	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0053775 (43) 공개일자 2018년05월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 1/107 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) C07K 1/22 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)		(71) 출원인 제넨테크, 인크. 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우 쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(52) CPC특허분류 C07K 1/107 (2013.01) A61K 39/395 (2013.01)		(72) 발명자 스키어, 저스틴 미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내 스피스, 크리스토프 미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내 안수라, 다니엘 지. 미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(21) 출원번호 10-2018-7013781(분할)		
(22) 출원일자(국제) 2011년04월22일 심사청구일자 없음		
(62) 원출원 특허 10-2012-7030541 원출원일자(국제) 2011년04월22일 심사청구일자 2016년04월22일		
(85) 번역문제출일자 2018년05월15일		
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/033610		
(87) 국제공개번호 WO 2011/133886 국제공개일자 2011년10월27일		
(30) 우선권주장 61/327,302 2010년04월23일 미국(US)		(74) 대리인 양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 이종다량체 단백질의 생산

# (57) 요약

하나 초과와 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 다른 다량체 단백질 복합체 (본원에서 집합적으로 이종 다량체 단백질로 지칭함)의 효율적 생산 방법이 본원에 기재된다. 표적은, 예를 들어 단일 분자 상의 상이한 에 피토프일 수 있거나, 또는 상이한 분자 상에 위치할 수 있다. 방법은 이종다량체 단백질에 대한 효율적인 높은 유전자 발현 수준, 적절한 어셈블리 및 정제의 용이성을 조합한다. 본 발명은 또한 이러한 이종다량체 단백질의 사용 방법, 및 이러한 항체를 포함하는 조성물, 키트 및 제조품을 제공한다.

(52) CPC특허분류

*C07K 1/22* (2013.01)

*C07K 16/46* (2013.01)

*C12N 15/63* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

이종다량체 단백질을 포함하는 조성물의 용도.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본원은 2010년 4월 23일자로 출원된 발명의 명칭 "이종다량체 단백질의 생산(Production of Heteromultimeric Proteins)"의 미국 가특허 출원 일련 번호 61/327,302를 우선권 주장하며, 상기 특허의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 기술 분야
- [0004] 본 발명은 이종다량체 단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0005] IgG 유형의 모노클로날 항체는 2개의 동일한 항원-결합 아암 및 불변 도메인 (Fc)을 함유한다. 결합 아암에 있어서 다양한 특이성을 갖는 항체는 통상적으로 자연에서 발생하지 않으며, 따라서 화학 공학 (예를 들어, 화학적 가교 등), 재조합 DNA 및/또는 세포-융합 기술의 도움으로 정교하게 만들어져야 한다.
- [0006] 이중특이적 항체는 2개의 상이한 항원에 동시에 결합할 수 있다. 이러한 특성은 종래의 모노클로날 항체로는 가능하지 않은 치료 전략의 개발을 가능하게 한다. 개발된 상상적인 이중특이적 항체 포맷의 큰 패널은 이들 분자에 대한 강한 관심을 반영한다. 문헌 [Berg J, Lotscher E, Steimer KS, et al., "Bispecific antibodies that mediate killing of cells infected with human immunodeficiency virus of any strain," Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88(11): 4723-4727] 및 [Fischer N and Leger O., "Biospecific Antibodies: Molecules That Enable Novel Therapeutic Strategies," Pathobiology (2007) 74:3-14]을 참조한다.
- [0007] 다중특이적 분자의 또 다른 클래스는 재조합 융합 단백질이다. 면역조절 단백질의 세포의 도메인 및 이뮤노글로불린 (Ig)의 불변 (Fc) 도메인으로 이루어진 재조합 융합 단백질은 성장하고 있는 인간 치료제의 클래스를 나타낸다. 이뮤노어드헤신은 단백질 서열의 결합 영역을 항체의 이펙터 도메인과 바람직한 특이성으로 결합시킨다. 이뮤노어드헤신은 치료제로서 그의 잠재력에 의미있는 2가지 중요한 특성을 갖는다: 표적 특이성 및 약동학 안정성 (항체의 생체내 반감기에 필적하는 생체내 반감기). 이뮤노어드헤신은 해로운 상호작용을 억제하거나 차단하기 위한 길항제, 또는 생리적 반응을 모방하거나 개선하기 위한 효능제로서 사용될 수 있다. 문헌 [Chamow SM, Zhang DZ, Tan XY, et al., "A humanized, bispecific immunoadhesin-antibody that retargets CD3+ effectors to kill HIV-1-infected cells," J Hematother 1995; 4(5): 439-446]을 참조한다.
- [0008] 다른 다중특이적 분자는 다른 곳에서 논의된 바 있다. 그 예에는 문헌 [Fisher et al., Pathobiology (2007) 74:3-14] (다양한 이중특이적 포맷의 검토); 2003년 12월 9일 허여된 미국 특허 번호 6,660,843 (Feige et al.) (캡티바디); 2002년 1월 10일 공개된 미국 특허 공보 번호 2002-004587 (다중특이적 항체); 2009년 11월 3일 허여된 미국 특허 번호 7612181 (Wu et al.) (이중 가변 도메인 포맷); 미국 특허 번호 6,534,628, 문헌 [Nord K et al., Prot Eng (1995) 8:601-608], [Nord K et al., Nat Biotech (1997) 15:772-777] 및 [Groenwall et al., Biotechnol Appl Biochem. (2008) Jun;50(Pt 2):97-112] (아피바디); 문헌 [Martens et al., Clin Cancer Res (2006), 12: 6144-6152] 및 [Jin et al., Cancer Res (2008) 68(11):4360-4368] (1 아암 항체); 문헌 [Bostrom et al., Science (2009) 323:1610-1614] (이중 작용 Fab, 일명 혼합 결합가 항체)가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 포맷은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0009] 임상 등급 물질의 제조는 상기 기재된 다중특이적 분자에 대한 과제로 남아 있다. 상기 기재된 바와 같이, 혼합 결합 아암, 즉 서로 동일하지 않은 결합 아암을 갖는 분자의 생산을 위한 여러 경로가 존재한다. 이들 방법은 각각의 결점을 갖는다.

- [0010] 화학적 가교는, 관련된 종이 동종이량체 및 다른 바람직하지 않은 부생성물로부터 정제될 필요성을 여전히 가질 수 있듯이 노동 집약적이다. 또한 화학적 변형 단계는 단백질의 완전성을 변경하여 불량한 안정성을 유발할 수 있다. 따라서, 이 방법은 종종 비능률적이며, 항체 활성의 손실로 이어질 수 있다.
- [0011] 세포-융합 기술 (예를 들어, 하이브리드 하이브리도마)은 무작위로 어셈블리되어 10가지의 항체 조합을 생성하는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 발현한다. 바람직한 이종다량체 항체는 이에 따라 생산된 항체의 단지 작은 일부이다. 바람직한 이종다량체 단백질의 정제는 극적으로 생산 수율을 감소시키고, 제조 비용을 증가시킨다.
- [0012] 재조합 DNA 기술은 Fc 도메인을 포함하지 않는 다양한 이종다량체 포맷, 예를 들어 단일 쇄 Fv, 디아바디 등을 생성하는데 사용되어 왔다. 항체 분자의 이러한 유형에 대한 주요 결점은 Fc 도메인의 결핍, 및 이에 따른 이펙터 기능 (예를 들어, 보체 활성화, Fc-수용체 결합 등)을 촉발하는 항체의 능력의 결핍이다. 따라서, 기능적 Fc 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 바람직하다.
- [0013] 재조합 DNA 기술은 또한 '노브 인투 홀(knob into hole)' 이중특이적 항체를 생성하는데 이용되어 왔다. 미국 특허 출원 20030078385 (Arathoon et al. - 제넨테크(Genentech))를 참조한다. 이러한 전략의 한가지 제약은 2개의 모 항체의 경쇄가, 동일한 세포에서 발현되어 바람직하지 않고/거나 불활성인 분자를 형성하는 것 및 쌍을 이루지 못하는 것을 방지하기 위해 동일해야 한다는 것이다.
- [0014] 따라서, 이종다량체 단백질을 생산하는 대안적 방법에 대한 필요성이 남아있다. 본원에 기재된 본 발명은 이러한 방법을 제공한다. 본 발명의 이들 및 다른 측면, 및 이점은 본원에 제공된 발명의 설명으로부터 명백할 것이다.

### 발명의 내용

- [0015] 현재의 기술을 이용하여 이종다량체 단백질, 예를 들어 다중특이적 항체를 제조하는 것은 무엇보다도 생성물의 혼합물의 생산, 수율의 감소 및 이펙터 기능의 감소/제거를 비롯한 결점을 갖는다. 따라서, 효율적으로 및 높은 수준으로 이종다량체 단백질을 생산하는 것이 바람직하다.
- [0016] 다양한 수단에 의한 항체 분자의 생산은 일반적으로 널리 이해되어 있다. 미국 특허 6331415 (Cabilly et al.)에는, 예를 들어 중쇄 및 경쇄가 단세포에서 단일 벡터로부터 또는 2개의 별개의 벡터로부터 동시에 발현되는 이뮤노글로불린의 재조합 생산 방법이 기재되어 있다. 문헌 [Wibbenmeyer et al., 1999, Biochim Biophys Acta 1430(2): 191-202] 및 [Lee and Kwak, 2003, J. Biotechnology 101 :189-198]에는 이. 콜라이(E. coli)의 별개의 배양물에서 발현된 플라스미드를 사용한, 개별적으로 생산된 중쇄 및 경쇄로부터의 모노클로날 항체의 생산이 기재되어 있다. 항체의 생산과 관련된 다양한 다른 기술이, 예를 들어 문헌 [Harlow, et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)] 및 WO2006028936에 기재되어 있다. 그러나, 이들 각각은 낮은 수율, 화학물질의 사용과 같은 결점을 갖는다.
- [0017] 본 발명의 방법은 환원제의 첨가 없이, 별개의 숙주 세포에서 각각의 성분, 예를 들어 항체, 힌지-함유 이종다량체 단백질의 1 아암을 발현시키는 방법, 및 힌지-함유 이종다량체 단백질, 예를 들어 다중특이적 항체의 어셈블리 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 이종다량체 단백질, 예를 들어 다중특이적 항체의 경제적인 생산을 가능하게 하는 용이하고 효율적인 생산 공정/방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 종래 방법의 한계를 극복한, 다중특이적 이뮤노글로불린 복합체 (예를 들어, 다중특이적 항체) 및 다른 다량체 단백질 (본원에서 집합적으로 이종다량체 단백질로 지칭함)의 효율적인 신규 생산 방법을 제공한다. 이종다량체 단백질, 예컨대 이중특이적 항체는 본 발명의 방법에 따라 고도로 균질한 이종다량체 폴리펩티드로서 제공될 수 있다. 또한, 본원에 제공된 방법은 이종다량체 단백질 내에서 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개의 쇄간 디설피드 결합의 형성을 달성하기 위하여 환원제의 첨가에 의지하지 않는다.
- [0020] 제1 측면에서, 본원에 기재된 방법은,
- [0021] (a) 힌지-함유 폴리펩티드가 발현되는 조건 하에 제1 힌지-함유 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산을 포함하는 제1 숙주 세포를 배양하는 단계;
- [0022] (b) 힌지-함유 폴리펩티드가 발현되는 조건 하에 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 숙주 세포를 배양하는 단계;



- [0023] (c) 단일 현탁액으로 함께 조합된 제1 및 제2 숙주 세포의 세포 막을 파괴하는 단계; 및
- [0024] (d) 이중다량체 단백질을 회수하는 단계
- [0025] 를 포함하며, 환원제의 첨가를 필요로 하지 않는,
- [0026] 제1 이중이량체화 도메인을 갖는 제1 힌지-함유 폴리펩티드 및 제2 이중이량체화 도메인을 갖는 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제2 이중이량체화 도메인은 제1 이중이량체화 도메인과 상호작용하고, 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 하나 이상의 쇠간 디설피드 결합에 의해 연결되는 것인 이중다량체 단백질의 제조를 가능하게 한다.
- [0027] 제2 측면에서,
- [0028] (a) 제1 이중이량체화 도메인을 갖는 정제된 제1 힌지-함유 폴리펩티드를 제공하는 단계;
- [0029] (b) 제2 이중이량체화 도메인을 갖는 정제된 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 제공하는 단계;
- [0030] (c) 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 조합하는 단계;
- [0031] (d) 단리된 폴리펩티드의 다량체화를 허용하는 조건 하에 시험관내에서 제1 힌지-함유 폴리펩티드와 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 리폴딩하는 단계; 및
- [0032] (e) 이중다량체 단백질 복합체를 회수하는 단계
- [0033] 를 포함하는,
- [0034] 제1 이중이량체화 도메인을 갖는 제1 힌지-함유 폴리펩티드 및 제2 이중이량체화 도메인을 갖는 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제2 이중이량체화 도메인은 제1 이중이량체화 도메인과 상호작용하고, 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 하나 이상의 쇠간 디설피드 결합에 의해 연결되는 것인 이중다량체 단백질의 제조 방법이 제공된다.
- [0035] 제3 측면에서, 본원에 제공된 방법은, 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 제1 쌍 및 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 제2 쌍을 폴리펩티드의 제1 및 제2 쌍의 다량체화를 허용하는 조건 하에 인큐베이션하여 실질적으로 균질한 항체의 집단을 형성하는 것을 포함하며, 여기서 상기 조건은 환원제의 첨가를 포함하지 않고; 폴리펩티드의 제1 쌍은 제1 표적에 결합할 수 있고; 폴리펩티드의 제2 쌍은 제2 표적 분자에 결합할 수 있고; 제1 중쇄 폴리펩티드의 Fc 폴리펩티드 및 제2 중쇄 폴리펩티드의 Fc 폴리펩티드는 인터페이스에서 만나고; 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스는 제1 Fc 폴리펩티드의 인터페이스에서의 함몰부에 위치할 수 있는 돌출부를 포함하는 것인, 이중다량체 단백질 제조 방법에 관한 것이다.
- [0036] 제4 측면에서,
- [0037] (a) 제1 숙주 세포 및 2종 이상의 추가의 숙주 세포 (여기서,
- [0038] a. 상기 제1 숙주 세포는 제1 이중이량체화 도메인-함유 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산을 포함하고;
- [0039] b. 상기 추가의 숙주 세포는 제2 이중이량체화 도메인-함유 폴리펩티드를 포함하는 핵산을 포함함)를 배양하는 단계;
- [0040] (b) 제1 숙주 세포 및 2종 이상의 추가의 숙주 세포를 조합하는 단계;
- [0041] (c) 제1 및 제2 이중이량체화 도메인-함유 폴리펩티드가 세포외 환경으로 방출되도록 세포를 처리하는 단계; 및
- [0042] (d) 이중다량체 단백질을 회수하는 단계
- [0043] 를 포함하며, 환원제의 첨가를 필요로 하지 않는,
- [0044] 제1 이중이량체화 도메인을 갖는 제1 힌지-함유 폴리펩티드 및 제2 이중이량체화 도메인을 갖는 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제2 이중이량체화 도메인은 제1 이중이량체화 도메인과 상호작용하고, 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 하나 이상의 쇠간 디설피드 결합에 의해 연결되는 것인 조합 이중다량체 단백질 라이브러리의 생성 방법이 제공된다.
- [0045] 제5 측면에서, 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 이중다량체 단백질이 제공된다.
- [0046] 본 발명의 방법이 일반적으로 본원에 기재된 본 발명의 방법에 포함되는 공정을 개시하고/거나 완료하는데 명백

한 일상적 단계인 다른 단계를 포함할 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 방법의 단계 (a)에 앞서 제1 힌지-함유 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 제1 숙주 세포에 도입하고 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 제2 숙주 세포에 도입하는 단계가 선행한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 2개 이상의 별개의 표적에 결합 특이성을 갖는 이종다량체 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드의 약 10%, 15% 또는 20% 이하가 이종다량체 단백질의 정제 단계 이전에 단량체 또는 중쇄-경쇄 이량체로서 존재한다.

[0047] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 항체 중쇄이다. 추가 실시양태에서, 항체 중쇄는 항체 경쇄와 쌍을 이루어 중쇄-경쇄 쌍을 제공한다. 일부 실시양태에서, 중쇄-경쇄 쌍은 공유적으로 연결된다. 또 다른 실시양태에서, 중쇄-경쇄 쌍은 표적 결합 아암을 규정한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 아암은 동일하다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 아암은 각각 2개의 별개의 표적을 인식한다.

[0048] 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 Fc 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서 제1 및/또는 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 하나 이상의 불변 중쇄 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 가변 중쇄 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 수용체 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 실질적으로 동일하다 (즉, 이종이량체화 도메인은 동일한 이종이량체화 도메인의 외부 영역과 동일할 수 없음). 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 동일하지 않다.

[0049] 일부 실시양태에서, 이종다량체 단백질은 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 1-아암 항체, 단일특이적 1가 항체, 다중특이적 1가 항체, 이중특이적 맥시바디, 모노바디, 이뮤노어드레신, 펩티바디, 이중특이적 펩티바디, 1가 펩티바디, 아피바디 및 수용체 융합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0050] 일부 실시양태에서, 상기 이종다량체 단백질은 정상적으로 중쇄간 디설피드 연결을 형성할 수 있는, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 총 개수 이하의 임의의 정수 개수의 시스테인 잔기를 갖는 힌지 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 시스테인은 힌지 영역 내로 도입된다.

[0051] 본 발명의 이종다량체 단백질은 그것이 이뮤노글로불린의 힌지 영역을 포함하는 한, 또한 항체 단편, 예컨대, 예를 들어 Fc 또는 Fc 융합 폴리펩티드일 수 있다. Fc 융합 폴리펩티드는 일반적으로 이종 폴리펩티드 서열 (예컨대 항원 결합 도메인)에 융합된 Fc 폴리펩티드 (또는 그의 단편), 예컨대 이뮤노글로불린 Fc 폴리펩티드에 융합된 수용체 세포의 도메인 (ECD) (예를 들어, IgG2 Fc에 융합된 Flt 수용체 ECD)을 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, Fc 융합 폴리펩티드는 flt, flk 등을 포함하는 VEGF 수용체일 수 있는 VEGF 결합 도메인을 포함한다. 본 발명의 이종다량체 단백질은 일반적으로 중쇄 불변 도메인 및 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 중쇄간 이량체화 또는 다량체화의 형성을 위한 변형 (예를 들어, 비제한적으로, 예를 들어 이량체화 서열 예컨대 류신 지퍼를 형성하기 위한 하나 이상의 아미노산의 삽입)을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 폴리펩티드의 일부 (전부는 아님)는, 이뮤노글로불린의 힌지 영역을 보유하는 한 본 발명의 이종다량체에서 결손된다. 이러한 실시양태의 일부에서, Fc 폴리펩티드의 결손 서열은 일부의 또는 모든 C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 도메인이다. 이러한 실시양태의 일부에서, 이종다량체 단백질은, 예를 들어 중쇄 단편의 C-말단에 융합된 이량체화 도메인 (예컨대 류신 지퍼 서열)을 포함한다. 이러한 실시양태의 일부에서, 이종다량체 단백질은 "노브 인투 홀" 이량체화 도메인 (하기 추가로 정의된 바와 같음)을 제공하는 돌연변이를 포함하는 이량체화 도메인을 포함한다.

[0052] 본 발명의 방법 및 이종다량체 단백질의 일부 실시양태에서, 힌지-함유 폴리펩티드는 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드 (예를 들어, 중쇄의 Fc 폴리펩티드 사이)의 동종이량체화를 최소화하면서 이종이량체화를 촉진하는 하나 이상의 특성을 포함한다. 이러한 특성(들)은 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 이종다량체 단백질 집단의 수율 및/또는 순도 및/또는 균질성을 개선한다. 한 실시양태에서, 제1 힌지-함유 폴리펩티드 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드의 Fc 폴리펩티드는 인터페이스에서 만난다/상호작용한다. 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드의 Fc 폴리펩티드가 인터페이스에서 만나는 일부 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스는 제1 Fc 폴리펩티드의 인터페이스에서의 함몰부에 위치할 수 있는 돌출부를 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드가 함몰부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 제2 Fc 폴리펩티드가 돌출부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 둘 다이다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드가 함몰부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 제2 Fc 폴리펩티드가 돌출부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 둘 다이다. 한 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스는 제1 Fc 폴리펩티드의 인터페이스에서의 함몰부에 위치할 수 있는 돌출부를 포함하고, 여기서 함몰

부 또는 돌출부 또는 둘 다는 각각 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스로 도입된다. 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 인터페이스에서 만나는 일부 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드의 인터페이스는 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스에서의 함몰부에 위치할 수 있는 돌출부를 포함한다. 한 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드가 함몰부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 제1 Fc 폴리펩티드가 돌출부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 둘 다이다. 한 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드가 함몰부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되고, 제1 Fc 폴리펩티드가 돌출부를 코딩하도록 주형/본래 폴리펩티드로부터 변경되거나 또는 둘 다이다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드의 인터페이스는 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스에서의 함몰부에 위치할 수 있는 돌출부를 포함하고, 여기서 돌출부 또는 함몰부 또는 둘 다는 각각 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 인터페이스로 도입된다.

[0053] 한 실시양태에서, 돌출부 및 함몰부는 각각 자연 발생 아미노산 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 주형/본래 폴리펩티드의 인터페이스로부터의 본래 잔기를 본래 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 유입 잔기로 대체하여 생성된다. 한 실시양태에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드의 인터페이스로부터의 본래 잔기를 코딩하는 핵산을 본래보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 유입 잔기를 코딩하는 핵산으로 대체하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된다. 한 실시양태에서, 본래 잔기는 트레오닌이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 아르기닌 (R)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 페닐알라닌 (F)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 티로신 (Y)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 트립토판 (W)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 R, F, Y 또는 W이다. 한 실시양태에서, 돌출부는 주형/본래 폴리펩티드에서 2개 이상의 잔기를 대체하여 생성된다. 한 실시양태에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 366에서 트레오닌의 트립토판으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 문헌 [Kabat et al. (pp. 688-696 in Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Vol. 1 (1991; NIH, Bethesda, MD))]의 EU 넘버링 방식에 따름).

[0054] 일부 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 주형/본래 폴리펩티드의 인터페이스에서의 본래 잔기를 본래 잔기보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 유입 잔기로 대체하여 생성된다. 예를 들어, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드의 인터페이스로부터의 본래 잔기를 코딩하는 핵산을 본래보다 더 작은 측쇄 부피를 갖는 유입 잔기를 코딩하는 핵산으로 대체하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다. 한 실시양태에서, 본래 잔기는 트레오닌이다. 한 실시양태에서, 본래 잔기를 류신이다. 한 실시양태에서, 본래 잔기를 티로신이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 시스테인 (C)이 아니다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 알라닌 (A)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 세린 (S)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 트레오닌 (T)이다. 한 실시양태에서, 유입 잔기는 발린 (V)이다. 함몰부는 주형/본래 폴리펩티드의 하나 이상의 본래 잔기를 대체하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 트레오닌, 류신 및 티로신으로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 본래 아미노산의 대체를 포함한다. 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 알라닌, 세린, 트레오닌 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 유입 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 트레오닌, 류신 및 티로신으로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 본래 아미노산의 대체를 포함하고, 여기서 상기 본래 아미노산은 알라닌, 세린, 트레오닌 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 유입 잔기로 대체된다. 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 366에서 트레오닌의 세린으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 상기 문헌 [Kabat et al.]의 EU 넘버링 방식에 따름). 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 368에서 류신의 알라닌으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 상기 문헌 [Kabat et al.]의 EU 넘버링 방식에 따름). 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 407에서 티로신의 발린으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 상기 문헌 [Kabat et al.]의 EU 넘버링 방식에 따름). 한 실시양태에서, 함몰부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 T366S, L368A 및 Y407V로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 아미노산 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 상기 문헌 [Kabat et al.]의 EU 넘버링 방식에 따름). 이들 항체 단편의 일부 실시양태에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩티드는 위치 366에서 트레오닌의 트립토판으로의 대체를 포함한다 (아미노산 넘버링은 상기 문헌 [Kabat et al.]의 EU 넘버링 방식에 따름).

[0055] 다양한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 폴리펩티드의 Fc 폴리펩티드는 동일할 수 있거나, 또는 동일하지 않을 수 있고, 단 이들은 Fc 영역 (본원에 정의된 바와 같음)을 형성하기 위해 이량체화될 수 있다. 제 1 Fc 폴리펩티드 (예를 들어 힌지, 불변 및/또는 가변 도메인 서열을 가짐)는 일반적으로 단일 폴리펩티드에 있는 이뮤노글로불린 중쇄의 하나 이상의 도메인에 인접하게 연결된다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드는 적어도 일부 (전체 포함)의 힌지 서열, 적어도 일부 (전체 포함)의 C<sub>H</sub>2 도메인 및/또는 적어도 일부 (전체 포함)의 C<sub>H</sub>3 도

메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드는 이뮤노글로불린의 힌지 서열 및 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드는 힌지 서열의 적어도 일부 (전체 포함), C<sub>H</sub>2 도메인의 적어도 일부 (전체 포함) 및/또는 C<sub>H</sub>3 도메인의 적어도 일부 (전체 포함)를 포함한다. 한 실시양태에서, 제2 Fc 폴리펩티드는 이뮤노글로불린의 힌지 서열 및 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 각각 적어도 일부의 하나 이상의 항체 불변 도메인을 포함하는 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 불변 도메인은 C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 도메인이다. 불변 도메인을 포함하는 본 발명의 항체의 임의의 실시양태에서, 항체 불변 도메인은 임의의 이뮤노글로불린 클래스, 예를 들어 IgG로부터의 것일 수 있다. 이뮤노글로불린 공급원은 원래의 (예를 들어, IgG는 인간 IgG<sub>1</sub>일 수 있음) 또는 합성 형태의 임의의 적합한 종의 것일 수 있다.

[0056] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체의 각각의 제1 및 제2 표적 분자 결합 아암의 제1 경쇄 폴리펩티드 및 제2 경쇄 폴리펩티드는 상이한/별개의 항원 결합 결정인자 (예를 들어, 상이한/별개의 가변 도메인 서열)을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체의 각각의 제1 및 제2 표적 분자 결합 아암의 제1 경쇄 폴리펩티드 및 제2 경쇄 폴리펩티드는 동일한 (즉, 공통의) 항원 결합 결정인자, 예를 들어 동일한 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0057] 본 발명의 방법은 높은 균질성으로 이종다량체 분자를 생성할 수 있다. 따라서, 본 발명은 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 폴리펩티드가 제1 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 쌍 및 제2 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 쌍을 포함하는 복합체로 존재하는 것인 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 약 60 내지 99%, 70 내지 98%, 75 내지 97%, 80 내지 96%, 85 내지 96%, 또는 90 내지 95%의 폴리펩티드가 제1 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 쌍 및 제2 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 쌍을 포함하는 복합체로 존재하는 것인 방법을 제공한다.

[0058] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 IgG, IgE, IgA, IgM 및 IgD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체의 힌지 영역은 바람직하게는 IgG, IgA 및 IgD로 이루어진 군으로부터 선택된 이뮤노글로불린의 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체의 힌지 영역은 IgG의 것이고, 일부 실시양태에서 이는 IgG1 또는 IgG2 (예를 들어, IgG2a 또는 IgG2b)이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 IgG, IgA 및 IgD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 항체는 인간, 인간화, 키메라 또는 비-인간 (예를 들어, 무린) 기원의 것이다.

[0059] 본 발명의 이종다량체 단백질은 일반적으로 항원에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 항원은 예를 들어 종양 항원, 세포 생존 조절 인자, 세포 증식 조절 인자, 조직 발생 또는 분화와 연관된 (예를 들어, 그에 기능적으로 기여하는 것으로 공지되어 있거나 의심되는) 분자, 세포 표면 분자, 림포카인, 시토카인, 세포 주기 조절에 관여하는 분자, 혈관형성에 관여하는 분자 및 혈관신생과 연관된 (예를 들어, 그에 기능적으로 기여하는 것으로 공지되어 있거나 의심되는) 분자를 포함한다. 본 발명의 이종다량체 단백질이 결합할 수 있는 항원은 상기 언급된 카테고리 중 하나의 하위세트의 구성원일 수 있으며, 여기서 상기 카테고리의 다른 하위세트(들)는 (관심 항원에 관하여) 별개의 특성을 갖는 다른 분자/항원을 포함한다. 관심 항원은 또한 둘 이상의 카테고리에 속하는 것으로 여겨질 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 세포 표면 분자가 아닌 종양 항원에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 이종다량체 단백질을 제공한다. 한 실시양태에서, 종양 항원은 세포 표면 분자, 예컨대 수용체 폴리펩티드이다. 또 다른 예에서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 클러스터 분화 인자가 아닌 종양 항원에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합한다. 또 다른 예에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 클러스터 분화 인자에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합할 수 있고, 일부 실시양태에서 이는 예를 들어 CD3 또는 CD4가 아니다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 항-VEGF 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 IL-1알파/IL-1베타, IL-12/IL-18; IL-13/IL-9; IL-13/IL-4; IL-13/IL-5; IL-5/IL-4; IL-13/IL-1베타; IL-13/IL-25; IL-13/TARC; IL-13/MDC; IL-13/MEF; IL-13/TGF-β; IL-13/LHR 효능제; IL-12/TWEAK, IL-13/CL25; IL-13/SPRR2a; IL-13/SPRR2b; IL-13/ADAM8, IL-13/PED2, IL17A/IL17F, CD3/CD19, CD138/CD20; CD138/CD40; CD19/CD20; CD20/CD3; CD38/CD138; CD38/CD20; CD38/CD40; CD40/CD20; CD-8/IL-6; CD20/BR3, TNF알파/TGF-베타, TNF알파/IL-1베타; TNF알파/IL-2, TNF 알파/IL-3, TNF알파/IL-4, TNF알파/IL-5, TNF알파/IL6, TNF알파/IL8, TNF알파/IL-9, TNF알파/IL-10, TNF알파/IL-11, TNF알파/IL-12, TNF알파/IL-13, TNF알파/IL-14, TNF알파/IL-15, TNF알파/IL-16, TNF알파/IL-17, TNF알파/IL-18, TNF알파/IL-19, TNF알파/IL-20, TNF알파/IL-23, TNF알파/IFN알파, TNF알파/CD4, TNF알파/VEGF, TNF알파/MIF, TNF알파/ICAM-1, TNF알파/PGE4, TNF알파/PEG2, TNF알파/RANK 리간드, TNF알파/Te38; TNF알파/BAFF; TNF알파/CD22; TNF알파/CTLA-4; TNF알파/GP130; TNF α /IL-12p40; VEGF/HER2, VEGF-A/HER2, VEGF-



A/PDGF, HER1/HER2, VEGF-A/VEGF-C, VEGF-C/VEGF-D, HER2/DR5, VEGF/IL-8, VEGF/MET, VEGFR/MET 수용체, VEGFR/EGFR, HER2/CD64, HER2/CD3, HER2/CD16, HER2/HER3; EGFR/HER2, EGFR/HER3, EGFR/HER4, IL-13/CD40L, IL4/CD40L, TNFR1/IL-1R, TNFR1/IL-6R, TNFR1/IL-18R, EpCAM/CD3, MAPG/CD28, EGFR/CD64, CSPGs/RGM A; CTLA-4/BTN02; IGF1/IGF2; IGF1/2/Erb2B; MAG/RGM A; NgR/RGM A; NogoA/RGM A; OMGP/RGM A; PDL-I/CTLA-4; 및 RGM A/RGM B, IL1 $\beta$ /IL18, NRP1/VEGFA, VEGFA/NRP2, cMET/EGFR, ALK1/BMP9, VEGFA/ $\alpha$ 5 $\beta$ 1, HER1/HER3-BU 및 CMV로 이루어진 군으로부터 선택된 이중특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 이중다량체 단백질은  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, ALK1, BMP9, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TARC, MDC, MEF, TGF- $\beta$ , LHR 효능제, TWEAK, CL25, SPRR2a, SPRR2b, ADAM8, PED2, CD3, CD4, CD16, CD19, CD20, CD22, CD28, CD40, CD38, CD64, CD138, CD-8, BR3, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-19, IL-20, IL-23, IL-25, IFN $\alpha$ , MIF, ICAM-1, PGE4, PEG2, RANK 리간드, Te38, BAFF, CTLA-4, GP130, IL-12p40, VEGF, VEGF-A, PDGF, HER1, HER2, HER3, HER3-BU, HER4, VEGF-C, VEGF-D, DR5, cMET, MET, MET 수용체, VEGFR, EGFR, CD40L, TNFR1, IL-1R, IL-6R, IL-18R, EpCAM, MAPG, CSPGs, BTN02, IGF1, IGF2, IGF1/2, Erb2B, MAG, NgR, NogoA, NRP1, NRP2, OMGP, PDL-I, RGM A 및 RGM B로 이루어진 군으로부터 선택된 2종 이상의 표적 분자에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 이중다량체 단백질은 CD3, 및 BLR1, BR3, CD19, CD20, CD22, CD72, CD79A, CD79B, CD180 (RP105), CR2, FcRH1, FcRH2, FcRH5, FCER2, FCRL4, HLA-DOB, 및 NAG14로부터 선택된 하나 이상의 추가의 표적 분자에 결합한다.

[0060] 본 발명의 방법의 제1 및 제2 숙주 세포는 관심 폴리펩티드의 발현 및 단리를 허용하는 임의의 환경에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 방법의 제1 숙주 세포 및 제2 숙주 세포는 별개의 세포 배양 물로서 성장한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법의 제1 숙주 세포 및 제2 숙주 세포는 숙주 세포를 둘 다 포함하는 혼합 배양물로서 성장한다.

[0061] 일부 실시양태에서, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 그 초과와 추가적인, 힌지-함유 폴리펩티드 발현 숙주 세포는 제1 및/또는 제2 힌지-함유 숙주 세포와 동일한 또는 별개의 배양물에서 성장할 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 힌지-함유 폴리펩티드(들)는 제1 힌지-함유 폴리펩티드와 동일한 이중이량체화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 힌지-함유 폴리펩티드(들)는 제2 힌지-함유 폴리펩티드와 동일한 이중이량체화 도메인을 포함한다.

[0062] 이중다량체 단백질은 추가의 바람직한 특성을 개선하고/거나 추가하기 위해 변형될 수 있다. 이러한 특성은 생물학적 기능, 예컨대 면역 이펙터 기능, 바람직한 생체내 반감기/청소율, 생체이용률, 생체분포 또는 다른 약동학 특성을 포함한다. 이러한 변형은 당업계에 널리 공지되어 있고, 또한 실험적으로 결정될 수 있고, 펩티드-기반일 수 있거나 아닐 수 있는 모이어티에 의한 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체는 일반적으로 숙주 세포의 성질에 적어도 부분적으로 의존하여 글리코실화되거나 또는 비-글리코실화될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 비-글리코실화된다. 본 발명의 방법에 의해 생산된 비-글리코실화 항체는, 예를 들어 당업계에 널리 공지된 시험관내 글리코실화 방법을 이용하여 후속적으로 글리코실화될 수 있다. 상기 및 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 이중다량체 단백질은 원핵 세포, 예컨대 예를 들어 이. 콜라이에서 생산될 수 있다. 이. 콜라이-생산 이중다량체 단백질은 일반적으로 비-글리코실화되고, 포유동물 숙주 세포 (예를 들어, CHO) 생산 이중다량체 단백질에서 발견되는 글리코실화 프로파일과 정상적으로 연관된 생물학적 기능이 결핍된다.

[0063] 본 발명은 또한 이중 모이어티와 접합된 본 발명의 이중다량체 단백질을 포함하는 면역접합체를 제공한다. 임의의 이중 모이어티가, 항체에 대한 그의 접합이 후속적으로 항체의 바람직한 기능 및/또는 특성을 감소시키지 않는 한, 적합할 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 면역접합체는 세포독성제인 이중 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 세포독성제는 방사성 동위원소, 화학요법제 및 독소로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 독소는 칼리케미신, 메이탄신 및 트리코텐으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 면역접합체는 검출가능한 마커인 이중 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 검출가능한 마커는 방사성 동위원소, 리간드-수용체 쌍의 구성원, 효소-기질 쌍의 구성원 및 형광 공명 에너지 전달 쌍의 구성원으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0064] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 이중다량체 단백질 및 담체를 포함하는 조성물을 제공하고, 일부 실시양태에서 상기 담체는 제약상 허용되는 것이다.

[0065] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역접합체 및 담체를 포함하는 조성물을 제공하고, 일부 실시양태에서 상기 담체는 제약상 허용되는 것이다.

[0066] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 다중특이적 이중다량체 단백질의 집단을 포함하는 조성물을 제공한다. 당업

자에 명백하듯이, 일반적으로 그러한 조성물은 완전히 (즉, 100%) 균질하지는 않을 것이다. 그러나, 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 방법은 다중특이적 이종다량체 단백질의 실질적으로 균질한 집단을 생산할 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 이종다량체 단백질을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 상기 이종다량체 단백질의 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%가 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 다중특이적 항체 (예를 들어, 이종특이적 항체 등)이다.

[0067] 한 측면에서, 본 발명은 제1 숙주 세포 및 제2 숙주 세포의 혼합물을 포함하는 세포 배양물을 제공하며, 여기서 제1 숙주 세포는 제1 힌지-함유 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하고, 제2 숙주 세포는 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하고, 이들 두 쌍은 상이한 표적 결합 특이성을 갖는다. 한 측면에서, 본 발명은 제1 숙주 세포 및 제2 숙주 세포의 혼합물을 포함하는 세포 배양물을 제공하며, 여기서 제1 숙주 세포는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 제1 쌍을 발현하고, 제2 숙주 세포는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 제2 쌍을 발현하고, 이들 두 쌍은 상이한 표적 결합 특이성을 갖는다.

[0068] 또 다른 측면에서, 본 발명은 용기 및 그 안에 수용된 조성물을 포함하는 제조품을 제공하며, 여기서 조성물은 본 발명의 이종다량체 단백질 (예를 들어, 항체)을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 용기 및 그 안에 수용된 조성물을 포함하는 제조품을 제공하며, 여기서 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 면역접합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 제조품은 상기 조성물의 사용에 대한 지침서를 추가로 포함한다.

[0069] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 이종다량체 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역접합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0070] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 분자 (예를 들어, 항체)를 발현시키기 위한 재조합 벡터를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 면역접합체를 발현시키기 위한 재조합 벡터를 제공한다.

[0071] 임의의 수많은 숙주 세포가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 이러한 세포는 당업계에 공지되어 있거나 (이 중 일부는 본원에 기재되어 있음), 당업계에 공지되어 있는 상용 기법을 이용하여 본 발명의 방법에 사용하기 위한 적합성에 대하여 실험적으로 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 그람-음성 박테리아 세포이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 이. 콜라이이다. 일부 실시양태에서, 이. 콜라이는 지단백질 결핍 ( $\Delta lpp$ ) 균주의 것이다. 일부 실시양태에서, 이. 콜라이 숙주 세포의 유전자형은 *degP* 및 *prc* 유전자가 결핍되고, 돌연변이체 *spr* 유전자를 보유한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포, 예를 들어 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다.

[0072] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포, 예를 들어 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 그람-음성 박테리아 세포이고, 일부 실시양태에서 이는 이. 콜라이이다. 본 발명의 숙주 세포는 폴리뉴클레오티드 또는 재조합 벡터 코딩 분자를 추가로 포함할 수 있으며, 숙주 세포에서의 그의 발현은 본 발명의 방법에서의 이종다량체 단백질의 수율을 개선한다. 예를 들어, 이러한 분자는 사페론 단백질일 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 분자는 *DsbA*, *DsbC*, *DsbG* 및 *FkpA*로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 재조합 벡터는 *DsbA* 및 *DsbC*를 둘 다 코딩한다. 일부 실시양태에서, 이. 콜라이 숙주 세포는 내인성 프로테아제 활성 결핍 균주의 것이다. 일부 실시양태에서, 이. 콜라이 숙주 세포의 유전자형은 *degP* 및 *prc* 유전자가 결핍되고 돌연변이체 *spr* 유전자를 보유하는 이. 콜라이 균주의 것이다. 일부 실시양태에서, 이. 콜라이 숙주 세포의 유전자형은  $\Delta lpp$ 이다.

[0073] 본 발명의 이종다량체 단백질은 다양한 환경에서의 다양한 용도를 갖는다. 한 예에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 치료 항체이다. 또 다른 예에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 효능제 항체이다. 또 다른 예에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 길항작용 항체이다. 본 발명의 이종다량체 단백질은 또한 진단 항체일 수 있다. 또 다른 예에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 차단 항체이다. 또 다른 예에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 중화 항체이다.

[0074] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 이종다량체 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 질환을 치료하거나 지연시키는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 질환은 암이다. 또 다른 실시양태에서, 질환은 혈관신생의 조절이상과 연관된다. 또 다른 실시양태에서, 질환은 면역 장애, 예컨대 류마티스 관절염, 면역 혈소판감소성 자반증, 전신 홍반성 루푸스 등이다.

[0075] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대 자가면역) 장애 및/또는 혈관

신생-관련 장애의 치유적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에서의 본 발명의 이종다량체 단백질 (예를 들어, 항체)의 용도를 제공한다.

[0076] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애의 치유적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에서의 본 발명의 핵산의 용도를 제공한다.

[0077] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애의 치유적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에서의 본 발명의 발현 벡터의 용도를 제공한다.

[0078] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애의 치유적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에서의 본 발명의 숙주 세포의 용도를 제공한다.

[0079] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애의 치유적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에서의 본 발명의 제조품의 용도를 제공한다.

[0080] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애의 치유적 및/또는 예방적 치료를 위한 의약의 제조에서의 본 발명의 키트의 용도를 제공한다.

[0081] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 하기 상세한 설명으로부터 명백해 질 것이다. 그러나, 상세한 설명과 구체적인 실시예가 본 발명의 바람직한 실시양태를 표시하긴 하지만, 단지 예시로 제공된다는 것을 이해해야 하는데, 이는 본 발명의 범주 및 취지 내의 각종 변화 및 변형이 본 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이기 때문이다.

### 도면의 간단한 설명

[0082] 도 1a는 완전히 산화된 반-항체를 도시한다. "노브" 또는 "홀" 또는 다른 이종이량체화 도메인은 나타내지 않았다. 본 도면에 도시된 반-항체는 IgG1 이소형이다. 당업자는 다른 이뮤노글로불린 이소형이 상응하는 쇠간 및 쇠내 결합을 갖는 반-항체로서 계획될 수 있음을 인식할 것이다. 무손상 Ab에서, 힌지 시스테인은 쇠간 디설피드 결합을 형성할 것이다.

도 1b는 전장 이중특이적 항체를 도시한다. 힌지 영역의 중쇄간 디설피드 결합은 도시하지 않았다.

도 2a 및 b는 각각 노브 및 홀 반-항체를 코딩하는 플라스미드를 도시한다.

도 3a는 공통 경쇄 방법을 이용하는 이종다량체 단백질, 예를 들어 이중특이적 항체의 생산을 도시한다. 생산된 BsAb는 공통 경쇄와 각각 쌍을 이룬 2개의 상이한 중쇄를 갖는다.

도 3b는 개별적으로 조작되고 발현된 반-항체를 사용하는 이종다량체 단백질, 예를 들어 이중특이적 항체의 생산을 도시한다. 생산된 BsAb는 전형적으로 각각 그의 동족 경쇄와 쌍을 이룬 2개의 상이한 중쇄를 갖는다. 이 방법에서, 각각의 경쇄가 각각의 반-항체에 대해 반드시 동일한 것은 아니다.

도 4a는 개별적으로 조작되고 발현된 반-항체를 사용하는 이중특이적 항체의 생산에 대한 흐름도이다. 이 방법에서, 산화환원 화학이 이용된다.

도 4b는 쿠마시 염색된 겔을 보여준다. 2개의 반-항체를 SDS-PAGE에 의해 환원 및 비-환원 조건 하에 분석하였다. 우세한 분획은 비-환원 조건 하에서의 각각의 반-항체에 대한 75kD 경쇄-중쇄 쌍이다. 환원 조건 (예를 들어, DTT로의 처리) 하에, 각각의 쇠는 별개의 밴드로서 나타난다.

도 4c는 1 mM N-에틸말레이미드 (NEM) 처리 및 비처리 반-항체의 ESI-TOF 질량 분광측정법의 결과를 보여준다. NEM으로의 처리시 반-항체의 질량에서의 변화가 없었으며, 이는 모든 시스테인이 완전히 산화되었음을 나타낸다. 산화된 힌지 시스테인은 도시된 아미노산 서열에서 시클릭 디설피드로서 표시된다. 반-항체에 대한 예상 질량은 질량 분광측정법에 의해 관찰된 값으로 72,548 달톤이며, 이는 어떠한 공유적 부가물도 없음을 나타낸다.

도 4d는 항-EGFR/항-c-met 이중특이적 항체의 생산에 대한 카르복시메틸 (CM) 크로마토그램, SDS-PAGE 겔의 사진 및 디컨볼루션된 질량을 보여준다. CM 크로마토그래피는 단일 피크를 생성하였고, 이를 후속적으로 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 겔의 주 밴드는 전장 (즉, 무손상) 이중특이적 항체이다. 부 밴드가 또한 75kD 범위



에서 보일 수 있다. 주 밴드를 후속적으로 질량 분광측정법에 의해 분석하였고, 검출가능한 무손상 항체 생성물만이 항-EGFR/항-c-met 이중특이적 항체의 이론적 MW와 동义的 것으로 나타났다.

도 5a는 개별적으로 조작되고 발현된 반-항체를 사용하는 이중특이적 항체의 대규모 생산에 대한 흐름도이다.

도 5b는 정제된 반-항체가 비-환원 조건 하에 대부분 약 75 kD 중이었음을 보여주는 겔의 사진이다. 환원 조건 (예를 들어, DTT로의 처리) 하에, 각각의쇄는 별개의 밴드로서 나타난다.

도 5c는 응집체 제거 후의, 정제된 이중특이적 항체의 SDS-PAGE 분석의 결과를 보여주며, 이는 주 종이 150 kD에서의 무손상 이중특이적 항체임을 나타낸다. 환원 조건 하에서의 동일한 샘플을 또한 보여주며, 이는 모든 단리된 생성물이 경쇄 또는 중쇄 항체임을 나타낸다.

도 6a는 시토카인 IL-4 및 IL-13의 중화를 시험하는 TF-2 세포 증식 검정에서의 항체의 생물학적 활성을 보여주는 그래프이다. 그래프는 이중특이적 항체가 함께 첨가되거나 개별적으로 첨가된 2개의 포유동물-생산된 전장 항체와 유사한 활성을 보유한다는 것을 보여준다.

도 6b는 ELISA에 의해 결정시 야생형 Fc 및 돌연변이된 Fc에 대한 시노폴구스 원숭이에서의 항-IL-4/항-IL-13 이중특이적 항체의 약동학 (PK) 특성을 보여주는 3개의 그래프의 패널이다. 첫번째 그래프는 야생형 Fc에 대한 2 mg/kg 용량에서의 PK 특성을 보여준다. 가운데 그래프는 또한 야생형 Fc에 대한 20 mg/kg 용량에서의 PK 특성을 보여준다. 마지막 그래프는 돌연변이체 Fc에 대한 20 mg/kg 용량에서의 PK 특성을 보여준다. 이중특이적 항체는 시험된 동물에서 예상된 2 구획 청소율을 나타낸다. 암컷은 흑색 기호에 의해 표시하고, 수컷은 백색 기호에 의해 표시하였다. 세 동물에서, 21 일째에 혈청에서 측정된 항체의 급격한 감소에 의해 나타난 바와 같이 항-치료 반응이 관찰되었다.

도 7은 폴리아크릴아미드 겔의 사진이다. 전체 발효 브로스를 혼합한 후에 다양한 비율로 용해시켰다. 용해시킨 후에, 단백질을 추출하고, 비-환원 조건 하에서 겔 상에 로딩하였다. 이 절차 동안 형성된 정제된 이중특이적 항체는 겔의 상부 밴드로서 나타난다.

도 8a는 세포를 개별적으로 배양한 경우의 이중특이적 항체 생산을, 반-항체를 발현하는 세포의 공동-배양물과 비교하는 2장의 폴리아크릴아미드 겔의 사진이다. 무손상 이중특이적 항체는 공동-배양 조건 하에 훨씬 높은 수준으로 형성된다. 반-항체를 독립적으로 발현시키고, 정제하고, 이어서 혼합한 경우, 반-항체는 5% 이하의 무손상 이중특이적 항체를 형성한다. 공동-배양 조건 하에서, 리-코어(Li-Core) 단백질 결정을 이용하여 150 kD/(150kD + 75kD)에 의해 결정시 40% 초과가 무손상 이중특이적 항체였다.

도 8b는 초기 집종의 세포 집단을 달리한 공동-배양 실험의 개략도이다. 전장 이중특이적 항체의 사용 비 및 상대적인 양을 도면의 하단에 나타내었다.

도 8c는 1:1 세포 비의 항-EGFR 및 항-c-Met의 3회의 별도의 10 리터 발효 작업에 대한 겔의 사진이다. 각각의 작업에서 주요 생성물로서 전장 이중특이적 항체가 생산되었고, 이는 방법의 재현성을 나타낸다.

도 8d는 이중다량체 단백질, 예를 들어 이중특이적 항체의 생산을 위한 공동-배양 방법의 흐름도이다.

도 8e는 280nm에서의 UV 흡광도의 크로마토그램이며, 체류 시간 91.79 및 102.35에서 2개의 유의한 피크가 확인된다. 질량 분광측정법에 의한 후속적 분석은 무손상 이중특이적 항체가 잉여 반-항체로부터 효과적으로 분리되었음을 나타내었다.

도 8f는 SDS-PAGE 및 질량 분광측정법에 의한 도 8e로부터의 피크 91.79의 분석을 보여준다. 질량 분광측정법 데이터의 디컨볼루션으로 146,051.89 달톤에서 단일 피크가 생성되었고, 이는 이중특이적 항체의 예상 질량과 일치하였다. 오염 동종이량체 종은 검출되지 않았다.

도 8g는 이중다량체 단백질의 독립적 생산 및 공동-배양 생산에 대한 작업 흐름도의 비교이다.

도 9a는 3개의 크로마토그램을 보여준다. 상단 크로마토그램은 EDTA 무함유 샘플의 경우 용리 동안 흡광도 피크가 없음을 보여준다. 가운데 크로마토그램은 EDTA 함유 샘플이 뚜렷한 용리 피크를 갖는다는 것을 보여주며, 이로부터 본 발명자들은 대략 1.5 mg 단백질을 회수하였다. 하단 크로마토그램은 EDTA 및 Mg로 처리한 샘플이 또한 유사한 용리 피크를 나타낸다는 것을 보여주며, 이로부터 본 발명자들은 1.1 mg 단백질을 회수하였다. EDTA 샘플, EDTA 플러스 Mg 샘플로부터 회수한 단백질, 및 비처리된 EDTA 샘플로부터의 동일한 체류 시간으로부터의 분획의 풀을 환원 및 비-환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.

