



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0118825  
(43) 공개일자 2024년08월05일

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C07K 16/32 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)<br/>A61K 47/54 (2017.01) A61K 47/65 (2017.01)<br/>A61K 47/68 (2017.01) C07K 16/28 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>C07K 16/32 (2013.01)<br/>A61K 47/549 (2017.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7022190</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년12월22일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년07월03일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/087399</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/118398<br/>국제공개일자 2023년06월29일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>21217585.5 2021년12월23일<br/>유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인<br/>에프. 호프만-라 로슈 아게<br/>스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124</p> <p>(72) 발명자<br/>호퍼 커스틴<br/>독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하</p> <p>마틴 라이너 이<br/>스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>제일특허법인(유)</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 부위 특이적 항체 접합 및 이의 용도

(57) 요약

본원 발명은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변형된 항체에 관한 것이며, 여기서 중쇄 및/또는 경쇄는 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalBTG) 또는 이의 기능적으로 활성 변이체에 대한 하나 이상의 첫 번째 인식 부위(들)를 포함한다. 하나 이상의 첫 번째 인식 부위(들)는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 내의  
(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



하나 이상의 선택된 위치(들)에 도입된다. 본원 발명은 또한 본원 발명에 따른 변형된 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산뿐만 아니라 직접적으로 또는 첫 번째 링커를 거쳐 하나 이상의 첫 번째 인식 부위(들)에 공유적으로 접합된 (i) 본원 발명에 따른 변형된 항체 및 (ii) 하나 이상의 비항체 모이어티(페이로드(들))를 포함하는 공유 접합체에 관한 것이다. 특정 실시형태에서, 비항체 모이어티는 치료적 실체 및 선택적으로 두 번째 링커를 포함한다. 본원 발명은 또한 본원 발명에 따른 변형된 항체를 비항체 모이어티에 공유적으로 접합하는 방법에 관한 것이다. 비항체 모이어티가 치료적 실체를 포함하는 경우, 본원 발명은 또한 약제로서 이용하기 위한 것뿐만 아니라 질병 치료에 이용하기 위한 약학 조성물로서 본원 발명에 따른 변형된 항체와 치료적 실체의 접합체에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

- A61K 47/65 (2017.08)
- A61K 47/6807 (2017.08)
- A61K 47/6811 (2017.08)
- A61K 47/6849 (2017.08)
- A61K 47/6851 (2017.08)
- A61K 47/6871 (2017.08)
- A61K 47/6889 (2017.08)
- C07K 16/2881 (2013.01)
- C07K 16/2896 (2013.01)

**슈마허 펠릭스 프란츠**

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게

**세라 타티아나**

독일 82377 쾨츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하

(72) 발명자

**모하메드 모하메드 요스리 하산**

독일 82377 쾨츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하

**오엘슬라겔 토비아스**

독일 82377 쾨츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노스틱스 게엠베하

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

적어도 항체 중쇄를 포함하는 변형된 항체로서, 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341) 및 위치 401(HC401)(카밧(Kabat)에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalBTG)에 대한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.

#### 청구항 2

적어도 항체 경쇄를 포함하는 변형된 항체로서, 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143) 및 위치 214(LC214)(카밧에 따른 넘버링)를 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalBTG)에 대한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.

#### 청구항 3

중쇄 및 경쇄를 포함하는 변형된 항체로서, 중쇄 및/또는 경쇄는 항체 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143) 및 위치 214(LC214), 및 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341) 및 위치 401(HC401)(카밧에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalBTG)에 대한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, KalBTG에 대한 첫 번째 인식 부위는 개별 항체 사슬의 아미노산 서열 내에 있는 것인, 변형된 항체.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 항체 중쇄의 C-말단에 있거나 이에 융합된 KalBTG에 대한 첫 번째 인식 부위를 추가로 포함하는, 변형된 항체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 항체 중쇄의 위치 446(HC446) 또는 위치 447(HC447)(카밧에 따른 넘버링)에 KalBTG에 대한 첫 번째 인식 부위를 추가로 포함하는, 변형된 항체.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 2개의 동일한 항체 중쇄를 포함하는, 변형된 항체.

#### 청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 2개의 상이한 항체 중쇄를 포함하는, 변형된 항체.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 KalBTG에 대한 인식 부위 이외에 다음 돌연변이(카밧에 따른 넘버링)를 포함하는, 변형된 항체:

a) 두 Fc-영역 폴리펩티드 모두에서 L234A, L235A;

- b) 두 Fc-영역 폴리펩티드 모두에서 P329G;
- c) 한 Fc-영역 폴리펩티드에서 T366W 및 다른 Fc-영역 폴리펩티드에서 T366S, L368A, Y407V;
- d) 한 Fc-영역 폴리펩티드에서 S354C 및 다른 Fc-영역 폴리펩티드에서 Y349C;
- e) a)와 b);
- f) a)와 b)와 c); 또는
- g) a)와 b)와 c)와 d).

**청구항 10**

적어도 하나의 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 변형된 항체 Fc-영역으로서, 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341) 및 위치 401(HC401)(카밧에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제 (KalbTG)에 대한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역으로서, KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위는 아미노산 서열 RYGQR(서열 번호: 11), RWRQR(서열 번호: 12), YRQRT(서열 번호: 13), IRQRQ(서열 번호: 14), FRYRQ(서열 번호: 15), YRYRQ(서열 번호: 17) 및 RVRQR(서열 번호: 18)을 포함하는 첫 번째 인식 부위의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역으로서, KalbTG에 대한 인식 부위는 위치 뒤에 삽입되는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역으로서, KalbTG에 대한 인식 부위는 2개의 유연한 펩티드 링커 사이에 위치되어 있는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 펩티드 링커는 각각 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Ser(n=1, 2, 3, 4, 5; 서열 번호: 19)을 갖는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 반복 단위를 포함하는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하고:

A<sup>↓</sup>STKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<sup>↓</sup>GVHTFPAVLQSS<sup>↓</sup>GLYSLSSVTV<sup>↓</sup>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<sup>↓</sup>KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI<sup>↓</sup>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<sup>↓</sup>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTI<sup>↓</sup>SKAKG<sup>↓</sup>QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD<sup>↓</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<sup>↓</sup>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<sup>↓↓</sup>,

여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 뒤에는 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되고, 여기서 "<sup>↓↓</sup>"에 의해 식별된 위치 뒤에는 KalbTG에 대한 추가의 첫 번째 인식 부위가 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나의 위치에 삽입되는 경우에만 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.

**청구항 16**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하고:

A<sup>↓</sup>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS<sup>↓</sup>GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<sup>↓</sup>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKG<sup>↓</sup>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD<sup>↓</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG<sup>↓↓</sup>,

여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 뒤에는 KabTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되고,

여기서 "<sup>↓↓</sup>"에 의해 식별된 위치 뒤에는 KabTG에 대한 추가의 첫 번째 인식 부위가 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나의 위치에 삽입되는 경우에만 KabTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.

**청구항 17**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하고:

A<sup>↓</sup>STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS<sup>↓</sup>GLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKTVVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN<sup>↓</sup>STFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG<sup>↓</sup>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD<sup>↓</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG<sup>↓↓</sup>,

여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 뒤에는 KabTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되고,

여기서 "<sup>↓↓</sup>"에 의해 식별된 위치 뒤에는 KabTG에 대한 추가의 첫 번째 인식 부위가 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나의 위치에 삽입되는 경우에만 KabTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.

**청구항 18**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하고:

A<sup>↓</sup>STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS<sup>↓</sup>GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<sup>↓</sup>STFRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKTKG<sup>↓</sup>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSD<sup>↓</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNRFTQKSLSLSPG<sup>↓↓</sup>,

여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 뒤에는 KabTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되고,

여기서 "<sup>↓↓</sup>"에 의해 식별된 위치 뒤에는 KabTG에 대한 추가의 첫 번째 인식 부위가 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나의 위치에 삽입되는 경우에만 KabTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.

**청구항 19**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하고:

A<sup>↓</sup>STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS<sup>↓</sup>GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVSPNMVPHAHHAQAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN<sup>↓</sup>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCK

KVSNKGLPSSIEKTI SKAKG<sup>↓</sup> QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD<sup>↓</sup> GSFFLYSRLTVDKSRWQEGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG<sup>↓↓</sup>,

여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 뒤에는 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되고,

여기서 "<sup>↓↓</sup>"에 의해 식별된 위치 뒤에는 Ka1bTG에 대한 추가의 첫 번째 인식 부위가 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나의 위치에 삽입되는 경우에만 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.

**청구항 20**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하는, 변형된 항체.

**청구항 21**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하는, 변형된 항체.

**청구항 22**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하는, 변형된 항체.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 항체 경쇄 불변 영역을 포함하고:

RTV<sup>↓</sup> AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE<sup>↓</sup> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK  
SFNRGEC<sup>↓</sup>,

여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 뒤에는 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.

**청구항 24**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 항체 경쇄 불변 영역을 포함하고:

QPK<sup>↓</sup> AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA<sup>↓</sup> VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTV  
PTEC<sup>↓</sup>S

여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 뒤에는 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.

**청구항 25**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 10에 기재된 아미노산 서열을 갖는 항체 경쇄 불변 영역을 포함하는, 변형된 항체.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 수용체 매개 세포내이입을 유도하는 수용체에 특이적으로 결합하는, 변형된 항체.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 항체는 인간 트랜스페린 수용체 1(TfR1), 인간 인슐린 유사

성장 인자 1 수용체(IGF-1R), 인간 저밀도 지질단백질 수용체 관련 단백질 1(LRP1) 및 인간 저밀도 지질단백질 수용체 관련 단백질 8(LRP8)로 구성된 항원의 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하는, 변형된 항체.

**청구항 28**

공유 접합체로서,

(i) 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체, 및

(ii) (i)의 변형된 항체의 KalbTG에 대한 하나 이상의 첫 번째 인식 부위에 공유적으로 접합된 하나 이상의 비항체 도메인을 포함하고,

여기서 비항체 도메인은 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위를 포함하는, 공유 접합체.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 비항체 도메인은 다음을 포함하는 것인, 공유 접합체:

(i) 치료적 실체,

(ii) 변형된 항체에 존재하는 첫 번째 인식 부위에 상보적인 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위, 및

(iii) 선택적으로 치료적 실체와 두 번째 인식 부위 사이의 두 번째 링커.

**청구항 30**

제28항 또는 제29항에 있어서, KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위는 펩티드 서열 RYESK(서열 번호: 16)에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 K-태그인, 공유 접합체.

**청구항 31**

제29항 또는 제30항에 있어서, 두 번째 링커는 알킬 링커, 폴리에틸렌 링커, 펩티드 링커 또는 이들의 혼합물인, 공유 접합체.

**청구항 32**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체를 치료적 실체에 공유적으로 접합하는 방법으로서, 다음 단계를 포함하는 방법:

a) 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체를 제공하는 단계,

b) 비항체 도메인을 제공하되, 상기 비항체 도메인이

(i) 치료적 실체,

(ii) (i)에 제공된 변형된 항체에 존재하는 첫 번째 인식 부위에 상보적인 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위, 및

(iii) 선택적으로 치료적 실체와 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위 사이의 두 번째 링커

를 포함하는, 단계; 및

c) a)의 변형된 항체와 b)의 비항체 도메인을 KalbTG 또는 이의 기능적으로 활성 변이체 또는 단편의 존재하에 인큐베이션하여 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위와 두 번째 인식 부위 사이에 이소펩티드 결합을 형성하고,

이로써 변형된 항체를 치료적 실체에 접합하는 단계.

**청구항 33**

제32항에 있어서, KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위는 RYESK(서열 번호: 16)의 아미노산 서열을 갖는 것인, 방법.

**청구항 34**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체, 변형된 Fc-영역, 공유 접합체 또는 방법으로서, KalbTG

는 다음 아미노산 서열(3문자 코드)을 포함하는 것인, 변형된 항체, 변형된 Fc-영역, 공유 접합체 또는 방법:

Met His Lys Trp Phe Leu Arg Ala Ala Val Val Ala Ala Val Gly Phe Gly Leu Pro Thr Leu Ile Ala Thr Thr  
Ala Gln Ala Ala Ala Val Ala Ala Pro Thr Pro Arg Ala Pro Leu Ala Pro Pro Leu Ala Glu Asp Arg Ser Tyr  
Arg Thr Trp Arg Val Glu Asp Tyr Val Glu Ala Trp Glu Arg Tyr His Gly Arg Glu Met Thr Glu Asp Glu Arg  
Glu Asn Leu Ala Arg Gly Cys Ile Gly Val Thr Val Val Asn Leu Asn Arg Glu Asp Leu Ser Asn Pro Pro Leu  
Asn Leu Ser Phe Gly Ser Leu Arg Thr Ala Glu Ala Val Gln Ala Ala Leu Asn Lys Ile Val Asp Thr His Pro  
Ser Pro Ala Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Lys Asp Pro Ile Leu Lys Arg Leu Lys Asn Val Val Lys Ala Leu  
Pro Ser Trp Ile Asp Ser Ala Lys Leu Lys Ala Ser Ile Phe Ser Lys Arg Phe Tyr Ser Trp Gln Asn Pro Asp  
Trp Ser Glu Glu Arg Ala His Thr Thr Tyr Arg Pro Asp Arg Glu Thr Asp Gln Val Asp Met Ser Thr Tyr Arg  
Tyr Arg Ala Arg Pro Gly Tyr Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Gln Asp Thr Asn Thr Trp Trp His Ala  
Asn His Glu Glu Pro Arg Met Val Val Tyr Gln Ser Thr Leu Arg His Tyr Ser Arg Pro Leu Gln Asp Phe Asp  
Glu Gln Val Phe Thr Val Ala Phe Ala Lys Lys Asp(서열 번호: 31).

**청구항 35**

제29항 내지 제31항 및 제34항 중 어느 한 항에 따른 공유 접합체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 36**

약제로서의 용도를 위한, 제29항 내지 제31항 및 제34항 중 어느 한 항에 따르거나 제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 생산된 공유 접합체.

**청구항 37**

제36항에 따른 용도로서, 신경 질환은 신경병증 장애, 신경퇴행성 질환, 암, 안구 질환 장애, 발작 장애, 리소좀 축적병, 아밀로이드증, 바이러스성 또는 미생물성 질병, 허혈, 행동 장애, CNS 염증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 뇌 전이가 있는 CD20 양성 암, 및 뇌 전이가 있는 HER2 양성 암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 용도.

**청구항 38**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체를 인코딩하는 핵산 또는 핵산 조성물.

**청구항 39**

제38항에 따른 핵산 또는 핵산 조성물을 포함하는 세포.

**청구항 40**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체를 생산하기 위한 방법으로서, 다음 단계를 포함하는 방법:

- 제39항에 따른 세포를 배양하는 단계,
  - 세포 또는/및 배양 배지로부터 변형된 항체를 회수하는 단계, 및
- 이에 의해 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 변형된 항체를 생산하는 단계.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본원 발명은 항체 기술 분야, 특히 항체-약물 접합체 분야에 관한 것이다. 특히, 본원 발명은 쿠츠네리아 알비다(Kutzneria albida)로부터의 트랜스글루타미나아제에 대한 하나 이상의 인공 인식 부위를 포함하는 변형된 항체 및 상기 변형된 항체를 포함하는 항체-약물 접합체에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 의약품은 질병을 치료, 치유 또는 예방하는 데 이용되는 화학 물질이다. 이는 다양한 경로를 통해 투여될 수 있

으며, 많은 의약품은 하나 초과로 투여될 수 있다. 전형적인 투여 경로에는 용액, 현탁액 또는 유제로서의 주사(예: 근육내, 정맥내, 복강내, 안구내, 골내, 피하 또는 척수강내), 경구, 직장, 설하 또는 국소가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 분명히, 의약품은 일반적으로 환자의 체내에 전신적으로 분포되며 원하지 않는 부위에서의 활성으로 인해 부작용을 일으킬 수 있다. 다른 부위는 접근이 어려울 수 있다. 표적 요법은 작용하도록 의도된 신체 부위에 직접적으로 작용하는 의약품을 이용하여 이러한 단점을 극복하는 것을 목표로 한다. 표적 요법은 기존 비표적 치료 형태보다 효과가 뛰어나고 부작용도 적을 것으로 기대된다.

[0003] 치료적 실체를 의도된 작용 장소로 지향시키는 한 가지 방법은 이것을 표적 세포나 조직에 특이적으로 결합하는 항체에 접합하는 것이다. 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체(AOC)와 같은 항체 약물 접합체(ADC)와 관련된 과제 중 하나는 제조이다. 대부분의 약물-항체 결합은 티올-말레이미드 화학을 가능하게 하는 부분적으로 감소된 사슬 간 이황화 결합 또는 활성화된 에스테르를 이용한 리신 기능화 또는 인공적으로 도입된 시스템인 잔기 중 어느 하나를 이용한다. 이들 방법은 서로 다른 부위에 서로 다른 수의 약물이 부착된 접합된 항체 종의 통계적 혼합물을 생성한다. 모노메틸 아우리스타틴 E 페이로드를 갖는 ADC에서 약물 대 항체 비율(DAR)이 4, 6 또는 8인 ADC 중은 소수성이 점점 더 증가하는 것으로 나타나고 DAR2 중보다 응집되는 경향이 더 큰 것으로 밝혀졌다(Adem et al.).

[0004] 따라서, 치료적 실체의 부착 수와 부위에 대한 보다 정밀한 제어를 통한 표적 치료를 위해 AOC와 같은 ADC를 제공하는 것이 바람직하다. 이로써 ADC의 동질성이 높아져야 한다. 개선된 부위 특이적 접합 기술은 치료용 ADC뿐만 아니라 진단용 항체 표지 또는 항체-효소 접합체의 제조에 잠재적으로 이용할 수 있기 때문에 많은 제약 회사의 관심 대상으로 남아 있다.

[0005] 스트렙토미세스 모바라엔시스(*Streptomyces mobaraensis*)로부터의 미생물 트랜스글루타미나아제는 단백질 교차 연결뿐만 아니라 부위별 단백질 표지화를 위한 저렴하고 사용하기 쉬운 효소로 부상하였다(Ando et al., 2014; Strop et al., 2013).

[0006] 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터 새로운 트랜스글루타미나아제(KalbTG)의 발견 및 개별 펩티드 기질의 확인은 Steffen et al. (2017)에 의해 설명되었다. KalbTG는 이전에 기술된 미생물 트랜스글루타미나아제(mTG)와 비교하여 유사한 효율성을 나타내지만 특이성과 개발 가능성이 향상되었다.

[0007] US 2020/0249231은 트랜스글루타미나아제 종의 식별 및 특성화를 위한 시스템 및 방법을 보고했다.

[0008] IgG 중쇄 C-말단은 항체 표지화를 위한 mTG에 적합한 Q-태그 삽입 부위로 설명되었다(예를 들면, WO 2021/174091 참조).

### 발명의 내용

[0009] 위에서 언급한 단점을 회피하기 위해, 본원 발명의 목적은 KalbTG 매개 접합과 관련하여 변형된 항체의 향상된 특성을 야기하는 Q-태그 모티프의 통합을 위한 IgG 분자 내의 부위를 확인하는 것이었다. Q-태그의 통합은 항체 접합이나 기능을 손상시키거나 발현 수율을 감소시켜서는 안 되며, 치료적 실체의 치료 활성뿐만 아니라 접합에 필요한 접근성을 제공해야 한다. 본원 발명에 따른 이러한 부위의 성공적인 확인은 정의된 화학양론뿐만 아니라 조절된 부위 특이적 방식으로 IgG 분자당 하나 이상의 치료 모이어티의 통합을 허용한다. 이로써 보다 균질한 접합체 생성물이 제공될 수 있으며, 예를 들면 필요한 정제 및 분리 노력을 줄이고 보다 유리한 약물 유사 특성을 갖는 분자를 생성할 수 있다. 추가적으로, 접합 과정 및/또는 접합된 페이로드에 의해 항원에 대한 항체의 결합이 손상될 위험이 감소된다.

[0010] 본원 발명자들은 무엇보다도 페이로드를 IgG 중쇄 C-말단에 접합할 때 응집 및 소수성이 증가한다는 것을 발견했다. KalbTG를 이용하여 의약품으로 유용한 항체-약물 접합체를 제조할 수 있으려면 KalbTG Q-태그가 본원 발명에 따른 IgG 백본 내의 정의된 위치에 도입되어야 한다.

[0011] 본원 발명은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변형된 항체에 관한 것이며, 여기서 중쇄 및/또는 경쇄는 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG) 또는 이의 기능적으로 활성 변이체에 대한 하나 이상의 첫 번째 인식 부위(들)를 포함한다. 하나 이상의 첫 번째 인식 부위(들)는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 내의 하나 이상의 선택된 위치(들)에 도입된다.

[0012] 본원 발명의 한 양상은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변형된 항체이며, 여기서 중쇄 및/또는 경쇄는 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)로부터 선택된 위치 중 하나 이상의 위치

에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나 이상의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다. 따라서, 본원 발명의 변형된 항체에서, KalbTG에 대한 인식 부위는 항체 중쇄 폴리펩티드의 불변 영역 내부에 위치하고, 즉 항체 중쇄의 임의의 N- 또는 C-말단에 위치하지 않고, 및/또는 항체 경쇄 불변 도메인 내부에 또는 이의 C-말단에 위치한다.

