

(11) 공개번호 10-2024-0082397
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2024-7014743

(22) 출원일자(국제) 2022년10월06일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년05월02일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/077817

(87) 국제공개번호 WO 2023/057571
국제공개일자 2023년04월13일

(30) 우선권주장
21201712.3 2021년10월08일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
젠맵 에이/에스
덴마크 2500 발뷔 칼 야콥센 바이 30

(72) 발명자
사테인, 다비트
네덜란드 3584 씨티 유티레흐트 워살라란 15 젠맵
비.브이. 씨/오
엔젤베르츠, 패트릭
네덜란드 3584 씨티 유티레흐트 워살라란 15 젠맵
비.브이. 씨/오
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
양영준, 김영

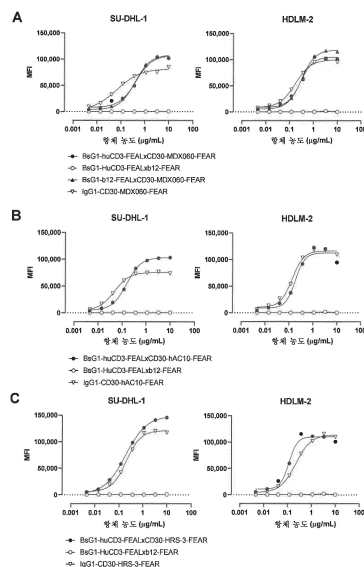
전체 청구항 수 : 총 60 항

(54) 발명의 명칭 CD30 및 CD3에 결합하는 항체

(57) 요약

본 발명은 CD3 및 CD30에 결합하는 다중특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명은 본 발명의 항체를 포함하는 제약 조성물, 항체를 코딩하는 핵산, 항체를 생산하는 숙주 세포, 항체를 생산하는 방법, 및 특히 암 요법을 위한 항체의 용도를 추가로 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

(72) 발명자

캠퍼, 크리스텔

네덜란드 3584 씨티 유평레흐트 윗살라란 15 쥬맵

비.브이. 씨/오

브레이즈, 에스더, 씨, 더블유,

네덜란드 3584 씨티 유평레흐트 윗살라란 15 쥬맵

비.브이. 씨/오

우스틴디, 시몬

네덜란드 3584 씨티 유평레흐트 윗살라란 15 쥬맵

비.브이. 씨/오

알렘다이, 파르시트

네덜란드 3584 씨티 유평레흐트 윗살라란 15 쥬맵

비.브이. 씨/오

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 다중특이적 항체:

(i) 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및

(ii) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 중쇄 가변 영역 및/또는 제1 경쇄 가변 영역이 인간인 다중특이적 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제2 중쇄 가변 영역 및/또는 제2 경쇄 가변 영역이 인간화인 다중특이적 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 9에서 X가 H인 다중특이적 항체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 9에서 X가 G인 다중특이적 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 14에 제시된 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 16에 제시된 서열을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 다중특이적 항체가 이중특이적 항체인 다중특이적 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 다중특이적 항체가 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역을 포함하는 것인 다중특이적 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, Fc 영역이 IgG1 Fc 영역, 바람직하게는 인간 IgG1 Fc 영역인 다중특이적 항체.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 다중특이적 항체가 전장 항체인 다중특이적 항체.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 불활성 Fc 영역을 포함하는 다중특이적 항체.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 Fc 폴리펩티드가 인간 IgG1 중쇄에서 위치 L234 및/또는 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 각각 F 및 E로의 치환이고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 다중특이적 항체.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 제1 및/또는 제2 Fc 폴리펩티드가 인간 IgG1 중쇄에서 위치 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 R로의 치환이고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 다중특이적 항체.

청구항 15

제14항에 있어서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 인간 IgG1 중쇄에서 위치 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 R로의 치환인 다중특이적 항체.

청구항 16

제12항 또는 제13항에 있어서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 제1 및/또는 제2 Fc 폴리펩티드가 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 A로의 치환이고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 다중특이적 항체.

청구항 17

제16항에 있어서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드가 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 A로의 치환인 다중특이적 항체.

청구항 18

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나가 위치 L234, L235 및 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 R로의 치환을 포함하고, 다른 Fc 폴리펩티드가 위치 L234, L235E 및 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 A로의 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 다중특이적 항체.

청구항 19

제18항에 있어서, 제1 Fc 폴리펩티드 및 제1 중쇄 가변 영역이 동일한 폴리펩티드 쇄 내에 포함되고, 제2 Fc 폴리펩티드 및 제2 중쇄 가변 영역이 동일한 폴리펩티드 쇄 내에 포함되는 것인 다중특이적 항체.

청구항 20

제19항에 있어서, 제1 Fc 폴리펩티드가 위치 L234, L235 및 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 R로의 치환을 포함하고, 제2 Fc 폴리펩티드가 위치 L234, L235E 및 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 A로의 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 다중특이적 항체.

청구항 21

제9항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 Fc 폴리펩티드에서, 인간 IgG1 중쇄에서 T366, L368, K370, D399, F405, Y407 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 중 적어도 하나가 치환되어 있고, 제2 Fc 폴리펩티드에서, 인간 IgG1 중쇄에서 T366, L368, K370, D399, F405, Y407 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 중 적어도 하나가 치환되어

있으며, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드에서의 상기 치환은 동일한 위치에 있지 않고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 다중특이적 항체.

청구항 22

제21항에 있어서, F405에 상응하는 위치에서의 아미노산이 제1 Fc 폴리펩티드에서 L이고, K409에 상응하는 위치에서의 아미노산이 제2 Fc 폴리펩티드에서 R이거나, 또는 그 반대의 경우인 다중특이적 항체.

청구항 23

제22항에 있어서, K409에 상응하는 위치에서의 아미노산이 제1 Fc 폴리펩티드에서 R이고, F405에 상응하는 위치에서의 아미노산이 제2 Fc 폴리펩티드에서 L인 다중특이적 항체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 포함하며:

(i) 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및

(ii) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역;

여기서 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역을 포함하고;

여기서 제1 Fc 폴리펩티드 및 제1 중쇄 가변 영역은 동일한 폴리펩티드 쇠 내에 포함되고, 여기서 제2 Fc 폴리펩티드 및 제2 중쇄 가변 영역은 동일한 폴리펩티드 쇠 내에 포함되고;

여기서 제1 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235 및 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 R로의 치환을 포함하고, 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235 및 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 A로의 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같고;

여기서 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제1 Fc 폴리펩티드에서 R이고, 여기서 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제2 Fc 폴리펩티드에서 L인

다중특이적 항체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 17 및 19에 제시된 중쇄 서열 및 서열식별번호: 18 및 20에 제시된 경쇄 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 다중특이적 항체.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 17 및 19에 제시된 중쇄 서열 및 서열식별번호: 18 및 20에 제시된 경쇄 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지며, 여기서 다중특이적 항체는 이중특이적 항체인 다중특이적 항체.

청구항 27

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) CD30 결합 영역 및/또는 CD3 결합 영역이 Fab이거나,

(ii) CD30 결합 영역 및/또는 CD3 결합 영역이 scFv이거나,

(iii) CD30 결합 영역이 Fab이고 CD3 결합 영역이 scFv이거나, 또는

(iv) CD30 결합 영역이 scFv이고 CD3 결합 영역이 Fab인

다중특이적 항체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체를 코딩하는 핵산 구축물, 또는 핵산 구축물의 조합물.

청구항 29

제28항에 따른 핵산 구축물(들)을 포함하는 발현 벡터, 또는 발현 벡터의 조합물.

청구항 30

제28항에 따른 핵산 구축물(들)을 포함하는 전달 비히클.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 전달 비히클이 입자인 전달 비히클.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 입자가 지질 나노입자인 전달 비히클.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 지질 나노입자가 지질, 이온화가능한 아미노지질, PEG-지질, 콜레스테롤 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인 전달 비히클.

청구항 34

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체를 생산할 수 있는 재조합 숙주 세포로서, 여기서 숙주 세포는 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체를 코딩하는 1종 이상의 핵산 구축물을 포함하는 것인 재조합 숙주 세포.

청구항 35

제34항에 있어서, 재조합 숙주 세포가 CHO 세포인 재조합 숙주 세포.

청구항 36

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 37

제1항 내지 제28항, 제30항 내지 제33항 및 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제28항, 제30항 내지 제33항 및 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 암의 치료에 사용하기 위한 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물.

청구항 39

제1항 내지 제28항, 제30항 내지 제33항 및 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 호지킨 림프종 또는 비-호지킨 림프종 (NHL)의 치료에 사용하기 위한 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 비-호지킨 림프종이 T 세포 비-호지킨 림프종 (T-NHL)인 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, T-NHL이 피부 T-세포 림프종 (CTCL) 또는 말초 T-세포 림프종 (PTCL)인 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포 비-호지킨 림프종 (T-NHL)이 역형성 대세포 림프종 (ALCL)인 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물.

청구항 43

제39항에 있어서, 비-호지킨 림프종이 B 세포 비-호지킨 림프종 (B-NHL)인 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물.

청구항 44

제37항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물이 정맥내로 및/또는 피하로, 바람직하게는 피하로 투여된 것인 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물.

청구항 45

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체를 생산하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

- (i) 제34항 또는 제35항의 재조합 숙주 세포를 항체가 생산되는 조건 하에서 배양하는 단계, 및
- (ii) 생산된 다중특이적 항체를 배양물로부터 분리하는 단계.

청구항 46

제9항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체를 생산하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

- a) 제1항 (i)에 기재된 바와 같은 CD30 결합 영역을 포함하는 제1 항체, 및 제1항 (ii)에 기재된 바와 같은 CD3 결합 영역을 포함하는 제2 항체를 제공하며, 여기서 상기 항체는 임의로 제2항 내지 제26항 중 어느 한 항에 기재된 추가의 특색을 함유하고,

여기서 제1 및 제2 항체는 Fc 영역을 포함하고,

여기서 제1 및 제2 항체의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체성 상호작용이 제1 및 제2 CH3 영역의 동중이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것인

단계;

- b) 힌지 영역에서의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪는 것을 허용하는데 충분한 환원 조건 하에서 제1 항체를 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및
- c) 제1 항체의 제1 이뮤노글로불린 중쇄 및 제1 이뮤노글로불린 경쇄 및 제2 항체의 제2 이뮤노글로불린 중쇄 및 제2 이뮤노글로불린 경쇄를 포함하는 다중특이적 항체를 수득하는 단계.

청구항 47

파트들의 키트, 예컨대 동반 진단제로서 사용하기 위한/환자의 집단 내에서 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체로의 치료에 반응하는 경향을 갖는 환자를 확인하기 위한 키트로서, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체; 및 상기 키트의 사용을 위한 지시서를 포함하는 파트들의 키트.

청구항 48

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 다중특이적 항체를 포함하는 진단 조성물.

청구항 49

하기를 포함하는 항체:

- (i) 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역, 및 서열

식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및

(ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄에서 위치 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 R로의 치환이고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 Fc 영역.

청구항 50

제49항에 있어서, 제1 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 14에 제시된 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 항체가 서열식별번호: 17에 제시된 중쇄 서열 및 서열식별번호: 18에 제시된 경쇄 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진 것인 항체.

청구항 52

하기를 포함하는 항체:

(i) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역, 및

(ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄에서 위치 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 R로의 치환이고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 Fc 영역.

청구항 53

제52항에 있어서, 서열식별번호: 9에서 X가 H인 항체.

청구항 54

제52항에 있어서, 서열식별번호: 9에서 X가 G인 항체.

청구항 55

제52항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 16에 제시된 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 56

제49항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 전장 항체인 항체.

청구항 57

제49항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IgG1 중쇄에서 T366, L368, K370, D399, F405, Y407 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 중 적어도 하나가 치환되어 있으며, 여기서 바람직하게는, F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 L이거나 또는 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 R인 항체.

청구항 58

다중특이적 항체를 생산하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

a) 제49항 내지 제51항 및 제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 제1 항체 및 하기를 포함하는 제2 항체를 제공하거나:

(i) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역, 및

(ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환, 및 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 A로의 치환을 포함하는 것인 Fc 영역,

또는

제52항 내지 제57항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 제2 항체 및 하기를 포함하는 제1 항체를 제공하는 단계:

(i) 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및

(ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환, 및 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 A로의 치환을 포함하는 것인 Fc 영역,

여기서 제1 및 제2 항체의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체성 상호작용이 제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것이고; 여기서 바람직하게는 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제1 CH3 영역에서 L이고, K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제2 CH3 영역에서 R이거나, 또는 그 반대의 경우임;

b) 힌지 영역에서의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪는 것을 허용하는데 충분한 환원 조건 하에서 제1 항체를 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및

c) 제1 항체의 제1 이뮤노글로불린 중쇄 및 제1 이뮤노글로불린 경쇄 및 제2 항체의 제2 이뮤노글로불린 중쇄 및 제2 이뮤노글로불린 경쇄를 포함하는 다중특이적 항체를 수득하는 단계.

청구항 59

제58항에 있어서, 하기 단계를 포함하는 다중특이적 항체를 생산하는 방법:

a) 제49항 내지 제51항 및 제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 제1 항체 및 하기를 포함하는 제2 항체를 제공하는 단계:

(i) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역, 및

(ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환, 및 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 A로의 치환을 포함하는 것인 Fc 영역,

여기서 제1 및 제2 항체의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체성 상호작용이 제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것이고; 여기서 바람직하게는 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제1 CH3 영역에서 R이고, F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제2 CH3 영역에서 L임;

b) 힌지 영역에서의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪는 것을 허용하는데 충분한 환원 조건 하에서 제1 항체를 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및

c) 제1 항체의 제1 이뮤노글로불린 중쇄 및 제1 이뮤노글로불린 경쇄 및 제2 항체의 제2 이뮤노글로불린 중쇄 및 제2 이뮤노글로불린 경쇄를 포함하는 다중특이적 항체를 수득하는 단계.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 기재된 바와 같은 방법에 의해 수득된 다중특이적 항체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CD30 및 CD3에 결합하는 다중특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명은 항체를 포함하는 제약 조성물, 항체를 코딩하는 핵산, 항체를 생산하는 숙주 세포, 항체를 생산하는 방법, 및 특히 암 요법을 위한 항체의 용도를 추가로 제공한다.

배경 기술

[0002] CD30, 일명 Ki-1 또는 TNFRSF8은 120 kD 막횡단 당단백질 수용체이고, 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR) 슈퍼패밀리의 구성원이다 (Smith et al. (1994) Cell 76: 959-962). CD30은 그의 세포외 도메인에 6개의 시스테인-풍부 반복부를 갖는 단일-통과 유형 I 막 단백질이다 (Durkop et al. (1992) Cell 68: 421-427). 또한, CD30의 가용성 형태 (sCD30)는 궤양성 결장염 (UC)을 포함하는 염증성 질환 (Giacomelli et al. Clin Exp Immunol. 1998;111:532-5), 및 CD30-양성 혈액 악성종양 (Josimovic-Alasevic et al. (1989) Eur J Immunol)을 갖는 환자의 혈청에서 검출되었다. sCD30은 세포 막-고정된 메탈로프로테이나제, 예컨대 TACE/ADAM17 및 ADAM10에 의한 CD30의 세포외 부분의 절단 산물을 나타낸다 (Nagata et al., PNAS 2005; Hansen et al., FASEB, 2004).

[0003] 정상 조직에서, CD30 발현은 주로 활성화된 T 및 B 림프구의 하위세트에 제한된다 (Bowen et al. (1996) J Immunol. 156:442-9; Shanebeck et al. (1995) Eur J Immunol. 25:2147-53). CD30 발현은 다양한 림프구성 신 생물에서 검출되었다. 고전적 호지킨 림프종 (cHL) 및 역형성 대세포 림프종 (ALCL)은 높은 CD30 발현 수준을 나타낸다. 특히, cHL에서 전형적으로 발견되는 대다수의 리드-스틴버그(Reed-Sternberg) (RS) 세포는 CD30에 대해 양성이다 (Frizzera et al. (1992) Semin. Diagn. Pathol. 9: 291-296).

[0004] 예를 들어, CD30-표적화 항체-약물 접합체 브렌투시맙 베도틴 (BV; SGN-35)은 암, 예컨대 cHL, ALCL 및 CTCL을 치료하는데 사용되었거나 사용하기 위해 제안되었다 (Younes et al. J Clin Oncol. 2012 Jun 20;30(18):2183-9; Pro et al. Blood. 2017 Dec 21;130(25):2709-2717; Shea et al. Curr Hematol Malig Rep. 2020 Feb;15(1):9-19). 4가 이중특이적 CD30xCD16A 항체 AFM13은 cHL 및 CD30-양성 림프종에 대한 NK 세포-매개 면역요법으로서 개발되고 있다 (Rothe et al. Blood. 2015 Jun 25;125(26):4024-31).

[0005] 더욱이, CD30-표적화 CAR-T 세포 요법은 cHL 및 CD30-양성 림프종에 대해 개발되고 있다. 다른 CD30 항체는 W02003059282 (메다렉스(Medarex)), US8257706 (시애틀 제네틱스(Seattle genetics)), US20100239571 (시애틀 제네틱스) W02007040653 (유에스 가버먼트 앤드 헬스(US government & Health)), 및 W020160177846 (아피메드(Affimed))에 기재되었다.

[0006] 문헌 [Pohl et al. (1993 Int. J. Cancer, 54: 820-827)]은 CD30 모노클로날 항체 HRS-3-생산 하이브리도마 세포와 CD3 모노클로날 항체 OKT-3-생산 하이브리도마 세포의 융합 (하이브리드 하이브리도마 기술)에 의해 생성된 CD3xCD30 이중특이적 항체 OKT-3/HRS-3을 기재하고 있다.

[0007] W02008119567은 CD30 및 CD3 교차-종 특이적 이중특이적 단일쇄 분자의 생성 및 특징규명을 기재하고 있다.

[0008] US20200095330은 항-CD3 (오르토클론(Orthoclon) OKT-3)에의 2개의 항-CD30 클론 (명칭 8D10 및 10C2)의 화학적 이중접합으로부터 초래된 CD3xCD30 이중특이적 항체를 기재하고 있다.

[0009] 그러나, 이들 CD3xCD30 이중특이적 항체 중 어느 것도 임상 환경에서 시험되지 않았다.

[0010] 따라서, 개선된 CD30-표적화 암 요법에 대한 필요가 존재한다. 효과적이고/거나, 안전하고/거나, 우수한 제조 가능성을 갖고/거나, 긴 저장 수명을 갖는 CD30 표적화 화합물에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 인간 및 시노물구스 원숭이 CD30 및 CD3에 결합하는 T-세포 결합 항체에 관한 것이다. 본 발명자들은 일부 CD30 결합 항체가 2가 (모노클로날) 포맷에서는 CD30-발현 세포에 잘 결합하지만, 1가 CD30 결합을 갖는 이중특이적 포맷에서는 강하게 감소된 결합 및 세포독성을 나타냄을 발견하였다. 강한 1가 CD30 결합 뿐만 아니라 탁월한 종양 세포 살해를 갖는 이중특이적 항체가 확인되었다. 더욱이, 탁월한 안정성 및 가용성 때문에 제약 생성물로 개발하는데 적합한 기능적으로 불활성인 Fc 백본을 갖는 이중특이적 항체가 확인되었다.

- [0012] 한 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 다중특이적 항체에 관한 것이다:
- [0013] (i) 서열식별번호(SEQ ID NO): 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및
- [0014] (ii) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역.
- [0015] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 코딩하는 핵산 구축물, 또는 핵산 구축물의 조합물에 관한 것이다.
- [0016] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 구축물(들)을 포함하는 발현 벡터 또는 전달 비히클에 관한 것이다.
- [0017] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 생산할 수 있는 재조합 숙주 세포로서, 여기서 숙주 세포는 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 코딩하는 1종 이상의 핵산 구축물을 포함하는 것인 재조합 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0018] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 다중특이적 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 추가의 측면에서, 본 발명은 예를 들어 암의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 다중특이적 항체, 핵산 구축물, 전달 비히클 또는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 또한 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021] **도 1: SU-DHL-1 또는 HDLM-2 세포에의 이중특이적 CD3xCD30 항체 및 그들의 단일특이적, 2가 CD3 및 CD30 대응물의 결합.** SU-DHL-1 세포 (좌측 패널) 또는 HDLM-2 세포 (우측 패널)에의 (A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR, 및 IgG1-CD30-MDX060-FEAR, (B) bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, 및 IgG1-CD30-hAC10-FEAR, (C) bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, 및 IgG1-CD30-HRS-3-FEAR, (D) BsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, 및 IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR, (E) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, 및 IgG1-CD30-T405-FEAR, (F) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, 및 IgG1-CD30-T105-FEAR, (G) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, 및 IgG1-CD30-T408-FEAR, 및 (H) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, 및 IgG1-CD30-HRS-3-FEAR의 용량-의존적 결합. (I) 1.11 μ g/mL의 농도에서 SU-DHL-1 (좌측 패널) 또는 HDLM-2 세포 (우측 패널)에의 CD3xCD30 이중특이적 항체 및 CD30 단일특이적 항체의 결합. CD30 아암에 대해 사용된 항체 클론은 x-축 상에 지시된다. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험에 대한, 유동 세포계측법에 의해 결정된 바와 같은 평균 형광 강도 (MFI) 값이다.

도 2: HL 및 ALCL 세포주에의 bsG1-huCD3xCD30-MDX060의 결합. (A) HDLM-2 (HL), (B) L-428 (HL), (C) DEL (ALCL), 또는 (D) KI-JK (ALCL) 세포에의 bsG1-huCD3xCD30-MDX060의 결합을 유동 세포계측법에 의해 평가하였다. 이중특이적 항체 bsG1-huCD3xb12 및 bsG1-b12xCD30-MDX060 및 단일특이적 항체 IgG1-CD30-MDX060, IgG1-huCD3 및 IgG1-12는 대조군으로서 포함되었다. 모든 항체는 지시된 바와 같이 그들의 Fc 도메인에 FEAL 및/또는 FERR Fc 침묵화 및 듀오바디(DuoBody)® 기술 돌연변이를 함유하였다. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험에 대한, 유동 세포계측법에 의해 결정된 바와 같은 평균 형광 강도 (MFI) 값이다.

도 3: SU-DHL-1 또는 HDLM-2 세포에서의 CD3xCD30 이중특이적 항체에 의한 시험관내에서의 세포독성의 유도. CD3xCD30 이중특이적 항체를 표적 세포로서 CD30-양성 종양 세포주 SU-DHL-1 세포 (좌측 패널) 또는 HDLM-2 세포 (우측 패널) 및 이펙터 세포로서 T 세포 (CD3-양성 ADCC 이펙터 세포 유형 IV 세포; 클린 셀스(Clean Cells), 프랑스 몽테규)를 사용하여 시험관내 세포독성 검정에서 시험하였다. 하기 항체를 시험하였다: (A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR, 및 IgG1-CD30-MDX060-FEAR, (B) bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR 및 IgG1-CD30-hAC10-FEAR, (C) bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR 및 IgG1-CD30-

HRS-3-FEAR, (D) BsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR 및 IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR, (E) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR 및 IgG1-CD30-T405-FEAR, (F) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR 및 IgG1-CD30-T105-FEAR, (G) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR 및 IgG1-CD30-T408-FEAR, 또는 (H) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR 및 IgG1-CD30-HRS-3-FEAR. 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR은 모든 실험에서 대조군으로서 포함되었다. 제시된 데이터는 백분율 생존 세포이며; 각각의 그래프에 대한 데이터는 한 대표적인 실험으로부터 얻어졌다.

도 4: 여러 ALCL 및 HL 세포주에서의 CD3xCD30 이중특이적 항체에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 증식의 유도. (A-C) CD3xCD30 이중특이적 항체를 표적 세포로서 상이한 ALCL 및 HL 세포주 및 이펙터 세포로서 정제된 T 세포 (A, B) 또는 ADCC 이펙터 세포 유형 IV 세포 (C)를 사용하여 시험관내 세포독성 검증에서 시험하였다. CD3xCD30 이중특이적 항체는 CD3에 대한 더 낮은 친화도를 갖는 huCD3-FEAL Fab 아암 또는 huCD3-H101G-FEAL 변이체, 및 CD30-특이적 MDX060-FEAR Fab 아암을 함유하였다. IgG1-huCD3 및 IgG1-b12 (A, B) 또는 bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR 및 IgG1-CD30-MDX060-FEAR (C)은 대조군으로서 포함되었다. 제시된 데이터는 백분율 생존 세포이며; 각각의 그래프에 대한 데이터는 한 대표적인 실험으로부터 얻어졌다. (D) 표적 세포로서 HDLM-2 세포 (좌측 패널) 또는 NCEB-1 세포 (우측 패널)를 사용하여 세포독성 검증에서 CFSE-양성 세포의 수를 절대 T-세포 카운트의 척도로서 평가하였다.

도 5: Expi293F 세포 내로 형질감염된 전장 인간 및 시노물구스 원숭이 CD30에의 CD3xCD30 이중특이적 항체의 결합. (A-C) 야생형 Expi293F 세포 (A) 또는 전장 인간 CD30으로 일시적으로 형질감염된 Expi293F 세포 (B) 또는 시노물구스 원숭이 CD30 (C)에의 1가 및 2가 CD30 항체의 결합. 세포를 증가하는 농도의 하기 항체와 인큐베이션하였다: IgG1-CD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR, 및 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR. 데이터는 2회의 기술적 반복실험의 유동 세포계측법에 의해 결정된 바와 같은 평균 형광 강도 (MFI) 값으로서 제시된다. (D) 인간 T 세포 또는 시노물구스 원숭이 T 세포에의 항체 IgG1-CD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, 및 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR의 결합. 데이터는 한 대표적인 실험의 유동 세포계측법에 의해 결정된 바와 같은 평균 형광 강도 (MFI) 값으로서 제시된다.