도 9b는 도 9a에 기재된 SDS-PAGE 겔의 사진이다. EDTA로 처리된 샘플은 배양 배지로 방출된 무손상 이중특이적 항체를 생산하였다.

도 9ca, 도 9cb 및 도 9cc는 도 9a에서 회수되고 기재된 샘플에 대한 질량 분광측정 크로마토그램을 보여준다. EDTA 함유 샘플은 이중특이적 항체에 대한 예상 질량 및 잉여 반-항체에 대한 질량을 나타내었다.

도 9d는 SDS-PAGE 겔의 사진 및 나타난 밴드의 질량 크로마토그램이다. 레인 1은 MW 마커이고, 레인 2는 독립적으로 발현된 항-IL-13이고, 레인 3은 독립적으로 발현된 항-IL-4이고, 레인 4는 2개의 세포의 공동-배양물이다. 3가지 샘플 모두의 질량 분광측정 분석은 공동-배양물이 무손상 이중특이적 항체 및 잉여의 하나의 반-항체, 항-IL-4를 생산한다는 것을 보여준다. 이는 항-IL-13 반-항체가 화학량론적으로 한정적임을 나타낸다. 반-항체를 독립적으로 발현시키고, 정제하고, 이어서 혼합한 경우, 반-항체는 대략 2% (항-IL-13) 및 3% (항-IL-4)의 무손상 이중특이적 항체를 형성한다. 공동-배양 조건 하에서, 리-코어 단백질 결정을 이용하여 150 kD/(150kD + 75kD)에 의해 결정시 대략 60%가 무손상 이중특이적 항체였다.

도 9ea 및 도 9eb는 나타난 바와 같이 초기 발효 접종물에서 상이한 세포 비를 갖는 2개의 공동-배양물에 대한 2개의 HIC 크로마토그램을 보여준다. 생성물에서의 명백한 차이가 관찰되며, 이는 초기 접종물 비를 반영한다. 상기 접근법을 이용함으로써, 초기 접종물 비를 변경하여 이중다량체 단백질의 최적 생산을 달성할 수 있다는 것이 명백해졌다.

도 9f는 본원에 기재된 공동-배양 방법에 의해 생산된 8개의 다양한 이중특이적 항체의 환원 및 비-환원 조건 하에서의 SDS-PAGE 분석을 보여주는 4장의 사진의 패널이다. 항-CD3/항-CD19 이중다량체 단백질에 대한 비-환원 겔은 나타나지 않았다. 화살표는 무손상 이중특이적 항체를 나타낸다.

도 10은 이중다량체 단백질을 스크리닝하기 위한 매트릭스 접근법의 개략도이다.

도 11은 본원에 기재된 방법을 이용하여 생산된 이중특이적 항체의 시험관내 활성화에 대한 2개의 그래프를 보여준다.

도 12는 항-EGFR/항-c-met 이중특이적 항체가 생체내 KP4 췌장 이종이식 모델에서 항-종양 활성을 보유한다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 13은 항-EGFR/항-c-met 이중특이적 항체가 생체내 A431 표피양 암종 이종이식 모델에서 항-종양 활성을 보유한다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 14는 a) 어셈블리 전 노브, b) 어셈블리 전 홀, c) 어셈블리 후 이중특이적 항체의 HIC를 보여준다. 도 14d는 어셈블리 전 각각의 아암의 겔이다

도 15는 어셈블리된 물질의 전기영동도를 보여주며, 이는 물질의 86%가 완전히 산화되었음을 나타낸다.

도 16: 어셈블리된 이중특이적 항체의 특성화: a) 물질이 >90.5 퍼센트 이중특이적 항체임을 나타내는 어닐링된 이중특이적 항체의 HIC 크로마토그램, b) 정제된 물질의 겔, c) 최종 샘플의 질량 분광측정 디컨볼루션, 및 d) 이론적 질량의 표.

도 17은 (가열에 의한) 산화환원 절차의 개략도이다: a) 샘플을 1 시간 동안 가열하여 디설피드 결합을 고리화시키고, b) 이어서 냉각시키고, 2mM DTT를 사용하여 2 시간 동안 시스테인을 환원시키고, c) 이어서, 농축시키고, 시스테인을 실온에서 투석에 의해 공기 산화시킨다.

도 18은 (가열하지 않는) 산화환원 절차의 개략도이다: a) 샘플을 2 시간 동안 혼합하고, b) 2mM DTT를 사용하여 2 시간 동안 시스테인을 환원시키고, c) 이어서, 농축시키고, 실온에서 투석에 의해 EDTA를 제거하면서 시스테인을 공기 산화시킨다

도 19: 어셈블리된 이중특이적 항체의 분석: a) 가열 단계가 있는 산화환원 절차를 이용한 HIC 크로마토그램, b) 가열 단계가 없는 산화환원 절차를 이용한 HIC 크로마토그램.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083]

약어

[0084]

ADCC = 항체-의존성 세포-매개 세포독성

- [0085] API = 항-병원체 이뮤노어드헤신
- [0086] BPI = 살박테리아/투과성-증가 단백질
- [0087] C1q = 보체 인자 1q
- [0088] CD = 분화 클러스터
- [0089] CDC = 보체-의존성 세포독성
- [0090] CH1 또는 C<sub>H</sub>1 = 중쇄 제1 불변 도메인
- [0091] CH2 또는 C<sub>H</sub>2 = 중쇄 제2 불변 도메인
- [0092] CH3 또는 C<sub>H</sub>3 = 중쇄 제3 불변 도메인
- [0093] CH4 또는 C<sub>H</sub>4 = 중쇄 제4 불변 도메인
- [0094] CL 또는 C<sub>L</sub> = 경쇄 불변 도메인
- [0095] CTLA = 세포독성 T 림프구-연관 분자
- [0096] Fc = 결정화가능 단편
- [0097] Fc γ R = IgG의 Fc 부분에 대한 수용체 감마
- [0098] HIV = 인간 면역결핍 바이러스
- [0099] ICAM = 세포간 부착 분자
- [0100] BsAb = 이중특이적 항체
- [0101] BsDb = 이중특이적 디아바디
- [0102] dsFv = 디설파이드-안정화 Fv
- [0103] Fc = 항체의 불변 단편
- [0104] Fd = 항체의 V<sub>H</sub>+C<sub>H</sub>1
- [0105] FcR = Fc 수용체
- [0106] Fv = 항체의 가변 단편
- [0107] IgG = 이뮤노글로불린 G
- [0108] mAb = 모노클로날 항체
- [0109] PBL = 말초 혈액 림프구
- [0110] scDb = 단일-쇄 디아바디
- [0111] scFv = 단일-쇄 Fv
- [0112] (scFv)<sub>2</sub> = scFv-scFv 탠덤
- [0113] Tandab = 탠덤 디아바디
- [0114] V<sub>H</sub> 또는 V<sub>H</sub> = 항체의 중쇄의 가변 도메인
- [0115] V<sub>L</sub> 또는 V<sub>L</sub> = 항체의 경쇄의 가변 도메인
- [0116] 상세한 설명
- [0117] 이제 하기 정의 및 예만을 이용하여 참조의 방식으로 본 발명을 상세히 기재할 것이다. 본원에 인용된 모든 특허 및 공보 (상기 특허 및 공보에 개시되어 있는 모든 서열 포함)는 명백히 참조로 포함된다.

- [0118] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 문헌 [Singleton, *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2d Ed., John Wiley and Sons, New York (1994)], 및 [Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991)]은 당업자에게 본 발명에서 사용된 많은 용어의 일반적인 사전적 의미를 제공한다. 본원에 기재된 바와 유사하거나 등가의 모든 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있긴 하지만, 바람직한 방법 및 물질이 기재된다. 수치 범위는 그 범위를 정의하는 숫자를 포함한다. 달리 표시되지 않는 한, 각각, 핵산은 좌측에서 우측으로 5'에서 3' 배향으로 기재되고; 아미노산 서열은 좌측에서 우측으로 아미노에서 카르복시 배향으로 기재된다. 진료의는 당업계의 정의 및 용어에 대해 특히 문헌 [Sambrook *et al.*, 1989] 및 [Ausubel *et al.*, 1993]에 집중한다. 본 발명이 본원에 기재된 특별한 방법론, 프로토콜 및 시약으로 제한되지 않는데, 이는 이들이 달라질 수 있기 때문이라는 것을 이해해야 한다.
- [0119] 수치 범위는 그 범위를 정의하는 숫자를 포함한다.
- [0120] 달리 표시되지 않는 한, 각각, 핵산은 좌측에서 우측으로 5'에서 3' 배향으로 기재되고; 아미노산 서열은 좌측에서 우측으로 아미노에서 카르복시 배향으로 기재된다.
- [0121] 본원에 제공된 표제는 전체로서 본 명세서를 참조로 할 수 있는 본 발명의 각종 측면 또는 실시양태를 제한하지 않는다. 따라서, 바로 다음에 정의된 용어들은 전체로서 본 명세서를 참조로 하여 보다 상세히 정의된다.
- [0122] I. 정의
- [0123] "이종다량체", "이종다량체 복합체" 또는 "이종다량체 단백질"은 적어도 제1 힌지-함유 폴리펩티드 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 포함하는 분자를 지칭하며, 여기서 제2 힌지-함유 폴리펩티드는 하나 이상의 아미노산 잔기가 제1 힌지-함유 폴리펩티드로부터의 아미노산 서열과 상이하다. 이종다량체는 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드에 의해 형성된 "이종이량체"를 포함할 수 있거나, 또는 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드 이외의 폴리펩티드가 존재하는 경우에 보다 높은 차수의 3차 구조를 형성할 수 있다. 이종다량체의 폴리펩티드는 비-펩티드성 공유 결합 (예를 들어, 디설피드 결합) 및/또는 비-공유 상호작용 (예를 들어, 수소 결합, 이온 결합, 반 데르 발스 힘 및/또는 소수성 상호작용)에 의해 서로 상호작용할 수 있다.
- [0124] 본원에 사용된 "이종다량체화 도메인"은 이종다량체 형성의 촉진 및 동종다량체 형성의 방해를 위한, 생물 분자에 대한 변경 또는 부가를 지칭한다. 동종이량체보다 이종이량체를 형성하는 것이 강하게 우세한 임의의 이종이량체화 도메인은 본 발명의 범주 내에 포함된다. 예시적 예는, 예를 들어 미국 특허 출원 20030078385 (Arathoon *et al.* - 제넨테크; 노브 인투 홀 기재); WO2007147901 (Kjærgaard *et al.* - 노보 노르디스크(Novo Nordisk): 이온성 상호작용 기재); WO 2009089004 (Kannan *et al.* - 암젠(Amgen): 정전기 스티어링 효과 기재); 미국 특허 출원 61/243,105 (Christensen *et al.* - 제넨테크; 코일드 코일 기재)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 예를 들어 류신 지퍼를 기재하는 문헌 [Pack, P. & Plueckthun, A., Biochemistry 31, 1579-1584 (1992)] 또는 나선 대 나선 연결구조 모티프를 기재하는 문헌 [Pack *et al.*, Bio/Technology 11, 1271-1277 (1993)]을 참조한다. 어구 "이종다량체화 도메인" 및 "이종이량체화 도메인"은 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0125] 본원에 사용된 어구 "힌지-함유 폴리펩티드"는 당업계에서 이해되는 바와 같은 이뮤노글로불린의 힌지 영역, 예를 들어 중쇄의 C<sub>H</sub>1 및 C<sub>H</sub>2 도메인 사이의 영역에 상응하는 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 본원에 사용된 "힌지 영역", "힌지 서열" 및 그의 변형은, 예를 들어 문헌 [Janeway's Immunobiology, (Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, NY) (7th ed., 2008)]; [Bloom *et al.*, Protein Science (1997), 6:407-415]; [Humphreys *et al.*, J. Immunol. Methods (1997), 209:193-202]에 설명되어 있는, 당업계에 공지된 의미를 포함한다. 또한, 예를 들어 문헌 [Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)] 및 [Papadea, C. and I. J. Check (1989) "Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects." Crit Rev Clin Lab Sci 27(1): 27-58]을 참조한다. 당업자는 쇠간 디설피드 결합 형성에 이용가능한 아미노산의 수 뿐만 아니라 시스테인 잔기의 수가 이뮤노글로불린의 클래스 및 이소형 사이에서 달라진다는 것을 인식할 것이다. 모든 이러한 힌지 영역은 힌지-함유 폴리펩티드에 있을 수 있고, 본 발명의 범주 내에 포함된다.
- [0126] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 임의의 이뮤노글로불린 (Ig) 분자, 및 목적하는 생물학적 활성 (예를 들어, 에피토프 결합 활성)을 나타내는 한 그의 임의의

단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체를 의미한다. 항체의 예는 본원에 기재된 바와 같은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 및 항체 단편을 포함한다. 항체는 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙된 항체일 수 있다.

[0127] 참조의 프레임으로서 본원에 사용된 항체는 이뮤노글로불린 G (IgG)의 구조를 지칭할 것이다. 그러나, 당업자는 임의의 이뮤노글로불린 클래스의 항체가 본원에 기재된 본 발명의 방법에 사용될 수 있음을 이해할/인지할 것이다. 명료성을 위해, IgG 분자는 동일한 중쇄 (HC)의 쌍 및 동일한 경쇄 (LC)의 쌍을 함유한다. 각각의 LC는 1개의 가변 도메인 ( $V_L$ ) 및 1개의 불변 도메인 ( $C_L$ )을 갖는 반면, 각각의 HC는 1개의 가변 ( $V_H$ ) 및 3개의 불변 도메인 ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ )을 갖는다.  $C_{H1}$  및  $C_{H2}$  도메인은 힌지 영역에 의해 연결된다. 이 구조는 당업계에 널리 공지되어 있다. 도 1b를 참조한다.

[0128] 본원에 사용된, "반-항체"는 하나의 이뮤노글로불린 경쇄와 회합된 하나의 이뮤노글로불린 중쇄를 지칭한다. 예시적인 반-항체는 도 1a에 도시되어 있다. 당업자는 반-항체가 또한 단일 가변 도메인으로 이루어진 항원 결합 도메인을 가질 수 있음을 쉽게 인식할 것이다.

[0129] 용어 "맥시바디"는 Fc 폴리펩티드에 융합된 scFv를 포함하는 융합 단백질을 지칭한다. WO 2009089004의 도 8a를 참조한다. 이중특이적 맥시바디에 대해서는 WO 2009089004의 도 2를 참조한다.

[0130] 용어 인간 IgG Fc 영역의 " $C_{H2}$  도메인"은 대체로 EU 넘버링 시스템에 따른 IgG의 약 잔기 231로부터 약 340까지 이어진다.  $C_{H2}$  도메인은 또 다른 도메인과 근접하게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 쇄가 무손상 천연 IgG 분자의 2개의  $C_{H2}$  도메인 사이에 배치된다. 탄수화물이 도메인-도메인 쌍 형성에 대한 대안을 제공하고  $C_{H2}$  도메인의 안정화를 도울 수 있는 것으로 추정되었다. 문헌 [Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)].

[0131] 용어 " $C_{H3}$  도메인"은 Fc 영역 내의  $C_{H2}$  도메인에 대해 C-말단인 잔기들의 스트레치 (즉, EU 넘버링 시스템에 따른 IgG의 약 아미노산 잔기 341로부터 약 아미노산 잔기 447까지)를 포함한다.

[0132] 본원에 사용된 용어 "Fc 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 폴리펩티드 서열을 포함하는 이량체 복합체를 일반적으로 지칭하고, 여기서 C-말단 폴리펩티드 서열은 무손상 항체의 파파인 소화에 의해 수득가능한 것이다. Fc 영역은 천연 또는 변이체 Fc 서열을 포함할 수 있다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 서열의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 서열은 통상적으로 약 위치 Cys226의 아미노산 잔기로부터 또는 약 위치 Pro230의 아미노산 잔기로부터 Fc 서열의 카르복실 말단까지 이르는 스트레치로 정의된다. 본원에 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재된 바와 같은 EU 넘버링 시스템 (또한 EU 인덱스로 지칭됨)에 따른다. 이뮤노글로불린의 Fc 서열은 일반적으로  $C_{H2}$  도메인 및  $C_{H3}$  도메인의 2개의 불변 도메인을 포함하고, 임의로  $C_{H4}$  도메인을 포함한다. 본원에서의 "Fc 폴리펩티드"는 Fc 영역, 예를 들어 단량체 Fc를 구성하는 폴리펩티드들 중 하나를 의미한다. Fc 폴리펩티드는 임의의 적합한 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub> 하위유형, IgA, IgE, IgD 또는 IgM으로부터 수득될 수 있다. Fc 영역은 디설피드에 의해 함께 결합되어 있는 H 쇄 둘 다의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역 내의 서열에 의해 결정되고, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식되는 부분이다. 일부 실시양태에서, Fc 폴리펩티드는 야생형 힌지 서열의 일부 또는 모두를 포함한다 (일반적으로 그의 N 말단에서). 일부 실시양태에서, Fc 폴리펩티드는 기능적 또는 야생형 힌지 서열을 포함하지 않는다.

[0133] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 보유한다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향조절 등을 포함한다. 상기 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 결합할 것을 필요로 하고, 예를 들어 본원의 정의에서 개시된 바와 같은 다양한 검정을 사용하여 평가할 수 있다.

[0134] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG<sub>1</sub> Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG<sub>2</sub> Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG<sub>3</sub> Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG<sub>4</sub> Fc 영역 뿐만 아니라 이들의 자연 발생 변이체를 포함한다.



- [0135] "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 통하여 천연 서열 Fc 영역과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교해서 1개 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 약 1 내지 약 10개 아미노산 치환을 갖고, 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역 내에 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서의 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80%의 상동성을 가질 것이고, 가장 바람직하게는 적어도 약 90%의 상동성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%의 상동성을 가질 것이다.
- [0136] 본원에 사용된 "Fc 성분"은 Fc 영역의 힌지 영역, C<sub>H</sub>2 도메인 또는 C<sub>H</sub>3 도메인을 지칭한다.
- [0137] 특정 실시양태에서, 힌지-함유 폴리펩티드는 IgG Fc 영역 (바람직하게는 야생형 인간 IgG Fc 영역으로부터 유래된 것)을 포함한다. "야생형" 인간 IgG Fc는 인간 집단 내에서 자연적으로 발생하는 아미노산의 서열을 의미한다. 물론, Fc 서열이 개체 사이에서 다소 상이할 수 있듯이, 야생형 서열에 하나 이상의 변형이 이루어질 수 있고, 이는 여전히 본 발명의 범주 내에 포함된다. 예를 들어, Fc 영역은 본 발명과 관련되지 않은 추가의 변형, 예컨대 글리코실화 부위에서의 돌연변이 또는 비천연 아미노산의 봉입을 함유할 수 있다.
- [0138] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시킬 때 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄 (각각 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>)의 가변 도메인은 일반적으로 각각의 도메인이 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 초가변 영역 (HVR)을 갖는 유사한 구조를 갖는다. (예를 들어, 문헌 [Kindt et al. Kuby Immunology, 6<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조). 단일 V<sub>H</sub> 또는 V<sub>L</sub> 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정한 항원에 결합하는 항체는 각각 상보적인 V<sub>L</sub> 또는 V<sub>H</sub> 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 V<sub>H</sub> 또는 V<sub>L</sub> 도메인을 사용하여 분리될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993)]; [Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.
- [0139] 본원에 사용된 용어 "Fab"는 항체의 항원-결합 단편을 지칭한다. 상기 기재된 바와 같이, 파파인은 무손상 항체를 소화시키는데 사용될 수 있다. 항체의 파파인 소화는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 즉 "Fab" 단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (즉, 상기 Fc 영역)을 생산한다. Fab 단편은 H 쇄의 가변 영역 도메인 (V<sub>H</sub>) 및 1개 중쇄의 제1 불변 도메인 (C<sub>H</sub>1)과 함께 L 쇄 전체로 이루어진다.
- [0140] 본원에 사용된 어구 "항원 결합 아암", "표적 분자 결합 아암", "표적 결합 아암" 및 그의 변형은 관심 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 본 발명의 이종다량체 단백질의 구성 부분을 지칭한다. 일반적으로 및 바람직하게는, 항원 결합 아암은 이뮤노글로불린 폴리펩티드 서열, 예를 들어 CDR 및/또는 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인 서열의 복합체이다.
- [0141] "표적" 또는 "표적 분자"는 이종다량체 단백질의 결합 아암에 의해 인식되는 모이어티를 지칭한다. 예를 들어, 이종다량체 단백질이 항체인 경우, 표적은 문맥에 따라서 단일 분자 상의 또는 다양한 분자 상의 에피토프, 또는 병원체 또는 종양 세포일 수 있다. 유사하게, 이종다량체 단백질이 수용체-Fc 융합 단백질인 경우, 표적은 수용체에 대한 동족 결합 파트너일 것이다. 당업자는 표적이 표적 결합 아암의 결합 특이성에 의해 결정되고, 상이한 표적 결합 아암이 상이한 표적을 인식할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 표적은 바람직하게는 (스캐차드 분석에 따라) 1μM Kd보다 높은 친화도로 본 발명의 이종다량체 단백질에 결합한다. 표적 분자의 예는 혈청 가용성 단백질 및/또는 그의 수용체, 예컨대 시토카인 및/또는 시토카인 수용체, 어드헤신, 성장 인자 및/또는 그의 수용체, 호르몬, 바이러스 입자 (예를 들어, RSV F 단백질, CMV, StaphA, 인플루엔자, C형 간염 바이러스), 미생물 (예를 들어, 박테리아 세포 단백질, 진균 세포), 어드헤신, CD 단백질 및 그의 수용체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0142] "무손상" 또는 "전장" 항체의 한 예는 항원 결합 아암 뿐만 아니라 C<sub>L</sub> 및 적어도 중쇄 불변 도메인, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.
- [0143] 본원에 사용된 용어 "커플링"은 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드를 서로 연결하는데 필요한 단계, 예를 들어 공유 결합의 형성을 지칭한다. 이러한 단계는 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드의 시스테인 잔기를 환원, 어닐

링 및/또는 산화시켜 쇠간 디설피드 결합을 형성하는 것을 포함한다. 커플링은 화학적 가교에 의해, 또는 산화 환원 시스템의 이용에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Humphreys et al., J. Immunol. Methods (1998) 217:1-10] 및 [Zhu et al., Cancer Lett., (1994) 86: 127-134]을 참조한다.

[0144] 용어 "다중특이적 항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 다중에피토프 특이성을 갖는 항체를 포함한다. 이러한 다중특이적 항체는  $V_H V_L$  유닛이 다중에피토프 특이성을 갖는, 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ ) 및 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ )을 포함하는 항체, 각각의  $V_H V_L$  유닛이 상이한 에피토프에 결합하는 2개 이상의  $V_L$  및  $V_H$  도메인을 갖는 항체, 각각의 단일 가변 도메인이 상이한 에피토프에 결합하는 2개 이상의 단일 가변 도메인을 갖는 항체, 전장 항체, 항체 단편, 예컨대 Fab, Fv, dsFv, scFv, 디아바디, 이중특이적 디아바디 및 트리아바디, 공유 또는 비공유 연결된 항체 단편을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. "다중에피토프 특이성"은 동일하거나 상이한 표적(들) 상의 2개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 지칭한다. "단일특이적"은 하나의 에피토프에만 결합하는 능력을 지칭한다. 한 실시양태에 따라, 다중특이적 항체는 각각의 에피토프에 5  $\mu$ M 내지 0.001 pM, 3  $\mu$ M 내지 0.001 pM, 1  $\mu$ M 내지 0.001 pM, 0.5  $\mu$ M 내지 0.001 pM, 또는 0.1  $\mu$ M 내지 0.001 pM의 친화도로 결합하는 IgG 항체이다. 이중특이적 항체의 예시적 도면이 도 1b에 제공된다.

[0145] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편; 디아바디 (Db); 탠덤 디아바디 (taDb); 선형 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,641,870; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)] 참조); 1-아암 항체, 단일 가변 도메인 항체, 미니바디, 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-C<sub>H</sub>3 및 (scFv)<sub>4</sub>-Fc를 포함하지만 이에 제한되지는 않음)를 포함한다.

[0146] 표현 "단일 도메인 항체" (sdAb) 또는 "단일 가변 도메인 (SVD) 항체"는 일반적으로 단일 가변 도메인 ( $V_H$  또는  $V_L$ )이 항원 결합을 부여할 수 있는 항체를 지칭한다. 즉, 단일 가변 도메인은 표적 항원을 인식하기 위해 또 다른 가변 도메인과의 상호작용을 필요로 하지 않는다. 단일 도메인 항체는 각각의 항원 결합 아암 상의 단일 단량체 가변 항체 도메인 ( $V_H$  또는  $V_L$ )으로 구성된다. 단일 도메인 항체의 예는 낙타류 (라마 및 낙타) 및 연골 어류 (예를 들어, 너스 상어)로부터 유래된 것 및 인간 및 마우스 항체로부터 재조합 방법으로 유래된 것을 포함한다 (문헌 [Ward et al., Nature (1989) 341:544-546]; [Dooley and Flajnik, Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56]; [Muyldermans et al., Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235]; [Holt et al., Trends Biotechnol (2003):21:484-490]; WO 2005/035572; WO 03/035694; 문헌 [Davies and Riechmann, Febs Lett (1994) 339:285-290]; WO00/29004; WO 02/051870). 단일 가변 도메인 항체는 다른 가변 영역 또는 가변 도메인을 갖는 항원 결합 아암 (예를 들어, 동종- 또는 이종-다량체)에 존재할 수 있고, 그런 경우에 이는 단일 도메인 항체가 아니다.

[0147] 표현 "선형 항체"는 일반적으로 문헌 [Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)]에 기재된 항체를 지칭한다. 간략하게, 이들 항체는 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 탠덤 Fd 절편 ( $V_H$ -C<sub>H</sub>1- $V_H$ -C<sub>H</sub>1)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0148] 본원에서 언급되는 용어 "노브-인투-홀(knob-into-hole)" 또는 "KnH" 기술은 돌출부 (노브)를 하나의 폴리펩티드 내로 및 함몰부 (홀)를 다른 폴리펩티드 내로 이들이 상호작용하는 인터페이스에서 도입함으로써 시험관내에서 또는 생체내에서 함께 2개의 폴리펩티드의 쌍 형성을 유도하는 기술을 의미한다. 예를 들어, KnH는 항체의 Fc:Fc 결합 인터페이스, C<sub>L</sub>:C<sub>H</sub>1 인터페이스 또는  $V_H$ / $V_L$  인터페이스에서 도입되었다 (예를 들어, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 및 문헌 [Zhu et al. (1997) Protein Science 6:781-788]). 이것은 특히 다중특이적 항체의 제조 동안 함께 2개의 상이한 중쇄의 쌍 형성을 유도하는데 유용하다. 예를 들어, 그의 Fc 영역에 KnH를 갖는 다중특이적 항체는 각각의 Fc 영역에 연결된 단일 가변 도메인을 추가로 포함할 수 있거나, 또는 유사하거나 상이한 경쇄 가변 도메인과 쌍을 이루는 상이한 중쇄 가변 도메인을 추가로 포함할 수 있다. KnH 기술은 또한 2개의 상이한 수용체 세포의 도메인이 함께 쌍을 이루도록 하거나, 또는 상이한 표적 인식 서열 (예를 들어, 아피바디, 펩티바디 및 다른 Fc 융합체 포함)을 포함하는 임의의 다른 폴리펩티드 서열이 쌍을 이루도록 하는데 사용될 수 있다.

[0149] "Fv"는 강한 비공유 회합 상태의 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 이루어진다. 이들 2개 도메인이 폴딩되어 6개의 초가변 루프 (H 쇠 및 L 쇠로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 상기 루프는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인



(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)도, 종종 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도로도 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0150] "단일 쇠 Fv" (또한 약어로 "sFv" 또는 "scFv"라고 함)는 단일 폴리펩티드 쇠로 연결된  $V_H$  및  $V_L$  항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합에 요구되는 구조를 형성하게 하는 폴리펩티드 링커를  $V_H$  도메인과  $V_L$  도메인 사이에 추가로 포함한다. sFv에 대해서는, 문헌 [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; [Malmborg et al., J. Immunol. Methods 183:7-13, 1995]을 참조한다.

[0151] 용어 "디아바디"는  $V_H$  도메인 및  $V_L$  도메인 사이의 짧은 링커 (약 5 내지 10개 잔기)로 sFv 단편 (이전 단락 참조)을 구축함으로써 V 도메인의 쇠내 쌍 형성이 아닌 쇠간 쌍 형성을 달성하여 2가 단편, 즉, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성하도록 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의  $V_H$  및  $V_L$  도메인이 상이한 폴리펩티드 쇠에 존재하는 2개의 "교차" sFv 단편의 이중이량체이다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0152] 용어 "1-아암 항체" 또는 "1-아암 항체들"은 (1)  $C_H2$  도메인,  $C_H3$  도메인 또는  $C_H2$ - $C_H3$  도메인을 포함하는 폴리펩티드에 펩티드 결합에 의해 연결된 가변 도메인 및 (2) 제2  $C_H2$ ,  $C_H3$  또는  $C_H2$ - $C_H3$  도메인을 포함하는 항체를 지칭하고, 여기서 가변 도메인은 제2  $C_H2$ ,  $C_H3$  또는  $C_H2$ - $C_H3$  도메인을 포함하는 폴리펩티드에 펩티드 결합에 의해 연결되지 않는다. 한 실시양태에서, 1-아암 항체는 3개의 폴리펩티드, 즉 (1) 가변 도메인 (예를 들어,  $V_H$ ),  $C_H1$ ,  $C_H2$  및  $C_H3$ 을 포함하는 제1 폴리펩티드, (2) 가변 도메인 (예를 들어,  $V_L$ ) 및  $C_L$  도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드, 및 (3)  $C_H2$  및  $C_H3$  도메인을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 1-아암 항체는 불변 중쇄를 연결하는 디설피드 결합을 형성하는 2개의 시스테인 잔기를 함유하는 부분적인 힌지 영역을 갖는다. 한 실시양태에서, 1-아암 항체의 가변 도메인은 항원 결합 영역을 형성한다. 또 다른 실시양태에서, 1 아암 항체의 가변 도메인은 단일 가변 도메인이고, 여기서 각각의 단일 가변 도메인은 항원 결합 영역이다. 한 실시양태에서, 1-아암 항체는 단일 가변 도메인 항체이다.

[0153] 본 발명의 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 한편, 쇠(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 이러한 항체의 단편 (단, 이는 원하는 생물학적 활성을 나타냄)이다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]). 본원에서 관심 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 영장류화 항체를 포함한다.

[0154] 비인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 원하는 항체 특이성, 친화도 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에 없는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 정밀화되도록 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 임의로, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0155] "펩티바디" 또는 "펩티바디들"은 무작위로 생성된 펩티드 및 Fc 도메인의 융합체를 지칭한다. 2003년 12월 9일자로 허여된 미국 특허 번호 6,660,843 (Feige et al.) (그의 전문이 참고로 포함됨)을 참조한다. 이는 N-말단, C-말단, 아미노산 측쇄, 또는 하나 초과와 상기 부위에 연결된 하나 이상의 펩티드 포함한다. 펩티바디 기술을 사용함으로써 하나 이상의 리간드 또는 수용체, 중앙-귀소 펩티드, 막 수송 펩티드 등을 표적화하는

펩티드를 포함하는 치료제를 설계할 수 있다. 펩티바디 기술은 선형 및 디설피드-제한된 펩티드, "탠덤 펩티드 다량체" (즉, Fc 도메인의 단일쇄 상의 하나 초과 펩티드)를 포함하는 많은 상기 분자의 설계에 유용한 것으로 입증되었다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,660,843; 2003년 10월 16일자로 공개된 미국 특허 출원 번호 2003/0195156 (2002년 11월 21일자로 공개된 WO 02/092620에 대응함); 2003년 9월 18일자로 공개된 미국 특허 출원 번호 2003/0176352 (2003년 4월 17일자로 공개된 WO 03/031589에 대응함); 1999년 10월 22일자로 출원된 미국 일련 번호 09/422,838 (2000년 5월 4일자로 공개된 WO 00/24770에 대응함); 2003년 12월 11일자로 공개된 미국 특허 출원 번호 2003/0229023; 2003년 7월 17일자로 공개된 WO 03/057134; 2003년 12월 25일자로 공개된 미국 특허 출원 번호 2003/0236193 (2004년 4월 8일자로 출원된 PCT/US04/010989에 대응함); 2003년 9월 18일자로 출원된 미국 일련 번호 10/666,480 (2004년 4월 1일자로 공개된 WO 04/026329에 대응함) (이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다.

[0156] "아피바디들" 또는 "아피바디"는 Fc 영역에 펩티드 결합에 의해 연결된 단백질의 사용을 지칭하고, 여기서 단백질은 표적 분자에 대한 결합 표면을 제공하는 스캐폴드로서 사용된다. 단백질은 종종 자연 발생 단백질, 예를 들어 스태필로코쿠스 단백질 A 또는 IgG-결합 B 도메인, 또는 그로부터 유래된 Z 단백질 (문헌 [Nilsson et al. (1987), Prot Eng 1, 107-133], 및 미국 특허 번호 5,143,844 참조) 또는 그의 단편 또는 유도체이다. 예를 들어, 아피바디는 표적 분자(들)에 대한 변경된 결합 친화도를 갖는 Z 단백질 변이체로부터 생성될 수 있고, Z 단백질의 절편은 표적 분자에 결합할 수 있는 변이체의 라이브러리를 생성하기 위해 무작위 돌연변이 유발에 의해 돌연변이된다. 아피바디의 예는 미국 특허 번호 6,534,628, 문헌 [Nord et al., Prot Eng 8:601-608 (1995)] 및 [Nord K et al., Nat Biotech 15:772-777 (1997)], [Biotechnol Appl Biochem. 2008 Jun;50(Pt 2):97-112]의 것을 포함한다.

[0157] 본원에 사용된 용어 "이뮤노어드헤신"은 이종 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 이뮤노글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 조합한 분자를 나타낸다. 구조적으로, 이뮤노어드헤신은 아미노산 서열이 항체의 항원 인식 및 결합 부위 이외의 서열인 (즉, 항체의 불변 영역에 비해 "이중성"인) 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열과 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열 (예를 들어, IgG의 C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 서열)의 융합체를 포함한다. 예시적인 어드헤신 서열은 관심 단백질에 결합하는 수용체 또는 리간드의 일부를 포함하는 인접 아미노산 서열을 포함한다. 어드헤신 서열은 또한 관심 단백질에 결합하는 서열일 수 있지만, 수용체 또는 리간드 서열이 아니다 (예를 들어, 펩티바디 내의 어드헤신 서열). 상기 폴리펩티드 서열은 파지 디스플레이 기술 및 고 처리량 분류 방법을 포함하는 다양한 방법에 의해 선택 또는 확인될 수 있다. 이뮤노어드헤신 내의 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 이뮤노글로불린, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 하위유형, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 얻을 수 있다.

[0158] 본원에 사용된 "복합체" 또는 "복합체화된"은 펩티드 결합이 아닌 결합 및/또는 힘 (예를 들어, 반 데르 발스, 소수성, 친수성 힘)을 통해 서로 상호작용하는 2개 이상의 분자의 회합을 지칭한다. 한 실시양태에서, 복합체는 이종다량체이다. 본원에 사용된 용어 "단백질 복합체" 또는 "폴리펩티드 복합체"는 단백질 복합체 내의 단백질에 접합된 비-단백질 개체 (예를 들어, 화학 분자, 예를 들어 독소 또는 검출 물질을 포함하지만 이에 제한되지는 않음)를 갖는 복합체를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0159] 관심 항원에 "결합하는" 본 발명의 이종다량체 단백질은 이종 다량체 단백질이 표적을 발현하는 단백질 또는 세포 또는 조직을 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 항원에 결합하고, 다른 단백질과 유의하게 교차반응하지 않는 것이다. 그러한 실시양태에서, "비-표적" 단백질에 대한 이종다량체 단백질의 결합의 정도는 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석 또는 방사성면역침전법 (RIA) 또는 ELISA에 의해 결정할 때 그의 특정 표적 단백질에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만일 것이다. 표적 분자에 대한 이종다량체 단백질의 결합에 대해서, 용어 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하다" 또는 "특이적인"은 비-특이적 상호작용과 측정가능하게 상이한 결합을 의미한다 (예를 들어, 비-특이적 상호작용은 소 혈청 알부민 또는 카세인에 대한 결합일 수 있음). 특이적 결합은, 예를 들어 분자의 결합을 대조군 분자의 결합과 비교하여 결정함으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적과 유사한 대조군 분자, 예를 들어 과량의 비표지 표적과의 경쟁에 의해 측정할 수 있다. 이 경우, 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지 표적에 의해 경쟁적으로 억제된다면 특이적 결합이다. 본원에 사용된 용어 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하다" 또는 "특이적인"은, 예를 들어 표적에 대해 적어도 약 200 nM, 대안적으로 적어도 약 150 nM, 대안적으로 적어도 약 100 nM, 대안적으로 적어도 약 60 nM, 대안적으로 적어도 약 50 nM, 대안적으로 적어도 약 40 nM, 대안적으로 적어도 약 30 nM, 대안적으로 적어도 약 20 nM, 대안적으로 적어도 약 10 nM, 대안적으로

적어도 약 8 nM, 대안적으로 적어도 약 6 nM, 대안적으로 적어도 약 4 nM, 대안적으로 적어도 약 2 nM, 대안적으로 적어도 약 1 nM 또는 그 초과와 Kd를 갖는 분자로 나타날 수 있다. 한 실시양태에서, 용어 "특이적 결합"은 이종다량체 단백질이 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 대해 실질적으로 결합하지 않으면서 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 결합을 지칭한다.

[0160] "결합 친화도"는 일반적으로 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 지칭한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수 ( $K_d$ )로 표시될 수 있다. 예를 들어,  $K_d$ 는 약 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM일 수 있거나, 또는 이보다 강할 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 비롯하여, 당업계에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원과 서서히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원과 보다 신속하게 결합하고 보다 오랫동안 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 목적상, 이들 중 임의의 방법이 사용될 수 있다.

[0161] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 " $K_d$ " 또는 " $K_d$  값"은 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정된 표적 (예를 들어 항원) CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어(BIAcore)<sup>TM</sup>-2000 또는 비아코어<sup>TM</sup>-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 미국 뉴저지주 피스카타웨이)을 이용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용함으로써 측정된다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신아미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5  $\mu$ g/ml (약 0.2  $\mu$ M)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5  $\mu$ l/분의 유량으로 주입한다. 항원 주입 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (예를 들어, 0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25  $\mu$ l/분의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 회합 속도 ( $k_{on}$ ) 및 해리 속도 ( $k_{off}$ )는 회합 및 해리 센서그램을 동시 피팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 ( $K_d$ )는  $k_{off}/k_{on}$ 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 항체의 회합 속도가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하면, 분광측정계, 예컨대 정지-유동 구비된 분광광도계 (아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(Aminco) 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서의 측정과 같이, 회합 속도는 25°C에서 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항체 (Fab 형태)의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 대역 통과)에서의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 쉐칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0162] 본 발명의 이종다량체 단백질, 예를 들어 항체, 그의 단편 또는 유도체와 관련하여 "생물학적 활성인" 및 "생물학적 활성" 및 "생물학적 특성"은 달리 명시된 경우를 제외하고 생물학적 분자에 결합하는 능력을 갖는 것을 의미한다.

[0163] 다양한 이종다량체 폴리펩티드를 기재하는데 사용되는, "단리된"은 발현되는 세포 또는 세포 배양물로부터 분리 및/또는 회수된 이종다량체를 의미한다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 이종다량체의 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이종다량체는 (1) 로우리(Lowry) 방법으로 측정시에 단백질의 95 중량%를 초과하는 정도, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하는 정도로, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드는 적어도 1회의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0164] 본 발명의 이종다량체는 일반적으로 실질적 균질성으로 정제된다. 어구 "실질적으로 균질한", "실질적으로 균질한 형태" 및 "실질적 균질성"은 생체물에 목적하지 않는 폴리펩티드 조합으로부터 유래하는 부산물 (예를 들어 동종다량체)이 실질적으로 결여됨을 나타내기 위해 사용된다.

[0165] 순도와 관련하여 표현된 실질적 균질성은 부산물의 양이 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 4%, 3%, 2% 또는 1 중량%를 초과하지 않거나, 1 중량% 미만인 것을 의미한다. 한 실시양태에서, 부산물은 5% 미만이다.

- [0166] "생물학적 분자"는 핵산, 단백질, 탄수화물, 지질, 및 이들의 조합을 지칭한다. 한 실시양태에서, 생물학적 분자는 자연에 존재한다.
- [0167] 본원에 사용된 "연결된" 또는 "연결"은 제1 아미노산 서열과 제2 아미노산 서열 사이의 직접적인 펩티드 결합 연결, 또는 제1 아미노산 서열과 제2 아미노산 서열에 및 이들 사이에 결합된 펩티드인 제3 아미노산 서열을 포함하는 연결을 의미한다. 예를 들어, 링커 펩티드가 하나의 아미노산 서열의 C-말단 말단부 및 다른 아미노산 서열의 N-말단 말단부에 결합된다.
- [0168] 본원에 사용된 "링커"는 길이가 2개 이상의 아미노산인 아미노산 서열을 의미한다. 링커는 중성 극성 또는 비극성 아미노산으로 구성될 수 있다. 링커의 길이는 예를 들어 2 내지 100개의 아미노산, 예를 들어 2 내지 50개의 아미노산, 예를 들어 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50개의 아미노산일 수 있다. 링커는 예를 들어 자가-절단, 또는 효소적 또는 화학적 절단에 의해 "절단가능"할 수 있다. 아미노산 서열 내의 절단 부위 및 상기 부위에서 절단하는 효소 및 화학물질은 당업계에 공지되어 있고, 또한 본원에서 설명된다.
- [0169] 본원에 사용된 "테더"는 2개의 다른 아미노산 서열을 연결하는 아미노산 링커를 의미한다. 본원에 사용된 테더는 이뮤노글로불린 중쇄 가변 도메인의 N-말단을 이뮤노글로불린 경쇄 불변 도메인의 C-말단과 연결할 수 있다. 특정 실시양태에서, 테더의 길이는 약 15 내지 50개의 아미노산, 예를 들어 20 내지 26개의 아미노산 (예를 들어, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 26개의 아미노산)이다. 테더는 예를 들어 당업계의 표준 방법 및 시약을 사용하여 자가-절단, 또는 효소적 또는 화학적 절단에 의해 "절단가능"할 수 있다.
- [0170] "링커" 또는 "테더"의 효소적 절단은 엔도펩티다제, 예를 들어 Lys-C, Asp-N, Arg-C, V8, Glu-C, 키모트립신, 트립신, 펩신, 파파인, 트롬빈, 케네나제, 인자 Xa, TEV (담배 식각 바이러스 시스테인 프로테아제), 엔테로키나제, HRV C3 (인간 리노바이러스 C3 프로테아제), 키니노게나제, 뿐만 아니라 서브틸리신-유사 전구단백질 컨버타제 (예를 들어, 푸린 (PC1), PC2, 또는 PC3) 또는 N-아르기닌 이염기성 컨버타제의 사용을 수반할 수 있다. 화학적 절단은 예를 들어 히드록실아민, N-클로로숙신이미드, N-브로모숙신이미드, 또는 브로민화시아노겐의 사용을 수반할 수 있다.
- [0171] 본원에 사용된 "Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위"는 Lys-C 엔도펩티다제에 의해 C-말단 측에서 절단될 수 있는 아미노산 서열의 리신 잔기이다. Lys-C 엔도펩티다제는 리신 잔기의 C-말단 측에서 절단된다.
- [0172] "무질서유발제"는 분자내 상호작용 (예를 들어, 수소 결합, 반 데르 발스 힘, 또는 소수성 효과)의 안정화를 방해함으로써 단백질 (예를 들어, 항체)의 3차원 구조를 붕괴시키는 수용성 물질을 의미한다. 예시적인 무질서유발제는 우레아, 구아니딘-HCl, 과염소산리튬, 히스티딘, 및 아르기닌을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0173] "연성 세제"는 분자내 상호작용 (예를 들어, 수소 결합, 반 데르 발스 힘, 또는 소수성 효과)의 안정화를 방해함으로써 단백질 (예를 들어, 항체)의 3차원 구조를 붕괴시키지만, 생물학적 활성의 상실이 야기되도록 단백질 구조를 영구적으로 붕괴시키지는 않는 (즉, 단백질을 변성시키지 않는) 수용성 물질을 의미한다. 예시적인 연성 세제는 트윈 (예를 들어, 트윈-20), 트리톤 (예를 들어, 트리톤 X-100), NP-40 (노닐 페녹실폴리에톡시에탄올), 노니데트(Nonidet) P-40 (옥틸 페녹실폴리에톡시에탄올), 및 나트륨 도데실 술페이트 (SDS)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0174] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.
- [0175] "항체-의존성 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는, 특정 세포독성의 세포 (예를 들어 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비형 Ig가 상기 세포독성의 이펙터 세포를 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합시킨 후에 표적 세포를 세포독성체로 사멸시킬 수 있는 것인 세포독성의 한 형태를 지칭한다. 항체는 세포독성 세포의 "아암"이고 이러한 사멸에 반드시 필요하다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc $\gamma$ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII를 발현한다. 조혈모세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평



가할 수 있다.

