[0220] H. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 96, 98 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0221] 또는

[0222] I. 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 95, 96, 98 및 20 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 99, 100,

101 및 28에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

[0223] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 도메인은 다음을 포함한다:

[0224] A. 상기 임의의 (o)에 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 임의의 (p)에 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL, 및 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 72, 73, 74 및 68 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL,

[0225] 또는

[0226] B. 상기 임의의 (q)에 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VH 및 상기 임의의 (r)에 정의된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 VL 및 참고 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 동일한 골격 영역(FR) 1, 2, 3 및 4를 각각 포함하는 VH 및 VL로서: VH FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 15, 78, 79 및 68 각각에 제시된 바와 같고, VL FR의 경우 참고 서열은 서열 번호: 75, 76, 77 및 28 각각에 제시된 바와 같은 VH 및 VL.

[0227] 임의의 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 서열 번호: 2 내지 5 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 서열을 포함하는 가변 중쇄를 포함한다.

[0228] 임의의 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 서열 번호: 7 내지 10 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄; 또는 이에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 서열을 포함하는 가변 경쇄를 포함한다.

[0229] 임의의 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 서열 번호: 2 내지 5 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 및 서열 번호: 7 내지 10 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄; 또는 이에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0230] 본원에 기술된 바와 같이, 항원 결합 단백질은:

[0231] (i) 단일 도메인 항체(single domain antibody; sdAb);

[0232] (ii) 단일 쇄 Fv 단편(scFv);

[0233] (iii) 이량체성(dimeric) scFv(di-scFv);

[0234] (iv) 항체의 불변 영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인 (CH) 2 및/또는 CH3에 연결된 (ii) 또는 (iii) 중 하나;

[0235] (v) 면역 효과기 세포(immune effector cell)에 결합하는 단백질에 연결된 (i) 내지 (iv) 중 하나;

[0236] (vi) 변형된 T 세포 수용체와 같은, 변형된 면역 세포 수용체에 연결된 (i) 내지 (iv) 중 하나; 또는

[0237] (vii) 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR) 또는 변이체 T 세포 수용체의 맥락에서 (i) 내지 (iv) 중 하나의 형태일 수 있다.

[0238] 또한, 본원에 기술된 바와 같이, 항원 결합 단백질은:

[0239] (i) 디아보디(diabody);

[0240] (ii) 트리아보디(triabody);

[0241] (iii) 테트라보디(tetrabody);

[0242] (iv) Fab;

[0243] (v) F(ab')2;

[0244] (vi) Fv;

[0245] (vii) 이중특이적 항체(bispecific antibody), 또는 다른 형태의 다중특이적 항체(multispecific antibody);

[0246] (viii) 항체, Fc 또는 중쇄 불변 도메인(CH) 2 및/또는 CH3의 불변 영역에 연결된 (i) 내지 (vii) 중 하나; 또는

[0247] (ix) 면역 효과기 세포(immune effector cell)에 결합하는 단백질에 연결된 (i) 내지 (vii) 중 하나,

[0248] (x) 면역 효과기 세포에 결합 하는 단백질에 연결된 (i) 내지 (vii) 중 하나;

[0249] (xi) 변형된 T 세포 수용체와 같은 변형된 면역 세포 수용체에 연결된 (i) 내지 (vii) 중 하나, 또는

[0250] (xiii) 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 변이체 T 세포 수용체(예를 들면, 표적 세포의 표면에서 결합 항원에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩타이드와 함께 사용하기 위한 보편적인(universal) CAR 시스템의 맥락에서)의 맥락에서 (i) 내지 (vii) 중 하나의 형태일 수 있다.

[0251] 앞서의 항원 결합 단백질은 또한 항체의 항원 결합 도메인으로 지칭될 수 있다.

[0252] 바람직하게는, 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 전형적으로, 항원 결합 단백질은 항체, 예를 들면, 모노클로날 항체이다. 항원 결합 단백질은 재조합 또는 변형된 항체(예컨대, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, CDR-이식된 항체, 영장류화된 항체, 탈-면역화된 항체(de-immunised antibody), 신인간화된 항체(synhumanised antibody), 반-항체(half-antibody), 이중특이적 항체(bispecific antibody), 삼중특이적 항채(trispecific antibody) 또는 다중특이적 항체(multispecific antibody))이다. 항체는 화학적 변형, 예를 들면, 활성제 또는 방사표지에 대한 접합, 또는 용해도를 증진시키기 위한 제제 또는 본원에 기술된 다른 변형을 추가로 포함할 수 있다.

[0253] 본원에 사용된 바와 같은 항원 결합 단백질은 가변 도메인일 수 있다.

[0254] 본 발명은 예를 들면 다음(N에서 C 말단(terminus)으로의 순서 또는 C에서 N 말단으로의 순서)의 아미노산 서열로 본질적으로 이루어진 또는 이루어진 항원 결합 단백질을 제공한다:

[0255] 서열 번호: 2 및 10;

[0256] 서열 번호: 3 및 9;

[0257] 서열 번호: 2 및 9;

[0258] 서열 번호: 2 및 7;

[0259] 서열 번호: 2 및 8;

[0260] 서열 번호: 3 및 7;

[0261] 서열 번호: 3 및 8;

[0262] 서열 번호: 3 및 10;

[0263] 서열 번호: 4 및 7;

[0264] 서열 번호: 4 및 8;

[0265] 서열 번호: 4 및 9;

[0266] 서열 번호: 4 및 10;

[0267] 서열 번호: 5 및 7;

[0268] 서열 번호: 5 및 8;

[0269] 서열 번호: 5 및 9; 또는

[0270] 서열 번호: 5 및 10.

[0271] 본원에 사용된 바와 같은, 본 발명의 항원 결합 단백질의 상보성 결정 영역서열(CDR)은 IMGT, 초티아(Chothia) 또는 카밧(Kabat) 넘버링 시스템에 따라 정의된다.

[0272] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질을 제공하고 여기서 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 중 하나 이상을 형성하는 아미노산 서열은 인간 서열이다.

[0273] 본 발명은 항-FLAG 태그 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 본원에 기술된 바와 같은 서열을 갖는 항원 결합 단백질을 포함하거나, 또는 본원에 기술된 바와 같은 CDR 및/또는 FR 서열을 포함하는 다중특이적 항체를 제공한다.

[0274] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 서열을 갖는 항원 결합 단백질을 포함하거나, 또는 본원에 기술된 CDR 및/또는 FR 서열을 포함하는 디아보디 또는 트리아보디를 제공한다.

[0275] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체를 포함하는 융합 단백질(fusion protein)을 제공한다.

[0276] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 키메라 항원 단백질(CAR) 또는 변이체 T 세포 수용체의 구성성분으로서 포함될 수 있다. 이러한 실시양태에서 본 발명의 항원 결합 단백질을 포함하는 생성된 CAR 또는 변이체 T 세포는 "간접적인 CAR"(때때로 공통의(universal) CAR로 지칭된다)로서 지칭될 수 있음이 인식될 것이다. 간접적인 CAR 시스템에서, CAR의 항원 결합 도메인은 표적 세포에서 표적 항원에 직접적으로 결합하지 않지만, 대신에 중간체에 결합하며, 여기서 중간체는 표적 세포에 직접 결합하기 위한 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 중간체는 표적 세포에 직접 결합하기 위한 항원 결합 도메인을 포함한다. 중간체의 방식으로 세포를 인식하는 CAR의 예는 당해 분야, 예를 들면, 유럽 특허원 제EP 2651442호에 공지되어 있다.

[0277] 따라서, 간접적인 CAR의 맥락에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 중간체에 존재하는 FLAG 태그(tag)에 결합하기 위한 것이고 여기서 중간체는 또한 표적 세포(예컨대, 암 세포)에 결합하기 위한 항원 결합 도메인이다. 중간체는 표적 세포(예를 들면, 암 세포)에 대한 특이성을 제공하는 반면 CAR를 갖는 유전적으로 변형된 세포는 효능을 제공하고 표적 세포에 대해 면역 반응을 지시한다. 중간체는 표적 세포에서 표적 항원에 직접 결합 하거나 상호작용하는 프로브와 같은 분자일 수 있고, 또한 FLAG 태그를 포함한다. 이러한 프로브의 비-제한적 예는 항체, 융합 단백질, 항체의 Fab, scFv, 가용성의 가공된 TCR 또는 압타머(aptamer)를 포함한다. 용어 "압타머"는 표적에 특이적으로 결합하거나, 또는 이와 복합체를 우선적으로 형성하는 올리고핵산, 폴리핵산, 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0278] 본 발명은 또한 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체 dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 표지 또는 세포독성제에 접합된 다중특이적 항체 또는 융합 단백질의 형태의 접합체를 제공한다.

[0279] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질, 또는 접합체에 결합하기 위한 항체를 제공한다.

[0280] 항원 결합 단백질을 형성하는 다중 폴리펩타이드 쇄에 대해 지시된 본 발명의 양태에서, 발현 작제물은 예컨대, 프로모터에 작동적으로 연결된 VH를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화(encoding)하는 핵산 및 예컨대, 프로모터에 작동적으로 연결된 VL을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0281] 다른 예에서, 발현 작제물(expression construct)은 예컨대, 5' 내지 3' 순서로:

[0282] (i) 프로모터

[0283] (ii) 제1의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산;

[0284] (iii) 내부 리보소옴 도입 부위(internal ribosome entry site); 및

[0285] (iv) 제2의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 작동가능하게 연결된 구성성분을 포함하는 비시스트론성 발현 카세트(bicistronic expression construct)이고,

[0286] 여기서 제1의 폴리펩타이드는 VH를 포함하고 제2의 폴리펩타이드는 VL을 포함하거나, 또는 이의 역을 포함한다.

[0287] 본 발명은 또한 이중 하나가 VH를 포함하는 제1의 폴리펩타이드를 암호화하고 이중 다른 것이 VL을 포함하는 제2의 폴리펩타이드를 암호화하는 별개의 발현 카세트를 고려한다. 예를 들면, 본 발명은 또한:

[0288] (i) 프로모터에 작동적으로 연결된 VH를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 제1의 발현 작제물; 및

[0289] (ii) 프로모터에 작동적으로 연결된 VL을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 제2의 발현 작제물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0290] 본 발명은 본원에 기술된 벡터 또는 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 바람직하게는, 세포는 단리된, 실질적으로 정제된 또는 재조합체이다. 하나의 예에서, 세포는 본 발명의 발현 카세트 또는:

[0291] (i) 프로모터에 작동적으로 연결된 VH를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 제1의 발현 작제물; 및

[0292] (ii) 프로모터에 작동적으로 연결된 VL을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 제2의 발현 작제물을 포함하고,

[0293] 여기서 제1 및 제2의 폴리펩타이드는 연합하여 본 발명의 항원 결합 단백질을 형성한다.

[0294] 본 발명의 세포의 예는 세균 세포, 효모 세포, 곤충 세포 및 포유동물 세포를 포함한다.

[0295] 본 발명은 본원에 기술된 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질 또는 접합체를 암호화하는 핵산을 제공한다.

[0296] 본 발명은 본원에 기술된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 바람직하게는 핵산은 서열 번호: 2 내지 5 및 7 내지 10에 상응하는 아미노산 서열 중 임의의 하나 이상을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0297] 본 발명은 본원에 기술된 벡터 또는 핵산을 포함하는 세포를 제공한다.

[0298] 다른 실시양태에서 본원에 기술된 세포를 포함하는 이로부터 유래된 동물 또는 조직이 제공된다.

[0299] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 또는 예를 들면, CDR 및/또는 FR 서열, 또는 본원에 기술된 바와 같은 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질, 또는 접합체 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0300] 본 발명은 항원 결합 단백질, 또는 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 CDR 및/또는 FR 서열, 또는 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질 또는 접합체, 희석제 및 임의로 표지(label)를 포함하는 진단 조성물을 제공한다.

[0301] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 또는 예를 들면, CDR 및/또는 FR 서열 또는 본원에 기술된 바와 같은 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질 또는 접합체를 포함하는 키트(kit) 또는 제조 물품을 제공한다.

[0302] 본 발명은 FLAG 태그에 대한 결합을 위해 항원 결합 단백질을 생산하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 및 FR4 중 하나 이상에 따른 서열의 용도를 제공한다.

[0303] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질 또는 CDR 및/또는 FR 서열의 돌연변이로부터 생산된 핵산 분자의 라이브러리를 제공하고, 여기서 상기 라이브러리에서 적어도 하나의 핵산 분자는 FLAG 태그에 대한 결합을 위해 항원 결합 단백질을 암호화한다.

[0304] 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 세포 또는 동물에서 본원에 기술된 바와 같은 핵산을 발현시키는 단계를 포함하는 본원에 기술된 바와 같은 FLAG 태그에 대한 결합을 위한 항원 결합 단백질을 생산하기 위한 방법을 제공한다.

[0305] 본 발명의 어떠한 양태에서도, 항원 결합 단백질은 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC)을 유도하기 위한 향상된 능력을 갖도록 가공된 Fc 영역을 포함한다. 바람

직하게는, ADCC를 유도하는 향상된 능력은 Fc 수용체와 상호작용하는 Fc 영역에서 아미노산의 돌연변이, 결실 또는 변형에 의해 부여된다. 바람직하게는, 돌연변이되거나, 결실되거나 또는 변형된 아미노산은 서열 번호: 60(여기서 알라닌은 118번 위치이다)에서 239, 330, 및/또는 332번 위치 또는 239, 330 및/또는 332번에 대해 동등한 위치에 존재한다. 바람직하게는, 아미노산은 S239D, A330L 및 I332E로 돌연변이된다. 전형적으로, Fc는 서열 번호: 62에 나타낸 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어진다.

[0306] 본 발명의 임의의 양태에서, 항원 결합 단백질은 항체-의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC)를 유도하기 위한 감소된 능력을 갖도록 가공되지 않은 Fc 영역을 포함한다. 바람직하게는, 서열 번호: 60(여기서 알라닌은 118번 위치이다)에서 234, 235, 및/또는 331번 위치 또는 234, 235 및/또는 331번에 대해 동등한 위치에서 아미노산은 각각 F, E 및/또는 S가 아니다. 다시 말해서, 234번 위치에서 아미노산은 F가 아니고/아니거나, 235번 위치에서 E가 아니고/아니거나 331번 위치에서 S가 아니다.

[0307] 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은:

[0308] - 시험관 내 또는 생체 내 반감기를 증가시키거나;

[0309] - 항체-의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC), 항체-의존성 식균작용(antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP) 또는 상보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity)을 유도하는 증가된 능력을 갖거나;

[0310] - 효과기 기능을 감소시키거나; 또는

[0311] - 항원 결합 단백질의 공-개입(co-engagement)을 증가시키기 위해 가공되는 Fc 영역을 포함한다.

[0312] 본 발명은 FLAG 태그의 발현과 관련된 암 또는 상태 또는 질환의 치료를 위한 의약의 제조에서 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질, 접합체 또는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0313] 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 단백질 또는 항체는 바람직하게는 인간 불변 영역, 예컨대, IgG 불변 영역, 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 불변 영역 또는 이의 혼합물을 포함한다. VH 및 VL을 포함하는 항체 또는 단백질의 경우에, VH는 중쇄 불변 영역에 연결될 수 있고 VL은 경쇄 불변 영역에 연결될 수 있다.

[0314] 본 발명의 항원 결합 단백질의 기능적 특성은 본 발명의 항체에 대해 약간 수정(*mutatis mutandis*)하여 적용할 것이다.

[0315] 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질은 정제되고/되거나, 실질적으로 정제되고/되거나, 단리되고/되거나 재조합체일 수 있다.

[0316] 본 발명의 항원 결합 단백질은 본 발명의 항원 결합 단백질을 발현하는 하이브리도마가 성장하는 배지로부터 취한 상층액의 부분일 수 있다.

[0317] 본 발명은 FLAG 태그에 결합시키기 위한 항원 결합 단백질을 포함하는 단일 도메인 항체를 제공한다.

[0318] 본원에 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 요구하는 경우를 제외하고는, 용어 "포함하다" 및 이러한 용어의 변형, 예를 들면, "포함하는", "포함하다" 및 "포함된"은 추가의 첨가, 구성성분, 정수 또는 단계를 배제하는 것으로 의도되지 않는다.

[0319] 본 발명의 추가의 양태 및 앞서의 절에 기술된 양태의 추가의 실시양태는 실시예의 방식으로 및 첨부된 도면을 참조로 제공된, 다음의 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0320] **도 1:** IgG 인간화된 FLAG-태그 결합 모노클로날 항체의 ELISA 역가.

도 2: FLAG-태그된 CAR에 결합시키기 위한 인간화된 모노클로날 항체는 CAR T 세포로부터 IFN 감마 분비를 유도한다.