도 6: Expi293F 세포 내로 형질감염된 전장 인간 및 레서스 원숭이 CD30에의 CD3xCD30 이중특이적 항체의 결합. 전장 인간 CD30 (좌측 패널) 또는 레서스 원숭이 CD30 (우측 패널)으로 일시적으로 형질감염된 Expi293F 세포에의 1가 및 2가 CD30 항체의 결합을 유동 세포계측법에 의해 평가하였다. 하기 항체를 평가하였다: (A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR 및 IgG1-CD30-hAC10-FEAR, (C) bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR 및 IgG1-CD30-HRS-3-FEAR, (D) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR 및 IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR, (E) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR 및 IgG1-CD30-T405-FEAR, (F) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR 및 IgG1-CD30-T105-FEAR, (G) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR 및 IgG1-CD30-T408-FEAR, 또는 (H) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR 및 IgG1-CD30-HRS-3-FEAR. 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR은 모든 실험에서 음성 대조군으로서 포함되었다. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험에 대한, 유동 세포계측법에 의해 결정된 바와 같은 평균 형광 강도 (MFI) 값이다.

도 7: 시차 주사 형광계측법 (DSF)에 의해 결정된 바와 같은 상이한 비-활성화 돌연변이를 갖는 항체의 열안정성. 증가하는 온도에서의 형태적 단백질 안정성을 DSF에 의해 중복으로 평가하였다. 하기 항체의 용융 곡선이 제시된다: (A) pH 7.4에서의 IgG1-CD30-MDX060-FEAR, (B) pH 7.4에서의 IgG1-CD30-MDX060-FERR, (C) pH 7.4에서의 IgG1-huCD3-FEAL, 및 (D) pH 7.4에서의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR.

도 8: HL 세포주에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합.

HL 세포주 L-540 (A), KM-H2 (B), 및 L-1236 (C)에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합을 유동 세포계측법에 의해 평가하였다. 이중특이적 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR 및 bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 단일특이적 항체 IgG1-CD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL 및 IgG1-12-FEAL은 대조군으로서 포함되었다. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험에 대한, 유동 세포계측법에 의해 결정된 바와 같은 평균 형광 강도 (MFI) 값이다.

도 9: ALCL 세포주에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합.

ALCL 세포주 SUP-M2 (A), DL-40 (B), KARPAS-299 (C), L-82 (D), 및 SR-786 (E)에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합을 유동 세포계측법에 의해 평가하였다. 이중특이적 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR 및

bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 단일특이적 항체 IgG1-CD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL 및 IgG1-12-FEAL은 대조군으로서 포함되었다. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험에 대한, 유동 세포계측법에 의해 결정된 바와 같은 평균 형광 강도 (MFI) 값이다.

도 10: NHL 세포주에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합.

(A) SUP-T1 (TLL), (B) JVM-2 (MCL), (C) HH (CTCL), 및 (D) NCEB-1 (MCL) 세포주에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합을 유동 세포계측법에 의해 평가하였다. 이중특이적 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR 및 bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 단일특이적 항체 IgG1-CD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL 및 IgG1-12-FEAL은 대조군으로서 포함되었다. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험에 대한, 유동 세포계측법에 의해 결정된 바와 같은 평균 형광 강도 (MFI) 값이다.

도 11: HEK293 세포 내로 형질감염된 전장 인간 및 레서스 원숭이 CD30에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합. 전장 인간 CD30 (A) 또는 레서스 원숭이 CD30 (B)으로 일시적으로 형질감염된 HEK293 세포에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합을 유동 세포계측법에 의해 평가하였다. bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR은 음성 대조군으로서 포함되었다. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험에 대한, 유동 세포계측법에 의해 결정된 바와 같은 평균 형광 강도 (MFI) 값이다.

도 12: T 세포 및 종양 세포에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 동시 결합. 형광 표시된 종양 세포 및 나이브 T 세포에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 동시 결합을 유동 세포계측법에 의해 연구하였다.

(A) 이중-양성 사건은 6×10^{-5} 내지 $10 \mu\text{g/mL}$ bsG1huCD3FEALxCD30-MDX060-FERR 또는 대조군 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, bsG1b12FEALxCD30MDX060-FERR, 또는 IgG1-b12-FEAL의 존재 하에서의 총 생존 세포의 백분율로서 제시된다. 항체 없이 인큐베이션된 샘플에서의 이중-양성 사건의 백분율은 점선으로 지시된다. (B) $0.12 \mu\text{g/mL}$ bsG1huCD3FEALxCD30-MDX060-FERR과 인큐베이션된 샘플에서의 이중 양성 세포의 게이팅 전략의 예.

도 13: CD3xCD30 이중특이적 항체에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 활성화의 유도.

CD3xCD30 이중특이적 항체의 패널을 표적 세포로서 CD30-양성 종양 세포주 Karpas-299 및 이펙터 세포로서 건강 한 인간 공여자 연막으로부터 정제된 T 세포를 사용하여 시험관내 세포독성 검정에서 시험하였다. 이들 검정에서, CD25 발현을 T-세포 활성화에 대한 척도로서 CD4^+ 및 CD8^+ 세포에서 평가하였다. 하기 항체를 시험하였다: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, BsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR, 및 bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR. (A) CD3xCD30 항체에 의한 Karpas-299 세포의 세포독성에 대한 IC_{50} 값. (B) 시험 항체에 의한 Karpas-299 세포의 최대 세포독성의 백분율. (C-F) CD3xCD30 항체에 의한 CD4^+ (C, E) 또는 CD8^+ (D, F) T 세포에서의 CD25 (C-D) 또는 PD-1 (E-F) 발현의 유도에 대한 EC_{50} 값. 데이터는 6명의 상이한 공여자로부터 수득된 T 세포로 수행된 2회의 독립적인 실험으로부터 얻어졌다. 통계적 값은 지시된 클론 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 사이의 윌콕슨(Wilcoxon) 매칭된 쌍 부호 순위 검정의 결과를 나타낸다. NS: 유의하지 않음, *: $p < 0.05$.

도 14: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 세포주의 T-세포 매개 세포독성. bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 용량-의존적 T-세포 매개 세포독성을 표적 세포로서 L-428 (A), KM-H2 (B), SUP-M2 (C), 또는 KI-JK (D) 종양 세포주 및 이펙터 세포로서 정제된 T 세포를 사용하여 시험관내에서 시험하였다. IgG1-huCD3-FEAL, bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, 및 IgG1-b12-FEAL은 대조군으로서 포함되었다. 제시된 데이터는 백분율 생존 세포이며, 각각의 그래프에 대한 데이터는 한 대표적인 실험에 대해 얻어졌다.

도 15: L-428 및 KI-JK 세포주에서의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 증식. T-세포 증식을 표적 세포로서 L-428 (A, B) 또는 KI-JK (C, D)를 사용하여 T-세포 매개 세포독성 검정에서 평가하였다. 희석된 셀트레이스 바이올렛(Celltrace Violet) 염색을 갖는 CD4^+ (A, C) 또는 CD8^+ (B, D) T 세포를 게이팅하고, T-세포 증식에 대한 척도로서 확장 지수를 플로우조(FlowJo)로부터의 증식 모델링 도구를 사용하여 계산하였다.

도 16: L-428 및 KI-JK 세포주에서의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 활성화 마커 CD69의 발현. T-세포 활성화를 표적 세포로서 L-428 (A, B) 또는 KI-JK (C, D)를 사용하여 T-세포 매개

세포독성 검정에서 평가하였다. T-세포 활성화 마커 CD69의 발현을 $CD4^+$ (A, C) 또는 $CD8^+$ (B, D) T 세포에서 평가하였다.

도 17: L-428 및 KI-JK 세포주에서의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 활성화 마커 CD25의 발현. T-세포 활성화를 표적 세포로서 L-428 (A, B) 또는 KI-JK (C, D)를 사용하여 T-세포 매개 세포독성 검정에서 평가하였다. T-세포 활성화 마커 CD25의 발현을 $CD4^+$ (A, C) 또는 $CD8^+$ (B, D) T 세포에서 평가하였다.

도 18: L-428 및 KI-JK 세포주에서의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 활성화 마커 PD-1의 발현. T-세포 활성화를 표적 세포로서 L-428 (A, B) 또는 KI-JK (C, D)를 사용하여 T-세포 매개 세포독성 검정에서 평가하였다. T-세포 활성화 마커 PD-1의 발현을 $CD4^+$ (A, C) 또는 $CD8^+$ (B, D) T 세포에서 평가하였다.

도 19: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 시토카인 및 그랜자임 B 생산. 14가지 상이한 시토카인 (CD40, IFN γ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, PDL-1, TNF α) 및 그랜자임 B의 농도를 표적 세포로서 L-428을 사용하여 시험관내 T 세포-매개 세포독성 실험 동안 수집된 상청액에서 평가하였다. 시토카인 및 그랜자임 B 농도는 상이한 농도의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 또는 대조군 항체 IgG1-b12-FEAL로 처리된 샘플에 대해 제시된다.

도 20: 다양한 이펙터 대 표적 비에서의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 증식. (A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 용량-의존적 T-세포 매개 세포독성을 1:1, 2:1, 4:1 또는 8:1의 E:T 비에서 표적 세포로서 L-428 종양 세포 및 이펙터 세포로서 정제된 T 세포를 사용하여 시험관내에서 시험하였다. bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR은 대조군 항체로서 포함되었다. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험으로부터 얻어진 백분율 생존 세포이다. (B, C) 희석된 셀트레이스 바이올렛 염색을 갖는 $CD4^+$ (B) 또는 $CD8^+$ (C) T 세포의 백분율은 증식하는 T 세포의 척도로서 제시된다.

도 21: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 증식의 동역학. (A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 T-세포 매개 세포독성의 동역학을 4:1의 E:T 비에서 표적 세포로서 L-428 종양 세포 및 이펙터 세포로서 정제된 T 세포를 사용하여 시험관내에서 시험하였다. 세포독성을 24시간, 48시간, 및 72시간 후에 평가하였다. bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR은 대조군 항체로서 포함되었다. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험으로부터 얻어진 백분율 생존 세포이다. (B, C) 희석된 셀트레이스 바이올렛 염색을 갖는 $CD4^+$ (B) 또는 $CD8^+$ (C) T 세포를 게이팅하고, 세포독성 검정에서 T-세포 증식에 대한 척도로서 확장 지수를 플로우조로부터의 증식 모델링 도구를 사용하여 계산하였다.

도 22: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성 및 CD30 발현 수준과의 상관관계. CD30 발현 수준 대비 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 최대 T-세포 매개 살해 (A) 또는 T-세포 매개 세포독성의 IC₅₀ 농도 (B) 사이의 상관관계를 8가지 종양 세포주에서 평가하였다. 스피어만 (Spearman) 순위 상관관계 검정 (그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어)을 사용하여 T-세포 매개 세포독성 (최대 살해 또는 IC₅₀) 및 CD30 발현 사이의 상관관계의 정도의 통계적 유의성을 평가하였다.

도 23: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 활성화된 T 세포의 동족살해. 단리된 건강한 공여자 T 세포를 1 μ g/mL 항-CD3 (OKT-3), 1 μ g/mL 항-CD28 및 0.025 μ g/mL IL-15로 4일 동안 자극하였다. 활성화 (CD25 상향조절)를 확인하고, T 세포를 증가하는 농도의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsIgG1-ctrlxCD30-MDX060-FERR, bsIgG1-CD3xb12, 또는 IgG1-b12-FEAL과 48시간 동안 인큐베이션하였다. 활성화된-CD30⁺ T-세포의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-유도된 T-세포 동족살해를 임의의 항체를 첨가하지 않은 조건에서의 생존 T 세포의 수에 비한 각각의 조건에서의 생존 T 세포의 백분율로서 측정하였다. (A-B) 항-CD3, 항-CD28 및 IL-15로의 자극 후 72시간 및 96시간에, $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T-세포에서의 CD25⁺ (A) 또는 CD30⁺ (B) 세포의 백분율을 유동 세포계측법에 의해 결정하였다. (C) T-세포 동족살해를 임의의 항체를 첨가하지 않은 조건에 비한 백분율 T-세포 생존으로서 제시하였다. 데이터는 한 대표적인 T-세포 공여자에 대해 제시된다.

도 24: CD30⁺ 세포 배양물의 상청액에서의 가용성 CD30 및 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 항-종양 활성과 그의 간섭. (A) ELISA에 의해 측정된 바와 같은 상이한 혈액 종양 세포주의 상청액 중의 가용성 CD30

(sCD30) 농도가 제시된다. (B) 상이한 혈액 종양 세포주에서의, 정량적 유동 세포계측법 (인간 IgG 교정 키트-바이오사이텍스(Biocyte))을 사용하여 결정된 바와 같은, sCD30 농도 및 세포 표면 상의 CD30 분자의 수 사이의 상관관계를 스피어만 순위 상관관계 검정 (그래프패드 프리즘 소프트웨어)에 의해 평가하였다. (C) BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR을 표적 세포로서 CD30-양성 ALCL 종양 세포주 DEL 및 이펙터 세포로서 건강한 공여자 단리된 T 세포를 사용하여 시험관내 세포독성 검정에서 시험하였다. 하기 대조군 항체가 포함되었다: BsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, BsG1-huCD3-FEALxb12-FERR, IgG1-huCD30-FEAL 및 IgG1-b12-FEAL. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험으로부터 얻어진 백분을 생존 세포이다.

도 25. L-428 종양 세포에서의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 생체외에서의 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 증식의 유도. (A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR을 표적 세포로서 L-428 종양 세포 및 이펙터 세포로서 1차 환자-유래 T 세포를 사용하여 생체의 세포독성 검정에서 시험하였다. 호지킨 림프종 (HL), 급성 골수성 백혈병 (AML) 및 말초 T-세포 림프종 (PTCL) 환자-유래 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 T 세포의 공급원으로서 사용하여 CD3-의존적 종양 세포 살해를 평가하였다. IgG1-b12-FEAL은 대조군으로서 포함되었다. 제시된 데이터는 백분을 생존 표적 세포이다. (B-D) T-세포 활성화를 백분율 양성 세포로서 지시된, PBMC 하위세트 내의 CD4⁺/CD8⁺ T 세포 상의 CD69 (B), CD25 (C) 및 PD-1 (D) 마커의 상향조절에 의해 평가하였다.

도 26. SCID 마우스에서의 정맥내 주사 후의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 혈장 농도. SCID 마우스를 10 µg (0.5 mg/kg) 또는 100 µg (5 mg/kg)의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 단일 IV 용량으로 주사하였다. (A) 총 인간 IgG를 ELISA에 의해 결정하고, 평균 인간 IgG1 농도를 시간 경과에 따라 플롯팅하였다. (B) 평균 클리어런스율을 0.5 또는 5 mg/kg 용량 수준에 대해 플롯팅하였다. 점선은 마우스에서의 비-결합 보통의 인간 IgG1의 표준 분포 부피에 기반한 추정된 클리어런스율을 지시한다.

도 27: 막-결합된 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에의 C1q 결합. bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-옴소닌화된, 활성화된 인간 CD8⁺ T 세포, 또는 CD30⁺ NCEB-1 세포에의 C1q의 결합을 FITC 표지된 토끼 항-C1q 항체를 사용하여 유동 세포계측법에 의해 평가하였다. (A) C1q의 공급원으로서 정상 인간 혈청의 존재 하에서 항-CD3/CD28 비드로 자극된 인간 CD8⁺ T 세포에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL 또는 양성 대조군 항체 IgG1-CD52-E430G의 결합. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험으로부터의 반복실험 웰로부터의 기하 평균 형광 강도 (gMFI) ± SD이다. (B) C1q의 공급원으로서 정상 인간 혈청의 존재 하에서의, CD30⁺ NCEB-1 세포에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR 또는 양성 대조군 항체 IgG1-7D8-E430G의 결합. 제시된 데이터는 한 대표적인 실험으로부터의 gMFI이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 정의

[0023] 본원에 사용된 용어 "항체"는 유의한 기간, 예컨대 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 적어도 약 24시간 이상, 적어도 약 48시간 이상, 적어도 약 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과 등의 반감기, 또는 임의의 다른 관련된 기능적으로-정의된 기간 (예컨대 항원에의 항체 결합과 연관된 생리학적 반응을 유도하고/거나, 촉진시키고/거나, 증진시키고/거나, 조정하는데 충분한 시간 및/또는 항체가 내재화되는데 충분한 시간)을 갖는 전형적인 생리학적 및/또는 종양-특이적 조건 하에서 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 이뮤노글로불린 분자, 이뮤노글로불린 분자의 단편, 또는 이 중 어느 하나의 유도체를 지칭하는 것으로 의도된다. 항체는 항원과 상호작용할 수 있는 결합 영역 (또는 본원에 사용될 수 있는 결합 도메인, 둘 다는 동일한 의미를 가짐)을 포함하며, 결합 영역은 이뮤노글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 영역 등을 포함한다. 항체는 면역계의 다양한 세포 (예컨대 이펙터 세포) 및 보체계의 성분, 예컨대 보체 활성화의 고전적 경로에서의 제1 성분인 C1q를 포함하는, 숙주 조직 또는 인자에의 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있는 항체 (Ab)의 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 맥락에서, 용어 "항체"는 모노클로날 항체 (mAb), 항체-유사 폴리펩티드, 키메라 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 뿐만 아니라 임의의 공지된 기술, 예컨대 효소적 절단, 펩티드 합성, 및 재조합 DNA 기술에 의해 제공된 항원 (항원-결합 단편)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 '항체 단편' 또는 '그의 단편'을 포함한다. 용어 "항체"는 추가의 변형을 갖는 이중, 삼중, 또는 다중특이적 항체 및/또는 항체, 예를 들어, 항체-약물 접합체 및/또는 IgG Fc 도메인에 변형을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명에 따라 정의된 바와 같은 항체는, 본원의 개시내용이 달리 제한되지 않는 한, 임의의 이소타입을 가질 수 있거나, 이소타입을 갖지 않을 수 있다.

(예를 들어, scFv 항체).

[0025] 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 제시되었다. 용어 "항체" 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) Fab' 또는 Fab 단편, 즉, 경쇄 가변 도메인 (VL), 중쇄 가변 도메인 (VH), 경쇄 불변 영역 (CL) 및 중쇄 불변 영역 도메인 1 (CH1) 도메인으로 이루어진 1가 단편, 또는 WO 2007/059782에 기재된 바와 같은 1가 항체; (ii) F(ab')₂ 단편, 즉, 힌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 본질적으로 이루어지고 또한 도메인 항체 [Holt et al.; Trends Biotechnol., 2003 Nov;21(11):484-90]로 지칭되는 dAb 단편 [Ward et al., Nature 341, 544546 (1989)]; (vi) 카멜리드 또는 나노바디 [Reverts et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24] 및 (vii) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 2개의 도메인, 즉, VL 및 VH는 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 이들이 VL 및 VH 영역이 쌍형성하여 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇠로서 만들어지는 것을 가능하게 하는 합성 링커에 의해, 재조합 방법을 사용하여 연결될 수 있다 (단일 쇠 항체 또는 단일 쇠 Fv (scFv)로 공지됨, 예를 들어 문헌 [Reverts et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24] 및 [Bird et al., Science 242, 423426 (1988)] 참조. 이러한 단일 쇠 항체는 달리 언급되거나 맥락에 의해 명백하게 지시되지 않는 한, 용어 항체 내에 포함된다. 이러한 단편은 일반적으로 항체의 의미 내에 포함되지만, 이들은 집합적으로 및 각각 독립적으로 상이한 생물학적 특성 및 유용성을 나타내는 본 발명의 고유한 특색이다. 본 발명의 맥락에서 이들 및 다른 유용한 항체 단편은 본원에서 추가로 논의된다.

[0026] 제어된 Fab-아암 교환 (cFEA)을 통해 예를 들어, 이중특이적 항체를 생성하는 최종 산물로서의 또는 중간체로서의 항체는 상이한 시험관내 또는 생체의 발현 또는 생산 시스템에서 생산되고, 그로부터, 예를 들어 재조합적으로 변형된 숙주 세포로부터, 항체를 코딩하는 핵산 서열의 시험관내 전사 및/또는 번역을 지지하는 세포성 추출물을 사용하는 하이브리도마 또는 시스템으로부터 수집될 수 있다.

[0027] 본원에 사용된 용어 "이뮤노글로불린 중쇄" 또는 "이뮤노글로불린의 중쇄"는 이뮤노글로불린의 중쇄 중 하나를 지칭하는 것으로 의도된다. 중쇄는 전형적으로 이뮤노글로불린의 이소타입을 정의하는 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역 (본원에서 CH로 약칭됨)으로 구성된다. IgG의 중쇄 불변 영역은 전형적으로 3개의 도메인, 즉, CH1, CH2, 및 CH3으로 구성된다. 본원에 사용된 용어 "이뮤노글로불린"은 폴리펩티드 쇠의 2개의 쌍, 즉, 경 (L) 저분자량 쇠의 한 쌍 및 중 (H) 쇠의 한 쌍 (모든 4개는 잠재적으로 디설파이드 결합에 의해 상호-연결됨)으로 전형적으로 이루어진 구조적으로 관련된 당단백질의 부류를 지칭하는 것으로 의도된다. 이뮤노글로불린의 구조는 널리 특징규명되었다 (예를 들어 문헌 [Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)] 참조). 이뮤노글로불린의 구조 내에서, 2개의 중쇄는 소위 "힌지 영역"에서 디설파이드 결합을 통해 상호-연결된다. 중쇄와 동등하게, 각각의 경쇄는 전형적으로 여러 영역으로 구성된다; 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역. 경쇄 불변 영역은 전형적으로 1개의 도메인, 즉, CL로 구성된다. 더욱이, VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 용어화되는 보다 보존된 영역 사이에 배치된, 또한 상보성 결정 영역 (CDR)으로 용어화되는 초가변성의 영역 (또는 구조적으로 한정된 루프의 서열 및/또는 형태에 있어서 초가변성일 수 있는 초가변 영역)으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 전형적으로 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0028] 본원에 사용되는 경우, 용어 "절반 분자", "Fab-아암" 및 "아암"은 하나의 중쇄-경쇄 쌍을 지칭한다. 이중특이적 항체가 제1 항체"로부터 유래된" 절반-분자 항체, 및 제2 항체"로부터 유래된" 절반-분자 항체를 포함하는 것으로 기재되는 경우, 용어 "로부터 유래된"은 이중특이적 항체가 임의의 공지된 방법에 의해, 상기 제1 및 제2 항체의 각각으로부터의 상기 절반-분자를 생성된 이중특이적 항체로 재조합함으로써 생성되었음을 지시한다. 이 맥락에서, "재조합하는"은 재조합의 임의의 특정한 방법에 의해 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 따라서 예를 들어 절반-분자 교환에 의한 재조합, 뿐만 아니라 핵산 수준에서 및/또는 동일한 세포에서의 2개의 절반-분자의 공동-발현을 통한 재조합을 포함하는, 본원에 기재된 이중특이적 항체를 생산하는 모든 방법을 포함한다.

[0029] 항체 또는 그의 도메인 또는 영역의 맥락에서 사용되는 경우 용어 "제1" 및 "제2"는 단지 참조의 용이성을 위해 의도되며, 특정한 상대적 위치 등을 지시하는 것으로 의도되지 않는다.

[0030] 본원에 사용된 용어 "항원-결합 영역" 또는 "결합 영역"은 항원에 결합할 수 있는 항체의 영역을 지칭한다. 항원은 임의의 분자, 예컨대 폴리펩티드, 단백질, 폴리사카라이드 또는 이들의 조합일 수 있다. 항원은 예를 들

어 세포, 박테리아, 또는 비리온 상에 제시될 수 있다. 용어 "항원" 및 "표적"은, 맥락에 의해 모순되지 않는 한, 본 발명의 맥락에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 용어 "항원-결합 영역" 및 "항원-결합 부위"는, 맥락에 의해 모순되지 않는 한, 본 발명의 맥락에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0031] 본원에 사용된 용어 " K_D " (M)는 특정한 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수를 지칭하며, k_d 를 k_a 로 나눔으로써 얻어진다. K_D 는 또한 "결합 친화도"로 지칭될 수 있다.

[0032] 본원에 사용된 용어 " k_d " (sec^{-1})는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리 속도 상수를 지칭한다. 상기 값은 또한 k_{off} 값 또는 오프-레이트로 지칭된다.

[0033] 본원에 사용된 용어 " k_a " ($\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$)는 특정한 항체-항원 상호작용의 회합 속도 상수를 지칭한다. 상기 값은 또한 k_{on} 값 또는 온-레이트로 지칭된다.

[0034] 본원에 사용된 용어 "결합"은 항체를 리간드로서 및 항원을 분석물로서 사용하여 생물층 간섭측정법에 의해 결정되는 경우, 전형적으로 1E^{-6} M 이하, 예를 들어 5E^{-7} M 이하, 1E^{-7} M 이하, 예컨대 5E^{-8} M 이하, 예컨대 1E^{-8} M 이하, 예컨대 5E^{-9} M 이하, 또는 예컨대 1E^{-9} M 이하, 예컨대 1E^{-10} M 이하 또는 예컨대 1E^{-11} M 이하의 K_D 에 상응하는 결합 친화도로, 미리 결정된 항원 또는 표적에의 항체의 결합을 지칭하며, 미리 결정된 항원 또는 가깝게-관련된 항원 이외의 비-특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카세인)에의 결합에 대한 그의 친화도보다 적어도 10배 더 낮은, 예컨대 적어도 100배 더 낮은, 예를 들어 적어도 1,000배 더 낮은, 예컨대 적어도 10,000배 더 낮은, 예를 들어 적어도 100,000배 더 낮은 K_D 에 상응하는 친화도로 미리 결정된 항원에 결합한다.