- [0176] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하고 상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함하여 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII 하위클래스의 수용체를 포함하는 것이다. Fc $\gamma$ RII 수용체는 Fc $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 주로 그의 세포질 도메인에서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (문헌 [M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토되어 있다. 추후로 확인될 것을 포함하는 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 모 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 또한 포함한다 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., European J. Immunol. 24:2429-2434 (1994)]).
- [0177] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc $\gamma$ RIII를 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 분리될 수 있다.
- [0178] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재 하에서의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 전통적인 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원에 결합된 항체 (적합한 서브클래스의 항체)에 결합하는 것에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.
- [0179] 용어 "치료 유효량"은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 항체, 항체 단편, 또는 유도체의 양을 지칭한다. 종양 (예를 들어, 암성 종양)의 경우, 치료 유효량의 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 다중특이적 항체 또는 항체 단편)은 암 세포수의 감소, 원발성 종양 크기의 감소, 주변 장기로의 암 세포 침투의 억제 (즉, 어느 정도의 감소, 바람직하게는 중지); 종양 전이의 억제 (즉, 어느 정도의 감소, 바람직하게는 중지); 어느 정도 종양 성장의 억제 및/또는 장애와 연관된 하나 이상의 증상의 어느 정도의 경감을 달성할 수 있다. 항체 또는 항체 단편이 암 세포의 성장을 방지하고/하거나 존재하는 암 세포를 사멸시킬 정도로, 세포종식 억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법의 경우, 생체내 효능은 예를 들어 생존 기간, 질환 진행까지의 시간 (TTP), 반응률 (RR), 반응 지속기간, 및/또는 삶의 질을 평가하여 측정될 수 있다.
- [0180] "감소시키거나 억제한다"는 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 75%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과와 전반적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 감소 또는 억제는 치료할 장애의 증상, 전이의 존재 또는 크기, 원발성 종양의 크기, 또는 혈관신생 장애에서 혈관의 크기 또는 수를 지칭할 수 있다.
- [0181] 용어 "암" 및 "암성"은 일반적으로 탈조절된 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 이 정의에는 양성 및 악성 암이 포함된다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 구체적인 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포암, 위장암 또는 위암, 예컨대 위장관암, 췌장암, 교모세포종, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 (예를 들어, 신세포 암종), 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다. "조기 암"은 침습성 또는 전이성이 아니거나 또는 0, I, 또는 II기 암으로서 분류되는 암을 의미한다. 용어 "전암성"은 전형적으로 암에 선행하거나 암으로 발전하는 상태 또는 성장을 지칭한다. "비-전이성"은, 양성인 암, 또는 여전히 원발성 부위 내에 있으면서 림프계 또는 혈관계로 침투되지 않았거나 원발성 부위 이외의 조직 내로 침투되지 않은 암을 의미한다. 일반적으로, 비-전이성 암은 0, I 또는 II기의 암 및 때때로 III기 암인 임의의 암이다.
- [0182] 본원에서 "알레르기성 또는 염증성 장애"는 개체의 면역계의 과다활성화로부터 발생하는 질환 또는 장애이다. 예시적인 알레르기성 또는 염증성 장애는 천식, 건선, 류마티스 관절염, 아토피성 피부염, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스, 습진, 기관 이식, 연령-관련 황반 변성, 크론병, 케양성 결장염, 호산구성 식도염, 및 염증과 연관된 자가면역 질환을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0183]

본원에서 "자가면역 질환"은 개체의 자기 자신의 조직 또는 공동-분리물로부터 발생하거나 이와 관련된 또는 장애 또는 그의 증상 또는 그로부터 발생하는 상태이다. 자가면역 질환 또는 장애의 예는 관절염 (류마티스 관절염 예컨대 급성 관절염, 만성 류마티스 관절염, 통풍성 관절염, 급성 통풍성 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 감염성 관절염, 라임 관절염, 증식성 관절염, 건선성 관절염, 척추 관절염, 및 소아 발병 류마티스 관절염, 골관절염, 만성 진행성 관절염, 변형성 관절염, 만성 원발성 다발성관절염, 반응성 관절염, 및 강직성 척추염), 염증성 과다증식성 피부 질환, 건선 예컨대 판상 건선, 적상 건선, 농포성 건선, 및 손발톱 건선, 피부염 예를 들어 접촉성 피부염, 만성 접촉성 피부염, 알레르기성 피부염, 알레르기성 접촉성 피부염, 포진성 피부염, 및 아토피성 피부염, x-연관 과다 IgM 증후군, 두드러기 예컨대 만성 알레르기성 두드러기 및 만성 특발성 두드러기, 예를 들어 만성 자가면역 두드러기, 다발성근염/피부근염, 소아 피부근염, 독성 표피 괴사용해, 경피증 (전신 경피증 포함), 경화증 예컨대 전신 경화증, 다발성 경화증 (MS) 예컨대 척수-시신경 MS, 원발성 진행성 MS (PPMS), 및 재발 완화형 MS (RRMS), 진행성 전신 경화증, 아테롬성동맥경화증, 동맥경화증, 파종성 경화증, 및 실조성 경화증, 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론병, 자가면역-매개 위장 질환, 결장염 예컨대 궤양성 결장염, 궤양 결장염, 현미경적 결장염, 콜라겐성 결장염, 폴립성 결장염, 괴사성 소장결장염, 및 경벽성 결장염, 및 자가면역 염증성 장 질환), 괴저성 농피증, 결절성 홍반, 원발성 경화성 담관염, 상공막염), 호흡 곤란 증후군, 예를 들어 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 수막염, 포도막의 전체 또는 일부의 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역 혈액 장애, 류마티스 척추염, 돌발성 난청, IgE-매개 질환 예컨대 아나필락시스 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염 예컨대 라스무센 뇌염 및 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예컨대 전방 포도막염, 급성 전방 포도막염, 육아종성 포도막염, 비육아종성 포도막염, 수정체항원성 포도막염, 후방 포도막염, 또는 자가면역 포도막염, 신증후군을 수반하거나 수반하지 않는 사구체신염 (GN) 예컨대 만성 또는 급성 사구체신염 예컨대 원발성 GN, 면역-매개 GN, 막성 GN (막성 신병증), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신병증, 막- 또는 막성 증식성 GN (MPGN), 예를 들어 제I형 및 제II형, 및 급속 진행성 GN, 알레르기 상태, 알레르기 반응, 습진 예를 들어 알레르기성 또는 아토피성 습진, 천식 예컨대 기관지성 천식, 기관지 천식, 및 자가면역 천식, T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 수반하는 상태, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 또는 전신 에리테마토데스 루푸스 예컨대 피부 SLE, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 파종성 홍반성 루푸스, 루푸스 (신염, 뇌염, 소아, 비-신장, 신장외, 원판상, 탈모증 포함), 소아 발병 (제I형) 당뇨병 예를 들어 소아 인슐린-의존성 당뇨병 (IDDM), 성인 발병 당뇨병 (제II형 당뇨병), 자가면역 당뇨병, 특발성 요붕증, 시토키인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 연관된 면역 반응, 결핵, 사르코이드증, 육아종증 예를 들어 림프관육아종증, 베게너 육아종증, 무과립구증, 맥관염 예를 들어 혈관염 (예를 들어 대혈관 혈관염 (예를 들어 류마티스성 다발성근육통 및 거대 세포 (다카야스) 동맥염), 중형 혈관 혈관염 (예를 들어 가와사키병 및 결절성 다발동맥염), 현미경적 다발동맥염, CNS 혈관염, 괴사, 피부, 또는 과민 혈관염, 전신 괴사성 혈관염, 및 ANCA-연관 혈관염, 예컨대 처크-스트라우스 혈관염 또는 증후군 (CSS)), 측두 동맥염, 재생불량성 빈혈, 자가면역 재생불량성 빈혈, 콧수양성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 빈혈, 용혈성 빈혈 또는 면역 용혈성 빈혈 예를 들어 자가면역 용혈성 빈혈 (AIHA), 악성 빈혈, 애디슨병, 순적혈구 빈혈 또는 무형성증 (PRCA), 인자 VIII 결핍, 혈우병 A, 자가면역 호중구감소증, 범혈구감소증, 백혈구감소증, 백혈구 누출을 수반하는 질환, CNS 염증성 장애, 다발성 기관 손상 증후군 예컨대 패혈증, 외상 또는 출혈에 속발성인 것, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트병 또는 베체트 질환, 캐슬만 증후군, 굿패스처 증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐-존슨 증후군, 유천포창 예컨대 수포성 유천포창 및 피부 유천포창, 천포창 (예를 들어 심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 천포창 점액-막 유천포창, 및 홍반성 천포창), 자가면역 다발내분비병증, 라이터병 또는 증후군, 면역 복합체 신염, 항체-매개 신염, 시신경척수염, 다발신경병증, 만성 신경병증 예컨대 IgM 다발신경병증 또는 IgM-매개 신경병증, 혈소판감소증 (예를 들어 심근경색 환자에 의해 발생), 예를 들어 혈전성 혈소판감소성 자반증 (TTP) 및 자가면역 또는 면역-매개 혈소판감소증 예컨대 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP) 예를 들어 만성 또는 급성 ITP, 고환 및 난소의 자가면역 질환 예를 들어 자가면역 고환염 및 난소염, 원발성 갑상선기능저하증, 부갑상선기능저하증, 자가면역 내분비 질환 예를 들어 갑상선염 예컨대 자가면역 갑상선염, 하시모토병, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염), 또는 아급성 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선기능저하증, 그레이브스병, 다선성 증후군 예컨대 자가면역 다선성 증후군 (또는 다선성 내분비병증 증후군), 부신생물성 증후군 예를 들어, 신경학적 부신생물성 증후군 예컨대 램버트-이튼 근무력 증후군 또는 이튼-램버트 증후군, 강직 인간 증후군, 뇌척수염 예컨대 알레르기성 뇌척수염 또는 알레르기 뇌척수염 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 중증 근무력증 예컨대 흥선종-연관 중증 근무력증, 소뇌 변성, 신경근긴장증, 안진전 또는 안진전 근간대경련 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 다초점성 운동 신경병증, 쉬한 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 루푸스양 간염, 거대 세포 간염, 만성 활성 간염 또는 자가면역 만성 활성 간염, 림

프성 간질성 폐렴, 폐쇄성 세기관지염 (비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군, 베르케르병 (IgA 신병증), 특발성 IgA 신병증, 선형 IgA 피부병, 원발성 담즙성 간경변증, 폐경변증, 자가면역 장병증 증후군, 복강병, 복강 질환, 복강 스프루 (글루텐 장병증), 불응성 스프루, 특발성 스프루, 한랭글로불린혈증, 근위축성 측삭 경화증 (ALS; 루게릭병), 관상 동맥 질환, 자가면역 귀 질환 예컨대 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 청력 상실, 안진전 근간대경련 증후군 (OMS), 다발연골염 예컨대 불응성 또는 재발성 다발연골염, 폐포 단백증, 아밀로이드 증, 공막염, 비-암성 림프구증가증, 원발성 림프구증가증 (모노클로날 B 세포 림프구증가증 (예를 들어, 양성 모노클로날 감마글로불린병증 및 의미 불명 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS))) 포함, 말초 신경병증, 부신 생물성 증후군, 채널병증 예컨대 간질, 편두통, 부정맥, 근육 장애, 난청, 실명, 주기성 마비, 및 CNS의 채널병 증, 자폐증, 염증성 근병증, 국소성 분절성 사구체경화증 (FSGS), 내분비 안병증, 포도막망막염, 맥락망막염, 자가면역 간 장애, 섬유근육통, 다발성 내분비 부전, 슈미트 증후군, 부신염, 위 위축, 초로기 치매, 탈수초성 질환 예컨대 자가면역 탈수초성 질환, 당뇨병성 신병증, 드레슬러 증후군, 원형 탈모증, 크레스트 증후군 (석회 증, 레이노 현상, 식도 운동장애, 수지경화증, 및 모세혈관확장증), 남성 및 여성 자가면역 불임, 혼합 결합 조직 질환, 사가스병, 류마티스성 열, 반복 유산, 농부 폐, 다형 홍반, 심장절개후 증후군, 쿠싱 증후군, 조류-사육자 폐, 알레르기성 육아종성 혈관염, 양성 림프구성 혈관염, 알포트 증후군, 폐포염 예컨대 알레르기성 폐포염 및 섬유화 폐포염, 간질성 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈만편모충증, 파동편모충증, 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증, 샴터 증후군, 카플란 증후군, 탕기, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 미만성 간질성 폐 섬유증, 간질성 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭성 섬유증, 안내염, 장기 용기성 홍반, 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 술만 증후군, 펠티 증후군, 사상충증, 모양체염 예컨대 만성 모양체염, 이시성 모양체염, 홍채섬모체염, 또는 푸크 모양체염, 헤노흐-셴라인 자반증, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, 에코 바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파르보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신접종후 증후군, 선천성 풍진 감염, 엡스테인-바르 바이러스 감염, 뎀프스, 에반 증후군, 자가면역 생식선 부전, 시테남 무도병, 스트렙토코쿠스 감염후 신염, 폐쇄성 혈전혈관염, 갑상선종독증, 척수로, 맥락막염, 거대 세포 다발근육통, 내분비 안병증, 만성 과민 폐렴, 건성 각결막염, 유행성 각결막염, 특발성 신염 증후군, 미세 변화 신병증, 양성 가족성 및 허혈-재관류 손상, 망막 자가면역, 관절 염증, 기관지염, 만성 폐쇄성 기도 질환, 규폐증, 아프타, 아프타성 구내염, 동맥경화성 장애, 무정액증, 자가면역 용혈, 뵈크병, 한랭글로불린혈증, 듀피트렌 구축, 수정체 과민 안내염, 알레르기성 장염, 나병 결절성 홍반, 특발성 안면 마비, 만성 피로 증후군, 류마티스성 열, 함만-리치병, 감각신경성 청력 상실, 발작성 혈색소뇨증, 생식선기능저하증, 국한성 회장염, 백혈구감소증, 감염성 단핵구증, 횡단성 척수염, 원발성 특발성 점액부종, 신증, 교감성 안염, 육아종성 고환염, 췌장염, 급성 다발신경근염, 괴저성 농피증, 케르병 갑상선염, 후천성 비장 위축, 항정자 항체로 인한 불임, 비-악성 홍선종, 백반증, SCID 및 엡스타인-바르 바이러스-연관 질환, 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 기생충성 질환 예컨대 리슈만편모충, 독성-쇼크 증후군, 식중독, T 세포의 침윤을 수반하는 상태, 백혈구-부착 결핍, 시토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 연관된 면역 반응, 백혈구 누출을 수반하는 질환, 다발성 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항사구체 기저막 질환, 알레르기성 신경염, 자가면역 다발내분비병증, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역 위축성 위염, 교감성 안염, 류마티스 질환, 혼합 결합 조직 질환, 신증후군, 췌도염, 다발내분비 부전, 말초 신경병증, 제I형 자가면역 다선성 증후군, 성인-발병 특발성 부갑상선기능저하증 (AOIH), 전두 탈모증, 확장성 심근병증, 후천성 수포성 표피박리증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신증후군, 원발성 경화성 담관염, 화농성 또는 비화농성 부비동염, 급성 또는 만성 부비동염, 사골, 전두, 상악, 또는 접형 동염, 호산구-관련 장애 예컨대 호산구증가증, 폐 침윤 호산구증가증, 호산구증가증-근육통 증후군, 괴플러 증후군, 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구증가증, 기관지폐렴성 아스페르길루스증, 아스페르길루스증, 또는 호산구 함유 육아종, 아나필락시스, 혈청음성 척추관절염, 다발내분비 자가면역 질환, 경화성 담관염, 공막, 상공막, 만성 점막피부 칸디다증, 브루튼 증후군, 영아의 일시적 저감마글로불린혈증, 비스코트-알드리치 증후군, 운동실조 모세혈관확장증, 콜라겐 질환과 연관된 자가면역 장애, 류마티즘, 신경계 질환, 허혈성 재관류 장애, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능장애, 혈관확장증, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각과민증, 뇌 허혈, 및 혈관형성을 수반하는 질환, 알레르기성 과민 장애, 사구체신염, 재관류 손상, 심근 또는 다른 조직의 재관류 손상, 급성 염증 요인을 갖는 피부병, 급성 화농성 수막염 또는 다른 중추 신경계 염증성 장애, 안구 및 안와 염증성 장애, 과립구 수혈-연관 증후군, 시토카인-유발 독성, 급성 중증 염증, 만성 난치성 염증, 신우염, 폐경변증, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 대동맥 장애, 동맥내막 증식증, 소화성 궤양, 판막염, 및 자궁내막증을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0184] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 지칭한다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $\text{P}^{32}$ ,



및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 예를 들어 메토크세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삼입제, 효소 및 그의 단편, 예를 들어 뉴클레오티드 분해 효소, 항생제, 및 독소, 예를 들어 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체, 및 본원에 개시된 다양한 항종양제, 항암제 및 화학요법제를 포함하는 것으로 의도된다. 다른 세포독성제는 본원에 기재되어 있다. 종양사멸제는 종양 세포의 파괴를 야기한다.

[0185] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제 예컨대 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)® 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트 예컨대 부술허, 임프로술허 및 피포술허; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 블라타신 및 블라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파론; 라파롤; 콜히친; 베틀린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴(HYCANTIN)®), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코닥티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마 1 (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994)]참조); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물 예컨대 메토크세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시타딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충물 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내추럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오리건주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 탁솔(TAXOL)® 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스킵 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스턴), 아브락산(ABRAXANE)™ 파클리탁셀의 크레모포르-무함유, 알부민-조작된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 일리노이주 샤움버그), 및 탁소테레(TAXOTERE)® 도세탁셀 (룽-프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니); 클로람부실; 겐시타빈 (겐자르(GEMZAR)®); 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토크세이트; 백금 유사체 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 예컨대 레티노산; 카페시타빈 (젤로다(XELODA)®); 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유

도제; 뿐만 아니라 상기 것들 중 2종 이상의 조합, 예컨대 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어인 CHOP, 및 5-FU 및 류코보빈과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴 (ELOXATIN)™)을 사용한 치료 요법에 대한 약어인 FOLFOX를 포함한다.

[0186] 또한, 상기 정의에는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절하거나 감소시키거나 차단하거나 억제하는 작용을 하고, 종종 전신 또는 신체-전반 치료의 형태인 항호르몬제도 포함된다. 이들은 그 자체가 호르몬일 수 있다. 그 예는, 항에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (예를 들어, 놀바텍스(NOLVADEX)® 타목시펜), 에비스타(EVISTA)® 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON)® 토레미펜; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향-조절제 (ERD); 난소를 저해하거나 또는 그의 기능을 정지시키는 기능을 하는 작용제, 예를 들어 황체화 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 효능제, 예컨대 루프론(LUPRON)® 및 엘리가드(ELIGARD)® 류프롤리드 아세테이트, 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트리프테렐린; 다른 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예컨대 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)® 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)® 엑세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)® 보로졸, 페마라(FEMARA)® 레트로졸 및 아리미덱스(ARIMIDEX)® 아나스트로졸을 포함한다. 또한, 화학요법제의 이러한 정의는 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스타크(OSTAC)®), 디드로칼(DIDROCAL)® 에티드로네이트, NE-58095, 조메타(ZOMETA)® 졸레드론산/졸레드로네이트, 포사막스(FOSAMAX)® 알렌드로네이트, 아레디아(AREDIA)® 파미드로네이트, 스킨리드(SKELID)® 텔루드로네이트 또는 악토넬(ACTONEL)® 리세드로네이트; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 연루된 신호전달 경로 중의 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신 및 벡시드(VAXID)® 백신; 루르토테칸(LURTOTECAN)® 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH; 라파티닙 디토실레이트 (GW572016이라고도 공지되어 있는, ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); 및 상기한 것들 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0187] "성장 억제제"가 본원에 사용되는 경우, 이것은 세포의 성장을 시험관내 또는 생체내 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포의 핵분열을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 단계에) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빈카 (예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 타산, 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 또한 S기 정지로 이어질 수 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)] (특히, p. 13)에서 찾아볼 수 있다. 타산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목에서 유래된 항암 약물이다. 유럽형 주목에서 유래된 도세탁셀 (탁소테레®, 롱-프랑 로리)은 파클리탁셀 (탁술®, 브리스톨-마이어스 스쿼프)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜블린 이량체로부터의 미세소관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세소관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제를 야기한다.

[0188] 본원에 사용된 "항암 요법"은 대상체에서 암을 감소시키거나 억제하는 치료를 지칭한다. 항암 요법의 예는 세포독성 방사선요법 뿐만 아니라 대상체에게 치료 유효량의 세포독성제, 화학요법제, 성장 억제제, 암 백신, 혈관신생 억제제, 전구약물, 시토카인, 시토카인 길항제, 코르티코스테로이드, 면역억제제, 항구토제, 항체 또는 항체 단편, 또는 진통제를 투여하는 것을 포함한다.

[0189] 본원에 사용된 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 중양 세포에 덜 세포독성이고, 효소에 의해 활성화되거나 전환되어 더욱 활성인 모 형태가 될 수 있는, 제약 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조한다. 전구약물은 보다 활성의 세포독성의 유리 약물로 전환될 수 있는, 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 펩티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형 전구약물, 글리코실화

전구약물, 베타-락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기 기재된 화학요법제를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0190] 용어 "시토카인"은 세포간 매개자로서 또 다른 세포에 대해 작용하는, 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반 용어이다. 이러한 시토카인의 예는 림포카인, 모노카인 및 통상적인 폴리펩티드 호르몬이다. 시토카인은 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬 (HGH), N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 펠라신; 프로펠라신; 당단백질 호르몬, 예를 들어 여포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체화 호르몬 (LH); 표피 성장 인자 (EGF); 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자 (FGF); 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 물리관 억제 물질; 마우스 고나도트로핀-회합 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예를 들어 NGF-알파; 혈소판-성장 인자; 형질전환 성장 인자 (TGF), 예를 들어 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예를 들어 인터페론-알파, -베타 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터류킨 (IL), 예를 들어 IL-1, IL-1알파, IL-1베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-18; 종양 괴사 인자, 예를 들어 TNF-알파 또는 TNF-베타; 및 LIF 및 kit 리간드 (KL)를 포함하는 다른 폴리펩티드 인자를 포함한다. 본원에 사용된 용어 시토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 시토카인의 생물학적 활성 증가물을 포함한다.

[0191] "시토카인 길항제"는 적어도 하나의 시토카인의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나 또는 중화시키는 분자를 의미한다. 예를 들어, 시토카인 길항제는 시토카인 발현 및/또는 분비의 억제에 의해, 또는 시토카인 또는 시토카인 수용체에의 결합에 의해 시토카인 활성을 억제할 수 있다. 시토카인 길항제는, 항체, 합성 또는 천연-서열 펩티드, 이뮤노어드헤신, 및 시토카인 또는 시토카인 수용체에 결합하는 소분자 길항제를 포함한다. 시토카인 길항제는 임의로 세포독성제와 접합 또는 융합된다. 예시적인 TNF 길항제는 에타네르셉트 (엔브렐(ENBREL)®), 인플릭시맵 (레미케이드(REMICADE)®) 및 아달리무맵 (휴미라(HUMIRA)™)이다.

[0192] 본원에 사용된 용어 "면역억제제"는 치료되는 대상체의 면역계를 저해하거나 또는 차폐하는 작용을 하는 물질을 지칭한다. 이는 시토카인 생성을 저해하거나, 자가-항원 발현을 하향조절 또는 저해하거나, 또는 MHC 항원을 차폐하는 물질을 포함한다. 면역억제제의 예는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘 (미국 특허 번호 4,665,077 참조); 미코페놀레이트 모페틸, 예컨대 셀셉트(CELLCEPT)®; 아자티오프린 (이뮤란(IMURAN)®, 아자산(AZASAN)®/6-메르캅토피린; 브로모크립틴; 다나졸; 답손; 글루타르알데히드 (미국 특허 번호 4,120,649에 기재된 것과 같이 MHC 항원을 차폐함); MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체; 시클로스포린 A; 스테로이드, 예컨대 코르티코스테로이드 및 글루코코르티코스테로이드, 예를 들어 프레드니손, 프레드니솔론, 예컨대 페디아프 레드(PEDIAPRED)® (프레드니솔론 인산나트륨) 또는 오라프레드(ORAPRED)® (프레드니솔론 인산나트륨 경구 용액), 메틸프레드니솔론 및 텍사메타손; 메토크세이트 (경구 또는 피하) (류마트렉스(RHEUMATREX)®, 트렉살(TREXALL)™); 히드록시클로로퀸/클로로퀸; 술파살라진; 레플루노미드; 시토카인 또는 시토카인 수용체 길항제, 예를 들어 항-인터페론- $\gamma$ , - $\beta$  또는 - $\alpha$  항체, 항-종양 괴사 인자- $\alpha$  항체 (인플릭시맵 또는 아달리무맵), 항-TNF  $\alpha$  이뮤노어드헤신 (엔브렐®, 에타너셉트), 항-종양 괴사 인자- $\beta$  항체, 항-인터류킨-2 항체, 및 항-IL-2 수용체 항체; 항-LFA-1 항체, 예를 들어 항-CD11a 및 항-CD18 항체; 항-L3T4 항체; 이중 항-림프구 글로불린; 폴리클로날 또는 pan-T 항체, 또는 모노클로날 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 펩티드 (WO 90/08187); 스트렙토키나제; TGF- $\beta$ ; 스트렙토도르나제; 숙주로부터의 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 데옥시시페르구알린; 라파마이신; T-세포 수용체 (미국 특허 번호 5,114,721 (Cohen et al.)); T-세포 수용체 단편 (문헌 [Offner et al. Science, 251:430-432 (1991)]; WO 90/11294; [Ianeway, Nature 341:482 (1989)] 및 WO 91/01133); T 세포 수용체 항체 (EP 340,109), 예컨대 T10B9; 시클로포스파미드 (시톡산®); 답손; 페닐라민 (쿠프리민(CUPRIMINE)®); 혈장 교환; 또는 정맥내 이뮤노글로불린 (IVIG)을 포함한다. 이들은 단독으로 또는 서로 조합하여, 특히 스테로이드 및 또 다른 면역억제제와 조합하여 사용될 수 있거나, 또는 이러한 조합물에 있어서 스테로이드에 대한 요구를 줄이기 위한 비-스테로이드제를 함유하는 유지 용량으로 사용될 수 있다.

[0193] "진통제"는 대상체에서 통증을 억제 또는 저해시키는 작용을 하는 약물을 지칭한다. 예시적인 진통제는 비-스테로이드성 항-염증성 약물 (NSAID), 예를 들어 이부프로펜 (모트린(MOTRIN)®), 나프록센 (나프로신(NAPROSYN)®), 아세틸살리실산, 인도메타신, 숀린달 및 톨메틴 (그의 염 및 유도체 포함), 뿐만 아니라 발생할 수 있는

자통의 감소에 사용되는 여러 다른 의약, 예를 들어 항경련제 (가바펜틴, 페닐로인, 카르바마제핀) 또는 삼환계 항우울제를 포함한다. 구체적인 예는 아세트아미노펜, 아스피린, 아미트립틸린 (엘라빌(ELAVIL)®), 카르바마제핀 (테그레톨(TEGRETOL)®), 페닐토인 (딜란틴(DILANTIN)®), 가바펜틴 (뉴론틴(NEURONTIN)®), (E)-N-바닐릴-8-메틸-6-논아미드 (캡사이신(CAPSAICIN)®) 또는 신경 차단제를 포함한다.

[0194] "코르티코스테로이드"는 자연 발생 코르티코스테로이드의 효과를 모방하거나 증대시키는, 스테로이드의 일반적인 화학 구조를 갖는 여러가지 합성 또는 자연 발생 물질 중 임의의 것을 지칭한다. 합성 코르티코스테로이드의 예는 프레드니손, 프레드니솔론 (메틸프레드니솔론 포함), 텍사메타손, 트리암시놀론 및 베타메타손을 포함한다.

[0195] 본원에 사용된 "암 백신"은 대상체에서 암에 대한 면역 반응을 자극하는 조성물이다. 전형적으로, 암 백신은 항원에 대한 면역 반응을 추가로 자극 및 부스팅하는 다른 성분 (예를 들어, 아주반트)과 함께, 대상체에 대해 자가유래 (자신으로부터) 또는 동종이형 (다른 것으로부터)일 수 있는 암-관련 물질 또는 세포 (항원)의 공급원으로 구성된다. 암 백신은 대상체의 면역계의 자극을 유발하여 하나 또는 여러 특이적 항원에 대한 항체를 생산하고/거나 이들 항원을 갖는 암 세포를 공격하기 위한 킬러 T 세포를 생산할 수 있다.

[0196] 본원에 사용된 "세포독성 방사선요법"은 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 방사선 요법을 지칭한다. 방사선 요법에는 예를 들어 외부 빔 조사, 또는 방사성 표지된 작용제, 예컨대 항체로의 요법이 포함될 수 있다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{32}\text{P}$ , 및 Lu의 방사성 동위원소)의 사용을 포함하는 것으로 의도된다.

[0197] "대상체"는 척추동물, 예를 들어 포유동물 (예를 들어, 인간)이다. 포유동물은 가축 (예컨대, 소), 스포츠 동물, 애완동물 (예컨대, 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스, 및 래트를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0198] 문맥에 의해 달리 나타낸 경우를 제외하고, 용어 "제1" 폴리펩티드 및 "제2" 폴리펩티드 및 그의 변형은 단순한 일반적 확인자이며, 본 발명의 항체의 특정한 또는 특별한 폴리펩티드 또는 성분을 확인하기 위해 취해진 것이 아니다

[0199] 달리 나타내지 않는 한, 본 실시예에서 언급되는 상업적으로 입수가능한 시약은 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. ATCC 등록 번호에 의해, 하기 실시예 및 명세서 전반에 걸쳐 확인되는 세포의 공급원은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, 버지니아주 마나사스)이다. 달리 언급되지 않는 한, 본 발명은 본원의 상기 및 하기 문헌에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 기술의 표준 절차를 이용한다: 상기 문헌 [Sambrook et al.]; 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1989)]; [Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc, NY, 1990)]; [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988)]; [Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press, Oxford, 1984)]; [Freshney, Animal Cell Culture, 1987]; [Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991].

[0200] 본 명세서 및 특허청구범위 전반에 걸쳐, 용어 "포함하다", 또는 "포함한다" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 언급한 정수 또는 정수 군을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수 군은 배제시키지 않는다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0201] II. 이종다량체 단백질의 구축

[0202] 전형적으로, 본원에 기재된 이종다량체 단백질은 항체 Fc 영역의 중요한 부분을 포함할 것이다. 그러나, 다른 측면에서, 중쇄는 C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 도메인의 일부만을 포함한다.

[0203] 이종다량체화 도메인

[0204] 이종다량체 단백질은 이종다량체화 도메인을 포함한다. 이종다량체 분자의 실질적으로 균질한 집단을 생성하기 위해, 이종다량체화 도메인은 동종다량체보다 이종다량체를 형성하는 것이 강하게 우세해야 한다. 본원에 예시된 이종다량체 단백질은 이종다량체화를 용이하게 하기 위해 노브 인투 홀 기술을 이용하지만, 당업자는 본 발명에 유용한 다른 이종다량체화 도메인을 인식할 것이다.

[0205] 노브 인투 홀



[0206] 다중특이적 항체를 생산하는 방법으로서의 노브 인투 홀의 이용은 당업계에 널리 공지되어 있다. 1998년 3월 34일자로 허여된 미국 특허 번호 5,731,168 (제넨테크에게 양도됨), 2009년 7월 16일자로 공개된 PCT 공보 번호 W02009089004 (암젠에게 양도됨) 및 2009년 7월 16일자로 공개된 미국 특허 공보 번호 20090182127 (노보 노르 디스크 A/S에게 양도됨)을 참조한다. 또한, 문헌 [Marvin and Zhu, Acta Pharmacologica Sincia (2005) 26(6):649-658] 및 [Kontermann (2005) Acta Pharacol. Sin., 26:1-9]을 참조한다. 간략한 논의가 본원에 제공된다.

[0207] "돌출부"는, 제1 폴리펩티드의 인터페이스로부터 돌출하여 이중다량체를 안정화하도록 인접한 인터페이스 (즉, 제2 폴리펩티드의 인터페이스)에 있는 상보적 함몰부에 위치가능하고 따라서 예를 들어 동중다량체 형성에 비해 이중다량체 형성이 유리한, 하나 이상의 아미노산 측쇄를 지칭한다. 돌출부는 본래 인터페이스에 존재할 수 있거나, 또는 합성적으로 (즉, 인터페이스를 코딩하는 핵산을 변경하여) 도입될 수 있다. 통상적으로, 제1 폴리펩티드의 인터페이스를 코딩하는 핵산을 돌출부를 코딩하도록 변경한다. 이를 달성하기 위해, 제1 폴리펩티드의 인터페이스에 있는 하나 이상의 "본래" 아미노산 잔기를 코딩하는 핵산을, 본래 아미노산 잔기보다 큰 측쇄 용적을 갖는 하나 이상의 "유입" 아미노산 잔기를 코딩하는 핵산으로 대체한다. 하나 초과와 본래 및 상응하는 유입 잔기가 있을 수 있음을 인식할 것이다. 대체되는 본래 잔기의 수에 대한 상한은 제1 폴리펩티드의 인터페이스에 있는 총 잔기의 수이다. 다양한 아미노산 잔기의 측쇄 용적이 하기 표에 나타나 있다.

표 1

아미노산 잔기의 특성

아미노산	1-문자 약어	질량 <sup>a</sup> (달톤)	부피 <sup>b</sup> (옹스트롬 <sup>3</sup> )	접근가능한 표면적 <sup>c</sup> (옹스트롬 <sup>2</sup> )
알라닌 (Ala)	A	71.08	88.6	115
아르기닌 (Arg)	R	156.20	173.4	225
아스파라긴 (Asn)	N	114.11	117.7	160
아스파르트산 (Asp)	D	115.09	111.1	150
시스테인 (Cys)	C	103.14	108.5	135
글루타민 (Gln)	Q	128.14	143.9	180
글루탐산 (Glu)	E	129.12	138.4	190
글리신 (Gly)	G	57.06	60.1	75
히스티딘 (His)	H	137.15	153.2	195
이소류신 (Ile)	I	113.17	166.7	175
류신 (Leu)	L	113.17	166.7	170
리신 (Lys)	K	128.18	168.6	200
메티오닌 (Met)	M	131.21	162.9	185
페닐알라닌 (Phe)	F	147.18	189.9	210
프롤린 (Pro)	P	97.12	122.7	145
세린 (Ser)	S	87.08	89.0	115
트레오닌 (Thr)	T	101.11	116.1	140
트립토판 (Trp)	W	186.21	227.8	255
티로신 (Tyr)	Y	163.18	193.6	230
발린 (Val)	V	99.14	140.0	155

<sup>a</sup> 아미노산 분자량 - 물 분자량. 문헌 [Handbook of Chemistry and Physics, 43rd ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961]로부터의 값.

<sup>b</sup> 문헌 [A.A. Zamyatin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972]로부터의 값.

<sup>c</sup> 문헌 [C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975]로부터의 값.

접근가능한 표면적은 상기 참고문헌의 도 6-20에 정의되어 있다.

[0208]

[0209]

돌출부를 형성하기 위한 바람직한 유입 잔기는 일반적으로 자연 발생 아미노산 잔기이며, 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y) 및 트립토판 (W)으로부터 선택된다. 가장 바람직한 잔기는 트립토판 및 티로신이다. 한 실시양태에서, 돌출부를 형성하기 위한 본래 잔기는 작은 측쇄 용적을 갖는다 (예컨대, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글리신, 세린, 트레오닌 또는 발린).

[0210]

"함몰부"는 제2 폴리펩티드의 인터페이스로부터 후퇴되어 제1 폴리펩티드의 인접한 인터페이스에 있는 상응하는 돌출부를 수용하는 하나 이상의 아미노산 측쇄를 지칭한다. 함몰부는 본래 인터페이스에 존재할 수 있거나, 또는 합성적으로 (예를 들어 인터페이스를 코딩하는 핵산을 변경하여) 도입될 수 있다. 통상적으로, 제2 폴리펩티드의 인터페이스를 코딩하는 핵산을 함몰부를 코딩하도록 변경한다. 이를 달성하기 위해, 제2 폴리펩티드의 인터페이스에 있는 하나 이상의 "본래" 아미노산 잔기를 코딩하는 핵산을, 본래 아미노산 잔기보다 작은 측쇄

용적을 갖는 하나 이상의 "유입" 아미노산 잔기를 코딩하는 DNA로 대체한다. 하나 초과와 본래 및 상응하는 유입 잔기가 있을 수 있다. 대체되는 본래 잔기의 수에 대한 상한은 제2 폴리펩티드의 인터페이스에 있는 총 잔기의 수이다. 다양한 아미노산의 측쇄 용적이 상기 표 1에 나타나 있다. 함몰부를 형성하기 위한 바람직한 유입 잔기는 통상적인 자연 발생 아미노산 잔기이며, 바람직하게는 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T) 및 발린 (V)으로부터 선택된다. 가장 바람직한 잔기는 세린, 알라닌 또는 트레오닌이다. 한 실시양태에서, 함몰부를 형성하기 위한 본래 잔기는 큰 측쇄 용적을 갖는다 (예컨대, 티로신, 아르기닌, 페닐알라닌 또는 트립토판).

[0211] "본래" 아미노산 잔기는 본래 잔기보다 작거나 큰 측쇄 용적을 가질 수 있는 "유입" 잔기에 의해 대체되는 것이다. 유입 아미노산 잔기는 자연 발생 또는 비-자연 발생의 아미노산 잔기일 수 있으나, 바람직하게는 자연 발생 아미노산 잔기이다. "자연 발생" 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해 코딩되고 상기 표 1에 열거된 잔기이다. "비-자연 발생" 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해 코딩되지 않으나 폴리펩티드쇄 내에서 인접한 아미노산 잔기(들)에 공유적으로 결합할 수 있는 잔기를 지칭한다. 비-자연 발생 아미노산 잔기의 예는, 예를 들어 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린 및 문헌 [Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)]에 기재된 것과 같은 기타 아미노산 잔기 유사체이다. 이러한 비-자연 발생 아미노산 잔기를 생성하기 위해서, 문헌 [Noren et al. Science 244: 182 (1989)] 및 상기 문헌 [Ellman et al.]의 절차가 이용될 수 있다. 간략하게, 이는 비-자연 발생 아미노산 잔기를 사용한 억제제 tRNA의 화학적 활성화, 후속의 시험관 내 전사 및 RNA의 번역을 포함한다. 본 발명의 방법은 하나 이상의 본래 아미노산 잔기를 대체하는 것을 포함하나, 하나 초과와 본래 잔기가 대체될 수도 있다. 통상적으로, 제1 또는 제2 폴리펩티드의 인터페이스에 있는 총 잔기 개수를 넘지 않는 잔기가 대체된 본래 아미노산 잔기를 포함할 것이다. 전형적으로, 대체를 위한 본래 잔기는 "매장된다". "매장된"은 잔기가 본질적으로 용매에 접근가능하지 않다는 것을 의미한다. 일반적으로, 유입 잔기는 가능한 산화를 방지하거나 디설파이드 결합이 쌍을 이루지 못하는 것을 방지하기 위해, 시스테인이 아니다.

[0212] 돌출부는 함몰부에 "위치가능"하며, 이는, 각각 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드의 인터페이스에 있는 돌출부 및 함몰부의 공간적 배치 및 돌출부 및 함몰부의 크기가, 돌출부가 인터페이스에서 제1 및 제2 폴리펩티드의 정상적 회합을 유의하게 방해하지 않으면서 함몰부에 위치될 수 있도록 한다는 것을 의미한다. 돌출부, 예컨대 Tyr, Phe 및 Trp는 전형적으로 인터페이스의 측으로부터 수직으로 연장되지 않고 바람직한 입체형태를 갖기 때문에, 돌출부의 상응하는 함몰부와와의 정렬은 X-선 결정학 또는 핵 자기공명 (NMR)에 의해 수득되는 구조와 같은 3차원 구조에 기초된 돌출부/함몰부 쌍을 모델링하는 것에 의존한다. 이는 당업계에 널리 수용되는 기술을 이용하여 달성될 수 있다.

[0213] "본래 또는 주형 핵산"은 돌출부 또는 함몰부를 코딩하기 위해 "변경" (즉, 유전자 조작 또는 돌연변이)될 수 있는 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 의미한다. 본래 또는 출발 핵산은 자연 발생 핵산일 수 있거나, 앞서 변경된 핵산을 포함할 수 있다 (예컨대, 인간화 항체 단편). 핵산의 "변경"은 본래 핵산이 관심 아미노산 잔기를 코딩하는 하나 이상의 코돈을 삽입, 결실 또는 대체에 의해 돌연변이시키는 것을 의미한다. 일반적으로, 본래 잔기를 코딩하는 코돈은 유입 잔기를 코딩하는 코돈으로 대체된다. DNA를 이러한 방식으로 유전자 변형하는 기술이 문헌 [Mutagenesis: a Practical Approach, M.J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK. (1991))]에서 검토되었으며, 예를 들어 부위-지정 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발 및 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 돌연변이유발을 포함한다. 본래/주형 핵산을 돌연변이시킴으로써, 본래/주형 핵산에 의해 코딩되는 본래/주형 폴리펩티드가 상응하게 변경된다.

[0214] 돌출부 또는 함몰부는 합성적 수단, 예를 들어 재조합 기술, 시험관 내 펩티드 합성, 앞서 기재된 비-자연 발생 아미노산 잔기의 도입을 위한 기술, 펩티드의 효소적 또는 화학적 커플링 또는 이들 기술의 일부 조합에 의해 제1 또는 제2 폴리펩티드의 인터페이스로 "도입"될 수 있다. 따라서, "도입되는" 돌출부 또는 함몰부는 "비-자연 발생" 또는 "비-천연"의 것이며, 이는 자연에 또는 본래 폴리펩티드에 존재하지 않는다는 것을 의미한다 (예컨대, 인간화 모노클로날 항체).

[0215] 일반적으로, 돌출부를 형성하기 위한 유입 아미노산 잔기는 상대적으로 적은 수 (예컨대, 약 3 내지 6개)의 "회전이성질체"를 갖는다. "회전이성질체"는 아미노산 측쇄의 에너지적으로 유리한 입체형태이다. 다양한 아미노산 잔기의 회전이성질체의 수가 문헌 [Ponders and Richards, J. Mol. Biol. 193: 775-791 (1987)]에 검토되어 있다.

[0216] III. 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

[0217] 본 발명의 이종다량체 단백질 (예를 들어, 항체)의 재조합 생산을 위해, 이를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 (DNA 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터에 삽입한다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 절차를



이용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리 및 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 따라 달라진다. 일반적으로, 바람직한 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 (일반적으로 포유동물, 그러나 또한 진균 (예를 들어, 효모), 곤충, 식물, 및 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포) 기원의 것이다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이같은 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있음을 인지할 것이다.

[0218] a. 원핵 숙주 세포를 사용한 이종다량체 단백질의 생성

[0219] i. 벡터 구축

[0220] 본 발명의 이종다량체 단백질 (예를 들어, 항체)의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 표준 재조합 기술을 이용하여 얻을 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오타이드 서열은, 예를 들어 항체 생산 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 단리되어 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 일단 수득된 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵 숙주에서 이종 폴리뉴클레오타이드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가 가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적에 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따라 달라질 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이종 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 함유한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이종 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0221] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 상기 숙주에 대하여 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 마킹 서열을 포함한다. 예를 들어, 이. 콜라이는 전형적으로 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 암피실린 (Amp) 및 테트라시클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지 또한 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유할 수 있거나, 또는 상기 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et al.)에 상세하게 기재되어 있다.

[0222] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파지 벡터를 상기 숙주에 대한 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예컨대 λGEM.TM.-11이 이. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포의 형질전환에 사용될 수 있는 재조합 벡터의 제조에 이용될 수 있다.

[0223] 본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 시스트론의 발현을 조정하는, 시스트론의 상류 (5')에 위치하는 비번역 조절 서열이다. 원핵세포 프로모터는 전형적으로 두 클래스의 프로모터, 즉 유도성 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재, 또는 온도의 변화에 반응하여 그의 제어 하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.

[0224] 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 수많은 프로모터가 널리 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써, 예를 들어 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이종 프로모터를 둘 다 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.

[0225] 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터에는 PhoA 프로모터, β-갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 또는 trc 프로모터가 포함된다. 그러나, 박테리아에서 기능적인 다른 프로모터 (예컨대, 다른 공지의 박테리아 또는 파지 프로모터)도 적합하다. 이들의 뉴클레오타이드 서열은 공개되어 있고, 따라서 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하기 위한 링커 또는 어댑터를 사용하여 이들 서열을 이종다량체 단백질의 유전자, 예를 들어 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이션시킬 수 있다 (문헌 [Siebenlist et al., (1980) Cell 20: 269]).

- [0226] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택되는 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이중 폴리펩티드에 천연인 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 않는 원핵생물 숙주 세포의 경우, 신호 서열이, 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵생물 신호 서열로 치환된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 발현 시스템의 시스트론 둘 모두에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.
- [0227] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이뮤노글로불린의 생산은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으며, 따라서 각 시스트론 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고, 어셈블리되어, 세포질 내에서 기능적 이뮤노글로불린을 형성한다. 특정 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이  $trxB^-$  균주)는 디설피드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 적절한 폴딩 및 어셈블리를 허용한다. 문헌 [Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)]을 참조한다.
- [0228] 본 발명의 이중다량체 단백질 (예를 들어, 항체)의 발현에 적합한 원핵 숙주 세포에는 고세균 및 진정세균, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체가 포함된다. 유용한 박테리아의 예에는 에스케리키아(*Escherichia*) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실루스(*Bacilli*) (예를 들어, 비. 서브틸리스(*B. subtilis*)), 엔테로박테리아, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 중 (예를 들어, 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 시겔라(*Shigella*), 리조비아(*Rhizobia*), 비트레오실라(*Vitreoscilla*) 또는 파라코쿠스(*Paracoccus*)가 포함된다. 한 실시양태에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예로는 유전자형 W3110  $\Delta fhuA$  ( $\Delta tonA$ )  $ptr3$   $lac Iq$   $lacL8$   $\Delta ompT$   $\Delta (nmpc-fepE)$   $degP41$   $kan^R$ 을 갖는 균주 33D3 (미국 특허 번호 5,639,635)을 비롯한, 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체가 포함된다. 다른 균주 및 그 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이<sub>X</sub> 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이  $\Delta lpp$ 가 특히 유용하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다. 규정된 유전자형을 갖는 임의의 상기 언급된 박테리아의 유도체를 구축하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내의 레플리콘의 복제능을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKN410과 같은 널리 공지된 플라스미드를 사용하여 레플리콘을 공급하는 경우에는, 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제가 바람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.
- [0229] ii. 폴리펩티드 생산
- [0230] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.
- [0231] 형질전환은 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 구성요소에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 사용되는 또 다른 기술은 전기천공이다.
- [0232] 본 발명의 폴리펩티드를 생산하는데 사용되는 원핵세포를 당업계에 공지되어 있는, 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예에는 필수 영양 보충물이 부가된 루리아(Luria) 브로쓰 (LB)가 포함된다. 일부 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구조를 기초로 하여 선택된 선택제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.
- [0233] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로, 또는 복합 질소 공급

원과 같은 또 다른 보충물 또는 배지와와의 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트릴 및 디티오트레이톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 환원제를 함유할 수 있다.

[0234] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 이. 콜라이 성장을 위해, 바람직한 온도 범위는 예를 들어 약 20 °C 내지 약 39 °C, 보다 바람직하게는 약 25 °C 내지 약 37 °C, 보다 더 바람직하게는 약 30 °C이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이의 경우, pH는 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4, 보다 바람직하게는 약 7.0이다.

[0235] 유도성 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사의 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도용의 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 바람직하게는, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당 업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구축물에 따라 다양한 다른 유도제가 사용될 수 있다.

[0236] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 힌지-함유 숙주 세포는 개별적으로 배양되고, 발현된 본 발명의 폴리펩티드는 개별적으로 숙주 세포의 원형질막공간 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 제2 실시양태에서, 제1 및 제2 힌지-함유 숙주 세포는 개별적으로 배양되고, 힌지-함유 폴리펩티드의 단리 전에, 두 숙주 세포 배양물을 함께 혼합하고, 세포를 펠릿화한다. 제3 실시양태에서, 제1 및 제2 힌지-함유 숙주 세포는 개별적으로 배양되고, 개별적으로 원심분리 및 재현탁되고, 이어서 힌지-함유 폴리펩티드를 단리하기 전에 혼합한다. 제4 실시양태에서, 제1 및 제2 힌지-함유 숙주 세포는 동일한 배양 용기에서 함께 배양된다. 전형적으로, 단백질 회수는 일반적으로 삼투압 충격, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물 세포막을 파괴하는 것을 포함한다. 세포가 파괴되면, 세포 파편 또는 전체 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질은 예를 들어 친화성 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 대안적으로, 단백질을 배양 배지 내로 옮기고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상청액을 여과하고 농축하여 생산된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 추가로 단리하고 확인할 수 있다. 단리된 폴리펩티드는 이종다량체 단백질을 생산하는데 사용될 것이다.

[0237] 본 발명의 한 측면에서, 이종다량체 단백질 (예를 들어, 항체) 생산은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 발효 절차가 제조할 단백질의 생산에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 이들 발효기는 산소 및 영양소, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키기 위해 교반기 임펠러를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 용적이 대략 100 리터 이하인 발효기 내에서의 발효를 지칭하는데, 이는 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.

[0238] 발효 과정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건 하에서 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD<sub>550</sub>으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 정지기에 있다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구축물에 따라 다양한 유도제를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50 시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.

[0239] 본 발명의 폴리펩티드의 생산 수율 및 품질을 향상시키기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 이종다량체 단백질 (예를 들어, 항체)의 적당한 어셈블리와 폴딩을 개선시키기 위해, 샤페론 단백질, 예를 들어 Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 활성을 갖는 펩티딜프롤릴 시스,트랜스-이소머라제)를 과다발현하는 추가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵세포를 공동-형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생산된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다. 문헌 [Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605]; 미국 특허 번호 6,083,715 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 6,027,888 (Georgiou et al.); 문헌 [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210].

[0240] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질분해에 감수성인 단백질)의 단백질분해를 최소화하기 위해, 단백질분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주를 변형시켜, 공지된 박테리아 프로테아제, 예를 들어 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V,

프로테아제 VI 및 그의 조합물을 코딩하는 유전자에서 유전적 돌연변이(들)를 수행할 수 있다. 몇몇 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하며, 예를 들어 문헌 [Joly et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2773-2777]; 미국 특허 번호 5,264,365 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 5,508,192 (Georgiou et al.); 문헌 [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)]에 기재되어 있다.

[0241] 한 실시양태에서, 단백질을 효소가 결핍되고 1종 이상의 사포닌 단백질을 과다발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로 사용된다. 제2 실시양태에서, 이. 콜라이 균주는 외부 막의 지단백질이 결핍된다 ( $\Delta lpp$ ).

[0242] iii. 이종다량체 단백질 정제

[0243] 한 실시양태에서, 추가적인 검정 및 용도를 위한 실질적으로 균질한 제제를 수득하기 위해 본원에서 생산된 항체 단백질을 추가로 정제하였다. 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예시이다: 면역친화성 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어 세파덱스(Sephadex) G-75를 이용한 겔 여과.

[0244] 한 측면에서, 고체 상에 고정된 단백질 A가, 예를 들어 본 발명의 전장 항체 생성물의 면역친화성 정제에 사용된다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역에 고 친화도로 결합하는 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터의 41 kD 세포벽 단백질이다. 문헌 [Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]. 단백질 A가 고정되는 고체 상은 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 보다 바람직하게는 제어된 공극 유리 칼럼 또는 규산 칼럼이다. 일부 용도에서, 오염물의 비특이적 부착을 방지하기 위하여 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅한다.

[0245] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양물로부터 유래된 제제를 단백질 A 고정된 고체 상에 적용하여 관심 항체가 단백질 A에 특이적으로 결합하게 할 수 있다. 그 후, 고체 상을 세척하여 고체 상에 비-특이적으로 결합된 오염물을 제거한다. 이종다량체 단백질 (예를 들어 항체)을 고체 상으로부터 용리에 의해 회수한다.

[0246] b. 진핵 숙주 세포를 사용한 이종다량체 단백질의 생성:

[0247] 벡터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

[0248] i. 신호 서열 성분

[0249] 진핵 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열, 또는 관심 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 바람직하게 선택된 이종 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 포유동물 세포 발현시에는, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스성 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다. 이러한 전구체 영역을 위한 DNA는 목적 이종다량체 단백질(들) (예를 들어, 항체)을 코딩하는 DNA에 리딩 프레임으로 라이게이션된다.

[0250] ii. 복제 기점

[0251] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 대해서는 필요하지 않다. 예를 들어, SV40 기점은 단지 초기 프로모터를 포함하기 때문에 일반적으로 사용될 수 있다

[0252] iii. 선택 유전자 성분

[0253] 발현 및 클로닝 벡터는 선택 마커라고도 불리는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토평렉세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 관련이 있는 경우에는 영양요구성 결핍을 보충하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0254] 선택 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이종 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포들은 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선택 계획에서 생존한다. 이러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히드로마이신을 사용한다.



- [0255] 포유동물 세포에 적합한 선택 마커의 또 다른 예는 항체 핵산을 취하는 세포 성분의 확인을 가능하게 하는 것, 예컨대 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.
- [0256] 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포는 우선 DHFR의 경쟁 길항제인 메토틱세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인한다. 야생형 DHFR을 사용할 때의 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결핍된 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.
- [0257] 대안적으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질, 및 또 다른 선택 마커 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스페라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질감염되거나 공동-형질감염된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)를, 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418과 같은 선택 마커에 대한 선택제를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택할 수 있다. 예를 들어 미국 특허 번호 4,965,199를 참조한다.
- [0258] iv. 프로모터 성분
- [0259] 발현 및 클로닝 벡터는 대체로 숙주 유기체에 의해 인식되고 목적하는 힌지-함유 폴리펩티드(들) (예를 들어, 항체) 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 출발점으로부터 70 내지 80개 염기 상류에 존재하는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 대부분의 진핵세포 유전자의 3' 말단에 존재한다. 모든 이러한 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.
- [0260] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터 목적하는 힌지-함유 폴리펩티드(들) (예를 들어, 항체)의 전사는 프로모터가 숙주 세포계와 상용성이라면, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예를 들어 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스의 게놈으로부터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터로부터, 또는 열 충격 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 제어된다.
- [0261] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득된다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키기 위한 시스템이 미국 특허 번호 4,419,446에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형이 미국 특허 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 단순 포진 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포에서의 인간  $\beta$ -인터페론 cDNA의 발현에 대해서는 또한 문헌 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복체를 프로모터로 사용할 수 있다.
- [0262] v. 인핸서 요소 성분
- [0263] 고등 진핵생물에 의한 목적 힌지-함유 폴리펩티드(들) (예를 들어, 항체)를 코딩하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가시킬 수 있다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (예를 들어, 글로빈, 엘라스타제, 알부민,  $\alpha$ -페토단백질 및 인슐린 유전자)로부터 공지되어 있다. 또한, 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 수 있다. 그 예는 복제 기점의 후측 (bp 100-270)의 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 후측의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 진핵 프로모터의 활성화를 향상시키기 위한 요소의 설명에 대해서는 또한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 향상이 달성되는 한, 인핸서는 위치 5' 또는 3'에서 항체 폴리펩티드 코딩 서열까지 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 일반적으로 프로모터부터 부위 5'에 위치한다.
- [0264] vi. 전사 종결 성분
- [0265] 진핵 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 전형적으로 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열 또한 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 유용한 전사 종결 성분 중 하나는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다.

W094/11026 및 여기에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0266] vii. 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0267] 본원의 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포에는 척추동물 숙주 세포를 비롯한 본원에 기재된 고등 진핵세포가 포함된다. 배양 (조직 배양)시의 척추동물 세포의 증식은 상용 절차가 되었다. 유용한 포유 동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 또는 현탁 배양하에 성장하도록 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이나이즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주 (Hep G2)이다.

[0268] 숙주 세포를 목적 힌지-함유 폴리펩티드(들) (예를 들어, 항체) 생산을 위한 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나 형질전환체를 선택하거나 목적 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 통상의 영양 배지에서 배양한다.

