



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월20일
 (11) 등록번호 10-1431318
 (24) 등록일자 2014년08월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 16/46 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
 C12N 15/62 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7025868
- (22) 출원일자(국제) 2010년03월30일
 심사청구일자 2011년10월31일
- (85) 번역문제출일자 2011년10월31일
- (65) 공개번호 10-2011-0130525
- (43) 공개일자 2011년12월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2010/002004
- (87) 국제공개번호 WO 2010/112193
 국제공개일자 2010년10월07일
- (30) 우선권주장
 09004909.9 2009년04월02일
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2007109254 A2*
 BMC Biotechnology. 2007, Vol. 7, page
 14.(2007. 3. 8.)
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 로슈 글리카트 아게
 스위스 솔리렌-취리히 체하-8952 바기슈트라체 18
- (72) 발명자
 브링크만 올리흐
 독일 82362 베일하임 페이흐틀스트라체 12
 브루엔커 피터
 스위스 체하-8335 히트나우 부르그비에 쉐스트라체
 3째
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 7 항

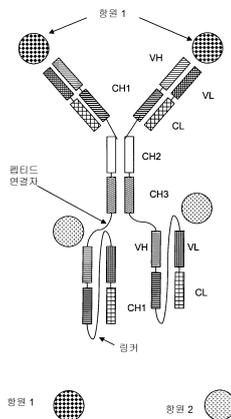
심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **전장 항체 및 단일쇄 F A B 단편을 포함하는 다중특이성 항체**

(57) 요약

본 발명은 전장 항체 및 단일쇄 Fab 단편을 포함하는 다중특이성, 특히 이중특이성 항체, 그의 제조 방법, 상기 항체를 함유하는 약학 조성물 및 그의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

크로아스테일 레베카

독일 82387 안트도르프 임 시펠트 39

클레인 크리스티안

스위스 체하-8906 본스테텐 크루에자허베그 41

코페츠키 에르하르트

독일 82377 펜즈베르그 카스트너호프스트라쎄 21

모에스너 에케하르트

스위스 체하-8280 크레우즈링겐 펠센부그베그 5

레글라 조에르그 토마스

독일 80639 뮌헨 리에르스트라쎄 15

슈안저 주에르겐 미카엘

독일 80469 뮌헨 아우엔스트라쎄 31

스트라케 잔 올라프

독일 81373 뮌헨 브루네커스트라쎄 7

우마나 파블로

스위스 체하-8832 불레라우 펠센라인스트라쎄 28

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 1차 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어지는 전장 항체; 및
- (b) 1 내지 4개의 추가 항원에 결합하는 1 내지 4개의 단일쇄 Fab 단편

을 포함하고, 상기 (b)의 단일쇄 Fab 단편이 상기 (a)의 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 (a)의 전장 항체에 융합되어 있는, 다중특이성 항체.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

2차 항원에 결합하는 1 또는 2개의 단일쇄 Fab 단편이 전장 항체의 중쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는, 다중특이성 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

2차 항원에 결합하는 1개의 단일쇄 Fab 단편이 전장 항체의 1개의 중쇄 또는 1개의 경쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는, 다중특이성 항체.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

2차 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편 VL-CL-링커-VH-CH1 또는 VH-CH1-링커-VL-CL의 N-말단이 전장 항체의 2개의 중쇄의 2개의 C-말단에서 또는 상기 전장 항체의 2개의 경쇄의 2개의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는, 다중특이성 항체.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

2차 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편 VL-CL-링커-VH-CH1 또는 VH-CH1-링커-VL-CL의 C-말단이 전장 항체의 2개의 중쇄의 2개의 N-말단에서 또는 상기 전장 항체의 2개의 경쇄의 2개의 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는, 다중특이성 항체.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

2차 항원에 결합하는 1개의 단일쇄 Fab 단편이 전장 항체의 1개의 중쇄 또는 1개의 경쇄의 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는, 다중특이성 항체.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 다중특이성 항체를 암호화하는 핵산.

청구항 10

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 전장(full length) 항체 및 단일쇄 Fab 단편을 포함하는 다중특이성, 특히 이중특이성 항체, 그의 제조 방법, 상기 항체를 함유하는 약학 조성물 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 매우 다양한 다중특이성 재조합 항체 포맷, 예를 들면, IgG 항체 포맷 및 단일쇄 영역의 융합에 의한 4가 이중특이성 항체가 최근에 개발되었다(예를 들면, 문헌 [Coloma, M.J., et al., Nature Biotech 15, 159-163 (1997)]; 국제특허출원 공개 제 WO 2001/077342 호; 및 문헌 [Morrison, S.L., Nature Biotech 25, 1233-1234 (2007)] 참조).

[0003] 또한, 항체 코어 구조(IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM)가 더 이상 유지되지 않는 여러 다른 새로운 포맷, 예를 들면, 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 여러 단일쇄 포맷(scFv, 비스-scFv)이 개발되었다[Holliger, P., et al., Nature Biotech 23, 1126-1136 (2005); Fischer, N., Leger, O., Pathobiology 74, 3-14 (2007); Shen, J., et al., Journal of Immunological Methods 318, 65-74 (2007); Wu, C., et al., Nature Biotech. 25, 1290-1297 (2007)].

[0004] 모든 상기 포맷은 항체 코어(IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM) 내지 또 다른 결합 단백질(예, scFv)에 융합되거나 또는 예를 들면, 2개의 Fab 단편 또는 scFv에 융합되기 위한 링커를 사용한다[Fischer, N., Leger, O., Pathobiology 74, 3-14 (2007)]. 예를 들어, 천연 항체와 고도의 유사성을 유지함으로써 Fc 수용체 결합을 통해 매개되는 보체-의존성 세포독성(CDC) 또는 항체 의존성 세포독성(ADCC)과 같은 작동인자 기능을 유지하기를 원할 수 있음을 주지해야 한다.

[0005] 국제특허출원 공개 제 WO 2007/024715 호에는 조작처리된 다가 및 다중특이성 결합 단백질로서 이중 가변 영역 면역글로불린이 보고되어 있다. 생물학적으로 활성인 항체 이량체의 제조 방법은 미국 특허 제 6,897,044 호에 보고되어 있다. 펩티드 링커를 통해 서로 연결된 4개 이상의 가변 영역을 갖는 다가 Fv 항체 구조물이 미국 특허 제 7,129,330 호에 보고되어 있다. 이량체 및 다량체 항원 결합 구조물은 미국 특허출원 공개 제 2005/0079170 호에 보고되어 있다. 연결 구조에 의해 서로 공유적으로 결합된 3개 또는 4개의 Fab 단편을 포함하는 3가 또는 4가 단일특이성 항원-결합 단백질(상기 단백질은 천연 면역글로불린이 아니다)이 미국 특허 제 6,511,663 호에 보고되어 있다. 국제특허출원 공개 제 WO 2006/020258 호에는 원핵 및 진핵 세포에서 효과적으로 발현될 수 있으며, 치료 및 진단 방법에 유용한 4가 이중 특이성 항체가 보고되어 있다. 2종의 폴리펩티드 이량체를 포함하는 혼합물로부터 1개 이상의 쇠간 다이설파이드 결합을 통해 연결되지 않은 이량체로부터 1개 이상의 쇠간 다이설파이드 결합을 통해 연결된 이량체를 분리하거나 선택적으로 합성하는 방법이 미국 특허출원 공개 제 2005/0163782 호에 보고되어 있다. 이중특이성 4가 수용체는 미국 특허 제 5,959,083 호에 보고되어 있다. 3개 이상의 작용성 항원 결합 부위를 갖는 조작처리된 항체가 국제특허출원 공개 제 WO 2001/077342 호에 보고되어 있다.

[0006] 다중특이성 및 다가 항원-결합 폴리펩티드는 국제특허출원 공개 제 WO 1997/001580 호에 보고되어 있다. 국제특허출원 공개 제 WO 1992/004053 호는, 전형적으로 동일 항원 결정인자에 결합하는 IgG 부류의 단클론성 항체로부터 제조된 단독접합체가 합성 가교결합에 의해 공유 결합됨을 보고하고 있다. 항원에 대한 높은 결합활성을 갖는 올리고머 단클론성 항체가 국제특허출원 공개 제 WO 1001/06305 호에 보고되어 있는데, 여기서 함께 결합되어 4가 또는 6가 IgG 분자를 형성하는 2개 이상의 면역글로불린 단량체를 갖는, 전형적으로 IgG 부류의 올리고머가 분비된다. 인터페론 감마 활성이 발병원인 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있는 양-유래 항체 및 조작처리된 항체 구조물이 미국 특허 제 6,360,860 호에 보고되어 있다. 미국 특허출원 공개 제 2005/0100543 호에는 이중특이성 항체의 다가 담체인 표적성 구조물이 보고되어 있다, 즉, 표적성 구조물의 각 분자는 2개 이상의 이중특이성 항체의 담체로서 작용할 수 있다. 유전자 처리된 이중특이성 4가 항체는 국제특허출원 공개 제 WO 1995/009917 호에 보고되어 있다. 국제특허출원 공개 제 WO 2007/109254 호에는 안정화된 scFv로 이루어지거나 이를 포함하는 안정화된 결합 분자가 보고되어 있다.

[0007] 문헌 [Muller, D., Et al., Handbook of Therapeutic antibodies, Part III, Chapter 2, 345-378 (2008)]은 이중특이성 항체, 예를 들면, 중쇄의 C-말단에서 펩티드 링커를 통해 2개의 scFv 단편이 융합된 전장 항체를 언급하고 있다(또한 국제특허출원 공개 제 WO 1995/009917 호 참조). 문헌 [Hust, M., et al., BMC Biotechnology 7 (2007)]은 단일쇄 Fab(scFab) 단편을 언급하고 있다.

[0008] 그러나, 다중특이성 항체의 다양한 문제 및 태양들(예를 들면, 약동학적 및 생물학적 성질, 안정성, 응집성, 발현 수율)을 고려하여, 또 다른 대안적인 다중특이성 항체 포맷에 대한 요구가 존재한다. 국제특허출원 공개 제 WO 1995/009917 호 및 문헌 [Muller D., et al., Handbook of Therapeutic antibodies, Part III, Chapter 2, 345-378 (2008)]에 보고된, 특히 유전자 처리된 이중특이성 4가 항체는 매우 낮은 발현 수율만을 나타내었다.

발명의 내용

[0009] 본 발명의 첫 번째 태양은 다음을 포함하는 다중특이성 항체이다:

[0010] (a) 1차 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어지는 전장 항체; 및

[0011] (b) 1 내지 4개의 추가 항원(바람직하게는 1개의 추가 항원에 특이적으로 결합하는)에 특이적으로 결합하는 1개 이상의 단일쇄 Fab [여기서, 상기 (b)의 단일쇄 Fab 단편은 상기 (a)의 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 펩티드 연결자(connector)를 통해 상기 전장 항체에 융합된다].

[0012] 본 발명의 바람직한 태양은 다음을 포함하는 다중특이성 항체이다:

[0013] (a) 1차 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어지는 전장 항체; 및

[0014] (b) 1 내지 4개의 추가 항원(바람직하게는 1개의 추가 항원에 특이적으로 결합하는)에 특이적으로 결합하는 1 내지 4개의 단일쇄 Fab [여기서, 상기 (b)의 단일쇄 Fab 단편은 상기 (a)의 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합된다].

[0015] 바람직하게, 상기 다중특이성 항체는 2차 항원에 결합하는 1 또는 2개의 단일쇄 Fab 단편을 포함한다(이중특이성 항체).

[0016] 바람직하게, 상기 다중특이성 항체는 2차 항원에 결합하는 2개의 단일쇄 Fab 단편을 포함한다(이중특이성 항체).

[0017] 바람직하게, 상기 다중특이성 항체는 2차 항원 및 3차 항원에 결합하는 2개의 단일쇄 Fab 단편을 포함한다(삼중특이성 항체).

[0018] 본 발명의 또 다른 태양은 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에 융합되어 있는 상기 다중특이성 항체의 쇄를 암호화하는 핵산 분자이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 태양은 상기 다중특이성 항체를 포함하는 약학 조성물이다.

[0020] 본 발명에 따른 다중특이성 항체는, 예를 들면, 2개의 scFv 단편이 중쇄의 C-말단에서 펩티드 링커에 의해 융합된 전장 항체와 비교하여, 높은 안정성, 낮은 응집 경향(예를 들면, 실시예 2 참조)과 같은 유용한 성질을 나타내었다(국제특허출원 공개 제 WO 1995/009917 호 또는 문헌 [Muller, D., et al., Handbook of Therapeutic antibodies, Part III, Chapter 2, 345-378 (2008)] 참조). 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 한편으로는 상이한 항원에 대한 그의 결합으로 인한 새로운 성질을 나타내며, 다른 한편으로는 그의 우수한 안정성, 낮은 응집성 및 유용한 약동학적 및 생물학적 성질로 인해 생산 및 약학 제형에 적합하다. 그의 Ig 코어 및 포유동물 발현 시스템에서 생산되는 능력으로 인해, 이들은 여전히 ADCC 및 CDC와 같은 천연 항체의 성질을 유지한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 전형적인 순서로 가변 및 불변 영역을 포함하는 2쌍의 중쇄 및 경쇄를 갖는 1차 항원 1에 특이적으로 결합하는 CH4 영역을 갖지 않는 전장 항체의 도식적 구조이다.

도 2는 예를 들면, 2차 항원 2에 특이적으로 결합하는 4개의 가능한 단일쇄 Fab 단편의 도식적 구조이다.

도 3은 1차 항원 1에 특이적으로 결합하는 전장 항체 및 2차 항원 2에 특이적으로 결합하는 2개의 단일쇄 Fab를 포함하는 본 발명에 따른 다중특이성 항체의 도식적 구조(이중특이성 4가 항체의 예)이다.

도 4는 IGF-1R에 특이적으로 결합하는 전장 항체 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab를 포함하는 본 발명에 따른 이중특이성 항체 - ScFab-XGFR1 분자 A, B, C 및 D, 및 정제후 발현 수준을 나타낸 것이다. A: 중쇄의 C-말단에 융합된 scFab(VH-CH1-링커-VL-CL), B: 중쇄의 C-말단에 융합된 추가 VH44-VL100 다이설파이드 가교를 갖는 scFab(VH-CH1-링커-VL-CL), C: 경쇄의 C-말단에 융합된 scFab(VH-CH1-링커-VL-CL), D: 경쇄의 C-말단에 융합된 추가 VH44-VL100 다이설파이드 가교를 갖는 scFab(VH-CH1-링커-VL-CL).

도 5는 EGFR에 특이적으로 결합하는 전장 항체 및 IGF-1R에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab를 포함하는 본 발명에 따른 이중특이성 항체 - ScFab-XGFR2 분자 A, B, C 및 D를 나타낸 것이다. A: 중쇄의 C-말단에 융합된 scFab(VH-CH1-링커-VL-CL), B: 중쇄의 C-말단에 융합된 추가 VH44-VL100 다이설파이드 가교를 갖는 scFab(VH-CH1-링커-VL-CL), C: 경쇄의 C-말단에 융합된 scFab(VH-CH1-링커-VL-CL), D: 경쇄의 C-말단에 융합된 추가 VH44-VL100 다이설파이드 가교를 갖는 scFab(VH-CH1-링커-VL-CL).

도 6은 1차 항원 1에 특이적으로 결합하는 전장 항체 및 2차 항원 2에 특이적으로 결합하는 1개의 단일쇄 Fab를 포함하는 본 발명에 따른 다중특이성 항체의 도식적 구조(놉(knob) 및 홀(hole)을 갖는 이중특이성 3가 항체의 예)이다.

도 7은 1차 항원 1에 특이적으로 결합하는 전장 항체, 2차 항원 2에 특이적으로 결합하는 1개의 단일쇄 Fab 및 3차 항원 3에 특이적으로 결합하는 1개의 단일쇄 Fab를 포함하는 본 발명에 따른 다중특이성 항체의 도식적 구조(놉 및 홀을 갖는 삼중특이성 4가 항체의 예)이다.

도 8은 단일쇄 Fab 함유 이중특이성 항체 유도체 saFab-XGFR1의 SDS-PAGE 분석 결과이다. 1: scFab-XGFR1_4720(환원되지 않음), 2: scFab-XGFR1_4721(환원되지 않음), 3: scFab-XGFR1_4720(환원됨), 4: scFab-XGFR1_4721(환원됨).

도 9는 scFab 함유 이중특이성 항체 유도체 saFab-XGFR1의 HP-SEC 분석 결과이다. 도 9a: scFab-XGFR1-4720; 7.7% 응집(박스안에 표시), 도 9b: scFab-XGFR1-4721; 3.5% 응집(박스안에 표시).

도 10은 EGFR 및 IGF1R에 대한 scFab-XGFR1 및 scFab-XGFR2의 결합을 나타낸 것이다. 도 10a: 비아코어(Biacore) 다이어그램 - EGFR에 대한 scFab-XGFR1_2720의 결합, KD = 2 nM, 도 10b: 비아코어 다이어그램 - IGF-1R에 대한 scFab-XGFR1_2720의 결합, KD = 2 nM, 도 10c: 비아코어 다이어그램 - EGFR에 대한 scFab-XGFR2_2720의 결합, KD = 0.5 nM, 도 10d: 비아코어 다이어그램 - IGF-1R에 대한 scFab-XGFR2_2720의 결합, KD = 11 nM.

도 11은 하기의 일반 절차를 사용한 FACS 경쟁분석에 의해 분석된 세포에 대한 scFab-XGFR의 결합 도식이다: - 알렉사(Alexa)647로 표지된 <IGF1R> Mab(1 µg/mL) 및 동시에 비표지된 scFab-XGFR(100 내지 0.00 µg/mL)을 가한다; - 얼음상에서 45 분간 접종하고, 세척하고, 미결합 항체를 제거한다; - 1% HCHO로 고정된 후 FACS를 수행한다.

도 12는 FACS 경쟁분석에 의해 분석된 세포에 대한 scFab-XGFR_2721 및 모<IGF1R> 클론18의 결합의 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 12a: <IGF-1R> 클론 18(0, 18 µg/mL) 및 scFab-XGFR_2721(0, 15 µg/mL)의 IC50 값의 비교, 도 12b: <IGF-1R>클론 18의 결합 곡선(변곡점 0, 11 µg/mL) - y-축 = RLU; x-축 = 항체 농도(µg/mL), 도 12c: scFab-XGFR_2721의 결합 곡선(변곡점 0, 10 µg/mL) - y-축 = RLU; x-축 = 항체 농도(µg/mL).

도 13은 상이한 scFab-XGFR 변이체(100 nM)로 접종한지 24 시간후 H322M-세포에 대한 IGF-1R의 하향조절을 나타낸 것이다.

도 14는 상이한 scFab-XGFR 변이체(100 nM)로 접종한지 24 시간후 H322M-세포에 대한 EGFR의 하향조절을 나타낸 것이다.