[0035] 본원에 사용된 용어 "CD30"은 인간 분화의 클러스터 30 단백질, 일명 TNFRSF8 (종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 8)을 지칭한다. CD30은 다양한 종에서 발견되며, 따라서, 용어 "CD30"은 맥락에 의해 모순되지 않는 한, 인간 CD30에 제한되지 않을 수 있다. 인간 CD30의 서열은 서열식별번호: 39에 제시된다.

[0036] 본원에 사용된 용어 "CD3"은 T-세포 공동-수용체 단백질 복합체의 일부이고 4개의 별개의 쇠로 구성된 인간 분화의 클러스터 3 단백질을 지칭한다. CD3은 다양한 종에서 발견되며, 따라서, 용어 "CD3"은 맥락에 의해 모순되지 않는 한, 인간 CD3에 제한되지 않을 수 있다. 포유동물에서, 복합체는 CD3 γ (감마) 쇠 (인간 CD3 γ 쇠 유니프룻(UniProt)KB/스위스-프룻(Swiss-Prot) 번호 P09693, 또는 시노물구스 원숭이 CD3 γ 유니프룻KB/스위스-프룻 번호 Q95LI7), CD3 δ (델타) 쇠 (인간 CD3 δ 유니프룻KB/스위스-프룻 번호 P04234, 또는 시노물구스 원숭이 CD3 δ 유니프룻KB/스위스-프룻 번호 Q95LI8), 2개의 CD3 ϵ (엡실론) 쇠 (인간 CD3 ϵ : 유니프룻KB/스위스-프룻 번호 P07766 (본원에서 그의 서열은 서열식별번호: 42로서 포함됨); 시노물구스 원숭이 CD3 ϵ 유니프룻KB/스위스-프룻 번호 Q95LI5; 또는 레서스 원숭이 CD3 ϵ 유니프룻KB/스위스-프룻 번호 G7NCB9), 및 CD3 ζ -쇠 (제타) 쇠 (인간 CD3 ζ 유니프룻KB/스위스-프룻 번호 P20963, 시노물구스 원숭이 CD3 ζ 유니프룻KB/스위스-프룻 번호 Q09TK0)를 함유한다. 이들 쇠는 T 세포 수용체 (TCR)로 공지된 분자와 회합하며, T 림프구에서 활성화 신호를 생성한다. TCR 및 CD3 분자는 함께 TCR 복합체를 포함한다.

[0037] 용어 "항체 결합 영역"은 항체가 결합하는 에피토프를 포함하는 항원의 영역을 지칭한다. 항체 결합 영역은 생물층 간섭측정법을 사용한 에피토프 비닝에 의해, 알라닌 스캔에 의해, 또는 도메인 셔플 검정에 의해 (항원의 영역이 또 다른 종의 그것으로 교환된 항원 구축물을 사용하고, 항체가 여전히 항원에 결합하는지 그렇지 않은지 여부를 결정하여) 결정될 수 있다. 항체와의 상호작용에 관여하는 항체 결합 영역 내의 아미노산은 수소/중수소 교환 질량 분광법에 의해 및/또는 그의 항원에 결합된 항체의 결정학에 의해 결정될 수 있다.

[0038] 용어 "에피토프"는 항체에 의해 특이적으로 결합되는 항원 결정자를 의미한다. 에피토프는 통상적으로 분자, 예컨대 아미노산, 당 측쇄 또는 이들의 조합의 표면 그룹핑으로 이루어지며, 통상적으로 특이적 3차원 구조적 특징, 뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 갖는다. 형태적 및 비-형태적 에피토프는 전자에의 결합은 변성 용매 또는 단백질 또는 그의 다량체의 3차원 구조를 파괴하는 다른 작용제의 존재 하에서 소실되지만, 후자는 그렇지 않다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접적으로 관여하는 아미노산 잔기, 및 결합에 직접적으로 관여하지 않는 다른 아미노산 잔기, 예컨대 그것이 항원에 결합되는 경우 항체에 의해 효과적으로 차단되거나 커버되는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0039] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체", "모노클로날 Ab", "모노클로날 항체 조성물", "mAb" 등은 단일 분자 조

성물의 항체 분자의 제제를 지칭하며, 전형적으로 특정한 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 모노클로날 항체는 전형적으로 고유한 모 세포의 모든 클론인 동일한 세포, 예컨대 예를 들어 하이브리도마, 안정한 세포주 등에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 지칭한다. 인간 모노클로날 항체는 불멸화 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스젠 및 경쇄 트랜스젠을 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 또는 트랜스-크로모조말 비인간 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산될 수 있다. 인간 모노클로날 항체는 인간 B 세포 또는 형질 세포로부터 유래될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 재조합적으로 변형된 숙주 세포, 또는 항체를 코딩하는 핵산 서열의 시험관내 전사 및/또는 번역을 지지하는 세포성 추출물을 사용하는 시스템으로부터 생산될 수 있다.

[0040] 본원에 사용된 용어 "이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 이뮤노글로불린 부류 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 또는 IgM) 또는 그의 임의의 알로타입, 예컨대 IgG1m(za) 및 IgG1m(f)를 지칭한다. 추가로, 각각의 중쇄 이소타입은 카파 (κ) 또는 람다 (λ) 경쇄 중 어느 하나와 조합될 수 있다.

[0041] 본원에 사용되는 경우 용어 "전장 항체"는 중쇄 및 경쇄의 한 쌍 또는 중쇄 및 경쇄의 2개의 쌍을 포함하는 항체 (예를 들어, 모 또는 변이체 항체)를 지칭하며, 각각의 쌍은 예컨대 그 이소타입의 야생형 항체의 중쇄-경쇄 쌍에서 통상적으로 발견되는 중쇄 및 경쇄 불변 및 가변 도메인을 함유한다. 따라서, 예를 들어, 전장 IgG1 항체는 VH, CH1, CH2, CH3, 힌지, VL 및 CL 도메인을 함유한다. 전장 변이체 항체에서, 중쇄 및 경쇄 불변 및 가변 도메인은 특히 전장 모 또는 야생형 항체와 비교할 경우 항체의 기능적 특성을 변형시키고/거나 개선시키는 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 전장 항체는 (i) CDR 서열을 완전한 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 1종 이상의 적합한 벡터 내로 클로닝하는 단계, 및 (ii) 중쇄 및 경쇄 서열을 갖는 수득된 적합한 벡터를 적합한 발현 시스템에서 발현하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산될 수 있다. CDR 서열 또는 전체 가변 영역 서열 중 어느 하나로부터 시작하는 경우 전장 항체를 생산하는 것은 통상의 기술자의 지식 내에 있다. 따라서, 통상의 기술자는 본 발명에 따른 전장 항체를 생성하는 방법을 알고 있다.

[0042] 본원에 사용된 용어 "인간화 항체"는 인간 항체 불변 도메인, 및 인간 가변 도메인과 높은 수준의 서열 상동성을 함유하도록 변형된 비-인간 가변 도메인을 함유하는 유전자 조작된 비-인간 항체를 지칭한다. 이는 상동 인간 수용자 프레임워크 영역 (FR) 상으로의, 함께 항원 결합 부위를 형성하는 비-인간 항체 상보성-결정 영역 (CDR)의 그래프팅에 의해 달성될 수 있다 (그 중에서도 W092/22653 및 EP0629240 참조). 모 항체의 결합 친화도 및 특이성을 완전히 재구성하기 위해, 인간 프레임워크 잔기의 일부의 모 항체 (즉, 비-인간 항체)로부터의 프레임워크 잔기의 일부로의 치환 (역-돌연변이)이 요구될 수 있다. 구조적 상동성 모델링은 항체의 결합 특성에 중요한 프레임워크 영역에서의 아미노산 잔기를 확인하는 것을 도울 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 비-인간 CDR 서열, 주로 임의로 비-인간 아미노산 서열에 대한 1개 이상의 아미노산 역-돌연변이를 포함하는 인간 프레임워크 영역, 및 완전히 인간 불변 영역을 포함할 수 있다. 임의로, 반드시 역-돌연변이는 아닌 추가의 아미노산 변형이 적용되어 예를 들어 탈아미드화를 회피하고/거나, 제조를 개선시키는 변형을 포함하도록, 바람직한 특징, 예컨대 특정한 유용한 친화도 및 생화학적 특성을 갖는 인간화 항체를 수득할 수 있다. 더욱이, CDR 및/또는 프레임워크 영역은 예를 들어 친화성 성숙 절차를 통해, 항원에 대한 친화도를 개선시키도록 변형될 수 있다.

[0043] 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 중, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상으로 그래프팅된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다. 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 통상적인 모노클로날 항체 방법론, 예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975)]의 표준 체세포 혼성화 기술을 포함하는 다양한 기술에 의해 생산될 수 있다. 체세포 혼성화 절차가 원칙적으로 바람직하지만, 모노클로날 항체를 생산하기 위한 다른 기술, 예를 들어, B-림프구의 바이러스 또는 종양유전자 형질전환, 또는 인간 항체 유전자의 라이브러리를 사용한 파지 제시 기술도 이용될 수 있다. 인간 모노클로날 항체는 마우스 시스템이라기 보다는 인간 면역계의 부분을 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모조말 마우스, 예컨대 HCo12 마우스 (예를 들어 W0 03/059282 참조) 등을 사용하여 생성될 수 있다.

[0044] 본원에 사용된 용어 "Fc 영역"은 항체의 2개의 중쇄 폴리펩티드의 N-에서 C-말단으로의 방향으로, 적어도 힌지

영역, CH2 영역 및 CH3 영역을 포함하는 영역을 지칭한다. Fc 폴리펩티드는 전형적으로 글리코실화된다. 항체의 Fc 영역은 면역계의 다양한 세포 (예컨대 이펙터 세포) 및 보체계의 성분을 포함하는, 숙주 조직 또는 인자에의 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. Fc 영역은 전형적으로 또한 FcRn 및 단백질 A에 결합한다.

[0045] 본원에 사용된 어구 "위치...에서의 아미노산에 상응하는 아미노산" 등은 인간 IgG1 중쇄에서의 아미노산 위치 번호를 지칭한다. 다른 이뮤노글로불린에서의 상응하는 아미노산 위치는 인간 IgG1과의 정렬에 의해 발견될 수 있다. 달리 언급되거나 맥락에 의해 모순되지 않는 한, 불변 영역 서열의 아미노산은 본원에서 넘버링의 EU-지수에 따라 넘버링된다 (문헌 [Kabat, E.A. et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662, 680, 689]에 기재됨). 따라서, 또 다른 서열에서의 아미노산 또는 절편"에 상응하는" 한 서열에서의 아미노산 또는 절편은 전형적으로 디폴트 설정에서의 표준 서열 정렬 프로그램, 예컨대 ALIGN, 클러스탈(Clustal)W 또는 유사한 것을 사용하여 다른 아미노산 또는 절편과 정렬되고, 인간 IgG1 중쇄와 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 것이다. 서열 또는 서열 내의 절편을 정렬하는 방법 및 이로써 본 발명에 따른 아미노산 위치에 대한 서열 내의 상응하는 위치를 결정하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지된 것으로 간주된다.

[0046] 본원에 사용된 용어 "힌지 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 힌지 영역을 지칭한다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 힌지 영역은 문헌 [Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991)]에 제시된 바와 같은 Eu 넘버링에 따른 아미노산 216-230에 상응한다. 그러나, 힌지 영역은 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 다른 하위유형일 수 있다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "CH1 영역" 또는 "CH1 도메인"은 이뮤노글로불린 중쇄의 CH1 영역을 지칭한다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH1 영역은 카바트 (동일 문헌)에 제시된 바와 같은 Eu 넘버링에 따른 아미노산 118-215에 상응한다. 그러나, CH1 영역은 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 다른 하위유형일 수 있다.

[0048] 본원에 사용된 용어 "CH2 영역" 또는 "CH2 도메인"은 이뮤노글로불린 중쇄의 CH2 영역을 지칭한다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH2 영역은 카바트 (동일 문헌)에 제시된 바와 같은 Eu 넘버링에 따른 아미노산 231-340에 상응한다. 그러나, CH2 영역은 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 다른 하위유형일 수 있다.

[0049] 본원에 사용된 용어 "CH3 영역" 또는 "CH3 도메인"은 이뮤노글로불린 중쇄의 CH3 영역을 지칭한다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH3 영역은 카바트 (동일 문헌)에 제시된 바와 같은 Eu 넘버링에 따른 아미노산 341-447에 상응한다. 그러나, CH3 영역은 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 다른 하위유형일 수 있다.

[0050] 본원에 사용된 용어 "Fc-매개 이펙터 기능"은 폴리펩티드 또는 항체를 세포막 상의 그의 표적 또는 항원에 결합시키는 결과인 기능을 지칭하는 것으로 의도되며, 여기서 Fc-매개 이펙터 기능은 폴리펩티드 또는 항체의 Fc 영역에 기인한다. Fc-매개 이펙터 기능의 예는 (i) C1q 결합, (ii) 보체 활성화, (iii) 보체-의존성 세포독성 (CDC), (iv) 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), (v) Fc-감마 수용체 (FcγR)-결합, (vi) 항체-의존성, FcγR-매개 항원 가교, (vii) 항체-의존성 세포성 포식작용 (ADCP), (viii) 보체-의존성 세포성 세포독성 (CDCC), (ix) 보체-증진된 세포독성, (x) 항체에 의해 매개된 옵소닌화 항체의 보체 수용체에의 결합, (xi) 옵소닌화, 및 (xii) 임의의 (i) 내지 (xi)의 조합을 포함한다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "불활성화", "불활성" 또는 "비-활성화"는 임의의 FcγR에 결합하고, FcγR의 Fc-매개의 가교를 유도하고, FcγR-매개 이펙터 기능, 예컨대 ADCC 및 ADCP를 유도하고, 개별적인 항체의 2개의 Fc 영역을 통한 표적 항원의 FcγR-매개 가교를 유도할 수 없거나 또는 그러한 최소 능력을 갖는, 및/또는 C1q에 결합하고, 보체-매개 이펙터 기능, 예컨대 CDC 및 CDCC를 유도할 수 없는 Fc 영역을 지칭한다. 항체의 Fc 영역의 불활성화는 단일특이적 또는 이중특이적 포맷의 항체를 사용하여 시험될 수 있다.

[0052] 본 발명의 맥락에서 용어 "1가 항체"는 단지 1개의 항원-결합 도메인 (예를 들어 1개의 Fab 아암)을 갖는, 항원과 상호작용할 수 있는 항체 분자를 지칭한다. 다중특이적, 예컨대 이중특이적 항체의 맥락에서, "1가 항체 결합"은 단지 1개의 항원-결합 도메인 (예를 들어 1개의 Fab 아암)을 갖는 1개의 항원에의 다중특이적 항체의 결합을 지칭한다.

[0053] 본 발명의 맥락에서 용어 "단일특이적 항체"는 단지 1개의 항원, 1개의 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체를 지칭한다. 항체는 단일특이적, 1가 항체 (즉, 단지 1개의 항원-결합 영역을 운반함), 단일특이적, 2가 항체 (예를 들어 2개의 동일한 항원-결합 영역을 갖는 항체) 또는 단일특이적, 다가 항체 (예를 들어 2개 초과

동일한 항원-결합 영역을 갖는 항체)일 수 있다.

[0054] 용어 "다중특이적 항체"는 2개 이상의 상이한 에피토프에 결합하는 2개 이상의 항원-결합 도메인을 갖는 항체를 지칭한다. 용어 "이중특이적 항체"는 상이한 에피토프에 결합하는 2개의 항원-결합 도메인, 예를 들어 VH 및 VL 영역의 2개의 비-동일한 쌍, 2개의 비-동일한 Fab-아암 또는 비-동일한 CDR 영역을 갖는 2개의 Fab-아암을 갖는 항체를 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 이중특이적 및 다중특이적 항체는 각각 2개 이상의 상이한 에피토프에 대한 특이성을 갖는다. 이러한 에피토프는 동일한 또는 상이한 항원 또는 표적 상에 있을 수 있다. 에피토프가 상이한 항원 상에 있는 경우, 이러한 항원은 동일한 세포 또는 상이한 세포, 세포 유형 또는 구조, 예컨대 세포외 매트릭스 또는 베지클 및 가용성 단백질 상에 있을 수 있다. 따라서 다중특이적 및 이중특이적 항체는 다수의 항원, 예를 들어 2개의 상이한 세포를 가교할 수 있다.

[0055] 용어 "2가 항체"는 2개의 항원-결합 영역을 갖는 항체를 지칭하며, 여기서 상기 항원-결합 영역은 동일하고, 동일한 에피토프에 결합할 수 있거나, 또는 이들은 비-동일하고, 동일한 또는 상이한 항원(들) 상에 있을 수 있는 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 따라서, 2가 항체는 단일특이적 항체 또는 이중특이적 항체일 수 있다.

[0056] 용어 "아미노산" 및 "아미노산 잔기"는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있으며, 제한적인 것으로 이해되지 않아야 한다. 아미노산은 각각의 아미노산에 특이적인 측쇄 (R 기)와 함께, 아민 (-NH₂) 및 카르복실 (-COOH) 관능기를 함유하는 유기 화합물이다. 본 발명의 맥락에서, 아미노산은 구조 및 화학적 특징에 기반하여 분류될 수 있다. 따라서, 아미노산의 부류는 하기 표 중 하나 또는 둘 다에 반영될 수 있다:

[0057] 표 1

[0058] R 기의 구조 및 일반적 화학적 특징규명에 기반한 주요 분류

부류	아미노산
산성 잔기	D 및 E
염기성 잔기	K, R, 및 H
친수성 비하전된 잔기	S, T, N, 및 Q
지방족 비하전된 잔기	G, A, V, L, 및 I
비-극성 비하전된 잔기	C, M, 및 P
방향족 잔기	F, Y, 및 W

[0059]

[0060] 표 2

[0061] 아미노산 잔기의 대안적인 물리적 및 기능적 분류

부류	아미노산
히드록실 기 함유 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V, 및 M
시클로알케닐-연관 잔기	F, H, W, 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y
음으로 하전된 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T
양으로 하전된 잔기	H, K, 및 R
작은 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T, 및 V
매우 작은 잔기	A, G, 및 S
턴 형성에 관여하는 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, 및 T
가요성 잔기	Q, T, K, S, G, P, D, E, 및 R

[0062]

- [0063] 하나의 아미노산의 또 다른 것에 대한 치환은 보존적 또는 비-보존적 치환으로서 분류될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, "보존적 치환"은 하나의 아미노산의 유사한 구조적 및/또는 화학적 특징을 갖는 또 다른 아미노산으로의 치환, 하나의 아미노산 잔기의 상기 임의의 2개의 표에 정의된 바와 같은 동일한 부류의 또 다른 아미노산 잔기에 대한 이러한 치환이다: 예를 들어, 보존적 치환은 류신의 이소류신으로의 치환일 수 있는데, 이는 이들이 둘 다 지방족, 분지형 소수성물질이기 때문이다. 유사하게, 보존적 치환의 예는 아스파르트산의 글루탐산으로의 치환인데, 이는 이들이 둘 다 작은 음으로 하전된 잔기이기 때문이다.
- [0064] 본 발명의 맥락에서, 항체에서의 치환은 하기로서 지시된다: 원래 아미노산 - 위치의 번호 - 치환된 아미노산.
- [0065] 아미노산에 대한 널리 인식된 명명법에 관하여, 임의의 아미노산 잔기를 지시하는 부호 "Xaa" 또는 "X"를 포함하는 3문자 부호, 또는 1문자 부호가 사용된다. 따라서, Xaa 또는 X는 전형적으로 임의의 20개의 천연 발생 아미노산을 나타낼 수 있다. 본원에 사용된 용어 "천연 발생"은 하기 아미노산 잔기 중 어느 하나를 지칭한다: 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 세린, 트레오닌, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 프롤린, 트립토판, 페닐알라닌, 티로신, 메티오닌, 및 시스테인.
- [0066] 따라서, 표기 "K409R" 또는 "Lys409Arg"는 항체가 아미노산 위치 409에 리신의 아르기닌으로의 치환을 포함함을 의미한다. 임의의 다른 아미노산에 대한 주어진 위치에서의 아미노산의 치환은 원래 아미노산 - 위치; 또는 예를 들어 "K409"로 지칭된다. 원래 아미노산(들) 및/또는 치환된 아미노산(들)이 하나 초과와 아미노산(들)을 포함할 수 있지만, 모든 아미노산(들)을 포함하지 않는 변형에 대해, 하나 초과와 아미노산은 ", " 또는 "/"에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어 위치 409에서 리신의 아르기닌, 알라닌, 또는 페닐알라닌으로의 치환은 "Lys409Arg,Ala,Phe" 또는 "Lys409Arg/Ala/Phe" 또는 "K409R,A,F" 또는 "K409R/A/F" 또는 "K409 내지 R, A, 또는 F"이다. 이러한 명칭은 본 발명의 맥락에서 상호교환가능하게 사용될 수 있지만, 동일한 의미 및 목적을 갖는다.
- [0067] 더욱이, 용어 "치환"은 어느 하나 또는 다른 19개의 천연 아미노산으로의, 또는 다른 아미노산, 예컨대 비-천연 아미노산으로의 치환을 포함한다. 예를 들어, 위치 409에서 아미노산 K의 치환은 하기 치환의 각각을 포함한다: 409A, 409C, 409D, 409E, 409F, 409G, 409H, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409T, 409V, 409W, 409P, 및 409Y. 이들 치환은 또한 K409A, K409C, 등 또는 K409A,C, 등 또는 K409A/C/등으로 지칭될 수 있다. 동일한 것은 본원에서 이러한 치환 중 어느 하나를 구체적으로 포함하기 위해, 본원에 언급된 각각의 및 모든 위치에 대해 유사하게 적용된다.
- [0068] 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"는 핵산, 예컨대 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 용어는 특정한 대상 세포를 지칭할 뿐만 아니라, 이러한 세포의 자손을 포함할 수 있는 것으로 의도됨이 이해되어야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향 중 어느 하나로 인해 특정 변형이 후속 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 사실 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다. 재조합 숙주 세포 (즉, 재조합 단백질의 생산에 사용되는 숙주 세포)는 예를 들어, 트랜스펙토마, 예컨대 CHO 세포, HEK-293 세포, Expi293F 세포, PER.C6 세포, NS0 세포, 및 림프구성 세포, 및 원핵 생물 세포, 예컨대 이. 콜라이(*E. coli*) 및 다른 진핵생물 숙주, 예컨대 식물 세포 및 진균을 포함한다.
- [0069] 본원에 사용된 용어 "트랜스펙토마"는 항체 또는 표적 항원을 발현하는 재조합 진핵생물 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포, PER.C6 세포, NS0 세포, HEK-293 세포, Expi293F 세포, 식물 세포, 또는 효모 세포를 포함하는 진균을 포함한다.
- [0070] 본 발명의 목적상, 2개의 아미노산 서열 사이의 서열 동일성은 EMBOSS 패키지 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), 바람직하게는 버전 5.0.0 또는 그 이후의 니들(Needle) 프로그램에서 실행된 바와 같은 니들만-운쉬(Needleman-Wunsch) 알고리즘 (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)을 사용하여 참조된 서열의 길이에 걸쳐 결정된다. 사용되는 파라미터는 10의 갭 오픈 페널티, 0.5의 갭 연장 페널티, 및 EBLOSUM62 (BLOSUM62의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스이다. 니들 표지된 "최강 동일성" (-노브리프 옵션을 사용하여 수득됨)의 산출물은 퍼센트 동일성으로서 사용되며, 하기와 같이 계산된다:
- [0071] $(\text{동일한 잔기} \times 100) / (\text{정렬의 길이} - \text{정렬에서의 갭의 총 수})$.
- [0072] 유사한 잔기의 보유는 또한 또는 대안적으로 BLAST 프로그램 (예를 들어, 표준 설정 BLOSUM62, 오픈 갭=11 및 연장된 갭=1을 사용하여 NCBI를 통해 이용가능한 BLAST 2.2.8)을 사용하여 결정된 바와 같은 유사성 점수에 의해 측정될 수 있다. 적합한 변이체는 전형적으로 모 또는 참조된 서열과 적어도 약 45%, 예컨대 적어도 약

55%, 적어도 약 65%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 그 초과 (예를 들어, 약 99%)의 유사성을 나타낸다.