도 3: 인간화된 변이체 v4 및 v7를 지닌 모 항체로부터 VH 및 VL 영역의 정렬.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0321] **서열 정보**

[0322] [표 1]

서열 정보

설명	서열 번호:	아미노산 서열
모 VH(마우스)	1	QVQLQQSAGELARPGASVKMSCKASGYSFTT YTIHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSGYAAYNQ NFKDETTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCAREKFYGYDYWGQGTTLTVSS
인간화된 VH1(hu-VH1) 중쇄 변이체 1 (IGHV1-46*01 배선)	2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTT YTIHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSGYAAYNQ KFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREKFYGYDYWGQGTTVTVSS
인간화된 VH2(hu-VH2) 중쇄 변이체 2 (IGHV1-46*01 배선)	3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTT YTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGYAAYN QKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAREKFYGYDYWGQGTTVTVSS
인간화된 VH3(hu-VH3) 중쇄 변이체 3 (IGHV7-4-1*-2 배선)	4	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFTT YTIHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSGYAAYNQ GFTGRFVLSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYY CAREKFYGYDYWGQGTTVTVSS
인간화된 VH4(hu-VH4) 중쇄 변이체 4(IGHV7-4-1*-2 배선)	5	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFTT YTMNWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGYAAYN QGFTGRFVFSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCAREKFYGYDYWGQGTTVTVSS

[0323]

모 VL(마우스)	6	DVLMTQLPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHR NGNTYLEWYLLKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQG SHVPYTFGGGTKLEIK
인간화된 VL1 (hu-VL1) 경쇄 변이체 1 (IGKV2-30*01 배선)	7	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHR NGNTYLEWFQLRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQ GSHVPYTFGGGTKLEIK
인간화된 VL2(hu-VL2) 경쇄 변이체 2(IGKV2-30*01 배선)	8	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHR NGNTYLEWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQ GSHVPYTFGGGTKLEIK
인간화된 VL3(hu-VL3) 경쇄 변이체 3 (IGKV4-1*01 배선)	9	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVHR NGNTYLEWYQLKPGQPPKLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQG SHVPYTFGGGTKLEIK
인간화된 VL4(hu-VL4) 경쇄 변이체 4 (IGKV4-1*01 배선)	10	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIVHR NGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQ GSHVPYTFGGGTKLEIK
FLAG 태그	11	DYKD
모 CDR H1, VH1, VH2, VH3 및 VH4 (IMGT)	12	GYSFTTYT

[0324]

모 CDR H2, VH1, VH2, VH3 및 VH4 (IMGT)	13	INPSSGYA
모 CDR H3, VH1, VH2, VH3 및 VH4 (IMGT)	14	AREKFYGYDY
FR H1 VH1 및 VH2 (IMGT 및 초티아)	15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
FR H2 VH1 (IMGT)	16	IHWVRQAPGQGLEWIGY
FR H2 VH2 (IMGT)	17	MHWVRQAPGQGLEWMGY
FR H3 VH1 및 VH3 (IMGT)	18	AYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC
FR H3 VH2 (IMGT)	19	AYNQKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC
FR H4 VH1, VH2, VH3 및 VH4 (IMGT, 카밧 및 초티아)	20	WGQGTTVTVSS
모 CDR L1, VL1, VL2, VL3 및 VL4 (IMGT)	21	QSIVHRNGNTY
모 CDR L2, VL1, VL2, VL3 및 VL4 (IMGT)	22	KVS
모 CDR L3, VL1, VL2, VL3 및 VL4	23	FQGSHVPYT

[0325]

(IMGT, 카밧 및 초티아)		
FR L1 VL3 및 VL4 (IMGT)	24	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS
FR L2 VL4 (IMGT)	25	LEWYQQKPGQPPKLLIY
FR L2 VL3 (IMGT)	26	LEWYQLKPGQPPKLLIY
FR L3 VL3 및 VL4 (IMGT)	27	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
모 FR L4, VL1, VL2, VL3 및 VL4 (IMGT, 카밧 및 초티아)	28	FGGGTKLEIK
FLAG 태그 데카펩타이드	29	GDYKDDDDKG
FLAG 태그 옥타펩타이드	30	DYKDDDDK
FLAG 태그 노나펩타이드	31	MDYKDDDDK
FLAG 태그 헵타펩타이드	32	DFKDDDK
FLAG 태그 대안의 옥타펩타이드	33	DYKAFDNL
FLAG 태그	34	DYKDHDG

[0326]

대안의 헵타펩타이드		
대안의 FLAG 태그	35	MDFKDDDDK
대안의 FLAG 태그	36	MDYKAFDNL
대안의 FLAG 태그	37	DYKDHDI
대안의 FLAG 태그	38	DYKDH
대안의 FLAG 태그	39	DYKDD
대안의 FLAG 태그	40	DYKDHD
대안의 FLAG 태그	41	DYKDDD
모 CDR H1, VH1 및 VH3 (카밧)	42	TYTIH
CDR H1 VH2 (카밧)	43	TYTMH
CDR H2 VH1 및 VH2 (카밧)	44	YINPSSGYAAYNQKFQG
모 CDR H3, VH1, VH2, VH3 및 VH4 (카밧 및 초티아)	45	EKFYGYDY
FR H1 VH1 및 VH2 (카밧)	46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSF
FR H2 VH1 및 VH3 (카밧)	47	WVRQAPGQGLEWIG

[0327]

FR H2 VH2 및 VH4 (카밧)	48	WVRQAPGQGLEWMG
FR H3 VH1 (카밧)	49	RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
FR H3 VH2 (카밧)	50	RVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
CDR L1 VL3 및 VL4 (카밧 및 초티아)	51	KSSQSIVHRNGNTYLE
모 CDR L2, VL1, VL2, VL3 및 VL4 (카밧 및 초티아)	52	KVSNRFS
FR L1 VL3 및 VL4 (카밧 및 초티아)	53	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINC
FR L2 VL4 (카밧 및 초티아)	54	WYQQKPGQPPKLLIY
FR L2 VL3 (카밧 및 초티아)	55	WYQLKPGQPPKLLIY
FR L3 VL3 및 VL4 (카밧 및 초티아)	56	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
모 CDR H1, VH1, VH2, VH3 및 VH4 (초티아)	57	GYSFTTY
모 CDR H2, VH1, VH2, VH3 및 VH4 (초티아)	58	NPSSGY

[0328]

FR H2 VH1 및 VH3 (초티아)	59	TIHWVRQAPGQGLEWIGYI
FR H2 VH2 (초티아)	60	TMHWVRQAPGQGLEWMGYI
FR H3 VH1 (초티아)	61	AAYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
FR H3 VH2 (초티아)	62	AAYNQKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
모 CDR H2 (카밧)	63	YINPSSGYAAYNQNFKD
모 CDR L1 VL1 및 VL2 (카밧 및 초티아)	64	RSSQSIVHRNGNTYLE
모 FR H1 (IMGT)	65	QVQLQQSAGELARPGASVKMSCKAS
모 FR H2 (IMGT)	66	IHWVKQRPGQGLEWIGY
모 FR H3 (IMGT)	67	AYNQNFKDETTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC
모 FR H4 (IMGT, 카밧 및 초티아)	68	WGQGTTLTVSS
모 FR L1 및 VL1 (IMGT)	69	DVLMTQLPLSLPVSLGDQASISCRSS
모 FR L2 및 VL1 (IMGT)	70	LEWYLLKPGQSPKLLIY
모 FR L3 및 VL1 (IMGT)	71	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC
모 FR H1 (카밧)	72	QVQLQQSAGELARPGASVKMSCKASGYSFT

[0329]

모 FR H2 (카밧)	73	WVKQRPGQGLEWIG
모 FR H3 (카밧)	74	ETTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
모 FR L1 및 VL1 (카밧 및 초티아)	75	DVLMTQLPLSLPVSLGDQASISC
모 FR L2 및 VL1 (카밧 및 초티아)	76	WYLLKPGQSPKLLIY
모 FR L3 및 VL1 (카밧 및 초티아)	77	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF
모 FR H2 (초티아)	78	TIHWVKQRPGQGLEWIGYI
모 FR H3 (초티아)	79	AAYNQNFKDETTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
FR H1 VH3 및 VH4 (IMGT)	80	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKAS
FR H2 VH4 (IMGT)	81	MNWVRQAPGQGLEWMGY
FR H3 VH3 (IMGT)	82	AYNQGFTGRFVLSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC
FR H3 VH4 (IMGT)	83	AYNQGFTGRFVFSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC
FR L1 VL2 (IMGT)	84	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS
FR L2 VL2 (IMGT)	85	LEWFQQRPGQSPRLLIY
FR L3 VL2 (IMGT)	86	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

[0330]

CDR H1 VH4 (카밧)	87	TYTMN
CDR H2 VH3 및 VH4 (카밧)	88	YINPSSGYAAYNQGFTG
FR H1 VH3 및 VH4 (카밧)	89	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFT
FR H3 VH3 (카밧)	90	RFVLSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR
FR H3 VH4 (카밧)	91	RFVFSADKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR
FR L1 VL2 (카밧)	92	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
FR L2 VL2 (카밧)	93	WFQQRPGQSPRLLIY
FR L3 VL2 (카밧)	94	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
FR H1 VH3 및 VH4 (초티아)	95	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKAS
FR H2 VH4 (초티아)	96	TMNWVRQAPGQGLEWMGYI
FR H3 VH3 (초티아)	97	AAYNQGFTGRFVLSADKSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYCAR
FR H3 VH4 (초티아)	98	AAYNQGFTGRFVFSADKSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYCAR
FR L1 VL2 (초티아)	99	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
FR L2 VL2 (초티아)	100	WFQQRPGQSPRLLIY
FR L3 VL2 (초티아)	101	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

[0331]

[0332] ***실시양태의 상세한 설명***

[0333] 본 명세서에 개시되고 정의된 발명이 내용 또는 도면에 언급되거나 이로부터 명백한 개개 특징 중 2개 이상의 모든 대안의 조합까지 확장됨이 이해될 것이다. 이러한 상이한 조합 모두는 본 발명의 다양한 대안의 양태를 구성한다.

[0334] 본 발명의 추가의 양태 및 앞서의 절에 기술된 양태의 추가의 실시양태는 실시예의 방식으로 및 첨부되는 도면을 참조로, 다음의 설명으로부터 명백할 것이다.

[0335] 이제 본 발명의 특정의 실시양태에 대해 참조가 이루어질 것이다. 본 발명이 실시양태와 관련하여 기술될 것이지만, 본 발명을 이러한 실시양태로 제한하는 것을 의도하지 않음이 이해될 것이다. 대조적으로, 본 발명은 모든 대안, 변형, 및 등가물을 포괄하는 것으로 의도되며, 이는 청구범위에 정의된 바와 같이 본 발명의 영역 내에 포함될 것이다.

[0336] 본 발명자는 FLAG 태그에 결합하는, 항원 결합 단백질, 예를 들면, 항체를 개발하였다. 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질은 재조합 단백질; 재조합 펩타이드; 유전적으로 변형된 세포(예를 들면, 이의 표면에서 수용체를 발현하도록 변형된 유전적으로 변형된 세포, 여기서 수용체는 하나 이상의 FLAG 태그를 포함한다) 중 어느 것에 존재하는 하나 이상의 FLAG 태그에 결합시키기 위한 것이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 세포독성 세포와 같은 유전적으로 변형된 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR)에 존재하는 하나 이상의 FLAG 태그에 결합시키기 위해 사용될 수 있다.

[0337] 본 발명의 항원 결합 단백질은 이를 인간 치료제에서 사용하기 위한 유전적으로 가공된 세포(genetically engineered cell)에 의해 발현된, CAR 또는 다른 수용체 또는 단백질에 결합시키기에 특히 적합하도록 하는, 인간화된 항체이다. 특히, FLAG 태그, 예를 들면, 본원에 기술된 태그를 함유하도록 가공된 단백질은 본 발명의 항원 결합 단백질에 의해 시험관 내에서 또는 생체 내에서 결합될 수 있다.

[0338] *일반원칙*

[0339] 본 명세서 전체에서, 달리 구체적으로 기술되지 않거나 맥락이 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성물, 단계의 그룹 또는 물질의 조성물의 그룹에 대한 참조가 이러한 단계, 물질의 조성물, 단계의 그룹 또는 물질의 조성물의 그룹 중 하나 및 다수(즉, 하나 이상)를 포함하도록 이루어질 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은, 단수 형("a", "an" 및 "the")은, 내용이 달리 명확하게 서술하지 않는 한, 다수의 양태를 포함하고, 이의 역도 가능하다. 예를 들면, 단수("a")에 대한 참조는 단일 뿐만 아니라 2개 이상을 포함하고; 단수("an")에 대한 참조는 단일 뿐만 아니라 2개 이상을 포함하고; 단수 ("the")는 단일 뿐만 아니라 2개 이상을 포함하는 등이다.

[0340] 당해 분야의 기술자는 본 발명이 구체적으로 기술된 것 이외의 변화 및 변형에 민감함이 인식될 것이다. 본 발명이 모든 이러한 변화 및 변형을 포함함이 이해되어야 한다. 본 발명은 또한 개별적으로 또는 총괄적으로, 본 명세서를 참조로 또는 이에 나타낸 단계, 특징, 조성물 및 화합물 모두, 및 임의의 및 모든 조합 또는 상기 단계 또는 특징 중 임의의 2개 이상을 포함한다.

[0341] 당해 분야의 기술자는 본원에 기술된 것과 유사하거나 이와 동일한 많은 방법 및 물질을 인식할 것이고, 이는 본 발명의 실시에 사용될 수 있다. 본 발명은 어떠한 방식으로도 기술된 방법 및 물질에 제한되지 않는다.

[0342] 본원에 지칭된 특허 및 공보 모두는 이의 전문이 참고로 포함된다.

[0343] 본 발명은 단지 예시의 목적으로 의도된, 본원에 기술된 특정 실시예에 의해 영역에서 제한되지 않아야 한다. 기능적으로-동일한 생성물, 조성물 및 방법은 본 발명의 영역 내에서 명확하다.

[0344] 본 발명의 어떠한 실시예 또는 실시양태도 달리 구체적으로 기술되지 않는 한 본 발명의 임의의 다른 예 또는 실시양태에 대해 약간의 변형을 적용하기 위해 취할 것이다.

[0345] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당해 분야(예를 들면, 세포 배양, 분자 유전학, 면역학, 면역염색화학, 단백질 화학, 및 생화학)의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는 것으로 고려될 수 있다.

[0346] 달리 나타내지 않는 한, 본 개시내용에 사용된 재조합 단백질, 세포 배양, 및 면역학적 기술은 당해 분야의 기술자에게 잘 공지된, 표준 과정이다. 이러한 기술은 출처, 예를 들면, 문헌: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley 및 Sons (1984), J. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), 및 F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience(1988, 지금까지의 모든 업데이트 포함), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 및 J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons(지금까지의 모든 업데이트 포함)에서 문헌 전체에 기술되고 설명되어 있다.

[0347] 본원의 다양한 시약 및 이의 부분, 면역글로불린, 항체 및 이의 단편의 설명 및 정의는 문헌: Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991, Bork et al., J Mol. Biol. 242, 309-320, 1994, Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196:901 -917, 1987, Chothia et al. Nature 342, 877-883, 1989 및/또는 또는 Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273, 927-948, 1997에서의 논의에 의해 추가로 명확해질 수 있다.

[0348] 용어 "및/또는", 예컨대, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해될 수 있고 의미 둘 다 또는 어느 하나의 의미에 대해 분명한 뒷받침을 제공하는 것으로 고려될 수 있다.

[0349] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "로부터 유래된"은 명시된 정수가 이러한 출처에서 필수적으로 직접 얻은 것은 아니지만 특수한 출처에서 얻을 수 있음을 나타내는 것으로 고려된다.

[0350] 예를 들면, 잔기의 범위에 대한 본원의 참조는 포괄적인 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "56 내지 65번 아미노산을 포함하는 영역"에 대한 참조는 포괄적인 방식으로 이해될 것인데, 즉, 해당 영역은 명시된 순서로 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 및 65번으로 넘버링된 아미노산의 서열을 포함한다.

[0351] *선택된 정의*

[0352] 본원에 사용된 바와 같은, FLAG-태그, 또는 FLAG 옥타펩타이드, 또는 FLAG 에피토프는 서열 모티프(motif) DYKDDDDK(서열 번호 : 29)를 가진, 재조합 DNA 기술을 사용하여 단백질에 가해질 수 있는 폴리펩타이드 단백질 태그이다. FLAG 태그는 단백질의 C-말단 또는 n-말단에 융합될 수 있거나, 단백질 내에 삽입될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 이것이 단백질의 C 말단 또는 N 말단에 존재하거나, 단백질 내에 삽입되는 것에 상관없이, FLAG 태그에 구체적으로 결합할 수 있다. 구체적인 예에서, FLAG 태그는 본 발명의 키메라 항원 수용체(CAR) 작제물 및 항원 결합 단백질 내에 포함될 수 있으므로 FLAG 태그의 방식으로 CAR에 결합할 수 있다.

[0353] 본원에 사용된 바와 같은, "키메라 항원 수용체(CAR)"는 항원에 결합할 수 있는 세포외 도메인, 세포외 도메인이 유래되는 폴리펩타이드와는 상이한 폴리펩타이드로부터 유래된 막관통 도메인(transmembrane domain), 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질을 의미한다. "키메라 항원 수용체(CAR)"는 때때로 "키메라 수용체", "T-바디", 또는 "키메라 면역 수용체(CIR)"로 불린다. "항원에 결합할 수 있는 세포외 도메인"은 특정 항원에 결합할 수 있는 임의의 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. "세포내 도메인"은 세포에서 생물학적 공정의 활성화 또는 억제를 유발하는 신호를 전달하는 도메인으로서 기능하는 것으로 알려진 임의의 올리고펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다.

[0354] 용어 "단리된 단백질" 또는 "단리된 폴리펩타이드"는 이의 기원 또는 유래된 공급원에 따라 이의 천연 상태에서 이를 동반하는 천연적으로 관련된 구성성분과 연합되지 않고; 동일한 공급원으로부터의 다른 단백질이 실질적으로 없는 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 단백질은 당해 분야에 공지된 단백질 정제 기술을 사용하여, 천연적으로 연합된 구성성분이 실질적으로 없도록 하거나 또는 단리에 의해 실질적으로 정제할 수 있다. "실질적으로 정제된"은 단백질에 오염제가 실질적으로 없는, 예컨대, 오염제가 적어도 약 70% 또는 75% 또는 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 없는 것을 의미한다.

[0355] 용어 "재조합"은 인공 유전적 재조합의 생성물을 의미하는 것으로 이해될 수 있다. 따라서, 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 재조합 단백질의 맥락에서, 이러한 용어는 B 세포 성숙 동안 발생하는 천연 재조합의 생성물인 대상체(subject) 신체 내에서 천연적으로 발생하는 항체를 포함하지 않는다. 그러나, 이러한 항체가 단리되는 경우, 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 단리된 단백질이 고려되어야 한다. 유사하게, 단백질을 암호화하는 핵산이 단리되고 재조합 수단을 사용하여 발현되는 경우, 수득되는 단백질은 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 재조합 단백질이다. 재조합 단백질은 또한 이것이 세포, 조직 또는 대상체 내에 존재하는 경우, 예컨대, 이것이 발현되는 경우 인공 재조합 수단에 의해 발현된 단백질을 포함한다.

[0356] 용어 "단백질"은 단일의 폴리펩타이드 쇄, 즉, 펩타이드 결합에 의해 연결된 일련의 연속된 아미노산 또는 서로 공유결합으로 또는 비-공유결합으로 연결된 일련의 폴리펩타이드 쇄(즉, 폴리펩타이드 복합체)를 포함하는 것으로 고려될 수 있다. 예를 들면, 일련의 폴리펩타이드 쇄는 적합한 화학적 또는 이황화물 결합을 사용하여 공유결합으로 연결시킬 수 있다. 비-공유결합성 결합의 예는 수소 결합, 이온 결합, 반데르 바알스 힘(Van der Waals force), 및 소수성 상호작용을 포함한다.