도 15는 상이한 scFab-XGFR 변이체(100 nM)에 의한 H322M-세포로부터의 증식 억제를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명의 첫 번째 태양은 다음을 포함하는 다중특이성 항체이다:

[0023] (a) 1차 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어지는 전장 항체; 및

- [0024] (b) 1 내지 4개의 추가 항원(바람직하게는 1개의 추가 항원에 특이적으로 결합하는)에 특이적으로 결합하는 1개 이상의 단일쇄 Fab [여기서, 상기 (b)의 단일쇄 Fab 단편은 상기 (a)의 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합된다].
- [0025] 본 발명의 바람직한 태양은 다음을 포함하는 다중특이성 항체이다:
- [0026] (a) 1차 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어지는 전장 항체; 및
- [0027] (b) 1 내지 4개의 추가 항원(바람직하게는 1개의 추가 항원에 특이적으로 결합하는)에 특이적으로 결합하는 1 내지 4개의 단일쇄 Fab [여기서, 상기 (b)의 단일쇄 Fab 단편은 상기 (a)의 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합된다].
- [0028] 한 양태에서, 2차 항원에 결합하는 1 또는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0029] 한 양태에서, 2차 항원에 결합하는 1 또는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0030] 한 양태에서, 2차 항원에 결합하는 1 또는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 경쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0031] 한 양태에서, 2차 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0032] 한 양태에서, 2차 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 각 중쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0033] 한 양태에서, 2차 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 각 경쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0034] 용어 "전장 항체"는 2개의 "전장 항체 중쇄" 및 2개의 "전장 항체 경쇄"로 이루어지는 항체를 의미한다(도 1 참조). "전장 항체 중쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로, 항체 중쇄 가변 영역(VH), 항체 불변 중쇄 영역 1(CH1), 항체 힌지 영역(HR), 항체 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 항체 중쇄 불변 영역 3(CH3)(VH-CH1-HR-CH2-CH3으로 약칭); 및 서브클래스 IgE의 항체인 경우 선택적으로 항체 중쇄 불변 영역 4(CH4)으로 이루어지는 폴리펩티드이다. 바람직하게, "전장 항체 중쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH, CH1, HR, CH2 및 CH3으로 이루어지는 폴리펩티드이다. "전장 항체 경쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 경쇄 불변 영역(CL)로 이루어지는(VL-CL로 약칭) 폴리펩티드이다. 항체 경쇄 불변 영역(CL)은 κ (카파) 또는 λ (람다)일 수 있다. 2개의 전장 항체 쇠는 CL 영역과 CH1 영역사이에 및 전장 항체 중쇄의 힌지 영역 사이에 폴리펩티드간 다이설파이드 결합에 의해 서로 연결된다. 전형적인 전장 항체의 예는 IgG(예를 들면, IgG1 및 IgG2), IgM, IgA, IgD 및 IgE와 같은 천연 항체이다. 본 발명에 따른 전장 항체는 단일 중, 예를 들면, 인간으로부터 유래될 수 있거나, 또는 키메라화 또는 인간화된 항체일 수 있다. 본 발명에 따른 전장 항체는, 둘다 동일 항원에 특이적으로 결합하는, 한 쌍의 VH 및 VL에 의해 각각 형성된 2개의 항원 결합 부위를 포함한다. 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단은 상기 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서의 마지막 아미노산을 의미한다. 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단은 상기 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에서의 마지막 아미노산을 의미한다.
- [0035] "단일쇄 Fab 단편"(도 2 참조)은 항체 중쇄 가변 영역(VH), 항체 불변 영역1(CH1), 항체 경쇄 가변 영역(VL), 항체 경쇄 불변 영역(CL) 및 링커로 이루어진 폴리펩티드이며, 여기서 상기 항체 영역 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 순서: a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1, 또는 d) VL-CH1-링커-VH-CL 중 1개를 가지며; 상기 링커는 30 개 이상의 아미노산, 바람직하게는 32 내지 50개의 아미노산을 갖는 폴리펩티드이다. 상기 단일쇄 Fab 단편 a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 및 d) VL-CH1-링커-VH-CL은 CL 영역과 CH1 영역 사이의 천연 다이설파이드 결합에 의해 안정화된다. 용어 "N-말단"은 N-말단의 마지막 아미노산을 의미하고, 용어 "C-말단"은 C-말단의 마지막 아미노산을 의미한다.
- [0036] 바람직한 양태에서, 상기 단일쇄 Fab 단편에서 상기 항체 영역 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 순서 중 1개를 갖는다: a) VH-CH1-링커-VL-CL, 또는 b) VL-CL-링커-VH-CH1, 보다 바람직하게는 VL-CL-링커-

VH-CH1.

- [0037] 또 다른 바람직한 양태에서, 상기 단일쇄 Fab 단편에서 상기 항체 영역 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 순서 중 1개를 갖는다: a) VH-CH1-링커-VL-CL, 또는 b) VL-CL-링커-VH-CH1.
- [0038] 선택적으로, 상기 단일쇄 Fab 단편에서, CL-영역과 CH1 영역 사이에 천연 다이설파이드 결합에 추가적으로, 또한 항체 중쇄 가변 영역(VH) 및 항체 경쇄 가변 영역(VL)은 하기 위치 사이에 다이설파이드 결합의 도입에 의해 안정화된다:
- [0039] i) 중쇄 가변 영역 위치 44 대 경쇄 가변 영역 위치 100,
- [0040] ii) 중쇄 가변 영역 위치 105 대 경쇄 가변 영역 위치 43, 또는
- [0041] iii) 중쇄 가변 영역 위치 101 대 경쇄 가변 영역 위치 100(번호는 항상 카바트(Kabat)의 EU 지수에 따른다).
- [0042] 단일쇄 Fab 단편의 상기 또 다른 다이설파이드 안정화는 단일쇄 Fab 단편의 가변 영역 VH 및 VL 사이에 다이설파이드 결합의 도입에 의해 달성된다. 단일쇄 Fv의 안정화를 위해 비천연 다이설파이드 가교를 도입하는 기술은, 예를 들면, 국제특허출원 공개 제 WO 94/029350 호, 문헌 [Rajagopal, V., et al., Prot. Engin. 10, 1453-1459 (1997); Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology 25, 387-393 (1998); 또는 Schmidt, M., et al., Oncogene 18, 1711-1721 (1999)]에 기술되어 있다. 한 양태에서, 본 발명에 따른 항체에 포함된 단일쇄 Fab 단편의 가변 영역들 사이의 선택적 다이설파이드 결합은 중쇄 가변 영역 위치 44와 경쇄 가변 영역 위치 100 사이에 존재한다. 한 양태에서, 본 발명에 따른 항체에 포함된 단일쇄 Fab 단편의 가변 영역들 사이의 선택적 다이설파이드 결합은 중쇄 가변 영역 위치 105와 경쇄 가변 영역 위치 43 사이에 존재한다(번호는 항상 카바트의 EU 지수에 따른다).
- [0043] 한 양태에서, 단일쇄 Fab 단편의 가변 영역 VH와 VL 사이에 상기 선택적인 다이설파이드 안정화를 갖지 않는 단일쇄 Fab 단편이 바람직하다.
- [0044] 본 발명에서 사용된 바와 같은 용어 "펩티드 연결자"는 바람직하게는 합성 기원을 갖는 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 의미한다. 본 발명에 따른 이들 펩티드 연결자는 단일쇄 Fab 단편을 전장 항체의 C-말단 또는 N-말단에 융합시켜 본 발명에 따른 다중특이성 항체를 생성하기 위해 사용된다. 바람직하게, 상기 (b)의 펩티드 연결자는 5개 이상의 아미노산의 길이, 바람직하게는 5개 이상 내지 100개, 보다 바람직하게는 10 내지 50개 아미노산의 길이를 갖는 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다. 한 양태에서, 상기 펩티드 연결자는 (GxS)_n 또는 (GxS)_nG_m으로, 여기서 G는 글라이신이고, S는 세린이고, (x는 3이고, n은 3, 4, 5 또는 6이고, m은 0, 1, 2 또는 3이거나) 또는 (x는 4이고, n은 2, 3, 4 또는 5이고, m은 0, 1, 2 또는 3이고), 바람직하게 x는 4이고 n은 2 또는 3이고, 보다 바람직하게는 x는 4이고, n은 2이다. 한 양태에서, 상기 펩티드 연결자는 (G₄S)₂이다.
- [0045] 본 발명에서 사용된 바와 같은 용어 "링커"는 바람직하게는 합성 기원을 갖는 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 의미한다. 본 발명에 따른 상기 펩티드는 (a) VH-CH1을 VL-C1에, (b) VL-CL을 VH-CH1에, (c) VH-CL을 VL-CH1에, 또는 (d) VL-CH1을 VH-CL에 연결시켜 본 발명에 따른 다음의 단일쇄 Fab 단편을 생성하기 위해 사용된다: (a) VH-CH1-링커-VL-C1, (b) VL-CL-링커-VH-CH1, (c) VH-CL-링커-VL-CH1, 또는 (d) VL-CH1-링커-VH-CL. 단일쇄 Fab 단편내의 상기 링커는 30개 이상의 아미노산의 길이, 바람직하게는 32 내지 50개 아미노산의 길이를 갖는 아미노산을 갖는 펩티드이다. 한 양태에서, 상기 링커는 (GxS)_n으로, 여기서 G는 글라이신이고, S는 세린이고, (x는 3이고, n은 8, 9 또는 10이고, m은 0, 1, 2 또는 3이거나) 또는 (x는 4이고, n은 6, 7 또는 8이고, m은 0, 1, 2 또는 3이고), 바람직하게 x는 4이고 n은 6 또는 7이고, 보다 바람직하게는 x는 4이고, n은 7이고 m은 2이다. 한 양태에서, 상기 펩티드 연결자는 (G₄S)₆G₂이다.
- [0046] 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 각각의 C-말단 또는 N- 말단에는 상기 (b)의 단일쇄 Fab 단편으로부터 1개만이 동시에 융합될 수 있다. 따라서, 8개 이하의 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체에 융합될 수 있다. 바람직하게, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 1 내지 4개의 단일쇄 Fab 단편을 포함한다. 보다 바람직하게, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 둘 다 상기 (a)의 전장 항체의 2개의 중쇄의 2개의 C-말단에 또는 2개의 경쇄의 2개의 C-말단에 융합되어 있는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편(바람직하게는 VL-CL-링커-VH-CH1)을 포함한다. 상기 융합은 전장 항체의 (i) 경쇄 또는 중쇄와 동시발현되어 본 발명에 따른 다중특이성 항체를 제공하는 2개의 동일한 융합 펩티드((i) 중쇄 및 단일쇄 Fab 단편, 또는 (ii) 경쇄 및 단일쇄 Fab 단편)를 제공한다(도 3, 4 및 5 참조).
- [0047] 또 다른 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 둘 다 상기 (a)의 전장 항체의 2개의 중쇄의 2

개의 N-말단에 또는 2개의 경쇄의 2개의 N-말단에 융합되어 있는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편(바람직하게는, VH-CH1-링커-VL-CL)을 포함한다. 상기 융합은 전장 항체의 (i) 경쇄 또는 중쇄와 동시발현되어 본 발명에 따른 다중특이성 항체를 제공하는 2개의 동일한 융합 펩티드((i) 중쇄 및 단일쇄 Fab 단편, 또는 (ii) 경쇄 및 단일쇄 Fab 단편)를 제공한다.

- [0048] 본 발명에 따른 다중특이성 항체의 2개의 부분 모두 항원-결합 부위를 포함한다(본 발명에 따른 전장 항체는 2개의 항원 결합 부위를 포함하고, 각각의 단일쇄 Fab 단편은 1개의 항원 결합 부위를 포함한다). 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결합 부위" 또는 "항원-결합 부위"는 각각의 항원이 실질적으로 특이적으로 결합하는 본 발명에 따른 상기 다중특이성 항체의 영역(들)을 의미한다. 전장 항체에서든 또는 단일쇄 Fab 단편에서든 항원 결합 부위는 각각 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)으로 이루어진 쌍에 의해 형성된다.
- [0049] 목적 항원(예, EGFR)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 부위는 (a) 항원에 대해 공지된 항체(예, 항-EGFR 항체)로부터, 또는 (b) 무엇보다 항원 단백질 또는 핵산 또는 그의 단편을 사용하는 신생 면역화 방법에 의해 또는 파지 디스플레이에 의해 수득된 새로운 항체 또는 항체 단편으로부터 유도될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 항체의 항원-결합 부위는 항원에 대한 결합 부위의 친화도에 다양한 정도로 기여하는 6개의 상보성 결정 영역(CDR)을 함유한다. 3개의 중쇄 가변 영역 CDR(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 3개의 경쇄 가변 영역 CDR(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)이 존재한다. CDR 및 프레임워크 영역(FR)의 크기는 상기 영역들이 서열들 중 가변성에 따라 정의된 아미노산 서열의 편집된 데이터베이스와 비교하여 결정된다.
- [0051] 항체 특이성은 항원의 특정 에피토프에 대한 항체의 선택적 인식을 말한다. 예를 들면, 천연 항체는 단일특이성이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "다중특이성" 항체는 적어도 2개가 상이한 항원 또는 동일 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 2개 이상의 항원-결합 부위를 갖는 항체를 의미한다. 본 발명에 따른 "이중특이성" 항체는 2개의 상이한 항원-결합 특이성을 갖는 항체이다. 본 발명의 항체는, 예를 들면, 2개 이상의 상이한 항원, 즉, 1차 항원으로 EGFR 및 2차 항원으로 IGF-1R에 대해 다중특이성이다. 본 발명의 한 양태에서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 이중특이성이다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 삼중특이성이다.
- [0052] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단일특이성" 항체는 그 각각이 동일 항원의 동일 에피토프에 결합하는 1개 이상의 결합 부위를 갖는 항체를 의미한다.
- [0053] 본 출원에 사용된 바와 같은 용어 "-가"는 항체 분자에 특정 수의 결합 부위의 존재를 의미한다. 예를 들어, 천연 항체 또는 본 발명에 따른 전장 항체는 2개의 결합 부위를 가지며 2가이다. 따라서, 용어 "3가", "4가", "5가" 및 "6가"는 항체 분자중에 각각 2개의 결합 부위, 3개의 결합 부위, 4개의 결합 부위, 5개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위의 존재를 의미한다. 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 적어도 "3가"이다. 바람직하게, 이들은 "3가", "4가", "5가" 또는 "6가"이며, 보다 바람직하게, 이들은 "3가" 또는 "4가"이다.
- [0054] 본 발명의 항체는 3개 이상의 결합 부위를 가지며 다중특이성, 바람직하게는 2중특이성 또는 3중특이성이다. 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 3개보다 많은 결합 부위가 존재하는(즉, 항체가 4가, 5가 또는 6가 또는 다가인) 경우에도 2중특이성일 수 있다. 2개보다 많은 항원 결합 부위를 갖는 항체의 경우, 일부 결합 부위는, 단백질이 2개의 상이한 항원에 대한 결합 부위를 갖는 한 동일할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 양태는 다음을 포함하는 다중특이성 항체이다:
- [0056] (a) 1차 항원에 특이적으로 결합하며, (aa) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 영역(VH), 항체 중쇄 불변 영역 1(CH1), 항체 힌지 영역(HR), 항체 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 항체 중쇄 불변 영역 3(CH3)으로 이루어진 2개의 동일한 항체 중쇄; 및 (ab) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 경쇄 불변 영역(CL)로 이루어진 2개의 동일한 항체 경쇄(VL-CL)로 이루어진 전장 항체; 및
- [0057] (b) 1 내지 4개의 또 다른 항원에 특이적으로 결합하는(바람직하게는 1개의 추가 항원에 특이적으로 결합하는) 1 내지 4개의 단일쇄 Fab 단편[여기서, 단일쇄 Fab 단편은 항체 중쇄 가변 영역(VH) 및 항체 불변 영역 1(CH1), 항체 경쇄 가변 영역(VL), 항체 경쇄 불변 영역(CL) 및 링커로 이루어지고; 상기 항체 영역 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 순서: (ba) VH-CH1-링커-VL-CL, (bb) VL-CL-링커-VH-CH1, (bc) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 (bd) VL-CH1-링커-VH-CL 중 1개를 가지며 30개 이상의 아미노산, 바람직하게는 32 내지 50개 아미노산의 펩티드이고; 상기 (b)의 단일쇄 Fab 단편은 상기 (a)의 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되며; 상기 펩티드 연결자는 5개 이상의 아미노산, 바람직하게

는 10 내지 50개 아미노산의 펩티드이다].

- [0058] 상기 양태에 있어서, 2차 항원에 특이적으로 결합하는, 바람직하게 1 또는 2개, 보다 바람직하게는 2개의 단일쇄 Fab 단편 (ba) VH-CH1-링커-VL-CL 또는 (bb) VL-CL-링커-VH-CH1, 바람직하게는 (bb) VL-CL-링커-VH-CH1은 상기 전장 항체의 중쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되며, 단일쇄 Fab 단편은 다 이설파이드 안정화되지 않는다.
- [0059] 본 발명의 한 양태는, 2차 항원에 결합하는 1 또는 2개의 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체의 중쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는 본 발명에 따른 다중특이성 항체이다(이중특이성 항체).
- [0060] 바람직하게, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는, 둘 다 중쇄에 융합되거나 또는 둘 다 경쇄 C-말단 또는 N-말단에 융합되어 있는 2차 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편을 포함한다(이중특이성 항체).
- [0061] 본 발명의 한 양태는, 2차 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편 VL-CL-링커-VH-CH1 또는 VH-CH1-링커-VL-CL, 바람직하게는 VL-CL-링커-VH-CH1의 N-말단이 상기 전장 항체의 2개의 중쇄의 2개의 C-말단에서 또는 상기 전장 항체의 2개의 경쇄의 2개의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는 본 발명에 따른 다중특이성 항체이다(4개의 이중특이성 항체). 바람직한 태양에서, 본 발명에 따른 상기 다중특이성 항체(바람직하게는 상기 4개의 이중특이성 항체)는 전장 IgG 및 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편을 함유하며, 인간 IGF-1R 및 인간 EGFR에 특이적으로 결합한다. 상기 분자들은 바람직하게는 인간 항-IGF-1R 항체 <IGF-1R> HUMAB 클론 18(DSM ACC 2587; 국제특허출원 공개 제 WO 2005/005635 호, <IGF-1R>클론 18 또는 <IGF-1R> AK18로 약칭) 및 인간화 <EGFR>ICR62(국제특허출원 공개 제 WO 2006/082515 호, <EGFR>ICR62로 약칭)의 항원-결합 부위를 기초로 한다. 상기 분자들은 중앙 세포에 대한 2개 수용체 티로신 키나제의 작용을 동시에 표적화하고 상기 작용을 방해한다. 상기 이중 활성은 상기 수용체들 중 하나만을 방해하는 항체에 비해 현저히 개선된 항종양 활성을 야기한다. 상기 분자의 디자인, 조성, 제조 및 특성분석은 실시예 1 내지 6에 나타내었다.
- [0062] 따라서, 한 태양에서 본 발명에 따른 상기 다중특이성 항체는, (i) 상기 전장 항체가 IGF1R에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역에 서열번호: 1의 CDR3 영역, 서열번호: 2의 CDR2 영역 및 서열번호: 3의 CDR1 영역을 포함하고 경쇄 가변 영역에 서열번호: 4의 CDR3 영역, 서열번호: 5의 CDR2 영역 및 서열번호: 6의 CDR1 영역을 포함하며; (ii) 상기 단일쇄 Fab 단편이 EGFR에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역에 서열번호: 9의 CDR3 영역, 서열번호: 10의 CDR2 영역 및 서열번호: 11의 CDR1 영역을 포함하고 경쇄 가변 영역에 서열번호: 12의 CDR3 영역, 서열번호: 13의 CDR2 영역 및 서열번호: 14의 CDR1 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0063] 한 양태에서, 본 발명에 따른 상기 다중특이성 항체는, (i) 상기 전장 항체가 IGF-1R에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역으로 서열번호: 7, 및 경쇄 가변 영역으로 서열번호: 8을 포함하며; (ii) 상기 단일쇄 Fab 단편이 EGFR에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역으로 서열번호: 15, 및 경쇄 가변 영역으로 서열번호: 16을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0064] 한 양태에서, 본 발명에 따른 상기 다중특이성 항체는, (i) 상기 전장 항체가 EGFR에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역에 서열번호: 9의 CDR3 영역, 서열번호: 10의 CDR2 영역 및 서열번호: 11의 CDR1 영역을 포함하고 경쇄 가변 영역에 서열번호: 12의 CDR3 영역, 서열번호: 13의 CDR2 영역 및 서열번호: 14의 CDR1 영역을 포함하며; (ii) 상기 단일쇄 Fab 단편이 IGF1R에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역에 서열번호: 1의 CDR3 영역, 서열번호: 2의 CDR2 영역 및 서열번호: 3의 CDR1 영역을 포함하고 경쇄 가변 영역에 서열번호: 4의 CDR3 영역, 서열번호: 5의 CDR2 영역 및 서열번호: 6의 CDR1 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0065] 한 양태에서, 본 발명에 따른 상기 다중특이성 항체는, (i) 상기 전장 항체가 EGFR에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역으로 서열번호: 15, 및 경쇄 가변 영역으로 서열번호: 16을 포함하며; (ii) 상기 단일쇄 Fab 단편이 IGF-1R에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역으로 서열번호: 7, 및 경쇄 가변 영역으로 서열번호: 8을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0066] 본 발명의 한 양태는, 2차 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편 VL-CL-링커-VH-CH1 또는 VH-CH1-링커-VL-CL, 바람직하게는 VL-CL-링커-VH-CH1의 C-말단이 상기 전장 항체의 2개의 중쇄의 2개의 N-말단에서 또는 상기 전장 항체의 2개의 경쇄의 2개의 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는 본 발명에 따른 다중특이성 항체이다.
- [0067] 본 발명의 한 양태는, 2차 항원에 결합하는 1개의 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체의 1개의 중쇄 또는 1개의

경쇄의 C 또는 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는 본 발명에 따른 다중특이성 항체이다. 본 발명의 한 양태는, 2차 항원에 결합하는 1개의 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체의 1개의 중쇄 또는 1개의 경쇄의 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는 본 발명에 따른 다중특이성 항체이다. 본 발명의 한 양태는, 2차 항원에 결합하는 1개의 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체의 1개의 중쇄 또는 1개의 경쇄의 C-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되어 있는 본 발명에 따른 다중특이성 항체이다(예를 들면, 도 6 참조).