[0073] 표 3 아미노산 서열

SEQ ID NO:	참조	도메인	서열
1	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR1	GGSFSAYY
2	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR2	INHGGGT
3	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR3	ASLTAY
4	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR1	QGISSW
5	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR2	AAS
6	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR3	QQYDSYPIT
7	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR1	GFTFNTYA
8	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR2	IRSKYNNYAT
9	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR3	VRXGNFGNSYVSWFAY, 여기서 X는 H 또는 G임
10	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR1	TGAVTTSNY
11	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR2	GTN
12	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR3	ALWYSNLWV

[0074]

13	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLNsvtaadtavyycasltaywgqgslvtvss
14	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL	DIQMTQSPTSLASVGDRTITCRASQGISSWLTWYQQ KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSL QPEDFATYYCQYDSYPITFGQGTRLEIK
15	IgG1-huCD3-FEAL	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRXGNFGNSYVSWFAYW GQGLTLTVSS, 여기서 X는 H 또는 G임
16	IgG1-huCD3-FEAL	VL	QAVVTQEPFSFVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAfrGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGgTKLTVL
17	IgG1-CD30-MDX060-FERR	전체 중쇄	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLNsvtaadtavyycasltaywgqgslvtvssast KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPEFERGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
18	IgG1-CD30-MDX060-FERR	전체 경쇄	DIQMTQSPTSLASVGDRTITCRASQGISSWLTWYQQ KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSL QPEDFATYYCQYDSYPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

[0075]

19	IgG1-huCD3-FEAL	전체 중쇄	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
20	IgG1-huCD3-FEAL	전체 경쇄	QAVVTQEPFSFVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYS SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
21	IgG1-CD30-hAC10-FEAR	전체 중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYITWVR QAPGQGLEWMGWIYPGSGNTKYNEKFKGRVTMTSDTSI STAYMELSRLRSDDAVYYCANYGNYWFAYWGQGTLLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAP EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0076]

22	IgG1-CD30-hAC10-FEAR	전체 경쇄	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDFDGD SYMN WYQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQSQNEDPWTFGGQTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
23	IgG1-CD30-HRS-3-FEAR	전체 중쇄	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYFTFTYTIHWVR QRPGRHLEWIGYINPSSGYSDYNQNFKGKTTLTADKSS NTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRADYGNIEYTWFAWYG QGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
24	IgG1-CD30-HRS-3-FEAR	전체 경쇄	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVTVTCKASQNVGTNVAWFQ QKPGQSPKVLIIYASRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEYFCQQYHTYPLTFGGGKLEINRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0077]

25	IgG1-CD30- HeFi-I-FEAR	전체 중쇄	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMNWVR QPPGKALEWLGFI RNKANGYTFESASVMGRFTISRDDS QSILYLQMNLT LAEDSATYYCARDPPYGNPHY YAMDY W GQGT SVTVSSASTKGPSVF LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	IgG1-CD30- HeFi-I-FEAR	전체 경쇄	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSASGYNYMHW YQQKAGQPPKLLIHLASNL ESGV PARFSGSGSGTDFTLNI HPVEEEDASTYYCQHS GELPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	IgG1-CD30- T405-FEAR	전체 중쇄	QVQLQQIGAELVRPGASVKLSCKASGYTFNNYWINWVK QRPGQGLEWIGNIYPSDSR SNYNQKFKDKATLTVDKPS STAYMQLSSPTSEDSAVYYCTLSGYWGQGLTVTVSAAST KGPSVF LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG

[0078]

28	IgG1-CD30- T405-FEAR	전체 경쇄	DVVMQTPTLTSVTIGQPASISCKSSQSLSDSDGKTYLN WLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGYYCWQGAHFPRTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	IgG1-CD30- T105-FEAR	전체 중쇄	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFGFSLSTSGMGVSWI RQPSGKDLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSS NQVFLKITSVDTADTATYYCARRADGLFYLDVWGAGTT VTVSSASTKGPSVF LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IgG1-CD30- T105-FEAR	전체 경쇄	DIVMTQSQKFMSTSVGDRSVTCKASQNVNTNVAWYQ QKPGQSPEALIYSASYRSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISN VQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0079]

31	IgG1-CD30-T408-FEAR	전체 중쇄	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVK QRPQGQLEWIGNIYPSDSYSNQNQKFKDKATLTVDKSS STAYMQLSSPTSEDSAVYYCTLGSYWGQGLTVTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
32	IgG1-CD30-T408-FEAR	전체 경쇄	DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLSDSDGKTYLN WLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTL KISRVEADLGVIYCWQGAHFPRTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
33	IgG1-CD30-T215-FEAR	전체 중쇄	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLVSGMGVSWI RQPSGKGLEWLAHIHWDDRRSNPSLRSLTISKDTSN NQVFLKITSVDTADTATYICARRPDLYGNYFFDFWGQG TTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPP CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNV FSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0080]

34	IgG1-CD30-T215-FEAR	전체 경쇄	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVFTNVAWYQ QKLGQSPKPLIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISD VQSEDLAEYFCQQYNSYPVTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEHKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	IgG1-huCD3H101G-FEAL	전체 중쇄	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRGGNFGNSYVSWFAYW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	IgG1-b12-FEAL	전체 중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWVR QAPGQRFWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVFTTADTSA NTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYM DVWGKGTTIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0081]

37	IgG1-b12- FEAL	전체 경쇄	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRVAVYQH KPGQAPRLVIHGVSNNRAGISDRFSGSGSGTDFTLTITR VEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEHKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	IgG1-b12- FERR	전체 중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVFTTADTSA NTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYM DVWGKGTTIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCAPEFERGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	인간 CD30		FPQDRPFEDTCHGNPSHYDKA VRCCYRCMPGLFPTQ QCPQRPTDCRKQCEPDYLLDEADRCTACVTC SRDDLVE KTPCAWNSSRVCECRPGMFCSTSAVN SCARCFH SVCP AGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSS GTIPQAKPTPVSPATSSASTMPVRGGTRLAQEAASKLTR APDSPSSVGRPSDPLSPTQPCPEGSGDCRKQCEPDY YLDEAGRCTACVSCSRDDLVEKTPCAWNSSRTCECRPG MICATSATNSCARCVYPICAAETVTKPQDMAEKDTTFE APPLGTQPD CNTPENGEPASTSPTQSLLVDSQASKTL PIPTSAPVALSSTGKPVLDAGPVLFVWVILV VVVVGS SAF LLCHRRACRKIRIQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRS STQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLES LPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKA DTVIVGT VKAELPEGRGLAGPAEPEEEEELEADHTPHYPE QETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK

[0082]

40	시노볼구스 원숭이 CD30		FPQDRPFEDTCRGNPGHYDYKAVRRCYRCPTGTAQKN TVCEPASPGVSPACASPENCKEPSSGTIPQAKPTPVSPAT SNASTMPLRGGTRLAQEAASKLTRAPGSPSSVGRPSSDP GLSPTQPCPQGGSDCRKQCEPDYLLDEAGRCTACVSCS RDDLVKTPCAWNSSRICECRPGMICATSATNSCARCVP YPICAAETGKPKQDMAEKDTTFAAPPVGTQPCDSPTPEN GEAPASTSPTLSSLVDSQASKTLPIPTSAPIALSSTGKPV DAGPVLFVWILVLAVVVGSSFTLLCHRRACRKRIRQKLHL CYPVQTSRPKLELVDSRPRRSSTQFESGTFVTKPSAEELG LMSLPPKETCRNVGAACPESLPLWDASPAGGPSSPRDLP EPRVSTEHTNNRIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGQGLA GPAEPELEEELEADHAPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEE EGKEDPLPTAASGK
41	레스스 원숭이 CD30		FPQDRPFEDTCRGNPGHYDYKAVRRCYRCMPGLFPTQ QCPQRPADCRKQCEPDYLLDEAGRCTACVSCSRDDLVE KMPCAWNSSRVCECQPGMFCASVSVNSCARCFFHSVCP AGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSS GTIPQAKPTPVSPATSNASTMPLRGGTRLAQEAASKLTR APGSPSSVGRPSSDPGLSPTQPCPQGGSDCRKQCEPDY YLDEAGRCTACVSCSRDDLVEKTPCAWNSSRICECRPG MICATSATNSCARCVPYPICAAETGKPKQDMAEKDTTFA APPVGTQPCDSPTPENGEAPASTSPTLSSLVDSQASKTL PIPTSAPIALSSTGKPVLDAGPVLFVWILVLAVVVGSSFTLL CHRRACRKRIRQKLHLCPVQTSRPKLELVDSRPRRSST QFESGTFVTKPSAEELGLMSLPPKETCRNVGAACPESLPL WDASPAGGPSSPRDLEPRVSTEHTNNRIEKIYIMKADT VIVGTVKAELPEGQGLAGPAEPELEEELEADHAPHYPEQE TEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK
42	인간 CD3 (엡실론)		QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCQYPGSEILWQ HNDKNIGGEDDDKNIGSDEHLSLKEFSELEQSGYYVCY PRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDI CITGGLLLLVYYWSKNRKAKAPVTRGAGAGGRQRGQN KERPPVPNPDYEPKIRKGQRDLYSGLNQRI

[0083]

43	시노물구스 원숭이 CD3		QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQW QHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYVVCYPRGSNPE DASHHLYLKARVCENCMEMDMVAVATIVIVDICITLGLLL LVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPVP NPDYEPiRKQQDLYSGLNQRRI
44	IgG1 불변 영역		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
45	IgG1 불변 영역	FER 치환 (볼드체)을 가짐	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE R GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
46	IgG1 불변 영역	FEA 치환 (볼드체)을 가짐	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV A VSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG

[0084]

47	IgG1 불변 영역	F405L 치환 (볼드체)을 가집	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
48	IgG1 불변 영역	K409R 치환 (볼드체)을 가집	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSLFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
49	IgG1 불변 영역	FER 치환 및 F405L 치환 (볼드체)을 가집	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG

[0085]

50	IgG1 불변 영역	FER 치환 및 K409R 치환 (볼드체)을 가짐	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE R GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYS R LTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
51	IgG1 불변 영역	FEA 치환 및 F405L 치환 (볼드체)을 가짐	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV A VSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSF L LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
52	IgG1 불변 영역	FEA 치환 및 K409R 치환 (볼드체)을 가짐	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV A VSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYS R LTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
53	불변 영역	인간 카파 경쇄의 불변 영역	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

54	불변 영역	인간 람다 경쇄의 불변 영역	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKS SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
55	IgG1-CD30-MDX060- FEAR	전체 중쇄	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAYVGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLNSTAAADTAVYYCASLTAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG

본 발명의 추가의 측면 및 실시양태

상기 기재된 바와 같이, 제1 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 다중특이적 항체에 관한 것이다:

(i) 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역, 및 서열 식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및

(ii) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역.

- [0092] 한 실시양태에서, 서열식별번호: 9에서 X는 H이다. 또 다른 실시양태에서, 서열식별번호: 9에서 X는 G이다.
- [0093] 한 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 인간 또는 인간화이다. 또 다른 실시양태에서, 제1 경쇄 가변 영역은 인간 또는 인간화이다. 한 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역은 인간 또는 인간화이다. 또 다른 실시양태에서, 제2 경쇄 가변 영역은 인간 또는 인간화이다. 또 다른 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역 및 제1 경쇄 가변 영역은 인간이다. 또 다른 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역 및 제1 경쇄 가변 영역은 인간화이다. 또 다른 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역은 인간이다. 또 다른 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역은 인간화이다. 또 다른 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역 및 제1 경쇄 가변 영역은 인간이고, 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역은 인간이다. 또 다른 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역 및 제1 경쇄 가변 영역은 인간이고, 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역은 인간화이다.
- [0094] 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있을 것인 바와 같이, 항체의 각각의 항원-결합 영역은 일반적으로 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 가변 영역의 각각은 각각 3개의 CDR 서열, 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 각각 4개의 프레임워크 서열, 즉, FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함할 수 있다. 이 구조는 바람직하게는 또한 본 발명에 따른 항체에서 발견된다. 한 실시양태에서, 상기 4개의 프레임워크 서열 중 1개, 2개, 3개 또는 모두는 인간 프레임워크 서열이다.
- [0095] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 그의 서열이 서열식별번호: 39에 제시된 인간 CD30에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함한다. 특히, 본 발명에 따른 항체는 인간 CD30에 결합할 수 있는 상기 항원-결합 영역이 인간 CD30의 세포외 도메인, 예컨대 세포, 보다 바람직하게는 중양 세포 상에 발현된 CD30 분자에 결합할 수 있는 항체이다.
- [0096] 기재된 바와 같이, 항체는 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역을 포함한다.
- [0097] CDR1, CDR2 및 CDR3 영역은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 가변 중쇄 및 경쇄 영역으로부터 확인될 수 있다. 상기 가변 중쇄 및 경쇄 영역으로부터의 CDR 영역은 IMGT에 따라 주석되었다 (문헌 [Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)]; [Lefranc, Developmental and Comparative Immunology, 27(1), 55-77 (2003)] 참조).
- [0098] 한 실시양태에서, CD30에 결합하는 항원-결합 영역은 하기를 포함한다:
- [0099] • 서열식별번호: 13의 서열, 또는 서열식별번호: 13의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 (제1) 중쇄 가변 영역 (VH); 및,
- [0100] • 서열식별번호: 14의 서열, 또는 서열식별번호: 14의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 (제1) 경쇄 가변 영역 (VL).
- [0101] 추가의 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 본원에 정의된 바와 같은 CD30에 결합하는 항원-결합 영역의 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함하고, 여기서 서열은 서열식별번호: 13과 비교할 경우, 총합하여, 최대 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0102] 추가의 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 본원에 정의된 바와 같은 CD30에 결합하는 항원-결합 영역의 경쇄 가변 (VL) 영역을 포함하고, 여기서 서열은 서열식별번호: 14와 비교할 경우, 총합하여, 최대 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0103] 추가의 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 14에 제시된 서열을 포함한다.
- [0104] 인간 CD30에 결합할 수 있는 이러한 항원-결합 영역은 그 중에서도 본원에 참조로 포함되는 W003059282 (메다렉스)에 기재되었다.
- [0105] 본 발명에 따른 상기 항체는 인간 CD30에 결합하는 항원-결합 영역 사이의 평형 해리 상수 KD로 결합할 수 있으며, 인간 CD30은 0.1 내지 20 nM의 범위 내, 예를 들어 0.5-5 nM의 범위 내, 예컨대 1.5-2 nM의 범위 내 (1가 결합)이다. 상기 결합 친화도는 생물층 간섭측정법에 의해 결정될 수 있다.

- [0106] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 또한 시노물구스 CD30 (서열식별번호: 40)에 결합할 수 있다.
- [0107] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 인간 CD3에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함한다. 더욱이, 본 발명은 인간 CD3ε (엡실론), 예컨대 서열식별번호: 22에 명시된 바와 같은 인간 CD3ε (엡실론)에 결합할 수 있는 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 이러한 항원-결합 영역은 T 세포, 예컨대 1차 인간 T 세포 상에 제시된 바와 같은 인간 CD3ε (엡실론)에 결합할 수 있다.
- [0108] 기재된 바와 같이, 항체는 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역을 포함한다.
- [0109] 한 실시양태에서, CD3에 결합하는 항원-결합 영역은 하기를 포함한다:
- [0110] • 서열식별번호: 15의 서열, 또는 서열식별번호: 15의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 (제2) 중쇄 가변 영역 (VH); 및,
- [0111] • 서열식별번호: 16의 서열, 또는 서열식별번호: 16의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 (제2) 경쇄 가변 영역 (VL).
- [0112] 추가의 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 본원에 정의된 바와 같은 CD3에 결합하는 항원-결합 영역의 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함하고, 여기서 서열은 서열식별번호: 15와 비교할 경우, 총합하여, 최대 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0113] 추가의 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 본원에 정의된 바와 같은 CD3에 결합하는 항원-결합 영역의 경쇄 가변 (VL) 영역을 포함하고, 여기서 서열은 서열식별번호: 16과 비교할 경우, 총합하여, 최대 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0114] 추가의 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 16에 제시된 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 서열식별번호: 15에서 X는 H이다. 또 다른 실시양태에서, 서열식별번호: 15에서 X는 G이다.
- [0115] 인간 CD3에 결합할 수 있는 이러한 항원-결합 영역은 그 중에서도 본원에 참조로 포함되는 W02015/001085 (젠맵 (Genmab))에 기재되었다. 그의 변이체, 예컨대 X가 H인 모 항체보다 인간 CD3 결합에 대한 더 낮은 친화도를 갖는 X가 G인 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 VH CDR3 영역을 포함하는 변이체는 본원에 참조로 포함되는 W02017/009442 (젠맵)의 실시예 2에 기재되었다.
- [0116] 본 발명에 따른 상기 항체는 인간 CD3에 결합하는 항원-결합 영역 사이의 평형 해리 상수 KD로 결합할 수 있으며, 인간 CD3은 5 내지 30 nM, 예컨대 10 내지 20 nM의 범위 내 (1가 결합에 대해)이다.
- [0117] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 또한 시노물구스 원숭이 CD3 (서열식별번호: 43)에 결합할 수 있다.
- [0118] 추가의 실시양태에서, 다중특이적 항체는 하기를 포함한다:
- [0119] (i) 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 14에 제시된 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및
- [0120] (ii) 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 16에 제시된 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역.
- [0121] 항체 포맷
- [0122] 본 발명의 다중특이적 항체는 2개 이상의 특이성, 예컨대 2개 또는 3개 이상의 특이성을 가질 수 있다. 더욱이, 다중특이적 항체는 CD3 및/또는 CD30에 대한 항원-결합 영역의 1개 초과 카피를 가질 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 항체는 CD3에 결합할 수 있는 2개의 항원-결합 영역, 예컨대 CD3에 결합하는 2개의 동일한 결합 영역을 갖는다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 항체는 CD30에 결합하는 2개의 항원-결합 영역, 예컨대 CD30에 결합하는 2개의 동일한 결합 영역을 갖는다. 추가의 항원-결합 영역은 예를 들어 불변 영역에 공유 연결된 scFv의 형태로 존재할 수 있다.
- [0123] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다. 많은 상이한 포맷 및 이중특이적 항체의 용도는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 문헌 [Kontermann; Drug Discov Today, 2015 Jul;20(7):838-

47] 및 [MAbs, 2012 Mar-Apr;4(2):182-97] 및 [Labrijn et al. 2019 Nat Rev Drug Discov 18(8) 585-608]에 의해 검토되었다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 임의의 특정한 이중특이적 포맷 또는 이를 생산하는 방법에 제한되지 않을 수 있다.

[0124] 본 발명에 사용될 수 있는 이중특이적 항체 분자의 예는 (i) 상이한 항원-결합 영역을 포함하는 2개의 아암을 갖는 단일 항체; (ii) 예를 들어, 가외의 펩티드 링커에 의해 탠덤으로 연결된 2개의 scFv를 통해, 2개의 상이한 표적에 대한 특이성을 갖는 단일쇄 항체; (iii) 각각의 경쇄 및 중쇄가 짧은 펩티드 연결을 통해 탠덤으로 2개의 가변 도메인을 함유하는 이중-가변-도메인 항체 (DVD-Ig) (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iv) 화학적으로-연결된 이중특이적 (Fab')₂ 단편; (v) 표적 항원의 각각에 대한 2개의 결합 부위를 갖는 4가 이중특이적 항체를 발생시키는 2개의 단일쇄 디아바디의 융합물인 탄답(Tandab); (vi) 다가 분자를 발생시키는 디아바디를 갖는 scFv의 조합인 플렉시바디; (vii) Fab에 적용되는 경우, 상이한 Fab 단편에 연결된 2개의 동일한 Fab 단편으로 이루어진 3가 이중특이적 결합 단백질을 생성할 수 있는 단백질 키나제 A에서 "이량체화 및 도킹 도메인"에 기반한 소위 "독 앤드 록" 분자; (viii) 예를 들어, 인간 Fab-아암의 둘 다의 말단에 융합된 2개의 scFv를 포함하는 소위 스콜피온(Scorpion) 분자; 및 (ix) 디아바디를 포함한다.

[0125] 이중특이적 항체의 상이한 부류의 추가의 예는 (i) 이중이량체화를 강제하는 상보적 CH3 도메인을 갖는 IgG-유사 분자; (ii) 분자의 2개의 측이 각각 적어도 2개의 상이한 항체의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 부분을 함유하는 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자; (iii) 전장 IgG 항체가 가외의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 부분에 융합된 IgG 융합 분자; (iv) 단일쇄 Fv 분자 또는 안정화된 디아바디가 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 그의 부분에 융합된 Fc 융합 분자; (v) 상이한 Fab-단편이 함께 융합되고, 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 그의 부분에 융합된 Fab 융합 분자; 및 (vi) 상이한 단일쇄 Fv 분자 또는 상이한 디아바디 또는 상이한 중쇄 항체 (예를 들어 도메인 항체, 나노바디)가 서로에 또는 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 그의 부분에 융합된 또 다른 단백질 또는 운반체 분자에 융합된 scFv- 및 디아바디-기반 및 중쇄 항체 (예를 들어, 도메인 항체, 나노바디)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0126] 상보적 CH3 도메인 분자를 갖는 IgG-유사 분자의 예는 트리오맵(Triomab)/콰드로마(Quadroma) 분자 (트리온 파마(Trion Pharma)/프레세니우스 바이오테크(Fresenius Biotech); 로슈(Roche), W02011069104), 소위 낚-인투-홀(Knobs-into-Holes) 분자 (제넨테크(Genentech), W09850431), 크로스맵(CrossMAbs) (로슈, W02011117329) 및 정전기적으로-매칭된 분자 (암젠(Amgen), EP1870459 및 W02009089004; 추가이(Chugai), US201000155133; 온코메드(Oncomed), W02010129304), LUZ-Y 분자 (제넨테크, Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), DIG-바디 및 PIG-바디 분자 (파맙신(Pharmabcine), W02010134666, W02014081202), 가닥 교환 조작된 도메인 바디 (SEED바디) 분자 (이엠디 세로노(EMD Serono), W02007110205), 비클로닉스(Biclonics) 분자 (메루스(Merus), W02013157953), Fc Δ Adp 분자 (리제네론(Regeneron), W0201015792), 이중특이적 IgG1 및 IgG2 분자 (화이자(Pfizer)/리나트(Rinat), W011143545), 아지메트릭(Azymetric) 스케폴드 분자 (짐웍스(Zymeworks)/머크(Merck), W02012058768), mAb-Fv 분자 (젠코어(Xencor), W02011028952), 2가 이중특이적 항체 (W02009080254) 및 듀오바디[®] 분자 (젠맵 에이/에스, W02011131746)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0127] 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자의 예는 이중 표적화 (DT)-Ig 분자 (W02009058383), 투-인-원(Two-in-one) 항체 (제넨테크; Bostrom, et al. 2009. Science 323, 1610-1614.), 가교된 Mab (카르마노스 캔서 센터(Karmanos Cancer Center)), mAb2 (F-스타(F-Star), W02008003116), 자이바디(Zybody) 분자 (진게니아(Zyngenia); LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr;5(2):208-18), 공통 경쇄를 갖는 접근법 (크루셀(Crucell)/메루스, US7,262,028), 카파/람다 바디TM 분자 (노비문(NovImmune), W02012023053) 및 CovX-바디 (코브엑스(CovX)/화이자; Doppalapudi, V.R., et al. 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17,501-506.)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0128] IgG 융합 분자의 예는 이중 가변 도메인 (DVD)-Ig 분자 (애보트(Abbott), US7,612,181), 이중 도메인 이중 헤드 항체 (유니레버(Unilever); 사노피 아벤티스(Sanofi Aventis), W020100226923), IgG-유사 이중특이적 분자 (임클론(ImClone)/일라이 릴리(Eli Lilly), Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8), Ts2Ab (메드이뮤(MedImmune)/AZ; Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92) 및 BsAb 분자 (자이모제네틱스(Zymogenetics), W02010111625), 허큘레스(HERCULES) 분자 (바이오젠 아이덱(Biogen Idec), US007951918),

scFv 융합 분자 (노바티스(Novartis)), scFv 융합 분자 (창저우 아담 바이오테크 인크(Changzhou Adam Biotech Inc), CN 102250246) 및 TvAb 분자 (로슈, WO2012025525, WO2012025530)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0129] Fc 융합 분자의 예는 scFv/Fc 융합물 (Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep;42(6):1179-88), 스콜 피온 분자 (이머전트 바이오솔루션스(Emergent BioSolutions)/트루비온(Trubion), Blankenship JW, et al. AACR 100th Annual meeting 2009 (초록 # 5465); 자이모제네틱스/BMS, WO2010111625), 이중 친화도 재표적화 기술 (Fc-DART) 분자 (마크로제닉스(MacroGenics), WO2008157379, WO2010080538) 및 이중(scFv)₂-Fab 분자 (내셔널 리서치 센터 포 안티바디 메디슨(National Research Center for Antibody Medicine) - 중국)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0130] Fab 융합 이중특이적 항체의 예는 F(ab)₂ 분자 (메다렉스/암젠; Deo et al. J Immunol. 1998 Feb 15;160(4):1677-86.), 듀얼-액션(Dual-Action) 또는 비스-Fab 분자 (제넨테크, Bostrom, et al. 2009. Science 323, 1610-1614.), 독-앤드-록(Dock-and-Lock) (DNL) 분자 (이뮤노메딕스(ImmunoMedics), WO2003074569, WO2005004809), 2가 이중특이적 분자 (바이오테크놀(Biotechnol), Schoonjans, J Immunol. 2000 Dec 15;165(12):7050-7.) 및 Fab-Fv 분자 (UCB-셀테크(UCB-Celltech), WO 2009040562 A1)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0131] scFv-, 디아바디-기반 및 도메인 항체의 예는 이중특이적 T 세포 인게이지 (BiTE) 분자 (미크로메트(Micromet), WO2005061547), 탠덤 디아바디 분자 (탄답(TandAb)) (아피메드) Le Gall et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr;17(4):357-66.), DART 분자 (마크로제닉스, WO2008157379, WO2010080538), 단일-쇄 디아바디 분자 (Lawrence, FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84), TCR-유사 항체 (AIT, 리셉터로직스(ReceptorLogics)), 인간 혈청 알부민 scFv 융합물 (메리마크(Merrimack), WO2010059315) 및 콤바디(COMBODY) 분자 (에피겐 바이오테크(Epigen Biotech), Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75.), 이중 표적화 나노바디 (압링크스(Ablynx), Hmila et al., FASEB J. 2010) 및 이중 표적화 중쇄 단독 도메인 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0132] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 디아바디, 크로스-바디, 또는 제어된 Fab-아암 교환을 통해 수득된 이중특이적 항체 (예컨대 WO2011131746 (젠맵)에 기재됨)이다.

