

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C07K 15/28	(45) 공고일자 1999년 12월 15일	(11) 등록번호 10-0236156
	(24) 등록일자 1999년 09월 29일	
(21) 출원번호 10-1994-0701789	(65) 공개번호 특 1994-0703391	(43) 공개일자 1994년 10월 24일
(22) 출원일자 1994년 05월 27일		
번역문제출일자 1994년 05월 27일		
(86) 국제출원번호 PCT/US 92/010140	(87) 국제공개번호 WO 99/00001	(87) 국제공개일자 1999년 01월 01일
(86) 국제출원일자 1992년 11월 25일		
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 말라위 수단 EA EURASIAN특허 : 러시아 EP 유럽특허 : 그리스 모나코 포르투갈 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 룩셈부르크 네덜란드 스웨덴 OA OAPI특허 : 코트디부와르 국내특허 : 아일랜드 기네 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 노르웨이 루마니아 몽고 폴란드		
(30) 우선권주장 7/801.798 1991년 11월 29일 미국(US)		
(73) 특허권자 프로테인 디자인랩스 인코포레이티드 킨 캐리 미국 캘리포니아주 94043 마운틴뷰 가르시아 애비뉴 2375		
(72) 발명자 쵸 제이. 윤 미합중국 캘리포니아 94025 멘로파크 #16 오크 그로브 애비뉴 445 코스텔니 웨리 에이. 미합중국 캘리포니아 94041 마운틴 뷰 치키타 애비뉴 310 콜 마이클 에스. 미합중국 캘리포니아 94036 팔로알토 칼리지 애비뉴 990		
(74) 대리인 나영환, 이상섭		

심사관 : 한현숙

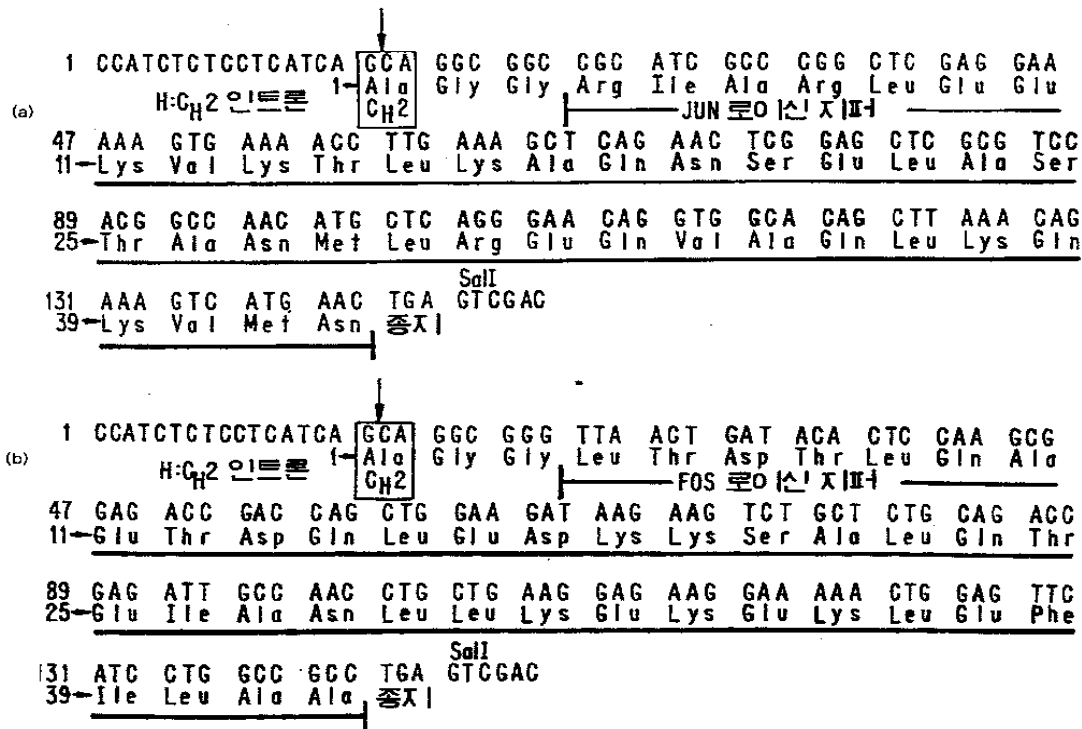
(54) 2중 특이 항체 이종이량체(Bispecific antibody heterodimers)

요약

본 발명은 로이신 지퍼에 의해 형성된 2중 특이 항체를 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다. 이종이량체를 우선적으로 형성시킬 수 있는 로이신 지퍼는 각각 여러 결합 특이성을 갖는 에피토프 결합 성분에 결합된다. 2중 특이 항체는 로이신 지퍼의 쌍 결합에 의해 형성되어, 2개의 독특한 에피토프 결합 성분을 결합시킨 이종이량체를 형성시킨다. 이종이량체화는 2개의 로이신 지퍼 영역의 상호 작용에 의해 일어날 수 있고, 이로써 2중 특이 항체가 형성된다. 이러한 2중 특이 항체는 2개의 단량체 서브유닛사이에 이황화 결합과 같은 분자내 화학적 결합을 형성시킴으로써 더욱 안정화될 수 있다.

이러한 단량체 서브유닛 간의 분자내 결합이 형성된 다음 로이신지퍼는 제거되거나 보유될 수 있다. 이런 방법에 의해 제조된 2중 특이 항체는 거의 순수하며 고수율로 대량 생산될 수 있다. 또한, 2작용성 이종이량체는 에피토프 결합 성분이 아닌 거래 분자 종류에 에피토프 결합 성분을 결합시킴으로써 형성될 수 있다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

2중 특이 항체 이중이량체

[도면의 간단한 설명]

제1도는 Jun 로이신 지퍼(A) 및 Fos 로이신 지퍼(B)의 서열. 화살표는 인트론 H: C_H2 및 엑손 C_H2 사이의 접목 부위를 나타낸다.

제2도는 항-Tac-Jun(A) 및 항-CD3-Fos(B)의 형질 발현을 위한 플라스미드 작제물의 도식. 또한, 단백질 생성물의 모식도도 예시된다. 암호 서열은 박스로 나타낸 것이다. 제한 부위의 기호는 다음과 같다 : B, BamHI; F, FspI; H, HindIII; S, SalI; X, XbaI; 및 Xh, XhoI.

제3도는 래트 항-마우스 카바 세파로즈에 의해 정제된 항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos의 SDS PAGE 분석, 단백질은 12.5% 폴리아크릴아미드 겔상에서 분석하였고 쿠마시 블루로 염색시켰다. 레인 1, 2, 3은 정제된 항 CD3-Fos이고 레인 4, 5, 6은 항-Tac-Jun이며, 비환원 조건하에서 진행시킨 것이다. 레인 7, 8, 9는 항-CD3-Fos이고 레인 10, 11, 12는 항-Tac-Jun이며, 환원 조건하에서 진행시켰다. 분자량 마커는 다음과 같다: 포토포릴라제 b, 94kd; 소혈청 알부민, 67kd; 오브알부민, 43kd; 탄산 탈수효소, 30kd; 콩트립신 억제제, 20kd; 및 리소자임, 14kd. 약어는 다음과 같다: F(ab')₂, F(ab'-지퍼)₂; LC, 경쇄; 및 Fd, Fd-지퍼.

제4도는 FPLC에 의한 BAKERBOND ABx 컬럼상의 항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos를 형질 발현하는 중복 형질 감염체에 의해 소비된 배지의 분획화.

(a) (NH₄)₂SO₄ 구배에 따라 용출된 것들의 280nm에서의 단백질의 흡광도 프로파일. 초기에 용출된 단백질 (분획 T)은 대부분 트랜스페린 및 인슐린과 같은 배지 보강물이다. (b) ELISA로 측정된 바와 같은 마우스 IgG 양성 분획. 414nm에서의 흡광도는 퍼옥시다제-결합된 염소 항-마우스 IgG인 2차 항체에 의해 발현된 색깔을 나타낸다. (c) 유동 세포계수법으로 측정된 여러 분획들의 항-CD3 활성(○) 및 항-Tac 활성(■).

제5도는 분획 11 유래의 2중 특이 항체에 의해 매개된 표적화된 세포독성. 작동인자 및 ⁵¹Cr-표지된 표적 세포를 100:1(○), 25:1(○), 및 10:1(■)의 비율로 다양한 희석율의 분획 11(제 4A도)와 함께 항온 배양 하여 특이적인 용균에 대해 검증했다. 점들은 3반복 측정치들의 평균값을 나타낸다. 단백질 농도는 유동 세포계수법으로 측정했다.

제6도는 비환원 조건하에서 SDS PAGE에 의해 분석된 바와 같은 시험관내에서의 2중 특이 F(ab'-지퍼)₂의 형성. 레인 1, 환원 전의 항-Tac-Jun; 레인 3, 4mM의 2-머캅토에틸아민으로 환원시킨 후의 항-Tac-Jun; 레인 4, 2mM의 2-머캅토에틸아민으로 환원시킨 후의 항 CD3-Fos; 및 레인 5, 산화 환원 완충액에 대해 투석한 후의 항-Tac-Jun x 항-CD3-Fos. 모든 단백질 샘플은 20mM의 요오도아세트아미드로 처리하여 샘플 SDS 완충액중에서 가열처리되기전에 유리 설피하이드릴기를 차단시켰다. 분자량 마커는 제 3 도에서 사용된 것과 같다. 이것은 사용하기 전에 환원성 샘플 SDS 완충액중에서 가열처리했다. 약어는 다음과 같다 : F(ab')₂ F(ab-지퍼)₂; Fab', Fab'-지퍼; 및 LC, 경쇄.

제7도는 시험관내에서 형성된 2중 특이 F(ab-지퍼)₂의 분획화. 시험관내에서 형성된 항-Tac-Jun x 항-CD3-Fos를 BAKERBOND ABx 컬럼상에 장입시키기 전에 10mM MES 완충액(pH5.2)에 대해 투석시켰다. 컬럼에 결합된 단백질은 (NH₄)₂SO₄ 구배로 용출시켰다. (a) 280nm에서의 흡광도 프로파일. (b) 유동 세포 계수법으로 분석된 여러 분획들에 대한 항-CD3 활성(○) 및 항-Tac 활성(■).

제8도는 (a) 비환원 조건, 또는 (b) 환원 조건하에서 진행시킨 제 7 도의 피크 분획의 SDS PAGE 분석. 레인 1, ABx 컬럼 병류(flow-through) 분획; 레인 2, 분획 I; 레인 3, 분획 II; 레인 4, 분획 III; 및 레인 5, 분획 IV. 분획 II 및 분획 IV로부터 샘플링을 위해 보다 많은 용량(5배)을 취했다. 분자량 마커는 제 3 도에 사용된 것과 같다. 약어는 다음과 같다: F(ab')₂, F(ab-지퍼)₂; LC, 경쇄; 및 Fd, Fd-지퍼.

제9도는 시험관내에서 형성된 2중 특이 항-Tac-Jun x 항-CD3-Fos에 의해 매개된 표적화된 세포 독성. 작동 인자 및 ⁵¹Cr-표지된 표적 세포를 25:1(○) 및 10:1(○)의 비율로 사용하여 특이적인 용균 활성을 위해 다양한 농도의 분획 III(제 7a도)과 함께 항은 배양했다.

[발명의 상세한 설명]

발명의 기술분야

본 발명은 2중 특이 항체, 다른 에피토프 결합 성분과 특이적인 이종이량체(heterodimer)를 형성할 수 있는 에피토프 결합 성분, 상기 2중 특이 항체와 에피토프 결합 성분을 생성하는 방법, 상기 2중 특이 항체와 에피토프 결합 성분을 사용하는 방법, 및 상기 2중 특이 항체와 에피토프 결합성분을 함유하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

발명의 배경

2중 특이 항체는 이중의 에피토프 결합 특이성을 갖는 항체로서, 한가지 특이성은 제 1 에피토프에 결합하는 작용이고, 두 번째 특이성은 제 2 의 에피토프에 결합하는 작용이다.

이러한 2중 특이 항체는 임의의 구체예에서는 면역요법에 매우 중요한 분자이다. 예를들면, 2중 특이 항체는 표적 세포에 세포독성의 작동 세포를 교차 결합시켜(Segal and Snider, (1989) Chem, Immunol, 47 : 179) 표적 세포를 사멸시킨다.

많은 2중 특이 항체가 생체외에서 효과적인 것으로 밝혀진 바 있지만(Gilil and et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 ; 7719; Lanzavecchia and Scheidegger, (1987) Eur. J. Immunol. 17; 105; Stearz and Bevan, (1986) Immunol, Today 7; 241; Berg et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 ; 4732), 치료제로서 임상적으로 시험된 적은 거의 없다.

2중 특이 항체의 치료제로서의 개발이 부진한 이유중의 하나는 2중 특이 항체를 충분한 순도와 충분한 양으로 제조하기가 어렵다는 것이다.