- [0013] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 본원 발명의 변형된 항체는 C-말단, 즉 중쇄의 위치 446(HC446) 또는 위치 447(HC447)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 이에 융합된 KalbTG에 대한 인식 부위를 추가로 포함한다.
- [0014] 본원 발명의 맥락에서, "위치에 KalbTG에 대한 인식 부위의 삽입"이라는 용어는 항체의 개별 사슬의 비변형된 아미노산 서열 내 해당 위치에 존재하는 아미노산 잔기가 인식 부위에 의해 대체된다, 즉 인식 부위가 아미노산 잔기 대신에 삽입된다는 것을 의미하거나, 또는 바람직한 실시형태에서 인식 부위가 두 개의 짧고 유연한 링커 펩티드 사이에 바로 또는 간격을 두고, 아미노산 서열 내 해당 위치 바로 뒤에 삽입된다, 즉 아미노산 잔기가 유지된다는 것을 의미한다.
- [0015] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 경쇄의 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된다.
- [0016] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 경쇄의 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 341(HC341), 위치 297(HC297), 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된다.
- [0017] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 변형된 항체는 2개의 동일한 중쇄 또는 중쇄 Fc-영역을 포함한다.
- [0018] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 변형된 항체는 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)로부터 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 2개, 4개 또는 그 초과 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0019] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 2개의 상이한 중쇄 또는 항체 Fc-영역을 포함하며, 이에 따라 적어도 이중이량체화를 유도하기 위한 각각의 돌연변이로부터 차이가 발생한다.
- [0020] 특정 실시형태에서, 변형된 항체는 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401) (Kabat에 따른 넘버링)로부터 선택된 하나 이상의 위치에서 서로 독립적으로 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 1개, 2개, 3개 또는 그 초과 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0021] 마찬가지로, 본원 발명은 변형된 항체 Fc-영역에 관한 것이며, 여기서 변형된 항체 Fc-영역은 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341) 및 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나 이상의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0022] 따라서, 본원 발명의 변형된 항체 Fc-영역에서, KalbTG에 대한 인식 부위는 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 불변 영역 내부에 위치한다, 즉 어떤 말단에도 위치하지 않는다. 또한, 본원 발명의 변형된 항체 Fc-영역은 중쇄의 위치 446(HC446) 또는 위치 447(HC447), 즉 C-말단(Kabat에 따른 넘버링)에 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위를 추가로 포함할 수 있다. 본원 발명의 맥락에서 "위치에 KalbTG에 대한 인식 부위의 삽입"이라는 용어는 비변형된 서열 내 해당 위치에 존재하는 아미노산이 인식 부위에 의해 대체된다는 것을 의미하거나, 또는 바람직한 실시형태에서 인식 부위가 두개의 유연하고 짧은 링커 펩티드 사이에 바로 또는 간격을 두고, 해당 위치 뒤에 추가로 삽입된다는 것을 의미한다.
- [0023] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 중쇄의 위치 118(HC118), 위치

177(HC177), 위치 297(HC297) 및 위치 341(HC341)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된다.

- [0024] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 중쇄의 위치 341(HC341), 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된다.
- [0025] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0026] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0027] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0028] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 2개의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0029] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.
- [0030] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.
- [0031] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 2개의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.
- [0032] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 2개의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 첫 번째 쌍의 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고 두 번째 쌍의 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.
- [0033] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 2개의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 첫 번째 쌍의 중쇄는 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫

번째) 인식 부위(들)를 포함하고 두 번째 쌍의 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.

[0034] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 2개의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 첫 번째 쌍의 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고, 두 번째 쌍의 중쇄는 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고, 두 번째 쌍의 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.

[0035] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 2개의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 첫 번째 쌍의 중쇄는 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고, 두 번째 쌍의 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고, 두 번째 쌍의 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.

[0036] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 2개의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 첫 번째 쌍의 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 2개의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고 두 번째 쌍의 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.

[0037] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 인식 부위(들)는 위치 바로 뒤에 삽입된다. 특정 실시형태에서, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 인식 부위(들)는 2개의 유연한 펩티드 링커 사이에 간격을 두고 삽입된다. 특정 실시형태에서, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 인식 부위(들)는 아미노산 서열 GGGSYRYRQGGGS(서열 번호: 25)를 갖는다.

[0038] 본원 발명은 또한 본원 발명에 따른 변형된 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산뿐만 아니라 직접적으로 또는 첫 번째 링커를 거쳐 하나 이상의 첫 번째 인식 부위(들)에 공유적으로 접합된 (i) 본원 발명에 따른 변형된 항체 및 (ii) 하나 이상의 비항체 모이어티(페이로드(들))를 포함하는 공유 접합체에 관한 것이다. 특정 실시형태에서, 비항체 모이어티는 치료적 실체 및 선택적으로 두 번째 링커를 포함한다.

[0039] 본원 발명은 또한 본원 발명에 따른 변형된 항체를 비항체 모이어티에 공유적으로 접합하는 방법에 관한 것이다. 비항체 모이어티가 치료적 실체를 포함하는 경우, 본원 발명은 또한 약제로서 이용하기 위한 것뿐만 아니라 질병 치료에 이용하기 위한 약학 조성물로서의 본원 발명에 따른 변형된 항체와 치료적 실체의 접합체에 관한 것이다.

[0040] KalbTG는 글루타민(Gln, Q) 측쇄와 리신(Lys, K) 측쇄 사이의 이소펩티드 결합 형성을 촉매한다. 형성된 이소펩티드 결합은  $\epsilon$ -( $\gamma$ -글루타미드) 리신 결합/다리이다. 효소 결합 형성은 공유 결합이므로 대부분 비가역적이다. YRYRQ(서열 번호: 17)는 KalbTG Gln 함유 모티프(Q-태그)로 식별되었으며, RYESK(서열 번호: 16)는 Lys 함유 수용자 모티프(K-태그)로 식별되었다.

[0041] 따라서, 본원 발명은 적어도 다음 실시형태를 포함한다:

[0042] 1. 적어도 항체 중쇄를 포함하는 변형된 항체로서, 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341) 및 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과된 첫 번째

인식 부위(들)를 포함하는 것인, 변형된 항체.

- [0043] 2. 적어도 항체 경쇄를 포함하는 변형된 항체로서, 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143) 및 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)를 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된, 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제 (KalbTG)에 대한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 첫 번째 인식 부위(들)를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0044] 3. 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변형된 항체로서, 중쇄 및/또는 경쇄는 항체 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된, 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 첫 번째 인식 부위(들)를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0045] 4. 실시형태 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위는 개별 항체 사슬의 아미노산 서열 내에 있는 것인, 변형된 항체.
- [0046] 5. 실시형태 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 항체 중쇄의 C-말단에 있거나 이에 융합된 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위를 추가로 포함하는, 변형된 항체.
- [0047] 6. 실시형태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 항체 중쇄의 위치 446(HC446) 또는 위치 447(HC447)(Kabat에 따른 넘버링)에 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위를 추가로 포함하는, 변형된 항체.
- [0048] 7. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 위치는 항체 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체.
- [0049] 8. 실시형태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 위치는 항체 경쇄의 위치 214(LC214) 및 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체.
- [0050] 9. 실시형태 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 위치는 항체 경쇄의 위치 214(LC214) 및 항체 중쇄의 위치 341(HC341), 위치 297(HC297), 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체.
- [0051] 10. 실시형태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 위치는 항체 경쇄의 위치 214(LC214) 및 항체 중쇄의 위치 297(HC297), 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체.
- [0052] 11. 실시형태 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 항체 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 짝수개의 첫 번째 인식 부위(들)를 포함하는, 변형된 항체.
- [0053] 12. 실시형태 11에 있어서, 짝수개는 2개, 4개, 6개 또는 8개인, 변형된 항체.
- [0054] 13. 실시형태 11 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 짝수개는 2개 또는 4개인, 변형된 항체.
- [0055] 14. 실시형태 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 항체 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 홀수개의 첫 번째 인식 부위(들)를 포함하는, 변형된 항체.
- [0056] 15. 실시형태 14에 있어서, 홀수개는 1개, 3개, 5개 또는 7개인, 변형된 항체.
- [0057] 16. 실시형태 14 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 홀수개는 1개 또는 3개인, 변형된 항체.

- [0058] 17. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 동족 쌍을 포함하는, 변형된 항체.
- [0059] 18. 실시형태 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0060] 19. 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0061] 20. 실시형태 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0062] 21. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 2개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0063] 22. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0064] 23. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0065] 24. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 2개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0066] 25. 실시형태 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 동족 항체 경쇄의 2개의 쌍을 포함하는, 변형된 항체.
- [0067] 26. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서,
- [0068] (i) 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄 각각 2개의 쌍을 포함하고, 여기서 항체 중쇄 또는/및 항체 경쇄 각각은 KalbTG에 대한 하나 이상의 첫 번째 인식 부위를 포함하거나, 또는
- [0069] (ii) 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄 각각 2개의 쌍을 포함하고, 여기서 항체 중쇄 또는/및 항체 경쇄 중 하나는 KalbTG에 대한 하나 이상의 첫 번째 인식 부위를 포함하거나, 또는
- [0070] (iii) 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄 및 하나의 추가 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 하나의 쌍을 포함하고, 여기서 항체 중쇄 또는/및 항체 중쇄 Fc-영역 단편 또는 항체 경쇄는 KalbTG에 대한 하나 이상의 첫 번째 인식 부위를 포함하는, 변형된 항체.
- [0071] 27. 실시형태 25에 있어서, 첫 번째 쌍의 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 두 번째 쌍의 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0072] 28. 실시형태 25에 있어서, 첫 번째 쌍의 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 두 번째 쌍의 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0073] 29. 실시형태 25에 있어서, 첫 번째 쌍의 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 두 번째 쌍의 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를

포함하며, 두 번째 쌍의 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.

- [0074] 30. 실시형태 25에 있어서, 첫 번째 쌍의 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 두 번째 쌍의 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하며, 두 번째 쌍의 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0075] 31. 실시형태 25에 있어서, 첫 번째 쌍의 항체 중쇄는 항체 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 2개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 두 번째 쌍의 항체 경쇄는 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0076] 32. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 두 항체 중쇄 모두 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0077] 33. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 두 항체 중쇄 모두 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0078] 34. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 두 항체 경쇄 모두 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0079] 35. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 두 항체 중쇄 모두 항체 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 2개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0080] 36. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 두 항체 중쇄 모두 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 두 항체 경쇄 모두 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0081] 37. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 두 항체 중쇄 모두 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 두 항체 경쇄 모두 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0082] 38. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 두 항체 중쇄 모두 항체 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 2개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고, 두 항체 경쇄 모두 항체 경쇄의 위치 214(LC214)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체.
- [0083] 39. 실시형태 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 2개의 동일한 항체 중쇄를 포함하는, 변형된 항체.
- [0084] 40. 실시형태 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 2개의 상이한 항체 중쇄를 포함하는, 변형된 항체.
- [0085] 41. 실시형태 40에 있어서, 적어도 이중이량체화를 유도하기 위한 개별 돌연변이로부터 차이가 발생하는 것인, 변형된 항체.
- [0086] 42. 실시형태 1 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 KalbTG에 대한 인식 부위(들) 이외에 다음 돌연변이(Kabat에 따른 넘버링)를 포함하는, 변형된 항체:
  - [0087] a) 두 Fc-영역 폴리펩티드 모두에서 L234A, L235A;
  - [0088] b) 두 Fc-영역 폴리펩티드 모두에서 P329G;
  - [0089] c) 한 Fc-영역 폴리펩티드에서 T366W 및 다른 Fc-영역 폴리펩티드에서 T366S, L368A, Y407V;

- [0090] d) 한 Fc-영역 폴리펩티드에서 S354C 및 다른 Fc-영역 폴리펩티드에서 Y349C;
- [0091] e) a)와 b);
- [0092] f) a)와 b)와 c); 또는
- [0093] g) a)와 b)와 c)와 d).
- [0094] 43. 적어도 하나의 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 변형된 항체 Fc-영역으로서, 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341) 및 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된, 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 첫 번째 인식 부위(들)를 포함하는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0095] 44. 실시형태 43에 있어서, KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위는 개별 항체 사슬의 아미노산 서열 내에 있는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0096] 45. 실시형태 43 내지 44 중 어느 하나에 따라서, 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 C-말단에 있거나 이에 융합된 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위를 추가로 포함하는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0097] 46. 실시형태 43 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 항체 중쇄의 위치 446(HC446) 또는 위치 447(HC447)(Kabat에 따른 넘버링)에 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위를 추가로 포함하는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0098] 47. 실시형태 43 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 위치는 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297) 및 위치 341(HC341)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0099] 48. 실시형태 43 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 위치는 항체 중쇄의 위치 341(HC341), 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0100] 49. 실시형태 43 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 위치는 항체 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체.
- [0101] 50. 실시형태 43 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 Fc-영역은 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341) 및 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 짝수개의 첫 번째 인식 부위(들)를 포함하는, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0102] 51. 실시형태 50에 있어서, 짝수개는 2개, 4개, 6개 또는 8개인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0103] 52. 실시형태 49 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 짝수개는 2개 또는 4개인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0104] 53. 실시형태 43 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 Fc-영역은 항체 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341) 및 위치 401(HC401)(Kabat에 따른 넘버링)을 포함하는 위치의 군으로부터 서로 독립적으로 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 홀수개의 첫 번째 인식 부위(들)를 포함하는, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0105] 54. 실시형태 53에 있어서, 홀수개는 1개, 3개, 5개 또는 7개인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0106] 55. 실시형태 53 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 홀수개는 1개 또는 3개인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0107] 56. 실시형태 43 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0108] 57. 실시형태 43 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는

것인, 변형된 항체 Fc-영역.

- [0109] 58. 실시형태 43 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 항체 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 2개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0110] 59. 실시형태 43 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 Fc-영역은 실시형태 43 내지 58 중 어느 하나에 따른 2개의 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0111] 60. 실시형태 43 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 Fc-영역은 2개의 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 하나의 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하고 다른 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0112] 61. 실시형태 43 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 Fc-영역은 2개의 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 둘 모두 항체 중쇄의 위치 297(HC297)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0113] 62. 실시형태 43 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 Fc-영역은 2개의 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 둘 모두 항체 중쇄의 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 1개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0114] 63. 실시형태 43 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 Fc-영역은 2개의 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 둘 모두 항체 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(Kabat에 따른 넘버링)에 있거나 그 뒤에 삽입된 KalbTG에 대한 2개의 첫 번째 인식 부위를 포함하는, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0115] 64. 실시형태 43 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 Fc-영역은 2개의 동일한 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0116] 65. 실시형태 43 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 Fc-영역은 2개의 상이한 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0117] 66. 실시형태 65에 있어서, 적어도 이중이량체화를 유도하기 위한 개별 돌연변이로부터 차이가 발생하는 것인, 변형된 항체 Fc-영역.
- [0118] 67. 실시형태 43 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 KalbTG에 대한 인식 부위(들) 이외에 다음 돌연변이(Kabat에 따른 넘버링)를 포함하는 것인, 변형된 항체 Fc-영역:
  - [0119] a) 두 Fc-영역 폴리펩티드 모두에서 L234A, L235A;
  - [0120] b) 두 Fc-영역 폴리펩티드 모두에서 P329G;
  - [0121] c) 한 Fc-영역 폴리펩티드에서 T366W 및 다른 Fc-영역 폴리펩티드에서 T366S, L368A, Y407V;
  - [0122] d) 한 Fc-영역 폴리펩티드에서 S354C 및 다른 Fc-영역 폴리펩티드에서 Y349C;
  - [0123] e) a)와 b);
  - [0124] f) a)와 b)와 c); 또는
  - [0125] g) a)와 b)와 c)와 d).
- [0126] 68. 실시형태 43 내지 67 중 어느 하나에 따른 변형된 항체 Fc-영역을 포함하는 변형된 항체.
- [0127] 69. 실시형태 1 내지 68 중 어느 하나에 따른 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역으로서, KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위(들)는 Gln 함유 5개 아미노산 길이 모티프를 포함하거나 갖는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.

- [0128] 70. 실시형태 1 내지 69 중 어느 하나에 따른 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역으로서, KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위(들)는 아미노산 서열 RYGQR(서열 번호: 11), RWRQR(서열 번호: 12), YRQRT(서열 번호: 13), IRQRQ(서열 번호: 14), FRYRQ(서열 번호: 15), YRYRQ(서열 번호: 17) 및 RVRQR(서열 번호: 18)을 포함하는 첫 번째 인식 부위의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0129] 71. 실시형태 1 내지 70 중 어느 하나에 따른 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역으로서, KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위(들)는 아미노산 서열 YRYRQ(서열 번호: 17) 또는 RVRQR(서열 번호: 18)로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0130] 72. 실시형태 1 내지 71 중 어느 하나에 따른 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역으로서, KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위(들)는 YRYRQ(서열 번호: 17)인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0131] 73. 실시형태 1 내지 72 중 어느 하나에 따른 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역으로서, KalbTG에 대한 인식 부위(들)는 위치 뒤에 삽입되는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0132] 74. 실시형태 1 내지 73 중 어느 하나에 따른 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역으로서, KalbTG에 대한 인식 부위(들)는 2개의 유연한 펩티드 링커 사이에 위치되어 있는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0133] 75. 실시형태 74에 있어서, 각 펩티드 링커는 서로 독립적으로 1개 내지 20개 아미노산을 포함하는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0134] 76. 실시형태 74 내지 75 중 어느 하나에 있어서, 각 펩티드 링커는 서로 독립적으로 1개 내지 10개 아미노산을 포함하는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0135] 77. 실시형태 74 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 각 펩티드 링커는 서로 독립적으로 1개 내지 5개 아미노산을 포함하는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0136] 78. 실시형태 74 내지 77 중 어느 하나에 있어서, 상기 펩티드 링커는 Q-태그, KalbTG, 항체의 접힘 및 변형된 항체에 부착되는 페이로드의 기능을 본질적으로 간섭하지 않는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0137] 79. 실시형태 74 내지 79 중 어느 하나에 있어서, 펩티드 링커는 주로 또는 배타적으로 Gly 및/또는 Ser 및/또는 Ala 및/또는 Thr 및/또는 Glu 아미노산 잔기를 포함하는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0138] 80. 실시형태 74 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 펩티드 링커는 GGGP(서열 번호: 20), ESGS(서열 번호: 21), APAP(서열 번호: 22), KESGSVSSEQLAQRSLD(서열 번호: 23) 및 EGKSSGSGSESKST(서열 번호: 24)를 포함하는 펩티드 링커의 군으로부터 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0139] 81. 실시형태 74 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 펩티드 링커는 서로 독립적으로 주로 또는 완전히 Gly 및 Ser 로 구성되는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0140] 82. 실시형태 74 내지 81 중 어느 하나에 있어서, 펩티드 링커는  $(Gly_mSer)_n$ 이고, 여기서  $m = 1, 2, 3$  또는 4이고,  $n = 1, 2, 3, 4$  또는 5이며,  $m$ 과  $n$ 은 서로 독립적으로 선택되는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0141] 83. 실시형태 82에 있어서,  $m = 3$ 이고  $n = 1$ 인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0142] 84. 실시형태 74 내지 83 중 어느 하나에 있어서, 펩티드 링커는 각각 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Ser( $n=1, 2, 3, 4, 5$ ; 서열 번호: 19)을 갖는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 반복 단위를 포함하는 것인, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0143] 85. 실시형태 84에 있어서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Ser( $n=1$ ; 서열 번호 19)를 갖는 하나의 반복 단위를 포함하는, 변형된 항체 또는 변형된 항체 Fc-영역.
- [0144] 86. 실시형태 1 내지 85 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 Fab-단편을 포함하는, 변형된 항체.
- [0145] 87. 실시형태 1 내지 86 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 동족 항체 경쇄-중쇄 쌍을 형성하는 하나의 전장 항체 경쇄 및 하나의 전장 항체 중쇄, 그리고 전장 항체 중쇄의 Fc-영역과 연관된 힌지 영역을 포함하는 하나의 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드 단편을 포함하는 일가, 단일특이적 항체인, 변형된 항체.
- [0146] 88. 실시형태 1 내지 87 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 인간 Ig 중쇄 불변 영역을 기반으로 하는, 변형

된 항체.

- [0147] 89. 실시형태 1 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 또는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역을 기반으로 하는, 변형된 항체.
- [0148] 90. 실시형태 1 내지 89 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 인간 IgG1 중쇄 폴리펩티드를 기반으로 하며 서열 번호: 1 또는 2에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 또는 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 갖는, 변형된 항체.
- [0149] 91. 실시형태 1 내지 89 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 인간 IgG2 중쇄 폴리펩티드를 기반으로 하며 서열 번호: 3에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 또는 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 갖는, 변형된 항체.
- [0150] 92. 실시형태 1 내지 89 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 인간 IgG3 중쇄 폴리펩티드를 기반으로 하며 서열 번호: 4에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 또는 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 갖는, 변형된 항체.
- [0151] 93. 실시형태 1 내지 89 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 인간 IgG4 중쇄 폴리펩티드를 기반으로 하며 서열 번호: 5에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 또는 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 갖는, 변형된 항체.
- [0152] 94. 실시형태 1 내지 89 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하고:
- [0153] A<sup>↓</sup>STKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS<sup>↓</sup>GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<sup>↓</sup>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG<sup>↓</sup>QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD<sup>↓</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<sup>↓↓</sup>,
- [0154] 여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 또는 그 뒤에는 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되고,
- [0155] 여기서 "<sup>↓↓</sup>"에 의해 식별된 위치 뒤에는 Ka1bTG에 대한 추가의 첫 번째 인식 부위가 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나의 위치에 삽입되는 경우에만 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.
- [0156] 95. 실시형태 1 내지 89 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하고:
- [0157] A<sup>↓</sup>STKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS<sup>↓</sup>GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<sup>↓</sup>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG<sup>↓</sup>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD<sup>↓</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<sup>↓↓</sup>,
- [0158] 여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 또는 그 뒤에는 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되고,
- [0159] 여기서 "<sup>↓↓</sup>"에 의해 식별된 위치 뒤에는 Ka1bTG에 대한 추가의 첫 번째 인식 부위가 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나의 위치에 삽입되는 경우에만 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.
- [0160] 96. 실시형태 1 내지 89 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 불변 영역을 포함하고:
- [0161] A<sup>↓</sup>STKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS<sup>↓</sup>GLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVKDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN<sup>↓</sup>STFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK



이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 또는 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 갖는, 변형된 항체.