[0133] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 이중특이적 듀오바디® 분자 (젠맵 에이/에스, WO2011131746)이다.

[0134] 본 발명의 다중특이적, 예컨대 이중특이적 항체는 임의의 이소타입의 것일 수 있다. 예시적인 이소타입은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4 이소타입 중 어느 하나를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 항체는 실시예에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 이소타입의 것이도록 선택될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역, 카파 또는 람다 중 어느 하나, 또는 둘 다, 예를 들어 서열식별번호: 53 및 54에 제시된 서열이 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, CD30 결합에 관여하는 경쇄는 카파 불변 영역을 포함하고, CD3 결합에 관여하는 경쇄는 람다 불변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체의 둘 다의 중쇄는 IgG1 이소타입의 것이다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체의 2개의 중쇄는 각각 IgG1 및 IgG4 이소타입의 것이다. 바람직하게는, 이중특이적 항체는 실시예에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 이소타입의 것이도록 선택될 수 있다. 임의로, 및 바람직하게는, 선택된 이소타입의 중쇄 및 그의 Fc 영역 서열은 이중특이적 항체의 생성을 가능하게 하고 불활성화를 도입하도록 바람직하게는 힌지, CH2 및/또는 CH3 영역에서 변형될 수 있다.

[0135] 한 실시양태에서, 본 발명의 다중특이적 항체는 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역을 포함한다.

[0136] 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드 및 제1 중쇄 가변 영역은 동일한 폴리펩티드 쇄 내에 포함되고, 여기서 제2 Fc 폴리펩티드 및 제2 중쇄 가변 영역은 동일한 폴리펩티드 쇄 내에 포함된다.

[0137] 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 각각 임의의 인간 이소타입, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM, 또는 IgA 이소타입 또는 혼합된 이소타입을 포함하는 임의의 이소타입의 것일 수 있다. 바람직하게는, Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 이소타입 또는 혼합된 이소타입이다. 한 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 영역이다.

[0138] 추가의 실시양태에서, 다중특이적 항체는 본원에 정의된 바와 같은 전장 항체이다.

[0139] 본 발명에 따른 항체는 항체를 불활성, 또는 비-활성화 항체로 만드는 Fc 영역 내의 변형을 포함할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 항체에서, 하나 또는 둘 다의 중쇄는 항체가 상기 변형을 포함하지 않는 것을 제외하고는 동일한 항체에 비해 더 적은 정도로 Fc-매개 이펙터 기능을 유도하도록 변형될 수 있다. Fc-매개 이펙터 기

능은 T 세포 상의 Fc-매개 CD69 발현 (즉, 예를 들어 W02015001085에 기재된 바와 같이 CD3 항체-매개, Fc γ 수용체-의존적 CD3 가교의 결과로서의 CD69 발현)을 결정함으로써, Fc γ 수용체에의 결합에 의해, C1q에의 결합에 의해, 또는 Fc γ R의 Fc-매개 가교의 유도에 의해 측정될 수 있다. 특히, 중쇄 불변 서열은 Fc-매개 CD69 발현이 야생형 (비변형된) 항체와 비교할 경우 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소되도록 변형될 수 있고, 여기서 상기 Fc-매개 CD69 발현은 PBMC-기반 기능적 검정에서, 예를 들어 W02015001085의 실시예 3에 기재된 바와 같이 유동 세포계측법에 의해 결정된다. 중쇄 및 경쇄 불변 서열의 변형은 또한 상기 항체에의 C1q의 감소된 결합을 발생시킬 수 있다. 비변형된 항체와 비교하여, 감소는 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100%일 수 있고, C1q 결합은 ELISA에 의해 결정될 수 있다. 또한, Fc 영역은, 예를 들어 곡선의 선형 부분에서, 상기 항체가 비변형된 항체와 비교하여 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소된 Fc-매개 T-세포 증식을 매개하도록 변형될 수 있고, 여기서 상기 T-세포 증식은 PBMC-기반 기능적 검정에서 측정된다.

[0140] Fc-매개 이펙터 기능을 제거하기 위해 아미노산 치환, 및 이들의 조합이 IgG1 이소타입 항체의 불변 중쇄 영역에 도입된 폭넓은 범위의 상이한 비-활성화 항체 포맷이 개발되었다 (예를 들어 Chiu et al., Antibodies 2019 Dec; 8(4): 55; Liu et al., Antibodies, 2020 Nov 17;9(4):64; 29(10):457-66; Shields et al., J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6591-604).

[0141] 예를 들어 IgG1 이소타입 항체에서 변형될 수 있는 아미노산 위치의 예는 위치 L234 및 L235를 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄에서 위치 L234 및/또는 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 각각 F 및 E로의 치환이고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같다.

[0142] 아미노산 위치 L234 및 L235의 변형에 추가로, 추가의 위치가 변형될 수 있음이 이해된다. 따라서, 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 제1 및/또는 제2 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄에서 위치 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 R로의 치환이다.

[0143] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄에서 위치 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 R로의 치환이다.

[0144] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 제1 및/또는 제2 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 A로의 치환이다.

[0145] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E의 치환을 포함하고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 A로의 치환이다.

[0146] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 위치 L234, L235 및 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 R로의 치환을 포함하고, 다른 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235E 및 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 A로의 치환을 포함한다.

[0147] 추가의 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235 및 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 R로의 치환을 포함하고, 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235E 및 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 A로의 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같다.

[0148] 예를 들어, 이러한 Fc 영역 치환을 갖는 불변 영역은 그 중에서도 서열식별번호: 45, 46, 49, 50, 51 및 52에 제공되며, 이는 이러한 치환(들)을 갖지 않는 서열식별번호: 44와 비교될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열식별번호: 45, 46, 49, 50, 51 및 52로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.

[0149] 한 실시양태에서, 본 발명의 다중특이적 또는 이중특이적 항체는 제1 및 제2 CH3 영역을 포함하는 Fc 영역을 포함하며, 상기 제1 및 제2 CH3 영역은 상이하고, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체성 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것이다. 이들 상호작용 및 이들이 달성될 수 있는 방법에 대한 보다 상세한 사항은 본원에 참조로 포함되는 W02011131746 및 W02013060867 (젠맵)에서 제공된다. 안정한 이중이량체성 항체는 CH3 영역에 단지 소수의 비대칭적 돌연변이를 함유하는 2개의 동종이량체성 출발 항체에 기반하여, 예를 들어 WO 2008/119353 및 WO 2011/131746에 제공된 바와 같은 소위

Fab-아암 교환에 의해 높은 수율로 수득될 수 있다.

- [0150] 특정한 실시양태에서, 본 발명은 인간 IgG1 중쇄에서 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산이 상기 제1 Fc 폴리펩티드에서 R이고, 인간 IgG1 중쇄에서 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산이 상기 제2 Fc 폴리펩티드에서 L이거나, 또는 그 반대의 경우인 항체를 제공한다.
- [0151] 추가의 실시양태에서, K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제1 Fc 폴리펩티드에서 R이고, 여기서 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제2 Fc 폴리펩티드에서 L이다.
- [0152] 따라서, 한 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드에서, 인간 IgG1 중쇄에서 T366, L368, K370, D399, F405, Y407 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 중 적어도 하나는 치환되어 있고, 제2 Fc 폴리펩티드에서, 인간 IgG1 중쇄에서 T366, L368, K370, D399, F405, Y407 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 중 적어도 하나는 치환되어 있으며, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드에서의 상기 치환은 동일한 위치에 있지 않고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같다. 예를 들어, 이러한 Fc 영역 치환을 갖는 불변 영역은 그 중에서도 서열식별번호: 47, 48, 49, 50, 51 및 52에 제공되며, 이는 이러한 치환을 갖지 않는 서열식별번호: 44와 비교될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열식별번호: 47, 48, 49, 50, 51 및 52로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0153] 바람직하게는, F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제1 Fc 폴리펩티드에서 L이고, K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제2 Fc 폴리펩티드에서 R이거나, 또는 그 반대의 경우이다.
- [0154] 따라서, 한 실시양태에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 위치 L234, L235, G236 및 F405에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E, R 및 L로의 치환을 포함하고, 다른 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235E, D265 및 K409에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E, A 및 R로의 치환을 포함한다.
- [0155] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 위치 L234, L235, G236 및 K409에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E, R 및 R로의 치환을 포함하고, 다른 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235E, D265 및 F405에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E, A 및 L로의 치환을 포함한다.
- [0156] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 다중특이적 항체로서:
- [0157] (i) 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및
- [0158] (ii) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역;
- [0159] 여기서 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역을 포함하고;
- [0160] 여기서 제1 Fc 폴리펩티드 및 제1 중쇄 가변 영역은 동일한 폴리펩티드 쇄 내에 포함되고, 여기서 제2 Fc 폴리펩티드 및 제2 중쇄 가변 영역은 동일한 폴리펩티드 쇄 내에 포함되고;
- [0161] 여기서 제1 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235 및 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 R로의 치환을 포함하고, 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235 및 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 A로의 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같고;
- [0162] 여기서 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제1 Fc 폴리펩티드에서 R이고, 여기서 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제2 Fc 폴리펩티드에서 L인
- [0163] 다중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0164] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 다중특이적 항체로서:
- [0165] (i) 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및
- [0166] (ii) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서

열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역;

- [0167] 여기서 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역을 포함하고;
- [0168] 여기서 제1 Fc 폴리펩티드 및 제1 중쇄 가변 영역은 동일한 폴리펩티드 쇠 내에 포함되고, 여기서 제2 Fc 폴리펩티드 및 제2 중쇄 가변 영역은 동일한 폴리펩티드 쇠 내에 포함되고;
- [0169] 여기서 제1 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235 및 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 A로의 치환을 포함하고, 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234, L235 및 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F, E 및 A로의 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같고;
- [0170] 여기서 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제1 Fc 폴리펩티드에서 R이고, 여기서 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제2 Fc 폴리펩티드에서 L인
- [0171] 다중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0172] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열식별번호: 17 및 19에 제시된 중쇄 서열 및 서열식별번호: 18 및 20에 제시된 경쇄 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.
- [0173] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열식별번호: 17 및 19에 제시된 중쇄 서열 및 서열식별번호: 18 및 20에 제시된 경쇄 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 상기 항체는 이중특이적 항체이다.
- [0174] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열식별번호: 17 및 35에 제시된 중쇄 서열 및 서열식별번호: 18 및 20에 제시된 경쇄 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.
- [0175] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열식별번호: 55 및 19에 제시된 중쇄 서열 및 서열식별번호: 18 및 20에 제시된 경쇄 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.
- [0176] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열식별번호: 55 및 35에 제시된 중쇄 서열 및 서열식별번호: 18 및 20에 제시된 경쇄 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.
- [0177] 또한 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR 또는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이다. 또한 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이다.
- [0178] 서열식별번호: 44-52 및 55에 열거된 불변 영역 서열은 C-말단 리신 (K)을 포함하지 않는다. 그러나, 이들 Fc 영역이 유래되는 인간에서 발견되는 천연 발생 서열에서, 이러한 C-말단 리신은 오픈 리딩 프레임의 일부로서 존재할 수 있다. 재조합 항체의 세포 배양 생산 동안, 이 말단 리신은 내인성 카르복시펩티다제(들)에 의한 단백질분해에 의해 절단되어, 동일한 서열을 갖지만 C-말단 리신을 결여하는 불변 영역을 발생시킬 수 있다. 항체의 제조 목적을 위해, 이 말단 리신을 코딩하는 DNA는 항체가 리신 없이 생산되도록 서열로부터 생략될 수 있다. 항체를 코딩하는 서열로부터의 C-말단 리신의 생략은 C-말단 리신의 존재에 관하여 항체의 동질성을 증가시킬 수 있다. 말단 리신을 코딩하거나, 또는 코딩하지 않는 핵산 서열로부터 생산된 항체는 서열에 있어서 및 기능에 있어서 실질적으로 동일한데, 이는 예를 들어 CHO-기반 생산 시스템에서 생산된 항체를 사용하는 경우 C-말단 리신의 프로세싱의 정도가 전형적으로 높기 때문이다 (Dick, L.W. et al. Biotechnol. Bioeng. 2008;100: 1132-1143). 따라서, 본 발명에 따른 항체는 예컨대 본원에 열거된 C-말단 리신을 코딩하거나 갖지 않고 생성될 수 있음이 이해된다. 제조 목적을 위해, 항체는 따라서 C-말단 리신을 갖지 않고 생성될 수 있다.
- [0179] 대안적인 실시양태에서, 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 Fc 영역을 포함하는 고전적 전장 항체가 아니다. 예를 들어, 한 실시양태에서,
- [0180] (i) CD30 결합 영역 및/또는 CD3 결합 영역은 Fab이거나,
- [0181] (ii) CD30 결합 영역 및/또는 CD3 결합 영역은 scFv이거나,
- [0182] (iii) CD30 결합 영역은 Fab이고, CD3 결합 영역은 scFv이거나, 또는
- [0183] (iv) CD30 결합 영역은 scFv이고, CD3 결합 영역은 Fab이다.
- [0184] 결합, 세포독성 및 T-세포 활성화
- [0185] 인간 CD3 및 인간 CD30에 결합할 수 있는 본원에 기재된 바와 같은 항체, 예컨대 이중특이적 항체는 유리하게는 T 세포를 인간 CD30 발현 암 세포에 표적화하며, 이로써 상기 암 세포의 T-세포 매개 살해를 유도할 수 있다.

- [0186] 상기와 같이, 바람직하게는, 본 발명에 따른 항체는 불활성이고, 더욱이, 항체는 하기 특징 중 하나 이상을 포함한다:
- [0187] a) 예를 들어 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 유동 세포계측법을 사용하여 시험되는 경우, CD30-발현 인간 종양 세포, 예컨대 SU-DHL-1 세포, SUP-M2 세포, DL-40 세포, KARPAS-299 세포, L-82 세포, SR-786 세포, L-540 세포, KM-H2 세포, L-1236 세포, JVM-2 세포, HH 세포, NCEB-1 세포 및/또는 HDLM-2 세포에 결합할 수 있음,
- [0188] b) 본원의 실시예에 기재된 바와 같이 검정되는 경우, 이펙터 세포로서 예를 들어, 정제된 PBMC, ADCC 이펙터 세포 또는 T 세포를 사용하는 경우, CD30-발현 인간 종양 세포의 농도-의존적 세포독성을 매개할 수 있음,
- [0189] c) 본원의 실시예에 기재된 바와 같이 검정되는 경우, 이펙터 세포로서 예를 들어, 정제된 PBMC 또는 T 세포를 사용하는 경우, SU-DHL-1 세포, L-428 세포, KM-H2 세포, SUP-M2 세포, KI-JK 세포 및 HDLM-2 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 인간 CD30-발현 종양 세포주의 농도-의존적 세포독성을 매개할 수 있음,
- [0190] d) 예를 들어 본원의 실시예에 기재된 바와 같이 검정되는 경우, CD30-발현 인간 종양 세포의 존재 하에서 시험관내에서 T 세포의 증식을 유도할 수 있음,
- [0191] e) 본원의 실시예에 기재된 바와 같이 검정되는 경우, SU-DHL-1 세포, L-428 세포, KI-JK 세포, 및 HDLM-2 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 CD30-발현 인간 종양 세포주의 존재 하에서 시험관내에서 T 세포를 활성화시킬 수 있음,
- [0192] f) 본원의 실시예에 기재된 바와 같이 검정되는 경우, 시토카인 및 그랜자임 B의 T 세포에 의해 시험관내에서 용량-의존적 생산을 유도할 수 있음,
- [0193] g) 본원의 실시예에 기재된 바와 같이 검정되는 경우, CD30이 활성화된 T 세포의 하위집단 상에 발현되더라도 T 세포의 동족살해를 발생시키지 않을 수 있음, 및/또는
- [0194] h) 본원의 실시예에 기재된 바와 같이 검정되는 경우, 심지어 sCD30의 존재 하에서도 T 세포 매개 세포독성을 유도할 수 있음.
- [0195] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 예컨대 L-428 종양 세포를 사용하고 유동 세포계측법에 의해 측정하여 검정되는 경우, 0.050 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.045 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.040 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.035 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.030 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.025 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.020 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 EC₅₀ 농도로 T-세포 매개 세포독성을 유도한다.
- [0196] 추가의 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 예컨대 L-428 종양 세포를 사용하고 유동 세포계측법에 의해 측정하여 검정되는 경우, T-세포 매개 세포독성을 유도하는 경우 80% 초과, 예컨대 85% 초과, 예컨대 90% 초과, 최대 용해를 갖는다.
- [0197] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 예컨대 L-428 종양 세포를 사용하고 유동 세포계측법에 의해 측정하여 검정되는 경우, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.045 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.04 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.035 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 CD25 발현의 EC₅₀ 농도를 갖는 CD4⁺ T 세포 활성화를 유도한다. 추가의 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 예컨대 L-428 종양 세포를 사용하고 유동 세포계측법에 의해 측정하여 검정되는 경우, 0.005 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.001 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.0009 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.0008 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.0007 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 CD25 발현의 EC₅₀ 농도를 갖는 CD8⁺ T 세포 활성화를 유도한다.
- [0198] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 예컨대 L-428 종양 세포를 사용하고 유동 세포계측법에 의해 측정하여 검정되는 경우, 0.004 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.003 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.002 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.001 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.0009 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 CD69 발현의 EC₅₀ 농도를 갖는 CD4⁺ T 세포 활성화를 유도한다. 추가의 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 예컨대 L-428 종양 세포를 사용하고 유동 세포계측법에 의해 측정하여 검정되는 경우, 0.0035 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.0030 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.0025 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.0020 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.0015 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 CD69 발현의 EC₅₀ 농도를 갖는 CD8⁺ T 세포 활성화를 유도한다.

- [0199] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 예컨대 L-428 종양 세포를 사용하고 유동 세포계측법에 의해 측정하여 검정되는 경우, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.008 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.007 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.006 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.005 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 PD-1 발현의 EC_{50} 농도를 갖는 CD4^+ T 세포 활성화를 유도한다. 추가의 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체는 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 예컨대 L-428 종양 세포를 사용하고 유동 세포계측법에 의해 측정하여 검정되는 경우, 0.007 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.006 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.005 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.004 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 예컨대 0.003 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 PD-1 발현의 EC_{50} 농도를 갖는 CD8^+ T 세포 활성화를 유도한다.
- [0200] 검정은 통상의 기술자에게 통상적으로 공지된 바와 같이 수행될 수 있으며, 임의로, 4:1의 이펙터 세포 대 표적 세포 (E:T)의 비 및/또는 임의로, 72시간의 인큐베이션 기간을 포함할 수 있다. 검정은 예를 들어 종양 세포, 바람직하게는 표지된 종양 세포, 예컨대 L-428 종양 세포를 제공하고; 본원에 기재된 바와 같은 항체를 바람직하게는 시리즈 희석으로 첨가하고; T 세포, 바람직하게는 표지된 T 세포를 4:1의 E:T인 이펙터 대 표적의 비로 제공하고, 72시간 동안 인큐베이션하고; 임의로, 관련된 파라미터, 예컨대 CD4, CD8, CD25, CD69 및/또는 PD-1에 대해 염색하고, 마지막으로 세포를 FACS와 같은 유동 세포계측법을 사용하여 분석함으로써 수행될 수 있다. % 살아있는 세포 및/또는 T 세포 증식/활성화는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 공지된 바와 같은 분석에 의해 얻어진 데이터로부터 계산될 수 있다.
- [0201] 본 발명의 항체의 생산
- [0202] 전통적인 방법, 예컨대 하이브리드 하이브리도마 및 화학적 접합 방법 (Marvin and Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26:649)은 본 발명의 다중특이적, 예컨대 이중특이적 항체의 제조에 사용될 수 있다. 상이한 중쇄 및 경쇄로 이루어진 2개의 항체의 숙주 세포에서의 공동-발현은 목적하는 이중특이적 항체에 추가로 가능한 항체 산물의 혼합물을 초래하며, 이는 이어서 예를 들어, 친화도 크로마토그래피 또는 유사한 방법에 의해 분리될 수 있다.
- [0203] 언급된 바와 같이, 상이한 항체 구축물의 공동-발현 시, 기능적 이중특이적 산물의 형성을 선호하는 전략, 예를 들어 문헌 [Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219)]에 의해 기재된 방법은 또한 사용될 수 있다. 상이한 항체를 생산하는 래트 및 마우스 하이브리도마의 융합은 우선적인 중-제한된 중쇄/경쇄 쌍형성 때문에 제한된 수의 이중이량체성 단백질을 초래한다. 동중이량체에 비해 이중이량체의 형성을 촉진시키는 또 다른 전략은 이중이량체 형성을 촉진시키고 동중이량체 형성을 방해하도록 돌기가 이들 2개의 중쇄의 계면에서의 공동에 위치될 수 있도록, 돌기가 제1 중쇄 폴리펩티드 상에 도입되고, 상응하는 공동이 제2 중쇄 폴리펩티드에 도입되는 "넙-인투-홀" 전략이다. "돌기"는 제1 폴리펩티드의 계면으로부터의 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄로 대체함으로써 구축된다. 돌기와 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "공동"은 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것으로 대체함으로써 제2 폴리펩티드의 계면에서 생성된다 (미국 특허 5,731,168). EP1870459 (추가) 및 W02009089004 (암젠)는 숙주 세포에서의 상이한 항체 도메인의 공동-발현 시 이중이량체 형성을 선호하는 다른 전략을 기재한다. 이들 방법에서, 둘 다의 CH3 도메인에서 CH3-CH3 계면을 구성하는 1개 이상의 잔기는 동중이량체 형성이 정전기적으로 비선호되고, 이중이량체화가 정전기적으로 선호되도록 하전된 아미노산으로 대체된다. W02007110205 (머크)는 IgA 및 IgG CH3 도메인 사이의 차이가 이용되어 이중이량체화를 촉진시키는 또한 또 다른 전략을 기재한다.
- [0204] 이중특이적 항체를 생산하는 또 다른 시험관내 방법은 W02008119353 (젠랩)에 기재되었고, 여기서 이중특이적 항체는 환원 조건 하에서 인큐베이션 시 2개의 단일특이적 IgG4- 또는 IgG4-유사 항체 사이의 "Fab-아암" 또는 "절반-분자" 교환 (중쇄 및 부착된 경쇄의 스와핑)에 의해 형성된다. 생성된 산물은 상이한 서열을 포함할 수 있는 2개의 Fab 아암을 갖는 이중특이적 항체이다.
- [0205] 본 발명의 이중특이적 CD3xCD30 항체를 제조하는 바람직한 방법은 하기 단계를 포함하는 W02011131746 및 W013060867 (젠랩)에 기재된 방법을 포함한다:
- [0206] a) Fc 영역을 포함하는 제1 항체를 제공하며, 상기 Fc 영역은 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 단계;
- [0207] b) 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 항체를 제공하며, 상기 Fc 영역은 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,
- [0208] 여기서 제1 항체는 CD30 항체이고, 제2 항체는 CD3 항체이거나, 또는 그 반대의 경우이고;
- [0209] 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체성 상호작용

이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것임;

[0210] c) 상기 제1 항체를 환원 조건 하에서 상기 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및

[0211] d) 상기 이중특이적 CD3xCD30 항체를 수득하는 단계.

[0212] 유사하게, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 다중특이적, 예컨대 이중특이적 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다:

[0213] a) 본원에 기재된 바와 같은 CD30 결합 영역을 포함하는 제1 동종이량체성 항체, 및 본원에 기재된 바와 같은 CD3 결합 영역을 포함하는 제2 동종이량체성 항체를 제공하며, 여기서 상기 항체는 Fc 영역을 포함하고, 임의로 본원에 기재된 추가의 특색을 함유하고,

[0214] 여기서 제1 및 제2 항체의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체성 상호작용이 제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것인

[0215] 단계;

[0216] b) 힌지 영역에서의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪는 것을 허용하는데 충분한 환원 조건 하에서 제1 항체를 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및

[0217] c) 제1 항체의 제1 이뮤노글로불린 중쇄 및 제1 이뮤노글로불린 경쇄 및 제2 항체의 제2 이뮤노글로불린 중쇄 및 제2 이뮤노글로불린 경쇄를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 이중이량체성 다중특이적 항체를 수득하는 단계.

[0218] 한 실시양태에서, 상기 제1 항체는 상기 제2 항체와 함께 힌지 영역에서의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪는 것을 허용하는데 충분한 환원 조건 하에서 인큐베이션되고, 여기서 생성된 이중이량체성 항체에서의 상기 제1 및 제2 항체 사이의 이중이량체성 상호작용은 37°C에서 24시간 후 0.5 mM GSH에서 Fab-아암 교환이 일어나지 않도록 하는 것이다.

[0219] 이론에 제한되지는 않지만, 단계 c)에서, 모 항체의 힌지 영역에서의 중쇄 디설피드 결합은 환원되고, 생성된 시스테인은 이어서 또 다른 모 항체 분자 (원래 상이한 특이성을 가짐)의 시스테인 잔기를 갖는 중쇄간 디설피드 결합을 형성할 수 있다. 이 방법의 한 실시양태에서, 단계 c)에서의 환원 조건은 환원제, 예를 들어 2-메르캅토에틸아민 (2-MEA), 디티오프레이톨 (DTT), 디티오에리트릴 (DTE), 글루타티온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP), L-시스테인 및 베타-메르캅토-에탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 환원제, 바람직하게는 2-메르캅토에틸아민, 디티오프레이톨 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀으로 이루어진 군으로부터 선택되는 환원제의 첨가를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 환원제는 2-메르캅토에틸아민이다. 추가의 실시양태에서, 단계 c)는 예를 들어 환원제의 제거에 의해, 예를 들어 탈염에 의해, 조건을 비-환원 또는 덜 환원이 되도록 복원하는 것을 포함한다.