[0269] viii. 숙주 세포의 배양

[0270] 본 발명의 목적 힌지-함유 폴리펩티드(들) (예를 들어, 항체)를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 배지, 예컨대 햅 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM) (시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM) (시그마)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 재허여 30,985에 기재된 배지들 중 임의의 배지를 숙주 세포용 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지에는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 겐타마이신(GENTAMYCIN)<sup>TM</sup> 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원이 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수도 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 이용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0271] ix. 이종다량체 단백질의 정제

[0272] 제조합 기술을 사용할 때, 힌지-함유 폴리펩티드는 세포 내에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 힌지-함유 폴리펩티드가 세포 내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서 입자형 파편인 숙주 세포 또는 용해된 단편을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 힌지-함유 폴리펩티드가 배지로 분비되는 경우, 일반적으로는 우선 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 상업적으로 입수가 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 단백질 분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0273] 세포로부터 제조된 이종다량체 조성물은, 예를 들어 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있는데, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 인간  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  또는  $\gamma 4$  중쇄를 기초로 한 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간  $\gamma 3$ 에 대해 추천된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 공극이 제어된 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스보다 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유량 및 더 짧은 프로세싱 시간을 가능하게 한다. 항체가 C<sub>H</sub>3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX<sup>TM</sup> 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수할 항체에 따라, 단백질 정제를 위한

다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스™ 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 이용될 수도 있다.

[0274] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물을 대상으로, pH 약 2.5 내지 4.5의 용리 완충제를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어 약 0 내지 0.25M 염)에서 수행되는 저 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피를 실시할 수 있다. 이종다량체 단백질의 생산은 (임의의 상기 특정 방법에) 대안적으로 또는 추가적으로 폴리펩티드의 혼합물을 포함하는 용액을 투석하는 것을 포함한다.

[0275] x. 바큇로바이러스를 사용한 항체 생산

[0276] 재조합 바큇로바이러스는, 예를 들어 리포펙틴 (깁코-BRL(GIBCO-BRL)로부터 상업적으로 입수가능함)을 사용하여 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 플라스미드 및 바큇로골드(BaculoGold)™ 바이러스 DNA (파밍겐(Pharmingen))를 곤충 세포, 예를 들어 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포 (예를 들어, Sf9 세포; ATCC CRL 1711) 또는 드로소필라 멜라노가스터(Drosophila melanogaster) S2 세포 내로 동시-형질감염시킴으로써 생성될 수 있다. 특정 예에서, 항체 서열은 바큇로바이러스 발현 벡터 내에 함유된 에피토프 태그의 상류에 융합된다. 상기 에피토프 태그는 폴리-His 태그를 포함한다. 상업적으로 입수가능한 플라스미드, 예를 들어 pVL1393 (노바겐(Novagen)) 또는 pAcGP67B (파밍겐)로부터 유래된 플라스미드를 비롯하여 다양한 플라스미드가 사용될 수 있다. 간단히 설명하면, 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 서열은 5' 및 3' 영역에 상보성인 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 증폭될 수 있다. 5' 프라이머는 측면에 접하는 (선택된) 제한 효소 부위를 포함할 수 있다. 이어서, 생성물을 선택된 제한 효소로 소화시키고, 발현 벡터 내로 서브클로닝시킨다.

[0277] 발현 벡터로 형질감염시킨 후, 숙주 세포 (예를 들어, Sf9 세포)를 28℃에서 4-5일 동안 인큐베이팅하고, 방출된 바이러스를 수확하고 추가의 증폭을 위해 사용한다. 바이러스 감염 및 단백질 발현은 예를 들어 문헌 [O'Reilley et al. (Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. Oxford: Oxford University Press (1994))]에 설명된 바와 같이 수행할 수 있다.

[0278] 이어서, 발현된 폴리-His 태깅된 항체를, 예를 들어 다음과 같이 Ni<sup>2+</sup>-킬레이트 친화성 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 추출물을 문헌 [Rupert et al. (Nature, 362:175-179 (1993))]에 기재된 바와 같이 재조합 바이러스-감염 Sf9 세포로부터 제조할 수 있다. 간단히 설명하면, Sf9 세포를 세척하고, 초음파처리 완충제 (25 mL HEPES pH 7.9; 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1 mM EDTA; 10% 글리세롤; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl) 내에 재현탁하고, 얼음 상에서 20초 동안 2회 초음파처리한다. 초음파처리물을 원심분리에 의해 청정화하고, 상청액을 로딩 완충제 (50 mM 포스페이트, 300 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 7.8) 내에 50배 희석하고, 0.45 μm 필터를 통해 여과한다. Ni<sup>2+</sup>-NTA 아가로스 칼럼 (키아젠(Qiagen)으로부터 상업적으로 입수가능함)을 5 mL의 층 부피로 제조하고, 25 mL의 물로 세척하고, 25 mL의 로딩 완충제로 평형화시킨다. 여과된 세포 추출물을 분 당 0.5 mL로 칼럼에 로딩한다. 칼럼을 로딩 완충제로 A280 기준선까지 세척하고, 이 시점에서 분획 수집을 시작하였다. 이어서, 칼럼을 비특이적으로 결합된 단백질을 용리시키는 2차 세척 완충제 (50 mM 포스페이트, 300 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 6.0)로 세척한다. 다시 A280 기준선에 도달한 후, 칼럼을 2차 세척 완충제에서 0 → 500 mM 이미다졸 구배로 전개시킨다. 분획 1 mL를 수집하고, SDS-PAGE 및 은 염색 또는 알칼리성 포스포타제에 접합된 Ni<sup>2+</sup>-NTA (키아젠)로의 웨스턴 블롯에 의해 분석한다. 용리된 His<sub>10</sub>-태깅된 항체를 함유하는 분획을 모으고 로딩 완충제에 대해 투석한다.

[0279] 대안적으로, 항체의 정제는 공지의 크로마토그래피 기술, 예를 들어 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 수행할 수 있다. 한 실시양태에서, 관심 항체는 무질서유발제 또는 연성 세제를 함유하는 용액 내로 용리에 의해 칼럼의 고체 상으로부터 회수할 수 있다. 예시적인 무질서유발제 및 연성 세제는 구아니딘-HCl, 우레아, 리튬 퍼클로레이트, 아르기닌, 히스티딘, SDS (나트륨 도데실 술페이트), 트윈, 트리톤 및 NP-40을 포함하지만 이에 제한되지는 않고, 이들은 모두 상업적으로 입수가능하다.

[0280] IV. 이종다량체 단백질 형성/어셈블리

[0281] 완전한 이종다량체 단백질의 형성은 본 발명에서 리폴딩으로서 지칭되는 디설피드 결합 형성에 의한 제1 및 제2 힌지-함유 폴리펩티드의 재어셈블리를 포함한다. 리폴딩은 제1 힌지-함유 폴리펩티드와 제2 힌지-함유 폴리펩티드의 회합, 및 쇄간 디설피드 결합의 형성을 포함한다. 본 발명에서 리폴딩 (또한 탈변성이라 불림)은 시험 관내에서 환원제의 첨가 없이 수행된다.

[0282] 숙주 세포는 별개의 배양물로서 또는 단일 배양물로서 상기 기재된 방법을 이용하여 배양될 수 있다. 한 방법

에서, 제1 숙주 세포 및 제2 숙주 세포를 동일한 배양 용기에서 성장시킨다 (본원에서 때때로 공동-배양 또는 혼합 배양으로 지칭됨). 또 다른 방법에서, 제1 및 제2 숙주 세포를 별개의 배양 용기에서 성장시킨다. 한 방법에서, 세포 막을 파괴하기 전에, 별개의 배양물을 개별적으로 처리하고 이어서 혼합/조합한다. 또 다른 방법에서, 세포 막을 파괴하기 전에, 별개의 배양물을 혼합하고 이어서 처리한다. 한 방법에서, 세포 막을 파괴하기 전에, 별개의 배양물을 추가 처리 없이 혼합한다. 한 방법에서, 세포 막을 파괴하기 전에, 제1 및 제2 숙주 세포를 포함하는 단일 배양물을 처리한다. 또 다른 방법에서, 세포 막의 파괴 전에, 공동-배양된 세포를 처리하지 않는다. 세포의 처리는 원심분리 및 적절한 완충제 (예를 들어, 추출 완충제) 중의 재현탁을 포함한다.

[0283] 추출 완충제는 당업계에 공지되어 있고, 당업자는 과도한 실험 없이 사용할 완충제를 결정할 수 있을 것이다.

[0284] 숙주 세포 막은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 파괴된다. 이러한 방법은 세포 막 투과화 및 세포 막 붕괴를 포함한다. 세포 막 투과화는, 예를 들어 세포가 생존 상태로 유지되도록 막의 전체적 완전성을 파괴하지 않으면서 물을 도입함으로써, 막이 "누출"되도록 하는 것을 지칭한다. 즉, 투과화는 세포 막을 가로지르는 거대분자 운동을 제공하고, 세포 생존율이 지속되도록 하는데 충분히 세포 구조를 보존한다. 대조적으로, 세포 막 붕괴는 세포 내용물이 세포외 환경으로 방출되도록 하고, 세포 사멸을 유발한다.

[0285] 세포 막을 파괴하는 방법은 효소적 용해, 초음파처리, 삼투압 충격, 마이크로플루이다이어를 통한 통과, EDTA의 첨가, 다양한 세제, 용매 (예컨대, 톨루엔, 디메틸 술폰 등), 계면활성제 (예컨대, 트리톤-X 100, 트윈 20 등), 저장성 완충제의 사용, 냉동/해동 기술의 이용, 전기천공, 및 스테인레스 스틸 볼 균질화기를 통한 통과를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0286] 힌지-함유 폴리펩티드가 (투과화 또는 붕괴에 의해) 세포로부터 방출되면 이종다량체화 도메인은 이종다량체 단백질의 회합을 유도할 것이다. 회합된 힌지-함유 폴리펩티드의 쇠간 디설피드 형성은 환원제의 첨가 없이 진행된다. 이어서, 생성된 디설피드 연결된 이종다량체 단백질을 정제한다. 임의로, 이를 연구, 진단, 치료 또는 다른 목적을 위해 제제화할 수 있다.

[0287] V. 표적 분자

[0288] 본 발명의 이종다량체 단백질에 의해 표적화될 수 있는 분자의 예는 가용성 혈청 단백질 및 그의 수용체 및 다른 막 결합 단백질 (예를 들어, 어드헤신)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0289] 또 다른 실시양태에서 본 발명의 이종다량체 단백질은 BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, IGF1, IGF2, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNB1, IFNG, IFNW1, FEL1, FEL1 (엠펙셀론 (EPSELON)), FEL1 (제타(ZETA)), IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL17B, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, PDGFA, PDGFB, TGFA, TGFBI, TGFBI2, TGFBI3, LTA (TNF-b), LTB, TNF (TNF-a), TNFSF4 (OX40 리간드), TNFSF5 (CD40 리간드), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27 리간드), TNFSF8 (CD30 리간드), TNFSF9 (4-1BB 리간드), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, HGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, IL1R1, IL1R2, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL20RA, IL21R, IL22R, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIF1, HGF, LEP (렙틴), PTN 및 THPO로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2개 또는 그 초과 시토킨, 시토킨-관련 단백질 및 시토킨 수용체에 결합할 수 있다.

[0290] 또 다른 실시양태에서, 표적 분자는 CCL1 (I-309), CCL2 (MCP-1 / MCAF), CCL3 (MIP-Ia), CCL4 (MIP-Ib), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCLH (에오타신), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-Id), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MDP-3b), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (SLC / 엑소터스-2), CCL22 (MDC / STC-I), CCL23 (MPIF-I), CCL24 (MPIF-2 / 에오타신-2), CCL25 (TECK), CCL26 (에오타신-3), CCL27 (CTACK / ILC), CCL28, CXCL1 (GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYD1), SCYE1, XCL1 (림포타틴), XCL2 (SCM-Ib), BLR1 (MDR15), CCBP2 (D6 / JAB61), CCR1 (CKR1 / HM145), CCR2 (mcp-1RB / RA), CCR3 (CKR3 / CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5 / ChemR13), CCR6 (CMKBR6 / CKR-



L3 / STRL22 / DRY6), CCR7 (CKR7 / EBI1), CCR8 (CMKBR8 / TER1 / CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5 / CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR /STRL33 / 본조(Bonzo)), HM74, IL8RA (IL8Ra), IL8RB (IL8Rb), LTB4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (C10), EPO, FY (DARC), GDF5, HDF1A, DL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2 및 VHL로 이루어진 군으로부터 선택된 케모카인, 케모카인 수용체 또는 케모카인-관련 단백질이다.

[0291]

또 다른 실시양태에서 본 발명의 이종다량체 단백질은 ABCF1; ACVR1; ACVR1B; ACVR2; ACVR2B; ACVRL1; ADORA2A; 아그레칸; AGR2; AICDA; AIF1; AIG1; AKAP1; AKAP2; AMH; AMHR2; ANGPT1; ANGPT2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANPEP; APC; APOC1; AR; AZGP1 (아연-a-당단백질); B7.1; B7.2; BAD; BAFF (BLys); BAG1; BAI1; BCL2; BCL6; BDNF; BLNK; BLR1 (MDR15); BMP1; BMP2; BMP3B (GDF10); BMP4; BMP6; BMP8; BMPR1A; BMPR1B; BMPR2; BPAG1 (플렉틴); BRCA1; C19orf10 (IL27w); C3; C4A; C5; C5R1; CANT1; CASP1; CASP4; CAV1; CCBP2 (D6 / JAB61); CCL1 (1-309); CCL11 (에오타신); CCL13 (MCP-4); CCL15 (MIP-Id); CCL16 (HCC-4); CCL17 (TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3b); CCL2 (MCP-1); MCAF; CCL20 (MIP-3a); CCL21 (MTP-2); SLC; 엑소터스-2; CCL22 (MDC / STC-I); CCL23 (MPIF-1); CCL24 (MPIF-2 / 에오타신-2); CCL25 (TECK); CCL26 (에오타신-3); CCL27 (CTACK / ILC); CCL28; CCL3 (MTP-Ia); CCL4 (MDP-Ib); CCL5 (RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCR1 (CKR1 / HM145); CCR2 (mcp-1RB / RA); CCR3 (CKR3 / CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5 / ChemR13); CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 / STRL22 / DRY6); CCR7 (CKR7 / EBI1); CCR8 (CMKBR8 / TER1 / CKR-L1); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHK1); CCRL2 (L-CCR); CD164; CD19; CD1C; CD20; CD200; CD22; CD24; CD28; CD3; CD37; CD38; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD44; CD45RB; CD52; CD69; CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CDH1 (E-카드헤린); CDH10; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKN1A (p21Wap1/Cip1); CDKN1B (p27Kip1); CDKN1C; CDKN2A (P16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; 키티나제; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (클라우딘-7); CLN3; CLU (클루스테린); CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1 (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (G-CSF); CTLA4; CTNBN1 (b-카테닌); CTSB (카텝신 B); CX3CL1 (SCYD1); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (I-TAC / IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78 / LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR /STRL33 / 본조); CYB5; CYC1; CYSLTR1; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF (VEGFD); FEL1 (엡실론); FIL1 (제타); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (피브로넥틴); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-I); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GF11; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRH1; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCC10 (C10); GRP; GSN (겔수린); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIF1A; HDP1; 히스타민 및 히스타민 수용체; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOX1; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFN감마; IFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2, IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (당단백질 130); EL7; EL7R; EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAKI; ERAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6 인테그린); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b 4 인테그린); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; KLF5 (GC Box BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (케라틴 19); KRT2A; KHTHB6 (모발-특이적 유형 H 케라틴); LAMAS; LEP (렙틴); 링고-p75; 링고-트로이; LPS; LTA (TNF-b); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTBR; MACMARCKS; MAG 또는 Omgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; 미드킨; MEF; MIP-2; MKI67; (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (메탈로티오넥틴-III); MTSS1;

MUC1 (뮤신); MYC; MYD88; NCK2; 뉴로칸; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF); NGFR; NgR-링고; NgR- Nogo66 (노고); NgR-p75; NgR-트로이; NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NROB1; NROB2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NR1I2; NR1I3; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; ODZ1; OPRD1; P2RX7; PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; PDGFA; PDGFB; PECAM1; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; 포스포칸; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PRI; PRKCQ; PRKD1; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (p21Rac2); RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNFI10 (ZNF144); ROBO2; S100A2; SCGB1D2 (리포필린 B); SCGB2A1 (마마글로빈 2); SCGB2A2 (마마글로빈 1); SCYE1 (내피 단핵구-활성화 시토카인); SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERPINB5 (마스핀); SERPINE1 (PAI-1); SERPDMF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPP1; SPRR1B (Spr1); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCP10; TDGF1; TEK; TGFA; TGFBI; TGFBI1; TGFBI2; TGFBI3; TGFBI; TGFBR1; TGFBR2; TGFBR3; TH1L; THBS1 (트롬보스폰딘-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1); TMP3; 조직 인자; TLR10; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF-a; TNFAEP2 (B94); TNFAIP3; TNFRSF11A; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10 (TRAIL); TNFSF11 (TRANCE); TNFSF12 (APO3L); TNFSF13 (April); TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L); TNFSF15 (VEGI); TNFSF18; TNFSF4 (OX40 리간드); TNFSF5 (CD40 리간드); TNFSF6 (FasL); TNFSF7 (CD27 리간드); TNFSF8 (CD30 리간드); TNFSF9 (4-1BB 리간드); TOLLIP; To11-유사 수용체; TOP2A (토포이소머라제 Ea); TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; VEGF; VEGFB; VEGFC; 베르시칸; VHL C5; VLA-4; XCL1 (림포타틴); XCL2 (SCM-1b); XCR1(GPR5 / CCXCR1); YY1; 및 ZFPM2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다.

[0292] 본 발명에 포함되는 항체의 바람직한 표적 분자는 CD 단백질, 예를 들어 CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD34; CD64, ErbB 수용체 패밀리의 CD200 구성원, 예를 들어 EGF 수용체, HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 세포 부착 분자, 예를 들어 LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, 알파4/베타7 인테그린, 및 알파v/베타3 인테그린, 예를 들어 그의 알파 또는 베타 서브유닛 (예를 들어 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); 성장 인자, 예를 들어 VEGF-A, VEGF-C; 조직 인자 (TF); 알파 인터페론 (알파IFN); TNF알파, 인터류킨, 예를 들어 IL-1베타, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL17A/F, IL-18, IL-13R알파1, IL13R알파2, IL-4R, IL-5R, IL-9R, IgE; 혈액형 항원; flk2/flt3 수용체; 비만 (OB) 수용체; mpl 수용체; CTLA-4; RANKL, RANK, RSV F 단백질, 단백질 C 등을 포함한다.

[0293] 한 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 저-밀도 지단백질 수용체-관련 단백질 (LRP)-1 또는 LRP-8 또는 트랜스페린 수용체, 및 1) 베타-세크레타제 (BACE1 또는 BACE2); 2) 알파-세크레타제; 3) 감마-세크레타제; 4) 타우-세크레타제; 5) 아밀로이드 전구체 단백질 (APP); 6) 사멸 수용체 6 (DR6); 7) 아밀로이드 베타 펩티드; 8) 알파-시누클레인; 9) 파킨(Parkin); 10) 헌팅틴(Huntingtin); 11) p75 NTR, 및; 12) 카스파제-6으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 표적에 결합한다.

[0294] 한 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체 단백질은 IL-1알파 및 IL-1베타, IL-12 및 IL-18; IL-13 및 IL-9; IL-13 및 IL-4; IL-13 및 IL-5; IL-5 및 IL-4; IL-13 및 IL-1베타; IL-13 및 IL-25; IL-13 및 TARC; IL-13 및 MDC; IL-13 및 MEF; IL-13 및 TGF-β; IL-13 및 LHR 효능제; IL-12 및 TWEAK, IL-13 및 CL25; IL-13 및 SPRR2a; IL-13 및 SPRR2b; IL-13 및 ADAM8, IL-13 및 PED2, IL17A 및 IL17F, CD3 및 CD19, CD138 및 CD20; CD138 및 CD40; CD19 및 CD20; CD20 및 CD3; CD38 및 CD138; CD38 및 CD20; CD38 및 CD40; CD40 및 CD20; CD-8 및 IL-6; CD20 및 BR3, TNF알파 및 TGF-베타, TNF알파 및 IL-1베타; TNF알파 및 IL-2, TNF 알파 및 IL-3, TNF알파 및 IL-4, TNF알파 및 IL-5, TNF알파 및 IL6, TNF알파 및 IL8, TNF알파 및 IL-9, TNF알파 및 IL-10, TNF알파 및 IL-11, TNF알파 및 IL-12, TNF알파 및 IL-13, TNF알파 및 IL-14, TNF알파 및 IL-15, TNF알파 및 IL-16, TNF알파 및 IL-17, TNF알파 및 IL-18, TNF알파 및 IL-19, TNF알파 및 IL-20, TNF알파 및 IL-23, TNF알파 및 IFN알파, TNF알파 및 CD4, TNF알파 및 VEGF, TNF알파 및 MIF, TNF알파 및 ICAM-1, TNF알파 및 PGE4, TNF알파 및 PEG2, TNF알파 및 RANK 리간드, TNF알파 및 Te38; TNF알파 및 BAFF; TNF알파 및 CD22; TNF알파 및 CTLA-4; TNF알파 및 GP130; TNF α 및 IL-12p40; VEGF 및 HER2, VEGF-A 및 HER2, VEGF-A 및 PDGF, HER1 및 HER2, VEGF-A 및 VEGF-C, VEGF-C 및 VEGF-D, HER2 및 DR5, VEGF 및 IL-8, VEGF 및 MET, VEGFR 및 MET 수용체, VEGFR 및 EGFR, HER2 및 CD64, HER2 및 CD3, HER2 및 CD16, HER2 및 HER3; EGFR(HER1) 및 HER2, EGFR 및 HER3, EGFR 및 HER4, IL-13 및 CD40L, IL4 및 CD40L, TNFR1 및 IL-1R, TNFR1 및 IL-6R 및 TNFR1 및 IL-18R, EpCAM 및 CD3, MAPG 및 CD28, EGFR 및 CD64, CSPGs 및 RGM A; CTLA-4 및 BTNO2; IGF1 및 IGF2; IGF1/2 및 Erb2B; MAG 및 RGM A; NgR 및 RGM A; NogoA 및 RGM A; OMGP 및 RGM A; PDL-I 및 CTLA-4; 및 RGM A 및 RGM B로

이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 표적 분자에 결합한다.

[0295] 가용성 항원 또는 그의 단편 (임의로 또 다른 분자에 접합됨)이 항체를 생성시키기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막횡단 분자, 예컨대 수용체에 대해서는, 그의 단편 (예를 들어, 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 막횡단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이러한 세포는 천연 공급원 (예를 들어 암 세포주)으로부터 유래될 수도 있고, 또는 막횡단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수도 있다. 항체의 제조에 유용한 다른 항원 및 그의 형태가 당업자에게 명백할 것이다.

[0296] VI. 활성 검정

[0297] 본 발명의 이종다량체 단백질은 당업계에 공지된 다양한 검정에 의해 그의 물리적/화학적 성질 및 생물학적 기능에 대해 특성화될 수 있다.

[0298] 정제된 이종다량체 단백질은 N-말단 서열분석, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광법, 이온 교환 크로마토그래피 및 과과인 소화를 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 일련의 검정에 의해 추가로 특성화될 수 있다.

[0299] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본원에서 생산된 이뮤노글로불린은 그의 생물학적 활성에 대하여 분석된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 이뮤노글로불린은 그의 항원 결합 활성에 대하여 시험된다. 당업계에 공지되고 본원에서 사용될 수 있는 항원 결합 검정은 비제한적으로 웨스턴 블롯, 방사성면역검정, ELISA (효소 결합 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침전 검정, 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정과 같은 기술을 이용한 임의의 직접적 또는 경쟁적 결합 검정을 포함한다. 예시적인 항원 결합 검정은 하기 실시예 섹션에서 제공된다.

[0300] 한 실시양태에서, 본 발명은, 생체내 항체의 반감기가 중요하지만 특정 이펙터 기능 (예컨대, 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 유해한 다수의 응용에서 항체를 바람직한 후보자로 만드는 이펙터 기능 일부 (전부는 아님)를 갖는 변경된 항체를 고려한다. 특정 실시양태에서, 생산된 이종다량체 단백질의 Fc 활성을 측정하여 원하는 특성만이 유지되는 것을 확인한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 이종다량체 단백질에 Fc $\gamma$ R 결합이 결합되어 있으나 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 결합될 것임), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc $\gamma$ RIII만을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII을 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 예가 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재되어 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 항체가 C1q에 결합하지 못하여 CDC 활성이 결합되어 있는지를 확인하기 위해 또한 C1q 결합 검정을 수행할 수도 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 또한, FcRn 결합 및 생체내 청소율/반감기 측정을 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0301] VII. 접합된 단백질

[0302] 본 발명은 또한 경쇄 또는 중쇄의 불변 영역 중 하나가 화학적 분자, 예를 들어 염료 또는 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 본원에 기재된 임의의 이종다량체 단백질 (예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 항체)을 포함하는 접합된 단백질, 예를 들어 접합된 항체 또는 면역접합체 (예를 들어, "항체-약물 접합체", 또는 "ADC")를 제공한다. 특히, 본원에 기재된 바와 같이, 이종다량체화 도메인을 사용하면 2개의 상이한 중쇄 (HC1 및 HC2) 뿐만 아니라 2개의 상이한 경쇄 (LC1 및 LC2)를 함유하는 항체를 구축할 수 있다. 본원에 기재된 방법을 사용하여 구축된 면역접합체는 단지 중쇄 중 하나 (HC1 또는 HC2) 또는 경쇄 중 하나 (LC1 또는 LC2)의 불변 영역에 접합된 세포독성제를 함유할 수 있다. 또한, 면역접합체는 단지 하나의 중쇄 또는 경쇄에만 부착된 세포독성제를 가질 수 있기 때문에, 대상체에게 투여되는 세포독성제의 양은 두 중쇄 또는 경쇄 모두에 부착된 세포독성제를 갖는 항체의 투여에 비해 감소된다. 대상체에게 투여되는 세포독성제의 양의 감소는 세포독성제와 연관된 유해 부작용을 제한한다.

[0303] 세포독성제 또는 세포증식억제제, 즉 암의 치료에서 종양 세포를 사멸시키거나 억제하는 약물의 국부 전달을 위한 항체-약물 접합체의 사용 (문헌 [Syrgos and Epenetos Anticancer Research 19:605-614 (1999)]);

[Niculescu-Duvaz and Springer, Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172 (1997)]; 미국 특허 번호 4,975,278)은 종양으로의 약물 모이어티의 표적화된 전달, 및 그 내부의 세포내 축적을 허용하고, 여기서 이들 비접합된 약물 작용제의 전신 투여는 제거하고자 하는 종양 세포뿐만 아니라 정상 세포에도 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 (문헌 [Baldwin et al., Lancet (Mar. 15, 1986):603-605 (1986)]; [Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506]). 이로써 최소 독성을 갖는 최대 효능이 얻어진다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체 둘 모두가 상기 전략에 유용한 것으로 보고되었다 (문헌 [Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87 (1986)]). 상기 방법에 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (상기 문헌 [Rowland et al., (1986)]). 항체-독소 접합체에 사용되는 독소는 박테리아 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 독소, 예를 들어 리신, 소분자 독소, 예를 들어 겔라나마이신 (문헌 [Mandler et al., Jour. of Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581 (2000)]; [Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028 (2000)]; [Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13:786-791 (2002)]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]), 및 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al., Cancer Res. 58:2928 (1998)]; [Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)])을 포함한다. 독소는 튜블린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 억제제를 포함하는 메카니즘에 의해 그의 세포독성 및 세포증식억제 효과를 나타낼 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합되는 경우에 불활성이 되거나 활성이 감소되는 경향이 있다.

[0304] 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 본원에 (예를 들어, 상기에) 기재되어 있다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사과오나리아 오피시날리스(*Saponaire officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232를 참조한다. 방사성접합된 항체의 생산을 위한 다양한 방사선택종이 이용가능하다. 그 예는 <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y 및 <sup>186</sup>Re를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질-커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-다이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. 예를 들어, WO 94/11026을 참조한다.

[0305] 항체 및 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우로스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 이들 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에서 고려된다.

[0306] i. 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0307] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 본 발명의 항체 (전장 또는 단편)를 포함한다.

[0308] 메이탄시노이드는 튜블린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타(*Maytenus serrata*)로부터 처음 분리되었다 (미국 특허 번호 3,896,111). 이후, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 발견되었다 (미국 특허 번호 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0309] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의한 제조에 비교적 이용하기 쉽고, (ii) 비-디술피드 링커를 통한 항체로의 접합에 적합한 관능기로의 유도체화에 대해 변



형이 가능하고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체 약물 접합체에서 매력적인 약물 모이어티이다.

[0310] 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 그의 제조 방법, 및 그의 치료 용도는 예를 들어 그 개시내용이 본원에 참조로 명백하게 포함되는 미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064, 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다. 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 지정된 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 상기 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 검정에서 항 종양 활성을 나타냈다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 무린 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 또 다른 무린 모노클로날 항체 TA.1에 디설피드 링커를 통해 접합된 면역접합체가 기재되어 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당  $3 \times 10^5$ 개의 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관 내에서 시험되었다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물과 유사한 수준의 세포독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시켜 증가시킬 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타냈다.

[0311] 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,208,020을 참조한다 (그 개시 내용은 본원에 명백하게 참조로 포함됨). 항체 분자 당 평균 3-4개로 접합된 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증진시키는 효능을 나타냈지만, 1개의 독소/항체 분자일지라도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증진시킬 것이라 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 공지되어 있으며, 공지의 기술에 의해 합성될 수도 있고 천연 공급원으로부터 단리될 수도 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비-특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0312] 예를 들어 그 개시 내용이 본원에 명백하게 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,208,020 또는 EP 특허 0 425 235 B1, 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)], 및 미국 특허 출원 공보 번호 2005/016993에 개시된 것을 비롯한, 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 위한 많은 연결기가 당업계에 공지되어 있다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 미국 특허 출원 공보 번호 2005/016993에 개시된 바와 같이 제조할 수 있다. 연결기는 상기 언급된 특허에 개시된 바와 같이 디설피드 기, 티오에테르 기, 산 불안정성 기, 광분해성 기, 펩티다제 불안정성 기 또는 에스테라제 불안정성 기를 포함하고, 디설피드 및 티오에테르 기가 바람직하다. 추가의 연결기는 본원에 기재되고 예시되어 있다.

[0313] 항체 및 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노타올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피디메이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 디설피드 연결을 제공하기 위해 특히 바람직한 커플링제는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)]), 및 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.

[0314] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결은 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실 기와의 반응으로 형성될 수 있다. 반응은 히드록실 기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실 기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실 기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

[0315] ii. 아우리스타틴 및 도라스타틴

[0316] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 도라스타틴 또는 도로스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 아우리스타틴에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588). 도라스타틴 및 아우리스타틴은 미세소관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al., Antimicrob. Agents and

Chemother. 45(12):3580-3584 (2001)], 항암 (미국 특허 번호 5,663,149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al., Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965(1998)])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드 약물 모이어티의 N- (아미노) 말단 또는 C- (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0317] 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 그 개시내용 전문이 명백하게 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 공보 번호 2005/0238649 ("Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")에 개시된, N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 포함한다.

[0318] 전형적으로, 펩티드-기재의 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합 형성으로 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은, 예를 들어 펩티드 화학 분야에 널리 공지된 액상 합성 방법 (문헌 [E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides," volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조될 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588; 문헌 [Pettit et al., J. Nat. Prod. 44:482-485 (1981)]; [Pettit et al., Anti-Cancer Drug Design 13:47-66 (1998)]; [Poncet, Curr. Pharm. Des. 5: 139-162 (1999)]; 및 [Pettit, Fortschr. Chem. Org. Naturst. 70:1-79 (1997)]의 방법에 따라 제조될 수 있다. 또한, 문헌 [Doronina, Nat. Biotechnol. 21(7):778-784 (2003)]; 및 미국 출원 공보 번호 2005/0238649 ("Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands") (그 전문이 본원에 참조로 포함됨) (예를 들어, 링커 및 링커에 접합된 모노메틸발린 화합물, 예를 들어 MMAE 및 MMAF의 제조 방법을 개시함)를 참조한다.

[0319] iii. 칼리케아미신

[0320] 다른 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다. 칼리케아미신 패밀리의 항생제는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA 절단부를 생산할 수 있다. 칼리케아미신 패밀리의 접합체를 제조하는 것에 대해서는 미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 및 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 캄파니(American Cyanamid Company)의 특허)를 참조한다. 사용할 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-아세틸- $\gamma_1^I$ , PSAG 및  $\theta_1^I$ 을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)] 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 항폴레이트제인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 다 세포내 작용 부위를 갖고, 원형질막을 쉽게 통과하지 않는다. 따라서, 항체-매개 내재화를 통한 이들 작용제의 세포 흡수는 이들의 세포독성 효과를 크게 증진시킨다.

[0321] iv. 기타 세포독성제

[0322] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 또는 본원에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있는 다른 항종양제는 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 번호 5,053,394 및 5,770,710에 기재된, 집합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 작용제의 패밀리, 뿐만 아니라 에스페라미신 (미국 특허 번호 5,877,296)을 포함한다.

[0323] 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모테신 A쇄, 알파-사르신, 알레우리티스 포르티디 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다 (예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조).

[0324] 본 발명은 항체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.

[0325] 종양의 선택적인 파괴를 위해, 항체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성 접합된 항체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ , 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  또는  $^{123}\text{I}$ 을 포함할 수 있거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 표지, 예를 들어 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15,

산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.

[0326] 방사성- 또는 다른 표지를 공지의 방식으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성될 수도 있거나, 또는 예를 들어 수소 대신에 플루오린-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용한 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수도 있다.  $^{99m}\text{Tc}$  또는  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  및  $^{111}\text{In}$  과 같은 표지가 펩티드 내의 시스템인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 아이오도젠(IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978)])을 사용하여 아이오딘-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.

[0327] 항체 및 세포독성체의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤젠-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성뉴클레오타이드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. 예를 들어, WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술폰드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0328] 본 발명의 화합물은 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc., 미국 일리노이주 록포드)로부터) 상업적으로 입수가능한 가교제: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC, 및 술폰-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 사용하여 제조된 ADC를 명백하게 고려하지만, 이에 제한되지는 않는다. 문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 467-498 페이지를 참조한다.

[0329] v. 접합된 항체의 제조

[0330] 본 발명의 접합된 항체에서, 항체는 임의로 링커를 통해 하나 이상의 모이어티 (예를 들어, 약물 모이어티), 예를 들어 항체당 약 1 내지 약 20개의 모이어티에 접합된다. 접합된 항체는 (1) 항체의 친핵성 기를 공유결합을 통해 2가 링커 시약과 반응시킨 후, 이를 관심 모이어티와 반응시키는 것; 및 (2) 모이어티의 친핵성 기를 공유결합을 통해 2가 링커 시약과 반응시킨 후, 이를 항체의 친핵성 기와 반응시키는 것을 비롯하여, 당업자에게 공지되어 있는 유기 화학 반응, 조건, 및 시약을 이용하여 여러 경로로 제조할 수 있다. 접합된 항체의 제조를 위한 추가의 방법이 본원에서 설명된다.

[0331] 링커 시약은 하나 이상의 링커 성분을 포함할 수 있다. 예시적인 링커 성분에는 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시 카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카복실레이트 ("SMCC"), 및 N-숙신이미딜 (4-아이오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")가 포함된다. 부가적인 링커 성분이 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에서 기재된다. 또한, 그 내용 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 공보 번호 2005/0238649 ("Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")를 참조한다.

[0332] 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 아미노산 링커 성분은 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드를 포함한다. 예시적인 디펩티드에는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)이 포함된다. 예시적인 트리펩티드에는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)이 포함된다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 자연적으로 발생하는 것들 뿐만 아니라 소수의 아미노산 및 비-자연 발생 아미노산 유사체, 예컨대 시트룰린을 포함한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 종양-관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 이들의 선택도 측면에서 설계되고 최적화될 수 있다.

- [0333] 항체 상의 친핵성 기는 (i) N-말단 아민 기, (ii) 측쇄 아민 기, 예를 들어 리신, (iii) 측쇄 티올 기, 예를 들어 시스테인, 및 (iv) 항체가 글리코실화되는 당 히드록실 또는 아미노 기를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 아민, 티올 및 히드록실 기는 친핵성이고, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 쇠간 디설피드, 즉 시스테인 가교를 갖는다. 환원제, 예컨대 DTT (디티오프레이톨) 처리를 통해 항체를 링커 시약과의 접합에 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 가교는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵성 기를 형성할 것이다. 리신을 2-이미노티올란 (트라우트 시약)과 반응시켜서 아민을 티올로 전환시킴으로써 추가의 친핵성 기를 항체에 도입할 수 있다. 반응성 티올 기는 1, 2, 3, 4개 또는 그보다 많은 수의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 돌연변이체 항체를 제조함으로써) 항체 (또는 그의 단편)에 도입될 수 있다.
- [0334] 본 발명의 접합된 항체는 또한 링커 시약 또는 약물 또는 다른 모이어티 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하기 위해 항체의 변형에 의해 생산될 수 있다. 글리코실화된 항체의 당은 예를 들어 피아이오데이트 산화 시약으로 산화되어, 링커 시약 또는 약물 또는 다른 모이어티의 아민 기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 형성할 수 있다. 생성된 이민 쉬프 염기 기는 안정적인 연결을 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어, 보로히드라이드 시약에 의해 환원되어 안정적인 아민 연결을 형성할 수 있다. 한 실시양태에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-피아이오데이트와 반응시키면, 약물 또는 다른 모이어티 상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (문헌 [Hermanson, Bioconjugate Techniques]). 또 다른 실시양태에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-피아이오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드가 생산될 수 있다 (문헌 [Geoghegan and Stroh, Bioconjugate Chem. 3:138-46 (1992)]; 미국 특허 번호 5,362,852). 그러한 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.
- [0335] 유사하게, 모이어티 (예컨대, 약물 모이어티) 상의 친핵성 기는 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; 및 (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드 기를 포함하는, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드 기를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0336] 대안적으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접하거나 접합체의 목적하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리된, 접합체의 2개 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항체는, 항체-수용체 접합체를 개체에게 투여한 후 결합되지 않은 접합체를 제거제를 사용하여 순환으로부터 제거하고 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사선헌종)와 접합되는 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여하는 종양 예비 표적화에 사용하기 위해, "수용체" (예컨대, 스트렙타비딘)에 접합될 수 있다.
- [0337] VIII. 유용성
- [0338] 본원에 제공된 본 발명의 방법은 이종다량체 단백질의 생산에서 산업적 이용가능성을 갖는다. 본 발명의 방법은 두 별도의 발효 및 단리에 관련된 작업의 양을 감소시키며, 두 분리된 발효 고유의 기술적 곤란을 감소시킨다. 또한, 상기 방법 절차의 어닐링 및 산화환원 단계의 제거는 수율을 증가시키고, 처리의 복잡성 및 비용을 감소시킬 수 있다.
- [0339] 본원에 기재된 이종다량체 단백질은, 예를 들어 시험관내, 생체의 및 생체내 치료 방법에서 유용하다. 본 발명은 이들 분자 중 하나 이상을 사용하는 것을 기반으로 다양한 방법을 제공한다. 특정 병리학적 상태에서, 이종다량체 단백질, 예를 들어 다중특이적 항체를 사용하는 것이 필요하고/거나 바람직하다. 본 발명은 다양한 목적을 위해, 예를 들어 치료제, 예방제 및 진단제로서 사용될 수 있는 이종다량체 단백질을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 이종다량체 단백질을 투여하여 질환을 치료하는 것을 포함하는, 질환의 치료 방법을 제공한다. 본원에 기재된 본 발명의 임의의 이종다량체 단백질은 본원에 기재된 치료 (또는 예방 또는 진단) 방법에 사용될 수 있다.
- [0340] 예를 들어, 이종다량체 단백질이 다가인 경우, 가치 있는 이점은 그들이 그의 항원에 대해 취하는 결합력의 개선이다. 항원 기반에 대한 결합 단위 (즉, Fab)에 대한 내인성 고친화도를 갖는 것 이외에도, 보통의 IgG 항체



는 또한 표적에 대한 2가 결합으로 인해 항원과의 회합을 증가시키는 결합력 효과를 이용한다.

[0341] 동일한 항원 분자 상의 2개의 별개의 에피토프에 대해 지정된 이종다량체 단백질은 (2가 결합으로 인해) 개선된 결합력의 이점을 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 또한 모 항체 중 어느 것과도 연관되지 않는 신규 특성을 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 이종다량체 단백질은, 예를 들어 수용체-리간드 상호작용의 차단에 유용하다.

[0342] 본원에 기재된 이종다량체 단백질은 또한 1개의 분자로 2개의 표적의 신호전달 경로를 동시에 차단하는 응용에서 유용하다.

[0343] IX. 치료 용도

[0344] 이종다량체 단백질, 예컨대 본원에 기재된 항체 및 항체 단편 (예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 항체 및/또는 그의 단편)은 치료 용도로 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 이종다량체 단백질은 전암성, 비-전이성, 전이성, 및 암성 종양 (예를 들어, 조기 암)을 비롯한 종양의 치료, 알레르기성 또는 염증성 장애의 치료, 또는 자가면역 질환의 치료, 또는 암 (예를 들어, 유방암, 결장직장암, 폐암, 신세포 암종, 신경교종, 또는 난소암), 알레르기성 또는 염증성 장애, 또는 자가면역 질환이 발생할 위험이 있는 대상체의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0345] 용어 암은 전암성 성장, 양성 종양 및 악성 종양 (이에 제한되지 않음)을 포함하는 증식성 장애의 총체를 포함한다. 양성 종양은 발원 부위에 국한되어 유지되고 원위 부위로 침윤, 침습, 또는 전이하는 능력을 갖지 않는다. 악성 종양은 그 주변의 다른 조직에 침습하여 손상시킬 것이다. 이들은 또한 일반적으로는 혈류를 통해 또는 림프절이 위치한 림프계를 통해 이들이 시작된 곳으로부터 분리되어 신체의 다른 부위로 확산하는 (전이하는) 능력을 수득할 수 있다. 원발성 종양은 이들이 발생한 조직의 유형에 따라 분류되고, 전이성 종양은 암 세포가 유래된 조직의 유형에 따라 분류된다. 시간이 지남에 따라, 악성 종양 세포는 더욱 비정상적으로 되고 정상 세포와 달라진다. 암 세포의 외형에 있어서의 이러한 변화를 종양 등급이라 칭하며, 암 세포는 고분화성, 중간 분화성, 저분화성 또는 미분화성으로 기재된다. 고분화성 세포는 상당히 정상적인 외형을 나타내며 이들이 유래된 정상 세포와 유사하다. 미분화성 세포는 세포의 기원을 알 수 없을 정도로 매우 비정상적이 된 세포이다.

[0346] 종양은 고형 종양 또는 비-고형 또는 연부 조직 종양일 수 있다. 연부 조직 종양의 예는 백혈병 (예를 들어, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 성인 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 성숙 B-세포 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 전림프구성 백혈병 또는 모발상 세포 백혈병), 또는 림프종 (예를 들어, 비-호지킨 림프종, 피부 T-세포 림프종 또는 호지킨병)을 포함한다. 고형 종양은 혈액, 골수 또는 림프계 이외의 신체 조직의 임의의 암을 포함한다. 고형 종양은 상피 세포 기원의 것 및 비상피 세포 기원의 것으로 추가로 분리될 수 있다. 상피 세포 고형 종양의 예는 위장관, 결장, 유방, 전립선, 폐, 신장, 간, 췌장, 난소, 두경부, 구강, 위, 십이지장, 소장, 대장, 항문, 담낭, 음순, 비인두, 피부, 자궁, 남성 생식기관, 비뇨기관, 방광, 및 피부의 종양을 포함한다. 비상피 기원의 고형 종양은 육종, 뇌 종양 및 골 종양을 포함한다.

[0347] 상피암은 일반적으로 양성 종양에서 침습전 단계 (예를 들어, 계내 암종)로, 기저막을 침투하고 상피하 기질을 침습하는 악성 암으로 발전한다.

[0348] 다중특이적 단백질 복합체는 또한 이들 치료 용도에 사용될 수 있고, HER2에 결합하는 항체는 특히 유방암, 결장직장암, 폐암, 신세포 암종, 신경교종, 또는 난소암의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0349] 본 발명의 조성물을 투여할 후보인 다른 대상체는 섬유혈관 조직의 비정상적 증식, 장미 여드름, 후천성 면역결핍 증후군, 동맥 폐쇄, 아토피성 각막염, 박테리아성 궤양, 베타트병, 혈액계 종양, 경동맥 폐쇄성 질환, 맥락막 신생혈관형성, 만성 염증, 만성 망막 박리, 만성 포도막염, 만성 유리체염, 콘택트 렌즈 과도착용, 각막 이식편 거부, 각막 신생혈관형성, 각막 이식편 신생혈관형성, 크론병, 일스병, 유행성 각결막염, 진균성 궤양, 단순 포진 감염, 대상 포진 감염, 고점도 증후군, 카포시 육종, 백혈병, 지질 변성, 라임병, 변연 각결막염, 무릎 궤양, 나병 이외의 미코박테리아 감염, 근시, 안구 신생혈관 질환, 시신경 소와, 오슬러-웨버 증후군 (오슬러-웨버-렌드), 골관절염, 파체트병, 주변부 포도막염, 유천포창, 소수포증, 다발동맥염, 레이저후 합병증, 원충 감염, 탄성섬유 가성황색증, 건성 익상편 각막염, 방사상 각막절개, 망막 신생혈관형성, 미숙아 망막병증, 수정체후 섬유증식증, 사르코이드, 공막염, 겸상 적혈구성 빈혈, 쇼그렌 증후군, 고형 종양, 스타가르트병, 스티븐 존슨병, 상윤부 각막염, 매독, 전신 루푸스, 테리엔 변연 각막변성, 독소플라스마증, 유잉 육종의 종양, 신경모세포종의 종양, 골육종의 종양, 망막모세포종의 종양, 횡문근육종의 종양, 궤양성 결장염, 정맥 폐쇄, 비타민 A 결핍, 베게너 사르코이드증, 당뇨병과 연관된 바람직하지 않은 혈관신생, 기생충성 질환, 비정상적 상처 치유,

수술, 손상 또는 외상 (예를 들어, 급성 폐 손상/ARDS) 후 비대증, 모발 성장의 억제, 자궁에서의 배란 및 황체 형성의 억제, 착상의 억제 및 배아 발생의 억제를 갖거나, 또는 발병 위험에 있다.