[0068] 바람직하게, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 2차 항원 및 3차 항원에 결합하는 2개의 단일쇄 Fab 단편을 포함한다(삼중특이성 항체)(예를 들면, 도 7 참조).

[0069] 본 발명의 또 다른 양태로, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 (a) 2개의 동일한 항체 중쇄 VH-CH1-HR-CH2-CH3 및 2개의 동일한 항체 경쇄 VL-CL로 이루어진 1차 항원에 결합하는 전장 항체; 및 (b) 1 내지 4개의 추가 항원에 결합하는 1 내지 4개의 단일쇄 Fab 단편 (ba) VH-CH1-링커-VL-CL 또는 (bb) VL-CL-링커-VH-CH1[여기서, 상기 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 및 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 연결된다]을 포함한다.

[0070] 본 발명의 전장 항체는 1개 이상의 면역글로불린 부류의 면역글로불린 불변 영역을 포함한다. 면역글로불린 부류로는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 이소타입 및 IgG 및 IgA의 경우 그의 아형이 포함된다. 바람직한 태양에서, 본 발명의 전장 항체는 IgG 타입 항체의 불변 영역 구조를 갖는다.

[0071] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "단클론성 항체" 또는 "단클론성 항체 조성물"은 단일 아미노산 조성을 갖는 항체 분자의 제제를 말한다.

[0072] 용어 "키메라성 항체"는 한 공급원 또는 종으로부터의 가변 영역, 즉, 결합 영역, 및 상이한 공급원 또는 종으로부터 유도된 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는, 통상적으로 재조합 DNA 기술에 의해 제조된 항체를 말한다. 무인 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라성 항체가 바람직하다. 본 발명에 포함되는 "키메라성 항체"의 다른 바람직한 형태는 불변 영역이 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합과 관련하여 본 발명에 따른 성질을 제공하기 위해 원래 항체로부터 변형되거나 변화된 형태이다. 상기 키메라성 항체는 또한 "부류-전환 항체"로도 지칭된다. 키메라성 항체는 면역글로불린 가변 영역을 암호화하는 DNA 절편 및 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 DNA 절편을 포함하는 발현된 면역글로불린 유전자의 산물이다. 키메라성 항체를 제조하는 방법은 통상적인 재조합 DNA 및 유전자 형질감염 기술을 포함하며 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, 문헌 [Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855 (1984)]; 미국 특허 제 5,202,238 호 및 미국 특허 제 5,204,244 호 참조).

[0073] 용어 "인간화된 항체"는 프레임워크 또는 "상보성 결정 영역"(CDR)이 모 면역글로불린과 비교할 때 상이한 특이성을 갖는 면역글로불린의 CDR을 포함하도록 변형된 항체를 말한다. 바람직한 양태에서, 무인 CDR은 "인간화 항체"를 제조하기 위해 인간 항체의 프레임워크 영역내에 그래프트된다(예를 들면, 문헌 [Riechmann, L., et al., Nature 332, 323-327 (1988); and Neuberger, M.S., et al., Nature 314, 268-270 (1985)] 참조). 특히 바람직한 CDR은 키메라성 항체에 대해 상기 언급한 항원을 인지하는 서열을 나타내는 것에 상응한다. 본 발명에 포함되는 "인간화 항체"의 다른 형태는, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합과 관련하여, 본 발명에 따른 성질을 제공하기 위해 불변 영역이 원래 항체의 불변 영역으로부터 추가로 변형되거나 변화된 항체이다.

[0074] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것이다. 인간 항체는 당해 분야에 공지되어 있다[van Dijk, M.A., and van de Winkel, J., G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 268-274 (2001)]. 인간 항체는 또한, 면역화시 내인성 면역글로불린 생성의 부재하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 유전자전이 동물(예를 들면, 마우스)에서 생성될 수 있다. 상기 생식 계열 돌연변이 마우스에서 인간 생식 계열 면역글로불린 유전자 배열의 전이는 항원 자극시 인간 항체의 생성을 야기할 것이다(예를 들면, 문헌 [Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-2555 (1993); Jakobovits, A., et al., Nature 362, 255-258 (1993); Brueggemann, M., et al., Year Immunol. 7, 33-40 (1993)] 참조). 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리에서 생성될 수 있다[Hoogenboom, H.R., and Winter, G.J. Mol. Biol. 227, 381-388 (1992); Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)]. 콜(Cole) 등 및 보르너(Boerner) 등의 기술은 또한 인간 단클론성 항체의 제조에 이용가능하다[Cole, S.P.C., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77 (1985); and Boerner, P., et al., J. Immunol. 147, 86-95 (1991)]. 본 발명에 따른 키메라 및 인간화 항체에 대해 이미 언급했듯이, 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "인간 항체"는 또한, 예를 들면, "부류 전환", 즉,

Fc 부분의 변화 또는 돌연변이(예를 들면, IgG1으로부터 IgG4 및/또는 IgG1/IgG4 돌연변이로)에 의해, 특히 C1q 결합 및/또는 FcR 결합과 관련하여, 본 발명에 따른 성질을 제공하기 위해 불변 영역에서 변형된 상기 항체를 포함한다.

- [0075] 본 발명에 따른 다중특이성 항체가 헤테로이량체 융합 펩티드를 야기하는 1 또는 3개의 단일쇄 Fab 단편을 포함하는 경우(또는 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 둘 다에 결합되는 2개의 동일하지 않은 단일쇄 단편을 포함하는 경우), 본 발명에 따른 상기 전장 항체의 CH3 영역은 "뿔-인투-홀(knob-into-hole)" 기술에 의해 변형될 수 있으며, 상기 기술은 예를 들면, 국제특허출원 공개 제 WO 96/027011 호 문헌 [Ridgway, J.B., et al., Protein Eng 9, 617-621 (1996); and Merchant, A.M., et al., Nat Biotechnol 16, 677-681 (1998)]에 여러 예와 함께 상세히 기술되어 있다. 상기 방법에서는, 2개의 CH3 영역의 상호작용 표면이 상기 2개의 CH3 영역을 함유하는 2개의 중쇄의 헤테로이량체화를 증가시키도록 변형된다. (두 중쇄의) 2개의 CH3 영역은 각각 "뿔"일 수 있는 한편, 다른 1개는 "홀"일 수 있다. 다이설파이드 가교의 도입은 헤테로이량체를 안정화시키고 [Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16, 677-681 (1998); Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270, 26-35 (1997)], 수율을 증가시킨다.
- [0076] 따라서, 본 발명의 한 태양에서, 본 발명에 따른 상기 다중특이성 항체는 단지 1개의 단일쇄 Fab 단편을 포함하며, 또한 한 중쇄의 CH3 영역 및 다른 중쇄의 CH3 영역이 각각 항체 CH3 영역들 사이의 원래의 계면을 포함하는 계면에서 만나는 것을 특징으로 하는데; 이때 상기 계면은 2가의 이중특이성 항체의 생성을 촉진하기 위해 변형되며, 상기 변형은 (a) 한 중쇄의 CH3 영역이 변형되어, 2가의 이중특이성 항체내의 다른 중쇄의 CH3 영역의 원래 계면과 만나는 한 중쇄의 CH3 영역의 원래 계면 내에서, 아미노산 잔기가 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환됨으로써 다른 중쇄의 CH3 영역의 계면내의 공동에 위치할 수 있는 한 중쇄의 CH3 영역의 계면내에 돌출부를 생성하고, (b) 다른 중쇄의 CH3 영역이 변형되어, 3가의 이중특이성 항체내의 제 1 CH3 영역의 원래 계면과 만나는 제 2 CH3 영역의 원래 계면 내에서, 아미노산 잔기가 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 치환됨으로써 제 1 CH3 영역의 계면내의 돌출부가 위치할 수 있는 제 2 CH3 영역의 계면내에 공동을 생성하는 것을 특징으로 한다.
- [0077] 바람직하게, 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W)으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0078] 바람직하게, 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 발린(V)으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0079] 본 발명의 한 태양에서, 2개의 CH3 영역은 모두, 2개의 CH3 영역 사이에 다이설파이드 가교가 생성될 수 있도록 각각의 CH3 영역의 상응하는 위치에 아미노산으로 시스테인(C)의 도입에 의해 추가로 변형된다.
- [0080] 바람직한 양태에서, 상기 다중특이성 항체는 1개의 단일쇄 Fab 단편만을 포함하고 3가의 이중특이성 항체이다. 상기 3가의 이중특이성 항체는 "뿔 쇠"의 CH3 영역에 T366W 돌연변이를 포함하고, "홀 쇠"의 CH3 영역에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 예를 들면, "뿔 쇠"의 CH3 영역내에 Y349C 돌연변이를 도입하고 "홀 쇠"의 CH3 영역내에 S354C를 도입함으로써, CH3 영역 사이에 추가 쇠간 다이설파이드 가교를 또한 사용할 수 있다 [Merchant, A.M. et al., Nature Biotech 16, 677-681 (1998)]. 따라서, 또 다른 바람직한 양태에서, 상기 3가의 이중특이성 항체는 2개의 CH3 영역 중 1개의 CH3 영역에서 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2개의 CH3 영역 중 다른 1개의 CH3 영역에서 E356C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하거나, 또는 상기 3가의 이중특이성 항체는 2개의 CH3 영역 중 1개의 CH3 영역에서 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2개의 CH3 영역 중 다른 1개의 CH3 영역에서 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다(1개의 CH3 영역에서 추가 Y349C 돌연변이 및 다른 CH3 영역에서 추가 E356C 또는 S354C 돌연변이는 쇠간 다이설파이드 가교를 형성한다)(번호는 항상 카바트의 EU 지수에 따른다). 그러나, 또한 EP 1870459 A1 호에 기술된 바와 같은 다른 뿔-인-홀 기술을 대안적으로 또는 추가적으로 사용할 수 있다. 상기 3가 이중특이성 항체의 바람직한 예는 "뿔 쇠"의 CH3 영역에서 R409D; K370E 돌연변이, 및 "홀 쇠"의 CH3 영역에서 D399K; E357K 돌연변이이다(번호는 항상 카바트의 EU 지수에 따른다).
- [0081] 또 다른 바람직한 양태에서, 상기 3가의 이중특이성 항체(1개의 단일쇄 Fab 단편 만을 포함하는 다중특이성 항체)는 "뿔 쇠"의 CH3 영역에 T366W 돌연변이, 및 "홀 쇠"의 CH3 영역에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이, 및 추가적으로 "뿔 쇠"의 CH3 영역에 R409D; K370E 돌연변이, 및 "홀 쇠"의 CH3 영역에 D399K; E357K 돌연변이를 포함한다.
- [0082] 또 다른 바람직한 양태에서, 상기 3가의 이중특이성 항체(1개의 단일쇄 Fab 단편 만을 포함하는 다중특이성 항

체)는 2개의 CH3 영역 중 1개의 CH3 영역에서 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2개의 CH3 영역 중 다른 1개의 CH3 영역에서 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하거나, 또는 상기 3가의 이중특이성 항체는 2개의 CH3 영역 중 1개의 CH3 영역에서 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2개의 CH3 영역 중 다른 1개의 CH3 영역에서 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이, 및 추가적으로 "놉 쇠"의 CH3 영역에서 R409D; K370E 돌연변이, 및 "홀 쇠"의 CH3 영역에서 D399K; E357K 돌연변이를 포함한다.

[0083] 따라서, 본 발명의 한 양태는, 2차 항원에 결합하는 1개의 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체의 1개의 중쇄 또는 1개의 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서(바람직하게는 한 중쇄의 C-말단) 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되고, 전장 항체가 2개의 CH3 영역 중 1개의 CH3 영역에서 T366W 돌연변이 및 2개의 CH3 영역 중 다른 1개의 CH3 영역에서 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하는 본 발명에 따른 다중특이성 항체이다. 본 발명의 또 다른 양태는, 2차 항원에 결합하는 1개의 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체의 1개의 중쇄 또는 1개의 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서(바람직하게는 한 중쇄의 C-말단) 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되고, 전장 항체가 2개의 CH3 영역 중 1개의 CH3 영역에서 Y349C, T366W 돌연변이 및 2개의 CH3 영역 중 다른 1개의 CH3 영역에서 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하는 본 발명에 따른 다중특이성 항체이다(도 6 참조). 본 발명의 또 다른 양태는, 2차 항원에 결합하는 1개의 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체의 1개의 중쇄 또는 1개의 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서(바람직하게는 한 중쇄의 C-말단) 펩티드 연결자를 통해 상기 전장 항체에 융합되고, 전장 항체가 2개의 CH3 영역 중 1개의 CH3 영역에서 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2개의 CH3 영역 중 다른 1개의 CH3 영역에서 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하는 본 발명에 따른 다중특이성 항체이다.

[0084] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나 발현되거나 생산되거나 분리된 모든 인간 항체, 예를 들면, NS0 또는 CHO 세포와 같은 숙주 세포로부터 또는 인간 면역글로불린 유전자를 위해 유전자전이성인 동물(예, 마우스)로부터 분리된 항체, 또는 숙주 세포내에 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체를 포함하는 것이다. 상기 재조합 인간 항체는 재배열된 형태의 가변 및 불변 영역을 갖는다. 본 발명에 따른 재조합 인간 항체는 생체내 체세포 과돌연변이에 적용되었다. 따라서, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유도되고 그와 관련되긴 하지만 생체내에서 인간 항체 생식 계열 레퍼토리 내에 천연적으로 존재할 수 없는 서열이다.

[0085] 본원에서 사용된 바와 같은 "가변 영역"(경쇄의 가변 영역(VL), 중쇄의 가변 영역(VH))은 항체를 항원에 결합시키는 데 직접적으로 수반되는 경쇄 및 중쇄의 쌍 각각을 의미한다. 가변 경쇄 및 중쇄의 영역들은 동일한 일반 구조를 가지며, 각각의 영역은 그 서열이 "초가변 영역"(또는 상보성 결정 영역, CDR)에 의해 광범위하게 보존, 연결된다. 프레임워크 영역은 β-시트 형태를 취하며, CDR은 β-시트 구조를 연결하는 루프를 형성할 수 있다. 각 쇠 중의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 그의 3차원 구조로 유지되며 다른 쇠로부터의 CDR과 함께 항원 결합 부위를 형성한다. 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 영역은 본 발명에 따른 항체의 결합 특이성/친화도에 특히 중요한 역할을 하므로, 본 발명의 또 다른 목적을 제공한다.

[0086] 용어 "초가변 영역" 또는 "항체의 항원-결합부"는 본원에서 사용되는 경우, 항원-결합의 원인이 되는 항체의 아미노산 잔기를 말한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터 아미노산 잔기를 포함한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR 영역은 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 이외의 다른 가변 영역이다. 그러므로, 항체의 경쇄 및 중쇄는 N-말단에서 C-말단까지 영역 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각 쇠에 있어 CDR은 상기 프레임워크 아미노산에 의해 분리된다. 특히, 중쇄의 CDR3은 주로 항원 결합에 기여하는 영역이다. CDR 및 FR 영역은 [Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]의 표준 정의에 따라 결정된다.

[0087] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결합" 또는 "특이적 결합"은 시험관내 분석에서, 바람직하게는 정제된 야생형 항원을 사용한 플라즈몬(plasmon) 공명 분석에서 항원의 에피토프에 대한 항체의 결합을 말한다. 결합 친화도는 ka 항(항체/항원 복합체로부터 항체의 결합에 일정한 척도), kd(해리 상수) 및 Kd(kd/ka)에 의해 결정된다. 결합 또는 특이적 결합은 10⁻⁸ 몰/1 이하, 바람직하게는 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹³ 몰/1의 결합 친화도(Kd)를 의미한다. 따라서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는, 10⁻⁸ 몰/1 이하, 바람직하게는 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹³ 몰/1의 결합 친화도(Kd)하에 특이적인 각각의 항원에 특이적으로 결합한다

[0088] FcγRIII에 대한 항체의 결합은 비아코어(BIAcore) 분석법(지이-헬스케어(GE-Healthcare), 스웨덴 옘살라)에 의

해 조사할 수 있다. 결합 친화도는 용어 k_a (항체/항원 복합체로부터 항체의 결합에 대한 속도 상수), k_d (해리 상수) 및 $K_D(k_d/k_a)$ 로 정의된다.

- [0089] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 폴리펩티드 결정인자를 포함한다. 특정 양태에서, 에피토프 결정인자는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설포닐과 같은 분자들의 화학적 활성 표면 군들을 포함하며, 특정 양태에서 특정한 3차원 구조 특징 및/또는 특정한 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합되는 항원의 영역이다.
- [0090] 특정 양태에서, 항체는 단백질 및/또는 거대분자의 복합 혼합물중에서 그의 표적 항원을 우선적으로 인지하는 경우 항원에 특이적으로 결합한다고 한다.
- [0091] 본 출원에 사용된 바와 같은 용어 "불변 영역"은 가변 영역이 아닌 항체의 영역의 전부를 의미한다. 불변 영역은 항원의 결합에 직접 수반되지는 않지만, 다양한 작동인자 기능을 나타낸다. 그 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라, 항체는 다음 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 분류되며, 이들 중 여럿은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, IgA1 및 IgA2와 같은 서브클래스로 더 분류될 수 있다. 항체의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 영역은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭된다. 5개 항체 부류 모두에서 발견될 수 있는 경쇄 불변 영역(CL)은 κ (카파) 및 λ (람다)로 지칭된다.
- [0092] 본 출원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 기원으로부터 유래된 불변 영역"은 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 인간 항체의 불변 중쇄 영역 및 불변 경쇄 카파 또는 람다 영역을 의미한다. 상기 불변 영역은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 카바트(Kabat, E.A.)에 의해 기술되었다(예를 들면, 문헌 [Johnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28, 214-218 (2000); Kabat, E.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2785-2788 (1975)] 참조).
- [0093] IgG4 서브클래스의 항체가 감소된 Fc 수용체(Fc γ RIIIa) 결합을 나타내는 반면, 다른 IgG 서브클래스의 항체는 강한 결합을 나타낸다. 그러나, Pro238, Asp265, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 및 His435는, 변형되는 경우 또한 감소된 Fc 수용체 결합을 제공하는 잔기들이다(문헌 [Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604 (2001); Lund, J., et al., *FASEB J.* 9, 115-119 (1995); Morgan, A., et al., *Immunology* 86, 319-324 (1995)]; EP 0 307 434 호).
- [0094] 한 양태에서, 본 발명에 따른 항체는 IgG1 항체에 비해 감소된 FcR 결합을 가지며, 전장 모 항체는 S228, L234, L235 및/또는 D265에 돌연변이를 갖는 IgG4 서브클래스 또는 IgG1 또는 IgG2 서브클래스의 FcR 결합과 관련되고/되거나 PVA236 돌연변이를 함유한다. 또 다른 양태에서, 전장 모 항체에서의 돌연변이는 IgG4 S228P 및 IgG1 L234A 및 L235A에서 일어난다. 불변 중쇄 영역은 서열번호: 17 및 18에 나타나 있다. 한 양태에서, 전장 모 항체의 불변 중쇄 영역은 돌연변이 L234A 및 L235A를 갖는 서열번호: 17을 갖는다. 또 다른 양태에서, 전장 모 항체의 불변 중쇄 영역은 돌연변이 S228P를 갖는 서열번호: 18을 갖는다. 또 다른 양태에서, 전장 모 항체의 불변 경쇄 영역은 서열번호: 19의 카파 경쇄 영역이거나 또는 람다 경쇄 영역이다. 바람직하게, 전장 모 항체의 불변 중쇄 영역은 돌연변이 S228P를 갖는 서열번호: 17 또는 서열번호: 19를 갖는다.
- [0095] 항체의 불변 영역은 ADCC(항체-의존성 세포-매개 세포독성) 및 CDC(보체-의존성 세포독성)에 직접 수반된다. 보체 활성화(CDC)는 대부분의 IgG 항체 서브클래스의 불변 영역에 대한 보체 인자 C1q의 결합에 의해 개시된다. 항체에 대한 C1q의 결합은 소위 결합 부위에서 정의된 단백질-단백질 상호작용에 의해 야기된다. 상기 불변 영역 결합 부위는 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌 [Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127, 2555-2560 (1981); Brunhouse, R. and Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16, 907-917 (1979); Burton, D.R., et al., *Nature* 288, 338-344 (1980); Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37, 995-1004 (2000); Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164, 4178-4184 (2000); Hezar도 M., Et al., *J. Virol.* 75, 12161-12168 (2001); Morgan, A., et al., *Immunology* 86, 319-324 (1995)] 및 EP 0 307 434 호에 기술되어 있다. 상기 불변 영역 결합 부위는, 예를 들면, 아미노산 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 및 P329(번호는 카바트의 EU 지수에 따른다)에 의해 규정된다.
- [0096] 용어 "항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)"는 작동인자 세포의 존재하에 본 발명에 따른 항체에 의한 인간 표적 세포의 용해를 말한다. ADCC는 바람직하게는, 새로 분리된 PBMC와 같은 작동인자 세포 또는 백혈구 연층으로부터 정제된 작동인자 세포, 예를 들면, 단구 또는 자연 살해(NK) 세포 또는 영구적으로 성장하는 NK 세포주와 같은 작동인자 세포의 존재하에 본 발명에 따른 항체로 항원 발현 세포의 제제를 처리함으로써 측정된다.