[0178] 105. 실시형태 1 내지 104 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 항체 경쇄 불변 영역을 포함하고:

[0179] RTV<sup>↓</sup>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPRE<sup>↓</sup>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<sup>↓</sup>,

[0180] 여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 또는 그 뒤에는 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.

[0181] 106. 실시형태 1 내지 104 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 항체 경쇄 불변 영역을 포함하고:

[0182] QPK<sup>↓</sup>AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA<sup>↓</sup>VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC<sup>↓</sup>S

[0183] 여기서 "<sup>↓</sup>"에 의해 식별된 위치 중 하나 이상의 위치 또는 그 뒤에는 Ka1bTG에 대한 첫 번째 인식 부위가 삽입되는, 변형된 항체.

[0184] 107. 실시형태 1 내지 106 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 서열 번호: 10에 기재된 아미노산 서열을 갖는 항체 경쇄 불변 영역을 포함하는, 변형된 항체.

[0185] 108. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 (i) 서열 번호: 6 또는 7 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 비변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 또는 (ii) 서열 번호: 1 내지 5의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 비변형된 항체 중쇄 불변 영역을 포함하는, 변형된 항체.

[0186] 109. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:

[0187] a) 서열 번호: 6 또는 7 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 비변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및

[0188] b) 서열 번호: 1 내지 5의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 중쇄 불변 영역으로서, Ka1bTG에 대한 적어도 하나의 인식 부위가 삽입된 변형된 항체 중쇄 불변 영역.

[0189] 110. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:

[0190] a) 서열 번호: 6 또는 7 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인으로서, Ka1bTG에 대한 적어도 하나의 인식 부위가 삽입된 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및

[0191] b) 서열 번호: 1 내지 5의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 비변형된 항체 중쇄 불변 영역.

[0192] 111. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:

[0193] a) 서열 번호: 6 또는 7의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 항체 경쇄 불변 도메인; 및

[0194] b) 서열 번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 중쇄 불변 영역.

[0195] 112. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:

[0196] a) 서열 번호: 6 또는 7의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 항체 경쇄 불변 도메인; 및

- [0197] b) 서열 번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 중쇄 불변 영역.
- [0198] 113. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0199] a) 서열 번호: 6 또는 7의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0200] b) 서열 번호: 34의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 중쇄 불변 영역.
- [0201] 114. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0202] a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0203] b) 서열 번호: 1 내지 5의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 항체 중쇄 불변 영역.
- [0204] 115. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0205] a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0206] b) 서열 번호: 1 내지 5의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 항체 중쇄 불변 영역.
- [0207] 116. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0208] a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0209] b) 서열 번호: 1 내지 5의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 항체 중쇄 불변 영역.
- [0210] 117. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0211] a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0212] b) 서열 번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 중쇄 불변 영역.
- [0213] 118. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0214] a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0215] b) 서열 번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 중쇄 불변 영역.
- [0216] 119. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0217] a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0218] b) 서열 번호: 34의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 항체 중쇄 불변 영역.
- [0219] 120. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0220] a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0221] b) 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 항체 중쇄 불변 영역.

- [0222] 121. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0223] a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0224] b) 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 항체 중쇄 불변 영역.
- [0225] 122. 실시형태 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 다음을 포함하는, 변형된 항체:
- [0226] a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 항체 경쇄 불변 도메인; 및
- [0227] b) 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 항체 중쇄 불변 영역.
- [0228] 123. 실시형태 1 내지 122 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 항원에 결합하는, 변형된 항체.
- [0229] 124. 실시형태 1 내지 123 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 혈액 뇌 장벽의 교차를 가능하게 하는 구조에 특이적으로 결합하는, 변형된 항체.
- [0230] 125. 실시형태 1 내지 124 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 수용체 매개 세포내이입을 유도하는 수용체에 특이적으로 결합하는, 변형된 항체.
- [0231] 126. 실시형태 1 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 인간 트랜스페린 수용체 1(TfR1), 인간 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-1R), 인간 저밀도 지질단백질 수용체 관련 단백질 1(LRP1) 및 인간 저밀도 지질단백질 수용체 관련 단백질 8(LRP8)로 구성된 항원 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하는, 변형된 항체.
- [0232] 127. 실시형태 1 내지 126 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 인간 트랜스페린 수용체 1에 특이적으로 결합하는, 변형된 항체.
- [0233] 128. 실시형태 1 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 변형된 항체는 1개 또는 2개의 항원에 특이적으로 결합하고, 상기 1개 또는 2개의 항원은 특정 세포 유형에 특이적인, 변형된 항체.
- [0234] 129. 실시형태 128에 있어서, 항원 중 하나 또는 둘 모두가 종양 세포에 특이적인 종양 마커인, 변형된 항체.
- [0235] 130. 실시형태 128 내지 129 중 어느 하나에 있어서, 세포 유형은 유방암 세포인, 변형된 항체.
- [0236] 131. 공유 접합체로서,
- [0237] (i) 실시형태 1 내지 130 중 어느 하나에 따른 변형된 항체, 및
- [0238] (ii) (i)의 변형된 항체의 KalbTG에 대한 하나 이상의 첫 번째 인식 부위(들)에 공유적으로 접합된 하나 이상의 비항체 도메인(들)을 포함하고,
- [0239] 여기서 비항체 도메인은 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위를 포함하는, 공유 접합체.
- [0240] 132. 실시형태 131에 있어서, 비항체 도메인은 치료적 실체 및 선택적으로 두 번째 링커를 포함하는 치료 모이 어티인, 공유 접합체.
- [0241] 133. 실시형태 131 내지 132 중 어느 하나에 있어서, 비항체 도메인은 다음을 포함하는 것인, 공유 접합체:
- [0242] (i) 치료적 실체,
- [0243] (ii) 변형된 항체에 존재하는 첫 번째 인식 부위에 상보적인 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위, 즉 변형된 항체가 Q-태그를 포함하는 경우 비항체 도메인은 K-태그를 포함하거나 그 반대이고, 특히 제2 인식 부위는 Lys 함유 모티프, 특히 서열 RYESK(서열 번호: 16)(K-태그)를 포함하거나 갖고,
- [0244] (iii) 선택적으로 치료적 실체와 두 번째 인식 부위 사이의 두 번째 링커.
- [0245] 134. 실시형태 131 내지 133 중 어느 하나에 있어서, KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위는 펩티드 서열 RYESK(서열 번호: 16)에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 K-태그인, 공유 접합체.
- [0246] 135. 실시형태 131 내지 134 중 어느 하나에 있어서, 치료적 실체는 핵산인, 공유 접합체.
- [0247] 136. 실시형태 131 내지 135 중 어느 하나에 있어서, 치료적 실체는 DNA, RNA 또는 이들의 혼합물인, 공유 접합체.

- [0248] 137. 실시형태 131 내지 136 중 어느 하나에 있어서, 치료적 실체는 비코딩 RNA 분자인, 공유 접합체.
- [0249] 138. 실시형태 131 내지 137 중 어느 하나에 있어서, 치료적 실체는 15-24개 염기쌍 길이의 비코딩 RNA 분자인, 공유 접합체.
- [0250] 139. 실시형태 131 내지 138 중 어느 하나에 있어서, 치료적 실체는 하나 이상의 잠금 핵산(LNA) 잔기를 포함하는 것인, 공유 접합체.
- [0251] 140. 실시형태 131 내지 139 중 어느 하나에 있어서, 치료적 실체는 DNA 또는 RNA 잔기와 혼합된 LNA 올리고뉴클레오티드인, 공유 접합체.
- [0252] 141. 실시형태 131 내지 140 중 어느 하나에 있어서, 치료적 실체는 siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인, 공유 접합체.
- [0253] 142. 실시형태 131 내지 141 중 어느 하나에 있어서, 치료적 실체는 LNA 뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 독소, 소형 유기 분자 및 면역 조절제를 포함하는 군으로부터 선택되는 것인, 공유 접합체.
- [0254] 143. 실시형태 142에 있어서, 소형 유기 분자는 2,500 달톤 이하의 분자량을 갖는 것인, 공유 접합체.
- [0255] 144. 실시형태 142 내지 143 중 어느 하나에 있어서, 소형 유기 분자는 1,000 달톤 이하의 분자량을 갖는 것인, 공유 접합체.
- [0256] 145. 실시형태 131 내지 144 중 어느 하나에 있어서, 두 번째 링커는 알킬 링커, 폴리에틸렌 링커, 펩티드 링커 또는 이들의 혼합물인, 공유 접합체.
- [0257] 146. 실시형태 131 내지 145 중 어느 하나에 있어서, 두 번째 링커는 에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 것인, 공유 접합체.
- [0258] 147. 실시형태 131 내지 146 중 어느 하나에 있어서, 두 번째 링커는 약 2개 내지 50개의 에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 것인, 공유 접합체.
- [0259] 148. 실시형태 131 내지 147 중 어느 하나에 있어서, 두 번째 링커는 지방족 탄소 사슬을 포함하는 것인, 공유 접합체.
- [0260] 149. 실시형태 131 내지 148 중 어느 하나에 있어서, 두 번째 링커는 치환되지 않거나 치환된 C<sub>1-6</sub> 알킬을 포함할 수 있고, 치환된 C<sub>1-6</sub> 알킬의 경우 치환기는 알콕시, 아실, 아실옥시, 알콕시카르보닐, 카르보닐알콕시, 아실아미노, 아미노, 아미노아실, 아미노카르보닐아미노, 아미노카르보닐옥시, 시클로알킬, 시클로알케닐, 시아노, 아지도, 할로, 히드록실, 니트로, 카르복실, 티올, 티오알킬, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로시클릴, 아미노술폰, 술폰, 아미노, 술폰 및 옥소로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 공유 접합체.
- [0261] 150. 실시형태 131 내지 145 중 어느 하나에 있어서, 두 번째 링커는 펩티드 링커인, 공유 접합체.
- [0262] 151. 실시형태 131 내지 150 중 어느 하나에 있어서, 접합체는 실시형태 1 내지 130 중 어느 하나에 따른 변형된 항체 및 하나 이상의 치료 핵산을 포함하고, 여기서 각각의 치료 핵산은 이소펩티드 결합을 통해 단일 Q-태그에 연결되고, 선택적으로 두 번째 링커를 거쳐 K-태그의 말단 잔기에 아미드 결합되는, 공유 접합체.
- [0263] 152. 실시형태 151에 있어서, 하나 이상의 치료 핵산(들)은 안티센스 올리고뉴클레오티드(들)인, 공유 접합체.
- [0264] 153. 실시형태 151 내지 152 중 어느 하나에 있어서, 두 번째 링커는 하나 이상의 에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 공유 접합체.
- [0265] 154. 실시형태 131 내지 153 중 어느 하나에 있어서, 비항체 도메인은 뇌 질환을 치료하거나 예방하기 위한 RNA 또는 LNA 및 선택적으로 PEG 링커를 포함하는 치료적 실체를 포함하는, 공유 접합체.
- [0266] 155. 실시형태 154에 있어서, 뇌 질환은 파킨슨병 또는 알츠하이머병인, 공유 접합체.
- [0267] 156. 실시형태 1 내지 130 중 어느 하나에 따른 변형된 항체를 치료적 실체에 공유적으로 접합하는 방법으로서, 상기 방법은 다음 단계를 포함하는, 방법:
  - [0268] a) 실시형태 1 내지 130 중 어느 하나에 따른 변형된 항체를 제공하는 단계,
  - [0269] b) 비항체 도메인을 제공하되, 상기 비항체 도메인이 다음을 포함하는 단계: (i) 치료적 실체, (ii) (i)에 제공

된 변형된 항체에 존재하는 첫 번째 인식 부위에 상보적인 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위, (iii) 선택적으로 치료적 실체와 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위 사이의 두 번째 링커; 그리고

- [0270] c) a)의 변형된 항체와 b)의 비항체 도메인을 KalbTG 또는 이의 기능적으로 활성 변이체 또는 단편의 존재하에 인큐베이션하여 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위와 두 번째 인식 부위 사이에 이소펩티드 결합을 형성하고,
- [0271] 이로써 변형된 항체를 치료적 실체에 접합하는 단계.
- [0272] 157. 실시형태 156에 있어서, 단계 c)는 KalbTG의 활성화에 도움이 되는 조건하에서 수행되는 것인, 방법.
- [0273] 158. 실시형태 156 내지 157 중 어느 하나에 있어서, KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위는 아미노산 서열 YRYRQ (서열 번호 17)를 갖는 것인, 방법.
- [0274] 159. 실시형태 156 내지 158 중 어느 하나에 있어서, KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위는 RYESK(서열 번호: 16)의 아미노산 서열을 갖는 것인, 방법.
- [0275] 160. 실시형태 1 내지 159 중 어느 하나에 따른 변형된 항체, 변형된 Fc-영역, 공유 접합체 및 방법으로서, KalbTG는 다음 아미노산 서열(3문자 코드)을 포함하는, 변형된 항체, 변형된 Fc-영역, 공유 접합체 및 방법:
- [0276] Met His Lys Trp Phe Leu Arg Ala Ala Val Val Ala Ala Val Gly Phe Gly Leu Pro Thr Leu Ile Ala Thr Thr Ala Gln Ala Ala Val Ala Ala Pro Thr Pro Arg Ala Pro Leu Ala Pro Pro Leu Ala Glu Asp Arg Ser Tyr Arg Thr Trp Arg Val Glu Asp Tyr Val Glu Ala Trp Glu Arg Tyr His Gly Arg Glu Met Thr Glu Asp Glu Arg Glu Asn Leu Ala Arg Gly Cys Ile Gly Val Thr Val Val Asn Leu Asn Arg Glu Asp Leu Ser Asn Pro Pro Leu Asn Leu Ser Phe Gly Ser Leu Arg Thr Ala Glu Ala Val Gln Ala Ala Leu Asn Lys Ile Val Asp Thr His Pro Ser Pro Ala Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Lys Asp Pro Ile Leu Lys Arg Leu Lys Asn Val Val Lys Ala Leu Pro Ser Trp Ile Asp Ser Ala Lys Leu Lys Ala Ser Ile Phe Ser Lys Arg Phe Tyr Ser Trp Gln Asn Pro Asp Trp Ser Glu Glu Arg Ala His Thr Thr Tyr Arg Pro Asp Arg Glu Thr Asp Gln Val Asp Met Ser Thr Tyr Arg Tyr Arg Ala Arg Pro Gly Tyr Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Gln Asp Thr Asn Thr Trp Trp His Ala Asn His Glu Glu Pro Arg Met Val Val Tyr Gln Ser Thr Leu Arg His Tyr Ser Arg Pro Leu Gln Asp Phe Asp Glu Gln Val Phe Thr Val Ala Phe Ala Lys Lys Asp(서열 번호: 31).
- [0277] 161. 실시형태 131 내지 155 및 160 중 어느 하나에 따른 공유 접합체를 포함하는 약학 조성물.
- [0278] 162. 약제로서 이용하기 위한, 실시형태 131 내지 155 및 160 중 어느 하나에 따르거나 실시형태 156 내지 160 중 어느 하나의 방법에 따라 생산된 공유 접합체.
- [0279] 163. 실시형태 162에 따른 용도로서, 신경 질환, 뇌 질환 또는 암을 치료하기 위한, 용도.
- [0280] 164. 실시형태 162 내지 163에 따른 용도로서, 신경 질환은 신경병증 장애, 신경퇴행성 질환, 암, 안구 질환 장애, 발작 장애, 리소좀 축적병, 아밀로이드증, 바이러스성 또는 미생물성 질병, 허혈, 행동 장애, CNS 염증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 뇌 전이가 있는 CD20 양성 암, 뇌 전이가 있는 HER2 양성 암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 용도.
- [0281] 165. 실시형태 162 내지 164 중 어느 하나에 따른 용도로서, 신경 질환은 신경병증 장애, 신경퇴행성 질환, 암, 안구 질환 장애, 발작 장애, 리소좀 축적병, 아밀로이드증, 바이러스성 또는 미생물성 질병, 허혈, 행동 장애 및 CNS 염증으로부터 선택되는 것인, 용도.
- [0282] 166. 실시형태 162 내지 165 중 어느 하나에 있어서, 알츠하이머병, 파킨슨병 또는 유방암을 치료하기 위한, 용도.
- [0283] 167. 실시형태 1 내지 130 중 어느 하나에 따른 변형된 항체를 인코딩하는 핵산 또는 핵산의 조성물.
- [0284] 168. 실시형태 167에 따른 핵산 또는 핵산 조성물을 포함하는 세포.
- [0285] 169. 실시형태 1 내지 130 중 어느 하나에 따른 변형된 항체를 생산하기 위한 방법으로서, 다음 단계를 포함하는, 방법:
- [0286] - 실시형태 168에 따른 세포를 배양하는 단계,
- [0287] - 세포 또는/및 배양 배지로부터 변형된 항체를 회수하여 실시형태 1 내지 130 중 어느 하나에 따른 변형된 항체를 생산하는 단계.

[0288] 170. 실시형태 169에 있어서, 세포는 포유동물 세포인, 방법.

[0289] 171. 실시형태 169 내지 170 중 어느 하나에 있어서, 세포는 CHO 세포인, 방법.

[0290] **본원 발명의 특정 실시형태에 대한 상세한 설명**

[0291] 본원 발명은 적어도 부분적으로 Q-태그가 페이로드에 대한 접합에 대한 부수적 적합성과 함께 IgG1 항체와 같은 항체 내의 모든 부위에 통합될 수는 없다는 발견에 기초한다. 항체 불변 도메인 영역이 KalbTG를 통한 접합에 대해 스크리닝되었다. 이러한 맥락에서, KalbTG Q-태그가 인간 IgG1 중쇄와 경쇄 불변 영역 내의 표면 노출된 도메인 간 및 도메인 내 유연성 루프뿐만 아니라 각각의 중쇄와 경쇄의 C-말단에 삽입되었다. 전체적으로, IgG1 중쇄와 경쇄 내 9개의 개별 부위가 검사되었다. KalbTG Q-태그 모티프는 아미노산 서열 GGGs-YRYRQ-GGGs(서열 번호: 25)로서 두 개의 유연한 링커 사이에/내부에 삽입되었다. 연구 결과의 일반적인 적용가능성을 보여주기 위해, 추가적으로, 결합 특이성이 다른 5개의 항체(mAb-1 내지 mAb-5)가 검사되었다. 단일 KalbTG 인식 부위 삽입을 갖는 이들 분자는 발현 속도에 대해 평가되었다. 결과는 실시예 및 표 1에 제시되어 있다.

[0292] **표 1: 다양한 위치에 Q-태그가 삽입된 다양한 항체의 발현 수율.**

**표 1**

수율 대규모 [mg] → Q 태그 위치 ↓	mAb-1 (CD163)		mAb-2 (HER2)		mAb-3 (LeY)	
	24mL	1L	24mL	1L	24mL	1L
야생형, 즉 Q-태그 없음(참조)	4.7	196	4.3	179	0.4	17
HC118	7.5	313	2.5	104	1.0	42
HC177	7.3	304	2.6	106	1.5	63
HC297	7.7	321	2.9	121	1.6	67
HC341	6.4	267	3.4	142	1.7	71
HC401	4.5	188	2.7	113	1.0	42
HC446	4.3	179	2.8	117	1.3	54
LC110	1.7	70.8	3.0	125	0.4	17
LC143	0.7	29.2	1.1	46	0.4	17
LC214	3.3	138	2.5	104	0.5	21

[0293]

[0294] 삽입 부위에 따라 발현 역가가 변경, 즉 감소되거나 심지어 개선되었음을 알 수 있는데, 이는 전혀 예상치 못한 일이다.

[0295] 이들 변형된 항체는 KalbTG에 의한 효소적 변형을 위한 Q-태그의 접합 및 접근성에 대해 추가로 검사되었다. 두 가지 다른 페이로드, 즉 소분자(형광 염료)와 소형 단일 가닥 핵산이 검사되었다. 항체가 대칭인 경우, 즉 2개의 동일한 중쇄와 경쇄 쌍을 포함하는 경우, 분자당 2개의 Q-태그가 존재했다. 항체가 비대칭인 경우, 즉 두 개의 서로 다른 중쇄와 경쇄 쌍을 포함하는 경우, 분자당 단일 Q-태그가 존재했다. 따라서, 대칭 항체의 경우 100% 접합 효율에서 2의 약물 대 항체 비율(DAR, 즉 항체 분자당 페이로드 분자의 수)이 예상되었고 비대칭 항체의 경우 100% 접합 효율에서 1의 DAR이 예상되었다. mAb-5의 경우 형광 염료에 대한 결과가 표 2에 나타나 있다.