2중 특이 항체는 하이브리드-하이브리도마(Milstein and Cuello, (1984) Immunol. Today 5: 299) 또는 트랜스펙토마(transfectoma)에 의한 화학적 교차 결합에 의해 제조되거나, 또는 2개의 상이한 Fab'의 경첩부(hinge)에 형성되는 이황화물 교환에 의해 제조될 수 있다. 상기 제 1 방법은 불균질하고 분명치 않은 산물을 산출한다. 제 2 방법은 세포 교차 결합의 활성을 방해할 수 있는 많은 하이브리드-항체 부산물로부터 2중 특이 항체를 충분히 정제할 필요가 있다. 이황화물 교환 방법은 대부분 F(ab')₂에만 적용되며, 이것은 따라서 모노클로날 항체가 효소 분해에 의한 절단에 대해 민감하기 때문에 제한받는다(Parham, (1983) J. Immunol. 131: 2895). 더욱이, Fab'는 서로에 대한 친화성이 매우 적기 때문에 Fab'간에 이황화 결합을 형성시키려면 매우 높은 단백질 농도가 필요로 된다. 상기 이황화물 교환 방법은 하나의 Fab'를 다른 Fab'와 함께 산화시키기 전에 엘만 시약을 사용하여 변형시켜 동종이량체화(homodimerization)의 발생을 감소시킴으로써 개선된 바 있다 (Brennan et al., (1985) Science 229: 81). 그러나, 이러한 개선책에도 불구하고, 이종이량체 F(ab')₂는 50% 이상의 수율로 거의 제조되지 않았다(Glennie et al., (1987) J. Immunol. 139: 2367).

따라서, 2중 특이 항체와 다른 유사 화합물을 고순도로 효과적으로 제조하기 위한 개선된 방법의 필요성이 상당히 요구되고 있다.

발명의 개요

본 발명은 1) F(ab')₂ 및/또는 다른 에피토프 결합 성분을 예를들면, 유전자 형질발현에 의해 직접적으로 제조하는 방법, 및 2) 이종이량체-형성서열을 이용하여 2중 특이 항체를 효과적으로 생성시키는 방법을 비롯하여 2중 특이 항체를 제조하는 신규 방법들을 포함한다. 사용된 서열은 전사 인자 Fos 및 Jun의 로이신 지퍼(Landschulz et al., (1988) Science 240: 1759, 및 재검토하기 위해 Maniatis and Abel, (1989) Nature 341: 24 참조, 본원에 참조문헌으로 포함됨)영역들에서부터 유래될 수 있다. 로이신 지퍼는 7번째 잔기마다 일반적으로 로이신을 지닌 약 20-40 잔기 길이의 특이적인 아미노산 서열이다. 이러한 지퍼 서열은 이량체를 형성하기 위해 로이신 잔기가 소수성 측면위에 정렬되므로 양친매성의 α-나선 구조를 형성한다. Fos 및 Jun 단백질의 로이신 지퍼에 상응하는 펩티드는 주로 이종 이량체를 형성한다(O'Shea et al. (1989) Science 245:646).

본 발명에서는 2개의 로이신 지퍼 서열이 2개의 상이한 Fab'에 융합될 때 2중 특이 F(ab')₂형성을 촉진시키는데 사용된다. 2중 특이 항체는 본 발명의 방법에 의해 제조되며, 이로 인해 2개의 상이한 지퍼 서열의 쌍 결합은 하나의 지퍼를 함유하는 제 1 Fab' 또는 다른 에피토프 결합 성분에 다른 지퍼를 함유하는 제 2 Fab' 또는 다른 에피토프 결합 성분을 연결시킨다. 이러한 구체예에 있어서, 이종이량체 분자는 2개의 에피토프 결합 성분의 결합 성질을 함유할 것이다.

본 발명은 에피토프 결합 성분에 연결된 로이신 지퍼를 함유하는 제 1 단백질 및 에피토프 결합 성분에 연결된 로이신 지퍼를 함유하는 제 2 단백질로부터 제조된 2중 특이 항체를 제공하며, 여기에서 제 1 및

제 2 단백질의 로이신 지퍼는 쌍 친화성을 갖고 있어 제 1 및 제 2 단백질을 함유하는 이종이량체를 형성시킨다. 본 발명의 임의의 구체예에 있어서, 로이신 지퍼들 중의 하나는 Fos 로이신 지퍼 또는 Jun 로이신 지퍼이다. 본 발명의 한가지 구체예에 있어서, 하나의 로이신 지퍼는 Fos 로이신 지퍼이고, 다른 로이신 지퍼는 Jun 로이신 지퍼이다. 본 발명은 또한 제 1 및 제 2 로이신 지퍼의 구조적 서열이 (로이신-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆)_n 인 2중 특이 항체를 제공하며, 여기에서 X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ 및 X₆ 각각은 통상적인 20개 아미노산중의 하나이고 n은 3이상의 정수이다.

본 발명은 인체 IL-2 수용체에 결합하는 2중 특이 항체, 및 인체 CD3 단백질에 결합하는 2중 특이 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 Fab'인 하나 이상의 에피토프 결합 성분을 지닌 2중 특이 항체를 제공한다. 본 발명의 일부 구체예에는 인체화된 면역글로불린인 하나 이상의 에피토프 결합 성분을 갖고 있다.

본 발명은 또한 제 1 단백질 및 제 2 단백질이 생성되는 2중 특이 항체를 제조하는 방법을 제공하며, 그 단백질 각각은 에피토프 결합 성분과 로이신 지퍼를 함유하며, 상기 제 1 단백질 및 제 2 단백질은 2중 특이 항체를 형성하도록 이종이량체의 형성을 허용하는 조건하에서 접촉된다. 제 1 단백질 및 제 2 단백질의 접촉은 이 단백질들을 모두 형질 발현하는 단세포내에서 생체내 또는 시험관내에서 실행될 수 있다. 임의의 구체예에 있어서, 상기 방법은 Fos 또는 Jun 로이신 지퍼 또는 일반식 (로이신-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆)_n에 상응하는 다른 유사한 로이신 지퍼를 갖는 단백질을 이용하며, 여기에서, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ 및 X₆ 각각은 통상적인 20개 아미노산중의 하나이며, n은 3이상의 정수이다. 본 발명의 일부 방법에서는 F(ab')₂ 이종이량체 2중 특이 항체가 최종 생성물로서 생성되거나, 또는 2개의 Fab'가 화학적으로 결합(예, 이황화 결합)되어 있는 F(ab')₂ 2중 특이 항체를 산출시키기 위해 로이신 지퍼를 절단(예, 히드록실아민에 의한 아스파라긴-글리신 펩티드 결합의 절단) 제거할 수도 있다. Fab'이외의 에피토프 결합 성분도 본 발명의 방법에 사용되어 화학적 결합으로 연결되어 있으나 로이신 지퍼가 제거된 2중 특이 항체를 형성시킬 수도 있다.

본 발명은 또한 에피토프 결합 성분 및 로이신 지퍼를 함유하는, 특히 항체 중쇄의 V, C_{H1}, 및 경첩부 도메인을 갖는 에피토프 결합 성분을 함유하는, 더욱 특히, Fab'를 함유하는 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

Fab' 이외의 에피토프 결합 성분이 사용되고, 그리고/또는 2중 특이 항체의 한 성분이 에피토프 결합 성분이 아닌 거대 분자 종류인 다른 2중 특이 항체도 또한 상기 방법들에 의해 생성될 수 있다.

본 발명은 또한 2중 특이 항체의 약학적 조성물, 상기 2중 특이 항체의 치료학적 사용방법, 진단용 및 연구용에 2중 특이 항체를 사용하기 위한 방법 및 조성물을 포함한다.

본 발명에 따라, 2중 특이 항체, 이러한 2중 특이 항체를 생성하는 방법, 2중 특이 항체의 약학적 조성물, 상기 2중 특이 항체의 치료학적 사용방법, 및 진단용과 연구용에 2중 특이 항체를 사용하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다.

정의

'F(ab')₂ 이종이량체'는 본원에서 제 1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제 1 Fab', 및 제 2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 제 2 Fab'를 함유하는 이량체로서 정의되며, 이때, 제 1 및 제 2 에피토프는 동일하지 않다.

'Fab'-지퍼'는 로이신 지퍼에 연결된 Fab'로서 정의된다.

'F(ab'-지퍼)₂ 이종이량체'는 본원에서 제 1 에피토프에 대한 결합 특이성을 가지며 로이신 지퍼에 결합된 제 1 Fab', 및 제 2 에피토프에 대한 결합 특이성을 가지며 로이신 지퍼에 결합된 제 2 Fab'를 함유하는 이량체로서 정의되며, 이때 상기 제 1 및 제 2 에피토프는 동일하지 않다.

본 발명의 '에피토프 결합 성분'은 면역글로불린 상과(上科) 유전자에 의해 거의 암호되는 하나 이상의 폴리펩티드로 이루어진 단백질을 의미한다[예를들면, 본원에 참조적으로 포함되는 문헌(The Immunoglobulin Gene Superfamily, A. F. Williams and A. N. Barclay, in Immunoglobulin Genes, T. Honjo, F. W. Alt, and T. H. Rabbitts, eds., (1989) Academic press: San Diego, CA, pp. 361-387) 참조]. 예를들면, 에피토프 결합 성분은 중쇄 일부부이나 전체, 및 경쇄 일부부이나 전체를 포함할 수 있거나, 또는 중쇄의 일부부이나 전체만을 포함할 수 있다. 그러나, 에피토프 결합 성분은 특이적인 표적, 또는 에피토프에 대한 결합 성질을 보유하기 위하여 면역글로불린 상과 유전자 생성물의 충분한 부분을 포함하고 있어야만 한다.

로이신 지퍼

최근, '로이신 지퍼'로서 표기되는 단백질 구조적 모티브가 동정된 바있다(Landschulz et al., (1988) Science 240: 1759). 로이신 지퍼는 당업계에 6개의 아미노산에 의해 서로 분리되어 있는 4-5개의 로이신 잔기를 함유하는 약 35개 아미노산의 신장부로서 정의된 바 있다(Maniatis and Abel, (1989) Nature 341: 24). 로이신 지퍼는 다양한 진핵성 DNA-결합 단백질중에서 발생되는 것으로 발견된 바 있고, 그 예로는 GCN4, C/EBP, c-fos 유전자 산물(Fos), c-jun 유전자 산물(Jun), 및 c-myc 유전자 산물이 있다. 이러한 단백질 중에서, 로이신 지퍼는 이량체화 계면을 산출시키며, 이때 로이신 지퍼를 함유하는 단백질은 안정된 동종이량체, 및/또는 이종 이량체를 형성할 수 있다.

2가지 원종양 유전자인 c-fos 및 c-jun에 의해 암호된 단백질 산물의 분자적 분석은 우위적으로 이종 이량체가 형성되는 경우를 나타냈다. 이러한 DNA-결합 단백질은 모두 로이신 지퍼 영역을 포함하나, Jun이 동종 이량체를 형성할 수 있고 Fos와 Jun이 서로 이종이량체화할 수 있는 반면, Fos의 동종 이량체화에 대해 증명된 바는 없다(Gentz et al., (1989) Science 243: 1695; Nakabeppu et al., (1988) Cell 55:907; Cohen et al., (1989) Genes Dev. 3: 173). 따라서, Fos 로이신 지퍼는 Jun 로이신 지퍼와 Fos 로이신 지퍼사이의 나선 계면에서의 특징적인 상호작용으로 인해 Jun과 우선적으로 이량체화할 수 있다

(O'Shea et al. 상기 참조; Schuemann et al., (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 739).

Fos 와 Jun의 로이신 지퍼 영역을 함유하는 합성 펩티드는 그 자체가 이중 이량체 형성을 매개하기에 충분하며, 합성 펩티드의 아미노 말단 각각이 분자내 이화화 결합을 허용하는 시스테인 잔기를 포함하는 경우, 이중이량체 형성이 동종이량체화를 거의 배제시킨다.

본 발명의 로이신 지퍼는 7가 원자의 반복 서열 (로이신 $-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$)_n 로서 공지된 일반 구조식을 가지며, 여기에서 X는 통상적인 20개 아미노산 중 임의의 것일 수 있으나 (Proteins, Structures and Molecular Principles, (1984) Creighton(ed.), W. H. Freeman and Company, New York, 본원에 참조문헌으로 포함됨), 대부분 높은 α -나선 형성능을 지닌 아미노산, 예를들면, 알라닌, 발린, 아스파르트산, 글루탐산, 및 리신이기 쉽고 (Richardson and Richardson, (1988) *Science* 240 : 1648), n은 3 또는 그 이상일 수 있고, 일반적으로 n은 4 또는 5이다. 20개의 통상적인 아미노산은 글리신, 프롤린, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 메티오닌, 트립토판, 페닐알라닌, 이소로이신, 로이신, 발린, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아스파라긴, 티로신, 아스파르트산, 및 글로탐산이다.

본 발명의 로이신 지퍼는 쌍 친화성을 갖고 있다. 로이신 지퍼는 양친매성 알파 나선을 형성하고, 더욱 구체적으로는 나선화된 나선을 형성한다. 쌍친화성이란 2종류의 로이신 지퍼가 충분한 농도로 존재하는 경우 이중이량체 형성이 동종이량체 형성보다 바람직하므로, 한 종류의 로이신 지퍼, 예를들면 비제한적으로 Fos 로이신 지퍼가 또다른 종류의 로이신 지퍼, 예를들면 비제한적으로 Jun 로이신 지퍼와 이중이량체를 주로 형성하는 능력으로서 정의된다. 따라서, 이중이량체의 우세한 형성은 일반적으로 50 내지 75%, 바람직하게는 75 내지 85% 이상의 이중이량체를 포함하는 이량체 군으로 유도한다. 'Fos 로이신 지퍼'는 제 1(b)도에 나타난 서열과 거의 유사한 아미노산 서열로서 정의된다. 'Jun 로이신 지퍼'는 제 1(a)도에 나타난 서열과 거의 유사한 아미노산 서열로서 정의된다.

