



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0020367
(43) 공개일자 2017년02월22일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/468 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7035654</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년06월25일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년12월20일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/064409</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/197772
국제공개일자 2015년12월30일</p> <p>(30) 우선권주장
1411320.3 2014년06월25일 영국(GB)</p> | <p>(71) 출원인
유씨비 바이오파마 에스피알엘
벨기에 브뤼셀 1070 알레 더 라 러셰르세 60</p> <p>(72) 발명자
바타 팔라비
영국 슬라우 버크셔 에스엘1 3더블유이 바스 로드
208 유씨비 셀텍 아이피디
데이브 엠마
영국 슬라우 버크셔 에스엘1 3더블유이 바스 로드
208 유씨비 셀텍 아이피디
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김진희, 김태홍</p> |
|---|---|

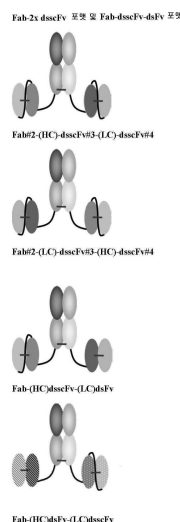
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 다중특이적 항체 작제물

(57) 요약

본 개시내용은 a) 화학식 (I): $VH-CH_1-X-V_1$ 의 폴리펩타이드 사슬; 및 b) 화학식 (II): $VL-CL-Y-V_2$ 의 폴리펩타이드 사슬을 포함하거나 이들로 이루어지는 다중특이적 항체 분자 및, 예를 들면 치료에 사용하기 위한 이를 포함하는 약제학적 제형에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 상기 다중특이적 항체 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 및 상기 벡터 및/또는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포로부터 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자를 발현시키는 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/624 (2013.01)

C07K 2317/64 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

헤이우드 샘 필립

영국 슬라우 버크셔 에스엘1 3더블유이 바스 로드

208 유씨비 셀텍 아이피디

험프리스 데이비드 폴

영국 슬라우 버크셔 에스엘1 3더블유이 바스 로드

208 유씨비 셀텍 아이피디

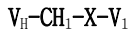
명세서

청구범위

청구항 1

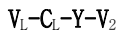
하기 a) 및 b)를 포함하거나 하기 a) 및 b)로 이루어지는 다중특이적 항체 분자:

a) 하기 화학식 (I):



의 폴리펩타이드 사슬; 및

b) 하기 화학식 (II):



의 폴리펩타이드 사슬;

상기 화학식에서,

V_H 는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;

CH_1 은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들면 중쇄 불변 영역의 도메인 1을 나타내며;

X 는 결합 또는 링커를 나타내고;

Y 는 결합 또는 링커를 나타내며;

V_1 은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;

V_L 은 경쇄 가변 도메인을 나타내며;

C_L 은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;

V_2 는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내며;

여기서 V_1 또는 V_2 중 하나 이상은 dsFv 또는 dsscFv이다.

청구항 2

제1항에 있어서, X 가 링커인 다중특이적 항체 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, Y 가 링커인 다중특이적 항체 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, V_1 이 dsFv이고 V_2 가 dsFv인 다중특이적 항체 분자.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, V_1 이 dsscFv이고 V_2 가 dsscFv인 다중특이적 항체 분자.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, V_1 이 dsscFv이고 V_2 가 dsFv이거나, 또는 V_1 이 dsFv이고 V_2 가 dsscFv인 다중특이적 항체 분자.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, V_1 이 scFv가 아닌 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 8

제1항 내지 제3항 및 제7항 중 어느 한 항에 있어서, V_2 가 scFv가 아닌 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, V_1 의 경쇄 가변 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이, 예를 들면 펩타이드 결합을 통해, X에 부착된 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, V_2 의 경쇄 가변 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이, 예를 들면 펩타이드 결합을 통해, Y에 부착된 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, V_1 의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 및/또는 V_2 의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인이 2개의 조작된 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합에 의해 연결된 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, V_1 및/또는 V_2 의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 2개의 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합에 의해 연결되고, 시스테인 잔기의 쌍의 위치가 V_H37 및 V_L95 , V_H44 및 V_L100 , V_H44 및 V_L105 , V_H45 및 V_L87 , V_H100 및 V_L50 , V_H100b 및 V_L49 , V_H98 및 V_L46 , V_H101 및 V_L46 , V_H105 및 V_L43 , 및 V_H106 및 V_L57 을 포함하거나 이들로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 상기 V_H 및 V_L 값은 주어진 V_1 또는 V_2 내에서 독립적으로 선택되는 것인 다중특이적 항체 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, 조작된 시스테인 잔기의 쌍의 위치가 V_H44 및 V_L100 인 다중특이적 항체 분자.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, X가 펩타이드 링커, 예를 들면 서열번호: 1, 2, 69 및 70인 다중특이적 항체 분자.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, Y가 펩타이드 링커, 예를 들면 서열번호: 1, 2, 69 및 70인 다중특이적 항체 분자.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 삼중특이적인 다중특이적 항체 분자.

청구항 17

제16항에 있어서, 3개의 결합 도메인 각각이 상이한 항원에 결합하는 것인 삼중특이적 항체 분자.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자 또는 이의 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 19

제18항에서 정의된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들을 포함하는 벡터.

청구항 20

제18항 또는 제19항의 하나 이상의 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드를 각각 포함하는 숙주 세포.

청구항 21

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자의 상이한 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 각각 포함하는 2개의 또는 3개의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 정의된 숙주 세포로부터 다중특이적 항체 분자를 발현시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 23

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자 및 하나 이상의 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 24

치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자 또는 제23항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 분자 또는 제23항에 따른 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 치료가 필요한 환자를 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 특정 다중특이적 항체 작제물, 상기 작제물을 포함하는 약제학적 제형, 상기 작제물을 인코딩하는 DNA 및 이를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한, 예를 들면 숙주 세포에서, 상기 작제물을 발현시키는 방법 및 약제학적 조성물로서 이를 제형화하는 방법까지 확장된다. 본 개시내용은 또한 치료에 있어서 상기 다중특이적 항체 작제물 및 제형의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이종특이적 항체를 생성하기 위한 많은 접근법이 있으며, 이들 중 다수는 단쇄 가변 단편(scFv)을 전체 항체, 예컨대 IgG에 융합하거나, 또는 항체 Fab 단편에 융합하는 것(Schoonjans *et al.*, 2000, Journal of Immunology, 165, 7050-7057)을 포함하는 Morrison 등(Coloma and Morrison 1997, Nat Biotechnol. 15, 159-163)이 최초로 기술한 방식에 기초한다.

[0003] Fab-scFv의 경우, 그러한 이종특이적 및 삼중특이적 분자에서 사용되는 scFv의 V_H 및 V_L 도메인은 일반적으로 펩타이드 링커에 의해 결합되어 있다. 그러나, V_H 및 V_L 가변 도메인의 어떤 조합의 경우, 펩타이드 링커가 scFv에 충분한 안정성을 부여할 수 없어서, 가변 도메인 '휴식(breathing)' 및 가변 도메인과의 무차별적인 분자간 쌍형성 및 따라서 이의 단쇄 Fv 부분을 통해 다량체를 형성하는 성향을 야기한다. 이것은 이종특이적 분자의 맥락에서 도 1에서 예시되어 있다.

[0004] 본 발명자들은 발현 단계에서 및/또는 정제 후에 다량체화를 최소화하면서, 동등한 기능성을 갖는 항체 분자를 제공하기 위해 관련된 다중특이적 항체 분자를 재조작하였다. 이는 수득된 "단량체성" 물질의 수율을 증가시키는 것을 용이하게 하고, 정제, 농축 및 제형화 후 치료에 사용하기 위해 적합한 안정성의 분자를 제공한다.

- [0005] 따라서, 일 양태에서, 하기 a) 및 b)를 포함하거나 하기 a) 및 b)로 이루어지는 다중특이적 항체 분자가 제공된다:
- [0006] a) 하기 화학식 (I):
- [0007] $V_H-CH_1-X-V_1$
- [0008] 의 폴리펩타이드 사슬; 및
- [0009] b) 하기 화학식 (II):
- [0010] $V_L-C_L-Y-V_2$
- [0011] 의 폴리펩타이드 사슬;
- [0012] 상기 화학식에서,
- [0013] V_H 는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0014] CH_1 은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들면 중쇄 불변 영역의 도메인 1을 나타내며;
- [0015] X 는 결합 또는 링커를 나타내고;
- [0016] Y 는 결합 또는 링커를 나타내며;
- [0017] V_1 은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;
- [0018] V_L 은 경쇄 가변 도메인을 나타내며;
- [0019] C_L 은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0020] V_2 는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내며;
- [0021] 여기서 V_1 또는 V_2 중 하나 이상은 dsFv 또는 dsscFv이다.
- [0022] 유리하게도, 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자는 정제 후 관찰되는 응집의 양을 최소화하고 약제학적 농도에 서 작제물의 제형 내의 단량체의 양을 최대화하는데, 이는 보관시 경시적으로 높은 단량체 수준을 유지하는 것을 포함하며, 예를 들면 상기 단량체는 총 단백질의 50%, 60%, 70% 또는 75% 이상, 예컨대 80 또는 90% 이상, 예컨대 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상으로 존재할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 개시내용의 Fab-2xdsscFv 및 Fab-dsscFv-dsFv 작제물을 나타낸다.
- 도 2는 단백질 G-정제된, HEK293-발현된 Fab-1xdsscFv, 1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 단백질의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.
- 도 3은 단백질 G-정제된, HEK293-발현된 Fab-1xdsscFv, 1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 단백질의 G3000 SE HPLC 분석을 나타낸다.
- 도 4는 정제된, HEK293-발현된 Fab-2xdsscFv#3 단백질의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.
- 도 5는 정제된, HEK293-발현된 Fab-2xdsscFv#3 단백질의 S200 SE HPLC 분석을 나타낸다.
- 도 6은 본 개시내용의 다양한 단백질 G 정제된 Fab-dsscFv-dsFv 작제물의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.
- (A) Fab-dsscFv-dsscFv 샘플. (B) Fab-dsscFv-dsFv 샘플
- 도 7은 본 개시내용의 단백질 G-정제된 Fab-dssFv-dsFv 작제물의 G3000 SE HPLC 분석을 나타낸다.
- 도 8은 환원 조건하에 본 개시내용에 따른 다양한 작제물의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.
- 도 9는 단량체성 Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 G3000 SE-HPLC 시간-경과 분석을 나타낸다.

도 10 은 단백질-G 정제된 EXPiHEK 발현된 Fab-2xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 SDS-Page 분석을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본원에 사용된 바와 같이 "다중특이적 항체"는 둘 이상의 결합 도메인, 예를 들면 2 또는 3개의 결합 도메인을 갖는 본원에 기재된 바와 같은 항체 분자를 지칭한다.
- [0025] 일 구현예에서 항체 작제물은 삼중특이적 항체이다.
- [0026] 본원에 사용된 바와 같이 "삼중특이적 항체"는 독립적으로 동일하거나 상이한 항원에 결합할 수 있는 3개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 분자를 지칭한다. 일 예에서 삼중특이적 항체 분자는 2개의 상이한 항원에 결합하며, 즉 2개의 결합 부위는 동일한 항원에 결합하고 제3 결합 부위는 제2의 상이한 항원에 결합한다. 바람직하게는 본 발명의 삼중특이적 항체 분자의 3개의 결합 부위는 독립적으로 3개의 상이한 항원에 결합한다.
- [0027] 일 구현예에서 작제물은 이중특이적 항체이다.
- [0028] 본원에 사용된 바와 같이 "이중특이적 분자"는 동일하거나 상이한 항원에 결합할 수 있는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 분자를 지칭한다.
- [0029] 일 구현예에서 도메인 모두는 항원 상의 동일한 에피토프에 결합하는 것 또는 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것을 포함하는 동일한 항원에 결합한다.
- [0030] 일 구현예에서 3개의 결합 도메인이 있으며 상기 3개의 결합 도메인 각각은 상이한(구별되는) 항원에 결합한다.
- [0031] 일 구현예에서 3개의 결합 도메인이 있으며 2개의 결합 도메인은 동일한 항원 상의 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 결합하는 것을 포함하는 동일한 항원에 결합하고, 제3 결합 도메인은 상이한(구별되는) 항원에 결합한다.
- [0032] 본원에 사용된 바와 같이 "항원 결합 부위"는 분자의 부분을 지칭하며, 이는 한 쌍의 가변 영역, 특히 표적 항원과 특이적으로 상호작용하는 동족 쌍을 포함한다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같이 결합 도메인은 단일 도메인 항체, 즉 가변 영역 및 항원 결합 부위를 포함한다.
- [0034] 본원에 사용된 바와 같이 "특이적으로"는 특이적인 항원만을 인식하는 결합 부위 또는 결합 도메인 또는 비특이적인 항원에 대한 친화성과 비교하여 특이적인 항원에 대하여 유의하게 더 높은 결합 친화성, 예를 들면 5, 6, 7, 8, 9, 10배 더 높은 결합 친화성을 갖는 결합 부위 또는 결합 도메인을 지칭하고자 하는 것이다.
- [0035] 결합 친화성은 표준 분석, 예를 들면 표면 플라즈몬 공명, 예컨대 BIAcore에 의해 측정될 수 있다.
- [0036] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 다중특이적 항체 분자는 각각 화학식 (I) 및 (II)의 중쇄 및 경쇄의 이량체로서 제공되며, 여기서 V_H-CH_1 부분은 V_L-C_L 부분과 함께 기능적 Fab 또는 Fab' 단편을 형성한다.
- [0037] V_H 는 가변 도메인, 예를 들면 중쇄 가변 도메인을 나타낸다. 일 구현예에서 V_H 는 중쇄 가변 도메인을 나타낸다. 일 구현예에서 V_H 는 키메라성 가변 도메인이며, 즉 그것은 적어도 2개의 종으로부터 유래된 성분, 예를 들면 인간 프레임워크 및 비인간 CDR을 포함한다. 일 구현예에서 V_H 는 인간화된다. 일 구현예에서 V_H 는 인간이다.
- [0038] V_L 은 가변 도메인, 예를 들면 경쇄 가변 도메인을 나타낸다. 일 구현예에서 V_L 은 경쇄 가변 도메인을 나타낸다. 일 구현예에서 V_L 은 키메라성 가변 도메인이며, 즉 그것은 적어도 2개의 종으로부터 유래된 성분, 예를 들면 인간 프레임워크 및 비인간 CDR을 포함한다. 일 구현예에서 V_L 은 인간화된다. 일 구현예에서 V_H 는 인간화된다. 일 구현예에서 V_H 는 인간이다.
- [0039] 일반적으로 V_H 및 V_L 은 함께 항원 결합 도메인을 형성한다. 일 구현예에서 V_H 및 V_L 은 동족 쌍을 형성한다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같이 "동족 쌍"은 생체내에서 생성된, 단일 항체로부터의 가변 도메인의 쌍, 즉 숙주로부터 단리된 가변 도메인의 자연적으로 발생하는 쌍 형성을 지칭한다. 그러므로 동족 쌍은 V_H 및 V_L 쌍이다. 일 예에서 동족 쌍은 협력하여 항원에 결합한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같이 "가변 영역"은 CDR 및 프레임워크, 특히 적합한 프레임워크를 포함하는 항체 사슬 내

의 영역을 지칭한다.

- [0042] 본 개시내용에서 사용하기 위한 가변 영역은 일반적으로 본 기술분야에서 알려진 임의의 방법에 의해 생성될 수 있는 항체로부터 유래될 것이다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같이 "로부터 유래된"은 이용된 서열 또는 이용된 서열과 매우 유사한 서열이 원래의 유전 물질, 예컨대 항체의 경쇄 또는 중쇄로부터 획득되었다는 사실을 지칭한다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같이 "매우 유사한"은 그의 전체 서열에 대하여 95% 이상 유사한, 예컨대 96, 97, 98 또는 99% 유사한 아미노산 서열을 지칭하고자 하는 것이다.
- [0045] V_H 및 V_L 에 대해 상기 본원에서 기술된 바와 같이, 본 발명에서 사용하기 위한 가변 영역은 임의의 적합한 공급 원으로부터 유래될 수 있고 예를 들면, 완전히 인간이거나 인간화될 수 있다.
- [0046] 일 구현예에서 V_H 및 V_L 에 의해 형성된 결합 도메인은 제1 항원에 특이적이다.
- [0047] 일 구현예에서 V_L 에 의해 형성된 결합 도메인은 제2 항원에 특이적이다.
- [0048] 일 구현예에서 V_2 에 의해 형성된 결합 도메인은 제2 또는 제3 항원에 특이적이다.
- [0049] 일 구현예에서 CH_1 도메인은 항체 중쇄 또는 이의 유도체로부터의 자연적으로 발생하는 도메인 1이다.
- [0050] 일 구현예에서 경쇄 내의 C_L 단편은 불변 카파 서열 또는 불변 람다 서열 또는 이의 유도체이다.
- [0051] 본원에 사용된 바와 같이 자연적으로 발생하는 도메인의 유도체는, 예를 들어 도메인의 특성을 최적화하기 위해, 예컨대 바람직하지 않은 특성을 제거함으로써, 자연적으로 발생하는 서열 내의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 치환되거나 결실되었으나, 상기 도메인의 특징(들)은 유지되는 경우를 지칭한다.
- [0052] 일 구현예에서 하나 이상의 천연 또는 조작된 사슬간(즉 경쇄 및 중쇄간) 디설파이드 결합은 기능적 Fab 또는 Fab' 단편에 존재한다.
- [0053] 일 구현예에서 "천연" 디설파이드 결합은 화학식 (I) 및 (II)의 폴리펩타이드 사슬 내의 CH_1 및 C_L 사이에 존재한다.
- [0054] C_L 도메인이 카파 또는 람다 중 어느 하나로부터 유래되는 경우, 결합 형성 시스테인을 위한 천연 위치는 인간 c 카파 및 c람다에서 214이다(Kabat numbering 4th edition 1987).
- [0055] CH_1 내의 디설파이드 결합 형성 시스테인의 정확한 위치는 실제 이용된 특정 도메인에 좌우된다. 따라서, 예를 들면 인간 감마-1에서 디설파이드 결합의 천연 위치는 위치 233에 위치한다(Kabat numbering 4th edition 1987). 감마 2, 3, 4, IgM 및 IgD와 같은 다른 인간 동형(isotype)에 대한 결합 형성 시스테인의 위치는 공지되어 있으며, 예를 들면 인간 IgM, IgE, IgG2, IgG3, IgG4의 경우 위치 127 및 인간 IgD 및 IgA2B의 중쇄의 위치 127 및 128이다.
- [0056] 선택적으로 화학식 I 및 II의 폴리펩타이드의 V_H 및 V_L 사이에 디설파이드 결합이 있을 수 있다.
- [0057] 일 구현예에서 본 개시내용에 따른 다중특이적 항체는 CH_1 및 C_L 사이에서 천연적으로 발생하는 것에 동등하거나 상응하는 위치에 디설파이드 결합을 갖는다.
- [0058] 일 구현예에서 CH_1 을 포함하는 불변 영역 및 C_L 과 같은 불변 영역은 비자연적으로 발생하는 위치 내에 있는 디설파이드 결합을 갖는다. 이것은 상기 위치 또는 필요한 위치에서 시스테인(들)을 아미노산 사슬 내로 도입함으로써 분자에 조작될 수 있다. 이 비천연 디설파이드 결합은 CH_1 및 C_L 사이에 존재하는 천연 디설파이드 결합에 부가적이거나 대안적이다. 천연 위치 내의 시스테인(들)은 디설파이드 다리를 형성할 수 없는 세린과 같은 아미노산에 의해 치환될 수 있다.
- [0059] 조작된 시스테인의 도입은 본 기술분야에서 알려진 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 이들 방법은, 비제한적으로, PCR 연장 오버랩 돌연변이유발, 부위-지향적 돌연변이유발 또는 카세트 돌연변이유발을 포함한다(일반적으로, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory

Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993 참고). 부위-지향적 돌연변이유발 키트는, 예컨대 QuikChange® 부위-지향적 돌연변이유발 키트(Stratagene, La Jolla, CA)와 같이, 상업적으로 이용가능하다. 카세트 돌연변이유발은 문헌[Wells et al., 1985, Gene, 34:315-323]에 기초하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 돌연변이체는 어닐링, 라이게이션 및 PCR 증폭에 의한 총 유전자 합성 및 중첩 올리고뉴클레오타이드의 클로닝에 의해 만들어질 수 있다.