[0296] **표 2: 다양한 위치에 Q-태그가 있는 항체 mAb-5에 대한 형광 염료의 접합 효율**

표 2

Q 태그 위치 ↓	mAb-5 (mTfR) DAR(HIC)
HC118	1.8
HC177	1.8
HC297	1.7
HC341	1.8
HC401	2.0
LC110	1.4
LC143	1.3
LC214	1.5

[0297]

[0298]

mAb-1 및 2의 경우 15개 뉴클레오티드 길이, mAb-4의 경우 20개 뉴클레오티드 길이의 단일 가닥 핵산에 대한 결과가 표 3에 나타나 있다(HIC 및 UV-vis로 결정).

[0299]

표 3: 다양한 위치에 Q-태그가 있는 다양한 항체에 대한 15개 또는 20개 뉴클레오티드로 구성된 핵산의 접합 효율

표 3

Q 태그 위치 ↓	mAb-1 (CD163)	mAb-2 (HER2)		mAb-4 (TfR)
	(HIC)	(HIC)	(UV-vis)	(HIC)
HC118	1.5	1.9	1.8	n.d.
HC177	2.0	1.9	1.8	n.d.
HC297 비대칭 대칭	n.d. 2.0	n.d. 1.9	n.d. 1.7	0.9 1.9
HC341	2.0	1.8	1.8	n.d.
HC401	1.9	1.8	1.7	n.d.
HC446 비대칭 대칭	n.d. 2.0	n.d. 1.9	n.d. 1.8	0.9 1.8
LC110	2.0	1.8	1.7	n.d.
LC143	1.9	1.9	1.7	n.d.
LC214 비대칭 대칭	n.d. 2.0	n.d. 1.8	n.d. 1.7	1.0 n.d.

[0300]

[0301]

n.d. = 결정되지 않음

[0302]

Mab-1과 mAb-2는 단일 단계 방법으로 접합되었다; mAb-4는 2-단계 방법으로 접합되었다(클릭 화학을 이용하여 먼저 K-태그에 접합한 다음 K-태그를 핵산에 접합). 이에 따라 본원 발명에 따른 항체를 이용하는 본원 발명에 따른 방법의 일반적인 적용가능성이 나타난다, 즉 이 방법은 페이로드를 K-태그에 접합(즉 직접적으로 또는 순차적으로)하는 데 이용되는 기술뿐만 아니라 항체의 결합 특이성에도 무관하다.

[0303]

예를 들어 mAb-2의 경우 5개의 서로 다른 Q-태그인 RYGQR(서열 번호: 11), RWRQR(서열 번호: 12), YRQRT(서열

번호: 13), IRQRQ(두 Q 모두 변형될 수 있음; 서열 번호: 14) 및 FRYRQ(서열 번호: 15)가 각각 3개의 서로 다른 위치, 즉 HC297, HC446 및 LC143에 도입되었다. 발현 수율(1L, µg/mL) 및 접합(DAR; HIC/UV-vis)에 대한 결과는 표 4에 나타나 있다.

[0304] 표 4: 다양한 Q-태그를 갖는 변형된 항체의 발현 수율 및 접합 효율

표 4

Q-태그 위치 → Q-태그 서열 ↓	HC297		HC446		LC143	
	수율	접합 효율	수율	접합 효율	수율	접합 효율
RYGQR (서열 번호: 11)	90	1.6/1.5	144	1.8/1.7	42	0.7/0.6
RWRQR (서열 번호: 12)	136	1.7/1.6	114	1.8/1.7	12.2	1.1/0.8
YRQRT (서열 번호: 13)	102	1.7/1.7	0	n.d.	28	1.8/1.7
IRQRQ (서열 번호: 14)	132	3.1/3.1	124	2.8/2.8	44	2.6/2.2
FRYRQ (서열 번호: 15)	136	1.6/1.7	62	1.5/1.3	22	1.7/1.7

[0305]

[0306] n.d. = 결정되지 않음

[0307] 또한, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 통해 각각 15개 뉴클레오티드와 20개 뉴클레오티드로 구성된 단일 가닥 핵산에 접합된 변형된 항체의 생물물리학적 특성 분석이 이루어졌다. 이는 표 5 및 도 1에 mAb-2(15개 뉴클레오티드)에 대한 예시로 나타나 있다. 친수성 마커의 체류 시간은 9.25분이었고, 소수성 마커의 상대 체류 시간은 25.9분이었다. (mAb-2).

[0308] 표 5: 15개 뉴클레오티드(mAb-2)와 20개 뉴클레오티드(mAb-4)로 구성된 핵산에 접합된 변형된 항체의 체류 시간.

표 5

상대 체류 시간 → Q 태그 위치 ↓	mAb-2 (HER2)		mAb-4 (TfR)	
	접합되지 않음	핵산에 접합	접합되지 않음	핵산에 접합
mAb-2(wt)(참조)	0.246	n.d.	0.023	n.d.
HC118	0.311	0.685	n.d.	n.d.
HC177	0.221	0.647	n.d.	n.d.
HC297 비대칭 대칭	n.d. 0.233	n.d. 0.446	0.023 0.070	0.472 0.670
HC341	0.269	0.566	n.d.	n.d.
HC401	0.247	0.634	n.d.	n.d.
HC446 비대칭 대칭	n.d. 0.215	n.d. 0.745	0.015 0.001	0.845 0.994
LC110	0.402	0.732	n.d.	n.d.
LC143	0.291	0.691	n.d.	n.d.
LC214	0.246	0.501	0.020	0.556

[0309]

[0310] 따라서, 본원 발명자들은 발현 수율에 부정적인 영향을 미치지 않고 효소 접근성을 허용/제공하는, IgG 백본의

길이에 걸쳐 있는 다수의 KalbTG Q-태그 삽입 부위를 성공적으로 식별하였다.

[0311] 따라서 Q-태그의 발현 수율 및 효소적 접근성과 관련하여 적합한 삽입 부위는 경쇄의 위치 110(LC110), 143(LC143), 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 177(HC177), 297(HC297), 341(HC341), 401(HC401)이다 (아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다).

[0312] 또한, 인간 FcRn 유전자도입 생쥐를 이용한 생체내 분석을 통해 각각 1개 또는 2개의 단일 가닥 핵산에 접합된 변형된 항체의 약동학 매개변수가 작성되었다. 이들 결과는 표 6에 나타나 있다.

[0313] 표 6: 항체-핵산 접합체에 대해 결정된 청소율.

표 6

접합 부위	청소 항체 부분 (ml/일/kg) [CV]	청소 ASO 부분 (ml/일/kg) [CV]
없음 - 아생형 참조	23 [4.7%]	-
HC118 - DAR 1	83.2 [11.9%]	241 [7.8%]
HC177 - DAR 1	20.6 [17.4%]	92.1 [14.4%]
HC 295 - DAR 1	10.8 [25.3%]	117 [15.4%]
HC297 - DAR 1	14.4 [15.5%]	85.7 [9.7%]
HC341 - DAR 1	33.9 [3.9%]	231 [7.9%]
HC401 - DAR 1	29.4 [8.2%]	166 [21.8%]
HC446 - DAR 1	46.2 [13.4%]	279 [4.6%]
LC214 - DAR 1	23.9 [4%]	105 [15.4%]
HC297 - DAR 2	28.6 [14.5%]	145 [15.2%]
HC431 - DAR 2	214 [20.3%]	219 [4.8%]
HC446 - DAR 2	152 [29.7%]	190 [14.7%]

[0314]

[0315] 따라서 Q-태그의 PK 특성과 관련하여 바람직한 삽입 부위는 경쇄의 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 177(HC177), 297(HC297)이다(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다).

[0316] 따라서, 첫 번째 양상에서 본원 발명은 중쇄와 경쇄를 포함하는 변형된 항체에 관한 것이며, 여기서 중쇄 및/또는 경쇄는 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)로부터 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albid*a)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나 이상의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다. 따라서, 본원 발명의 변형된 항체에서, KalbTG에 대한 인식 부위는 Ig 중쇄 폴리펩티드의 불변 영역 내부에 위치하고, 즉 어떤 말단에도 위치하지 않고, 및/또는 Ig 경쇄 불변 도메인의 내부에 또는 C-말단에 위치한다. 또한, 본원 발명의 변형된 항체는 중쇄의 위치 446(HC446), 즉 C-말단에 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위를 추가로 포함할 수 있다. KalbTG에 대한 인식 부위를 특정 위치에 삽입한다는 것은 비변형된 서열의 해당 위치에 존재하는 아미노산이 인식 부위로 대체되거나 인식 부위가 바람직하게는 해당 위치 뒤에 추가로 삽입된다는 것을 의미한다.

[0317] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 경쇄의 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된다.

[0318] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 경쇄의 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 341(HC341), 위치 297(HC297), 위치 177(HC177)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된다.

- [0319] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 경쇄의 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 297(HC297), 위치 177(HC177)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된다.
- [0320] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 2개의 동일한 중쇄 또는 중쇄 Fc-영역을 포함한다. 추가 실시형태에서, 이러한 변형된 항체는 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)로부터 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 2개, 4개 또는 그 초과(첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0321] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 2개의 상이한 중쇄를 포함하며, 이에 따라 이중이량체화를 유도하기 위한 각각의 돌연변이로부터 차이가 발생한다. 추가 실시형태에서, 이러한 변형된 항체는 경쇄의 위치 110(LC110), 위치 143(LC143), 위치 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341), 위치 401(HC401)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)로부터 선택된 하나 이상의 동일하거나 상이한 위치에 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 1개, 2개 또는 그 초과(첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0322] 마찬가지로, 본원 발명은 중쇄 Fc-영역을 포함하는 변형된 항체 Fc-영역에 관한 것이며, 여기서 중쇄 Fc-영역은 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297), 위치 341(HC341) 및 위치 401(HC401)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된 위치 중 하나 이상의 위치에 있거나 그 뒤에 삽입된 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나 이상의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다. 따라서, 본원 발명의 변형된 항체 Fc-영역에서, KalbTG에 대한 인식 부위는 Ig 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 불변 영역 내부에 위치한다, 즉 어떤 말단에도 위치하지 않는다. 또한, 본원 발명의 변형된 항체 Fc-영역은 중쇄의 위치 446(HC446), 즉 C-말단에 KalbTG에 대한 첫 번째 인식 부위를 추가로 포함할 수 있다. KalbTG에 대한 인식 부위를 특정 위치에 삽입한다는 것은 비변형된 서열의 해당 위치에 존재하는 아미노산이 인식 부위로 대체되거나 인식 부위가 바람직하게는 해당 위치 뒤에 추가로 삽입된다는 것을 의미한다.
- [0323] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 중쇄의 위치 118(HC118), 위치 177(HC177), 위치 297(HC297) 및 위치 341(HC341)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된다.
- [0324] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 중쇄의 위치 341(HC341), 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)을 포함하는 위치 군으로부터 선택된다.
- [0325] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 위치는 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)을 포함하는 위치의 군으로부터 선택된다.
- [0326] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)에 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0327] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄의 위치 177(HC177)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)에 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.
- [0328] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 적어도 하나의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)에 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함한다.



미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)에 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.

[0337] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 항체 중쇄 및 항체 경쇄의 2개의 (동족) 쌍을 포함하며, 여기서 첫 번째 쌍의 중쇄는 중쇄의 위치 297(HC297) 및 위치 177(HC177)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)에 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 2개의 (첫 번째) 인식 부위(들)를 포함하고 두 번째 쌍의 경쇄는 경쇄의 위치 214(LC214)(아미노산 넘버링은 Kabat의 EU 넘버링 체계를 따른다)에 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 하나의 (첫 번째) 인식 부위를 포함한다.

[0338] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 인식 부위(들)는 위치 바로 뒤에 삽입된다. 특정 실시형태에서, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 인식 부위(들)는 2개의 유연한 펩티드 링커 사이에 삽입된다. 특정 실시형태에서, 쿠즈네리아 알비다(*Kutzneria albida*)로부터의 트랜스글루타미나아제(KalbTG)에 대한 인식 부위(들)는 아미노산 서열 GGGSYRYRQGGGS(서열 번호: 25)를 갖는다.

[0339] 용어 "항체" 및 "Ig"는 본원에서 상호교환적으로 이용된다. 이는 가장 넓은 의미로 이용되며, 예를 들면 결합 특이성과 무관한 단일클론 항체(효원체, 길항제, 중화 항체, 전장 또는 무손상 단일클론 항체 포함), 일가 항체, 예를 들면 하나의 Fab가 결합된 전장 항체), 다가 항체, 즉 이가 또는 사가인 항체, 다중특이적 항체 및 전장 항체의 단편(단, 이들이 위에 설명된 변형 중 적어도 하나를 포함하는 한)을 포함한다.

[0340] 자연 발생 항체는 중쇄 단독(예: 중쇄 단독 VHH 항체) 또는 중쇄와 경쇄(예: 야생형 IgG 항체)의 조립에 의해 생성된다. 각 중쇄는 4개의 도메인: 가변 도메인(VH) 및 3개의 불변 도메인(CH1, CH2, CH3)으로 구성된다. 이들은 유연한 힌지 영역에 의해 연결된다. 경쇄는 가변 도메인(VL)과 불변 도메인(CL)으로 구성된다. 중쇄와 경쇄가 존재하는 경우, 경쇄는 동족 중쇄, 즉 VH 및 CH1 도메인을 포함하는 중쇄의 Fab 단편과 쌍을 이루어 항체의 결합 부위를 형성한다. 연관된 경쇄와 중쇄 Fab 단편은 함께 Fab 단편으로 표시된다. 중쇄 CH2 및 CH3 도메인은 함께 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드로 표시된다. 하나의 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 예를 들면 두 번째 항체 중쇄로부터의 추가적인 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드와 이량체화하여 Fc-영역을 형성한다. Fc-영역은 유연한 힌지 영역을 통해 Fab-단편(들)에 연결된다. 따라서, 특정 실시형태에서, 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드는 CH2 및 CH3 도메인 이외에 힌지 영역의 전부 또는 일부를 추가로 포함한다. 힌지 영역은 2개의 항체 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드를 함께 공유적으로 연결하는 여러 이황화 다리를 포함한다. Fab 단편에서 경쇄와 중쇄 Fab 단편도 하나의 이황화 다리로 연결된다. 그러나 연결성은 IgG 하위부류마다 다르다. 전장 IgG의 전체 구조는 Y자 모양과 유사하며, Fc 영역은 염기를 형성하고 두 Fab 단편은 팔을 형성하고 항원에 결합하는 데 이용 가능하다.

[0341] 가변 도메인 내에는 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 루프가 있다. 이들은 주로 항체와 항원의 직접적인 상호작용을 담당한다. 이들 CDR에서 아미노산 수가 상당히 다양하기 때문에 가변 영역에 대한 여러 가지의 넘버링 체계가 있다. 본원에 이용된 중쇄와 경쇄의 모든 불변 영역과 도메인의 아미노산 위치는 Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)에 기술된 Kabat 넘버링 시스템에 따라 넘버링되고 본원에서 "Kabat에 따른 넘버링"으로 지칭된다. 구체적으로, Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)의 Kabat 넘버링 시스템(647-660 페이지 참조)이 카파와 람다 이소타입의 경쇄 불변 도메인 CL에 이용되고, Kabat EU 인덱스 넘버링 시스템(661-723 페이지 참조)이 불변 중쇄 도메인(CH1, 힌지, CH2 및 CH3)에 이용되며, 이 경우 "Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링"을 참조함으로써 본원에서 더 명확해진다.

[0342] 본원에 이용된 용어 "변형된 항체"는 적어도 하나의 (인공) 내부 Q-태그(원하는 부위에)를 포함하는 본원 발명에 따른 항체 또는 항체 Fc-영역을 의미한다. 변형된 항체에는 합성 항체, 단일클론 항체, 재조합 항체, 다중특이적 항체(이중특이적 항체 포함), 인간화 항체, 낙타화 항체, 키메라 항체, 인트라바디, 항-이디오타입(항-id) 항체, 중쇄 단독 항체 및 이들의 기능적 단편이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. "기능적 단편"이라는 용어는 단편이 유래된 항체의 항원 결합 활성의 일부 또는 전부를 보유하는 온전한 항체의 일부를 의미한다. 항체의 기능적 단편의 무제한적 예에는 Fab-단편, F(ab')-단편, F(ab)2-단편, F(ab')2-단편 등이 포함된다. 특히, 본원 발명에 따른 변형된 항체에는 항체 분자 및 항체 분자의 면역학적 활성 부분, 예를 들면 항원에 결합하는 항원 결합 부위(예를 들면 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR))를 함유하는 항원 결합 도메인 또는 분자(본원 발명에 따른 변형이 존재하는 한)가 포함된다. 본원에 제공된 변형된 항체는 임의의 유형(예를 들면, IgG, IgE, IgM,

IgD, IgA 및 IgY, 특정 실시형태에서 IgG), 임의의 부류(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2, 바람직한 실시형태에서 IgG1), 또는 임의의 하위부류(예를 들면 IgG2a 및 IgG2b)일 수 있다. 항체는 인간화, 키메라 및/또는 친화성 성숙된 것일 뿐만 아니라 다른 종, 예를 들면 생쥐, 토끼 및 양으로부터의 항체일 수 있다.

[0343] 본원 발명에 따르면, 특정 실시형태에서, 변형된 항체는 적어도 하나의 중쇄 및 적어도 하나의 경쇄를 포함한다. 따라서, 특정 실시형태에서 변형된 항체는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 Fab-단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 변형된 항체는 동족 경쇄-중쇄 쌍(하나의 결합 부위 포함)을 형성하는 하나의 (전장) 경쇄와 하나의 (전장) 중쇄 및 (전장) 중쇄의 Fc-영역과 연관된 힌지 영역을 포함하는 하나의 중쇄 Fc-영역 단편을 포함하는 일가, 단일특이적 항체이다.

[0344] 본원 발명에 따르면, 특정 실시형태에서, 변형된 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체, 특히 인간화, 생쥐, 토끼 또는 양 항체를 기반으로 할 수 있다. 예시적이고 적합한 서열이 다음에 제공되는데, 여기서 "X" 주석에서 "X"는 아미노산 잔기/위치를 나타내고 "↓"는 Q-태그 모티프(링커 서열이 있거나 없는)의 삽입 부위를 나타낸다.

[0345] IgG1 하위부류의 인간 중쇄 불변 영역(G1m1.17 - 백인 알로타입): (서열 번호: 1)

A<sup>+</sup>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS<sup>+</sup>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK  
SCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<sup>N</sup>N<sup>+</sup>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<sup>G</sup>G<sup>+</sup>QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV  
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD<sup>+</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP<sup>G</sup>G<sup>+</sup>

[0346]

[0347] IgG1 하위부류의 인간 중쇄 불변 영역(G1m17 - 아프리카계 미국인 알로타입): (서열 번호: 2)

A<sup>+</sup>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS<sup>+</sup>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK  
SCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<sup>N</sup>N<sup>+</sup>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<sup>G</sup>G<sup>+</sup>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD<sup>+</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQ  
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP<sup>G</sup>G<sup>+</sup>

[0348]

[0349] IgG2 하위부류의 인간 중쇄 불변 영역: (서열 번호: 3)

A<sup>+</sup>STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSS<sup>+</sup>GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKTVK  
CCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF<sup>N</sup>N<sup>+</sup>STFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK  
VSNKGLPAPIEKTISKTK<sup>G</sup>G<sup>+</sup>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD<sup>+</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP<sup>G</sup>G<sup>+</sup>

[0350]

[0351] IgG3 하위부류의 인간 중쇄 불변 영역: (서열 번호: 4)

A<sup>+</sup>STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS<sup>+</sup>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVEL  
KTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTP  
PPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF  
KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<sup>+</sup>STFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKISKTKG<sup>+</sup>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSD<sup>+</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIF  
SCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG<sup>+</sup>

[0352]

[0353] IgG4 하위부류의 인간 중쇄 불변 영역: (서열 번호: 5)

A<sup>+</sup>STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSS<sup>+</sup>GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVSPN  
MVPHAHHAQAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE  
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN<sup>+</sup>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
KCKVSNKGLPSSIEKISKAKG<sup>+</sup>QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD<sup>+</sup>GSFFLYSRLTVDKSRWQEG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG<sup>+</sup>

[0354]

[0355] 따라서, 일부 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체의 중쇄 불변 영역은 인간 Ig 중쇄 불변 영역, 예를 들면 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3 또는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역을 기반으로 한다. 특정 실시형태에서, 중쇄 불변 영역은 본원 발명에 따른 적어도 하나의 Q-태그를 포함한다.