[0357] 용어 "폴리펩타이드" 또는 폴리펩타이드 쇄"는 앞서의 절로부터 펩타이드 결합에 의해 연결된 일련의 연속 아미노산을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0358] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "항원 결합 단백질"은 "항원 결합 도메인"과 상호교환적으로 사용되고 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 영역, 즉, VH 또는 VL 또는 VH과 VL 둘 다를 포함하는 Fv를 의미하는 것으로 고려될 수 있다. 항원 결합 도메인은 전체 항체의 맥락으로 있을 필요는 없는데, 즉, 이는 단리되어 있거나(즉, 도메인 항체) 또는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같은, 다른 형태, 예를 들면, scFv일 수 있다.

[0359] 본 개시내용을 위한 목적을 위해, 용어 "항체"는 Fv 내에 함유된 항원 결합 도메인으로 인하여 하나 또는 몇개의 밀접하게 관련된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 포함한다. 이러한 용어는 4개의 쇄 항체(예컨대, 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄), 재조합 또는 변형된 항체(예컨대, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, CDR-이식된 항체, 영장류화된 항체, 탈-면역화된 항체(de-immunized antibody), 신인간화된 항체(synhumanized antibody), 반-항체, 이중특이적 항체)를 포함한다. 항체는 일반적으로 불변 도메인을 포함하고, 이는 불변 영역 또는 불변 단편 또는 결정화가능한 단편(Fc)로 정렬될 수 있다. 항체의 예시적인 형태는 이의 기본 단위로서 4개의 쇄 구조를 포함한다. 전체 길이 항체는 공유결합으로 연결된 2개의 중쇄(~50 내지 70 kD) 및 2개의 경쇄(각각 ~23 kDa)를 포함한다. 경쇄는 일반적으로 바변 영역(존재하는 경우) 및 불변 영역을 포함하고 포유동물에서 는 κ 경쇄 또는 λ 경쇄이다. 중쇄는 일반적으로 추가의 불변 도메인(들)에 힌지 영역에 대해 연결된 가변 영역 및 1개 또는 2개의 불변 도메인(들)을 포함한다. 포유동물의 중쇄는 다음 유형 중 하나이다: α, δ, ε,

γ, 또는 μ. 각각의 경쇄는 또한 중쇄 중 하나에 공유결합으로 연결된다. 예를 들면, 2개의 중쇄 및 중쇄 및 경쇄는 쇄간 이환화물 결합 및 비-공유결합성 상호작용에 의해 서로 유지된다. 쇄-간 이황화물 결합의 수는 항체의 상이한 유형 중에서 변할 수 있다. 각각의 쇄는 N-말단 가변 영역(VH 또는 VL로서 여기서 각각은 길이가 ~110개의 아미노산이다) 및 C-말단에서 하나 이상의 불변 영역을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인(길이가 ~110개 아미노산인 CL)은 중쇄(길이가 330 내지 440개 아미노산인 CH1)의 제1의 불변 도메인과 정렬되고 이에 이황화물 결합된다. 경쇄 가변 영역은 중쇄의 가변 영역과 함께 정렬된다. 항체 중쇄는 2개 이상의 추가의 CH 도메인(예를 들면, CH2, CH3 등)을 포함할 수 있고 CH1과 CH2 불변 도메인 사이에 힌지 영역을 포함할 수 있다. 항체는 어떠한 유형(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 부류(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브부류일 수 있다. 하나의 예에서, 항체는 뮤린(murine)(마우스 또는 래트) 항체 또는 영장류(예를 들면, 인간) 항체이다. 하나의 예에서 항체 중쇄는 C-말단 라이신 잔기를 결여하고 있다. 하나의 예에서, 항체는 인간화되거나, 신인간화되거나, 키메라이거나, CDR-이식되거나 또는 탈면역화된다.

[0360] 용어 "전장 항체(full-length antibody), "완전한 항체" 또는 "전체 항체"는 항체의 항원 결합 단편과는 대치되는, 이의 실질적으로 완전형 형태의 항체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 구체적으로, 전체 항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 지닌 것을 포함한다. 불변 도메인은 야생형 서열 불변 도메인(예컨대, 인간 야생형 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0361] 본원에 사용된 바와 같은, "가변 영역"은 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 본원에 정의된 바와 같은 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 부분(portion)을 지칭하고, 상보성 결정 영역(CDR), 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 골격 영역(FR)의 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들면, 가변 영역은 3개의 CDR과 함께 3개 또는 4개의 FR(예컨대, FR1, FR2, FR3 및 임의로 FR4)를 포함한다. VH는 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0362] 본 발명에 따른 FLAG 태그는 예를 들면, 제EP 0 150 126호, 미국 특허 제4,703,004호, 미국 특허 제4,782,137호 및 미국 특허 제4,8151,341호에 기술되고 특히 서열 DYK, 바람직하게는 서열 DYKD(서열 번호: 11)를 함유하는, 아미노산-기반 마커이다. 이러한 서열 외에, 다른 아미노산, 바람직하게는 친수성 아미노산, 예를 들면 R(Arg), D(Asp), E(Glu) 및 K(Lys) 및/또는 방향족 측쇄를 지닌 아미노산, 예를 들면, Y(Tyr), F(Phe), H(His) 및 W(Trp)이 존재할 수 있다. 이러한 FLAG-태그의 예는 전술한 특허 명세서에 개시되어 있고 본 발명의 영역 내에서 사용될 수 있다.

[0363] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "대상체"는 인간, 예를 들면, 포유동물을 포함하는 임의의 동물을 의미하는 것으로 고려될 수 있다. 예시적인 대상체(subject)는 인간 및 비-인간 영장류를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, 대상체는 인간이다.

[0364] "항체" 또는 "면역글로불린" 또는 Ig"는 혈액, 또는 항원에 결합하는 면역계에서 기능하여, 외부 대상을 확인하고 이를 중화시키는 기능을 하는 척추동물의 다른 체액에서 발견되는 감마 글로불린 단백질이다.

[0365] 항체는 일반적으로 2개의 동일한 경(L) 쇄 및 2개의 동일한 중(H) 쇄로 구성된 헤테로사량체성 당단백질이다. 각각의 L 쇄는 하나의 공유결합성 이황화물 결합에 의해 H 쇄에 연결된다. 2개의 H 쇄는 하나의 공유결합성 이황화물 결합에 의해 H 쇄에 연결된다. 2개의 H 쇄는 H 쇄 동형에 따라 하나 이상의 이황화물 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 및 L 쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇄간 이황화물 브릿지(interchain disulfide bridge)를 갖는다.

[0366] H 및 L 쇄는 특이적인 Ig 도메인을 정의한다. 보다 특히, 각각의 H 쇄는 N-말단에서, 가변 도메인(VH)에 이어서 α 및 γ 쇄 각각의 경우 3개의 불변 도메인(CH) 및 μ 및 ε 동형의 경우 4개의 CH 도메인이 이어진다. 각각의 L 쇄는 N-말단에서, 가변 도메인(VL)에 이어 이의 다른 말단에서 불변 도메인을 갖는다. VL은 VH와 정렬되고 CL은 중쇄(CH)의 첫번째 불변 도메인과 정렬된다.

[0367] 항체는 상이한 부류(class) 또는 동형(isotype)으로 지정될 수 있다. 면역글로불린의 4개의 부류: 각각 α, δ, ε, γ, 및 μ로 지정된 중쇄를 갖는, IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재한다. γ 및 α 부류는 CH 서열 및 기능에서 비교적 약간의 차이를 기반으로 서브부류(subclass)로 추가로 분할되는데, 예컨대, 인간은 다음의 서브부류를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2. 임의의 척추동물 종으로부터의 L 쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로, 카파 및 람다로 불리는 2개의 명확하게 구별되는 유형 중 하나로 지정될 수 있다.

[0368] 불변 도메인은 이황화물에 의해 함께 유지된 H 쇄 둘 다의 카복시-말단 부분을 포함하는 Fc 부분을 포함한다.

항체의 효과기 기능, 예를 들면, ADCC는 Fc 영역에서 서열에 의해 결정되며, 이러한 영역은 또한 세포의 특정 유형에서 발견된 Fc 수용체(FcR)에 의해 인식된 부분이다.

[0369] VH 및 VL 함께 쌍화(pairing)는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 포함하는 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"을 형성한다. 중쇄의 가변 도메인은 "VH"로 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 "VL"로 지칭될 수 있다. V 도메인은 항체 결합에 영향을 미치고 이의 특수한 항원에 대해 특수한 항체의 특이성을 정의하는 항원 결합 단백질을 함유한다. V 영역은 약 110개 아미노산 잔기로 확장되고 길이가 각각 9 내지 12개 아미노산인 "초가변 영역"(일반적으로 약 3)으로 불리는 극도의 가변성의 보다 짧은 영역에 의해 분리된 15 내지 30개 아미노산의 골격 영역(FR)(일반적으로 약 4)로 불리는 상대적으로 비변이체인 스트레치(stretch)로 이루어져 있다. FR은 β-시트 구조(β-sheet structure)를 주로 채택하고 초가변 영역은 연결되고, 일부 경우에 β-시트 구조의 일부를 형성하는 루프(loop)를 형성한다.

[0370] "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 서열에서 초가변성인 항체 가변 도메인의 영역을 지칭하고/하거나 구조적으로 정의된 루프를 형성한다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역을 포함한다: VH에서 3개(H1, H2, H3), 및 VL에서 3개(L1, L2, L3). 초가변 영역 구분의 수는 사용되고 있고 본원에 포함된다.

[0371] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "상보성 결정 영역"(약어(syn.) CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 이의 존재가 특이적인 항원 결합에 대한 주요 기여자인 항체 가변 영역의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각각의 가변 영역 도메인(VH 또는 VL)은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 확인된 3개의 CDR을 갖는다. VH의 CDR은 본원에서 각각 CDR H1, CDR H2 및 CDR H3으로서 지칭되고, 여기서 CDR H1은 VH의 CDR 1에 상응하고, CDR H2는 VH의 CDR 2에 상응하고 CDR H3은 VH의 CDR 3에 상응한다. 유사하게, VL의 CDR은 본원에서 각각 CDR L1, CDR L2 및 CDR L3으로서 지칭되고, 여기서 CDR L1은 VL의 CDR 1에 상응하고, CDR L2는 VL의 CDR 2에 상응하고 CDR L3은 VL의 CDR 3에 상응한다. 하나의 예에서, CDR 및 FR로 지정된 아미노산 위치는 문헌: Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 및 1991(또한 본원에서 "카밧 넘버링 시스템"으로서 지칭된다)에 따라 정의된다. 다른 예에서, CDR 및 FR로 지정된 아미노산 위치는 향상된 초티어 넘버링 체계(Enhanced Chothia Numbering Scheme)(http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html)에 따라 정의된다. 본 발명은 카밧 넘버링 시스템에 의해 정의된 바와 같은 FR 및 CDR에 제한되지 않지만, 모든 넘버링 시스템, 예를 들면, 표준 넘버링 시스템 또는 초티아(Chothia) 및 레스크(Lesk)의 문헌: J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342: 877-883, 1989; 및/또는 Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927-948, 1997의 넘버링 시스템; 문헌: Honnegher and Plükthun J. Mol. Biol. 309: 657-670, 2001의 넘버링 시스템; 또는 문헌: Giudicelli et al., Nucleic Acids Res. 25: 206-211 1997에 논의된 IMGT 시스템을 포함한다. 하나의 예에서, CDR은 카밧 넘버링 시스템에 따라 정의된다. 임의로, 카밧 넘버링 시스템에 따른 중쇄 CDR2는 본원에 나열된 5개의 C-말단 아미노산을 포함하지 않거나 또는 이러한 아미노산 중 임의의 하나 이상은 다른 천연적으로 발생하는 아미노산으로 치환된다. 이와 관련하여, 문헌: Padlan et al., FASEB J., 9: 133-139, 1995은 중쇄 CDR2의 5개의 C-말단 아미노산이 항원 결합에 일반적으로 포함되지 않음을 확립하였다.

[0372] "골격" 또는 "FR" 잔기는 초가변 영역 이외의 가변 도메인 또는 본원에 정의된 CDR 잔기이다. VH의 FR은 본원에서 각각 FR H1, FR H2, FR H3 및 FR H4로 지칭되고, 여기서 FR H1은 VH의 FR 1에 상응하고, FR H2는 VH의 FR 2에 상응하고, FR H3은 VH의 FR 3에 상응하고 FR H4는 VH의 FR 4에 상응한다. 유사하게, VL의 FR은 본원에서 각각 FR L1, FR L2, FR L3 및 FR L4로서 지칭되고, 여기서 FR L1은 VL의 FR 1에 상응하고, FR L2는 VL의 FR 2에 상응하고, FR L3은 VL의 FR 3에 상응하고 FR L4는 VL의 FR 4에 상응한다.

[0373] "항원 결합 단백질을 형성하기 위한 펩타이드"는 일반적으로 항원에 대해 항체의 특이성을 부여하는 구조를 형성할 수 있는 펩타이드를 지칭한다. 예는 전체 항체 또는 전체 항체 관련 구조, 가변 도메인, 가변 도메인들 및 이의 단편, 예를 들면, 초가변 영역 또는 불변 영역의 일부를 포함하지만 모두는 포함하지 않는 경쇄 및 중쇄의 단편을 포함하는 전체 항체 단편을 포함한다.

[0374] "완전한(intact)" 또는 "전체(whole)" 항체는 항원-결합 단백질 뿐만 아니라 CL 및 적어도 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연의 서열 불변 도메인(예컨대, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0375] "전체 항체 관련 구조"는 전체 항체의 다량체화된 형태를 포함한다.

[0376] "가변 도메인을 포함하는 전체 항체 단편"은 Fab, Fab', F(ab')2, 및 Fv 단편; 디아보디; 선형 항체; 단일 쇄

항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0377] Fab 단편은 H 쇄의 가변 영역 도메인(VH)을 따라 전체 L 쇄, 및 하나의 중쇄의 제1 불변 도메인(CHI)으로 이루어진다. 각각의 Fab 단편은 항원 결합과 관련하여 1가인데, 즉, 이는 단일의 항원-결합 단백질을 갖는다.

[0378] Fab 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 CHI 도메인의 카복시 말단에서 추가의 몇몇 잔기를 가짐으로써 Fab 단편과는 상이하다. Fab'-SH는 Fab'에 대한 본원의 지정이며 여기서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)는 유리된 티올 그룹을 지닌다.

[0379] F(ab')2 단편은 2가 항원-결합 활성을 가진 2개의 이황화물 연결된 Fab 단편에 대략적으로 상응하고 항원을 여전히 교차-연결시킬 수 있다.

[0380] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 단편은 강력한, 비-공유결합성 연합으로 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 이루어진다.

[0381] 단일-쇄 Fv(scFv) 종(species)에서, 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인은 유연한 펩타이드 링커에 ;공유결합으로 연결됨으로써 경쇄 및 중쇄가 2개-쇄 Fv 종에서 이에 대해 유사한 "이량체성" 구종로 연합될 수 있도록 할 수 있다. 이러한 2개의 도메인의 폴딩(folding)으로부터 항원 결합을 위해 아미노산 잔기에 기여하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여하는 6개의 초가변 루프(H 및 L 쇄로부터 각각 3개의 루프)가 생성된다.

[0382] "sFv" 또는 "scFv"로서 또한 약술되는 "단일-쇄 Fv"는 단일 폴리펩타이드 쇄를 형성하기 위해 연결된 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, scFv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적한 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH 및 VL 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다.

[0383] "단일 가변 도메인"은 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화성이지만, 항원을 인식하여 이에 결합하는 능력을 갖는 Fv(항원에 대해 특이적인 단지 3개의 CDR을 포함함)의 1/2이다.

[0384] "디아보디"는 2개의 항원-결합 부위를 지닌 항체 단편을 지칭하고, 이러한 단편은 동일한 폴리펩타이드 쇄(VH-VL)에서 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)를 포함한다. 작은 항체 단편은 VH와 VL 도메인 사이에 짧은 링커(약 5 내지 10개의 잔기)를 사용하여 sFv 단편(앞서의 절 참고)을 구축함에 의해 제조하여 V 도메인의 쇄간 쌍화가 달성되도록 하지만 쇄내 쌍화는 달성되지 않도록 함으로써, 2가 단편, 즉, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편이 생성되도록 한다.

[0385] 디아보디는 2가이거나 이중특이적일 수 있다. 이중특이적 디아보디는 2개의 항체의 VH 및 VL 도메인이 상이한 폴리펩타이드 쇄에 존재하는 2개의 "교차(crossover" sFv 단편의 이종이량체(heterdimer)이다. 트리아보디 및 테트라보디는 또한 일반적으로 당해 분야에 알려져 있다.

[0386] "단리된 항체"는 이의 기존 환경의 구성성분으로부터 확인되어 분리되고/되거나 회수된 것이다. 오염 구성성분은 항체에 대한 치료학적 용도를 방해할 수 있는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다.

[0387] "인간 항체"는 인간에 의해 생산되고/되거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체를 제조하기 위한 기술 중 어느 것도 사용하여 제조된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 지닌 항체를 지칭한다. 인간 항체의 이러한 정의는 구체적으로 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 배제한다. 인간 항체는 당해 분야에 공지된 다양한 기술, 예를 들면, 파아지-디스플레이 라이브러리를 사용하여 생산할 수 있다. 인간 항체는 항원성 챌린지에 대한 반응으로 이러한 항체를 생산하도록 변형되지만 이의 내인성 유전자자리는 무능하게된 유전자이식 동물에 항원을 투여함으로써 제조할 수 있다.

[0388] 비-인간(예컨대, 설치류) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 항체로부터 유래된 최소의 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화된 항체는 인간 면역글로불린(수용체 항체)이며 여기서 수용체의 초가변 영역으로부터의 잔기는 목적한 항체 특이성, 친화성, 및 능력을 갖는 비-인간 종(공여체 항체), 예를 들면, 마우스, 래트, 토끼 또는 비-사람 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체된다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 골격 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화된 항체는 수용체 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않은 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 추가로 정의하기 위해 제조된다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 1개의, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인 중 실질적으로 모두를 포함할 것이고, 여기서 초가변 루프 중 모두 또는 실질적으로 모두는 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고 FR의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화된 항체는 임의로 또한 면역글로불린 불변 영

역(Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다.