당업자라면 본 발명의 로이신 지퍼가 제 1 도에 나타난 것과 동일하지 않은 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 예를들면 비제한적으로 내부 또는 말단 첨가, 결실, 또는 치환되었거나, 또는 7가원자의 반복서열의 순서가 재배열된 아미노산 서열을 포함할 수 있다는 것을 이해하고 있을 것이다. 일례로서 본 발명은 글리신 및/또는 시스테인으로 이루어진 말단 아미노산의 첨가 또는 치환을 포함하며, 여기에 국한되는 것은 아니다.

Jun 및 Fos 단백질의 로이신 지퍼 영역은 보통 단백질들을 함께 결합시켜 전사 인자 AP-1이 형성되도록 한다. Jun 및 Fos 지퍼는 또한 이들이 유전자적으로 융합되어 있는 다른 단백질, 예를들면, 2중 특이 항체의 2개의 Fab' 절반들을 이량체화시킬 것이다. 2가지 지퍼 펩티드의 쌍결합으로 인해 동종이량체보다는 이중이량체를 형성하는 경향이 훨씬 크므로, 바람직한 생성물의 형성이 증가된다.

2중 특이 항체

2중 특이 항체는 상이한 결합 특이성을 갖는 2개의 에피토프 결합 성분을 결합시킴으로써 제조될 수 있다.

본 발명의 '에피토프 결합 성분'은 면역글로불린 초과(superfamily) 유전자에 의해 거의 암호화된 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드로 이루어지며, 항원이 에피토프에 대해 특이적인 결합 친화성을 갖는 단백질을 의미한다. 인지된 면역글로불린 유전자 상과는 문헌(The Immunoglobulin Gene Super family, A. F. Williams and A. N. Barclay, 상기 참조)에 기술되어 있다. 면역글로불린 유전자의 구체적인 예로는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 입실론 및 유 불변부 유전자, 뿐만 아니라 무수한 면역글로불린 가변부 유전자를 포함한다. 면역글로불린은 항체이외에 다양한 형태로 존재할 수 있으며, 즉 예를들면, Fv, Fab, 및 F(ab)2, 뿐만 아니라, 일본쇄(예, Huston et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:5879-5883(1988), 및 Bird, et al., *Science*, 242:423-426(1988), 본원에 참조문헌으로 포함됨)도 포함한다[일반적으로, 본원에 참조문헌으로 포함되는 문헌(Hood, et al., 'Immunology', Benjamin, N. Y., 2nd ed. (1984), 및 Hunkapiller and Hood, *Nature*, 323: 15-16(1986) 참조]. 에피토프 결합 성분의 다른 예로서 T-세포 항원 수용체, 및 MHC 단백질상의 에피토프에 결합하는 CD4 단백질을 포함한다.

천연 형태의 '성숙' 면역글로불린은 그 서열내에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 첨가됨에 따라 길이가 다소 달라질 것이라는 것은 공지되어 있다. 따라서, 가변부 및 불변부는 둘다 대부분 천연적으로 변형되기 쉬우나, '거의 동일'하며, 각각의 활성을 그대로 유지할 수 있다. 인체 불변부 및 재배열된 가변부 DNA 서열은 다양한 인체 세포, 바람직하게는 무한 증식성 B-세포로부터 공지된 절차에 따라 분리될 수 있다.

유사한 방법으로 비-인체 원으로부터 비인체 면역글로불린 서열을 분리할 수도 있다. DNA 서열의 적합한 공급원 세포, 및 형질 발현과 분비를 위한 숙주 세포는 다양한 공급원, 예를들면, 미국 모식균 배양 수집소로부터 획득될 수 있다('Catalogue of Cell Lines and Hybridomas', Fifth edition(1985) Rockville, Maryland, U. S. A., 본원에 참조문헌으로 포함됨).

이러한 천연-발생적인 형태의 면역글로불린쇄외에도, '거의 동일한' 변형된 중쇄 및 경쇄가 당업자에게 공지된 다양한 재조합 DNA 기법을 이용함으로써 쉽게 고안되고 제조될 수 있다. 예를들면, 상기쇄는 1차 구조의 측면에서 여러 아미노산 치환, 말단 및 중간 첨가 및 결실등에 의해 천연-발생적인 서열과 달라질 수 있다. 대안적으로는, 1차 구조의 일부만을 포함하는 폴리펩티드 단편이 생성될 수 있으며, 이 단편들은 하나 또는 그 이상의 면역글로불린 활성(예, 결합활성)을 갖고 있다. 특히, 많은 유전자들 처럼, 면역글로불린-관련 유전자들도 각각 하나 또는 그 이상의 독특한 생물학적 활성을 갖는 여러 가지 작용성 영역을 포함한다는 것은 주목할 만한 것이다. 일반적으로, 목적하는 에피토프 결합 성분을 암호화하는 유전자의 변형을 다양한 공지 기법, 예를들면, 부위 지지성 돌연변이 유발에 의해 쉽게 수행될 수 있다[문헌(Gillman and Smith, *Gene* 8:81-97(1979) and Roberts, S. et al., *Nature* 328:731-734(1987) 참조, 본원에 참조 문헌으로 포함됨]. 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 에피토프 결합 성분은 '키메라성' 또는 '인체화된' 면역글로불린 유전자에 의해 암호된다[일반적으로, 문헌(Co and Queen(1991) *Nature* 351:501)참조, 본원에 참조 문헌으로 포함됨].

적합한 에피토프 결합 성분은 당업계에 공지된 DNA 서열이나 모노클로날 항체원으로부터 당업자에 의해 제조될 수 있고, 더욱 특히 W090/07861 및 U. S. S. N. 07/310,252에 기술되어 있으며, 이것은 본원에 참조문헌으로 포함된다.

Fab'-Jun(Jun 로이신 지퍼를 함유하는 Fab') 및 Fab'-Fos(Fos 로이신 지퍼를 함유하는 Fab') 단백질을 한 세포주의 생체내에서 동시 형질 발현시킴으로써, 또는 별도의 세포내에서 형질 발현시킨 후 시험관내에서 혼합함으로써 2중 특이 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 시험관내 혼합 절차는 2중 특이 항체의 다량 생산에 바람직하다. Fab' 외에도, 다른 에피토프 결합 성분이 Jun 또는 Fos 로이신 지퍼에 연결될 수 있고, 시험관내에서 혼합함으로써 결합될 수 있다.

시험관내 혼합 절차는 특정한 Fab'-Fos 또는 Fab'-Jun이 그 다음 상보적인 로이신 지퍼를 함유하는 다양한 에피토프 결합 성분과 결합될 수 있으므로 단지 한번 생성될 필요가 있다는 장점을 갖고 있다. 예를들면, 2중 특이 항체의 T 세포 결합 성분, Fos 로이신 지퍼를 포함하는 Fab' 및 T 세포 항원 CD3에 대한 결합 특이성은 단지 한번 생성될 필요가 있으며, 이것은 그 다음 Jun 로이신 지퍼를 함유하는 다양한 에피토프 결합 성분들중 임의의 하나와 결합될 수 있기 때문이며, 그예는 목적하는 표적 세포에 대한 결합 활성을 갖는 Fab'-Jun 분자이다. 또한, Fab' 단편은 에세리히아 콜리(*Escherichia coli*)내에서 고 수율로 생성된 바 있고, 따라서 F(ab'-지퍼)₂ 2중 특이 항체도 또한 다량이 경제적으로 우세하게 생성될 수 있어, 임상적 시도를 가능케했다.

에피토프 결합 성분에 연결된 로이신 지퍼는 다양한 방법으로 생성될 수 있다. 예를들면, 로이신 지퍼를 함유하는 융합 단백질을 암호하는 폴리뉴클레오티드 서열은 세포성 숙주, 또는 시험관내에서의 해독 시스템에 의해 형질 발현될 수 있으며, 여기에 국한되는 것은 아니다. 또한, 로이신 지퍼 및/또는 에피토프 결합 성분은 별도로 화학적 펩티드 합성에 의해, 그리고 목적하는 폴리펩티드를 암호하는 폴리뉴클레오티드 서열의 형질 발현에 의해, 또는 로이신 지퍼를 함유하는 다른 단백질, 항체, 또는 거대분자 종류를 절단한 후 정제함으로써 생성될 수 있다. 이러한 정제된 폴리펩티드는 중개 스페이스(spacer)아미노산 서열을 포함하거나 포함하지 않는 펩티드 결합에 의해 연결될 수 있거나, 또는 중개 스페이스 분자를 포함하거나 포함하지 않는 비-펩티드 공유 결합에 의해 연결될 수 있으며, 상기 스페이스 분자는 아미노산 이거나 다른 비-아미노산 화학적 구조물일 수 있다. 연쇄 방법이나 종류와는 관계없이, 상기 연쇄는 가역적이거나 비가역적 연쇄는 펩티드이거나, 그렇지 않다면 자발적으로 절단되거나, 또는 열, 전자선, 프로테아제, 또는 화학인자로 처리시 절단될 수 있는 화학적으로 불안정한 결합을 포함할 수 있으며, 여기에 국한되는 것은 아니다. 이러한 가역적인 연쇄의 2가지 예를 예시하면, 즉 (1) 히드록실아민에 의해 절단될 수 있는 Asn-Gly 펩티드 결합을 함유하는 연쇄, 및 (2) 환원제에 의해 절단될 수 있는 이황화 결합 연쇄이며, 여기에 국한되는 것은 아니다.

일반적으로, 하기 사용된 명명법, 및 이하에 기술된 재조합 DNA 기법중의 실험실적 절차는 당업계에 공지된 것이며 널리 사용되고 있다. 클로닝, DNA 및 RNA 분리, 증폭 및 정제에 표준 기법을 사용했다. 일반적으로, DNA 리가아제, DNA 폴리머라제, 제한 엔도뉴클레아제들을 포함하는 효소적 반응은 제조업자의 설명에 따라 수행했다. 이 기법 및 다양한 다른 기법들은 일반적으로 샘브록 등(*Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, cold Spring Harbor, New York, 1989)에 따라 수행했다. 기타 일반적인 참조문헌도 본원을 통해 제공했다. 본원에 사용된 절차는 당업계에 공지된 것으로 생각되며 당업자들의 편의를 위해 본원에 제공한다. 본원에 포함되어 있는 모든 자료는 본원의 참조 문헌에 포함된다.

목적하는 2중 특이 항체를 궁극적으로 형질발현할 수 있는 본 발명의 핵산 서열은 다양한 여러 가지 기법에 의해 다양한 여러 폴리뉴클레오티드(게놈성 또는 cDNA, RNA 등)로부터 제조될 수 있다. 적절한 게놈 서열을 연결시키는 것이 현재 가장 일반적인 제조 방법이나, cDNA 및 합성 서열도 또한 사용될 수 있다(유럽 특허 출원 번호 제 85102655.8호, 제 85305604.2호, 제 84302368.0호 및 제 85115311.4호, 뿐만 아니라 PCT 출원 번호 GB85/00392 및 US 86/02269 참조, 이들 모두는 본원에 참조문헌으로 포함됨).

DNA 작제물은 일반적으로 천연적으로-관련된 프로모터 영역이나, 또는 이종의 프로모터 영역을 포함하는 암호 서열에 작동 가능하게 결합된 형질발현 조절 DNA 서열을 포함한다. 바람직하게는, 형질 발현 조절 서열은 진핵 숙주 세포를 형질 전환시키거나 형질 감염시킬 수 있는 벡터내의 진핵성 프로모터 시스템일 것이다. 일단 벡터가 적절한 숙주내로 병입되면, 숙주는 뉴클레오티드 서열을 고수율로 형질 발현시키고, 2중 특이 항체를 수거 및 정제하기에 적합한 조건하에 유지시킨다.

전술한 바와 같이, DNA 서열은 그 서열이 형질 발현 조절 서열에 작동 가능하게 결합된 후(즉, 구조 유전자의 해독을 확실케 하기 위해 배치됨), 숙주내에서 형질 발현될 것이다. 이러한 형질 발현 벡터는 일반적으로 숙주 개체내에서 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 구성 부분으로서 복제될 수 있다. 일반적으로, 형질 발현 벡터는 목적하는 DNA 서열로 형질 전환된 세포를 검출할 수 있도록 하기 위해 테트라 사이클린이나 네오마이신과 같은 선택 마커를 포함할 수 있다(예를들면, 미합중국 특허 제 4,704,362호 참조, 본원에 참조 문헌으로 포함됨).

일반적으로, 원핵 세포는 2중 특이 항체의 성분을 암호하는 DNA 서열을 클로닝하는데 사용될 수 있다. 이. 콜리는 본 발명의 DNA 서열을 클로닝하는데 특히 유용한 하나의 원핵성 숙주이다. 사용될 수 있는 특정한 이.콜리 균주로는 HB101, DH-1, 및 MH-1을 포함한다.

