



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0127854
(43) 공개일자 2014년11월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) **C12N 15/13** (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) **C12P 21/08** (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7024750
- (22) 출원일자(국제) 2013년02월08일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년09월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/025365
- (87) 국제공개번호 WO 2013/119966
국제공개일자 2013년08월15일
- (30) 우선권주장
61/597,486 2012년02월10일 미국(US)

- (71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
브라니크, 베른트
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
이튼, 댄 엘.
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이귀동

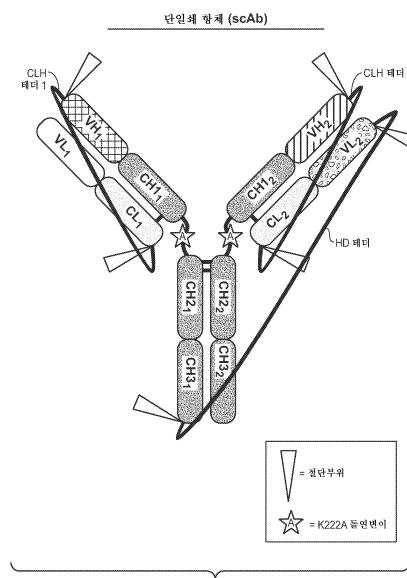
전체 청구항 수 : 총 214 항

(54) 발명의 명칭 단일-쇄 항체 및 다른 이종다량체

(57) 요약

본 발명은 1, 2 또는 3개의 테더를 사용하여 구축된 조작된 이종다량체 단백질 복합체, 및 다양한 결합 특성을 갖는 이러한 복합체, 예컨대 항체의 제조, 사용 및 정제 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

크리스텐슨, 에린 에이치.

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

우, 젠성

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

특허청구의 범위

청구항 1

하기 성분:

- (a) 제1 VH (VH_1) 도메인 및 제2 VH (VH_2) 도메인,
- (b) HD 테더; 및
- (c) 하나 이상의 중쇄 불변 도메인

을 포함하는 단일 폴리펩티드를 포함하며,

여기서 상기 하나 이상의 중쇄 불변 도메인은 제1 CH2 ($CH2_1$) 도메인, 제1 CH3 ($CH3_1$) 도메인, 제2 CH2 ($CH2_2$) 도메인 및 제2 CH3 ($CH3_2$) 도메인으로부터 선택되고;

상기 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VH_1 -임의의 $CH2_1$ -임의의 $CH3_1$ -HD 테더- VH_2 -임의의 $CH2_2$ -임의의 $CH3_2$ 와 같이 위치하는 것인

단일-쇄 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 중쇄 불변 도메인 중 적어도 하나가 또 다른 중쇄 불변 도메인과 쌍을 형성하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 폴리펩티드가

- (a) 상기 VH_1 및 $CH2_1$ 도메인 사이에 위치한 제1 헌지 ($헌지_{11}$) 도메인,
- (b) 상기 VH_2 및 $CH2_2$ 도메인 사이에 위치한 제2 헌지 ($헌지_{21}$) 도메인; 또는
- (c) 제1 헌지 ($헌지_{11}$) 도메인 및 제2 헌지 ($헌지_{21}$) 도메인 둘 다

를 추가로 포함하며, 여기서 상기 도메인은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VH_1 -임의의 헌지₁₁-임의의 $CH2_1$ -임의의 $CH3_1$ -HD 테더- VH_2 -임의의 헌지₂₁-임의의 $CH2_2$ -임의의 $CH3_2$ 와 같이 위치하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 제1 CH1 ($CH1_1$) 도메인 또는 제2 CH1 ($CH1_2$) 도메인 또는 둘 다를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VH_1 -임의의 $CH1_1$ -임의의 헌지₁₁-임의의 $CH2_1$ -임의의 $CH3_1$ -HD 테더- VH_2 -임의의 $CH1_2$ -임의의 헌지₂₁-임의의 $CH2_2$ -임의의 $CH3_2$ 와 같이 위치한 도메인을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 제1 VL (VL_1) 도메인 또는 제2 VL (VL_2) 도메인 또는 둘 다를 추가로 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 VL₁ 도메인 및 VL₂ 도메인을 포함하며, 여기서 상기 VL₁ 도메인은 제1 테더 (CLH 테더₁)에 의해 상기 VH₁ 도메인에 연결되고, 상기 VL₂ 도메인은 제2 테더 (CLH 테더₂)에 의해 상기 VH₂ 도메인에 연결되고, 상기 도메인은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VL₁-CLH 테더₁-VH₁-임의의 CH1₁-임의의 힌지₁-CH2₁-CH3₁-HD 테더-VL₂-CLH 테더₂-VH₂-임의의 CH1₂-임의의 힌지₂-CH2₂-CH3₂와 같이 위치하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 제1 CL (CL₁) 도메인 또는 제2 CL (CL₂) 도메인 또는 둘 다를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VL₁-임의의 CL₁-CLH 테더₁-VH₁-임의의 CH1₁-임의의 힌지₁-임의의 CH2₁-임의의 CH3₁-HD 테더-VL₂-임의의 CL₂-CLH 테더₂-VH₂-임의의 CH1₂-임의의 힌지₂-임의의 CH2₂-임의의 CH3₂와 같이 위치한 CL₁ 도메인 또는 CL₂ 도메인을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 10

서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 다음과 같이 위치한 하기 도메인: VL₁-CL₁-CLH 테더₁-VH₁-CH1₁-힌지₁-CH2₁-CH3₁-HD 테더-VL₂-CL₂-CLH 테더₂-VH₂-CH1₂-힌지₂-CH2₂-CH3₂를 포함하는 단일 폴리펩티드를 포함하는 단일-쇄 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더가 15-100개 아미노산 길이인 단일-쇄 항체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 HD 테더가 30-39개 아미노산 길이인 단일-쇄 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더가 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 HD 테더가 GGS 반복부를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 HD 테더가 8 내지 9개의 GGS 반복부 (서열 19)를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더가 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 아미노산 서열을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 상기 엔도펩티다제에 의해 제자리에서 절단되는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 정체 후에 상기 엔도펩티다제의 첨가시에 절단되는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 HD 테더가 상기 HD 테더의 N- 및 C-말단에 위치한 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 2개의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린, 우로키나제, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPa), 게네나제, Lys-C, Arg-C, Asp-N, Glu-C, 인자 Xa, 담배 식각 바이러스 프로테아제 (TEV), 엔테로키나제, 인간 리노바이러스 C3 프로테아제 (HRV C3) 및 키니노게나제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린인 단일-쇄 항체.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 HD 테더가 상기 HD 테더의 N- 및 C-말단에 위치한 2개의 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하며, 여기서 상기 엔도펩티다제 절단 부위 중 하나는 푸린 절단 부위인 단일-쇄 항체.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 24

제21항 또는 제22항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RHRQPR (서열 10)을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 엔도펩티다제 절단 부위 중 하나가 Lys-C 절단 부위인 단일-쇄 항체.

청구항 26

제7항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 또는 상기 CLH 테더₂가 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 또는 상기 CLH 테더₂가 GGS 반복부를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 및 상기 CLH 테더₂가 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 및 상기 CLH 테더₂가 GGS 반복부를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 및 상기 CLH 테더₂가 각각 10-80개 아미노산 길이인 단일-쇄 항체.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 및 상기 CLH 테더₂가 각각 20-40개 아미노산 길이인 단일-쇄 항체.

청구항 32

제7항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 또는 상기 CLH 테더₂가 엔도펩티다제에 의해 절단 가능한 아미노산 서열을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 상기 엔도펩티다제에 의해 제자리에서 절단되는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 34

제32항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 정제 후에 상기 엔도펩티다제의 첨가시에 절단되는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 35

제32항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 및 상기 CLH 테더₂가 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 아미노산 서열을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 36

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린, 우로키나제, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA), 게네나제, Lys-C, Arg-C, Asp-N, Glu-C, 인자 Xa, 담배 식각 바이러스 프로테아제 (TEV), 엔테로키나제, 인간 리노바이러스 C3 프로테아제 (HRV C3) 및 키니노케나제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린인 단일-쇄 항체.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 또는 상기 CLH 테더₂가 상기 CLH 테더₁ 또는 상기 CLH 테더₂의 N- 및 C-말단에 위치한 2개의 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하며, 여기서 상기 엔도펩티다제 절단 부위는 둘 다 푸린 절단 부위인 단일-쇄 항체.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 CLH 테더₁ 및 상기 CLH 테더₂가 각각 상기 CLH 테더₁ 및 상기 CLH 테더₂의 N- 및 C-말단에 위치한 2개의 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하며, 여기서 상기 엔도펩티다제 절단 부위는 푸린 절단 부위인 단일-쇄 항체.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 41

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RHRQPR (서열 10)을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 42

제3항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 헌지 도메인 또는 상기 제2 헌지 도메인이 인간 IgG1의 Glu216 내지 Pro230을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 제1 힌지 도메인 또는 상기 제2 힌지 도메인이 Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위가 불활성화 돌연변이를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 불활성화 돌연변이가 K222A 치환 (EU 넘버링 시스템)인 단일-쇄 항체.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 단일특이적 단일-쇄 항체인 단일-쇄 항체.

청구항 47

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 또는 다중특이적 단일-쇄 항체인 단일-쇄 항체.

청구항 48

제47항에 있어서, 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 단일-쇄 항체.

청구항 49

제47항에 있어서, 동일한 항원 상의 2개 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 단일-쇄 항체.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 Fc 성분 상의 기능적 모이어티에 접합된 불변 영역을 포함하는 단일-쇄 항체.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 또는 CLH 테더 중 하나 이상의 절단 후에 엑소펩티다제를 위한 하나 이상의 절단 부위를 포함하는 단일-쇄 항체.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 하나 이상의 절단 부위가 상기 엑소펩티다제에 의해 제자리에서 절단되는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 53

제51항에 있어서, 상기 하나 이상의 절단 부위가 정제 후에 상기 엑소펩티다제의 첨가시에 절단되는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 54

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엑소펩티다제가 카르복시펩티다제 A, 카르복시펩티다제 B, 혈장 카르복시펩티다제 B, 카르복시펩티다제 D, 카르복시펩티다제 E, 카르복시펩티다제 M, 카르복시펩티다제 N 및 카르복시펩티다제 Z로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 엑소펩티다제가 염기성 잔기에서 절단하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 엑소펩티다제가 카르복시펩티다제 B인 단일-쇄 항체.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH3_1 및 CH3_2 도메인이 각각 돌출부 또는 함몰부를 포함하며, 여기서 상기 CH3_1 도메인 내의 상기 돌출부 또는 함몰부는 각각 상기 CH3_2 도메인 내의 상기 함몰부 또는 돌출부에 위치할 수 있는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 CH3_1 및 CH3_2 도메인이 상기 돌출부 및 함몰부 사이의 인터페이스에서 만나는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 59

제8항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가

- (a) 상기 CH1_1 도메인 또는 상기 CH1_2 도메인 또는 둘 다 내의 돌출부 또는 함몰부, 및
- (b) 상기 CL_1 도메인 또는 상기 CL_2 도메인 또는 둘 다 내의 돌출부 또는 함몰부

를 추가로 포함하며; 여기서

- (c) 상기 CH1_1 도메인 내의 상기 돌출부 또는 함몰부는 각각 상기 CL_1 도메인 내의 상기 함몰부 또는 돌출부에 위치할 수 있거나,
- (d) 상기 CH1_2 도메인 내의 상기 돌출부 또는 함몰부는 각각 상기 CL_2 도메인 내의 상기 함몰부 또는 돌출부에 위치할 수 있거나; 또는
- (e) (c) 및 (d) 둘 다인 것인 단일-쇄 항체.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 CH1_1 및 CL_1 도메인, 상기 CH1_2 및 CL_2 도메인, 또는 모든 4개의 상기 도메인이 상기 돌출부 및 함몰부 사이의 인터페이스에서 만나는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH2_1 또는 CH2_2 도메인 중 하나 이상이 항체 이펙터 기능에 영향을 미치는 CH2 도메인 돌연변이를 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 62

제61항에 있어서, 항체 이펙터 기능에 영향을 미치는 상기 CH2 도메인 돌연변이가 N297 돌연변이인 단일-쇄 항체.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항의 단일-쇄 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 64

제63항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 65

제64항의 벡터를 포함하는 속주 세포.

청구항 66

제65항에 있어서, 포유동물 세포인 속주 세포.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 CHO 세포인 숙주 세포.

청구항 68

제65항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 원핵 세포가 이. 콜라아이(*E. coli*) 세포인 숙주 세포.

청구항 70

배양 배지에서 제64항의 백터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제62항 중 어느 한 항의 단일-쇄 항체를 생산하는 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 숙주 세포 또는 상기 배양 배지로부터 상기 단일-쇄 항체를 회수하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 72

하기 성분:

- (a) 각각 VL 도메인 및 CL 도메인을 포함하는 제1 및 제2 동일 폴리펩티드; 및
- (b) (i) 제1 VH (VH_1) 및 제2 VH (VH_2) 도메인,
 - (ii) HD 태더,
 - (iii) 제1 헌지 ($Hinge_1$) 도메인 또는 제2 헌지 ($Hinge_2$) 도메인 또는 둘 다; 및
 - (iv) 하나 이상의 중쇄 불변 도메인

을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하며,

여기서 상기 하나 이상의 중쇄 불변 도메인은 제1 CH1 ($CH1_1$) 도메인, 제1 CH2 ($CH2_1$) 도메인, 제1 CH3 ($CH3_1$) 도메인, 제2 CH1 ($CH1_2$) 도메인, 제2 CH2 ($CH2_2$) 도메인 및 제2 CH3 ($CH3_2$) 도메인으로부터 선택되고;

상기 제3 폴리펩티드의 상기 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VH_1 -임의의 $CH1_1$ -임의의 헌지₁-임의의 $CH2_1$ -임의의 $CH3_1$ -HD 태더- VH_2 -임의의 $CH1_2$ -임의의 헌지₂-임의의 $CH2_2$ -임의의 $CH3_2$ 와 같이 위치하는 것인 항체.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드의 상기 VL 및 CL 도메인이 각각 상기 VH_1 및 $CH1_1$ 도메인과 회합하고, 상기 제2 폴리펩티드의 상기 VL 및 CL 도메인이 각각 상기 VH_2 및 $CH1_2$ 도메인과 회합하는 것인 항체.

청구항 74

하기 성분:

- (a) 제1 VL (VL_1) 도메인 및 제1 CL (CL_1) 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드;
- (b) (i) 제1 VH (VH_1) 및 a 제2 VH (VH_2) 도메인,
 - (ii) HD 태더,

(iii) 제2 VL (VL_2) 및 제2 CL (CL_2) 도메인,

(iv) CLH 테더,

(v) 제1 헌지 (H_{11}) 도메인 또는 제2 헌지 (H_{12}) 도메인 또는 둘 다; 및

(vi) 하나 이상의 중쇄 불변 도메인

을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하며,

여기서 상기 하나 이상의 중쇄 불변 도메인은 제1 CH1 (CH_{11}) 도메인, 제1 CH2 (CH_{21}) 도메인, 제1 CH3 (CH_{31}) 도메인, 제2 CH1 (CH_{12}) 도메인, 제2 CH2 (CH_{22}) 도메인 및 제2 CH3 (CH_{32}) 도메인으로부터 선택되고;

상기 제2 폴리펩티드의 상기 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VH_1 -임의의 CH_{11} -임의의 헌지₁₁-임의의 CH_{21} -HD 테더- VL_2 - CL_2 -CLH 테더- VH_2 -임의의 CH_{12} -임의의 헌지₁₂-임의의 CH_{22} -임의의 CH_{32} 와 같이 위치하는 것인

항체.

청구항 75

하기 성분:

(a) (i) 제1 VL (VL_1) 도메인 및 제1 CL (CL_1) 도메인,

(ii) CLH 테더,

(iii) 제1 VH (VH_1) 및 a 제2 VH (VH_2) 도메인,

(iv) HD 테더,

(v) 제1 헌지 (H_{11}) 도메인 또는 제2 헌지 (H_{12}) 도메인 또는 둘 다; 및

(vi) 하나 이상의 중쇄 불변 도메인

을 포함하는 제1 폴리펩티드; 및

(b) 제2 VL (VL_2) 도메인 및 제2 CL (CL_2) 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드

를 포함하며, 여기서 상기 제1 폴리펩티드의 상기 하나 이상의 중쇄 불변 도메인은 제1 CH1 (CH_{11}) 도메인, 제1 CH2 (CH_{21}) 도메인, 제1 CH3 (CH_{31}) 도메인, 제2 CH1 (CH_{12}) 도메인, 제2 CH2 (CH_{22}) 도메인 및 제2 CH3 (CH_{32}) 도메인으로부터 선택되고;

상기 제1 폴리펩티드의 상기 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VL_1 - CL_1 -CLH 테더- VH_1 -임의의 CH_{11} -임의의 헌지₁₁-임의의 CH_{21} -HD 테더- VH_2 -임의의 CH_{12} -임의의 헌지₁₂-임의의 CH_{22} -임의의 CH_{32} 와 같이 위치하는 것인

항체.

청구항 76

제72항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 중쇄 불변 도메인 중 적어도 하나가 또 다른 중쇄 불변 도메인과 쌍을 형성하는 것인 항체.

청구항 77

제72항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더가 15-100개 아미노산 길이인 항체.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 HD 테더가 30-39개 아미노산 길이인 항체.

청구항 79

제72항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더가 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함하는 것인 항체.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 HD 테더가 GGS 반복부를 포함하는 것인 항체.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 HD 테더가 8 내지 9개의 GGS 반복부 (서열 19)를 포함하는 것인 항체.

청구항 82

제72항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더가 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 상기 엔도펩티다제에 의해 제자리에서 절단되는 것인 항체.

청구항 84

제82항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 정제 후에 상기 엔도펩티다제의 첨가시에 절단되는 것인 항체.

청구항 85

제82항에 있어서, 상기 HD 테더가 상기 HD 테더의 N- 및 C-말단에 위치한 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 2개의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 86

제82항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린, 우로카니제, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPa), 게네나제, Lys-C, Arg-C, Asp-N, Glu-C, 인자 Xa, 담배 식각 바이러스 프로테아제 (TEV), 엔테로카니제, 인간 리노바이러스 C3 프로테아제 (HRV C3) 및 키니노게나제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린인 항체.

청구항 88

제87항에 있어서, 상기 HD 테더가 상기 HD 테더의 N- 및 C-말단에 위치한 2개의 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하며, 여기서 상기 엔도펩티다제 절단 부위 중 하나는 푸린 절단 부위인 항체.

청구항 89

제86항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함하는 것인 항체.

청구항 90

제86항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RHRQPR (서열 10)을 포함하는 것인 항체.

청구항 91

제90항에 있어서, 상기 엔도펩티다제 절단 부위 중 하나가 Lys-C 절단 부위인 항체.

청구항 92

제74항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CLH 테더가 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함하는 것인 항체.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 CLH 테더가 GGS 반복부를 포함하는 것인 항체.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, 상기 CLH 테더가 10-80개 아미노산 길이인 항체.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 CLH 테더가 20-40개 아미노산 길이인 항체.

청구항 96

제74항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CLH 테더가 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 상기 엔도펩티다제에 의해 제자리에서 절단되는 것인 항체.

청구항 98

제96항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 정제 후에 상기 엔도펩티다제의 첨가시에 절단되는 것인 항체.

청구항 99

제96항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린, 우로키나제, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPa), 게네나제, Lys-C, Arg-C, Asp-N, Glu-C, 인자 Xa, 담배 식각 바이러스 프로테아제 (TEV), 엔테로키나제, 인간 리노바이러스 C3 프로테아제 (HRV C3) 및 키니노게나제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 100

제99항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린인 항체.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 CLH 테더가 상기 CLH 테더의 N- 및 C-말단에 위치한 2개의 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하며, 여기서 상기 엔도펩티다제 절단 부위는 둘 다 푸린 절단 부위인 항체.

청구항 102

제99항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함하는 것인 항체.

청구항 103

제99항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RHRQPR (서열 10)을 포함하는 것인 항체.

청구항 104

제72항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 헌지 도메인 또는 상기 제2 헌지 도메인이 인간 IgG1의 Glu216 내지 Pro230을 포함하는 것인 항체.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 제1 헌지 도메인 또는 상기 제2 헌지 도메인이 Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하는 것인 항체.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위가 불활성화 돌연변이를 포함하는 것인 항체.

청구항 107

제106항에 있어서, 상기 불활성화 돌연변이가 K222A 치환 (EU 넘버링 시스템)인 항체.

청구항 108

제72항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 단일특이적 항체인 항체.

청구항 109

제72항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 또는 다중특이적 항체인 항체.

청구항 110

제109항에 있어서, 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 항체.

청구항 111

제110항에 있어서, 동일한 항원 상의 2개 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 항체.

청구항 112

제72항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성제에 접합된 불변 영역을 포함하는 항체.

청구항 113

제72항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더의 절단 후에 엑소펩티다제를 위한 하나 이상의 절단 부위를 포함하는 항체.

청구항 114

제74항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CLH 테더의 절단 후에 엑소펩티다제를 위한 하나 이상의 절단 부위를 포함하는 항체.

청구항 115

제113항 또는 제114항에 있어서, 상기 하나 이상의 절단 부위가 상기 엑소펩티다제에 의해 제자리에서 절단되는 것인 항체.

청구항 116

제113항 또는 제114항에 있어서, 상기 하나 이상의 절단 부위가 정제 후에 상기 엑소펩티다제의 첨가시에 절단되는 것인 항체.

청구항 117

제113항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엑소펩티다제가 카르복시펩티다제 A, 카르복시펩티다제 B, 혈장 카르복시펩티다제 B, 카르복시펩티다제 D, 카르복시펩티다제 E, 카르복시펩티다제 M, 카르복시펩티다제 N 및 카르복시펩티다제 Z로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 118

제117항에 있어서, 상기 엑소펩티다제가 염기성 잔기에서 절단하는 것인 항체.

청구항 119

제118항에 있어서, 상기 엑소펩티다제가 카르복시펩티다제 B인 항체.

청구항 120

제72항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH3_1 및 CH3_2 도메인이 각각 돌출부 또는 함몰부를 포함하며, 여기서 상기 CH3_1 도메인 내의 상기 돌출부 또는 함몰부는 각각 상기 CH3_2 도메인 내의 상기 함몰부 또는 돌출부에 위치할 수 있는 것인 항체.

청구항 121

제120항에 있어서, 상기 CH3_1 및 CH3_2 도메인이 상기 돌출부 및 함몰부 사이의 인터페이스에서 만나는 것인 항체.

청구항 122

제72항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가

(a) 상기 CH1_1 도메인 또는 상기 CH1_2 도메인 또는 둘 다 내의 돌출부 또는 함몰부, 및

(b) 상기 CL_1 도메인 또는 상기 CL_2 도메인 또는 둘 다 내의 돌출부 또는 함몰부

를 추가로 포함하며; 여기서

(c) 상기 CH1_1 도메인 내의 상기 돌출부 또는 함몰부는 각각 상기 CL_1 도메인 내의 상기 함몰부 또는 돌출부에 위치할 수 있거나,

(d) 상기 CH1_2 도메인 내의 상기 돌출부 또는 함몰부는 각각 상기 CL_2 도메인 내의 상기 함몰부 또는 돌출부에 위치할 수 있거나; 또는

(e) (c) 및 (d) 둘 다인 것인 항체.

청구항 123

제122항에 있어서, 상기 CH1_1 및 CL_1 도메인, 상기 CH1_2 및 CL_2 도메인, 또는 모든 4개의 상기 도메인이 상기 돌출부 및 함몰부 사이의 인터페이스에서 만나는 것인 항체.

청구항 124

제72항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH2_1 또는 CH2_2 도메인 중 하나 이상이 항체 이펙터 기능에 영향을 미치는 CH2 도메인 돌연변이를 포함하는 것인 항체.

청구항 125

제124항에 있어서, 상기 항체 이펙터 기능에 영향을 미치는 CH2 도메인 돌연변이가 N297 돌연변이인 항체.

청구항 126

제72항 내지 제125항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 127

제126항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 128

제127항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 129

제128항에 있어서, 포유동물 세포인 숙주 세포.

청구항 130

제129항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 CHO 세포인 숙주 세포.

청구항 131

제128항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

청구항 132

제131항에 있어서, 원핵 세포가 이. 콜라이인 숙주 세포.

청구항 133

배양 배지에서 제127항의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 제72항 내지 제125항 중 어느 한 항의 항체를 생산하는 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 숙주 세포 또는 상기 배양 배지로부터 상기 항체를 회수하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 135

하기 성분:

- (a) 어드헤신,
- (b) 제1 CH₂ (CH₂₁) 도메인 또는 제1 CH₃ (CH₃₁) 도메인 또는 둘 다,
- (c) HD 테더,
- (d) VH 도메인; 및
- (e) CH₁ 도메인, 제2 CH₂ (CH₂₂) 도메인 또는 제2 CH₃ (CH₃₂) 도메인으로부터 선택된 하나 이상의 중쇄 불변 도메인

을 포함하며, 여기서 상기 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: 어드헤신-임의의 CH₂₁-임의의 CH₃₁-HD 테더-VH-임의의 CH₁-임의의 CH₂₂-임의의 CH₃₂와 같이 위치하는 것인 이종다량체.

청구항 136

제135항에 있어서, VL 도메인 및 CL 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 추가로 포함하며, 여기서 상기 VL 도메인은 상기 VH 도메인과 회합하는 것인 이종다량체.

청구항 137

제135항에 있어서, 하기 성분:

- (a) VL 도메인,
- (b) CL 도메인; 및
- (c) CLH 테더

를 추가로 포함하며, 여기서 상기 이종다량체의 상기 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: 어드헤신-임의의 CH₂₁-임의의 CH₃₁-HD 테더-VL-CL-CLH 테더-VH-임의의 CH₁-임의의 CH₂₂-임의의 CH₃₂와 같이 위치하는 것인 이종다량체.

청구항 138

제135항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 스페이서가 상기 어드헤신 및 CH₂₁ 도메인 사이에 위치하는 것인 이종다량체.

청구항 139

제138항에 있어서, 상기 아미노산 스페이서가 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 140

제139항에 있어서, 상기 아미노산 스페이서가 GGS 반복부를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 141

제138항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산 스페이서가 10-80개 아미노산 길이인 이종다량체.

청구항 142

제141항에 있어서, 상기 아미노산 스페이서가 20-40개 아미노산 길이인 이종다량체.

청구항 143

제135항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH₂₁ 또는 CH₃₁ 도메인이 각각 상기 CH₂₂ 또는 CH₃₂ 도메인과 쌍을 형성하는 것인 이종다량체.

청구항 144

제143항에 있어서, 상기 CH₂₁ 및 CH₃₁ 도메인이 각각 상기 CH₂₂ 및 CH₃₂ 도메인과 쌍을 형성하는 것인 이종다량체.

청구항 145

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH₁ 및 CH₂₂ 도메인 사이에 위치한 힌지 도메인을 추가로 포함하는 이종다량체.

청구항 146

제135항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더가 15-100개 아미노산 길이인 이종다량체.

청구항 147

제146항에 있어서, 상기 HD 테더가 30-39개 아미노산 길이인 이종다량체.

청구항 148

제135항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더가 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 149

제148항에 있어서, 상기 HD 테더가 GGS 반복부를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 150

제149항에 있어서, 상기 HD 테더가 8 내지 9개의 GGS 반복부 (서열 19)를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 151

제135항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HD 테더가 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 아미노산 서열을 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 152

제151항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 상기 엔도펩티다제에 의해 제자리에서 절단되는 것인 이종다량체.

청구항 153

제151항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 정체 후에 상기 엔도펩티다제의 첨가시에 절단되는 것인 이종다량체.

청구항 154

제151항에 있어서, 상기 HD 테더가 상기 HD 테더의 N- 및 C-말단에 위치한 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 2개의 아미노산 서열을 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 155

제151항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린, 우로키나제, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPa), 케네나제, Lys-C, Arg-C, Asp-N, Glu-C, 인자 Xa, 담배 식각 바이러스 프로테아제 (TEV), 엔테로키나제, 인간 리노바이러스 C3 프로테아제 (HRV C3) 및 키니노게나제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 이종다량체.

청구항 156

제155항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린인 이종다량체.

청구항 157

제156항에 있어서, 상기 HD 테더가 상기 HD 테더의 N- 및 C-말단에 위치한 2개의 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하며, 여기서 상기 엔도펩티다제 절단 부위 중 하나는 푸린 절단 부위인 이종다량체.

청구항 158

제155항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 159

제155항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RHRQPR (서열 10)을 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 160

제159항에 있어서, 상기 엔도펩티다제 절단 부위 중 하나가 Lys-C 절단 부위인 이종다량체.