- [0060] 일 구현예에서 CH_1 및 C_L 사이의 디설파이드 결합이 완전히 존재하지 않으며, 예를 들면 사슬간 시스테인은 세린과 같은 또 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있다. 따라서 일 구현예에서 분자의 기능적 Fab 단편 내에 사슬간 디설파이드 결합이 없다. 본원에 참고로 통합된 제W02005/003170호와 같은 개시내용들은 사슬간 디설파이드 결합이 없는 Fab 단편을 제공하는 방법을 기술한다.
- [0061] V_1 은 dsFv, sdAb, scFv, 또는 dsscFv, 예를 들면 dsFv, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.
- [0062] V_2 는 dsFv, sdAb, scFv, 또는 dsscFv, 예를 들면 dsFv, scFv 또는 dsscFv를 나타낸다.
- [0063] 일 구현예에서, V_1 및 V_2 는 모두 dsscFv이다.
- [0064] 일 구현예에서, V_1 및 V_2 는 모두 dsFv이다. V_1 및 V_2 모두가 dsFv인 경우, V_H 또는 V_L 가변 도메인 중 어느 하나는 V_1 및 V_2 에 대해 동일하다. 일 구현예에서, V_1 및 V_2 는 동일한 V_H 가변 도메인을 갖는다. 또 다른 구현예에서, V_1 및 V_2 는 동일한 V_L 가변 도메인을 갖는다. 일 구현예에서 V_H 및 V_L 가변 도메인은 V_1 및 V_2 에 대해 동일하다. 후자는 일부 표적에게 바람직할 수 있는 가교-연결을 가능하게 한다.
- [0065] 일 구현예에서 V_1 은 dsFv이고 V_2 는 scFv이다. 일 구현예에서 V_1 은 scFv이고 V_2 는 dsFv이다. 일 구현예에서 V_1 은 dsscFv이고 V_2 는 dsFv이다. 일 구현예에서 V_1 은 dsFv이고 V_2 는 dsscFv이다. 일 구현예에서 V_1 은 dsscFv이고 V_2 는 scFv이다. 일 구현예에서 V_1 은 scFv이고 V_2 는 dsscFv이다. 일 구현예에서, V_1 은 scFv가 아니다. 일 구현예에서, V_2 는 scFv가 아니다. 일 구현예에서, V_1 및 V_2 모두는 scFv가 아니다.
- [0066] 따라서, 일 양태에서, 하기 a) 및 b)를 포함하거나 하기 a) 및 b)로 이루어지는 다중특이적 항체 분자가 제공된다:
- [0067] a) 하기 화학식 (I):
- [0068] $V_H-CH_1-X-V_1$
- [0069] 의 폴리펩타이드 사슬; 및
- [0070] b) 화학식 (II):
- [0071] $V_L-C_L-Y-V_2$
- [0072] 의 폴리펩타이드 사슬;
- [0073] 상기 화학식에서,
- [0074] V_H 는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0075] CH_1 은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들면 중쇄 불변 영역의 도메인 1을 나타내며;
- [0076] X 는 결합 또는 링커를 나타내고;
- [0077] Y 는 결합 또는 링커를 나타내며;
- [0078] V_1 은 dsFv 또는 dsscFv를 나타내고;
- [0079] V_L 은 경쇄 가변 도메인을 나타내며;
- [0080] C_L 은 불변 영역으로부터의 도메인, 예를 들면 경쇄 불변 영역 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;

- [0081] V_2 는 dsFv 또는 dsscFv를 나타낸다;
- [0082] 본원에 사용된 바와 같이 "단쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 V_H 및 V_L 가변 도메인 사이의 펩타이드 링커에 의해 안정화된 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)을 포함하거나 이들로 이루어지는 단쇄 가변 단편을 지칭한다. V_H 및 V_L 가변 도메인은 임의의 적합한 배향일 수 있으며, 예를 들면 V_H 의 C-말단은 V_L 의 N-말단에 연결될 수 있거나 또는 V_L 의 C-말단은 V_H 의 N-말단에 연결될 수 있다.
- [0083] 본원에 사용된 바와 같이 "디설파이드-안정화된 단쇄 가변 단편" 또는 "dsscFv"는 V_H 및 V_L 가변 도메인 사이의 펩타이드 링커에 의해 안정화되고 또한 V_H 및 V_L 사이의 도메인간 디설파이드 결합을 포함하는 단쇄 가변 단편을 지칭한다.
- [0084] 본원에 사용된 바와 같이 "디설파이드-안정화된 가변 단편" 또는 "dsFv"는 V_H 및 V_L 가변 도메인 사이에 펩타이드 링커를 포함하지 않고 그 대신에 V_H 및 V_L 사이의 도메인간 디설파이드 결합에 의해 안정화된 단쇄 가변 단편을 지칭한다.
- [0085] 본원에 사용된 바와 같이 "단일 도메인 항체" 또는 "sdAb"는 단일 단량체성 가변 항체 도메인, 예컨대 V_H 또는 V_L 또는 VHH로 이루어지는 항체 단편을 지칭한다.
- [0086] 일 구현예에서, V_1 및/또는 V_2 가 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V_1 및/또는 V_2 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 사이의 디설파이드 결합은 하기 열거된 잔기 중 2개의 사이에 있다(문맥이 달리 나타내지 않는 한 카바트 넘버링이 하기 목록에서 이용됨). 카바트 넘버링이 언급되는 경우, 관련 참고문헌은 Kabat *et al.*, 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA이다.
- [0087] 일 구현예에서 디설파이드 결합은 하기를 포함하는 군으로부터 선택되는 위치에 있다:
- [0088] · $V_H37 + V_L95C$ 예를 들면 문헌[Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997)] 참고;
- [0089] · $V_H44 + V_L100$ 예를 들면 문헌[Biochemistry 33 5451-5459 Reiter *et al* (1994)]; 또는 [Journal of Biological Chemistry Vol. 269 No. 28 pp.18327-18331 Reiter *et al* (1994)]; 또는 [Protein Engineering, vol.10 no.12 pp.1453-1459 Rajagopal *et al* (1997)] 참고;
- [0090] · $V_H44 + V_L105$ 예를 들면 문헌[J Biochem. 118, 825-831 Luo *et al* (1995)] 참고;
- [0091] · $V_H45 + V_L87$ 예를 들면 문헌[J Biochem. 118, 825-831 Luo *et al* (1995)] 참고;
- [0092] · $V_H55 + V_L101$ 예를 들면 문헌[FEBS Letters 377 135-139 Young *et al* (1995)] 참고;
- [0093] · $V_H100 + V_L50$ 예를 들면 문헌[Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber *et al* (1990)] 참고;
- [0094] · $V_H100b + V_L49$;
- [0095] · $V_H98 + V_L46$ 예를 들면 문헌[Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber *et al* (1990)] 참고;
- [0096] · $V_H101 + V_L46$;
- [0097] · $V_H105 + V_L43$ 예를 들면 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90 pp.7538-7542 Brinkmann *et al* (1993)]; 또는 [Proteins 19, 35-47 Jung *et al* (1994)] 참고;
- [0098] · $V_H106 + V_L57$ 예를 들면 문헌[FEBS Letters 377 135-139 Young *et al* (1995)] 참고,
- [0099] 및 상기 분자에 위치한 가변 영역 쌍 내의 이에 상응하는 위치.
- [0100] 일 구현예에서, 디설파이드 결합은 위치 V_H44 및 V_L100 사이에 형성된다.
- [0101] 상기 열거된 아미노산 쌍은 디설파이드 결합이 형성될 수 있도록 시스테인에 의한 치환에 도움이 되는 위치 내에 있다. 시스테인은 공지된 기술에 의해 이들 원하는 위치 내로 조작될 수 있다. 그러므로 일 구현예에서 본

개시내용에 따른 조작된 시스테인은 제시된 아미노산 위치에서 자연적으로 발생하는 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 경우를 지칭한다.

- [0102] 조작된 시스테인의 도입은 본 기술분야에서 알려진 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 이들 방법은, 비제한적으로, PCR 연장 오버랩 돌연변이유발, 부위-지향적 돌연변이유발 또는 카세트 돌연변이유발을 포함한다(일반적으로, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993 참고). 부위-지향적 돌연변이유발 키트는, 예컨대 QuikChange® 부위-지향적 돌연변이유발 키트(Stratagene, La Jolla, CA)와 같이, 상업적으로 이용가능하다. 카세트 돌연변이유발은 문헌[Wells et al., 1985, Gene, 34:315-323]에 기초하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 돌연변이체는 어닐링, 라이게이션 및 PCR 증폭에 의한 총 유전자 합성 및 중첩 올리고뉴클레오타이드의 클로닝에 의해 만들어질 수 있다.
- [0103] 따라서, 일 구현예에서 V_1 및/또는 V_2 가 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V_1 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 및/또는 V_2 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 은 2개의 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합에 의해 연결될 수 있고, 여기서 시스테인 잔기의 쌍의 위치는 V_H37 및 V_L95 , V_H44 및 V_L100 , V_H44 및 V_L105 , V_H45 및 V_L87 , V_H100 및 V_L50 , V_H100b 및 V_L49 , V_H98 및 V_L46 , V_H101 및 V_L46 , V_H105 및 V_L43 , 및 V_H106 및 V_L57 로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0104] 일 구현예에서 V_1 및/또는 V_2 가 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V_1 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 및/또는 V_2 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 은 CDR의 외부에 있는 2개의 시스테인 잔기(V_H 에 하나 및 V_L 에 하나) 사이의 디설파이드 결합에 의해 연결될 수 있고, 시스테인 잔기의 쌍의 위치는 V_H37 및 V_L95 , V_H44 및 V_L100 , V_H44 및 V_L105 , V_H45 및 V_L87 , V_H100 및 V_L50 , V_H98 및 V_L46 , V_H105 및 V_L43 , 및 V_H106 및 V_L57 로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0105] 일 구현예에서 V_1 이 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V_1 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 은 2개의 조작된 시스테인 잔기(위치 V_H44 에 하나 및 V_L100 에 다른 하나) 사이의 디설파이드 결합에 의해 연결된다.
- [0106] 일 구현예에서 V_2 가 dsFv 또는 dsscFv인 경우, V_2 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 은 2개의 조작된 시스테인 잔기(위치 V_H44 에 하나 및 V_L100 에 다른 하나) 사이의 디설파이드 결합에 의해 연결된다.
- [0107] 일 구현예에서 V_1 이 dsFv, dsscFv, 또는 scFv인 경우, V_1 의 V_H 도메인은 X에 부착된다.
- [0108] 일 구현예에서 V_1 이 dsFv, dsscFv, 또는 scFv인 경우, V_1 의 V_L 도메인은 X에 부착된다.
- [0109] 일 구현예에서 V_2 가 dsFv, dsscFv, 또는 scFv인 경우, V_2 의 V_H 도메인은 Y에 부착된다.
- [0110] 일 구현예에서 V_2 가 dsFv, dsscFv, 또는 scFv인 경우, V_2 의 V_L 도메인은 Y에 부착된다.
- [0111] 숙련가는 V_1 및/또는 V_2 가 dsFv에 해당하는 경우, 다중특이적 항체가 X 또는 Y에 부착되지 않은 상응하는 자유 V_H 또는 V_L 도메인을 인코딩하는 제3 폴리펩타이드를 포함할 것임을 인식할 것이다. V_1 및 V_2 가 모두 dsFv인 경우, "자유 가변 도메인"(즉 폴리펩타이드의 나머지에 디설파이드 결합을 통해 연결된 도메인)은 두 사슬에 공통적일 것이다. 따라서 폴리펩타이드에 X 또는 Y를 통해 융합되거나 연결된 실제 가변 도메인은 각 폴리펩타이드 사슬에서 상이할 수 있지만, 이와 쌍을 형성한 가변 도메인은 일반적으로 서로 동일할 것이다.
- [0112] 일 구현예에서 X는 결합이다.
- [0113] 일 구현예에서 Y는 결합이다.
- [0114] 일 구현예에서 X 및 Y 모두는 결합이다.
- [0115] 일 구현예에서 X는 링커, 바람직하게는 펩타이드 링커, 예를 들면 부분 CH_1 및 V_1 를 연결하기 위한 적합한 펩타이드이다.
- [0116] 일 구현예에서 Y는 링커, 바람직하게는 펩타이드 링커, 예를 들면 부분 C_L 및 V_2 를 연결하기 위한 적합한 펩타이드이다.

- [0117] 일 구현예에서 X 및 Y 모두는 링커이다. 일 구현예에서 X 및 Y 모두는 펩타이드 링커이다.
- [0118] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "펩타이드 링커"는 아미노산으로 구성된 펩타이드를 지칭한다. 다양한 적합한 펩타이드 링커는 본 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있을 것이다.
- [0119] 일 구현예에서 펩타이드 링커는 50개 이하의 아미노산 길이, 예를 들면 20개 이하의 아미노산, 예컨대 약 15개 이하의 아미노산, 예컨대 9, 10, 11, 12, 13 또는 14개의 아미노산 길이이다.
- [0120] 일 구현예에서 링커는 서열 1 내지 67에 나타난 서열로부터 선택된다.
- [0121] 일 구현예에서 링커는 서열번호: 1 또는 서열번호: 2에 나타난 서열로부터 선택된다.
- [0122] 일 구현예에서 X는 서열 SGGGGTGGGS(서열번호: 1)를 갖는다.
- [0123] 일 구현예에서 Y는 서열 SGGGGTGGGS(서열번호: 1)를 갖는다.
- [0124] 일 구현예에서 X는 서열 SGGGSGGGGS(서열번호: 2)를 갖는다. 일 구현예에서 Y는 서열 SGGGSGGGGS(서열번호: 2)를 갖는다.
- [0125] 일 구현예에서 X는 서열번호: 1에 제시된 서열을 가지며 Y는 서열번호: 2에 제시된 서열을 갖는다.
- [0126] 일 구현예에서 X는 서열번호: 69 또는 70에 제시된 서열을 갖는다. 일 구현예에서 Y는 서열번호: 69 또는 70에 제시된 서열을 갖는다. 일 구현예에서 X는 서열번호: 69에 제시된 서열을 갖고, Y는 서열번호: 70에 제시된 서열을 갖는다.

표 1

- [0127] **한지 링커 서열**

서열번호:	서열
3	DKHTCAA
4	DKHTCPPCPA
5	DKHTCPPCPATCPPCPA
6	DKHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
7	DKHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
8	DKHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
9	DKHTCCVECPPCPA
10	DKHTCPRCPEPKSCDTPPPCRPCA
11	DKHTCPSCPA

표 2

- [0128] **가요성(flexible) 링커 서열**

서열번호:	서열
12	SGGGGSE
13	DKHTS
14	(S)GGGS
15	(S)GGGSGGGGS
16	(S)GGGSGGGSGGGGS
17	(S)GGGSGGGSGGGSGGGGS
18	(S)GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
19	AAAGSG-GASAS
20	AAAGSG-XGGGS-GASAS
21	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
22	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
23	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
24	AAAGSG-XS-GASAS
25	PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
26	ATTTGSSPGPT
27	ATTTGS

-	GS
28	EPSPGPISTINSPPSKESHKSP
29	GTVAAPSVFIFPPSD
30	GGGGIAPSMVGGGGS
31	GGGGKVEGAGGGGGS
32	GGGGSMKSHDGGGGS
33	GGGGNLITIVGGGGS
34	GGGGVVPSPGPGGGS
35	GGEKSIPGGGGS
36	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
37	YPRSIYIRRRHPSPLTT
38	TPSHLSHILPSFGLPTFN
39	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
40	SPAAHFPRSIPRPGPIRT
41	APGPSAPSHRSLPSRAFG
42	PRNSIHFLHPLLVAFLGA
43	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
44	SPQYPSPLTLTPHPSL
45	NPSLNPPSYLHRAPSRI
46	LPWRTSLPSLPLRRRP
47	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
48	VPPAPVSLRSAHARPPY
49	LRPTPPRVSYTCCCTP-
50	PNVAHVLPLLTPWDNLR
51	CNPLLPLCARSPAVRTFP

[0129] (s)는 서열 14 내지 18에서 선택적이다.

[0130] 견고한(rigid) 링커의 예는 펩타이드 서열 GAPAPAAPAPA(서열번호: 52), PPPP(서열번호: 53) 및 PPP를 포함한다.

[0131] 일 구현예에서 펩타이드 링커는 알부민 결합 펩타이드이다.

[0132] 알부민 결합 펩타이드의 예가 W02007/106120호에 제공되어 있으며, 이는 하기를 포함한다:

표 3

서열번호:	서열
54	DLCLRDWGCLW
55	DICLPRWGCLW
56	MEDICLPRWGCLWGD
57	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
58	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
59	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
60	EDICLPRWGCLWEDD
61	RLMEDICLPRWGCLWEDD
62	MEDICLPRWGCLWEDD
63	MEDICLPRWGCLWED
64	RLMEDICLARWGCLWEDD
65	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
66	RAPESFVCYWETICFERSEQ
67	EMCYFPGICWM

[0134] 유리하게도, 링커로서 알부민 결합 펩타이드의 사용은 다중특이적 항체 분자의 반감기를 증가시킬 수 있다.

[0135] 일 구현예에서 V_1 이 scFv 또는 dsscFv인 경우, 링커, 예를 들면 V_1 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 을 연결하기 위한 적합한 펩타이드가 있다.

- [0136] 일 구현예에서 V_2 가 scFv 또는 dsscFv인 경우, 링커, 예를 들면 V_2 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 을 연결하기 위한 적합한 펩타이드가 있다.
- [0137] 일 구현예에서 scFv 또는 dsscFv 내의 펩타이드 링커는 약 12개 내지 25개 아미노산 길이, 예컨대 15개 내지 20개 아미노산의 범위이다.
- [0138] 일 구현예에서 V_1 이 scFv 또는 dsscFv인 경우, V_1 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 을 연결하는 링커는 서열 GGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호: 68)를 갖는다.
- [0139] 일 구현예에서 V_2 가 scFv 또는 dsscFv인 경우, V_2 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 을 연결하는 링커는 서열 GGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호: 68)를 갖는다.
- [0140] 일 구현예에서 V_1 이 scFv 또는 dsscFv인 경우, V_1 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 을 연결하는 링커는 서열 SGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호: 69)를 갖는다.
- [0141] 일 구현예에서 V_2 가 scFv 또는 dsscFv인 경우, V_2 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 을 연결하는 링커는 서열 SGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호: 69)를 갖는다.
- [0142] 일 구현예에서 V_1 이 scFv 또는 dsscFv인 경우, V_1 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 을 연결하는 링커는 서열 SGGGSGGGGTGGGGS(서열번호: 70)를 갖는다.
- [0143] 일 구현예에서 V_2 가 scFv 또는 dsscFv인 경우, V_2 의 가변 도메인 V_H 및 V_L 을 연결하는 링커는 서열 SGGGSGGGGTGGGGS(서열번호: 70)를 갖는다.
- [0144] 따라서, 일 양태에서 하기 a) 및 b)를 포함하거나 하기 a) 및 b)로 이루어지는 다중특이적 항체 분자가 제공된다:
- [0145] a) 하기 화학식 (I):
- [0146] $V_H-CH_1-X-V_1$
- [0147] 의 폴리펩타이드 사슬; 및
- [0148] b) 하기 화학식 (II):
- [0149] $V_L-C_L-Y-V_2$
- [0150] 의 폴리펩타이드 사슬;
- [0151] 상기 화학식에서,
- [0152] V_H 는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0153] CH_1 은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들면 중쇄 불변 영역의 도메인 1을 나타내며;
- [0154] X 는 결합 또는 링커를 나타내고;
- [0155] Y 는 결합 또는 링커를 나타내며;
- [0156] V_1 은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;
- [0157] V_L 은 경쇄 가변 도메인을 나타내며;
- [0158] C_L 은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0159] V_2 는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv 를 나타내며;
- [0160] 여기서 V_1 또는 V_2 중 하나 이상은 dsFv 또는 dsscFv이다.
- [0161] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 서열과 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 유사한

서열을 제공한다.

- [0162] 본원에서 사용된 바와 같이, "동일성"은 정렬된 서열 내의 어느 특정 위치에서 아미노산 잔기가 상기 서열 간에 동일하다는 것을 가리킨다.
- [0163] 본원에서 사용된 바와 같이, "유사성"은 정렬된 서열 내의 어느 특정 위치에서 아미노산 잔기가 서열 간에 유사한 유형임을 가리킨다. 예를 들면, 이소류신 또는 발린은 류신으로 치환될 수 있다. 종종 서로 치환될 수 있는 다른 비제한적으로 하기를 포함한다:
- [0164] - 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판(방향족 측쇄를 갖는 아미노산);
- [0165] - 리신, 아르기닌 및 히스티딘(염기성 측쇄를 갖는 아미노산);
- [0166] - 아스파테이트 및 글루타메이트(산성 측쇄를 갖는 아미노산);
- [0167] - 아스파라긴 및 글루타민(아마이드 측쇄를 갖는 아미노산); 및
- [0168] - 시스테인 및 메티오닌(황-함유 측쇄를 갖는 아미노산).
- [0169] 동일성 및 유사성 정도는 쉽게 계산될 수 있다(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, the BLAST™ software available from NCBI(Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656,).
- [0170] 본 발명의 다중특이적 작제물에서 사용하기 위한 항체는 본 기술분야에서 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0171] 동물의 면역화가 필요한 경우, 널리 공지되고 일상적인 프로토콜을 이용하여 항원 폴리펩타이드를 동물, 바람직하게는 비인간 동물에게 투여함으로써 항원 폴리펩타이드에 대해 생성된 항체가 수득될 수 있으며, 예를 들면 문헌[Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986]을 참고한다. 많은 온혈 동물, 예컨대 토끼, 마우스, 랫트, 소, 낙타 또는 돼지가 면역화될 수 있다. 그러나, 마우스, 토끼, 돼지 및 랫트가 일반적으로 가장 적합하다.
- [0172] 단일클론 항체는 본 기술분야에서 알려진 임의의 방법, 예컨대 하이브리도마 기술(Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), 트리오마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술(Kozbor *et al* 1983, Immunology Today, 4:72) 및 EBV-하이브리도마 기술(Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985)에 의해 제조될 수 있다.
- [0173] 항체는 또한, 예를 들면, Babcook, J. *et al* 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-78481; 제 W092/02551호; 제W02004/051268호 및 제W02004/106377호에 기재된 방법에 의해, 특이적 항체의 생산을 위해 선택된 단일 림프구로부터 생성된 면역글로불린 가변 영역 cDNA를 클로닝하고 발현시킴으로써 단일 림프구 항체 방법을 이용하여 생성될 수 있다.
- [0174] 본 개시내용에서 사용하기 위한 항체는 또한 본 기술분야에서 공지된 다양한 과아지 디스플레이 방법을 이용하여 생성될 수 있고 이는 Brinkman *et al.* (in J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames *et al.* (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough *et al.* (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic *et al.* (Gene, 1997 187 9-18), Burton *et al.* (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) and W090/02809; W091/10737; W092/01047; W092/18619; W093/11236; W095/15982; W095/20401; 및 US 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; 5,969,108, 및 W020011/30305에 의해 개시된 것을 포함한다.
- [0175] 일 구현예에서 본 개시내용에 따른 다중특이적 분자는 인간화된다.
- [0176] 본원에 사용된 바와 같이 인간화된(CDR-이식된 항체 포함)은 비인간 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영

역(CDRs) 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 프레임워크 영역을 갖는 분자를 지칭한다(예컨대 US 5,585,089; W091/09967 참고). 전체 CDR보다는 CDR의 특이성 결정 잔기만을 옮기는 것이 필요할 수 있음이 인식될 것이다(예를 들면, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34 참고). 인간화된 항체는 CDR이 유래된 비인간 종으로부터 유래된 하나 이상의 프레임워크 잔기를 임의로 더 포함할 수 있다.