사용하기에 적합한 다른 미생물 숙주로는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus Subtilis*)와 같은 바실러스, 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*)와 같은 기타 장내균과, 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종을 포함한다.

이러한 원핵성 숙주내에서, 또한 숙주 세포와 화합성인 형질 발현 조절 서열(예, 복제 오리진)을 일반적으로 포함하는 형질 발현 벡터를 제조할 수 있다. 또한, 다양한 공지 프로모터가 임의의 수로 존재할 수 있으며, 그예로는 락토오스 프로모터 시스템, 트립토판(*trp*) 프로모터 시스템, 베타-락타메이스 프로모터 시스템, 또는 람다 파아지로부터의 프로모터 시스템을 포함한다. 프로모터는 보통 임의적으로 작동인자 서열과 함께 형질 발현을 조절하며, 전사 및 해독을 개시하고 완료시키기 위해 리보솜 결합 부위 서열

등을 갖고 있다.

효모와 같은 다른 미생물도 또한 형질 발현에 사용될 수 있다. 사카로마이세스(*Saccharomyces*)는 형질 발현 조절 서열, 복제, 오리진, 종지 서열등을 필요한 만큼 지닌 적합한 벡터를 함유하는 바람직한 숙주이다. 일반적인 프로모터로는 3-포스포글리세레이트 키나제 및 다른 해당 효소를 포함한다. 유도성 효모 프로모터로는 다른 것들 중에서 알콜 탈수소 효소 2, 이소시토크롬 C, 및 말토오스 및 갈락토오스 이용에 관여하는 효소로부터 유래되는 프로모터를 포함한다.

효모에 사용하기 위한 벡터를 작제하는 경우, 플라스미드 YRp701 사용될 수 있다(Stinchcomb, et al., *Nature*, 282: 39(1979) 참조). 이 플라스미드는 트립토판을 함유하는 배지 상에서 증식하는 능력이 부족한 돌연변이 균주에 대해 선택 가능한 마커인 *trp1* 유전자를 함유한다. *trp1* 유전자의 존재는 형질 전환된 돌연변이 세포가 선택 배지상에서 증식하고 동정될 수 있도록 한다.

미생물외에도, 포유류 조직 세포 배양물이 또한 본 발명의 폴리펩티드를 제조하는데 사용될 수 있다(Winnacker, 'From Genes to Clones', VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987), 본원에 참고문헌으로 포함됨). 진핵 세포가 사실상 바람직하며, 이것은 천연의 면역글로불린을 분비할 수 있는 적합한 많은 숙주 세포주가 당업계에서 개발된 바 있기 때문이며, 그 예로는 CHO 세포주, 다양한 COS 세포주, HeLa 세포, 미엘로마 세포주등을 포함하며, 바람직하게는 형질 전환된 B-세포 또는 하이브리도마를 포함한다. 이 세포들의 형질 발현 벡터는 형질 발현 조절 서열, 예, 복제 오리진, 프로모터, 인핸서(Queen, C. et al., *Immunol. Rev.* 89: 49-68(1986), 본원에 참조문헌으로 포함됨), 및 필수적인 프로세싱 정보 부위, 예, 리보솜 결합 부위, RNA 접목 부위, 폴리아데닐화 부위, 및 전사 종지인자 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 형질 발현 조절 서열은 면역글로불린 유전자, 시토메갈로바이러스, SV40, 아데노바이러스, 소 종양 형성 바이러스등으로부터 유래되는 프로모터이다.

진핵성 DNA 전사는 인핸서 서열을 벡터내로 삽입시킴으로써 증가될 수 있다. 인핸서는 프로모터에 의한 전사를 증가시키는 10 내지 300bp 사이의 시스-작용 서열이다. 인핸서는 5' 또는 3'로부터 전사 유니트로의 전사를 증가시키는데 효과적이다. 또한, 인핸서가 인트론내에 위치하거나, 또는 암호 서열 자체내에 위치하는 경우에도 효과적이다. 일반적으로, 바이러스 인핸서가 사용되며, 그 예로는 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 인핸서, 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 포유류시스템으로부터의 인핸서 서열도 또한 일반적으로 사용되며, 그 예로는 마우스 면역글로불린 중쇄 인핸서를 포함한다.

포유류 형질 발현 벡터 시스템은 또한 일반적으로 선택 가능한 마커 유전자를 포함한다. 적합한 마커의 예로는 디히드로폴레이트 환원 효소 유전자(DHFR), 티미딘 키나아제 유전자(TK), 또는 약제 내성을 부여하는 원핵성 유전자를 포함한다. 처음 2가지 마커 유전자는 증식 배지에 티미딘을 첨가하지 않으면 증식할 수 없는 돌연변이 세포주의 사용을 선호한다. 형질 전환된 세포는 그 다음 비보강 배지상에서 증식하는 능력으로 확인될 수 있다. 마커로서 유용한 원핵성 약제 내성 유전자의 예로는 G418, 미코페놀산, 및 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 유전자를 포함한다.

목적하는 DNA 분절을 함유하는 벡터는 세포성 숙주의 종류에 따라 공지 방법에 의해 숙주 세포내로 전이될 수 있다. 예를들면, 염화 칼슘 형질 감염은 원핵 세포에 대해 일반적으로 이용되는 반면, 인산 칼슘 처리 또는 일렉트로포레이션(electroporation)은 다른 세포성 숙주에 대해 사용될 수 있다. 포유류 세포를 형질 전환하는데 사용된 다른 방법으로는 폴리브렌(Polybrene), 원형질 융합, 리포솜, 및 미량주입법의 사용을 포함한다(일반적으로 문헌 Sambrook 등, 상기 참조).

일단 형질 발현되면, 2중 특이 항체, 에피토프 결합 성분, 이들의 이량체, 또는 로이신 지퍼가 결합되었거나 결합되지 않은 개개의 경쇄 및 중쇄, 또는 개개의 로이신 지퍼 종류가 당업계의 표준 방법에 따라 정제될 수 있으며, 그 예로는 황산 암모늄 침전, 분별 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기 영동등을 포함한다[일반적으로, 문헌(Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N. Y. (1982) 참조]. 일단 부분적으로, 또는 필요하다면, 균질하게 정제되었다면, 그 폴리펩티드는 그 다음 치료학적으로 사용되거나, 또는, 분석 절차, 면역 형광 염색등을 결발하고 수행하는데 사용될 수 있다[일반적으로, 문헌(Immunological Methods, Vols. I and II, Eds, Lefkovits and Pernis, Academic Press, New York, N. Y. (1979 and 1981) 참조].

본 발명의 2중 특이 항체는 치료용으로 사용될 수 있다. 또한, 비제한적인 예시로서, 암, 자가 면역 질환, 또는 바이러스 감염을 치료하는데 사용될 수 있다. 암을 치료하기 위해, 에피토프 결합 성분 중 하나는 일반적으로 암세포상에서 우선적으로 형질 발현되는 항원에 결합할 것이며, 그 예로는 erbB-2, CEA, CD33, 및 당업계에 공지된 많은 다른 항원들을 포함한다. 자가 면역 질환을 치료하기 위해, 에피토프 결합 성분들 중의 하나는 일반적으로 T-세포상에서 형질 발현된 항원에 결합할 것이고, 그 예로는 CD4, IL-2 수용체, 다양한 T-세포 항원 수용체 및 당업계에 공지된 많은 다른 항원을 포함한다[예, 문헌(Fundamental Immunology, 2nd ed., W. E. Paul, ed., Raven Press: New York, NY, 본원에 참고 문헌으로 포함됨)참조]. 바이러스 감염을 치료하기 위해, 에피토프 결합 성분들중의 하나는 일반적으로 특정 바이러스에 의해 감염된 세포상에서 형질 발현된 항원에 결합할 것이고, 그 예로는 헤르페스 단순 바이러스 및 시토메갈로바이러스의 당야한 당단백질(예, gB, gD, gH), 및 당업계에 공지된 다른 많은 항원을 포함한다[예, 문헌(Virology, 2nd ed., B. N. Fields et al., eds., (1990), Raven Press: New York, NY, 본원에 참고문헌으로 포함됨) 참조]. 임의의 경우에, 제 2의 에피토프 결합 성분은 일반적으로 T세포 또는 다른 백혈구 세포상에 형질 발현된 에피토프에 결합하며, 이 에피토프는 CD3 또는 CD16과 같은 활성화 시그널을 전달할 수 있다.

본 발명의 2중 특이 항체를 함유하는 약학적 조성물은 비경구 투여, 즉, 피하, 근육내, 또는 정맥내 투여에 유용하다. 비경구 투여 조성물은 일반적으로 항체 용액이나 또는, 허용성 담체, 바람직하게는 수성 담체 중에 용해된 항체 용액의 칼데일을 포함할 것이다. 다양한 수성 담체로는 예를들면, 물, 완충수, 0.4% 식염수, 0.3% 글리신 등이 사용될 수 있다. 이 용액은 멸균 상태이고, 일반적으로 미립자 물질이 없다. 이 조성물은 통상적으로 공지된 멸균 기법에 의해 멸균될 수 있다. 이 조성물은 pH 조정제 및 완충제, 독성 조정제 등과 같은 적절한 생리적 조건에 필요한 약학적 허용성 보조물질을 포함할 수 있고, 그 예로는 아세트산 나트륨, 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 칼슘, 젖산 나트륨등이 있다. 이러한 조성물중에 함유된

2중 특이 항체의 농도는 다양하며, 즉, 약 0.01% 이상, 일반적으로 약 0.1% 이상 내지 5중량% 정도이며, 선택된 특정 투여 방식에 따라, 주로 액체량, 점도등에 따라 선택될 수 있다.

따라서, 근육내 주입하기 위한 일반적인 약학적 조성물은 1ml의 멸균 완충수, 및 약 1mg의 2중 특이 항체를 포함하도록 제조할 수 있다. 정맥내 주입하기 위한 일반적인 조성물은 250ml의 멸균 링거 용액, 및 10mg의 2중 특이 항체를 포함하도록 제조할 수 있다. 비경구 투여용 조성물을 제조하기 위한 실제적인 방법은 당업계에 공지되어 있거나 명백한 것이며, 보다 상세하게는 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 15th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania(1980), 본원에 참고 문헌으로 포함됨]에 기술되어 있다.

본 발명의 2중 특이 항체는 저장하기 위해 동결건조될 수 있고, 사용하기 전에 적합한 담체중에서 복원될 수 있다. 이 기법은 통상적인 면역 글로불린에는 효과적인 것으로 밝혀졌으며, 공지된 동결 건조 및 복원 기법이 사용될 수 있다. 이 동결 건조 및 복원은 가변적인 정도로 항체 활성 손실을 유도할 수 있으며(예를 들면, 통상적인 면역 글로불린, IgM 항체인 경우, IgG 항체보다도 큰 활성 손실을 초래함), 사용량은 보충되도록 조정한다.

본 발명의 2중 특이 항체 또는 이것의 카테일을 함유하는 조성물은 예방적 및/또는 치료적 처리를 위해 투여될 수 있다. 치료적 투여에 있어서, 조성물은 특정 질환에 이미 걸린 환자에게 그 질환과 그의 합병증을 치료하거나 적어도 부분적으로 억제시키기 위해 충분한 양으로 투여한다. 이것을 수행하기에 적당한 양은 '치료학적 유효량'이라고 정의된다. 이러한 용도에 효과적인 양은 질환의 정도 및 환자 자신의 면역 시스템의 일반적인 상태에 따라 달라지나, 일반적으로 투여량당 2중 특이 항체 약 0.01 내지 약 100mg 범위이며, 보다 일반적으로 사용되는 것은 환자 당 1 내지 10mg의 투여량이다.

예방적 투여에 있어서, 2중 특이 항체 또는 이의 카테일을 함유하는 조성물은 질병 상태에 있지 않은 환자에게 투여되어 환자의 저항성을 향상시킨다. 이런 양을 '예방학적 유효량'으로 정의한다. 이러한 용도에 있어서, 정확한 양은 환자의 건강 상태 및 일반적으로 면역 정도에 의존적이나, 일반적으로 투여량 당 0.1 내지 100mg 범위이고, 특히 환자당 1 내지 10mg이다.

상기 조성물의 일회 투여 또는 다중 투여는 치료 의사가 선택하는 방식 및 투여량으로 실시한다. 모든 경우에 있어서, 약학적 제제는 상기 환자를 효과적으로 치료하는데 충분한 본 발명의 2중 특이 항체의 양을 함유해야만 한다.

본원에 기술된 2중 특이 항체는 또한 진단 및 영상화를 위해 페리틴(Hammerling et al., (1968) J. Exp. Med. 128: 1461) 또는 양고추냉이 퍼옥시다제(Milstein and Cuello, (1983), Nature 305: 537)와 같은 검출제와 에피토프 결합 성분을 교차 결합시키는데 사용될 수 있다. 검출제는 2중 특이 항체의 제 2의 에피토프 결합 성분을 통해 에피토프 결합 성분에 연결되거나, 또는 본원에 기술된 이중이량체 형성 로이신 지퍼에 의해 제 1의 에피토프 결합 성분에 직접적으로 연결될 수 있다. 이와 유사하게, 중금속 원자에 결합하는 단백질인 메탈로티오네인(metallothionein)은 융합 단백질로서 Fos 로이신 지퍼와 함께 형성될 수 있고 Fab'-Jun에 결합되어 있다.