청구항 161

제137항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CLH 테더가 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 162

제161항에 있어서, 상기 CLH 테더가 GGS 반복부를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 163

제161항 또는 제162항에 있어서, 상기 CLH 테더가 10-80개 아미노산 길이인 이종다량체.

청구항 164

제163항에 있어서, 상기 CLH 테더가 20-40개 아미노산 길이인 이종다량체.

청구항 165

제137항 내지 제164항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CLH 테더가 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 아미노산 서열을 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 166

제165항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 상기 엔도펩티다제에 의해 제자리에서 절단되는 것인 이종다량체.

청구항 167

제165항에 있어서, 상기 아미노산 서열이 정제 후에 상기 엔도펩티다제의 첨가시에 절단되는 것인 이종다량체.

청구항 168

제165항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린, 우로키나제, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPa), 게네나제, Lys-C, Arg-C, Asp-N, Glu-C, 인자 Xa, 담배 식각 바이러스 프로테아제 (TEV), 엔테로키나제, 인간 리노바이러스 C3 프로테아제 (HRV C3) 및 키니노게나제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 이종다량체.

청구항 169

제168항에 있어서, 상기 엔도펩티다제가 푸린인 이종다량체.

청구항 170

제169항에 있어서, 상기 CLH 테더가 상기 CLH 테더의 N- 및 C-말단에 위치한 2개의 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하며, 여기서 상기 엔도펩티다제 절단 부위는 둘 다 푸린 절단 부위인 이종다량체.

청구항 171

제168항 내지 제170항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 172

제168항 내지 제170항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린에 의해 절단가능한 아미노산 서열이 아미노산 서열 RHRQPR (서열 10)을 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 173

제145항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 헌지 도메인이 인간 IgG1의 Glu216 내지 Pro230을 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 174

제173항에 있어서, 상기 헌지 도메인이 Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 175

제174항에 있어서, 상기 Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위가 불활성화 돌연변이를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 176

제175항에 있어서, 상기 불활성화 돌연변이가 K222A 치환 (EU 넘버링 시스템)인 이종다량체.

청구항 177

제135항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 단일특이적 이종다량체인 이종다량체.

청구항 178

제135항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 또는 다중특이적 이종다량체인 이종다량체.

청구항 179

제178항에 있어서, 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 이종다량체.

청구항 180

제179항에 있어서, 동일한 항원 상의 2개 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 이종다량체.

청구항 181

제135항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성제에 접합된 불변 영역을 포함하는 이종다량체.

청구항 182

제137항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CLH 테더의 절단 후에 엑소펩티다제를 위한 하나 이상의 절단 부위를 포함하는 이종다량체.

청구항 183

제182항에 있어서, 상기 하나 이상의 절단 부위가 상기 엑소펩티다제에 의해 제자리에서 절단되는 것인 이종다량체.

청구항 184

제183항에 있어서, 상기 하나 이상의 절단 부위가 정제 후에 상기 엑소펩티다제의 첨가시에 절단되는 것인 이종다량체.

청구항 185

제182항 내지 제184항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엑소펩티다제가 카르복시펩티다제 A, 카르복시펩티다제 B, 혈장 카르복시펩티다제 B, 카르복시펩티다제 D, 카르복시펩티다제 E, 카르복시펩티다제 M, 카르복시펩티다제 N 및 카르복시펩티다제 Z로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 이종다량체.

청구항 186

제185항에 있어서, 상기 엑소펩티다제가 염기성 잔기에서 절단하는 것인 이종다량체.

청구항 187

제186항에 있어서, 상기 엑소펩티다제가 카르복시펩티다제 B인 이종다량체.

청구항 188

제135항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH₃₁ 및 CH₃₂ 도메인이 각각 돌출부 또는 함몰부를 포함하며, 여기서 상기 CH₃₁ 도메인 내의 상기 돌출부 또는 함몰부는 각각 상기 CH₃₂ 도메인 내의 상기 함몰부 또는 돌출부에 위치할 수 있는 것인 이종다량체.

청구항 189

제188항에 있어서, 상기 CH₃₁ 및 CH₃₂ 도메인이 상기 돌출부 및 함몰부 사이의 인터페이스에서 만나는 것인 이종다량체.

청구항 190

제136항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH₁ 및 CL 도메인이 각각 돌출부 또는 함몰부를 포함하며, 여기서 상기 CH₁ 도메인 내의 상기 돌출부 또는 함몰부는 각각 상기 CL 도메인 내의 상기 함몰부 또는 돌출부에 위치할 수 있는 것인 이종다량체.

청구항 191

제190항에 있어서, 상기 CH₁ 및 CL 도메인이 상기 돌출부 및 함몰부 사이의 인터페이스에서 만나는 것인 이종다

량체.

청구항 192

제135항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CH_2_1 또는 CH_2_2 도메인 중 하나 이상이 이뮤노글로불린 불변 도메인 성분의 이펙터 기능에 영향을 미치는 CH_2 도메인 돌연변이를 포함하는 것인 이종다량체.

청구항 193

제192항에 있어서, 상기 이뮤노글로불린 불변 도메인 성분의 이펙터 기능에 영향을 미치는 CH_2 도메인 돌연변이가 N297 돌연변이인 이종다량체.

청구항 194

제135항 내지 제193항 중 어느 한 항의 이종다량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 195

제194항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 196

제195항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 197

제196항에 있어서, 포유동물 세포인 숙주 세포.

청구항 198

제197항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 CHO 세포인 숙주 세포.

청구항 199

제196항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

청구항 200

제199항에 있어서, 상기 원핵 세포가 이. 콜라이인 숙주 세포.

청구항 201

배양 배지에서 제195항의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 제135항 내지 제193항 중 어느 한 항의 이종다량체를 생산하는 방법.

청구항 202

제201항에 있어서, 상기 숙주 세포 또는 상기 배양 배지로부터 상기 이종다량체를 회수하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 203

서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 다음과 같이 위치한 하기 도메인: $\text{VL}_1-\text{CL}_1-\text{CLH}$ 테더₁- $\text{VH}_1-\text{CH}_1_1-\text{힌지}_1-\text{CH}_2_1-\text{CH}_3_1-\text{HD}$ 테더-VL₂-CL₂-CLH 테더₂- $\text{VH}_2-\text{CH}_1_2-\text{힌지}_2-\text{CH}_2_2-\text{CH}_3_2$ 를 포함하는 단일 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 CLH 테더₁, CLH 테더₂ 및 HD 테더는 각각 푸린 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 아미노산 서열을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 204

제203항에 있어서, 푸린 절단가능한 서열이 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 205

제203항에 있어서, 푸린 절단가능한 서열이 아미노산 서열 RHRQPR (서열 10)을 포함하는 것인 단일-쇄 항체.

청구항 206

제203항 또는 제205항의 단일-쇄 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 207

제206항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 208

제207항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 209

제208항에 있어서, 포유동물 세포인 숙주 세포.

청구항 210

제209항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 CHO 세포인 숙주 세포.

청구항 211

제208항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

청구항 212

제211항에 있어서, 상기 원핵 세포가 이. 콜라이인 숙주 세포.

청구항 213

배양 배지에서 제207항의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 제203항 내지 제205항 중 어느 한 항의 단일-쇄 항체를 생산하는 방법.

청구항 214

제213항에 있어서, 상기 숙주 세포 또는 상기 배양 배지로부터 상기 단일-쇄 항체를 회수하는 것을 추가로 포함하는 방법.

명세서**기술분야**

[0001] 본원은 2012년 2월 10일에 출원된 미국 출원 번호 61/597,486에 관한 것으로 이를 우선권을 주장하며, 그의 개시내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다.

서열 목록

[0003] 본원은 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 그의 전체내용이 본원에 참조로 포함된다. 2013년 1월 28일에 생성된 상기 ASCII 복사본은 P4733R1W0_PCTSequenceListing.txt로 명명되고, 크기는 7,501 바이트이다.

발명의 분야

[0005] 본 발명은 단일- 또는 다중-특이성을 갖는 신규 조작된 단백질 및 단백질 복합체 (이종다량체 포함) (예를 들어, 단일-쇄 항체, 다중-쇄 항체 및 이뮤노어드헤신-항체 복합체), 그의 구축 및 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단일- 또는 다중-특이적 이종다량체를 수득하는데 유용한 기술의 새로운 적용에 관한 것이다. 본원에 제공된 방법에 의해 생성된 이종다량체는 임의의 질환 또는 병리학적 상태를 위한 요법으로서 뿐만 아니라 항체의 사용이 유리한 임의의 다른 용도에 유용하다.

배경기술

[0006]

상업적 및 치료 목적을 위해 유용하고 척도화 가능한 상이한 결합 특성 (예를 들어, 단일특이적 또는 다중특이적)을 갖는 항체 또는 다른 이종다량체를 생산하기 위한 기술을 개발하는 것은 찾기 힘들었다. 다수의 방법이 시도되었으나, 거의 모두가 포유동물 세포에서 잘 용해되지 않거나 또는 발현되지 않는 것과 같은 상당한 문제점을 나타내었으며, 이는 이종이량체 형성의 낮은 수율이 다른 문제들 중에서 제조 또는 면역원성에 기술적으로 도전할만한 사항이거나, 생체내에서 짧은 반감기를 나타내거나, 또는 불안정하게 만든다는 것을 입증한다 (예를 들어, 문헌 [Hollinger et al., (1993) PNAS 90:6444-6448]; US5,932,448; US6,833,441; US5,591,828; US7,129,330; US7,507,796; [Fischer et al., (2007) Pathobiology 74:3-14; Booy (2006) Arch. Immunol. Ther. Exp. 54:85-101; Cao et al., (2003) 55: 171-197; 및 Marvin et al., (2006) Current Opinion in Drug Discovery & Development 9(2): 184-193]). 따라서, 상이한 결합 특성을 갖는 항체 또는 다른 이종다량체를 제조하기 위한 개선된 기술 및 공정이 요망되고 있다.

발명의 내용

[0007]

본 발명은 이종다량체 (예를 들어, 신규 단일-쇄 항체 (scAb), 다중-쇄 항체 (mcAb), 및 이뮤노어드헤신-항체 복합체) 및 이종다량체의 생성, 제조 및 사용 방법을 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 제1 중쇄 가변 (VH) 도메인을 제2 VH 도메인에 연결하는 이종이량체화 (HD) 테더를 포함하는 이종다량체 단일-쇄 항체를 특징으로 하며, 여기서 이종다량체는 제1 CH2 도메인, 제1 CH3 도메인, 제2 CH2 도메인 및 제2 CH3 도메인으로부터 선택된 하나 이상의 중쇄 불변 (CH) 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 이종다량체는 중쇄 불변 도메인의 하나 이상의 쌍을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 이종다량체는 하나 또는 양쪽 중쇄 상의 VH 및 CH2 도메인 사이에 위치한 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 이종다량체는 제1 및/또는 제2 CH1 도메인을 포함한다. 1 또는 2개의 CH1 도메인은 하나 또는 양쪽 VH 도메인에 대해 C-말단에 및 하나 또는 양쪽 힌지 도메인, 또는 힌지 도메인의 부재 하에 하나 또는 양쪽 CH2 도메인에 대해 N-말단에 위치한다. 특정한 실시양태에서, 이종다량체는 또한 1 또는 2개의 CLH 테더 (동족 LC-HC 테더)에 의해 제1 및/또는 제2 VH 도메인에 대해 N-말단에 연결된 1 또는 2개의 경쇄 (VL) 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종다량체는 각각 하나 또는 양쪽 VL 도메인에 대해 C-말단에 및 하나 또는 양쪽 CLH 테더에 대해 바로 N-말단에 위치한 1 또는 2개의 경쇄 불변 (CL) 도메인을 추가로 포함한다.

[0008]

또 다른 측면에서, 본 발명은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 다음과 같이 위치한 다음 도메인: VL₁-CL₁-CLH 테더₁-VH₁-CH1₁-힌지₁-CH2₁-CH3₁-HD 테더₂-VL₂-CL₂-CLH 테더₂-VH₂-CH1₂-힌지₂-CH2₂-CH3₂를 갖는 단일 폴리펩티드를 포함하는 이종다량체 단일-쇄 항체를 특징으로 한다.

[0009]

또 다른 측면에서, 본 발명은 3개의 폴리펩티드 쇄를 포함하는 다중-쇄 항체 이종다량체를 특징으로 하며, 여기서 제1 및 제2 폴리펩티드 쇄는 동일하고, 각각 경쇄 (LC)를 형성하고, 제3 폴리펩티드 쇄는 제1 중쇄 (HC) 및 제2 HC를 형성한다. 제1 및 제2 폴리펩티드 쇄는 각각 VL 및 CL 도메인을 포함한다. 제3 폴리펩티드 쇄는 2개의 VH 도메인, HD 테더, 1 또는 2개의 힌지 도메인, 및 제1 CH1 도메인, 제1 CH2 도메인, 제1 CH3 도메인, 제2 CH1 도메인, 제2 CH2 도메인 및 제2 CH3 도메인으로부터 선택된 하나 이상의 중쇄 불변 도메인을 포함하며, 여기서 제2 폴리펩티드 쇄의 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VH₁-임의의 CH1₁-임의의 힌지₁-임의의 CH2₁-임의의 CH3₁-HD 테더 -VH₂-임의의 CH1₂-임의의 힌지₂-임의의 CH2₂-임의의 CH3₂와 같이 위치한다.

[0010]

또 다른 측면에서, 본 발명은 2개의 폴리펩티드 쇄를 포함하는 다중-쇄 항체 이종다량체를 특징으로 하며, 여기서 제1 폴리펩티드 쇄는 제1 경쇄 (LC)를 형성하고, 제2 폴리펩티드 쇄는 제1 중쇄 (HC), 제2 LC 및 제2 HC를 형성한다. 제1 폴리펩티드 쇄는 제1 VL 및 CL 도메인을 포함한다. 제2 폴리펩티드 쇄는 2개의 VH 도메인, HD 테더, 제2 VL 도메인, 제2 CL 도메인, CLH 테더, 1 또는 2개의 힌지 도메인, 및 제1 CH1 도메인, 제1 CH2 도메인, 제1 CH3 도메인, 제2 CH1 도메인, 제2 CH2 도메인 및 제2 CH3 도메인으로부터 선택된 하나 이상의 중쇄 불변 도메인을 포함하며, 여기서 제2 폴리펩티드 쇄의 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VH₁-임의의 CH1₁-임의의 힌지₁-임의의 CH2₁-임의의 CH3₁-HD 테더-VL₂-CL₂-CLH 테더-VH₂-임의의 CH1₂-임의의 힌지₂-임의의 CH2₂-임의의 CH3₂와 같이 위치한다.

[0011]

또 다른 측면에서, 본 발명은 2개의 폴리펩티드 쇄를 포함하는 다중-쇄 항체 이종다량체를 특징으로 하며, 여기서 제1 폴리펩티드 쇄는 제1 LC, 제1 HC 및 제2 HC를 형성하고, 제2 폴리펩티드 쇄는 제2 LC를 형성한다. 제1

폴리펩티드 쇄는 2개의 VH 도메인, HD 테더, 제1 VL 도메인, 제1 CL 도메인, CLH 테더, 1 또는 2개의 헌지 도메인, 및 제1 CH1 도메인, 제1 CH2 도메인, 제1 CH3 도메인, 제2 CH1 도메인, 제2 CH2 도메인 및 제2 CH3 도메인으로부터 선택된 하나 이상의 중쇄 불변 도메인을 포함하며, 여기서 제2 폴리펩티드 쇄의 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: VL₁-CL₁-CLH 테더-VH₁-임의의 CH1₁-임의의 헌지₁-임의의 CH2₁-임의의 CH3₁-HD 테더-VH₂-임의의 CH1₂-임의의 헌지₂-임의의 CH2₂-임의의 CH3₂와 같이 위치한다. 제2 폴리펩티드 쇄는 제2 VL 및 CL 도메인을 포함한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 2개의 폴리펩티드 쇄를 포함하는 이종다량체를 특징으로 하며, 여기서 제1 폴리펩티드는 어드헤신 및 하나 이상의 중쇄 불변 도메인 (예를 들어, CH₂₁ 및/또는 CH₃₁)을 포함하는 이뮤노어드헤신을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 VH 도메인 및 하나 이상의 중쇄 불변 도메인 (예를 들어, CH₁, CH₂₂ 및/또는 CH₃₂)을 포함하는 절반-항체를 형성하고, 제1 및 제2 폴리펩티드 쇄는 서로 HD 테더에 의해 연결되어 단일 폴리펩티드 쇄를 형성한다. 이종다량체의 성분은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: 어드헤신-임의의 CH₂₁-임의의 CH₃₁-HD 테더-VH-임의의 CH₁-임의의 CH₂₂-임의의 CH₃₂와 같이 위치한다. HD 테더는 이뮤노어드헤신 및 절반-항체의 하나 이상의 불변 도메인 사이의 상호작용을 용이하게 한다. 한 실시양태에서, CLH 테더는 절반-항체의 경쇄 및 중쇄 성분의 상호작용을 용이하게 하여 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 하기: 어드헤신-임의의 CH₂₁-임의의 CH₃₁-HD 테더-VL-CL-CLH 테더-VH-임의의 CH₁-임의의 CH₂₂-임의의 CH₃₂와 같이 위치한 성분을 갖는 이종다량체를 생성한다. 또 다른 실시양태에서, 절반-항체의 경쇄의 VL 및 CL 도메인이 제2 폴리펩티드에 의해 제공되며, 이는 제1 폴리펩티드 쇄의 절반-항체의 중쇄와 연관되어 경쇄-중쇄 동족 쌍을 형성한다. 또 다른 실시양태에서, 이종다량체의 이뮤노어드헤신 부분은 그의 어드헤신 및 중쇄 불변 도메인 성분 사이에 아미노산 스페이서를 포함할 수 있다. 스페이서는, 한 실시양태에서, 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기, 예를 들어 GGS 반복부를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 스페이서는 10-80개 아미노산 길이, 예를 들어 20-40개 잔기 길이이다.

[0013] 본 발명의 이종다량체는 15-100개 아미노산 길이의 HD 테더를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, HD 테더는 30-39개 아미노산 길이, 예를 들어 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39개 아미노산 길이이다. 테더는, 한 실시양태에서, 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 테더는 GGS 반복부를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 테더는 8 내지 9개의 GGS 반복부 (서열 19)를 포함한다.

[0014] 본 발명의 이종다량체는 또한 하나 이상의 CLH 테더를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 CLH 테더는 각각 10-80개 아미노산 길이이다. 특정한 실시양태에서, 하나 이상의 CLH 테더는 각각 20-40개 아미노산 길이이다. 테더는, 한 실시양태에서, 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 테더는 GGS 반복부를 포함한다.

[0015] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 HD 및 CLH 테더 중 하나 이상은 하기 엔도펩티다제 중 하나 이상에 의해 절단 가능하다: 푸린, 우로키나제, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPa), 게네나제, Lys-C, Arg-C, Asp-N, Glu-C, 인자 Xa, 담배 식각 바이러스 프로테아제 (TEV), 엔테로키나제, 인간 리노바이러스 C3 프로테아제 (HRV C3) 또는 키니노게나제. 바람직한 실시양태에서, 테더 중 하나 이상은 푸린에 의해 절단 가능하다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 하나 이상의 테더 중 하나 이상은 테더의 N- 및 C-말단에 있거나 이에 근접한 2개의 부위에서 절단 가능하다. 바람직하게는 HD 테더의 경우에, 2개의 절단 부위 중 하나가 푸린 절단 부위이고, 다른 절단 부위는 Lys-C 절단 부위이다. 바람직하게는 CLH 테더의 경우에, 하나 이상의 CLH 테더의 양쪽 N- 및 C-말단 절단 부위가 푸린에 의해 절단 가능하다. 특정 실시양태에서, 푸린 절단 부위는 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함한다. 특정의 다른 실시양태에서, 푸린 절단 부위는 아미노산 서열 RHRQPR (서열 10)을 포함한다. 한 실시양태에서, 엔도펩티다제 절단은 제자리에서 발생한다. 특정 실시양태에서, 엔도펩티다제는 숙주 세포에서 재조합적으로 발현된다. 또 다른 실시양태에서, 엔도펩티다제 절단은 정제 후에 엔도펩티다제의 첨가시에 발생한다.

[0016] 본 발명의 이종다량체는 하나 이상의 (예를 들어, 2개의) CLH 테더를 가질 수 있으며, 이는 각각 하기 특정 엑소펩티다제: 카르복시펩티다제 A, 카르복시펩티다제 B, 혈장 카르복시펩티다제 B (또한, 카르복시펩티다제 U 또는 트롬빈-활성화가능한 섬유소용해 억제제 (TAFI)로 알려져 있음), 카르복시펩티다제 D, 카르복시펩티다제 E (또한, 엔케팔린 컨버타제 또는 카르복시펩티다제 H로 알려져 있음), 카르복시펩티다제 M, 카르복시펩티다제 N, 또는 카르복시펩티다제 Z 중 하나 이상을 위한 하나 이상의 절단 부위를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체는 카르복시펩티다제 B 엑소펩티다제에 의해 절단 가능하다. 한 실시양태에서, 엑소펩티다제

절단은 제자리에서 발생한다. 특정 실시양태에서, 엑소펩티다제는 숙주 세포에서 재조합적으로 발현된다. 또 다른 실시양태에서, 엑소펩티다제 절단은 정제 후에 엑소펩티다제의 첨가시에 발생한다. 본원에 사용된 카르복시펩티다제 B는 카르복시펩티다제의 부류 또는 특정 카르복시펩티다제를 지칭할 수 있다. 일반적 카르복시펩티다제 B는 카르복시펩티다제 A를 제외한 모든 특정 카르복시펩티다제를 포함한다. 특정 카르복시펩티다제로서, 카르복시펩티다제 B는 또한 카르복시펩티다제 U 또는 TAFI로 알려져 있다. 당업자는 용어가 사용된 문맥에 따라 일반적 카르복시펩티다제 B와 특정 엑소펩티다제로서의 카르복시펩티다제 B를 용이하게 구별할 수 있다.

[0017] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체는 인간 IgG1의 Glu216 내지 Pro230을 포함하는 힌지 도메인을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 또는 양 쪽 힌지 도메인은 Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위를 제거하는 돌연변이를 포함한다. 한 예에서, Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위를 제거하는 돌연변이는 K222A 치환 (EU 넘버링 시스템)이다.

[0018] 본 발명의 이종다량체는 단일특이적일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 단일특이적 이종다량체는 동일한 에피토프에 결합하나 상이한 친화도로 결합할 수 있는 2개의 절반-항체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 단일특이적 이종다량체는 각각 동일한 결합 파트너 또는 에피토프에 특이적인 이뮤노어드헤신과 연관된 절반-항체를 포함한다.

[0019] 본 발명의 이종다량체는 이종특이적 또는 다중특이적일 수 있다. 한 실시양태에서, 이종다량체는 2개 이상의 항원에 결합할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 이종다량체는 동일한 항원 상의 2개 이상의 에피토프에 결합할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이종특이적 또는 다중특이적 이종다량체는 각각 상이한 결합 파트너 또는 에피토프에 특이적인 이뮤노어드헤신과 연관된 절반-항체를 포함한다.

[0020] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체는 세포독성제에 접합된 불변 영역을 포함한다.

[0021] 또 다른 실시양태에서, 이종다량체는 돌출부 또는 함몰부를 갖는 2개의 중쇄 불변 도메인 (예를 들어, 2개의 CH₃ 도메인)을 포함할 수 있으며, 여기서 1개의 중쇄 불변 도메인 (예를 들어, CH₃₁ 도메인)의 돌출부 또는 함몰부는 각각 제2 중쇄 불변 도메인 (예를 들어, CH₃₂ 도메인)의 함몰부 또는 돌출부에 위치할 수 있다. 바람직하게는, 2개의 불변 도메인은 돌출부 및 함몰부를 포함하는 인터페이스에서 만난다. 또 다른 실시양태에서, 이종다량체는 1개 이상의 경쇄 불변 도메인 및 1개의 중쇄 불변 도메인 인터페이스 (예를 들어, CL/CH₁ 인터페이스)를 포함할 수 있으며, 여기서 경쇄 불변 도메인 (예를 들어, CL 도메인) 및 중쇄 불변 도메인 (예를 들어, CH₁ 도메인)은, 적어도 부분적으로, 돌출부-함몰부 상호작용에 의해 상호작용한다.

[0022] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체는 그의 CH₂₁ 또는 CH₂₂에 변경된 이펙터 기능을 갖는 항체를 발생시키는 CH₂ 도메인 돌연변이를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, CH₂ 도메인 돌연변이는 N297 돌연변이이다. 특정 실시양태에서, N297 돌연변이는 N297A 돌연변이이다. 특정의 다른 실시양태에서, CH₂ 도메인은 D256A 돌연변이를 추가로 포함한다.

[0023] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명의 이종다량체를 생산하는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 이종다량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 특징으로 한다. 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 벡터를 포함하는 숙주 세포를 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 바람직한 실시양태에서, 포유동물 세포는 CHO 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 추가 실시양태에서, 원핵 세포는 이. 콜라이(*E. coli*) 세포이다. 추가의 측면에서, 본 발명은 배양 배지에서 이종다량체-코딩 폴리뉴클레오티드를 갖는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 이종다량체를 생산하는 방법을 특징으로 한다. 바람직하게는, 이종다량체는 숙주 세포 또는 숙주 세포의 배양 배지로부터 회수된다.

[0024] 추가 측면에서, 본 발명은 서로에 대해 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 다음과 같이 위치한 다음 도메인: VL₁-CL₁-CH₁ 테더₁-VH₁-CH₁-힌지₁-CH₂₁-CH₃₁-HD 테더-VL₂-CL₂-CH₁-힌지₂-CH₂₂-CH₃₂를 포함하는 단일 폴리펩티드를 포함하는 단일-쇄 항체를 제공하며, 여기서 CL₁ 테더₁, CH₁ 테더₂ 및 HD 테더는 각각 푸린 엔도펩티다제에 의해 절단가능한 아미노산 서열을 포함한다. 측면의 특정 실시양태에서, 푸린 절단가능한 서열은 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함하며, 다른 실시양태에서는, 푸린 절단가능한 서열은 아미노산 서열 RHRQPR (서열 10)을 포함한다. 관련된 측면에서, 본 발명은 본 발명의 단일-쇄 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 CHO 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 포유동물 세포이다. 특정의 다른 실시양태에서, 숙주 세포

는 이. 콜라이 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 원핵 세포이다. 추가의 관련된 측면에서, 본 발명은 배양 배지에서 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 단일-쇄 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 방법은 상기 숙주 세포 또는 상기 배양 배지로부터 상기 단일-쇄 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함한다.

[0025] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명, 도면 및 특허청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 3개의 절단가능한 테더를 포함하는 예시적인 이종다량체 단일-쇄 항체의 구조를 보여주는 개략적 다이어그램이다. 엔도펩티다제 절단 부위는 삼각형으로 나타낸다. 또한 임의의 K222A 돌연변이가 도시된다.

도 2는 예시적인 이종다량체 단일-쇄 항체의 LC, HC, 테더 및 절단 부위의 배열을 보여주는 개략적 다이어그램이다. 절단 부위는 RKRKRRG(GGS)₆GRSRKRR (서열 14) 및 (GGS)₍₈₋₁₀₎RSRKRR (서열 15-17)로 예시된다. 푸린 인식 부위는 RXRXRR (서열 8)로 나타낸다.

도 3a는 푸린 절단 후의 이종다량체 단일-쇄 항체의 예이다. 팔호 내의 잔기 (RKRKRR (서열 9), 및 RKRKR (서열 18))는 고르지 못한 C-말단을 생성하는 단백질 A 칼럼 상에서의 정제 전에 내인성 엑소펩티다제에 의해 제거될 수 있는 잔기를 나타낸다. 또한, 임의의 K222A 돌연변이가 도시된다.

도 3b는 푸린, Lys-C, 및 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B) 처리 후의 이종다량체 단일-쇄 항체의 예이다. 또한 임의의 K222A 돌연변이가 도시된다.

도 4는 테더를 제거하기 위한 절단 전의 예시적인 접합된 이종다량체 단일-쇄 항체이다. 또한, 임의의 접합된 모이어티, 예를 들어 독소, 항생제 등, 및 임의의 K222A 돌연변이가 도시된다.

도 5a는 1개의 절단가능한 테더를 함유하는 예시적인 이종다량체 다중-쇄 항체의 구조를 보여주는 개략적 다이어그램이다. 2개의 테더링되지 않은 LC는 테더-함유 폴리펩티드와 독립적으로 발현될 수 있다. 테더링되지 않은 LC는 동일한 세포 또는 상이한 세포에서 연결된 중쇄로서 발현될 수 있다. 테더링되지 않은 LC는 동일한 또는 상이한 플라스미드 상에서 발현될 수 있다. 또한, 임의의 접합된 모이어티, 예를 들어 독소, 항생제 등, 및 임의의 K222A 돌연변이가 도시된다.