[0356] 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체의 기초가 될 수 있는 인간 IgG1 중쇄 폴리펩티드는 서열 번호: 1 또는 2에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 예를 들면 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 및 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 IgG1 항체를 기반으로 하며, 따라서 변형/변이체 IgG1 항체이다. 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체의 기초가 될 수 있는 인간 IgG2 중쇄 폴리펩티드는 서열 번호: 3에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 예를 들면 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 및 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체의 기초가 될 수 있는 인간 IgG3 중쇄 폴리펩티드는 서열 번호: 4에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 예를 들면 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 및 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체의 기초가 될 수 있는 인간 IgG4 중쇄 폴리펩티드는 서열 번호: 5에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 예를 들면 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 및 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0357] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 본원 발명에 따른 삽입된 Kab1TG 인식 부위 이외에 다음의 추가 돌연변이(Kabat에 따른 넘버링)를 포함한다:

[0358] a) 두 Fc-영역 폴리펩티드 모두에서 L234A, L235A;

[0359] b) 두 Fc-영역 폴리펩티드 모두에서 P329G;

[0360] c) 한 Fc-영역 폴리펩티드에서 T366W 및 다른 Fc-영역 폴리펩티드에서 T366S, L368A, Y407V;

[0361] d) 한 Fc-영역 폴리펩티드에서 S354C 및 다른 Fc-영역 폴리펩티드에서 Y349C;

[0362] e) a)와 b);

[0363] f) a)와 b)와 c); 또는

[0364] g) a)와 b)와 c)와 d).

[0365] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 첫 번째 Fc-영역 폴리펩티드에 돌연변이 L234A, L235A, P329G, T366W를 포함하고, 두 번째 Fc-영역 폴리펩티드에 돌연변이 L234A, L235A, P329G, T366S, L368A, Y407V를 포함한다. 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 변형된 항체는 첫 번째 Fc-영역 폴리펩티드에 돌연변이 S354C와 Y349C 중 하나 및 두 번째 Fc-영역 폴리펩티드에 다른 하나를 추가로 포함한다.

[0366] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 인간 중쇄 폴리펩티드를 기반으로 하며 서열 번호: 8 또는 서열 번호: 9 또는 서열 번호: 34에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 예를 들면 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상, 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 갖는다:

[0367] HC177(서열 번호: 34)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGGGSYRYRQGGGSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP  
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT  
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0368]

[0369] 또는

[0370] HC297(서열 번호: 8)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC  
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNGGGSYRYRQGGGSSTYRVVSVLT  
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0371]

[0372] 또는

[0373] HC341(서열 번호: 9)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC  
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKISKAKGGGGSYRYRQGGGSQPREPQVYTLPPSRDEL  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0374]

[0375] 본원 발명에 따르면, 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 변형된 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체, 특히 인간화 항체를 기반으로 하며, 경쇄 불변 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 본원 발명에 따라 변형된 경쇄 불변 도메인에 대한 예시적이고 적합한 서열이 다음에 제공되는데, 여기서 "X" 주석에

서 "X"는 아미노산 잔기/위치를 나타내고 "<sup>+</sup>"는 Q-태그 모티프(링커 서열이 있거나 없는)의 삽입 부위를 나타낸다:

[0376] 인간 카파 경쇄 불변 도메인(서열 번호: 6)

RTV<sup>+</sup>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE<sup>+</sup>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<sup>+</sup>

[0377]

[0378] 인간 람다 경쇄 불변 도메인(서열 번호: 7)

QPK<sup>+</sup>AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA<sup>+</sup>VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC<sup>+</sup>S

[0379]

[0380] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체의 기초가 될 수 있는 인간 경쇄 폴리펩티드는 서열 번호: 6 또는 7에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 예를 들면 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 및 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0381]

[0381] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체의 인간 경쇄 폴리펩티드는 서열 번호: 10에 기재된 아미노산 서열과 75% 이상, 예를 들면 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 및 최대 100% 동일한 불변 영역 아미노산 서열을 갖는다:

[0382]

LC214(서열 번호: 10)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSYRYRQGGGS

[0383]

[0384] 바람직하게는, 비변형된 경쇄 불변 도메인은 서열 번호: 6 또는 7 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 비변형된 중쇄 불변 영역은 서열 번호: 1 내지 5의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0385]

[0385] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 다음을 포함한다:

[0386]

a) 서열 번호: 6 또는 7 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 비변형된 경쇄 불변 도메인; 그리고

[0387]

b) 서열 번호: 1 내지 5의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 변형된 중쇄 불변 영역으로서, KalbTG에 대한 적어도 하나의 인식 부위가 삽입된 변형된 중쇄 불변 영역.

[0388]

[0388] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 다음을 포함한다:

[0389]

a) 서열 번호: 6 또는 7 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 변형된 경쇄 불변 도메인으로서, KalbTG에 대한 적어도 하나의 인식 부위가 삽입된 변형된 경쇄 불변 도메인; 및

[0390]

b) 서열 번호: 1 내지 5의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 비변형된 중쇄 불변 영역.

[0391]

[0391] 또한 바람직하게는, 경쇄 불변 도메인은 서열 번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 또는 중쇄 불변 영역은 서열 번호: 8 또는 9 또는 34의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구

성된다.

- [0392] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 a) 서열 번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 경쇄 불변 도메인; 그리고 b) 서열 번호: 8 또는 9 또는 34의 아미노산 서열과 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%, 특히 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 변형된 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0393] 위에서 상세히 설명한 바와 같이, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 이중특이적 또는 다중특이적 항체일 수 있다. 예시적인 이중특이적 또는 다중특이적 항체는 다음을 포함한다:
- [0394] - 도메인 교환을 갖는 전장 항체:
- [0395] 첫 번째 Fab 단편 및 두 번째 Fab 단편을 포함하는 다중특이적 IgG 항체, 여기서 첫 번째 Fab 단편에서
- [0396] a) CH1 및 CL 도메인만 서로 대체되거나(즉, 첫 번째 Fab 단편의 경쇄가 VL 및 CH1 도메인을 포함하고, 첫 번째 Fab 단편의 중쇄가 VH 및 CL 도메인을 포함하거나);
- [0397] b) VH 및 VL 도메인만 서로 대체되거나(즉, 첫 번째 Fab 단편의 경쇄가 VH 및 CL 도메인을 포함하고, 첫 번째 Fab 단편의 중쇄가 VL 및 CH1 도메인을 포함하거나); 또는
- [0398] c) CH1 및 CL 도메인이 서로 대체되고 VH 및 VL 도메인이 서로 대체되며(즉, 첫 번째 Fab 단편의 경쇄가 VH 및 CH1 도메인을 포함하고 첫 번째 Fab 단편의 중쇄가 VL 및 CL 도메인을 포함하며); 그리고
- [0399] 여기서 두 번째 Fab 단편은 VL 및 CL 도메인을 포함하는 경쇄, 및 VH 및 CH1 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하고;
- [0400] 도메인 교환을 갖는 전장 항체는 CH3 도메인을 포함하는 첫 번째 중쇄 및 CH3 도메인을 포함하는 두 번째 중쇄를 포함할 수 있으며, 여기서 두 CH3 도메인 모두 첫 번째 중쇄 및 변형된 두 번째 중쇄의 이중이량체화를 지원하기 위해 각각의 아미노산 치환에 의해 상보적인 방식으로 조작되고;
- [0401] - 도메인 교환 및 추가의 중쇄 C-말단 결합 부위를 갖는 전장 항체:
- [0402] 다음을 포함하는 다중특이적 IgG 항체:
- [0403] a) 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄 각각의 2개의 쌍을 포함하는 하나의 전장 항체(여기서 전장 중쇄 및 전장 경쇄의 각 쌍에 의해 형성된 결합 부위는 첫 번째 항원에 특이적으로 결합함), 그리고
- [0404] b) 하나의 추가 Fab 단편(여기서 추가 Fab 단편은 전장 항체의 하나의 중쇄의 C-말단에 융합되고, 추가 Fab 단편의 결합 부위는 두 번째 항원에 특이적으로 결합함),
- [0405] 여기서 두 번째 항원에 특이적으로 결합하는 추가 Fab 단편은 i) a) 경쇄 가변 도메인(VL)과 중쇄 가변 도메인(VH)이 서로 대체되거나, 또는 b) 경쇄 불변 도메인(CL)과 중쇄 불변 도메인(CH1)이 서로 대체되도록 하는 도메인 교차를 포함하거나, 또는 ii) 단일 사슬 Fab 단편이고;
- [0406] - 외팔 단일 사슬 형식(= 외팔 단일 사슬 항체):
- [0407] 첫 번째 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 첫 번째 결합 부위 및 두 번째 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 두 번째 결합 부위를 포함하는 항체로서, 개별 사슬이 다음과 같은 항체:
- [0408] - 경쇄(가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인)
- [0409] - 조합된 경쇄/중쇄(가변 경쇄 도메인 + 경쇄 불변 도메인 + 펩티드 링커 + 가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 노브 돌연변이가 있는 CH3)
- [0410] - 중쇄(가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홀 돌연변이가 있는 CH3);
- [0411] - 두팔 단일 사슬 형식(= 두팔 단일 사슬 항체):
- [0412] 첫 번째 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 첫 번째 결합 부위 및 두 번째 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 두 번째 결합 부위를 포함하는 항체로서, 개별 사슬이 다음과 같은 항체:
- [0413] - 조합된 경쇄/중쇄 1(가변 경쇄 도메인 + 경쇄 불변 도메인 + 펩티드 링커 + 가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홀 돌연변이가 있는 CH3)

- [0414] - 조합된 경쇄/중쇄 2(가변 경쇄 도메인 + 경쇄 불변 도메인 + 펩티드 링커 + 가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 노브 돌연변이가 있는 CH3);
- [0415] - 공통 경쇄 이중특이적 형식(= 공통 경쇄 이중특이적 항체):
- [0416] 첫 번째 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 첫 번째 결합 부위 및 두 번째 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 두 번째 결합 부위를 포함하는 항체로서, 개별 사슬이 다음과 같은 항체:
  - [0417] - 경쇄(가변 경쇄 도메인 + 경쇄 불변 도메인)
  - [0418] - 중쇄 1(가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홀 돌연변이가 있는 CH3)
  - [0419] - 중쇄 2(가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 노브 돌연변이가 있는 CH3).
- [0420] "특이적으로 결합하는"이라는 용어는 항체가 적어도  $10^{-8}$  mol/l의 해리 상수(= $K_{Diss}$ )로 동족 항원과 상호작용한다는 것을 의미한다. 따라서, "특이적으로 결합하는"이라는 용어는 항체가  $10^{-8}$  mol/l 이하의 해리 상수(= $K_{Diss}$ )로 동족 항원에 결합한다는 것을 의미한다. "특이적으로 결합하지 않는" 또는 "특이적으로 결합하지 않는다"라는 용어는 항체가 많으면  $10^{-7}$  mol/l 이상, 즉, 예를 들면,  $10^{-5}$  mol/l의 해리 상수(= $K_{Diss}$ )로 비관련 항원에 결합한다는 것을 의미한다. 이와 동시에 "특이적으로 결합하지 않는"이라는 특성은 개별 비관련 항원에 대해  $10^{-7}$  mol/l 이하의  $K_{Diss}$ 로 보장된다. 특정 실시형태에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 동족 항원에 대한 반응성과 비관련 항원에 대한 반응성 사이에 적어도 100배의  $K_{Diss}$ -값을 가질 것이다.
- [0421] 항체의 결합 특성, 특히  $K_{Diss}$ 는 BIAcore® 기기로 평가할 수 있다. 이 방법에서는 표면 플라즈몬 공명(SPR)의 변화를 통해 결합 특성을 평가한다. 조사 중인 항체를 고정상(칩이라고 함)에 결합하고 문제의 항원을 이 코팅된 칩에 적용하여 결합을 평가하는 것은 편리하다.
- [0422] 상응하는 중쇄와 경쇄 도메인과 관련하여 본원에 이용된 용어 "서로 대체된"은 앞서 언급된 도메인 교차를 지칭한다. 따라서, CH1 및 CL 도메인이 "서로 대체"되는 경우, 이는 항목 (i)에 언급된 도메인 교차 및 생성된 중쇄와 경쇄 도메인 서열을 지칭한다. 따라서, VH 및 VL이 "서로 대체되는" 경우, 이는 항목 (ii)에 언급된 도메인 교차를 지칭하고; 그리고 CH1 및 CL 도메인이 "서로 대체"되고 VH 및 VL 도메인이 "서로 대체"되는 경우, 이는 항목 (iii)에 언급된 도메인 교차를 지칭한다.
- [0423] 다중특이적 항체는 또한 특정 실시형태에서 상기 항목 (i)에 언급된 CH1 및 CL 도메인의 도메인 교차, 또는 상기 항목 (ii)에 언급된 VH 및 VL 도메인의 도메인 교차, 또는 상기 항목 (iii)에 언급된 VH-CH1 및 VL-VL 도메인의 도메인 교차를 포함하는 적어도 하나의 Fab 단편을 포함한다. 도메인 교차를 갖는 다중특이적 항체의 경우, 동일한 항원(들)에 특이적으로 결합하는 Fab는 동일한 도메인 서열이 되도록 작제된다. 따라서, 도메인 교차를 갖는 하나 초과 Fab가 다중특이적 항체에 포함되어 있는 경우, 상기 Fab(들)은 동일한 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0424] "항원"이라는 용어는 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 미리 정해진 표적을 의미한다. 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐 또는 이의 단편, 또는 기타 자연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 특정 실시형태에서, 항원은 폴리펩티드이다. 다른 실시형태에서, 항원은 치료 관련성을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 항원은 특정 기관이나 세포 유형 또는 질병이 있는 부위와 같은 신체의 특정 부위에 특이적이거나 전달을 허용한다. 이는 수용체나 중앙 마커와 같은 세포 표면상의 특정 구조일 수 있다. 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 항원은 인간 트랜스페린 수용체이다.
- [0425] 바람직하게는, (i) 항체는 중쇄와 경쇄 각각의 2개의 쌍(여기서 각각의 중쇄 및/또는 경쇄가 하나 이상의 첫 번째 인식 부위를 포함함)을 포함하거나, (ii) 항체는 중쇄와 경쇄 각각의 2개의 쌍(여기서 중쇄 및/또는 경쇄 중 하나가 하나 이상의 첫 번째 인식 부위를 포함함)을 포함하거나, 또는 (iii) 항체는 한 쌍의 중쇄와 경쇄 및 추가적인 중쇄 Fc-영역(여기서 중쇄 및/또는 중쇄 Fc-영역 단편 또는 경쇄가 하나 이상의 첫 번째 인식 부위를 포함함)을 포함한다.
- [0426] 본원 발명에 따르면, 변형된 항체는 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드에 KalbTG에 대한 하나 이상의 인식 부위를 포함한다. 인식 부위는 KalbTG에 대한 모티프를 포함하며, 여기서 KalbTG는 변형된 항체와 변형된 항체에 결합될 화합물(페이로드) 사이의 이소펩티드 결합의 형성을 촉매할 수 있다. 전형적으로 이소펩티드 결합

은 글루타민(Gln, Q) 측쇄와 리신(Lys, K) 측쇄 사이에 형성된다. 바람직하게는, 본원 발명의 변형된 항체를 얻기 위해 항체에 도입된 변형은 항체 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩티드 내에서 (인공) Q-태그, 즉 KalbTG에 의해 인식되는 Gln 함유 모티프의 생성을 포함한다. 적합한 Q-태그는 WO 2017/102759에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참고로 명시적으로 포함된다. 특정 실시형태에서 서로 독립적으로 하나 이상의 첫 번째 KalbTG 인식 부위는 Gln 함유 모티프, 특히 서열 RYQQR(서열 번호: 11), RWRQR(서열 번호: 12), YRQRT(서열 번호: 13), IRQRQ(서열 번호: 14), FRYRQ(서열 번호: 15), 또는 YRYRQ(서열 번호: 17), 특히 YRYRQ(서열 번호: 17)를 포함하거나 갖는다. Q-태그는 치환 또는 삽입, 바람직하게는 삽입과 같은 하나 이상의 아미노산 변형에 의해 생성될 수 있다. 특정 실시형태에서, Q-태그는 YRYRQ(서열 번호: 17) 또는 RVRQR(서열 번호: 18), 특히 YRYRQ(서열 번호: 17)를 포함하는 아미노산 서열의 삽입 및/또는 이에 의한 대체에 의해 생성된다. 바람직하게는, 삽입된 아미노산 서열은 5 내지 20개의 아미노산 길이를 갖고 YRYRQ(서열 번호: 17) 또는 RVRQR(서열 번호: 18), 특히 YRYRQ(서열 번호: 17)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 삽입은 링커가 없는 Q-태그 모티프이다, 즉, 삽입은 YRYRQ(서열 번호: 17) 또는 RVRQR(서열 번호: 18), 특히 YRYRQ(서열 번호: 17)로 구성된다. KalbTG에 대한 하나 이상의 인식 부위의 도입은 경쇄 및/또는 중쇄의 불변 영역에서의 유일한 변형일 수 있다. 대안적으로, 정제를 위한 태그(예: His-태그) 또는 기타 변형, 예를 들면 안정성 증가 또는 이중이량체화 또는 효과기 기능 수정을 위한 변형과 같은 추가 변형이 단독으로 또는 조합되어 존재할 수 있다.

[0427] 위에서 언급한 바와 같이, KalbTG에 대한 하나 이상의 첫 번째 인식 부위(들)는 항체의 특정 부위, 즉 경쇄의 위치 110(LC110), 143(LC143), 214(LC214) 및 중쇄의 위치 118(HC118), 177(HC177), 297(HC297), 341(HC341), 401(HC401)로부터 선택된 위치 중 하나 이상의 위치, 특히 HC177 및/또는 HC297 및/또는 LC214에 삽입된다. 특정 실시형태에서, 본원 발명의 변형된 항체는 특히 첫 번째 인식 부위에 결합된 도메인과 상이한 도메인에 결합하기 위해 중쇄의 위치 446(HC446), 즉 C-말단에 KalbTG에 대한 추가의 (두 번째) 인식 부위를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 첫 번째 인식 부위는 서로 독립적으로 중쇄의 위치 177(HC177) 또는 297(HC297)에 또는 경쇄의 위치 214(LC214)에 있다.

[0428] 특정 실시형태에서, Q-태그는 1개 또는 2개의 링커(들) 사이에 또는 이를 통해 항체 경쇄/중쇄 아미노산 서열에 삽입된다. 링커는 유연성을 높이거나 더 큰 페이로드에 대한 접합을 허용할 수 있다. 특정 실시형태에서, 각각의 링커 서열은 서로 독립적으로 1 내지 20개의 아미노산, 특정 실시형태에서 1 내지 10개의 아미노산, 추가 실시형태에서 1 내지 5개의 아미노산을 포함하고, 상기 링커는 Q-태그의 기능. KalbTG, 항체의 접힘 및 변형된 항체에 부착되는 페이로드를 본질적으로 방해하지 않는다. 링커는 N- 및/또는 C-말단에서 Q-태그에 부착될 수 있다. 특정 실시형태에서, 링커 아미노산은 글리신 또는 세린과 같은 작은 아미노산이다. 아미노산 링커 및 이들의 조성은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, Chichili et al. 참조). 아미노산 글리신, 세린, 알라닌, 트레오닌 및 글루탐산염은 일반적으로 유연한 링커의 아미노산을 구성한다. 따라서, 링커(들)는 주로 또는 완전히 Gly 및/또는 Ser 및/또는 Ala 및/또는 Thr 및/또는 Glu, 예를 들면 GGGP(서열 번호: 20), ESGS(서열 번호: 21) 또는 APAP(서열 번호: 22)로 구성될 수 있다. 또한, KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열 번호: 23) 또는 EGKSSGSGSESKST(서열 번호: 24)를 포함하거나 이로 구성된 링커가 존재할 수 있다. 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 링커는 주로 또는 완전히 Gly 및 Ser, 예를 들면  $(Gly_mSer)_n$ 로 서로 독립적으로 구성되며,  $m = 1, 2, 3$  또는 4이고  $n = 1, 2, 3, 4$  또는 5이고,  $m$ 과  $n$ 은 서로 독립적이며, 바람직하게는  $m=3$ 이고  $n=1$ 이다. 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 첫 번째 인식 부위는 말단에서 1개 또는 2개의 링커(들)를 통해 중쇄 및/또는 경쇄 아미노산 서열에 삽입되며, 특히 링커는 주로 또는 완전히 Gly 및 Ser, 예를 들면  $(Gly-Gly-Gly-Ser)_n$ (서열 번호: 19)로 구성되며,  $n = 1, 2, 3, 4$  또는 5, 바람직하게는  $n = 1$ 이다.

[0429] 링커가 존재하는 경우, 아미노산 서열 X1-YRYRQ-X2(서열 번호: 17) 또는 X1-RVRQR-X2(서열 번호: 18)가 항체에 삽입된다. X1 및 X2는 서로 독립적으로 존재하지 않거나 링커, 특히 링커 아미노산이다. 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 삽입은 2개의 유연한 링커를 갖는 Q-태그 모티프, 특히 GGSYRYRQGGGS(서열 번호: 25) 또는 GGSYRYRQGGGS(서열 번호: 26), 특히 GGSYRYRQGGGS(서열 번호: 25)의 삽입이다.

[0430] 첫 번째 인식 부위(굵은 글씨)가 있는 힌지 영역(서열 번호: 32, 113으로 지칭됨) 및 이것이 없는 힌지 영역(서열 번호: 33, 110으로 지칭됨)의 일부를 포함하는 예시적인 Fc-영역은 다음 서열을 갖는다:

113: DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT  
 110: DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT

113: CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY  
 110: CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY

113: RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALGA PIEKTISKAK  
 110: RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALGA PIEKTISKAK

113: GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 110: GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

113: WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGGGSYRYRQ GGGSGSFFLY  
 110: WESNGQPENN YKTTTPVLDS D..... . . . .GSFFLY

113: SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK  
 110: SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[0431]

[0432]

[0433]

[0434]

[0435]

[0436]

[0437]

[0438]

[0439]

[0440]

두 번째 양상에서, 본원 발명은 본원 발명에 따른 변형된 항체의 사슬을 코딩하는 하나 이상의 핵산에 관한 것이다.