결과적으로 산출되는 생성물은 영상화 및 치료를 위해 항원 함유 부위에 방사핵종을 전달하는데 사용될 수 있다. 이와 유사하게 비제한적인 예시로서, 리신이나 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 세포의 독소와 같은 단백질 독소가 또한 Fos 로이신 지퍼에 융합된 다음, 면역독소로서 사용될 Fab'-Jun에 결합될 수 있다.

또한, 키트는 선정된 세포 표면 수용체의 존재 또는 세포 활성의 검출이나 세포 활성에 대한 방어에 본 발명의 2중 특이 항체와 함께 사용하기 위해 공급된다. 따라서, 본 발명의 조성물은 보통 용기내에 동결 건조된 형태로서 단독적으로 또는 목적하는 세포 종류에 특이적인 부가 항체와 함께 제공될 수 있다. 표지 인자 또는 독소에 결합되어 있거나, 또는 결합되어 있지 않은 2중 특이 항체는 트리스, 포스페이트, 카보네이트 등과 같은 완충액, 안정화제, 생물치사제, 불활성 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민 등, 및 사용 설명서와 함께 키트중에 포함된다. 일반적으로, 이 물질들은 활성 항체의 양을 기준으로 할 때 약 5중량%이하로 제공되며, 보통 항체 농도를 기초로 할 때 총 약 0.001중량% 이상의 양으로 제공된다. 때로, 활성 성분을 희석하기 위해 불활성 증량제 또는 부형제를 함유하는 것이 바람직하며, 이 부형제는 총 조성물의 약 1 내지 99중량%로 제공될 수 있다. 2중 특이 항체에 결합할 수 있는 제 2 항체를 분석에 사용하는 경우, 이 제 2 항체는 별도의 바이엘로 제공하는 것이 일반적이다. 제 2 항체는 일반적으로 표지 인자에 결합되고 상술한 항체 제제와 유사한 방식으로 조제된다.

하기 실시예는 예시적인 목적으로 제공되는 것이며, 여기에 국한되지 않는다.

실험

플라스미드의 작제. Fos와 Jun의 로이신 지퍼부에 대한 유전자를 4가지 중첩되는 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 별도로 합성했다(모델 380B DNA 합성기, Applied Biosystems, Foster City, CA). 유전자들은 각각 윤과 프라이드(Yon and Fried, (1989) Nucl. Acid Res. 17: 4849)에 의해 기술된 바와 같은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 법(Saiki et al., (1988) Science 239: 487)을 사용하여 마우스 IgG2a 유전자(제 1 도)의 C_H2 엑손의 제 1 코돈에상(phase)내에서 융합시켰다. 결과적으로 산출되는 PCR 산물은 C_H1 엑손의 일부분, C_H1:H 인트론, 경첩부(H) 엑손, H:C_H2 인트론, 및 C_H2/지퍼 엑손을 함유하는 911 bp의 XhoI-Sal I 단편이었다. XhoI 부위는 C_H1 엑손내의 천연의 제한 부위이나, Sal I 부위는 PCR 동안 지퍼 서열의 말단에 첨가되었다. 마우스 IgG2a 유전자의 3' 비암호 서열을 함유하는 162bp의 SalI-BamHI 단편도 또한 PCR로 생성된다. 이 서열은 3'에서부터 직접적으로 C_H3 엑손의 종지 코돈을 시작하여 폴리아데닐화 시그널을 제공한다. Jun 및 Fos 작제물에 있어서, XhoI-SalI 및 SalI-BamHI 단편은 그 다음 마우스 증쇄 형질 발현 벡터의 XhoI 및 BamHI 부위 사이에 함께 삽입되고, C_H2 및 C_H3 엑손은 C_H2/지퍼 엑손으로 대체된다(제 2 도). 선택마커로서의 돌연변이 디히드로폴레이트 환원 효소 유전자(mdhfr)(Simonsen and Levinson, (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495), 전사 개시용 인체 시토메갈로바이러스(hCMV) 주요 즉시형

초기 프로모터와 인헨서(Boshart et al., (1985) Cell 41:521), 및 마우스 IgG2a 불변부를 함유하는 중쇄 형질 발현 벡터는 표준 방법에 의해 각각의 단편으로부터 작제했다.

마우스 항-Tac 중쇄 유전자(Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029)의 V_H 엑손을 함유하는 XbaI 단편을 그 다음 Jun 지퍼 함유 벡터(제 2 도)의 XbaI 부위내로 삽입시켜 플라스미드 pTAC-Jun을 산출시켰다.

이와 유사하게, 햄스터 항체 145-2C11 중쇄 유전자의 V_H 유전자를 Fos 지퍼함유 벡터내에 삽입시켜 플라스미드 p145-2C11-Fos를 산출시켰다. 경쇄를 형질 발현시키기 위해, hCMV 프로모터 및 인헨서와 이전의 인트론의 일부분을 함유하는 유린 C, 유전자를 함유하는 2개의 벡터를 사용했다. 이 벡터중 하나는 크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스페라제(gpt) 유전자(Mulligan and Berg, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072), 및 다른 하이그로마이신B 포스포트랜스페라제(hyg)유전자(Blochlinger and Diggelmann, (1984) Mol. Cell. Biol. 4: 2929)를 갖고 있다. 이 벡터들은 각각의 단편으로부터 표준 방법으로 작제했다. XbaI 부위를 PCR 에 의한 항-Tac 및 145-2C11의 V_L 유전자 단편에 첨가했다. 항-Tac의 V_L 유전자는 gpt 함유 벡터내에 클로닝하고, 145-2C11의 V_L 유전자는 hyg 함유 벡터내에 클로닝하여 각각 플라스미드 pTAC-k 및 p145.2C11-k를 산출시켰다.

형질 감염. Gene Pulser 장치(Bio-Rad, Richmond, CA)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 360V 및 25 μ FD 정전 용량에서 일렉트로포레이션으로 형질감염시켰다. 형질 감염시키기 전에, 경쇄 및 중쇄 함유 플라스미드를 Fsp1을 사용하여 선형화시키고 페놀-클로로포름으로 추출시킨 뒤, 에탄올 침전시켰다. 형질 감염은 모두 각 플라스미드 DNA 20 μg 및 인산염-완충 식염수(PBS)중의 약 10⁷ Sp2/0세포(ATCC CRL 1581)를 사용하여 실시했다. 각각 형질감염시킨 후 세포를 하나의 96-웰 조직 배양판에서 평판배양시켰다.

48시간 후, 선택 배지를 유입시켰다 : DMEM + 10% 태내 송아지 혈청(FCS) + [HT 배지 보강물(Sigma, St. Louis, MO) + 미코페놀산 1 μg/ml를 지닌 크산틴 300 μg/ml] 또는 [하이그로마이신 500 μg/ml(Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN)]. 웰을 생존하는 세포 콜로니와 융합시킨 후, 각 웰로부터의 배지를 염소 항-마우스 감마 Ig(Sigma)을 사용하여 ELISA에 의해 분비된 항체의 존재 및 양에 대해 분석했다.

유동 세포계수, 2.5 × 10⁴ Hut-102 세포를 PBS 100 μl중에서 다양한 농도의 항-Tac, 항-Tac-Jun, 또는 2 중 특이 F(ab'-지퍼)₂와 함께 4°C에서 30분간 항온 배양했다. 그 다음 세포를 PBS로 세정한 뒤, FITC-결합된 래트 항-마우스 카파(Pandex, Mundelein, IL) 500ng을 함유하는 PBS 25 μl에 재현탁시킨 다음, 4°C에서 30분간 항온 배양시켰다. 세포를 PBS로 세정하고, 1% 파라포름알데히드로 고정시킨 뒤 FACScan(Becton Dickinson, Mountain View, CA)으로 분석했다. EL4 세포에 대한 항-CD3 또는 이것의 유도체의 결합도 유사하게 분석했다. 2중 특이 F(ab'-지퍼)₂의 농도를 측정하기 위해 형광성 강도 대 항-CD3 항체 농도의 표준 곡선을 사용했다.

F(ab'-지퍼)₂정제. 형질 감염체로부터의 배지 상청액을 모노클로날 래트항-마우스 카파 세파로오즈(Zymed, South San Francisco, CA) 컬럼상으로 통과시키고, 결합된 단백질을 0.2M 글리신-HCl, pH 2.1로 용출시켰다. 용출 분획을 Tris 염기로 중화시키고 PBS에 대해 투석시켰다. 또 다른 실험에서는 중복형질감염체로부터 농축 배지를 10mM MES 완충액으로 1 : 4의 희석율로 희석시킴으로써 pH 5.2로 조정하고, FPLC 시스템(Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) 상에서 분리시키기 위해 BAKERBOND ABx 컬럼(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)상에 장입시켰다. 결합된 단백질은 0-0.25M(NH₄)₂SO₄의 선형 구배로 용출시키고, F(ab'-지퍼)₂ 단백질은 상술한 바와 같은 ELISA 또는 유동 세포계수로 확인했다. 시험관내에서 형성된 2중 특이 F(ab'-지퍼)₂를 ABx 크로마토그래피로 유사하게 정제했다. 불순 분획 중의 F(ab'-지퍼)₂ 농도를 상술한 바와 같은 유동 세포계수로 측정했다. 1mg/ml가 1.4의 A₂₈₀을 갖는다는 가정하에 정제 단백질 분획중의 농도를 280nm의 흡광도로 측정했다.

시험관내 2중 특이 F(ab'-지퍼)의 형성

항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos의 동종이량체를 PBS중의 2-머캅토에타닐아민으로 37°C에서 1시간 동안 환원시켜 Fab'-지퍼를 형성시켰다. 그 다음 이것을 산화 환원 완충액(50mM Tris-HCl, pH8.5, 1mM EDTA, 500 μM 환원된 글루타치온, 및 500 μM 산화된 글루타치온)과 혼합하여 4°C에서 48시간 동안 투석시키고, 그 완충액은 투석에 의해 다시 PBS로 대체시켰다.

마우스 작동 인자 세포에 의한 세포 독성 분석. 마우스 비장 세포를 DMEM + 10% FCS + 4 μg/ml 콘카나발린 A 중에서 배양했다. 3일후, 세포를 DMEM + 10% FCS + 10U/ml 재조합 IL-2(Amgen, Thousand, Oaks, CA) 중에 1:2 로 희석시켜 계대배양시켰다. 4일후 작동 세포를 수거하여 세포 독성 분석에 사용했다. 표적 세포는 HuT-102 세포를 DMEM 100 μl중의 Na₂⁵¹CrO₄(Amersham, Chicago, IL) 100 μCi와 함께 37°C에서 1시간 동안 항온 배양함으로써 제조했다. 세포를 사용하기 전에 DMEM으로 2회 세정했다. 세포독성은 96 웰조직 배양판 중에서 표준 ⁵¹Cr-방출 분석으로 측정했다. 각 웰에 PBS 중의 2중 특이 F(ab'-지퍼)₂ 50 μl중의 ⁵¹Cr-표지된 HuT-102 세포 10⁴, 및 DMEM 중의 작동세포 50 μl를 공급했다. 각 웰중의 총 용량은 200 μl였다. 세포 혼합물은 37°C에서 4시간 동안 항온 배양하여 용균시켰다. 원심분리후, 각웰로부터 상청액을 취하여 HuT-102 세포로부터의 ⁵¹Cr의 방출에 대해 분석했다. 세포독성 분석에 있어서 특이적인 방출율 %는 다음과 같이 계산했다: {2중 특이 F(ab'-지퍼)₂에 의해 방출된 수 - F(ab'-지퍼)₂의 무첨가시 방출된 수} / {0.1% SDS에 의해 방출된 수 - F(ab'-지퍼)₂ 무첨가시 방출된 수} × 100. 세포독성 분석에 있어서의 모든 점들은 3반복으로 측정하여 이것의 평균치를 기재한 것이다.

Fab'-로이신 지퍼 유전자의 작제 및 형질감염

본 발명자들은 Jun 또는 Fos 로이신 지퍼 서열을 마우스 IgG2a 유전자 C_H2엑손의 제 1 코돈에 결합시키기 위해 PCR 법을 사용했다(제 1 도). 융합 경첩부에 2개의 글리신 코돈을 병입시켜 그 연결부가 단백질 생성물내에서 보다 유연하도록 하였다. 로이신 지퍼 서열 후, 마우스 IgG2a 유전자로부터의 종지 코돈과 폴리아델닐화 시그널을 함유하는 서열을 포함시켰다. 이 융합 유전자를 전술한 중쇄 합성에 사용된 형질 발현 벡터내로 각각 삽입시켰다(제 2 도). 목적하는 항체에 대한 V_H 유전자는 결과적으로 산출되는 신규 벡터의 XbaI 부위내에 삽입될 수 있다. mRNA 전사물은 그 다음 각 플라스미드상의 CMV 프로모터로부터 개시할 것이고, V_H, C_H1, 경첩부 및 C_H2/로이신 지퍼 엑손은 함께 접목될 것으로 예측된다.