도 5b는 2개의 절단가능한 테더를 함유하는 예시적인 이종다량체 다중-쇄 항체의 구조를 보여주는 개략적 다이어그램이다. HD 테더는 제1 HC를 제2 HC에 테더링된 LC에 의해 간접적으로 연결한다. 테더링되지 않은 LC는 테더-함유 폴리펩티드와 독립적으로 발현될 수 있다. 테더링되지 않은 LC는 동일한 세포 또는 상이한 세포에서 연결된 중쇄로서 발현될 수 있다. 테더링되지 않은 LC는 동일한 또는 상이한 플라스미드 상에서 발현될 수 있다. 또한 임의의 K222A 돌연변이가 도시된다.

도 5c는 2개의 절단가능한 테더를 함유하는 예시적인 이종다량체 다중-쇄 항체의 구조를 보여주는 개략적 다이어그램이다. HD 테더는 제1 HC를 제2 HC에 직접 연결한다. 테더링되지 않은 LC는 테더-함유 폴리펩티드와 독립적으로 발현될 수 있다. 테더링되지 않은 LC는 동일한 세포 또는 상이한 세포에서 연결된 중쇄로서 발현될 수 있다. 테더링되지 않은 LC는 동일한 또는 상이한 플라스미드 상에서 발현될 수 있다. 또한 임의의 K222A 돌연변이가 도시된다.

도 6a-6d는 옥텟(Octet) 분석으로부터의 결과를 보여주는 그래프이다. (a) b-d에 제시된 그래프의 복합체. (b) 예시적인 이종다량체 단일-쇄 항체는 항원 1 및 항원 2 둘 다에 동시에 결합한다. (c 및 d) 항체 1 및 항체 2는 서로의 항원과 교차 반응하지 않지만, 그의 각각의 항원에는 결합한다. x-축은 시간 (초)이다. y-축은 상대 흡광도이다. 실시예 3을 참조한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 원치않는 중쇄 동종이량체화는 전형적으로 다중 폴리펩티드 쇄에 상이한 결합 특성을 갖는 단일특이적 또는 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항체 또는 다른 이종다량체를 생성하는 경우에 발생한다. 본 발명자들은 이러한 통상의 문제가 그의 어셈블리가 하나 이상의 테더에 의해 지시되는 단일-쇄 단일특이적 또는 다중특이적 이종다량체의 생성에 의해 방지될 수 있다는 것을 발견하였다. 이론에 제한되지 않고, 본 발명자들은 HD 테더가 높은 정도의 정확도 및 효율을 갖는 특징적인 Fc 중쇄 성분의 결합을 가능하게 하여, 동일한 표적 또는 상이한 표적에 동일하거나 상이한 결합 친화도로 결합하는 2-절반 분자 (예를 들어, 2개의 절반-항체)를 포함하는

기능적 이종다량체를 생성한다고 여겼다. 연결된 중쇄 성분을 갖는 이종다량체는 추가로 특징적인 경쇄 성분을 포함할 수 있으며, 중쇄 및 경쇄의 완전한 성분을 갖는 기능적 단일-쇄 단일특이적 또는 다중특이적 이종다량체(예를 들어, 항체)를 생성한다. 본 발명에 따른 추가의 테더를 이용하여 이종다량체의 경쇄 및 중쇄를 연결시키고, 이에 의해 각 경쇄의 그의 동족 중쇄에 대한 적절한 회합을 도울 수 있다.

[0028] 본원에 기재된 이종다량체를 제조하는 방법의 이용은 단일 또는 다중 폴리펩티드 서열로부터 생성된 단일특이적 또는 다중특이적 이종다량체의 실질적으로 균질한 집단의 생성은 허용한다. 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 이종다량체는 병원성 경로에서 하나 초과의 표적의 인식 또는 특정 표적(예를 들어, 종양 세포) 및 이 표적에 대해 지시된 작용제(예를 들어, T 세포)의 공동-국제화에 유용할 수 있다. 또한, 본원에 기재된 이종다량체는 2개의 항원을 표적으로 하는 조합 요법에 대한 필요 및 대상체에게 2종 이상의 요법을 제공하는 것과 연관된 위험을 제거하기 때문이 유리하다.

I. 정의

[0030] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 임의의 이뮤노글로불린(Ig) 분자, 및 원하는 생물학적 활성(예를 들어, 에피토프 결합 활성)을 나타내는 한 그의 임의의 단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체를 의미한다. 항체의 예는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체 및 항체 단편을 포함한다.

[0031] 카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기(대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)을 지칭하는데 사용된다(예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 일반적으로 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역의 잔기를 지칭하는 경우에 사용된다(예를 들어, 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 보고된 EU 인덱스). "카바트에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 중쇄 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다.

[0032] 자연 발생 기본적 4-쇄의 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄(LC)와 2개의 동일한 중쇄(HC)로 이루어진 이종사량체 당단백질이다(IgM 항체는 J 쇄로 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본 이종사량체 단위로 구성되고, 따라서 10개의 항원 결합 부위를 포함하는 한편, 분비된 IgA 항체는 중합되어 J 쇄와 함께 2-5개의 기본적 4-쇄 단위를 포함하는 다가 회합체를 형성할 수 있다). IgG의 경우에, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 LC는 1개의 공유 디슬피드 결합에 의해 HC에 연결되지만, 2개의 HC는 HC 이소형에 따라 1개 이상의 디슬피드 결합에 의해 서로 연결된다. 또한, 각각의 HC 및 LC는 일정한 간격을 두고 이격된 쇄내 디슬피드 가교를 갖는다. 각각의 HC는 N-말단에 가변 도메인(VH)을 가지며, 이어서 α 및 γ 쇄 각각의 경우에 3개의 불변 도메인(CH1, CH2, CH3), μ 및 ϵ 이소형의 경우에 4개의 C_J 도메인을 갖는다. 각각의 LC는 N-말단에 가변 도메인(VL), 이어서 그의 다른 말단에 불변 도메인(CL)을 갖는다. VL은 VH와 정렬되고, CL은 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)과 정렬된다. CH1은 힌지 영역에 의해 중쇄의 제2 불변 도메인(CH2)에 연결될 수 있다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 인터페이스를 형성한다고 여겨진다. VH 및 VL의 쌍형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6]을 참조한다.

[0033] "힌지 영역"은 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216으로부터 Pro230으로 확장된 것으로 정의된다(문헌 [Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985)]). 다른 IgG 이소형의 힌지 영역은 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫번째 및 마지막 시스테인 잔기를 IgG1 서열과 동일한 위치에 배치하여 정렬될 수 있다.

[0034] Fc 영역의 "하부 힌지 영역"은 통상적으로 힌지 영역에 대해 바로 C-말단인 잔기, 즉 Fc 영역의 잔기 233 내지 239의 스트레치로서 정의된다. 본 발명 전에, Fc감마R 결합은 일반적으로 IgG Fc 영역의 보다 낮은 힌지 영역 내의 아미노산 잔기에 따른 것이었다.

[0035] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"은 통상적으로 IgG의 약 잔기 231로부터 약 340까지 이어진다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 근접하게 쌍을 형성하지 않는다는 점에서 특징적이다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 쇄가 무손상 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 배치된다. 탄수화물이 도메인-도메인 쌍형성에 대

한 대안을 제공하고 CH2 도메인의 안정화를 도울 수 있는 것으로 추정되었다. 문헌 [Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985)].

[0036] "CH3 도메인"은 Fc 영역 내의 CH2 도메인에 대해 C-말단인 잔기의 스트레치 (즉, IgG의 약 아미노산 잔기 341로부터 약 아미노산 잔기 447까지)를 포함한다.

[0037] 임의의 척추동물 종으로부터의 경쇄 (LC)는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파 및 람다라고 불리는 명백하게 특징적인 2종의 유형 중 1종에 배정될 수 있다. 이뮤노글로불린은 중쇄의 불변 도메인 (C_H)의 아미노산 서열에 따라 상이한 부류 또는 이소형으로 배정될 수 있다. 5종의 부류의 이뮤노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하고, 각각 α , δ , γ , ϵ 및 μ 로 지칭되는 중쇄를 갖는다. γ 및 α 부류는 C_H 서열 및 기능에 있어서의 상대적으로 작은 차이점에 기초하여 하위부류로 추가로 분류되는데, 예를 들어 인간은 하위부류: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다.

[0038] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 절편의 서열이 항체마다 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 특정한 항체마다 그의 특정한 항원에 대한 특이성을 정의한다. 그러나, 가변성이 가변 도메인의 110개 아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 대신, V 영역은 "초가변 영역"이라 불리는 극단적인 가변성의 더 짧은 영역 (각각 9-12개 아미노산 길이)으로 분리된 프레임워크 영역 (FR) (15-30개 아미노산)이라 불리는 비교적 불변성의 스트레치로 이루어진다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각, 베타-시트 형태를 주로 채택하는 4개의 FR을 포함하고, 이들은 상기 베타-시트 구조를 연결하며 일부 경우에는 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된다. 각 쇄 내의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇄의 초가변 영역과 함께 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체의 참여를 나타낸다.

[0039] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변성이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR; VH 내의 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내의 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터의 및/ 또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 서열 가변성이 가장 높고/거나 항원 인식과 관련된다. 본원에 사용된 HVR은 위치 24-36 (L1에 대해), 46-56 (L2에 대해), 89-97 (L3에 대해), 26-35B (H1에 대해), 47-65 (H2에 대해) 및 93-102 (H3에 대해) 내에 위치한 임의의 번호의 잔기를 포함한다. 따라서, HVR은 (A), (B) 및 (C)에 이전에 기재된 위치의 잔기를 포함한다: (A) 24-34 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3) (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]); (B) L1의 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65 및 H3의 95-102 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)])]; (C) 30-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35 (H1), 47-58 (H2), 93-100a-j (H3) (문헌 [MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)]). 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인 내의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0040] 다수의 HVR 설명이 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기반으로 하며, 가장 통상적으로 사용된다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]). 대신, 코티아는 구조적 루프의 위치를 지칭한다 (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM HVR은 카바트 HVR 및 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합체 결정 구조의 분석을 기반으로 한다. 각각의 이러한 HVR로부터의 잔기는 하기 언급된다.

<u>루프</u>	<u>카바트</u>	<u>AbM</u>	<u>코티아</u>	<u>접촉</u>
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(카바트 넘버링)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26 -H32	H30 -H35
	(코티아 넘버링)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53 -H55	H47 -H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96 -H101	H93 -H101

[0041]

[0042]

HVR은 하기와 같이 "확장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 이들 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0043]

"프레임워크 영역" (FR)은 CDR 잔기가 아닌 가변 도메인 잔기들이다. 각각의 가변 도메인은 전형적으로 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 확인되는 4개의 FR를 갖는다. CDR이 카바트에 따라 정의되는 경우, 경쇄 FR 잔기는 약 잔기 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) 및 98-107 (LCFR4)에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기에서 약 잔기 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) 및 103-113 (HCFR4)에 위치한다. CDR이 초가변 루프의 아미노산 잔기를 포함하는 경우, 경쇄 FR 잔기는 경쇄의 약 잔기 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) 및 97-107 (LCFR4)에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기의 약 잔기 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) 및 102-113 (HCFR4)에 위치한다. 일부 경우에, CDR이 카바트에 의해 정의된 바와 같은 CDR의 아미노산과 초가변 루프의 아미노산 둘 다를 포함하는 경우에는 FR 잔기가 그에 따라 조정될 것이다. 예를 들어, CDRH1이 아미노산 H26-H35를 포함하는 경우, 중쇄 FR1 잔기는 위치 1-25에 존재하고 FR2 잔기는 위치 36-49에 존재한다.

[0044]

"인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이谬노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이谬노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 카바트에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우, 하위군은 카바트에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우, 하위군은 카바트에서와 같은 하위군 III이다.

[0045]

"무손상" 항체의 한 예는 항원-결합 부위 뿐만 아니라 CL 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0046]

"항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편; 디아바디 (Db); 탠덤 디아바디 (taDb); 선형 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,641,870, 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]) ; 1-아암 항체, 단일 가변 도메인 항체, 미니바디, 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3 및 (scFv)4-Fc를 포함하나 이에 제한되지는 않음)를 포함한다.

[0047]

"Fab" 단편은 항체의 파파인 소화에 의해 생성된 항원-결합 단편이며, H 쇄의 가변 영역 도메인 (VH) 및 1개 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)과 함께 전체 L 쇄로 이루어진다. 항체의 파파인 소화는 2개의 동일한 Fab 단편을 생산한다. 항체의 팹신 처리는 2가 항원-결합 활성을 갖는 2개의 디슬피드 연결된 Fab 단편에 대략적으로 상응하며 항원을 여전히 가교할 수 있는 큰 단일 F(ab')2 단편을 생성한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇 개의 잔기가 추가된 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')2 항체 단편은 본래 그 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생산된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

- [0048] "Fc" 단편은 파파인 소화에 의해 생성된 나머지 항체 단편이며, 이 명칭은 용이하게 결정화되는 단편의 능력을 반영한 것이다. Fc 단편은 디슬피드에 의해 함께 결합되어 있는 H 쇄 둘 다의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역 내의 서열에 의해 결정되고, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식되는 부분이다.
- [0049] 용어 "Fc 영역"은 본원에서 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는, 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226에서의 아미노산 잔기로부터, 또는 Pro230으로부터 그의 카르복실-말단까지의 범위로 경계지어진다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어 항체의 생산 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 조작으로 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않는 항체 집단, 및 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체들의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다.
- [0050] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 갖는다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향조절 등을 포함한다. 상기 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 결합할 것을 필요로 하고, 예를 들어 본원의 정의에서 개시된 바와 같은 다양한 검정을 사용하여 평가할 수 있다.
- [0051] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 그의 자연 발생 변이체를 포함한다.
- [0052] "변이체 Fc 영역"은 적어도 1개의 아미노산 변형, 바람직하게는 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 통해 천연 서열 Fc 영역과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 1개 이상의 아미노산 치환을 갖고, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서의 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 약 80% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 약 90% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 보유할 것이다.
- [0053] 본원에서 사용된 "Fc 복합체"는 함께 상호작용하는 Fc 영역의 2개의 CH2 도메인 및/또는 함께 상호작용하는 Fc 영역의 2개의 CH3 도메인을 지칭하고, 여기서 CH2 도메인 및/또는 CH3 도메인은 웨프티드 결합이 아닌 결합 및/또는 힘 (예를 들어, 반 데르 발스, 소수성, 친수성 힘)을 통해 상호작용한다.
- [0054] 본원에 사용된 "Fc 성분"은 Fc 영역의 헌지 영역, CH2 도메인 또는 CH3 도메인을 지칭한다.
- [0055] 본원에 사용된 "Fc CH 성분" 또는 "FcCH"는 Fc 영역의 CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0056] "Fv"는 강한 비공유 회합 상태의 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 이루어진다. 이들 2개 도메인이 폴딩되어 6개의 초가변 루프 (H 및 L 쇄로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 이는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)도, 종종 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도로도 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0057] 본원에 사용된 용어 "이뮤노어드헤신"은 이종 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 이뮤노글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 조합한 문자를 나타낸다. 구조적으로, 이뮤노어드헤신은 아미노산 서열이 항체의 항원 인식 및 결합 부위 이외의 서열인 (즉, 항체의 불변 영역에 비해 "이종성"인) 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열과 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열 (예를 들어, IgG의 CH2 및/또는 CH3 서열)의 융합체를 포함한다. 어드헤신 및 이뮤노글로불린 불변 도메인은 임의의 아미노산 스페이셔에 의해 분리될 수 있다. 예시적인 어드헤신 서열은 관심 단백질에 결합하는 수용체 또는 리간드의 일부를 포함하는 인접 아미노산 서열을 포함한다. 어드헤신 서열은 또한 관심 단백질에 결합하는 서열일 수 있지만, 수용체 또는 리간드 서열이 아니다 (예를 들어, 웨프티바디 내의 어드헤신 서열). 상기 폴리펩티드 서열은 파지 디스플레이 기술 및 고처리량 분류 방법을 포함하는 다양한 방법에 의해 선택 또는 확인될 수 있다. 이뮤노어드헤신 내의 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위유형, IgA (IgA1 및 IgA2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 얻을 수 있다.

- [0058] 본원에 사용된 아미노산 "스페이서"는 예를 들어 자가-절단, 효소적 또는 화학적 절단에 의해 절단가능하지 않은 2개 이상의 아미노산 길이의 아미노산 서열을 의미한다. 스페이서는 중성, 극성 또는 비극성 아미노산으로 이루어질 수 있다. 아미노산 스페이서는 예를 들어 2 내지 100개 아미노산 길이, 예컨대 10-80개 아미노산 또는 20-40개 아미노산 길이, 예를 들어 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40개 아미노산 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 스페이서는 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를, 예를 들어 GGS 반복부로서 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 스페이서는 트레오닌 (T) 및 히스티딘 (H) 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 스페이서는 THT (서열 1), GGGSTHT (서열 2) 및 GGGSGGGSTHT (서열 3)이다.
- [0059] "단일-쇄 Fv" ("sFv" 또는 "scFv"로도 약칭됨)는 단일 폴리펩티드 쇄 내로 연결된 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합에 요구되는 구조를 형성하게 하는 폴리펩티드 링커를 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 추가로 포함한다. sFv에 대해, 문헌 [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Malmborg et al., J. Immunol. Methods 183:7-13, 1995]을 참조한다.
- [0060] 용어 "디아바디"는 VH 및 VL 도메인 사이의 짧은 링커 (약 5-10개 잔기)로 sFv 단편 (상기 단락 참조)을 구축함으로써 V 도메인의 쇄내 쌍형성이 아닌 쇄간 쌍형성을 달성하여 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성하여 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 VH 및 VL 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇄에 존재하는 2개의 "가교" sFv 단편으로 이루어진 이종이량체이다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.
- [0061] 표현 "단일 도메인 항체" (sdAb) 또는 "단일 가변 도메인 (SVD) 항체"는 일반적으로 단일 가변 도메인 (VH 또는 VL)이 항원 결합을 부여할 수 있는 항체를 지칭한다. 즉, 단일 가변 도메인은 표적 항원을 인식하기 위해 또 다른 가변 도메인과의 상호작용을 필요로 하지 않는다. 단일 도메인 항체의 예는 낙타류 (라마 및 낙타) 및 연골어류 (예를 들어, 너스 상어)로부터 유래된 것 및 인간 및 마우스 항체로부터 재조합 방법으로 유래된 것을 포함한다 (문헌 [Nature (1989) 341: 544-546; Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56; Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235; Trends Biotechnol (2003) 21:484-490]; WO 2005/035572; WO 03/035694; [Febs Lett (1994) 339:285-290]; WO00/29004; WO 02/051870).
- [0062] 본원에 사용된 용어 "절반-항체"는 항체의 1 아암을 지칭하고, 적어도 VH 도메인 및 1개의 CH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 절반-항체는 이뮤노어드헤신과 회합되어 본 발명의 이종다량체를 형성할 수 있다. 다른 실시양태에서, 제1 절반-항체는 동일한 또는 상이한 아미노산 서열 (예를 들어, 1개 이상의 아미노산 잔기가 상이함)의 제2 절반-항체와 회합되어 각각 대칭 또는 비대칭 이종다량체를 형성할 수 있다.
- [0063] 용어 "단일-쇄 항체"는 가장 넓은 의미로 본원에 사용되며, 특히 처음에 단일 연속적 폴리펩티드 쇄로서 생성된 단일특이성 또는 다중특이성 (예를 들어, 이중특이성)을 갖는 항체를 포함한다. 이러한 단일-쇄 항체는 서로 상이하거나 또는 동일할 수 있으며, 2개의 상이한 또는 동일한 VH 도메인, 2개의 HC를 연결하는 HD 테더, 및 2개의 상이한 또는 동일한 CH2 도메인 및 2개의 상이한 또는 동일한 CH3 도메인으로부터 선택된 1개 이상의 중쇄 불변 도메인을 포함할 수 있는 2개의 연결된 HC를 갖는 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 단일-쇄 항체는 추가로 1 또는 2개의 상이한 또는 동일한 CH1 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일-쇄 항체는 1 또는 2개의 헌지 도메인을 포함하며, 이는 1개의 HC 도메인 (예를 들어, VH 또는 CH1)을 제2 인접하게 위치한 도메인 (예를 들어, CH2)에 연결시킨다. 다른 실시양태에서, 단일-쇄 항체는 서로 상이하거나 또는 동일할 수 있으며, 각각 CLH 테더에 의해 특정한 HC에 연결된 2개의 상이한 또는 동일한 VL 및 CL 도메인을 각각 포함할 수 있는 1 또는 2개의 연결된 LC를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 단일-쇄 항체는 추가로 HC/HC 또는 HC/LC 이종이량체화를 지지하는 노브-인투-홀(knob-into-hole) 기술을 이용할 수 있으며, 절단가능한 테더를 포함할 수 있다. 단일-쇄 항체는 본 발명의 이종다량체이다.
- [0064] 본원에 사용된, 용어 "다중-쇄 항체"는 2개의 LC 및 2개의 HC로 구성된 항체를 지칭하며, 여기서 2개의 HC는 단일 폴리펩티드로 발현되고, 1개 이상의 LC는 개별 폴리펩티드로 발현된다. 독립적으로 발현된 LC는 그의 동족 HC와 회합되어 2개의 기능적 아암을 갖는 항체를 형성한다. 다중-쇄 항체는 단일특이적 또는 다중특이적일 수 있다. 다중-쇄 항체는 추가로 HC/HC 또는 HC/LC 이종이량체화를 지지하는 노브-인투-홀 기술을 이용할 수 있으며, 절단가능한 테더를 포함할 수 있다.
- [0065] 본원에 언급된 용어 "노브-인투-홀" 또는 "KnH" 기술은 돌출부 (노브)를 하나의 폴리펩티드 내로 및 함몰부 (홀)를 다른 폴리펩티드 내로 이들이 상호작용하는 인터페이스에서 도입함으로써 시험관내에서 또는 생체내에서

함께 2개의 폴리펩티드의 쌍형성을 지시하는 기술을 지칭한다. 예를 들어, KnH는 항체의 Fc:Fc 결합 인터페이스, CL:CH1 인터페이스 또는 VH/VL 인터페이스에서 도입되었다 (예를 들어, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 및 문헌 [Zhu et al. (1997) Protein Science 6:781-788]). 이것은 특히 다중특이적 항체의 제조 동안 함께 2개의 상이한 중쇄의 쌍형성을 유도하는데 유용하다. 예를 들어, 그의 Fc 영역에 KnH를 갖는 다중특이적 항체는 각각의 Fc 영역에 연결된 단일 가변 도메인을 추가로 포함할 수 있거나, 또는 유사하거나 상이한 경쇄 가변 도메인과 쌍형성하는 상이한 중쇄 가변 도메인을 추가로 포함할 수 있다. KnH 기술은 또한 2개의 상이한 수용체 세포와 도메인이 함께, 또는 상이한 표적 인식 서열을 포함하는 임의의 다른 폴리펩티드 서열이 쌍형성하는데 사용될 수 있다.

[0066] 용어 "다중특이적 항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 폴리에피토프 특이성을 갖는 항체를 포함한다. 이러한 다중특이적 항체는 VH/VL 단위가 폴리에피토프 특이성을 갖는, 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항체, 각각의 VH/VL 단위가 상이한 에피토프에 결합하는 2개 이상의 VL 및 VH 도메인을 갖는 항체, 각각의 단일 가변 도메인이 상이한 에피토프에 결합하는 2개 이상의 단일 가변 도메인을 갖는 항체, 전장 항체, 항체 단편, 예컨대 Fab, Fv, dsFv, scFv, 디아바디, 이중특이적 디아바디 및 트리아바디, 공유 또는 비공유 연결된 항체 단편을 포함하고 이로 제한되지 않는다. "폴리에피토프 특이성"은 동일하거나 상이한 표적(들) 상의 2개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 지칭한다. "단일특이적"은 오직 1개의 항원에 결합하는 능력을 지칭한다. 한 실시양태에서, 단일특이적 이종다량체는 동일한 표적/항원 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에 따르면, 다중특이적 항체는 각각의 에피토프에 5 μM 내지 0.001 pM, 3 μM 내지 0.001 pM, 1 μM 내지 0.001 pM, 0.5 μM 내지 0.001 pM, 또는 0.1 μM 내지 0.001 pM의 친화도로 결합하는 IgG 항체이다.

[0067] 본 발명의 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 한편, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 이러한 항체의 단편 (단, 이는 원하는 생물학적 활성을 나타냄)이다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]). 본원에서 관심 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 영장류화 항체를 포함한다.

[0068] 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 원하는 항체 특이성, 친화도 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에 없는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되도록 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 임의로, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0069] 본원에 사용된 "복합체" 또는 "복합체화된"은 웹티드 결합이 아닌 결합 및/또는 힘 (예를 들어, 반 데르 밸스, 소수성, 친수성 힘)을 통해 서로 상호작용하는 2개 이상의 분자의 회합을 지칭한다. 한 실시양태에서, 복합체는 이종다량체이다. 본원에 사용된 용어 "단백질 복합체" 또는 "폴리펩티드 복합체"는 단백질 복합체 내의 단백질에 접합된 비-단백질 개체 (예를 들어, 화학 분자, 예컨대 독소 또는 겸출 작용제를 포함하나 이에 제한되지는 않음)을 갖는 복합체를 포함하는 것으로 이해해야 한다.

[0070] 본원에 사용된 용어 "이종다량체" 또는 "이종다량체성"은 비-펩티드성, 공유 결합 (예를 들어, 디슬피드 결합) 및/또는 비-공유 상호작용 (예를 들어, 수소 결합, 이온성 결합, 반 데르 밸스 힘 또는 소수성 상호작용)에 의해 서로 상호작용하는 상이한 서열의 2개 이상의 폴리펩티드를 설명한다. 또한, 이 정의에는 처음에 연결된 형태의 다량체성 폴리펩티드 (예를 들어, 단일 연속적 폴리펩티드 쇄의 형태로 생산됨)가 포함된다. 본원에 사용된 이종다량체는 예를 들어 단일-쇄 항체 및 다중-쇄 항체 뿐만 아니라 하나 이상의 이뮤노어드헤신과 연관된 하나 이상의 절반 항체를 갖는 다량체를 포함한다. 이종다량체는 HD 테더가 존재하거나 또는 존재하지 않는 폴

리펩티드 및/또는 폴리펩티드 복합체를 포함한다.

[0071] 관심 항원에 "결합하는" 본 발명의 항체는, 항체가 항원을 발현하는 세포 또는 조직의 표적화시에 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 항원에 결합하되 다른 단백질과는 유의하게 교차반응하지 않는 항체이다. 이러한 실시양태에서, "비-표적" 단백질에 대한 항체의 결합 정도는, 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석 또는 방사성면역침전법 (RIA) 또는 ELISA에 의해 측정시 특정한 표적 단백질에 대한 항체 결합의 약 10% 미만일 것이다. 표적 분자에 대한 항체의 결합에 대해, 용어 특정한 폴리펩티드 또는 특정한 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하다" 또는 "특이적인"은 비-특이적 상호작용과 측정 가능하게 상이한 결합을 의미한다 (예를 들어, 비-특이적 상호작용은 소 혈청 알부민 또는 카세인에 대한 결합일 수 있음). 특이적 결합은, 예를 들어 분자의 결합을 대조군 분자의 결합과 비교하여 결정함으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적과 유사한 대조군 분자, 예를 들어 과량의 비-표지된 표적과의 경쟁에 의해 측정할 수 있다. 이 경우에, 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지 표적에 의해 경쟁적으로 억제된다면 특이적 결합이다. 본원에 사용된 용어 특정한 폴리펩티드 또는 특정한 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하다" 또는 "특이적인"은, 예를 들어 표적에 대해 약 1 μM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 200 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 200 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 150 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 150 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 100 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 100 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 60 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 60 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 50 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 50 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 30 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 30 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 20 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 20 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 10 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 10 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 8 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 8 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 6 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 6 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 4 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 4 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 2 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 2 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 1 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 1 nM 내지 약 1 pM의 Kd를 갖는 분자로 나타날 수 있다. 한 실시양태에서, 용어 "특이적 결합"은 분자가 특정한 폴리펩티드 또는 특정한 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하고 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에는 실질적으로 결합하지 않는 것을 나타낸다.

[0072] "결합 친화도"는 일반적으로, 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 전체 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 표시될 수 있다. 예를 들어, Kd는 약 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM 일 수 있거나, 또는 이보다 강할 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원에 서서히 결합하고 용이하게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원에 보다 신속하게 결합하고 보다 길게 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 목적상, 이를 중 임의의 방법이 이용될 수 있다.