[0389] "모노클로날 항체(monoclonal antibody)"는 실질적으로 상동성인 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하는데, 즉, 집단을 포함하는 개개 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연적으로 발생하는 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고, 항원 상의 단일 항원 부위 또는 결정인자에 대해 지시된다. 이의 특이성 외에, 모노클로날 항체는 다른 항체로 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 세균, 진행 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조할 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 파아지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0390] 본원의 모노클로날 항체는 "키메라" 항체를 포함하고 여기서 중쇄 및/또는 경쇄의 부분은 특수한 종으로부터 유래되거나 특수한 항체 부류 또는 서브부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 쇄(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래되거나 다른 항체 부류 또는 서브부류에 속하는 항체, 뿐만 아니라, 이것이 목적한 생물학적 활성을 나타내는 한, 이러한 항체의 단편에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에 대해 상동성이다. 본원에서 목적한 키메라 항체는 비-인간 영장류(예컨대, 구대륙 원숭이(Old World Monkey), 유인원 등)로부터 류래한 가변 도메인 항원-결합 서열, 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화된" 항체를 포함한다.

[0391] 용어 "항-FLAG 항체" 또는 "FLAG에 결합하는 항체"는 FLAG 태그(예컨대, 본원에서 서열 번호: 11 또는 29로 정의된 바와 같음)에 충분한 친화성으로 결합할 수 있어서 FLAG 태그를 나타내는 발현하는 단백질 또는 세포를 표적화하는 데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 하는 항체를 지칭한다. 바람직하게는, 관련되지 않은 태그 또는 단백질에 대한 항-FLAG 항체의 결합 정도는 예컨대, 방사면역검정(RIA)에 의해 측정된 바와 같은 FLAG에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정의 실시양태에서, FLAG에 결합하는 항테는 해리 상수(dissociation constant: K_D)가 < 1 μM, < 100 nM, < 10 nM, < 1 nM, 또는 < 0.1 nM이다.

[0392] "결합 친화성"은 일반적으로 분자(예컨대, 항체)와 이의 결합 파트너(예컨대, 항원)의 단일 결합 부위 사이에 비공유결합성 상호작용의 총 합의 길이를 지칭한다. 일반적으로, "결합 친화성"은 결합 쌍(예컨대, 항체 및 항원)의 구성원 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유의 결합 친화성을 지칭한다. 이의 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로 해리 상수(dissociation constant: K_D)로 나타낸다. 친화성은 당해 분야에 공지된 일반적인 방법, 예를 들면, 본원에 기술된 것으로 측정할 수 있다. 저-친화성 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하여 신속하게 해리되는 경향이 있는 반면, 고-친화성 항체는 일반적으로 항원에 보다 빠르게 결합하여 보다 오래동안 결합하여 남는 경향이 있다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법이 당해 분야에 공지되어 있고, 이중 어느 것도 본 발명의 목적을 위해 사용할 수 있다.

[0393] 본원에 사용된 바와 같은, 항원 결합 단백질 또는 이의 결합 도메인과 항원의 상호작용을 참고로 용어 "결합하다"는 상호작용이 항원 상에서 특수한 구조(예컨대, 항원성 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존함을 의미한다. 예를 들면, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특정 단백질 구조를 인식하여 이에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 결합하는 경우, 표지된 "A" 및 단백질을 함유하는 반응에서 에피토프 "A"(또는 유리되거나, 표지되지 않은 "A")를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합 된 표지된 "A"의 양을 감소시킬 것이다.

[0394] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "특이적으로 결합하다(specifically binds 또는 binds specifically)"는 본 발명의 항원 결합 단백질이 대안의 항원 또는 세포와 반응 또는 연합하는 것보다 이것이 이를 발현하는 특수한 항원 또는 세포와 보다 흔히, 보다 신속하게, 보다 긴 기간 동안 및/또는 보다 큰 친화성으로 반응 또는 연합함을 의미하기 위해 고려될 수 있다.

[0395] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "검출가능하게 결합하지 않는다"는 항원 결합 단백질, 예컨대, 항체가 후보물 항원에 배경보다 10% 미만, 또는 8% 또는 6% 또는 5% 초과로 결합함을 의미하는 것으로 이해될 수 있다. 배경은 단백질의 부재 및/또는 음성 대조군 단백질(예컨대, 동형 대조군 항체)의 존재에서 검출된 결합 신호의 수준 및/또는 음성 대조군 항원의 존재하에 검출된 결합의 수준일 수 있다. 결합의 수준은 바이오센서 분석(예컨대, Biacore)을 사용하여 검출되며 여기서 항원 결합 단백질은 고정되고 항원과 접촉된다.

[0396] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "유의적으로 결합하지 않는다"는 폴리펩타이드에 대한 본 발명의 항원 결합 단백질의 결합 수준이 배경, 예컨대, 항원 결합 단백질의 부재하에서 및/또는 음성 대조군 단백질(예컨대, 동형 대조군 항체)의 존재하에서 검출된 결합 신호의 수준 및/또는 음성 대조군 폴리펩타이드의 존재하에서 검출된 결합의 수준보다 통계적으로 유의적으로 더 높지 않음을 의미하는 것으로 이해될 수 있다. 결합의 수준은 바이

오센서 분석(예컨대, Biacore)을 사용하여 검출되며 여기서 항원 결합 단백질은 고정되고 항원과 접촉된다.

[0397] "친화성 성숙된(affinity matured)" 항체는 이의 하나 이상의 HVR에서 하나 이상의 변경을 지니지 않은 모 항체와 비교하여, 항원에 대한 항체의 친화성에서 개선을 야기하는 하나 이상의 HVR에서 하나 이상의 변경을 지닌 것이다. 바람직한 친화성 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화성을 가질 것이다. 친화성 성숙된 항체는 당해 분야에 공지된 과정에 의해 생산된다.

[0398] "ADCC"는 항체-의존성 세포 세포독성으로 불리는 공정을 지칭하고, 이는 인간에서 천연 킬러(NK) 세포에 의해 주로 매개된 면역 반응이다. ADCC에서, NK 세포의 표면 상의 FcɣRIII은 표적 세포의 표면에 나타나는 항원에 결합된 항체의 Fc 영역을 인식한다. 이는 NK 세포를 활성화시키고, 이는 퍼포린 및 그랜자임을 방출하여, 표적 세포의 분해 및 세포자멸사를 이끈다.

[0399] "CDC"는 2개의 주요 경로 중 하나를 통해 작용할 수 있는 단백질의 캐스케이드의 작용을 통해 세포 사멸을 이끌 수 있는 상보체-의존성 세포독성으로 불리는 복잡한 공정을 지칭한다.

[0400] "ADCP"는 항체 의존성 세포-매개된 식세포작용으로 불리는 공정을 지칭한다. 이러한 Fc 수용체-매개된 공정에서, 항체가 결합된 표적 세포는 포식 세포, 예를 들면, 대식세포, 단핵구, 호중구, 및 수지 세포에 의해 둘러싸인다. 다수의 Fc 수용체가 이러한 공정에 포함된다.

[0401] "차단하는" 항체 또는 "길항제" 항체는 이것이 결합 하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 것이다. 바람직한 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.

[0402] 본원에 사용된 바와 같은, "효능제 항체"는 목적한 폴리펩타이드의 기능적 활성 중 적어도 하나를 최소화하는 항체이다.

[0403] 본원에서 의미한 바와 같이, "Fc 영역"은 하나 이상의 이황화물 결합에 의해 결합 된 2개의 폴리펩타이드 쇄로 이루어진 이량체이고, 각각의 쇄는 힌지 도메인과 CH2 및 CH3 도메인 중 부분 또는 모두를 포함한다. 폴리펩타이드 쇄 각각은 "Fc 폴리펩타이드 쇄"를 지칭한다. 2개의 Fc 폴리펩타이드 쇄를 구별하기 위하여, 하나는 본원에서 "A 쇄"로 지칭되고 다른 것은 "B 쇄"로서 지칭된다. 보다 구체적으로, 본 발명으로 사용하기에 고려되는 Fc 영역은 IgG Fc 영역이고, 이는 포유동물 또는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 Fc 영역일 수 있다. 인간 IgG1 Fc 영역 중에서, 적어도 2개의 대립형질 유형은 알려져 있다.

[0404] 본원에 의미되는 바와 같은 "Fc-함유 단백질"은 본원에 기술된 바와 같은 Fc 영역 및 표적 분자에 결합하는 결합 영역을 포함하는 단백질이다. 용어 "Fc 함유 단백질"은 Fc 영역을 함유하는 항체 또는 Fc 융합 단백질을 포함한다.

[0405] 어구 "치료학적 유효량"은 일반적으로 (i) 특수한 질환, 상태, 또는 장애를 치료하거나, (ii) 특수한 질환, 상태, 또는 장애 중 하나 이상을 약화시키거나, 개선하거나, 또는 제거하거나, 또는 (iii) 본원에 기술된 특수한 질환, 상태, 또는 장애의 하나 이상의 증상의 발병을 나타내는 본 발명의 항원 결합 단백질의 양을 지칭한다.

[0406] 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 대상체가 바람직하지 않은 생리학적 변화 또는 장애를 늦추는(줄이는) 치료학적 치료를 지칭한다. 본 발명의 목적을 위해, 유리하거나 목적한 임상 결과는 검출가능하거나 검출불가능한 것에 상관없이, 증상의 경감, 질환의 정도의 축소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않은) 상태, 질환 진행의 지연 또는 늦춤, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 차도(부분적이거나 전체적으로)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 치료는 또한 치료를 받지 않는 경우 예측된 생존과 비교하여 보다 긴 생존을 또한 의미할 수 있다. 치료는 질환 또는 장애의 완전한 제거를 필수적으로 야기하지 않을 수 있지만 합병증 및 감염의 부작용 및 질환 또는 장애의 진행을 감소시키거나 최소화시킬 수 있다. 치료의 성공 등은 다른 것들 중에서, 개애의, 세포병리학적, 혈청학적 DNA, 또는 mRNA 검출 기술의 물리적 실험에 의해 모니터링할 수 있다.

[0407] 단어 "예방하다(prevent)" 및 "예방"은 일반적으로 주어진 질환 또는 장애로의 진행으로부터 질환 또는 장애를 가지지 않은 개체를 보호하거나 방해하기 위한 예방적(prophylactic) 또는 예방적 척도를 지칭한다.

[0408] 어구 "약제학적으로 허용되는"은 물질 또는 조성물이 다른 성분을 포함하는 제형으로 화학적으로 및/또는 독성학적으로 양립될 수 있어야만 하고/하거나 포유동물이 이로 치료됨을 나타낸다.

[0409] **단백질에 대한 돌연변이**

[0410] 본 발명은 또한 본원에 개시된 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항원 결합 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 제공한다. 하나의 예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질 또는 핵산은 본원에 개시된 서열에 대해 적어도

약 85% 또는 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0411] 대안적으로, 또는 추가로, 항원 결합 단백질은 임의의 예에 대해 본원에 기술된 바와 같은 VH 또는 VL의 CDR(들)에 대해 적어도 약 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 CDR(예컨대, 3개의 CDR)을 포함한다.

[0412] 다른 예에서, 본 발명의 핵산은 임의의 예에 따라 본원에 기술된 바와 같은 기능을 갖는 항원 결합 단백질을 암호화하는 서열에 대해 적어도 약 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 항원 결합 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하고, 이는 유전 코드의 축퇴의 결과로서 본원에 예시된 서열과는 상이하다.

[0413] 핵산 또는 폴리펩타이드의 동일성%는 갭 생성 페널티(gap creation penalty) = 5, 및 갭 연장 페널티(gap extension penalty) = 0.3인 GAP(Needleman and Wunsch. Mol. Biol. 48, 443-453, 1970) 분석(GCG 프로그램)으로 결정된다. 질의 서열(query sequence)은 길이가 적어도 50개 잔기이고, GAP 분석은 적어도 50개의 잔기의 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 예를 들면, 질의 서열은 길이가 적어도 100개 잔기이고 GAP 분석은 적어도 100개의 잔기의 영역에 걸쳐 2개의 서열을 정렬한다. 예를 들면, 2개의 서열은 이의 전체 길이에 걸쳐 정렬된다.

[0414] 본 발명은 또한 본원에 기술된 항원 결합 단백질을 암호화하는 핵산에 대해 엄격한 하이브리드화 조건 하에서 하이브리드화되는 핵산을 고려한다. "보통의 엄격성(moderate stringency)"은 본원에서 45℃ 내지 65℃의 범위의 온도, 또는 동일한 조건에서 2 x SSC 완충제, 0.1%(w/v) SDS에서 수행된 하이브리드화 및/또는 세척으로 정의된다. "높은 엄격성"은 본원에서 0.1 x SSC 완충제, 0.1%(w/v) SDS, 또는 보다 낮은 염 농도, 및 적어도 65℃, 또는 동일한 조건에서 수행된 하이브리드화 및/또는 세척으로 정의된다. 엄격성의 특수한 수준에 대한 본원의 참조는 당해 분야의 기술자에게 공지된 SSC 외에 세척/하이브리드화 용액을 사용하는 동일한 조건을 포함한다. 예를 들면, 이중 가닥 핵산의 가닥이 해리될 온도(또한 융점 온도, 또는 T_m으로 공지됨)를 계산하기 위한 방법은 당해 분야에 알려져 있다. 핵산의 T_m과 유사하거나(예컨대, 5℃ 또는 10℃ 이내) 동일한 온도가 높은 엄격성으로 고려된다. 배지 엄격성은 핵산의 계산된 T_m의 10℃ 내지 20℃ 또는 10℃ 내지 15℃이내 인 것으로 고려되어야 한다.

[0415] 본 발명은 또한 본원에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 본 발명의 항원 결합 단백질의 돌연변이체 형태를 고려한다. 일부 예에서, 항원 결합 단백질은 10개 이하, 예컨대, 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2 또는 1개의 보존적 아미노산 치환을 포함한다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄 및/또는 하이드로패티서티(hydropathicity) 및/또는 친수성을 갖는 아미노산 잔기로 대체된다.

[0416] 유사한 측쇄, 예를 들면, 염기성 측쇄(예컨대, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예컨대, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예컨대, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예컨대, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌 트립토판), β-측쇄된 측쇄(예컨대, 트레오닌, 발린, 이소루이신) 및 방향족 측쇄(예컨대, 타이로신, 페닐알라닌, 트립 토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산 잔기의 계열은 당해 분야에 정의되어 있다. 하이드로패틱 지수(hydropathic index)는 예를 들면, 문헌: Kyte and Doolittle J. Mol. Biol., 157: 105-132, 1982에 기술되어 있고 친수성 지수는 예컨대, 제US4554101호에 기술되어 있다.

[0417] 본 발명은 또한 비-보존적 아미노산 변화를 고려하고 있다. 예를 들면, 하전된 아미노산(charged amino acid)을 다른 하전된 아미노산 및 중성 아미노산 또는 양으로 하전된 아미노산으로 치환하는 것이 특히 관심있다. 일부 예에서, 항원 결합 단백질은 10개 이사, 예컨대, 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2 또는 1개의 비-보존적 아미노산 치환을 포함한다.

[0418] 하나의 예에서, 돌연변이(들)는 본 발명의 항원 결합 단백질의 항원 결합 도메인의 FR 내에서 발생한다. 다른 예에서, 돌연변이(들)는 본 발명의 항원 결합 단백질의 CDR 내에서 발생한다.

[0419] 항원 결합 단백질의 돌연변이체 형태를 생산하기 위한 예시적인 방법은 다음을 포함한다:

[0420] - DNA(Thie et al., Methods Mol. Biol. 525: 309-322, 2009) 또는 RNA(Kopsidas et al., Immunol. Lett. 107:163-168, 2006; Kopsidas et al. BMC Biotechnology, 7: 18, 2007; 및 WO1999/058661)의 돌연변이유발;

[0421] - 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 돌연변이 유발 유전자(mutator) 세포, 예컨대, XL-1Red, XL-mutS 및 XL-mutS-Kanr 세균 세포(Stratagene) 내로의 도입;

[0422] - 예컨대, 문헌: Stemmer, Nature 370: 389-91, 1994에 개시된 바와 같은 DNA 셔플링(shuffling); 및

[0423] - 예컨대, 문헌: Dieffenbach (ed) and Dveksler (ed)(In: PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995)에 기술된 바와 같은 부위 지시된 돌연변이유발.

[0424] 본 발명의 돌연변이체 항원 결합 단백질의 생물학적 활성, 예컨대, 항원 결합을 결정하기 위한 예시적인 방법은 숙련가에게 명백하고/하거나 본원에 기술되어 있다. 예를 들면, 항원 결합, 결합의 경쟁적 억제, 친화성, 연합, 해리 및 치료학적 효능은 본원에 기술되어 있다.

[0425] 본원에 사용된 바와 같이, 아미노산의 특성은 다음 표에 정의되어 있다:

아미노산	3-문자 코드	1-문자 코드	특성
알라닌	Ala	A	지방족 소수성 중성
아르기닌	Arg	R	극성 친수성 하전된 (+)
아스파라긴	Asn	N	극성 친수성 중성
아스파르테이트	Asp	D	극성 친수성 하전된(-)
시스테인	Cys	C	극성 소수성 중성
글루타민	Gln	Q	극성 친수성 중성
글루타메이트	Glu	E	극성 친수성 하전된(-)
글리신	Gly	G	지방족 중성
히스티딘	His	H	방향족 극성 친수성 하전된(+)
이소루이신	Ile	I	지방족 소수성 중성
루이신	Leu	L	지방족 소수성 중성

[0426]

라이신	Lys	K	극성 친수성 하전된(+)
메티오닌	Met	M	소수성 중성
페닐알라닌	Phe	F	방향족 소수성 중성
프롤린	Pro	P	소수성 중성
세린	Ser	S	극성 친수성 중성
트레오닌	Thr	T	극성 친수성 중성
트립토판	Trp	W	방향족 소수성 중성
타이로신	Tyr	Y	방향족 극성 소수성
발린	Val	V	지방족 소수성 중성

[0427]

[0428] **불변 영역**

[0429] 본 발명은 항체의 불변 영역을 포함하는 본원에 기술된 항원 결합 단백질 및/또는 항체를 포함한다. 이는 Fc에 융합된 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0430] 본 발명의 단백질을 생산하는 데 유용한 불변 영역의 서열은 다수의 상이한 공급원으로부터 수득될 수 있다. 일부 예에서, 단백질의 불변 영역 또는 이의 부분은 인간 항체로부터 유래된다. 불변 영역 또는 이의 부분은 항체 부류, 예를 들면, IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE, 및 임의의 항체 동형, 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 유래될 수 있다. 하나의 예에서, 불변 영역은 인간 동형 IgG4 또는 안정화된 IgG4 불변 영역이다.