[0350]

본원에 기재된 방법에 따라 제조된 항체를 사용하여 치료할 수 있는 알레르기성 또는 염증성 장애 또는 자가면역 질환 또는 장애의 예는 관절염 (류마티스 관절염 예컨대 급성 관절염, 만성 류마티스 관절염, 통풍성 관절염, 급성 통풍성 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 감염성 관절염, 라임 관절염, 증식성 관절염, 건선성 관절염, 척추 관절염, 및 소아 발병 류마티스 관절염, 골관절염, 만성 진행성 관절염, 변형성 관절염, 만성 원발성 다발성관절염, 반응성 관절염, 및 강직성 척추염), 염증성 과다증식성 피부 질환, 건선 예컨대 판상 건선, 적상 건선, 농포성 건선, 및 손발톱 건선, 피부염 예를 들어 접촉성 피부염, 만성 접촉성 피부염, 알레르기성 피부염, 알레르기성 접촉성 피부염, 포진성 피부염, 및 아토피성 피부염, x-연관 과다 IgM 증후군, 두드러기 예컨대 만성 알레르기성 두드러기 및 만성 특발성 두드러기, 예를 들어 만성 자가면역 두드러기, 다발근염/피부근염, 소아 피부근염, 독성 표피 괴사용해, 경피증 (전신 경피증 포함), 경화증 예컨대 전신 경화증, 다발성 경화증 (MS) 예컨대 척수-시신경 MS, 원발성 진행성 MS (PPMS), 및 재발 완화형 MS (RRMS), 진행성 전신 경화증, 아테롬성동맥경화증, 동맥경화증, 파종성 경화증, 및 실조성 경화증, 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론병, 자기면역-매개 위장 질환, 결장염 예컨대 궤양성 결장염, 궤양 결장염, 현미경적 결장염, 콜라겐성 결장염, 폴립성 결장염, 괴사성 소장결장염, 및 경벽성 결장염, 및 자가면역 염증성 장 질환), 괴저성 농피증, 결절성 홍반, 원발성 경화성 담관염, 상공막염), 호흡 곤란 증후군, 예를 들어 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 수막염, 포도막의 전체 또는 일부의 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역 혈액 장애, 류마티스 척추염, 돌발성 난청, IgE-매개 질환 예컨대 아나필락시스 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염 예컨대 라스무센 뇌염 및 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예컨대 전방 포도막염, 급성 전방 포도막염, 육아종성 포도막염, 비육아종성 포도막염, 수정체항원성 포도막염, 후방 포도막염, 또는 자가면역 포도막염, 신증후군을 수반하거나 수반하지 않는 사구체신염 (GN) 예컨대 만성 또는 급성 사구체신염 예컨대 원발성 GN, 면역-매개 GN, 막성 GN (막성 신병증), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신병증, 막- 또는 막성 증식성 GN (MPGN), 예를 들어 제I형 및 제II형, 및 급속 진행성 GN, 알레르기 상태, 알레르기 반응, 습진 예를 들어 알레르기성 또는 아토피성 습진, 천식 예컨대 기관지성 천식, 기관지 천식, 및 자가면역 천식, T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 수반하는 상태, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍, 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 또는 전신 에리테마토데스 루푸스 예컨대 피부 SLE, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 파종성 홍반성 루푸스, 루푸스 (신염, 뇌염, 소아, 비-신장, 신장외, 원판상, 탈모증 포함), 소아 발병 (제I형) 당뇨병 예를 들어 소아 인슐린-의존성 당뇨병 (IDDM), 성인 발병 당뇨병 (제II형 당뇨병), 자가면역 당뇨병, 특발성 요붕증, 시토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 연관된 면역 반응, 결핵, 사르코이드증, 육아종증 예를 들어 림프종양 육아종증, 베게너 육아종증, 무과립구증, 맥관염 예를 들어 혈관염 (예를 들어 대혈관 혈관염 (예를 들어 류마티스성 다발성근육통 및 거대 세포 (다카야스) 동맥염), 중형 혈관 혈관염 (예를 들어 가와사키병 및 결절성 다발동맥염), 현미경적 다발동맥염, CNS 혈관염, 괴사, 피부, 또는 과민 혈관염, 전신 괴사성 혈관염, 및 ANCA-연관 혈관염, 예컨대 처크-스트라우스 혈관염 또는 증후군 (CSS)), 측두 동맥염, 재생불량성 빈혈, 자가면역 재생불량성 빈혈, 쿨스 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 빈혈, 용혈성 빈혈 또는 면역 용혈성 빈혈 예를 들어 자가면역 용혈성 빈혈 (AIHA), 악성 빈혈, 애디슨병, 순적혈구 빈혈 또는 무형성증 (PRCA), 인자 VIII 결핍, 혈우병 A, 자가면역 호중구감소증, 범혈구감소증, 백혈구감소증, 백혈구 누출을 수반하는 질환, CNS 염증성 장애, 다발성 기관 손상 증후군 예컨대 패혈증, 외상 또는 출혈에 속발성인 것, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트 또는 베체트병, 케슬만 증후군, 굿패스처 증후군, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군, 스티븐-존슨 증후군, 유천포창 예컨대 수포성 유천포창 및 피부 유천포창, 천포창 (예를 들어 심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 천포창 점액-막 유천포창, 및 홍반성 천포창, 자가면역 다발내분비병증, 라이터병 또는 증후군, 면역 복합체 신염, 항체-매개 신염, 시신경척수염, 다발신경병증, 만성 신경병증 예컨대 IgM 다발신경병증 또는 IgM-매개 신경병증, 혈소판감소증 (예를 들어 심근경색 환자에 의해 발생), 예를 들어 혈전성 혈소판감소성 자반증 (TTP) 및 자가면역 또는 면역-매개 혈소판감소증 예컨대 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP) 예를 들어 만성 또는 급성 ITP, 고환 및 난소의 자가면역 질환 예를 들어 자가면역 고환염 및 난소염, 원발성 갑상선기능저하증, 부갑상선기능저하증, 자가면역 내분비 질환 예를 들어 갑상선염 예컨대 자가면역 갑상선염, 하시모토병, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염), 또는 아급성 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선기능저하증, 그레이브스병, 다선성 증후군 예컨대 자가면역 다선성 증후군 (또는 다선성 내분비병증 증후군), 부신생물성 증후군, 예를 들어 신경학적 부신생물성 증후군 예컨대 램버트-이튼 근무력 증후군 또는 이튼-램버트 증후군, 강직 인간 증후군, 뇌척수염 예컨대 알레르기성 뇌척수염 또는 알레르기 뇌척수염 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 중증 근무력증 예컨대 흥선중-연

관 중증 근무력증, 소뇌 변성, 신경근긴장증, 안진전 또는 안진전 근간대경련 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 다초점성 운동 신경병증, 쉬한 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 루푸스양 간염, 거대 세포 간염, 만성 활성 간염 또는 자가면역 만성 활성 간염, 림프성 간질성 폐렴, 폐쇄성 세기관지염 (비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군, 베르게르병 (IgA 신병증), 특발성 IgA 신병증, 선형 IgA 피부병, 원발성 담즙성 간경변증, 폐경변증, 자가면역 장병증 증후군, 복강병, 복강 질환, 복강 스프루 (글루텐 장병증), 불응성 스프루, 특발성 스프루, 한랭 글로불린혈증, 근위축성 측삭 경화증 (ALS; 루게릭병), 관상 동맥 질환, 자가면역 귀 질환 예컨대 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 청력 상실, 안진전 근간대경련 증후군 (OMS), 다발연골염 예컨대 불응성 또는 재발성 다발연골염, 폐포 단백증, 아밀로이드증, 공막염, 비-암성 림프구증가증, 원발성 림프구증가증 (모노클로날 B 세포 림프구증가증 (예를 들어, 양성 모노클로날 감마글로불린병증 및 의미 불명 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS)) 포함), 말초 신경병증, 부신생물성 증후군, 채널병증 예컨대 간질, 편두통, 부정맥, 근육 장애, 난청, 실명, 주기성 마비, 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근병증, 국소성 분절성 사구체경화증 (FSGS), 내분비 안병증, 포도막망막염, 맥락막막염, 자가면역 간 장애, 섬유근육통, 다발성 내분비 부전, 슈미트 증후군, 부신염, 위 위축, 초로기 치매, 탈수초성 질환 예컨대 자가면역 탈수초성 질환, 당뇨병성 신병증, 드레슬러 증후군, 원형 탈모증, 크레스트 증후군 (석회증, 레이노 현상, 식도 운동장애, 수지경화증, 및 모세혈관확장증), 남성 및 여성 자가면역 불임, 혼합 결함 조직 질환, 샤가스병, 류마티스성 열, 반복 유산, 농부 폐, 다형 홍반, 심장 절개후 증후군, 쿠싱 증후군, 조류-사육자 폐, 알레르기성 육아종성 혈관염, 양성 림프구성 혈관염, 알포트 증후군, 폐포염 예컨대 알레르기성 폐포염 및 섬유화 폐포염, 간질성 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈만편모충증, 파동편모충증, 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증, 샴터 증후군, 카플란 증후군, 탱기, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 미만성 간질성 폐 섬유증, 간질성 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭성 섬유증, 안내염, 장기 용기성 홍반, 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 술만 증후군, 펠티 증후군, 사상충증, 모양체염 예컨대 만성 모양체염, 이시성 모양체염, 홍채섬모체염, 또는 푸크 모양체염, 헤노흐-헨라인 자반증, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파르보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신접종후 증후군, 선천성 풍진 감염, 엡스타인-바르 바이러스 감염, 뎀프스, 에반 증후군, 자가면역 생식선 부전, 시데남 무도병, 스트렙토코쿠스 감염후 신염, 폐쇄성 혈전혈관염, 갑상선중독증, 척수로, 맥락막염, 거대 세포 다발근육통, 내분비 안병증, 만성 과민 폐렴, 건성 각결막염, 유행성 각결막염, 특발성 신염 증후군, 미세 변화 신병증, 양성 가족성 및 허혈-재관류 손상, 망막 자가면역, 관절 염증, 기관지염, 만성 폐쇄성 기도 질환, 규폐증, 아프타, 아프타성 구내염, 동맥경화성 장애, 무정액증, 자가면역 용혈, 비크병, 한랭글로불린혈증, 듀피트렌 구축, 수정체과민 안내염, 알레르기성 장염, 나병 결절성 홍반, 특발성 안면 마비, 만성 피로 증후군, 류마티스성 열, 함만-리치병, 감각신경성 청력 상실, 발작성 혈색소뇨증, 생식선기능저하증, 국한성 회장염, 백혈구감소증, 감염성 단핵구증, 황단성 척수염, 원발성 특발성 점액부종, 신증, 교감성 안염, 육아종성 고환염, 췌장염, 급성 다발신경근염, 괴저성 농피증, 퀴르뱅 갑상선염, 후천성 비장 위축, 항정자 항체로 인한 불임, 비-악성 흉선종, 백반증, SCID 및 엡스타인-바르 바이러스-연관 질환, 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 기생충성 질환 예컨대 리슈만편모충, 독성-쇼크 증후군, 식중독, T 세포의 침윤을 수반하는 상태, 백혈구-부착 결핍, 시토키인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 연관된 면역 반응, 백혈구 누출을 수반하는 질환, 다발성 기관 손상 증후군, 항원-항체 복합체-매개 질환, 항사구체 기저막 질환, 알레르기성 신경염, 자가면역 다발내분비병증, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역 위축성 위염, 교감성 안염, 류마티스 질환, 혼합 결함 조직 질환, 신증후군, 췌도염, 다내분비선 부전, 말초 신경병증, 제I형 자가면역 다선성 증후군, 성인-발병 특발성 부갑상선기능저하증 (AOIH), 전두 탈모증, 확장성 심근병증, 후천성 수포성 표피박리증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신증후군, 원발성 경화성 담관염, 화농성 또는 비화농성 부비동염, 급성 또는 만성 부비동염, 사골, 전두, 상악, 또는 접형 동염, 호산구-관련 장애 예컨대 호산구증가증, 폐 침윤 호산구증가증, 호산구증가증-근육통 증후군, 괴플러 증후군, 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구증가증, 기관지폐렴성 아스페르길루스증, 아스페르길루스증, 또는 호산구 함유 육아종, 아나필락시스, 혈청음성 척추관절염, 다내분비선 자가면역 질환, 경화성 담관염, 공막, 상공막, 만성 점막피부 칸디다증, 브루튼 증후군, 영아의 일시적 저감마글로불린혈증, 비스코트-알드리치 증후군, 운동실조 모세혈관확장증, 콜라겐 질환과 연관된 자가면역 장애, 류마티즘, 신경계 질환, 허혈성 재관류 장애, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능장애, 혈관확장증, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각과민증, 뇌 허혈, 및 혈관형성을 수반하는 질환, 알레르기성 과민 장애, 사구체신염, 재관류 손상, 심근 또는 다른 조직의 재관류 손상, 급성 염증 요인을 갖는 피부병, 급성 화농성 수막염 또는 다른 중추신경계 염증성 장애, 안구 및 안와 염증성 장애, 과립구 수혈-연관 증후군, 시토키인-유발 독성, 급성 중증 염증, 만성 난치성 염증, 신우염, 폐경변증, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 대동맥 장애, 동맥내막 증식증, 소화성 궤양, 판막염, 및 자궁내막증을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

- [0351] 치료 용도 뿐만 아니라, 본 발명의 항체는 진단 방법, 예컨대 본원에 기재된 질환 및 상태를 위한 진단 방법을 포함하여, 다른 목적에 사용될 수 있다.
- [0352] X. 투여량, 제제 및 지속시간
- [0353] 본 발명의 단백질은 우수한 의료 실무에 일치하는 방식으로 제제화되고, 투약 및 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려되는 인자는 치료되는 특정 장애, 치료되는 특정 포유동물, 개별 대상체의 임상 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 전문의에게 공지된 기타 인자를 포함한다. 투여되는 단백질의 "치료 유효량"은 상기 고려사항에 의해 결정될 것이고, 특정 장애 (예를 들어, 암, 알레르기성 또는 염증성 장애, 또는 자가면역 장애)의 예방, 개선 또는 치료를 위해 필요한 최소량이다. 단백질은 그럴 필요는 없지만, 임의로는 장애의 예방 또는 치료를 위해 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제에 존재하는 단백질의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 요인에 따라 달라진다. 일반적으로, 이들은 이전에 사용되던 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나, 이전에 사용되던 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다. 일반적으로, 암의 완화 또는 치료는 암과 연관된 하나 이상의 증상 또는 의료 문제를 감소시키는 것을 포함한다. 치료 유효량의 약물은 암 세포 수를 (적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 또는 그 초과만큼) 감소시키고/거나; 종양 크기 또는 종양 부하를 감소 또는 억제하고/하거나; 말초 기관으로의 암 세포 침윤을 억제하고/하거나 (즉, 어느 정도로 감소시키고/거나 중지시킴); 선종의 경우 호르몬 분비를 감소시키고/거나; 혈관 밀도를 감소시키고/거나; 종양 전이를 억제하고/하거나; 종양 성장을 감소 또는 억제하고/억제하거나; 암과 연관된 증상 중 하나 이상을 어느 정도 경감시키는 것 중 하나 또는 이들의 조합을 달성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질은 대상체에서 암 또는 자가면역 장애의 발생 또는 재발을 예방하기 위해 사용된다.
- [0354] 한 실시양태에서, 본 발명은 암 또는 자가면역 장애에 감수성이거나 이 장애로 진단된 인간 대상체의 생존 기간을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 생존 기간은 약물의 첫번째 투여에서 사망까지의 시간으로 정의된다. 생존 기간은 또한 치료 동안 대상체의 사망 위험을 나타내는 치료군 대 대조군의 총화 위험비 (HR)에 의해 측정될 수 있다.
- [0355] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 치료는 다양한 항암 요법으로 치료되는, 암에 감수성이거나 암으로 진단된 인간 대상체의 군에서 반응률을 유의하게 증가시킨다. 반응률은 치료된 대상체 중 치료에 반응한 대상체의 백분율로서 정의된다. 한 측면에서, 본 발명의 단백질, 및 수술, 방사선 요법 또는 하나 이상의 화학요법제를 사용한 본 발명의 조합 치료는 수술, 방사선 요법, 또는 화학요법 단독으로 치료된 군에 비해 치료된 대상체 군에서 반응률을 유의하게 증가시키고, 증가는 0.005 미만의 카이-제곱 p-값을 갖는다. 암 치료에 있어서 치료 효능의 추가의 측정은 미국 특허 출원 공보 번호 20050186208에 기재되어 있다.
- [0356] 치료 제제는 목적하는 순도를 지닌 활성 성분을 임의의 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 당업계에 공지된 표준 방법을 이용하여 제조한다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (20<sup>th</sup> edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA]). 허용되는 담체는 염수, 또는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈<sup>TM</sup>, 플루로닉스(PLURONICS)<sup>TM</sup> 또는 PEG를 포함한다.
- [0357] 임의로, 그러나 바람직하게는, 제제는 제약상 허용되는 염, 바람직하게는 염화나트륨을 함유하고, 바람직하게는 이는 대략 생리학적 농도이다. 임의로, 본 발명의 제제는 제약상 허용되는 보존제를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 보존제 농도는 0.1 내지 2.0%, 전형적으로는 v/v의 범위이다. 적합한 보존제는 제약 업계에 공지된 것을 포함한다. 벤질 알콜, 페놀, m-크레졸, 메틸파라벤 및 프로필파라벤이 바람직한 보존제이다. 임의로, 본 발명의 제제는 0.005 내지 0.02% 농도의 제약상 허용되는 계면활성제를 포함할 수 있다.
- [0358] 본원의 제제는 또한 치료할 특정한 적응증에 필요한, 바람직하게는 서로 유해 효과를 내지 않는 상보적인 활성을 갖는, 1종 초과 활성 화합물을 함유할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.
- [0359] 활성 성분은 또한 예를 들어 액적형성 기술 또는 인터페이스 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각



각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내에 또는 마크로에멀전 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 상기 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences]에 개시되어 있다.

[0360] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예로는 이종다량체 단백질을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및  $\gamma$  에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 에컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)<sup>TM</sup> (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가 가능한 마이크로구체), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 이종다량체 단백질(들)이 장시간 동안 신체에 남아있을 때, 이들은 37°C에서 수분에 노출된 결과 변성 또는 응집되어 생물학적 활성의 상실 및 가능하게는 면역원성의 변화를 야기할 수 있다. 수반된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안될 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설피드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 안정화는 술폰히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.

[0361] 본원에 기재된 단백질 (예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 이종다량체 단백질, 에컨대 다중특이적 항체)은 공지된 방법에 따라, 예를 들어 정맥내 투여 (예를 들어 볼루스로서 또는 일정 시간에 걸친 연속 주입에 의해), 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액막내, 경막내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 의해 인간 대상체에게 투여된다. 심한 부작용 또는 독성이 단백질에 의해 인식되는 표적 분자에 대한 길항작용과 연관될 경우 국소 투여가 특히 바람직할 수 있다. 치료 용도를 위해 생체의 전략을 사용할 수도 있다. 생체의 전략은 대상체로부터 얻은 세포를 본 발명의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 형질감염시키거나 형질도입시키는 것을 포함한다. 이어서, 상기 형질감염 또는 형질도입된 세포를 대상체에게 다시 주입한다. 세포는 조혈 세포 (예를 들어, 골수 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, T 세포 또는 B 세포), 섬유모세포, 상피 세포, 내피 세포, 각질세포 또는 근육 세포를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아닌 임의의 넓 범위의 유형일 수 있다.

[0362] 한 예에서, 단백질 복합체 (예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 이종다량체 단백질, 에컨대 다중특이적 항체)는 예를 들어 장애 또는 종양의 위치가 허용될 때 직접적인 주사에 의해 국소 투여되고, 주사는 주기적으로 반복될 수 있다. 또한, 단백질 복합체는 국소 재발 또는 전이를 예방하거나 감소시키기 위해, 대상체에게 전신 전달되거나 또는 종양 세포에, 예를 들어 종양 또는 종양의 수술에 의한 절제 후에 종양층에 직접 전달될 수 있다.

[0363] XI. 제조품

[0364] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본원에 기재된 하나 이상의 단백질 복합체, 및 장애 (예를 들어, 자가면역 질환 또는 암)의 치료 또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이다. 제조품은 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 다양한 물질, 에컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 용기가 형성될 수 있다. 용기는 상태의 치료에 효과적인 조성물을 보유하고, 멸균 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 이종다량체 단백질 (예를 들어, 항체 또는 항체 단편)이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 해당 조성물이 특정 상태를 치료하는데 사용됨을 표시한다. 라벨 또는 포장 삽입물은 대상체에게 이종다량체 단백질 조성물을 투여하기 위한 지침서를 추가로 포함할 것이다. 본원에 기재된 조합 요법제를 포함하는 제조품 및 키트가 또한 고려된다.

[0365] 포장 삽입물은 치료 생성물의 시판되는 포장물 내에 통상적으로 포함되어 있으며 이러한 치료 생성물의 사용에 관한 적응증, 사용법, 투용량, 투여, 금기 사항 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 지침서를 지칭한다. 특정 실시양태에서 포장 삽입물은 조성물이 유방암, 결장직장암, 폐암, 신세포 암종, 신경교종, 또는 난소암의 치료를 위해 사용됨을 나타낸다.

[0366] 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예를 들어 정균 주사용수 (BWFJ), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제조품은 상업적 및 사용자 관점에서 고려되는 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 추가로 포함할 수 있다.

- [0367] 다양한 목적, 예를 들어 세포로부터 항원 (예를 들어, HER2 또는 EGFR)의 정제 또는 면역침전을 위해 유용한 키트가 또한 제공된다. 항원 (예를 들어, HER2 또는 EGFR)의 단리 및 정제를 위해, 키트는 비드 (예를 들어, 세파로스 비드)에 커플링된 이종다량체 단백질 (예를 들어, EGFR/HER2 항체)을 함유할 수 있다. 시험관 내에서, 예를 들어 ELISA 또는 웨스턴 블롯에서 항원의 검출 및 정량화를 위한 이종다량체 단백질(들)을 함유하는 키트를 제공할 수 있다. 제조품과 마찬가지로, 키트는 용기, 및 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 용기는 적어도 하나의 본 발명의 이종다량체 단백질 (예를 들어, 다중특이적 항체 또는 항체 단편)을 포함하는 조성물을 수용한다. 예를 들어 희석제 및 완충액 또는 대조군 항체를 수용하는 추가 용기가 포함될 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물의 설명 뿐만 아니라 의도된 시험관내 또는 진단 용도에 대한 지침을 제공할 수 있다.
- [0368] 상기 기재된 설명은 당업자가 본 발명을 실시할 수 있을 만큼 충분한 것으로 간주된다. 하기 실시예는 단지 예시 목적으로만 제공되며, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 실제로, 본원에 제시되고 기재된 것 이외의 본 발명의 다양한 변형은 전술된 기재로부터 당업자에게 명백해질 것이고, 첨부된 특허청구범위 내에 속할 것이다.
- [0369] 하기 실험 개시내용에서, 하기 약어가 적용된다: eq (당량); M (몰 농도);  $\mu$ M (마이크로몰 농도); N (노르말); mol (몰); mmol (밀리몰);  $\mu$ mol (마이크로몰); nmol (나노몰); g (그램); mg (밀리그램); kg (킬로그램);  $\mu$ g (마이크로그램); L (리터); ml (밀리리터);  $\mu$ l (마이크로리터); cm (센티미터); mm (밀리미터);  $\mu$ m (마이크로미터); nm (나노미터);  $^{\circ}$ C (섭씨 온도); h (시간); min (분); sec (초); msec (밀리초); ADCC (항체-의존성 세포 세포독성); BsAb (이중특이적 항체);  $C_L$  (경쇄의 불변 도메인);  $C_H$  (중쇄의 불변 도메인); CMC (보체-매개 세포 독성); Fab (항원 결합 단편); Fc (결정화된 단편); Fv (가변 단편 ( $V_L+V_H$ )); EGFR (표피 성장 인자 수용체); HC (중쇄); IGFR (인슐린-유사 성장 인자 수용체); LC (경쇄); scFv (단일쇄 가변 단편) (아미노산 링커에 의해 테더링된  $V_L$  및  $V_H$ ); VEGF (혈관 내피 성장 인자); VEGFR2 (혈관 내피 성장 인자 수용체 2);  $V_H$  (가변 중쇄 도메인);  $V_L$  (가변 경쇄 도메인).
- [0370] 실시예
- [0371] 본 발명은 다음 실시예에 추가로 상세히 기재되는데, 이러한 실시예는 청구된 바와 같은 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 제한하지 않는다. 첨부되는 도면은 본 발명의 명세서 및 설명의 통합 부분으로서 간주되어야 한다는 것을 의미한다. 인용된 모든 참고 문헌은 그에 기재되는 모든 것에 대해 본원에 구체적으로 참조로 포함된다. 하기 실시예는 예시를 위해 제공되며, 청구된 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다.
- [0372] 실시예 1
- [0373] 발현 벡터의 구축
- [0374] 본 실시예는 숙주 세포를 형질전환시키는데 사용된 핵산 구축물을 예시한다.
- [0375] 일반적으로, 두 중쇄 및 경쇄 DNA 코딩 서열을, 각각의 서열 및 항생제 내성에 대한 별개의 프로모터 요소를 함유하는 발현 플라스미드로 클로닝하여 발현 플라스미드를 함유하는 박테리아 세포를 선택하였다. 벡터 구축물은 또한 박테리아 세포의 주변세포질 공간으로의 항체 폴리펩티드의 유출을 위해 내열성 장독소 II (STII) 분비 신호를 코딩한다 (문헌 [Picken et al., 1983, Infect. Immun. 42:269-275] 및 [Lee et al., 1983, Infect. Immun. 42:264-268]). 각각의 쇄의 전사는 phoA 프로모터에 의해 제어되고 (문헌 [Kikuchi et al., 1981, Nucleic Acids Res., 9:5671-5678]), 번역 제어는 번역 개시 영역 (TIR)에 침묵 코돈 변화를 함유하는, 측정된 상대적 번역 강도의 앞서 기재된 STII 신호 서열 변이체에 의해 제공된다 (문헌 [Simmons and Yansura, 1996, Nature Biotechnol. 14:629-634] 및 [Simmons et al., 2002, J. Immunol Methods, 263:133-147]). 노브 및 홀 플라스미드의 개략도를 각각 도 2a 및 2b에 나타내었다.
- [0376] 본 발명은 특정 항체 결합 서열에게 의존적이지 않고, 임의의 반-항체 조합에 적용가능하지만, 본원의 실시예는 c-met, EGFR, IL-4 및 IL-13에 지정된 이종다량체 항체에 관한 것이다. 항-c-met 항체의 예는 미국 특허 번호 7,472,724 및 미국 특허 번호 7,498,420에 제시되어 있다. 항-EGFR 항체의 예는 미국 가출원 61/210,562 (2009년 3월 20일 출원), 미국 특허 출원 공보 번호 20080274114 (2008년 11월 6일 공개) 및 미국 특허 번호 5,844,093 (1998년 12월 1일 허여)에 제시되어 있다. 항-IL-13 항체의 예는 미국 특허 번호 7,501,121 (2009년 3월 10일 허여), 미국 특허 번호 7,615,213 (2009년 11월 10일 허여), WO 2006/085938 (2006년 8월 17일 공개), 미국 특허 출원 공보 번호 20090214523 (2009년 8월 27일 공개) 및 미국 특허 번호 7,674,459 (2010년 3

월 9일 허여)에 기재되어 있다. 항-IL-4 항체의 예는 미국 특허 출원 공보 번호 US 20080241160 (2008년 10월 2일 공개) 및 미국 특허 번호 6,358,509 (2002년 3월 19일 허여)에 기재되어 있다.

[0377] 각각의 반-항체는 미국 특허 번호 7,642,228에 기재된 바와 같이 중쇄 내로 조작된 노브 (돌출부) 또는 홀 (함몰부)을 가졌다. 간략하게, C<sub>H</sub>3 노브 돌연변이체를 먼저 생성하였다. 이어서, C<sub>H</sub>3 홀 돌연변이체의 라이브러리를 파트너 C<sub>H</sub>3 도메인 상의 노브에 근접하여 있는 잔기 366, 368 및 407을 임의 추출함으로써 생성하였다. 하기 실시예에서, 노브 돌연변이는 T366W이고, 홀은 IgG1 백본에 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V를 갖는다. 다른 이뮤노글로불린 이소형의 동등한 돌연변이는 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 또한, 당업자는 이중특이적 항체에 사용된 2개의 반-항체가 동일한 이소형인 것이 바람직하다는 것을 쉽게 인식할 것이다. 상이한 이소형의 반-항체가 사용될 수 있지만, 추가의 돌연변이를 필요로 할 수 있다.

[0378] 본 실시예에 기재된 벡터가 항-c-Met 또는 항-EGFR 반-항체에 대한 것이지만, 당업자는 어떠한 항체라도 플라스미드에서 코딩될 수 있다는 것을 쉽게 인식할 것이다. 본원에 사용된 모든 구축물에 대한 출발 플라스미드는 중쇄에 대해 1, 경쇄에 대해 1의 상대적 TIR을 갖는, 앞서 기재된 항-조직 인자 별개의 시스트론 플라스미드, paTF50이다 (문헌 [Simmons et al., 2002, J. Immunol Methods, 263:133-147] 및 미국 특허 번호 6,979,556). 상대적 TIR 강도의 증가를 이용하여 이들 반-항체의 발현 역가를 증가시켰다.

[0379] 실시예 2

[0380] 별개의 세포 배양물을 사용한 이중다량체 단백질 생산

[0381] 하기 실시예는 단량체 구성 요소를 발현하는 세포가 별개의 배양물에서 성장하는 경우의 이중다량체 단백질의 생산을 보여준다. 이 방법에서, 세포를 별개의 배양물에서 반-항체를 발현하도록 성장시키고, 유도하였다. 한 방법에서, 숙주 세포 배양물을 조합한 후, 단백질 정제를 수행할 수 있다. 또 다른 방법에서 구성 요소를 먼저 정제하고, 이어서 조합하여, 이중다량체 단백질을 형성할 수 있다.

[0382] 두 방법 모두에서, 제1 힌지-함유 폴리펩티드 (예를 들어, 반-항체 (노브))를 코딩하는 핵산을 제1 숙주 세포로 도입하고, 제2 힌지-함유 폴리펩티드 (예를 들어, 반-항체 (홀))를 코딩하는 핵산을 제2 숙주 세포로 도입하였다. 본 실시예가 BsAb의 형성을 예시하지만, 당업자는 기재된 방법이 힌지 영역을 포함하는 임의의 이중다량체 단백질, 예를 들어 아피마디 등에 적용가능하다는 것을 쉽게 인식할 것이다.

[0383] 방법 #1 - 별개의 배양물에서 노브 반-항체 및 홀 반-항체를 독립적으로 생산하고, 반-항체를 개별적으로 정제하고, 혼합하고, 산화환원시켜, 무손상 BsAb를 형성한다.

[0384] 노브 또는 홀 돌연변이를 함유하는 반-항체를, 박테리아 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이에서 실시예 1에서 기재된 구축물을 사용하여 중쇄 및 경쇄를 발현시킴으로써 별개의 배양물에서 생성하였다. 도 3b 및 4a를 참조한다. 이 방법 #1에서, 노브 반-항체는 항-EGFR이었고, 홀 반-항체는 항-c-met였다. 실시예 1의 발현 플라스미드를 이. 콜라이 숙주 균주 33D3 (문헌 [Ridgway et al. (1999) 59 (11): 2718]) 또는 64B4 (W3110 ΔfhuA ΔphoA ilvG<sup>+</sup> Δprc spr43H1 ΔdegP ΔmanA lacI<sup>q</sup> ΔompT)로 도입하고, 형질전환체를 카르베니실린 함유 LB 플레이트 상에서 선택하였다. 이어서, 형질전환체를 사용하여 카르베니실린을 함유하는 LB 종균 배양물을 접종하고, 이를 30°C에서 진탕하면서 밤새 성장시켰다. 종균 배양물을 카르베니실린을 함유하는 포스페이트 제한 배지 C.R.A.P. (문헌 [Simmons et al., 2002, J. Immunol Methods, 263:133-147])로 100X 희석하고, 이를 30°C에서 진탕하면서 24 시간 동안 성장시켰다. 배양물을 원심분리하고, 세포 펠릿을 항체 정제 시작시까지 동결시켰다. 펠릿을 해동하고, 25 mM 트리스-염기 (염산을 사용하여 pH 7.5로 조정), 125 mM NaCl 및 5 mM EDTA (TEB 또는 트리스 추출 완충제)를 함유하는 추출 완충제 중에 세포 펠릿 5 g 당 100 mL TEB의 부피 대 중량 비로 재현탁시키고, 재현탁 혼합물을 마이크로플루이드스 코퍼레이션(Microfluidics Corporation) 모델 110F 마이크로플루이디저 (매사추세츠주 뉴턴)를 통해 3회 통과시킴으로써 마이크로플루이드스를 이용하여, 세포를 파괴함으로써 추출하였다. 이어서, 박테리아 세포 추출물을 15,000Xg에서 20 분 동안 원심분리하여 청정화시키고, 상청액을 수집하고, 0.22 마이크로미터 아세테이트 필터를 통해 여과한 후, 정제하였다.

[0385] 각각의 반-항체를 단백질 A 포획에 의해 개별적으로 정제한 후, 양이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. 노브 반-항체로부터의 청정화 세포 추출물을 지이 헬쓰케어 (GE Healthcare, 뉴저지주 피츠카타웨이)로부터의 1 mL 하이트랩 맵셀렉트 슈어(HiTrap MabSelect SURE) 칼럼 상에 2 mL/분으로 로딩하였다. 로딩한 후, 칼럼을 10 칼럼 부피 (CV)의 40 mM 시트르산나트륨, pH 6.0, 125 mM 염화나트륨 및 5 mM EDTA에 이어서 5 칼럼 부피의 20 mM 시트르산나트륨 (pH 6.0)으로 세척하여, 양이온 교환 칼럼에 의한 포획을 촉진하였다. 친화도 포획 반-



항체를 10 칼럼 부피 (CV)의 0.2 mM 아세트산 (pH 2-3)으로 용리시키고, 지이 헬스케어로부터의 1 mL 하이트랩 SP-HP 강한 양이온 교환 칼럼 상에 직접적으로 포획하였다. 칼럼을 10 CV의, 25 mM 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES) pH 5.8을 함유하는 완충제 A로 세척하였다. 반-항체를 0→50 % 완충제 B (25 mM MES, pH 5.8 및 1 M 염화나트륨 (NaCl))의 선형 구배로 용리시켰다. 20 내지 40 % B에서 용리된 단백질, 및 수집된 분획의 280 nm에서의 UV 흡광도 및 비-환원 SDS-PAGE 분석에 의해 결정된 용리액 피크를 둘 다 노브 또는 홀 반-항체로서 개별적으로 모았다. 두 단백질은 일반적으로 주요 용리 피크를 나타냈고, 서로 산화된 중쇄 및 경쇄 중을 함유하는 모든 분획을 풀에 포함시켰다. 환원 및 비-환원 SDS-PAGE에 의한 정제된 반-항체의 분석을 도 4b에 나타내었다. 결과는 대부분의 발현되고 포획된 단백질이 75 kD 크기임을 나타내었다. 본 발명자들은 도 4c에 나타낸 ESI-TOF 질량 분광측정법에 의해 이를 확인하였다. 반-항체의 질량은 예상된 질량이었고, 이는 힌지 영역의 2개의 시스테인 잔기를 비롯하여 모든 시스테인 상에 디설피드 부가물이 없다는 것을 나타낸다. 힌지 시스테인이 환원되어 반응성 유리 티올을 나타내는지의 여부를 결정하기 위해, 단백질을 1 mM N-에틸말레이미드 (NEM)와 중성 pH에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. 단백질의 질량은 변하지 않았고, 이는 힌지 시스테인이 아마도쇄내 디설피드, 예를 들어 시클릭 디설피드에서 서로 산화되었음을 나타낸다. 이들 2개의 반-항체 (노브 및 홀)를 사용하여 완전 무손상 이중특이적 항체를 어셈블리하기 위해, 먼저 힌지 영역에서쇄내 디설피드를 환원시켜 시스테인 유리 티올을 유리시킴으로써 이들이 후속적으로 다른 중쇄로 산화되어 150 kD 이중특이적 항체를 형성하도록 하는 것이 필요하였다.

[0386] 2개의 상보적 반-항체의 어닐링, 환원 및 재산화를 통해 무손상 이중특이적 분자를 형성하기 위해, 하기 절차를 개발하였다. 독립적으로 단리한 후, 정제된 단백질을 절차의 풀 단계에서 동일한 질량으로 함께 조합하고 (도 5a에 나타냄), 1/10 부피의 1 M 트리스, pH 7.5를 첨가하여 풀의 pH를 7.5로 조정하고, 실온에서 0.5 mM 트리스 [2-카르복시에틸] 포스핀 (TCEP)을 사용하여 단백질을 환원시켰다. 2 시간 동안 환원시킨 후, 모든 단백질을 5 mL 제바(Zeba) 탈염 스핀 칼럼 (피어스(Pierce), 일리노이주 록포드)을 사용하여 25 mM 트리스, pH 7.5, 및 125 mM NaCl로 완충제 교환함으로써 단백질 농도 1 mg/mL의 약 4 mL 부피를 생성하였다. 이어서, 혼합물을 52 °C로 25 분 동안 가열하여 단백질을 어닐링한 후, 실온, 약 20 °C로 냉각시켰다. 어닐링된 항체를 10 kD MW 컷 오프 스핀 농축기를 이용하여 약 8 mg/mL의 단백질 농도를 갖는 0.5 mL 부피로 농축시키고, 디메틸설폭시드 중에 용해된 100 mM DHAA의 원액으로부터의 반응 혼합물에 300 마이크로몰 데히드로아스코르브산 (DHAA)을 첨가하여 산화시켰다. 산화를 위해 첨가한 DHAA의 양은 단백질 몰 농도에 비해 약 10배 과량이었다. 실온에서 밤새 산화시킨 후, 산화된 물질을 25 mM MES pH 6.0 및 300 mM NaCl을 함유하는 완충제 중의 S-200 겔 여과 칼럼 (지이 헬스케어로부터의 22 mL S200 트리콘(Tricorn)) 상에 적용하였다. 무손상 항체를 모으고, 물 중에 10배 희석하였다. 이어서, BsAb 단백질을 4.5에서 9.2로의 pH 구배 용리로 카르복시메틸 (CM) 수지 (1 mL 하이트랩 CM-FF, 지이 헬스케어)를 이용하여 약한 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 완충제 A 및 B 조성물은 20 mM 시트르산나트륨, 30 mM MES, 20 mM HEPES, 20 mM 이미디졸, 20 mM 트리스, 20 mM CAPS 및 25 mM NaCl로 구성되었으며, 여기서 A 완충제는 HCl로 pH 4.2로 조정하였고, B 완충제는 NaOH를 사용하여 pH 9.2 (또는 10.4)로 조정하였다. CM 크로마토그래피 후에 수득한 정제된 물질을 질량 분광측정법에 의해 분석하여, 정확한 분자 조성을 결정하였다 (도 4d). 질량 분광측정 분석에서 단지 검출가능한 무손상 항체 생성물이 146,051.89의 MW를 갖는 것으로 나타났으며, 이는 145,051.75의 이론적 MW를 갖는 이중이량체 노브-홀 중 항-EGFR/항-c-met와 거의 동등하게 일치한다. 노브 약 2 mg 및 홀 2 mg으로 시작한 상기 절차의 수율은 약 0.5-1 mg이었다.

[0387] 비-인간 영장류에서의 생체내 실험, 예컨대 약동학적 특성의 결정을 위한 항체를 대규모로 생산하기 위해, 100 mg 내지 그램 스케일 양의 항체가 필요하였다. 본 발명자들은 도 5a에 나타낸 바와 같이 각각의 반-항체에 대한 별개의 독립적 배양물을 사용하는 절차를 개발하여 무손상 이중특이적 항체를 이러한 양으로 생산하였다. 이들 체제에 대해, 충분한 양의 항체를 함유하는 세포 펠릿 또는 전 브로쓰를 생산하는데 10 리터 발효가 요구되었다 (문헌 [Simmons et al., 2002. J. Immunol. Methods, 263:133-147] 및 미국 특허 번호 6,979,556). 실험 동안, 세포 펠릿 또는 박테리아 전 브로쓰를 발현된 반-항체를 함유하는 바이오매스로 사용하였다. 일부 경우에서, 유의한 분율의 항체가 배지로 누출되었으며, 여기서 전 브로쓰가 더 높은 수율을 가졌다. 세포 펠릿의 경우, 물질을 25 mM 트리스, pH 7.5, 5 mM EDTA 및 125 mM NaCl을 함유하는 추출 완충제 중에 재현탁시키고, 마이크로플루이딕스 (매사추세츠주 뉴턴)으로부터의 모델 HC80003A 마이크로플루이다이어를 이용하여 미세유동화에 의해 용리시켰다. 전 브로쓰는 첨가제의 첨가 없이 직접적으로 미세유동화하였다. 두 경우 모두에서, 기기를 통해 물질을 3회 통과시켰다. 본 실시예에서, 본 발명자들은 시토카인 인터류킨-4 (노브) 및 인터류킨-13 (홀)을 표적으로 하는 2가지 버전의 이중특이적 항체 500 mg을 제조하였다.

[0388] 제1 버전의 이중특이적 항체는 단지 노브 및 홀 돌연변이를 갖는 인간 IgG1a Fc를 함유하였고, 제2 버전은 신생



아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 보다 큰 친화도를 유발하는 2개의 돌연변이, T307Q 및 N434A를 갖는 추가로 변형된 Fc를 함유하였다. 제2 버전은 항체에 대해 보다 느린 청소율 및 보다 긴 반감기를 부여할 것으로 예상되었다. 두 버전 모두의 Fc (전자의 경우 WT-Fc, 후자의 경우 FcRn-변이체)의 홀 항체 (IL-4를 표적으로 함) 및 노브 항체 (IL-13을 표적으로 함)를 둘 다 10 리터 발효 및 전 브로쓰 함유 성장 배지에서 개별적으로 성장시키고, 박테리아 세포를 독립적으로 균질화시키고 정제하였다. 전 브로쓰의 미세유동화 후, 추출물을 동일 부피의 0.4% 폴리에틸렌이민 (PEI) (pH 9.0)으로 처리하여, 원심분리에 의한 청정화를 위한 추출물을 제조하였다. 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 또는 4°C에서 밤새 교반하였다. PEI는 추출물의 과도한 침전을 유발하였고, 이를 15,000Xg에서 45 분 동안 원심분리에 의해 청정화하였다. 후속으로, 상청액을 0.22 마이크로미터 필터로 여과한 후, 100 mL 맵 셀렉트 슈어 단백질 A 포획 칼럼 상에 로딩하였다. 추출물을 20 ml/분으로 로딩하고, 280에서의 UV 흡광도가 안정한 기준선에 도달할 때까지 (일반적으로 약 10 칼럼 부피 (CV)), 40 mM 시트르산나트륨, pH 6.0 및 100 mM NaCl로 세척하였다. 세척 완충제를 20 mM 시트르산나트륨, pH 6.0으로 변경하고, 약 2 CV 동안 세척하였다. 포획된 반-항체를 0.2 M 아세트산을 사용하여 용리시켰다. 단백질 A에 의한 단리 후, 항체를 S-FF 수지 (지이 헬스케어)를 사용하는 양이온 교환 크로마토그래피 또는 S200 수지 (지이 헬스케어)를 사용하는 겔 여과 크로마토그래피에 의해 정제하여, 불순물 및 응집체를 제거하였다. 도 5b에 나타난 바와 같이 정제된 반-항체는 대부분 약 75 kD 중이었다. 제2 단리 단계 후, 각각의 반-항체 500 mg을 1 mg/ml의 농도로 함께 모으고, 1 M 트리스, pH 7.5를 사용하여 pH를 7.5 조정하였다. 혼합물을 인큐베이터에서 37°C로 가열하고, 150 kD 항체 종의 발생에 대해 겔 여과에 의해 모니터링하였다. 2 시간 후, 어닐링이 완료되었고 (이량체 150 kD 종으로의 완전한 전환을 나타냄), 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 2 mM DTT를 첨가하여 24°C에서 2 시간 동안 단백질을 환원시키고, 이어서 10 kD 컷오프 스핀 필터를 사용하여 20 mg/ml로 농축시켰다. 농축 용액을 25 mM 트리스, pH 8.0만을 함유하는 완충제 중에서 밤새 투석하여 산화시켰다. 후속으로, 산화된 물질을 순도 및 응집에 대해 분석하였다. 무손상 항체 종은 질량 분광측정법에 의해 무손상 완전 산화 이중이량체 이중특이적 분자로 결정되었으나, 겔 여과 및 SDS-PAGE 분석에서는 유의한 양의 응집체의 존재가 나타났고, 이 중 일부는 분명히 디설피드 연결된 다량체의 결과물이었다 (데이터는 제시하지 않음). 생체내 실험을 위해 이중특이적 항체를 추가로 정제하기 위해, 항체를 트리스, pH 7.5 및 125 mM NaCl 중에서 S-200 겔 여과 칼럼 상에서 분리하였다. 정제된 물질은 도입된 응집체의 제거로 인해 물질의 30% 초과 손실을 나타내었다. 제조의 마지막 단계를 위해, 단백질을 양이온 교환 칼럼에 부착시키고, 50 mM 아세트산나트륨, pH 5.0 중 0.1% TX114로 세척하여 오염 내독소를 제거하고, 50 mM 트리스, pH 8.0을 함유하는 고 pH 완충제로 용리시켰다. 이어서, 용리된 단백질을 생체내 실험에 적합한 완충제로 투석하여 제제화하고, 4°C에서 보관하였다. WT-Fc 및 FcRn-변이체로 이루어진 최종 물질을 SDS-PAGE, 질량 분광측정법, 오염 내독소 수준을 결정하기 위한 LAL 검정, 및 겔 여과 분석에 의해 분석하였다. SDS-PAGE의 결과를 도 5c에 나타내었고, 이는 주요 종이 150 kD의 무손상 이중특이적 항체임을 나타낸다. 도 6a는 시토카인 IL-4 및 IL-13의 중화를 시험하는 TF-2 세포 증식 검정에서의 항체의 생물학적 활성을 보여준다. 검정을 위해, 항-IL-4/IL-13 이중특이적 항체, 항-IL-4 및 항-IL-13 항체를 25 ug/ml의 출발 농도로 사용하여, 검정 배지 (rhGM-CSF 무함유 배양 배지) 중에 0.025 pg/ml의 최종 농도로, 또는 0.4 ng/ml 인간 IL-4 (알앤디 시스템즈(R&D Systems), 카탈로그 # 204-IL) + 20 ng/ml 인간 IL-13 (제넨테크 인크.)을 함유하는 검정 배지 중에 50 uL/웰의 최종 부피로 96 웰 배양 플레이트 (팔콘(Falcon), Cat# 353072)에서 10배 연속 희석하였다. 희석된 항체를 37°C에서 30 분 동안 예비 인큐베이션하였다.

[0389] 예비 인큐베이션 후, RPMI 1640 (제넨테크, 인크.), 10% 태아 소 혈청 (하이클론(HyClone), Cat# SH300071.03), 2 mM L-글루타민, 100 유닛/ml 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신 (김코(Gibco), Cat# 10378) 및 2 ng/ml rhGM-CSF (알앤디 시스템즈, Cat #215-GM) 중에 배양된 TF-1 세포를 검정 배지로 2회 세척하고, 검정 배지 중에 재현탁시켜  $2 \times 10^5$  개 세포/ml의 최종 농도를 수득하였다. 세포 50 uL를 희석된 항체, 검정 배지 + IL-4 및 IL-13 시토카인 (최대 증식 대조군), 또는 검정 배지 단독 (배경 대조군)을 함유하는 각각의 웰에 첨가하였다. 모든 샘플을 2벌로 플레이트팅하였다. 플레이트를 37°C에서 4 일 동안 5% CO<sub>2</sub> 하에 인큐베이션하였다. <sup>3</sup>H 티미딘 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer), Cat# NET027005MC)을 인큐베이션의 마지막 4 시간 동안 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 팩커드 필터메이트(Packard Filtermate)를 이용하여 유니필터-96(Unifilter-96) GF/C (퍼킨 엘머, Cat# 6005174)에 수확하고, <sup>3</sup>H 티미딘 도입을 탑카운트(TopCount) NXT (퍼킨 엘머)를 이용하여 측정하였다. 데이터를 칼레이다그래프(KaleidaGraph)를 이용하여 플롯팅하였다. 결과는 WT 항-IL-4/항-IL-13 이중특이적 항체가 IL-4 및 IL-13 활성을 중화시키는데 있어서 IL-4 및 IL-13의 IgG 항체 조합 만큼 효과적인 것으로 나타났다.

[0390] 이어서, 2개의 항체 (WT 항-IL-4/항-IL-13 및 FcRn-변이체 항-IL-4/항-IL-13)를 시노몰구스 원숭이에서 그의

약동학 (PK) 특성에 대해 시험하였다. 단일 용량 주사를 이용하여, 20 mM 히스티딘-아세테이트, pH 5.5, 240 mM 수크로스, 및 0.02 % 트윈 20 중에서 10.8 mg/mL 및 1 mg/mL로 제제화된 WT 분자, 및 20 mM 인산나트륨, pH 7.5, 240 mM 수크로스, 및 0.02 % 트윈 20 중에 10.5 mg/mL로 제제화된 FcRn-변이체를 IV 주사에 의해 투여하였다. 투여 수준은 2개의 WT 농도의 경우 20 mg/kg 및 2 mg/kg, FcRn-변이체의 경우 20 mg/kg이었다. 상기 3가지 치료제를 주사한 2마리의 암컷 및 2마리의 수컷 원숭이로부터의 혈청 샘플을 42 일의 기간에 걸쳐 주기적으로 채취하였다. 혈청 샘플을 ELISA에 의해 무손상 이중특이적 항체에 대해 분석하였으며, 이 때 IL-4 또는 IL-13의 1개의 항원을 플레이트 상에 코팅하고, 후속으로 항체를 혈청으로부터 포획하였다. 포획된 본 발명의 이중특이적 항체의 양을, IL-13 또는 IL-4의 제2 비오틴화 리간드 (어느 리간드든 플레이트 상에 코팅되지 않은 것) 및 효소-커플링된 스트렙타비딘을 사용한 검출에 의해 결정하였다. 도 6b의 결과는 3가지 샘플의 예상된 2 구획 청소율을 보여준다. 2가지 상이한 버전의 항체의 PK 특성을, CHO 생산 숙주 (아바스틴 및 헤르셉틴)로부터 유도되고 Fc-글리코실화를 함유하는 2개의 다른 항체와 비교하여 하기 표 2에 나타내었다. 이, 콜라이 생산 이중특이적 항체가 표준 방법으로부터의 CHO 유래 항체와 유사하며, FcRn-변이체가 보다 긴 반감기를 갖는다는 것이 명백하다.

표 2

집단 평균 (% RSE)	Vc (mL/kg)	CL (mL/kg/일)	T1/2 (일)
WT	29.0 (9.48)	4.49 (7.66)	~ 10
FcRn	15.8 (5.72)	2.11 (2.47)	~ 18
아바스틴		4.3	~ 12
헤르셉틴		5.5	~ 9

[0391]

[0392]

방법 #2 - 별개의 (즉, 독립적인) 배양물에서 노브 반-항체 및 홀 반-항체를 생산하고, 전 브로쓰를 혼합한 후에 반-항체를 정제하고, 환원제의 첨가 없이 용해시켜, 무손상 BsAb를 형성한다.

[0393]

이 방법은 노브 및 홀 반-항체를 동시에 정제함으로써 방법에서의 단계 수를 줄이기 위한 시도였다. 따라서, 발효 브로쓰를 혼합한 후, 펠릿화하고, 추출 완충제 중에 재현탁시켰다. 각각의 숙주 세포가 세포 막 파괴에 따라 추출 완충제로 힌지 영역 내에 시클릭 디설파이드를 함유하는 그의 발현된 반-항체를 방출할 것으로 여겨졌다. 후속으로, 두 반-항체의 정제를 동시에 수행하고, 이어서 산화환원-어닐링 단계를 수행하여 무손상 BsAb를 형성할 수 있었다. 놀랍게도, 본 발명자들은 노브-홀 항체가 이중이량체화되고 자체 산화되어, 조합된 총 무손상 항체 및 반-항체 (약 75 kD)의 20% 초과로 전장 항체 (약 150 kD)를 형성하였음을 발견하였다 (표 3 참조).

[0394]

노브 반-항체 및 홀 반-항체 발현 숙주 세포를 상기 방법 #1에 기재된 방법을 이용하여 별개의 배양물로 성장시키고, 유도하였다. 각각의 배양물로부터의 전 세포 발효 브로쓰를 3가지 상이한 부피 비로 서로 혼합하고, 이어서 원심분리하여 단세포 펠릿을 형성하였다. 전 세포 발효 브로쓰를 1:1, 2:1 또는 1:2의 (항-c-met):(항-EGFR) 비율의 500 mL 최종 부피로 함께 혼합하였으며, 이 때 항-EGFR 반 항체가 동일한 조건 하에 cMet 항체와 유사하게 발현된다는 바탕 하에 상대적으로 동일한 존재비로 2개의 항체의 회수율을 일치시키려는 의도가 있었다. 각각의 세포 펠릿을 추출 완충제 중에 재현탁시키고, 용해시켰다. 단백질을 실시예 2, 방법 #1에 기재된 바와 같이 단백질-A 크로마토그래피에 이어서 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 추출 및 정제하였다. 추출 완충제는 25 mM 트리스, pH 7.5, 125 mM NaCl 및 5 mM EDTA를 함유하였다. 개별적으로 정제하는 경우, 각각의 노브-반-항체 및 홀-반-항체는 힌지 영역 내에 시클릭 디설파이드, 즉 쇠내 디설파이드 (노브 및 홀 중쇄의 공유적 회합을 방지함)를 형성하였다. 그러나, 제1 및 제2 숙주 세포를 원심분리 전에, 공동-배양 후 또는 전 발효 브로쓰의 혼합 후에 함께 용해시킨 경우에, 약간의 수준의 무손상 항체 종으로의 어셈블리가 있었다는 것이 발견되었다. 도 7은 3가지 비에서 관찰된 무손상 항체 종을 보여준다. 이는 절차에 대한 변형이 무손상 이중특이적 항체의 자발적 형성을 일으킬 수 있고 추가적 화학 단계에 대한 필요성을 실질적으로 없앨 수 있음을 시사한다.

[0395]

2개의 단백질 종의 정량화를, 노벡스(Novex) 4→20% 트리스-글리신 겔 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)을 이용하여 SDS-PAGE에 의해 단백질의 5 마이크로그램을 분리함으로써 수행하였다. 전기영동 후, 겔을 물 중 150 mM 황산암모늄, 1.74 M 아세트산, 10 % 메탄올 및 0.4g/L 쿠마시 염료 R250을 함유하는 콜로이드성 쿠마시 염료

로 염색하였다. 물 중 10% 아세트산을 사용하여 겔을 탈색하고, 후속으로 겔-드라이 건조 용액 (인비트로젠) 중에서 평형화시키고, 2개의 셀로판 시트 사이에서 건조시켰다. 겔을 건조시킨 후, 단백질 밴드를 700 nm에서 오디세이(Odyssey) IR 영상화 시스템 (리-코어 바이오사이언시즈, 네브래스카주 링컨)에 의해 정량화하였다.