본 발명자들은 Jun 형질 발현 플라스미드에 마우스 항-Tac 항체의 V_H 유전자를 삽입시켰고, Fos 플라스미드에 햄스터 145-2C11 항체의 V_H 유전자를 삽입시켰다. 항-Tac 항체는 인체 IL-2 수용체(IL-2R)의 p55쇄에 결합하며(Uchiyama et al., (1981) J. Immunol. 126:1393); 이것의 중쇄 및 경쇄 유전자는 이전에 클로닝되었다(Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029). 145-2C11 항체는 마우스 CD3 복합체의 ε쇄를 인식하며(Leo et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1374); 이것의 중쇄 및 경쇄 유전자도 또한 클로닝되었다. 각 V_H 유전자는 시그널 서열과 J 분절을 함유하고 있으며, 그 다음 접목 공급 서열이 위치하여 C_H1 도메인에 접목된다(Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029). 마우스 V_H 유전자와 함께 항-Tac 및 145-2C11의 V_L 유전자를 각각 함유하는 유사 플라스미드를 제조했다(제 2 도).

각 중쇄 형질 발현 플라스미드를 이에 상응하는 경쇄 플라스미드와 함께 사용하여 유린 미엘로마 세포주 Sp2/0을 동시형질감염시켰다. 안정한 형질감염체는 항-Tac-Jun에 대한 gpt 마커, 및 항-CD3-Fos에 대한 hyg 마커를 사용하여 선별했다. 각 형질감염체로부터의 배지 상청액을 항체 단백질의 존재에 대해 염소 항-마우스 감마 항체와의 ELISA로 선별한다. ELISA-양성형질 감염체는 그 상청액을 CD3 및 p55 양성 세포주에 결합하는 항체-유사 분자의 존재에 대해 시험하기 위해 유동 세포계수를 사용하여 확인했다. 상기 2 가지 경우에 있어서, 형질 감염체는 10⁵ 미엘로마 세포당 약 1의 빈도수로 수득되었다. 형질감염체는 F(ab')₂-유사 분자를 약 0.1-2μg/ml/10⁶ 세포/24h 정도 분비했다. 이 분자들의 생성량은 유사 실험에 있어서의 총 항체 분자의 생성량에 비해 조금 낮은 것으로 밝혀졌다. 항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos에 대한 보다 높은 수율의 형질감염체를 추가의 특성 규명을 위해 확대배양시켰다.

항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos의 정제 및 특성 규명

항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos를 정제하기 위해 친화성 크로마토그래피를 사용했다. 형질 감염체 각 종류로부터의 상청액을 래트 항-마우스 카파세파로오즈 컬럼상에 장입시켰다. 컬럼에 결합된 단백질은 글리신-HCl(pH2.1)로 용출시켰다. PBS에 대하여 투석시킨 후, 용출된 단백질을 SDS PAGE 겔(Laemmli, (1970) Nature 227:680)상에서 환원시키거나 환원시킴이 없이 분석했다(제 3 도). 환원된 단백질은 단지 2개의 밴드만을 나타냈으며, 각각 겔보기 분자량이 25kd 및 31kd으로서, 각각 경쇄 및 중쇄 Fd-지퍼에 해당된다. 비환원된 단백질은 대략적인 분자량 25kd 이하 및 100kd 이상에서 주밴드를 나타냈다. 이 2가지 밴드 모두 경쇄 및 Fd-지퍼로 환원될 수 있다는 사실의 측면에서, 이 2가지 밴드는 유리 경쇄(25kd)와 항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos의 F(ab'-지퍼)₂ 이량체를 나타내는 것 같다. 또한, 항-CD3-Fos 샘플은 하기 입증되는 바와 같이 경쇄 이량체로 이루어진 50kd 밴드를 함유했다. 특히, 상기 단백질을 정제하는데 사용된 친화성 크로마토그래피는 유리 Fd-지퍼 쇠를 제외한 유리 경쇄와 경쇄 이량체를 포획할 수 있다. 따라서, 상기 50kd 단백질은 Fd-지퍼 이량체인 것 같지 않다. SDS PAGE 상의 단백질의 이동성에 대한 사슬간 이황화 결합의 영향은 환원시키거나 환원시킴이 없이 경쇄 이동의 정도를 비교함으로써 관찰될 수 있다.

생체내 2중 특이 F(ab'-지퍼)의 형성

본 발명자들은 플라스미드 작제물이 적절한 F(ab'-지퍼)₂ 동종이량체를 직접 형질 발현시킬 수 있다는 것을 밝힌 다음, 하나의 형질 감염체내에서 항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos에 필요로 되는 4가지 상이한 폴리펩티드 쇠가 모두 형질 발현됨으로써 2중 특이 F(ab'-지퍼)₂가 생체내에서 생성될 수 있다는 것을 밝혔다.

항-CD3-Fos 형질 감염체를 항-Tac-Jun에 대한 플라스미드 작제물로 추가 형질감염시켰다. 중복형질감염체를 gpt 및 hyg 마커를 사용하여 선정하고 정제된 IL-2R p55에 결합할 수 있는 항체 단백질의 분비에 대해 ELISA로 선별했다. 이 중복형질감염체로부터의 상청액을 또한 항-Tac 및 항 CD3 활성의 존재에 대해 유동 세포계수법으로 분석했다.

항-Tac 및 항-CD3 활성을 생성하는 대표적인 중복감염체를 확대 배양하여 그 항체 생성물을 추가로 특성 규명하였다. 이 중복감염체로부터의 배지 상청액을 ABx 컬럼상의 FPLC 크로마토그래피에 장입시켜 (NH₄)₂SO₄ 구배로 용출시킴으로써 분석했다(제 2a 도). 마우스 중쇄 및 경쇄에 대한 ELISA 분석에 반응성인 단백질을 함유하는 단지 5개의 피크가 용출되었다(제 4b 도).

분획 I, II, III, IV 및 V로서 표기되는 항체-양성 피크를 사용하여 CD3⁺ EL4 T-임파종 세포 및 IL-2R⁺ HuT-102 세포에 결합하는 지에 대해 유동 세포계수법으로 분석했다. 분획 II는 항-Tac 및 항-CD3 활성을 갖고 있는 반면, 분획 I은 대부분 항-Tac 활성을 갖고 있었고 분획 III과 IV 및 V는 항-CD3 활성만을 갖고 있었다(제 4c 도). 별도의 실험으로서, 항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos를 별도로 형질 발현되는 형질 감염체로부터의 배지를 상기와 동일한 시스템에서 크로마토그래피시켰다. 항-Tac-Jun은 분획 I과 동일한 위치에서 용출되었고, 항-CD3-Fos는 분획 IV의 위치에서 용출되었다(데이터 제시안됨). 따라서, 분획 II는 2중 특이 항체를 함유하고 있고, 분획 III과 V는 항-CD3 활성만을 갖는 다른 하이브리드 항체를 함유하고 있다.

분획 II가 정말로 2중 특이 활성을 함유하고 있음을 증명하기 위해, 본 발명자들은 활성화된 마우스 비장 T세포에 의한 ⁵¹Cr-표지된 HuT-102 세포의 용균을 매개하기 위해 분획 II를 사용했다(제 5 도). 분획 II중의 단백질은 200ng/ml 이하의 농도로 표적 세포를 용균시켰다. 정제된 항-CD3-Fos 및 항-Tac-Jun 동종이

항체는 단독형이거나 또는 혼합형이건 간에 세포를 용균시키는 데이는 전적으로 비효과적이었다. 이 데이는 2중 특이 활성이 생체내에서 형성될 수 있다는 것을 나타낸다.

시험관내에서 2중 특이 F(ab'-지퍼)₂의 형성

동종이량체 F(ab'-지퍼)₂ 단백질은 경첩부에서 환원되어 Fab'-지퍼 단량체를 형성시킬 수 있다. 다양한 농도의 2-머캅토에틸아민을 사용하여 중쇄 Fd-지퍼로부터 경쇄를 해리시킴이 없이 Fab'-지퍼를 형성시키기 위한 최상의 조건을 결정하였다. 환원 생성물은 SDS PAGE 상에서 비환원 조건하에 분석했다. 정제된 항-Tac-Jun의 환원을 위한 최상의 조건은 PBS 중의 4mM 2-머캅토에틸아민과 37°C에서 1시간동안 반응시킨 것이다. 항-CD3-Fos는 동일 조건하에서 2mM 2-머캅토에틸아민을 필요로 했다. 이런 조건하에서 환원된 단백질을 제 6 도에 나타낸다. 상기 2가지 경우 모두, Fab'-지퍼에 상응하는 50-55kd의 단백질 밴드군은 환원 시 나타났다. 이질성에 대한 원인은 불명료하나, 종래 관찰된 바 있다(Curran and Franza, (1988) Cell 55:395). 항-CD3-Fos 샘플내의 경쇄 이량체는 또한 단량체로 매우 쉽게 환원되었다. 이러한 조건하에서 Fab'-지퍼로부터 경쇄의 해리는 최소량이었으며, 이것은 Fd-지퍼 밴드가 나타나지 않는 것으로부터 입증되었다(제 3 도와 비교).

항-Tac 및 항-CD3 Fab'-지퍼 단백질을 1:1 비율로 최종 농도가 100 µg/ml가 되도록 함께 혼합하고, 산화 환원 완충액에 대하여 투석한 다음, PBS에 대하여 투석시켰다. Fab'-지퍼 밴드가 사라졌고, F(ab'-지퍼)₂ 단백질에 상응하는 신규 밴드가 나타났다(제 6 도, 레인 5). 신규 단백질은 생체내에서 생성되는 F(ab'-지퍼)₂를 위해 사용했던 것과 동일한 조건하에서 ABx 크로마토그래피로 분별시켰다. 크로마토그램에 3개의 주 단백질 피크와 2개의 부 단백질 피크가 나타났다(제 7a 도). 이 피크들을 확인하기 위해 ELISA, 유동 세포계수법(제 7b 도), SDS PAGE(제 8 도)를 복합적으로 사용했다. 병류(flow through: FT) 분석은 과량의 경쇄 및 경쇄 이량체만을 함유하고 있었다. 1차 용출된 주피크(분획 1)는 대부분 경쇄를 함유하고 있으나, 또한 소량의 항-Tac-Jun도 유동 세포계수법으로 검출되었다. 또한, 이 분획뿐만 아니라 잇따른 분획들은 BSA를 함유하고 있으며, 이것은 비특이적인 단백질이 정착되지 못하도록 ABX 컬럼을 전처리하는데 사용된 것이다. 2차 용출된 피크(분획 11)는 유동세포계수법으로 측정되는 바와 같이 소량의 항-Tac 및 항-CD3 활성을 갖고 있었고, 부분적으로는 응집 형태인 F(ab'-지퍼)₂ 로 이루어져 있었다. 최종 피크(분획 1V)는 용출 위치(분획 IV, 제 4a 도 참조)와 EL4 세포 결합 활성으로 인해 항-CD3-Fos로서 확인되었다.

크로마토그램상의 3차 주피크(분획 111)는 생체내에서 생성된 2중 특이 F(ab'-지퍼)₂ 와 동일한 위치에서 정확하게 용출되었다(제 4a 도, 분획 11).

이 분획은 CD3⁺ EL4 세포와 IL-2R⁺ HuT-102 세포에 결합한다. 이 분획의 SDS PAGE 상에는 F(ab'-지퍼)₂ 에 대해 예상되는 분자량을 지닌 단지 하나의 기본적인 단백질 밴드가 관찰되었다(제 8a 도, 레인 4), 환원 시, 가깝게 이동하는 2개의 Fd-지퍼 밴드와 대략 동일량의 2개의 뚜렷한 경쇄 밴드로 해리되었다(제 8b 도, 레인 4), 본 발명자들은 상기 샘플과 나란히 항-CD3-Fos 동종이량체를 이동시킴으로써 항-CD3-Fos Fd-지퍼로서 상부 Fd-지퍼 밴드 및 항-CD3-Fos 경쇄로서 상부 경쇄 밴드를 확인할 수 있었다(제 8b 도의 레인 4 및 5 비교). 항-Tac-Jun 및 항-CD3-Fos 동종 이량체는 다른 분획에 용출되는 것으로 밝혀졌으므로, 분획 111은 항-Tac-Jun과 항-CD3-Fos의 이종이량체로 이루어져야만 한다. 이 분획이 2중 특이 항체를 함유한다는 것을 확인하기 위해, 본 발명자들은 이 분획을 마우스 T세포에 의한 Hut-102 세포의 표적화된 사멸에 사용했다. 특이적인 용균 작용은 10ng/ml 이하의 농도에서 관찰되었다(제 9 도). 일괄해보면, 이 데이터들은 이항화물 교환에 의해 시험관내에서 형성된 F(ab'-지퍼)₂ 가 주로 2중 특이 항-Tac x 항-CD3이고, 부산물의 형성은 거의 이루어지지 않는다는 것을 나타낸다.

전술한 바와 같이, 본 발명의 2중 특이 항체는 다른 2중 특이 항체보다 많은 잇점을 제공한다는 것을 알 수 있다. 2개의 로이신 지퍼가 쌍결합하여 형성되지 않는 2중 특이 항체에 비해, 본 발명의 2중 특이 항체는 고순도 및 고수율로 보다 경제적으로 생성될 수 있다. 이와 같이 증진된 순도 및 수율로 인해 2중 특이 항체가 인간이나 가축 질환의 치료, 또는 질환의 예방에 사용될 수 있다.