[0177] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간화된 항체 분자"는 중쇄 및/또는 경쇄가 수용체 항체(예컨대 인간 항체)의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 프레임워크 내로 이식된 공여체 항체(예컨대 쥐와 단일클론 항체)로부터의 하나 이상의 CDR(원하는 경우, 하나 이상의 변형된 CDR을 포함함)을 함유하는 항체 분자를 지칭한다. 검토를 위해, 문헌[Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998]을 참고한다. 일 구현예에서 전체 CDR이 옮겨지기도는, 상기 본원에 기재된 CDR 중 어느 하나로부터의 특이성 결정 잔기들 중 하나 이상만이 인간 항체 프레임워크로 옮겨진다(예를 들면, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34 참고). 일 구현예에서 상기 본원에 기재된 CDR 중 하나 이상으로부터의 특이성 결정 잔기들만이 인간 항체 프레임워크로 옮겨진다. 또 다른 구현예에서 상기 본원에 기재된 CDR 각각으로부터의 특이성 결정 잔기들만이 인간 항체 프레임워크로 옮겨진다.

[0178] CDR 또는 특이성 결정 잔기가 이식되는 경우, 마우스, 영장류 및 인간 프레임워크 영역을 포함하는 CDR이 유래되는 공여체 항체의 부류/유형을 고려하여 임의의 적절한 수용체 가변 영역 프레임워크 서열이 사용될 수 있다. 적합하게는, 본 발명에 따른 인간화된 항체는 인간 수용체 프레임워크 영역뿐만 아니라 본원에 제공된 CDR 중 하나 이상을 포함하는 가변 도메인을 갖는다.

[0179] 본 개시내용에서 사용될 수 있는 인간 프레임워크의 예는 KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY, 및 POM(상기 Kabat et al)이다. 예를 들면, KOL 및 NEWM은 중쇄를 위해 사용될 수 있고, REI는 경쇄를 위해 사용될 수 있으며 EU, LAY 및 POM은 중쇄 및 경쇄 모두를 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 인간 생식계열 서열이 사용될 수 있고; 이들은 <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php>에서 이용가능하다.

[0180] 본 개시내용의 인간화된 항체 분자에서, 수용체 중쇄 및 경쇄는 반드시 동일한 항체로부터 유래될 필요는 없으며, 원하는 경우, 상이한 사슬로부터 유래된 프레임워크 영역을 갖는 복합 사슬을 포함할 수 있다.

[0181] 프레임워크 영역은 수용체 항체의 것과 정확히 동일한 서열을 가질 필요는 없다. 예를 들어, 드문(unusual) 잔기들이 상기 수용체 사슬 부류 또는 유형을 위해 보다 흔히 존재하는 잔기로 바뀔 수 있다. 대안적으로, 수용체 프레임워크 영역 내의 선택된 잔기가 공여체 항체 내의 동일한 위치에서 발견되는 잔기에 상응하도록 바뀔 수 있다(Reichmann et al 1998, Nature, 332, 323-324 참고). 그러한 변화는 공여체 항체의 친화성을 회복하는데 필요한 최소한으로 유지되어야 한다. 변화될 필요가 있을 수 있는 수용체 프레임워크 영역 내의 잔기를 선택하는 프로토콜은 제W091/09967호에 제시되어 있다.

[0182] 프레임워크의 유도체는 대안적인 아미노산, 예를 들면 공여체 잔기로 치환된1, 2, 3 또는 4개의 아미노산을 가질 수 있다.

[0183] 공여체 잔기는 공여체 항체, 즉 CDR이 본래 유래된 항체로부터의 잔기이다. 공여체 잔기는 인간 수용체 프레임워크로부터 유래된 적합한 잔기(수용체 잔기)에 의해 치환될 수 있다.

[0184] 일 구현예에서 본 개시내용의 다중특이적 항체는 완전 인간이며, 특히 가변 도메인 중 하나 이상이 완전 인간이다.

[0185] 완전 인간 분자는 중쇄 및 경쇄 모두의 가변 영역 및 불변 영역(존재하는 경우)이 모두 인간 기원이거나, 또는 반드시 동일한 항체로부터 유래되는 것은 아닌, 인간 기원의 서열과 실질적으로 동일한 분자이다. 완전 인간 항체의 예는, 예를 들면 상기 기재된 파아지 디스플레이 방법에 의해 생산된 항체 및, 예컨대 제EP0546073호, 제US5,545,806호, 제US5,569,825호, 제US5,625,126호, 제US5,633,425호, 제US5,661,016호, 제US5,770,429호, 제EP0438474호, 및 제EP0463151호에서 일반적인 용어로 기술된 바와 같이, 쥐와 면역글로불린 가변 영역 유전자 및 선택적으로 불변 영역 유전자가 그들의 인간 대응물에 의해 치환된 마우스에 의해 생산된 항체를 포함할 수 있다.

[0186] 일 구현예에서 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자는 2 또는 3개 이상의 관심있는 상이한 항원에 선택적으로 결합할 수 있다.

[0187] 일 구현예에서, V_H/V_L , 또는 V_1 또는 V_2 에 의해 형성된 항원 결합 도메인에 의해 결합된 관심있는 항원은 세포-연관된 단백질, 예를 들면 박테리아 세포, 효모 세포, T-세포, B-세포, 내피 세포 또는 종양 세포와 같은 세포상의 세포 표면 단백질, 및 가용성 단백질로부터 독립적으로 선택된다.

- [0188] 관심있는 항원은 또한 어떤 의학적으로 관련된 단백질, 예컨대 질병 또는 감염 동안 상향조절된 단백질, 예를 들면 수용체 및/또는 이들의 상응하는 리간드일 수 있다. 항원의 특정 예는 세포 표면 수용체, 예컨대 T 세포 또는 B 세포 신호전달 수용체, 공동-자극성 분자, 체크포인트 억제제, 자연 살해 세포 수용체, 면역글로불린 수용체, TNFR 패밀리의 수용체, B7 패밀리의 수용체, 부착 분자, 인테그린, 사이토카인/케모카인 수용체, GPCR, 성장 인자 수용체, 키나아제 수용체, 조직-특이적 항원, 암 항원, 병원균 인식 수용체, 보체 수용체, 호르몬 수용체 또는 가용성 분자, 예컨대 사이토카인, 케모카인, 류코트리엔, 성장 인자, 호르몬 또는 효소 또는 이온 채널, 에피토프, 단편 및 이의 번역후 변형된 형태를 포함한다.
- [0189] 일 구현예에서 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자는 관심있는 항원(들)의 활성을 기능적으로 변화시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 항체 융합 단백질은 상기 항원의 활성을 직접 또는 간접적으로 중화시키거나, 길항시키거나 또는 작용시킬 수 있다.
- [0190] 일 구현예에서 V_1 및 V_2 는 동일한 항원에 특이적이며, 예를 들면 항원 내의 동일하거나 상이한 에피토프에 결합한다. 일 구현예에서 V_1 은 인간 혈청 알부민에 특이적이다. 일 구현예에서 V_2 는 인간 혈청 알부민에 특이적이다. 일 구현예에서 V_1 및 V_2 는 2개의 상이한 항원에 특이적이다.
- [0191] 일 구현예에서 V_1 및 V_2 는 동일한 항원, 예를 들면 동일한 항원 상의 동일하거나 상이한 에피토프에 특이적이다.
- [0192] 일 구현예에서, V_H/V_L 또는 V_1 또는 V_2 에 의해 결합된 관심있는 항원은 보체 경로 활성화 및/또는 효과기(effector) 세포 동원과 같은, 효과기 기능을 동원하는 능력을 제공한다.
- [0193] 효과기 기능의 동원은 효과기 기능이 세포 표면에 동원 분자를 갖는 세포와 연관되어 있다는 점에서 직접적일 수 있다. 간접적 동원은 동원 폴리펩타이드에 대한 본 개시내용에 따른 분자 내의 항원 결합 도메인(예컨대 V_1 또는 V_2)에의 항원의 결합이, 예를 들어 결국 직접적으로 또는 간접적으로 효과기 기능을 동원할 수 있는 인자의 방출을 야기할 때 일어날 수 있거나, 또는 신호전달 경로의 활성화를 통해서 일어날 수 있다. 예는 IL2, IL6, IL8, IFN γ , 히스타민, C1q, 옵소닌, 및 고전적 및 대체 보체 활성화 캐스캐이드의 다른 구성원, 예컨대 C2, C4, C3-전환효소, 및 C5 내지 C9를 포함한다.
- [0194] 본원에서 사용된 바와 같이, "동원 폴리펩타이드"는 Fc γ R, 예컨대 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII, 보체 경로 단백질, 예컨대, 비제한적으로, C1q 및 C3, CD 마커 단백질(Cluster of Differentiation marker) 또는 세포-매개된 효과기 기능을 직접 또는 간접적으로 동원하는 능력을 보유하는 이의 단편을 포함한다. 동원 폴리펩타이드는 또한 효과기 기능을 갖는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE 및 IgA와 같은 면역글로불린 분자를 포함한다.
- [0195] 일 구현예에서 본 개시내용에 따른 다중특이적 항체 분자 내의 항원 결합 도메인(예컨대 V_1 또는 V_2 또는 V_H/V_L)은 보체 경로 단백질에 대해 특이성을 가지며, C1q가 특히 바람직하다.
- [0196] 또한, 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자는 핵종(nuclide) 킬레이터 단백질에 결합하는 단일 도메인 항체에 의해 방사성핵종을 킬레이트화하는데 사용될 수 있다. 그러한 융합 단백질은 요법에 대한 영상화 또는 방사성핵종 표적화 접근법에서 유용하다.
- [0197] 일 구현예에서 본 개시내용에 따른 분자 내의 항원 결합 도메인(예컨대 V_1 또는 V_2 또는 V_H/V_L)은, 예를 들면 혈청 캐리어 단백질, 순환하는 면역글로불린 분자 또는 CD35/CR1에 결합함으로써 관심있는 항원에 대해 특이성을 갖는 항체 단편에게 연관된 반감기를 제공하기 위해, 상기 혈청 캐리어 단백질, 순환하는 면역글로불린 분자, 또는 CD35/CR1에 대해 특이성을 갖는다.
- [0198] 본원에서 사용된 바와 같이, "혈청 캐리어 단백질"은 티록신-결합 단백질, 트랜스티레틴, α 1-산 당단백질, 트랜스페린, 피브리노겐, 및 알부민, 또는 이의 임의의 단편을 포함한다.
- [0199] 본원에서 사용된 바와 같이, "순환하는 면역글로불린 분자"는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, sIgA, IgM 및 IgD, 또는 이의 임의의 단편을 포함한다.
- [0200] CD35/CR1은 36일의 반감기(28일 내지 47일의 정상 범위; Lanaro *et al.*, 1971, Cancer, 28(3):658-661)를 갖는 백혈구 세포 상에 존재하는 단백질이다.
- [0201] 일 구현예에서, V_H/V_L 이 특이성을 갖는 관심있는 항원은 혈청 캐리어 단백질, 예컨대 인간 혈청 캐리어, 예컨대

인간 혈청 알부민이다.

- [0202] 일 구현예에서, V_1 이 특이성을 갖는 관심있는 항원은 혈청 캐리어 단백질, 예컨대 인간 혈청 캐리어, 예컨대 인간 혈청 알부민이다.
- [0203] 일 구현예에서, V_2 이 특이성을 갖는 관심있는 항원은 혈청 캐리어 단백질, 예컨대 인간 혈청 캐리어, 예컨대 인간 혈청 알부민이다.
- [0204] 일 구현예에서 V_H/V_L , V_1 또는 V_2 중 하나만이 혈청 캐리어 단백질, 예컨대 인간 혈청 캐리어, 예컨대 인간 혈청 알부민에 대해 특이성을 갖는다.
- [0205] 일 구현예에서 본 개시내용의 작제물 내의 결합 부위는 6개의 CDR, 예를 들면 CDRH1의 경우 서열번호: 71, CDRH2의 경우 서열번호: 72, CDRH3의 경우 서열번호: 73, CDRL1의 경우 서열번호: 74, CDRL2의 경우 서열번호: 75 및 CDRL3의 경우 서열번호: 76을 포함한다.
- [0206] 일 구현예에서 상기 6개의 CDR 서열번호: 71 내지 76은 본 개시내용의 작제물에서 위치 V_H/V_L 내에 있다. 일 구현예에서 상기 6개의 CDR 서열번호: 71 내지 76은 본 개시내용의 작제물에서 위치 V_1 내에 있다. 일 구현예에서 상기 6개의 CDR 서열번호: 71 내지 76은 본 개시내용의 작제물에서 위치 V_2 내에 있다. 일 구현예에서 상기 6개의 CDR 서열번호: 71 내지 76은 본 개시내용의 작제물에서 위치 V_1 및 V_2 내에 있다. 일 구현예에서 상기 6개의 CDR 서열번호: 71 내지 76은 본 개시내용의 작제물에서 위치 V_H/V_L 및 V_1 내에 있다. 일 구현예에서 상기 6개의 CDR 서열번호: 71 내지 76은 본 개시내용의 작제물에서 위치 V_H/V_L 및 V_2 내에 있다.
- [0207] 일 구현예에서 본 개시내용의 작제물 내의 알부민 결합 부위는 서열번호: 77 및 서열번호: 78로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호: 79 및 서열번호: 80으로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인, 특히 중쇄 및 경쇄의 경우 각각 서열번호: 77 및 79 또는 서열번호: 78 및 80을 포함한다. 일 구현예에서 이들 도메인은 본 개시내용의 작제물에서 위치 V_H/V_L 내에 있다. 일 구현예에서 이들 가변 도메인은 위치 V_1 내에 있다. 일 구현예에서 이들 가변 도메인은 위치 V_2 내에 있다. 일 구현예에서 이들 가변 도메인은 위치 V_1 및 V_2 내에 있다. 일 구현예에서 이들 가변 도메인은 본 개시내용의 작제물에서 위치 V_H/V_L 및 V_1 내에 있다. 일 구현예에서 이들 가변 도메인은 본 개시내용의 작제물에서 위치 V_H/V_L 및 V_2 내에 있다. 상기 가변 도메인이 본 개시내용의 작제물에서 두 위치 내에 있는 경우, 상기 가변 도메인의 동일한 쌍이 각각의 위치 내에 있을 수 있거나 또는 가변 도메인의 2개의 상이한 쌍이 이용될 수 있다.
- [0208] 일 구현예에서 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자는 표적 항원 또는 항원들에 대해 개선된 친화성을 제공하도록 가공된다. 그러한 변이체는 CDR을 돌연변이시키는 것을 포함하는 많은 친화성 성숙 프로토콜(Yang *et al* J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), 사슬 서플링(Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), E. coli의 돌연변이유발자 균주의 사용(Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), DNA 서플링(Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), 파아지 디스플레이(Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) 및 성적 PCR(Cramer *et al* Nature, 391, 288-291, 1998)에 의해 수득될 수 있다. Vaughan 등(상기)은 이러한 친화성 성숙의 방법을 논의한다.
- [0209] 이 맥락에서 본원에 사용된 바와 같이 개선된 친화성은 출발 분자 대비 개선을 지칭한다.
- [0210] 원하는 경우, 본 개시내용에서 사용하기 위한 다중특이적 항체 작제물은 하나 이상의 효과기 분자(들)에 접합될 수 있다. 효과기 분자가 단일 효과기 분자 또는 본 발명의 항체에 부착될 수 있는 단일 모이어티를 형성하기 위해 연결된 둘 이상의 상기 분자를 포함할 수 있음이 인식될 것이다. 효과기 분자에 연결된 항체 단편을 수득하고자 하는 경우, 이것은 항체 단편이 효과기 분자에 직접 또는 커플링제를 통해 연결되는 표준 화학 또는 재조합 DNA 과정에 의해 제조될 수 있다. 그러한 효과기 분자를 항체에 접합하는 기술은 본 기술분야에 널리 공지되어 있다(Hellstrom *et al* Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson *et al* eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe *et al* 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 및 Dubowchik *et al* 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123 참고). 특정 화학적 과정은, 예를 들면, 제W093/06231호, 제W092/22583호, 제W089/00195호, 제W089/01476호 및 제W003031581호에 기재된 것을 포함한다. 대안적으로, 효과기 분자가 단백질 또는 폴리펩타이드인 경우, 상기 연결은, 예를 들면 제W086/01533호 및 제EP0392745호에 기재된 바와 같은 재조합 DNA 과정을

이용하여 달성될 수 있다.

- [0211] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "효과기 분자"는, 예를 들면, 생물학적 활성 단백질, 예를 들면 효소, 다른 항체 또는 항체 단편, 합성 또는 자연적으로 발생하는 폴리머, 핵산 및 이의 단편, 예컨대 DNA, RNA 및 이의 단편, 방사성핵종, 특히 방사성요오드, 방사성동위원소, 킬레이트화된 금속, 나노입자 및 리포터 그룹, 예컨대 형광성 화합물 또는 NMR 또는 ESR 분광학에 의해 검출될 수 있는 화합물을 포함한다.
- [0212] 다른 효과기 분자는 킬레이트화된 방사성핵종, 예컨대 ^{111}In 및 ^{90}Y , Lu^{177} , 비스무스 213 , 칼리포늄 252 , 이리듐 192 및 텅스텐 188 /레늄 188 ; 또는 약물, 예컨대 비제한적으로, 알킬포스포콜린, 토포이소머라아제 I 억제제, 탁소이드 및 수라민(suramin)을 포함할 수 있다.
- [0213] 다른 효과기 분자는 단백질, 펩타이드 및 효소를 포함한다. 관심있는 효소는, 비제한적으로, 단백질분해 효소, 가수분해효소, 리아제, 이소머라아제, 트랜스퍼라아제를 포함한다. 관심있는 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드는, 비제한적으로, 면역글로불린, 독소, 예컨대 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소, 단백질, 예컨대 인슐린, α -인터페론, β -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 또는 조직 플라스미노겐 활성화자, 혈전제 또는 항-혈관신생제, 예컨대 안지오테스틴 또는 엔도스테틴, 또는, 생물학적 반응 변형제, 예컨대 림포카인, 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-2(IL-2), 과립 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF), 과립 집락 자극 인자(G-CSF), 신경 성장 인자(NGF) 또는 다른 성장 인자 및 면역글로불린을 포함한다.
- [0214] 다른 효과기 분자는, 예를 들면 진단에서 유용한 검출가능한 물질을 포함할 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보결 그룹, 형광성 물질, 발광성 물질, 생물발광성 물질, 방사성 핵종, 양전자 방출 금속(양전자 방출 단층촬영에서 사용하기 위함), 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 진단법으로서 사용하기 위해 항체에 접합될 수 있는 금속 이온의 경우 일반적으로 제US4,741,900호를 참고한다. 적합한 효소는 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제, 또는 아세틸콜린에스테라아제를 포함하고; 적합한 보결 그룹은 스트렙타비딘, 아비딘 및 바이오틴을 포함하며; 적합한 형광성 물질은 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 및 피코에리트린을 포함하고; 적합한 발광성 물질은 루미놀을 포함하며; 적합한 생물발광성 물질은 루시페라아제, 루시페린, 및 애쿠오린을 포함하고; 적합한 방사성 핵종은 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , 및 ^{99}Tc 를 포함한다.
- [0215] 또 다른 구현예에서 효과기 분자는 생체내에서 항체의 반감기를 증가시킬 수 있고/거나 항체의 면역원성을 감소시킬 수 있고/거나 상피 장막을 가로질러 면역계로의 항체의 전달을 향상시킬 수 있다. 이러한 유형의 적합한 효과기 분자의 예는 폴리머, 알부민, 알부민 결합 단백질 또는 알부민 결합 화합물, 예컨대 제W005/117984호에 기재된 것을 포함한다.
- [0216] 효과기 분자가 폴리머인 경우, 그것은, 일반적으로, 합성 또는 자연적으로 발생하는 폴리머, 예를 들면 임의로 치환된 직쇄형 또는 분지형 사슬 폴리알킬렌, 폴리알케닐렌 또는 폴리옥시알킬렌 폴리머 또는 분지형 또는 비분지형 다당류, 예컨대 호모- 또는 헤테로- 다당류일 수 있다.
- [0217] 상기 언급된 합성 폴리머 상에 존재할 수 있는 특정한 선택적 치환체는 하나 이상의 하이드록시, 메틸 또는 메톡시기를 포함한다.
- [0218] 합성 폴리머의 특정한 예는 임의로 치환된 직쇄형 또는 분지형 사슬 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(프로필렌글리콜) 폴리(비닐알콜) 또는 이의 유도체, 특히 선택적으로 치환된 폴리(에틸렌글리콜), 예컨대 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 이의 유도체를 포함한다.
- [0219] 특정한 자연적으로 발생하는 폴리머는 락토스, 아밀로스, 텍스트란, 글리코겐 또는 이의 유도체를 포함한다.
- [0220] 본원에서 사용된 바와 같이 "유도체"는 반응성 유도체, 예를 들면 티올-선택적 반응성 그룹, 예컨대 말레이미드 등을 포함하고자 하는 것이다. 반응성 그룹은 직접 또는 링커 부분을 통해 폴리머에 연결될 수 있다. 상기 그룹의 잔기는 일부 경우 항체 단편과 폴리머 사이에 연결 그룹으로서 생성물의 일부를 형성할 것임이 인식될 것이다.
- [0221] 폴리머의 크기는 원하는 대로 달라질 수 있지만, 일반적으로 500Da 내지 50,000Da, 예를 들면 5,000Da 내지 40,000Da, 예컨대 20,000Da 내지 40,000Da의 평균 분자량 범위일 것이다. 폴리머 크기는 특히 생성물의 의도된 용도, 예를 들면 종양과 같은 어떤 조직에 국소화하거나 순환하는 반감기를 연장하는 능력에 기초하여 선택될 수 있다(검토를 위해 Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545 참고). 따라서, 예를 들면, 종양의 치료에 사용하기 위해, 예를 들면 생성물이 순환을 떠나 조직을 투과하고자 하는 경우, 예를 들면

약 5,000Da의 분자량을 갖는 작은 분자량 폴리머를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 생성물이 순환에 남아있는 적용을 위해, 예를 들면 20,000Da 내지 40,000Da 범위의 분자량을 갖는 더 높은 분자량 폴리머를 사용하는 것이 유리할 수 있다.