[0073] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 25°C에서 비아코어(BIAcore)™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이) 및 고정된 항원 CM5 칩 (~ 10 반응 단위 (RU))을 사용한 표면 플라즈몬 공명 검정을 이용하여 측정한다. 본 발명의 항체는 그의 표적에 대해 약 1 μM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 200 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 200 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 150 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 150 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 100 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 60 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 60 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 50 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 50 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 30 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 30 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 20 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 20 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 10 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 10 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 8 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 8 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 6 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 6 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 4 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 4 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 2 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 2 nM 내지 약 1 pM, 대안적으로 약 1 nM 내지 약 1 fM, 대안적으로 약 1 nM 내지 약 1 pM의 Kd 값을 갖는 친화도를 가질 수 있다. 표면 플라즈몬 공명 검정을 이용하여 Kd 값을 측정하기 위해, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CMS, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클

로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 주입한다. 항원 주사 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1M 에탄올아민을 주입한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (예를 들어, 0.78 nM \rightarrow 500 nM)을 대략 25 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 회합 및 해리 센서그램을 동시에 적합시켜 단순 일-대-일 랭무어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol.

293:865-881 (1999)]을 참조한다. 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 을 초과하면, 분광계, 예컨대 정지 유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠(Aviv Instruments)) 또는 교반 적색 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(Aminco) 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정된 바와 같이, 온-레이트는 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 대역투과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0074] 또한, 본 발명에 따른 "온-레이트", "회합의 비율" 또는 "회합률" 또는 " k_{on} "은 25°C에서 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 잉크., 뉴저지주 피스카타웨이) 및 고정된 항원 CM5 칩 (~ 10 반응 단위 (RU))을 사용하여 상기 동일한 표면 플라즈몬 공명 기술에 의해 측정할 수 있다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 잉크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 주입한다. 항원 주사 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1M 에탄올아민을 주입한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (예를 들어, 0.78 nM \rightarrow 500 nM)을 대략 25 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 회합 및 해리 센서그램을 동시에 적합시켜 단순 일-대-일 랭무어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol.

293:865-881 (1999)]을 참조한다. 그러나, 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 바람직하게는 분광계, 예를 들어 정지 유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코 분광광도계 (써모스펙트로닉)에서 측정된 바와 같이 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역투과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0075] 본 발명의 폴리펩티드, 예컨대 항체, 그의 단편 또는 유도체와 관련하여 "생물학적 활성인" 및 "생물학적 활성" 및 "생물학적 특성"은 달리 명시된 경우를 제외하고 생물학적 분자에 결합하는 능력을 갖는다는 것을 의미한다.

[0076] 본 발명의 이종다량체는 일반적으로 실질적 균질성으로 정제된다. 어구 "실질적으로 균질한", "실질적으로 균질한 형태" 및 "실질적 균질성"은 생성물에 목적하지 않는 폴리펩티드 조합으로부터 유래하는 부산물이 실질적으로 결여됨을 나타내기 위해 사용된다.

[0077] 순도와 관련하여 표현된 실질적 균질성은 부산물의 양이 10 중량%, 9 중량%, 8 중량%, 7 중량%, 6 중량%, 4 중량%, 3 중량%, 2 중량% 또는 1 중량%를 초과하지 않거나, 1 중량% 미만인 것을 의미한다. 한 실시양태에서, 부산물은 5% 미만이다.

[0078] "생물학적 분자"는 핵산, 단백질, 탄수화물, 지질, 및 그의 조합을 지칭한다. 한 실시양태에서, 생물학적 분자는 자연에 존재한다.

[0079] 본원에 개시된 다양한 이종다량체를 기재하는 데 사용되는 경우 "단리된"은 항체를 발현하는 세포 또는 세포 배양물로부터 확인 및 분리되고/되거나 회수된 이종다량체를 의미한다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 전형적으로 폴리펩티드의 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 이종다량체는 (1) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 연기에 충분한 수준까지, 또는 (2) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질해질 때까지 정제될 것이다. 폴리

펩티드 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이므로, 단리된 이종다량체는 재조합 세포 내의 제자리 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드는 적어도 1회의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0080] 본원에 사용된 "연결된" 또는 "연결"은 제1 및 제2 아미노산 서열 사이의 직접적인 펩티드 결합 연결, 또는 제1 및 제2 아미노산 서열에 및 이들 사이에 결합된 펩티드인 제3 아미노산 서열을 포함하는 연결을 의미한다. 예를 들어, 아미노산 링커가 1개의 아미노산 서열의 C-말단 말단부 및 다른 아미노산 서열의 N-말단 말단부에 결합된다.

[0081] 본원에 사용된 "링커"는 길이가 2개 이상의 아미노산인 아미노산 서열을 의미한다. 링커는 중성 극성 또는 비극성 아미노산으로 구성될 수 있다. 링커는 예를 들어 2 내지 100개 아미노산 길이, 예컨대 2 내지 50개 아미노산 길이, 예를 들어 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개 아미노산 길이일 수 있다. 링커는 예를 들어 자가-절단, 또는 효소적 또는 화학적 절단에 의해 "절단가능"할 수 있다. 아미노산 서열 내의 절단 부위 및 이러한 부위에서 절단하는 효소 및 화학물질은 당업계에 공지되어 있고, 또한 본원에 기재된다.

[0082] 본원에 사용된 "HD 테더" 또는 "이종이량체화 테더"는 2개의 상이한 중쇄 불변 (CH) 도메인-함유 폴리펩티드를 함께 연결하는 아미노산 링커를 의미한다. 일반적으로, 2개의 CH 도메인-함유 폴리펩티드는 그 자신이 제2 CH-함유 폴리펩티드의 성분인 VL 도메인에 제1 폴리펩티드의 CH₂ 또는 CH₃ 도메인을 연결시킴으로써 함께 연결된다. 일부 실시양태에서, HD 테더는 제1 폴리펩티드의 CH₃ 도메인을 제2 CH 도메인-함유 폴리펩티드의 VH 도메인에 직접 연결시킨다. 일반적으로, 15-100개 아미노산의 HD 테더가 효과적이며, 20-40개 아미노산, 25-40개 아미노산, 및 30-40개 아미노산의 HD 테더도 효과적이다. 특정한 실시양태에서, HD 테더는 30 내지 39개 아미노산 길이 (예를 들어, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 또는 39개 아미노산 길이)이다. HD 테더는 예를 들어 당업계의 표준 방법 및 시약을 사용하여 자가-절단, 또는 효소적 또는 화학적 절단에 의해 "절단가능"할 수 있다.

[0083] 본원에 사용된 "CLH 테더" 또는 "동족 LC-HC 테더"는 경쇄를 그의 동족 중쇄와 연결시키는 아미노산 링커를 의미한다. CLH 테더는 일반적으로 경쇄의 CL 도메인을 중쇄의 VH 도메인에 연결시키는 아미노산을 지칭한다. 일부 실시양태에서, CLH 테더는 경쇄의 VL 도메인을 중쇄의 VH 도메인에 직접 연결시킨다. 일반적으로, 10-80개 아미노산의 CLH 테더가 효과적이며, 20-40개 아미노산, 25-40개 아미노산, 30-40 개 아미노산 및 30-35개 아미노산 (예를 들어, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35개 아미노산)의 CLH 테더도 효과적이다. 본 발명의 단일-쇄 항체는 서열 및/또는 길이가 상이할 수 있거나 또는 상이할 수 없는 다중 CLH 테더를 가질 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 단일-쇄 항체는 각각 경쇄를 그의 동족 중쇄에 연결시키는 2개의 테더 (CLH 테더₁ 및 CLH 테더₂)를 갖는다. CLH 테더는 예를 들어 당업계의 표준 방법 및 시약을 사용하여 자가-절단, 또는 효소적 또는 화학적 절단에 의해 "절단가능"할 수 있다.

[0084] "링커" 또는 "테더"의 효소적 절단은 엔도펩티다제, 예를 들어 유로키나제, Lys-C, Asp-N, Arg-C, V8, Glu-C, 키모트립신, 트립신, 펩신, 파파인, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPa), 게네나제, 인자 Xa, TEV (담배 식각 바이러스 시스테인 프로테아제), 엔테로키나제, HRV C3 (인간 리노바이러스 C3 프로테아제), 키니노게나제, 뿐만 아니라 서브틸리신-유사 전구단백질 친버타제 (예를 들어, 푸린 (PC1), PC2 또는 PC3) 또는 N-아르기닌 이염기성 친버타제의 사용을 수반할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 효소적 절단은 엔도펩티다제 푸린을 포함한다. 화학적 절단은 예를 들어 히드록실아민, N-클로로су신이미드, N-브로모су신이미드 또는 브로민화시아노겐의 사용을 수반할 수 있다.

[0085] 본원에 사용된 "푸린 엔도펩티다제 절단 부위"는 X₁-X₂-X₃-아르기닌 아미노산 서열 (서열 6)이며, 여기서 X₁은 염기성 아미노산 잔기 (천연 또는 비천연, 변형되거나 또는 변형되지 않음)이고, X₂ 및 X₃은 각각 푸린 엔도펩티다제에 의해 C-말단 측면에서 절단될 수 있는 임의의 아미노산 잔기 (천연 또는 비천연, 변형되거나 또는 변형되지 않음)이다. 푸린 엔도펩티다제는 아르기닌 잔기의 C-말단 측면에서 절단한다. 특정 실시양태에서, 푸린 절단 부위는 아미노산 서열 RXRXYR을 포함하며, 여기서 Y는 K 또는 R이고, X는 임의의 아미노산 잔기 (서열 7)이고, 보다 구체적으로는 RXRXRR (서열 8)이다. 특정 실시양태에서, 푸린 절단 부위는 아미노산 서열 RKRKRR (서열 9)을 포함한다. 특정의 다른 실시양태에서, 푸린 절단 부위는 RHRQPR (서열 10)의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 푸린 절단 부위는 아미노산 서열 RSRKRR (서열 11)을 포함한다.

[0086] 본원에 사용된 "Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위"는 Lys-C 엔도펩티다제에 의해 C-말단 측면에서 절단될 수 있는 아미노산 서열의 리신 잔기이다. Lys-C 엔도펩티다제는 리신 잔기의 C-말단 측면에서 절단된다.

[0087] "링커" 또는 "테더"의 효소적 절단은 또한 엔도펩티다제 절단 후에 나머지 엔도펩티다제 인식 서열을 제거하기

위해 엑소펩티다제, 예컨대 예를 들어 카르복시펩티다제 A, 카르복시펩티다제 B, 카르복시펩티다제 D, 카르복시펩티다제 E (또한 카르복시펩티다제 H로 지칭됨), 카르복시펩티다제 M, 카르복시펩티다제 N, 또는 카르복시펩티다제 Z의 사용을 포함할 수 있다.

[0088] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0089] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성의 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 상기 세포독성의 이펙터 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 지칭한다. 항체는 세포독성 세포의 "아암"이고 이러한 사멸에 반드시 필요하다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성을 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0090] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 추가로, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하고 상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함하여 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 하위부류의 수용체를 포함하는 것이다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하며, 이들은 주로 그의 세포질 도메인에서 차이가 나는 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토되어 있다. 추후로 확인될 것을 포함하여 다른 FcR이 본원에서의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 모 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 또한 포함한다 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]).

[0091] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 단리될 수 있다.

[0092] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재 하의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 고전적 보체 경로의 활성화는 보체계의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 하위부류의 항체)에 결합하는 것에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0093] 용어 "치료 유효량"은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 이종다량체, 항체, 항체 단편 또는 유도체의 양을 지칭한다. 종양 (예를 들어, 암성 종양)의 경우에, 치료 유효량의 이종다량체, 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 다중특이적 항체 또는 항체 단편)은 암 세포 수의 감소, 원발성 종양 크기의 감소, 주변 기관으로의 암 세포 침윤의 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 정지시킴); 종양 전이의 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 정지시킴); 종양 성장의 어느 정도로의 억제 및/또는 장애와 연관된 하나 이상의 증상의 어느 정도로의 경감을 달성할 수 있다. 이종다량체, 항체 또는 항체 단편이 기존의 암 세포의 성장을 억제하고/하거나 이를 사멸시킬 정도로, 세포증식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법의 경우에, 생체내 효능은 예를 들어 생존 기간, 질환 진행까지의 시간 (TTP), 반응률 (RR), 반응 지속기간 및/또는 삶의 질을 평가하여 측정될 수 있다.

[0094] "감소시키거나 억제한다"는 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 75%, 85%,

90%, 95% 또는 그 초과의 전반적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 감소 또는 억제는 치료할 장애의 증상, 전이의 존재 또는 크기, 원발성 종양의 크기, 또는 혈관신생 장애에서 혈관의 크기 또는 수를 지칭할 수 있다.

[0095] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, 1¹³¹, 1¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², Ra²²³, P³², 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 예를 들어 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빙카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빙블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입제, 효소 및 그의 단편, 예컨대 핵산분해 효소, 항생제, 및 독소, 예를 들어 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 예를 들어 그의 단편 및/또는 변이체, 및 본원에 개시된 다양한 항종양제, 항암제 및 화학요법제를 포함하는 것으로 의도된다. 다른 세포독성제는 본원에 기재되어 있다. 종양사멸제는 종양 세포의 파괴를 유발한다.

[0096] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)® 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸리넬라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌넬라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오프스포르아미드 및 트리메틸올로넬라민; 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베타린산; 캄프토데신 (합성 유사체 토포데칸 (하이캄틴(HYCANTIN)®), CPT-11 (이리노데칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄프토데신, 스코폴레틴 및 9-아미노캄프토데신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르겔레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 포도필로토신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로로나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1 (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem. Int'l. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994)] 참조); 디네미신, 예를 들어 디네미신 A; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 약티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칙티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)® 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로페오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항부신, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포탈론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 웜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오리곤주 유진); 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라큐린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 탁솔(TAXOL)® 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스큐브 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스톤), 아브락산(ABRAXANE)® 파클리탁셀의 크레모포르-무함유 알부민-조작된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 일리노이주 샘버그) 및 탁소테레(TAXOTERE)® 도세탁셀 (롱-프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니); 클로란부실; 챔시타빈 (챔자르(GEMZAR)®); 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴;

빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈 (겔로다(XELODA)®); 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 중 둘 이상의 조합물, 예컨대 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법을에 대한 약어) 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보빈과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)™)을 사용하는 치료 요법에 대한 약어)를 포함한다.

[0097]

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

[0098]

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

[0099]

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

[0100]

"표적 분자"는 본 발명의 단백질 복합체에 (바람직하게는 스캐차드 분석에 따라 1 μM Kd보다 높은 친화도로) 결합할 수 있는 분자를 지칭한다. 표적 분자의 예는 혈청 가용성 단백질 및 그의 수용체, 예컨대 시토카인 및 시토카인 수용체, 어드헤신, 성장 인자 및 그의 수용체, 호르몬, 바이러스 입자 (예를 들어, RSVF 단백질, CMV,

StaphA, 인플루엔자, C형 간염 바이러스), 미생물 (예를 들어, 박테리아 세포 단백질, 진균 세포), 어드헤신, CD 단백질 및 그의 수용체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0101] "대상체"는 척추동물, 예컨대 포유동물, 예를 들어 인간이다. 포유동물은 가축 (예컨대, 소), 스포츠 동물, 애완동물 (예컨대, 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스, 및 래트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0102] 달리 나타내지 않는 한, 본 실시예에 언급된 상업적으로 입수 가능한 시약은 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. ATCC 등록 번호에 의해, 하기 실시예 및 명세서 전반에 걸쳐 확인되는 세포의 공급원은 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection, 버지니아주 마나사스)이다. 달리 나타내지 않는 한, 본 발명은 본원의 상기 및 하기 문헌에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 기술의 표준 절차를 이용한다: 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]; [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1989); Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc., NY, 1990); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press, Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991].

[0103] 본 명세서 및 특허청구범위 전반에 걸쳐, 용어 "포함하다", 또는 "포함한다" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 언급한 정수 또는 정수 군을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수 군을 배제하지는 않는다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0104] 본원에 사용된 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 종양 세포에 덜 세포독성이고, 보다 활성의 모 형태로 효소에 의해 활성화되거나 전환될 수 있는, 제약 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 및 Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조한다. 전구약물은 보다 활성의 세포독성의 유리 약물로 전환될 수 있는, 포스페이트-함유 전구약물, 티오프스페이트-함유 전구약물, 슬레이트-함유 전구약물, 웨티드-함유 전구약물, D-아미노산-변형 전구약물, 글리코실화 전구약물, 베타-락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 폐녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 폐닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기 기재된 화학요법제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0105] 용어 "시토카인"은 세포간 매개자로서 또 다른 세포에 대해 작용하는, 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반 용어이다. 이러한 시토카인의 예는 립포카인, 모노카인 및 통상적인 폴리펩티드 호르몬이다. 시토카인 중에 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬 (HGH), N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예를 들어 여포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체화 호르몬 (LH); 표피 성장 인자 (EGF); 간 성장 인자; 섭유모세포 성장 인자 (FGF); 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 물러관 억제 물질; 마우스 고나도 트로핀-연관 웨티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예를 들어 NGF- α ; 혈소판-성장 인자; 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF- β ; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예컨대 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터류킨 (IL), 예컨대 IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-18; 종양 괴사 인자, 예를 들어 TNF- α 또는 TNF- β ; 및 LIF 및 kit 리간드 (KL)를 포함하는 다른 폴리펩티드 인자가 포함한다. 본원에 사용된 용어 시토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 시토카인의 생물학적 활성을 포함한다.

[0106] "시토카인 길항제"는 하나 이상의 시토카인의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나 또는 중화시키는 분자를 의미한다. 예를 들어, 시토카인 길항제는 시토카인 발현 및/또는 분비의 억제에 의해, 또는 시토카인 또는 시토카인 수용체에의 결합에 의해 시토카인 활성을 억제할 수 있다. 시토카인 길항제는, 항체, 이종다량체, 합성 또는 천연-서열 웨티드, 이뮤노어드헤신, 및 시토카인 또는 시토카인 수용체에 결합하는 소분자 길항제를 포함한다. 시토카인 길항제는 임의로 세포독성제와 접합 또는 융합된다.

[0107] 본원에 사용된 용어 "면역억제제"는 치료되는 대상체의 면역계를 저해하거나 또는 차폐하는 작용을 하는 물질을

지칭한다. 이는 시토카인 생성을 저해하거나, 자가-항원 발현을 하향조절 또는 저해하거나, 또는 MHC 항원을 차폐하는 물질을 포함한다. 면역억제제의 예는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 페리미딘 (미국 특허 번호 4,665,077 참조); 미코페놀레이트 모페틸, 예컨대 셀셉트(CELLCEPT)®; 아자티오프린 (이뮤란(IMURAN)®, 아자산(AZASAN)®/6-메르캅토피린; 브로모크립틴; 다나졸; 딥손; 글루타르알테히드 (미국 특허 번호 4,120,649에 기재된 바와 같이 MHC 항원을 차폐함); MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체; 시클로스포린 A; 스테로이드, 예컨대 코르티코스테로이드 및 글루코코르티코스테로이드, 예를 들어 프레드니손, 프레드니솔론, 예컨대 페디아프레드(PEDIAPRED)® (프레드니솔론 인산나트륨) 또는 오라프레드(ORAPRED)® (프레드니솔론 인산나트륨 경구 용액), 메틸프레드니솔론 및 텍사메타손; 메토트렉세이트 (경구 또는 피하) (류마트렉스(RHEUMATREX)®, 트렉살(TREXALL)™); 히드록시클로로퀸/클로로퀸; 술파살라진; 레플루노미드; 시토카인 또는 시토카인 수용체 길항제, 예를 들어 항-인터페론- γ , - β 또는 - α 항체, 항종양 괴사 인자- α 항체 (인플릭시맙 또는 아달리무맙), 항-TNF α 이뮤노어드헤신 (엔브렐(ENBREL)®, 에타네르셉트), 항종양 괴사 인자- β 항체, 항-인터류킨-2 항체, 및 항-IL-2 수용체 항체; 항-LFA-1 항체, 예를 들어 항-CD11a 및 항-CD18 항체; 항-L3T4 항체; 이종 항립프구 글로불린; 폴리클로날 또는 pan-T 항체, 또는 모노클로날 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체; LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 웹터드 (WO 90/08187); 스트렙토키나제; TGF- β ; 스트렙토도르나제; 숙주로부터의 RNA 또는 DNA; FK506; RS-61443; 데옥시스페르구알린; 라파마이신; T-세포 수용체 (미국 특허 번호 5,114,721 (Cohen et al.)); T-세포 수용체 단편 (문헌 [Offner et al. Science 251: 430-432 (1991)]; WO 90/11294; [Ianeway, Nature 341:482 (1989)]; 및 WO 91/01133); T 세포 수용체 항체 (EP 340,109), 예컨대 T10B9; 시클로포스파미드 (시톡산®); 딥손; 페니실라민 (큐프리민(CUPRIMINE)®); 혈장 교환; 또는 정맥내 이뮤노글로불린 (IVIG)을 포함한다. 이들은 단독으로 또는 서로 조합하여, 특히 스테로이드 및 또 다른 면역억제제와 조합하여 사용될 수 있거나, 또는 이러한 조합물에 이어서 스테로이드에 대한 요구를 줄이기 위한 비-스테로이드 작용제를 함유하는 유저 용량으로 사용될 수 있다.

[0108] "진통제"는 대상체에서 통증을 억제 또는 저해하는 작용을 하는 약물을 지칭한다. 예시적인 진통제는 비스테로이드성 항염증성 약물 (NSAID), 예를 들어 이부프로펜 (모트린(MOTRIN)®), 나프록센 (나프로신(NAPROSYN)®), 아세틸살리실산, 인도메타신, 술린닥 및 톨메틴 (그의 염 및 유도체 포함), 뿐만 아니라 발생할 수 있는 자통의 감소에 사용되는 여러 다른 의약, 예를 들어 항경련제 (가바펜틴, 페닐로인, 카르바마제핀) 또는 삼환계 항우울제를 포함한다. 구체적인 예는 아세트아미노펜, 아스피린, 아미트립틸린 (엘라빌(ELAVIL)®), 카르바마제핀 (테그레톨(TEGRETOL)®), 페닐토인 (딜란틴(DILANTIN)®), 가바펜틴 (뉴론틴(NEURONTIN)®), (E)-N-바닐릴-8-메틸-6-논아미드 (캡사이신(CAPSACIN)®) 또는 신경 차단제를 포함한다.

[0109] "코르티코스테로이드"는 자연 발생 코르티코스테로이드의 효과를 모방하거나 증대시키는, 스테로이드의 일반적 화학 구조를 갖는 여러 합성 또는 자연 발생 물질 중 임의의 것을 지칭한다. 합성 코르티코스테로이드의 예는 프레드니손, 프레드니솔론 (메틸프레드니솔론 포함), 텍사메타손, 트리암시놀론 및 베타메타손을 포함한다.

[0110] 본원에 사용된 "암 백신"은 대상체에서 암에 대한 면역 반응을 자극하는 조성물이다. 전형적으로, 암 백신은 항원에 대한 면역 반응을 추가로 자극 및 부스팅하는 다른 성분 (예를 들어, 아주반트)과 함께, 대상체에 대해 자가유래 (자신으로부터) 또는 동종이계 (다른 것으로부터)일 수 있는 암-연관 물질 또는 세포 (항원)의 공급원으로 구성된다. 암 백신은 대상체의 면역계의 자극을 유발하여 하나 또는 여러 특정 항원에 대한 항체를 생산하고/거나 이를 항원을 갖는 암 세포를 공격하기 위한 킬러 T 세포를 생산할 수 있다.

[0111] "항구토제"는 대상체에서 오심을 줄이거나 또는 예방하는 화합물이다. 항구토제 화합물은, 예를 들어 뉴로키닌-1 수용체 길항제, 5HT3 수용체 길항제 (예컨대, 온단세트론, 그라니세트론, 트로피세트론 및 자티세트론), GABAB 수용체 효능제, 예컨대 바클로펜, 코르티코스테로이드, 예컨대 텍사메타손, 케나로그(KENALOG)®, 아리스토코트(ARISTOCORT)® 또는 나살리드(NASALIDE)®, 항도파민제, 페노티아진 (예를 들어, 프로클로르페라진, 플루페나진, 티오리다진 및 메소리다진), 드로나비놀, 메트로클로프라미드, 돔페리돈, 할로페리돌, 시클리진, 로라제팜, 프로클로르페라진, 및 레보메프로마진을 포함한다.

II. 단일-쇄 및 다중-쇄 테더링된 항체 및 다른 이종다량체의 구축

[0112] 본원에 기재된 이종다량체 (단일특이적 및 다중특이적 (예를 들어, 이종특이적) 항체 포함)는 하나 이상의 테더를 사용하여 구축될 수 있다.

[0114] 테더의 사용은 단일 이종다량체 내에 상이한 중쇄 및/또는 경쇄를 갖는 상대적으로 순수한 이종다량체 집단의 구축을 가능하게 한다. 특히, 상기 기재된 바와 같이, 항체는 전형적으로 2개의 동일한 중쇄를 포함하며, 이들은 각각 2개의 동일한 경쇄 중 하나와 쌍을 형성한다. 본 발명의 테더 기술의 사용은 상이한 항체 중쇄가 서로

이량체화되어 단일 폴리펩티드 쇄에 의해 형성된 단일 이종다량체성 항체를 형성하는 것을 가능하게 한다. 테더는 전형적으로 그 자체로 제2 테더에 의해 제2 중쇄에 연결되는 경쇄의 VL 도메인에 제1 중쇄의 CH3 도메인을 연결시킴으로써, 제1 중쇄를 제2 중쇄에 연결시킬 수 있다. 이종다량체 단일-쇄 항체에서, 제3 테더는 제2 경쇄를 제1 중쇄에 직접 연결시킬 수 있으며, 이에 따라 각각 그의 동족 경쇄와 쌍을 형성할 수 있는 2개의 상이한 중쇄를 포함하는 이종다량체가 생성된다. 다른 실시양태에서, 테더는 제1 중쇄 불변 도메인의 C-말단을 제2 중쇄 가변 도메인의 N-말단과 연결시킴으로써 제1 중쇄를 제2 중쇄에 직접 연결시킬 수 있다. 이러한 이종다량체 내의 중쇄 및 경쇄의 각각의 쌍은 상이한 중쇄 및 경쇄 동족 쌍의 존재로 인해 상이한 결합 특이성을 가질 수 있으며, 따라서 이종다량체는 다중특이적 항체로 간주될 수 있다. 본 발명의 테더 기술의 사용은 또한 3개의 폴리펩티드 쇄의 회합을 포함할수 있는 이종다량체 (예를 들어, 다중-쇄 항체)의 형성을 가능하게 하며, 여기서 1개의 폴리펩티드 쇄는 상기 기재된 바와 같이 HD 테더에 의해 함께 직접 연결된 2개의 HC를 포함하고, 다른 2개의 폴리펩티드 쇄는 동일하며, 2개의 HC와 회합하는 LC를 형성하여 2개의 기능적 HC/LC 동족 쌍을 형성한다. 다른 실시양태에서, HD 및 CLH 테더의 사용은 2개의 폴리펩티드 쇄에 의한 다중-특이적 항체의 형성을 가능하게 하며, 여기서 1개의 폴리펩티드 쇄는 제1 LC를 형성하고, 다른 폴리펩티드 쇄는 2개의 HC 및 제2 LC를 포함하고, 이는 HD 테더를 통해 제1 HC와 회합하고 CLH 테더를 통해 제2 HC와 회합한다. 다른 실시양태에서, HD 및 CLH 테더의 사용은 2개의 폴리펩티드 쇄를 갖는 다중-특이적 항체의 형성을 가능하게 하며, 여기서 제1 폴리펩티드 쇄는 제1 LC 및 2개의 HC를 포함하고, 이 때 1개의 HC는 CLH 테더를 통해 제1 LC와 직접 상호작용하고, HD 테더를 통해 제2 HC와 직접 상호작용하고, 제2 폴리펩티드는 제1 LC에 연결되지 않은 HC와 회합하는 제2 LC를 형성한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 테더 기술의 이용은 이뮤노어드헤신이 HD 테더를 통해 절반-항체화 회합하는 이종다량체의 형성을 가능하게 한다. 테더 기술은 단독으로 또는 노브-인투-홀 ("KnH") 기술과 조합하여 이용함으로써 본 발명의 이종다량체를 조작한다. KnH 기술을 이용하거나 또는 이용하지 않은 테더를 포함하는 이종다량체 뿐만 아니라 재조합 이종다량체 생산이 하기에 보다 상세하게 기재된다.

[0115] A. 이종다량체 테더

본 발명은 테더를 사용하여 구축된 이종다량체를 제공한다. 예를 들어, 이종다량체는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인의 C-말단을 이뮤노글로불린 중쇄 가변 도메인의 N-말단과 연결하는 테더를 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, 이종다량체는 중쇄의 그의 동족 경쇄와의 적절한 회합 (즉, 중쇄가 테더링되는 경쇄와 이 중쇄의 회합)을 돋기 위한 1개 이상의 (예를 들어, 2개의) 추가의 테더를 추가로 포함한다. 이러한 이종다량체는 추가의 이종이량체화 도메인, 예컨대 KnH 기술을 이용하여 생성된 것을 사용하거나 또는 사용하지 않고 구축될 수 있다.