- [0097] 용어 "보체-의존성 세포독성(CDC)"은 대부분의 IgG 항체 서브클래스의 Fc 부분에 대한 보체 인자 C1q의 결합에 의해 개시된 과정을 의미한다. 항체에 대한 C1q의 결합은 소위 결합 부위에서 정의된 단백질-단백질 상호작용에 의해 야기된다. 상기 Fc 부분 결합 부위는 당해 분야에 공지되어 있다(상기 참조). 상기 Fc 부분 결합 부위는, 예를 들면, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 및 P329(번호는 카밧의 EU 지수에 따른다)에 의해 규정된다. 서브클래스 IgG1, IgG2 및 IgG3의 항체는 통상적으로 C1q 및 C3 결합을 포함한 보체 활성화를 나타내는 반면, IgG4는 보체 시스템을 활성화시키지 않으며 C1q 및/또는 C3에 결합하지 않는다.
- [0098] 또 다른 양태에서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 상기 전장 항체가 인간 IgG1 서브클래스, 또는 돌연변이 L234A 및 L235A를 갖는 인간 IgG1 서브클래스의 항체임을 특징으로 한다.
- [0099] 또 다른 양태에서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 상기 전장 항체가 인간 IgG2 서브클래스의 항체임을 특징으로 한다.
- [0100] 또 다른 양태에서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 상기 전장 항체가 인간 IgG3 서브클래스의 항체임을 특징으로 한다.
- [0101] 또 다른 양태에서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 상기 전장 항체가 인간 IgG4 서브클래스, 또는 추가 돌연변이 S228P를 갖는 인간 IgG4 서브클래스의 항체임을 특징으로 한다.
- [0102] 바람직하게, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 상기 전장 항체가 인간 IgG1 서브클래스, 또는 추가 돌연변이 S228P를 갖는 인간 IgG4 서브클래스의 항체임을 특징으로 한다.
- [0103] 또 다른 양태에서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 상기 전장 항체가 인간 Fc-감마 수용체 IIIa에 대한 친화도를 증가시켜 ADCC를 매개하는 그의 능력을 증가시키는 방식으로 변형되는(Fc 영역에서의 돌연변이에 의해 또는 당공학에 의해) 것을 특징으로 한다. 푸코스의 양을 감소시켜 항체의 ADCC를 증대시키는 방법은, 예를 들면, 국제특허출원 공개 제 WO 2005/018572 호, 국제특허출원 공개 제 WO 2006/116260 호, 국제특허출원 공개 제 WO 2006/114700 호, 국제특허출원 공개 제 WO 2004/065540 호, 국제특허출원 공개 제 WO 2005/011735 호, 국제특허출원 공개 제 WO 2005/027966 호, 국제특허출원 공개 제 WO 1997/028267 호, 미국 특허출원 공개 제 2006/0134709 호, 미국 특허출원 공개 제 2005/0054048 호, 미국 특허출원 공개 제 2005/0152894 호, 국제특허출원 공개 제 WO 2003/035835 호, 국제특허출원 공개 제 WO 2000/061739 호, 문헌 [Niwa, R., et al., J. Immunol. Methods 306, 151-160 (2005); Shinkawa, T., et al., J. Biol. Chem., 278, 3466-3473 (2003)], 국제특허출원 공개 제 WO 03/055993 호 또는 미국 특허출원 공개 제 2005/0249722 호에 기술되어 있다. 그러므로, 본 발명의 한 양태에서, 본 발명에 따른 다중특이성 항체는 상기 전장 항체가 IgG1 또는 IgG3의 비푸코실화(afucosylated) 이소타입이며, 여기서 푸코스의 양은 Asn297에서 올리고사카라이드(당)의 총량의 60% 이하이다(이것은 Asn297에서 Fc 영역의 올리고사카라이드의 40% 이상이 비푸코실화된 것을 의미한다).
- [0104] 본 발명에 따른 항체는 재조합 방법에 의해 제조된다. 따라서, 본 발명의 한 태양은 본 발명에 따른 항체를 암호화하는 항체이며, 또 다른 태양은 본 발명에 따른 항체를 암호화하는 상기 핵산을 포함하는 세포이다. 재조합 제조 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며, 항체의 후속 분리 및 약학적으로 허용되는 순도로의 통상적인 정제하에 원핵 및 진핵 세포에서의 단백질 발현을 포함한다. 숙주 세포에서 전술한 바와 같은 항체의 발현에 있어, 각각의 변형된 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 핵산을 표준 방법에 의해 발현 벡터내에 삽입시킨다. 발현은 CHO 세포, NS0 세포, Sp2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, PER.C6 세포, 효모 또는 이.콜라이(E. coli) 세포와 같은 적절한 원핵 또는 진핵 세포에서 수행되며, 항체는 세포로(상등액 또는 용해후 세포)로부터 회수된다. 항체의 재조합 제조를 위한 일반적인 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌 [Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17, 183-202 (1999); Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8, 271-282 (1996); Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16, 151-160 (2000); Werner, R.G., Drug Res. 48, 870-880 (1998)]의 검토 논문에 기술되어 있다.
- [0105] 본 발명에 따른 다중특이성 항체는, 예를 들면, 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지로부터 적절히 분리된다. 단클론성 항체를 암호화하는 DNA 및 RNA는 통상적인 절차를 사용하여 용이하게 분리되고 서열화된다. 하이브리도마 세포는 상기 DNA 및 RNA의 공급원의 역할을 할 수 있다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터내에 삽입될 수 있으며, 이것은 이어서 달리 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 HEP 293 세포, CHO 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포내에 형질감염되어 숙주 세포에서 재조합 단클론성 항체의 합성을 수득한다.
- [0106] 다중특이성 항체의 아미노산 서열 변이체(또는 돌연변이체)는 적절한 뉴클레오티드 변형을 항체 DNA에 도입함으

로써, 또는 뉴클레오티드 합성에 의해 제조된다. 그러나, 상기 변형은, 예를 들면, 전술한 바와 같이 매우 제한된 범위내에서만 수행될 수 있다. 예를 들면, 변형은 IgG 이소타입 및 항원 결합과 같은 상기 언급한 항체 특징을 변형시키지 않으나, 재조합 생성 수율, 단백질 안정성을 개선하거나 정제를 촉진할 수 있다.

[0107] 본 출원에서 사용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"는 본 발명에 따른 항체를 생성하기 위해 처리될 수 있는 임의 종류의 세포 시스템을 의미한다. 한 양태에서, HEK293 세포 및 CHO 세포가 숙주 세포로 사용된다.

[0108] 본원에서 사용된 바와 같이, "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"이란 표현은 상호교환적으로 사용되며, 모든 상기 호칭들은 자손을 포함한다. 따라서, "형질전환체" 및 "형질전환 세포"란 용어는 1차 대상 세포, 및 전이 수에 관계없이 그로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한 모든 자손은 의도적 또는 의도하지 않은 돌연변이로 인해 DNA 함량에 있어 정확하게 일치할 필요는 없음을 이해해야 한다. 원래 형질전환된 세포에서 선별된 바와 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손이 포함된다. 명확한 명칭을 의도한 경우, 문맥으로부터 명백할 것이다.

[0109] NS0 세포에서의 발현은, 예를 들면, 문헌 [Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32, 109-123 (2000); Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73, 261-270 (2001)]에 기술되어 있다. 일시적 발현은, 예를 들면, 문헌 [Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30, E9 (2002)]에 기술되어 있다. 가변 영역의 클로닝은 문헌 [Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833-3837 (1989); Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4258-2489 (1992); and Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204, 77-87 (1997)]에 기술되어 있다. 바람직한 일시적 발현 시스템(HEK 293)은 문헌 [Schlaeger, E.J., and Christensen, K., Cytotechnology 30, 71-83 (1990); and Schlaeger, E.J., J. Immunol. Methods 194, 191-199 (1996)]에 기술되어 있다.

[0110] 원핵세포에 적합한 대조 서열은, 예를 들면, 프로모터, 선택적으로 작동유전자 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 인핸서 및 폴리아데닐화 신호를 이용하는 것으로 알려져 있다.

[0111] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 작용적 관계에 놓일 때 "작용가능하게 연결"된다. 예를 들면, 전구-서열 또는 분비 리더는 폴리펩티드의 분비에 관여하는 전구-단백질로서 발현되는 경우 폴리펩티드에 대한 DNA에 작용가능하게 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 상기 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 암호화 서열에 작용가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하기 위해 위치하는 경우 암호화 서열에 작용가능하게 연결된다. 일반적으로, "작용가능하게 연결된"이란은 연결되는 DNA 서열이 인접하며, 분비 리더의 경우 인접하고 해독 프레임에 존재함을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접되어서는 안된다. 연결은 통상적인 제한효소 부위에서 접합에 의해 수행된다. 상기 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 통상적인 관행에 따라 사용한다.

[0112] 항체의 정제는 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당해 분야에 공지된 기타 방법을 포함한 표준 기술에 의해 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들면, 다른 세포 핵산 또는 단백질을 제거하기 위해 수행된다(문헌 [Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)] 참조). 미생물 단백질을 사용한 친화성 크로마토그래피(예를 들면, 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피), 이온 교환 크로마토그래피(예를 들면, 양이온 교환 (카복시메틸 수지), 음이온 교환 (아미노 에틸 수지) 및 혼합-방식 교환), 친화성 흡착(예를 들면, 베타-머캅토에탄올 및 기타 SH 리간드 사용), 소수성 상호작용 또는 방향족 흡착 크로마토그래피(예를 들면, 페닐-세파로스, 아자-아레노필릭 수지 또는 m-아미노페닐보론산 사용), 금속 킬레이트 친화성 크로마토그래피(예를 들면, Ni(II)- 및 Cu(II)-친화성 물질), 크기 배제 크로마토그래피, 및 전기영동 방법(예를 들면, 겔 전기영동, 모세관 전기영동)과 같이, 다양한 방법들이 잘 확립되어 있으며 단백질 정제에 널리 사용된다[Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75, 93-102 (1998)].

[0113] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "형질전환"은 벡터/핵산의 숙주 세포로의 전이 과정을 말한다. 큰 세포벽 장애물을 갖지 않는 세포를 숙주 세포로 사용하는 경우, 형질감염은, 예를 들면, 문헌 [Graham, F.L., and van der Eb, A.J., Virology 52, 456-467 (1973)]에 기술된 바와 같은 갈슘 포스페이트 침전 방법에 의해 수행된다. 그러나, 예를 들면, 핵 주입 또는 원형질체 융합에 의해 세포내에 DNA를 도입하는 다른 방법도 또한 이용할 수 있다. 원핵 세포, 또는 실질적인 세포벽 구조물을 함유하는 세포를 사용하는 경우, 예를 들면, 형질감염의 한 방법은 문헌 [Cohen, S.N., et al., PNAS, 69, 2110-2114 (1972)]에 기술된 바와 같은 염화칼슘을 이용한 칼슘 처리이다.

- [0114] 본원에서 사용된 바와 같이, "발현"은 핵산이 mRNA로 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA(전사체로도 지칭됨)가 이어서 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 과정을 말한다. 전사체 및 암호화된 폴리펩티드는 총칭적으로 유전자 산물로 지칭된다. 폴리뉴클레오티드가 게놈 DNA로부터 유도되는 경우, 진핵 세포에서의 발현은 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다.
- [0115] "벡터"는 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포 내로 및/또는 숙주 세포 사이에 전이시키는 핵산 분자, 특히 자가-복제되는 핵산 분자이다. 상기 용어는 주로 DNA 또는 RNA의 세포내 삽입(예를 들면, 염색체 통합)에 작용하는 벡터, 주로 DNA 또는 RNA의 복제에 작용하는 벡터의 복제, 및 DNA 또는 RNA의 전사 및/또는 번역에 작용하는 발현 벡터를 포함한다. 1개보다 많은 전술한 바와 같은 기능을 제공하는 벡터도 또한 포함된다.
- [0116] "발현 벡터"는 적절한 숙주 세포내에 도입되는 경우 폴리펩티드로 전사 및 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드이다. "발현 시스템"은 통상적으로 목적하는 발현 산물을 생성하도록 작용할 수 있는 발현 벡터로 이루어진 적합한 숙주 세포를 말한다.
- [0117] 본 발명에 이르러 본 발명에 따른 항체는 생물학적 또는 약리학적 활성, 약동학적 성질 또는 독성과 같은 개선된 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이들은, 예를 들면, 암과 같은 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- [0118] 본 발명의 한 태양은 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물이다. 본 발명의 또 다른 태양은 약학 조성물을 제조하기 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다. 본 발명의 또 다른 태양은 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물의 제조 방법이다. 또 다른 태양에서, 본 발명은 약학 담체와 함께 제형화된, 본 발명에 따른 항체를 함유하는 조성물, 예를 들면, 약학 조성물을 제공한다.
- [0119] 본 발명의 한 양태는 암을 치료하기 위한, 본 발명에 따른 다중특이성, 바람직하게는 이중특이성 항체이다.
- [0120] 본 발명의 또 다른 태양은 암을 치료하기 위한 상기 약학 조성물이다.
- [0121] 본 발명의 또 다른 태양은 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다.
- [0122] 본 발명의 또 다른 태양은 본 발명에 따른 항체를 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이다.
- [0123] 본원에서 사용된 바와 같이, "약학적 담체"는 생리학적으로 상용성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 향균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 상기 투여(예를 들면, 주사 또는 주입에 의해)에 적합하다.
- [0124] 본 발명의 조성물은 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 숙련된 전문가에 의해 인지되듯이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 달라질 것이다. 특정 투여 경로에 의해 본 발명의 화합물을 투여하기 위해, 화합물을 그의 불활성화를 방지하기 위한 물질로 코팅하거나 또는 화합물을 상기 물질과 함께 동시-투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 대상에게 적절한 담체, 예를 들면, 리포솜 또는 희석제 중에서 투여될 수 있다. 약학적으로 허용되는 희석제로는 식염수 및 수성 완충액이 포함된다. 약학적 담체로는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말이 포함된다. 약학적으로 활성 물질을 위한 상기 매질 및 약제의 사용은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0125] 본원에서 사용된 바와 같은 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여되는"이란 어구는 장내 및 국소 투여 이외의 다른 투여 방식, 통상적으로, 주사에 의한 투여 방식을 의미하며, 제한하지 않고, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 캡슐내, 낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 피하내, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막의 및 흉골내 주사 및 주입이 포함된다.
- [0126] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 암은 증식성 질환, 예를 들면, 림프종, 림프구성 백혈병, 폐암, 비소세포 폐(NSCL)암, 기관지폐포 폐암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부암, 위선암, 위암, 대장암, 유방암, 자궁암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 외음부암, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신세포암, 신우암, 중피종, 간세포암, 담관암, 중추신경계(CNS) 종양, 척추종양, 뇌간 교세포종, 다형성 교모세포종, 성상세포종, 신경초종, 상의세포종, 수모세포종, 수막종, 편평세포암, 뇌하수체 선종 및 유잉 육종, 및 상기 암들 중 임의의 암의 난치성 암, 또는 1개 이상의 상기 암들의 조합을 말한다.
- [0127] 상기 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물 존재의 방지

는 상기의 멸균 절차에 의해서 및 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 솔브산 등의 혼합물 다에 의해 보장될 수 있다. 등장화제, 예를 들면, 당, 염화나트륨 등을 조성물에 혼합하는 것도 또한 바람직할 수 있다. 또한, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 약제의 혼합에 의해 주사가능한 약학적 형태의 지연된 흡수가 이루어질 수 있다.

[0128] 선택된 투여 경로에 관계없이, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물 및/또는 본 발명의 약학 조성물은 당해 분야의 기술을 가진 자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용되는 투여형으로 제형화된다.

[0129] 본 발명의 약학 조성물 중 활성 성분들의 실제 투여량 수준은, 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 환자에게 독성없이 목적하는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 달라질 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설률, 치료 기간, 사용되는 특정 조성물과 함께 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 질병, 일반적인 건강 및 이전의 병력, 및 의료 분야에 공지된 유사 요인들을 포함하여 다양한 약동학적 요인들에 따라 달라질 것이다.

[0130] 조성물은 멸균되어야 하며 조성물이 주사기로 전달가능할 정도로 유동성이어야 한다. 물 이외에, 담체는 바람직하게는 등장성 완충 식염수 용액이다.

[0131] 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해서, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해서, 및 계면활성제에 의해서 적절한 유동성을 유지할 수 있다. 많은 경우에서, 등장화제, 예를 들면, 당, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨 또는 솔비톨, 및 염화나트륨을 조성물에 포함하는 것이 바람직하다.

[0132] 하기의 실시예, 서열표 및 도면은 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공되며, 본 발명의 진정한 범위는 첨부된 특허 청구범위에 나타내었다. 본 발명의 진의에서 벗어나지 않고 나타난 절차에 변형이 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.