본 발명은 명료하게 이해시키고자 예시 및 실시예로 구체화되었으나, 첨부되는 특허청구의 범위내에서 임의의 변형 및 수정이 실시될 수 있다는 것은 명백한 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

제1에피토프 결합 성분에 결합된 제 1 로이신 지퍼를 함유하는 제 1 단백질; 및 제2에피토프 결합 성분에 결합된 제 2 로이신 지퍼를 함유하는 제 2 단백질을 포함하며, 상기 제 2 로이신 지퍼는 상기 제 1 로이신 지퍼에 대해 쌍 친화성을 갖는 2중 특이 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 하나의 로이신 지퍼가 Fos 로이신 지퍼인 2중 특이 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 하나의 로이신 지퍼가 Jun 로이신 지퍼인 2중 특이 항체

청구항 4

제1에피토프 결합 성분에 결합된 Fos 로이신 지퍼를 함유하는 제 1 단백질; 및 제2에피토프 결합 성분에 결합된 Jun 로이신 지퍼를 함유하는 제 2 단백질을 함유하는 2중 특이 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제1로이신 지퍼 및 제2로이신 지퍼 둘다 구조식(로이신- $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$)_n 을 가지며, 이 식중에서 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , 및 X_6 은 각각 통상적인 20개 아미노산으로 이루어진 군중에서 선택되고 n은 30이상의 정수인 것을 특징으로 하는 2중 특이 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 제 1 로이신 지퍼는 제 1(b)도에 나타난 아미노산 서열을 갖고 있고, 상기 제 2 로이신 지퍼는 제 1(a)도에 나타난 아미노산 서열을 갖고 있음을 특징으로 하는 2중 특이 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제 1 에피토프 결합 성분은 약 $10^8 M^{-1}$ 또는 그 이상의 친화성으로 인체 IL-2 수용체 단백질에 결합함을 특징으로 하는 2중 특이 항체.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 에피토프 결합 성분은 약 $10^8 M^{-1}$ 또는 그 이상의 친화성으로 인체 CD3 단백질에 결합함을 특징으로 하는 2중 특이 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 제 1 에피토프 결합 성분이 Fab'임을 특징으로 하는 2중 특이 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 에피토프 결합 성분중 하나 이상이 인체화된 면역글로불린임을 특징으로 하는 2중 특이 항체.

청구항 11

제1에피토프에 결합할 수 있는 제1에피토프 결합 성분에 결합된 제1로이신 지퍼를 함유하는 제1단백질을 산출시키는 단계; 제 2 에피토프에 결합할 수 있는 제 2 에피토프 결합 성분에 결합된 제 2 로이신 지퍼를 함유하며, 그 제 2 로이신 지퍼는 상기 제 1 로이신 지퍼에 대해 쌍 친화성을 갖는 제 2 단백질 산출시키는 단계; 및 F(ab'-지퍼)₂ 이중이량체의 형성을 허용하는 조건하에서 상기 제 1 단백질과 상기 제 2 단백질을 접촉시켜 2중 특이 항체를 형성시키는 단계를 포함하는 2중 특이 항체의 제조 방법.

청구항 12

제11 항에 있어서, 하나의 로이신 지퍼가 Fos 또는 Jun 로이신 지퍼인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 하나의 로이신 지퍼는 Fos 로이신 지퍼이고 다른 하나의 로이신 지퍼는 Jun 로이신 지퍼인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 상기 제 1 로이신 지퍼 및 상기 제 2 로이신 지퍼가 둘다 구조식(로이신- $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$)_n에 상응하는 아미노산 서열을 포함하며, 이 식중에서, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , 및 X_6 은 각각 통상적인 20개 아미노산으로 구성된 군중에서 선택되고 n은 30이상의 정수인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 15

제 11 항에 있어서, 상기 제 1 단백질과 상기 제 2 단백질의 접촉이 시험관내에서 이루어짐을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 16

제 11 항에 있어서, 상기 제 1 단백질과 상기 제 2 단백질의 접촉이 상기 제 1 단백질과 상기 제 2 단백질을 형질 발현하는 단세포 생체내에서 이루어짐을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 17

제 1 에피토프에 결합할 수 있는 제 1 에피토프 결합 성분에 결합된 제 1 로이신 지퍼를 함유하는 제 1 단백질을 산출시키는 단계; 제 2 에피토프에 결합할 수 있는 제 2 에피토프 결합 성분에 결합된 제 2 로이신 지퍼를 함유하며, 그 제 2 로이신 지퍼는 상기 제 1 로이신 지퍼에 대해 쌍친화성을 갖는 제 2 단백질을 산출시키는 단계; 상기 제 1 단백질과 상기 제 2 단백질을 접촉시켜 이중이량체를 형성시키는 단계; 상기 제 1 에피토프 결합 성분과 상기 제 2 에피토프 결합 성분사이의 직접적인 연쇄를 형성시키고, 이때 상기 직접적인 연쇄가 형성된 후 로이신 지퍼 서열은 에피토프 결합 성분으로부터 분리될 수 있으며 상기 직접적인 연쇄는 유지되는 단계; 상기 제 1 로이신 지퍼와 상기 제 1 에피토프 결합 성분 사이의 연쇄를 절단시키는 단계; 및 상기 제 2 로이신 지퍼와 상기 제 2 에피토프 결합 성분사이의 연쇄를 절단시켜 제 2 에피토프 결합 성분에 결합된 제 1 에피토프 결합 성분의 이중 이량체를 함유하는 2중 특이 항체를 형성시키는 단계를 포함하는 2중 특이 항체의 제조 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 에피토프 결합 성분 중 하나 이상이 Fab'임을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 19

제 17 항에 있어서, 상기 제 1 에피토프 결합 성분과 상기 제 2 에피토프 결합 성분 사이의 연쇄가 이황화 결합인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 20

제 17 항에 있어서, 상기 결합된 제 1 및 제 2 에피토프 결합 성분을 상기 절단된 제 1 및 제 2 로이신 지퍼로부터 분리시키는 단계를 포함함을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 21

제 17 항에 있어서, 상기 에피토프 결합 성분으로부터 상기 로이신 지퍼의 절단이 히드록실아민에 의해 절단될 수 있는 아스파라긴-글리신 펩티드 결합으로 이루어진 연쇄에서 일어남을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 22

에피토프 결합 성분과 로이신 지퍼를 함유하는 폴리펩티드를 암호하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물.

청구항 23

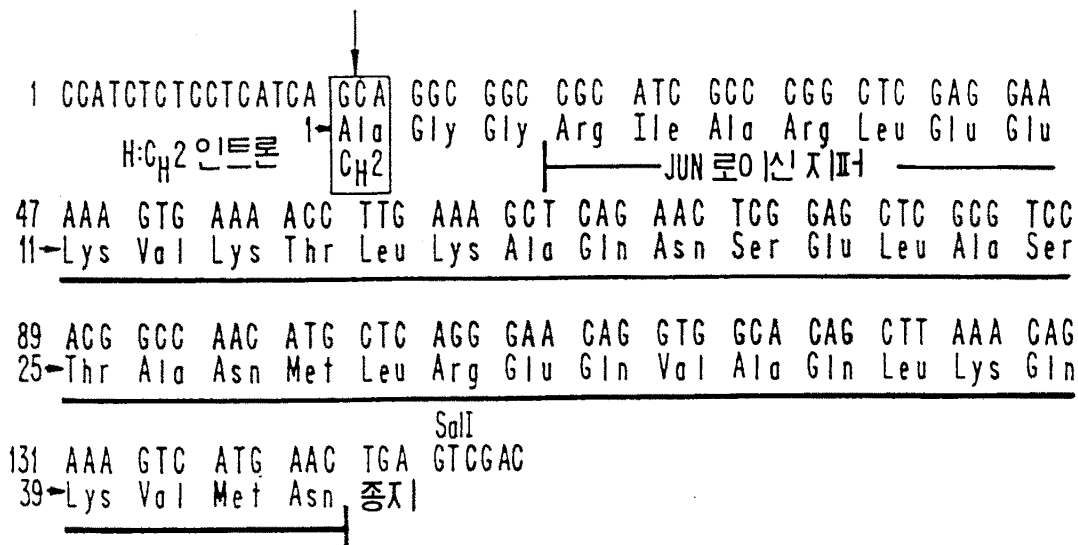
제 22 항에 있어서, 상기 로이신 지퍼가 Jun 또는 Fos 로이신 지퍼임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

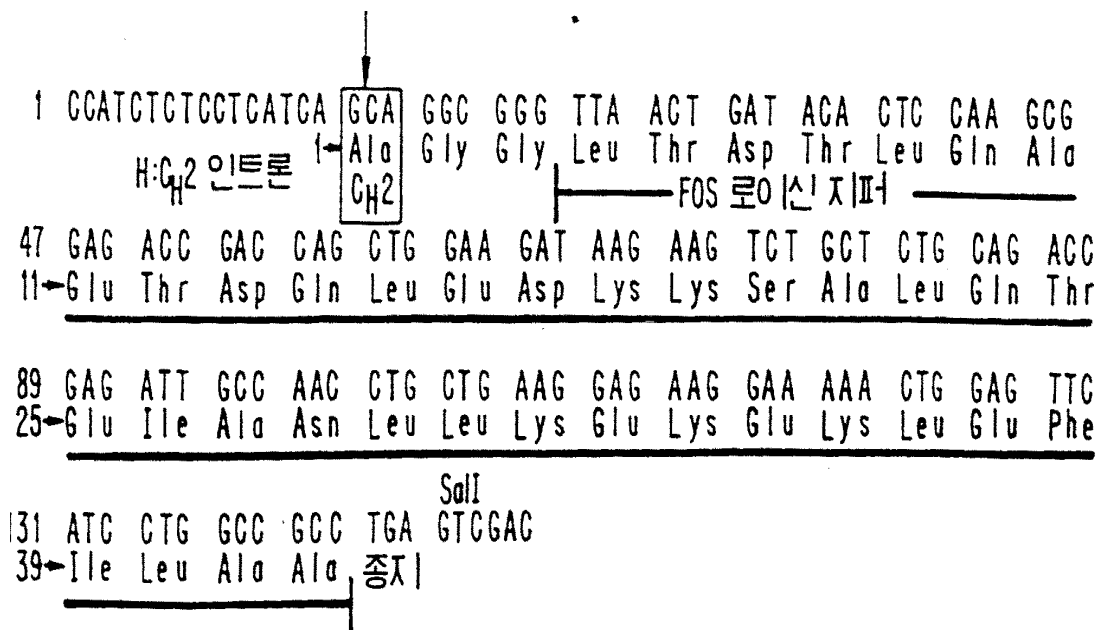
항체 중쇄의 V_H, C_{H1}, 및 경첩 도메인으로 이루어진 에피토프 결합 성분과 로이신 지퍼를 암호하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 25

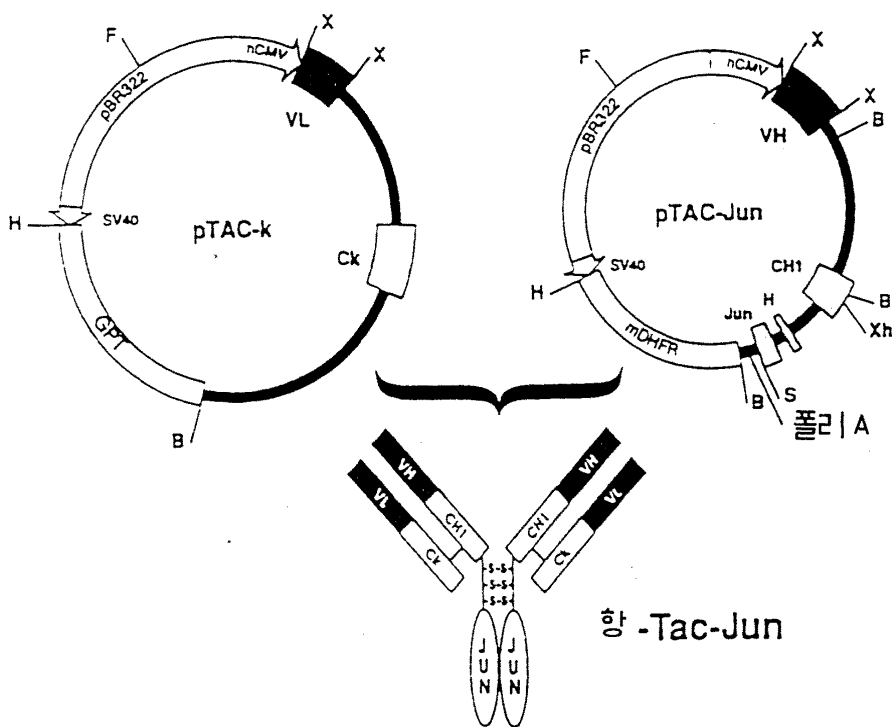
제 23 항에 있어서, 상기 암호된 에피토프 결합성분이 Fab'임을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