[0222] 적합한 폴리머는 폴리알킬렌 폴리머, 예컨대 폴리(에틸렌글리콜) 또는, 특히, 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 이의 유도체, 및 특히 약 15,000Da 내지 약 40,000Da 범위의 분자량을 갖는 것을 포함한다.

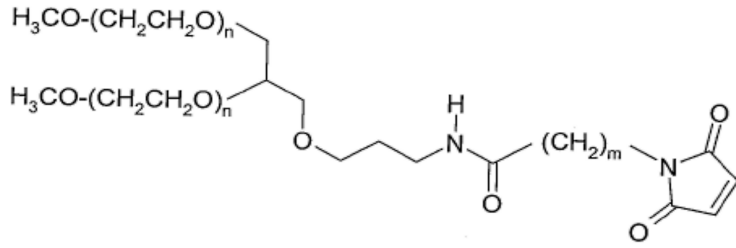
[0223] 일 구현예에서 본 개시내용에서 사용하기 위한 항체는 폴리(에틸에틸렌글리콜)(PEG) 모이어티에 부착된다. 한 가지 특정 예에서 항체는 항체 단편이고 PEG 분자는 항체 단편에 위치한 임의의 이용가능한 아미노산 측쇄 또는 말단 아미노산 기능적 그룹, 예를 들면 임의의 자유 아미노, 이미노, 티올, 하이드록실 또는 카복실 그룹을 통해 부착될 수 있다. 그러한 아미노산은 항체 단편에 자연적으로 존재할 수 있거나 또는 재조합 DNA 방법을 이용하여 단편 내로 조작될 수 있다(예를 들면 US5,219,996; US 5,667,425; W098/25971, W02008/038024 참고). 일 구현예에서 본 발명의 항체 분자는 변형된 Fab 단편이며, 여기서 상기 변형은 그의 중쇄의 C-말단에 효과기 분자의 부착을 허용하는 하나 이상의 아미노산을 부가하는 것이다. 적합하게는, 상기 부가적인 아미노산은 효과기 분자가 부착될 수 있는 하나 이상의 시스테인 잔기를 함유하는 변형된 힌지 영역을 형성한다. 다수의 부위가 둘 이상의 PEG 분자를 부착하기 위해 사용될 수 있다.

[0224] 적합하게는 PEG 분자는 항체 단편에 위치한 적어도 하나의 시스테인 잔기의 티올 그룹을 통해 공유 연결된다. 변형된 항체 단편에 부착된 각각의 폴리머 분자는 상기 단편에 위치한 시스테인 잔기의 황 원자에 공유 연결될 수 있다. 상기 공유 연결은 일반적으로 디설파이드 결합 또는, 특히, 황-탄소 결합일 것이다. 티올 그룹이 부착점으로서 사용되는 경우, 적절하게 활성화된 효과기 분자, 예를 들면 말레이미드 및 시스테인 유도체와 같은 티올 선택적 유도체가 사용될 수 있다. 활성화된 폴리머는 상기 기재된 바와 같은 폴리머-변형된 항체 단편의 제조에서 출발 물질로서 사용될 수 있다. 상기 활성화된 폴리머는 티올 반응성 그룹을 함유하는 임의의 폴리머, 예컨대 α -할로카복실산 또는 에스테르, 예컨대 아이오도아세트아마이드, 이미드, 예컨대 말레이미드, 비닐 설폰 또는 디설파이드일 수 있다. 그러한 출발 물질은 상업적으로 수득될 수 있거나(예를 들면 Nektar, 이전에 Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA로부터) 또는 종래의 화학 과정을 이용하여 상업적으로 이용가능한 출발 물질로부터 제조될 수 있다. 특정한 PEG 분자는 20K 메톡시-PEG-아민(Nektar, 이전에 Shearwater; Rapp Polymere; 및 SunBio로부터 수득가능함) 및 M-PEG-SPA(Nektar, 이전에 Shearwater로부터 수득가능함)를 포함한다.

[0225] 일 구현예에서, 분자 내의 F(ab')₂, Fab 또는 Fab'는 폐길화되며, 즉, 예컨대 제EP0948544호 또는 제EP1090037호에 개시된 방법에 따라, 이에 공유 부착된 PEG(폴리(에틸렌글리콜))를 갖는다 [또한 "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545 참고]. 일 구현예에서 PEG는 힌지 영역 내의 시스테인에 부착된다. 일 예에서, PEG 변형된 Fab 단편은 변형된 힌지 영역 내의 단일 티올 그룹에 공유 연결된 말레이미드 그룹을 갖는다. 리신 잔기는 말레이미드 그룹에 공유 연결될 수 있고 약 20,000Da의 분자량을 갖는 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 폴리머는 리신 잔기 상의 아민 그룹 각각에 부착될 수 있다. 그러므로, Fab 단편에 부착된 PEG의 총 분자량은 약 40,000Da일 수 있다.

[0226] 특정한 PEG 분자는 PEG2MAL40K(Nektar, 이전에 Shearwater로부터 수득가능함)로도 알려진, N,N'-비스(메톡시폴리(에틸렌 글리콜) MW 20,000) 변형된 리신의 2-[3-(N-말레이미도)프로피온아미도]에틸 아마이드를 포함한다.

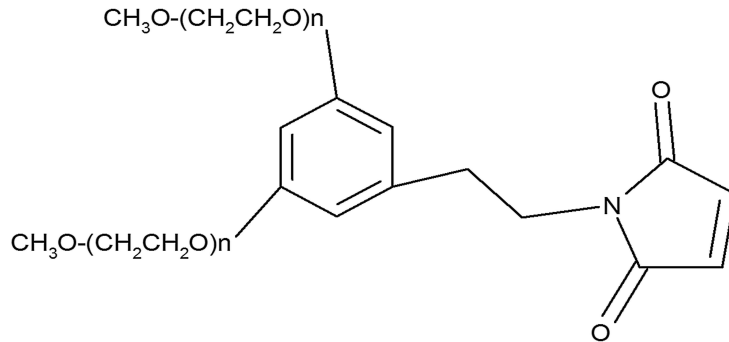
[0227] PEG 링커의 대안적인 공급원은 GL2-400MA2(하기 구조에서 m은 5임) 및 GL2-400MA(m은 2임)를 공급하는 NOF를 포함하며, n은 약 450이다:



m은 2 또는 5이다

즉, 각각의 PEG는 약 20,000Da이다.

하기 유형의 추가의 대안적인 PEG 효과기 분자는 Dr Reddy, NOF 및 Jenkem으로부터 이용가능하다:

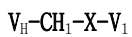


일 구현예에서 사슬 내의 아미노산 226, 예를 들어 중쇄의 아미노산 226(순차적 넘버링)에 또는 그 근처에 있는 시스테인 아미노산 잔기를 통해 부착된, 페길화된(예를 들면 본원에 기술된 PEG를 갖는) 항체 분자가 제공된다.

일 구현예에서 본 개시내용의 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 예컨대 DNA 서열이 제공된다.

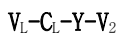
일 구현예에서 본 개시내용의 분자의 하나 이상, 예컨대 2 이상, 또는 3 이상의 폴리펩타이드 성분, 예컨대 하기 a) 및 b)를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 제공된다:

a) 하기 화학식 (I):



의 폴리펩타이드 사슬; 및

b) 하기 화학식 (II):



의 폴리펩타이드 사슬;

상기 화학식에서,

V_H 는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;

CH_1 은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들면 중쇄 불변 영역의 도메인 1을 나타내며;

X 는 결합 또는 링커를 나타내고;

Y 는 결합 또는 링커를 나타내며;

V_L 은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;

V_L 은 경쇄 가변 도메인을 나타내며;

C_L 은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;

- [0249] V_2 는 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내며;
- [0250] 여기서 V_1 또는 V_2 중 하나 이상은 dsFv 또는 dsscFv이다.
- [0251] 일 구현예에서 DNA와 같은 폴리뉴클레오타이드가 벡터에 포함된다.
- [0252] 숙련가는 V_1 및/또는 V_2 가 dsFv에 해당하는 경우, 다중특이적 항체가 X 또는 Y에 부착되지 않은 상응하는 자유 V_H 또는 V_L 도메인을 인코딩하는 제3 폴리펩타이드를 포함할 것임을 인식할 것이다. 따라서 본 발명의 다중특이적 단백질은 1 이상, 2 이상의 또는 3 이상의 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩될 수 있고 이들은 하나 이상의 벡터 내로 혼입될 수 있다.
- [0253] 벡터가 구축될 수 있는 일반적인 방법, 형질감염 방법 및 배양 방법은 본 기술분야의 숙련가에게 널리 알려져 있다. 이 점에 있어서, "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York 및 Cold Spring Harbor Publishing에 의해 생산된 Maniatis Manual이 참고된다.
- [0254] 본 발명의 다중특이적 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 DNA 서열을 포함하는 하나 이상의 클로닝 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다. 임의의 적합한 숙주 세포/벡터 시스템은 본 발명의 항체 분자를 인코딩하는 DNA 서열의 발현을 위해 사용될 수 있다. 박테리아, 예를 들면 *E. coli*, 및 다른 미생물 시스템이 사용될 수 있거나 또는 진핵, 예를 들면 포유동물, 숙주 세포 발현 시스템이 또한 사용될 수 있다. 적합한 포유동물 숙주 세포는 CHO, 골수종, NSO 골수종 세포 및 SP2 세포, COS 세포 또는 하이브리도마 세포를 포함한다.
- [0255] 본 개시내용은 또한 본 발명의 다중특이적 단백질을 인코딩하는 DNA로부터 단백질의 발현을 야기하는데 적합한 조건하에 본 발명의 벡터를 함유하는 숙주세포를 배양하는 것, 및 상기 다중특이적 단백질을 단리시키는 것을 포함하는, 본 개시내용에 따른 다중특이적 단백질의 생산을 위한 공정을 제공한다.
- [0256] 중쇄 및 경쇄 모두를 포함하는 생성물의 생산을 위해, 세포주는 경쇄 폴리펩타이드를 인코딩하는 제1 벡터 및 중쇄 폴리펩타이드를 인코딩하는 제2 벡터인 2개의 벡터로 형질감염될 수 있다. 대안적으로, 경쇄 및 중쇄 폴리펩타이드를 인코딩하는 서열을 포함하는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 일 예에서 세포주는 본 발명의 항체 분자의 폴리펩타이드 사슬을 각각 인코딩하는 2개의 벡터로 형질감염될 수 있다. V_1 및/또는 V_2 가 dsFv인 경우, 세포주는 본 발명의 다중특이적 단백질의 폴리펩타이드 사슬을 각각 인코딩하는 3개의 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0257] 일 구현예에서 세포주는 각각 하기 a) 및 b)로부터 선택되는 상이한 폴리펩타이드를 인코딩하는 2개의 벡터로 형질감염된다:
- [0258] a) 하기 화학식 (I):
- [0259] $V_H-CH_1-X-V_1$
- [0260] 의 폴리펩타이드 사슬;
- [0261] b) 하기 화학식 (II):
- [0262] $V_L-C_L-Y-V_2$
- [0263] 의 폴리펩타이드 사슬;
- [0264] 상기 화학식에서,
- [0265] V_H 는 중쇄 가변 도메인을 나타내고;
- [0266] CH_1 은 중쇄 불변 영역의 도메인, 예를 들면 중쇄 불변 영역의 도메인 1을 나타내며;
- [0267] X는 결합 또는 링커를 나타내고;
- [0268] Y는 결합 또는 링커를 나타내며;
- [0269] V_1 은 dsFv, sdAb, scFv 또는 dsscFv를 나타내고;
- [0270] V_L 은 경쇄 가변 도메인을 나타내며;

- [0271] C_L 은 경쇄 불변 영역으로부터의 도메인, 예컨대 C카파를 나타내고;
- [0272] V_2 는 dsFv, sdAb, scFV 또는 dsscFv를 나타내며;
- [0273] 여기서 V_1 또는 V_2 중 하나 이상은 dsFv 또는 dsscFv이다.
- [0274] 일 구현예에서 V_1 이 dsFv이고 V_1 의 V_H 도메인이 X에 부착되는 경우, 세포주는 V_1 의 V_L 도메인을 인코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0275] 일 구현예에서 V_1 이 dsFv이고 V_1 의 V_L 도메인이 X에 부착되는 경우, 세포주는 V_1 의 V_H 도메인을 인코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0276] 일 구현예에서 V_2 가 dsFv이고 V_2 의 V_H 도메인이 Y에 부착되는 경우, 세포주는 V_2 의 V_L 도메인을 인코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0277] 일 구현예에서 V_2 가 dsFv이고 V_2 의 V_L 도메인이 Y에 부착되는 경우, 세포주는 V_2 의 V_H 도메인을 인코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0278] 일 구현예에서 V_1 및 V_2 모두가 dsFv이고 V_2 의 V_L 도메인이 Y에 부착되고 V_1 의 V_L 도메인이 X에 부착되는 경우, 세포주는 V_1 및 V_2 모두의 공통 V_H 도메인을 인코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0279] 일 구현예에서 V_1 및 V_2 모두가 dsFv이고 V_2 의 V_H 도메인이 Y에 부착되고 V_1 의 V_H 도메인이 X에 부착되는 경우, 세포주는 V_1 및 V_2 모두의 공통 V_L 도메인을 인코딩하는 제3 벡터로 형질감염될 수 있다.
- [0280] 다중특이적 항체 생성물의 발현을 최적화하기 위해 숙주 세포 내로 형질감염된 각각의 벡터의 비율은 달라질 수 있음이 인식될 것이다. 일 구현예에서 2개의 벡터가 사용되는 경우, 벡터의 비율은 1:1일 수 있다. 일 구현예에서 3개의 벡터가 사용되는 경우, 벡터의 비율은 1:1:1일 수 있다. 숙련가가 형질감염 후 단백질 발현 수준의 일 상적인 시험에 의해 최적 비율을 찾아낼 수 있음이 인식될 것이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 각각의 벡터로부터 다중특이적 작제물의 각각의 폴리펩타이드 사슬의 발현 수준은 동일하거나 상이한 프로모터를 사용하여 제어될 수 있다.
- [0281] 2개 이상 또는 존재하는 경우 3개의 폴리펩타이드 성분은 단일 벡터에서 하나의 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩될 수 있는 것으로 인식될 것이다. 또한, 2개 이상, 특히 3개 이상의 폴리펩타이드 성분이 단일 벡터에서 하나의 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩되는 경우, 각각의 폴리펩타이드 성분의 상대적 발현은 본 개시내용의 폴리펩타이드 성분을 인코딩하는 각각의 폴리뉴클레오타이드를 위한 상이한 프로모터를 이용함으로써 달라질 수 있는 것으로 인식될 것이다.
- [0282] 일 구현예에서 벡터는 단일 프로모터의 제어 하에 본 발명의 다중특이적 항체 분자의 2개 또는 존재하는 경우 3개의 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 단일 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0283] 일 구현예에서 벡터는 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자의 2개 또는 존재하는 경우 3개의 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 단일 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서 각각의 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 각각의 폴리뉴클레오타이드 서열은 상이한 프로모터의 제어하에 있다.
- [0284] 본 개시내용에 따른 다중특이적 단백질은 숙주 세포로부터 우수한 수준으로 발현된다. 따라서 항체 및/또는 단편의 특성은 최적화되고 상업적 처리에 도움이 되는 것으로 보인다.
- [0285] 유리하게도, 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자는 정제 후 관찰되는 응집의 양을 최소화하고 약제학적 농도에서 작제물의 제형 내의 단량체의 양을 최대화하며, 예를 들면 단량체는 총 단백질의 50%, 60%, 70% 또는 75% 이상, 예컨대 80 또는 90% 이상, 예컨대 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상으로 존재할 수 있다. 일 예에서, 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자의 정제된 샘플은 4℃에서 28일 보관 후 98% 또는 99%를 초과하는 단량체성을 유지한다. 일 예에서, 인산 완충 염수(PBS)에서 5mg/ml의 본 개시내용의 다중특이적 항체 분자의 정제된 샘플은 4℃에서 28일 보관 후 98%를 초과하는 단량체성을 유지한다.
- [0286] 본 개시내용의 항체 분자 및 이를 포함하는 조성물은 치료에서, 예를 들면 병적 상태의 치료 및/또는 예방에서 유용하다.

- [0287] 본 개시내용은 또한 약제학적으로 허용가능한 부형제, 희석제 또는 캐리어 중 하나 이상과 조합된 본 개시내용의 항체 분자를 포함하는 약제학적 또는 진단용 조성물을 제공한다. 따라서, 치료에 사용하기 위한 그리고 특히 본원에 개시된 징후를 위한 약제의 제조를 위한 본 개시내용의 항체의 용도가 제공된다.
- [0288] 상기 조성물은 일반적으로 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함할 멸균된 약제학적 조성물의 부분으로서 공급될 것이다. 본 개시내용의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 보조제를 부가적으로 포함할 수 있다.
- [0289] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 항체 분자를 약제학적으로 허용가능한 부형제, 희석제 또는 캐리어 중 하나 이상과 함께 부가하고 혼합하는 것을 포함하는 약제학적 또는 진단용 조성물을 제조하기 위한 공정을 제공한다.
- [0290] 항체 분자는 약제학적 또는 진단용 조성물에서 유일한 활성 성분일 수 있거나 또는 다른 항체 성분, 예를 들면 항-IL-1 β , 항-T 세포, 항-IFN γ 또는 항-LPS 항체, 또는 비항체 성분, 예컨대 잔틴을 포함하는 다른 활성 성분을 동반할 수 있다. 다른 적합한 활성 성분은 관용(tolerance)을 유도할 수 있는 항체, 예를 들면, 항-CD3 또는 항-CD4 항체를 포함한다.
- [0291] 추가 구현예에서 본 개시내용에 따른 항체, 단편 또는 조성물은 추가의 약제학적 활성 제제와 조합하여 이용된다.
- [0292] 약제학적 조성물은 적합하게는 본 발명의 항체 분자의 치료적 유효량을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "치료적 유효량"은 표적화된 질병 또는 병태를 치료하거나, 개선하거나 또는 예방하는데 필요하거나, 또는 검출가능한 치료 또는 예방효과를 나타내는데 필요한 치료제의 양을 지칭한다. 어느 항체의 경우, 치료적 유효량은 세포 배양 분석에서 또는 동물 모델에서, 일반적으로 설치류, 토끼, 개, 돼지 또는 영장류에서 처음에 초기에 추정될 수 있다. 동물 모델은 또한 적절한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하는데 사용될 수 있다. 이후 상기 정보는 인간에서 투여하기 위한 유용한 용량 및 경로를 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0293] 인간 대상을 위한 정확한 치료적 유효량은 질병 상태의 중증도, 대상의 일반적 건강, 대상의 연령, 체중 및 성별, 식이, 투여 시간 및 빈도, 약물 조합(들), 반응 민감도 및 요법에 대한 관용/반응에 좌우될 것이다. 이 양은 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있고, 이는 임상의의 판단에 속한다. 일반적으로, 치료적 유효량은 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg, 예를 들면 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg일 것이다. 대안적으로, 용량은 1일당 1mg 내지 500mg, 예컨대 1일당 10mg 내지 100mg, 200mg, 300mg 또는 400mg일 수 있다. 약제학적 조성물은 본 발명의 활성 성분의 미리 결정된 양을 함유하는 단위 용량 형태로 편리하게 제공될 수 있다.
- [0294] 조성물은 환자에게 개별적으로 투여될 수 있거나 또는 다른 제제, 약물 또는 호르몬과 조합하여(예컨대 동시에, 연속적으로 또는 별도로) 투여될 수 있다.
- [0295] 본 개시내용의 항체 분자가 투여되는 용량은 치료될 병태의 특성, 존재하는 염증의 정도 및 항체 분자가 예방적으로 사용되고 있는지 또는 기존 병태를 치료하기 위해 사용되고 있는지 여부에 좌우된다.
- [0296] 용량의 빈도는 항체 분자의 반감기 및 그의 효과의 지속시간에 좌우될 것이다. 만약 항체 분자가 짧은 반감기(예컨대 2시간 내지 10시간)를 가지면, 1일당 하나 이상의 용량을 제공하는 것이 필요할 수 있다. 대안적으로, 만약 항체 분자가 긴 반감기(예컨대 2일 내지 15일)를 가지면, 단지 1일당 1회, 1주당 1회 또는 심지어 1 또는 2개월마다 1회 투여량을 제공하는 것이 필요할 수 있다.
- [0297] 약제학적으로 허용가능한 캐리어는 그 자체가 조성물을 받는 개체에게 해로운 항체의 생산을 유도하지 않아야 하며 독성이 없어야 한다. 적합한 캐리어는 크고, 느리게 대사되는 거대분자, 예컨대 단백질, 폴리펩타이드, 리포좀, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리머성 아미노산, 아미노산 코폴리머, 및 불활성 바이러스 입자일 수 있다.
- [0298] 약제학적으로 허용가능한 염, 예를 들면 미네랄 산 염, 예컨대 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트 및 설페이트, 또는 유기산의 염, 예컨대 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트가 사용될 수 있다.
- [0299] 치료용 조성물 내의 약제학적으로 허용가능한 캐리어는 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체를 추가적으로 함유할 수 있다. 부가적으로, 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충 물질이 상기 조성물 내에 존재할 수 있다. 그러한 캐리어는 환자에게 섭취를 위해, 약제학적 조성물을 정제, 환제, 드라제(dragee), 캡슐, 액체, 겔, 시럽, 슬러리 및 현탁액으로서 제형화하는 것을 가능하게 한다.
- [0300] 투여를 위한 적합한 형태는, 예컨대 주사 또는 주입에 의한, 예를 들면 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한, 경

구 투여에 적합한 형태를 포함한다. 제품이 주사용 또는 주입용인 경우, 그것은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 유화액의 형태를 취할 수 있고 그것은 현탁제, 보존제, 안정제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 항체 분자는 적절한 멸균 액체와 함께 사용하기 전 재구성을 위해, 건조 형태일 수 있다.