[0431] 하나의 예에서, 불변 영역의 Fc 영역은 예컨대, 천연의 또는 야생형 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 영역과 비교하여 효과기 기능을 유도하는 감소된 능력을 갖는다. 하나의 예에서, 효과기 기능은 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC) 및/또는 항체-의존적 세포-매개된 식세포작용(ADCP) 및/또는 상보체-의존적 세포독성(CDC)이다. Fc 영역 함유 단백질의 효과기 기능의 수준을 평가하기 위한 방법은 당해 분야에 알려져 있고/있거나 본원에 기술되어 있다.

[0432] 하나의 예에서, Fc 영역은 IgG4 Fc 영역(즉, IgG4 불변 영역), 예컨대, 인간 IgG4 Fc 영역이다. 적합한 IgG4 Fc 영역의 서열은 기술자에게 명백하고/하거나 공공으로 이용가능한 데이터베이스에서 이용가능하다(예컨대, 국립 생물공학 정보 V너(National Center for Biotechnology Information)에서 이용가능하다).

[0433] 하나의 예에서, 불변 영역은 안정화된 IgG4 불변 영역이다. 용어 "안정화된 IgG4 불변 영역"은 Fab 아암(arm) 교환 또는 Fab 아암 교환 또는 반-항체의 형성을 겪을 가능성 또는 반 항체를 형성시킬 가능성을 감소시키기 위해 변형된 IgG4 불변 영역을 의미하는 것으로 이해된다. "Fab 아암 교환"은 인간 IgG4에 대한 단백질 변형의 유형을 지칭하고, 여기서 IgG4 중쇄 및 부착된 경쇄(반-분자)는 다른 IgG4 분자로부터 중-경쇄 쌍으로 교환된다. 따라서, IgG4 분자는 2개의 명백한 항원을 인식하는 2개의 명백한 Fab 아암을 획득할 수 있다(이중특이적 분자를 생성함). Fab 아암 교환은 생체 내에서 천연적으로 발생하고 정제된 혈액 세포 또는 감소된 글루타티온과 같은 환원제에 의해 시험관 내에서 도입될 수 있다. "반 항체"는 IgG4 항체가 해리되어 단일 중쇄 및 단일 경쇄를 각각 함유하는 2개의 분자를 형성하는 경우 형성된다.

[0434] 하나의 예에서, 안정화된 IgG4 불변 영역은 카밧 시스템;에 따라 힌지 영역의 241번 위치에서 프롤린을 포함한다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 및/또는 1991). 이러한 위치는 EU 넘버링 시스템에 따라 힌지 영역의 228번 위치에 상응한다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington

DC United States Department of Health and Human Services, 2001 및 Edelman et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85, 1969). 인간 IgG4에서, 이러한 잔기는 일반적으로 세린이다. 프롤린을 세린으로 치환한 후, IgG4 힌지 영역은 서열 CPPC를 포함한다. 이와 관련하여, 기술자는 "힌지 영역"이 Fc 영역과 Fab 영역을 연결하여 항체의 2개의 Fab 아암에서 이동성을 부여하는 항체 중쇄 불변 영역의 프로린이 풍부한 부분이다. 힌지 영역은 중쇄 간 이황화물 결합에 포함된 시스테인 잔기를 포함한다. 이는 일반적으로 카밧의 넘버링 시스템에 따라 인간 IgG1의 Glu226로부터 Pro243 까지의 스트레칭(stretching)으로 정의된다. 다른 IgG 동형의 힌지 영역은 동일한 위치에서 중쇄 간 이황화물(S-S) 결합을 형성하는 제1 및 마지막 시스테인 잔기를 위치시킴으로써 IgG1 서열과 정렬시킬 수 있다(참고: 예를 들면 WO2010/080538).

[0435] 안정화된 IgG3 항체의 추가의 예는 인간 IgG4의 중쇄 불변 영역에서 409번 위치(EU 넘버링 시스템에 따름)에서의 아르기닌이 라이신, 트레오닌, 메티오닌, 또는 루이신으로 치환된 항체이다(예컨대, 제WO2006/033386호에 기술된 바와 같음). 불변 영역의 Fc 영역은 추가로 또는 대안적으로 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 잔기를 포함한다: 405번(EU 넘버링 시스템에 따름)에 상응하는 위치에서 알라닌, 발린, 이소루이신 및 루이신. 임의로, 힌지 영역은 241번 위치(즉, CPPC 서열)에서 프롤린을 포함한다(상기 기술된 바와 같음).

[0436] 다른 예에서, Fc 영역은 감소된 효과기 기능을 갖도록 변형된 영역, 즉, 비-면역자극성 Fc 영역"이다. 예를 들면, Fc 영역은 268, 309, 330 및 331로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 위치에서 치환을 포함하는 IgG1 Fc 영역이다. 다른 예에서, Fc 영역은 다음의 변화 E233P, L234V, L235A 중 하나 이상 및 G236의 결실 및/또는 다음의 변화 A327G, A330S 및 P331S 중 하나 이상을 포함하는 IgG1 Fc 영역이다(Armour et al., Eur J Immunol. 29:2613-2624, 1999; Shields et al., J Biol Chem. 276(9):6591-604, 2001). 비-면역자극성 Fc 영역의 추가의 예는 예를 들면, 문헌: Dall'Acqua et al., J Immunol. 177: 1129-1138 2006; 및/또는 Hezareh J Virol ;75: 12161-12168, 2001에 기술되어 있다.

[0437] 다른 예에서, Fc 영역은 예컨대, IgG4 항체로부터 적어도 하나의 CH2 도메인 및 IgG1 항체로부터 적어도 하나의 CH3 도메인을 포함하는 키메라 Fc 영역이고, 여기서 Fc 영역은 240, 262, 264, 266, 297, 299, 307, 309, 323, 399, 409 및 427(EU 넘버링)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 치환을 포함한다(예컨대, 제WO2010/085682호에 기술된 바와 같음). 예시적인 치환은 240F, 262L, 264T, 266F, 297Q, 299A, 299K, 307P, 309K, 309M, 309P, 323F, 399S, 및 427F를 포함한다.

[0438] **항체 결합 도메인 함유 단백질**

[0439] 다른 예에서 상기 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질이 제공되고 여기서 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 중 하나 이상을 형성하는 아미노산 서열은 인간 서열로부터 유래되거나 인간 서열의 형태이다.

[0440] 항원 결합 단백질은 비-인간(예컨대, 뮤린) 및 인간 면역글로불린 서열을 포함하는 인간화된 형태로 나타날 수 있다. 전형적으로, 항원 결합 단백질 중 모두 그러나 CDR 서열은 마우스 래트 또는 토끼와 같은 비-인간 종으로부터 유래된다. 일부 예에서, 항원 결합 단백질의 골격 잔기는 또한 비-인간일 수 있다. 항원 결합 단백질이 전체 항체의 형태로 제공되는 경우, 전형적으로 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부분은 인간이어서, 다양한 인간 효과기 기능이 가능하도록 한다.

[0441] 비-인간 항원 결합 단백질을 인간화하기 위한 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있고, 적합한 공정의 예는 문헌: Jones et al., (1986) Nature, 321 :522; Riechmann et al., (1988) Nature, 332:323; Verhoeyen et al., (1988) Science, 239:1534의 것을 포함한다.

[0442] 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하는 본원에 기술된 파아지 디스플레이 방법(phage display method)은 인간 항원 결합 단백질 및 인간 항체를 생성하는 데 유용하다.

[0443] 또한, 기능적 내인성 면역글로불린일 발현할 수 없지만, 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 유전자이식 마우스가 사용될 수 있다. 이러한 마우스는 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자를 배아 줄기 세포 내로 무작위 또는 표적화 삽입시켜 생성할 수 있다. 숙주 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 숙주 JH 영역의 삽입에 의해 또는 일부 다른 재조합 현상에 의해, 예를 들면, 동형 결실(homozygous deletion)에 의해 비-기능성으로 될 수 있다. 형질감염된 줄기 세포는 확장시키고 배반포세포내로 미세주사하여 키메라 마우스를 생산하고 이를 번식시켜 인간 항원 결합 단백질을 발현하는 동형 새끼(homozygous offspring)를 생산한다. FLAG 태그로 면역화한 후, 인간 모노클로날 항체가 수득될 수 있다. 유전자이식 동물 시스템의 한 가지 이점은 인간 면역글로불린 이식유전자가 B-세포 분화 중에 재배열되고 후속적으로 유전자이식 마우스에서 종류 변환(class switching) 및 체세포 돌연변이를 겪기 때문에 치료학적으로 유용한 동형을 생산할 수 있다는 것이다.

[0444] 표면-노출된 잔기를 대체시켜 항체가 면역계에 자체적으로 나타나도록 함으로써 본 발명의 CDR 및 FR을 포함하는 다양한 도메인을 거의 면역원성이 아니도록 제조할 수 있었다. 문헌: Padlan, E. A., 1991, MoI. Immunol. 28, 489은 예시적인 방법을 제공한다. 일반적으로, 항원 결합 단백질의 인근에서의 아미노산 잔기의 내부 패킹(internal packing)은 변화되지 않고 남고 일반적으로 결합 특성에 영향을 미치는 CDR 잔기 또는 인접한 잔기는 이러한 공정에서 치환되지 않아야 하므로, 친화성은 보존된다.

[0445] 다른 예에서 바람직하게는 표 1에 나타낸 바와 같은 서열을 사용하여, 본원에 기술된 바와 같은 항-FLAG 태그 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체를 제공한다.

[0446] 전체 항체와 비교하여, 보다 작은 분자량 항체 단편은 치료제 및 생체 내 진단 적용에 특히 유용할 수 있는 고형 종양에 대한 증진된 접근성 및 보다 신속한 제거(clearance)를 가질 수 있다.

[0447] 특정의 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 단일 쇄 Fv 단편(scFv)의 형태로 제공된다. Fv 및 scFv는 불변 영역이 고갈된 완전한 조합 부위를 가지므로 생체 내 사용 동안 감소된 비특이적 결합에 적합하다. scFv를 포함하는 융합 단백질을 작제하여 scFv의 아미노 또는 카복시 말단에서 효과기 단백질의 융합을 수득할 수 있다.

[0448] 다른 실시양태에서, 상기 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질을 포함하는 디아보디 또는 트리아보디 또는 다른 다중특이적 항체가 제공된다. 다중특이적 항체는 다량체화를 허용하는 폴리펩타이드 도메인을 사용하여 조립할 수 있다. 예는 Fc의 CH2 및 CH3 영역 및 CH1 및 C카파/람다 영역을 포함한다. 다른 천연적으로 발생하는 단백질 다량체화 도메인, 예를 들면, 루이신 지퍼 도메인(leucine zipper domain; bZIP), 나선-루프-나선 모티프(helix-loop-helix motif), Src 상동성 도메인(SH2, SH3), EF 핸드(EF hand), 포스포타이로신 결합(phosphotyrosine binding ; PTB) 도메인, 또는 당해 분야에 공지된 다른 도메인을 사용할 수 있다.

[0449] 다른 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체를 포함하는 융합 도메인 또는 이종 단백질이 제공된다.

[0450] 이종 폴리펩타이드는 본 발명의 항원 결합 단백질 또는 이를 함유하는 분자의 N- 또는 C-말단에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합될 수 있다.

[0451] 항체 또는 항원 결합 단백질이 융합(fusing)되는 이종 폴리펩타이드는 FLAG 태그를 포함하는 재조합 단백질, FLAG 태그를 포함하는 단백질을 포함하는 치료학적 항체 또는 다른 항원 결합 도메인; FLAG 태그를 포함하는 단백질을 포함하는 태그, 치료학적 항체 또는 다른 항원 결합 도메인; FLAG 태그를 발현하거나 FLAG 태그를 포함하는 수용체 또는 다른 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포 면역치료제를 포함하나 이에 제한되지 않는, 항체 또는 항원 결합 단백질이 융합된 이종 폴리펩타이드는 재조합 제제에 존재하는 FLAG 태그에 결합시키는 데 유용할 수 있다. 특정의 예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 세포독성 면역 세포(예를 들면, CAR T 세포)에 존재하는 키메라 항원 수용체(CAR)에 결합시키는 데 유용할 수 있다.

[0452] 추가로, 본 발명의 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체는 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 포스포릴화, 아미드화, 공지된 보호/차단 그룹에 의한 유도체화, 단백질분해적 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 변형될 수 있다.

[0453] *간접적인 CAR 및 관련된 키메라 수용체*

[0454] 여전히 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단백질이 융합된 이종 폴리펩타이드가 키메라 항원 단백질(CAR) 또는 변이체 T 세포 수용체로서 포함될 수 있다. 이러한 실시양태에서 본 발명의 항원 결합 단백질을 포함하는 생성된 CAR 또는 변이체 T 세포 수용체는 "간접적인 CAR"로 지칭될 수 있음(때때로 또한 공통의 CAR로 지칭됨)이 인식될 것이다. 간접적인 CAR 시스템에서, CAR의 항원 결합 도메인은 표적 세포 상의 표적 항원에 직접적으로 결합하지 않지만 대신에, 중간체에 결합하며, 여기서 중간체는 표적 세포를 직접적으로 결합시키기 위한 항원 결합 도메인을 포함한다. 중간체의 방식으로 세포를 인식하는 CAR의 예는 당해 분야, 예를 들면, 유럽 특허원 제EP 2651442호에 공지되어 있다.

[0455] 숙련가는 본 발명의 항원 결합 단백질이 포함될 수 있는 CAR 및 다른 변형된 수용체의 일반적인 아키텍처에 익숙할 것이다. 전형적으로, "키메라 항원 수용체"는 적어도 하나의 세포외 항원 결합 모이어티, 막관통 도메인 및 세포질성 신호전달 도메인(본원에서 또한 "세포내 신호전달 도메인"으로서 지칭됨)을 포함하는 재조합 폴리

펩타이드 작제물을 지칭한다.

[0456] 키메라 항원 수용체는 세포의 표면에서 발현 시 항원-특이적인 세포 반응을 유도할 수 있는 인공적으로 작제된 단백질이다. CAR은 적어도 2개의 도메인을 포함하는 데; 제1 도메인은 항원, 또는 보다 구체적으로 에피토프 부분, 또는 항원의 부분에 결합하는 항원 결합 도메인이고; 제2의 도메인은 세포내 신호전달 경로를 유도하거나, 또는 이의 유도에 참여할 수 있는 신호전달 도메인이다.

[0457] 이러한 2개의 도메인의 조합은 CAR의 항원 특이성 및 목적한 세포 반응을 유도하기 위한 CAR의 능력을 결정하고, 이중 후자는 또한 CAR의 숙주 세포에 의존한다. 예를 들면, T-헬퍼 세포에서 발현되고 CD3 활성화 도메인을 포함하는 신호전달 도메인을 갖는 CAR의 활성화는, 이의 동계 항원과 접함으로써 활성화되면, CD4+ T-헬퍼 세포를 유도하여 광범위한 사이토킨을 유도할 수 있다. 추가의 예에서, 동일한 CAR은 CD8+ 세포독성 T 세포에서 발현되는 경우, 동계 항원을 발현하는 세포에 의해 활성화되면, 항원-발현 세포의 세포사멸의 유도를 궁극적으로 이끄는 세포독소의 방출을 유도할 수 있다.

[0458] 항원-인식 도메인 및 신호전달 도메인(signalling domain) 외에, CAR은 추가의 구성성분, 또는 부분을 또한 포함할 수 있다. 예를 들면, CAR은 CAR의 신호전달 도메인 중 일부분을 포함할 수 있거나, 이와 연합될 수 있는 막관통 도메인(transmembrane domain)을 포함할 수 있다. 막관통 도메인은 전형적으로 하나 이상의 소수성 나선(hydrophobic helix)이고, 이는 세포의 지질 이층에 걸쳐져서 세포 막 내에 CAR을 묻는다. CAR의 막관통 도메인은 세포와 연합되는 경우 CAR의 발현 패턴에서 하나의 결정인자일 수 있다. 예를 들면, CD3 공-수용체와 연합된 막관통 도메인을 사용하는 것은 나이브(naïve) T 세포의 발현을 허용할 수 있지만, CD4 공-수용체로부터 막관통 도메인의 사용은 T-헬퍼 세포에서 CAR의 발현을 지시할 수 있지만 세포독성 T 세포에서는 그렇지 않다.

[0459] CAR의 추가의 구성성분 또는 부분은 링커(linker) 도메인일 수 있다. 링커 도메인(또한 스페이서 또는 힌지 도메인으로서 알려짐)은 막관통 도메인의 세포외 측면로부터 항원-결합 도메인까지 걸쳐져서, 항원 결합 도메인을 막관통 도메인에 연결할 수 있다. 일부 경우에, 링커 도메인은 기능적 CAR에 요구되지 않지만(즉, 항원-인식 도메인은 막관통 도메인에 직접 연결될 수 있다) 일부 상황에서 링커 도메인의 사용은 CAR의 보다 높은 효능을 위해 허용된다. 링커 도메인은 항원에 결합시키기 위한 CAR의 항원 결합 도메인의 필수적인 배향을 허용하기 위한 CAR의 유연성을 허용하는 것을 포함하는 다양한 기능을 가질 수 있다. 결과적으로, 링커 도메인은 이러한 기능을 허용하는 어떠한 아미노산 서열일 수 있다. 링커 도메인의 하나의 비-제한적인 예는 IgG 항체의 힌지 영역, 예를 들면, IgG1 힌지 영역에 대해 아미노산 서열 상동성을 갖는 도메인이다. 대안적인 예는 항체의 C_{H2}-C_{H3} 영역 또는 CD3 공-수용체 복합체, CD4 공-수용체(co-receptor) 또는 CD8 공-수용체의 부분에 대해 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0460] 일부 실시양태에서, CAR 또는 다른 변형된 수용체는 sdAb, scFv(예를 들면, 다가 scFv), Fab 또는 다른 항체-유사 구조의 형태의 본원에 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질을 포함할 수 있다.

[0461] CAR의 신호전달 도메인은 CAR의 항원-인식 도메인에 의한 항원의 인식 결과로서 CAR의 활성화시 세포내 신호전달 캐스캐이드를 유도할 수 있거나, 이의 유도에 참여할 수 있는 임의의 적합한 도메인일 수 있다. CAR의 신호전달 도메인은 CAR의 활성화 수 목적한 세포 결과에 따라 구체적으로 선택될 것이다. 많은 가능한 신호전달 도메인이 존재하지만, 면역치료요법 및 암 치료요법에 사용되는 경우, 신호전달 도메인은 이것이 유래되는 수용체, 즉, 활성화 수용체 및 공-자극성 수용체를 기반으로 2개의 일반적인 범주로 그룹화될 수 있다.