본원 발명의 변형된 항체를 인코딩하는 핵산은 항체를 재조합적으로 생산하기 위해 시험관내에서 단리되거나 생성될 수 있다. 추가 클로닝(DNA 증폭) 또는 추가 발현을 위해 핵산을 복제가능 벡터에 삽입할 수 있다.

"핵산"은 DNA(gDNA, cDNA)와 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산의 기본 구조 단위인 뉴클레오티드는 천연 뉴클레오티드뿐만 아니라 변형된 당이나 염기 부위를 갖는 유사체도 포함한다. 본원 발명의 중쇄와 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 이러한 변형에는 인코딩된 서열이 변하지 않는 한 뉴클레오티드의 추가, 결실, 또는 비보존적 또는 보존적 치환이 포함된다.

본원 발명에 따른 변형된 항체를 인코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여(예를 들면, 항체의 중쇄와 경쇄를 인코딩하는 DNA에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용하여) 단리 또는 합성될 수 있다.

다양한 전달 및 발현 벡터를 이용할 수 있다. 벡터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하지만 이들에 국한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열.

본원에 이용된 용어 "벡터"는 숙주 세포에서 관심 유전자를 발현하기 위한 수단으로서 플라스미드 벡터; 코스미드 벡터; 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노 관련 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 등을 의미한다. 벡터 내 변형된 항체를 인코딩하는 핵산은 프로모터 및 폴리아데닐화 신호 서열에 작동 가능하게 연결된다.

"작동 가능하게 연결된"은 핵산 발현 조절 서열(예를 들면, 프로모터, 신호 서열, 또는 전사 조절 인자 결합 부위의 어레이)과 또 다른 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 의미하며, 이로써 조절 서열은 다른 핵산의 전사 및/또는 번역을 조절한다.

진핵세포를 숙주로 이용하는 경우에, 포유동물 세포의 유전체 유래 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터,  $\beta$ -액틴 프로모터, 인간 헤모글로빈 프로모터, 인간 근육 크레아틴 프로모터) 또는 동물 바이러스 유래 포유동물 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 우두 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 생쥐 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스(EBV) 프로모터 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터)가 이용될 수 있다. 또한, 인코딩 핵산 뒤에 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 신호 서열이 존재한다.

세포는 전술한 벡터로 형질전환될 수 있다. 본원 발명의 항체를 생성하는 데 이용되는 세포는 원핵세포, 효모 또는 고등 진핵세포일 수 있지만 이들에 국한되지 않는다.

- [0441] 그러나 가장 큰 관심은 동물 세포에 있으며 유용한 숙주 세포주의 예로는 COS-7, BHK, CHO, CHO-S, CHO-K1, GS-CHO, CHO DXB-11, CHO DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U2OS, 또는 HT1080이 있으나 이들에 국한되지 않는다. 바람직한 실시형태에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다.
- [0442] 세 번째 양상에서, 본원 발명은 (i) 본원 발명에 따른 변형된 항체 및 (ii) KalbTG에 대한 하나 이상의 (첫 번째) 인식 부위(들)에 공유적으로 접합된 하나 이상의 비항체(페이로드) 도메인(들)을 포함하는 공유 접합체에 관한 것이며, 여기서 비항체 도메인은 KalbTG에 대한 상보적인 두 번째 인식 부위를 포함한다. 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 비항체 도메인은 치료적 실체 및 선택적으로 두 번째 링커를 포함하는 치료 모이어티이다.
- [0443] 위에서 상세히 설명한 바와 같이, 본원 발명의 변형된 항체는 KalbTG의 도움으로 하나 이상의 페이로드, 예를 들면 치료 모이어티를 항체의 하나 이상의 내부 부위(들)에 특이적으로 접합시키기 위해 제공된다. 이로써 표적 치료에 이용될 수 있는 ADC가 획득된다. 접합체는 관심 표적에 결합할 수 있어 페이로드, 예를 들면 치료 모이어티를 신체의 의도된 부위로 운반한다. 특정 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 표적을 인식하고 상보성 결정 영역(CDR)으로 표적에 결합하며, 특히 여기서 표적은 세포 상에 존재하는 생체분자이다.
- [0444] 위에서 자세히 설명한 바와 같이, 치료 모이어티를 환자 신체의 특정 부위에 표적화하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 생체내 분포를 개선하고 부작용을 줄일 수 있다. 분명히, 이는 다른 방법으로는 도달하기 어려운 부위에 치료 모이어티를 전달하려는 의도일 수 있다. 예를 들어, 치료 모이어티를 뇌로 지향시키는 것이 구상될 수 있다. 혈액 뇌 장벽으로 인해, 뇌에 직접 투여되지 않는 경우, 특히 치료 모이어티가 특정 크기 제한을 초과하는 경우 "나신" 치료 모이어티를 전달하는 것이 어렵다. 혈액 뇌 장벽을 극복하고 치료 모이어티를 뇌로 전달하는 데 도움이 되는 치료 접근법이 분명히 유리하다. 놀랍게도 동일한 접근법을 이용하여 치료제를 신체의 다른 부위로 지향시킬 수 있다.
- [0445] 본원 발명에서는 신체 내 구조에 특이적으로 결합하는 항체의 분자 인식 단위가 치료 모이어티의 표적화에 이용된다. 상기 관점에서 볼 때, 치료적 실체가 관심 질병의 치료 또는 예방에 유용한 임의의 화합물, 특히 신체의 특정 부위, 예를 들면 특정 기관이나 세포 유형 또는 질병이 있는 부위에 전달되는 화합물일 수 있다는 것은 분명하다.
- [0446] "치료하다", "치료하는" 및 "치료"라는 용어는 상태, 장애 또는 질병, 또는 상태, 장애 또는 질병과 관련된 증상 중 하나 이상을 완화 또는 제거하거나; 또는 상태, 장애 또는 질병 자체의 원인(들)을 완화 또는 근절하는 것을 포함하는 것으로 의미된다. "예방하다", "예방하는" 및 "예방"이라는 용어는 상태, 장애 또는 질병 및/또는 이에 수반되는 증상의 발병을 지연 및/또는 배제하거나; 개체가 상태, 장애 또는 질병에 걸리는 것을 차단하거나; 또는 개체가 상태, 장애 또는 질병에 걸릴 위험을 줄이는 방법을 포함하는 것으로 의미된다.
- [0447] 이를 위해, 치료적 실체 및 선택적으로 두 번째 링커를 포함하는 비항체 페이로드가 본원 발명의 변형된 항체에 공유적으로 접합된다. 치료 모이어티는 활성 치료적 실체 또는 전구약물을 포함한다. 선택적으로, 두 번째 링커가 존재할 수 있다. 두 번째 링커는 예를 들면, 알킬 기 또는 폴리에틸렌 기를 포함하는 화학적 링커, 또는 펩티드 링커일 수 있다.
- [0448] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 치료적 실체는 RNA, siRNA 또는 ASO(안티센스 올리고뉴클레오티드)와 같은 핵산, 특히 LNA 뉴클레오티드를 포함하는 ASO이고/이거나; 치료적 실체는 독소, 소형 유기 분자 또는 면역 조절제이다.
- [0449] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 바람직한 실시형태에서, 치료적 실체는 핵산이다. 특정 실시형태에서, 핵산은 DNA, RNA 또는 이들의 혼합물이다. RNA라는 용어에는 안티센스 RNA뿐만 아니라 전형적으로 길이가 20-24개 염기쌍이고 miRNA와 유사하며 RNA 간섭(RNAi) 경로 내에서 작동하는 한 부류의 이중 가닥 비코딩 RNA 분자인 짧은 간섭 RNA(siRNA)도 포함된다. 이는 전사 후 mRNA를 분해하여 번역을 방지함으로써 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 특정 유전자의 발현을 방해한다. 특정 실시형태에서, 핵산은 하나 이상의 잠금 핵산(LNA)을 포함한다. LNA는 리보오스 모이어티가 2' 산소와 4' 탄소를 연결하는 추가의 다리로 변형되는 변형된 RNA 뉴클레오티드이다. 다리는 3'- 엔도(North) 형태의 리보오스를 "잠근다". 이 구조는 효소 분해에 대한 증가된 안정성에 기인할 수 있다; 더욱이, LNA의 구조는 올리고뉴클레오티드의 단량체 또는 구성성분으로서 향상된 특이성과 친화성을 갖는다. 특정 실시형태에서, LNA 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 또는 핵산 내에서 DNA 또는 RNA 잔기와 혼합된다.

- [0450] 특정 실시형태에서, 추가적으로 또는 대안적으로, 치료적 실체는 소분자일 수 있다. 약리학 분야에서 소분자는 저분자량(< 2,500 달톤, 특히 < 1,000 달톤)이다. 많은 소분자 치료적 실체는 소형 유기 분자이다. 소형 유기 분자는 전형적으로 특정 생물학적 거대분자에 결합하고 이펙터 역할을 하여 표적의 활성이나 기능을 변경한다. 이러한 화합물은 천연(예: 일차와 이차 대사산물)이거나 인공(즉, 자연적으로 발생하지 않음)일 수 있다; 이들은 질병에 대해 유익한 효과가 있다.
- [0451] 본원 발명에서, 치료적 실체는 선택적으로 두 번째 링커를 거쳐 본원 발명의 변형된 항체에 공유적으로 결합된 비항체 도메인이다. 링커의 길이, 강성 및 화학적 조성이 접합 반응 속도 및 생성된 접합체의 안정성에 영향을 미칠 수 있으므로 링커는 의도된 표적 및 치료적 실체에 따라 달라질 수 있다. 본원 발명의 모든 양상 및 실시 형태의 바람직한 실시형태에서, (두 번째) 링커는 알킬 링커 또는 폴리에틸렌 링커 또는 펩티드 링커 또는 이들의 혼합물이다. 특정 실시형태에서, (두 번째) 링커는 에틸렌 글리콜(PEG) 단위, 예컨대 약 2 내지 50개의 에틸렌 글리콜 단위를 포함한다. 예시적인 링커에는 폴리에틸렌 글리콜 링커(-NH-C(=O)-PEG<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, n = 2 내지 25)가 포함된다. 특정 실시형태에서, (두 번째) 링커는 지방족 탄소 사슬이다. 링커는 치환되지 않거나 치환된 알킬, 예컨대 치환되지 않거나 치환된 C<sub>1-6</sub> 알킬을 포함할 수 있고, 여기서 C<sub>1-6</sub> 알킬은 알콕시, 아실, 아실옥시, 알콕시 카르보닐, 카르보닐알콕시, 아실아미노, 아미노, 아미노아실, 아미노카르보닐아미노, 아미노카르보닐옥시, 시클로알킬, 시클로알케닐, 시아노, 아지도, 할로, 히드록실, 니트로, 카르복실, 티올, 티오알킬, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로시클릴, 아미노술폰닐, 술폰닐아미노, 술폰닐 및 옥소로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있다. 특정 실시형태에서, (두 번째) 링커는 펩티드 링커, 즉 아미노산으로 구성된 링커이다.
- [0452] 본원 발명의 모든 양상 및 실시 형태의 바람직한 실시형태에서, 접합체는 본원 발명에 따른 변형된 항체 및 ASO와 같은 하나 이상의 치료 핵산을 포함하며, 여기서 각각의 치료 핵산은 이소펩티드 결합을 통해 단일 Q-태그에 연결되고, 선택적으로 상기 정의된 바와 같이 아마이드 결합을 통해 두 번째 링커, 특히 PEG 링커를 거쳐 K-태그의 말단 잔기에 연결된다.
- [0453] 본원 발명의 모든 양상 및 실시 형태의 특정 실시형태에서, 접합체는 약 1 내지 약 8, 약 1 내지 약 4, 또는 약 1 내지 약 2 범위의 DAR을 갖는다. 다른 실시형태에서, 접합체는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 또는 약 8의 DAR을 갖는다.
- [0454] 항체가 표적에 결합하면 접합체가 세포내이입에 의해 각각의 세포 내로 수송되고, 치료적 실체가 방출되어 의도된 방식으로 작용할 수 있다(예: 질병 치료).
- [0455] 본원 발명의 모든 양상 및 실시 형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 하나의 표적을 인식하고, 상기 표적은 수용체 매개 세포내이입을 유도하는 수용체, 예를 들면 인간 트랜스페린 수용체 1(TfR1), 인간 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-1R), 인간 저밀도 지질단백질 수용체 관련 단백질 1(LRP1) 또는 인간 저밀도 지질단백질 수용체 관련 단백질 8(LRP8), 특히 TfR1이다.
- [0456] 예를 들어, TfR1 또는 IGF-1R과 같은 특정 수용체의 경우, 항체가 표적에 결합하면 접합체가 세포내이입에 의해 각각의 세포 내로 수송되고, 엔도솜으로부터 방출되며, 다시 한 번 세포로부터 세포외유출된다. 세포가 혈액 뇌 장벽과 같은 장벽의 일부인 경우, 개별 장벽을 통과하는 수송이 달성된다. 이로써, 치료적 실체가 본원 발명에 따른 변형된 항체에 접합되지 않은 치료적 실체에 의해 도달될 수 없었던 신체의 구획으로 수송된다.
- [0457] 본원 발명의 모든 양상 및 실시 형태의 바람직한 실시형태에서, 변형된 항체는 혈액-뇌 장벽의 교차를 허용하는 구조에 특이적으로 결합한다. 특정 실시형태에서, 혈액 뇌 장벽의 교차를 허용하는 구조는 인간 트랜스페린 수용체이다.
- [0458] 특정 실시형태에서, 변형된 항체는 1개 또는 2개의 표적(들)을 인식하고, 상기 1개 또는 2개의 표적은 유방암 세포와 같은 종양 세포에 특이적인 종양 마커와 같이, 특정 세포 유형에 특이적이다.
- [0459] 본원 발명의 모든 양상 및 실시 형태의 바람직한 실시형태에서, 본원 발명에 따른 변형된 항체는 뇌 질환, 예컨대 파킨슨병 또는 알츠하이머병을 치료 또는 예방하기 위한 RNA 또는 LNA를 포함하는 치료적 실체 및 선택적으로 PEG 링커를 포함하는 비항체 도메인에 접합된다.
- [0460] 네 번째 양상에서, 본원 발명은 본원 발명에 따른 변형된 항체를 치료적 실체에 공유적으로 접합하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0461] a) 본원 발명에 따른 변형된 항체를 제공하는 단계,

- [0462] b) 비항체 도메인을 제공하되, 비항체 도메인은 (i) 치료적 실체,
- [0463] (ii) (i)에 제공된 변형된 항체 내에 존재하는 첫 번째 인식 부위에 상보적인 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위(바람직한 실시형태에서, 두 번째 인식 부위는 Lys 함유 모티프, 특히 서열 RYESK(서열 번호: 16)를 포함하거나 갖는다), 및
- [0464] (iii) 선택적으로 치료적 실체와 두 번째 인식 부위 사이의 두 번째 링커를 포함하는 단계; 그리고
- [0465] c) KalbTG 또는 이의 기능적으로 활성 변이체 또는 단편의 존재하에 그리고 KalbTG의 활성화에 도움이 되는 조건 하에서 a)의 변형된 항체와 b)의 비항체 도메인을 인큐베이션 또는 반응시켜, 첫 번째 및 두 번째 인식 부위 사이에 이소펩티드 결합을 형성하여 변형된 항체를 치료적 실체에 접합시키는 단계.
- [0466] 방법의 첫 번째 단계에서, 본원 발명의 변형된 항체 및 비항체 도메인이 제공된다.
- [0467] 비항체 도메인은 다음을 포함한다:
- [0468] (i) 치료적 실체,
- [0469] (ii) 변형된 항체 내에 존재하는 첫 번째 인식 부위에 상보적인 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위(즉, 변형된 항체가 Q-태그를 포함하는 경우 비항체 도메인은 K-태그를 포함하거나 또는 그 반대이고, 특히 두 번째 인식 부위는 Lys 함유 모티프, 특히 서열 RYESK(서열 번호: 16)(K-태그)을 포함하거나 갖는다), 그리고
- [0470] (iii) 선택적으로 치료적 실체와 두 번째 인식 부위 사이의 두 번째 링커.
- [0471] 도메인은 위에 정의된 대로일 수 있다.
- [0472] 변형된 항체 및 비항체 도메인은 KalbTG 또는 이의 기능적으로 활성 변이체 또는 단편(야생형 KalbTG와 비슷한 효소 활성을 갖는 KalbTG의 변이체 또는 단편을 의미함)의 존재하에 그리고 KalbTG의 활성화에 도움이 되는 조건 하에서 인큐베이션, 즉 반응되어, 첫 번째 인식 부위와 두 번째 인식 부위 사이에 이소펩티드 결합이 형성되어 변형된 항체가 치료적 실체에 접합된다.
- [0473] 본원 발명에 따른 방법의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 항체는 KalbTG의 효소 활성을 이용하여 각각의 하나 이상의 K-태그에 접합되는 하나 이상의 Q-태그(들)를 포함한다.
- [0474] 비항체 도메인은 KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위를 포함한다. 본원 발명에 따른 방법의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 비항체 도메인은 펩티드 서열 RYESK(서열 번호: 16)에 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 K-태그를 포함한다.
- [0475] KalbTG를 포함한 미생물 트랜스글루타미나아제(mTG)는 Gln-Lys 이소펩티드 결합의 형성을 촉매하며 식품 및 생명공학 응용 분야(예: 단백질이 풍부한 식품의 질감 개선이나 항체-약물 접합체 생성)에서 단백질과 펩티드의 교차연결에 널리 이용된다.
- [0476] 그러나 KalbTG는 알려진 mTG 기질 또는 항체와 같이 일반적으로 이용되는 표적 단백질과 본질적으로 교차반응성을 나타내지 않으므로 미리 결정된 부위에서 특이적인 접합이 가능하다.
- [0477] 따라서, KalbTG에 대한 두 번째 인식 부위(K-태그)를 포함하는 본질적으로 모든 페이로드(특히 여기서 두 번째 인식 부위는 Lys 함유 모티프, 특히 서열 RYESK(서열 번호: 16)를 포함하거나 갖는다)는 하나 이상의 첫 번째 인식 부위(들), 즉 Q-태그에서 변형된 항체에 접합/커플링될 수 있다.
- [0478] KalbTG 또는 이의 기능적으로 활성 변이체 또는 단편은 Steffen et al. (2017)에 정의되거나 WO 2016/100735 A1에 정의된 바와 같을 수 있으며, 둘 모두 본 명세서에 참고로 명시적으로 포함된다.
- [0479] 기능적으로 활성 변이체 또는 단편은 WO 2016/100735 A1(그 안의 서열 번호: 6 참조)의 KalbTG에 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 트랜스글루타미나아제일 수 있다. 대안적으로, KalbTG 또는 이의 기능적으로 활성 변이체는 예를 들면 정제 목적을 위해 태그와 같은 표지를 추가로 포함하는 융합 단백질의 일부일 수 있다.
- [0480] 특정 실시형태에서, KalbTG는 다음 아미노산 서열(3문자 코드)을 포함한다:
- [0481] Met His Lys Trp Phe Leu Arg Ala Ala Val Val Ala Ala Val Gly Phe Gly Leu Pro Thr Leu Ile Ala Thr Thr Ala Gln Ala Ala Val Ala Ala Pro Thr Pro Arg Ala Pro Leu Ala Pro Pro Leu Ala Glu Asp Arg Ser Tyr Arg Thr Trp Arg Val Glu Asp Tyr Val Glu Ala Trp Glu Arg Tyr His Gly Arg Glu Met Thr Glu Asp Glu Arg

Glu Asn Leu Ala Arg Gly Cys Ile Gly Val Thr Val Val Asn Leu Asn Arg Glu Asp Leu Ser Asn Pro Pro Leu Asn Leu Ser Phe Gly Ser Leu Arg Thr Ala Glu Ala Val Gln Ala Ala Leu Asn Lys Ile Val Asp Thr His Pro Ser Pro Ala Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Lys Asp Pro Ile Leu Lys Arg Leu Lys Asn Val Val Lys Ala Leu Pro Ser Trp Ile Asp Ser Ala Lys Leu Lys Ala Ser Ile Phe Ser Lys Arg Phe Tyr Ser Trp Gln Asn Pro Asp Trp Ser Glu Glu Arg Ala His Thr Thr Tyr Arg Pro Asp Arg Glu Thr Asp Gln Val Asp Met Ser Thr Tyr Arg Tyr Arg Ala Arg Pro Gly Tyr Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Gln Asp Thr Asn Thr Trp Trp His Ala Asn His Glu Glu Pro Arg Met Val Val Tyr Gln Ser Thr Leu Arg His Tyr Ser Arg Pro Leu Gln Asp Phe Asp Glu Gln Val Phe Thr Val Ala Phe Ala Lys Lys Asp(서열 번호: 31).