### 표 3

개별적으로 성장시킨 2개의 노브 및 홀 배양물로부터의 단백질을 혼합한 후의, 무손상 항체 및 반-항체에 대한 리코어(Licore)형광 신호 [이는 한지의 측정임]

부피 비 (c-met:EGFR)	150 kD RFU	75 kD RFU	조합 RFU	% 150 RFU/총
1:1	36.01	98.78	134.8	26.72
2:1	36.8	107	143.8	25.59
1:2	34.64	107.83	142.5	24.31

[0396]

[0397]

방법 #3 - 독립적인 배양물에서 노브 반-항체 및 홀 반-항체를 생산하고, 독립적으로 원심분리하고, 펠릿을 혼합하고, 재현탁시키고, 이어서 용해시키고, 환원제의 첨가 없이 BsAb를 정제한다.

[0398]

이 방법은 노브 및 홀을 동시에 정제함으로써 방법에서의 단계 수를 줄이기 위한 시도이다.

[0399]

세포를 독립적으로 배양하고, 원심분리에 의해 펠릿화하였다. 펠릿을 혼합하고, 추출 완충제 중에 함께 재현탁시켰다. 반-항체가 세포 막의 파괴에 따라 추출 완충제로 방출되고 상기 방법 #2에서와 유사한 생성물 프로파일이 나타날 것으로 여겨진다.

[0400]

실시예 3

[0401]

단일 혼합된 세포 배양물을 사용한 이중다량체 단백질 생산

[0402]

본 실시예는 두 숙주 세포 집단을 포함하는 배양물로부터의 이중다량체 단백질의 형성을 예시하며, 방법에서 환원제를 첨가하지 않는다.

[0403]

방법 #4 - 동일한 배양물 내의 상이한 세포 집단으로부터 노브 반-항체 및 홀 반-항체를 생산하여, 환원제의 첨가 없이 무손상 BsAb를 형성한다.

[0404]

먼저, 공동-배양 실험을 노브 또는 홀 반-항체를 함유하는 2개의 상이한 이. 콜라이 형질전환체를 사용하여 0.5 리터 진탕 플라스크에서 수행하였다. 이 실험을 위해, 두 노브 (항-EGFR) 및 홀 (항-cMet) 반-항체의 평균 배양물을 30°C에서 LB-배지 (100 µg/ml 카르베니실린) 중에 밤새 배양하여 5 mL 배양물로 생산하였다. 동일한 OD<sub>600</sub>의 상기 밤샘 배양물을 사용하여, 총 시드 부피를 배양물의 1/100으로 유지하면서 3가지 상이한 비 (항-EGFR:항-cMet; 1.5:1, 1:1 및 1:1.5)로 500 mL 완전 CRAP-배지 (100 µg/ml 카르베니실린)에 접종하였다. 세포를 30°C, 200 rpm에서 24 시간 동안 성장시켰다. 이어서, 세포를 원심분리 (6750 x g, 10 분, 4°C)에 의해 펠릿화시키고, 정제에 사용하였다.

[0405]

세포를 10 g 세포 펠릿 당 100 mL의 비율로 25 mM 트리스, pH 7.5, 5 mM EDTA 및 125 mM NaCl을 함유하는 추출 완충제 중에 재현탁시켰다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 미세유동화에 의해 추출하고, 크로마토그래피를 위해 준비한 후, 3가지 상이한 비율의 세포 추출물을, 40 mM 시트르산나트륨 (pH 6.0)만을 함유하는 칼럼 세척 완충제를 사용하여 맵 셀렉트 슈어 1 mL 하이트랩 칼럼 (지이 헬쓰케어, 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코) 상에 이중특이적 항체를 1차 포획함으로써 정제하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 세척하고 용리시킨 후, 단백질 A 포획 풀을 SP-HP 양이온 교환 칼럼 상에 로딩하고, 실시예 2에 기재된 바와 같이 정제하였다. 양이온 교환에 의한 분리 후, 각각의 3개의 정제로부터의 크로마토그래피 피크를 모으고, 약 50 - 100 마이크로리터의 부피 및 약 15 밀리그램/mL의 단백질 농도로 농축시켰다. 초기 접종 비는 무손상 항체의 최종 양에 차이를 주는 것으로 나타났고, 이 때 세포 펠릿을 37°C에서 밤새 배양한 후에 함께 혼합한 경우에 관찰된 것보다, 더 낮은 분자량 형태에 대한 무손상 이중특이적 항체의 비율이 더 높았다. 표 4를 참조한다.

표 4

접종 비	150 kD RFU	75 kD RFU	조합 RFU	% 150 RFU/ 총
1.5 대 1	11.71	10.28	22.0	53.25
1 대 1	9.09	8.96	18.1	50.36
1 대 1.5	7.28	8.71	16.0	45.53

[0406]

[0407]

공동-배양을 규모 증대 절차에 있어서 중요한 10 리터 발효 규모로 확장할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해, 여러 실험을 항-EGFR 및 항-cMet 반-항체를 사용하여 수행하였다. 10 리터 발효를 위해, 1:1 세포 비율의 항-EGFR 및 항-cMet를 함유하는 접종 종균 배양물을 이용하였다. 10 리터 공동-배양물을 실시예 2에 기재된 단일 반-항체 배양물에 대한 것과 동일한 조건 하에 성장시켰다. 세포 펠릿 또는 전 브로쓰를, 또한 상기 기재된 바와 같이 항체 물질의 추출 및 단리에 사용하였다. 세포 펠릿으로부터의 물질의 추출을 위해, 페이스트 약 2.5 kg을 하나의 10 리터 발효로부터 생산하였다. 세포 펠릿을 25 mM 트리스, pH 7.5 및 125 mM NaCl을 함유하는 완충제 5 리터 중에 재현탁시켰다. 펠릿을 2 분 동안 폴리트론 믹서로 처리한 후, 펠릿을 재현탁시키고, 이어서 미세유동화시키고, 청정화시키고, 실시예 2에 기재된 바와 같이 단백질 A 포획을 위해 준비하였다. 발효 실험을 2회 더 반복하고, 10 리터 발효기로부터의 공동-배양 단리의 결과를 도 8c에 나타내었다. 질량 분광측정법을 이용하여 약 150 kD 단백질 및 약 75 kD 단백질을 특성화함으로써 분자 성분을 결정하였다. 놀랍게도, 상기한 발현 프로파일을 근거로 우세한 상부 MW 단백질은 이종특이적 항체였고, 약 75 kD 단백질은 주로 cMet 반-항체였다. 이는 추가적 화학 단계에 대한 필요 없이 이종특이적 항체가 완전히 형성되었음을 나타낸다. 이종특이적 항체가 노브 및 홀 반-항체의 1:1 화학량론적 조합이기 때문에, 75 kD 단백질만 존재한다는 것은 대부분의 제한 반-항체가 자발적으로 무손상 이종특이적 항체로 도입되었음을 나타낸다.

[0408]

이 관찰은 도 8d에 나타난 바와 같은 단순화된 발현 및 정제 방식의 개발로 이어졌다. 단백질 A 포획 후, 항체를 1.5 M 황산암모늄 및 25 mM 인산나트륨 pH 6.5를 함유하는 완충제로 1:1로 희석하고, 소수성 상호작용 칼럼(HIC) 디오넥스 프로 팩(Dionex Pro Pac) HIC-10 4.6 mm x 100 mm (캘리포니아주 서니배일) 상에 로딩하였다. 25 mM 인산나트륨, pH 6.95 및 1.5 M 황산암모늄으로 이루어진 A 완충제, 및 25 mM 인산나트륨, pH 6.95 및 25 % 이소프로필 알콜로 이루어진 B 완충제의 30→60 % B의 구배를 사용하였다. 단백질을 15 CV 구배로 분리하였다. 단백질은 2개의 주요 종 (무손상 이종특이적 항체를 함유하는 것, 및 잉여의 항-EGFR 반-항체를 함유하는 다른 것)으로 분리되었다. 크로마토그래피 분리의 결과를 도 8e에 나타내었다. 무손상 항체를 함유하는 분획을 모으고, 25 mM 아세트산나트륨 완충제 pH 5.0에서 S-FF 칼럼에 부착시켜 남아있는 오염 내독소가 제거되도록 처리하고, 0.1 % 트리톤 X114를 함유하는 동일한 아세테이트 완충제로 세척하고, 이어서 출발 아세테이트 완충제로 세척하여 세제를 제거하였다. 단백질을 25 mM 트리스, pH 8.0을 사용하여 S-FF 칼럼으로부터 용리시키고, 모으고, SDS-PAGE, 질량 분광측정법 및 내독소에 대한 LAL 검정에 의해 분석하였다. 단백질은 최종 제제에서 0.076 EU/mg의 내독소를 함유하였고, 이는 생체내 적용에 적합하다는 것을 나타낸다. 최종 특성화를 도 8f에 나타내었다. SDS-PAGE 분석은 단백질의 대부분이 최종 무손상 이종특이적 항체가 되었음을 나타내었고, 질량 분광측정 분석은 이종특이적 항체에 대한 예상 분자량, 및 존재할 수 있는 임의의 오염 종, 특히 동종이량체 형태가 없음을 나타내었다. 어닐링 및 산화환원 화학을 필요로 하는 절차와 비교한, 공동배양을 이용하는 변형된 절차의 비교를 도 8g에 나타내었다.

[0409]

방법 #5 - 다양한 노브:홀 비를 사용하여, 동일한 배양물에서 노브 반-항체 및 홀 반-항체를 생산하여 무손상 BsAb를 형성한다.

[0410]

본 실시예는 유사한 발현 구축물 (발현되는 반-항체에서만 상이함)을 사용하는 숙주 세포가 서로에 대해 과다성장하지 않고 무손상 BsAb를 생산한다는 것을 보여준다.

[0411]

실험은, 확장 및 발현 전에 접종 비를 조정함으로써 각 쌍의 비율의 제어가 쉽게 이루어질 수 있음을 입증하였다. 두 균주는 서로에 대해 과다성장하지 않는다.

[0412]

접종 비가 공동-배양물의 발효에 걸쳐 보존되는지의 여부를 결정하기 위해, 실험을 수행하여 다양한 세포 비를 갖는 공동-배양물의 24 시간 발효의 종료 시점에 존재하는 노브 또는 홀 중쇄의 양을 결정하였다. 노브 (항-EGFR) 또는 홀 (항-c-Met) 플라스미드를 보유하는 세포를 30°C에서 LB-배지 (100 µg/ml 카르베니실린) 중에 밤새 개별적으로 성장시켰다. 종균 배양물을 사용하여, 조합 접종 부피를 최종 배양물의 1:100에서 유지하면서



다양한 비율의 상기 밤샘 배양물을 함유하는 완전 CRAP-배지 (100  $\mu\text{g/ml}$  카르베니실린)를 접종하였다. 항-EGFR:항-c-Met에 대해 시험된 비율은 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5 및 1:10이었다. 30°C에서 24 시간 동안 배양한 후, 세포 샘플을 수득하였고, 비-환원 SDS-PAGE (12 % 트리스글리신)에 의해 분석한 후, 접합된 염소 항-인간 IgG-Fc 항체 HRP (베틀 레보러토리즈, 인크.(Bethyl Laboratories, Inc.), 텍사스주 몽고메리)를 사용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 두 종의 중쇄가 SDS-PAGE에 의해 분할되었고, 결과를 도 8b에 나타내었다. 각각의 반-항체의 양은 공동-배양물의 접종 비와 상호관련되었으며, 이는 상이한 반-항체를 코딩하는 플라스미드를 보유하는 세포가 공동-배양물에서 서로에 대해 과다성장하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0413] 방법 #6 - 동일한 배양물에서 노브 반-항체 및 홀 반-항체를 생산하여 무손상 BsAb를 형성한다 - 막 투과화.

[0414] 본 실시예는 추가적인 화학 (예를 들어, 산화환원 또는 커플링)을 필요로 하지 않으면서 막 투과화에 의해 배지로 반-항체를 방출하고, 후속으로 무손상 BsAb를 형성하는 것을 보여준다.

[0415] 지단백질 합성의 손실을 유발하는 돌연변이는 이. 콜라이의 세포 막이 주변세포질 단백질을 배지로 유출하도록 변경하고, 또한 이. 콜라이가 EDTA에 과민성이 되도록 하는 것으로 공지되어 있다 (문헌 [Hirota, Y. et al. PNAS 74:1417-1420 (1977)]). EDTA를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 균주 65G4 (W3110  $\Delta\text{fhuA}$   $\Delta\text{phoA}$   $\text{ilvG}^+$   $\Delta\text{prc}$   $\text{spr43H1}$   $\Delta\text{degP}$   $\Delta\text{manA}$   $\text{lacI}^q$   $\Delta\text{ompT}$   $\Delta\text{lpp}$ )로부터의 발현된 항체의 방출을 비교하였다.  $\alpha$ -IL-4 (홀) 또는  $\alpha$ -IL-13 (노브)를 발현하는 세포를 방법 #4에 기재된 바와 같이 1:1 비율로 공동-배양하고, 인큐베이터 진탕기에서 200 rpm으로 30°C에서 20 시간 동안 성장시켰다. 인큐베이션 종료 시점에, 배양물을 3개의 동일한 분취액으로 나누었다. 한 샘플은 EDTA를 첨가하지 않은 대조군의 역할을 하였다. 다른 2개의 샘플에, EDTA, pH 8.0을 10 mM 최종 농도로 첨가하였다. 인큐베이션을 모든 샘플에 대해 30 분 동안 계속한 후, EDTA 처리 샘플 중 하나에  $\text{MgCl}_2$ 를 20 mM 최종 농도로 첨가하였다. 모든 샘플을 인큐베이터 진탕기에서 추가로 30 분 동안 인큐베이션한 후, 원심분리 (9200 x g, 20 분, 4°C)에 의해 세포를 제거하고, 상청액을 GF/F 필터 (와트만(Whatman), 뉴저지주 피스카타웨이) 및 0.2  $\mu\text{m}$  PES 필터 (날진(Nalgene), 뉴욕주 로체스터)를 통해 여과하였다. DNaseI, 소 체장 (시그마, 미주리주 세인트 루이스)을 4 mg/l로 첨가하여 여과를 향상시킬 수 있다.

[0416] 이어서, 여과된 상청액을 상기 기재된 바와 같이 1 mL 단백질 A 맵셀렉트 슈어 하이트랩 칼럼 (지이 헬스케어) 상에 직접 로딩하였다. 포획된 단백질을 상기 기재된 바와 같이 아세트산으로 용리시키고, 단백질의 피크 회수를 도 9a에 나타내었다. 결과는 총 UV 흡광도가 EDTA 처리된 샘플에서 증가하였음을 나타내었다. 이 흡광도는 무손상 이중특이적 항체 및 잉여 반-항체이다. 도 9b 및 9c를 참조한다.

[0417] 별개의 실험에서, 항-IL-4 및 항-IL-13 반-항체를 개별적으로 또는 65G4 세포의 1:1 공동-배양물로서 발현시켰다. 세포를, 실리콘 소포체 (플루카, 스위스 부흐스)를 0.02 % (v/v)로 완전 CRAP 배지에 보충한 것을 제외하고는 상기 (방법 #4) 기재된 바와 같이 배양하였다. 인큐베이터 진탕기에서 200 rpm으로 30°C에서 24 시간 동안 세포를 배양한 후, EDTA, pH 8.0을 10 mM 최종 농도로 첨가하고, 인큐베이션을 1 시간 동안 계속한 후,  $\text{MgCl}_2$ 를 20 mM로 첨가하였다. 세포를 원심분리 (6750 x g, 10 분, 4°C)에 의해 수확하고, 상청액을 여과하고 (0.2  $\mu\text{m}$  PES, 날진, 뉴욕주 로체스터), 항체를 상기 기재된 바와 같이 단백질 A에 의해 포획하고, SDS-PAGE 및 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. 도 9d에 나타낸 결과는 단지 이중특이적 항체의 두 절반만의 존재 하에 무손상 이중특이적 항체 형성이 관찰되었음을 나타낸다. 추가로, 75 kD 단백질 밴드가 대부분 항-IL-4 반-항체였음을 나타내는 질량 분광측정 분석으로서, 대부분의 항-IL-13 항체는 임의의 추가적인 산화환원 화학 없이 이중특이적 항체로 도입되었다. 단백질 A 정제 이중특이적 항체를 황산암모늄 완충제로 1:1로 희석하고, 실시예 3에 기재된 것과 동일한 절차를 이용하여 7.5 mm X 150 mm 프로팩 HIC-10 칼럼 (디오넥스(Dionex), 캘리포니아주 서니배일)에 의해 추가로 정제하였다. 무손상 이중특이적 항체는 99.68의 체류 시간에서 용리되는 것으로 나타났다. 이 피크를 모으고, 비-환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 거의 완전히 무손상 항체 종으로 이루어진 것으로 밝혀졌다. 이 단백질이 순수한 이중이량체 이중특이적 분자임을 확인하기 위해, 본 발명자들은 ESI-TOF LC/MS에 의해 단백질을 분석하였다. 이중특이적 항체 약 10 mg을 PLRP-S 300A 3 마이크로미터 50 x 2.1 mm 역상 칼럼 (폴리머 레보러토리즈(Polymer Laboratories)) 상에 주입하고, 애질런트(Agilent) 1200 시리즈 HPLC 및 0.5 ml/분의 유량 및 80°C에서의 칼럼 히터를 이용하여 34→45 % 0.05 % TFA 및 아세트오트릴의 4.3 분 구배로 분리하였다. LC로부터 용리된 단백질을 애질런트 6210 TOF에 의해 분석하였다. 단백질을 함유하는 단일 피크가 관찰되었고, 이 피크를 질량 범위 50,000-160,000, 1.0 Da 단계, 30.0 S/N 역치, 평균 질량 90, 비제한 질량 범위 및 동위원소 폭 (자동으로 설정됨)을 이용하여 애질런트 매스 헌터(Agilent Mass Hunter) 소프트웨어 버전 B.02.00를 통해 디컨볼루션하였다. 대부분의 신호가 이중특이적 분자의 예상 질량을 나타내었다. 가능한 동종이량체 단백질의 계산된 질량은 항-IL-4의 경우 144,954.6이고, 항-IL-13의 경우 145,133.4인

반면, 아미노산 서열로부터 계산된 무손상 이중이량체 이중특이적 항체에 대한 질량은 측정 질량의 1-2 달톤 내에 포함되는 144,044였다.

[0418] 본 발명자들은 다양한 접종 비가 다시 상기 항체의 세트에 대한 배양물까지 및 또한 65G4의 lpp 결핍과 관련하여 지속되는지의 여부를 시험하였다. 동일한 OD<sub>600</sub>의 항-IL-4 (홀) 또는 항-IL-13 (노브)을 함유하는 시드 배양물을 사용하여 2:1 및 1:2 비로 500 ml CRAP 배지에 접종하고, 배양하고, 상기 기재된 바와 같이 발효 종료 시점에 투과화시켰다 (방법 #6 참조). 2가지 상이한 배지 체제를 단백질 A 포획에 의해 정제하고, 이어서 HIC A 및 B 완충제의 pH를 6.5로 낮춘 것을 제외하고는 상기 기재된 바와 같이 HIC 분리를 수행하였다. 2가지 상이한 종균 배양 비의 결과를 도 9e에 나타내었다. 대부분의 단백질이 무손상 이중특이적 항체인 것으로 관찰되었다. 다른 피크를 질량 분광측정법에 의해 특성화하고, 도 9e에 표시하였다. 항-IL-13 반-항체가 약간 검출되었고, 유의한 양의 보다 많은 항-IL-4가 관찰되었다. 항-IL-4 대 항-IL-13의 33/66 비에서, 보다 많은 항-IL-13이 소량의 남아있는 항-IL-4와 함께 관찰되었다. 여기서, 본 발명자들은 접종 비가 배양물까지 유지되며, 종균 배양비를 조작하여 발현된 항체 절반의 비를 균형화시킴으로써 방법의 최적화를 달성할 수 있음을 발견하였다.

[0419] 본 발명자들은 계속하여 델타-lpp 세포에서의 공동-배양물 발현의 상기 방법을 수많은 다수의 항체 변이체에 대해 시험하였다. 본 발명자들은 도 9f에 몇몇 예시적인 반-항체의 HIC 크로마토그래피 후에 제제화한 다음의 최종 정제된 단백질을 나타내었다.

[0420] 실시예 4

[0421] 이중다량체 단백질 라이브러리

[0422] 본 실시예는 이중다량체 단백질 라이브러리의 구축을 예시한다.

[0423] 기재된 방법을 이용하여 이중특이적 항체의 혼합물을 스크리닝하거나, 또는 이중특이적 항체의 대형 어레이를 신속하게 생성하는데 이용할 수 있는 특정 방법.

[0424] 방법 # 7

[0425] 일부 경우에서, 이중특이적 항체의 선택은 공지되어 있지 않지만, 많은 다양한 반-항체의 조합의 결과일 수 있었다. 대안적으로, 특이적 표적 조합, 예를 들어 항-IL-4/항-IL-13이 요구될 수 있으나, 선택되는 수많은 후보 반-항체가 존재한다. 매트릭스 포맷으로 반-항체를 조합하여 최고 결합 또는 효능을 제공하는 특정 반-항체 조합을 발견할 수 있었고, 많은 이중특이적 항체 변이체를 신속하게 생산할 수 있었다. 이 실험을 위해, 하나의 항체, 예컨대 항-CD3을 스크리닝에 필요한 항체의 양보다 약 10배 (또는 그 초과) 과량으로 생산할 수 있었다. 이어서, 이 분자를 실시예 #1에 기재된 절차를 이용하여 어닐링하고 산화시켰다. 제1 항체의 총량의 약 1/10을 사용하여 도 10에 도시된 바와 같이 다양한 항원 (예컨대 항-CD19, 항-CD20 등)을 표적으로 하는 동일한 양의 약 10개의 반-항체와 조합할 수 있었다. 추가적인 1차 반-항체가 제2 반-항체 레퍼토리와 조합에 필요한 경우, 이를 수행하여 스크리닝 분자의 세트를 수득할 수 있었다.

[0426] 방법의 제2 변형에서, 1차 항체 (예컨대 항-CD3)를 "정상" 이. 콜라이 숙주 세포를 사용하거나, 또는 비-기능성 지단백질 표현형을 갖는 돌연변이체 균주를 사용하여 공동-배양물로서 성장시킬 수 있었다. 이어서, 상기 반-항체를 체계적으로 각각의 다양한 반-항체에 첨가하여, 1차 표적화 반-항체를 모두 함유하는 이중특이적 분자의 어레이를 생산할 수 있었다.

[0427] 방법 # 8

[0428] 1차 반-항체를 대안적 파트너 반-항체의 숙주와, 모든 다른 조합된 항체 반-항체와 조합되기에 충분한 양으로 상기 반-항체를 생산하는 것으로 이루어진 방식으로 조합할 수 있었다. 이어서, 1차 반-항체가 중쇄의 노브 또는 홀 버전이고, 2차 표적화 반-항체의 세트가 상보적 돌연변이체이도록 벌크 어닐링을 단일 반응으로 수행할 수 있었다. 여기서, 조합물로서 질환을 치료하는데 유용할 수 있는 항체의 복합체 혼합물을 생산할 수 있었다.

[0429] 대안적으로, 상기 실시예에 기재된 방법을 이용하는 공동-배양 접근법을 이용하여, 이중특이적 항체와 세트 1차 반-항체 및 다양한 2차 반-항체의 복합체 혼합물을 생산할 수 있었다. 이어서, 상기 혼합물을 벌크로 단리하고, 스크리닝 물질로 사용하여, 이중특이적 변이체의 풀의 양성 결과를 이후 디컨볼루션하여 활성 이중특이적 항체 종을 결정할 수 있도록 하거나, 또는 조합된 혼합물이 보다 효과적인 치료 혼합물로서 사용될 수 있도록 하였다.

[0430] 실시예 5

- [0431] 시험관내 활성
- [0432] 본 실시예는 본원에 기재된 이중특이적 항체가 시험관내 시스템에서 활성을 유지하는지를 시험하였다. 2개의 세포주는 하기 본 실시예 5 및 실시예 6에서 사용하였다. 이들 실험에서, KP4, 췌장관 암종 세포주, 및 A431, 표피양 암종 세포주는 둘 다 강하게 각각 Met 또는 EGFR에 의해 유도되었고, 따라서 이들은 독립적으로 각각의 표적에 대한 bsAb의 효능을 연구하기 위한 우수한 세포주 및 종양 이종이식편이다.
- [0433] KP4 세포주를 리켄 바이오리소스 센터 세포 은행(Riken BioResource Center Cell Bank) (세포주 #: RCB1005; 일본 305-0074 이바라키 츠클바-시 코야다이 3-1-1)으로부터 입수하였다. A431 세포주 (CRL-1555)를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC, 버지니아주 마나사스)로부터 입수하였다.
- [0434] 암 세포, A431을 PBS로 1회 세척하고, 혈청-무함유 배지 중에 재현탁시키고, 계수하고, 이어서 96-웰 플레이트 (2500개 세포/웰)로 첨가하였다. 이어서, 세포를 인간 HGF (0.5 nM) 및 TGF $\alpha$  (0.05 nM)로 단독으로, 또는 (1) 항-EGFR, (2) 항-c-met 항체 ("1-아암" c-met), (3) 항-EGFR 및 항-c-met 항체의 조합 또는 (4) 이중특이적 항-EGFR/항-c-met 항체의 용량 범위로 처리하였다. 3 일 알라마르블루(AlamarBlue)<sup>TM</sup> 검정을 제조업체 (바이오소스 인터내셔널(BioSource International); 캘리포니아주 카마틸로)의 지침에 따라 수행하였다. IC<sub>50</sub> 값을 4-파라미터 모델 (칼레이다그래프(KaleidaGraph) ver. 3.6, 시너지 소프트웨어(Synergy Software); 펜실베이니아주 리딩)을 이용하는 비선형 회귀 분석에 의해 결정하였다.
- [0435] 시험관내 및 생체내에서 Met 의존성인 KP4 세포 검정에서, TGF-알파 및 HGF로의 처리에 의해 자극된 성장을 항-c-met 항체, 항-c-met 항체 및 항-EGFR의 조합, 및 이중특이적 항체로 억제할 수 있었다. 항-EGFR로의 처리는 이들 세포에서 단일 작용제로서 제한된 활성을 보여주었다. 그러나, KP4 세포에서 항-c-met 단독, 또는 개별적으로 첨가된 항-c-met + 항-EGFR Ab보다 이중특이적 항체에 의해 보다 강력하게 억제되었다. 주로 EGFR에 의해 유도된 A431 세포에서, 항-EGFR 항체 또는 항-c-met 항체 단독 어느 것도 세포 증식을 유의하게 억제할 수 없었다. 두 분자 모두의 조합은 세포 증식의 약간의 억제를 보여주었지만, 이중특이적 항체가 동일한 농도에 보다 큰 활성을 나타내었다. 또한, 세포는 항-증식 이외에도 아포토시스를 나타내었다.
- [0436] 이들 검정에서 이중특이적 항체는 다른 항체 단독, 또는 개별적으로 첨가된 항-Met과 항-EGFR 항체의 조합과 비교하여 개선된 성능을 보여주었다. 이들 데이터는, 하나의 항체에 항-Met 및 항-EGFR 항체가 함께 배열되어 탁월한 이중특이적 항체를 생성한다는 것을 시사한다. 결과를 도 11에 나타내었다.
- [0437] 실시예 6
- [0438] 생체내 활성
- [0439] 본 실시예는 본원에 기재된 이중특이적 항체가 생체내 모델에서 활성을 유지한다는 것을 입증한다.
- [0440] 6-8 주령의 22-30 g 체중의 암컷 누드 마우스를 찰스 리버 래보러토리즈, 인크.(Charles River Laboratories, Inc., 캘리포니아주 홀리스트)로부터 입수하였다. 마우스를 제넨테크에서 표준 설치류 마이크로-아이솔레이터 케이지에 수용하고, 적어도 3일 동안 연구 조건에 순응시킨 후, 종양 세포를 이식하였다. 건강하고 명백한 이상이 없어 보이는 동물만을 연구에 이용하였다. 모든 실험 절차는 미국 생리학 협회의 지도 원칙에 따랐고, 제넨테크의 동물 실험 윤리 위원회에 의해 승인받았다. 마우스에게 각각의 인간 KP4 췌장암 세포 (마우스 당 행크 평형 염 용액 (HBSS) + 매트릭셀 (BD 바이오사이언시즈) 중 5백만개 세포) 또는 인간 A431 표피양 암종 세포 (HBSS + 매트릭셀 중 5백만개 세포/마우스)를 피하로 주사하였다. 종양이 약 150 mm<sup>3</sup>에 도달하면, 마우스를 무작위 추출하고, 2 주 동안 비히클 또는 이중특이적 EGFR/c-met (bsEGFR/c-met) (50 mg/kg IP 1x/주)로 처리하였다.
- [0441] 종양 부피를 울트라 Cal-IV 캘리퍼스 (모델 54-10-111; 프레드 브이. 파울러 캄파니(Fred V. Fowler Co.); 매사추세츠주 뉴턴)를 이용하여 2차원 (길이 및 폭)으로 측정하고, 엑셀, 버전 11.2 (마이크로소프트 코퍼레이션 (Microsoft Corporation); 워싱턴주 레드몬드)를 이용하여 분석하였다. 종양 억제 그래프를 칼레이다그래프, 버전 3.6 (시너지 소프트웨어; 펜실베이니아주 리딩)을 이용하여 플롯팅하였다. 종양 부피를 하기 화학식으로 계산하였다:
- [0442] 종양 크기 (mm<sup>3</sup>) = (더 긴 측정치 × 더 짧은 측정치<sup>2</sup>) × 0.5
- [0443] 하기 기재된 혼합 모델링 접근법에 의해 데이터를 분석하였다. 여기서, 정확한 평균 및 표준 편차는 계산하지 않았다. 변동성을 설명하기 위해 표준 편차를 제공하는 것보다는 신뢰 구간을 이용하였다. 이들을 표에서

AUC/일 % TGI 옆의 괄호에 상한치 및 하한치로서 기록하였다. 동물 체중은 어드벤처라 프로(Adventura Pro) AV812 스케일 (오하우스 코포레이션(Ohaus Corporation); 뉴저지주 파인 브룩)을 이용하여 측정하였다. 칼레이 다그래프, 버전 3.6을 이용하여 그래프를 생성하였다. 퍼센트 체중 변화를 다음 식을 이용하여 계산하였다:

[0444]  $\text{군 퍼센트 체중 변화} = (\text{새로 잰 체중} - \text{처음 체중}) / \text{처음 체중} \times 100$

[0445] 시간이 지남에 따른 동일한 동물로부터의 종양 부피의 반복 측정치를 적절하게 분석하기 위해, 혼합 모델링 접근법을 이용하였다 (문헌 [Pinheiro et al., Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. (2008) R package version 3.1-89]). 이 접근법은 반복 측정, 및 연구 종료 이전의 동물의 임의의 비-처리-관련 사망으로 인한 적절한 낙오를 둘 다 다룬다.

[0446] 입방 회귀 스플라인을 이용하여 비-선형 프로파일을 각각의 용량 수준에서의 경시적 로그<sub>2</sub> 종양 부피에 피팅하였다. 이어서, 이러한 비-선형 프로파일을 혼합 모델에서 용량과 관련시켰다. 비히클의 백분율로서의 종양 성장 억제 (%TGI)를 하기 식을 이용하여 비히클과 비교한 1일 당 각각의 투여군에 대한 피팅 곡선 아래 면적 (AUC)의 백분율로 계산하였다:

[0447]  $\%TGI = 100 \times (1 - AUC_{\text{용량}} / AUC_{\text{비히클}})$

[0448] %TGI에 대한 불명확 간격 (UI)을 결정하기 위해, 피팅 곡선 및 피팅 공분산 매트릭스를 이용하여 %TGI의 분포에 대한 근사로서 무작위 샘플을 생성하였다. 무작위 샘플은 피팅-혼합 모델의 1000회 모의 구현으로 구성되었으며, 여기서 %TGI를 각각의 구현에 대해 재계산하였다. 기록된 UI는 시간의 95%에 대한 값이었고, %TGI의 재계산 값은 피팅 모델에 제시된 상기 영역에 포함되었다. 모의 분포의 2.5 및 97.5 백분위수를 상한 및 하한 UI로서 사용하였다.

[0449] R, 버전 2.8.1 (R 디벨롭먼트 코어 팀(R Development Core Team) 2008; R 파운데이션 포 스타티스티컬 컴퓨팅 (R Foundation for Statistical Computing); 오스트리아 비엔나) 및 엑셀, 버전 12.0.1 (마이크로소프트 코포레이션)을 이용하여 플롯팅을 수행하고 생성하였다. 데이터를 R, 버전 2.8.1을 이용하여 분석하고, 혼합 모델을 nlme 패키지, 버전 3.1-89 (Pinheiro et al., 2008)를 이용하여 R에 피팅하였다.

[0450] 도 12 및 13은 각각 KP4 체장 이종이식 모델 및 A431 표피양 암종 이종이식 모델에서의 항-EGFR/c-met 이중특이적 항체의 생체내 활성을 보여준다. 이중특이적 항체는 처리물로서 비히클만을 투여한 동물 대조군과 비교시 두 모델에 대한 종양의 생체내 성장을 억제할 수 있었다. 그래프는 종양 부피가, 비히클 단독 아암에 대한 1710 mm<sup>3</sup> 과 비교하여 처리 20일 후 KP4 이종이식편에서 505 mm<sup>3</sup>, 및 비히클 단독 대조군에서의 495 mm<sup>3</sup>과 비교하여 20 일 후에 A431 이종이식편에서 328 mm<sup>3</sup>의 선형 혼합 효과 (LME) 피터 종양 부피로, 이중특이적 항체의 투여에 의해 감소되었음을 나타낸다. 전체적으로 %TGI로 표현된 AUC/일의 유의한 변화가 있었다. KP4 이종이식편에서의 이중특이적 항체 처리의 경우, 85% 종양 성장 억제 (TGI)가 있었고, A431 이종이식 모델에서는 68% TGI가 있었다.

[0451] 실시예 7

[0452] CHO 세포 배양물을 사용한 이중다량체 단백질 생산

[0453] 본 실시예는 두 숙주 CHO 세포 집단을 포함하는 배양물로부터의 이중다량체 단백질의 형성을 예시한다.

[0454] 노브 또는 홀 돌연변이를 함유하는 반-항체를 당업계에 널리 공지된 구축물 및 기술을 이용하여 중쇄 및 경쇄를 일시적으로 발현시킴으로써 별개의 배양물로 생성하였다. (예를 들어, 문헌 [Ye et al., Biotechnol Bioeng. 2009 Jun 15;103(3):542-51] 참조.) 세포를 1 리터의 배지에서 배양하고 (예를 들어, 문헌 [Wong et al., J. Biol. Chem. 2007 282(31):22953-22963] 참조), 14 일 후에 수확하였다.

[0455] 각각의 반 항체를 5mL 맵슈어 셀렉트 칼럼 상에 포획하였다. 이어서, 칼럼을 10 칼럼 부피 (CV)의 평형 완충제에 이어서 10 CV의 시트르산나트륨 저 전도성 완충제로 세척하였다 (평형 완충제는 50 mM 트리스 pH 8.0, 150mM NaCl, 0.05% 트리톤 X-100, 0.05% 트리톤 X-114로 이루어지고; 저 전도성 세척 완충제는 25mM 시트르산나트륨 pH 6.0으로 이루어짐). 각각의 아암을 0.15 M 아세트산나트륨 pH 2.7로 용리시켰다.

[0456] 각각의 반 항체를 실온에서 밤새 1 대 300 비율로 50mM 트리스 pH 8.0, 150mM NaCl, 1 mM EDTA로 투석하였다. 이어서, 각각의 아암을 원심분리하고, 0.22 마이크로미터 셀룰로스 아세테이트 필터를 이용하여 여과하고, 두 아암을 1 대 1 비율로 함께 혼합하였다 (총 농도는 2 밀리그램/mL 미만임). 이어서, 혼합물을 하기와 같은 2가

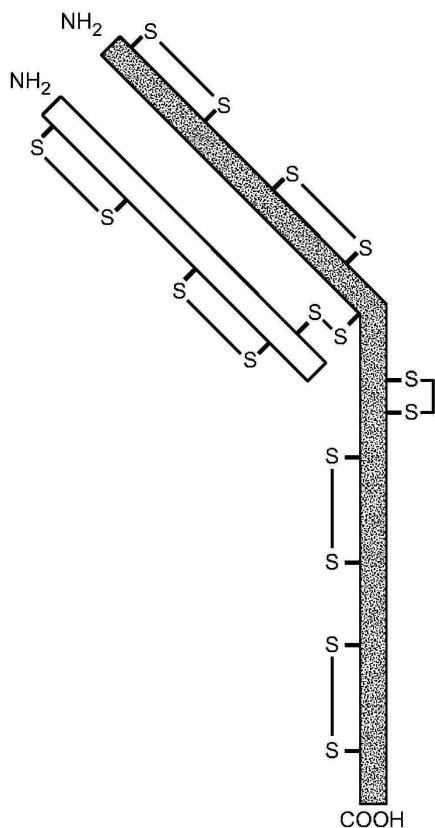


지 방법 중 하나로 처리하였다:

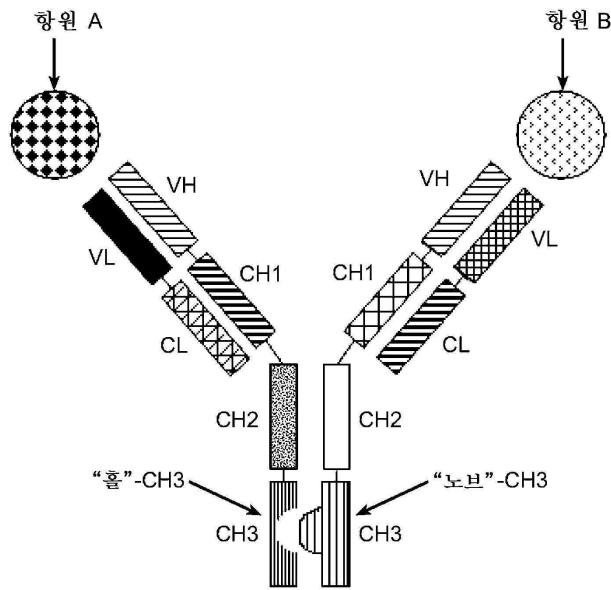
- [0457] 산화환원 (수조 이용): 이어서, 혼합물을 수조에서 37°C에서 가열하였다. 1 시간 후, 산화환원 혼합물을 수조로부터 꺼내고, 실온으로 냉각되도록 방치하였다. 혼합물이 실온에 도달하면, 새로 제조한 환원제, 디티오프로이톨 (DTT)을 첨가하여, 2mM DTT의 최종 농도를 달성하였다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 방치하고, 이어서 아미콘 울트라셀(Amicon Ultracell) 원심분리 필터 (10K)를 이용하여 11 mg/ml로 농축시키고, 50mM 트리스 pH 8.0, 150 mL NaCl (1:300)로 밤새 투석하였다.
- [0458] 산화환원 (수조 이용하지 않음): 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 방치한 후, 새로 제조한 환원제, 디티오프로이톨 (DTT)을 첨가하여 2mM DTT의 최종 농도를 달성하였다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 방치하고, 아미콘 울트라셀 원심분리 필터 (10K)를 이용하여 11 mg/mL로 농축시키고, 50mM 트리스 pH 8.0, 150 mL NaCl (1:300)로 밤새 투석하였다.
- [0459] 산화환원 후, 어셈블리된 물질을 상기 섹션과 유사한 20 CV 구배를 이용하여 15mL HIC 프로팩 10 칼럼 상에서 정제하였다. 러닝 완충제는 25mM 인산칼륨, 0.7M 황산암모늄 pH 6.5였고, 용리 완충제는 25mM 인산칼륨 pH 6.5, 25% 이소프로판올이었다. 1 mL 분획을 수집하고, 피크 분획을 4-20% 트리스-글리신 SDS PAGE에 의해 분리하여 순도를 분석하고, 그에 따라 모았다. 이어서, 풀을 아미콘 울트라셀 원심분리 필터 (10K)를 이용하여 약 1.5 mg/ml로 농축시키고, 50mM 트리스 pH 8.0, 150mM NaCl로 투석하고, 0.22  $\mu$ m 여과하였다.
- [0460] 각각의 어셈블리된 이중특이적 항체의 정체를 질량 분광측정법에 의해 확인하였다. 순도를 4-20% 트리스-글리신 SDS PAGE 겔 및 바이오분석기에 의해 분석하였다. 응집체 수준을 SEC-MALS에 의해 결정하였다.
- [0461] 결과를 도 14-19에 나타내었다. 본 실시예는 이중특이적 항체를 CHO 숙주 세포를 이용하여 생산할 수 있음을 입증한다. 당업자는 본 방법이 다른 이중다량체 단백질을 생산하는데 사용될 수 있음을 인지할 것이다.