[0220] 추가의 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 단일특이적 항체에 관한 것이다:

[0221] (i) 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제1 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및

[0222] (ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄에서 위치 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 R로의 치환이고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 Fc 영역.

[0223] 한 실시양태에서, 제1 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 포함하고, 제1 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 14에 제시된 서열을 포함한다.

[0224] 추가의 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 단일특이적 항체에 관한 것이다:

[0225] (i) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역, 및

[0226] (ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및

L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄에서 위치 G236에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 치환을 추가로 포함하며, 여기서 치환은 바람직하게는 R로의 치환이고, 여기서 아미노산 위치는 Eu 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 것인 Fc 영역.

- [0227] 한 실시양태에서, 서열식별번호: 9에서 X는 H이다. 또 다른 실시양태에서, 서열식별번호: 9에서 X는 G이다. 한 실시양태에서, 제2 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 포함하고, 제2 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 16에 제시된 서열을 포함한다.
- [0228] 한 실시양태에서, 상기 언급된 단일특이적 항체는 전장 항체이다. 바람직하게는, 인간 IgG1 중쇄에서 T366, L368, K370, D399, F405, Y407 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 중 적어도 하나는 치환되어 있으며, 여기서 바람직하게는, F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 L이거나 또는 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 R이다.
- [0229] 추가의 측면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 다중특이적 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다:
- [0230] a) 상기 본원에 기재된 바와 같은 제1 단일특이적 CD30 항체 및 하기를 포함하는 제2 항체를 제공하거나:
- [0231] (i) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역, 및
- [0232] (ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환, 및 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 A로의 치환을 포함하는 것인 Fc 영역,
- [0233] 또는
- [0234] 상기 본원에 기재된 바와 같은 제2 단일특이적 CD3 항체 및 하기를 포함하는 제1 항체를 제공하는 단계:
- [0235] (i) 서열식별번호: 1, 2 및 3에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 4, 5 및 6에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD30 결합 영역, 및
- [0236] (ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환, 및 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 A로의 치환을 포함하는 것인 Fc 영역,
- [0237] 여기서 제1 및 제2 항체의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체성 상호작용이 제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것이고; 여기서 바람직하게는 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제1 CH3 영역에서 L이고, K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제2 CH3 영역에서 R이거나, 또는 그 반대의 경우임;
- [0238] b) hinge 영역에서의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪는 것을 허용하는데 충분한 환원 조건 하에서 제1 항체를 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및
- [0239] c) 제1 항체의 제1 이뮤노글로불린 중쇄 및 제1 이뮤노글로불린 경쇄 및 제2 항체의 제2 이뮤노글로불린 중쇄 및 제2 이뮤노글로불린 경쇄를 포함하는 다중특이적 항체를 수득하는 단계.
- [0240] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 다중특이적 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다:
- [0241] a) 본원에 기재된 바와 같은 제1 단일특이적 CD30 항체 및 하기를 포함하는 제2 항체를 제공하는 단계:
- [0242] (i) 서열식별번호: 7, 8 및 9에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 10, 11 및 12에 각각 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 제2 경쇄 가변 영역을 포함하는 CD3 결합 영역, 및
- [0243] (ii) 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드로 이루어진 Fc 영역으로서, 여기서 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 L234 및 L235에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 각각 F 및 E로의 치환, 및 인간 IgG1 중쇄에서 위치 D265에서의 아미노산에 상응하는 아미노산의 A로의 치환을 포함하는 것인 Fc 영역,

- [0244] 여기서 제1 및 제2 항체의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체성 상호작용이 제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것이고; 여기서 바람직하게는 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제1 CH3 영역에서 R이고, F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 제2 CH3 영역에서 L임;
- [0245] b) 힌지 영역에서의 시스테인이 디설피드-결합 이성질체화를 겪는 것을 허용하는데 충분한 환원 조건 하에서 제1 항체를 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및
- [0246] c) 제1 항체의 제1 이뮤노글로불린 중쇄 및 제1 이뮤노글로불린 경쇄 및 제2 항체의 제2 이뮤노글로불린 중쇄 및 제2 이뮤노글로불린 경쇄를 포함하는 다중특이적 항체를 수득하는 단계.
- [0247] 본 발명은 추가로 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 수득된 다중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0248] 상기 방법에서, CD30 및/또는 CD3에 결합할 수 있는 제1 또는 제2 동종이량체성 항체를 제공하는 단계는 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0249] - 상기 항체 또는 상기 항체들을 생산하기 위한 발현 벡터를 함유하는 세포를 제공하는 단계; 및
- [0250] - 세포가 상기 항체 또는 상기 항체들을 생산하는 것을 허용하는 단계 및 후속적으로,
- [0251] - 상기 항체 또는 상기 항체들을 수득하고, 이로써 상기 항체 또는 상기 항체들을 제공하는 단계.
- [0252] 이 방법의 한 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 동종이량체성 항체는 전장 항체이다.
- [0253] 제1 및 제2 항체 동종이량체성 항체의 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 이소타입의 것일 수 있다. 이 방법의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 동종이량체성 항체 둘 다의 Fc 영역은 IgG1 이소타입의 것이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 동종이량체성 항체의 Fc 영역 중 하나는 IgG1 이소타입의 것이고, 다른 것은 IgG4 이소타입의 것이다. 후자의 실시양태에서, 생성된 이중특이적 항체는 IgG1의 Fc 영역 및 IgG4의 Fc 영역을 포함하고, 따라서 이펙터 기능의 활성화에 관하여 흥미로운 중간 특성을 가질 수 있다.
- [0254] 추가의 실시양태에서, 동종이량체성 출발 항체 중 하나는 단백질 A에 결합하지 않도록 조작되었고, 따라서 산물을 단백질 A 칼럼 상으로 통과시킴으로써 동종이량체성 출발 항체로부터 이중이량체성 항체를 분리하고, 유통액을 제거하고, 단백질 A 칼럼으로부터 이중이량체성 항체를 용리하여, 정제된 이중이량체성 항체 조성물을 수득하는 것을 허용한다.
- [0255] 상기 기재된 바와 같이, 동종이량체성 출발 항체의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체성 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것일 수 있다. 이들 상호작용 및 이들이 달성될 수 있는 방법에 대한 보다 상세한 사항은 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 W02011131746 및 W02013060867 (젠맵)에 제공된다.
- [0256] 특히, 안정한 이중특이적 CD3xCD30 항체는 각각 CD30 및 CD3에 결합하고, CH3 영역에 단지 소수의 상당히 보존적인 비대칭적 돌연변이를 함유하는 2개의 동종이량체성 출발 항체에 기반하여 본 발명의 상기 방법을 사용하여 높은 수율로 수득될 수 있다. 비대칭적 돌연변이는 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 비-동일한 위치에 아미노산 치환을 함유함을 의미한다.
- [0257] 본 발명의 다중특이적, 예컨대 이중특이적 항체는 또한 단일 세포에서 제1 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 구축물의 공동-발현에 의해 수득될 수 있다.
- [0258] 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 코딩하는 핵산 구축물, 또는 핵산 구축물의 조합물, 및 이러한 핵산 구축물(들)을 포함하는 발현 벡터, 또는 발현 벡터의 조합물에 관한 것이다.
- [0259] 더욱이, 본 발명은 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 생산할 수 있는 재조합 숙주 세포로서, 여기서 숙주 세포는 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 코딩하는 1종 이상의 핵산 구축물을 포함하는 것인 재조합 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0260] 따라서, 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다:
- [0261] (i) 본 발명의 재조합 숙주 세포를 항체가 생산되는 조건 하에서 배양하는 단계, 및

- [0262] (ii) 생산된 다중특이적 항체를 배양물로부터 분리하는 단계.
- [0263] 한 실시양태에서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0264] a) 제1 항체 중쇄의 제1 Fc 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 구축물을 제공하며, 상기 제1 Fc 영역은 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,
- [0265] b) 제2 항체 중쇄의 제2 Fc 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산 구축물을 제공하며, 상기 제2 Fc 영역은 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,
- [0266] 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이중이량체성 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체성 상호작용의 각각보다 더 강하도록 하는 것이고, 임의로 여기서 상기 제1 및 제2 핵산 구축물은 상기 제1 및 제2 항체의 경쇄 서열을 코딩함,
- [0267] c) 숙주 세포에서 상기 제1 및 제2 핵산 구축물을 공동-발현하는 단계, 및
- [0268] d) 세포 배양물로부터 상기 이중이량체성 단백질을 수득하는 단계.
- [0269] 바람직하게는 F405에 상응하는 위치에서의 코딩된 아미노산은 제1 CH3 영역에서 L이고, K409에 상응하는 위치에서의 코딩된 아미노산은 제2 CH3 영역에서 R이거나, 또는 그 반대의 경우이다.
- [0270] 프로모터, 인핸서 등을 포함하는 적합한 발현 벡터, 및 항체의 생산을 위한 적합한 숙주 세포는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 숙주 세포의 예는 효모, 박테리아 및 포유동물 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소 세포(CHO) 또는 인간, 예컨대 인간 배아 신장(HEK) 세포를 포함한다.
- [0271] 본원에 정의된 바와 같은 핵산 또는 1종 이상의 핵산은 RNA 또는 DNA일 수 있다. 본원에 정의된 바와 같은 핵산 또는 1종 이상의 핵산은 포유동물 세포에서의 발현에 사용하기 위한 것일 수 있다. 따라서, 더욱이 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 핵산을 포함하거나, 또는 1종 이상의 핵산을 포함하는 세포 또는 세포들을 제공한다.
- [0272] 본 발명의 맥락에서 핵산은 염색체, 비-염색체, 및 합성 핵산 벡터 (발현 제어 요소의 적합한 세트를 포함하는 핵산 서열)를 포함하는 임의의 적합한 벡터일 수 있는 발현 벡터일 수 있다. 이러한 벡터의 예는 SV40의 유도체, 박테리아 플라스미드, 파지 DNA, 바쿨로바이러스, 효모 플라스미드, 플라스미드 및 파지 DNA의 조합으로부터 유래된 벡터, 및 바이러스 핵산 (RNA 또는 DNA) 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, CD30 또는 CD3 항체-코딩 핵산은 예를 들어, 선형 발현 요소 (예를 들어 문헌 [Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355 59 (1997)]에 기재된 바와 같음), 콤팩트화 핵산 벡터 (예를 들어 US 6,077, 835 및/또는 WO 00/70087에 기재된 바와 같음), 플라스미드 벡터, 예컨대 pBR322, pUC 19/18, 또는 pUC 118/119, "각다귀" 최소-크기 핵산 벡터 (예를 들어 문헌 [Schakowski et al., Mol Ther 3, 793 800 (2001)]에 기재된 바와 같음), 또는 침전된 핵산 벡터 구축물, 예컨대 CaP04-침전된 구축물로서 (예를 들어 WO200046147, 문헌 [Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551 55 (1986)], [Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)], 및 [Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)]에 기재된 바와 같음)를 포함하는 네이키드 DNA 또는 RNA 벡터에 포함된다. 이러한 핵산 벡터 및 그의 용법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어 US 5,589,466 및 US 5,973,972 참조).
- [0273] 한 실시양태에서, 벡터는 박테리아 세포에서의 CD30 항체 및/또는 CD3 항체의 발현에 적합하다. 이러한 벡터의 예는 발현 벡터, 예컨대 블루스크립트(BlueScript) (스트라타진(Stratagene)), pIN 벡터 (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503 5509 (1989), pET 벡터 (노바젠(Novagen), 미국 위스콘신주 매디슨) 등)를 포함한다.
- [0274] 발현 벡터는 또한 또는 대안적으로 효모 시스템에서의 발현에 적합한 벡터일 수 있다. 효모 시스템에서의 발현에 적합한 임의의 벡터가 채용될 수 있다. 적합한 벡터는 예를 들어, 구성적 또는 유도성 프로모터, 예컨대 알파 인자, 알콜 옥시다제 및 PGH를 포함하는 벡터 (문헌 [F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)], 및 [Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516 544 (1987)]에서 검토됨)를 포함한다.
- [0275] 핵산 및/또는 발현 벡터는 또한 폴리펩티드, 예컨대 발생기 폴리펩티드 쇄를 주변세포질 공간에 또는 세포 배양 배지 내로 표적화할 수 있는 분비/국제화 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 분비 리더 또는 신호 펩티드를 포함한다. 핵산 및/또는 발현 벡터는 (이중특이적) 항체의 성분이 발현되도록 발현, 즉, 핵산의 전사 및/또는 번역을 용이하게 하는 임의의 적합한

요소를 포함할 수 있다. 핵산 및/또는 벡터는 임의의 적합한 프로모터, 인핸서, 및 다른 발현-용이화 요소와 회합될 수 있다. 이러한 요소의 예는 강한 발현 프로모터 (예를 들어, 인간 CMV IE 프로모터/인핸서 뿐만 아니라 RSV, SV40, SL3 3, MMTV, 및 HIV LTR 프로모터), 유효한 폴리 (A) 종결 서열, 이. 콜라이에서의 플라스미드 산물에 대한 복제 기점, 선택가능한 마커로서 항생제 저항성 유전자, 및/또는 편리한 클로닝 부위 (예를 들어, 폴리링커)를 포함한다. 핵산은 또한 구성적 프로모터, 예컨대 CMV IE와 반대로 유도성 프로모터를 포함할 수 있다.

[0276] 조성물 및 (의학적) 용도

[0277] 더욱이, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 이러한 조성물은 제약 조성물이며, 즉, 항체는 제약상 허용되는 담체에 포함된다.

[0278] 제약 조성물은 통상적인 기술, 예컨대 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에 개시된 것들에 따라 제제화될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 예를 들어 희석제, 충전제, 염, 완충제, 세정제 (예를 들어, 비이온성 세정제, 예컨대 트윈(Tween)-20 또는 트윈-80), 안정화제 (예를 들어, 당 또는 단백질-무함유 아미노산), 보존제, 조직 고정제, 가용화제, 및/또는 제약 조성물에 포함시키는데 적합한 다른 물질을 포함할 수 있다.

[0279] 제약 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식에 의해 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 그 제약 조성물은 정맥 내 또는 피하 주사 또는 주입에 의해 투여된다.

[0280] 본 발명에 따른 항체, 조성물, 또는 제약 조성물은 바람직하게는 의약으로서 사용하기 위한 것이다.

[0281] 본 발명에 따른 항체, 조성물, 또는 제약 조성물은 바람직하게는 질환의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0282] 특히, 본 발명의 이중특이적 항체는 다양한 형태의 암의 치료에 사용될 수 있다.

[0283] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 본 발명의 다중특이적 항체의 치료 유효량의 투여를 포함하는 방법을 제공한다. 추가의 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서 CD30을 발현하는 세포를 수반하는 장애를 치료하는 방법으로서, 본 발명의 다중특이적 항체의 치료 유효량의 투여를 포함하는 방법을 제공한다.

[0284] 상기와 같이, 본 발명에 따른 방법 및 용도에서 고려될 수 있는 적합한 질환은 암이다. 상기 암은 가장 바람직하게는 CD30의 발현을 특징으로 한다. 암에서의 CD30의 발현은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 PCR, 면역염색, 또는 FACS 분석, 즉, CD30 전사체 및/또는 단백질의 발현을 검출하는 것을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다. 인간 CD30에 결합할 수 있는 본원에 기재된 바와 같은 항체는 예를 들어 면역염색 및/또는 FACS 분석 등에 사용될 수 있다.

[0285] 한 측면에서, 본 발명은 호지킨 림프종 또는 역형성 대세포 림프종의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 다중특이적 항체, 조성물 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0286] 추가의 측면에서, 본 발명은 호지킨 림프종 (HL) 또는 비-호지킨 림프종 (NHL)의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 다중특이적 항체, 조성물 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0287] 한 실시양태에서, 호지킨 림프종은 고전적 호지킨 림프종 (cHL)이다.

[0288] 한 실시양태에서, 비-호지킨 림프종은 T 세포 비-호지킨 림프종 (T-NHL) 또는 B 세포 비-호지킨 림프종 (B-NHL)이다. 추가의 실시양태에서, 비-호지킨 림프종은 T 세포 비-호지킨 림프종 (T-NHL)이다.

[0289] 추가의 실시양태에서, T 세포 비-호지킨 림프종은 말초 T-세포 림프종 (PTCL) 또는 피부 T-세포 림프종 (CTCL)이다. 또한 추가의 실시양태에서, T 세포 비-호지킨 림프종 (T-NHL)은 역형성 대세포 림프종 (ALCL)이다. 또한 추가의 실시양태에서, 말초 T-세포 림프종 (PTCL)은 역형성 대세포 림프종 (ALCL)이다.

[0290] 한 실시양태에서, B 세포 비-호지킨 림프종 (B-NHL)은 외투 세포 림프종 (MCL)이다.

[0291] 또한 추가의 실시양태에서, 호지킨 림프종 (HL)은 재발성 및 난치성 호지킨 림프종이다. 추가의 실시양태에서, 호지킨 림프종 (HL)은 CD30+ 호지킨 림프종이다. 또한 추가의 실시양태에서, 호지킨 림프종 (HL)은 재발성 및 난치성 CD30+ 호지킨 림프종이다. 또한 추가의 실시양태에서, 호지킨 림프종 (HL)은 재발성 및 난치성 CD30+ 고전적 호지킨 림프종이다.

[0292] 또한 추가의 실시양태에서, 비-호지킨 림프종 (NHL)은 재발성 및 난치성 비-호지킨 림프종이다. 추가의 실시양

태에서, 비-호지킨 림프종 (NHL)은 CD30+ 비-호지킨 림프종이다. 또한 추가의 실시양태에서, 비-호지킨 림프종 (NHL)은 재발성 및 난치성 CD30+ 비-호지킨 림프종이다.

[0293] 추가의 실시양태에서, 호지킨 림프종 (HL) 또는 비-호지킨 림프종 (NHL)의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 다중특이적 항체, 조성물 또는 제약 조성물은 정맥내로 및/또는 피하로, 바람직하게는 피하로 투여되거나 또는 투여되었다.

[0294] 추가의 실시양태에서, 암으로 진단된 환자는 암 세포에서 CD30 발현이 평가될 수 있으며, 낮은 내지 높은 범위 일 수 있는 CD30이 검출되는 경우, 이러한 환자는 본 발명에 따른 항체로의 치료를 위해 선택될 수 있다. 그러나, 치료를 위한 환자를 선택하는데 있어서 이러한 평가를 포함하는 것이 반드시 요건이지 않을 수 있다.

[0295] 본 발명의 다중특이적 항체는 CD30을 발현하는 세포를 수반하는 장애의 진단 및 치료를 수반하는 다수의 시험관 내 및 생체내 진단적 및 치료적 유용성을 갖는다. 예를 들어, 항체는 다양한 장애를 치료하고/거나, 예방하고/거나, 진단하기 위해, 배양에서, 예를 들어, 시험관내에서 또는 생체외에서 세포에, 또는 예를 들어, 생체내에서 대상체에게 투여될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "대상체"는 인간 및 비-인간 개체를 포함하는 것으로 의도된다.

[0296] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 어느 하나에 따른 다중특이적 항체를 포함하는 진단 조성물에 관한 것이다.

[0297] 한 실시양태에서, 진단 조성물은 다중특이적 항체로의 치료로부터 이익을 얻을 환자를 스크리닝하고 선택하는데 사용되는 동반 진단제이다.

[0298] 키트

[0299] 본 발명은 상기 개시된 바와 같은 항체를 포함하는 파트들의 키트, 예컨대 동반 진단제로서 사용하기 위한/환자의 집단 내에서 상기 본원에 정의된 바와 같은 항체로의 치료에 반응하는 경향을 갖는 환자를 확인하기 위한, 또는 환자의 치료에 사용되는 경우 상기 항체의 효능 또는 항-종양 활성을 예측하기 위한 키트로서, 상기 정의된 바와 같은 항체; 및 상기 키트의 사용을 위한 지시서를 포함하는 것인 파트들의 키트를 추가로 제공한다.

[0300] 한 실시양태에서, 본 발명은 다중특이적 CD3xCD30 항체, 및 CD30 발현 세포 및 CD3 발현 세포의 가교를 검출하기 위한 1종 이상의 시약을 포함하는 용기를 포함하는 암의 진단을 위한 키트를 제공한다. 시약은 예를 들어, 형광 태그, 효소 태그, 또는 다른 검출가능한 태그를 포함할 수 있다. 시약은 또한 2차 또는 3차 항체 또는 효소 반응을 위한 시약을 포함할 수 있고, 여기서 효소 반응은 시각화될 수 있는 산물을 생산한다.

[0301] 추가의 측면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 어느 하나에 따른 다중특이적 항체의 투여 시, CD30- 및 CD3-발현 세포 사이의 가교가 환자로부터 유래된 샘플에서 발생하는지 여부를 검출하는 방법에 관한 것이다:

[0302] (i) 샘플을 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 어느 하나에 따른 다중특이적 항체와, 상기 이중특이적 항체 및 CD30-발현 세포 및 CD3-발현 세포 사이의 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에서 접촉시키는 단계; 및

[0303] (ii) 복합체가 형성되었는지 여부를 분석하는 단계.

[0304] 핵산 구축물의 전달 및 전달 비히클

[0305] 추가의 측면에서, 본 발명은 생체내 발현을 위한 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 구축물의 투여에 관한 것이다. 항체를 코딩하는 핵산의 생체내 발현을 위해, 상기 핵산은 전형적으로 핵산이 대상체의 세포에 들어가는 데 적합한 형태로 투여된다. 생체내 발현을 위한 핵산을 전달하는 상이한 방법이 존재하며, 기계적 및 화학적 수단을 수반하는 방법 둘 다를 포함한다. 예를 들어, 이러한 방법은 전기천공 또는 핵산을 피부 상으로 타투화하는 것을 수반할 수 있다 (Patel et al., 2018, Cell Reports 25, 1982-1993). 대상체에서의 핵산의 투여에 적합한 다른 방법은 적합한 제제에서의 핵산의 투여를 수반한다.