- [0482] 본원 발명에 따른 방법의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 상기 커플링은 제어되고, 예를 들면 방향체 도메인과 변형된 항체의 화학양론적 비율, 예를 들면 Q-태그/K-태그 쌍당 약 1:1로 달성된다. 변형된 항체에 2개 또는 심지어 다중 페이로드를 부착하기 위해 하나의 변형된 항체에 하나 초과와 첫 번째 인식 부위를 이용함으로써 다중 접합이 달성될 수도 있다.
- [0483] 다섯 번째 양상에서, 본원 발명의 변형된 항체를 포함하거나 본원 발명의 방법에 따라 생산된 공유 접합체는 특히 신경 질환 또는 뇌 질환, 예를 들면 알츠하이머병 또는 파킨슨병을 치료하는 데 이용하기 위한, 또는 유방암과 같은 암을 치료하는 데 이용하기 위한 약제로 이용하기 위한 것이다.
- [0484] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 질환은 신경 질환이다. 특정 실시형태에서, 신경 질환은 신경병증 장애, 신경퇴행성 질환, 암, 안구 질환 장애, 발작 장애, 리소좀 축적병, 아밀로이드증, 바이러스성 또는 미생물성 질병, 허혈, 행동 장애, CNS 염증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 뇌 전이가 있는 CD20 양성 암, 뇌 전이가 있는 HER2 양성 암으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0485] 본원 발명의 모든 양상 및 실시형태의 특정 실시형태에서, 신경 질환은 신경병증 장애, 신경퇴행성 질환, 암, 안구 질환 장애, 발작 장애, 리소좀 축적병, 아밀로이드증, 바이러스성 또는 미생물성 질병, 허혈, 행동 장애 및 CNS 염증으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0486] 위에서 상세히 설명한 바와 같이, 본원 발명에 따른 변형된 항체를 포함하는 접합체는 특히 신경 질환 또는 뇌 질환, 바람직한 실시형태에서 알츠하이머병 또는 파킨슨병의 치료, 또는 유방암과 같은 암의 치료에서 약제로 이용될 수 있다.
- [0487] 접합체는 조성물에 포함될 수 있다. 약학 조성물로도 지칭되는 이러한 조성물은 제약 분야 또는 약학적으로 이용하기 위한 조성물로서, 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하도록 하는 형태이며 약학 조성물이 투여될 대상에게 허용될 수 없을 정도로 독성이 있는 추가 성분을 함유하지 않는 제조물을 의미한다. 조성물은 선택적으로 완충 물질, 안정제 또는 보존제와 같은 약학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 운반체 및 선택적으로 추가 활성 성분, 특히 약학 조성물과 관련하여 공지된 성분을 함유할 수 있다.
- [0488] 일반적으로, 추가 성분의 성질은 약학 조성물의 특정 형태 및 이용되는 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 약학적으로 허용되는 운반체는 조성물을 향상 또는 안정화시키거나, 또는 조성물의 제조를 촉진하는 데 이용될 수 있다. 이러한 운반체에는 생리학적으로 적합한 식염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 용매, 분산 매질, 항균제와 항진균제, 등장성과 흡수 지연제 등뿐만 아니라 이들의 조합이 포함될 수 있지만 이들에 국한되지 않는다. 제제는 투여 방식에 적합해야 한다. 예를 들어, 비경구 제제는 통상적으로, 약학적으로 및 생리학적으로 허용되는 유체 예컨대 물, 생리 식염수, 균형 염 용액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 또는 기타 유사한 것을 운반체로서 포함하는 주사가능 유체를 포함한다. 투여되는 약학 조성물은 생물학적으로 중성 운반체 이외에, 소량의 비독성 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 보존제, pH 완충제 등을 함유할 수 있다.
- [0489] 약학 조성물은 안정제를 포함할 수 있다. 용어 "안정제"는 조성물을 불리한 조건, 예컨대 가열 또는 동결 중에 발생하는 것들로부터 보호하고/하거나 조건 또는 상태에서 본원 발명의 접합체의 안정성 또는 저장 수명을 연장하는 물질을 의미한다. 안정제의 예에는 당, 예컨대 수크로오스, 락토오스 및 만노오스; 당 알코올, 예컨대 만니톨; 아미노산, 예컨대 글리신 또는 글루타민산; 그리고 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민 또는 젤라틴이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0490] 전형적으로, 접합체의 치료적으로 유효 용량 또는 유효한 용량이 본원 발명의 약학 조성물에 이용된다. 투여되는 접합체의 양은 비교 가능한 비결합 치료제의 용량 및/또는 투약 요법에 대한 지침에 기초하여 초기에 결정될 수 있다. 일반적으로, 접합체는 표적화된 전달을 제공하여 투약 요법에서 감소된 용량 또는 감소된 투여 중 적어도 하나를 제공할 수 있다. 따라서, 접합체는 본원 발명의 접합체 내에 존재하기 전의 치료제에 비해 투약 요

법에서 감소된 용량 및/또는 감소된 투여를 제공할 수 있다. 위에서 언급한 바와 같이, 접합체가 약물 전달의 조절된 화학양론을 제공할 수 있기 때문에, 접합체의 용량은 항체-치료적 실체 접합체 기반으로 제공되는 약물 분자의 수를 기준으로 계산될 수 있다.

- [0491] 본원 발명의 약학 조성물은 1회, 수회 또는 여러 번에 걸쳐 투여될 수 있다. 접합체의 투여 빈도는 임의의 다양한 요인, 예를 들면 증상의 중증도 등에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 접합체는 6개월마다 1회, 5개월마다 1회, 4개월마다 1회, 3개월마다 1회, 2개월마다 1회, 월 1회, 월 2회, 월 3회, 격주로 (qow), 주 1회(qw), 주 2회(biw), 주 3회(tiw), 주 4회, 주 5회, 주 6회, 격일(qod), 매일(qd), 하루 2회(qid), 또는 하루 3회(tid) 투여된다.
- [0492] 특정 실시형태에서, 본원 발명의 접합체 또는 약학 조성물은 하나 이상의 추가 화합물과 동시에 투여된다. 특정 실시형태에서, 본원 발명의 접합체 또는 약학 조성물은 추가 화합물(들) 전후에 투여된다.
- [0493] 본원 발명의 약학 조성물은 개체를 치료하기 위한 약제로서 이용될 수 있다. 개체는 포유동물이다. 포유동물에는 가축(예: 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예: 인간 및 원숭이와 같은 비인간 영장류), 토끼 및 설치류(예: 생쥐 및 쥐)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 바람직하게는, 개체는 인간이다.
- [0494] 본원에 기술된 접합체를 포함하는 약학 조성물은 당해 분야에 공지된 전달 기술을 이용하여 세포, 세포군, 종양, 조직 또는 개체에 전달될 수 있다. 일반적으로, 접합체를 전달하기 위한 당해 분야에서 인정되는 임의의 적합한 방법은 본원에 기술된 조성물과 함께 이용하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 전달은 국부 투여(예: 직접 주사, 이식 또는 국소 투여), 전신 투여, 또는 피하, 정맥내, 안구내, 복강내 또는 두개내(예: 뇌실내, 뇌실질내 및 척수강내)를 포함한 비경구 경로, 또는 근육내 투여에 의해 이루어질 수 있다. 본원 발명의 공유 접합체는 바람직하게는 정맥내, 근육내 또는 동맥내, 보다 바람직하게는 정맥내 투여된다. 투여의 용이성 및 용량의 균일성을 위해 전술한 약학 조성물을 단위 약형으로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 이용된 단위 약형은 단위 용량으로 적합한 물리적으로 구별된 단위를 의미하며, 각 단위는 필요한 약학적 운반체와 관련하여 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 성분을 함유한다. 이러한 단위 약형의 예로는 주사액 또는 현탁액 등이 있다.
- [0495] 위에서 설명한 바와 같이, 본원 발명의 접합체/약학 조성물은 알츠하이머병 또는 파킨슨병과 같은 신경 질환 또는 뇌 질환을 치료하는 데 특히 유용하다. "신경 질환"이라는 용어는 특히 뇌의 신경퇴행성 질환, 신경염증성 질환 또는 발작 장애를 포함한다. 신경퇴행성 질환은 뉴런의 사멸을 포함하여 뉴런의 구조 또는 기능이 점진적으로 상실되는 것이 특징이다. 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증 및 다발성 경화증을 포함한 많은 신경퇴행성 질환은 신경퇴행 과정의 결과로 발생한다. 비정형 단백질 접합체뿐만 아니라 유도된 세포 사멸을 포함하여 다양한 신경퇴행성 질환 사이에는 많은 유사점이 있다. 신경퇴행은 분자에서 전신에 이르기까지 다양한 수준의 신경 회로에서 발견될 수 있다. "신경퇴행성 질환"과 "신경염증성 질환"이라는 용어는 부분적으로 중복되는 범위를 갖는다. 염증 반응은 신경퇴행성 질환의 특징이며 신경 세포 사멸의 다양한 메커니즘을 통해 참여하거나 기여한다. 키뉴레닌 경로(KP)를 따른 트립토판 이화작용은 이러한 메커니즘 중 하나를 나타낸다. 발작 장애는 뇌 세포 사이의 비정상적인 신호 전달을 특징으로 하는 뇌 장애이다. 발작 장애는 뇌의 일부(부분 발작) 또는 뇌 전체(전신 발작)에 영향을 미칠 수 있다. 가장 두드러진 발작 장애는 뇌전증이다. 혈액 뇌장벽을 통과하기 위해 수용체 유도 세포내이입을 매개하는 수용체가 이 접합체의 표적으로 이용될 수 있다. 이의 예에는 트랜스페린 수용체 1(TfR1), 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-1R), 저밀도 지질단백질 수용체 관련 단백질 1(LRP1) 또는 저밀도 지질단백질 수용체 관련 단백질 8(LRP8), 특히 TfR1이 포함된다.
- [0496] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어 및 임의의 약어는 본원 발명의 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 비록 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법과 재료가 본원에 제시된 바와 같이 실무에서 이용될 수 있긴 하지만, 특정한 방법과 재료가 본원에 기술되어 있다.
- [0497] 본원 발명은, 본원에 설명된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약이 다양할 수 있으므로 이들에 한정되지 않는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법과 재료가 본원 발명의 실시예에 이용될 수 있으며, 예시적인 방법과 재료가 본원에 기술되어 있다. 또한, 본원에 이용된 용어는 단지 특정한 실시형태를 설명하기 위해 이용된 것으로, 본원 발명을 한정하려는 의도가 아니다.
- [0498] 본 명세서와 첨부된 청구범위에 이용된 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수형을 포함한다. 마찬가지로, "포함하다", "함유하다", "포괄하다"라는 단어는 배타적으로 해석되기보다는 포괄적으로

해석되어야 한다. 마찬가지로, "또는"이라는 단어는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 "및"을 포함하는 것으로 의도된다. "복수"라는 용어는 두 개 이상을 의미한다.

[0499] 다음의 도면, 서열 및 실시예는 본원 발명의 다양한 실시형태를 설명하기 위한 것이다. 따라서, 논의된 특정 변형은 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원 발명의 범위를 벗어나지 않는 범위에서 다양한 등가물, 변화 및 변형이 가능하다는 점은 당업자에게 자명하며, 이러한 동등한 실시형태는 본원에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

**도면의 간단한 설명**

[0500] **도 1**은 15개 잔기를 갖는 단일 가닥 핵산에 접합된 9개의 서로 다른 Q-태그 삽입 부위를 갖는 mAb-2(HER2)의 소수성 상호작용 크로마토그래피를 보여준다.

**도 2**는 mAb와 핵산 페이로드의 단일 단계 KalbTG 매개 접합에 대한 예시적인 반응을 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0501] **실시예**

[0502] **실시예 1**

[0503] **본원 발명에 따른 변형된 항체의 재조합 생산**

[0504] 유전자 합성

[0505] 원하는 유전자 단편을 화학적 합성에 의해 제조하고, 합성된 유전자 단편을 Twist Bioscience(San Francisco, US)에서 HEK293 및 Expi293 세포에서의 발현을 위해 적합한 벡터에 클로닝하였다.

[0506] 포유동물 세포에서 변형된 항체의 발현

[0507] 항체 생산은 각각 F17 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 배양된 HEK293 세포 또는 Expi293 발현 배지(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양된 Expi293 세포에서 단일 발현 카세트 플라스미드의 일시적인 동시 형질감염에 의해 수행되었다. 대칭 표준 IgG1 형식의 경우 HC:LC 발현 플라스미드의 플라스미드 비율 = 1:1, 또는 비대칭 노브 인투 홀 형식의 경우 HC1:HC2:LC 발현 플라스미드의 플라스미드 비율 = 1:1:1을 이용하여 제조업체의 지침에 지정된 대로 형질감염을 수행하였다. 형질감염 7일 후 세포 배양 상층액을 수확하였다. 상층액은 감소된 온도(예: -20°C)에서 보관되었다.

[0508] 단백질 역가의 정량화

[0509] 상층액 샘플의 단백질 역가는 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Ultimate 3000 HPLC 시스템, Thermo Scientific, Waltham)에서 POROS A 20 μm 칼럼, 2.1 x 30mm(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용한 친화성 크로마토그래피로 결정되었다. 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4로 평형화된 칼럼에 상층액을 로딩한 후, 0.1 M 구연산, 0.2 M NaCl, pH 2.5로 용출하였다. 280 nm에서 흡광도를 측정하고 이어서 분석물의 용출 피크 면적(곡선 아래)을 참조 표준 곡선과 비교하여 단백질 농도를 계산함으로써 역가를 정량화했다.

[0510] 포유동물 배양 상층액으로부터 변형된 항체의 정제

[0511] 배양 상층액 중의 항체는 PBS 완충액, pH 7.4로 평형화된 Mab Select SuRe 칼럼(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 이용한 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 포획되었다. 결합되지 않은 단백질은 평형 완충액으로 세척하여 제거되었다. 변형된 항체를 50 mM 구연산염, pH 3.0으로 용출시키고, 용출액의 pH를 2M Tris, pH 9.0을 첨가하여 pH 7.5로 즉시 조정하였다. 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0에서 Superdex 200™ 칼럼(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 이용한 크기 배제 크로마토그래피를 두 번째 정제 단계로 수행하였다. 정제된 변형된 항체를 -80°C에서 보관하였다.

[0512] 중간 규모 자동화(Milan)를 이용한 항체 정제

[0513] Repligen(Waltham, MA, USA)의 칼럼이 장착된 액체 처리 시스템(Tecan, Männedorf, Switzerland)에서 MabSelectSuRe-세파라오스(Cytiva, Marlborough, MA, USA)를 이용한, 위에서 설명한 바와 같은 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용하여 항체를 한 단계로 정제하였다. 평형화, 샘플 로딩 및 세척 단계는 설명된 대로

수행되었으며, 25 mM 구연산염, pH 3.0을 이용하여 칼럼으로부터 항체를 용출하였다. 용출된 항체 분획물을 1.5 M Tris, pH 7.5로 중화하고 280 nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 농도를 결정하였다.

[0514] 예시적인 항체의 개요

[0515] 항체 110:

[0516] 설명:

[0517] P329G/L234A/L235A 돌연변이가 있는 IgG1 하위부류 기반 항-HER2 항체; HC 내의 아미노산 잔기 177(HC177)(EU 넘버링) 뒤에 Q-태그 삽입; Q-태그 및 스페이서 서열: GGSYRYRQGGGS(서열 번호: 25)

[0518] 중쇄 불변 영역 서열

[0519] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGGGSYRYRQGGGSLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKKCDKTHCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호: 27)

[0520] 경쇄 불변 도메인 서열

[0521] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRPAKVKWQVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호: 29)

[0522] 항체 113:

[0523] 설명:

[0524] P329G/L234A/L235A 돌연변이가 있는 IgG1 하위부류 기반 항-HER2 항체; HC 내의 아미노산 잔기 401(HC401)(EU 넘버링) 뒤에 Q-태그 삽입; Q-태그 및 스페이서 서열: GGSYRYRQGGGS(서열 번호: 25)

[0525] 중쇄 불변 영역 서열

[0526] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKKCDKTHCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGGSYRYRQGGSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호: 28)

[0527] 경쇄 불변 도메인 서열

[0528] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRPAKVKWQVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호: 30)

[0529] 표 1: 다양한 위치에 Q-태그가 삽입된 다양한 항체의 발현 수율.

수율 대규모 [mg] → Q 태그 위치 ↓	mAb-1 (CD163)		mAb-2 (HER2)		mAb-3 (LeY)	
	24mL	1L	24mL	1L	24mL	1L
야생형, 즉 Q-태그 없음(참조)	4.7	196	4.3	179	0.4	17
HC118	7.5	313	2.5	104	1.0	42
HC177	7.3	304	2.6	108	1.5	63
HC297	7.7	321	2.9	121	1.6	67
HC341	6.4	267	3.4	142	1.7	71
HC401	4.5	188	2.7	113	1.0	42
HC446	4.3	179	2.8	117	1.3	54
LC110	1.7	70.8	3.0	125	0.4	17
LC143	0.7	29.2	1.1	46	0.4	17
LC214	3.3	133	2.5	104	0.5	21

[0530]

[0531] 변형된 항체의 발현은 도입된 Q-태그의 위치에 의해 영향을 받는다. 위치 LC110, LC214, HC118, HC177, HC297,

HC341 및 HC401 뒤에 도입으로 가장 높은 수율이 나타났다.

[0532]

**실시예 2**

[0533]

**형광 염료에 대한 본원 발명에 따른 변형된 항체의 KalbTG 접합**

[0534]

**KalbTG를 이용한 접합**

[0535]

Q-태그가 포함된 정제된 항체를 투석을 통해 접합 완충액(NaCl을 포함하는 히스티딘 완충액, pH 8.5)으로 옮겼다. KalbTG 반응을 위해 항체를 K-태깅된 소분자(형광 염료, 10x 몰 과량)와 혼합하고 KalbTG를 첨가하였다 (mAb:KalbTG 몰 비율 > 100:1). 반응 혼합물을 진탕하면서 37°C에서 인큐베이션한 후, 용액에 10 mM 황산암모늄을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 접합되지 않은 페이로드와 잔류 효소를 제거하기 위해, 접합된 변형된 항체를 PBS pH 7.5에서 Superdex 200™ 칼럼(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 이용한 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 접합체를 -80°C에서 보관하였다.

[0536]

**접합체 분석**

[0537]

단백질 정량화를 Nanodrop 분광광도계(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 수행하였다. 또한, 정성적 DAR 측정을 아래의 실시예 4에 기재된 바와 같이 소수성 상호작용 크로마토그래피로 수행하였다. 접합체의 순도를 제조업체의 지침(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)에 따라 Caliper LabChip® GXII Touch™ 단백질 특성화 시스템을 이용하여 변성 및 환원 조건하에서 CE-SDS로 분석하였다.

[0538]

응집체 함량을 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Ultimate 3000 HPLC 시스템, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 M KCl, pH 6.2로 평형화된 TSKgel UP-SW3000 분석 크기 배제 칼럼(Tosoh Bioscience, Griesheim, Germany)을 이용한 SEC로 결정하였다.

[0539]

접합체의 동일성은 ESI-Q-ToF-MS(Bruker maXis 433, Bruker, Billerica, MA, USA)에 의해 확인되었다. MS 분석을 위해 샘플을 N-글리코시다아제 F(Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 탈당화시킨 후 2% 포름산, 40% 아세토니트릴로 탈염시켰다.

[0540]

**표 2: 다양한 위치에 Q-태그가 있는 항체 mAb-5에 대한 형광 염료의 접합 효율**

Q 태그 위치 ↓	접합 효율 [DAR] →	mAb-5 (mTfR) DAR(HIC)
HC118		1.8
HC177		1.8
HC297		1.7
HC341		1.8
HC401		2.0
LC110		1.4
LC143		1.3
LC214		1.5

[0541]

[0542]

**실시예 3**

[0543]

**본원 발명에 따른 변형된 항체와 핵산의 KalbTG 접합**

[0544]

**안티센스 올리고뉴클레오티드의 합성**

[0545]

단일 가닥 LNA 올리고뉴클레오티드는 표준 포스포라미디트 화학을 이용하여 합성되었다. DNA와 LNA 포스포라미디트 및 모든 표준 시약은 Merck KGaA(Darmstadt, Germany)로부터 구입되었다. K-태그 펩티드는 Schafer-N Aps(Copenhagen, Denmark) 및 Biosyntan(Berlin, Germany)에 의해 맞춤 합성되었다.

[0546]

올리고뉴클레오티드는 ÄKTA Oligopilot(GE Healthcare, Brondby, Denmark)의 NittoPhase HL UnyLinker 350 지지체(Kinovate, Oceanside, CA)에서 130 mmol 규모로 합성되었다. 합성 후, 올리고뉴클레오티드를 하룻밤 동안

지지체로부터 절단하였다. 올리고뉴클레오티드를 이온 교환 크로마토그래피로 정제하고 Millipore 막을 이용하여 탈염하였다. 동결건조 후, 화합물을 최종적으로 액체 크로마토그래피-질량 분석법(역상 및 전기분무 이온화-질량 분석법)으로 특성화하였다.

[0547] 올리고뉴클레오티드는 K-태그(1-단계 반응)에 접합하기 위해 각각의 링커에 또는 클릭 화학 접합(2-단계 반응)을 위해 수용자 부분에 접합되었다. 이어서, 접합체를 아래에 기재된 바와 같이 역상 HPLC에 의해 직접 정제하였다.