[0133] **아미노산 서열에 대한 설명**

- [0134] 서열번호: 1 중쇄 CDR3, <IGF-1R>HUMAB-클론 18
- [0135] 서열번호: 2 중쇄 CDR2, <IGF-1R>HUMAB-클론 18
- [0136] 서열번호: 3 중쇄 CDR1, <IGF-1R>HUMAB-클론 18
- [0137] 서열번호: 4 경쇄 CDR3, <IGF-1R>HUMAB-클론 18
- [0138] 서열번호: 5 경쇄 CDR2, <IGF-1R>HUMAB-클론 18
- [0139] 서열번호: 6 경쇄 CDR1, <IGF-1R>HUMAB-클론 18
- [0140] 서열번호: 7 중쇄 가변 영역, <IGF-1R>HUMAB-클론 18
- [0141] 서열번호: 8 경쇄 가변 영역, <IGF-1R>HUMAB-클론 18
- [0142] 서열번호: 9 중쇄 CDR3, 인간화<EGFR>ICR62
- [0143] 서열번호: 10 중쇄 CDR2, 인간화<EGFR>ICR62
- [0144] 서열번호: 11 중쇄 CDR1, 인간화<EGFR>ICR62
- [0145] 서열번호: 12 경쇄 CDR3, 인간화<EGFR>ICR62
- [0146] 서열번호: 13 경쇄 CDR2, 인간화<EGFR>ICR62
- [0147] 서열번호: 14 경쇄 CDR1, 인간화<EGFR>ICR62
- [0148] 서열번호: 15 중쇄 가변 영역, 인간화<EGFR>ICR62-I-HHD
- [0149] 서열번호: 16 경쇄 가변 영역, 인간화<EGFR>ICR62-I-KC
- [0150] 서열번호: 17 IgG1으로부터 유래된 인간 중쇄 불변 영역
- [0151] 서열번호: 18 IgG4로부터 유래된 인간 중쇄 불변 영역

- [0152] 서열번호: 19 카과 경쇄 불변 영역
- [0153] **실험 절차**
- [0154] **실시에**
- [0155] **재료 및 일반적 방법**
- [0156] 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 관한 일반적인 정보는 문헌 [Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 나와 있다. 항체 쇄의 아미노산은 EU 번호에 따라 번호를 매기고 언급한다[Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 78-85 (1969); Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)].
- [0157] **재조합 DNA 기술**
- [0158] 문헌 [Sambrook, J., et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)]에 기술된 바와 같은 표준 방법을 이용하여 DNA를 조작하였다. 분자 생물 시약들은 제조사의 지시에 따라 사용하였다.
- [0159] **유전자 합성**
- [0160] 목적하는 유전자 단편은 화학 합성에 의해 제조된 올리고뉴클레오티드로부터 제조하였다. PCR 증폭을 포함하여 올리고뉴클레오티드의 어닐링 및 접합에 의해 단일 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위에 접한 600 내지 1800 bp 길이의 유전자 단편을 제작한 후 이어서 지시된 제한효소 부위, 예를 들면, BamHI/BstEII, BamHI/BsiWI, BstEII/NotI 또는 BsiWI/NotI을 pUC 클로닝 벡터를 기초로 한 pcDNA 3.1/Zeo(+)(인비트로젠(Invitrogen)) 내에 클로닝하였다. 유전자 합성 단편은 진아트(Geneart, 독일 리젠버그)에서 제공된 설명에 따라 정렬하였다.
- [0161] **DNA 서열 결정**
- [0162] DNA 서열은 세퀴셀브 게엠베하(Sequiserive GmbH, 독일 바테르스테텐)에서 수행된 이중 가닥 서열분석에 의해 결정하였다.
- [0163] **DNA 및 단백질 서열 분석 및 서열 데이터 관리**
- [0164] GCG(제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 위스콘신주 매디슨) 소프트웨어 패키지 버전 10.2 및 인비트로젠스 벡터 NT1 어드밴스(Invitrogens Vector NT1 Advance) 스위트 버전 9.1을 서열 제작, 지도작성, 분석, 주석 및 도해에 사용하였다.
- [0165] **세포 배양 기술**
- [0166] 문헌 [Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J., and Yamada, K.M.,(eds.), John & Wiley & Sons, Inc. (2000)]에 기술된 바와 같은 표준 세포 배양 기술을 이용하였다.
- [0167] **HEK293F 세포에서 면역글로불린 변이체의 일시적 발현**
- [0168] 다중특이성 항체는 프리스타일(FreeStyle, 등록상표) 293 발현 시스템을 제조사의 지시(인비트로젠, 미국 소재)에 따라 사용하여 인간 배아 신장 293-F 세포의 일시 형질감염에 의해 발현시켰다. 간략하게, 현탁액 프리스타일(등록상표) 293-F 세포를 37 °C/8% CO₂에서 프리스타일(등록상표) 293 발현 배지에서 배양하고, 세포를 새로운 배지에 1 내지 2 x 10⁶ 생존 세포/ml의 밀도로 형질감염일에 접종하였다. DNA-293펙틴(등록상표) 복합체를 333 μl의 293펙틴(등록상표)(인비트로젠, 독일) 및 250 μg의 중쇄 및 경쇄 플라스미드 DNA를 250 ml 최종 형질감염 부피에 대해 1:1 몰비로 사용하여 옵티-멤(Opti-MEM, 등록상표) I 배지(인비트로젠, 미국 소재)에서 제조하였다. 이중특이성 항체 함유 세포 배양 상등액을 형질감염 7 일후에 14000 g에서 30 분간 원심분리하고 멸균 필터(0.22 μm)를 통해 여과시켜 정제하였다. 상등액은 정제시까지 -20 °C에서 저장하였다.
- [0169] **단백질 측정**

[0170] 정제된 항체 및 유도체의 단백질 농도는, 문헌 [Pace, C.N., et al., Protein Science, 4, 2411-2423 (1995)] 에 따른 아미노산 서열을 기준으로 산출한 몰 흡광 계수를 이용하여, 배경 보정으로 320 nm에서의 OD하에 280 nm에서의 흡광도(OD)를 측정하여 결정하였다.

[0171] **상등액 중 항체 농도 측정**

[0172] 세포 배양 상등액 중 항체 및 유도체의 농도는 친화성 HPLC 크로마토그래피로 측정하였다. 간략하게, 단백질 A 에 결합하는 항체 및 유도체를 함유하는 세포 배양 상등액을 200 mM KH₂PO₄, 100 mM 시트르산 나트륨(pH 7.4) 중에서 어플라이드 바이오시스템즈 포로스(Applied Biosystems Poros) A/20 컬럼에 적용하고, 울티메이트(UltiMate) 3000 HPLC 시스템(디오넥스(Dionex)) 상에서 200 mM NaCl, 100 mM 시트르산(pH 2.5)으로 매트릭스로부터 용출시켰다. 용출된 단백질을 UV 흡광도 및 피크 면적 적분에 의해 정량화하였다. 정제된 표준 IgG1 항체는 표준물의 역할을 하였다.

[0173] **단백질 정제**

[0174] 분비된 항체는 단백질 A-세파로스(등록상표)(GE 헬스케어, 스웨덴) 및 슈퍼덱스(Superdex)200 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 2 단계로 상등액으로부터 정제하였다. 간략하게, 이중특이성 및 삼중특이성 항체 함유 정제된 배양물 상등액을 PBS 완충제(10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 평형화된 하이트랩 프로테인에이(HiTrap ProteinA) HP(5 ml) 컬럼상에 적용하였다. 미 결합 단백질을 평형 완충액으로 세척하였다. 이중특이성 항체를 0.1 M 시트레이트 완충액(pH 2.8)으로 용출시키고, 단백질 함유 분획을 0.1 ml의 1 M 트리스(pH 8.5)로 중화시켰다. 이어서, 용출된 단백질 분획을 모으고, 아미콘(Amicon) 한외 원심분리 필터 장치(MWCO: 30 K, 밀리포어(Millipore))를 사용하여 3 ml의 부피로 농축하고, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl(pH 6.0)로 평형화된 슈퍼덱스200 하이로드(HiLoad) 120 ml 16/60 겔 여과 컬럼(GE 헬스케어, 스웨덴) 상에 적재하였다. 단량체 항체 분획을 모으고, 급속-냉동시키고 -80 °C에서 저장하였다. 샘플 일부는 후속 단백질 분석 및 특성분석을 위해 제공하였다.

[0175] **정제된 단백질의 분석**

[0176] 정제된 단백질 샘플의 단백질 농도는 아미노산 서열을 기준으로 산출된 몰 흡광 계수를 이용하여 280 nm에서 흡광도(OD)를 측정함으로써 결정하였다. 이중특이성 항체의 순도는 환원제(5 mM 1,4-다이티오트라이톨)의 존재 및 부재하에서 SDS-PAGE 및 쿠마시(Coomassie) 브릴리언트 블루로 염색하여 분석하였다. 뉴페이지(NuPAGE, 등록상표) 프리-캐스트(Pre-Cast) 겔 시스템(인비트로젠, 미국 소재)을 제조사의 지시에 따라 사용하였다(4 내지 20% 트리스-글리신 겔). 이중특이성 항체 샘플의 응집체 함량은 25 °C에서 200 mM KH₂PO₄, 250 mM KCl(pH 7.0) 유출 완충액중에서 슈퍼덱스 200 분석용 크기-배제 컬럼(GE 헬스케어, 스웨덴)을 사용하여 울티메이트 3000 HPLC 시스템(디오넥스) 상에서 고성능 SEC에 의해 분석하였다. 25 µg 단백질을 0.5 ml/분의 유량으로 컬럼상에 주입하고 50 분에 걸쳐 등용매 용출시켰다. 안정성 분석을 위해, 정제된 단백질의 0.1, 1 및 3 mg/ml 농축물을 제조하고 4 °C, 37 °C에서 7 일동안 배양한 후 고성능 SEC로 평가하였다. 환원된 이중특이성 항체 경쇄 및 중쇄의 아미노산 주쇄의 보전성은, 펩티드-N-글리코시다제 F(로슈 몰레큘라 바이오케미칼스(Roche Molecular Biochemicals))를 사용한 효소 처리에 의해 N-글리칸을 제거한 후 나노일렉트로스프레이(NanoElectrospray) Q-TOF 질량 분광분석법에 의해 확인하였다.

[0177] **실시예 1**

[0178] **인간 IGF1-수용체 및 인간 EGF-수용체를 인지하는 본 발명의 분자에 따른 다중특이성 항체의 설계**

[0179] 하기에서, 본 발명의 한 양태로서, 전장 항체에 펩티드 연결자를 통해 연결된 2차 상이한 항원(IGF-1R 또는 EGFR 중 다른 하나)에 결합하는 2개의 단일쇄 Fab 단편(중쇄의 2개의 C-말단에서 또는 경쇄의 2개의 C-말단에서 2개의 단일쇄 Fab 단편 모두)을 갖는 1차 항원(IGF-1R 또는 EGFR)에 결합하는 전장 항체를 포함하는 4가 이중특이성 항체를 예증한다. 상기 단일쇄 Fab 단편에서 항체 영역 및 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음의 순서를 갖는다: VL-CL-링커-VH-CH1.

[0180] <IGF-1R> 항원 결합 부위에 대한 중쇄 가변 영역 VH로서 서열번호: 15를 사용하였다. <IGF-1R> 항원 결합 부위에 대한 경쇄 가변 영역 VL로서 서열번호: 16을 사용하였다.

[0181] <EGFR> 항원 결합 부위에 대한 중쇄 가변 영역 VH로서 서열번호: 7을 사용하였다. <EGFR> 항원 결합 부위에 대한 경쇄 가변 영역 VL로서 서열번호: 8을 사용하였다.

- [0182] 유전자 합성 및 재조합 분자 생물 기술에 의해, 각각의 항원 결합 부위의 VH 및 VL을 포함하는 VL-CL 및 VH-CH1을 글리신 세린(G4S)_n 단일-쇄-링커에 의해 연결하여 단일쇄 Fab 단편 VL-CL-링커-VH-CH1을 획득하고, 이것은 (G4S)_n 링커를 사용하여 항체 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에 부착시켰다.
- [0183] 선택적으로, 시스템 잔기를 전술한 바와 같은 기술에 따라 단일쇄 Fab 단편의 VH(카뱃 위치 44 포함) 및 VL(카뱃 위치 100 포함) 영역에 도입하였다(예를 들면, 국제특허출원 공개 제 WO 94/029350 호; 문헌 [Reiter, Y., et al., Nature biotechnology 14, 1239-1245 (1996); Young, N.M., et al., FEBS Letters 377, 135-139 (1995); or Rajagopal, V., et al., Protein Engineering 10, 1453-1459 (1997)]).
- [0184] 모든 상기 분자는 재조합적으로 제조하고, 정제하고, 특성분석하고, 단백질 발현, 안정성 및 생물학적 활성을 평가하였다.
- [0185] 3가 이중특이성 <EGFR-IGF1R>, <IGF1R-EGFR> 항체를 생성하기 위해 적용된 다중특이성 항체 설계의 개요를 표 1에 나타내었다. 본 연구에서, 다양한 4가 단백질 존재를 기술하기 위해 용어 'scFab-Ab'를 사용한다. 설계된 포맷의 설명은 도 4 및 5에 나타내고 표 1에 열거하였다.

표 1

C-말단 단일쇄 Fab 단편 결합물을 갖는 상이한 이중특이성 항IGF1R 및 항 EGFR 4가 항체 포맷 및 상응하는 scFab-Ab-명명

분자명 (이중특이성 항체 에 대한 ScFab-Ab-명명)	유도된 전장 항체 주쇄	유도된 단일쇄 Fab 단편	가변 영역 VH 및 VL 서열번호	항체에 부착된 단일쇄 Fab의 위치	링커	캡티드 연결자	scFab 다이설파이드 VH44/VL100 안정화
scFab-XGFR1_2720	<IGF1R>	<EGFR>	7.8.15.16	C-말단 H쇄	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	없음
scFab-XGFR1_2721	<IGF1R>	<EGFR>	7.8.15.16	C-말단 H쇄	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	있음
scFab-XGFR1_4720	<IGF1R>	<EGFR>	7.8.15.16	C-말단 H쇄	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	없음
scFab-XGFR1_4721	<IGF1R>	<EGFR>	7.8.15.16	C-말단 H쇄	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	있음
scFab-XGFR2_2720	<EGFR>	<IGF1R>	7.8.15.16	C-말단 H쇄	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	없음
scFab-XGFR2_2721	<EGFR>	<IGF1R>	7.8.15.16	C-말단 H쇄	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	있음
scFab-XGFR2_4720	<EGFR>	<IGF1R>	7.8.15.16	C-말단 L쇄	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	없음
scFab-XGFR2_4721	<EGFR>	<IGF1R>	7.8.15.16	C-말단 L쇄	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	있음

- [0186]
- [0187] **실시예 2**
- [0188] **이중특이성 <EGFR-IGF1R> 항체 scFabXGFR1 분자의 발현 및 정제**
- [0189] 상응하는 이중특이성 항체의 경쇄 및 중쇄를 원핵 및 진핵세포 선택 마커를 갖는 발현 벡터내에 구축하였다. 이들 플라스미드를 이. 콜라이에서 증폭시키고 정제하고 이어서 HEK293F 세포에서 재조합 단백질의 일시 발현을 위해 형질감염시켰다(인비트로젠 프리스타일 시스템 사용). 7 일후에, HEK 293 세포 상등액을 수확하고, 단백질 A 및 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다. 모든 이중특이성 항체 구조물의 동종성을 비-환원 및 환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 확인하였다. 환원 조건하에서(도 8), C-말단 및 N-말단 scFab 융합을 갖는 폴리펩티드 쇠는 SDS-PAGE 시에 계산된 분자량과 유사한 겔보기 분자 크기를 나타내었다. 모든 구조물의 발현 수준은 단백질 A HPLC로 분석하였으며, '표준' IgG의 발현 수율과 유사하거나, 또는 일부 경우에는 다소 낮았다. 평균 단백질 수준은 상기 비-최적화 일시 발현 실험에서 1.5 내지 10 mg의 단백질/세포-배양 상등액 L이었다(도 4 및 5).
- [0190] 정제된 단백질의 HP-크기 배제 크로마토그래피 분석은 재조합 분자에 대해 다소 응집되는 경향을 나타내었다. 상기 이중특이성 항체의 응집과 관련된 문제를 해결하기 위해, 추가 결합 잔기의 VH 및 VL 사이의 다이설파이드-안정화를 적용하였다. 이를 위해, 한정된 위치(카뱃 번호표에 따른 위치 VH44/VL100)에서 scFab의 VH 및 VL 내에 단일 시스템인 치환을 도입하였다. 이들 돌연변이는 VH와 VL 사이에 안정한 쇠간 다이설파이드의 형성을 가능케 하며, 상기 다이설파이드는 생성된 다이설파이드-안정화된 scFab 모듈을 안정화시킨다. scFab 중 VH44/VL100 다이설파이드의 도입은 단백질 발현 수준을 별로 저해하지 않았으며, 일부 경우에는 개선된 발현 수준을 나타내었다(도 4 및 5).

[0191] 프리스타일(등록상표) 293 발현 시스템을 제조사의 지시(인비트로젠, 미국 소재)에 따라 사용하여 인간 배아 신장 293-F 세포의 일시 형질감염에 의해 이중특이성 항체를 발현시켰다. 간략하게, 현탁액 프리스타일(등록상표) 293-F 세포를 37 °C/8% CO₂에서 프리스타일(등록상표) 293 발현 배지에서 배양하고, 세포를 새로운 배지에 1 내지 2 x 10⁶ 생존 세포/ml의 밀도로 형질감염일에 접종하였다. DNA-293펙틴(등록상표) 복합체를 333 μl의 293펙틴(등록상표)(인비트로젠, 미국 소재) 및 250 μg의 중쇄 및 경쇄 플라스미드 DNA를 250 ml 최종 형질감염 부피에 대해 1:1 물비로 사용하여 옵티-멤(등록상표) I 배지(인비트로젠, 미국 소재)에서 제조하였다. 제조항 항체 유도체 함유 세포 배양 상등액을 형질감염 7 일후에 14000 g에서 30 분간 원심분리하고 멸균 필터(0.22 μm)를 통해 여과시켜 정제하였다. 상등액은 정제시까지 -20 °C에서 저장하였다.

[0192] 분비된 항체 유도체는 단백질 A-세파로스(등록상표)(GE 헬스케어, 스웨덴) 및 슈퍼텍스200 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 2 단계로 상등액으로부터 정제하였다. 간략하게, 이중특이성 및 삼중특이성 항체 함유 정제된 배양물 상등액을 PBS 완충제(10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 평형화된 하이트랩 프로테인A HP(5 ml) 컬럼상에 적용하였다. 미결합 단백질을 평형 완충액으로 세척하였다. 이중특이성 항체를 0.1 M 시트레이트 완충액(pH 2.8)으로 용출시키고, 단백질 함유 분획을 0.1 ml의 1 M 트리스(pH 8.5)로 중화시켰다. 이어서, 용출된 단백질 분획을 모으고, 아미콘 한의 원심분리 필터 장치(MWCO: 30 K, 밀리포어)를 사용하여 3 ml의 부피로 농축하고, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl(pH 6.0)로 평형화된 슈퍼텍스200 하이로드 120 ml 16/60 겔 여과 컬럼(GE 헬스케어, 스웨덴) 상에 적재하였다. 단량체 항체 분획을 모으고, 급속-냉동시키고 -80 °C에서 저장하였다. 샘플 일부는 후속 단백질 분석 및 특성분석을 위해 제공하였다. 정제된 단백질의 예시적인 SDS-PAGE 분석 및 이중특이성 항체 유도체의 HP-크기 배제 크로마토그래피(SEC)의 프로필을 도 8 및 9에 나타내었다.

[0193] 도 5는 일시 발현 시스템에서 관찰된 발현 수율을 열거한 것이다: 모든 설계된 항체 유도체가 추가 분석에 충분한 양으로 발현되고 정제될 수 있었다.

[0194] 비교 이유로, 국제특허출원 공개 제 WO 1995/009917 호 및 문헌 [Muller D., et al., Handbook of Therapeutic antibodies, Part III, Chapter 2, 345-378 (2008)]에 기술된 바와 같이 중쇄의 C-말단에서 펩티드 링커에 의해 2개의 scFv 단편이 융합된 전장 항체를 기초로 한 4가 이중특이성 항체를 제조하고 명명하였다. <IGF-1R> 항원 결합 부위에 대한 중쇄 가변 영역 VH로서 서열번호: 15를 사용하였다. <IGF-1R> 항원 결합 부위에 대한 경쇄 가변 영역 VL로서 서열번호: 16을 사용하였다. <EGFR> 항원 결합 부위에 대한 중쇄 가변 영역 VH로서 서열번호: 7을 사용하였다. <EGFR> 항원 결합 부위에 대한 경쇄 가변 영역 VL로서 서열번호: 8을 사용하였다. 상기 비교 분자는 XGFR1_2320으로 명명하였다(또한 PCT/EP2009/006782 호에 기술되었다).