도면**도면 1a**

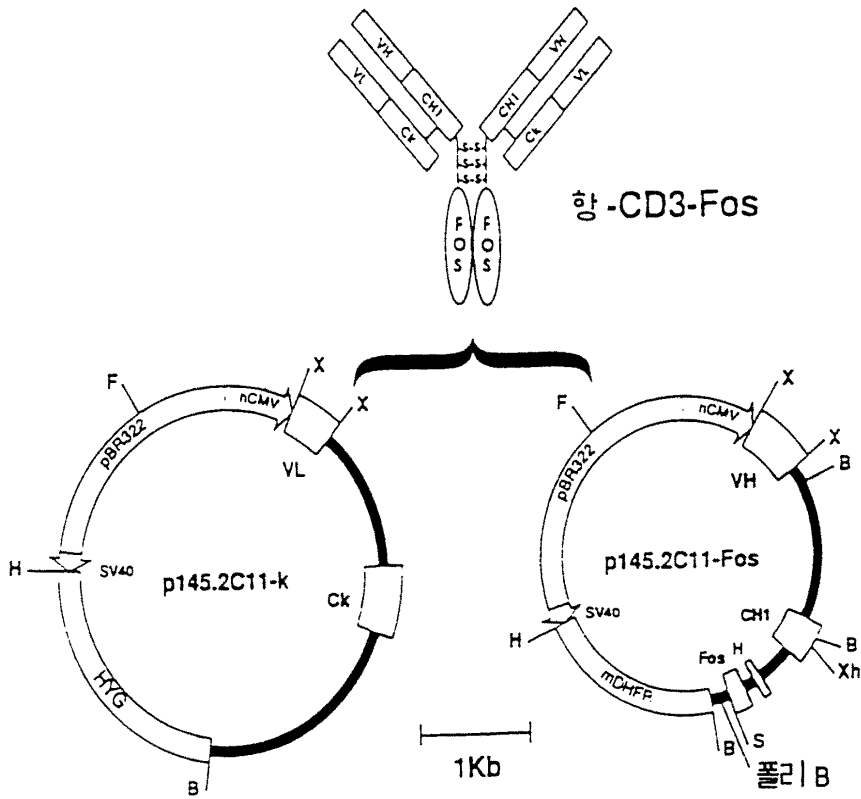
도면 1b



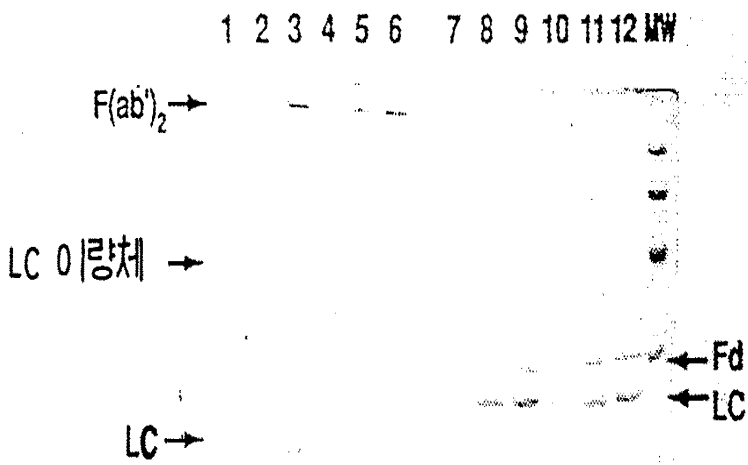
도면 2a



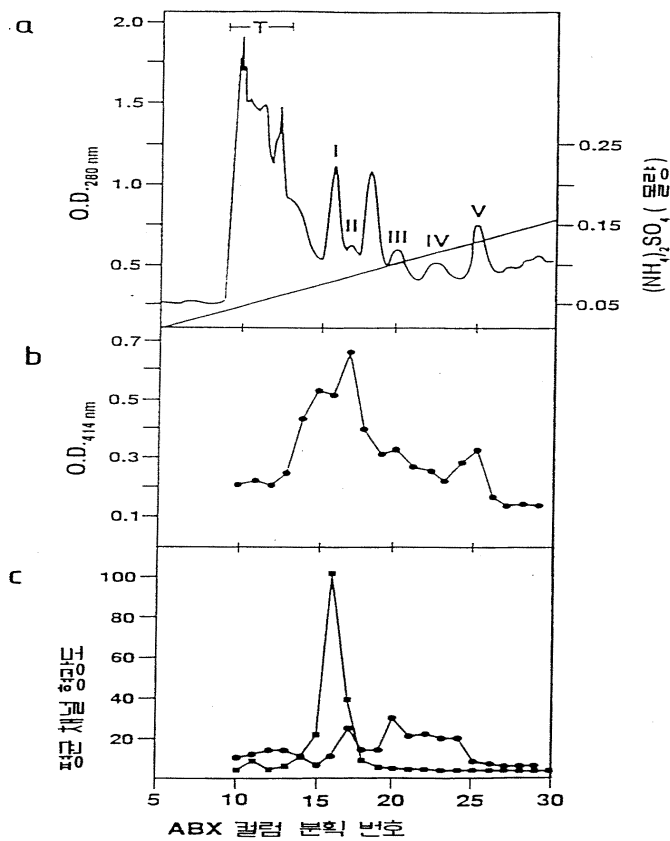
도면2b



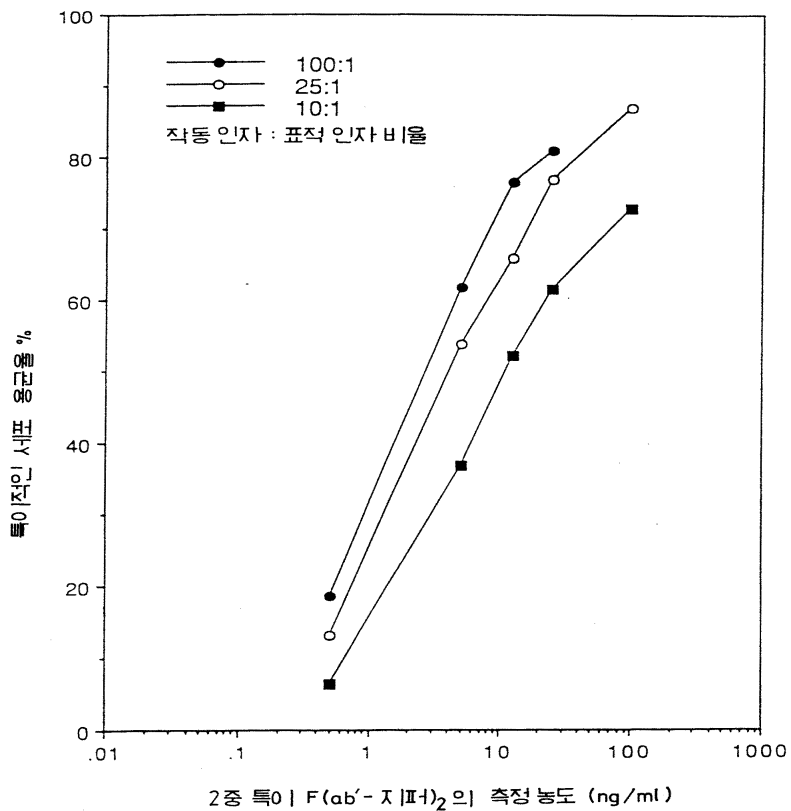
도면3



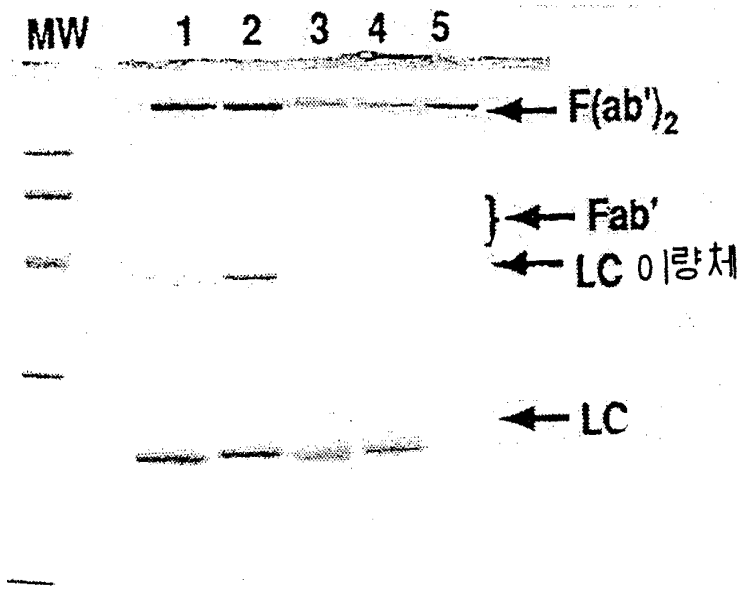
도면4



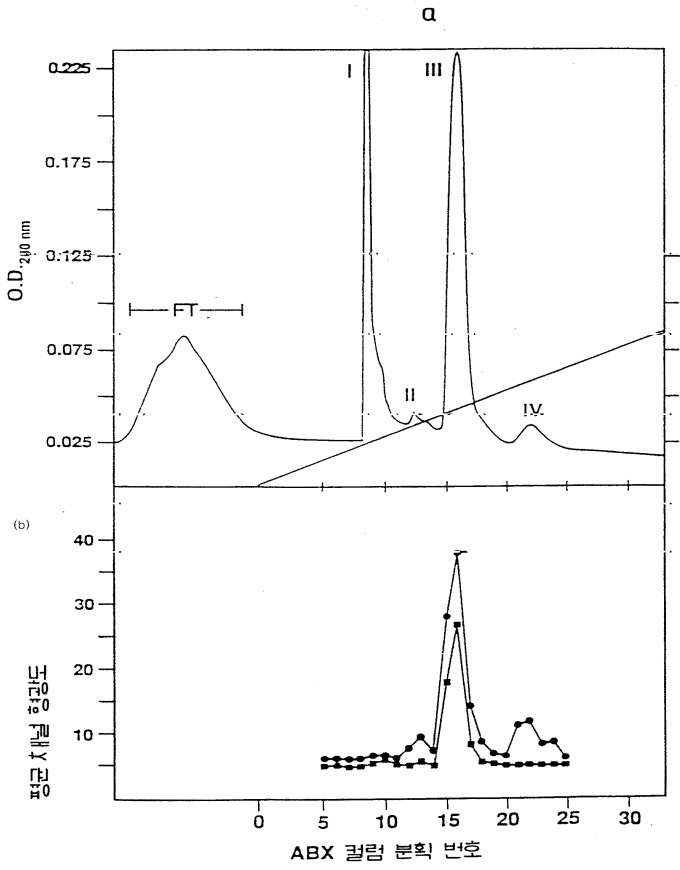
도면5



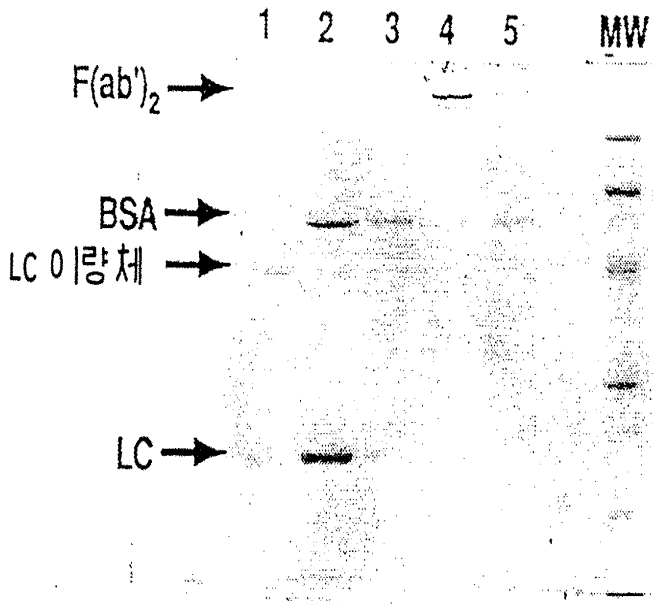
도면6



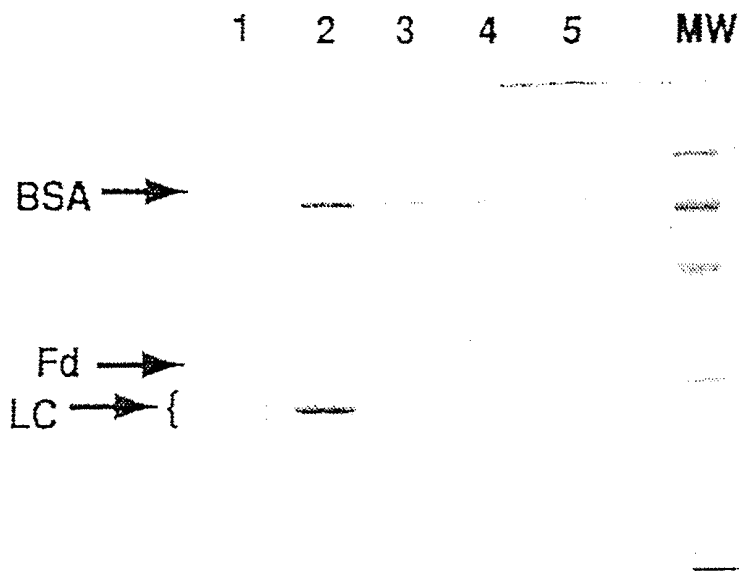
도면7



도면8a



도면8b



도면9