## 도면

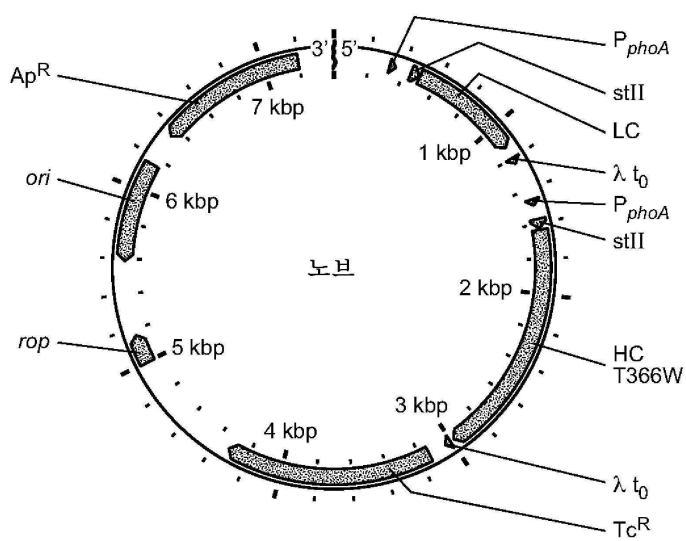
### 도면1a



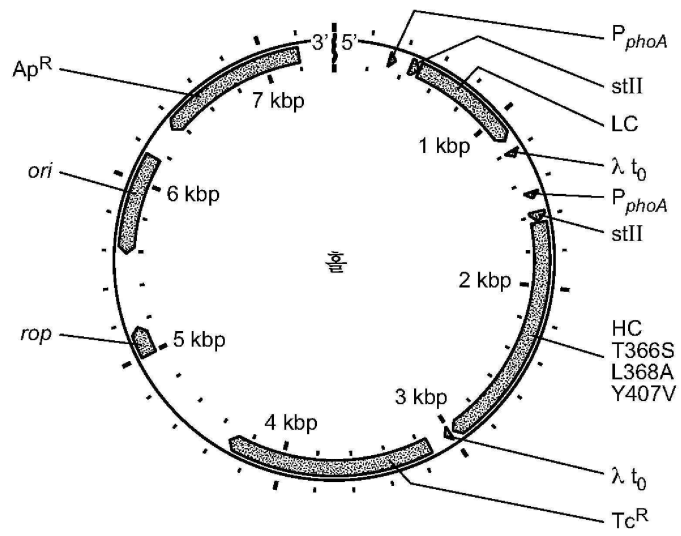
도면1b



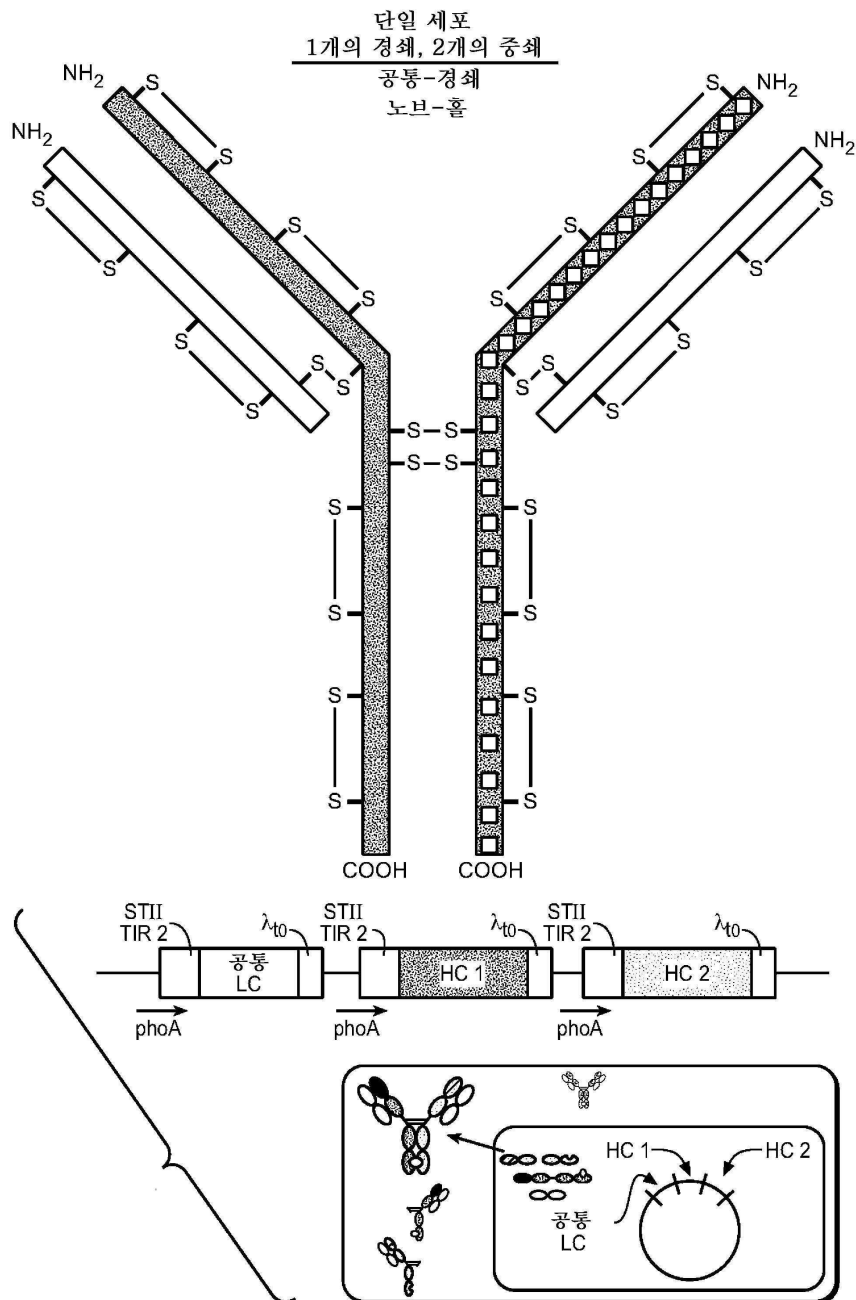
도면2a



도면2b

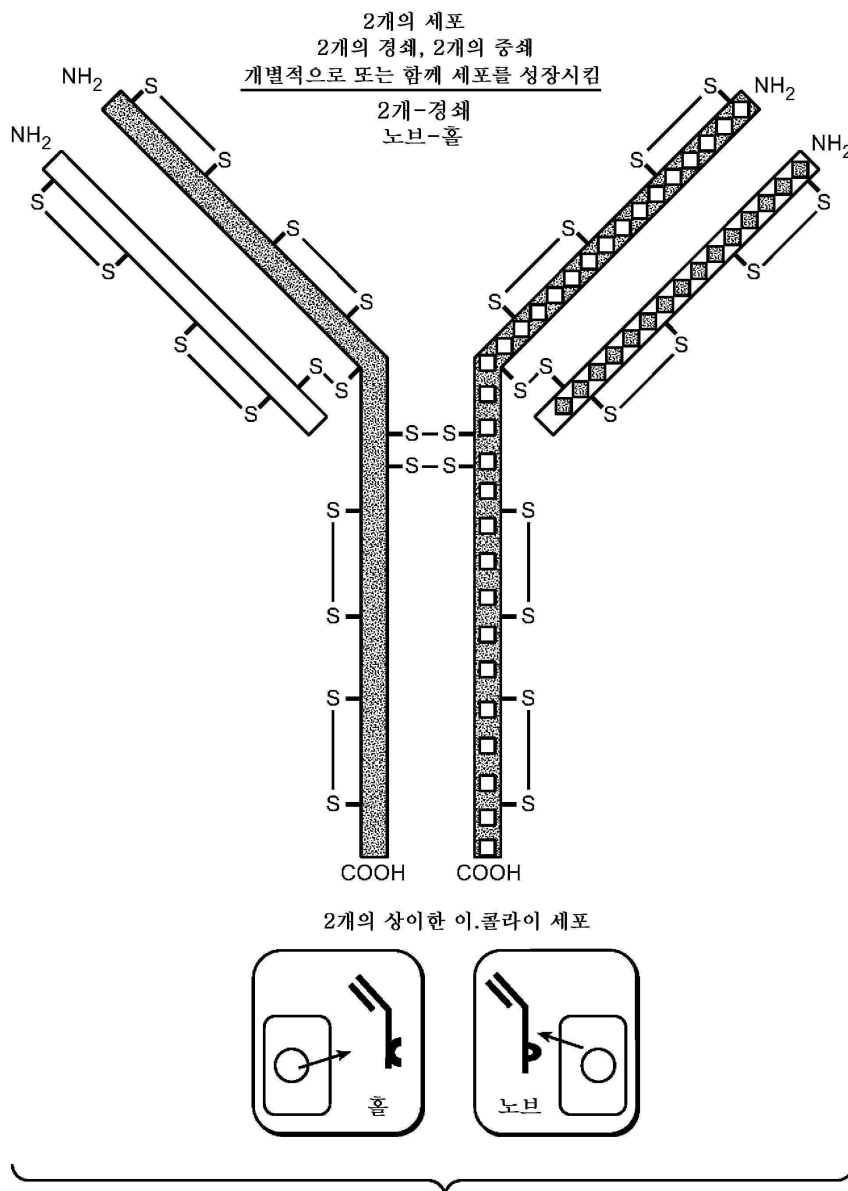


도면3a

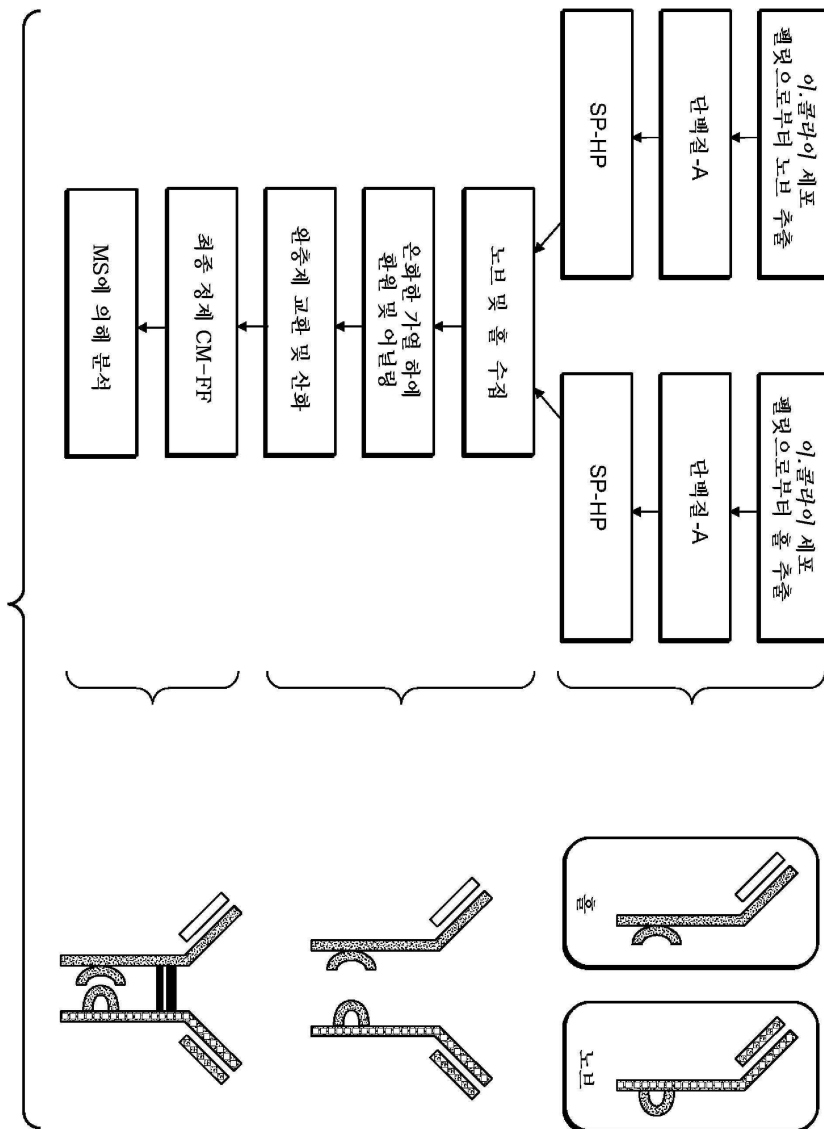




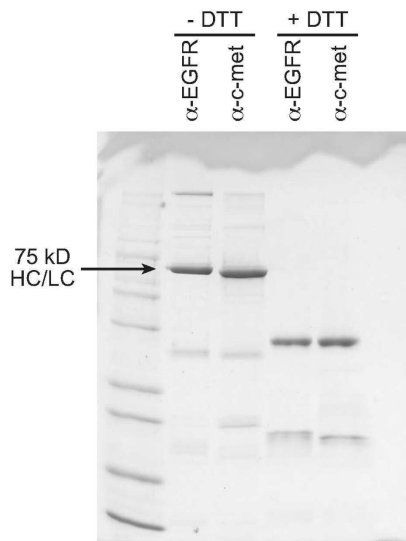
도면3b



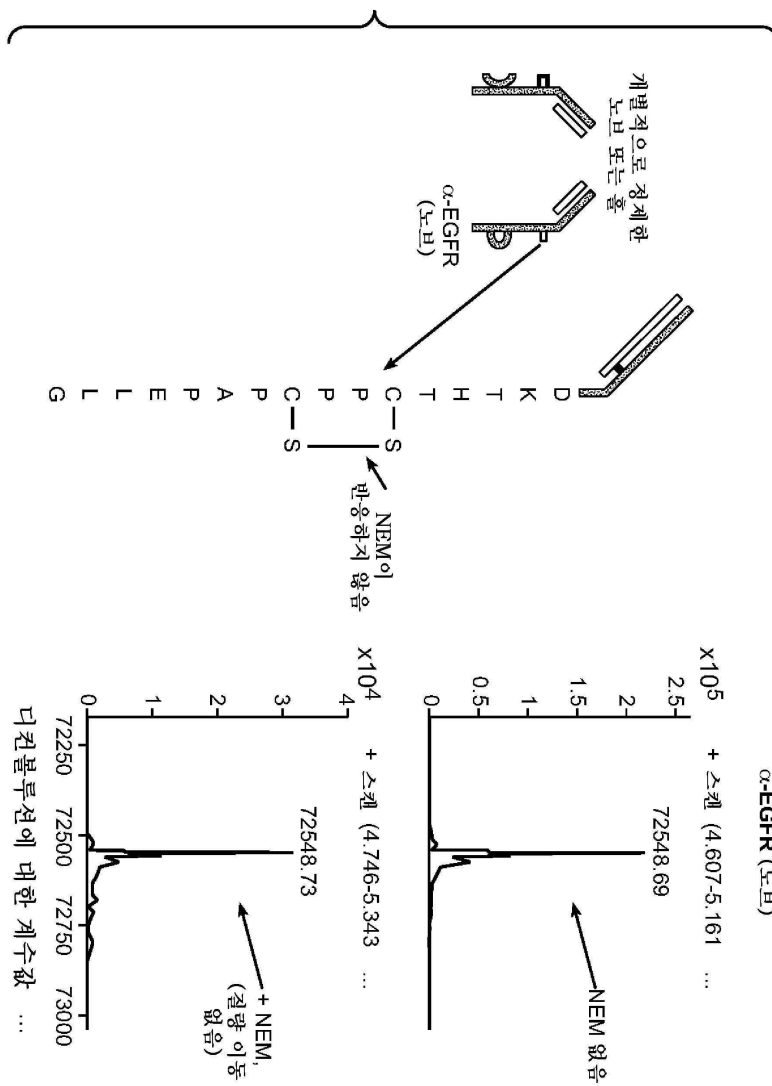
도면4a



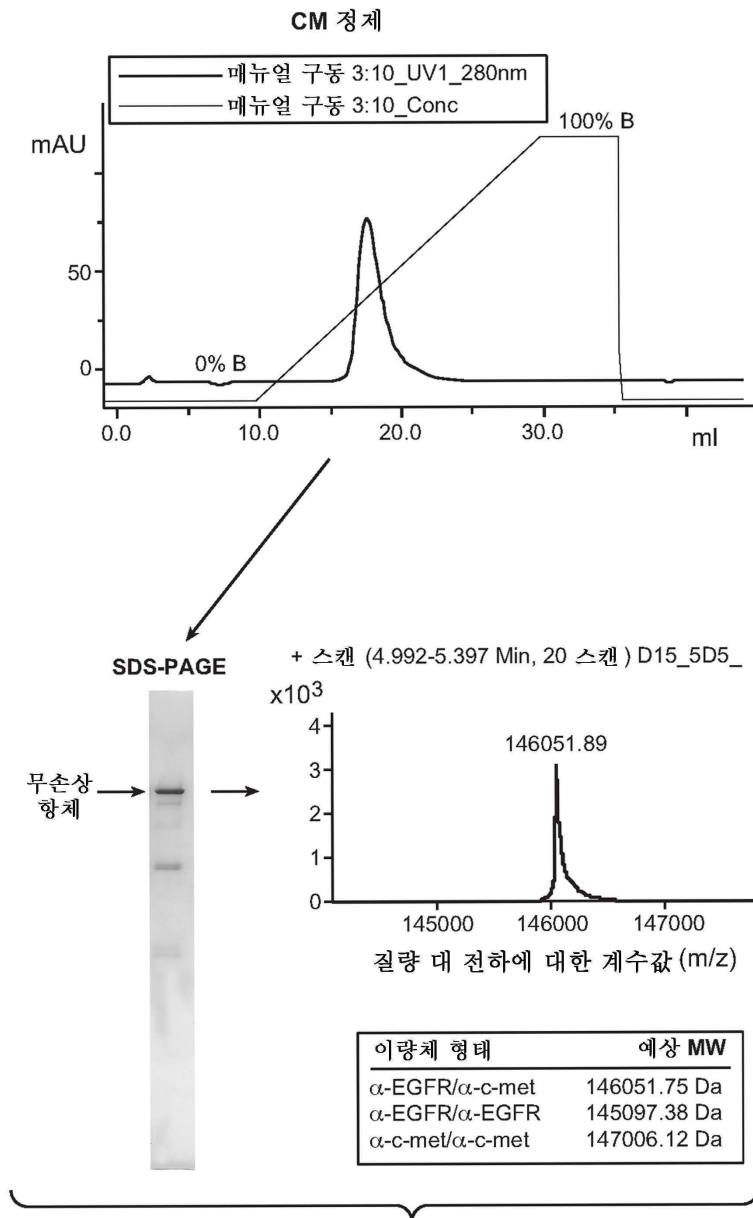
도면4b



도면4c

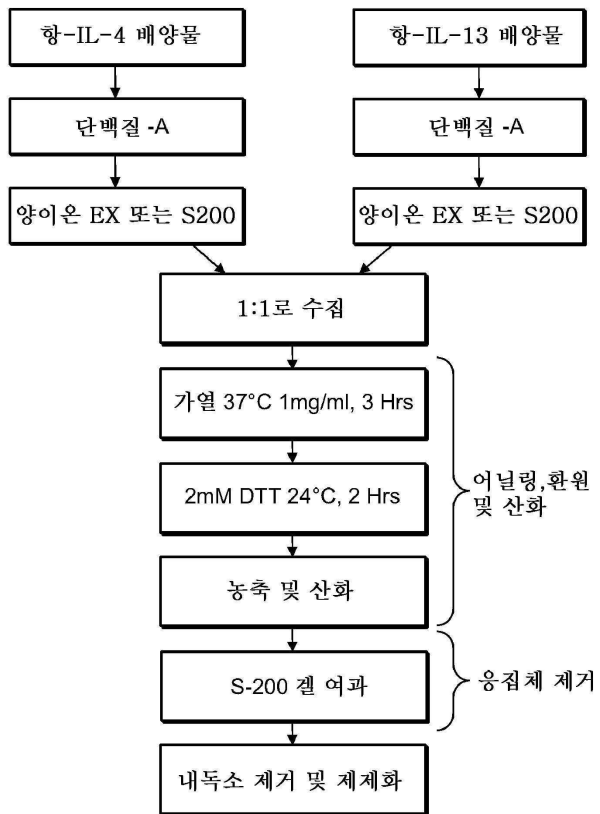


도면4d

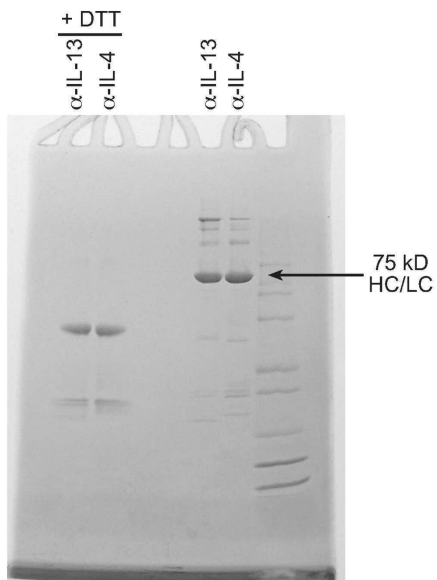




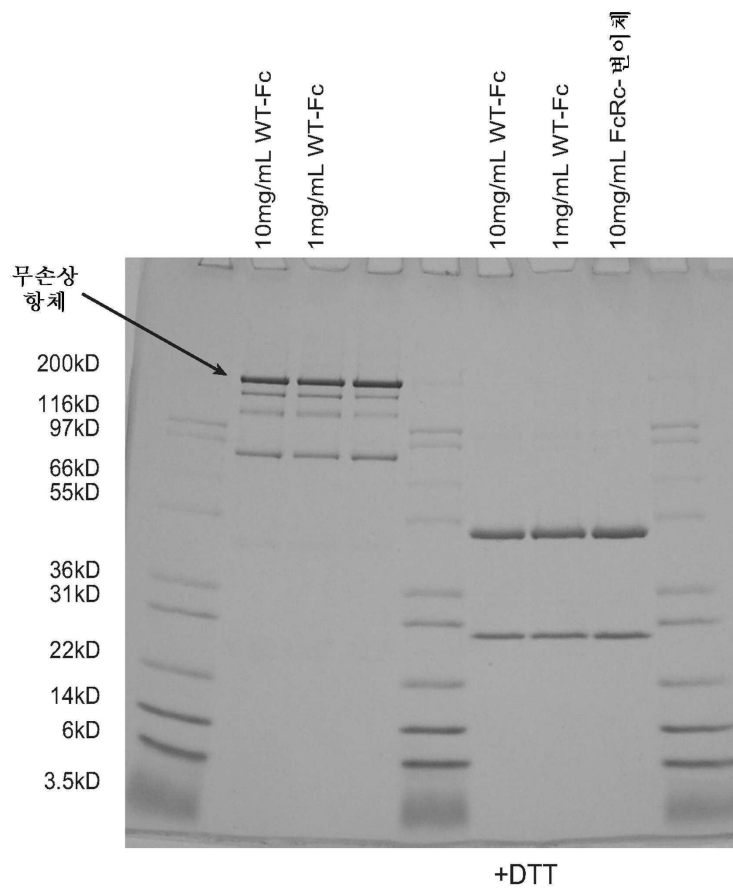
도면5a



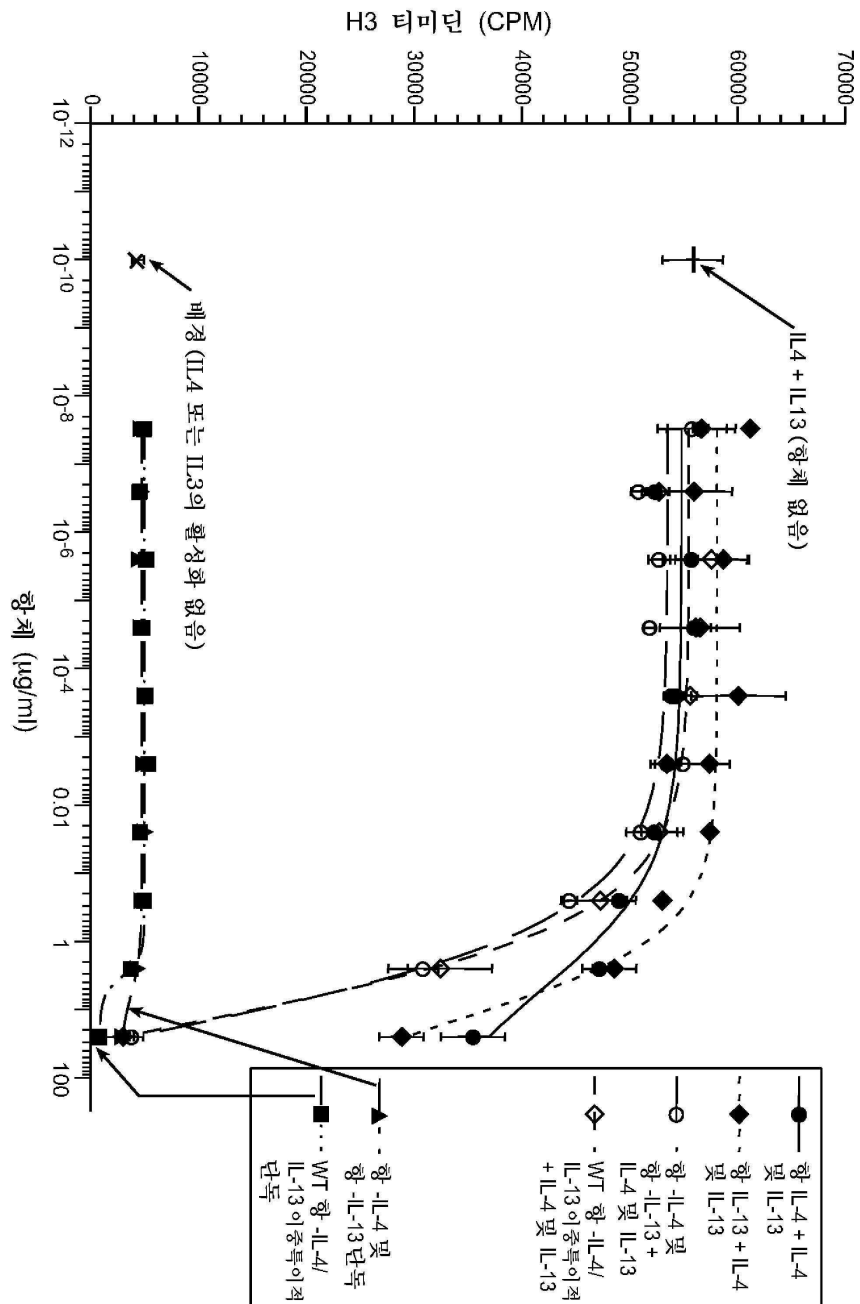
도면5b



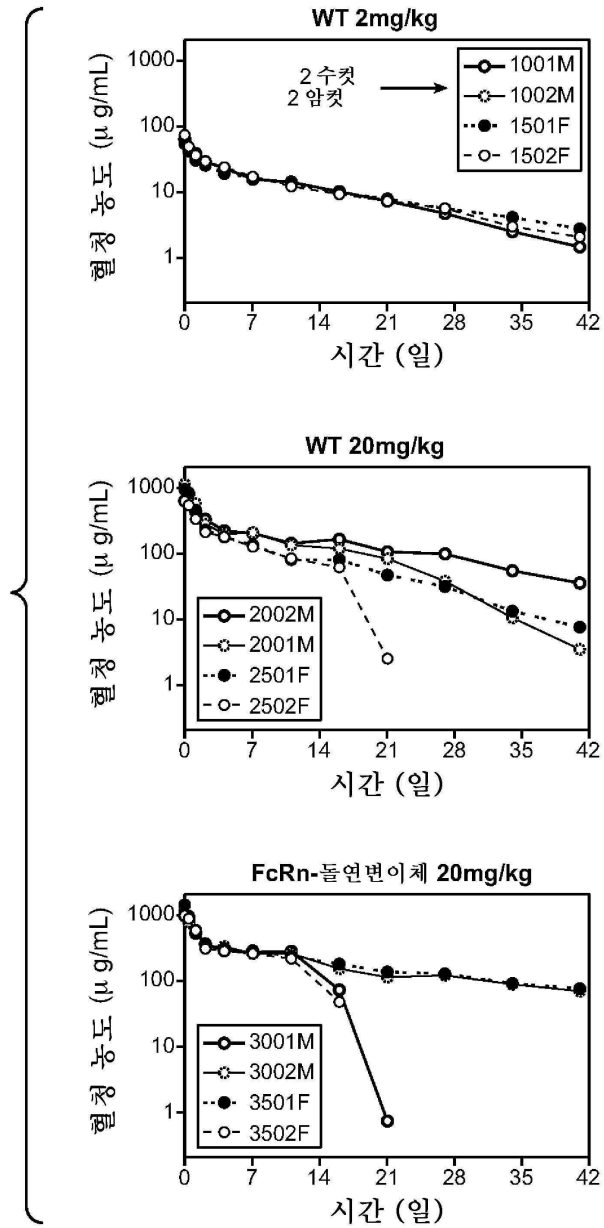
도면5c



도면6a

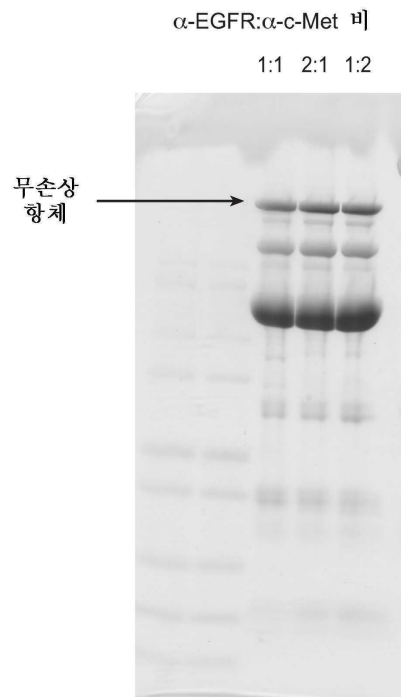


도면6b

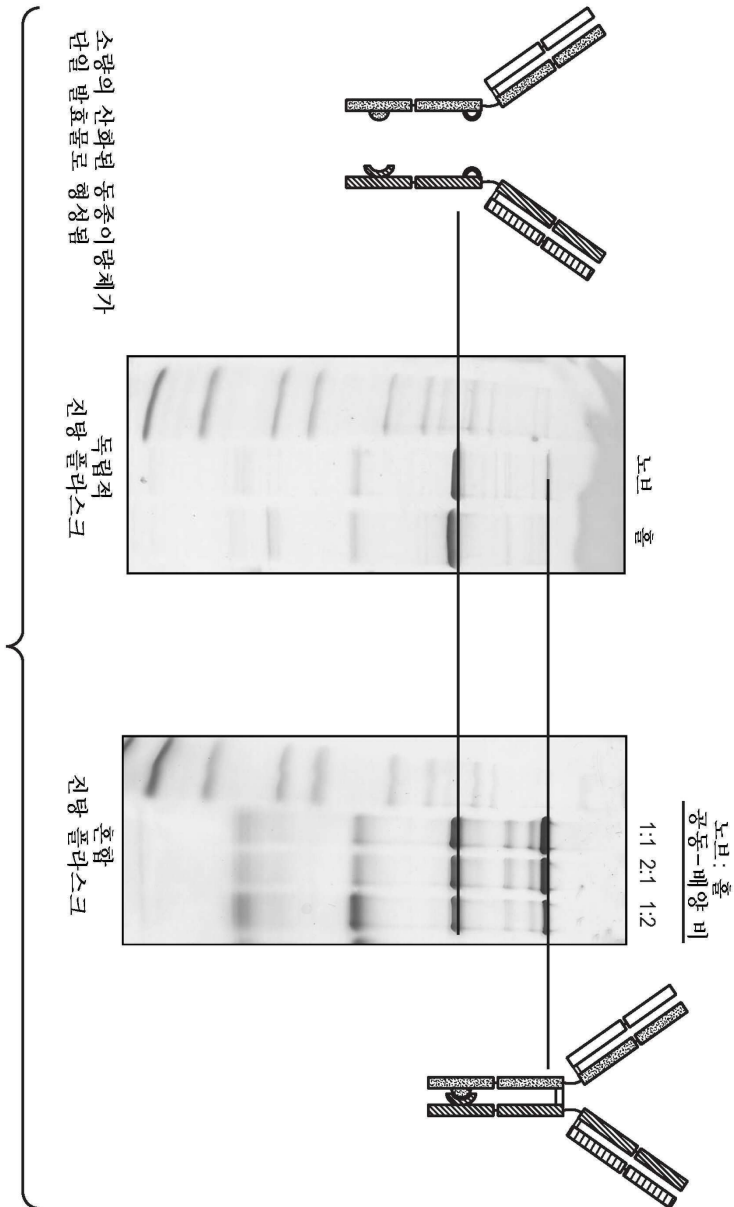




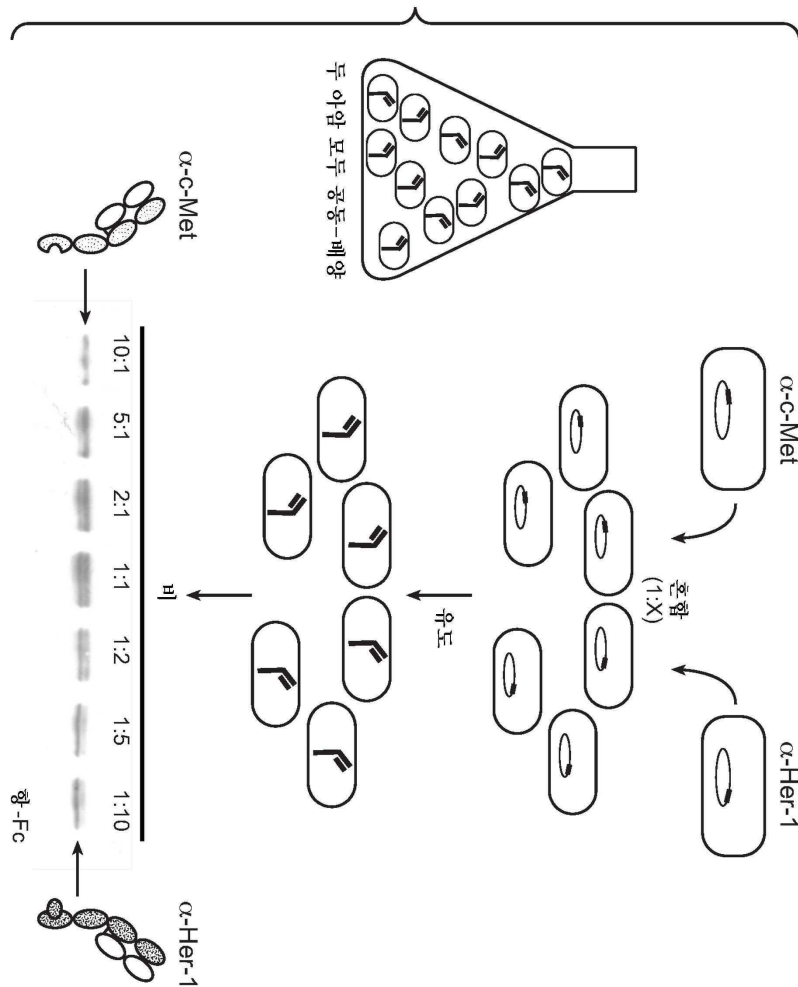
도면7



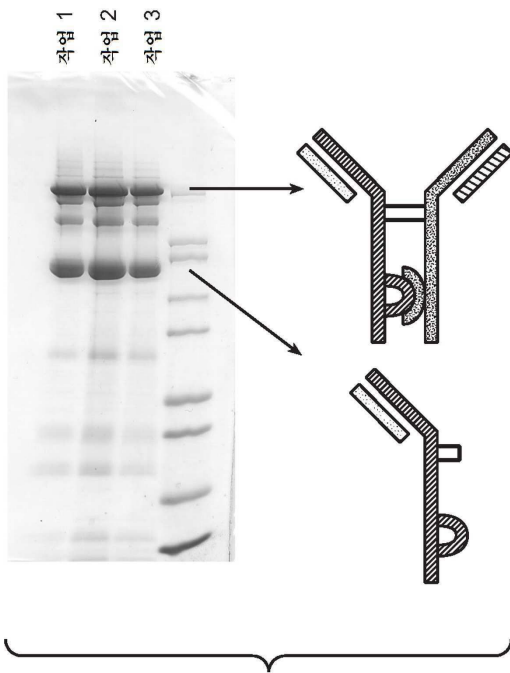
도면8a



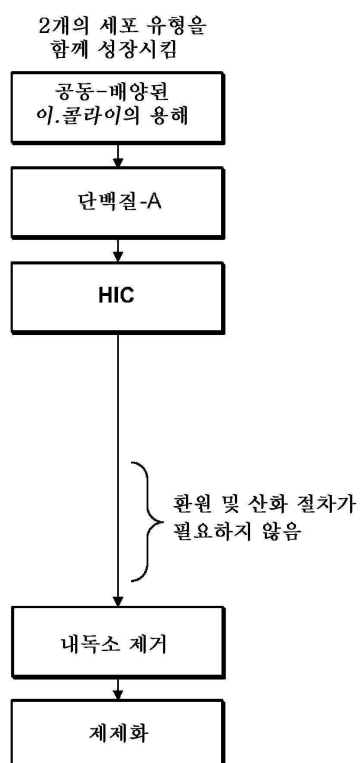
도면8b



도면8c

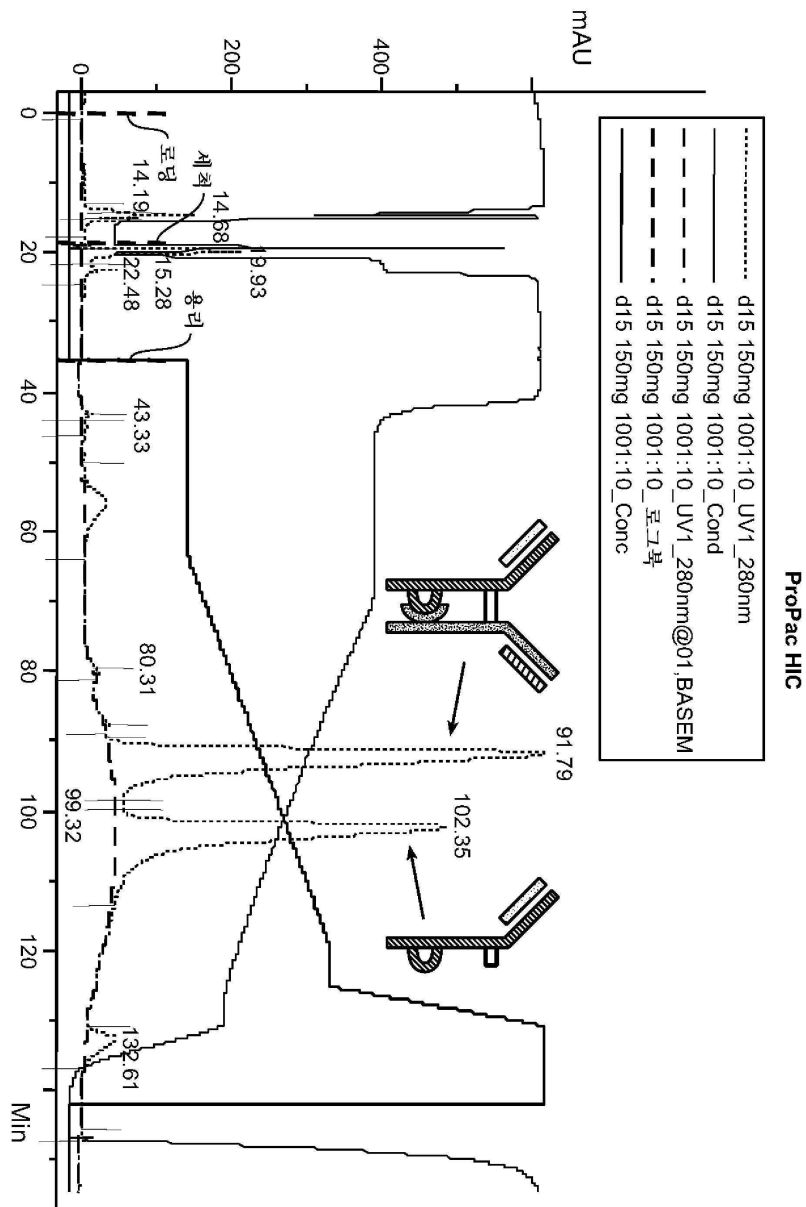


도면8d

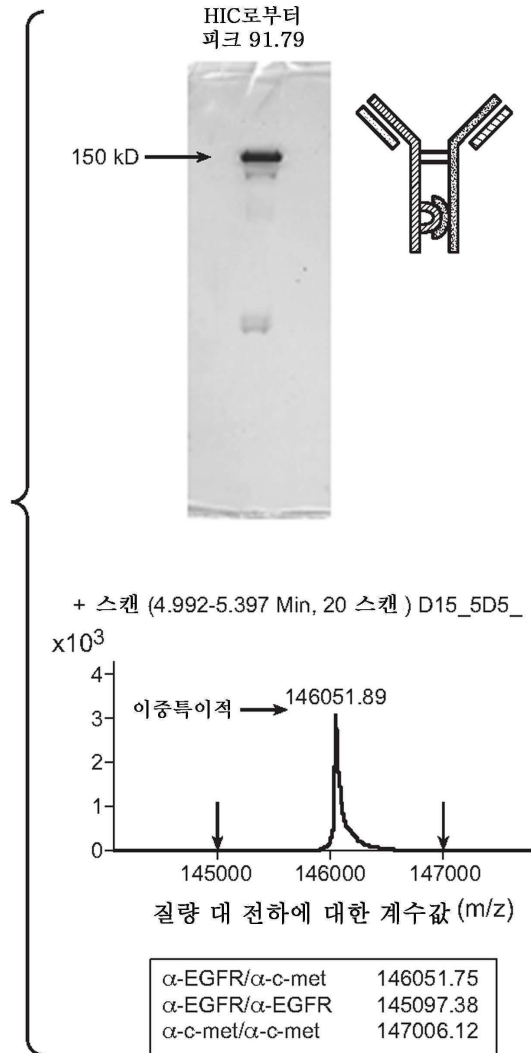




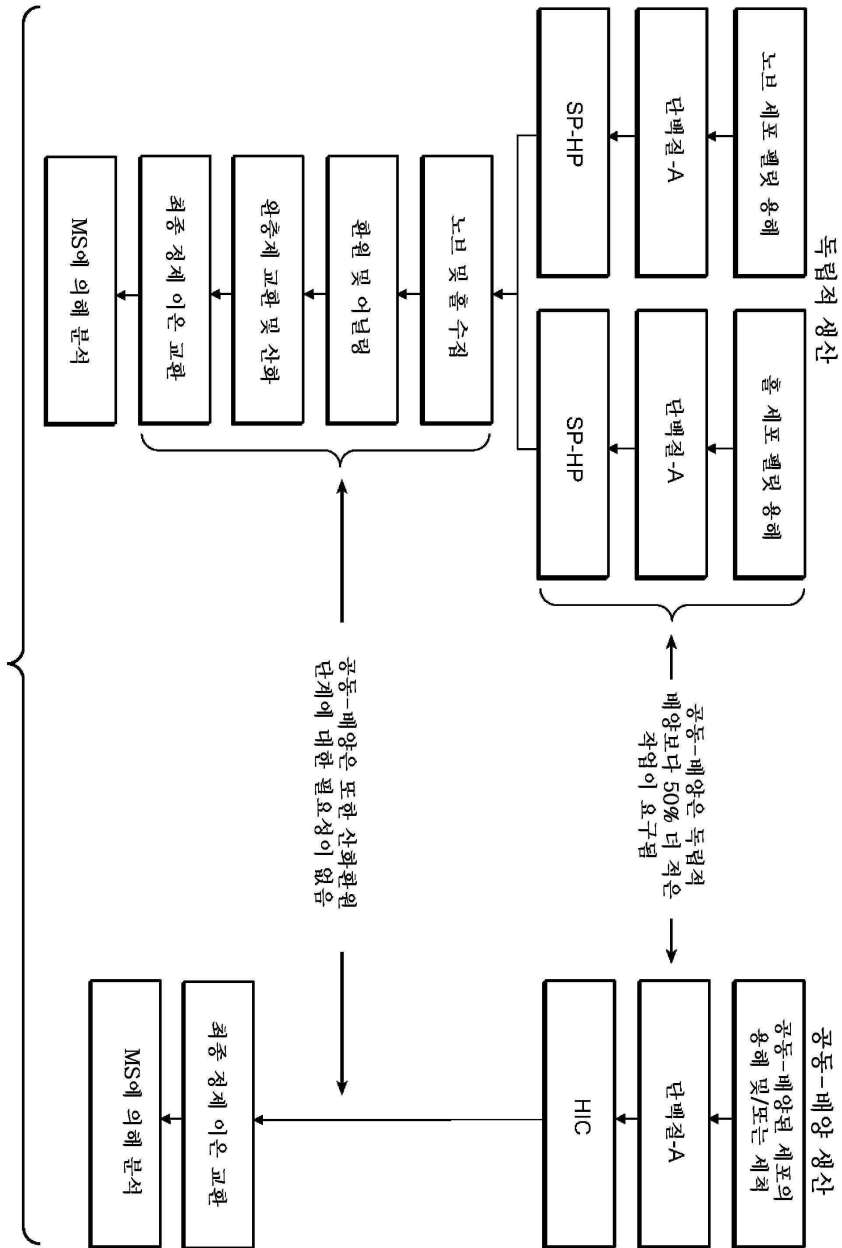
도면8e



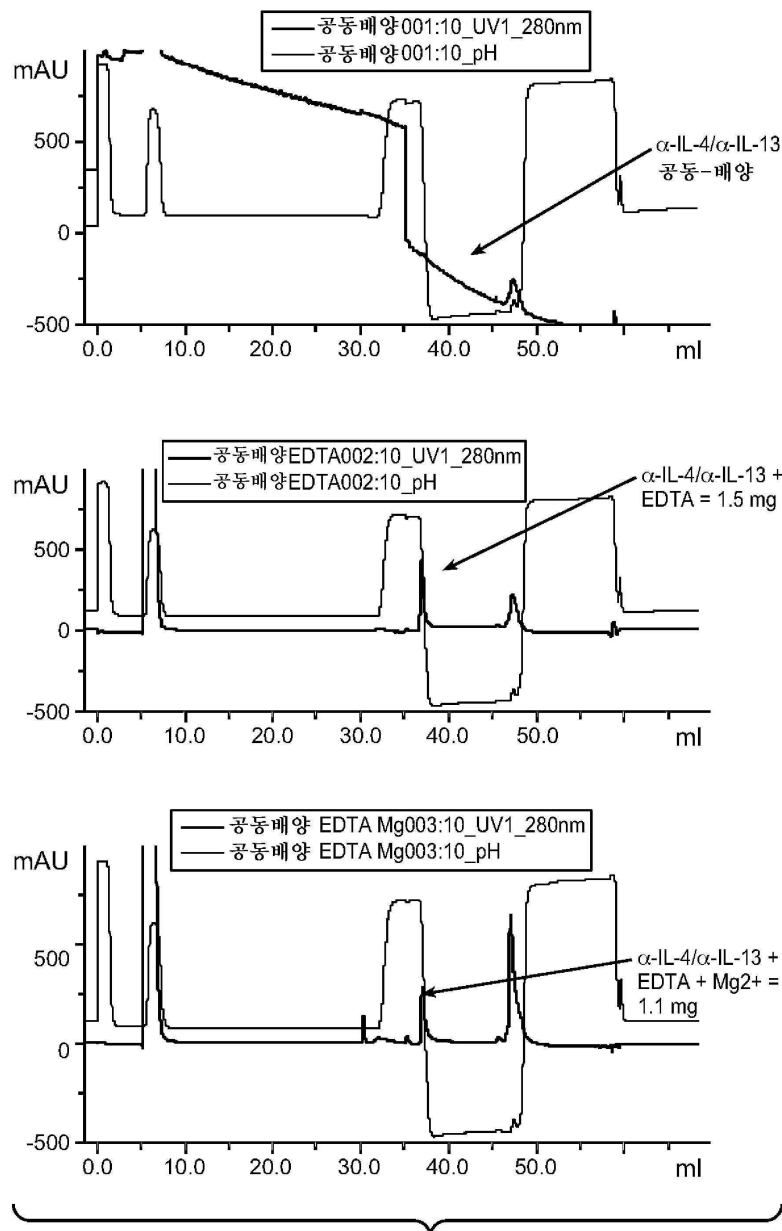
도면8f



도면8g

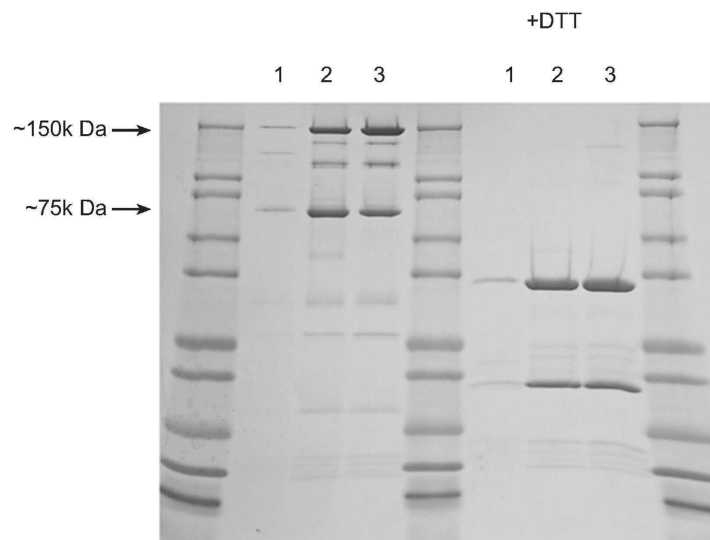


도면9a



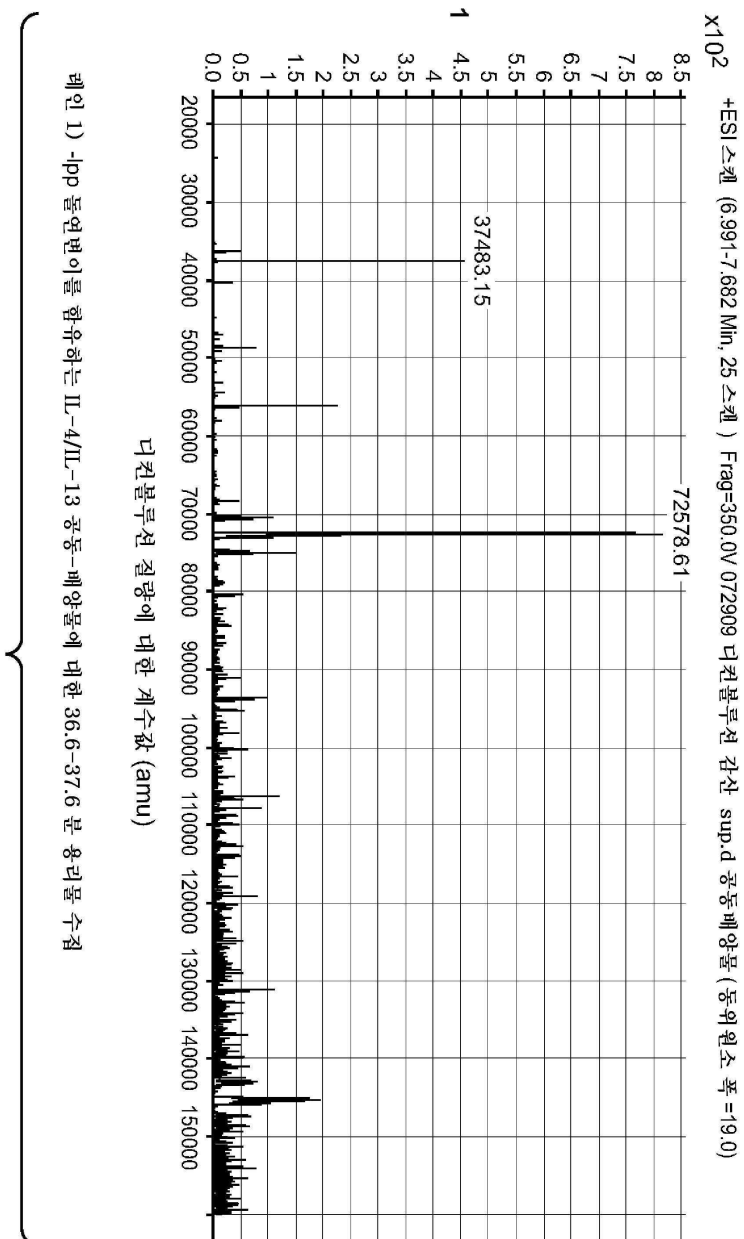


도면9b

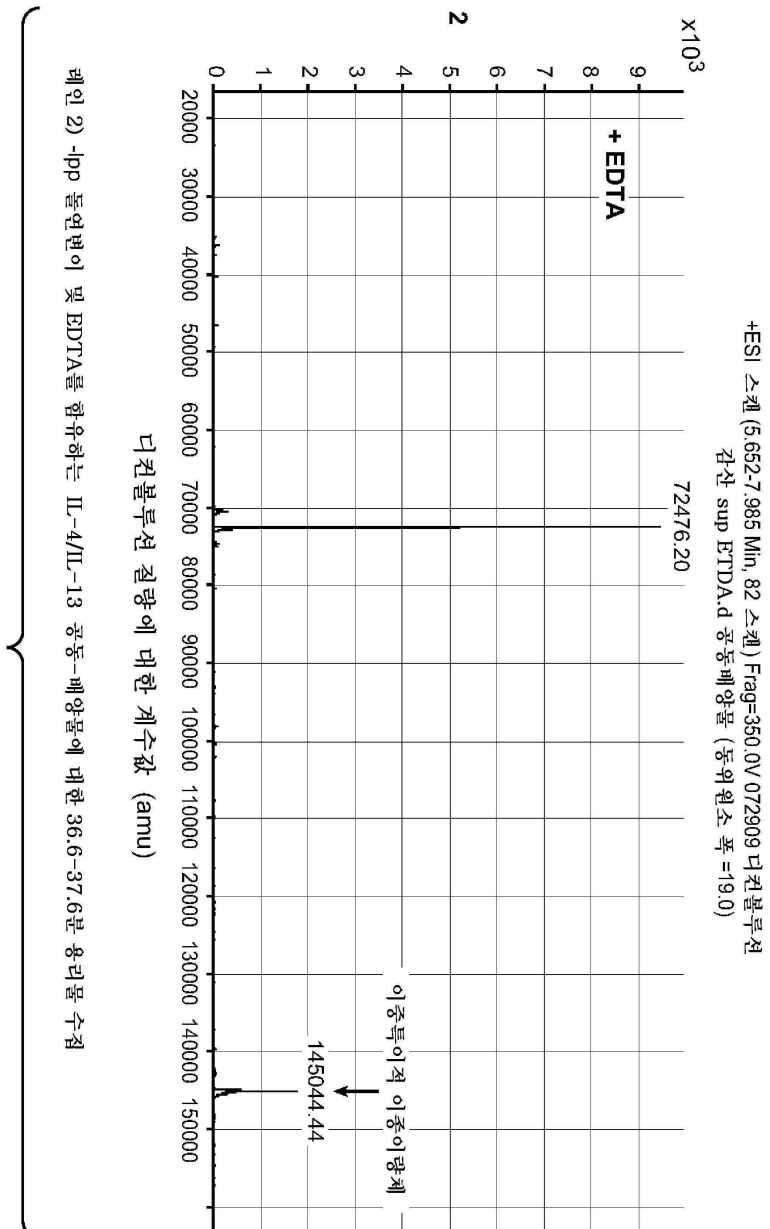


레인 1) -lpp 돌연변이를 함유하는 공동-배양물에 대한 36.6-37.6분 용리물 수집  
 레인 2) -lpp 돌연변이 및 EDTA를 함유하는 공동-배양물에 대한 36.6-37.6분 용리물 수집  
 레인 3) -lpp 돌연변이 및 EDTA 및 Mg<sup>2+</sup>를 함유하는 공동-배양물에 대한  
 36.6-37.6분 용리물 수집