표 2

비교예	유도된 전장 항체 주쇄	유도된 단일쇄 Fab 단편	가변 영역 VH 및 VL: 서열번호	항체에 부착된 scFv의 위치	단일쇄 Fv-링커	scFv와 중쇄의 C-말단사이의 펩티드 링커/연결자
scFv-XGFR1_2320	<IGF1R>	<EGFR>	7, 8, 15, 16	C-말단 H쇄	(G ₄ S) ₃	(G ₄ S) ₂

[0195]

[0196] 이중특이성 단일쇄 Fv 분자 XGFR1-2320은 0.27 mg의 정제후 최종 수율을 갖는 반면, 상응하는 단일쇄 Fab 분자 XGFR1-2720은 6.8 mg의 최종 수율을 가지며(도 4 참조, 화합물 A), 수율에서 200배 이상의 증가를 나타낸다.

[0197] **실시예 3**

[0198] **이중특이성 <EGFR-IGF1R> 항체 scFab-XGFR 분자의 안정성 및 응집 경향**

[0199] 제조항 항체 유도체의 제조시 존재하는 응집체의 양을 측정하기 위해 HP-크기 배제 크로마토그래피 분석을 수행하였다. 이를 위해, 슈퍼텍스200 분석용 크기-배제 컬럼(GE 헬스케어, 스웨덴)을 사용하여 엘티메이트 3000 HPLC 시스템(디오넥스) 상에서 고성능 SEC에 의해 이중특이성 항체 샘플을 분석하였다. 도 9는 상기 분석의 한 예를 나타낸 것이다. 응집체는 단량체성 항체 유도체를 함유하는 분획 이전에 별도의 피크 또는 솔더로서 나타난다. 상기 작업을 위해, 중쇄 및 경쇄 중 어느 하나에 연결된 scFab를 갖는 중쇄 및 경쇄의 2개 헤테로이량체로 이루어질 목적하는 "단량체성" 분자를 정의한다. 감소된 이중특이성 항체 경쇄 및 중쇄 및 융합 단백질의

아미노산 주쇄의 보전성은 펩티드-N-글리코시다제 F(로슈 몰레큘라 바이오케미칼스)를 사용한 효소 처리에 의한 N-글리칸의 제거후 나노일렉트로스프레이 Q-TOF 질량 분광분석법으로 확인하였다.

[0200] 상이한 조건하에서(다양한 농도 및 시간) 정제된 단백질의 HP-크기 배제 크로마토그래피 분석은 scFab를 함유하는 분자에 대해 응집되는 정상 IgG의 약한 경향에 필적하는 결과를 나타내었다(일부 분자에 대해 관찰된 상이 약한 경향은 scFab 모듈에서 VH44/VL100 쇠간 다이설파이드 결합의 도입에 의해 개선될 수 있다).

[0201] **실시예 4**

[0202] **RTKs EGFR 및 IGF1R에 대한 이중특이성 <EGFR-IGF1R> 항체 scFab-분자의 결합**

[0203] scFab 모듈의 결합, 및 상이한 이중특이성 항체 포맷 scFab-XGFR의 전장 IgG-모듈에서 보유한 항원-결합 부위의 결합을 결합 모듈 및 이중특이성 항체가 유도된 '야생형' IgG의 결합과 비교하였다. 상기 분석은 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, 비아코어) 및 세포-ELISA를 적용하여 수행하였다.

[0204] 결합 특성 이중특이성 <IGF-1R-EGFR> 항체를 비아코어 T100 기기(GE 헬스케어 바이오-사이언시즈(Bio-Sciences) AB, 옘살라)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 분석하였다. 상기 시스템은 분자 상호작용 연구에 잘 확립되어 있다. 상기 시스템은 리간드/분석대상물 결합의 연속 실시간 모니터링을 가능케 하므로 다양한 분석 세팅에서 결합 속도 상수(ka), 해리 속도 상수(kd) 및 평형 상수(KD)의 측정을 가능케 한다. SPR-기술은 금 코팅된 바이오센서 칩의 표면에 근접한 굴절률의 변화가 고정화된 리간드와 용액에 주입된 분석대상물과의 상호작용에 의해 야기되었다. 분자가 표면상의 고정화된 리간드에 결합하는 경우, 질량이 증가하고, 해리되는 경우, 질량이 감소된다.

[0205] 포획 항-인간 IgG 항체는 아민-커플링 화학을 이용하여 C1 바이오센서 칩의 표면에 고정화시켰다. 유동 세포를 5 µl/분의 유량에서 0.1 M N-하이드록시숙신이미드 및 0.1 M 3-(N,N-다이메틸아미노)프로필-N-에틸카보다이이미드의 1:1 혼합물로 활성화시켰다. 항-인간 IgG 항체를 나트륨 아세테이트(pH 5.0)에 5 µg/ml에서 주입시켜 약 200 RU의 표면 밀도를 야기하였다. 기준 대조군 유동 세포를 포획 하에 대신에 비히클 완충제만 사용하는 것을 제외하고 동일한 방법으로 처리하였다. 1 M 에탄올아민/HCl(pH 8.5)의 주입에 의해 표면을 차단하였다. 이중특이성 항체를 HBS-P에 희석하고 5 µl/분의 유량으로 주입하였다. 접촉 시간(결합 단계)은 1 내지 5 nM의 농도에서 항체에 대해 1 분이였다. EGFR-ECD를 1.2, 3.7, 11.1, 33.3, 100 및 300 nM의 증가하는 농도로 주입하고, IGF-1R은 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30 및 90 nM의 농도로 주입하였다. 접촉 시간(결합 단계)은 3 분이였고, 해리 시간(유출 완충액으로 세척)은 30 µl/분의 유량에서 2개의 분자 모두에 대해 5 분이였다. 모든 상호작용은 25 °C(표준 온도)에서 수행하였다. 0.85% 인산 및 5 mM 수산화나트륨의 재생 용액을 각각 60 초동안 5 µl/분의 유량으로 주입하여 각 결합 주기 후에 임의의 비-공유 결합 단백질을 제거하였다. 초당 1개의 신호의 속도로 신호를 검출하였다. 샘플을 증가하는 농도에서 주입하였다.

[0206] EGFR 및 IGF1R에 대한 이중특이성 항체 <IGF-1R-EGFR> 항체의 예시적인 동시 결합을 도 10a 내지 10d에 나타내었다.

표 3

EGFR 및 IGF-1R에 대한 이중특이성 항체(scFab-XGFR1_2720 및 scFab-XGFR2_2720)의 친화도(KD)

분자	KD 값(EGFR에 대한 친화도)	KD 값(IGF-1R에 대한 친화도)
scFab-XGFR1_2720	2 nM	2 nM
scFab-XGFR2_2720	0.5 nM	11 nM
<IGF-1R> 클론 18	n.a.	2 nM
<EGFR> ICR62	0.5 nM	n.a.

[0207]

[0208] 배양 세포에 대한 FACS-기본 결합 및 경쟁 분석을 또한 세포 표면에 노출되는 RTK에 대한 이중특이성 항체 유도체의 결합 능력을 평가하기 위해 적용할 수 있다. 도 11은 A549 암 세포에 대한 이중특이성 XGFR 유도체를 함유하는 scFab의 결합 능력을 시험하기 위해 사용한 실험 구성을 나타낸 것이다. 상기 세포 경쟁 분석에 있어, 항원 EGFR 및 IGF1R을 발현시키는 A549 세포를 분리하고 계수하였다. 원추형 96-웰 플레이트의 웰 당

1.5 x 10e5 세포를 접종하였다. 세포를 스핀 다운시키고(1500 rpm, 4 °C, 5 분), 1 µg/mL의 알렉사 (Alexa)647-표지된 IGF1R-특이적 항체를 함유하는 2% FCS(태아 소 혈청)으로 PBS 중 각각의 이중특이성 항체의 단계 희석물 50 µl중에서 얼음상에서 45 분동안 배양하였다. 세포를 다시 스핀다운시키고 2% FCS를 함유하는 200 µl PBS로 2회 세척하였다. 최종적으로, 세포를 BD 세포고정액(BD 바이오사이언시즈)에 재현탁하고 얼음상에서 적어도 10 분동안 배양하였다. 세포의 평균 형광 강도(mfi)를 유동 세포분석(FACS 칸토)에 의해 측정하였다. mfi는 적어도 이중의 2개의 독립적 염색물에서 측정하였다. 유동 세포분석 스펙트럼은 플로우조(FlowJo) 소프트웨어(트리스타(TreeStar))를 사용하여 더 처리하였다. 반-최대 결합은 XLFit 4.0(IDBS) 및 용량 반응 한 위치 모델 205를 이용하여 측정하였다.

[0209] 도 12a 내지 12c에 나타낸 상기 분석 결과는 종양 세포의 표면에 항체 유도체를 함유하는 이중특이성 scFab의 결합 작용성을 입증한다. 예를 들면, 이중특이성 항체 유도체 scFab-XGFR1_2721의 경쟁 실험에서 IC50은 0.11 µg/ml인 반면, 단일특이성 항체의 IC50은 50%보다 더 높았다(0.18 µg/ml). 모 항체와 비교한 이중특이성 scFab-XGFR_2721 유도체의 경쟁 분석에서 상기 증가된 활성은 이중특이성 분자가 단일특이성 항체보다 세포 표면에 더 잘 결합함을 시사한다.

[0210] **실시예 5**

[0211] **이중특이성 <EGFR-IGF-1R> 항체 scFab-XGFR 분자에 의한 EGFR 및 IGF-1R의 하향조절**

[0212] 인간 항-IGF-1R 항체 <IGF-1R> HUMAB 클론 18(DSM ACC 2587)은 IGF1R-신호전달을 억제하고, 인간화 래트항-EGFR 항체 <EGFR>ICR62는 EGFR에 의한 신호전달을 억제한다. 상이한 scFab-XGFR1 변이체의 잠재적 억제 활성을 평가하기 위해, 2개의 항체 모두로부터 수용체의 하향조절 정도를 분석하였다.

[0213] 종양 세포에서 IGF-I 수용체(IGF-1R)의 양에 대한 본 발명 항체의 효과를 검출하기 위해, 시간-과정 실험 및 IGF-1R 및 EGFR 특이성 항체를 사용한 후속 ELISA 분석을 수행하였다.

[0214] 10% FCS(PAA, Cat. No. E15-039) 및 1% 펜스트렙(PenStrep)으로 보충된 RPMI 1640 중의 인간 종양 세포 1 ml/웰로 6 웰 플레이트에 접종하였다. 3 ml의 배지를 각 웰에 가하고 세포를 37 °C 및 5% CO₂에서 24 시간동안 배양하였다.

[0215] 배지를 조심스럽게 제거하고 RPMI-VM 배지에 희석된 100 nM XGFR 항체 2 ml로 교체하였다. 대조용 웰에서, 배지를 항체가 없는 배지 및 완충제, 및 대조용 항체를 갖는 배지로 교체하였다(<IGF-1R> HUMAB 클론 18 및 <EGFR>ICR62 최종 농도 100 nM). 세포를 37 °C 및 5% CO₂에서 배양하고 개개 플레이트를 24 시간후에 더 처리하기 위해 따로 취하였다.

[0216] 배지를 흡인시켜 제거하고 세포를 1 ml PBS로 세척하였다. 300 µl/웰의 차가운 MES-용해 완충제를 가하였다 (MES, 10 mM Na₃VO₄ 및 컴플리트(Complete, 등록상표) 프로테아제 억제제). 1 시간 후에, 세포를 세포 스크레이퍼(코닝(Corning), Cat. No. 3010)를 사용하여 얼음상에서 분리하고, 웰 내용물을 에펜도르프(Eppendorf) 반응 튜브로 옮겼다. 세포 단편들을 13000 rpm 및 4 °C에서 10 분간 원심분리하여 제거하였다.

[0217] **EGFR 검출**

[0218] 96 웰 마이크로타이터플레이트(MTP)를 프로토콜에 따라 제조하였다(인간 EGFR에 대한 듀오셋(DuoSet) ELISA, RnD 시스템 Cat. No. DY231). PBS 중 인간 EGFR 염소 항체 144 µg/ml를 PBS에 1:180으로 희석하고, 100 µl/웰을 MTP에 가하였다. MTP를 실온에서 교반하에 밤새 배양하였다. 플레이트를 0.1% 트윈(Tween, 등록상표) 20으로 보충된 PBS로 3회 세척하고 300 µl/웰의 PBS, 3% BSA 및 0.1% 트윈(등록상표) 20 용액으로 실온(RT)에서 교반하에 1 시간(h)동안 차단하였다. 플레이트를 0.1% 트윈(등록상표) 20으로 보충된 PBS로 3회 세척하였다.

[0219] 세포 용해물 중 단백질의 양을 BCA 단백질 분석 키트(피어스(Pierce))를 사용하여 측정한 후, 세포 용해물을 100 mM Na₃VO₄ 1:100 및 컴플리트(등록상표) 프로테아제 억제제 1:20으로 보충된 MES-용해 완충제를 사용하여 0.04 mg/ml의 단백질 농도로 조정하고, 100 µl/웰의 용해물을 미리-준비된 MTP에 가하였다. 배경 측정을 위해, 100 µl의 용해 완충제를 MTP중의 웰에 가하였다.

[0220] 제 2의 세포 용해물 농도는 0.025 mg/ml에서 사용하였으며, 용해물은 1:2 희석물이었고, 웰 당 100 µl를 미리-준비된 MTP에 가하였다. MTP는 RT에서 교반하에 2 시간동안 더 교반한 다음, 0.1% 트윈(등록상표) 20 용액을 갖는 PBS로 3회 세척하였다.

- [0221] EGFR에 대한 검출 항체는 PBS, 3% BSA 및 0.2% 트윈(등록상표) 20에 1:180으로 희석된, 36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 인간 EGFR 염소 비오틴화 항체였다. 웰 당 100 μl 를 가하고 RT에서 교반하에 2 시간동안 배양하였다. 이어서, MTP를 200 μl /웰의 0.1% 트윈(등록상표) 20 용액 함유 PBS로 3회 세척하였다. 이어서, PBS, 3% BSA 및 0.2% 트윈(등록상표) 20 중 스트렙타비딘(Streptavidin)-HRP 1:200 100 μl /웰을 가하고 교반하에 RT에서 20 분간 배양하였다. 이어서, 플레이트를 0.1% 트윈(등록상표) 20 용액을 갖는 PBS로 6회 세척하였다. 100 μl /웰의 3,3'-5,5'-테트라메틸벤지딘(로슈, BM-블루 ID-No. 11484581)을 가하고 교반하에 RT에서 20 분간 배양하였다. 25 μl /웰의 1M H₂SO₄를 가하고 RT에서 5 분간 더 배양하여 색 반응을 중단시켰다. 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0222] **IGR-1R 검출**
- [0223] PBS, 3% BSA 및 0.2% 트윈(등록상표) 20에 1:200으로 희석시킨 AK1a-비오틴화 항체(젠맵(Genmab), 덴마크) 100 μl /웰을 가하여 스트렙타비딘-MTP(로슈 ID. No.: 11965891001)를 준비하였다. 스트렙타비딘-MTP를 교반하에 RT에서 1 시간동안 배양한 후 0.1% 트윈(등록상표) 20 용액 함유 PBS 200 μl /웰로 3회 세척하였다.
- [0224] 세포 용해물 중 단백질의 양을 BCA 단백질 분석 키트(피어스)를 사용하여 측정 후, 세포 용해물을 50 mM 트리스(pH 7.4), 100 mM Na₃VO₄ 1:100 및 킴플리트(등록상표) 프로테아제 억제제 1:20으로 0.3 mg/ml의 단백질 농도로 조정하고, 100 μl /웰의 용해물을 미리-준비된 스트렙타비딘-MTP에 가하였다.
- [0225] 제 2의 세포 용해물 농도는 0.15 mg/ml에서 사용하였으며, 용해물은 희석물이었고, 웰 당 100 μl 를 미리-준비된 스트렙타비딘-MTP에 가하였다. 배경 측정을 위해 100 μl 용해 완충제를 스트렙타비딘-MTP 중의 웰에 가하였다.
- [0226] MTP는 RT에서 교반하에 1 시간동안 더 교반한 다음, 0.1% 트윈(등록상표) 20 용액을 갖는 PBS로 3회 세척하였다.
- [0227] IGF-1R에 대한 검출 항체는 PBS, 3% BSA 및 0.2% 트윈(등록상표) 20에 1:750으로 희석된, 인간 IGF-1R β 래빗 항체(산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), Cat. No. sc-713)였다. 웰 당 100 μl 를 가하고 RT에서 교반하에 1 시간동안 배양하였다. 이어서, MTP를 200 μl /웰의 0.1% 트윈(등록상표) 20 용액 함유 PBS로 3회 세척하였다. 이어서, 2차 항체를 가하고, PBS, 3% BSA 및 0.2% 트윈(등록상표) 20 중의 래빗 IgG-POD(셀 시그널링 Cat. No. 7074) 1:4000 100 μl 를 웰 당 가하고 교반하에 RT에서 1 시간동안 배양하였다. 이어서, 플레이트를 0.1% 트윈(등록상표) 20 용액을 갖는 PBS로 6회 세척하였다. 100 μl /웰의 3,3'-5,5'-테트라메틸벤지딘(로슈, BM-블루 ID-No. 11484581)을 가하고 교반하에 RT에서 20 분간 배양하였다. 25 μl /웰의 1M H₂SO₄를 가하고 RT에서 5 분간 더 배양하여 색 반응을 중단시켰다. 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0228] A549 세포에서 모 단일특이성 항체 <EGFR>ICR62 및 <IGF-1R> HUMAB-클론 18과 비교한 XGFR 분자를 함유하는 이중특이성 scFab에 의한 수용체 하향조절 검출의 결과들도 13 및 14에 나타내었다. 이중특이성 항체 scFab-XGFR은 EGFR 및 IGF1R을 둘 다 하향조절한다. 이것은 결합 분자의 충분한 작용성(생물학적 작용성) 및 표현형 조절이 유지됨을 보여준다. 도 14는 또한, 놀랍게도 이중특이성 항체 scFab-XGFR_2720이도 <EGFR>ICR62 항체 단독에 비해 개선된 EGFR 하향조절을 나타내었음을 시사한다.
- [0229] scFab 함유 XGFR1 변이체가 동일한 물농도로 동일 분석에 적용되는 경우 야생형 항체와 동일하거나 그보다 우수한 활성을 나타내었다는 사실은 scFab-XGFR1 분자가 2개의 신호전달 경로 모두에 간섭할 수 있음을 시사한다.
- [0230] **실시예 6**
- [0231] **시험관내에서 종양 세포주의 scFab-XGFR1 및 scFab-XGFR2-매개 성장 억제**
- [0232] 인간 항-IGF-1R 항체 <IGF-1R>HUMAB 클론 18(DSM ACC 2587)은 IGF1R을 발현하는 종양 세포주의 성장을 억제한다(국제특허출원 공개 제 WO 2005/005635 호). 유사한 방식으로, 인간화 래트 항-EGFR 항체 <EGFR>ICR62는 EGFR을 발현하는 종양 세포주의 성장을 억제하는 것으로 밝혀졌다(국제특허출원 공개 제 WO 2006/082515 호). 종양 세포주의 성장 분석에서 상이한 scFab-XGFR1 변이체의 잠재적 억제 활성을 평가하기 위해, EGFR 및 IGF1R을 발현하는 H322M 세포에서의 억제 정도를 분석하였다.
- [0233] 플라스틱 표면에 부착되는 것을 방지하기 위해 폴리-HEMA(폴리(2-하이드록시에틸메타크릴레이트)) 코팅된 접시 상에서 10% FCS로 보충된 RPMI 1640 배지중에서 H322M 세포(5000 세포/웰)를 배양하였다. 상기 조건하에서 H322M 세포는 3차원적으로 자라는 치밀한 회전타원체를 형성한다(부착 비의존성으로 불리는 성질). 상기 회전 타원체는 3차원적 조직구조 및 동일반응계내 고품 종양의 구성과 밀접하게 유사하다. 회전타원체 배양물을 100