[0462] 따라서, 본 발명의 제1 양태의 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 활성화 수용체로부터 유래된 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 공-자극성 수용체로부터 유래된 부분을 포함한다.

[0463] 명세서 전체에서 사용된 바와 같은 용어 "부분"은 활성화 수용체 또는 공-자극성 수용체와 관련하여 사용되는 경우, 수용체와 이의 동계 항원 또는 리간드의 상호작용 후 세포내 신호전달 캐스캐이드의 개시/유도에 관여하거나, 이에 포함된 서열을 포함하는 수용체의 임의의 분절에 관한 것이다. CD3을 통한 T 세포 수용체(TCR)에 대한 세포내 신호전달 캐스캐이드의 개시/유도의 예는 하기에 요약되어 있다.

[0464] 이론에 얽매이려는 의도는 아니지만, TCR의 세포외 부분은 크게는 클로노타입(clonotype) TCRα 및 TCRβ 쇄(TCRα/β 수용체) 또는 TCRγ 및 TCRδ 쇄(TCRγδ 수용체)의 이종이량체를 포함한다. 이러한 TCR 이종이량체는 일반적으로 고유의 신호전달 형질도입 능력을 결여하므로 이는 CD3의 다수의 신호 형질도입 소단위(주로 CD3-ζ, - η, -δ, 및 -ε)와 비-공유결합으로 연합된다. CD3의 감마, 델타, 및 엡실론 쇄 각각은 단일 면역-타이로신-기반-활성화 모티프(Immune-receptor-Tyrosine-based-Activation-Motif; ITAM)를 포함하는 세포내(세

포질성) 부분을 가지지만, CD3-ζ 쇄는 3개의 탄뎀(tandem) ITAM을 포함한다. MHC의 존재하에서 이의 동계 항원에 의한 TCR의 개입(engagement), 및 CD4 및 CD8과 같은 필수적인 공-수용체의 연합시, CD3 쇄의 세포내 ITAM(들) 내에서 2개의 타이로신 잔기를 포스포릴화하는 타이로신 키나제(즉, Lck)를 생성하는 신호전달이 개시된다. 후속적으로, 제2의 타이로신 키나제(ZAP-70 - Lck 포스포릴화에 의해 자체적으로 활성화됨)는 ITAM을 비포스포릴화하기 위해 보충된다. 그 결과, 수개의 하부(downstream) 표적 단백질이 활성화되며 이는 궁극적으로 세포내 구조 변화, 칼슘 이동(calcium mobilisation), 및 조합되는 경우 전사 인자의 활성화 및 T 세포 면역반응의 유도를 이끄는 액틴 세포골격-재정렬을 이끈다.

[0465] 명세서 전체에서 사용된 바와 같이 용어 "활성화 수용체"는 T 세포 수용체(TCR) 복합체, 또는 항원성 또는 다른 면역원성 자극의 인식 결과로서 면역 세포의 특이적인 활성화에 포함된 수용체의 구성성분을 형성하거나, 또는 이의 형성에 포함되는 수용체, 또는 공-수용체에 관한 것이다.

[0466] 이러한 활성화 수용체의 비-제한적인 예는 T 세포 수용체-CD3 복합체의 구성성분(CD3-ζ, -η, -δ, 및 -ε), CD4 공-수용체, CD8 공-수용체, Fc 수용체 또는 천연 킬러(NK) 세포 관련된 활성화 수용체, 예를 들면, LY-49(KLRA1), 천연 세포독성 수용체(NCR, 바람직하게는 NKp46, NKp44, NKp30 또는 NKG2 또는 CD94/NKG2 이종이량체)를 포함한다. 결과적으로, 본 발명의 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 CD3 공-수용체 복합체(complex)의 구성원(바람직하게는 CD3-ζ 쇄 또는 이의 부분), CD4 공-수용체의 구성원, CD8 공-수용체의 구성원, Fc 수용체(FcR)의 구성원(바람직하게는 FcεRI 또는 FcηRI) 또는 NK 연합된 수용체의 구성원, 예를 들면, LY-49 중 하나 이상으로부터 유래된 부분을 포함한다.

[0467] CD3 쇄 각각의 특이적인 세포내 신호 형질도입 부분은 Fc 수용체의 세포내 부분과 같이, 당해 분야에 공지되어 있다.

[0468] 활성화 수용체의 부분의 다양한 조합을 이용하여 CAR의 막관통(TM) 및 세포내(IC) 부분, 예를 들면, CD3ζ TM 및 CD3ζ IC(Landmeier S. et al. Cancer Res. 2007; 67:8335-43; Guest RD. et al., J Immunother. 2005, 28:203-11; Hombach AA. et al. J Immunol. 2007; 178: 4650-7), CD4 TM 및 CD3ζ IC(James SE. et al. J Immunol. 2008;180:7028-38), CD8 TM 및 CD3ζ IC(Patel SD. Et al. Gene Ther. 1999; 6: 412-9), 및 FcεRIγ TM 및 FcεRIγ IC(Haynes NM. et al. J Immunol. 2001; 166: 182-7; Annenkov AE. et al. J Immunol. 1998; 161: 6604-13)를 형성할 수 있다.

[0469] 명세서 전체에 사용된 바와 같이, 용어 "공-자극성 수용체"는 활성화 수용체의 항원 특이적 유도 시 면역 세포의 활성화를 보조하는 수용체 또는 공-수용체에 관한 것이다. 이해될 바와 같이, 공-자극성 수용체는 항원의 존재를 요구하지 않으며 항원 특이적이지 않지만, 전형적으로 2개의 신호 중 하나이고, 다른 것은 면역 세포 반응의 유도에 요구되는, 활성화 신호이다. 면역 반응의 맥락에서 공-자극 수용체는 전형적으로 항원-제시 세포(antigen-presenting cell; APC), 예를 들면, 수지 세포 또는 대식구의 표면에서 이의 발현된 리간드의 존재에 의해 활성화된다. 특히 T 세포와 관련하여, 공-자극은 세포 활성화, 증식, 분화 및 생존(이들 모두는 일반적으로 T 세포 활성화의 영향(umbrella) 하에 있다고 지칭된다)을 이끄는 데 필수적이지만, 공-자극의 부재하에서 T 세포에 대한 항원의 제시는 아네르기(anergy), 클론 결실 및/또는 항원 특이적인 내성의 발달을 야기할 수 있다. 중요하게도, 공-자극성 분자는 동시에 마주친 항원에 대한 T 세포 반응을 알려줄 수 있다. 일반적으로, '양성' 공-자극성 분자의 맥락에서 마주친 항원은 T 세포의 활성화 및 이러한 항원을 발현하는 세포를 제거하는 것을 목표로 하는 세포 면역 반응을 이끌 것이다.

[0470] 반면 '음성' 공-수용체의 맥락에서 마주친 항원은 동시-마주친 항원에 대한 내성의 유도된 상태를 이끌 것이다.

[0471] T 세포 공-자극성 수용체의 비-제한적 예는 CD27, CD28, CD30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137), ICOS를 포함한다. 구체적으로, CD27, CD28, CD30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137), 및 ICOS 모두는 T 세포 반응의 활성화를 향상시키는 '양성' 공-자극성 분자를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 CD27, CD28, CD30, CD40, DAP10, OX40, 4-1BB (CD137) 및 ICOS 중 임의의 하나 이상으로부터 유래된 부분을 포함한다.

[0472] 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 CD28, OX40 또는 4-1BB 공-자극성 수용체로부터 유래된 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 CD28 공-자극성 수용체의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 OX40 공자극성 수용체의 부분을 포함한다. 공-자극성 수용체의 부분의 다양한 조합을 이용하여 CAR의 막관통(TM) 및 세포내(IC) 부분을 형성할 수 있다. 예를 들면, CD8 TM 및 DAP10 IC 또는 CD8 TM 및 4-1BB IC(Marin V. et al. Exp Hematol. 2007; 35: 1388-97), CD28 TM 및 CD28 IC(Wilkie S. et al. J Immunol.

2008;180: 4901-9; Maher J. et al. Nat Biotechnol. 2002; 20: 70-5), 및 CD8 TM 및 CD28 IC (Marin V. et al. Exp Hematol. 2007; 35: 1388-97).

[0473] *본 발명의 항원 결합 단백질의 추가의 세부사항*

[0474] 본 발명의 항원 결합 단백질은 펩타이드 결합 또는 변형된 펩타이드 결합, 즉, 펩타이드 등배체(peptide isostere)에 의해 서로 결합된 아미노산으로 구성될 수 있고, 20개의 유전자-암호화된 아미노산 이외의 아미노산을 함유할 수 있다. 본 발명의 항원 결합 단백질은 천연 공정, 예를 들면, 해독 후 프로세싱에 의해, 또는 당해 분야에 잘 공지된 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 기본 교재 뿐만 아니라, 연구 문헌에 잘 기술되어 있다. 변형은 펩타이드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카복시 말단을 포함하는 항원 결합 단백질의 어느 곳, 또는 탄수화물과 같은 모이어티(moiety) 상에서 발생할 수 있다. 동일한 유형의 변형이 주어진 항원 결합 단백질내 수개의 단백질에서 동일하거나 다양한 정도로 존재할 수 있다. 또한, 주어진 항원 결합 단백질은 많은 유형의 변형을 함유할 수 있다. 항원 결합 단백질은 예를 들면, 우비퀴틴화의 결과로서 측쇄될 수 있고, 이는 측쇄가 있거나 없는, 사이클릭일 수 있다. 사이클릭, 측쇄, 및 측쇄된 사이클릭 항원 결합 단백질은 해독후 천연 공정으로부터 생성될 수 있거나 합성 방법으로 제조될 수 있다. 변형은 플라빈의 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헴 모이어티의 공유결합 성 부착, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유결합성 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합성 부착, 포스파티딜이노시톨의 공유결합성 부착, 교차-연결, 폐환, 이황화물 결합 형성, 탈메틸화, 공유결합성 교차-연결의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 페길화, 단백질분해성 공정, 포스포릴화, 프레닐화, 셀레노일화, 황화, 아미노산의 단백질로의 전달-RNA 매개된 첨가, 예를 들면, 아르기닐화, 및 유비퀴틴화(ubiquitination)를 포함한다.

[0475] 다른 실시양태에서, 세포독성제, 예를 들면, 화학 치료제, 약물, 성장 억제제, 독소(예컨대, 세균, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 이의 단편), 또는 방사활성 동위원소와 같은 표지(즉, 방사 접합체)에 접합된 상기 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, Fab, dab, scFv, 디아보디, 트리아보디 또는 융합 단백질 형태의 접합체가 제공된다. 다른 양태에서, 본 발명은 추가로 면역접합체를 사용하는 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, 면역접합체는 세포독성제 또는 검출가능한 제제에 공유결합적으로 부착된 상기 가변 도메인 중 어느 것도 포함한다.

[0476] 다른 실시양태에서, 상기 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질 또는 접합체에 결합시키기 위한 항체가 제공된다.

[0477] 다른 실시양태에서, 상기 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv fragment, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질 또는 접합체를 암호화하는 핵산이 제공된다.

[0478] 상기 기술된 일반식(화학식) 중 어느 하나에 따른 CDR 또는 FR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이로 구성된 항원 결합 단백질은 예를 들면, 화학적 합성 또는 cDNA 또는 게놈 라이브러리로부터의 단리에 의해, 어떠한 공급원으로부터의 핵산으로부터 생성될 수 있다. 예를 들면, cDNA 라이브러리는 B 세포, 혈장 세포 또는 하이브리도마 세포와 같은 항체 생산 세포로부터 및 목적한 특수 클론에 대해 지시된 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 PCR 증폭에 의해 단리된 관련 핵산으로부터 생성될 수 있다. 단리된 핵산은 이후에 당해 분야에 공지된 어떠한 방법을 사용하여서도 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 관련 뉴클레오타이드 서열은 이후에 당해 분야에 공지된 방법, 예컨대, DNA 기술, 부위 지시된 돌연변이유발, PCR 등(참고, 예를 들면, 문헌: Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 및 Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY에 기술된 기술)을 사용하여 돌연변이유발시킴으로써, 상이한 아미노산 서열을 갖는 항원 결합 단백질을 생성시킬 수 있는데, 예를 들면, 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 생성할 수 있다.

[0479] **단백질 생산**

[0480] 다른 실시양태에서, 상기 기술된 세포 또는 비-인간 동물에서 상기 기술된 핵산을 발현하는 단계를 포함하는 상기 기술된 바와 같은 항-FLAG 항원 결합 단백질을 생산하는 방법이 제공된다.

[0481] 본 발명의 항원 결합 단백질의 생산은 일반적으로 본 발명의 항원 결합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이

드를 함유하는 발현 벡터를 요구한다. 본 발명의 항원 결합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 본원에 기술된 기술을 포함하는, 당해 분야에 잘 공지된 기술을 사용하여 재조합 DNA 기술에 의해 수득될 수 있고 항원 결합 단백질의 생산을 위해 벡터 내로 서브-클로닝될 수 있다. 많은 상이한 발현 시스템, 예를 들면, 항원 결합 단백질의 생산 및 분비를 위한 인간 세포를 포함하는 포유동물 세포의 사용이 고려된다. 세포의 예는 293F, CHO 및 NSO 세포주를 포함한다.

[0482] 단백질 암호화 서열 및 적절한 전사 및 해독 제어 신호를 함유하는 발현 벡터는 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 작제할 수 있다. 이는 시험관 내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체 내 유전 재조합을 포함한다. 특정의 실시양태에서 프로모터에 작동적으로 연결된 항원 결합 단백질을 암호화하는 핵산을 갖는 복제가능한 벡터가 제공된다.

[0483] 발현 벡터로 형질감염된 세포는 항원 결합 단백질을 생산하기 위한 통상의 기술로 배양할 수 있다. 따라서, 특정의 실시양태에서, 프로모터에 작동적으로 연결된 본 발명의 항원 결합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주 세포 또는 세포 형질전환체가 제공된다. 프로모터는 이종일 수 있다. 다양한 숙주 발현 벡터 시스템을 이용할 수 있고 특정의 시스템에서 벡터 시스템의 전사 기구는 숙주 세포와 특이 일치한다. 예를 들면, 차이니즈 햄스터 난소 세포(Chinese hamster ovary cell; CHO)와 같은 포유동물 세포는 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 주요 중간체 얼리 유전자 프로모터 성분(major intermediate early gene promoter element)을 포함하는 벡터로 형질감염시킬 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 해독후 변형의 다양한 형태를 포함하는, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 필요한 유전자 생성물을 변형시키고 프로세싱하는 숙주 세포를 사용할 수 있다. 특수한 해독 후 변형 공정을 갖는 포유동물 숙주 세포의 예는 CHO, VERY, BHK, HeIa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NSO, CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 포함한다.

[0484] 단백질 분자에 대해 의도된 용도에 따라서, 다수의 세균 발현 벡터를 유리하게 선택할 수 있다. 하나의 예에서, 용이하게 정제되는 높은 수준의 융합 단백질의 발현을 유발하는 벡터, 예를 들면, 이. 콜라이(*E. coli*) 발현 벡터 pUR278을 사용할 수 있고 여기서 다량의 항원 결합 단백질이 생산되어야만 한다. 발현 생성물은 lacZ과의 융합 단백질의 형태로 생산될 수 있다. 다른 세균 벡터는 pIN 벡터 등을 포함한다. pGEX 벡터를 또한 사용하여 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST)와의 융합 단백질로서 외부 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있다. 이러한 융합 단백질은 일반적으로 가용성이고 글루타티온-아가로스 친화성 매트릭스에 대한 흡착 및 결합에 이어서 유리 글루타티온의 존재하에서의 용출에 의해 분해된 세포로부터 용이하게 정제할 수 있다. 트롬빈 및/또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위는 발현된 폴리펩타이드로서 제공됨으로써 클로닝된 표적 유전자 생성물은 GST 모이어티로부터 방출될 수 있다.

[0485] 오토그라파 칼리포니카 핵다면체성 바이러스(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus; AcNPV)를 벡터로서 사용하여 곤충 시스템, 예를 들면, 스포도프테라프루기페르다(*Spodopter frugiperda*) 세포에서 외부 유전자를 발현할 수 있다. 사용된 특수한 프로모터는 단백질 암호화가 서열 내로 삽입된 경우에 의존할 수 있다. 예를 들면, 서열은 폴리헤드린 유전자 내로 개별적으로 클로닝될 수 있고 폴리헤드린 프로모터의 제어 하에 둘 수 있다.

[0486] 바이러스 기반 발현 시스템은 아데노바이러스와 같은 포유동물 세포를 사용하여 이용될 수 있고, 이에 의해 목적한 암호화 서열은 아데노바이러스 레이트 프로모터 및 3부(tripartite) 리더 서열에 연결될 수 있다. 이후에, 시험관 내 또는 생체 내 재조합을 사용하여 이러한 키메라 유전자를 아데노바이러스 게놈 내로 삽입시킬 수 있다. 영역 E1 또는 E3으로의 삽입은 감염된 숙주 세포에서 항원 결합 단백질을 발현할 수 있는 생존가능한 재조합 바이러스를 생성할 것이다. ATG 개시 코돈 및 인접한 서열을 포함하는 특이적인 개시 신호는 삽입된 항원 결합 단백질 암호화 서열의 효율적인 해독에 요구될 수 있다. 개시 및 해독 제어 신호 및 코돈은 천연 및 합성 둘 다의 다양한 기원으로부터 수득될 수 있다. 전사 인핸서 성분 및 전사 터미네이터를 사용하여 바이러스 기반 시스템의 발현의 효능을 향상시킬 수 있다.

[0487] 재조합 단백질의 장-기간, 고-수율 생산이 요구되는 경우, 안정한 발현이 바람직하다. 일반적으로, 선택가능한 마커 유전자가 사용되며 이에 의해 형질감염 후, 세포는 농축된 배지에서 1 내지 2일 동안 성장된 다음 상응하는 선택가능한 마커, 예를 들면, 항생제 내성을 함유하는 세포가 스크리닝될 수 있는 선택성 배지를 함유하는 배지로 이전시킨다. 결과는 플라스미드를 이의 염색체 내로 안정하게 통삽시키고 최종적으로 클로닝되어 세포주 내로 확장될 수 있는 포커스(focus)를 형성하는 세포이다. 헤르페스 단성 바이러스(herpes simplex virus) 티미딘, 하이포크산틴구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 유전자는 tk-, hgprt- 또는 aprT- 세포 각각에서 사용됨으로서, 적절한 선택 시스템을 제공할 수 있는 유전자의 예이다. 다음의 유전

자: 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr; 마이코페놀산에 내성을 부여하는, gpt; 아미노글루코시드 G-418에 내성을 부여하는 neo; 및 하이드로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygro가 항-대사산물 선택 시스템에서 사용될 수 있는 유전자의 예이다.