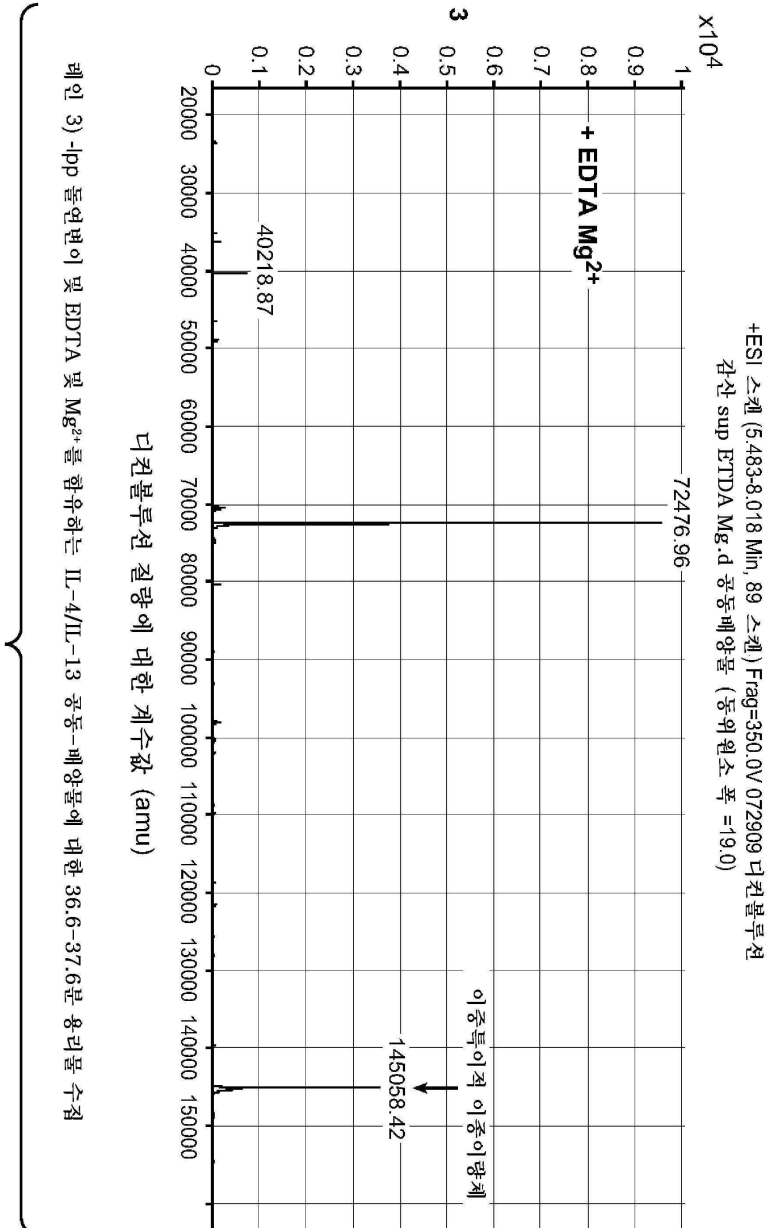
도면9ca



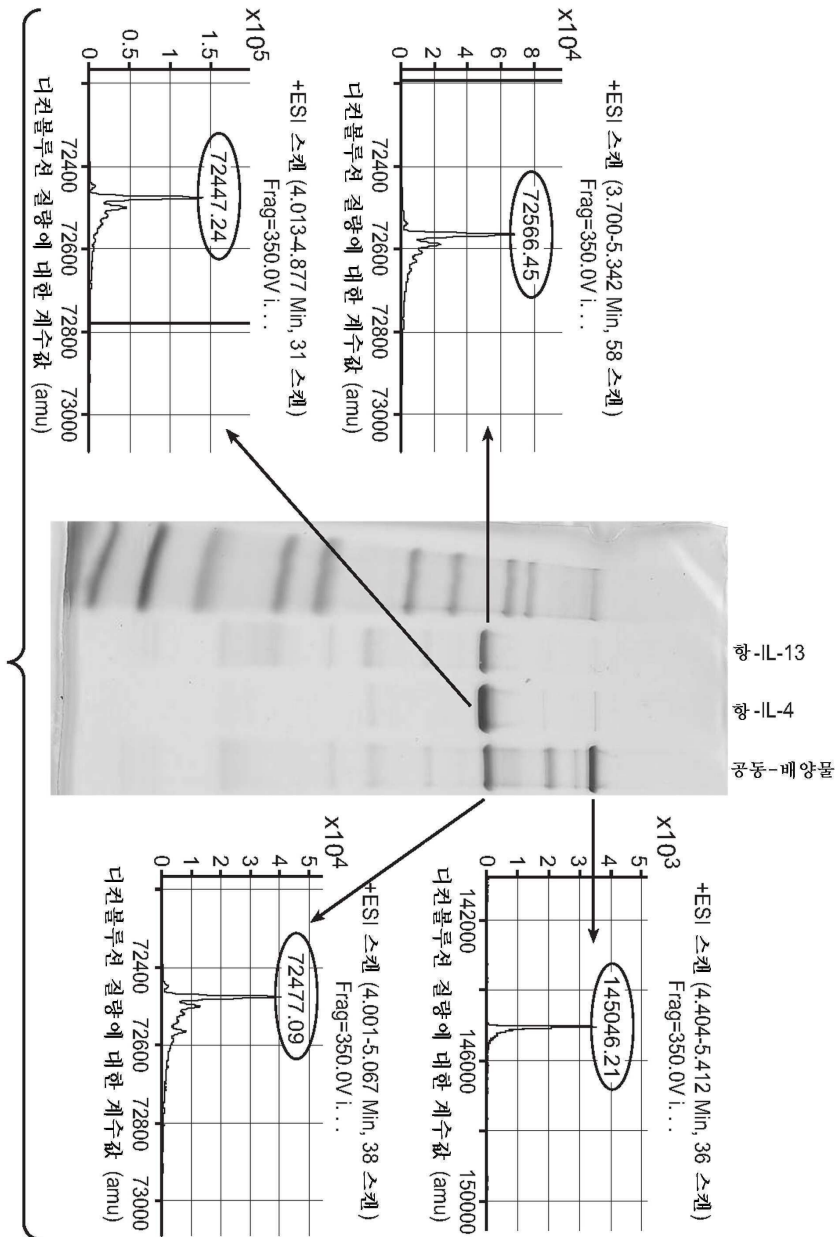
도면9cb



도면9cc

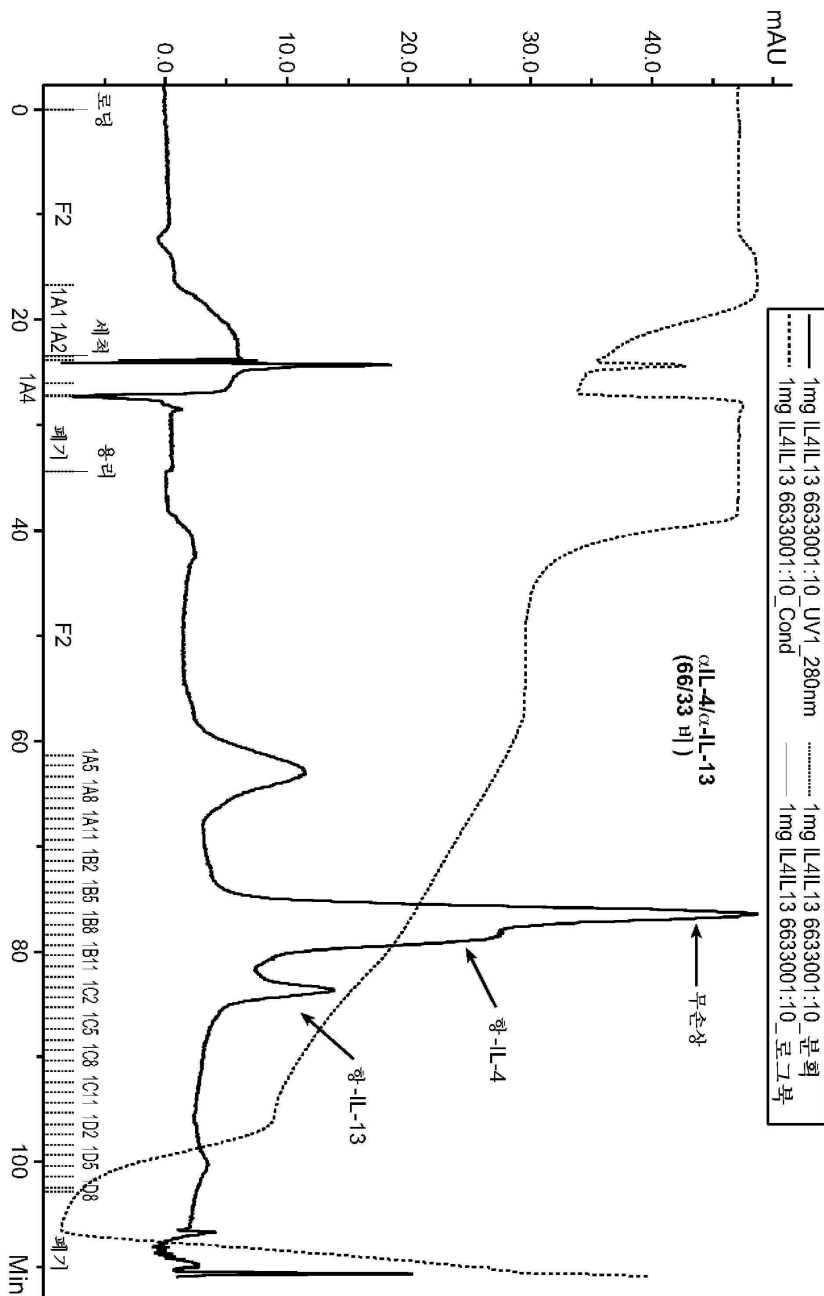


도면9d

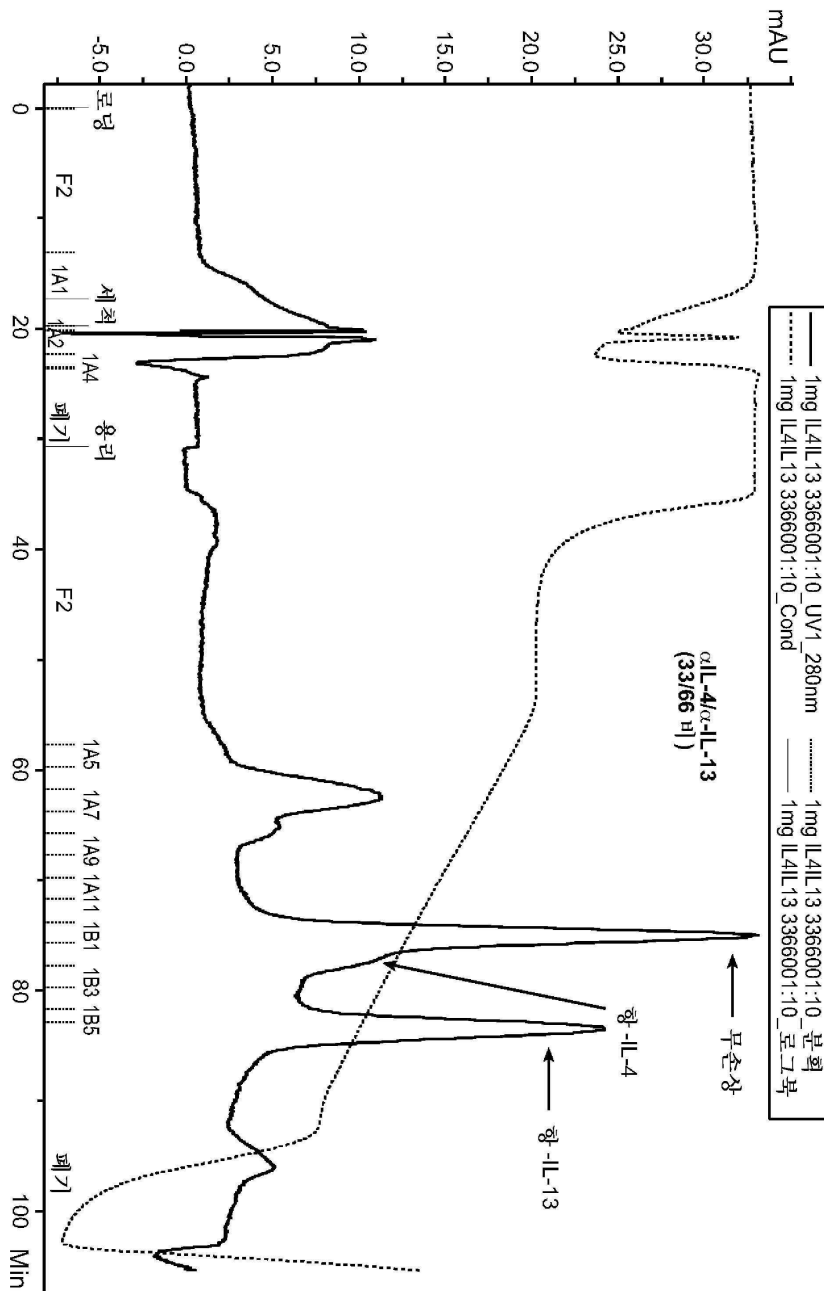




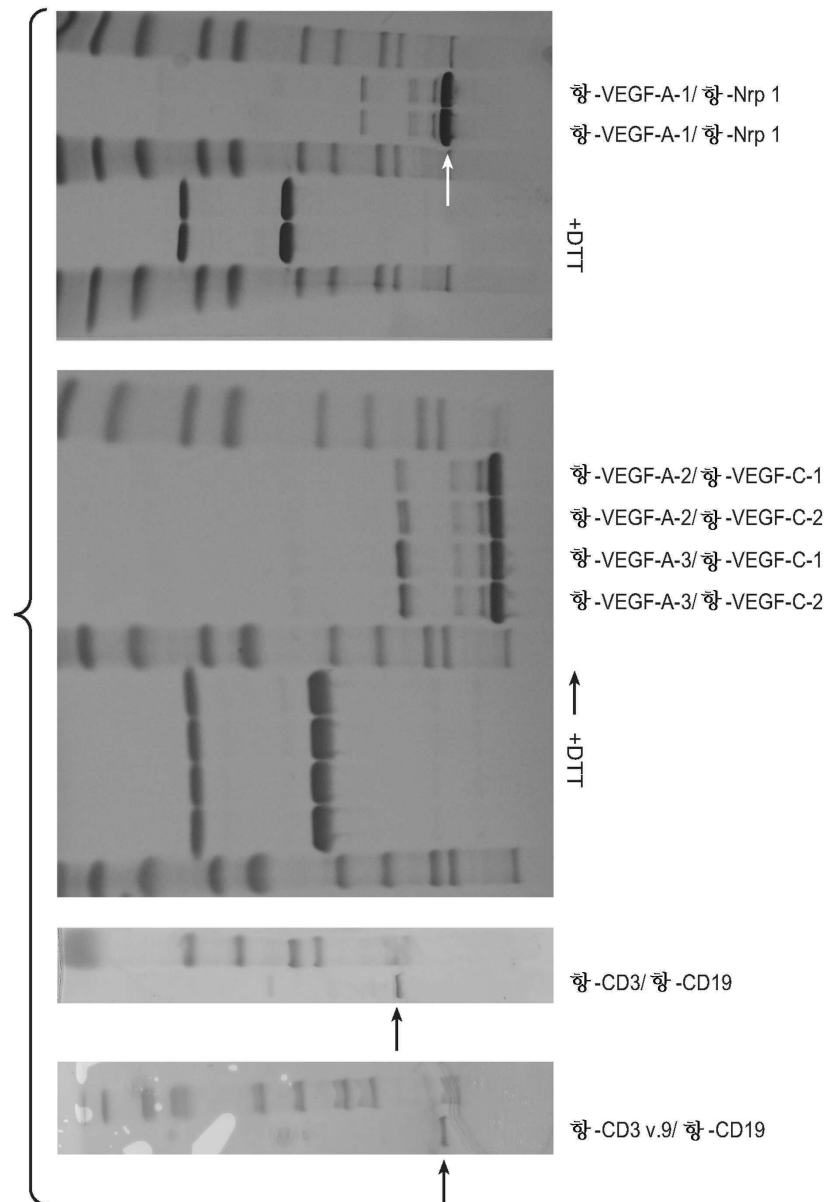
도면9ea



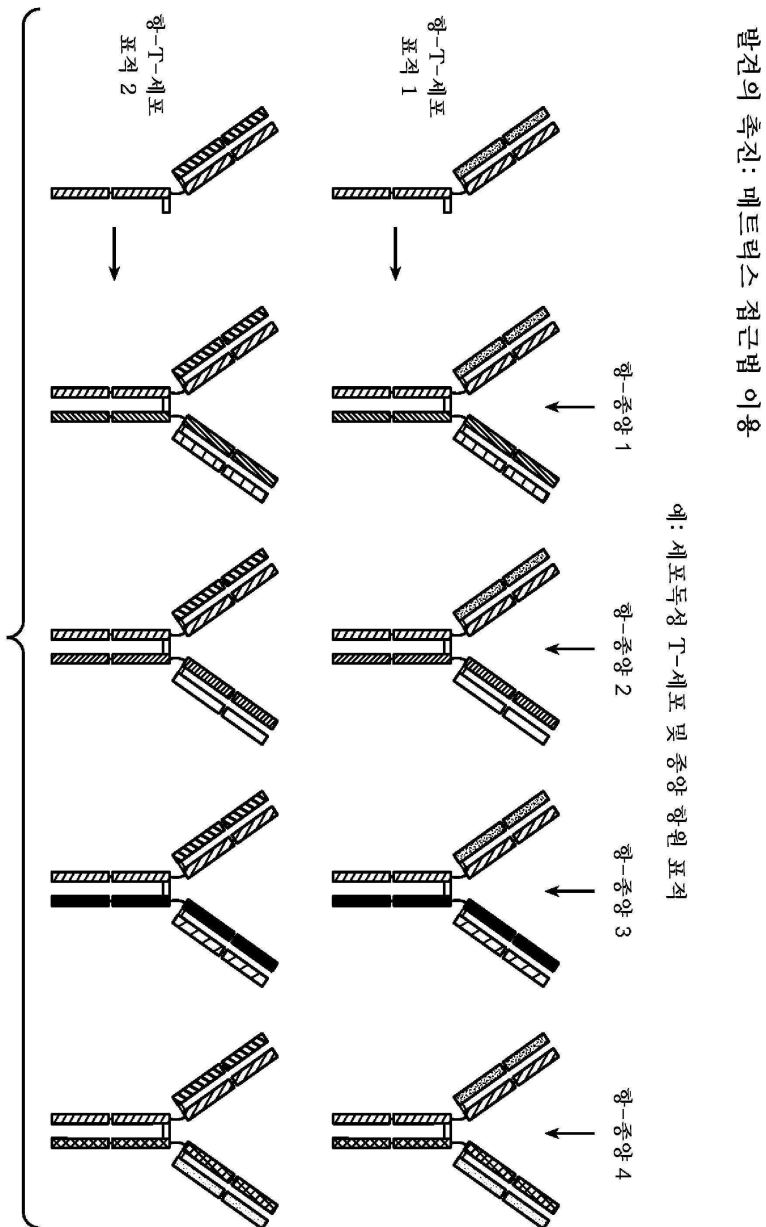
도면9b



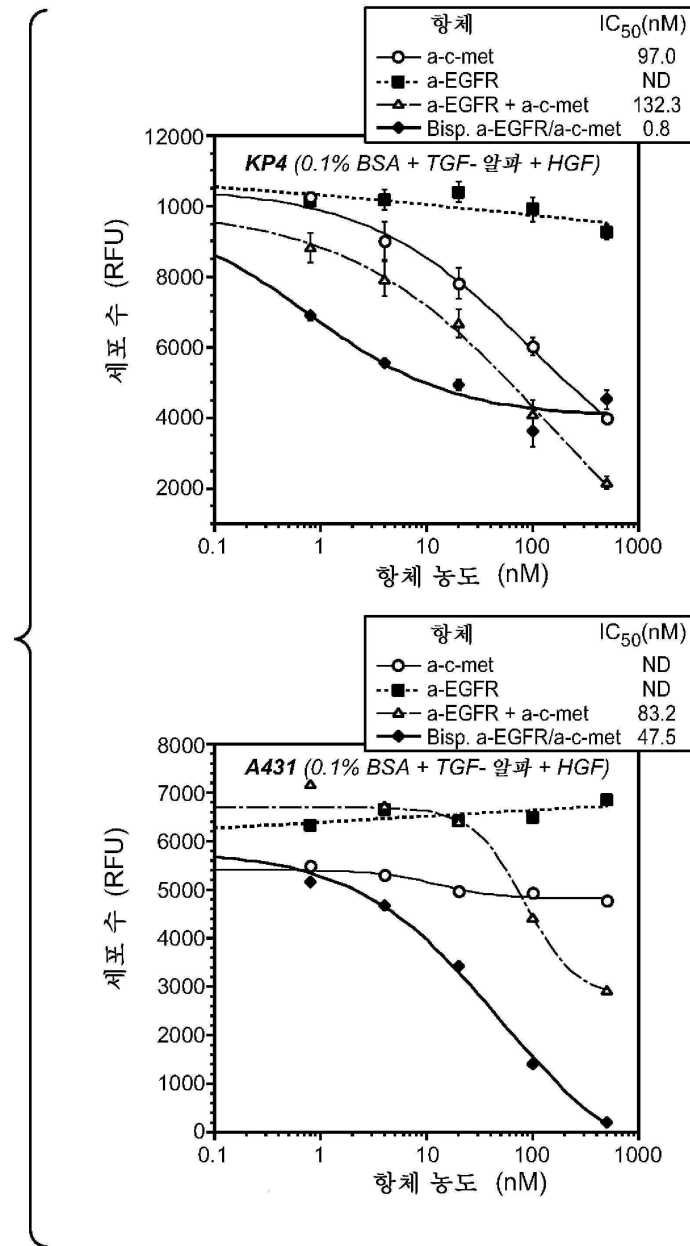
도면9f



도면10

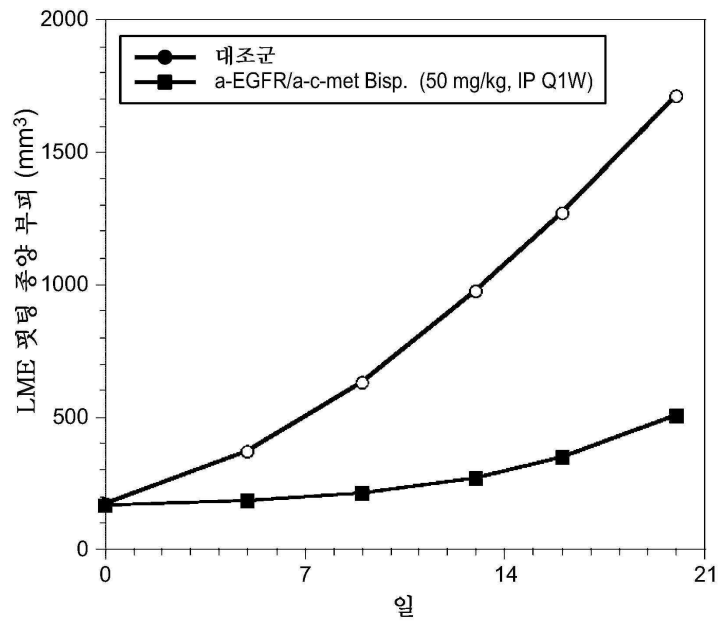


도면11

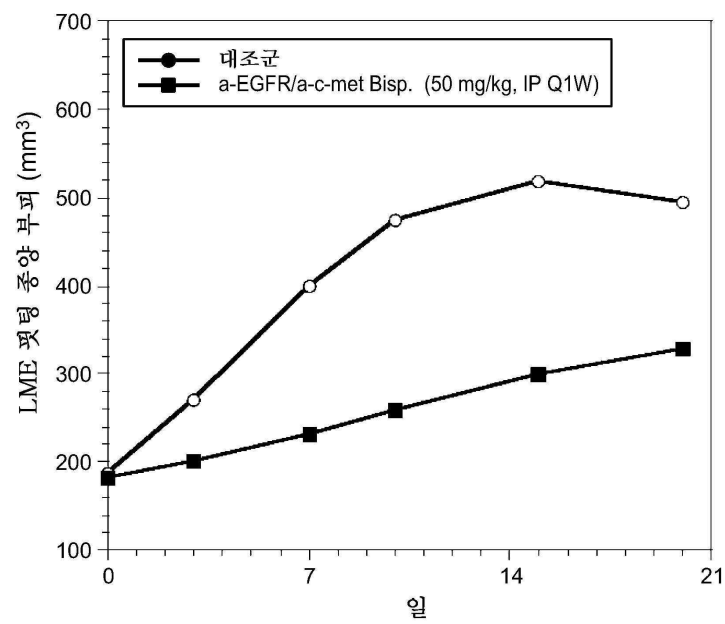




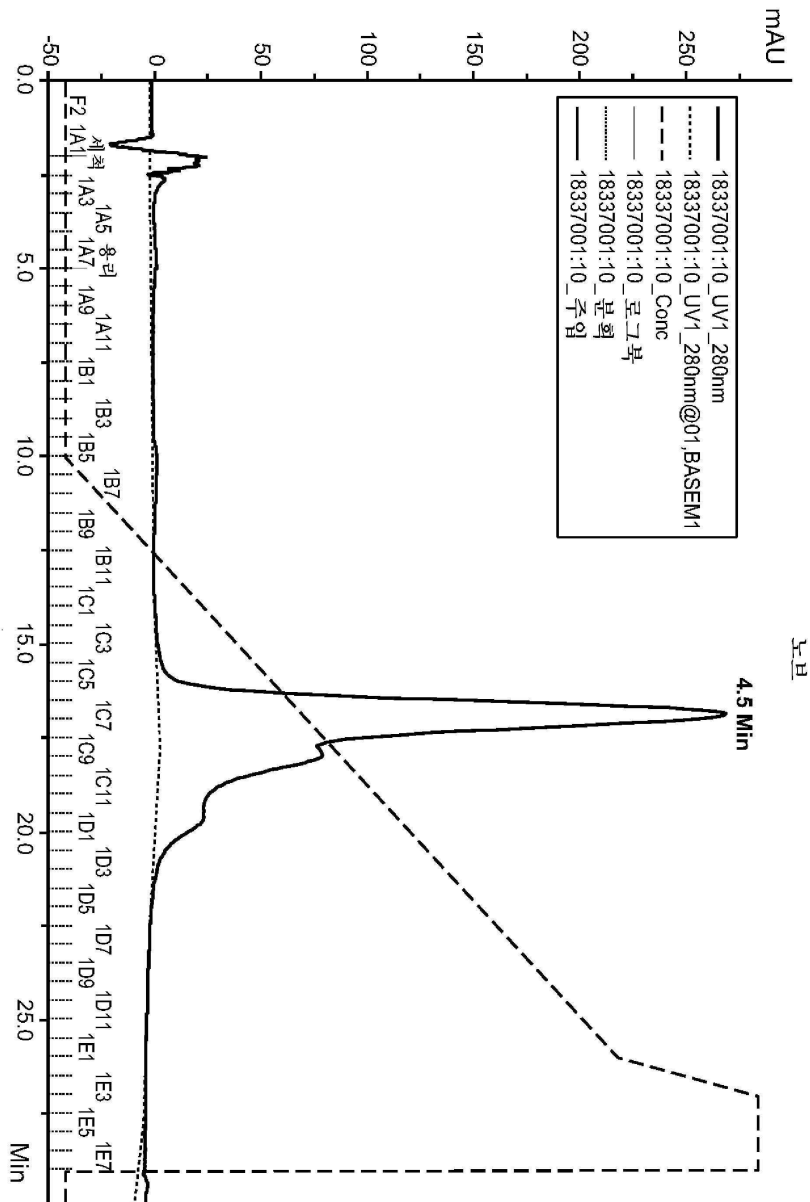
도면12



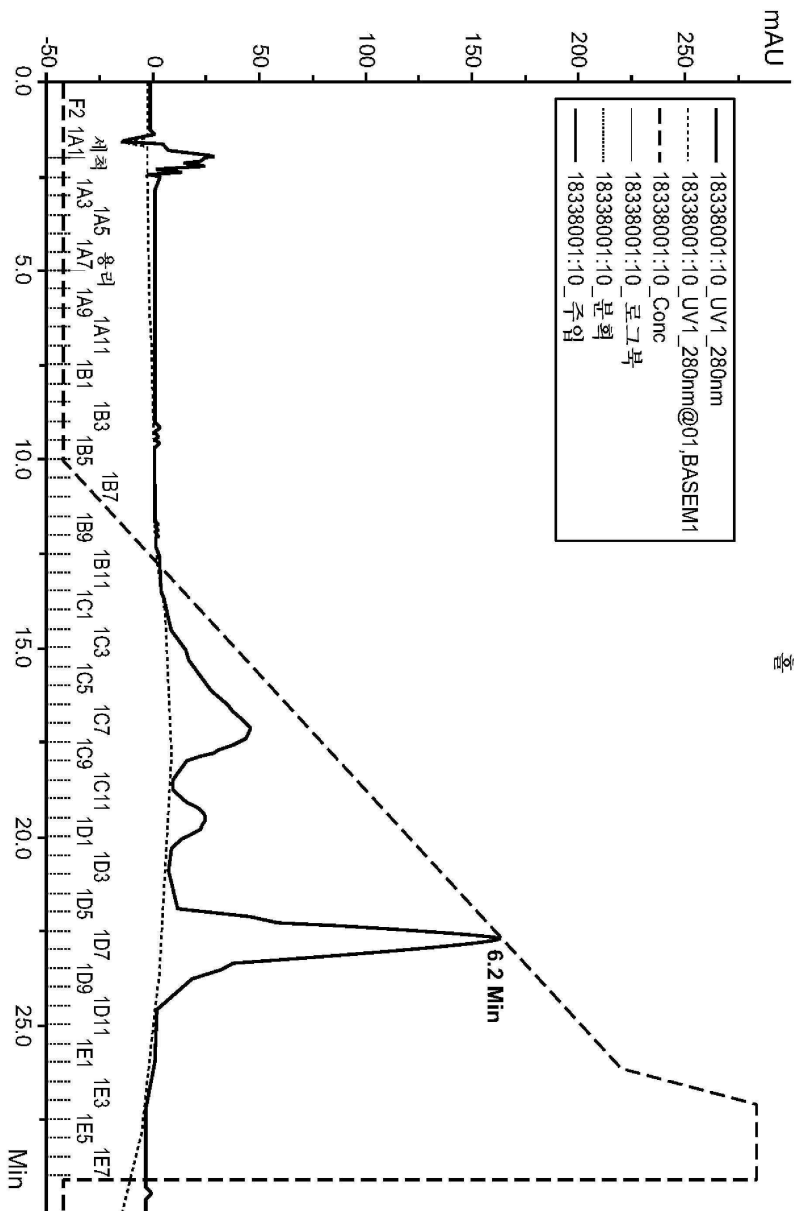
도면13



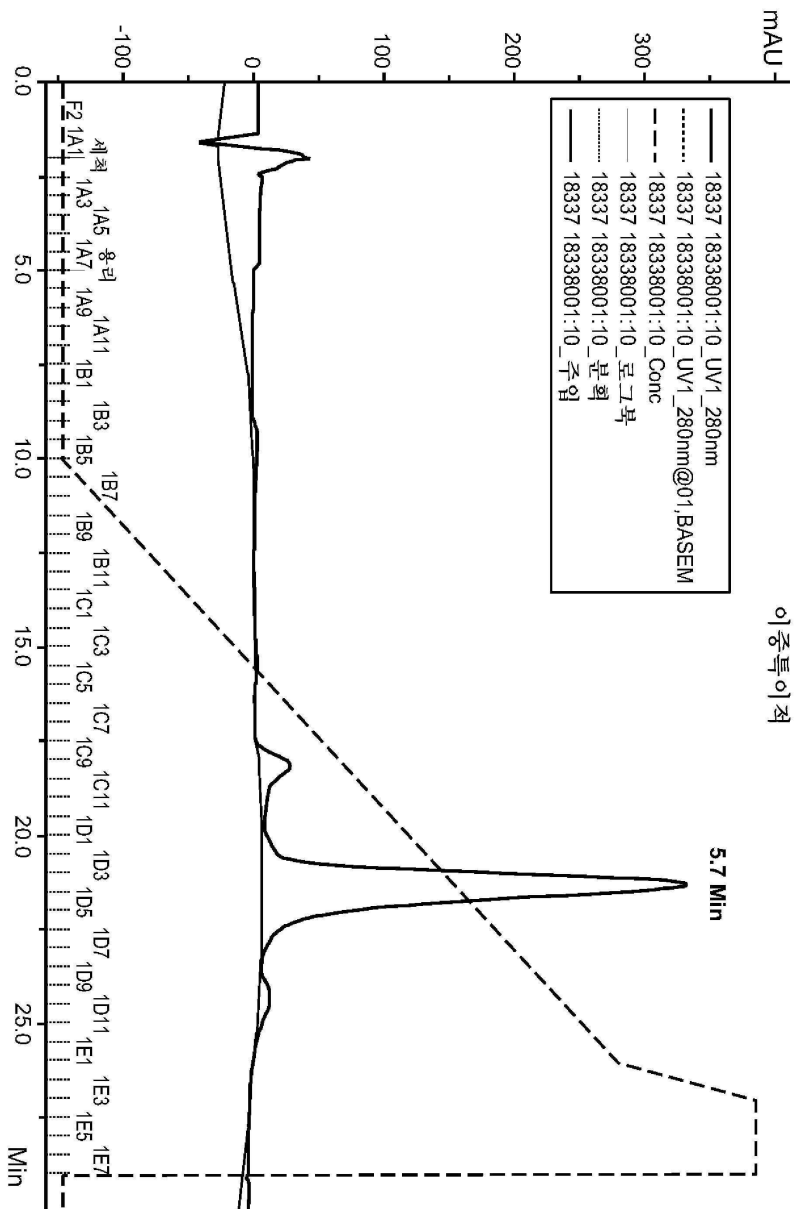
도면14a



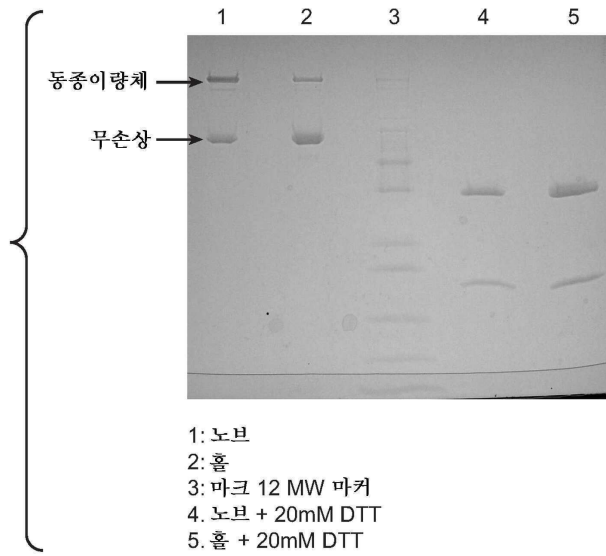
도면14b



도면14c

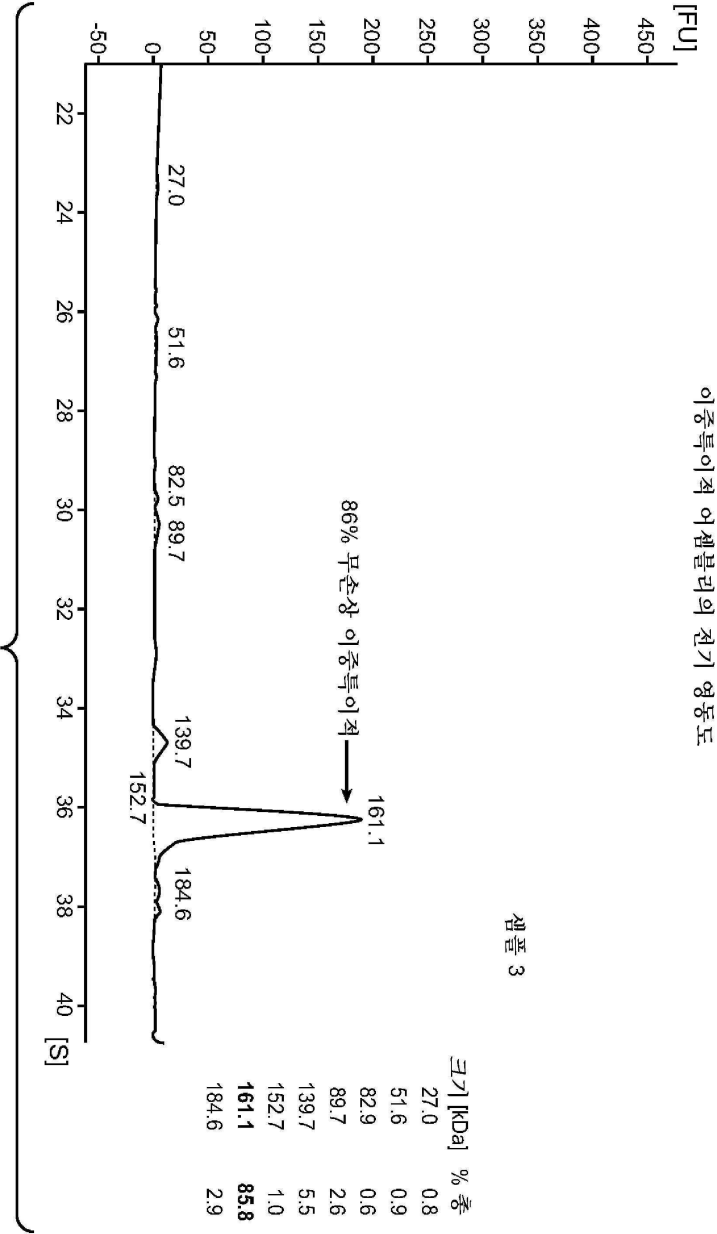


도면14d

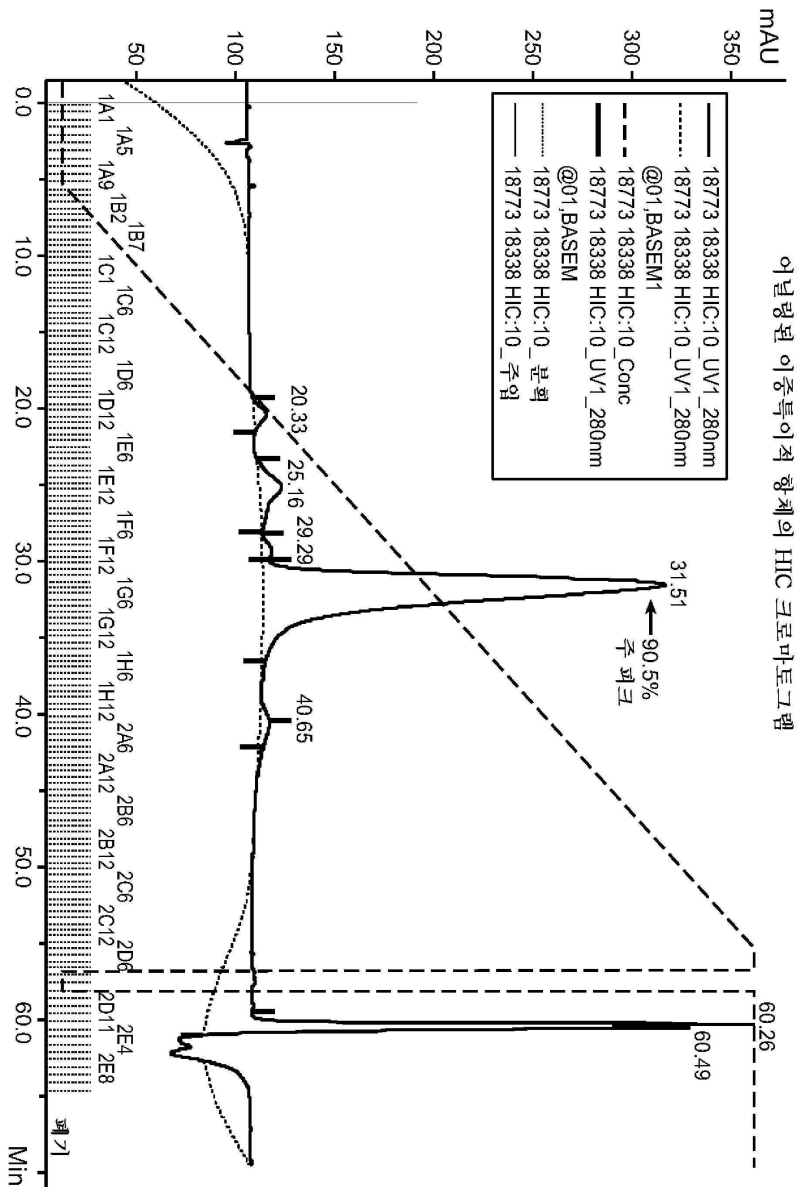




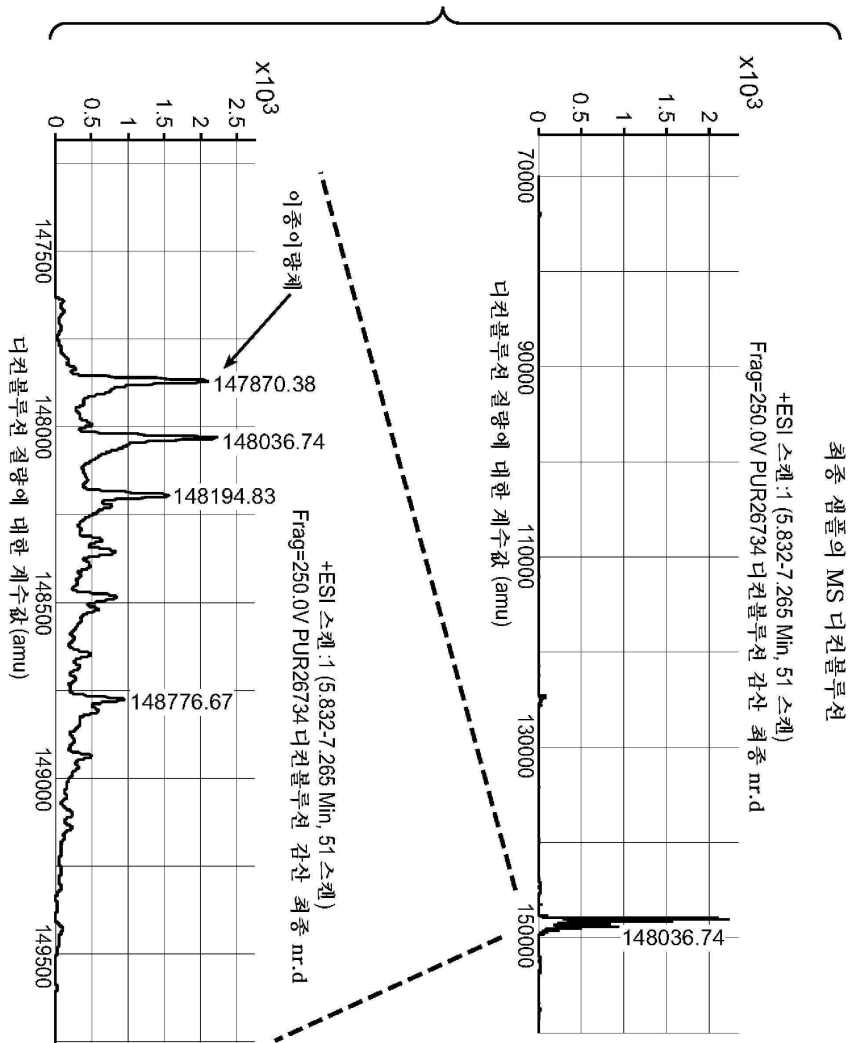
도면15



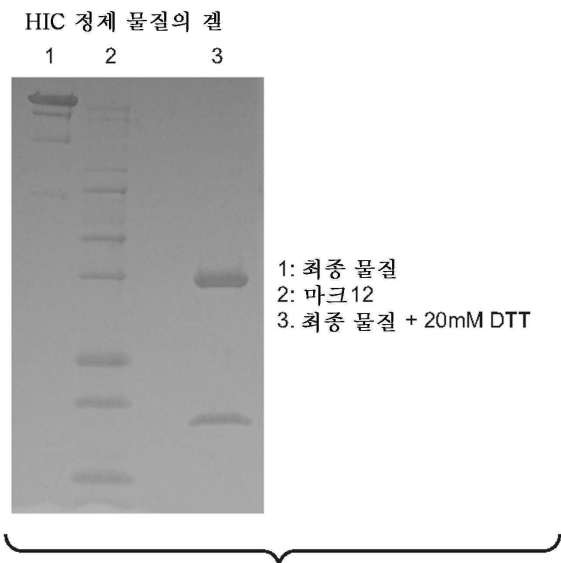
도면16a



도면16b



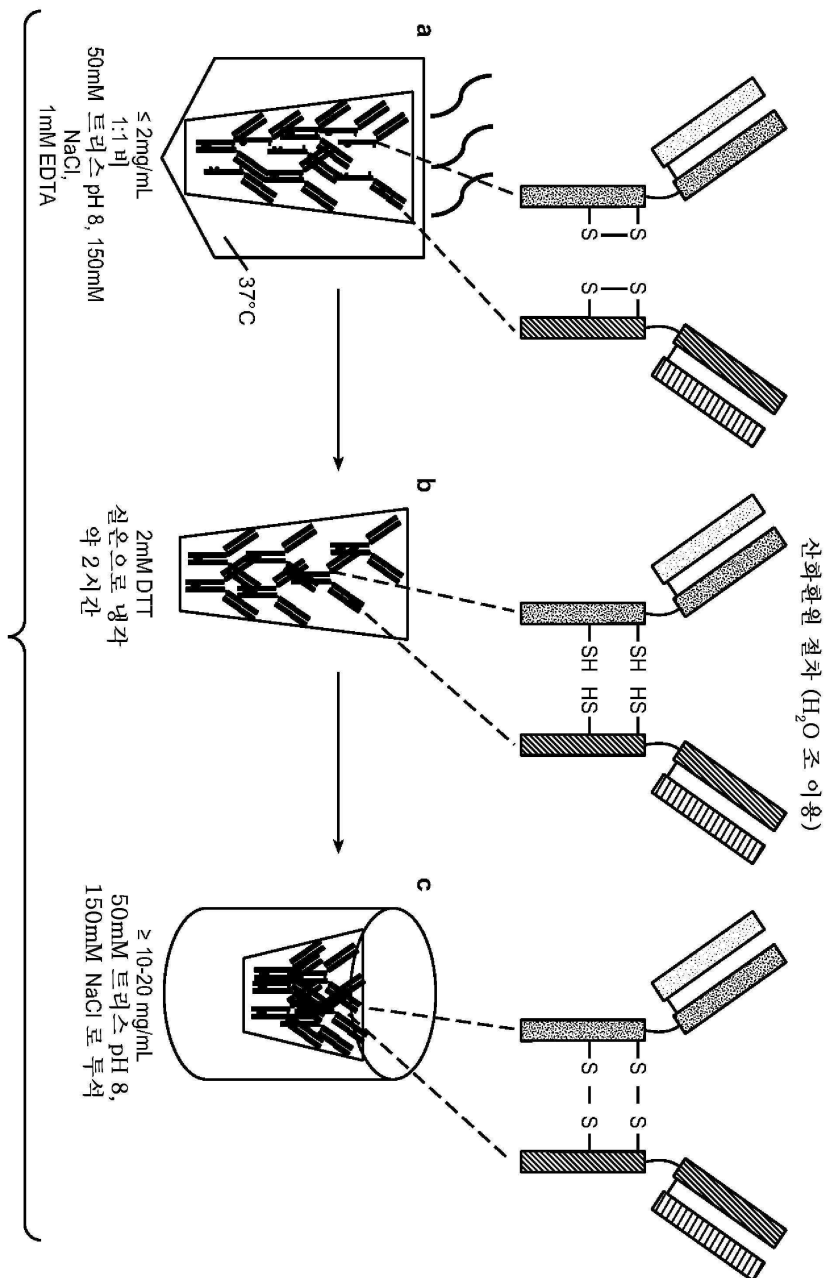
도면16c



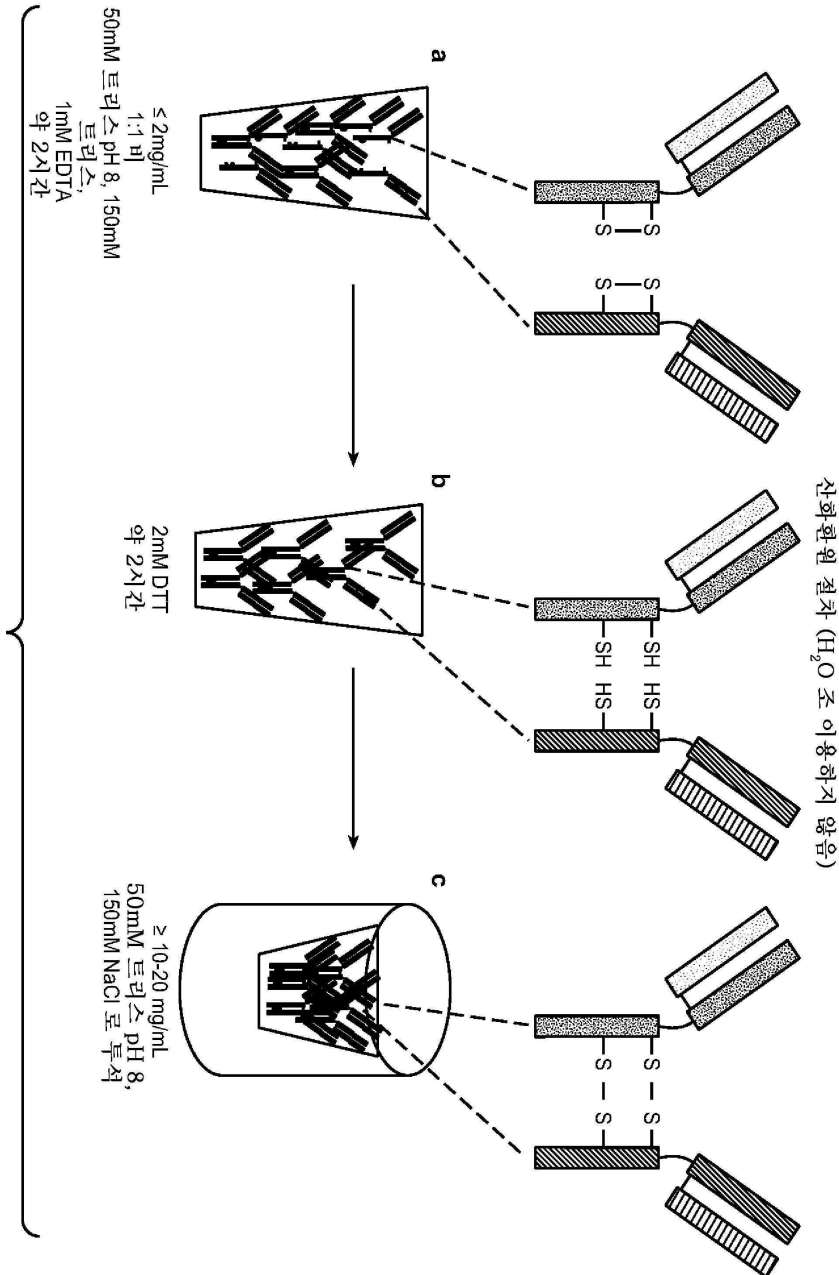
도면16d

	이론적 질량 (Da)	측정된 질량 (Da)
노브/노브	148,819.02	N/A
홀/홀	146,910.40	N/A
노브/홀	147,864.71	147,870.38

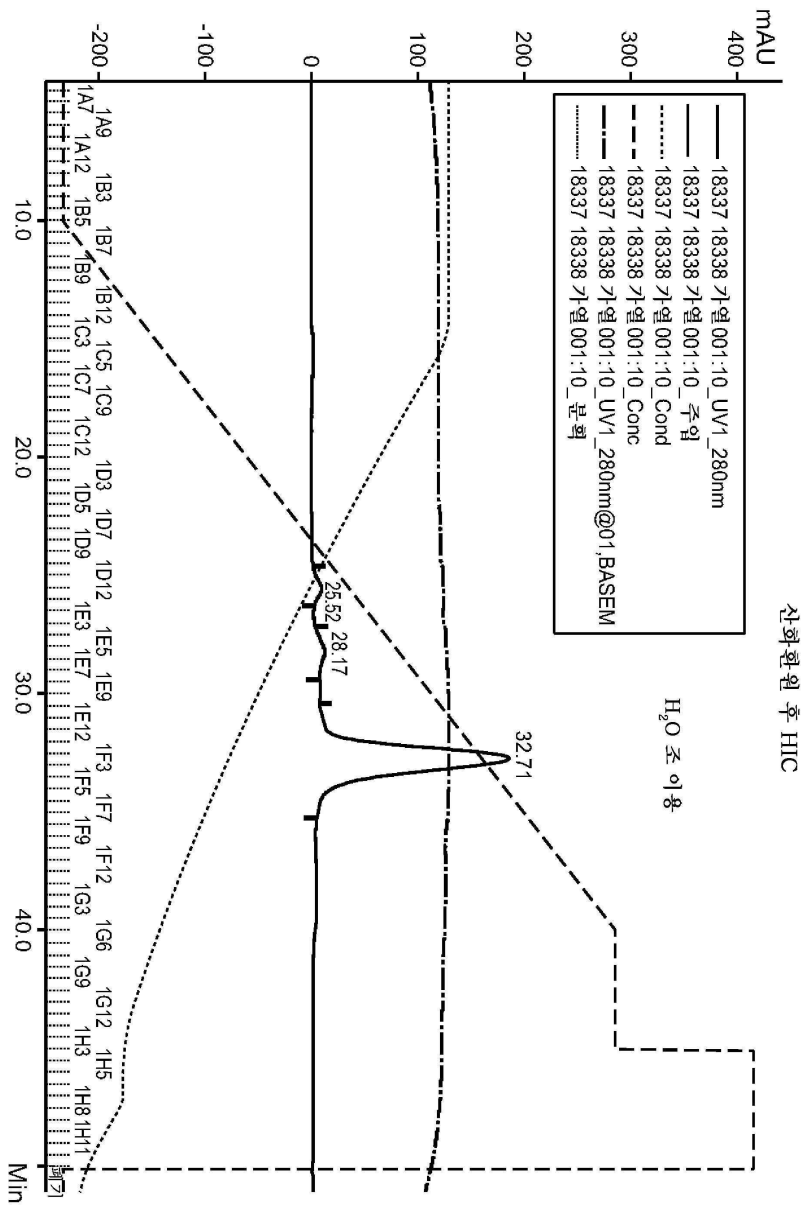
도면17



도면18



도면19a





도면19b