도 1의 개략적 다이어그램에 도시된 바와 같이, 예시적인 이종다량체는 2개의 상이한 중쇄 (HC1 및 HC2) 및 2개의 상이한 경쇄 (LC1 및 LC2)를 함유하는 다중특이적 단일-쇄 항체이며, 여기서 HC1 및 LC1은 제1 동족 쌍을 형성하고, HC2 및 LC2는 제2 동족 쌍을 형성한다. 예시적인 이종다량체에서, 3개의 테더가 존재한다. 제1 테더 (HD 테더)는 HC1을 LC2와 연결시키고, 제2 테더 (CLH 테더₁) 및 제3 테더 (CLH 테더₂)는 각각 LC1을 HC1과 연결시키고 LC2를 HC2와 연결시킨다. 테더는 2개의 상이한 중쇄 및 그의 동족 경쇄를 함께 불러오는 것을 돋고, 이에 의해 다중특이성을 갖는 이종다량체 단일-쇄 항체가 생성된다.

특정한 실시양태에서, HD 테더는 제1 및 제2 중쇄의 적절한 회합을 허용하기 위한 어셈블리된 이종다량체 (도 1)에서 HC1의 C-말단 및 LC2의 N-말단 사이의 (또는, LC2, HC2의 부재 하의) 거리를 스패닝하기에 충분히 길지만, HC1 및/또는 HC2의 분자간 동종이량체화를 방지하기에 충분히 짧다. HC1의 C-말단 및 LC2의 N-말단 사이의 (또는 LC2, HC2의 부재 항의) 거리는 어셈블리된 이종다량체 상이에서 상이할 수 있으며, 이에 따라 HD 테더의 길이는 또한 이종다량체 사이에서 달라질 수 있다. 일반적으로, 15-100개 아미노산의 HD 테더가 효과적이며, 20-40개 아미노산, 25-40개 아미노산 및 30-40개 아미노산의 HD 테더도 효과적이다. 특정한 실시양태에서, HD 테더는 36 내지 39개 아미노산 길이 (예를 들어, 36, 37, 38 또는 39개 아미노산 길이)이다.

특정한 실시양태에서, CLH 테더는 적절한 경쇄/중쇄 회합을 허용하기 위한 어셈블리된 이종다량체 (도 1)에서 중쇄의 N-말단 및 그의 동족 경쇄의 C-말단 사이의 거리를 스패닝하기에 충분히 길지만, 원치않는 쇄내 회합 (즉, 경쇄가 그에 직접 테더링되지 않는 비-동족 중쇄와 이러한 경쇄의 회합)을 방지하기에 충분히 짧다. 중쇄의 N-말단 및 그의 동족 경쇄의 C-말단 사이의 거리는 항체 사이에서, 또는 심지어는 항체 그 자체 내에서 상이할 수 있다 (즉, 제1 동족 쌍의 중쇄의 N-말단 및 동족 경쇄의 C-말단 사이의 거리는 제2 동족 쌍의 것과 상이함). 따라서, HD 테더의 길이는 본 발명의 이종다량체 사이에서 달라질 수 있고, CLH 테더₁의 길이는 동일한 이종다량체 내의 CLH 테더₂의 길이와 동일하지 않을 수 있다. 일반적으로, 10-80개 아미노산의 CLH 테더가 효

과적이며, 20-40개 아미노산, 25-40개 아미노산, 30-40개 아미노산 및 30-35개 아미노산 (예를 들어, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35개 아미노산)의 CLH 테더도 효과적이다. 본 발명의 이종다량체는 제1 경쇄를 제1 중쇄와 연결시키고 제2 경쇄를 제2 중쇄와 연결시키는 2개의 테더 (CLH 테더₁ 및 CLH 테더₂)를 가질 수 있다.

[0120] HD 또는 CLH 테더는 가요성을 유지하고, 2차 구조를 형성하지 않을 수 있으며, 이러한 목적을 위해 글리신 (G) 및 세린 (S) 잔기를 함유하는 테더가 사용될 수 있다. 테더는 단독으로 G 및 S 잔기로 이루어질 수 있으나, 테더가 상기 기재된 쇄내 회합을 허용하도록 가요성을 유지하는 한 다른 잔기를 또한 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, HD 또는 CLH 테더는 GGS 반복부를 함유한다 (도 2). 일부 실시양태에서, HD 테더는 1개 이상의 GGS 반복부를 함유한다. 본원에 기재된 예시적인 HD 테더는 그의 N- 및 C-말단에 8-9개 GGS 반복부 (서열 19) 및 엔도펩티다제 절단 부위 (예를 들어, 푸린 및 Lys-C 절단 부위)를 함유한다 (도 2). 또 다른 실시양태에서, CLH 테더는 1개 이상의 GGS 반복부를 함유한다. 본원에 기재된 예시적인 CLH 테더는 그의 N- 및 C-말단에 6개의 GGS 반복부 (서열 20) 및 엔도펩티다제 절단 부위 (예를 들어, 푸린 절단 부위)를 함유한다 (도 2).

B. 이종다량체 테더의 절단

[0122] 본 발명의 이종다량체가 어셈블리되면, 테더는 더 이상 요구되지 않을 수 있고, 일부 실시양태에서, 이종다량체로부터 절단될 수 있다. 테더 내에서 또는 테더와 바로 인접한 곳에서 발견되지만, 비-테더 이종다량체 성분 서열에 존재하지 않거나 또는 사용되는 조건 하에 절단을 위해 접근가능하지 않은 절단 부위가 테더를 제거하는데 사용될 수 있다.

[0123] 도 2는 예시적인 이종다량체 단일-쇄 항체 내에 존재할 수 있는 3개의 테더 내의 예시적인 절단 부위의 위치를 보여준다. 일반적으로, 테더 내의 절단 부위는 테더 서열의 C- 및 N-말단에 또는 이에 근접하여 위치하거나 또는 항체 및 테더가 연결되는 부위에 또는 이 부위에 근접하여 항체 서열 내에 위치한다. 테더 중 하나 이상이 Lys-C 엔도펩티다제를 사용하여 절단되는 경우에 (예를 들어, 불변 중쇄의 C-말단의 리신 잔기에서), 이종다량체의 서열은 Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위를 제거하기 위해 변형될 필요가 있을 수 있다. 이러한 변형의 예는 힌지 영역 내의 리신의 알라닌으로의 돌연변이 (예를 들어, 본원에 기재된 예시적인 이종다량체에서 K222A, 카바트 넘버링 시스템; K222A, EU 넘버링 시스템)이다. 상이한 절단제가 본 발명에서 사용하기 위해 선택될 때 다른 절단 부위의 변형이 필요하고 이루어질 수 있다.

[0124] 특정한 부위에서 아미노산 서열의 절단은 당업계의 표준이고, 효소에 의한 절단, 화학적 절단, 또는 자가 처리를 수반할 수 있다. 예를 들어, 테더는 엔도펩티다제를 사용하여 단백질로부터 절단될 수 있다. 예시적인 엔도펩티다제는 푸린, 우로키나제, Lys-C, Asp-N, Arg-C, V8, Glu-C, 트롬빈, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPa), 게네나제 (서브틸리신 BPN' 프로테아제의 변이체), 인자 Xa, TEV (담배 식각 바이러스 시스테인 프로테아제), 엔테로키나제, HRV C3 (인간 리노바이러스 C3 프로테아제), 키니노게나제, 키모트립신, 트립신, 웨브신 및 파파인을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 이들은 모두 상업적으로 입수 가능하다 (예를 들어, 베링거 만하임 (Boehringer Mannheim), 씨모 사이언티픽(Thermo Scientific), 또는 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)). 서브틸리신-유사 전구단백질 커버타제, 예컨대 푸린 (PC1), PC2 및 PC3 (문헌 [Steiner (1991) in Peptide Biosynthesis and Processing (Fricker ed.) pp. 1-16, CRC Press, Boca Raton, FL; Muller et al., JBC 275:39213-39222, (2000)]) 및 N-아르기닌 이염기성 커버타제 (문헌 [Chow et al., JBC 275:19545-19551 (2000)])는 이염기성 부위에서 절단한다. Lys-C는 리신 잔기의 카르복실 측면에서 절단하고, V8 및 Glu-C는 글루타메이트 잔기의 카르복실 측면에서 절단하고, Arg-C는 아르기닌 잔기의 카르복실 측면에서 절단하고, Asp-N은 아스파르테이트 잔기의 아미노 측면에서 절단하고, 키모트립신은 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 및 류신 잔기의 카르복실 측면에서 절단하고, 트립신은 아르기닌 및 리신 잔기의 카르복실 측면에서 절단한다. TEV는 아미노산 서열 GluAsnLeuTyrPheGlnGly (서열 4)을 "Gln" 및 "Gly" 잔기 사이에서 절단한다. 그러한 효소의 용도는 당업계의 표준이고, 프로토콜은 제조자로부터 이용 가능하다. 도 3a은 푸린으로의 절단 후에 예시적인 이종다량체 단일-쇄 항체를 보여준다.

[0125] 대안적으로 테더는 화학 물질, 예컨대 히드록실아민을 사용하여 단백질로부터 절단될 수 있다. 히드록실아민은 아스파라긴-글리신 웨프티드 결합을 절단한다. 히드록실아민이 단백질로부터 테더를 절단하기 위해 사용되는 경우에, 단백질의 단편화를 방지하기 위해 단백질 내의 몇몇 글리신 또는 아스파라긴 잔기가 돌연변이될 필요가 있을 수 있다.

[0126] 웨프티드 결합을 절단하는 많은 다른 화학물질이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, N-클로로숙신이미드는 트립토판 잔기의 C-말단 측면을 절단한다 (문헌 [Shechter et al., Biochemistry 15:5071-5075 (1976)]). N-브로모숙신이미드 및 브로민화시아노겐은 또한 트립토판 잔기의 C-말단 측면을 절단한다. 또한, 2-니트로티오시

아노벤조산 또는 유기포스핀은 단백질을 시스테인 잔기의 N-말단 측면에서 절단하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, EP 0339217 참조).

[0127] 단백질은 또한 자가-처리되는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 헛지호그(Hedgehog) 단백질은 단백질 내의 단백질분해 활성에 의해 GlyAspTrpAsnAlaArgTrpCysPhe 절단 부위 (서열 5)에서 처리된다. 또한, 자가단백질 분해 절단 부위가 링커 또는 테더 서열에 포함될 수 있다.

[0128] 엔도펩티다제 절단 후에, 본 발명의 이종다량체는 이종다량체의 정제 전에 또는 후에 하나 이상의 엑소펩티다제에 의해 추가로 처리될 수 있다. 도 3b는 정제 및 푸린, Lys-C, 및 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B) 처리 후의 이종다량체 단일-쇄 항체를 보여준다. 푸린 처리 후에, 이종다량체의 CH₃₁ 도메인에 여전히 부착된 HD 테더는 Lys-C 처리에 의해 제거된다. CL₁ 및 CL₂ 도메인에 부착된 나머지 푸린 인식 서열은 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)로의 처리에 의해 제거된다.

C. 노브-인투-홀 기술

[0130] 본 발명의 이종다량체는 추가로 2개의 상이한 항체 중쇄 사이의 인터페이스를 그의 회합을 촉진하도록 조작하는 노브-인투-홀 (KnH) 기술 (예를 들어, 그의 전체내용이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,731,168 참조)을 이용하는 이종이량체화 도메인을 포함할 수 있다. 일반적으로, 방법은 제1 중쇄의 인터페이스에서의 "돌출부" 및 제2 중쇄의 인터페이스 내의 대응하는 "함몰부"를, 돌출부가 중쇄의 이종이량체화를 추가로 촉진하도록 함몰부 내에 위치할 수 있게 도입하는 것을 포함한다.

[0131] 제1 바람직한 인터페이스는 제1 중쇄 (CH₃₁) 불변 도메인의 CH₃ 도메인의 적어도 일부 및 제2 중쇄 (CH₃₂) 불변 도메인의 CH₃ 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 돌출부는 제1 도메인 (예를 들어, CH₃₁)의 인터페이스로부터의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체하여 구축될 수 있다. 돌출부와 동일한 또는 유사한 크기의 상보적 함몰부는 임의로 제2 도메인 (예를 들어, CH₃₂)의 인터페이스 상에서 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체하여 생성될 수 있다. 제2 바람직한 인터페이스는 경쇄의 CL 도메인의 적어도 일부 및 중쇄의 CH₁ 도메인을 포함하며, 여기서 돌출부-함몰부 상호작용이 상기 기재된 바와 같이 구축될 수 있다. 적합하게 위치하고 한정된 돌출부 또는 함몰부가 제1 또는 제2 도메인의 인터페이스에 존재하는 경우에, 오직 인접한 인터페이스에서 각각 대응하는 함몰부 또는 돌출부를 조작할 필요가 있다.

D. 상이한 결합 특성을 갖는 단일특이적 또는 다중특이적 이종다량체

[0133] 이러한 이종다량체의 가변 도메인이 여러 방법으로부터 유래될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 본 발명의 이종다량체의 가변 도메인은 당업계에 공지된 기존의 항체와 같을 수 있다.

[0134] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 HD 테더는 다양한 결합 특성을 갖는 이종다량체를 생성하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 동일한 표적 에피토프에 대해 상이한 결합 친화도를 갖는 2개의 절반-항체를 포함하는 단일-쇄 단일특이적 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 단일-쇄 다중특이적 항체 (2개 이상의 항원 또는 동일한 항원 상의 2개 이상의 에피토프에 결합하는 항체)를 생성하는데 사용될 수 있다. 전형적으로, 자연 발생 IgG 항체에서, 항체 내의 중쇄 및 경쇄의 각각의 쌍의 가변 영역은 동일하다. 본 발명에 따른 테더의 사용은 상이한 상체 내의 2개의 중쇄가 상이한 결합 특이성을 갖는 항원-결합 도메인 (예를 들어, 에피토프 표적) 또는 동일한 특이성을 갖지만 상이한 결합 친화도를 갖는 항원-결합 도메인을 갖는 항체를 생성하는 것을 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, HD 테더는 단일 폴리펩티드 쇄 내에서 코딩되는 2개의 상이한 중쇄 사이의 회합을 촉진하여 오직 중쇄만의, 단일-쇄 항체를 생성한다. 다른 실시양태에서, CLH 테더는 중쇄 및 그의 동족 경쇄 사이의 회합을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 중 하나 및 그의 동족 경쇄 사이의 회합은 CLH 테더 없이 구축되어 본 발명의 이종다량체를 생성한다. 임의로, 테더 중 하나 이상은 엔도펩티다제 절단 부위 (예를 들어, 푸린 및 Lys-C 절단 부위)를 포함하며, 이는 하나 이상의 테더가 어셈블리 후에 이종다량체로부터 제거되도록 절단될 수 있다. 임의로, 본 발명의 이종다량체는 KnH 기술을 이용하여 생성된 하나 이상의 돌출부-함몰부 인터페이스를 추가로 포함한다.

[0135] 도 1에 도시된 바와 같이, 상기 기재된 예시적인 이종특이적 이종다량체 (이 경우에, 이종특이적 항체)는 HD 테더 및 2개의 CLH 테더를 함유하며, 이들은 각각 그의 N- 및 C-말단에 2개의 푸린 절단 부위를 포함할 수 있다. 임의로, 예시적인 이종다량체는 KnH 기술을 이용하여 HC1 및 HC2의 회합을 추가로 촉진할 수 있다.

[0136]

테더의 절단이 예측되는 이종다량체는 그의 서열 내에 테더를 절단하는데 사용되는 엔도펩티다제(들)에 대한 절단 부위를 함유하지 않아야 하거나, 이종다량체의 비-테더 서열 내에 절단 부위가 존재하는 경우에는, 절단 부위는 또한 이종다량체의 절단이 의도되지 않는 한 사용되는 조건 하에 절단되지 않아야 한다. 이종다량체의 서열을 스캐닝하여, 테더의 제거시에 이종다량체 자체의 절단을 방지하기 위해 제거될 필요가 있는 이종다량체의 중쇄 또는 경쇄 서열 내에 임의의 절단 부위 (예를 들어, 푸린 또는 Lys-C 엔도펩티다제 절단 부위)가 존재하는지 여부를 결정할 수 있다.

[0137]

단일-쇄 단일특이적 또는 다중특이적 이종다량체 (예를 들어, 항체)는 본원에 기재된 방법을 이용하여 구축될 수 있으며, 여기서 이종다량체의 2개의 상이한 중쇄는 서로 HD 테더에 의해 직접 연결된다. 한 실시양태에서, 단일-쇄, 중쇄-단독 단일특이적 또는 다중특이적 이종다량체는 추가로 CH1 도메인이 결여되어 있을 수 있다 (VH 도메인은 하나 이상의 CH 도메인에, 임의로는 헌지에 의해 직접 연결됨). 또 다른 실시양태에서, 단일-쇄 단일 특이적 또는 다중특이적 이종다량체 중쇄는 CH1 도메인이 결여되어 있으나, CL 도메인이 결여된 그의 상응하는 경쇄와 CLH 테더 통해 회합한다. 이러한 이종다량체는 2개의 상이한 항원을 함께 불러오거나 또는 B 및 T 세포를 회합시키는데 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 테더는 이뮤노어드헤신 내의 절반-항체를 회합시키는데 사용될 수 있다.

[0138]

또한, 본 발명은 단일특이성 또는 다중특이성을 갖는 이종다량체를 포함한다. 한 실시양태에서, CLH 테더에 의해 그의 동족 경쇄에 연결된 제1 중쇄는 그의 동족 경쇄가 테더와 독립적으로 회합된 제2 중쇄와 회합된다.

[0139]

E. 상이한 이펙터 기능을 갖는 이종다량체

[0140]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 이용하여 구축된 본 발명의 이종다량체 (예를 들어, 단일-쇄 또는 다중-쇄 항체, 또는 항체-이뮤노어드헤신 복합체)는 CH2 도메인 돌연변이를 포함할 수 있으며, 변경된 이펙터 기능을 허용한다. 전형적으로, CH2 도메인 돌연변이는 변경된 글리코실화 상태를 갖는 이종다량체를 생성할 수 있는 N297에서의 돌연변이이다. 특정 실시양태에서, N297 돌연변이는 N297A 치환이다. 변경된 이펙터 기능은 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성, Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개된 세포독성, 식세포작용, 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절 및 B 세포 활성화를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0141]

F. 접합된 단백질 복합체

[0142]

하기 상세하게 기재되는 바와 같이, 본 발명의 HD 테더는 또한 불변 영역이 세포독성제에 대한 접합에 의해 변형된 단백질 복합체, 예컨대 이종다량체 (예를 들어, 단일특이적, 이중특이적, 다중특이적, 단일- 또는 다중-쇄 항체)를 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, HD 테더는 중쇄 불변 영역 (HC1 또는 HC2) 중 하나가 세포독성제에 대한 접합을 허용하는 변형을 함유하는 반면, 다른 중쇄 불변 영역은 그렇지 않은 이종다량체의 구축을 가능하게 한다. 한 예에서, HC1은 세포독성제에 접합하나 HC2는 그렇지 않다. 본 발명의 접합된 이종다량체의 예를 설명하는 개략적 다이어그램이 도 4에 제시된다. 예시적인 이종다량체 단일-쇄 항체는 2개의 전장 중쇄 및 동족 경쇄 뿐만 아니라 상기 기재된 HD 및 CLH 테더를 포함한다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 중쇄 중 하나는 세포독성제 (예를 들어, 독소 또는 항생체)에 접합된다. 유사하게, 대안적 이종다량체 구축물에서, 경쇄 불변 영역 중 하나는 세포독성제에 접합될 수 있는 반면, 다른 경쇄 불변 영역은 그렇지 않다 (예를 들어, LC1은 세포독성제에 접합되고, LC2는 그렇지 않음). 도 5a에 도시된 바와 같이, 접합된 단백질 복합체는 본 발명의 다중-쇄 항체일 수 있다. 세포독성제의 접합은 도 5a에 도시된 특정 다중-쇄 항체로 제한되지 않는다. 다중-쇄 항체, 예컨대 도 5b 및 도 5c에 도시된 것 뿐만 아니라 이뮤노어드헤신-항체 이종다량체가 또한 불변 영역에서 접합될 수 있다.

[0143]

한 특정한 예에서, 이종다량체의 불변 영역은 세포독성제를 이종다량체에 접합하기 위해 사용되는 링커 시약 상의 또는 세포독성제 자체 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하기 위해 변형될 수 있다. 글리코실화된 항체의 당은 예를 들어 퍼아이오데이트 산화 시약으로 산화되어, 링커 시약 또는 세포독성제의 아민 기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케تون기를 형성할 수 있다. 생성된 이민 쇠프 염기 기는 안정한 연결을 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어 보로히드라이드 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 연결을 형성할 수 있다. 세포독성제 상의 친핵성 기는 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; 및 (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드 기를 포함하는 항체 영역 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트 및 아릴히드라지드 기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0144] G. 다른 단백질 특징

[0145] 본 발명에 따른 이종다량체는 인간 또는 뮤린 공급원을 포함하는 임의의 공급원으로부터의 서열 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 단백질의 특정 부분 (예를 들어, 초가변 영역)의 서열은 또한 인공 서열, 예컨대 무작위 서열을 포함하는 라이브러리 (예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리)를 스크리닝함으로써 확인되는 서열일 수 있다.

[0146] 상이한 공급원으로부터의 서열을 포함하는 이종다량체의 경우에, 이종다량체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종에서 유래하거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 한편, 쇄(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래하거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 이종다량체 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편일 수 있다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)] 참조). 이러한 키메라 이종다량체는 예를 들어 뮤린 가변 영역 (또는 그의 부분) 및 인간 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0147] 키메라 단일-쇄 이종다량체는 또한 임의로 "인간화" 단일-쇄 이종다량체 (예를 들어, 단일-쇄 항체)일 수 있으며, 이는 비-인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유한다. 인간화 이종다량체는 전형적으로 수용자의 초가변 영역의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 종 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역의 잔기로 교체된 인간 항체 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 이종다량체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 이종다량체 성능이 추가로 개선되도록 한다. 일반적으로, 인간화 이종다량체는 1개 이상, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 임의로, 인간화 이종다량체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 것도 또한 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0148] 보다 상세하게, 인간화 이종다량체는 그 내부에 비-인간 공급원으로부터 도입된 1개 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "유입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써 윈터(Winter) 및 동료의 방법 (문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)])에 따라 수행할 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 이종다량체는 무순상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 번호 4,816,567). 실제로, 인간화 이종다량체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 아마도 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0149] 인간화 이종다량체의 제조에 사용될 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적-적합" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지의 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 이종다량체에 대한 인간 프레임워크 영역 (FR)으로서 받아들여진다 (문헌 [Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정한 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정한 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 여러 상이한 인간화 이종다량체에 대해 사용될 수 있다 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)]).

[0150] 또한, 이종다량체가 하나 이상의 항원 표적에 대해 높은 친화도를 보유하고 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것이 중요하다. 이러한 목표를 달성하기 위해, 예시적인 방법에 따라, 인간화 이종다량체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석의 과정에 의해 제조한다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태적 구조를 설명하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 유입 서열로부터 선택 및 조합되어 원하는 이종다량체 특성, 예컨대 표적 항원

(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기가 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로, 및 가장 실질적으로 관련된다.

[0151] III. 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

본 발명의 이종다량체의 재조합 생산을 위해, 이를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 (DNA 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터에 삽입한다. 이종다량체를 코딩하는 DNA는 통상의 절차를 이용하여 (예를 들어, 이종다량체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 용이하게 단리 및 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 따라 달라진다. 일반적으로, 바람직한 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 (일반적으로 포유동물, 그러나 또한 진균 (예를 들어, 효모), 곤충, 식물, 및 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포) 기원의 것이다. IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이러한 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있음을 인지할 것이다.

[0153] A. 원핵 숙주 세포를 사용하는 이종다량체의 생성

[0154] i. 벡터 구축

본 발명의 이종다량체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 표준 재조합 기술을 이용하여 얻을 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오티드 서열은 항체 생산 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 단리되어 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 일단 수득된 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵 숙주에서 이종 폴리뉴클레오티드를 복제 및 발현 할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가능하고 당업계에 공지된 다수의 벡터를 본 발명의 목적에 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정한 숙주 세포에 따라 달라질 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이종 폴리뉴클레오티드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 다) 및 벡터가 존재하게 되는 특정한 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 함유한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이종 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

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

[0157] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파지 벡터를 상기 숙주에 대한 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예컨대 λ GEM-11TM이 이. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포의 형질전환에 사용될 수 있는 재조합 벡터의 제조에 활용될 수 있다.

[0158] 본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 시스트론의 발현을 조정하는, 시스트론의 상류 (5')에 위치하는 비번역 조절 서열이다. 원핵 프로모터는 전형적으로 2종의 부류의 프로모터, 즉 유도성 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재, 또는 온도의 변화에 반응하여 그의 제어 하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.

[0159] 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 널리 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써, 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 다수의 이종 프로모터를 둘 다 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.

[0160] 원핵 숙주와 함께 사용하기 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, β -갈اكت마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립

토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 *tac* 또는 *trc* 프로모터를 포함한다. 그러나, 박테리아에서 기능적인 다른 프로모터 (예컨대, 다른 공지된 박테리아 또는 파지 프로모터)도 적합하다. 이들의 뉴클레오티드 서열은 공개되어 있고, 따라서 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하기 위한 링커 또는 어답터를 사용하여 이를 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 라이게이션시킬 수 있다 (문헌 [Siebenlist et al., (1980) Cell 20: 269]).

[0161] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택되는 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 웨პ타다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이종 폴리펩티드에 천연인 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 않는 원핵 숙주 세포의 경우에, 신호 서열이, 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리터, LamB, PhoE, PeIB, OmpA 및 MBP로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵 신호 서열로 치환된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 발현 시스템의 시스트론 둘 다에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.

[0162] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이종다량체의 생산은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으며, 따라서 각 시스트론 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 이종다량체 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고, 어셈블리되어, 세포질 내에서 기능적 이종다량체를 형성한다. 특정 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이 *trxB*⁻ 균주)는 디술퍼드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 적절한 폴딩 및 어셈블리를 허용한다 (문헌 [Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)]).

[0163] 본 발명의 이종다량체의 발현에 적합한 원핵 숙주 세포는 아르카에박테리아 및 유박테리아, 예컨대 그램-음성 또는 그램-양성 유기체를 포함한다. 유용한 박테리아의 예는 에스케리키아(Escherichia) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실루스 (예를 들어, 비. 서브틸리스(B. subtilis)), 엔테로박테리아, 슈도모나스(Pseudomonas) 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사(P. aeruginosa)), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 세라티아 마르세스 칸스(Serratia marcescans), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 시겔라(Shigella), 리조비움, 비트레오실라(Vitreoscilla) 또는 파라코쿠스(Paracoccus)를 포함한다. 한 실시양태에서, 그램-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예는 유전자형 W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac Iq lacL8 $\Delta ompT\Delta$ (*nmpC-fepE*) *degP41 kan*^R을 갖는 균주 33D3 (미국 특허 번호 5,639,635)을 비롯한, 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체를 포함한다. 다른 균주 및 그의 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 λ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이를 예는 제한적이기 보다는 예시적이다. 규정된 유전자형을 갖는 임의의 상기-언급된 박테리아의 유도체를 구축하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내의 레플리콘의 복제등을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKN410과 같은 널리 공지된 플라스미드가 레플리콘을 공급하는데 사용되는 경우에, 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제가 바람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.*

[0164] ii. 이종다량체 생산

[0165] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.

[0166] 형질전환은 DNA가 염색체외 요소로서 또는 염색체 구성요소로서 복제가능하도록 DNA를 원핵 숙주 내로 도입시키는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포 벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 사용되는 또 다른 기술은 전기천공이다.

[0167] 본 발명의 이종다량체를 생산하는데 사용되는 원핵 세포를 당업계에 공지되어 있는, 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예는 필수 영양 보충물이 부가된 루리아 브로쓰 (LB)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵 세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의

구조를 기초로 하여 선택된 선택제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.

[0168] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로, 또는 복합 질소 공급원과 같은 또 다른 보충물 또는 배지와의 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트리톨 및 디티오프레이톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 환원제를 함유할 수 있다.

[0169] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 이. 콜라이 성장을 위해, 바람직한 온도 범위는 예를 들어 약 20 °C 내지 약 39°C, 보다 바람직하게는 약 25°C 내지 약 37°C, 보다 더 바람직하게는 약 30°C이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이의 경우에, pH는 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4, 보다 바람직하게는 약 7.0이다.