[0306] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 또는 핵산의 조합물을 포함하는 전달 비히클에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 전달 비히클은 지질 제제일 수 있다. 제제의 지질은 입자(들), 예컨대 지질 나노입자(들) (LNP)일 수 있다. 본 발명의 핵산 또는 핵산의 조합물은 상기 입자 내에, 예를 들어 상기 LNP 내에 캡슐화될 수 있다. 생체내 발현을 위한 대상체에서의 핵산의 투여에 적합한 상이한 지질 제제는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 지질 제제는 전형적으로 지질, 이온화가능한 아미노지질, PEG-지질, 콜레스테롤 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

- [0307] 치료 항체의 발현을 위한 대상체로의 핵산의 투여에 적합한 지질 제제의 제조를 위한 다양한 형태 및 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 지질 제제의 예는 US20180170866 (아크투루스(Arcturus)), EP 2391343 (아부투스(Arbutus)), WO 2018/006052 (프로티바(Protiva)), WO2014152774 (샤이어 휴먼 제네틱스(Shire Human Genetics)), EP 2 972 360 (트랜슬레이트 바이오(Translate Bio)), US10195156 (모더나(Moderna)) 및 US20190022247 (아퀴타스(Acuitas))에 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0308] 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 바람직하게는 암의 치료에, 예컨대 호지킨 림프종 또는 역형성 대세포 림프종의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 핵산 구축물(들) 또는 본 발명에 따른 전달 비히클에 관한 것이다.
- [0309] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0310] **실시예**
- [0311] **실시예 1 - 2-MEA-유도된 Fab-아암 교환에 의한 CD3xCD30 이중특이적 항체의 생성**
- [0312] 하기 항체가 실시예에서 사용되었다:
- [0313] 인간화 CD3 항체
- [0314] WO2015/001085 (젠맵)의 실시예 1에 기재된 바와 같은 IgG1-huCD3-H1L1. IgG1-huCD3-H1L1은 본원에서 'IgG1-huCD3'으로 지칭된다.
- [0315] WO2017/009442 (젠맵)의 실시예 2에 기재된 바와 같은 IgG1-huCD3-H1L1-H101G. IgG1-huCD3-H1L1-H101G는 본원에서 'IgG1-huCD3-H101G'로 지칭된다.
- [0316] CD30 항체
- [0317] HuMab 5F11로도 지칭되는 MDX-060은 WO2003/059282 (메다렉스)에 개시되었다. hAC10 (또는 SGN-30)은 US 8257706 및 US20100239571 (시아틀 제네틱스)에 개시되었다. HRS-3은 WO2016/0177846 (아피메드)에 개시되었다. HeFi-1, T405, T105, T408, 및 T215는 WO 2007/040653 (유에스 가버먼트 앤드 헬스)에 개시되었다.
- [0318] 항체 발현
- [0319] 항체 서열을 pcDNA3.3 발현 벡터 (인비트로젠(Invitrogen), 미국) 내로 클로닝하고, Fc 도메인에서 Fc-침묵화 및/또는 듀오바디® 기술 아미노산 치환과 함께 또는 없이, IgG1, κ 또는 IgG1, λ 로서 발현하였다 (하기 참조). 모든 항체를 혈청-무함유 조건 하에서, 특히 제조업체에 의해 기재된 바와 같이, 관련된 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 Expi293F™ 세포 (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 미국; 카탈로그 번호 A14527)에서 엑스피펙타민(ExpiFectamine)™ 293 (써모 피셔 사이언티픽; 카탈로그 번호 A14525)을 사용하여 공동-형질감염시킴으로써 생산하였다.
- [0320] 이중특이적 항체의 생성
- [0321] 이중특이적 항체를 듀오바디® 플랫폼 기술, 즉, WO2011147986, WO2011131746 및 WO2013060867 (젠맵) 및 문헌 [Labriijn et al. (Labriijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50); [Gramer et al., MAbs 2013, 5: 962- 973)]에 기재된 바와 같은 2-MEA-유도된 제어된 Fab-아암 교환 (cFAE)을 사용하여 시험관내에서 생성하였다. 이 방법에 의한 이중특이적 항체의 생성을 가능하게 하기 위해, CH3 도메인에 단일 돌연변이를 운반하는 IgG1 분자를 생성하였다: 하나의 모 IgG1 항체에서 F405L 돌연변이 (즉, CD3 항체 또는 대조군, HIV-1 gp120-특이적 항체), 다른 모 IgG1 항체에서 K409R 돌연변이 (즉, CD30 또는 대조군 항체). 이들 돌연변이에 추가로, 모 IgG1 항체는 IgG Fc 수용체 (Fc 감마 수용체)와 상호작용할 수 없는 Fc 도메인 및/또는 보체 인자, 예컨대 C1q: L234F, L235E, D265A (FEA; US 2015/0337049) 또는 L234F, L235E, G236R (FER)을 발생시키는 치환을 포함하였다.
- [0322] Fc 침묵화 및 듀오바디® 기술 돌연변이의 조합은 하기와 같이 표시되었다:
- [0323] L234F, L235E, D265A, 및 F405L: FEAL
- [0324] L234F, L235E, D265A, 및 K409R: FEAR
- [0325] L234F, L235E, G236R, 및 K409R: FERR

- [0326] 모 항체의 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC) 서열은 하기 서열식별번호에 제시된다:
- [0327] IgG1-huCD3-FEAL: 서열식별번호: 19 (HC) 및 서열식별번호: 20 (LC).
- [0328] IgG1-huCD3-H101G-FEAL: 서열식별번호: 35 (HC) 및 서열식별번호: 20 (LC).
- [0329] IgG1-CD30-MDX060-FERR: 서열식별번호: 17 (HC) 및 서열식별번호: 18 (LC).
- [0330] IgG1-CD30-MDX060-FEAR: 서열식별번호: 55 (HC) 및 서열식별번호: 18 (LC).
- [0331] IgG1-CD30-hAC10-FEAR: 서열식별번호: 21 (HC) 및 서열식별번호: 22 (LC).
- [0332] IgG1-CD30-HRS-3-FEAR: 서열식별번호: 23 (HC) 및 서열식별번호: 24 (LC).
- [0333] IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR: 서열식별번호: 25 (HC) 및 서열식별번호: 26 (LC).
- [0334] IgG1-CD30-T405-FEAR: 서열식별번호: 27 (HC) 및 서열식별번호: 28 (LC).
- [0335] IgG1-CD30-T105-FEAR: 서열식별번호: 29 (HC) 및 서열식별번호: 30 (LC).
- [0336] IgG1-CD30-T408-FEAR: 서열식별번호: 31 (HC) 및 서열식별번호: 32 (LC).
- [0337] IgG1-CD30-T215-FEAR: 서열식별번호: 33 (HC) 및 서열식별번호: 34 (LC).
- [0338] 이중특이적 항체를 생성하기 위해, 2가지 모 항체를 동등한 몰비로 PBS 완충제 (포스페이트 완충 염수; 8.7 mM HPO_4^{2-} , 1.8 mM H_2PO_4^- , 163.9 mM Na^+ , 140.3 mM Cl^- , pH 7.4)에서 혼합하였다. 2-메르캅토에틸아민-HCl (2-MEA)을 75 mM의 최종 농도로 첨가하고, 반응 혼합물을 31°C에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 2-MEA를 10 kDa 분자량 컷오프 슬라이드-A-레이저(Slide-A-Lyzer) 캐리지 (써모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 PBS 완충제 내로의 투석에 의해 제거하였다. 샘플을 4 °C에서 밤새 저장하여 디술피드 결합의 재-산화 및 무손상 이중특이적 항체의 형성을 허용하였다. cFAE의 효능은 문헌 [Gramer et al. (MAbs. 2013 Nov 1; 5(6): 962-973.)]에 기재된 바와 같은 전자분무 이온화 질량 분광법 (ESI-MS)에 의해 평가된 바와 같이 >95 %였다.
- [0339] 비-결합 대조군 항체 b12
- [0340] IgG1-b12는 음성, 비-결합 대조군 항체로서 실시예의 일부에서 사용된 HIV-1 gp120 특이적 항체 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230(3):812-23)이다. 중쇄의 서열 및 경쇄의 서열은 본원에서 각각 서열식별번호: 36 및 37 (FEAL) 또는 각각 서열식별번호: 38 및 37 (FERR)로서 포함된다.
- [0341] **실시예 2 - 인간 호지킨 림프종 (HL), 역형성 대세포 림프종 (ALCL) 및 TLL 세포주에서의 CD30 발현**
- [0342] CD30 표면 발현 수준을 정량적 유동 세포계측법 (인간 IgG 교정 키트, 바이오사이텍스, 카탈로그 번호 CP010)을 사용하여 HL, ALCL 및 TLL 세포주의 패널에서 평가하였다 (표 4). 세포 (5×10^4 개 세포/웰)를 폴리스티렌 96-웰 둥근 바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원(Greiner bio-one), 카탈로그 번호 650180)에서 0.1% 소 혈청 알부민 [BSA, 분획 V, 로슈, 카탈로그 번호 10735086001] 및 0.02% NaN_3 [시그마 알드리치(Sigma Aldrich), 카탈로그 번호 13412])으로 보충된 50 μL 염색 완충제 (PBS [론자(Lonza), 카탈로그 번호 BE17-517Q] 중 10 $\mu\text{g/mL}$ IgG1-CD30-MDX060-FERR과 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 병행하여, 표준 곡선을 인간 IgG 교정 키트 (바이오사이텍스, 카탈로그 번호 CP010)를 사용하여, 본질적으로 제조업체의 지시서에 따라 생성하였다. 비드당 인간 IgG 모노클로날 항체의 널리 정의된 수를 함유하는 교정 비드를 동일한 R-PE-접합된 2차 항체 (잭슨 면역리서치(Jackson ImmunoResearch), 영국; 카탈로그 번호 109-116-098; 1:500 희석)와 광으로부터 보호된 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포 및 비드를 FACS 완충제에서 세척하고, FACS셀레스타(FACSCelesta) 유동 세포계측기 (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences), 미국) 상에서 유동 세포계측법에 의해 분석하였다. 인간 IgG 교정 키트를 사용하여 얻어진 표준 곡선을 사용하여 세포당 결합된 IgG1-CD30-MDX060-FERR 항체의 수 (ABC)를 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 내삽하였으며, 이는 세포 표면 상에 발현된 CD30 분자의 수의 추정치를 나타낸다.
- [0343] 표 4 및 5는 SUP-T1을 제외한 모든 세포주에서 정량화의 하한 (LLOQ) 초과 CD30 발현이 관찰되었음을 제시한다.

[0344] 표 4: 세포주 및 CD30의 발현의 개관

세포주	종양 유형	카탈로그	공급업체	CD30 발현 (ABC)		
				중양값	범위	n
L-540	HL	ACC 72	DSMZ	145,723	61,779-271,304	3
L-428	HL	ACC 197	DSMZ	120,725	102,787-133,437	3
HDLM-2	HL	CRL-2965	ATCC	56,578	51,737-87,841	3
KM-H2	HL	ACC 8	DSMZ	19,720	17,283-29,129	3
NCEB-1	MCL	CRL-3005	ATCC	15,406	11,102-18,333	3
L-1236	HL	ACC 530	DSMZ	4,548	4,054-4,838	3
L-82	ALCL	ACC 597	DSMZ	127,616	70,495-172,019	3
SR-786	ALCL	ACC 369	DSMZ	104,947	69,630-133,464	3
KI-JK	ALCL	ACC 695	DSMZ	124,669	77,610-139,598	3
DEL	ALCL	ACC 338	DSMZ	122,003	55,416-153,484	3
SUP-M2	ALCL	ACC 509	DSMZ	6,129	37,047-93,777	3
SU-DHL-1	ALCL	ACC 356	DSMZ	75,238	72,529-80,697	2
HuT 78	ALCL	TIB-161	ATCC	19,399	20,608-18,189	2
SUP-T1	TLL	CRL-1942	ATCC	<LLOQ ^a	-	3

[0345]

[0346] 표 5: 세포주 및 CD30의 평균 발현의 개관

세포주	종양 유형	카탈로그	공급업체	CD30 발현 (ABC)		
				평균	범위	n
DEL	ALCL	ACC 338	DSMZ	110,301	55,416 - 153,484	3
DL-40	ALCL	JCRB1337	JCRB	98,174	60,392 - 156,229	3
HDLM-2	HL	CRL-2965	ATCC	64,510	51,737 - 87,841	3
HH	CTCL	ACC 707	DSMZ	161,740	122,598 - 206,774	3
HuT 78	ALCL	TIB-161	ATCC	19,399	20,608-18,189	2
JVM-2	MCL	ACC 12	DSMZ	25,842	12,644 - 43,081	3
KARPAS-299	ALCL	06072604	PHE	91,426	77,730-106,058	3
KI-JK	ALCL	ACC 695	DSMZ	118,794	77,610 - 139,598	3
KM-H2	HL	ACC 8	DSMZ	22,044	17,283 - 29,129	3
L-1236	HL	ACC 530	DSMZ	4,480	4,054 - 4,838	3
L-428	HL	ACC 197	DSMZ	117,743	102,787 - 133,437	3
L-540	HL	ACC 72	DSMZ	159,602	61,779 - 271,304	3
L-82	ALCL	ACC 597	DSMZ	127,616	70,495 - 172,019	3
NCEB-1	MCL	CRL-3005	ATCC	14,947	11,102 - 18,333	3
SR-786	ALCL	ACC 369	DSMZ	104,497	69,630 - 133,464	3
SU-DHL-1	ALCL	ACC 356	DSMZ	76,613	72,529-80,697	2
SUP-M2	ALCL	ACC 509	DSMZ	66,129	37,047 - 93,777	3
SUP-T1	TLL	CRL-1942	ATCC	<LLOQ ^a	-	3

[0347]

[0348] ^a <LLOQ, 정량화의 하한 (3300개의 ABC) 미만

[0349] 실시예 3 - 인간 호지킨 림프종 (HL) 및 비-호지킨 림프종 (NHL), 예컨대 역형성 대세포 림프종 (ALCL) 세포에 의 CD3xCD30 이중특이적 항체의 결합

[0350] 2가지 CD30-발현 인간 종양 세포주 SU-DHL-1 (ALCL; ATCC, 카탈로그 번호 ACC 356) 및 HDLM-2 (HL; ATCC, 카탈로그 번호 CRL-2965)에의 CD3xCD30 이중특이적 항체의 결합을 유동 세포계측법에 의해 분석하였다.

[0351] 세포 (3x10⁴ 개 세포/웰)를 폴리스티렌 96-웰 둥근 바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원, 카탈로그 번호 650180)에서 50 μL 염색 완충제 중 항체의 시리즈 희석물 (3배 희석 단계에서 범위 0.0046 내지 10 μg/mL)과 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 염색 완충제에서 2회 세척한 후, 세포를 50 μL 2차 항체와 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 2차 항체로서, 염색 완충제에 1:400 희석된 R-PE-접합된 염소-항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치, 영국; 카탈로그 번호 109-116-098)를 사용하였다. 다음으로, 세포를 염색 완충제에서 2회 세척하고, TO-PRO-3 아이오다이드 (썬모 피셔 사이언티픽; 카탈로그 번호 T3605; 1:8000 희석)로 보충된 100 μL 염색 완충제

에 재현타시킴, FACS셀레스타 유동 세포계측기 (비디 바이오사이언시스, 미국) 상에서 분석하였다. 살아있는 세포를 FSC/SSC, 및 TOPRO-3 염색의 부재에 기반하여 게이팅하였다. 결합 곡선을 그래프패드 프리즘 V7.02 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software), 미국 캘리포니아주 샌 디에고)를 사용하여 로그-변환된 데이터 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응, 4개의 파라미터)의 비-선형 회귀에 의해 분석하였다.

[0352] 결과

[0353] **도 1**은 SU-DHL-1 (좌측 패널) 및 HDLM-2 (우측 패널) 종양 세포에의 CD3xCD30 이중특이적 항체 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR (A), bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR (B), bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR (C), BsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR (D), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR (E), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR (F), BisIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR (G) 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR (H)의 용량-반응 결합 곡선을 제시한다.

[0354] 1.11 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR은 단일특이적, 2가 CD30 모 항체 IgG1-CD30-MDX060-FEAR, IgG1-CD30-hAC10-FEAR, IgG1-CD30-HRS-3-FEAR 및 IgG1-CD30-T105-FEAR의 결합과 비교할 경우 유사한 결합을 나타내었다 (도 1I).

[0355] 대조적으로, 1.11 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR의 결합은 SU-DHL-1 및 HDLM-2 세포에의 단일특이적, 2가 CD30 모 항체 IgG1-CD30-T405-FEAR, IgG1-CD30-T408-FEAR 및 IgG1-CD30-T215-FEAR의 결합보다 더 낮았다 (도 1I).

[0356] 전체적으로, 1.11 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, BsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR의 결합은 동일한 농도에서 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR의 결합보다 더 높았다 (도 1I).

[0357] 이들 실험에 포함된 음성 대조군 항체 BsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR은 SU-DHL-1 및 HDLM-2 세포에의 결합을 나타내지 않았으며, 이는 SU-DHL-1 세포도 HDLM-2 세포도 CD3을 발현하지 않음을 지시한다.

[0358] 결론적으로, CD30 항체 클론 T405, T408 및 T215는 2가 포맷과 비교하여 1가에서 감소된 결합을 나타낸 반면, 클론 MDX060, hAC10, HRS-3 및 T105는 1가 및 2가 포맷 둘 다에서 CD30-발현 종양 세포에의 효율적인 결합을 나타내었다.

[0359] **도 2**는 (A) HDLM-2 (HL), (B) L-428 (HL), (C) DEL (ALCL), 및 (D) KI-JK (ALCL) 세포에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 용량-반응 결합 곡선을 제시한다. BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR은 단일특이적, 2가 CD30 모 항체 IgG1-CD30-MDX060-FERR과 비교할 경우 유사한 최대 결합을 나타내었다. 음성 대조군 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, IgG1-huCD3-FEAL, 및 IgG1-b12-FEAL은 임의의 이들 세포주에의 결합을 나타내지 않았으며, 이는 이들 세포가 세포 표면 상에 CD3을 발현하지 않음을 지시한다. 이들 데이터는 HL 및 ALCL 세포주에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 효율적인 결합을 확인시켜 주었다.

[0360] **표 6**은 2회의 독립적인 실험에서 평가된 바와 같은 HDLM-2, L-428, DEL, 및 KI-JK 세포에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR의 결합에 대한 EC_{50} 값을 제시한다. EC_{50} 값은 0.05 내지 0.30 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위였다.

[0361] 표 6: bsG1-huCD3xCD30-MDX060의 결합에 대한 EC_{50} 값

	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
세포주	N=1	N=2
HDLM-2	0.1450	0.1197
L-428	0.1539	0.0705
DEL	0.3018	0.0568
KI-JK	0.1602	0.0735

[0362]

[0363] **도 8, 9, 및 10**은 CD30-발현 HL 세포주 (**도 8**), ALCL 세포주 (**도 9**), 및 NHL 세포주 (**도 10**)에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 용량-반응 결합 곡선을 제시한다. 모든 세포주에서, BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR은 1가 대조군 항체 BsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR과 비교하여 유사한 최대 결합을 나타내었다. 단일특이적, 2가 CD30 모 항체 IgG1-CD30-MDX060-FERR은 모든 세포주에의 용량-의존적 결합을 나타내었지만, BsG1-

huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR과 비교하여 더 낮은 최대 결합을 나타내었다. 음성 대조군 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, IgG1-huCD3-FEAL, 및 IgG1-b12-FEAL은 임의의 이들 세포주에의 결합을 나타내지 않았으며, 이는 이들 세포가 세포 표면 상에 CD3을 발현하지 않음을 지시한다. 이들 데이터는 HL 세포주, T-NHL, 예컨대 ALCL 및 CTCL 세포주; 및 B-NHL, 예컨대 MCL 세포주에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 효율적인 결합을 확인시켜 주었다.

표 7은 2 또는 3회의 독립적인 실험에서 평가된 바와 같은 HL, T-NHL, 및 B-NHL 세포주에의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합에 대한 EC₅₀ 값을 제시한다. EC₅₀ 값은 0.12 내지 0.35 µg/mL의 범위였다.

표 7: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 결합에 대한 EC₅₀ 값

세포주		CD30 결합		
명칭	암 유형	평균 결합 EC ₅₀	범위 결합 EC ₅₀ (µg/mL)	n 시험
L-540	HL	0.3229	0.2020 - 0.4694	3
L-428	HL	0.1743	0.1742 - 0.1744	2
KM-H2	HL	0.1587	0.1405 - 0.1824	3
L-1236	HL	0.2019	0.1628 - 0.2247	3
HDLM-2	HL	0.1674	0.1253 - 0.2206	3
L-82	ALCL	0.1999	0.1845 - 0.2153	2
SR-786	ALCL	0.3279	0.1735 - 0.5499	3
KI-JK	ALCL	0.1914	0.1431 - 0.2582	3
SUP-M2	ALCL	0.1667	0.1336 - 0.2225	3
DL-40	ALCL	0.2364	0.1698 - 0.3472	3
DEL	ALCL	0.2011	0.1430 - 0.2674	3
KARPAS-299	ALCL	0.2015	0.1343 - 0.2686	2
SUP-T1	TLL	0.3458	0.2572 - 0.4344	2
JVM-2	MCL	0.1257	0.1068 - 0.1411	3
NCEB-1	MCL	0.1564	0.1180 - 0.2000	3
HH	CTCL	0.1951	0.1559 - 0.2425	3

실시예 4 - CD3xCD30 이중특이적 항체에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 증식의 유도

CD3xCD30 이중특이적 항체를 표적 세포로서 CD30-양성 종양 세포주 및 이펙터 세포로서 T 세포를 사용하여 시험관내 세포독성 검정에서 시험하였다. T 세포의 공급원으로서, CD3-양성 ADCC 이펙터 세포 유형 IV (클린 셀스, 프랑스 몽테규) 또는 정제된 T 세포 (실시예 5에 기재된 바와 같음)를 사용하여 CD3-의존적 종양 세포 살해를 평가하였다.

SU-DHL-1 (ALCL), HuT78 (ALCL), HDLM-2 (HL), NCEB-1 (MCL), 또는 L540 (HL) 세포를 폴리스티렌 96-웰 둥근 바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원, 카탈로그 번호 650180) 내로 10,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 이펙터 세포를 0.5 µM CFSE (카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르; 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signalling Technology), 미국 매사추세츠주 덴버스; 카탈로그 번호 C34554)로 37°C에서 20분 동안 표지하고, 종양 세포에 E:T 비 = 10:1 (ADCC 이펙터 세포) 또는 7:1 (정제된 T 세포)로 첨가하였다. 이중특이적 CD3xCD30, b12xCD30 또는 CD3xb12 항체, 또는 단일특이적, 2가 CD30 항체의 시리즈 희석물을 첨가하고 (10 내지 0.041 µg/mL의 범위의 최종 농도; 3배 희석), 세포를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 일부 실험에서, CD3에 대한 감소된 친화도를 갖는, H101G 돌연변이를 함유하는 CD3 결합 아암을 갖는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR의 변이체 (WO2017/009442, 젠맵)를 사용하였다. 100 µL 염색 완충제에서 2회 세척한 후, 세포를 TO-PRO-3 아이오다이드를 함유하는 염색 완충제 (써모 피셔 사이언티픽; 카탈로그 번호 T3605; 1:4000 희석)에 재현탁시키고, FACS셀레스타 유동 세포계측기 (비디 바이오사이언시스, 미국) 상에서 분석하였다.

5 µM 스타우로스포린 (시그마-알드리치, 미국, 카탈로그 번호 S6942)으로 처리된 종양 세포 샘플의 생존력은

0%에서 설정되었고, 비처리된 종양 세포 샘플의 생존력은 100%에서 설정되었다.

[0371] '백분율 생존 세포'를 하기와 같이 계산하였다:

[0372] $\% \text{ 생존 세포} = ([\text{샘플의 세포 수} - \text{스타우로스포린 처리된 표적 세포의 세포 수}] / [\text{비처리된 표적 세포의 세포 수} - \text{스타우로스포린 처리된 표적 세포의 세포 수}]) \times 100.$

[0373] CFSE-양성 세포를 T 세포의 절대 수의 척도로서 카운팅하여 T-세포 증식을 평가하였다.

[0374] 용량-반응 곡선을 그래프패드 프리즘 V8 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)에 의해 분석하였다.

[0375] 결과

[0376] CD3xCD30 이중특이적 항체를 표적 세포로서 CD30-양성 종양 세포주 SU-DHL-1 세포 또는 HDLM-2 세포 및 이펙터 세포로서 ADCC 이펙터 세포 유형 IV 세포 (클린 셀스, 프랑스 몽테규)를 사용하여 시험관내 세포독성 검정에서 시험하였다.

[0377] **도 3**은 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR (A), bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR (B), bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR (C), BsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR (D), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR (E), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR (F), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR (G), 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR (H)이 SU-DHL-1 (좌측 패널) 또는 HDLM-2 (우측 패널) 세포의 용량-의존적 T-세포 매개 세포독성 (% 생존 세포의 감소로서 제시됨)을 유도하였음을 제시한다.

[0378] 단일특이적, 2가 CD30 항체 IgG1-MDX060-FEAR (A), IgG1-CD30-hAC10-FEAR (B), IgG1-CD30-HRS-3-FEAR (C), IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR (D), IgG1-CD30-T405-FEAR (E), IgG1-CD30-T105-FEAR (F), IgG1-CD30-T408-FEAR (G), 및 IgG1-CD30-T215-FEAR (H)은 T-세포 매개 세포독성을 유도하지 않았다. 대조군 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR은 또한 SU-DHL-1 또는 HDLM-2 세포의 T-세포 매개 세포독성을 유도하지 않았다.

[0379] 또한, CD3xCD30 이중특이적 항체를 표적 세포로서 상이한 MCL, ALCL 및 HL 세포주 및 이펙터 세포로서 정제된 T 세포 또는 ADCC 이펙터 세포 유형 IV 세포를 사용하여 시험관내 세포독성 검정에서 시험하였다. **도 4A-B**는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR에 의해 유도된 SU-DHL-1, HuT78, 또는 NCEB-1 세포의 T-세포 매개 세포독성이 감소된 친화도를 갖는 CD3 결합 아암을 갖는 이 항체의 변이체 (bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR)와 비교하여 더 강력함을 제시한다. HDLM-2 세포의 유사한 최대 T-세포 매개 세포독성이 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR 및 bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR에 의해 유도되었다 (**도 4B**). 대조군으로서 포함된 2가, 단일특이적 항체 IgG1-huCD3-FEAL 또는 IgG1-b12-FEAR과의 인큐베이션은 이들 세포주에서 세포독성을 유도하지 않았다. L540 세포의 강력하고 유사한 T-세포 매개 세포독성은 시험된 가장 낮은 농도 (0.014 $\mu\text{g/mL}$; **도 4C**)에서 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR 및 bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR에 의해 유도되었다. 대조군 항체 bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR 또는 IgG1-MDX060-FEAR은 L540 세포의 T-세포 매개 세포독성을 유도하지 않았다.

[0380] 결론적으로, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR은 다양한 CD30-발현 MCL, ALCL 및 HL 종양 세포주의 강력한 살해를 유도하였다. CD3 아암의 VH CDR3의 위치 101에 H를 함유하는 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR은 위치 101에 G를 함유하는 더 낮은-친화도 CD3 아암을 갖는 변이체와 비교하여 CD30-발현 MCL 및 ALCL 종양 세포를 살해하는데 있어서 더 강력하다.

[0381] 표적 세포로서 HDLM-2 세포 (좌측 패널) 또는 NCEB-1 세포 (우측 패널)를 사용한 세포독성 검정에서, CFSE-양성 세포의 수를 절대 T-세포 카운트의 척도로서 평가하였다. **도 4D**는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR 또는 bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR에 의해 유도된 HDLM-2 및 NCEB-1 세포의 T-세포 매개 세포독성 (**도 4B** 참조)이 T-세포 카운트의 용량-의존적 증가와 연관되었음을 제시한다. 일반적으로, 이 검정에서 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR 또는 bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR과의 인큐베이션 후 유사한 T-세포 수가 카운팅되었다. 1 $\mu\text{g/mL}$ 보다 더 높은 농도에서 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR과 인큐베이션된 NCEB-1 세포와의 공동-배양물에서, 감소된 T-세포 수가 주목되었다. 대조군 항체 IgG1-b12-FEAL은 이들 실험에서 T-세포 카운트에 영향을 미치지 않았다.

[0382] 결론적으로, BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR은 다양한 CD30-발현 ALCL, HL 및 MCL 종양 세포주의 존재 하에서 T-세포 증식을 유도하였다.