- [0301] 제형화되면, 본 발명의 조성물은 대상에게 직접 투여될 수 있다. 치료될 대상은 동물일 수 있다. 그러나, 하나 이상의 구현예에서 조성물은 인간 대상에게 투여하기 위해 조정된다.
- [0302] 일 구현예에서, 본 개시내용에 따른 제형에서, 최종 제형의 pH는 항체 또는 단편의 등전점의 값과 유사하지 않으며, 왜냐하면 만약 제형의 pH가 7이면 8-9 또는 그를 초과하는 pI가 적절할 수 있기 때문이다. 이론에 구속되지 않을지 모르지만, 이것은 궁극적으로 개선된 안정성을 갖는 최종 제형을 최종적으로 제공할 수 있는 것으로, 예를 들면 항체 또는 단편이 용해된 상태를 유지하는 것으로 여겨진다.
- [0303] 본 개시내용의 약제학적 조성물은, 비제한적으로, 경구, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수내, 척추강내, 심실내, 경피(예를 들면, 제W098/20734호 참고), 피하, 복강내, 비강내, 장내, 국소, 설하, 질내 또는 직장 경로를 포함하는 많은 경로에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하기 위해 하이포스프레이(Hypospray)가 또한 사용될 수 있다. 전형적으로, 치료 조성물은 주사제로서, 액체 용액 또는 현탁액 중 하나로서 제조될 수 있다. 주사 전에 액체 비히클 중의 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 항체 분자는 피하로, 흡입에 의해 또는 국소로 투여된다.
- [0304] 조성물의 직접 전달은 일반적으로 주사, 피하내로, 복강내로, 정맥내로 또는 근육내로 달성될 것이며, 또는 조직의 간극 공간(interstitial space)에 전달될 것이다. 조성물은 또한 관심있는 특정 조직 내로 투여될 수 있다. 투여 치료는 단일 용량 스케줄 또는 다중 용량 스케줄일 수 있다.
- [0305] 조성물 내의 활성 성분은 항체 분자일 것으로 인식될 것이다. 그와 같이, 그것은 위장관에서의 분해에 민감할 것이다. 따라서, 만약 조성물이 위장관을 이용한 경로에 의해 투여되는 경우, 항체가 분해되는 것을 막으나 일단 그것이 위장관으로부터 흡수되면 항체를 방출할 제제를 상기 조성물이 함유할 필요가 있을 것이다.
- [0306] 약제학적으로 허용가능한 캐리어의 철저한 논의는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Company, N.J. 1991)]에서 이용가능하다.
- [0307] 일 구현예에서 제형은 흡입을 포함하는 국소 투여를 위한 제형으로서 제공된다.
- [0308] 적합한 흡입가능한 조제물은 흡입가능한 분말, 추진 기체를 함유하는 정량(metering) 에어로졸 또는 추진 기체가 없는 흡입가능한 용액(예컨대 분무가능한 용액 또는 현탁액)을 포함한다. 활성 성분을 함유하는 본 개시내용에 따른 흡입가능한 분말은 상기 언급된 활성 물질만으로 이루어질 수 있거나 생리학적으로 허용가능한 부형제와 상기 언급된 활성 물질의 혼합물만으로 이루어질 수 있다.
- [0309] 이들 흡입가능한 분말은 단당류(예컨대 글루코스 또는 아라비노스), 이당류(예컨대 락토스, 사카로스, 말토스), 올리고- 및 다당류(예컨대 텍스트란), 폴리알콜(예컨대 솔비톨, 만니톨, 자일리톨), 염(예컨대 염화나트륨, 탄산칼슘) 또는 이들과 서로 간의 혼합물을 포함할 수 있다. 단당류 또는 이당류가 적합하게 사용되며, 락토스 또는 글루코스의 사용, 특히 비배타적으로 이들의 수화물의 형태가 사용된다.
- [0310] 폐에서의 침착을 위한 입자는 10 마이크로미터 미만, 예컨대 1-9 마이크로미터, 예를 들면 0.1 μm 내지 5 μm , 특히 1 μm 내지 5 μm 의 입자 크기를 필요로 한다. 활성제(예컨대 항체 또는 항체 단편)의 입자 크기가 매우 중요하다.
- [0311] 흡입가능한 에어로졸을 제조하는데 사용될 수 있는 추진 기체는 본 기술분야에서 알려져 있다. 적합한 추진 기체는 탄화수소, 예컨대 n-프로판, n-부탄 또는 이소부탄 및 할로탄화수소, 예컨대 메탄, 에탄, 프로판, 부탄, 사이클로프로판 또는 사이클로부탄의 염소화된 및/또는 불소화된 유도체 중에서 선택된다. 전술한 추진 기체는 그 자체로 또는 이의 혼합물로 사용될 수 있다.
- [0312] 특히 적합한 추진 기체는 TG 11, TG 12, TG 134a, 및 TG227로부터 선택된 할로젠화된 알칸 유도체이다. 전술한 할로젠화된 탄화수소 중에서, TG134a(1,1,1,2-테트라플루오로에탄) 및 TG227(1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오로프로판) 및 이의 혼합물이 특히 적합하다.
- [0313] 추진 기체 함유 흡입가능한 에어로졸은 또한 다른 성분, 예컨대 공용매, 안정화제, 표면-활성제(계면활성제), 향산화제, 윤활제 및 pH를 조절하기 위한 수단을 함유할 수 있다. 이들 모든 성분들은 본 기술분야에서 알려져 있다.

- [0314] 본 발명에 따른 추진 기체 함유 흡입가능한 에어로졸은 최대 5 중량%의 활성 물질을 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 에어로졸은, 예를 들면, 0.002 중량% 내지 5 중량%, 0.01 중량% 내지 3 중량%, 0.015 중량% 내지 2 중량%, 0.1 중량% 내지 2 중량%, 0.5 중량% 내지 2 중량% 또는 0.5 중량% 내지 1 중량%의 활성 물질을 함유한다.
- [0315] 대안적으로 폐로의 국소 투여는, 예를 들면 분무기, 예를 들면, 압축기에 연결된 분무기(예컨대, Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.사에 의해 제작된 Pari Master(R) 압축기에 연결된 Pari LC-Jet Plus(R) 분무기)와 같은 장치를 이용한 액체 용액 또는 현탁액 제형의 투여에 의할 수 있다.
- [0316] 일 구현예에서 제형은 분무에 의한 전달을 위해 단위 용량을 함유하는 별개의 애플로서 제공된다.
- [0317] 일 구현예에서 항체는 재구성을 위한 동결건조된 형태로 또는 대안적으로 현탁액 제형으로서 공급된다.
- [0318] 본 개시내용의 항체는 용매 중에 분산되어, 예컨대, 용액 또는 현탁액의 형태로 전달될 수 있다. 그것은 적절한 생리학적 용액, 예컨대, 생리학적 염수, 약리학적으로 허용가능한 용매 또는 완충 용액에 현탁될 수 있다. 본 기술분야에서 알려진 완충 용액은 약 4.0 내지 5.0의 pH를 달성하기 위하여 물 1 ml 당 0.05 mg 내지 0.15 mg 디소듐 에데테이트, 8.0 mg 내지 9.0 mg NaCl, 0.15 mg 내지 0.25 mg 폴리소르베이트, 0.25 mg 내지 0.30 mg 무수 시트르산, 및 0.45 mg 내지 0.55 mg 시트르산 나트륨을 함유할 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 현탁액은, 예를 들면, 동결건조된 항체로부터 만들어질 수 있다.
- [0319] 치료 현탁액 또는 용액 제형은 또한 하나 이상의 부형제를 함유할 수 있다. 부형제는 본 기술분야에서 널리 알려져 있으며 완충제(예컨대, 시트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 아세테이트 완충제 및 바이카보네이트 완충제), 아미노산, 우레아, 알콜, 아스코브산, 인지질, 단백질(예컨대, 혈청 알부민), EDTA, 염화나트륨, 리포솜, 만니톨, 솔비톨, 및 글리세롤을 포함한다. 용액 또는 현탁액은 리포솜 또는 생분해성 미소구체에 캡슐화될 수 있다. 제형은 일반적으로 멸균 제조 공정을 이용하여 실질적으로 멸균 형태로 제공될 것이다.
- [0320] 이것은 제형을 위해 사용된 완충 용매 용액의 여과에 의한 생산 및 멸균, 멸균 완충 용매 용액 중의 항체의 무균 현탁, 및 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 익숙한 방법에 의해 상기 제형을 멸균 용기 내로 분주하는 것을 포함할 수 있다.
- [0321] 본 개시내용에 따른 분무가능한 제형은, 예를 들면, 호일 봉투에 팩킹된 단일 용량 단위(예컨대, 밀봉된 플라스틱 용기 또는 바이알)로서 제공될 수 있다. 각각의 바이알은 일정 부피, 예컨대 2 ml의 용매/용액 완충액으로 단위 용량을 함유한다.
- [0322] 본 개시내용의 항체는 분무를 통한 전달에 적합한 것으로 여겨진다.
- [0323] 또한, 본 발명의 항체는 유전자 요법을 사용함으로써 투여될 수 있는 것으로 예상된다. 이를 달성하기 위해, 적절한 DNA 성분의 제어 하에 항체 분자의 증쇄 및 경쇄를 인코딩하는 DNA 서열이 환자 내로 도입되어, 상기 DNA 서열로부터 항체 사슬이 원 위치에서 조립된다.
- [0324] 병적 상태 또는 장애는, 예를 들면 감염(바이러스, 박테리아, 진균 및 기생충), 감염과 연관된 내독소 쇼크, 관절염, 예컨대 류마티스성 관절염, 천식, 예컨대 중증 천식, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 골반내 염증 질환, 알츠하이머병, 감염성 장질환, 크론병, 궤양성 대장염, 페이로니병, 복강 질환, 담낭 질환, 모소동(pilonidal disease), 복막염, 건선, 맥관염, 수술 유착, 뇌졸중, I형 당뇨병, 라임병, 수막뇌염, 자가면역 포도막염, 중추 및 말초 신경계의 면역 매개 염증 장애, 예컨대 다발성 경화증, 루프스(예컨대, 전신 홍반성 루프스) 및 길랑-바레 증후군, 아토피성 피부염, 자가면역 간염, 섬유화 폐포염(fibrosing alveolitis), 그레이브병, IgA 신증, 특발성 혈소판감소 자반병, 메니에르병, 천포창, 원발성 담증 간경변, 유육종증, 피부경화증, 베게너 육아종증, 다른 자가면역 장애, 췌장염, 정신적 외상(수술), 이식편대숙주 질병, 이식 거부, 허혈성 질환을 포함하는 심장병, 예컨대 심근 경색 뿐만 아니라 아테롬성 동맥경화증, 혈관내 응고, 골 재흡수, 골다공증, 골관절염, 치주염 및 저산증(hypochlorhydria)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0325] 본 개시내용은 또한 통증, 특히 염증과 연관된 통증의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른 다중특이적 항체 분자를 제공한다.
- [0326] 따라서 치료에 사용하기 위한 본 개시내용에 따른 다중특이적 항체 및 이를 이용한 치료 방법이 제공된다.
- [0327] 일 구현예에서 다중특이적 항체(특히 본 발명에 따른 항체 또는 단편)를 정제하기 위한 공정이 제공된다.
- [0328] 일 구현예에서 불순물이 컬럼에 보유되고 항체가 결합되지 않은 분획에 유지되도록, 비결합 방식으로 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하는, 다중특이적 항체(특히 본 발명에 따른 항체 또는 단편)를 정제

하기 위한 공정이 제공된다. 상기 단계는, 예를 들면 pH 약 6-8에서 수행될 수 있다.

- [0329] 상기 공정은 예를 들면 약 4 내지 5의 pH에서 수행되는, 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하는 초기 포획 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0330] 상기 공정은 생성물 및 공정 관련된 불순물이 생성물 스트림(stream)으로부터 적절히 분해되는 것을 확보하기 위해 부가적인 크로마토그래피 단계(들)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0331] 상기 정제 공정은 또한 하나 이상의 한외여과(ultra-filtration) 단계, 예컨대 농축 및 정용여과(diafiltration) 단계를 포함할 수 있다.
- [0332] 상기에 사용된 바와 같은 정제된 형태는 적어도 90% 순도, 예컨대 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% w/w 이상 순수하다는 것을 지칭하고자 하는 것이다.
- [0333] 내독소가 실질적으로 없다는 것은 일반적으로 mg 항체 생성물 당 1 EU 또는 그 미만, 예컨대 mg 생성물 당 0.5 EU 또는 0.1 EU의 내독소 함량을 지칭하고자 하는 것이다.
- [0334] 숙주 세포 단백질 또는 DNA가 실질적으로 없다는 것은 일반적으로 항체 생성물의 mg 당 숙주 세포 단백질 및/또는 DNA 함량 400 μ g 또는 그 미만, 예컨대 mg 당 100 μ g 또는 그 미만, 적절한 경우, 특히 mg 당 20 μ g을 지칭하고자 하는 것이다.
- [0335] 본 발명의 항체 분자는 또한 진단에서, 예를 들면 질병 상태의 생체내 진단 및 영상화에 사용될 수 있다.
- [0336] 일 구현예에서 하기 a), b) 및 c)를 포함하는, 본 발명에 따른 다중특이적 단백질 작제물을 선택하는 방법이 제공된다:
- [0337] a) 주어진 가변 영역 쌍에 대해 V_1 또는 V_2 중 어느 하나가 dsscFv일 때 단량체성 다중특이적 단백질의 수율을 결정하는 것
- [0338] b) 동일한 가변 영역 쌍에 대해 (a)에서 시험된 V_1 또는 V_2 중 어느 쪽이든 dsFv인 경우, 단량체성 다중특이적 단백질의 수율을 결정하는 것 및
- [0339] c) (a) 및 (b)에서 수득된 단량체의 수율을 비교하고 가장 높은 단량체성 수율을 갖는 다중특이적 단백질을 선택하는 것.
- [0340] 전형적으로 상기 방법의 단계 (a) 및 (b)에서 "가변 영역 쌍"은 V_H 및 V_L 쌍이다. 일반적으로 V_H 및 V_L 은 함께 항원 결합 도메인 V_1 또는 V_2 를 형성한다. 그러므로, 상기 방법은 V_H 및 V_L 쌍이 본 발명의 작제물에서 dsscFv 및 dsFv 모두로서 시험되는 것을 가능하게 하고 단계 (c)에서 가장 단량체성 작제물이 선택된다.
- [0341] 전형적으로 상기 방법의 단계 (a) 및 (b)에서, 수율은 정제 후에, 예컨대 친화성 크로마토그래피 후에 결정된다. 단량체 수율은 임의의 적합한 방법, 예컨대 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 결정될 수 있다.
- [0342] 본 명세서의 맥락에서 "포함하는(comprising)"은 포함하는(including)을 의미하고자 하는 것이다. 기술적으로 적절한 경우, 본 발명의 구현예는 조합될 수 있다. 구현예는 어떤 특징/요소를 포함하는 것으로 본원에서 기재된다. 상기 개시는 상기 특징/요소로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지는 별개의 구현예까지 확장된다.
- [0343] 특허 및 출원과 같은 기술 문헌은 본원에 참고로 통합되어 있다. 본원에 명시적으로 그리고 명백하게 언급된 임의의 구현예는 단독으로 또는 하나 이상의 추가 구현예와 조합되어 권리포기의 기초를 형성할 수 있다.
- [0344] 본 개시내용은 하기 실시예에서 단지 예시로서 더 설명되며, 이는 하기 첨부된 도면을 참조한다.
- [0345] **실시예**
- [0346] 항원 1에 대한 항체 단편은 #1로 표지됨
- [0347] 항원 2에 대한 항체 단편은 #2로 표지됨
- [0348] 항원 3에 대한 항체 단편은 #3으로 표지됨
- [0349] 항원 4에 대한 항체 단편은 #4로 표지됨
- [0350] **실시예 1: Fab-2xdsscFv**

- [0351] **포유동물 세포에서의 발현을 위한 플라스미드의 제작**
- [0352] scFv#3 및 scFv#4를 가요성 링커 SGGGSGGGGS [본원에서 S, 2xG4S로도 지칭됨](서열번호: 2)를 이용하여 #2 경쇄의 Km3 동종이인자형 인간 카파 불변 영역의 C-말단에 융합함으로써, 또는 scFv#3 및 scFv#4를 가요성 링커 SGGGTGGGGS [본원에서 S, G4T, G4S로도 지칭됨](서열번호: 1)를 이용하여 #2 중쇄의 γ 1 동형 인간 감마-1 CH₁ 불변 영역의 C-말단에 융합함으로써 Fab#2-(HC)dsscFv#3,(LC)dsscFv#4 및 Fab#2-(LC)dsscFv#3,(HC)dsscFv#4의 발현을 위한 플라스미드(도 1 참고)를 제작하였다. 또한, vL#3/vL#4 및 vH#3/vH#4 모두의 프레임워크 영역 내의 선택된 잔기에서 상기 DNA 서열 내로 점 돌연변이를 도입하였다. 상기 돌연변이(중쇄 G44C 및 경쇄 G100C)를 도입하여 Fv#3의 중쇄 및 경쇄 사이에 사슬간 디설파이드 결합을 생성하였다. 상기 돌연변이(중쇄 G44C 및 경쇄 Q100C)를 도입하여 Fv#4의 중쇄 및 경쇄 사이에 사슬간 디설파이드 결합을 생성하였다.
- [0353] scFv#4 및 dsscFv#4를 인코딩하는 유전자 단편(vHvL 및 vLvH 방향)을 화학적으로 제작하고 상기 상술한 Fab#2에 융합하여 하기 플라스미드를 생성하였다:
- [0354] **플라스미드 e1:** Light#2-(SGGGSGGGGS [서열번호: 2])-vL#4-(GGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-vH#4;
- [0355] **플라스미드 f1:** Light#2-(SGGGSGGGGS [서열번호: 2])-dsvL#4-(GGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-dsvH#4;
- [0356] **플라스미드 e2:** Light#2-(SGGGSGGGGS [서열번호: 2])-vH#4-(GGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-vL#4;
- [0357] **플라스미드 f2:** Light#2-(SGGGSGGGGS [서열번호: 2])-dsvH#4-(GGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-dsvL#4;
- [0358] **플라스미드 g1** Heavy#2-(SGGGTGGGGS [서열번호: 1])-vL#4-(GGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-vH#4;
- [0359] **플라스미드 h1:** Heavy#2-(SGGGTGGGGS [서열번호: 1])-dsvL#4-(GGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-dsvH#4;
- [0360] **플라스미드 g2:** Heavy#2-(SGGGTGGGGS [서열번호: 1])-vH#4-(GGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-vL#4; 및
- [0361] **플라스미드 h2:** Heavy#2-(SGGGTGGGGS [서열번호: 1])-dsvH#4-(GGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-dsvL#4.
- [0362] pND1 플라스미드(Fab#2 Heavy-(SGGGTGGGGS 서열번호: 1)-dsvH#3-(GGGSGGGSGGGSGGGGS 서열번호: 68)-dsvL#3) **[플라스미드 i]**은 이미 이용가능하였다. dsHLscFv#3을 인코딩하는 유전자 단편을 pND1으로부터 절단하고 상기 상술된 경쇄#2에 융합하여 Light#2-(SGGGSGGGGS 서열번호: 2)-dsvH#3-(GGGSGGGSGGGSGGGGS 서열번호: 68)-dsvL#3 **[플라스미드 j]**을 생성하였다.
- [0363] 모든 Fab 융합 포맷을 HCMV-MIE 프로모터 및 SV40E 폴리A 서열의 제어 하의 포유동물 발현 벡터 내로 클로닝하였다.
- [0364] **Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 HEK293 발현**
- [0365] HEK293 세포를 제조사의 지침에 따라 인비트젠 293fectin 형질감염 시약을 이용하여 관련 플라스미드로 형질감염시켰다. 플라스미드들을 표 4에 나타난 바와 같이 혼합하여 상이한 작제물을 발현시켰다:

표 4

항체 작제물	사용된 플라스미드
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3,(LC)HLscFv#4	1. 플라스미드 e2 2. 플라스미드 i
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3,(LC)dsHLscFv#4	1. 플라스미드 f2 2. 플라스미드 i
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3,(LC)LHscFv#4	1. 플라스미드 e1 2. 플라스미드 i
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3,(LC)dsLHscFv#4	1. 플라스미드 f1 2. 플라스미드 i
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)HLscFv#4	1. 플라스미드 g2 2. 플라스미드 j
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsHLscFv#4	1. 플라스미드 h2 2. 플라스미드 j

Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)LHscFv#4	1. 플라스미드 g1 2. 플라스미드 j
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)dsLHscFv#4	1. 플라스미드 h1 2. 플라스미드 j

[0367] 형질감염을 위해 사용된 플라스미드의 비율은 1:1이었다. 총 50 µg 플라스미드 DNA를 실온에서 20분간 125 µl 293fectin + 4.25ml Optimem 배지와 함께 배양하였다. 그리고 나서, 상기 혼합물을 1×10^6 세포/ml의 현탁액 중의 50ml HEK293 세포에 부가하고 37℃에서 진탕하면서 배양하였다. 10일에 1500g에서 원심분리하여 세포를 제거함으로써 상층액을 수확하였고, 상기 상층액을 0.22 µm 필터에 통과시켰다. 발현 수준을 단백질-G HPLC에 의해 결정하였다.