[0170] 유도성 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사의 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도를 위한 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 바람직하게는, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구축물에 따라 다양한 다른 유도제가 사용될 수 있다.

[0171] 한 실시양태에서, 발현된 본 발명의 이종다량체는 개별적으로 숙주 세포의 원형질막공간 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 전형적으로, 단백질 회수는 전형적으로 삼투 쇼크, 음파처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물 세포 막을 파괴하는 것을 포함한다. 세포가 파괴되면, 세포 용해물 또는 전세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 이종다량체는 예를 들어 친화성 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 대안적으로, 단백질은 배양 배지 내로 전달되고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상청액을 여과하고 농축하여 생산된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 추가로 단리하고 확인할 수 있다.

[0172] 본 발명의 한 측면에서, 이종다량체 생산은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 발효 절차가 재조합 단백질의 생산에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 이들 발효기는 산소 및 영양소, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키기 위해 교반기 임펠러를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 부피가 대략 100 리터 이하인 발효기 내에서의 발효를 지칭하는데, 이는 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.

[0173] 발효 공정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건 하에서 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180-220의 OD₅₅₀으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 고정상에 있다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구축물에 따라 다양한 유도제를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12-50시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.

[0174] 본 발명의 이종다량체의 생산 수율 및 품질을 개선하기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 이종다량체의 적당한 어셈블리와 폴딩을 개선하기 위해, 샤페론 단백질, 예컨대 Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 활성을 갖는 웨이퍼릴 시스, 트랜스-이소미라제)를 과다 발현하는 추가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵 세포를 공동-형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생산된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 용해도를 용이하게 하는 것으로 입증되었다 (문헌 [Chen et al., (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605]; 미국 특허 번호 6,083,715 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 6,027,888 (Georgiou et al.); [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al., (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210]).

[0175] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질분해에 감수성인 단백질)의 단백질분해를 최소화하기 위해, 단백질분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주를 변형시켜, 공지된 박테리아 프로테아제, 예컨대 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 그의 조합물을 코딩하는 유전자에서 유전자 돌연변이(들)를 수행할 수 있다. 일부 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하며, 예를 들어 문헌 [Joly et al., (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2773-2777]; 미국 특허 번호 5,264,365 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 5,508,192 (Georgiou et al.);

[Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)]에 기재되어 있다.

[0176] 한 실시양태에서, 단백질분해 효소가 결핍되고 하나 이상의 사페론 단백질을 과다발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로 사용된다.

[0177] 또 다른 실시양태에서, 이. 콜라이 세포는 추가로 엔도펩티다제 (예를 들어, 푸린)를 발현하여 정제 전에 관심이종다량체의 하나 이상의 테더를 절단한다. 또 다른 실시양태에서, 진핵 숙주 세포는 엔도펩티다제 (예를 들어, 푸린) 및 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)를 발현할 수 있고, 여기서 엔도펩티다제는 이종다량체의 하나 이상의 테더를 절단하고, 엑소펩티다제는 정제 전에 나머지 엔도펩티다제 절단 부위를 분해한다.

iii. 이종다량체 정제

[0179] 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 면역친화성 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 소수성 상호작용 칼럼 (HIC), 황산암모늄 침전, 및 예를 들어 세파텍스 G-75를 이용하는 걸 여과.

[0180] 한 측면에서, 고체 상에 고정된 단백질 A가 본 발명의 전장 이종다량체 생성물의 면역친화성 정제에 사용된다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역에 고 친화도로 결합하는 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터의 41-kD 세포벽 단백질이다. 문헌 [Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]. 단백질 A가 고정되는 고체 상은 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 보다 바람직하게는 제어된 기공 유리 칼럼 또는 규산 칼럼이다. 일부 용도에서, 오염물의 비특이적 부착을 방지하기 위하여 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅한다.

[0181] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양물로부터 유래된 세제를 단백질 A 고정된 고체 상에 적용하여 관심 이종다량체가 단백질 A에 특이적으로 결합하게 할 수 있다. 이어서, 고체 상을 세척하여 고체 상에 비-특이적으로 결합된 오염물을 제거한다. 관심 이종다량체는 카오트로픽제 또는 연성 세제를 함유하는 용액으로의 용리에 의해 고체 상으로부터 회수될 수 있다. 예시적인 카오트로픽제는 우레아, 구아니딘-HCl, 과염소산리튬, 히스티딘 및 아르기닌을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 연성 세제는 트윈 (예를 들어, 트윈-20), 트리톤 (예를 들어, 트리톤 X-100), NP-40 (노닐페녹실폴리에톡실에탄올), 노니텟 P-40 (옥틸 페녹실폴리에톡실에탄올) 및 나트륨 도데실 술페이트 (SDS)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 칼럼 (예를 들어, 맵슈어(mAbSure) 칼럼)으로부터의 용리 후에 카오트로픽제 또는 연성 세제를 함유하는 용액으로의 이종다량체의 희석은 용리 후의 이종다량체의 안정성을 유지한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 엔도펩티다제-처리된 이종다량체 하나 이상의 나머지 엔도펩티다제 절단 부위는 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)의 첨가에 의해 정제 후에 처리 및 분해된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체의 하나 이상의 테더는 정제 전을 대신하여 정제 후에 엔도펩티다제 (예를 들어, 푸린) 및 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)에 의해 절단 및 처리될 수 있다.

B. 진핵 숙주 세포를 사용하는 이종다량체의 생산

[0183] 박터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

i. 신호 서열 성분

[0185] 진핵 숙주 세포에 사용하기 위한 박터는 신호 서열, 또는 관심 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 선택된 이종 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (즉, 신호 웨პ티다제에 의해 절단)될 수 있다. 포유동물 세포 발현시에는, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스성 분비 리더, 예를 들어 단순 헤르페스 gD 신호가 이용가능하다. 이러한 전구체 영역을 위한 DNA는 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임으로 라이게이션된다.

ii. 복제 기점

[0187] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 박터에 대해서는 필요하지 않다. 예를 들어, SV40 기점은 오직 초기 프로모터를 포함하기 때문에 전형적으로 사용될 수 있다.

iii. 선택 유전자 성분

[0189] 발현 및 클로닝 박터는 선택 마커라고도 불리는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a)

항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 관련이 있는 경우에는 영양요구성 결핍을 보충하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0190] 선택 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이종 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선택 요법에서 생존한다. 이러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 사용한다.

[0191] 포유동물 세포에 적합한 선택 마커의 또 다른 예는 이종다량체 핵산을 취하는 세포 성분의 확인을 가능하게 하는 것, 예컨대 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.

[0192] 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포는 우선 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토트렉세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인한다. 야생형 DHFR을 사용할 때의 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결핍된 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.

[0193] 대안적으로, 이종다량체, 야생형 DHFR 단백질, 및 또 다른 선택 마커, 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스페라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질감염되거나 공동-형질감염된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)를, 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418과 같은 선택 마커에 대한 선택제를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택할 수 있다. 예를 들어 미국 특히 번호 4,965,199를 참조한다.

[0194] iv. 프로모터 성분

[0195] 발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 숙주 유기체에 의해 인식되고 이종다량체를 코딩하는 핵산 서열(들)에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에서 발견되는 AT-풍부 부위를 갖는다. 다수의 유전자의 전사 출발점으로부터 70 내지 80개 염기 상류에 존재하는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (서열 12) (여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열 (서열 13)이 대부분의 진핵 유전자의 3' 말단에 존재한다. 모든 이러한 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.

[0196] 포유동물 숙주 세포에서 이종다량체를 코딩하는 벡터로부터의 전사는 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성이 라면, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스의 계놈으로부터, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터로부터, 또는 열-쇼크 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 제어된다.

[0197] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득된다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 시스템이 미국 특히 번호 4,419,446에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형이 미국 특히 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복부를 프로모터로 사용할 수 있다.

[0198] v. 인핸서 요소 성분

[0199] 고등 진핵생물에 의한 이종다량체 폴리펩티드(들)를 코딩하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가시킬 수 있다. 다수의 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (예를 들어, 글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린 유전자)로부터 공지되어 있다. 또한, 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 수 있다. 그 예는 복제 기점의 후측 (bp 100-270)의 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 후측의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 진핵 프로모터의 활성화를 증진시키기 위한 요소의 설명에 대해서는 또한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 증진이 달성되는 한, 인핸서는 위치 5' 또는 3'에서 이종다량체 폴리펩티드-코딩 서열까지 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 일반적으로 프로모터부터 부위 5'에 위치한다.

[0200] vi. 전사 종결 성분

[0201] 진핵 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 전형적으로 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열 또한 함유할 것이

다. 이러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이를 영역은 이종다량체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 유용한 전사 종결 성분 중 하나는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO 94/11026 및 여기에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0202]

vii. 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0203]

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

[0204]

숙주 세포를 이종다량체 생산을 위한 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나 형질전환체를 선택하거나 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 통상의 영양 배지에서 배양한다.

[0205]

viii. 숙주 세포의 배양

[0206]

본 발명의 이종다량체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 ((MEM), (시그마)), RPMI-1640 (시그마) 및 둘째 코 변형 이글 배지 ((DMEM), 시그마)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 배지 중 임의의 배지를 숙주 세포를 위한 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요에 따라 호르몬 및/ 또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오시드 (예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대, 젠타마이신(GENTAMYCIN)TM 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 이용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0207]

ix. 이종다량체의 정제

[0208]

제조법 기술을 이용할 때, 이종다량체는 세포 내에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 이종다량체가 세포 내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서 입자형 파편인 숙주 세포 또는 용해된 단편을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 이종다량체가 배지로 분비되는 경우, 일반적으로는 우선 이러한 발현시스템으로부터의 상청액을 상업적으로 입수 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0209]

세포로부터 제조된 이종다량체 조성물은, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 이종다량체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 인간 γ1, γ2 또는 γ4 중쇄를 기초로 하여 이종다량체를 정제하는데 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 γ3에 대해 권장된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨

대 제어된 기공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유량 및 더 짧은 가공 시간을 가능하게 한다. 이종다량체가 CH₃ 도메인을 포함하는 경우에, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수할 항체에 따라, 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 해파린 세파로스(SEPHAROSE)™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대, 폴리아스파르트산 칼럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 이용될 수도 있다.

[0210] 한 실시양태에서, 진핵 숙주 세포는 추가로 엔도펩티다제 (예를 들어, 푸린)를 발현하여 정제 전에 (예를 들어, 트랜스-골지(Golgi) 수송 동안) 관심 이종다량체의 하나 이상의 테더를 절단한다. 또 다른 실시양태에서, 진핵 숙주 세포는 엔도펩티다제 (예를 들어, 푸린 또는 Lys-C) 및 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)를 발현할 수 있으며, 여기서 엔도펩티다제는 이종다량체의 하나 이상의 테더를 절단하고, 엑소펩티다제는 정제 전에 나머지 엔도펩티다제 절단 부위를 분해한다.

[0211] 관심 이종다량체는 카오트로프제 또는 연성 세제를 함유하는 용액으로의 용리에 의해 고체 상으로부터 회수된다. "카오트로프제"는 문자내 상호작용 (예를 들어, 수소 결합, 반 데르 발스 힘 또는 소수성 효과)의 안정화를 방해함으로써 단백질 (예를 들어, 항체)의 3차원 구조를 파괴하는 수용성 물질을 의미한다. 예시적인 카오트로프제는 우레아, 구아니딘-HCl, 과염소산리튬, 히스티딘 및 아르기닌을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "연성 세제"는 문자내 상호작용 (예를 들어, 수소 결합, 반 데르 발스 힘 또는 소수성 효과)의 안정화를 방해함으로써 단백질 또는 단백질 복합체 (예를 들어, 이종다량체)의 3차원 구조를 파괴하지만, 생물학적 활성의 상실을 유발하도록 단백질 구조를 영구적으로 파괴하지는 않는 (즉, 단백질을 변성시키지 않는) 수용성 물질을 의미한다. 예시적인 연성 세제는 트윈 (예를 들어, 트윈-20), 트리톤 (예를 들어, 트리톤 X-100), NP-40 (노닐페녹실폴리에톡실에탄올), 노니엣 P-40 (옥틸 페녹실폴리에톡실에탄올) 및 나트륨 도데실 슬레이트 (SDS)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0212] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 이종다량체 및 오염물을 포함하는 혼합물을, pH 약 2.5-4.5의 용리 완충제를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25M 염으로부터)에서 수행되는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용할 수 있다.

[0213] 일부 실시양태에서, 본 발명의 엔도펩티다제-처리된 이종다량체의 하나 이상의 나머지 엔도펩티다제 절단 부위는 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)에 의해 정제 후에 처리 및 분해될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체의 하나 이상의 테더는 정제 전을 대신하여 정제 후에 엔도펩티다제 (예를 들어, 푸린) 및 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)에 의해 절단 및 처리된다.

[0214] x. 바클로바이러스를 사용하는 이종다량체 생산

[0215] 재조합 바클로바이러스는, 예를 들어 리포팩틴 (깁코(GIBCO)-BRL로부터 상업적으로 입수가능함)을 사용하여 이종다량체 또는 이종다량체 단편을 코딩하는 플라스미드 및 바클로골드(BaculoGold)™ 바이러스 DNA (파밍겐(Pharmingen))를 곤충 세포, 예를 들어 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포 (예를 들어, Sf9 세포; ATCC CRL 1711) 또는 드로소필라 멜라노가스터(Drosophila melanogaster) S2 세포 내로 공동-형질감염시킴으로써 생성될 수 있다. 특정한 예에서, 이종다량체 서열은 바클로바이러스 발현 벡터 내에 함유된 에피토프 태그의 상류에 융합된다. 상기 에피토프 태그는 폴리-His 태그를 포함한다. 상업적으로 입수가능한 플라스미드, 예를 들어 pVL1393 (노바젠(Novagen)) 또는 pAcGP67B (파밍겐)로부터 유래된 플라스미드를 비롯하여 다양한 플라스미드가 사용될 수 있다. 간략하게, 항체 이종다량체 또는 그의 단편을 코딩하는 서열은 5' 및 3' 영역에 상보적인 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 증폭될 수 있다. 5' 프라이머는 측면에 접하는 (선택된) 제한 효소 부위를 포함할 수 있다. 이어서, 생성물을 선택된 제한 효소로 소화시키고, 발현 벡터 내로 서브클로닝시킨다.

[0216] 발현 벡터로 형질감염시킨 후에, 숙주 세포 (예를 들어, Sf9 세포)를 28°C에서 4-5일 동안 인큐베이션하고, 방출된 바이러스를 수확하고 추가의 증폭을 위해 사용한다. 바이러스 감염 및 단백질 발현은 예를 들어 문헌 [O'Reilly et al. (Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. Oxford: Oxford University Press (1994))]에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.

[0217] 이어서, 발현된 폴리-His 태그 부착된 이종다량체를, 예를 들어 다음과 같이 Ni²⁺-킬레이트 친화성 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 추출물을 문헌 [Rupert et al. (Nature 362:175-179 (1993))]에 의해 기재된 바와 같이 재조합 바이러스-감염된 Sf9 세포로부터 제조할 수 있다. 간략하게, Sf9 세포를 세척하고, 초음파분해 완

충제 (25 mL HEPES pH 7.9; 12.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10% 글리세롤; 0.1% NP-40; 0.4 M KC1) 내에 재현탁하고, 얼음 상에서 20초 동안 2회 초음파분해한다. 초음파분해물을 원심분리에 의해 정화하고, 상청액을 로딩 완충제 (50 mM 포스페이트, 300 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 7.8) 내에 50배 희석하고, 0.45 μm 필터를 통해 여과한다. Ni²⁺-NTA 아가로스 칼럼 (퀴아젠 (Qiagen)으로부터 상업적으로 이용가능함)을 5 mL의 총 부피로 제조하고, 25 mL의 물로 세척하고, 25 mL의 로딩 완충제로 평형화시킨다. 여과된 세포 추출물 칼럼 상으로 0.5 mL/분으로 로딩한다. 칼럼을 로딩 완충제로 A₂₈₀ 기준선까지 세척하고, 이 시점에서 분획 수집을 시작하였다. 이어서, 칼럼을 비특이적으로 결합된 단백질을 용리시키는 2차 세척 완충제 (50 mM 포스페이트, 300 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 6.0)로 세척한다. 다시 A₂₈₀ 기준선에 도달한 후, 칼럼을 2차 세척 완충제에서 0 → 500 mM 이마 다졸 구배로 전개시킨다. 분획 1 mL를 수집하고, SDS-PAGE 및 은 염색 또는 알칼리성 포스파타제에 접합된 Ni²⁺-NTA (퀴아젠)로의 웨스턴 블로트에 의해 분석한다. 용리된 His₁₀-태그 부착된 (서열 21) 이종다량체를 함유하는 분획을 모으고 로딩 완충제에 대해 투석한다.

[0218]

이종다량체의 정제는 또한 공지의 크로마토그래피 기술, 예를 들어 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 수행할 수 있다. 관심 이종다량체는 카오트로프제 또는 순한 세제를 함유하는 용액 내로 용리에 의해 칼럼의 고체 상으로부터 회수할 수 있다. 예시적인 카오트로프제 및 순한 세제는 구아니딘-HCl, 우레아, 리튬 퍼클로레이트, 아르기닌, 히스티딘, SDS (소듐 도데실 술페이트), 트윈, 트리톤 및 NP-40을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 이들은 모두 상업적으로 입수가능하다. 상기 기재된 바와 같이, 이종다량체의 하나 이상의 테더는 엔도펩티다제 (예를 들어, 푸린 또는 Lys-C) 및 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)의 첨가에 의해 정제 후에 절단 및 처리될 수 있다.

[0219]

C. 정제 기술

[0220]

HD 테더-함유 이종다량체에 사용될 수 있는 한 특정한 정제 접근법이 하기 제시된다.

테더링된 이종다량체를 4°C에서 단백질 A (예를 들어, 맵슈어) 칼럼 상에 로딩한다



칼럼을 KPO₄, 이어서 PBS + 0.1% 트리톤 X114로 세척한다



샘플을 트리스 pH 8.0 (200mM)으로 용리한다



샘플 pH를 8.0으로 조정하고, 37°C에서 1.5시간 동안 Lys-C로 절단한다



샘플을 맵슈어 칼럼 상에서 다시 정제한다



샘플 pH를 8.0으로 조정하고, 37°C에서 4시간 동안 카르복시펩티다제 B로 절단한다



샘플 전도성을 조정하고, 이온 교환 칼럼 상에 로딩한다



분획을 수집하고, 모아서 PBS로 투석한다

[0221]

[0222]

아르기닌 뿐만 아니라, 초기 단백질 A 칼럼 단계 후에 상기 정제 프로토콜에 사용될 수 있는 다른 카오트로프제 또는 연성 세제는 구아니딘-HCl, 우레아, 과염소산리튬, 히스티딘, SDS (나트륨 도데실 술페이트), 트윈, 트리톤 및 NP-40을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 이들은 모두 상업적으로 입수가능하다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 엔도펩티다제-처리된 이종다량체의 하나 이상의 나머지 엔도펩티다제 절단 부위는 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)에 의해 정제 후에 처리 및 분해될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 이종다량체의 하나 이상의 테더는 정제 전을 대신하여 정제 후에 엔도펩티다제 (예를 들어, 푸린 또는 Lys-C) 및 엑소펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 B)에 의해 절단 및 처리될 수 있다.

[0223]

IV. 접합 단백질

[0224]

본 발명은 또한 경쇄 또는 중쇄의 불변 영역 중 하나가 화학적 분자, 예컨대 염료 또는 세포독성제, 예컨대 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)에 접합된 본원에 기재된 임의의 이종다량체 (예를 들

어, HD 테더-함유 단일-쇄 단일특이적 또는 다중특이적 항체, HD 테더-함유 다중-쇄 단일특이적 또는 다중특이적 이종다량체)를 포함하는 접합된 단백질, 예컨대 접합된 이종다량체 또는 면역접합체 (예를 들어, "항체-약물 접합체", 또는 "ADC")를 제공한다. 특히, 본원에 기재된 바와 같이, HD 테더를 사용하여 2개의 상이한 중쇄 (HC1 및 HC2) 뿐만 아니라 2개의 상이한 경쇄 (LC1 및 LC2)를 함유하는 이종다량체를 구축할 수 있다. 본원에 기재된 방법을 이용하여 구축된 면역접합체는 단지 중쇄 중 하나 (HC1 또는 HC2) 또는 단지 경쇄 중 하나 (LC1 또는 LC2)의 불변 영역에 접합된 세포독성제를 함유할 수 있다. 또한, 면역접합체는 단지 하나의 중쇄 또는 경쇄에만 부착된 세포독성제를 가질 수 있기 때문에, 대상체에게 투여되는 세포독성제의 양은 양쪽 중쇄 또는 경쇄 모두에 부착된 세포독성제를 갖는 이종다량체의 투여에 비해 감소된다. 대상체에게 투여되는 세포독성제의 양의 감소는 세포독성제와 연관된 유해 부작용을 제한한다.

[0225] 세포독성제 또는 세포증식억제제, 즉 암의 치료에서 종양 세포를 사멸시키거나 억제하는 약물의 국부 전달을 위한 항체-약물 접합체의 사용 (문헌 [Syrigos and Epenetos, Anticancer Research 19:605-614 (1999); Niculescu-Duvaz and Springer, Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172 (1997)]; 미국 특허 번호 4,975,278)은 약물 모이어티의 종양으로의 표적화된 전달, 및 내부의 세포내 축적을 허용하며, 여기서 이러한 접합되지 않은 약물 작용제의 전신 투여는 제거되어야 할 종양 세포 뿐만 아니라 정상 세포에 대해 허용되지 않는 수준의 독성을 발생시킬 수 있다 (문헌 [Baldwin et al., Lancet (Mar. 15, 1986):603-605 (1986); Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506]). 이에 의해 최소 독성을 갖는 최대 효능이 요구된다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체는 둘 다 이러한 전략에 유용한 것으로 보고되었다 (문헌 [Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21:183-187 (1986)]). 이러한 방법에 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토트랙세이트 및 빈데신을 포함한다 (문헌 [Rowland et al., (1986), 상기 문헌]). 이종다량체-독소 접합체에 사용되는 독소는 박테리아 독소, 예컨대 디프테리아 독소, 식물 독소, 예컨대 리신, 소분자 독소, 예컨대 젤다나마이신 (문헌 [Mandler et al., Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581 (2000); Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028 (2000); Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13:786-791 (2002)]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]) 및 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al., Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)])을 포함한다. 독소를 튜뷸린 결합, DNA 결합 또는 토포이 소머라제 억제를 비롯한 메카니즘에 의해 거의 세포독성 및 세포증식억제 표과에 영향을 미칠 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 이종다량체성 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합되는 경우에 불활성화되거나 또는 덜 활성이 되는 경향이 있다.

[0226] 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 본원에 (예를 들어, 상기에) 기재되어 있다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232를 참조한다. 방사성접합된 항체의 생산을 위한 다양한 방사선핵종이 이용가능하다. 그 예는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질-커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디페미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도화합물 (예컨대, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사성뉴클레오티드를 접합시키기 위한 예시적인 키레이트화제이다. 예를 들어, WO94/11026을 참조한다.

[0227] 이종다량체 및 1종 이상의 소분자 독소 (예컨대 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우로스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 상기 독소의 유도체)의 접합체도 본원에서 고려된다.

[0228] A. 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0229] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 본 발명의 이종다량체를 포함한다.

[0230] 메이탄시노이드는 튜불린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타(*Maytenus serrata*)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 번호 3,896,111). 이후에, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 발견되었다 (미국 특허 번호 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0231] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의한 제조에 비교적 이용하기 쉽고, (ii) 비-디슬퍼드 링커를 통한 항체로의 접합에 적합한 관능기로의 유도체화에 대해 변형이 가능하고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 이종다량체 항체 약물 접합체에서 매력적인 약물 모이어티이다.

[0232] 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 그의 제조 방법, 및 그의 치료 용도는 예를 들어 그 개시내용이 참조로 명백하게 포함되는 미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다. 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 지정된 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 상기 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타냈다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤린 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 또 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1에 디슬퍼드 링커를 통해 접합된 면역접합체가 기재되어 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당 3×10^5 개의 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관 내에서 시험되었다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물과 유사한 수준의 세포독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자 당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시켜 증가시킬 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타냈다.

[0233] 메이탄시노이드 접합체는 이종다량체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 이종다량체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,208,020을 참조한다 (그 개시내용은 본원에 명백하게 참조로 포함됨). 이종다량체 항체 분자당 평균 3-4개로 접합된 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증진시키는 효능을 나타냈지만, 1개의 독소/항체 분자일지라도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증진시킬 것이라 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 기술에 의해 합성될 수도 있고 천연 공급원으로부터 단리될 수도 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0234] 예를 들어 그 개시내용이 본원에 명백하게 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,208,020 또는 유럽 특허 0 425 235 B1, 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)], 및 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0169933에 개시된 것을 포함한, 메이탄시노이드 접합체의 제조를 위한 당업계에 공지된 다수의 연결기가 존재한다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 메이탄시노이드 접합체는 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0169933에 개시된 바와 같이 제조할 수 있다. 연결기는 상기 언급된 특허에 개시된 바와 같이 디슬퍼드 기, 티오에테르 기, 산 불안정성 기, 광불안정성 기, 펩티다제 불안정성 기 또는 에스테라제 불안정성 기를 포함하고, 디슬퍼드 및 티오에테르 기가 바람직하다. 추가의 연결기는 본원에 기재되고 예시되어 있다.

[0235] 이종다량체와 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜 디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티울란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스

(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 디슬퍼드 연결을 제공하기 위해 특히 바람직한 커플링제는 N-숙신이미딜-3-(2-페리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)]), 및 N-숙신이미딜-4-(2-페리딜티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.

[0236] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결은 통상의 커플링 기술을 이용하여 히드록실 기와의 반응으로 형성될 수 있다. 반응은 히드록실 기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실 기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실 기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

B. 아우리스타틴 및 돌라스타틴

[0238] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 웨პ티드 유사체 및 유도체, 아우리스타틴에 접합된 본 발명의 이종다량체를 포함한다 (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588). 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al., Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584 (2001)]), 항암 (미국 특허 번호 5,663,149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al., Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965 (1998)])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 웨პ티드성 약물 모이어티의 N- (아미노) 말단 또는 C- (카르복실) 말단을 통해 이종다량체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0239] 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 그 개시내용이 전체가 명백하게 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 공개 번호 2005/0238649 ("Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")에 개시된, N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 포함한다.

[0240] 전형적으로, 웨პ티드-기체 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 웨პ티드 단편 사이의 웨პ티드 결합 형식으로 제조될 수 있다. 이러한 웨პ티드 결합은, 예를 들어 웨პ티드 화학 분야에 널리 공지된 액체 상 합성 방법 (문헌 [E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides," volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조될 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588; 문헌 [Pettit et al., J. Nat. Prod. 44:482-485 (1981); Pettit et al., Anti-Cancer Drug Design 13:47-66 (1998); Poncet, Curr. Pharm. Des. 5:139-162 (1999); 및 Pettit, Fortschr. Chem. Org. Naturst. 70:1-79 (1997)]의 방법에 따라 제조될 수 있다. 또한, 그 전체내용이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Doronina, Nat. Biotechnol. 21(7):778-784 (2003)]; 및 미국 출원 공개 번호 2005/0238649 ("Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands") (예를 들어, 링커 및 링커에 접합된 모노메틸발린 화합물, 예컨대 MMAE 및 MMAF의 제조 방법을 개시함)를 참조한다.

C. 칼리케아미신

[0242] 다른 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 본 발명의 이종다량체를 포함한다. 칼리케아미신 패밀리의 항생제는 피코몰 미만의 농도에서 이중-가닥 DNA 절단부를 생산할 수 있다. 칼리케아미신 패밀리의 접합체를 제조하는 것에 대해서는 미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 캄파니(American Cyanamid Company)의 특허)을 참조한다. 사용할 수 있는 칼리케아미신의 구조 유사체는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 Θ_1^I 을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)] 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항종양 약물은 항플레이트제인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 다 세포내 작용 부위를 갖고, 형질 막을 용이하게 통과하지 않는다. 따라서, 항체-매개된 내재화를 통한 이들 작용제의 세포 내 흡수는 그의 세포독성 효과를 크게 증진시킨다.

D. 다른 세포독성제

[0244] 본 발명의 이종다량체에 접합될 수 있는 또는 본원에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있는 다른 항종양제는 BCNU, 스트렙토조신, 빙크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 번호 5,053,394 및 5,770,710에 기재된, 접합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 작용제의 패밀리, 뿐만 아니라 에스페라미신 (미국 특허 번호 5,877,296)을

포함한다.