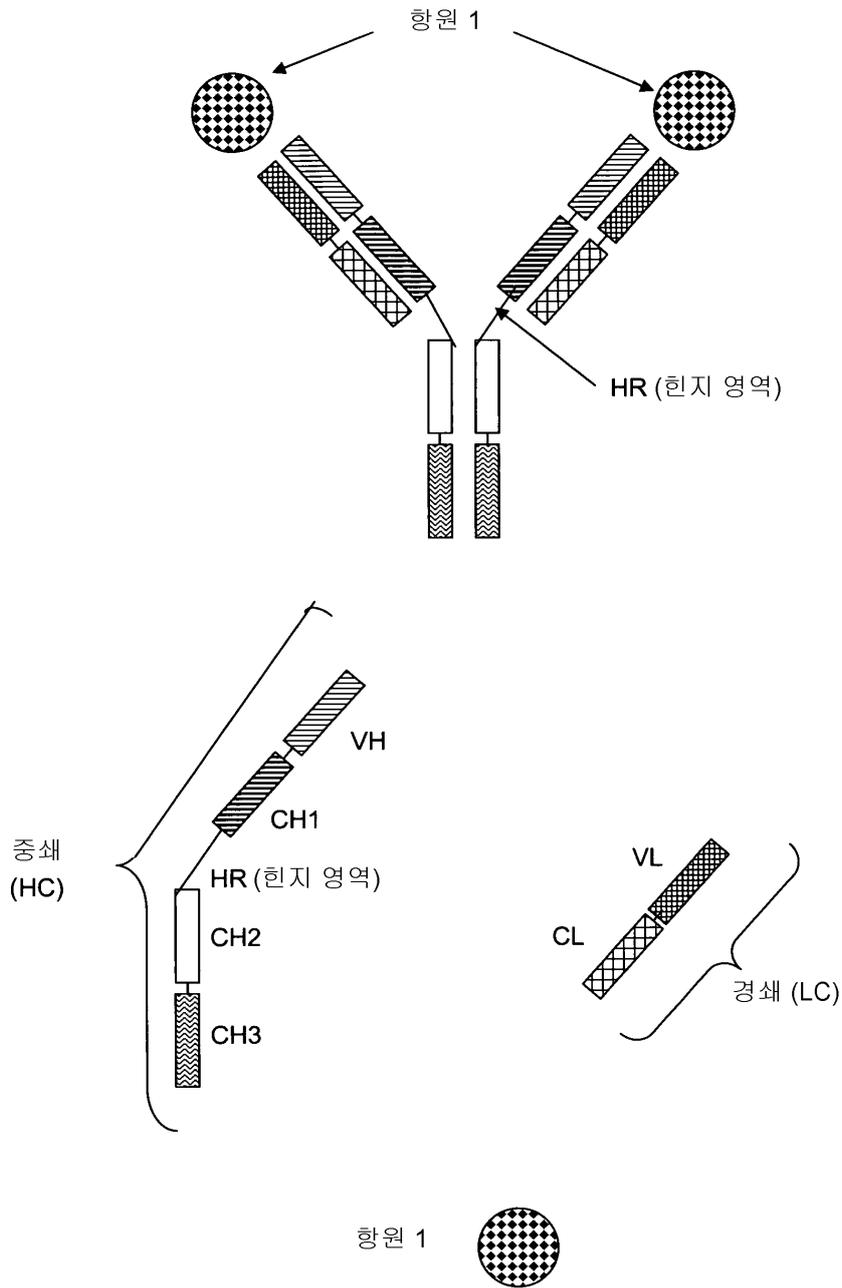
nM 항체의 존재하에서 7 일동안 배양하였다. 셀타이터 글로우(Celltiter Glow) 발광 분석을 이용하여 성장 억제율을 측정하였다. H322M 회전타원체 배양물을 <IGF-1R> HUMAB-클론 18로 처리한 경우, 성장의 억제가 관찰될 수 있다.

[0234] 도 15는 100 nM <IGF-1R> HUMAB-클론 18의 적용이 세포 성장을 72% 감소시켰으며 100 nM <EGFR>ICR62의 적용이 동일 분석에서 세포 성장을 77% 감소시켰음을 보여준다. 2개의 항체의 동시 적용(둘 다 100 nM의 동일 농도에서)은 세포 생존률의 완전한 감소를 야기하였다(100% 억제). 이것은 2개의 RTK 경로에 대한 동시 간섭이 단지한 경로 단독에 대한 간섭보다 종양 세포주에 대해 더 큰 영향을 가짐을 보여준다. 100 nM의 몰 농도에서 다양한 scFab-XGFR1-변이체의 적용은 단일 분자 단독에서 관찰된 것보다 훨씬 현저한 보다 높은 성장 억제율을 야기하였다. 사실상, 100 nM의 항체 농도에서, 다양한 scFab-XGFR1-변이체는 세포 성장의 완전한(100%) 억제를 나타낸 반면, 단일 모듈러스의 적용은 단지 부분적 억제를 야기하였다.

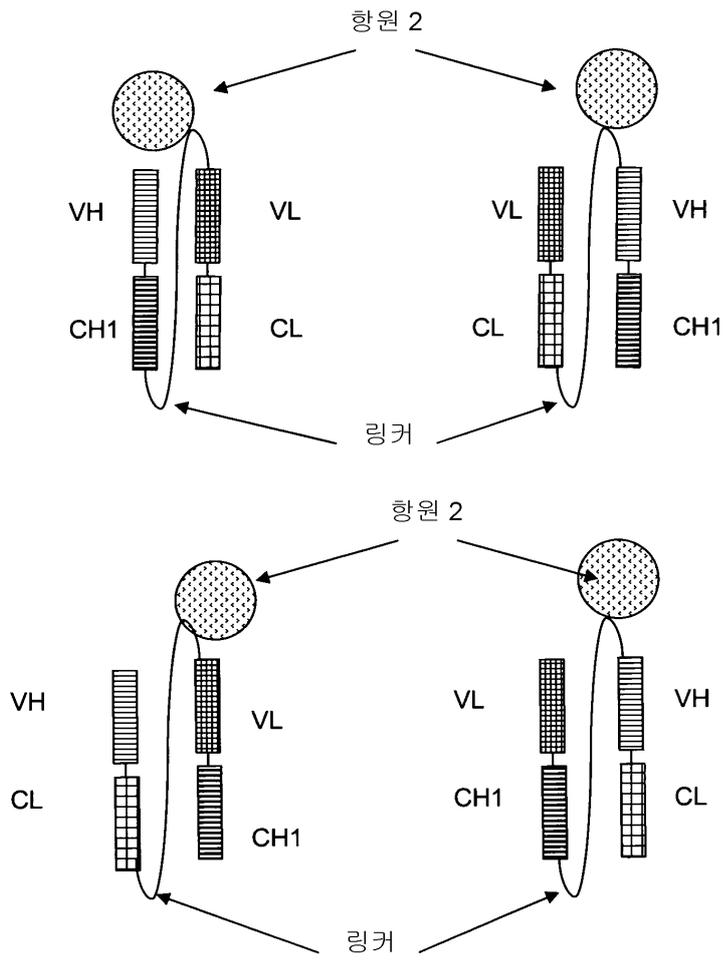
[0235] scFab-XGFR1 분자는 단지 EGFR 신호전달 또는 IGF1R 신호전달에만 간섭하는 IgG에 비해 현저히 증가된 성장 억제 활성을 갖는 것으로 결론지어진다.

도면

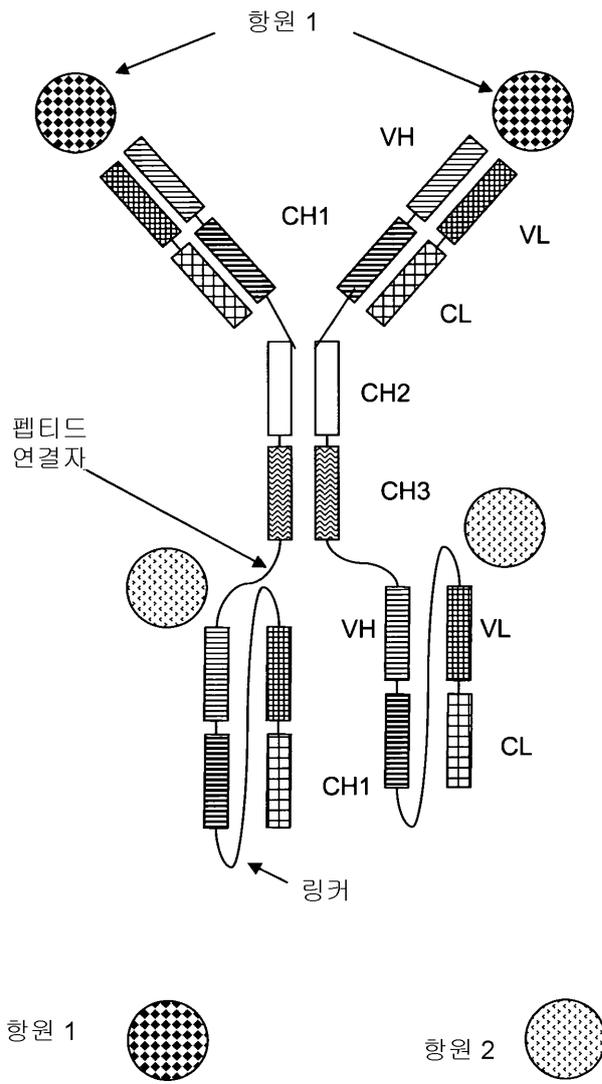
도면1

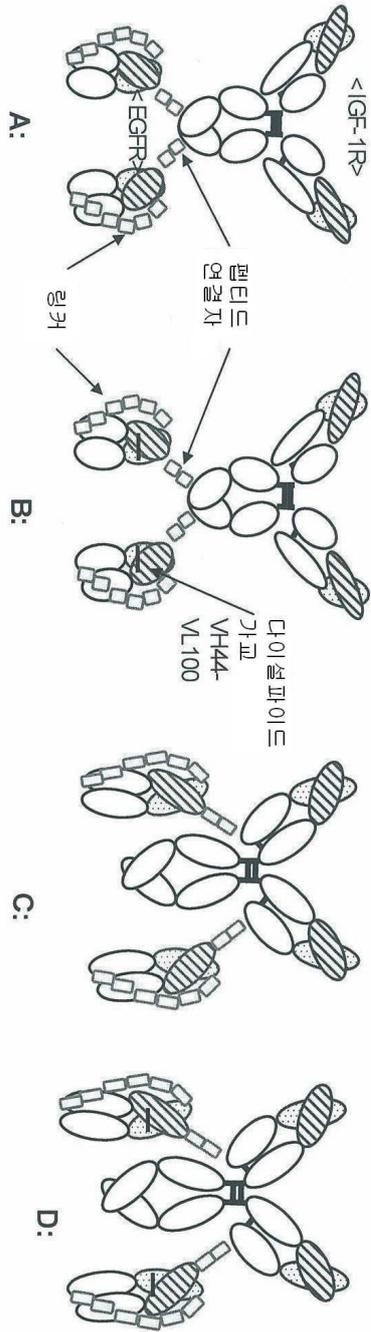


도면2



도면3

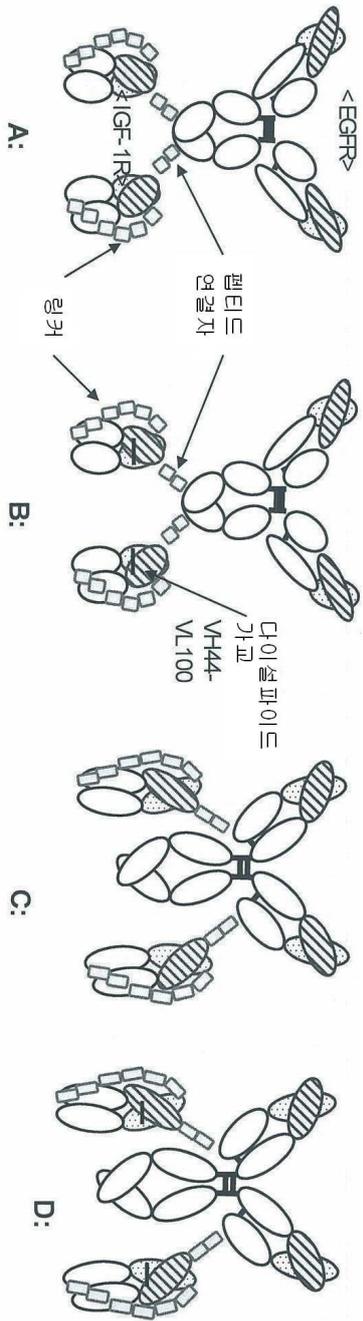




도면4

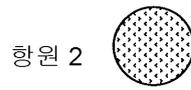
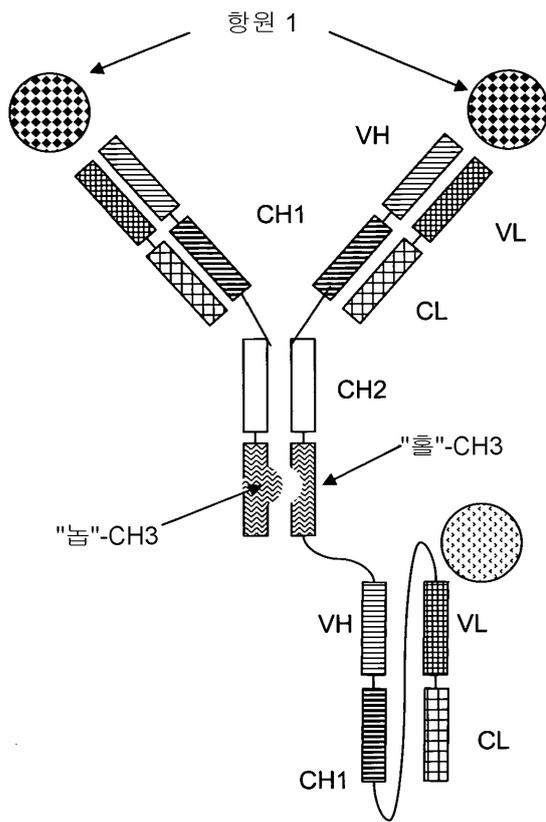
포맷	분자 명칭	평균 수율 (mg/L)	1 mg/ml에서 SEC후 응집(%)
A	scFab-XGFR1_2720	6.8	4.3
B	scFab-XGFR1_2721	7.5	1.7
C	scFab-XGFR1_4720	5.2	7.7
D	scFab-XGFR1_4721	9.5	3.5

도면5

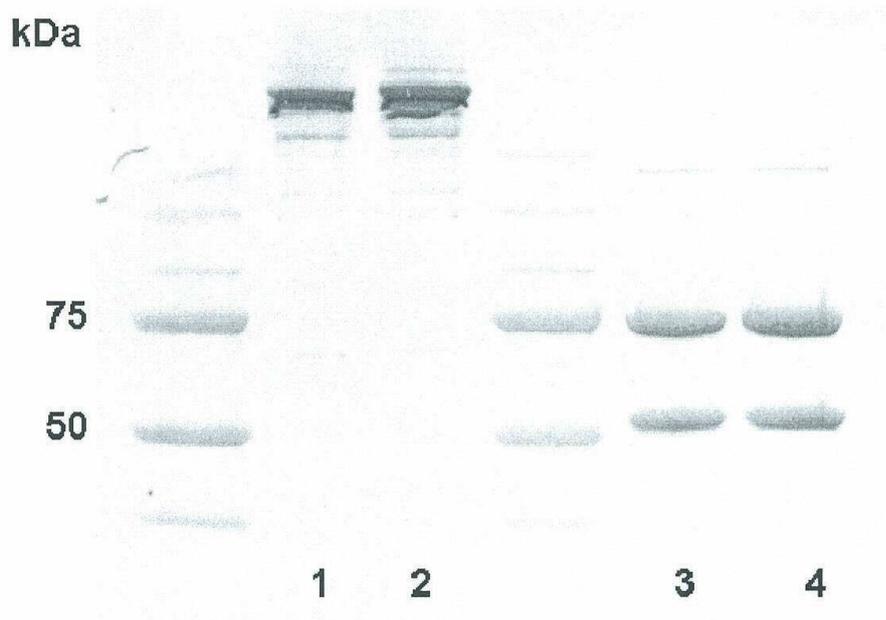


포맷	분자 명칭	평균 수율 (mg/L)	1 mg/ml에서 SEC후 응집(%)
A	scFab-XGFR2_2720	4.4	0
B	scFab-XGFR2_2721	1.2	2.2
C	scFab-XGFR2_4720		
D	scFab-XGFR2_4721		