[0368] 표 5는 단백질-G HPLC 분석의 결과를 보여준다. 볼 수 있는 바와 같이, 모든 작제물들의 발현 수준은 대등하였고, 11-23 µg/ml의 범위였다. 별표(*)로 표시된 것은 별도 형질감염에서 발현되었고, 그러므로 LC-scFv#3, HC-scFv#4의 절대적 발현 수준은 HC-scFv#3, LC-scFv#4와 비교될 수 없다.

표 5

항제 작제물	발현 수준(µg/ml)
Fab#2(HC)dsHLscFv#3, (LC)HLscFv#4	23
Fab#2(HC)dsHLscFv#3, (LC)dsHLscFv#4	18
Fab#2(HC)dsHLscFv#3, (LC)LHscFv#4	21
Fab#2(HC)dsHLscFv#3, (LC)dsLHscFv#4	20
Fab#2(LC)dsHLscFv#3, (HC)HLscFv#4	13*
Fab#2(LC)dsHLscFv#3, (HC)dsHLscFv#4	12*
Fab#2(LC)dsHLscFv#3, (HC)LHscFv#4	12*
Fab#2(LC)dsHLscFv#3, (HC)dsLHscFv#4	11*

[0370] HEK293 발현된 Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 단백질-G 정제

[0371] ~50ml HEK293 상층액을 10kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기를 이용하여 ~2ml로 ~25배 농축하였다. 상기 농축된 상층액을 20mM 포스페이트, 40mM NaCl pH7.4에서 평형화된 1ml HiTrap 단백질-G FF 컬럼(GE Healthcare)에 적용하였다. 상기 컬럼을 20mM 포스페이트, 40mM NaCl pH7.4로 세척하고 결합된 물질을 0.1M 글리신/HCl pH2.7로 용리시켰다. 용리 피크를 수집하고 2M Tris/HCl pH8.5를 이용하여 pH를 ~pH7.0으로 조절하였다. 상기 pH 조절된 용리액을 10kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기를 이용하여 농축시키고 완충제를 PBS pH7.4로 교환하였다.

[0372] 단백질-G 정제된, HEK293 발현된 Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 SDS-PAGE 분석

[0373] 샘플(2 µg)을 PBS를 이용하여 9.75 µl의 부피로 희석하고, 여기에 3.75 µl 4xLDS 샘플 완충제 및 1.5 µl 100 mM N-에틸말레이미드(비환원된 샘플) 또는 1.5 µl 10x NuPAGE 환원제(환원된 샘플)를 부가하였다. 샘플을 볼텍싱하고, 70℃에서 10분간 배양하고, 냉각하고, 12500 rpm에서 30초간 원심분리하였다. 상기 제조된 샘플을 4-20% 아크릴아마이드 Tris/글리신 SDS 겔에 로딩하고 125V, 정전압에서 ~100분간 작동시켰다. SeeBluePlus2(Life Technologies) 분자량 사다리를 사용하였다. 상기 겔을 인스턴트 블루 단백질 염색(Expedeon)으로 염색하고 증류수로 탈색하였다.

[0374] 환원 및 비환원 SDS-PAGE 후 예상된 밴드 크기가 표 6에 표시되어 있다.

표 6

SDS-PAGE 후 예상된 밴드 크기(kDa) (H=중쇄, L=경쇄, +/- 환원제)					
	- Red	+ Red		- Red	+ Red
Fab-1xdsscFv, 1x scFv	~100	H~50 L~50	Fab-2xdsscFv	~100	H~50 L~50

[0376] 모든 단백질의 경우, 비환원 겔은 ~100kDa의 밴드를 나타낼 것으로 예상된 반면, 환원 겔은 두 밴드에서 동일한

염색으로 ~50kDa에서 이중 밴드(doublet)를 나타낼 것으로 예상되었다.

[0377] 모든 Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 단백질의 경우, 환원 SDS-PAGE 겔은 이동 위치 및 염색 강도 측면에서 작제물이 ~50kDa에서 이중 밴드로 정확하게 발현되고 있음을 보여주는 밴딩 패턴을 나타내었다(도 2B,D). 부가적인 최상부의 작은 밴드는 비환원된 전장 단백질과 일치한다. 예상대로, 디설파이드 연결된 다량체들은 비환원 겔 상에서 관찰되며(도 2A,C), 이는 환원 조건하에서 사라진다(도 2B,D). 비환원 겔 상의 ~50kDa에서의 작은 밴드(도 2A,C)는 Fab 영역 내의 중쇄 및 경쇄 사이의 불완전한 ds 결합 형성과 일치할 수 있다.

[0378] 단백질-G 정제된, HEK293 발현된 Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 G3000 SE-HPLC 분석

[0379] 10 µg 정제된 단백질 샘플(PBS에서 희석된 0.1 mg/ml 스톡 100 µl)을 정제 후 3일에 TSK Gel G3000SWXL, 7.8x300mm, 컬럼(Tosoh) 상에 주입하였고 1ml/분의 200mM 포스페이트 pH7.0의 등용매 구배로 현상시켰다. 신호를 280nm에서의 흡광도에 의해 검출하였다.

[0380] 상기 결과가 도 3에 나타나 있다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 단백질-G 정제 후, Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷은 83-89% 단량체였다.

[0381] 상기 분석에서 모든 샘플이 유사한 단량체 수준을 가짐에도 불구하고, Fv 디설파이드가 결합된 scFv를 함유하는 샘플은 동적 평형 상태에 있다. 이것은 이들 샘플에 대해 상기 분석에서 측정된 % 단량체가 샘플의 농도에 의존적이며, 더 농축된 샘플이 더 높은 % 단량체를 야기하고 덜 농축된 샘플이 더 낮은 % 단량체를 야기한다는 것을 의미한다. 반면, scFv 모두가 디설파이드를 함유하는 샘플은 안정적이며 동적 평형에 있지 않다. 그러므로, 상기 분석에서 측정된 % 단량체는 샘플 농도 변화에 따라 변화하지 않는다.

[0382] Fab-2xdsscFv 포맷에서의 단량체 및 다량체가 안정적이고 동적 평형 상태에 있지 않으므로, 상기 샘플은 % 단량체를 증가시키기 위해 쉽게 더 정제될 수 있다. 상기 정제된 단량체성 샘플은 또한 주어진 제형 내의 작제물의 농도가 증가하는 경우에도 단량체성을 유지할 것이고, 이로써 상기 작제물을 약제학적 제조에 사용하는데 매우 적합하게 만든다. 반면, Fab-2xscFv는 단량체로서 정제 후에 scFv 도메인의 vL 및 vH 간의 분자간 동적 도메인 교환에 놓여질 수 있다. 그러므로, 이량체, 삼량체, 고차 구조물 및 응집물의 증가된 형성 위험 외에도, 상기 분자들은 관찰되기 어려운데, 비응집 형태가 분석 방법 동안 사용된 희석 단계 후에 단량체로 분해될 수 있기 때문이다. 따라서, Fab-2xdsscFv는 약제학적 조성물의 분석 동안 부가적인 명확성을 제공한다.

[0383] Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 CHOS 발현

[0384] CHOS 세포를 1L 규모로 전기천공 방법에 의해 관련 플라스미드로 형질감염시켰다. 플라스미드들을 표 7에 나타난 바와 같이 혼합하여 단백질을 발현시켰다. 배양물을 2 mM GlutaMAX가 보충된 CD-CHO 배지에서 성장시키고 24 시간 동안 140 rpm에서 8% CO₂와 함께 37°C에서 배양시킨 다음, 32°C에서 13일간 더 배양하였다. 형질감염 후 4 일째에, 3 mM의 최종 농도로 부티르산나트륨을 상기 배양물에 추가하였다. 형질감염 후 14일에, 원심분리에 의해 배양 상층액을 수집하고, 0.22 µm 필터로 멸균하였다. 발현 역가를 단백질 G HPLC에 의해 측정하였다(표 8).

표 7

항체 작제물	사용된 플라스미드
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)HLscFv#4	3. 플라스미드 g2 1. 플라스미드 j
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)dsHLscFv#4	3. 플라스미드 h2 1. 플라스미드 j
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)LHscFv#4	3. 플라스미드 g1 1. 플라스미드 j
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)dsLHscFv#4	3. 플라스미드 h1 1. 플라스미드 j

표 8

항체 작제물	발현 수준(µg/ml)
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)HLscFv#4	15
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)dsHLscFv#4	17
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)LHscFv#4	18
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)dsLHscFv#4	16

[0387] CHO 발현된 Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 단백질-G 정제

[0388] 1L CHO 상층액을 10kDa 분자량 컷오프 아미콘(Amicon) 교반 세포를 이용하여 ~40 ml로 ~25배로 농축하였다. 상기 농축된 상층액을 단백질 G 컬럼 및 러닝 완충제로서 PBS를 갖는 AKTA Express 정제 시스템에 로딩하였다. 결합된 물질을 0.1 M 글리신/HCl pH2.7으로 용리시키고 2M Tris/HCl pH8.5를 이용하여 pH를 ~pH7.0으로 조절하였다. 그리고 나서, 용리된 물질을 10kDa 분자량 농도를 이용하여 농축하고, 수득된 농축물을 러닝 완충제로서 PBS를 이용하여 겔 여과용 Superdex 컬럼(GE Healthcare) 상에 로딩하였다. 개별적인 용리 피크를 수집하고 크기 배제 HPLC에 의해 분석하여 단량체성 분획을 결정하였다. 최종 단량체성 단백질을 PBS에서 5 mg/ml로 농축하고 4℃에서 보관하였다.

[0389] Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 단백질-G 정제된, CHOS 발현된 단량체성 분획의 SDS-PAGE 분석

[0390] 샘플(2 µg)을 PBS를 이용하여 9.75 µl의 부피로 희석하고, 여기에 3.75 µl 4xLDS 샘플 완충제 및 1.5 µl 100 mM N-에틸말레이미드(비환원된 샘플) 또는 1.5 µl 10x NuPAGE 환원제(환원된 샘플)를 추가하였다. 샘플을 볼텍싱하고, 70℃에서 10분간 배양하고, 냉각하고, 12500 rpm에서 30초간 원심분리하였다. 상기 제조된 샘플을 4-20% 아크릴아마이드 Tris/글리신 SDS 겔 상에 로딩하고 125V, 정전압에서 ~100분간 작동시켰다. Mark12(Life Technologies) 분자량 사다리를 사용하였다. 상기 겔을 인스턴트 블루 단백질 염색(Expdeon)으로 염색하고 증류수로 탈색하였다.

[0391] 환원 및 비환원 SDS-PAGE 후 예상된 밴드 크기가 표 9에 나타나 있다.

표 9

[0392]

SDS-PAGE 후 예상된 밴드 크기(kDa) (H=중쇄, L=경쇄, +/- 환원제)					
	- Red	+ Red		- Red	+ Red
Fab-1xdsscFv, 1x scFv	~100	H~50 L~50	Fab-2xdsscFv	~100	H~50 L~50

[0393] 모든 단백질의 경우, 비환원 겔은 ~100kDa의 밴드를 나타낼 것으로 예상된 반면, 환원 겔은 두 밴드에서 동일한 염색으로 ~50kDa에서 이중 밴드(doublet)를 나타낼 것으로 예상되었다.

[0394] 모든 Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 단백질의 경우, 환원 SDS-PAGE 겔은 이동 위치 및 염색 강도 측면에서 작제물이 ~50kDa에서 이중 밴드로 정확하게 발현되고 있음을 보여주는 밴딩 패턴을 나타내었다(도 8B,D). 추가적인 최상부의 작은 밴드는 비환원된 전장 단백질과 일치한다(도 8B,D). 모든 단백질의 경우, 비환원 겔은 전장 단백질을 나타내는, ~100kDa에서 밴드를 나타내었다(도 8A, a). 비환원 겔 상의 ~50kDa에서의 작은 밴드(도 8A,b)는 Fab 영역 내의 중쇄 및 경쇄 사이의 불완전한 디설파이드 결합 형성과 일치할 수 있다.

[0395] 단량체성 Fab-1xdsscFv-1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 G3000 SE-HPLC 시간 경과 분석

[0396] 항체 포맷의 정제된 단량체 5 mg/ml을 PBS에서 4℃에서 보관하고 정제 후 4일, 14일 및 28일에 분석하였다. 샘플을 PBS를 이용하여 10 µg로 희석하고 TSK Gel G3000SWXL, 7.8x300mm, 컬럼(Tosoh)에 주입하고, 1ml/분로 200mM 포스페이트 pH7.0의 등용매 구배를 이용하여 현상하였다. 신호를 280 nm에서의 흡광도에 의해 검출하였다. 상기 결과가 도 9에 나타나 있다. 정제 후 4일에, Fab-2xdsscFv의 분석은 대부분의 단백질이 실험의 시작시(실선)에 단량체성이었고, 시간 경과 동안 단량체성을 유지하였고 안정하였음을 나타내었고, < 1 %는 다량체(이량체, 삼량체, 고차 및 큰 응집물)로서 정의되었다. 반면, 다량체화의 더 높은 발생이 Fab-1xdsscFv-1xscFv에 대해 검출되었는데, 이는 시간 경과에 따라 선형적으로 증가하는 것으로 관찰되었다(파선). 실제로, 다량체화의 우세는 V_L/V_H 방향으로 비디설파이드 안정화된 scFv를 함유하는 포맷에서 더 확연한 것으로 보였다. 그러나, iFv 디설파이드가 결합된 scFv를 함유하는 포맷은 동적 평형 상태에 있고 디설파이드 안정화된 scFv보다 보관 동안 다량체화에 더 취약함이 분명하다. 실제로, 디설파이드 안정화된 2개의 scFv를 함유하는 포맷은 주어진 제형 내의 단백질의 농도가 증가할 때에도 단량체성을 유지하는 것으로 나타났다. 이것은 두 scFv가 Fv 디설파이드를 함유하는 경우 작제물이 보관 기간 동안 고차 다량체 또는 거대한 응집물을 형성하는 위험성이 결정적으로 대수롭지 않을 필요가 있는 약제학적 제조에 사용하는데 실제로 적합하게 만든다.

[0397] 실시예 2: Fab-2xdsscFv(2개의 동일한 dsscFv를 갖는 2가)

[0398] 포유동물 세포에서의 발현을 위한 플라스미드의 제작

[0399] dsscFv#3을 가요성 링커 SGGGGSGGGGS [본원에서 S, 2xG4S로도 지칭됨](서열번호: 2)를 이용하여 경쇄#2의 Km3 동종이인자형 인간 카파 불변 영역의 C-말단에 융합함으로써, 또는 dsscFv#3을 가요성 링커 SGGGGTGGGGGS [본원에서 S, G4T, G4S로도 지칭됨](서열번호: 1)를 이용하여 중쇄#2의 γ 1 동형 인간 감마-1 CH₁ 불변 영역의 C-말단에 융합함으로써 Fab#2-(HC)dsscFv#3, (LC)dsscFv#3의 발현을 위한 플라스미드(도 4 참고)를 제작하였다. vL#3/vL#1 및 vH#3/vH#1 모두의 프레임워크 영역의 선택된 잔기에서 상기 DNA 서열 내로 점 돌연변이를 도입하였다. 상기 돌연변이(중쇄 G44C 및 경쇄 G100C)를 도입하여 Fv#3의 중쇄 및 경쇄 사이에 사슬간 디설파이드 결합을 생성하였다.

[0400] pND1 플라스미드(Fab#2 Heavy-(SGGGGTGGGGGS [서열번호: 1]-dsvH#3-(GGGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-dsvL#3) [플라스미드 i]는 이미 이용가능하였다. dsHLscFv#3을 인코딩하는 유전자 단편을 pND1으로부터 절단하고 상기 상술된 경쇄#2에 융합하여 Light#2-(SGGGSGGGGS [서열번호: 2])-dsvH#3-(GGGGSGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 68])-dsvL#3 [플라스미드 j]을 생성하였다.

[0401] 상기 Fab 융합 포맷을 HCMV-MIE 프로모터 및 SV40E 폴리A 서열의 제어하의 포유동물 발현 벡터 내로 클로닝하였다.

[0402] Fab-2xdsscFv#3의 HEK293 발현

[0403] HEK293 세포를 제조사의 지침에 따라 인비트로젠 293fectin 형질감염 시약을 이용하여 관련 플라스미드로 형질감염시켰다. 플라스미드들을 표 10에 나타난 바와 같이 혼합하여 단백질을 발현시켰다:

표 10

항체 작제물	사용된 플라스미드
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3, (LC)dsHLscFv#3	1. 플라스미드 j 2. 플라스미드 i

[0405] 형질감염을 위해 사용된 플라스미드의 비율은 1:1이었다. 총 50 μ g 플라스미드 DNA를 실온에서 20분간 125 μ l 293fectin + 4.25ml Optimem 배지와 함께 배양하였다. 그리고 나서, 상기 혼합물을 1×10^6 세포/ml로 현탁액 중의 50ml HEK293 세포에 부가하고 37°C에서 진탕하면서 배양하였다. 1500g에서 원심분리하여 세포를 제거함으로써 상층액을 10일에 수확하고, 상층액을 0.22 μ m 필터를 통과시켰다. 발현 수준을 단백질-G HPLC에 의해 결정하였다. 표 11은 단백질-G HPLC 분석의 결과를 보여준다. 발현 수준은 20 μ g/ml였다.

표 11

항체 작제물	발현 수준 (μ g/ml)
Fab#2(HC)dsHLscFv#3, (LC)dsHLscFv#3	20

[0407] HEK293 발현된 Fab-2xdsscFv#3의 정제

[0408] ~50ml HEK293 상층액을 30kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기를 이용하여 ~2ml로 ~25배 농축하였다. 상기 농축된 상층액을 30kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기를 이용하여 정제 및 더 농축하고 완충제를 PBS pH7.4로 교환하였다.

[0409] 단백질-G 정제된, HEK293 발현된 Fab-2xdsscFv#3의 SDS-PAGE 분석

[0410] 샘플(2 μ g)을 PBS를 이용하여 9.75 μ l의 부피로 희석하고, 여기에 3.75 μ l 4xLDS 샘플 완충제 및 1.5 μ l 100 mM N-에틸말레이미드(비환원된 샘플) 또는 1.5 μ l 10x NuPAGE 환원제(환원된 샘플)를 부가하였다. 상기 샘플을 불태우고, 70°C에서 10분간 배양하고, 냉각하고, 12500 rpm에서 30초간 원심분리하였다. 상기 제조된 샘플을 4-20% 아크릴아마이드 Tris/글리신 SDS 겔 상에 로딩하고 125V, 정전압에서 ~100분간 작동시켰다. SeeBluePlus2(Life Technologies) 분자량 사다리를 사용하였다. 상기 겔을 인스턴트 블루 단백질 염색(Expedeon)으로 염색하고 증류수로 탈색하였다. 환원 및 비환원 SDS-PAGE 후 예상된 밴드 크기가 표 12에 표시되어 있다.

표 12

[0411]

SDS-PAGE 후 예상된 밴드 크기(kDa) (H=중쇄, L=경쇄, +/- 환원제)		
	- Red	+ Red
Fab-2xdsscFv#3	~100	H~50 L~50

[0412]

비환원 겔은 ~100kDa에서 밴드를 나타낼 것으로 예상된 반면, 환원 겔은 두 밴드에서 동일한 염색으로 ~50kDa에서 이중 밴드(doublet)를 나타낼 것으로 예상되었다.

[0413]

환원 SDS-PAGE 겔은 이동 위치 및 염색 강도 측면에서 작제물이 ~50kDa에서 이중 밴드로 정확하게 발현되고 있음을 보여주는 밴딩 패턴을 나타내었다(도 4B), 그러나 Fab의 정제를 위해 전형적으로 사용되는 표준 단백질 G-매개된 정제 방법과 대조적으로 아마도 차선 정제 계획으로 인해 일부 부가적인 작은 종이 관찰되었다. 디설파이드 연결된 다량체는 비환원 겔 상에서 관찰되며(도 4A), 이는 환원 조건하에서 사라진다(도 4B).

[0414]

정제된, HEK293 발현된 Fab-2xdsscFv#3의 S200 SE-HPLC 분석

[0415]

10 µg 정제된 단백질 샘플(PBS에서 희석된 0.1 mg/ml 스톱 100 µl)을 정제 후 3일에 Superdex 200 10/300 GL Tricorn 컬럼(GE Healthcare)에 주입하고 1ml/분으로 PBS pH7.4의 등용매 구배를 이용하여 현상하였고, 280nm에서의 흡광도에 의해 연속 검출하였다. 상기 결과가 도 5에 나타나 있다. 도 5로부터 볼 수 있는 바와 같이, 정제 후, Fab-2xdsscFv#3 포맷은 81% 단량체였다.