- [0245] 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리 테스 포르디이 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 켈로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다 (예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조).
- [0246] 본 발명은 이종다량체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.
- [0247] 종양의 선택적 파괴를 위해, 이종다량체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합된 이종다량체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} , 및 Lu 의 방사성 동위원소를 포함한다. 접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 신티그레피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 Tc^{99m} 또는 I^{123} 을 포함할 수 있거나, 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 표지, 예컨대 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.
- [0248] 방사성- 또는 다른 표지는 공지된 방식으로 접합체에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 웨티드는 생합성될 수도 있거나, 또는 예를 들어 수소 대신에 플루오린-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용한 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수도 있다. tc^{99m} 또는 I^{123} , Re^{186} , Re^{188} 및 In^{111} 과 같은 표지가 웨티드 내의 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 아이오도겐 (IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978)])을 사용하여 아이오딘-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.
- [0249] 이종다량체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 이종다량체에 방사성뉴클레오티드를 접합시키기 위한 예시적인 키레이트화제이다. 예를 들어, WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커, 웨티다제-감수성 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디솔피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.
- [0250] 본 발명의 화합물은 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.) (미국 일리노이주 록포드)로부터) 상업적으로 입수 가능한 교차-링커 시약: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐슬픈)벤조에이트)를 사용하여 제조된 ADC를 명백하게 고려하지만, 이에 제한되지는 않는다. 문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 467-498 페이지를 참조한다.
- [0251] E. 접합된 이종다량체의 제조
- [0252] 본 발명의 접합된 이종다량체에서, 이종다량체는 임의로 링커를 통해 하나 이상의 모이어티 (예를 들어, 약물 모이어티), 예를 들어 항체당 약 1 내지 약 20개의 모이어티에 접합된다. 접합된 이종다량체는 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 사용하여 다음을 포함하는 여러 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 항체 이종다량체의 친핵성 기를 공유 결합을 통해 2가 링커 시약과 반응시킨 후에, 관심 모이어티와 반응시키는 방법; 및 (2) 모이어티의 친핵성 기를 공유 결합을 통해 2가 링커 시약과 반응시킨 후, 이를 항체 이종다량체의 친핵성 기와 반응시키는 방법. 컨쥬게이트 이종다량체를 제조하기 위한 추가의 방법은 여기서 기술된다.

[0253]

링커 시약은 하나 이상의 링커 성분으로 구성될 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시 카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-페리딜티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC"), 및 N-숙신이미딜 (4-아이오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")를 포함한다. 추가의 링커 성분이 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에서 기재된다. 또한, 그 전체내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 공개 번호 2005/0238649 ("Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands")를 참조한다.

[0254]

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

[0255]

본 발명의 이종다량체의 친핵성 기는 (i) N-말단 아민 기, (ii) 측쇄 아민 기, 예를 들어 리신, (iii) 측쇄 티올 기, 예를 들어 시스테인, 및 (iv) 이종다량체가 글리코실화되는 당 히드록실 기 또는 아미노 기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 아민, 티올 및 히드록실 기는 친핵성이 있고, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOEt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 이종다량체는 환원가능한 쇄간 디술피드, 즉 시스테인 가교를 갖는다. 본 발명의 이종다량체를 환원제, 예컨대 DTT (디티오타레이톨)로 처리하여 링커 시약과의 접합에 대해 반응성이도록 만들 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 가교는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 리신을 2-이미노티울란 (트라우트 시약)과 반응시켜서 아민을 티올로 전환시킴으로써 추가의 친핵성 기를 항체에 도입할 수 있다. 반응성 티올 기는 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 1종 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 돌연변이 이종다량체를 제조함으로써) 이종다량체 (또는 그의 단편) 새로 도입될 수 있다.

[0256]

본 발명의 접합된 이종다량체는 또한 링커 시약 또는 약물 또는 다른 모이어티 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하기 위해 이종다량체의 변형에 의해 생산될 수 있다. 본 발명의 글리코실화된 이종다량체의 당은 예를 들어 페아이오데이트 산화 시약으로 산화되어, 링커 시약 또는 약물 또는 다른 모이어티의 아민 기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 형성할 수 있다. 생성된 이민 쉬프 염기 기는 안정한 연결을 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어 보로히드라이드 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 연결을 형성할 수 있다. 한 실시양태에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-페아이오데이트와 반응시키면, 약물 또는 다른 모이어티 상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (문헌 [Hermanson, Bioconjugate Techniques]). 또 다른 실시양태에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-페아이오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 (문헌 [Geoghegan and Stroh, Bioconjugate Chem. 3:138-146 (1992)]; 미국 특허 번호 5,362,852). 이러한 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

[0257]

마찬가지로, 모이어티 (예컨대, 약물 모이어티) 상의 친핵성 기는 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOEt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; 및 (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드 기를 포함하는, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드 기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0258]

대안적으로, 이종다량체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 만들어질 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접하거나 접합체의 원하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리된, 접합체의 2개 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 이종다량체를 종양 예비-표적화에 활용하기 위해 "수용체" (상기, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있으며, 여기서 이종다량체-수용체 접합체를 개체에게 투여한 후에, 제거제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예를 들어,

아비딘)를 투여한다.

V. 치료 용도

[0259] 본원에 기재된 이종다량체 (예를 들어, HD 테더-함유 단일-쇄 단일특이적 또는 다중특이적 항체, HD 테더-함유 단일특이적 또는 다중특이적 항체, 이뮤노어드헤신-항체 복합체)는 치료 용도에 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 이종다량체는 중식성 질환, 암, 혈관신생 장애, 염증성 장애, 자가면역 질환, 및 면역 장애를 포함하여, 이종다량체 생성에 적합한 후보 표적이 존재하는 임의의 질환의 치료를 위하 사용될 수 있다.

[0261] 치료 용도 뿐만 아니라, 본 발명의 이종다량체는 진단 방법, 예컨대 항체 생성에 적합한 후보 표적이 존재하는 임의의 질환 또는 상태, 예컨대 상기 질환 또는 상태에 대한 진단 방법을 포함하여, 다른 목적에 사용될 수 있다.

VI. 투여량, 제제 및 지속시간

[0263] 본 발명의 이종다량체는 우수한 의료 행위에 일치하는 방식으로 제제화되고, 투약 및 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려되는 인자는 치료되는 특정한 장애, 치료되는 특정한 포유동물, 개별 대상체의 임상 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 진료의에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 투여되는 단백질의 "치료 유효량"은 상기 고려사항에 의해 결정될 것이고, 특정한 장애 (예를 들어, 중식성 질환, 암, 혈관신생 장애, 염증성 장애, 자가면역 질환 또는 면역 장애)의 예방, 개선 또는 치료를 위해 필요한 최소량이다. 단백질은 그럴 필요는 없지만, 임의로는 장애의 예방 또는 치료를 위해 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제에 존재하는 단백질의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 요인에 따라 달라진다. 일반적으로, 이들은 이전에 사용되던 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나, 이전에 사용되던 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

[0264] 한 실시양태에서, 본 발명은 이종다량체 생성에 적합한 후보 표적이 존재하는 특정한 장애에 걸리기 쉽거나 또는 이러한 장애를 갖는 것으로 진단된 인간 대상체의 생존 기간을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 생존 기간은 약물의 첫번째 투여에서 사망까지의 시간으로 정의된다. 생존 기간은 또한 치료 동안 대상체의 사망 위험을 나타내는 치료군 대 대조군의 계층화된 위험 비 (HR)에 의해 측정될 수 있다.

[0265] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 장애에 대한 하나 이상의 요법을 이용하여 치료되는, 장애에 걸리기 쉽거나 또는 장애를 갖는 것으로 진단된 인간 대상체의 군에서 반응률을 유의하게 증가시킨다. 반응률은 치료된 대상체 중 치료에 반응한 대상체의 백분율로서 정의된다. 한 측면에서, 본 발명의 단백질, 및 수술 또는 또 다른 형태의 요법 (예를 들어, 방사선 요법 또는 화학요법제)를 사용한 본 발명의 조합 치료는 수술 또는 또 다른 형태의 요법을 단독으로 사용하여 치료된 군에 비해 치료된 대상체 군에서 반응률을 유의하게 증가시키고, 증가는 0.005 미만의 카이-제곱 p-값을 갖는다. 암 치료에 있어 치료 효능의 추가적 측정은 미국 특허 출원 공개 번호 20050186208에 기재되어 있다.

[0266] 치료 제제는 원하는 순도를 갖는 활성 성분을 임의의 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 당업계에 공지된 표준 방법을 이용하여 제조한다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA]). 허용되는 담체는 염수, 또는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN)TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 PEG를 포함한다.

[0267] 임의로, 그러나 바람직하게는, 제제는 제약상 허용되는 염, 바람직하게는 염화나트륨을 함유하고, 바람직하게는 이는 대략 생리학적 농도이다. 임의로, 본 발명의 제제는 제약상 허용되는 보존제를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 보존제 농도는 0.1 내지 2.0% (전형적으로는 v/v)의 범위이다. 적합한 보존제는 제약 업계에 공지된 것을 포함한다. 벤질 알콜, 페놀, m-크레졸, 메틸파라벤 및 프로필파라벤이 바람직한 보존제이다. 임의로, 본 발명의 제제는 0.005 내지 0.02% 농도의 제약상 허용되는 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0268] 본원의 제제는 또한 치료할 특정한 적응증에 필요한, 바람직하게는 서로 유해 효과를 내지 않는 보완적 활성을 갖는, 하나 초과의 활성 화합물을 함유할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합

하게 존재한다.

[0269] 활성 성분은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 내에 또는 마크로에멀젼 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기 문헌]에 개시되어 있다.

[0270] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출의 적합한 예는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태인, 이종다량체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투성 매트릭스를 포함한다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 테포(LUPRON DEPOT)TM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 마이크로구체), 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 중합체, 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 보다 짧은 기간 동안 방출한다. 본 발명의 캡슐화된 이종다량체가 체내에 장시간 동안 남아있을 경우에, 이들은 37°C 하의 수분에 대한 노출 결과로서 변성 또는 응집되어, 생물학적 활성이 상실될 수 있고 면역원성 상의 변화가 가능해진다. 관련 메카니즘이 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안될 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디슬피드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 안정화는 술프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.

[0271] 본원에 기재된 단백질 (예를 들어, HD 테더-함유 단일-쇄 단일특이적 항체, HD 테더-함유 다중-쇄 단일특이적 또는 다중특이적 이종다량체, 이뮤노어드헤신-항체 복합체)은 공지된 방법에 따라, 예컨대 정맥내 투여, 예를 들어 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척수강내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 의해 인간 대상체에게 투여된다. 심한 부작용 또는 독성이 단백질에 의해 인식되는 표적 분자에 대한 길항작용과 연관될 경우 국소 투여가 특히 바람직할 수 있다. 치료 용도를 위해 생체외 전략을 사용할 수도 있다. 생체외 전략은 대상체로부터 얻은 세포를 본 발명의 이종다량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질감염시키거나 형질도입시키는 것을 포함한다. 이어서, 상기 형질감염되거나 형질도입된 세포를 대상체에게 다시 주입한다. 세포는 조혈 세포 (예를 들어, 골수 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, T 세포 또는 B 세포), 섬유모세포, 상피 세포, 내피 세포, 각질세포 또는 근육 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 광범위한 유형일 수 있다.

[0272] 한 예에서, 본 발명의 이종다량체는 종양의 장애 또는 위치가 허용하는 경우, 예를 들어 직접 주사함으로써 국소적으로 투여하고, 이러한 주사는 주기적으로 반복할 수 있다. 또한, 단백질 복합체는 국소 재발 또는 전이를 예방하거나 감소시키기 위해, 대상체에게 전신 전달되거나 또는 종양 세포에, 예를 들어 종양 또는 종양의 외과적 절제 후에 종양 층에 직접 전달될 수 있다.

VII. 제조품

[0273] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본원에 기재된 하나 이상의 이종다량체, 및 이종다량체 생성에 적합한 표적이 존재하는 임의의 장애의 치료 또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이다. 제조품은 용기, 및 용기 상의 또는 용기와 연관된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 상태의 치료에 효과적인 조성물을 보유하고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 중 하나 이상의 활성제는 본 발명의 이종다량체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 해당 조성물이 특정 상태를 치료하는데 사용됨을 표시한다. 라벨 또는 포장 삽입물은 대상체에게 이종다량체 조성물을 투여하기 위한 지침을 추가로 포함할 것이다. 본원에 기재된 조합요법제를 포함하는 제조품 및 키트가 또한 고려된다.

[0275] 포장 삽입물은 치료 생성물의 상업용 패키지 내에 통상적으로 포함되어 있으며 이러한 치료 생성물의 사용에 관한 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 지침서를 지칭한다.

[0276] 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예를 들어 정박테리아 주사용수 (BWFI), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제조품은 상업적 및 사용자 관점에서

고려되는 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 추가로 포함할 수 있다.

[0277] 또한, 다양한 목적, 예를 들어 세포로부터 항원의 정제 또는 면역침전에 유용한 키트가 제공된다. 항원의 단리 및 정제를 위해, 키트는 비드 (예를 들어, 세파로스 비드)에 커플링된 이종다량체를 포함할 수 있다. 시험관내에서, 예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블로트에서 항원의 검출 및 정량화를 위한 이종다량체를 포함하는 키트를 제공할 수 있다. 제조품과 마찬가지로, 키트는 용기, 및 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 용기는 하나 이상의 본 발명의 이종다량체를 포함하는 조성물을 보유한다. 예를 들어, 추가 용기가 포함될 수 있는데, 이는 희석제 및 완충제 또는 대조군 이종다량체를 함유한다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물의 설명 뿐만 아니라 의도된 시험관내 또는 진단 용도에 대한 지침을 제공할 수 있다.

VIII. 표적 분자

[0279] 본 발명의 이종다량체 (예를 들어, 단일-쇄 또는 다중-쇄 항체, 또는 이뮤노어드헤신-항체 복합체)에 의해 표적화될 수 있는 분자의 예는 가용성 혈청 단백질, 수용체 단백질, 막-결합된 단백질 (예를 들어, 어드헤신), 시토카인, 케모카인, 성장 인자 및 호르몬을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0280] 가용성 항원 또는 그의 단편 (임의로 또 다른 분자에 접합됨)이 이종다량체를 생성하기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막횡단 분자, 예컨대 수용체에 대해, 그의 단편 (예를 들어, 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 막횡단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이러한 세포는 천연 공급원 (예를 들어, 암 세포주)으로부터 유래될 수도 있고, 또는 막횡단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수도 있다. 이종다량체의 제조에 유용한 다른 항원 및 그의 형태가 당업자에게 명백할 것이다.

[0281] 상기 기재된 설명은 당업자가 본 발명을 실시할 수 있을 만큼 충분한 것으로 간주된다. 하기 실시예는 단지 예시적 목적으로만 제공되며, 어떠한 방식으로도 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 실제로, 본원에 제시되고 기재된 것 이외의 본 발명의 다양한 변형은 상기 기재로부터 당업자에게 명백해질 것이고, 첨부된 특허청구범위 내에 속할 것이다. 실시예에 제공된 기재는 일반적으로 본 발명의 일부로서 고려되도록 의도된다.

실시예

실시예 1. HD 테더-함유 이종다량체의 발현을 위한 벡터의 구축

[0284] 모든 HD 테더-함유 이종다량체 단일-쇄 항체 구축물은 내부에서 이미 이용가능한 기존의 IgG1 모노클로날 항체 구축물로부터 만들어졌다. LC를 PCR을 이용하여 제조하였으며, 여기서 LC의 3' 프라이머는 LC C-말단을 넘어 연장되고, CLH-테더의 N-말단 부분을 코딩하고, BamHI 부위에서 종결된다. 5' LC 프라이머는 ClaI 부위에서 종결된다. 이어서, PCR 단편을 소화시켜, 유사하게 소화되고 탈인산화된 pRK 벡터에 클로닝하였다 (제넨테크 인크.(Genentech Inc.); 문헌 [Eaton et al., Biochemistry 25:8343-8347 (1986)]). 이어서, 동족 HC를 PCR을 이용하여 제조하였으며, 여기서 5' 프라이머는 HC N-말단 (마이너스 신호 서열)을 넘어 연장되고, CLH-테더의 C-말단 부분을 코딩하고, BamHI 부위에서 종결된다. 3' HC 프라이머는 XbaI 부위에서 종결된다. HC PCR 단편을 소화시켜, 상기 기재된 동족 LC를 함유하는 유사하게 제조된 플라스미드에 클로닝하였으며, 이에 따라 테더링된 절반-항체가 형성되었다. BamHI 부위는 아미노산 잔기 "GS"를 코딩하고 테더의 GGS 반복부의 완전성을 유지하도록 위치한다. 위치 K222 (카바트 넘버링 방식)에서의 리신 잔기는 다음에 스트라타진(Stratagene)의 퀵체인저(Quikchange) II XL 부위-지정 돌연변이유발 키트를 이용하여 알라닌 잔기로 돌연변이시켰다.

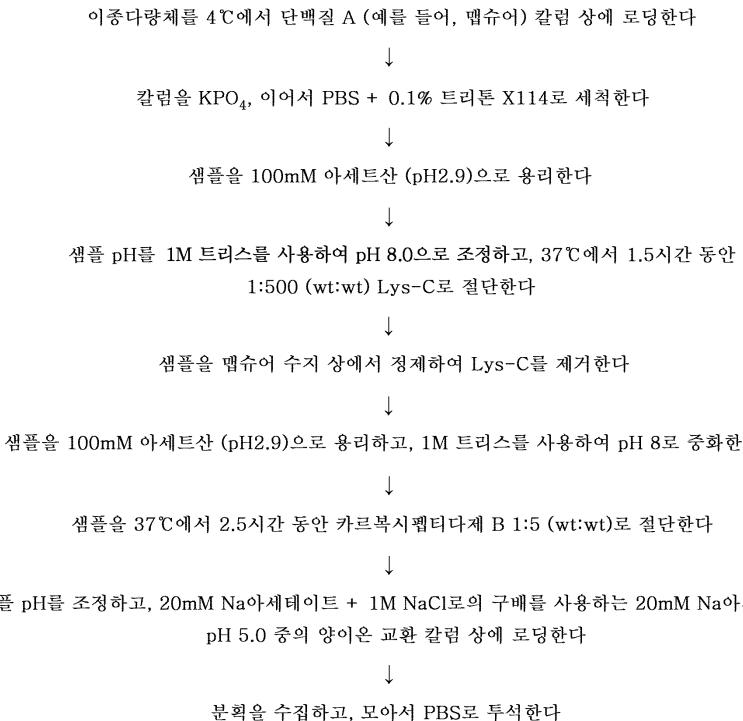
[0285] 이어서, 상기 기재된 CLH-테더링된 절반-항체 중 2개를 또 다른 라운드의 PCR을 통해 함께 연결하였으며, 여기서 단일-쇄 항체의 N-말단으로 예정된 절반-항체는 상기 사용된 동일한 5' LC 프라이머 및 HC의 C-말단을 넘어 연장되고, HD 테더의 N-말단을 코딩하고, BspEI 부위에서 종결되는 3' 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. PCR 단편을 소화시켜, 유사하게 소화되고 탈인산화된 pRK 벡터에 클로닝하였다. 이종다량체 단일-쇄 항체의 C-말단으로 예정된 절반-항체는 절반-항체의 구축에 사용된 동일한 3' HC 프라이머 및 LC N-말단 (마이너스 신호 서열)을 넘어 연장되고, HD 테더의 C-말단 부분을 코딩하고, BspEI 부위에서 종결되는 5' 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. PCR 생성물을 소화시켜, 유사하게 소화되고 탈인산화된 N-말단 구축물 벡터에 클로닝하였다. BamHI와 같이, BspEI는 테더의 GGS 반복부의 완전성을 유지하도록 위치할 수 있다.

[0286] HD 테더-함유 이종다량체 다중-쇄 항체의 구축은 유사하였으며, 단지 N-말단 "절반-항체"가 HC 신호 서열로 시작하고, 그의 동족 LC가 제2 pRK 플라스미드로부터 개별적으로 발현된다는 점만 상이하였다.

실시예 2. HD 테더-함유 이종다량체의 절단 및 정제

[0288]

본 발명의 이종다량체를 정제하는데 사용될 수 있는 예시적인 방식이 하기 제시된다.



[0289]

[0290]

특히, 이종다량체를 4°C에서 밤새 지어 헬스케어(GE Healthcare) (스웨덴)로부터의 맵슈어 셀렉트(mAbSure Select) 수지를 이용하여 조건화 배지로부터 정제하였다. 칼럼을 2 칼럼 부피 (CV)의 PBS (포스페이트 완충 염수)로 세척하고, 이어서 10 CV의 PBS + 0.1% 트리톤 X114 세제에 이어 10 CV 인산칼륨 완충제로 세척하였다. 칼럼을 100 mM 아세트산 (pH 2.9)으로 용리되고, 바로 트리스 (200 mM 최종 농도) pH 8.0을 사용하여 pH 8.0으로 조정하였다. HD 테더는 1-5시간 동안 37°C에서 1:500 (wt:wt) 비의 Lys-C 엔도펩티다제 (와코 퓨어 케미칼 래보리토리즈(Wako Pure Chemical Laboratories))로 처리시에 이종다량체로부터 제거되었다. 이어서, 샘플을 칼럼 상에 로딩하여 효소를 제거하였다. 잔류 푸린 인식 부위는 이후에 1-5시간 동안 1:5 (wt:wt) 돼지 카르복시펩티다제 B (로슈 어플라이드 사이언시스(Roche Applied Sciences), 카탈로그# 10103233001)를 사용하여 제거하였다. 절단된 샘플을 양이온 교환 칼럼 상에 로딩하여 효소를 제거하였다. 최대 분획을 모으고, 밤새 PBS에 대해 투석한 후에 질량 스펙트럼 분석을 수행하여 동일성 및 순도를 확인하였다.

[0291]

실시예 3. 조작된 이종다량체의 특성화

[0292]

본 발명의 HD 테더 이종다량체화 기술을 이용하여 구축된 예시적인 이종다량체가 그의 서열이 유래된 항체 또는 어드헤신의 결합 특성을 유지하는지 여부를 결정하기 위해, 결합 검정을 수행하였다 (도 6a-6d). 이를 결합 검정은 포르테바이오(ForteBio) 옥텟 시스템 상에서 동역학 위저드(wizard) 프로그램을 이용하여 시행하였다. 시험된 모든 샘플의 농도는 25 μg/ml이었고, 이 농도는 반복 실험에서 및 변화하는 샘플 사이에서 항-인간 IgG 프로브의 포화를 나타낸다. 프로브를 제1 샘플에 10분 동안 로딩하고, 30초 동안 PBS에서 세척하였다. 제2 및 제3 샘플에 대한 모든 회합은 회합 사이에 30초 동안 PBS로 세척하면서 15분 동안 수행하였다.

[0293]

다른 실시양태

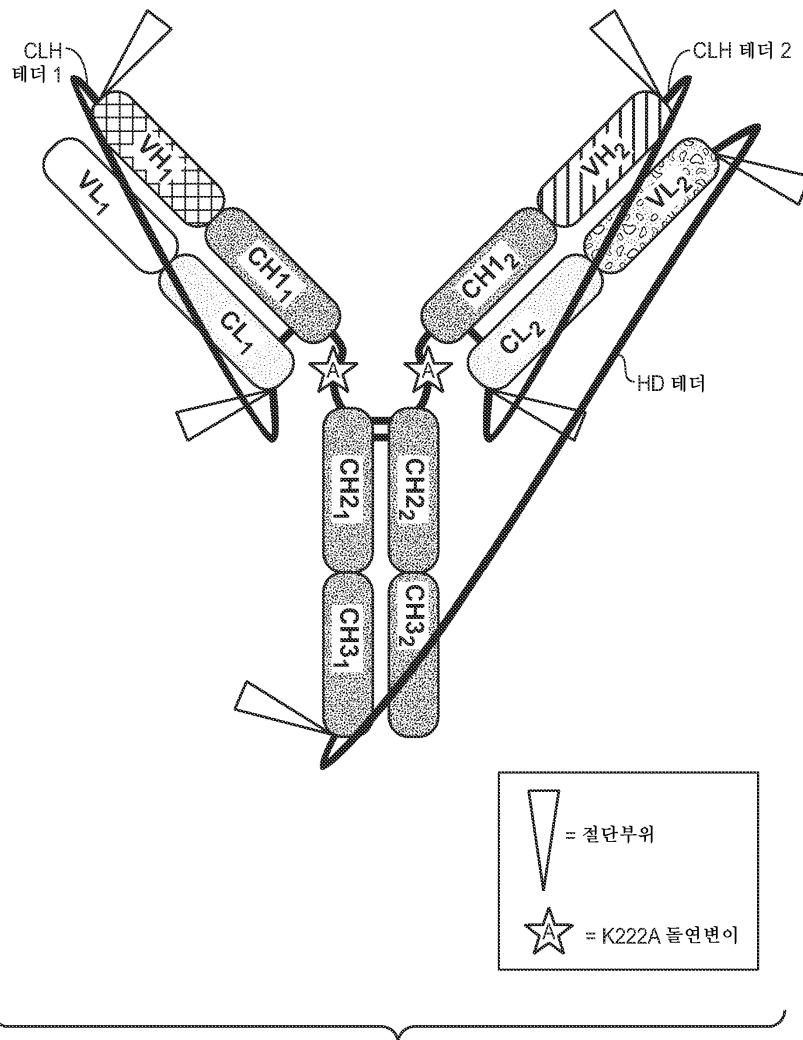
[0294]

본 명세서에서 언급되거나 인용된 모든 특허, 특히 출원, 특허 출원 공개 및 기타 간행물은 각각의 독립적인 특허, 특히 출원, 특허 출원 공개 또는 간행물이 구체적이고 개별적으로 참조로 포함되는 것과 동일한 정도로 본 원에 참조로 포함된다.