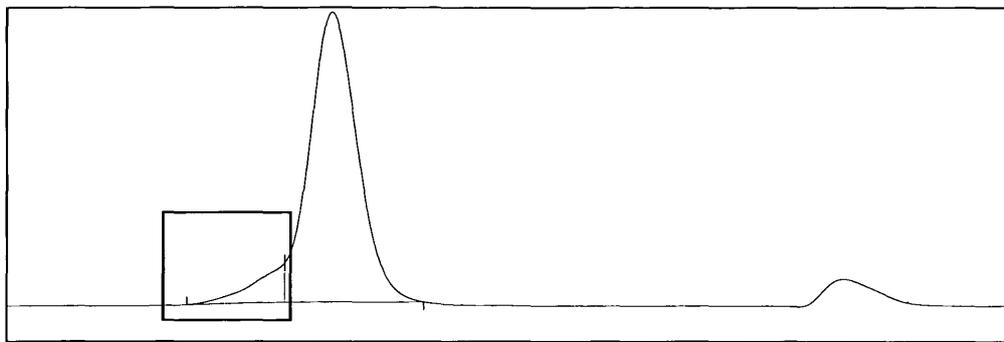
도면6



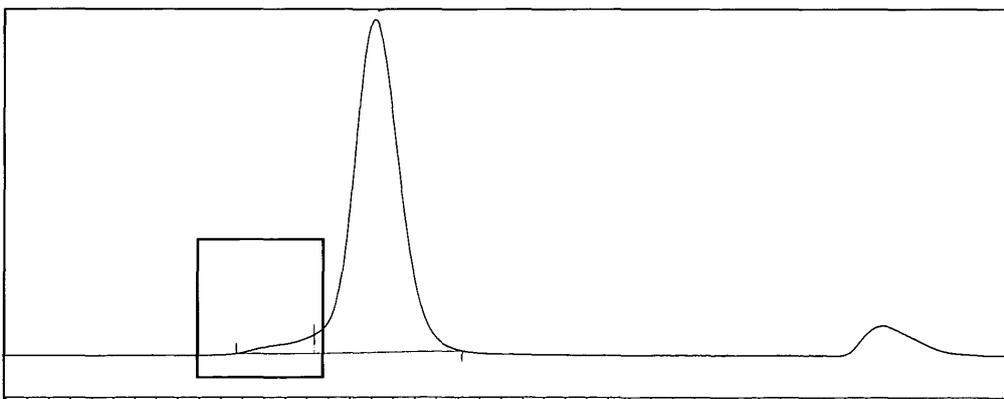
도면8



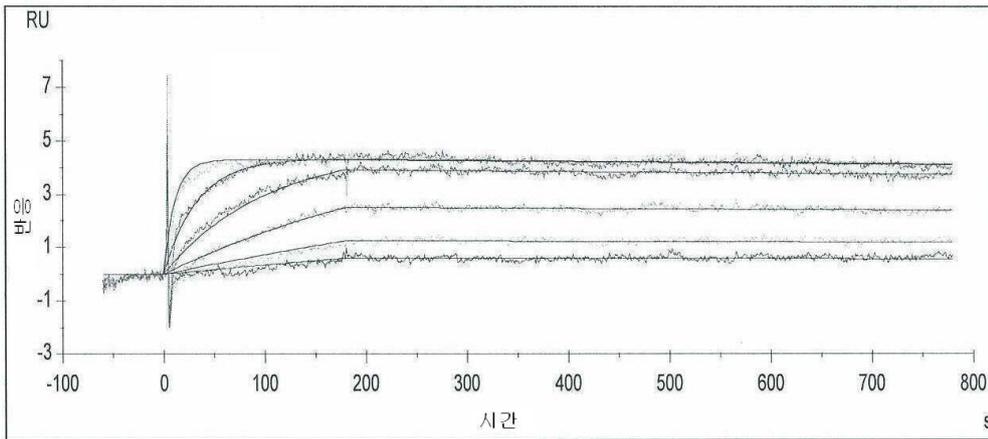
도면9a



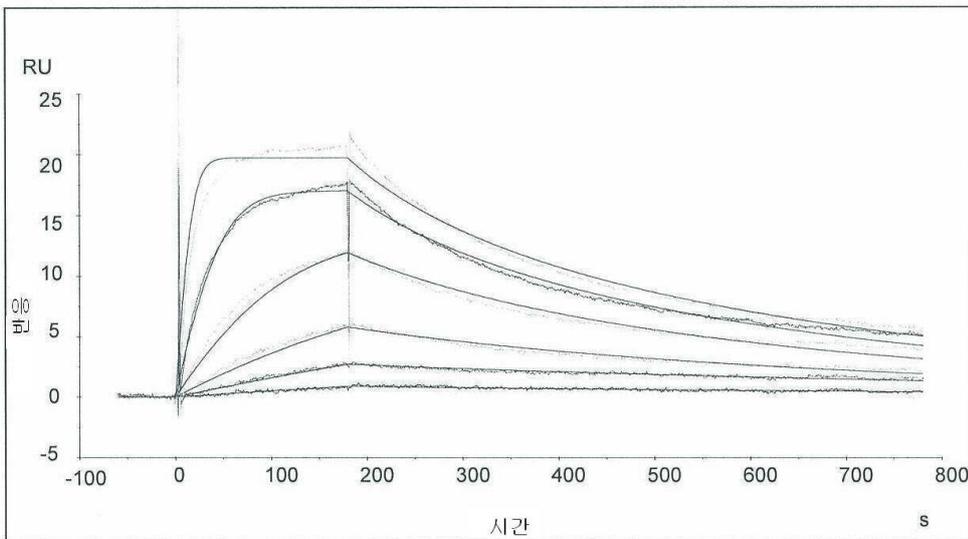
도면9b



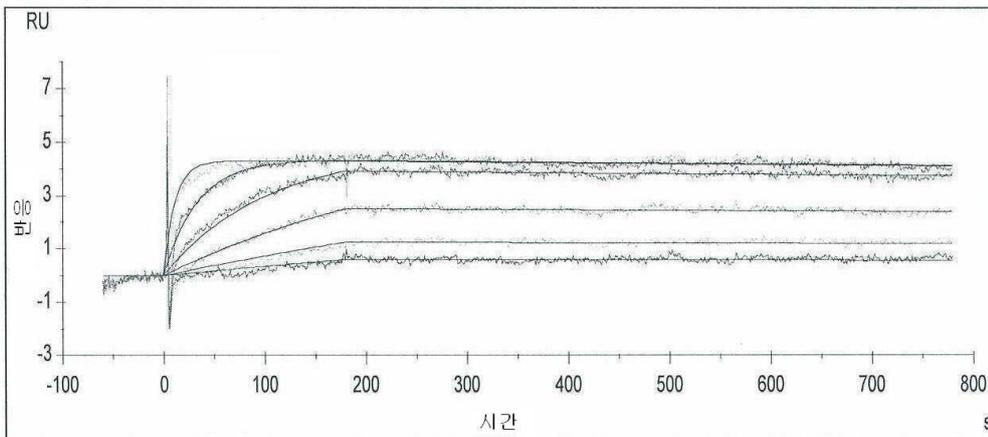
도면10a



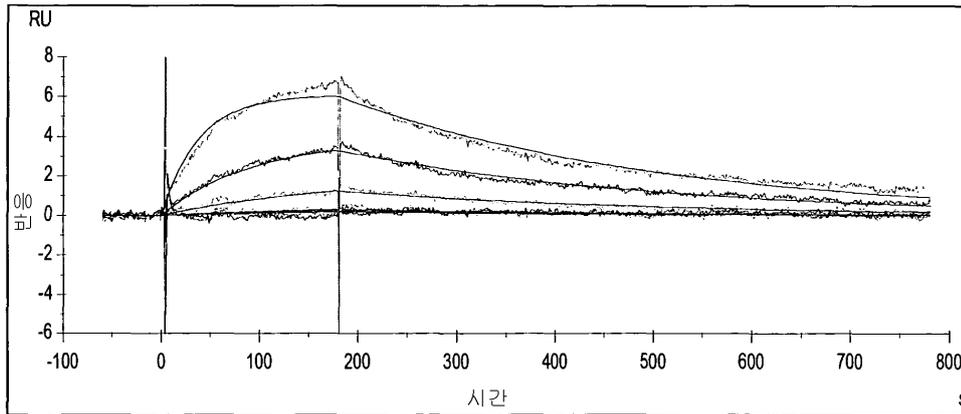
도면10b



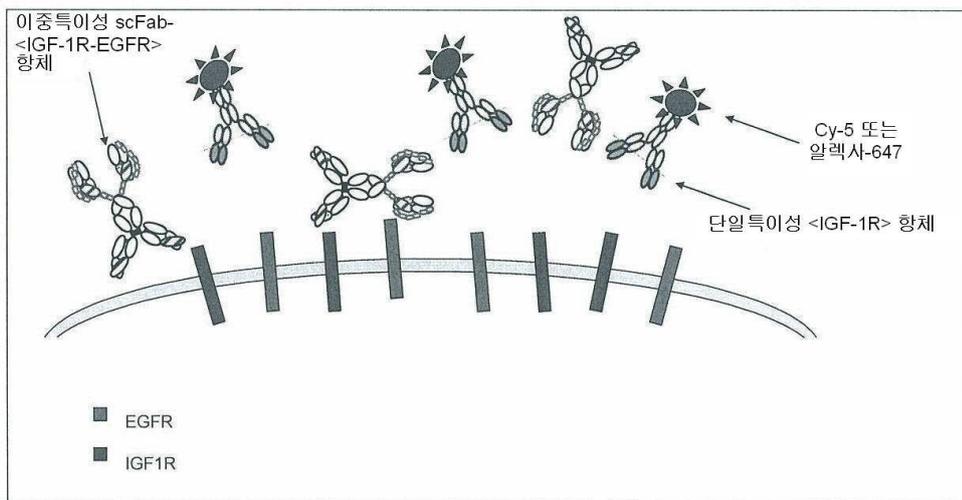
도면10c



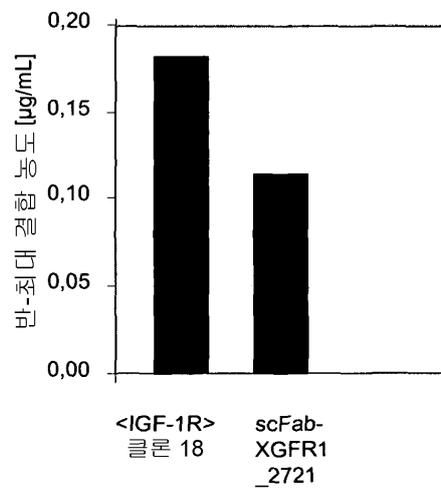
도면10d



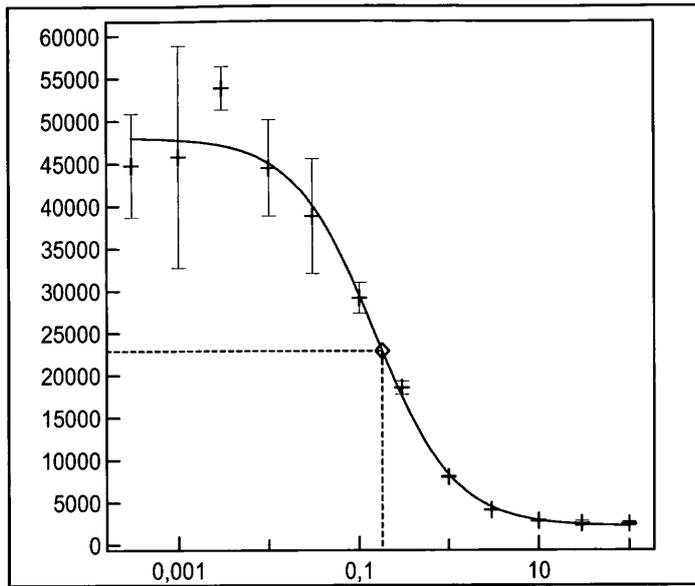
도면11



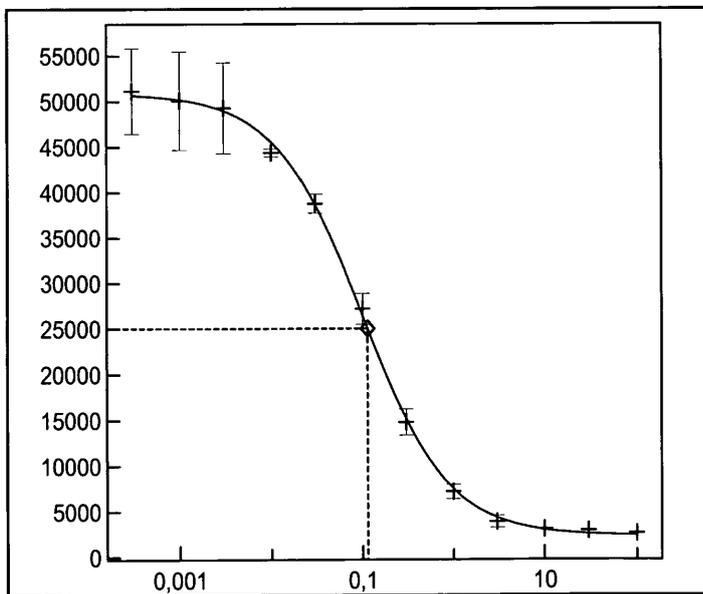
도면12a



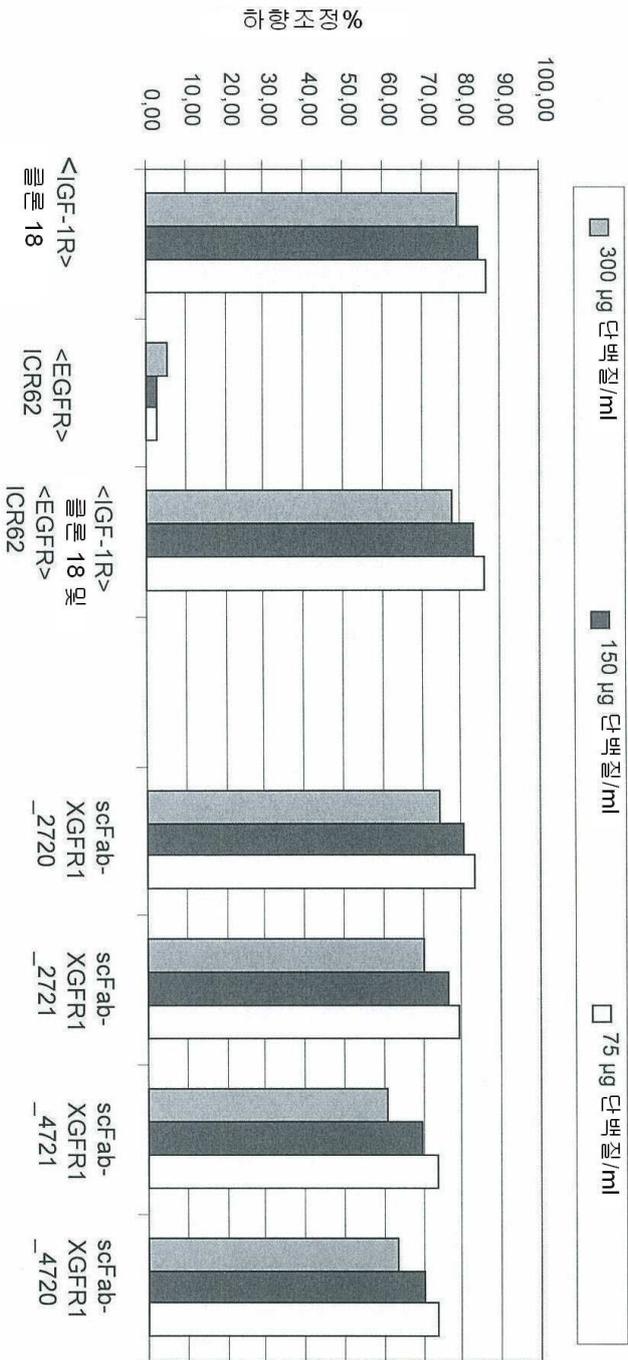
도면12b



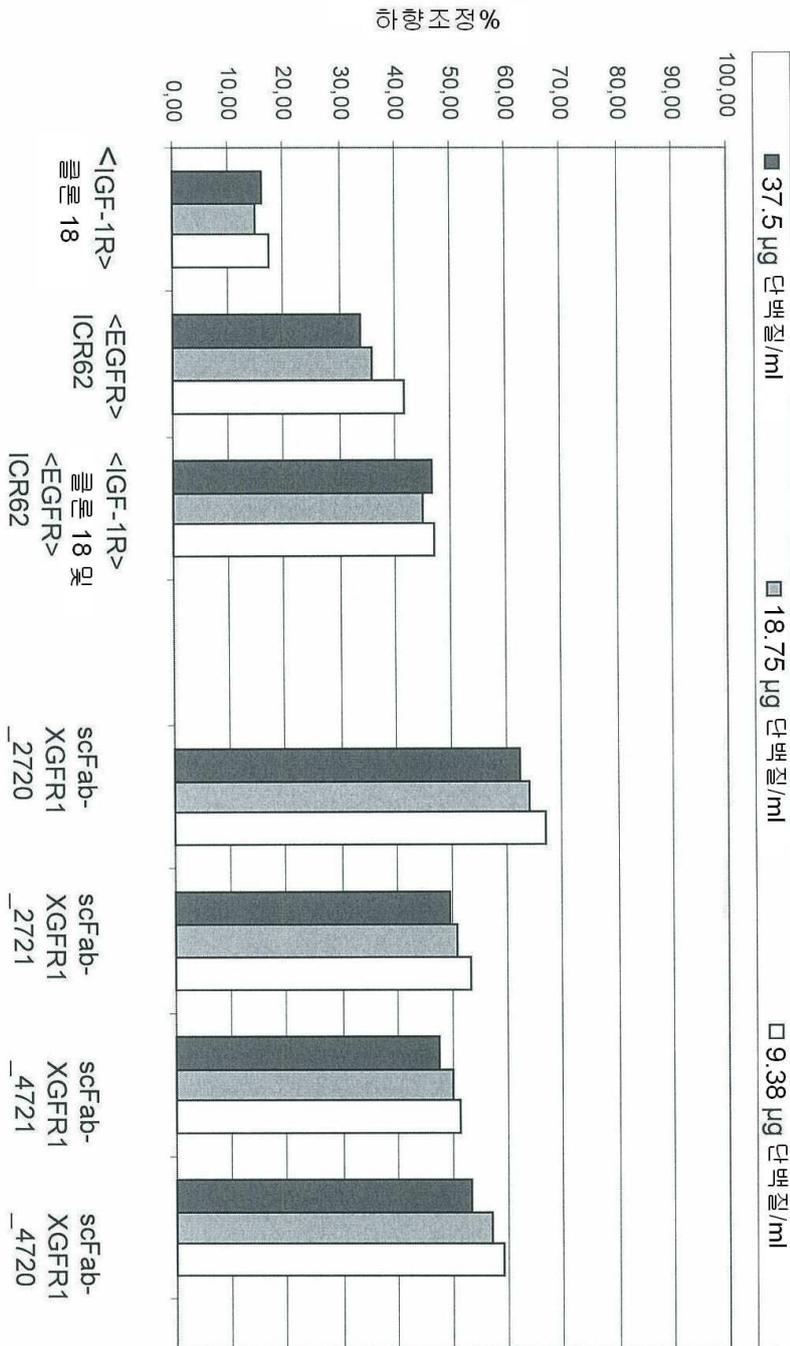
도면12c



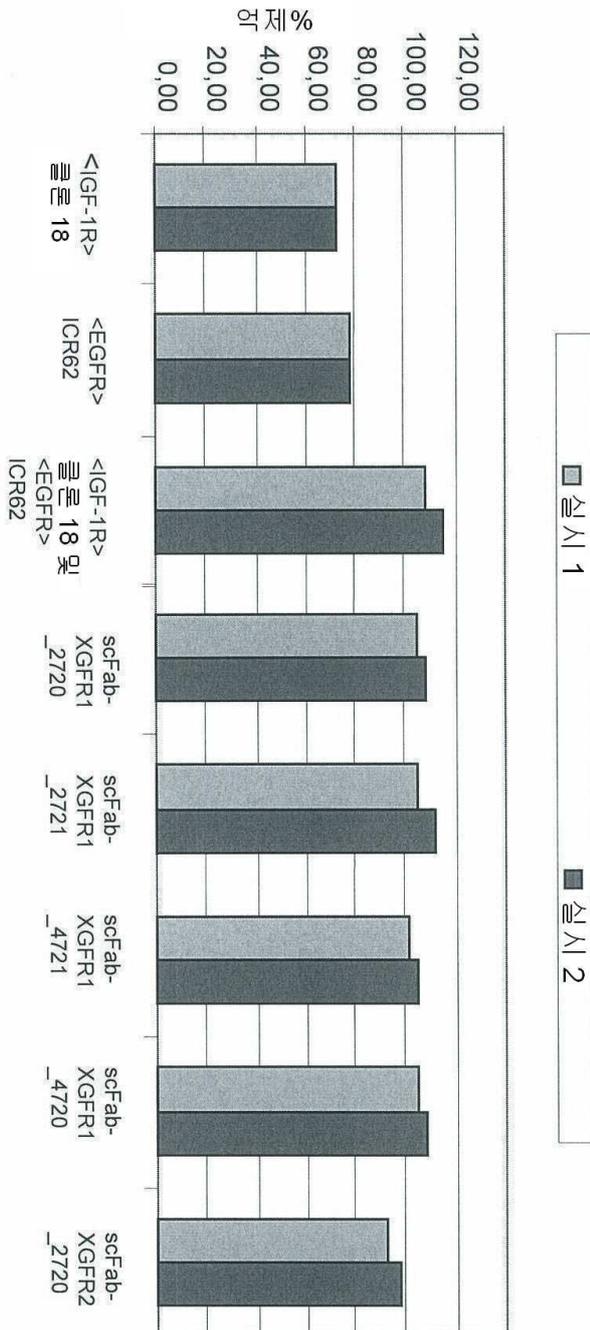
도면13



도면14



도면15



서열 목록

<110> Roche Glycart AG

<120> Multispecific antibodies comprising full length antibodies and single chain Fab fragments

<130> 26056 FT

<140> PCT/EP2010/002004

<141> 2010-03-30

<150> EP 09004909.9

<151> 2009-04-02

<160> 19

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR3, <IGF-1R> HUMAB-Clone 18

<400> 1

Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR2, <IGF-1R> HUMAB-Clone 18

<400> 2

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR1, <IGF-1R> HUMAB-Clone 18

<400> 3

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR3, <IGF-1R> HUMAB-Clone 18

<400> 4

Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR2, <IGF-1R> HUMAB-Clone 18

<400> 5

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR1, <IGF-1R> HUMAB-Clone 18

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

<220><223> heavy chain CDR3, humanized <EGFR>ICR62

<400> 9

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR2, humanized <EGFR>ICR62

<400> 10

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR1, humanized <EGFR>ICR62

<400> 11

Asp Tyr Lys Ile His

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR3, humanized <EGFR>ICR62

<400> 12

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR2, humanized <EGFR>ICR62

<400> 13

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR1, humanized <EGFR>ICR62

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain, humanized <EGFR>ICR62-I-HHD

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

 20 25 30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

 35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> light chain variable domain, humanized <EGFR>ICR62 -I-KC
 <400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 17
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