[0548] 아세톤 중 2% 과염소산리튬으로 링커 올리고뉴클레오티드를 침전시킨 후, 생성된 침전물을 아세톤으로 세척하고 진공하에 건조시킨 후 PBS에 재용해시켰다. 1.5 당량의 K-태그 펩티드를 PBS에 녹인 후 첨가하였다. 실온에서 1 시간 후, 반응 혼합물을 역상 HPLC로 직접 정제하였다.

[0549] 위의 두 반응 모두 0.1M 아세트산암모늄 및 아세토니트릴을 용리액으로 이용하여 Waters XBridge Peptide BEH C18 OBD Prep 칼럼, 300 Å, 10 µm, 10 mm X 150 mm에서 역상 HPLC로 정제되었다. 폴링된 분획물을 동결건조시키고 물에 재용해시킨 후 수성 NaOH를 이용하여 pH를 pH 7.0으로 조정하였다. 최종 동결건조 후, 화합물을 최종적으로 액체 크로마토그래피-질량 분석법(역상 및 전기분무 이온화-질량 분석법)으로 특성화하였다.

[0550] Q-태그가 있는 항체에 대한 LNA-ASO의 효소적 접합

[0551] *KalbTG*를 이용한 1-단계 접합

[0552] Q-태그가 포함된 정제된 항체를 투석을 통해 접합 완충액(약 150 mM 염화물 이온을 포함하는 히스티딘 완충액, pH 7.5)으로 옮겼다. *KalbTG* 반응을 위해 항체를 과량의 K-태그된 올리고뉴클레오티드와 혼합하고 *KalbTG*(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 진탕하면서 37°C에서 인큐베이션한 후, 용액에 10 mM 황산암모늄을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 접합되지 않은 페이로드와 잔류 효소를 제거하기 위해, 접합된 변형된 항체를 PBS, 250 mM 아르기닌, pH 7.5에서 Superdex 200<sup>TM</sup> 칼럼(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 이용한 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 접합체를 -80°C에서 보관하였다.

[0553] *KalbTG* 및 클릭 화학을 이용한 2-단계 접합

[0554] Q-태그가 포함된 정제된 항체를 투석을 통해 접합 완충액(NaCl을 포함하는 히스티딘 완충액, pH 8.5)으로 옮겼다. *KalbTG* 반응을 위해 항체를 클릭 접합의 첫 번째 부분을 포함하는 과량의 K-태그된 링커(10x 몰 과량)와 혼합하고 *KalbTG*를 첨가하였다. 반응 혼합물을 진탕하면서 37°C에서 인큐베이션한 후, 용액에 10 mM 황산암모늄을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 접합되지 않은 링커와 잔류 효소를 제거하기 위해, 접합된 변형된 항체를 PBS, 250 mM 아르기닌, pH 7.5에서 Superdex 200<sup>TM</sup> 칼럼(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 이용한 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 항체-링커 접합체를 PBS, 250 mM 아르기닌, pH 7.5 중 클릭 접합의 각각의 다른 부분에 접합된 과량의 올리고뉴클레오티드에 첨가하고, 반응 혼합물을 진탕하면서 실온에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 항체-올리고뉴클레오티드 접합체를 위에서 설명한 대로 크기 배제 크로마토그래피로 정제하고, 정제된 접합체를 -80°C에서 보관하였다.

[0555] 접합체 분석

[0556] 올리고뉴클레오티드 접합체의 정량화를 SoloVPE 시스템(C Technologies, Bridgewater, NJ, USA)을 이용하여 260, 280 및 350 nm에서 UV/Vis 분광법으로 수행하였다. 접합체 농도와 정량적 약물-대-항체 비율(DAR)을 Lambert-Beer 방정식을 이용하여 계산하였다. 또한, 정성적 DAR 측정은 아래의 실시예 4에 기재된 바와 같이 소수성 상호작용 크로마토그래피로 수행하였다. 접합체의 순도를 Caliper LabChip® GXII Touch<sup>TM</sup> 단백질 특성화 시스템(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)을 이용하여 변성 및 환원 조건하에서 CE-SDS로 분석하였다. 응집체 함량을 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Ultimate 3000 HPLC 시스템, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 M KCl, pH 6.2로 평형화된 TSKgel UP-SW3000 분석 크기 배제 칼럼(Tosoh Bioscience, Griesheim, Germany)을 이용한 SEC로 결정하였다. 접합체의 동일성은 ESI-Q-ToF-MS(Bruker maXis 433, Bruker, Billerica, MA, USA)에 의해 확인되었다. MS 분석을 위해 샘플을 N-글리코시다아제 F(Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 탈당화시킨 후 2% 포름산, 40% 아세토니트릴로 탈염시켰다.

[0557] 표 3: 다양한 위치에 Q-태그가 있는 다양한 항체에 대한 15개 또는 20개 뉴클레오티드로 구성된 핵산의 접합 효율

Q 태그 위치 ↓ [DAR2] →	mAb-1 (CD163)	mAb-2 (HER2)		mAb-4 (TfR)
	(HIC)	(HIC)	(UV-vis)	(HIC)
HC118	1.5	1.9	1.8	n.d.
HC177	2.0	1.9	1.8	n.d.
HC297 비대칭 대칭	n.d. 2.0	n.d. 1.9	n.d. 1.7	0.9 1.9
HC341	2.0	1.8	1.8	n.d.
HC401	1.9	1.8	1.7	n.d.
HC446 비대칭 대칭	n.d. 2.0	n.d. 1.9	n.d. 1.8	0.9 1.8
LC110	2.0	1.8	1.7	n.d.
LC143	1.9	1.9	1.7	n.d.
LC214 비대칭 대칭	n.d. 2.0	n.d. 1.8	n.d. 1.7	1.0 n.d.

[0558]

[0559]

n.d = 결정되지 않음

[0560]

변형된 항체의 접합은 도입된 Q-태그의 위치에 의해 영향을 받는다. 위치 LC110, LC143, LC214, HC118, HC177, HC297 및 HC341 뒤에 도입으로 최고 접합 효율이 나타났다.

[0561]

표 4: 다양한 Q-태그를 갖는 변형된 항체의 발현 수율 및 접합 효율

Q-태그 위치 Q-태그 서열 ↓	HC297		HC446		LC143	
	수율	접합 효율	수율	접합 효율	수율	접합 효율
FYGGQ (서열 번호: 11)	90	1.6/1.5	144	1.8/1.7	42	0.7/0.6
FWRQR (서열 번호: 12)	136	1.7/1.6	114	1.8/1.7	12.2	1.1/0.8
YRQRT (서열 번호: 13)	102	1.7/1.7	0	n.d.	28	1.8/1.7
IRQRQ (서열 번호: 14)	132	3.1/3.1	124	2.8/2.8	44	2.6/2.2
FRYRQ (서열 번호: 15)	136	1.6/1.7	62	1.5/1.3	22	1.7/1.7

[0562]

[0563]

n.d. = 결정되지 않음

[0564]

**실시예 4**

[0565]

**본원 발명에 따른 KalbTG 접합된 변형된 항체의 소수성 상호작용 크로마토그래피**

[0566]

소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Ultimate 3000 HPLC 시스템, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 TSKgel 부틸-NPR 칼럼(2.5 μm, 4.6 x 35 mm, TOSOH Bioscience, Tokyo, Japan)을 이용하여 1 mL/분의 유속으로 수행하였다. 칼럼을 용리액 A(20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 이수화물, 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0)로 평형화하고 60 μg의 각 샘플을 칼럼에 로딩하였다. 이어서, 용리액 A와 용리액 B 사이의 구배(20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 이수화물, 25%(v/v) 이소프로판올, pH 7.0)를 적용하였다.

[0567]

구배:

[0568]

0분 5% B

[0569]

0-30분 5% B → 80% B

- [0570] 30 - 34분 80% B -> 100% B
- [0571] 34 - 44분 100% B
- [0572] 45 - 55분 0% B
- [0573] 용출 프로파일은 280 nm에서 흡광도를 연속적으로 측정하여 얻었다. 약물 대 항체 비율(DAR)은 Chromeleon 7.2(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용한 피크 적분에 의해 결정되었다.
- [0574] 예시적인 결과는 도 1에 나타나 있다.
- [0575] 표 5: 15개 뉴클레오티드(mAb-2)와 20개 뉴클레오티드(mAb-4)로 구성된 핵산에 접합된 변형된 항체의 체류 시간.

상대 체류 시간 → Q 태그 위치 ↓	mAb-2 (HER2)		mAb-4 (TfR)	
	접합되지 않음	핵산에 접합	접합되지 않음	핵산에 접합
mAb-2(wt)(참조)	0.246	n.d.	0.023	n.d.
HC118	0.311	0.685	n.d.	n.d.
HC177	0.221	0.647	n.d.	n.d.
HC297 비대칭 대칭	n.d. 0.233	n.d. 0.446	0.023 0.070	0.472 0.670
HC341	0.269	0.566	n.d.	n.d.
HC401	0.247	0.634	n.d.	n.d.
HC446 비대칭 대칭	n.d. 0.215	n.d. 0.745	0.015 0.001	0.845 0.994
LC110	0.402	0.732	n.d.	n.d.
LC143	0.291	0.691	n.d.	n.d.
LC214	0.246	0.501	0.020	0.566

- [0576]
- [0577] 친수성 마커의 체류 시간은 9.25분이었고, 소수성 마커의 상대 체류 시간은 각각, 25.9분(mAb-2) 또는 9.00분 및 24.7분(mAb-4)이었다.
- [0578] 접합체의 소수성은 도입된 Q-태그의 위치에 의해 영향을 받는다. 위치 LC110, LC214 및 HC297 뒤에 도입은 비접합 항체 대 접합 변형된 항체의 최대 2배 변화를 초래한 반면, HC177은 검사된 모든 내부 삽입 부위 중 상대 체류 시간이 가장 짧았다.
- [0579] **실시예 5**
- [0580] **생체내 분석**
- [0581] **연구 설계**
- [0582] 인간 FcRn 유전자도입 생쥐(hFcRn Tg32 +/- 생쥐)를 시험할 12개의 서로 다른 화합물에 따라 12개의 코호트(코호트별 n = 3)로 무작위로 할당하였다.
- [0583] 모든 화합물은 항체 Fc 영역 단편(힌지 - CH2 - CH3; DKTHTCP PCP APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALGA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD S DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK; 서열 번호: 33)과 함께 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄 쌍의 동족 쌍을 포함하는 외팔 항-트랜스페린 수용체 항체를 기반으로 한다.
- [0584] Q-태그에는 해당 위치 뒤에 삽입된 아미노산 서열 GGGSYRYRQGGGS(서열 번호: 25)가 있었다.
- [0585] 화합물 1: 접합된 핵산이 없는 참조

- [0586] 화합물 2: 전장 중쇄의 위치 HC118 뒤에 삽입된 Q-태그에 접합된 1개의 핵산
- [0587] 화합물 3: 전장 중쇄의 위치 HC177 뒤에 삽입된 Q-태그에 접합된 1개의 핵산
- [0588] 화합물 4: 전장 중쇄의 위치 HC295 뒤에 삽입된 Q-태그에 접합된 1개의 핵산
- [0589] 화합물 5: 전장 중쇄의 위치 HC297 뒤에 삽입된 Q-태그에 접합된 1개의 핵산
- [0590] 화합물 6: 전장 중쇄의 위치 HC341 뒤에 삽입된 Q-태그에 접합된 1개의 핵산
- [0591] 화합물 7: 전장 중쇄의 위치 HC401 뒤에 삽입된 Q-tag에 접합된 1개의 핵산
- [0592] 화합물 8: 전장 중쇄의 위치 HC446 뒤에 삽입된 Q-태그에 접합된 1개의 핵산
- [0593] 화합물 9: 위치 LC214 뒤에 삽입된 Q-태그에 접합된 1개의 핵산
- [0594] 화합물 10: 전장 중쇄의 위치 HC297 뒤에 삽입된 Q-태그 및 Fc-영역 단편에 접합된 2개의 핵산
- [0595] 화합물 11: 전장 중쇄의 위치 HC341 뒤에 삽입된 Q-태그 및 Fc-영역 단편에 접합된 2개의 핵산
- [0596] 화합물 12: 전장 중쇄의 위치 HC446 뒤에 삽입된 Q-태그 및 Fc-영역 단편에 접합된 2개의 핵산
- [0597] 화합물을 20 mM 히스티딘(pH 6) 중 용액으로 제제화하고 20 mg/kg(체중)의 단일 명목 용량 및 2 mL/kg의 투약 용적으로 정맥내 투여하였다(예외적으로 화합물 1은 3.3 mL/kg의 용량 용적 및 16.7 mg/kg의 용량 수준으로 투여되었다). 제제는 각각 2개의 측면 꼬리 정맥 중 하나에 느린 일시 주사로 주입되었다. 꼬리 정맥 천자를 통해 혈액의 연속 마이크로샘플링(20  $\mu$ L/시점/생쥐)을 수행하였다. K3-EDTA 코팅된 Minivette® POCT에 투여 후 5분, 1시간, 7시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간 및 336시간에 혈액 샘플을 수집하였다. Minivette®이 채워지면 혈액을 즉시 0.2 ml PCR Eppendorf Tube®로 옮기고 4°C에서, 대략 10,000 xg로 대략 5분 동안 원심분리하였다. 최종 샘플링을 위해 심장 천자에 의해 혈액을 수집하고 K3-EDTA 코팅된 폴리프로필렌 튜브로 옮겼다. 추가 처리 및 분석을 위해 혈장 샘플을 -20°C에 보관하였다.
- [0598] 생분석
- [0599] 화합물의 약동학(PK)을 2가지 별도의 방법: 항체 성분을 정량화하는 한 가지 방법 및 접합체의 잠금 핵산 성분을 정량화하는 두 번째 방법으로 측정하였다.
- [0600] 혈장 샘플에서 PK를 측정하기 위해 Stubenrauch 등에 기초한 비-GLP 조건하에 cobas® e411(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 기기에서 인간 CH2 도메인에 특이적인 일반 전기화학발광 면역검정(ECLIA) 방법을 이용하였다. 간단히 말하면, 검사 샘플을 첫 번째 검출 항체(비오틴닐화), 두 번째 검출 항체(루테닐화) 및 SA-비드와 함께 검출 용기에 단계적으로 첨가하였다. 각 화합물에 대한 특정 표준 곡선의 교정 범위는 1% C57BL/6 생쥐 혈장에서 0.69 ng/mL 내지 1,500 ng/mL 분석 농도이었다. 분석 민감도는 100% 혈장에서 69 ng/mL이었다. 표준 곡선, 품질 관리 및 샘플 희석액은 C57BL/6 생쥐 혈장을 포함하는 분석 완충액에서 1% 매트릭스 농도가 되도록 준비되었다. 혈장 샘플은 두 가지 다른 희석 비율(1:100 내지 1:800)로 분석되었다.
- [0601] 비-GLP 조건하에서 혼성화 효소 결합 면역흡착 분석(hELISA)을 이용하여 동일한 혈장 샘플을 분석하였다.
- [0602] hELISA 방법의 경우, 비접합 핵산을 참조로 이용하여 표준, 품질 관리 및 사전 희석 샘플을 준비하였다. 비오틴닐화 포획 올리고뉴클레오티드 프로브 및 디옥시게닐화 검출 올리고뉴클레오티드 프로브를 혼성화를 위해 첨가하고 스트렙타비딘 코팅된 미세역가 플레이트로 옮겼다. 검출을 위해 다중클론 항-디옥시게닌-POD Fab 단편과 TMB 용액을 이용하였다. 색상 강도는 450 nm(690 nm 기준 파장)에서 광도계로 분석되었다. 색상 강도는 검사 샘플 내의 분석물 농도에 비례하였다. 1% C57BL/6 생쥐 혈장 내 0.8 pM 내지 111 pM 분석 농도에 대한 표준 곡선의 교정 범위. 혈장 샘플의 분석을 위해 표준 곡선, 품질 관리, 모든 희석액은 C57BL/6 생쥐 혈장을 포함하는 분석 완충액에서 1% 매트릭스 농도가 되도록 준비되었다. 혈장 샘플은 두 가지 다른 희석 비율(1:100 내지 1:400,000)로 분석되었다. 분석 민감도는 100% 혈장에서 90 pM이었다.
- [0603] 결과

[0604] 표 6: 항체-핵산 접합체에 대해 결정된 청소율.

접합 부위	청소 항체 부분 (ml/일/kg) [CV]	청소 ASO 부분 (ml/일/kg) [CV]
화합물 1	23 [4.7%]	-
화합물 2	83.2 [11.9%]	241 [7.8%]
화합물 3	<b>20.6 [17.4%]</b>	<b>92.1 [14.4%]</b>
화합물 4	10.8 [25.3%]	117 [15.4%]
화합물 5	<b>14.4 [15.5%]</b>	<b>85.7 [9.7%]</b>
화합물 6	33.9 [3.9%]	231 [7.9%]
화합물 7	29.4 [8.2%]	166 [21.8%]
화합물 8	46.2 [13.4%]	279 [4.6%]
화합물 9	<b>23.9 [4%]</b>	<b>105 [15.4%]</b>
화합물 10	<b>28.6 [14.5%]</b>	<b>145 [15.2%]</b>
화합물 11	214 [20.3%]	219 [4.8%]
화합물 12	152 [29.7%]	190 [14.7%]

[0605]

[0606] 참고문헌

[0607] - Adem, Y.T., et al., "Auristatin Antibody Drug Conjugate Physical Instability and the Role of Drug Payload", *Bioconj. Chem.* 25 (2014) 656-664; <https://doi.org/10.1021/bc400439x>.

[0608] - Agarwal, P. and Bertozzi, C. R., "Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development", *Bioconj. Chem.* 26 (2015) 176-192; doi:10.1021/bc5004982.

[0609] - Ando, H., et al., "Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms", *Agri. Biol. Chem.* 53 (2014) 2613-2617; doi:10.1080/00021369.1989.10869735.

[0610] - Chichili, V.P.R., et al., "Linkers in the structural biology of protein-protein interactions", *Prot. Sci.* 22 (2013) 153-167; <https://doi.org/10.1002/pro.2206>.

[0611] - Steffen, W., et al., "Discovery of a microbial transglutaminase enabling highly site-specific labeling of proteins", *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 15622-15635; doi:10.1074/jbc.M117.797811.

[0612] - Stubenrauch, K., et al., "Evaluation of an immunoassay for human-specific quantitation of therapeutic antibodies in serum samples from non-human primates", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 1003-1008; doi: 10.1016/j.jpba.2009.01.030.

[0613] - Strop, P., et al., "Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates", *Chem. Biol.* 20 (2013) 161-167; doi:10.1016/j.chembiol.2013.01.010.

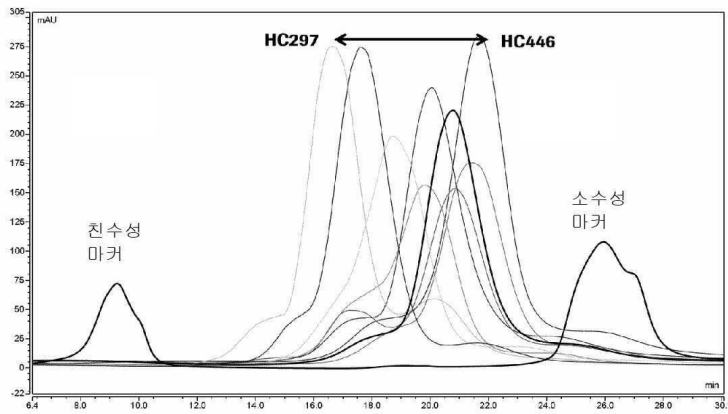
[0614] - WO 2021/174091

[0615] - WO 2017/102759

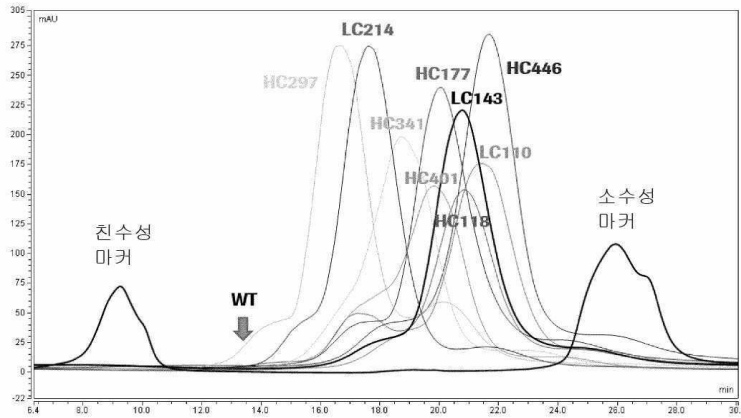
[0616] - Zhou, Q. and Kim, J., "Advances in the Development of Site-Specific Antibody-Drug Conjugation", *Anticancer Agents Med. Chem.* 15 (2015) 828-836; doi: 10.2174/1871520615666150302125448.

도면

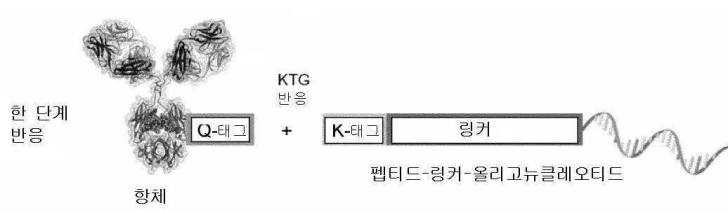
도면1a



도면1b



도면2



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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