[0416]

실시예 3: Fab-(HC)dsscFv-(LC)dsFv

[0417]

포유동물 세포에서의 발현을 위한 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 및 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨) 플라스미드의 제작

[0418]

dsscFv#1(dsvH-4xG4S-dsvL) 또는 dsvL#1 중 어느 하나를 가요성 링커 SGGGSGGGSGGGGS(서열번호: 69)를 이용하여 경쇄#2의 Km3 동종이인자형 인간 카파 불변 영역의 C-말단에 융합하여:

[0419]

Light#2-(SGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 69])-dsscFv#1 [플라스미드 b] 및

[0420]

Light#2-(SGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 69])-dsvL#1 [플라스미드 c]를 생성함으로써; 그리고

[0421]

HLdsscFv#3(dsvH-4xG4S-dsvL)을 가요성 링커 SGGGSGGGGTGGGGS(서열번호: 70)를 이용하여 중쇄#2의 γ1 동형 인간 감마-1 CH1 불변 영역의 C-말단에 융합하여:

[0422]

Heavy#2-(SGGGSGGGGTGGGGS [서열번호: 70])-dsscFv#3 [플라스미드 a]를 생성함으로써, Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 및 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨)의 발현을 위한 Fab#2 융합 단백질(도 6 참고)을 제작하였다.

[0423]

vL#3, vH#3, vL#1 및 vH#1의 프레임워크 영역 내의 선택된 잔기에서 상기 DNA 서열 내로 점 돌연변이(중쇄 G44C 및 경쇄 G100C)를 도입하여 Fv#3 및 Fv#1의 중쇄 및 경쇄 사이에 사슬간 디설파이드 결합을 생성하였다. 중쇄 및 경쇄 Fab-융합 유전자를 HCMV-MIE 프로모터 및 SV40E 폴리A 서열의 제어하의 포유동물의 발현 벡터 내로 클로닝하였다.

[0424]

Heavy#2-(SGGGSGGGGTGGGGS [서열번호: 70])-dsscFv#3 [플라스미드 a] 및

[0425]

dsvH#1 자유 도메인 [플라스미드 d]

[0426]

을 인코딩하는 유전자를 화학적으로 제작하고 각각 HCMV-MIE 프로모터 및 SV40E 폴리A 서열의 제어하의 포유동물의 발현 벡터 내로 클로닝하였다.

[0427]

dsscFv#1 및 dsvL#1을 인코딩하는 유전자를 화학적으로 제작하고 경쇄#2의 C-말단에 융합하여:

[0428]

Light#2-(SGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 69])-dsscFv#1 [플라스미드 b] 및

[0429]

Light#2-(SGGGSGGGSGGGGS [서열번호: 69])-dsvL#1 [플라스미드 c]

[0430]

을 생성하고, 전체 작제물을 HCMV-MIE 프로모터 및 SV40E 폴리A 서열의 제어하의 포유동물의 발현 벡터 내로 클로닝하였다.

[0431] Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 및

[0432] Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨)의 HEK293 발현

[0433] HEK293 세포를 제조사의 지침에 따라 인비트로젠 293fectin 형질감염 시약을 이용하여 관련 플라스미드로 형질 감염시켰다. 플라스미드들을 하기와 같이 혼합하여 하기 표 13에 나타난 바와 같이 상이한 작제물을 발현시켰다:

표 13

[0434]

항제 작제물	사용된 플라스미드
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1	1. 플라스미드 a 2. 플라스미드 b
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨)	1. 플라스미드 a 2. 플라스미드 c 3. 플라스미드 d

[0435] 2 플라스미드 조합의 경우, 형질감염을 위해 사용된 플라스미드의 비율은 1:1인 반면, 3 플라스미드 조합의 경우, 비율은 1:1:1이었다. 총 50 µg 플라스미드 DNA를 실온에서 20분간 125 µl 293fectin + 4.25ml Optimem 배지와 함께 배양하였다. 그리고 나서, 상기 혼합물을 1×10^6 세포/ml의 현탁액 중의 50ml HEK293 세포에 부가하고 37°C에서 진탕하면서 배양하였다. 상층액을 1500g에서 원심분리하여 세포를 제거함으로써 상층액을 10일에 수확하고, 상기 상층액을 0.22 µm 필터에 통과시켰다. 발현 수준을 단백질-G HPLC에 의해 결정하였다.

[0436] 상기 결과가 표 14에 나타나 있다. 볼 수 있는 바와 같이, 두 가지 작제물의 발현 수준은 서로 대등하였다(16-18 µg/ml). vL 및 vH 사이에 링커 또는 vL 및 vH를 결합시키는 이량체화 모티프 중 어느 하나가 결여된 Fv 영역의 발현은 연결된 Fv보다 실질적으로 더 낮은 발현 수준을 갖는다고 문헌에서 보고된 바 있다. 놀랍게도, 이것은 이 데이터에서 관찰되지 않으며, 여기서 작제물의 각각의 유형의 발현 수준 간에 유의미한 차이가 관찰되지 않았다.

표 14

[0437]

작제물	발현 수준(µg/ml)
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1	18
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨)	16

[0438] HEK293 발현된 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 및 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨)의 단백질-G 정제

[0439] ~50ml HEK293 상층액을 10kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기를 이용하여 ~2ml로 ~25배로 농축하였다. 상기 농축된 상층액을 20mM 포스페이트, 40mM NaCl pH7.4에서 평형화된 1ml HiTrap 단백질-G FF 컬럼(GE Healthcare)에 적용하였다. 상기 컬럼을 20mM 포스페이트, 40mM NaCl pH7.4로 세척하고, 결합된 물질을 0.1M 글리신/HCl pH2.7로 용리시켰다. 용리 피크를 수집하고 2M Tris/HCl pH8.5를 이용하여 pH를 ~pH7.0으로 조절하였다. 상기 pH 조절된 용리액을 10kDa 분자량 컷오프 원심분리 농축기를 이용하여 농축시키고 완충제를 PBS pH7.4로 교환하였다.

[0440] 단백질-G 정제된, HEK293 발현된 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC) dsscFv#1 및 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨)의 SDS-PAGE 분석

[0441] 샘플(2 µg)을 PBS를 이용하여 9.75 µl의 부피로 희석하고, 여기에 3.75 µl 4xLDS 샘플 완충제 및 1.5 µl 100 mM N-에틸말레이미드(비환원된 샘플) 또는 1.5 µl 10x NuPAGE 환원제(환원된 샘플)를 부가하였다. 상기 샘플을 불태싱하고, 70°C에서 10분간 배양하고, 냉각하고, 12500 rpm에서 30초간 원심분리하였다. 상기 제조된 샘플을 4-20% 아크릴아마이드 Tris/글리신 SDS 겔 상에 로딩하고 125V, 정전압에서 ~100분간 작동시켰다. SeeBluePlus2(Life Technologies) 분자량 사다리를 사용하였다. 상기 겔을 인스턴트 블루 단백질 염색(Expedeon)으로 염색하고, 증류수로 탈색하였다.

- [0442] 상기 결과가 도 6에 나타나 있다. Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1의 경우, 비환원 겔은 ~100kDa에서 밴드를 나타낼 것으로 예상된 반면, 환원 겔은 두 번째 밴드에서 대략적으로 동등한 염색으로 ~50kDa에서 이중 밴드(doublet)를 나타낼 것으로 예상되었다. Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨)의 경우, 비환원 겔은 ~100kDa에서 밴드를 나타낼 것으로 예상된 반면, 환원 겔은 대략 상부 밴드부터 하부 밴드까지 비율 3:2:1의 염색으로 ~50, ~36 및 ~13kDa에서 3개의 밴드를 나타낼 것으로 예상되었다.
- [0443] 환원 SDS-PAGE 겔은 작제물이 이동 위치 및 염색 강도 모두의 측면에서 정확하게 발현되고 있었음을 가리키는 밴딩 패턴을 나타내었다. 비환원 SDS-PAGE 겔은 다량체화와 일치하였던 Fab-2xdsscFv에 대해 >200kDa의 유의미한 밴딩 패턴을 나타내었으나(도 6 A, 레인 2), Fab-dsscFv-dsFv 샘플에서는 더 적은 고 분자량 종이 관찰되었다(도 6 B, 레인 2).
- [0444] **단백질-G 정제된, HEK293 발현된, Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 및 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨)의 G3000 SE-HPLC 분석**
- [0445] 10 µg 정제된 단백질 샘플(PBS에서 희석된 0.1 mg/ml 스톱 100 µl)을 정제 후 3일에 TSK Gel G3000SWXL, 7.8x300mm, 컬럼(Tosoh)에 주입하고 1ml/분으로 200mM 포스페이트 pH7.0의 등용매 구배를 이용하여 현상하였다. 신호를 280 nm에서의 흡광도에 의해 검출하였다.
- [0446] 상기 결과가 도 7에 나타나 있다. 단백질-G 정제 후, Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1(LC-vL 연결됨)은 91% 단량체인 반면, Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1은 30% 단량체였다.
- [0447] dsscFv#1은 다량체화에 매우 취약한 것으로 알려져 있다. 다량체가 dsscFv 링커(vL#1 또는 vH#1은 상이한 폴리펩타이드 사슬로부터의 vH#1 또는 vL#1과 쌍을 형성함)에 의해 물리적으로 연결된다는 것을 고려하면, dsscFv#1을 dsFv#1(scFv 링커를 포함하지 않음)로 치환함으로써, 수득된 백분율 단량체에 유의미한 증가가 있었다.
- [0448] 따라서, 숙련가는 다량체화하는 dsscFv의 성향에 따라, 일부 경우에, dsscFv 대신에 dsFv를 사용하는 것이 유리할 것임을 인식할 것이다.
- [0449] **실시예 4 비아코어(Biacore) 친화성 및 항원 표적의 동시 결합의 입증**
- [0450] Fab#2-(HC)dsHLscFv#3(LC)dsHLscFv#4의 상호작용을 위한 결합 친화성 및 운동 매개변수를 CM5 센서 칩(GE Healthcare Bio-Sciences AB) 및 HBS-EP(10mM HEPES(pH7.4), 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면활성제 P20) 러닝 완충제를 이용하여 BIAcore T100 또는 BIAcore 3000 상에서 수행된 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 결정하였다. 모든 실험은 25℃에서 수행하였다. 인간 F(ab')₂-특이적 염소 Fab(Jackson ImmunoResearch) 또는 자체 생산한 항 인간 CH₁ 단일클론 항체 중 하나를 이용하여 항체 샘플을 상기 센서 칩 표면에 포획하였다. 포획 항체의 공유 고정화를 6000-7000 반응 단위(RU)의 수준으로 표준 아민 커플링 화학에 의해 달성하였다.
- [0451] 항원 #2, #3 또는 #4를 상기 포획된 항체에 대해 개별적으로 적정하였다. 각각의 분석 사이클은 항원의 3분 주입으로 구성되는 해리 단계 전에, 1분 주입을 이용하여 항체 샘플을 먼저 포획하는 것으로 구성되었으며, 그 이후에 결합을 10분간 모니터링하였다. 각 사이클 후, 40 mM HCl의 2 x 1분 주입 후 5 mM NaOH를 30초 주입하여 포획 표면을 재생시켰다. 사용된 유속은 포획의 경우 10 µl 분⁻¹, 결합 및 해리 단계의 경우 30 µl 분⁻¹, 및 재생의 경우 10 µl 분⁻¹이었다. 비아코어 T100 평가 소프트웨어 v2.0.1 또는 비아코어 3000 BIAevaluation v3.2를 이용하여 수득된 센소그램을 표준 1:1 결합 모델에 동시 전역 핏팅(global-fitting)하여 운동 매개변수를 결정하였다. 상기 결과가 표 15에 나타나 있다. 항체는 시험된 항원에 대해 pM - nM 범위 내에서 예상된 친화성을 나타내었다.

표 15

분석물	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	KD(pM)
항원 #2	5.06E+06	3.80E-05	7.51E-12	7.51
항원 #3	5.54E+06	6.43E-05	1.16E-11	11.6
항원 #4	7.75E+04	1.35E-04	1.74E-09	1740

- [0453] 고정화된 항-인간 IgG-F(ab')₂를 통해 삼중-특이적 항체를 센서 칩에 포획함으로써 3개의 모든 항원에 동시에 결합하는 Fab#2-(HC)dsHLscFv#3(LC)dsHLscFv#4의 잠재성을 평가하였다. 각각의 항원 또는 항원 #2, #3 및 #4의

혼합된 용액을 3분 주입으로 포획된 항체에 대해 적정하였다. 독립적 주입에 대해 관찰된 결합 반응 및 조합된 반응이 표 16에 나타나 있다. 조합된 항원#2/#3/#4 용액에 대한 결합 반응은 독립적 주입의 반응의 합과 동등하였다. 이것은 Fab#2-(HC)dsHLscFv#3(LC)dsHLscFv#4가 시험된 3개의 모든 항원에 대해 동시 결합할 수 있음을 확인시켜준다.

표 16

[0454]

분석물	결합(RU)
항원 #2	58
항원 #3	38
항원 #4	47
항원 #2 + #3 + #4	130(143)

[0455]

실시예 5 Fab-2xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷 간의 단량체성 수용의 비교

[0456]

EXpiHEK 세포를 50 ml 규모로 전기천공 방법에 의해 관련 플라스미드로 형질감염시켰다. 플라스미드들을 표 17에 나타난 바와 같이 혼합하여 단백질을 발현시켰다. 배양물을 ExpiHEK 발현 배지에서 성장시키고 증대제 1 및 2를 부가하기 전에 16-18시간 동안 120 rpm에서 8% CO₂와 함께 37°C에서 배양하였다. 이후, 상기 배양물을 37°C에서 4일간 더 배양하였다. 배양 상층액을 원심분리에 의해 수확하고 0.22 µm 필터로 멸균하였다. 발현 역가를 단백질 G HPLC에 의해 측정하였다(표 18).

표 17

[0457]

항체 작제물	사용된 플라스미드
Fab#4-(LC)HLscFv#5, (HC)HLscFv#6	1. 플라스미드 k1 2. 플라스미드 l1
Fab#4-(LC)dsHLscFv#5, (HC)dsHLscFv#6	1. 플라스미드 k2 2. 플라스미드 l2
Fab#4-(LC)HLscFv#7, (HC)HLscFv#8	1. 플라스미드 m1 2. 플라스미드 n1
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7, (HC)dsHLscFv#8	1. 플라스미드 m2 2. 플라스미드 n2
Fab#4-(LC) HLscFv#9, (HC)LHscFv#10	1. 플라스미드 o1 2. 플라스미드 p1
Fab#4-(LC)dsHLscFv#9, (HC)dsLHscFv#10	1. 플라스미드 o2 2. 플라스미드 p2
Fab#4-(LC)HLscFv#7, (HC)LHscFv#10	4. 플라스미드 q1 5. 플라스미드 r1
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7, (HC)dsLHscFv#10	1. 플라스미드 q2 2. 플라스미드 r2

표 18

[0458]

항체 작제물	발현(µg/ml)
Fab#4-(LC)HLscFv#5, (HC)HLscFv#6	62
Fab#4-(LC)dsHLscFv#5, (HC)dsHLscFv#6	31
Fab#4-(LC)HLscFv#7, (HC)HLscFv#8	195
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7, (HC)dsHLscFv#8	34
Fab#4-(LC) HLscFv#9, (HC)LHscFv#10	298
Fab#4-(LC)dsHLscFv#9, (HC)dsLHscFv#10	55
Fab#4-(LC)HLscFv#7, (HC)LHscFv#10	226
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7, (HC)dsLHscFv#10	58

[0459] EXPiHEK 발현된 Fab-2xscFvFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 단백질-G 정제

[0460] 상층액을 10kDa 분자량 컷오프 농축기를 이용하여 ~2 ml로 ~25배 농축하였다. 상기 농축된 상층액을 포스페이트 완충제 pH7.4를 이용하여 단백질 G HPLC에 의해 정제하였다. 결합된 물질을 0.1 M 글리신/HCl pH2.7을 이용하여 용리시키고 2M Tris/HCl pH8.5를 이용하여 pH를 ~pH7.0으로 조절하였다. 상기 용리된 물질을 10kDa 분자량 컷오프 농축기를 이용하여 농축시키고, 완충제를 PBS로 교환하였다. 정제된 단백질을 PBS에서 ~4-5 mg/ml로 농축시키고 4℃에 보관하였다.

[0461] 단백질-G 정제된, EXPiHEK 발현된 Fab-2xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 SDS-PAGE 분석

[0462] 샘플(2 µg)을 PBS를 이용하여 9.75 µl의 부피로 희석시키고, 여기에 3.75 µl 4xLDS 샘플 완충제 및 1.5 µl 100 mM N-에틸말레이미드(비환원된 샘플) 또는 1.5 µl 10x NuPAGE 환원제(환원된 샘플)를 추가하였다. 상기 샘플을 볼텍싱하고, 70℃에서 10분간 배양하고, 냉각하고, 12500 rpm에서 30초간 원심분리하였다. 상기 제조된 샘플을 4-20% 아크릴아마이드 Tris/글리신 SDS 겔 상에 로딩하고, 125V, 정전압에서 ~100분간 작동시켰다. Seeblue2(Life Technologies) 분자량 사다리를 사용하였다. 상기 겔을 인스턴트 블루 단백질 염색(Expedeon)으로 염색하고 증류수로 탈색하였다.

[0463] 환원 및 비환원 SDS-PAGE 후 예상된 밴드 크기가 표 19에 표시되어 있다.

표 19

[0464]

SDS-PAGE 후 예상된 밴드 크기(kDa) (H=중쇄, L=경쇄, +/- 환원제)					
	- Red	+ Red		- Red	+ Red
Fab-2xscFv	~100	H~50 L~50	Fab-2xdsscFv	~100	H~50 L~50

[0465] 모든 단백질의 경우, 비환원 겔은 ~100kDa에서 밴드를 나타낼 것으로 예상된 반면, 환원 겔은 두 밴드에서 동일한 염색으로 ~50kDa에서 이중 밴드(doublet)를 나타낼 것으로 예상되었다.

[0466] 모든 Fab-2xscFv 및 Fab-2xdsscFv 단백질의 경우, 환원 SDS-PAGE 겔은 작제물이 이동 위치 및 염색 강도 모두의 측면에서 ~50kDa에서 이중 밴드로 정확하게 발현되었음을 나타내는 밴딩 패턴을 보여주었다(도 10B,a). 부가적인 최상부의 작은 밴드는 비환원된 전장 단백질과 일치한다(도 10B,b). 모든 단백질의 경우, 비환원 겔은 전장 단백질을 나타내는, ~130 kDa에서 밴드를 나타내었다(도 10A,a). 비환원 겔 상의 ~50kDa에서의 밴드(도 10A,b)는 Fab 영역 내의 중쇄 및 경쇄 사이에 불완전한 디설파이드 결합 형성과 일치할 수 있다.

[0467] Fab-2xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 G3000 SE-HPLC 분석

[0468] ~ 5 mg/ml의 정제된 항체 단백질을 분석 전에 24시간 동안 PBS에서 4℃에서 보관하였다. 25 µg의 농도에 상응하는 샘플을 TSK Gel G3000SWXL, 7.8x300mm, 컬럼(Tosoh) 상에 주입하고 1ml/분으로 200mM 포스페이트 pH7.0의 등용매 구배를 이용하여 현상하였다. 신호를 280nm에서 흡광도에 의해 검출하였다. 상기 결과가 표 20에 나타나 있다. 분석은 모든 Fab-2xdsscFv 단백질이 > 90 % 단량체성이었음을 보여주었다. 반면, 모든 Fab-2xscFv에 대하여 다량체화의 더 높은 발생이 검출되었다. Fv 디설파이드를 갖는 scFv를 함유하는 포맷은 Fv 디설파이드가 결합된 scFv에 비해 더 단량체성이 분명하다. 이것은 안정적인 품질 및 제조 공정에서 유리할 속성을 갖는 치료 분자를 선택하는 측면에서 Fv 디설파이드를 함유하는 scFv를 갖는 포맷을 이용하는 것이 선호된다는 것을 가리킨다.