도면

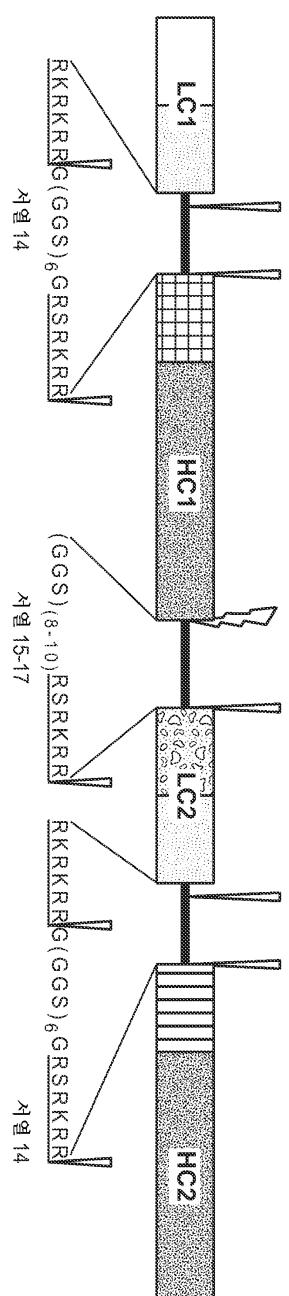
도면1

단일체 항체 (scAb)



도면2

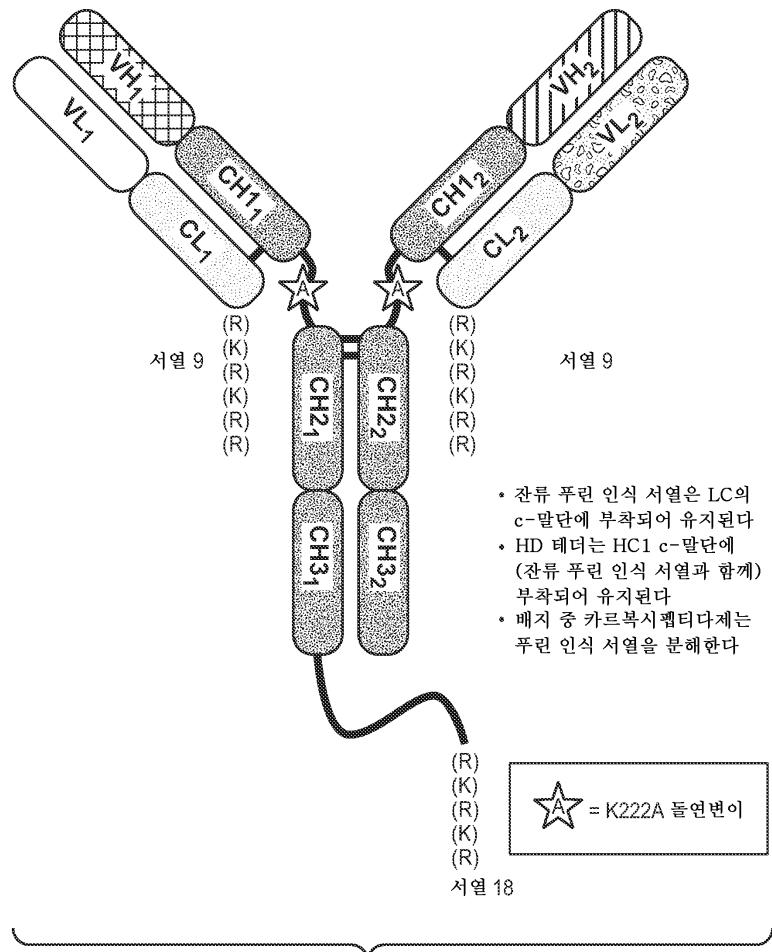
단일 쇄 항체 (scAb)



도면3a

단일 쇄 항체 (scAb)

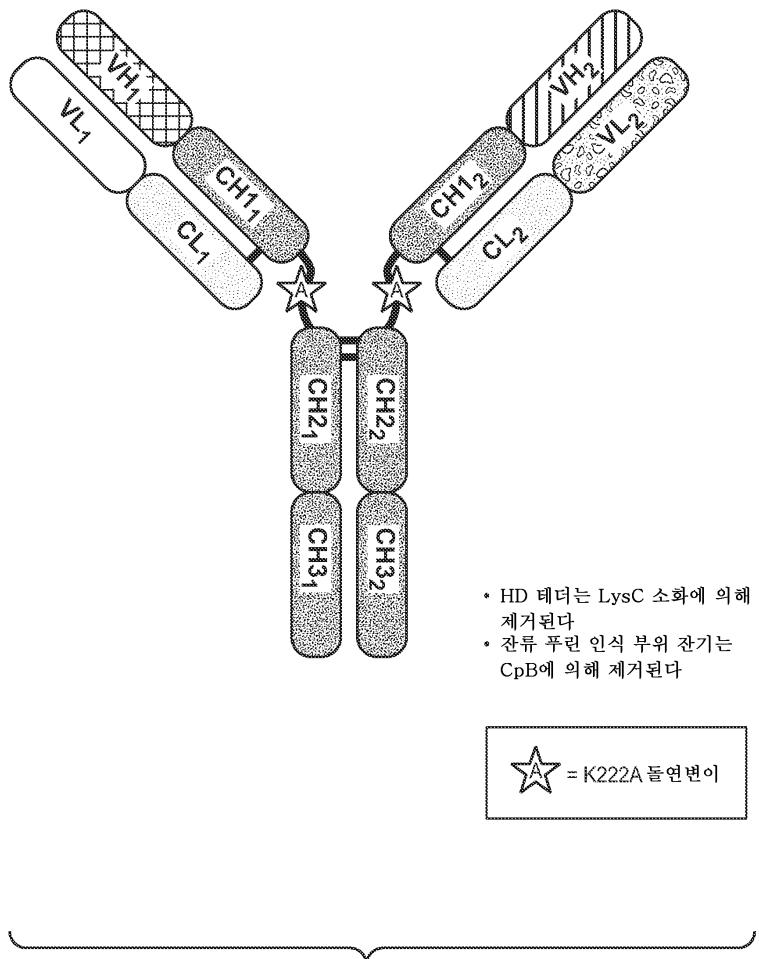
초기 ProA 정제 후의 scAb



도면3b

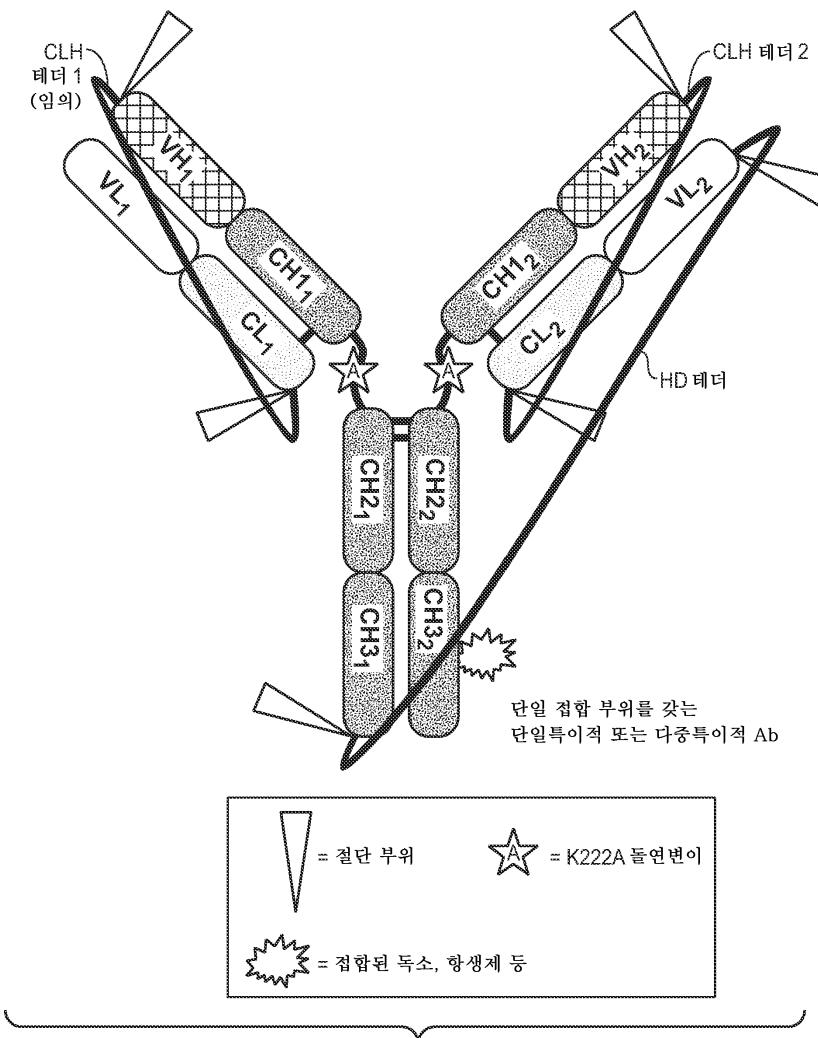
단일 쇄 항체 (scAb)

정제 및 효소 처리 후의 scAb

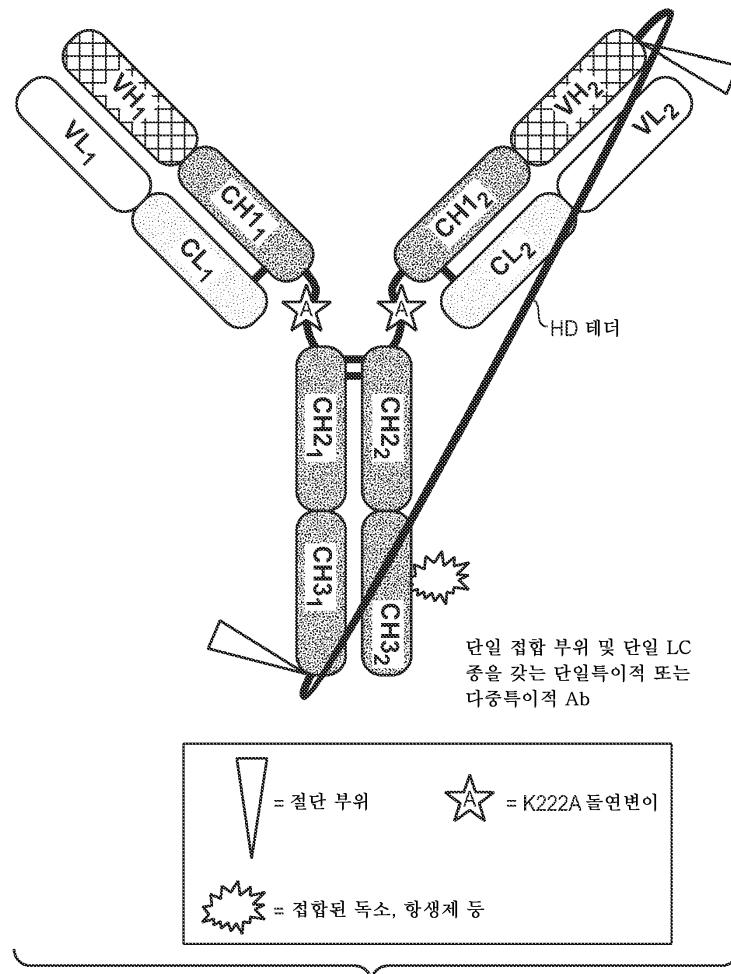


도면4

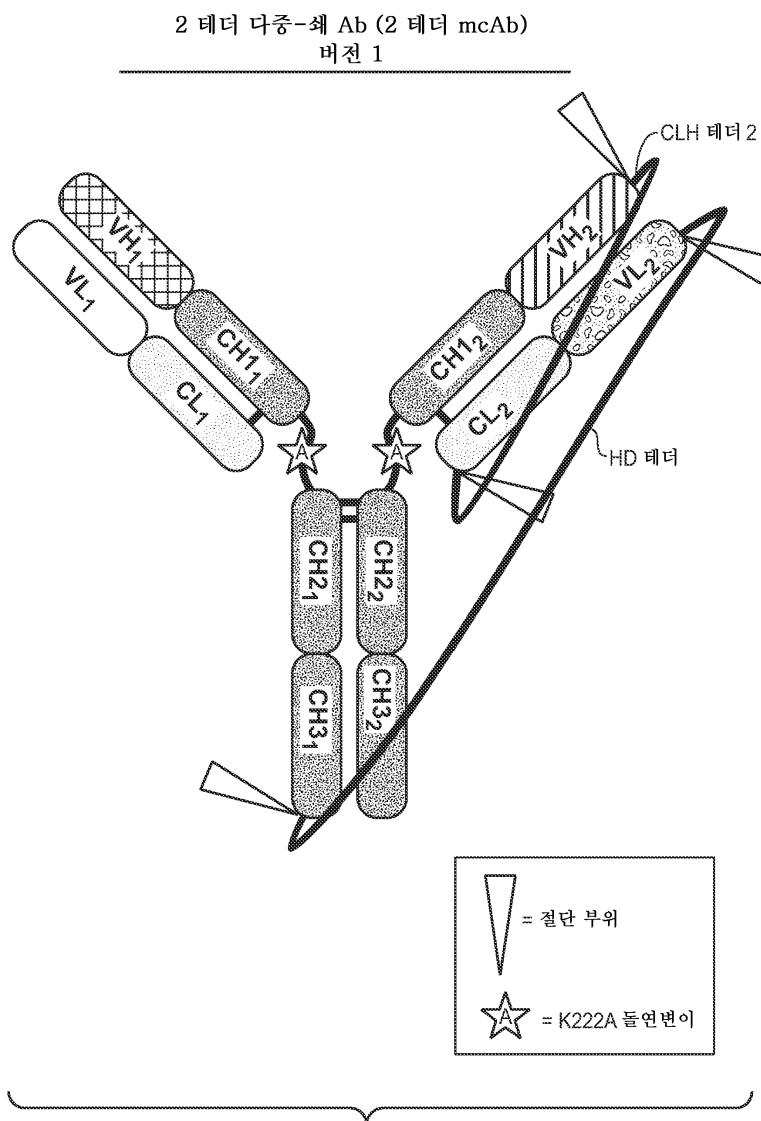
접합된 단일 쇄 Ab (scAb)



도면5a

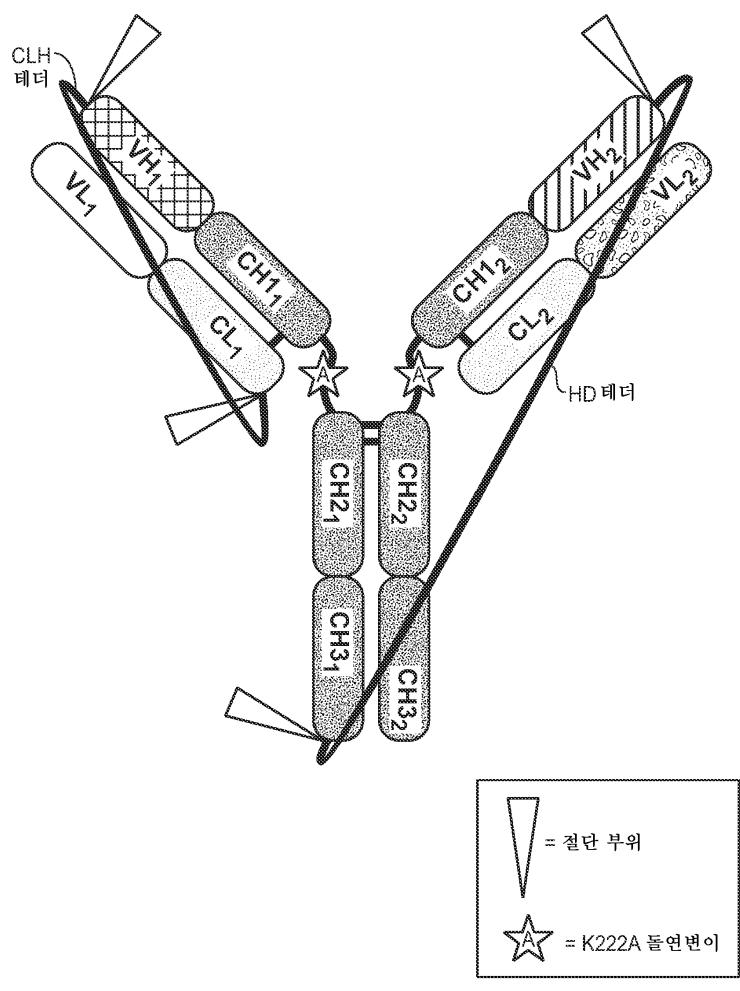
접합된 통상의 LC 다중 쇄 Ab (mcAb)

도면5b

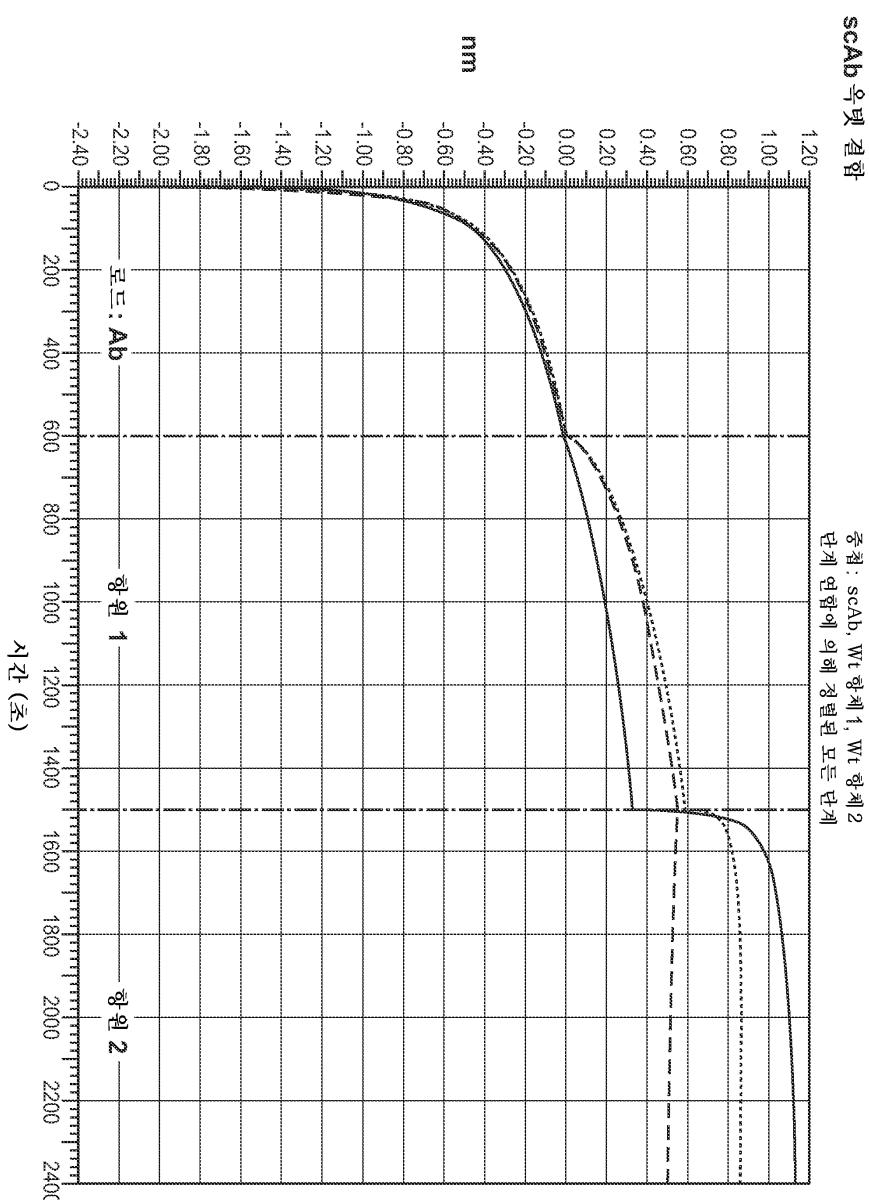


도면5c

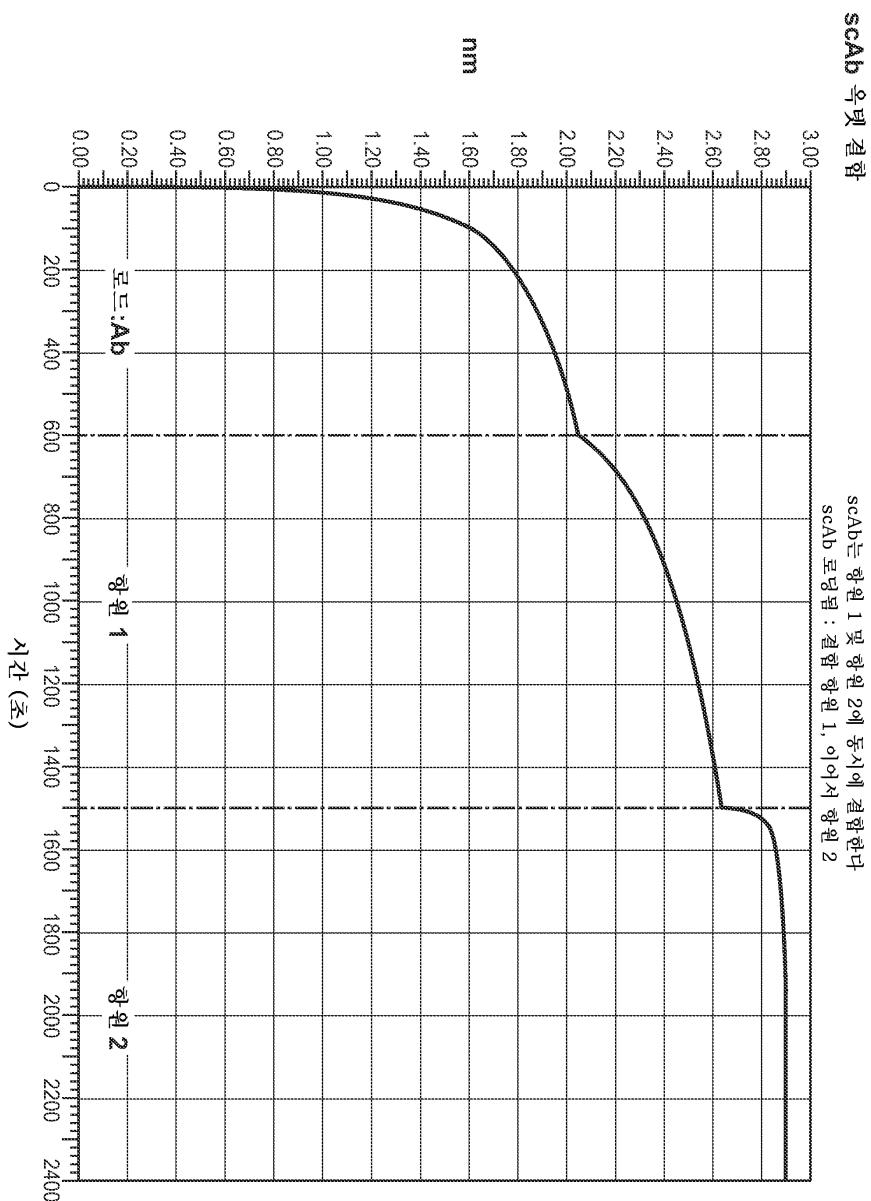
2 테더 다중-체 Ab (2 테더 mcAb)
버전 2



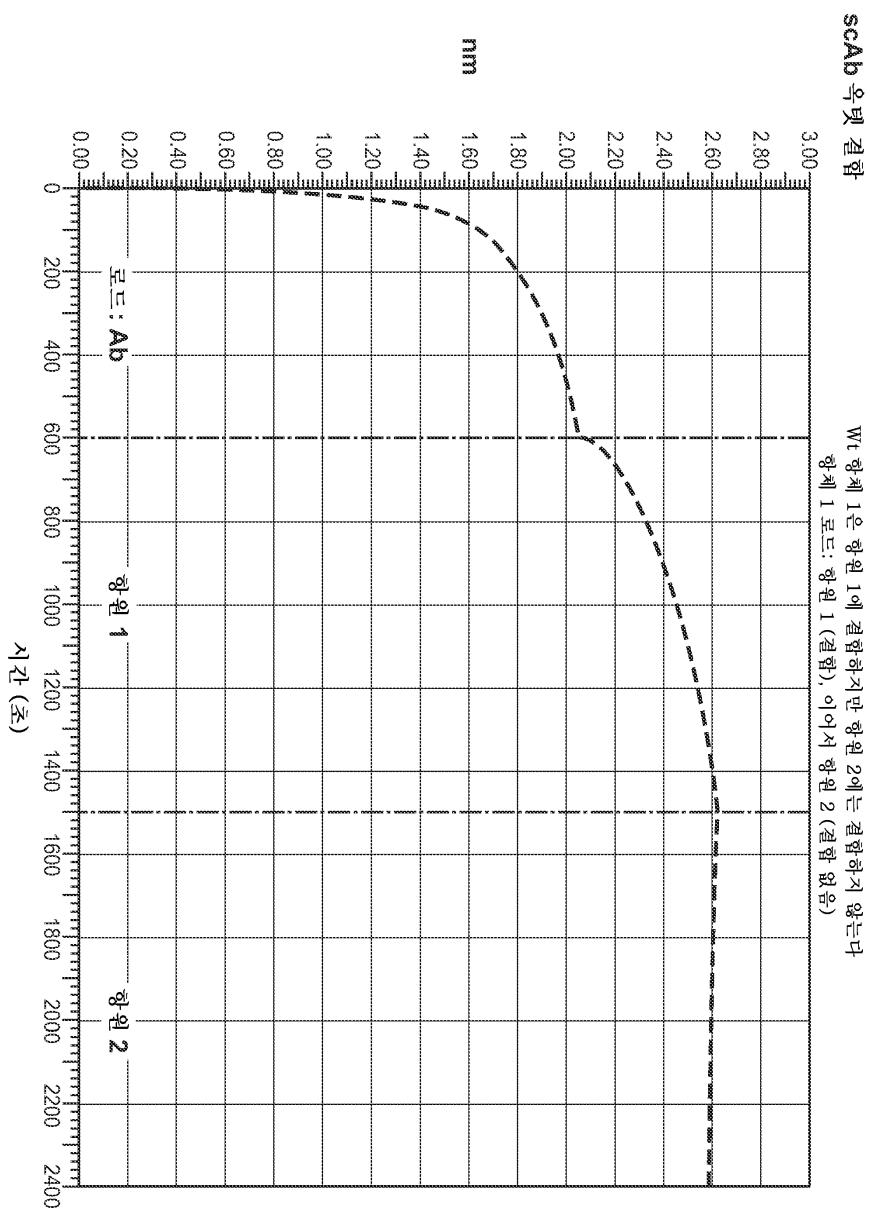
도면6a



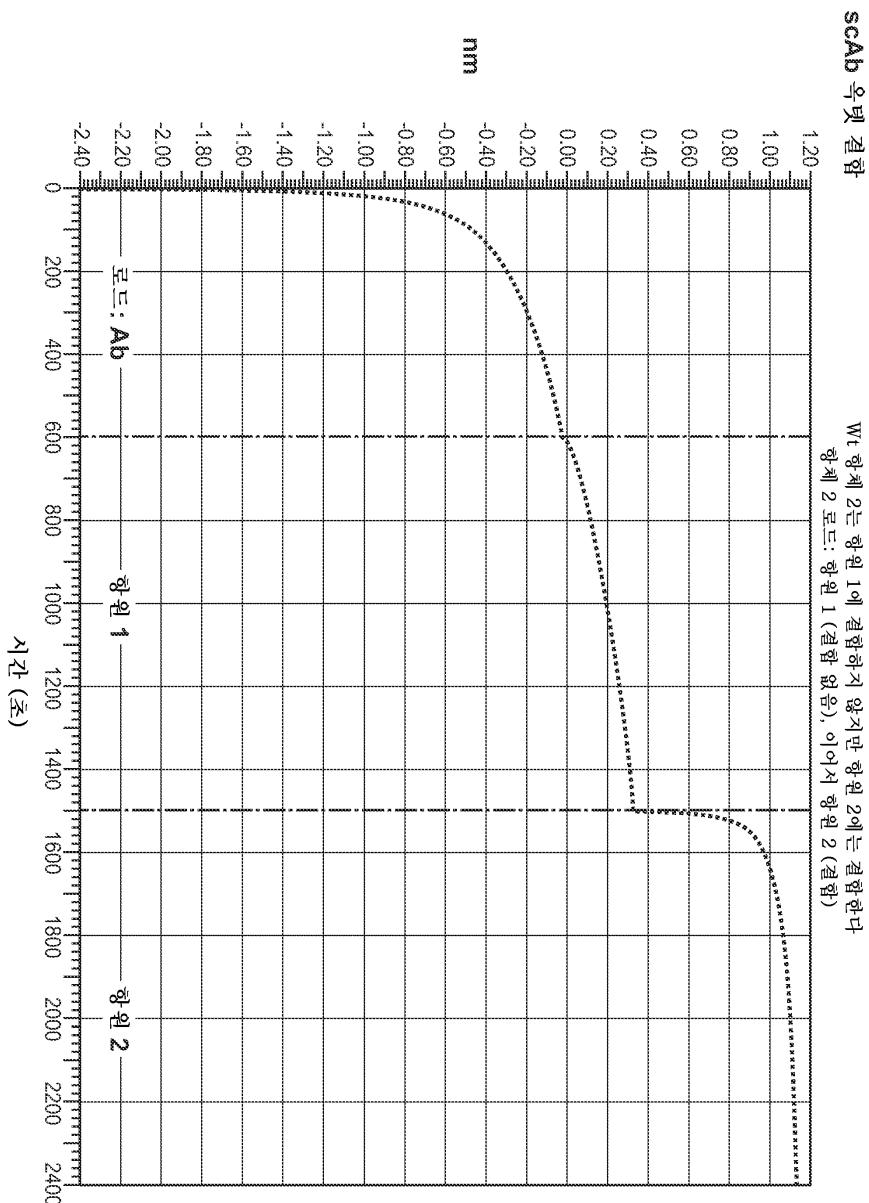
도면6b



도면6c



도면6d



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> SINGLE-CHAIN ANTIBODIES AND OTHER HETEROMULTIMERS

<130> P4733R1-W0

<140><141><150> 61/597 486

<151> 2012-02-10

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 1

Thr His Thr

1

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 2

Gly Gly Gly Ser Thr His Thr

1	5
---	---

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Thr His Thr

1	5	10
---	---	----

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown: Cleavage site

peptide cleaved by TEV"

<400> 4

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown: Cleavage site

peptide for Hedgehog protein"

<400> 5

Gly Asp Trp Asn Ala Arg Trp Cys Phe

1 5

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220>

221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Any basic amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(3)

<223> Any amino acid

<220><221> source

<223> /note="see specification as filed for detailed description

of substitutions and preferred embodiments"

<400> 6

Xaa Xaa Xaa Arg

1

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to the annotation for said position"

<400> 7

Arg Xaa Arg Xaa Lys Arg

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220>

221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid

<400> 8

Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9

Arg Lys Arg Lys Arg Arg

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 10

Arg His Arg Gln Pro Arg

1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 11

Arg Ser Arg Lys Arg Arg

1 5

<210> 12

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 12

cncatat 6

<210> 13

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 13

aataaa 6

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 14

Arg Lys Arg Lys Arg Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser

1 5 10 15
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Arg Lys Arg Arg
 20 25 30

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Arg Lys Arg Arg
 20 25 30

<210> 16
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 16
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Arg Lys Arg

20 25 30

Arg
<210> 17
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 17

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Arg Ser

20 25 30

Arg Lys Arg Arg

35

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Arg Lys Arg Lys Arg

1 5

<210> 19

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (25)..(27)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference"

with respect to those in the annotation for said positions"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(27)

<223> /note="This sequence may encompass 8 to 9 "Gly Gly Ser"

repeating units

<400> 19

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

20	25
----	----

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 20

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Ser

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

10xHis tag"

<400> 21

His His His His His His His His

1	5	10
---	---	----