[0488] 본 발명의 항원 결합 단백질은 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피(특히 특이적 항원 단백질 A 또는 단백질 G에 대한 친화성) 및 겔 여과 컬럼 크로마토그래피, 원심분리, 차등 용해도를 포함하는, 공지된 방법, 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 재조합 발현 시스템으로 정제할 수 있다. 정제를 융합 단백질의 형태로 항원 결합 단백질을 제공함으로써 용이하게 하거나 보조할 수 있다.

[0489] 다량의 본 발명의 항원 결합 단백질은 분석 규모 생물반응기(전형적으로 5 L 내지 약 50 L 생물반응기) 또는 생산 규모 생물반응기(예를 들면, 그러나 이에 제한되지 않는 75 L, 100 L, 150 L, 300 L, 또는 500 L)까지 규모를 확장시키는 연구 실험실에서 파일럿 발현 시스템으로 출발하는 규모조절가능한 공정으로 생산할 수 있다. 요구되는 규모확장가능한 공정은 HPSEC 또는 rCGE에 의해 측정되는 것으로서, 낮은 내지 검출불가능한 수준, 전형적으로 단백질의 5 중량% 이하의 응집 내지 단백질의 0.5 중량% 이하의 응집인 경우를 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 완전한 항원 결합 단백질을 나타내는 총 피크 영역의 측면에서 측정된 단편화의 검출불가능한 수준은 총 피크 영역의 적어도 80% 및 99.5% 이상이 완전한 항원 결합 단백질을 나타내도록 규모조절가능한 공정에서 요구될 수 있다, 다른 실시양태에서, 본 발명의 규모가능한 공정은 약 10 mg/L 내지 약 300 mg/L 이상의 생산 효능에서 항원 결합 단백질을 생산한다.

[0490] 숙주 세포에서 완전한 항체의 단백질분해성 분해 및 재조합 발현을 포함하는 항체의 생산을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 후자와 관련하여, 하기 기술된 바와 같이, Fab, Fv 및 scFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되고 이로부터 분비될 수 있고, 항체 단편은 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있고 Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수되어 화학적으로 커플링됨으로써 F(ab')2 단편을 형성할 수 있다. 다른 접근법에서, F(ab')2 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리된다.

[0491] 다른 실시양태에서, 상기 기술된 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다. 벡터는 예를 들면, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자, 또는 파아지의 형태일 수 있다. 적절한 핵산 서열은 다양한 과정에 의해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA는 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들) 내로 삽입된다. 벡터 구성성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 오리진, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터, 및 전사 종결 서열을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 구성성분 중 하나 이상을 함유하는 적합한 벡터의 작제는 기술자에게 공지된 표준 연결 기술을 사용한다.

[0492] 항체 결합 부위(site)는 재조합적으로 직접적으로 뿐만 아니라, 신호 서열 또는 주요 단백질 또는 폴리펩타이드의 N-말단에서 특정의 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩타이드일 수 있는, 이종 폴리펩타이드와의 융합 폴리펩타이드로서 생산될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 구성성분일 수 있거나, 이는 벡터 내로 삽입된 항원 결합 부위를 암호화하는 DNA의 부분일 수 있다. 신호 서열은 예를 들면, 알칼린 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 또는 열-안정성 엔테로톡신 II 리더의 그룹으로부터 선택된 원핵세포 신호 서열일 수 있다. 효소 분비를 위해 신호 서열은 예컨대, 효모 인버타제 리더(yeast invertase leader), 알파 인자 리더, 또는 산 포스파타제 리더(leader) 또는 씨. 알비칸스(*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열, 예를 들면, 이의 또는 관련된 종의 분비된 폴리펩타이드로부터의 신호 서열, 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더를 사용하여 단백질의 분비를 지시할 수 있다.

[0493] 본 발명의 항원 결합 단백질의 폴리펩타이드 구성성분을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 기술된 바와 같은 표준 재조합 기술을 사용하여 수득할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 수득되면, 폴리펩타이드를 암호화하는 서열은 원핵세포 숙주에서 이종 폴리뉴클레오타이드를 복제 및 발현시킬 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 이용가능하고 당해 분야에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적을 위해 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 벡터 내로 삽입될 핵산의 크기 및 특히 벡터로 형질전환될 숙주 세포에 의존할 것이다. 각각의 벡터는 이의 기능(이종 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 다) 및 이것이 존재하는 특수한 숙주 세포와의 이의 상용성(compatibility)에 따라, 다양한 구성성분을 함유한다.

[0494] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘(replicon) 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터를 이러한 숙주와 함께 사용한다. 발현 및 클로닝 벡터 둘 다는 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제할 수 있도록 하는 핵산 서열 뿐만 아니라, 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 마킹 서열을 함유한다. 이러한 서열은 다양한 세균, 효모, 및 바이러스에 대해 잘 알려져 있다. 암피실린(Amp) 및 테

트라사이클린(Tet) 내성을 암호화하는 유전자를 함유하는, 플라스미드 pBR322로부터의 복제 오리진은 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공하고, 대부분의 그램-음성 세균에 적합하다. 2 μm의 플라스미드 기원이 효모의 경우 적합하다. 다양한 바이러스 오리진(SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)이 포유동물 세포에서 벡터를 클로닝하는 데 유용하다 pBR322, 이의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파아지는 또한 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나, 또는 함유하도록 변형될 수 있다.

[0495] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파아지 벡터를 이러한 숙주와 관련하여 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들면, λGEM.TM.-11과 같은 박테리오파아지를 이. 콜라이 LE392와 같은 민감한 숙주 세포를 형질전환하는 데 사용할 수 있는 재조합 벡터를 제조하는 데 이용할 수 있다.

[0496] 본 발명의 발현 벡터는 2개 이상의 프로모터-시스트론(시스트론은 단일 폴리펩타이드의 생산을 위한 모든 정보를 함유하는 DNA의 분절이다) 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 이의 발현을 조절하는 시스트론에 대해 하부(5')에 위치한 해독되지 않은 조절 서열이다. 원핵세포는 전형적으로 유도성 및 구성적인, 2개의 부류에 속한다. 유도성 프로모터는 배양 조건에서 변화, 예컨대, 영양물의 존재 또는 부재 또는 온도 변화에 대한 반응시 이의 제어 하에 시스트론의 전사의 증가된 수준을 개시하는 프로모터이다.

[0497] 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식된 다수의 프로모터가 잘 알려져 있다. 선택된 프로모터는 제한 효소 분해를 통해 DNA 공급원으로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 암호화하는 시스트론 DNA에 작동적으로 연결시킬 수 있다. 천연의 프로모터 서열 및 많은 이종 프로모터 둘 다를 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종 프로모터는 일반적으로 천연의 표적 폴리펩타이드 프로모터와 비교하여 발현된 표적 유전자의 보다 높은 전사 및 보다 높은 수율을 허용하므로, 이용된다.

[0498] 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식된 프로모터가 잘 알려져 있다. 원핵세포 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, β-갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼린 포스파타제, 트립토판(trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예를 들면, tac 또는 trc 프로모터를 포함한다. 세균 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 본 발명의 항원 결합 단백질을 암호화하는 DNA에 작동적으로 연결된 샤인-달가노(Shine-Dalgarno; S.D.) 서열을 함유할 것이다. 그러나, 세균에서 기능성인 다른 프로모터(예를 들면, 다른 공지된 세균 또는 파아지 프로모터)가 또한 적합하다. 이의 뉴클레오타이드 서열은 발표되었고, 이에 의해 기술자가 링커 또는 어댑터(adaptor)를 사용하여 표적 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 시스트론에 이를 연결하여 어떠한 요구된 제한 부위도 공급하도록 할 수 있다.

[0499] 본 발명의 하나의 양태에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 막을 교차하여 발현된 폴리펩타이드의 전좌를 지시하는 분비 신호 서열 구성성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 구성성분일 수 있거나, 이는 벡터 내로 삽입되는 표적 폴리펩타이드 DNA의 부분일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱된(즉, 신호 펩티다제에 의해 절단된) 것일 수 있다. 이종 폴리펩타이드에 대해 천연의 신호 서열을 인식하여 프로세싱하지 않는 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은 예를 들면, 알칼린 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 엔테로톡신 II(STII) 리더, LamB, PhoE, PeIB, OmpA 및 MBP로 이루어진 그룹으로부터 선택된 원핵세포 신호 서열에 의해 치환된다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 발현 시스템의 시스트론 둘 다에 사용된 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 이의 변이체이다.

[0500] 다른 양태에서, 본 발명에 따른 면역글로불린의 생산은 숙주 세포의 세포질에서 발생할 수 있으므로, 각각의 시스트론 내에서 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 면역글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고 조립되어 세포질 내에서 기능적 면역글로불린을 형성한다. 특정의 숙주 균주(예컨대, 이. 콜라이, trxB 균주)는 이황화물 결합 형성을 위해 선호되는 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 소단위의 적절한 폴딩 및 조립을 허용한다.

[0501] 본 발명은 발현된 폴리펩타이드 구성성분의 정량적 비를 조절하여 본 발명의 분비되고 적절하게 조립된 항원 결합 단백질의 수율을 극대화시킬 수 있는 발현 시스템을 제공한다. 이러한 조절은 폴리펩타이드 구성성분에 대한 해독 강도를 동시에 조절함으로써 적어도 부분적으로 달성된다.

[0502] 진핵 숙주 세포에서의 발현 측면에서, 벡터 구성성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 오리진, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

[0503] 진핵 숙주 세포에서 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열 또는 성숙한 단백질 또는 목적한 폴리펩타이드의 N-

말단에서 특정의 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩타이드를 함유할 수 있다. 바람직하게는 선택된 이종의 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱된(즉, 신호 펩타다제에 의해 절단된) 것이다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들면, 헤르페스 단성 gD 신호가 이용가능하다.

[0504] 이러한 전구체 영역에 대한 DNA는 항체를 암호화하는 DNA에 판독 프레임(reading frame)으로 연결된다.

[0505] 일반적으로, 복제 구성성분의 기원(origin)은 포유동물 발현 벡터에 필요하지 않다. 예를 들면, SV40 기원은 얼리 프로모터(early promoter)를 함유하므로 전형적으로 유일하게 사용될 수 있다.

[0506] 발현 및 클로닝 벡터는 전형적으로 선택가능한 마커로 또한 명명된, 선택 유전자를 함유할 것이다. 대표적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예컨대, 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트, 또는 테트라사이클린에 대해 내성을 부여하는 단백질, (b) 상보성의 영양요구성 결핍을 부여하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양분을 공급하는 단백질, 예컨대, 세균의 경우 D-알라닌 라세마제를 암호화한다.

[0507] 선택 체계(selection scheme)의 하나의 예는 약물을 이용하여 숙주 세포의 성장을 저지한다. 이종 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하므로, 선택 요법에서 생존한다. 이러한 우성 선택의 예는 네오마이신, 마이코페놀산 및 하이드로마이신 약물을 사용한다.

[0508] 포유동물 세포용으로 적합한 선택가능한 마커의 예는 항원 결합 단백질-암호화 핵산, 예를 들면, DHFR 또는 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카복실레이트 등을 취하기에 충분한 세포의 확인을 가능하게 하는 것이다. 적절한 숙주 세포는 야생형 DHFR이 사용된 경우 제조도어 증식되는 DHFR 활성이 결여된 CHO 세포주(예컨대, ATCC CRL-9096)이다. 예를 들면, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포는 먼저 모든 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인, 메토트렉세이트(Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로서 확인된다. 대안적으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질, 및 다른 선택가능한 마커, 예를 들면, 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제(APH)를 암호화하는 DNA 서열로 형질전환되거나 공-형질전환된 숙주 세포(특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)를 선택 마커, 예를 들면, 아미노글리코시드성 항생제, 예컨대, 가나마이신, 네오마이신, 또는 G418에 대한 선택 제제를 함유하는 배지에서 세포 성장함으로써 선택할 수 있다.

[0509] 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로 mRNA 합성을 지시하는 핵산 서열을 암호화하는 항원 결합 단백질에 작동적으로 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식된 프로모터는 잘 알려져 있다.

[0510] 진핵세포 유전자는 일반적으로 전사가 개시되는 부위로부터 상부로 대략 25 내지 30개의 염기에 위치한 AT가 풍부한 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 개시로부터 상부로 70 내지 80개 염기에서 발견된 다른 서열은 CNCAAT 영역이고 여기서 N은 임의의 뉴클레오타이드일 수 있다. 대부분의 진핵세포 유전자의 3' 말단에는 암호화 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일(poly A tail)을 첨가하기 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 이러한 서열 모두는 진핵세포 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.

[0511] 효모 숙주와 함께 사용하기 위한 적합한 프로모팅(promoting) 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소, 예를 들면, 에놀라제, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카복실레이트, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오세포스페이트 이소머라제, 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.

[0512] 성장 조건에 의해 제어된 전사의 추가의 장점을 갖는 유도성 프로모터인, 다른 효소 프로모터는 알코올 데하이드로게나제 2, 이소사이토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 관련된 분해 효소(degradative enzyme), 메탈로티오네인, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용에 관여하는 효소에 대한 프로모터 영역이다.

[0513] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 항원 결합 단백질 전사는 예를 들면, 폴리오마 바이러스 파울폭스 바이러스, 아데노바이러스(예를 들면, 아데노바이러스 2), 소 파필로마 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B-형 간염 바이러스 및 시미안 바이러스 40(SV40)와 같은 바이러스의 게놈으로부터, 이종 포유동물 프로모터, 예컨대, 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로부터, 및 열-쇼크(heat-shock) 프로모터로부터 수득된 프로모터에 의해 제어되며, 단, 이러한 프로모터는 숙주 세포 시스템과 상용성이다.

[0514] 고등 진핵세포에 의한 항원 결합 단백질을 암호화하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입시킴으로써 증가시킬 수 있다. 인핸서 서열은 포유동물 유전자로부터 공지된 것(글로빈, 에스테라제, 알부민, α-페토단백질, 및 인슐린)을 포함한다. 그러나, 전형적으로, 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서을 사용할 것이다. 예는

복제 오리진의 측면(bp 100-270)에서 SV40 인핸서, 사이토메갈로바이러스 얼리 프로모터 인핸서(enhancer), 복제 오리진의 말기 측면에서 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다.

[0515] 진핵 숙주 세포(효모, 진균, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에서 사용된 발현 벡터는 또한 전사 종결 및 mRNA의 안정화에 필수적인 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 일반적으로 진핵세포 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 해독되지 않은 영역인, 5' 및, 때때로 3'로부터 이용가능하다. 이러한 영역은 항원 결합 단백질을 암호화하는 mRNA의 해독되지 않은 부분에 폴리아데닐화된 단편으로서 전사된 뉴클레오타이드 분절을 함유한다.

[0516] 다른 실시양태에서, 상기 기술된 벡터 또는 핵산을 포함하는 세포가 제공된다. 핵산 분자 또는 벡터는 유전적으로 변형된 숙주 세포 또는 숙주에 게놈 외부의 독립된 분자로서, 바람직하게는 복제할 수 있는 분자로서 존재할 수 있거나, 또는 이는 숙주 세포 또는 숙주의 게놈 내로 안정하게 통합될 수 있다.

[0517] 본 발명의 숙주 세포는 임의의 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다.

[0518] 원핵세포의 예는 이. 콜라이 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같이 클로닝을 위해 일반적으로 사용된 것이다. 추가로, 진핵 세포는 예를 들면, 진균 또는 동물 세포를 포함한다.

[0519] 적합한 진균 세포의 예는 효소 세포, 바람직하게는 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속의 세포, 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 종의 세포이다.

[0520] 동물 세포의 예는 예를 들면, 곤충 세포, 척추동물 세포, 바람직하게는 예컨대, HEK293, NSO, CHO, MDCK, U2-OS, Hela, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, PC-12, PC-3, IMR, NT2N, Sk-n-sh, CaSki, C33A와 같은 포유동물 세포이다. 이러한 숙주 세포, 예컨대, CHO-세포는 본 발명의 항체 분자에 대한 해독 후 변형, 예를 들면, 리더 펩타이드 제거, H(중) 및 L(경) 쇄의 폴딩 및 조립, 정확한 부위에서 분자의 글리코실화 및 기능성 분자의 분비를 제공할 수 있다.

[0521] 당해 분야에 공지된 추가의 적합한 세포주는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection; ATCC)과 같은 세포주 기탁기관으로부터 수득될 수 있다.

[0522] 다른 실시양태에서, 상기 기술된 세포를 포함하는 동물이 제공된다. 특정의 실시양태에서, 전이유전자를 함유하는 동물 및 이의 조직은 본 발명의 항원 결합 단백질을 생산하는 데 유용하다. 전이유전자로서 핵산 분자의 비-인간 숙주로의 도입 및 이의 후속적인 발현은 항원 결합 단백질의 생산을 위해 사용될 수 있는데, 예를 들면, 유전자이식 동물의 젖에서 이러한 전이유전자의 발현은 항원 결합 단백질을 정량적 양으로 수득하기 위한 수단을 제공한다. 이와 관련하여 유용한 전이유전자는 카제인 또는 β-락토글로불린과 같은, 포유동물 샘(gland) 특이적인 유전자로부터의 프로모터 및/또는 인핸서에 작동적으로 연결된, 본 발명의 핵산 분자, 예를 들면, 본원에 기술된 항원 결합 단백질에 대한 암호화 서열을 포함한다. 동물은 비-인간 포유동물, 가장 바람직하게는 마우스, 래트, 양, 송아지, 개, 원숭이 또는 유인원일 수 있다.

[0523] **표적 항원에 대한 결합**

[0524] 이의 표적 항원(즉, FLAG 태그)에 대한 본 발명의 항원 결합 단백질의 성공적인 결합을 결정하기 위한 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 이러한 방법의 비-제한적 예는 본원의 실시예에 기술되어 있다. 항원 결합 단백질의 특이성 및 결합 친화성의 확인 방법은 웨스턴 블롯팅(Western blotting), ELISA, 면역조직화학 및 비아코어 방법(Biacore method)의 사용을 포함하고, 이는 모두 당해 분야의 기술자의 기술 세트내에 있다.

[0525] **키트(Kit)**

[0526] 다른 실시양태에서, 상기 기술된 바와 같은 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질, 접합체 또는 약제학적 조성물을 포함하는 키트 또는 제조 물품이 제공된다.