표 20

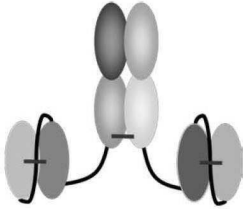
[0469]

포맷	% 단량체
Fab#4-(LC)HLscFv#5, (HC)HLscFv#6	51.3
Fab#4-(LC)dsHLscFv#5, (HC)dsHLscFv#6	96.8
Fab#4-(LC)HLscFv#7, (HC)HLscFv#8	80.8
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7, (HC)dsHLscFv#8	98.8
Fab#4-(LC) HLscFv#9, (HC)LHscFv#10	84.9
Fab#4-(LC)dsHLscFv#9, (HC)dsLHscFv#10	94.3
Fab#4-(LC)HLscFv#7, (HC)LHscFv#10	53.2
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7, (HC)dsLHscFv#10	90.8

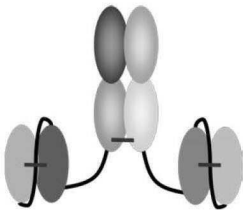
도면

도면1

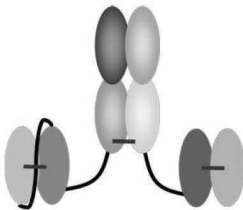
Fab-2x dsccFv 포맷 및 Fab-dsccFv-dsFv 포맷



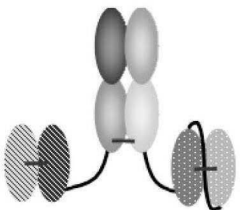
Fab#2-(HC)-dsccFv#3-(LC)-dsccFv#4



Fab#2-(LC)-dsccFv#3-(HC)-dsccFv#4



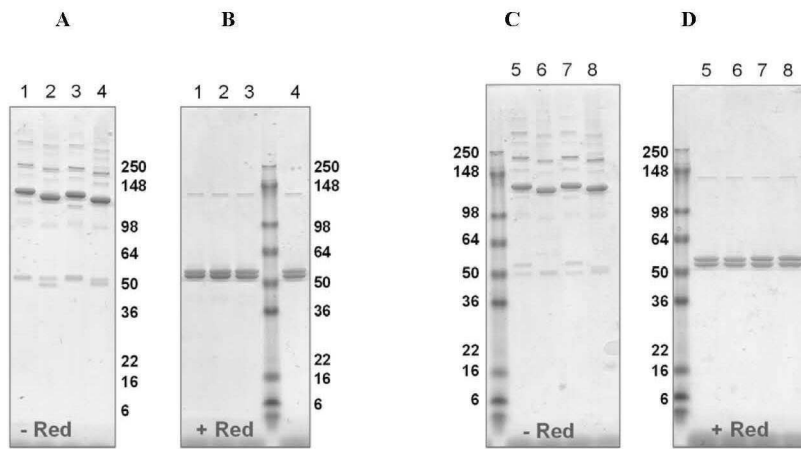
Fab-(HC)dsccFv-(LC)dsFv



Fab-(HC)dsFv-(LC)dsccFv

도면2

단백질 G-정제된, HEK293-발현된 Fab-1xdsscFv, 1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 단백질의 SDS-PAGE 분석

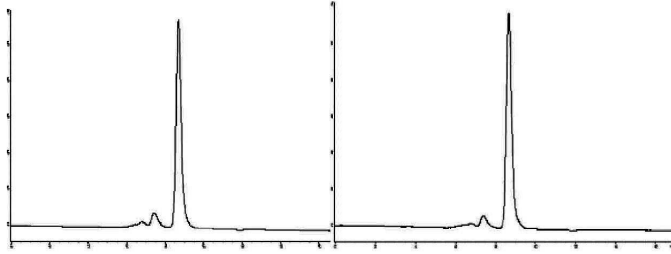


1. Fab#2-(HC) dsHLscFv#3, (LC) HLscFv#4
2. Fab#2-(HC)dsHLscFv#3, (LC)dsHLscFv#4
3. Fab#2-(HC)dsHLscFv#3, (LC)LHscFv#4
4. Fab#2-(HC)dsHLscFv#3, (LC)dsLHscFv#4
5. Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)HLscFv#4
6. Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)dsHLscFv#4
7. Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)LHscFv#4
8. Fab#2-(LC)dsHLscFv#3, (HC)dsLHscFv#4

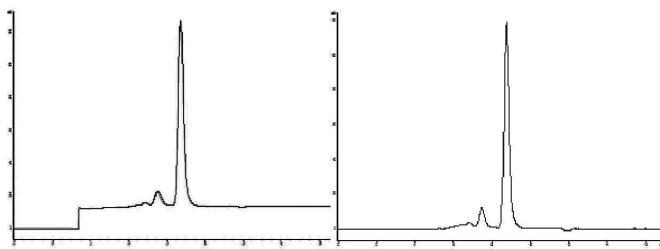
도면3

단백질 G-정제된, HEK293-발현된 Fab-1xdsscFv, 1xscFv 및 Fab-2xdsscFv 단백질의 G3000 SE HPLC 분석

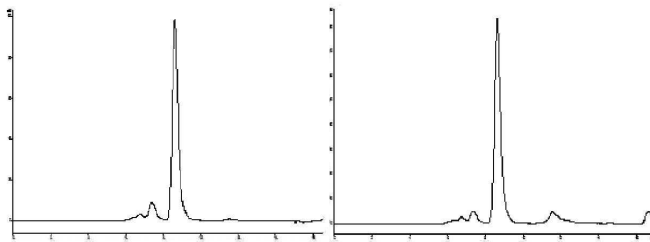
1. Fab#2 HC-dsHL#3 LC-HL#4: 86% 단량체 2. Fab#2 HC-dsHL#3 LC-dsHL#4: 89% 단량체



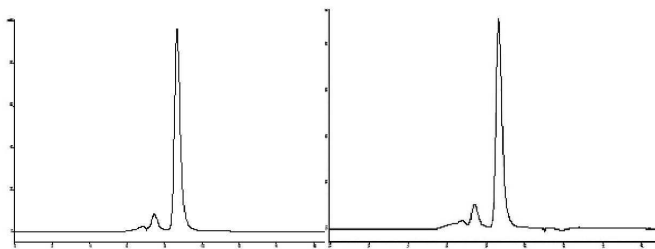
3. Fab#2 HC-dsHL#3 LC-LH: 84% 단량체 4. Fab#2 HC-dsHL#3 LC-dsLH#4: 83% 단량체



5. Fab#2 LC-dsHL#3 HC-HL#4: 85% 단량체 6. Fab#2 LC-dsHL#3 HC-dsHL#4: 88% 단량체

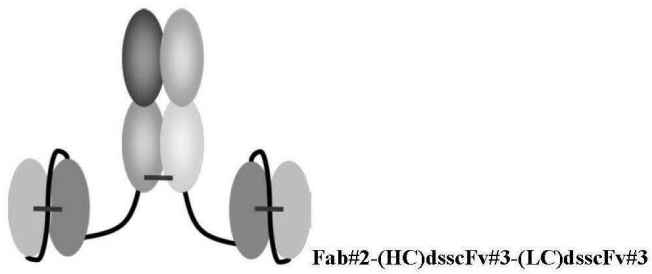
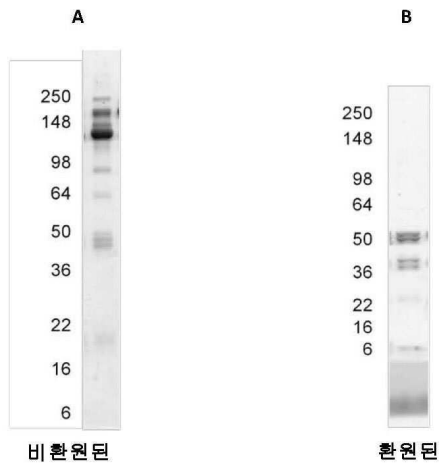


7. Fab#2 LC-dsHL#3 HC-LH#4: 88% 단량체 8. Fab#2 LC-dsHL#3 HC-dsLH#4: 83% 단량체



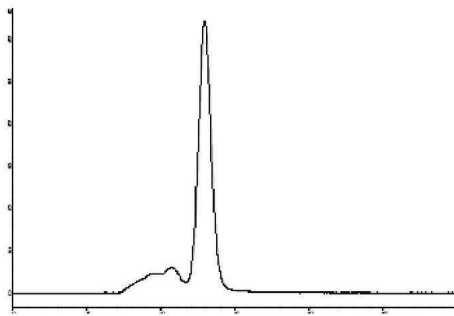
도면4

정제된, HEK293-발현된 Fab-2xdsscFv#3 단백질의 SDS-PAGE 분석



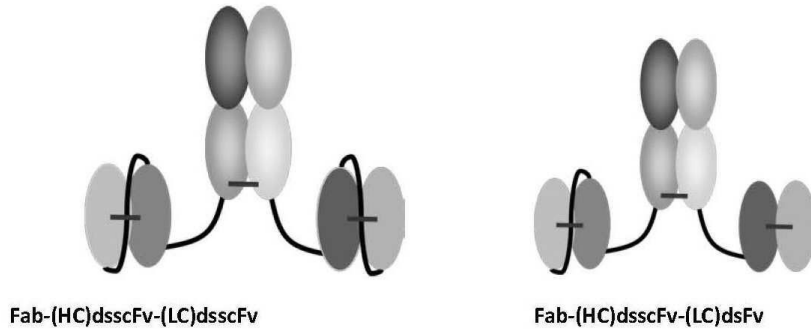
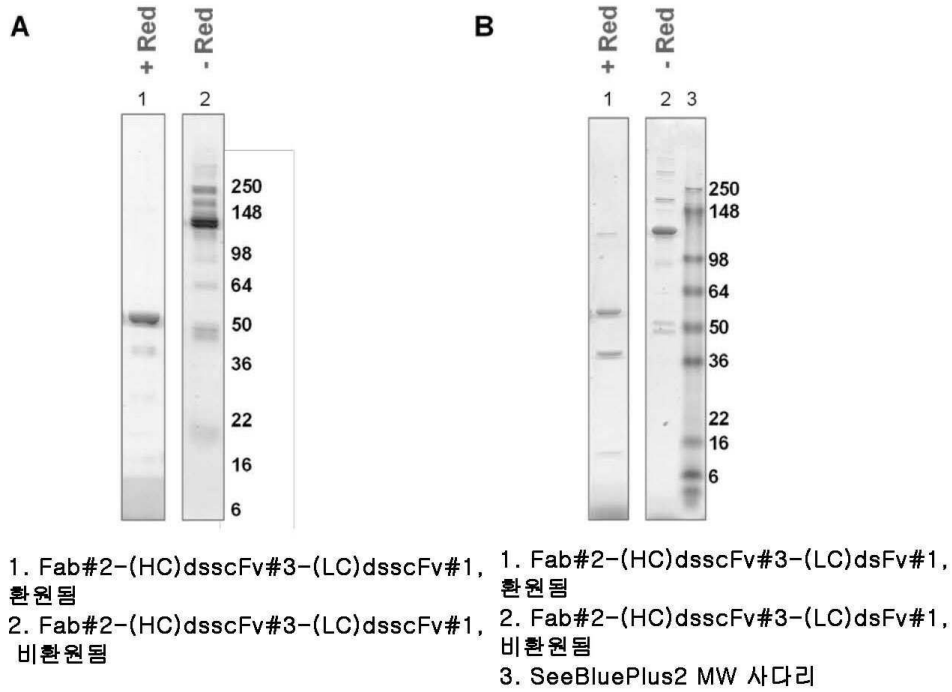
도면5

정제된, HEK293-발현된 Fab-2xdsscFv#3 단백질의 S200 SE HPLC 분석



도면6

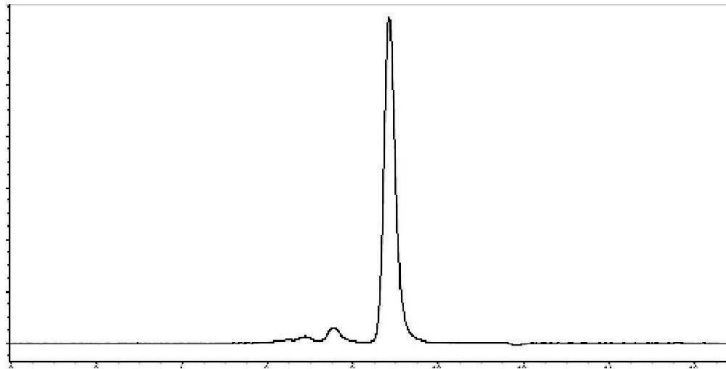
단백질 G-정제된, HEK293 발현된 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC) dsscFv#1 및 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 (LC-vL 연결됨) 단백질의 SDS-PAGE 분석



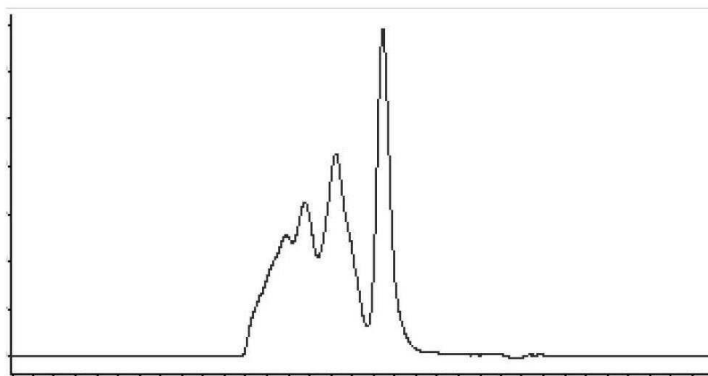
도면7

단백질 G-정제된, HEK293 발현된 Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 및
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 (LC-vL 연결됨) 단백질의 G3000 SE HPLC 분석

Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1: 91% 단량체

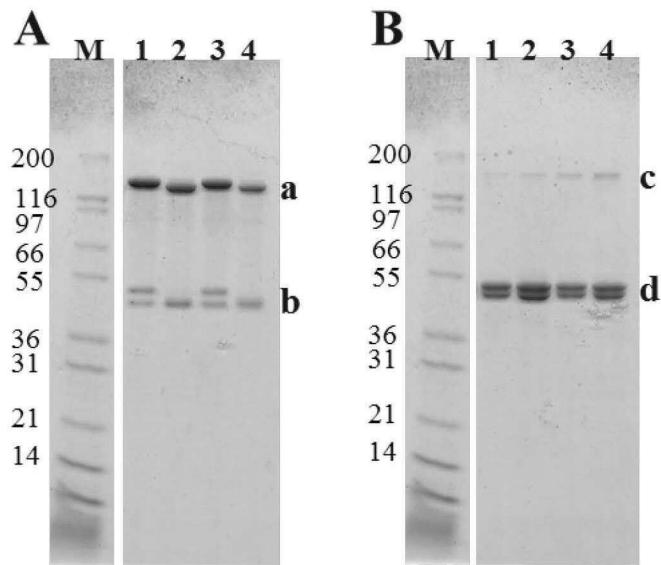


Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1: 30% 단량체



도면8

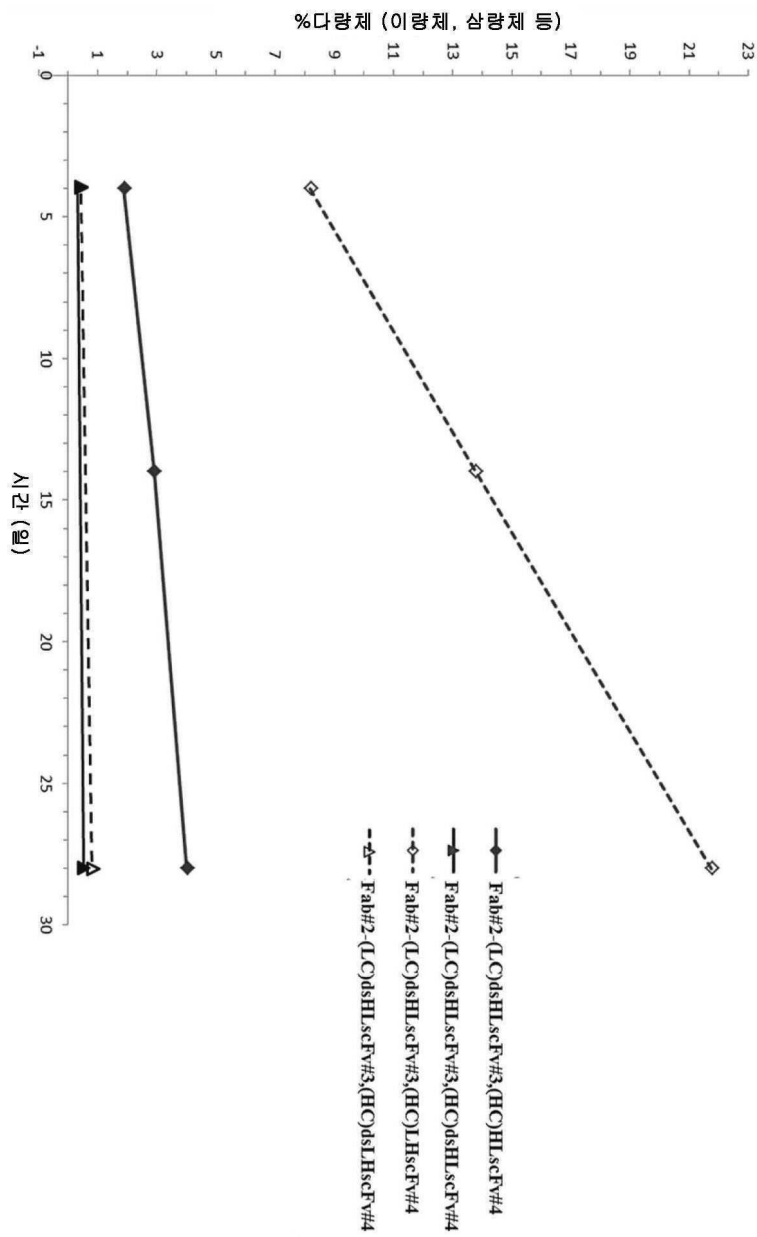
환원 조건 하에 SDS-PAGE 분석



M: Mark12 단백질 표준 (Life Technologies)

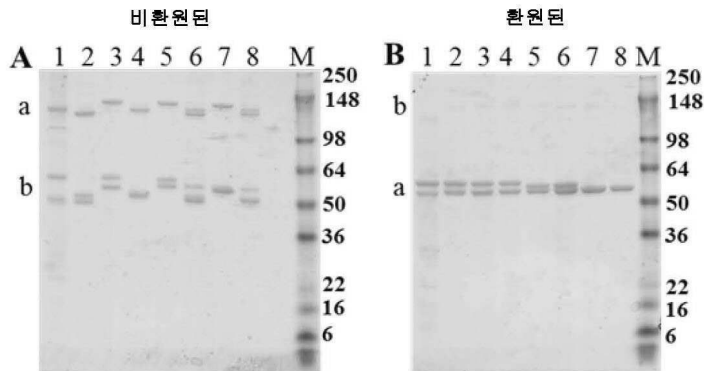
1. Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)HLscFv#4
2. Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsHLscFv#4
3. Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)LHscFv#4
4. Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsLHscFv#4

도면9



도면10

단백질 G-정제된, EXPiHEK 발현된 Fab-2xscFv 및 Fab-2xdsscFv 포맷의 SDS-PAGE 분석



1. Fab#4-(LC)HLscFv#5,(HC)HLscFv#6
2. Fab#4-(LC)dsHLscFv#5,(HC)dsHLscFv#6
3. Fab#4-(LC)HLscFv#7,(HC)HLscFv#8
4. Fab#4-(LC)dsHLscFv#7,(HC)dsHLscFv#8
5. Fab#4-(LC)HLscFv#9,(HC)LHscFv#10
6. Fab#4-(LC)dsHLscFv#9,(HC)dsLHscFv#10
7. Fab#4-(LC)HLscFv#7,(HC)LHscFv#10
8. Fab#4-(LC)dsHLscFv#7,(HC)dsLHscFv#10
- M. Seeblue2 단백질 표준 마커 (Life technologies)

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> UCB Biopharma SPRL

<120> Multispecific antibody constructs

<130> G0228_W0

<160> 80

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Linker

<400> 1

Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Linker

<400> 2

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

20 25

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu

1 5 10 15

Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

20 25 30

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 8

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His

1 5 10 15

Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr

20 25 30

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 9

Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 10

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp

1 5 10 15

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala

20 25

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge linker

<400> 11

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 12

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Ser

1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 14

Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 17

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser

20

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 18

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 19

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<400> 20

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser

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

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<400> 21

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser

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

Gly Ala Ser Ala Ser

20

<210> 22

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<400> 22

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser

20 25

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<400> 23

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser

20 25 30

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be naturally occurring amino acid

<400> 24

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser

1 5 10

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 25

Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr

1 5 10 15

Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr

20 25

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 26

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr

1 5 10

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 27

Ala Thr Thr Thr Gly Ser

1 5

<210> 28

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 28

Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu

1 5 10 15

Ser His Lys Ser Pro

20

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 29

Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 32

Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 35

Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 36

Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Pro Pro Phe Pro Phe Gly Phe Pro Ser Val

1 5 10 15

Arg Pro

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 37

Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu

1 5 10 15

Thr Thr

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 38

Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr

1 5 10 15

Phe Asn

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 39

Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu

1 5 10 15

Pro Ala

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 40

Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile

1 5 10 15

Arg Thr

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 41

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala

1 5 10 15

Phe Gly

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 42

Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu

1 5 10 15

Gly Ala

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 43

Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro

1 5 10 15

Asp Leu

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 44

Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro

1 5 10 15

Ser Leu

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 45

Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg

1 5 10 15

Ile Ser

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 46

Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg

1 5 10 15

Pro

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 47

Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe

1 5 10 15

Pro Pro

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 48

Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro

1 5 10 15

Pro Tyr

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 49

Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr

1 5 10 15

Pro

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 50

Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn

1 5 10 15

Leu Arg

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible linker

<400> 51

Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr

1 5 10 15

Phe Pro

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rigid linker

<400> 52

Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rigid linker

<400> 53

Pro Pro Pro Pro

1

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 54

Asp Leu Cys Leu Arg Asp Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 55

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 56

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Gly Asp

1 5 10 15

<210> 57

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 57

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp Glu

20

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 58

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Gly Arg Ser Val

20

<210> 59

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 59

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Gly Arg Ser Val Lys

20

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 60

Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp

1 5 10 15

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 61

Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 62

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp

1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 63

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp

1 5 10 15

<210>

> 64

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 64

Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Ala Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 65

Glu Val Arg Ser Phe Cys Thr Arg Trp Pro Ala Glu Lys Ser Cys Lys

1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly

20

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 66

Arg Ala Pro Glu Ser Phe Val Cys Tyr Trp Glu Thr Ile Cys Phe Glu

1 5 10 15

Arg Ser Glu Gln

20

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 67

Glu Met Cys Tyr Phe Pro Gly Ile Cys Trp Met

1 5 10

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding peptide

<400> 68

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> flexible linker

<400> 69

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

1 5 10 15

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> flexible linker

<400> 70

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRH1 dAbH1

<400> 71

Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn

1 5 10

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRH2 dAbH1

<400> 72

Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRH3 dAbH1

<400> 73

Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL1 dAbL1

<400> 74

Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser

1 5 10

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL2 dAbL1

<400> 75

Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL3 dAbL1

<400> 76

Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr

1 5 10

<210> 77

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain variable domain of anti-albumin antibody (no ds)

<400> 77

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 78

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain variable domain of anti-albumin antibody (ds)

<400> 78

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 79

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain variable domain of anti-albumin antibody (no ds)

<400> 79

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
 20 25 30
 Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
 85 90 95
 Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 80

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain variable domain of anti-albumin antibody (ds)

<400> 80

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
 20 25 30
 Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
 85 90 95
 Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110