[0527] 다른 실시양태에서 상기 언급된 용도에 사용하기 위한 키트가 제공되고, 키트는:

[0528] - 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, dab, scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, 디아보디, 트리아보디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 또는 다중특이적 항체, 융합 단백질, 접합체 또는 약제학적 조성물 중 하나 이상의 형태의 치료학적 조성물을 유지하는 용기(container);

[0529] - 표지(label) 또는 사용 설명서가 들어있는 패키지(package)를 포함한다.

[0530] 키트 또는 "제조 물품(article manufacture)"은 용기 및 용기 상에 또는 용기와 연합된 표지 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, 블리스터 팩(blister pack) 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 용기는 상태를 치료하는 데 효과적인 치료학적 조성물을 보유하고 멸균 수용 포트(sterile access port)(예를 들면, 용기는 정맥 주사액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 가진 바이알일 수 있다)를 가질 수 있다. 표지 또는 패키지 삽입물은 치료학적 조성물이 선택 상태를 치료하는 데 사용됨을 나타낸다. 하나의 실시양태에서, 표지 또는 패키지 삽입물은 사용을 위한 설명서를 포함한다.

[0531] 키트는 (a) 치료학적 조성물; 및 (b) 내부에 함유된 제2의 활성 물질(principle) 또는 성분이 들어있는 제2의 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 실시양태에서 키트는 이러한 및 다른 활성 물질이 장애를 치료하거나 또는 암으로부터 유래하는 합병증을 예방하는 데 사용될 수 있음을 나타내는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 키트는 약제학적으로 허용되는 완충제, 예를 들면, 정균주사용수(bacteriostatic water for injection; BWFI), 포스페이트-완충된 식염수, 링거 액(Ringer's solution) 및 덱스트로스 용액을 포함하는 제2(또는 제3)의 용기를 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 여과제, 침(needle), 및 주사기를 포함하는, 시판 및 사용자 관점으로부터 요구되는 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0532] 특정의 실시양태에서, 치료학적 조성물은 장치, 1회용 또는 재사용되는 형태, 예를 들면, 치료학적 조성물을 보유하기 위한 리셉타클(receptacle)의 형태로 제공될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 장치(device)는 주사기이다. 장치는 1 내지 2 mL의 치료학적 조성물을 보유할 수 있다. 치료학적 조성물은 장치에서 사용이 준비된 상태 또는 혼합 또는 추가의 구성성분의 첨가를 필요로하는 상태로 제공될 수 있다.

[0533] 다른 실시양태에서, 상기 언급한 진단 적용에 사용하기 위한 키트가 제공되고, 이러한 키트는:

[0534] - 항원 결합 단백질, 면역글로불린 가변 도메인, 항체, Fab, dab, scFv, 디아보디, 트리아보디, 융합 단백질 또는 접합체 중 하나 이상의 형태의 진단 조성물을 유지하는 용기;

[0535] - 표지 또는 사용 설명서가 들어있는 패키지를 포함한다.

[0536] 키트는 (a) 진단 조성물; 및 (b) 내부에 제2의 진단제 또는 제2의 표지가 들어있는 제2의 용기를 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 여과제 등을 포함하는, 상업적 및 사용자 측면으로부터 요구되는 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0537] 본 명세서에서 개시되고 정의된 본 발명은 내용 또는 도면으로부터 언급되거나 명백한 개개 특징 중 2개 이상의 모든 대안적인 조합으로 확장됨이 이해될 것이다. 이러한 상이한 조합 모두는 본 발명의 다양한 대안적인 양태를 구성한다.

[0538] 다음의 실시예는 본 발명을 설명하지만 이를 제한하지 않는 것으로 의도된다.

[0539] **실시예**

[0540] 실시예 1: 키메라 항체의 인간화

[0541] 마우스 항-FLAG 항체를 수득하였다. 상보성 결정 영역(CDR)을 확인하고 가장 가까운 매칭 배선 서열을 분석할 목적으로, IMGT 도메인 Gap 정렬 도구(IMGT Domain Gap Align tool)을 사용하였다(Ehrenmann F., Kaas Q. 및 Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 2010; 38:D301-D307).

[0542] 분자 모델(molecular model)은 내부 소프트웨어를 사용하여 이미 발표된 항체 결정 구조에 대한 상동성을 기반으로 VH 및 VL 도메인에 대해 구축하였다. PDB 파일은 임의의 분자 가시화 소프트웨어에서 고찰하기 위해 요청시 제공될 수 있다. 영상은 PyMol(The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 SchrÖdinger, LLC)를 사용하여 생성하였다.

[0543] 항체 서열을 발표된 단백질 모티프(protein motif)를 기반으로 특이적인 경향성에 대해 분석하였다. 분석은 다음의 모티프에 대해 분석함으로써 수행하였고, 여기서 X는 하기 표에 기술된 바와 같이 프롤린을 제외한 임의의 아미노산을 나타낸다:

위험	경향성	모티프
높음	글리코시드화	NXS 또는 NXT
	유리 시스테인	C
	탈아미드화	NG, NS 또는 QG
	이성체화	DG, DP 또는 DS
중간	탈아미드화	NH
	가수분해	NP
	절단	TS, KK, RK 또는 KR
	트랜스글루타미나제	LLQG
	인테그린 결합	RGD 또는 KGD
	플라스틱 결합	FHENSP 또는 WXXW

[0544]

[0545] 인간화 공정의 개시 시에, VH 및 VL의 상동성 모델을 단일 쇄 Fv(scFv) 포맷으로 구축된다. 모델링은 4개 단계로 이루어진다: 상동성 서열을 수집하는 단계; 폴드 라이브러리 스캐닝(fold library scanning) 단계; 루프 모델링 단계; 측쇄 대체 단계. 수득되는 모델을 사용하여 인간화 공정 동안 "공여체(donor)" 또는 "수용체" 아미노산을 안내한다.

[0546] 모(parental) VH 및 VL 서열은 인간 배선 서열의 패널(panel)로 정렬한다. 이러한 패널을 여과하여 원치않는 서열 경향성, 특히 N-연결된 글리코실화 부위 및 유리 시스테인을 함유하지 않는 배선 서열을 선택하였다. 2개의 상이한 VH 및 VL 계열로부터 가장 가까이 일치하는 배선을 선택한다. 인간화 알고리즘을 이후에 사용하여 CDR 및 골격 아미노산을 선택함으로써 공여체 모 서열로부터 인간 수용체 배선 서열에 이식한다. 4개의 VH 및 4개의 VL 서열을 생산하여, 가능한 16개 항체를 제공한다. 인간에 대한 동일성 퍼센트는 IMGT 도메인 갭 정렬 도구를 사용하여 계산한다(Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 2010; 38:D301-D307). 서열 경향성은 서열 모티프를 기반으로 결정한다.

[0547] VH 및 VL 서열을 IGMT 갭 정렬 도구를 통해 작동시켜 모든 공지된 항체 배선 서열에 대해 분석한다. CDR 영역을 IMGT 정의를 사용하여 지정하였다. 예측한 바와 같이, 서열은 마우스에 대해, 구체적으로, VH의 경우 IGHV1-4*01 계열에, VL의 경우 IGK1-117*01에 가장 가깝게 정렬된다. 모(parent) 서열 번호: 1에 대한 가장 가까운 일치 배선은 배선 IGHV1-46*01, IGHV7-4-1*02, IGKV2-30*01 및 IGKV4-1*01이었다.

[0548] 하기 표는 원래의 모 및 인간화된 서열을 요약한다:

확인 번호	포맷	인간 배선	인간에 대한 동일성 %
모 I		-	66.3%
hu-VH1	인간화됨	IGHV1-46*01	84.7%
hu-VH2	인간화됨	IGHV1-46*01	87.8%
hu-VH3	인간화됨	IGHV7-4-1*02	82.7%
hu-VH4	인간화됨	IGHV7-4-1*02	86.7%
모		-	80.0%
hu-VL1	인간화됨	IGKV2-30*01	90.0%
hu-VL2	인간화됨	IGKV2-30*01	91.0%
hu-VL3	인간화됨	IGKV4-1*01	80.2%
hu-VL4	인간화됨	IGKV4-1*01	81.2%

[0549]

[0550] 4개의 상이한 중쇄 및 경쇄 골격 영역의 조합은 16개의 상이한 V_H/V_L 조합을 생성시킨다.

[0551] 16개의 항체의 상이한 VH/VL 조합은 하기 표에 요약한다:

제안된 항체		VH 명칭	VL 명칭
	모	VH	VL
1	인간화된-v1	hu-VH1	hu-VL1
2	인간화된-v2	hu-VH1	hu-VL2
3	인간화된-v3	hu-VH1	hu-VL3
4	인간화된-v4	hu-VH1	hu-VL4
5	인간화된-v5	hu-VH2	hu-VL1
6	인간화된-v6	hu-VH2	hu-VL2
7	인간화된-v7	hu-VH2	hu-VL3
8	인간화된-v8	hu-VH2	hu-VL4
9	인간화된-v9	hu-VH3	hu-VL1
10	인간화된-v10	hu-VH3	hu-VL2
11	인간화된-v11	hu-VH3	hu-VL3
12	인간화된-v12	hu-VH3	hu-VL4
13	인간화된-v13	hu-VH4	hu-VL1
14	인간화된-v14	hu-VH4	hu-VL2
15	인간화된-v15	hu-VH4	hu-VL3
16	인간화된-v16	hu-VH4	hu-VL4

[0552]

[0553] 모든 인간화된 IgG1 포맷을 잘 발현시키고 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC에 의한 특성화를 위해 성공적으로 정제하여 단백질 품질을 평가하였다. 역가, 정제된 최종 항체의 양 및 단량체 함량을 하기 표에 기술한다:

확인 번호	포맷	%	역가 (mg/l)	정제됨 (mg)	당량체 (%)
모	IgG1	VH:66.3 VL:80	10	0.8	100
V1	인간화된 인간 IgG1	VH: 84.7 VL:90.0	22.5	1.8	99.2
V2	인간화된 인간 IgG1	VH: 84.7 VL: 91.0	1.25	0.1	100
V3	인간화된 인간 IgG1	VH:84.7 VL:80.2	50	4	100
V4	인간화된 인간 IgG1	VH: 84.7 VL:81.2	50	4	99.4
V5	인간화된 인간 IgG1	VH:87.8 VL:90.0	24.5	1.4	98.0
V6	인간화된 인간 IgG1	VH: 87.8 VL:91.0	8.5	0.7	97.8
V7	인간화된 인간 IgG1	VH: 87.8 VL:80.2	47.5	3.8	98.5
V8	인간화된 인간 IgG1	VH: 87.8 VL:81.2	40	3.2	98.5
V9	인간화된 인간 IgG1	VH: 82.7 VL:90.0	15	1.2	99.14
V10	인간화된 인간 IgG1	VH: 82.7 VL:91.0	10	0.8	100
V11	인간화된 인간 IgG1	VH: 82.7 VL:80.2	52.5	4.2	99.5
V12	인간화된 인간 IgG1	VH: 82.7 VL:81.2	49	3.9	99.7
V13	인간화된 인간 IgG1	VH: 86.7 VL:90.0	2.5	0.2	100
V14	인간화된 인간 IgG1	VH:86.7 VL:91.0	2.5	0.2	99.4
V15	인간화된 인간 IgG1	VH: 86.7 VL:80.2	27.5	2.2	99.6
V16	인간화된 인간 IgG1	VH: 86.7 VL: 81.2	37.5	3	100

[0554]

[0555] 실시예 2: 인간화된 항체의 특성화

[0556] 모든 16개의 IgG 포맷 및 scFv 포맷 인간화된 항체를 ELISA를 사용하여 표적(FLAG 태그)에 결합하는 이의 능력에 대해 평가하였다. 결과는 도 1에 나타낸다.

[0557] 대부분의 인간화된 변이체는 표적에 결합하는 능력을 보유하였지만, 3개의 인간화된 IgG 클론(v3, v4 및 v7)은 보다 큰 친화성을 가졌다. 이러한 3개의 IgG 클론 및 상응하는 scFV 포맷을 추가의 분석을 위해 선택하였다.

[0558] 인간화된 항체는 모 마우스 항체(즉, 인간 불변 영역의 맥락에서 마우스 VH/VL)에 대해 비교가능한 높은 결합 친화성을 입증할 수 있었다.

[0559] 하기 표는 Biacore에 의해 측정된 바와 같은 항체 친화성 및 입체화학을 요약한다:

항체	K_D (M)	결합 입체화학
V4 scFv	2.2E-08	2.8
V3 scFv	1.9E-08	5.5
V7 scFv	1.5E-08	3.7
V7 IgG	1.3E-09	1.1
V3 IgG	1.0E-09	1.2
Parental	9.6E-10	1.3
V4 IgG	9.1E-10	1.1

[0560]

[0561] 4개의 IgG 항체(모 마우스 항체 및 3개의 인간화된 항체: v3, v4 및 v7)를 Biacore에 의한 단일 항원 결합에 대해 상응하는 인간화된 scFv와 비교하였다. 마우스 scFv는 발현될 수 없으므로 친화성 비교를 위해 사용할 수 없었다. IgG 항체는 scFv와 비교하여 항체에 거의 10배 더 강력하게 결합하였다. 이는 IgG가 천연에서 2가이며 항원항체결합력(avidity)은 1가의 발현된 scFv와 비교하여 보다 강력한 결합을 야기할 것으로 예측된다.

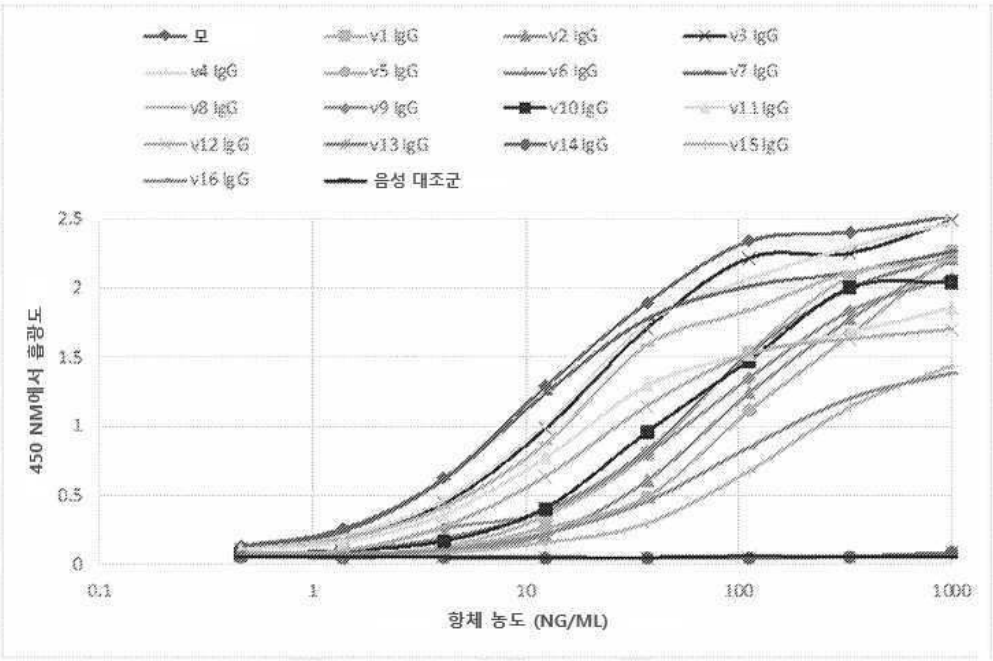
[0562] 항체 v3, v4, v7 및 v11(IgG 포맷 및 또한 v11의 경우에 scFv 포맷)을 추가로 특성화하였다. 항체를 항-HER2-FLAG CAR T 세포를 활성화시키고 IFN-γ를 유도하는 이의 능력에 대해 평가하였다. 항체는 도 2에 나타낸 바와 같이 IFN-γ 발현을 유도하였다. 항체 v11은 또한 IgG 및 scFv 포맷 둘 다로 평가에 포함시켰다. 결과는 항체 v7 및 v4 각각이 CAR T 세포에 의해 가장 큰 양의 IFN-γ를 유도시켰음을 나타낸다.

[0563] 이러한 결과를 기반으로, 항체 변이체 v4 및 v7을 추가의 연구를 위해 선택하였다.

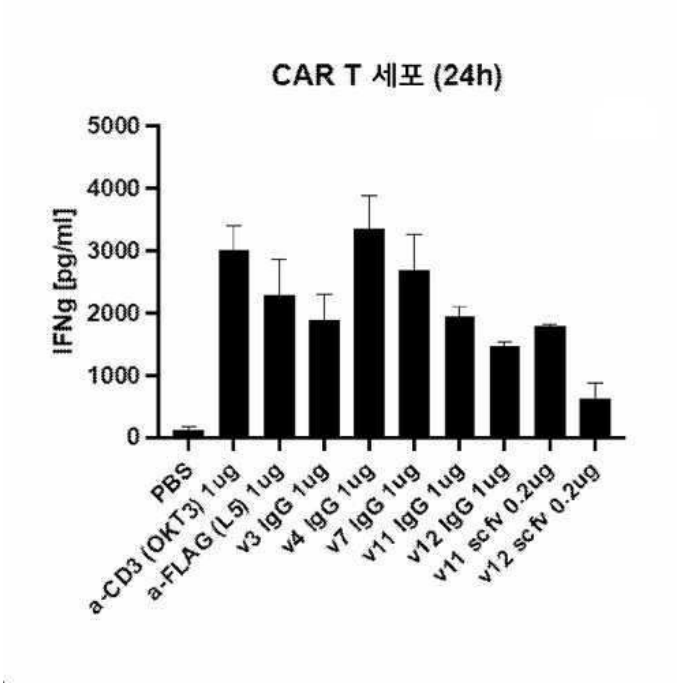
[0564] 본 명세서에 개시되고 정의된 발명은 내용 또는 도면에 언급되거나 또는 이로부터 명백한 개개 특정 중 2개 이상의 모든 대안적인 조합으로 확장됨이 이해될 것이다. 이러한 상이한 조합 모두는 본 발명의 다양한 대안적인 양태를 구성한다.

도면

도면1



도면2


CAR T 세포 (24h)
IFNg [pg/ml]
5000
4000
3000
2000
1000
0
PBS
a-CD3 (OKT3) 1ug
a-FLAG (L5) 1ug
v3 IgG 1ug
v4 IgG 1ug
v7 IgG 1ug
v11 IgG 1ug
v12 IgG 1ug
v11 scFv 0.2ug
v12 scFv 0.2ug

도면3