- [0383] 실시예 5 - Expi293F 세포에서 발현된 인간, 시노물구스, 또는 레서스 원숭이 CD30에의 CD3xCD30 이중특이적 항체의 결합
- [0384] 인간 CD30 또는 시노물구스 원숭이 CD30으로 일시적으로 형질감염된 Expi293 세포의 형질막에의 이중특이적 CD3xCD30 항체 및 단일특이적, 2가 CD30 항체의 결합을 유동 세포계측법에 의해 분석하였다.
- [0385] HEK-293F 또는 HEK-293 세포에서의 인간, 시노물구스 또는 레서스 원숭이 CD30의 일시적 발현
- [0386] 다양한 전장 CD30 변이체의 발현을 위한 하기 코돈-최적화된 구축물을 생성하였다: 인간 (호모 사피엔스(Homo sapiens)) CD30 (huCD30; 유니프룻 수탁 번호 P28908), 시노물구스 원숭이 (마카카 파시쿨라리스(Macaca fascicularis)) CD30 (mfCD30; 유니프룻 수탁 번호 A0A2K5VW07) (서열식별번호: 40) 및 레서스 원숭이 (마카카 무라타(Macaca mulatta)) CD30 (mmCD30; 유니프룻 수탁 번호 A0A1D5RK03) (서열식별번호: 41). 구축물은 클로닝을 위한 적합한 제한 부위 및 최적의 코작(Kozak) (GCCGCCACC) 서열 (Kozak, M., Gene 1999;234(2):187-208)을 함유하였다. 전장 인간 CD30, 시노물구스 및 레서스 원숭이 CD30 코돈-최적화된 구축물을 포유동물 발현 벡터 pcDNA3.3 (인비트로젠)에서 클로닝하고, Expi293F 발현 플랫폼 (써모 피셔 사이언티픽, 미국 매사추세츠주 월섬, 카탈로그 번호 A14527)을 사용하여 본질적으로 제조업체에 의해 기재된 바와 같이 발현하였다. 실험의 또 다른 세트에서, 전장 인간 CD30 또는 시노물구스 원숭이 CD30 구축물을 HEK-293 세포에서 발현하였다.
- [0387] Expi293 세포에서 발현된 인간, 시노물구스 원숭이 또는 레서스 원숭이 CD30에의 CD3xCD30 이중특이적 항체의 결합
- [0388] 세포 (3×10^4 개 세포/웰)를 폴리스티렌 96-웰 둥근 바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원, 카탈로그 번호 650180)에서 100 μ L 염색 완충제 중 항체의 시리즈 희석물 (3배 희석 단계에서 0.005 내지 10 μ g/mL의 범위)과 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 실험을 기술적 중복실험으로 수행하였다. 염색 완충제에서 2회 세척한 후, 세포를 50 μ L 2차 항체에서 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 2차 항체로서, 염색 완충제에 1:400 희석된 R-PE-접합된 염소-항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치, 영국; 카탈로그 번호 109-116-098)를 사용하였다. 세포를 염색 완충제에서 2회 세척하고, 0.4% EDTA를 함유하는 30 μ L 염색 완충제에 재현탁시키고, 아이큐 스크리너 (iQue Screener) (인텔리시트 코포레이션(Intellicyt Corporation), 미국) 상에서 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드 프리즘 V9.0.0 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 분석하였다.
- [0389] HEK293 세포에서 발현된 인간, 시노물구스 원숭이 또는 레서스 원숭이 CD30에의 CD3xCD30 이중특이적 항체의 결합
- [0390] 세포 (3×10^4 개 세포/웰)를 폴리스티렌 96-웰 둥근 바닥 플레이트 (써모 사이언티픽, 카탈로그 번호 163320)에서 50 μ L 염색 완충제 중 항체의 시리즈 희석물 (4배 희석 단계에서 0.0002 내지 50 μ g/mL의 범위)과 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 실험을 기술적 중복실험으로 수행하였다. 염색 완충제에서 2회 세척한 후, 세포를 50 μ L 2차 항체에서 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 2차 항체로서, 염색 완충제에 1:200 희석된 R-PE-접합된 염소-항-인간 IgG (잭슨 이뮤노리서치, 영국; 카탈로그 번호 109-116-098)를 사용하였다. 세포를 염색 완충제에서 2회 세척하고, 0.4% EDTA 및 1:10,000 희석된 ToPro-3 생존력 마커 (인비트로젠, 카탈로그 번호 T3605)를 함유하는 30 μ L 염색 완충제에 재현탁시켰다. 세포를 아이큐 스크리너 (인텔리시트 코포레이션, 미국) 상에서 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드 프리즘 V9.0.0 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 분석하였다.
- [0391] 인간 T 세포 또는 시노물구스 원숭이 PBMC에의 CD3xCD30 이중특이적 항체의 결합
- [0392] 시노물구스 원숭이 PBMC (테뷰-바이오(Tebu-Bio), 네덜란드; 카탈로그 번호 PBMCMA-10) 또는 정제된 인간 T 세포를 폴리스티렌 96-웰 둥근 바닥 플레이트에 플레이팅하였다. T 세포는 인간 공여자 연막 (산퀸(Sanquin), 네덜란드 암스테르담)으로부터 유래되었으며, 로세트셉(RosetteSep) 인간 T 세포 풍부화 카테일 (스텔셀 테크놀로지스(Stemcell Technologies), 프랑스, 카탈로그 번호 15061)을 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 분리하였다. 세포 (3×10^4 개 세포/웰)를 50 μ L 염색 완충제 중 항체 IgG1-CD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, 및 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR의 시리즈 희석물 (3배 희석 단계에서 0.0001 내지 10 μ g/mL의 범위)과 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 염색 완충제에서 2회 세척한 후, 세포를 50 μ L 2차 R-PE-접합된 염소-항-인간 IgG 항체에서 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다 (1:400 희석). 염색 완충제에서 2

회 세척한 후, T 세포를 T-세포 마커 CD3 (1:100; 밀테니 비오텍(Miltenyi biotec), 클론 10D12, APC에 접합됨), CD4 (1:50; 이바이오사이언스(eBioscience), 클론 OKT4, APC-Cy7에 접합됨), CD8 (1:100; 바이오레전드(Biolegend), 클론 RPA-T8, AF700에 접합됨) 및 T-세포 활성화 마커 CD69 (1:50; 비디 바이오사이언시스, 클론 AB2439, FITC에 접합됨), CD25 (1:50; 이바이오사이언스, 클론 BC96, PE-Cy7에 접합됨) 및 CD279/PD1 (1:50; 비디 바이오사이언시스, 클론 AEH12.2H7, BV605에 접합됨)에 대해 염색하였다. 울트라콤파(Ultracomp) 비드 (5 μ L; 인비트로젠, 카탈로그 번호 01-2222-42)를 갖는 단일 염색된 샘플을 유동 세포계측기의 보상 조정을 위해 사용하였다. 4°C에서 30분의 인큐베이션 후, 세포를 염색 완충제로 2회 세척하고, 100 μ L 염색 완충제에 재현탁시키고, FACS 포르테사(Fortessa) (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 분석하였다. 데이터를 플로우조 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 프로세싱하였다.

[0393] 결과

[0394] CD30-표적화 이중특이적 항체 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR 및 bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR은 야생형 Expi293F 세포에의 결합을 나타내지 않았지만 (도 5A), huCD30 (도 5B) 또는 mfCD30 (도 5C)로 형질감염된 Expi293F 세포에의 용량-의존적 결합을 나타내었다. 이들 이중특이적 항체의 결합은 단일특이적, 2가 CD30 항체 IgG1-CD30-MDX060-FEAR의 결합과 대등하였다. 예상된 바와 같이, 음성 대조군 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR은 야생형 또는 huCD30- 또는 mfCD30-형질감염된 Expi293F 세포에의 결합을 나타내지 않았다. 유사하게, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR은 huCD30 (도 11A) 또는 mfCD30 (도 11B)으로 형질감염된 HEK293 세포에의 용량-의존적 결합을 나타내었고, 음성 대조군 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR은 huCD30- 또는 mfCD30-형질감염된 HEK293 세포에의 결합을 나타내지 않았다. 이는 CD30-표적화 항체 MDX060이 2가 뿐만 아니라 1가 포맷에서 HEK 세포에서 발현된 인간 및 시노물구스 원숭이 CD30 둘 다에 효율적으로 결합함을 지시한다.

[0395] 도 5D는 CD3xCD30 이중특이적 항체 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR 및 대조군 이중특이적 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR이 1차 인간 및 시노물구스 원숭이 T 세포에 효율적으로 결합하였음을 제시한다. 이는 이들 CD3-표적화 이중특이적 항체가 T 세포 상에 내인적으로 발현된 인간 및 시노물구스 원숭이 CD3 둘 다에 효율적으로 결합함을 제시한다. IgG1-CD30-MDX060 2가, 모 항체는 인간 또는 시노물구스 원숭이 T 세포에 결합하지 않았으며, 이는 CD30이 이들 세포 상에 발현되지 않았음을 지시한다.

[0396] huCD30 또는 mmCD30으로 형질감염된 Expi293F 세포에의 CD3xCD30 이중특이적 항체 및 단일특이적 모 CD30 항체의 패닐의 결합을 유동 세포계측법에 의해 평가하였다. CD3xCD30 이중특이적 항체 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR (도 6A), bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR (도 6B), bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR (도 6C), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR (도 6E), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR (도 6F), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR (도 6G), 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR (도 6H)은 huCD30 또는 mmCD30을 발현하는 세포에의 동등한 결합을 나타내었다. 유사하게, 모, 단일특이적 CD30 항체 클론은 huCD30 또는 mmCD30을 발현하는 세포에의 동등한 결합을 나타내었다. 대조적으로, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR 및 모, 단일특이적 CD30 항체 IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR은 huCD30에의 결합을 나타내었지만, mmCD30에의 결합은 나타내지 않았다 (도 6D).

[0397] 실시예 6 - DSF 분석에 의한 단일특이적 및 이중특이적 비-활성화 항체 변이체의 형태적 안정성의 평가

[0398] 불변 중쇄 영역에 비-활성화 돌연변이를 보유하는 2가 단일특이적 CD30, CD3, 및 이중특이적 CD3xCD30 IgG1 항체 변이체의 단백질 안정성 특징을 시차 주사 형광계측법 (DSF)을 사용하여 평가하였다.

[0399] IgG1-CD30-MDX060-FEAR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL 및 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 샘플을 PBS pH 7.4에서 대략 1 mg/mL의 농도로 제제화하였다.

[0400] 형태적 안정성을 평가하기 위해, DSF를 IgG의 언폴딩 시 노출되는 소수성 영역에의 외부 염료 시프로-오렌지 (Sypro-Orange) (DMSO 중 5000x 농축물, 카탈로그 번호 S5692, 시그마-알드리치)의 결합에 의해 유발된 형광 강도의 변화를 검출할 수 있는 iQ5 멀티컬러(Multicolor) 실시간 PCR 검출 시스템 (바이오-래드(Bio-Rad))에서 수행하였다. 시프로-오렌지를 PBS pH 7.4 (하이클론 지이 헬스케어(Hyclone GE Healthcare))에 320배 희석하였다. 열 용융 곡선은 분석되는 IgG의 제어된 단계적 열 변성 동안 증가하는 형광을 측정하는 것으로부터 유래될 수 있다. 따라서, 5 μ L의 항체 용액 (PBS 중 1 mg/mL)의 중복 샘플을 iQ 96-웰 PCR 플레이트에서 PBS pH 7.4 중 20 μ L의 희석된 시프로-오렌지에 첨가하였다. 형광을 25 °C 내지 95 °C의 범위의 증가하는 농도에서, 증분당 0.5 °C의 단계적 증분 및 15초 지속시간 플러스 모든 웰의 형광을 기록하는데 필요한 시간에서 기록하였다. 데이터를 바이오-래드 CFX 매니저(Manager) 소프트웨어 3.0을 사용하여 분석하고, 융점을 소프트웨어에 의

해 형광 대 온도 그래프로부터 결정하였다.

[0401] 결과

도 7 및 **표 8**은 IgG1-CD30-MDX060-FERR의 용융 온도 (T_m)가 pH 7.4 (64.5°C)에서의 IgG1-CD30-MDX060-FEAR의 T_m 보다 더 높은 69.0°C임을 제시한다. 이는 IgG1-CD30-MDX060-FERR이 IgG1-CD30-MDX060-FEAR보다 더 높은 형태적 안정성을 가짐을 지시하며, 이는 FER 백본을 함유하는 IgG1-CD30-MDX060이 FEA 백본을 함유하는 IgG1-CD30-MDX060보다 더 높은 형태적 안정성을 가짐을 시사한다. BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 용융 온도는 2가지 모 항체 IgG1-huCD3-FEAL (62.5°C) 및 IgG1-CD30-MDX060-FERR (69.0°C)에 대해 결정된 T_m 사이인 64.5°C인 것으로 결정되었다.

표 8: 시차 주사 열량계측법 (DSC)에 의해 결정된 바와 같은 지시된 항체의 용융 온도 (T_m)

항체	T_m (°C)
IgG1-CD30-MDX060-FEAR	64.5
IgG1-CD30-MDX060-FERR	69.0
IgG1-huCD3-FEAL	62.5
BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR	64.5

[0405] **실시예 7 - T 세포 및 종양 세포와의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 동시 결합**

종양 세포 및 나이브 T 세포와의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 동시 결합을 연구하였다.

건강한 공여자로부터 분리된 동결된 T 세포를 해동시키고, 0.25 mM 셀트레이스 바이올렛 (퍼시픽 블루(Pacific Blue); 인비트로젠, 카탈로그 번호 C34557A)으로 37°C에서 15분 동안 표지하였다. L-428 종양 세포를 셀트레이스 파레드(FarRed) (APC; 인비트로젠 카탈로그 번호 C34564A)로 37°C에서 15분 동안 표지하고, T 세포에 1:1의 E:T 비로 첨가하였다. bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 또는 대조군 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, bsG1b12FEALxCD30MDX060-FERR, 또는 IgG1-b12-FEAL의 시리즈 희석물을 첨가하고 (6×10^{-5} 내지 10 μ g/mL의 범위의 최종 농도; 3배 희석), 세포를 4°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 생존력 마커 7-AAD (비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 559925)를 첨가하고 (100x 최종 희석), 세포를 FACS 셀레스타 유동 세포 계측기 (비디 바이오사이언시스) 상에서 분석하였다.

[0408] 결과

도 12는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 T 세포와의 종양 세포의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-매개 가교 (동시 결합)에 대한 척도로서 $CD3^+CD30^+$ 이중-양성 사건 (유동 세포계측법 염색에서 셀트레이스 파 레드 및 셀트레이스 바이올렛 둘 다를 발현하는 세포)의 형성을 유도함을 제시한다. 이중-양성 사건의 증가는 항체 농도-의존적이었으며, 벨-형상 곡선을 나타내었다. 대조군 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, bsG1b12FEALxCD30MDX060-FERR, 또는 IgG1-b12-FEAL와 인큐베이션된 샘플에서 또는 항체 없이 인큐베이션된 샘플에서, 종양 세포 및 T 세포의 가교의 증가는 관찰되지 않았다 (A). **도 12B**는 셀트레이스 파 레드 및 셀트레이스 바이올렛 둘 다를 발현하는 세포의 백분율에 의해 검출된 바와 같은, 종양 세포 및 나이브 T 세포와의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 동시 결합을 제시한다 (B).

이들 데이터는 bsG1huCD3FEALxCD30-MDX060-FERR이 $CD30^+$ 종양 세포 및 $CD3^+$ T 세포에 동시에 결합하고 이를 가 교시킬 수 있음을 지시한다.

[0411] **실시예 8 - CD3xCD30 이중특이적 항체에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 활성화의 유도**

CD3xCD30 이중특이적 항체의 패널에 의한 Karpas-299 종양 세포의 T-세포 매개 세포독성 및 연관된 T-세포 활성화를 평가하였다. 하기 항체를 평가하였다: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, bsG1-huCD3-FEALx CD30-HeFi-I-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALx CD30-T408-FEAR, 및 bsG1-huCD3-FEALx CD30-T215-FEAR.

T 세포를 건강한 인간 공여자 연막 (산퀸, 네덜란드 암스테르담)으로부터 획득하고, 로세트셉™ 인간 T-세포 풍부화 콕테일 (스텝셀 테크놀로지스, 프랑스, 카탈로그 번호 15061)을 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 분리

하였다. T 세포를 셀트레이스 바이올렛 (인비트로젠, 카탈로그 번호 C34557A; 최종 농도 5 μ M)으로 37°C에서 15분 동안 표지하였다. 병행하여, Karpas-299 종양 세포를 셀트레이스 파레드 (인비트로젠, 카탈로그 번호 C34564A; 최종 농도 2 μ M)로 37°C에서 15분 동안 표지하였다. 표지 후, 빙냉 DBSI의 부피의 5x를 첨가하고, RT에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 펠릿화하고, 배지에 재현탁시키고, 종양 세포를 96-웰 플레이트 (그라니너-바이오-원, 네덜란드, 카탈로그 번호 655180) 내로 50,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 이중특이적 CD3xCD30 항체의 시리즈 희석물을 첨가하고 (1,000 내지 0.051 ng/mL의 범위의 최종 농도; 3배 희석), 플레이트를 RT에서 15분 동안 인큐베이션하였다. T 세포를 종양 세포에 4:1의 이펙터 대 표적 (E:T) 비로 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 (염색 완충제)로 2회 세척한 후, 세포를 T-세포 마커 CD4 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 300521, 퍼시픽 블루에 접합됨), CD8 (1:100; 비디 바이오사이언시스, FITC에 접합됨) 및 T 세포 활성화 마커 CD69 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 310934, BV650에 접합됨), CD25 (1:100; 인비트로젠, 카탈로그 번호 25-0259-42, PE-Cy7에 접합됨) 및 CD279/PD-1 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 329930, BV605에 접합됨)에 대해 염색하였다. 울트라콤프 비드 (5 μ L; 인비트로젠, 카탈로그 번호 01-2222-42)를 갖는 단일 염색된 샘플이 포함되었고, 유동 세포계측기의 보상 조정을 위해 사용되었다. 4°C에서 30분의 인큐베이션 후, 플레이트를 염색 완충제로 2회 세척하고, 세포를 7-AAD (염색 완충제에서 1:100 희석됨)로 4°C에서 10분 동안 염색하였다. 세포를 FACS 셀레스타 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 분석하였다. 데이터를 플로우조 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 프로세싱하였다.

[0414] 용량-반응 곡선을 그래프패드 프리즘 V7.02 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)를 사용하여 비-선형 회귀 분석 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)을 사용하여 생성하였다.

[0415] 결과

[0416] **도 13A 및 B**는 모든 CD3xCD30 항체가 Karpas-299 세포의 T-세포 매개 세포독성을 유도함을 제시한다. CD30 클론 MDX060을 사용하여 생성된 CD3xCD30 이중특이적 항체 (bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR)는 시험된 모든 다른 클론과 비교하여 Karpas-299 세포를 살해하는데 있어서 더 효과적이었다. 사실, MDX060-기반 CD3xCD30 이중특이적 항체는 CD30 클론 HRS-3, HeFi-I, T105, T405, T408, 또는 T215를 사용하여 생성된 CD3xCD30 이중특이적 항체 (bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR, 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR; **도 13A**)와 비교하여 유의하게 더 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었다. 더욱이, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR은 CD30 클론 hAC10, HeFi-I, T405, T408, 또는 T215를 사용하여 생성된 CD3xCD30 이중특이적 항체 (bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR, 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR; **도 13B**)와 비교하여 더 높은 최대 살해를 유도하였다. **도 13C 및 D**는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR이 CD4⁺ T 세포 (**도 13C**) 또는 CD8⁺ T 세포 (**도 13D**)에서의 T-세포 활성화의 척도로서, CD25의 발현을 유도하는데 있어서 임의의 다른 CD3xCD30 이중특이적 항체보다 더 효과적이었음 (더 낮은 EC₅₀ 값)을 제시한다. PD-1 (**도 13E 및 F**) 및 CD69 (데이터는 제시되지 않음)의 발현에 대해 유사한 결과가 관찰되었다. FEAR 또는 FERR 돌연변이를 함유하는 2가지 MDX060-기반 CD3xCD30 이중특이적 항체 사이에는 T-세포-매개 살해 또는 T-세포 활성화의 차이가 관찰되지 않았다.

[0417] 이중특이적 항체 bsG1-huCD3xCD30-MX060은 또한 시험된 다른 패널 CD3xCD30 이중특이적 항체와 비교하여 L-428 세포의 T-세포 매개 세포독성을 유도하는데 있어서 더 효과적이었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0418] 이들 실험에 사용된 CD3xCD30 이중특이적 항체의 패널에 의해 유도된 T-세포 매개 세포독성의 평균 IC₅₀ 농도 및 최대 백분율 용해 및 T-세포 활성화 (CD25 발현)의 EC₅₀ 농도는 **표 9**에 요약된다.

[0419] 결론적으로, 이들 데이터는 bsG1huCD3xCD30-MDX060이 T-세포 매개 세포독성을 유도하는데 있어서 평가된 임의의 다른 CD3xCD30 이중특이적 항체보다 더 효과적이었음을 입증하였다.

[0420] 표 9: CD3xCD30 이중특이적 항체의 패널에 의해 유도된 Karpas-299 세포의 T-세포 매개 세포독성의 IC₅₀ 농도 및 최대 백분율 용해 및 T-세포 활성화 (CD25 발현)의 EC₅₀ 농도.

항제	세포독성		T-세포 활성화 (CD25 발현)		T-세포 활성화 (PD-1 발현)	
			CD4+ T 세포	CD8+ T 세포	CD4+ T 세포	CD8+ T 세포
	IC ₅₀ (μg/mL)	최대 용해 (%)	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)
	평균 (SD)	평균 (SD)	평균 (SD)	평균 (SD)	평균 (SD)	평균 (SD)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR	0.029 (0.004)	52.328 (3.929)	0.023 (0.004)	0.020 (0.005)	0.025 (0.006)	0.023 (0.009)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR	0.033 (0.004)	53.703 (5.949)	0.024 (0.004)	0.020 (0.005)	0.024 (0.006)	0.027 (0.009)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR	0.032 (0.006)	37.765 (5.340)	0.046 (0.011)	0.054 (0.021)	0.056 (0.021)	0.057 (0.031)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR	0.068 (0.011)	47.472 (6.539)	0.089 (0.031)	0.079 (0.031)	0.123 (0.046)	0.112 (0.047)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR	0.052 (0.011)	42.987 (6.603)	0.069 (0.013)	0.076 (0.016)	0.075 (0.024)	0.083 (0.023)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR	0.042 (0.007)	52.582 (5.344)	0.056 (0.010)	0.060 (0.017)	0.064 (0.021)	0.065 (0.024)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR	0.078 (0.023)	41.667 (4.560)	0.093 (0.027)	0.080 (0.056)	0.138 (0.054)	0.140 (0.126)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR	0.226 (0.112)	41.295 (5.482)	0.172 (0.046)	0.134 (0.077)	0.286 (0.104)	0.220 (0.126)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR	0.077 (0.032)	42.840 (6.464)	0.092 (0.036)	0.105 (0.063)	0.355 (0.476)	0.281 (0.308)

실시예 9 - bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성, T-세포 증식, 및 T-세포 활성화의 유도

bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 종양 세포의 T-세포 매개 세포독성 및 연관된 T-세포 증식 및 활성화를 HL 및 ALCL 세포주에서 평가하였다.

T 세포를 건강한 인간 공여자 연막 (산킨, 네덜란드 암스테르담)으로부터 수득하고, 로세트셉™ 인간 T-세포 풍부화 각테일 (스텝셀 테크놀로지스, 프랑스, 카탈로그 번호 15061)을 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 분리하였다. T 세포를 셀트레이스 바이올렛 (인비트로젠, 카탈로그 번호 C34557A; 최종 농도 5 μM)으로 37℃에서 15분 동안 표지하였다. 병행하여, 종양 세포 L-428, KI-JK, KM-H2, 또는 SUP-M2를 셀트레이스 파레드 (인비트로젠, 카탈로그 번호 C34564A; 최종 농도 2 μM)로 37℃에서 15분 동안 표지하였다. 표지 후, 빙냉 DBSI의 부피의 5x를 첨가하고, RT에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 펠릿화하고, 배지에 재현탁시키고, 종양 세포를 96-웰 플레이트 (그라이너-바이오-원, 네덜란드, 카탈로그 번호 655180) 내로 50,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 또는 대조군 항체 IgG1-huCD3-FEAL, bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-b12-FEAL의 시리즈 희석물을 첨가하고 (1,000 내지 0.051 ng/mL의 범위의 최종 농도; 3배 희석), 플레이트를 RT에서 15분 동안 인큐베이션하였다. T 세포를 종양 세포에 4:1의 이펙터 대 표적 (E:T) 비로 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 (염색 완충제)로 2회 세척한 후, 세포를 T-세포 마커 CD4 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 300521, 퍼시픽 블루에 접합됨), CD8 (1:100; 비디 바이오사이언시스, 카탈로그 번호 345772, FITC에 접합됨) 및 T 세포 활성화 마커 CD69 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 310934, BV650에 접합됨), CD25 (1:100; 인비트로젠, 카탈로그 번호 25-0259-42, PE-Cy7에 접합됨) 및 CD279/PD-1 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 329930, BV605에 접합됨)에 대해 염색하였다. 울트라콤프 비드 (5 μL; 인비트로젠, 카탈로그 번호 01-2222-42)를 갖는 단일 염색된 샘플이 포함되었고, 유동 세포계측기의 보상 조정을 위해 사용되었다. 4℃에서 30분의 인큐베이션 후, 플레이트를 염색 완충제로 2회 세척하고, 세포를 7-AAD (염색 완충제에서 1:100 희석됨)로 4℃에서 10분 동안 염색하였다. 세포를 FACS 셀레스타 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 분석하고, 데이터를 플로우조 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 프로세싱하였다.

살아있는 표적 세포의 백분율을 하기 식을 사용하여 계산하였다:

- [0426] % 살아있는 표적 세포 = (각각의 조건에서의 살아있는, 단일 셀트레이스 파레드-표지된 세포의 절대 수 / 임의의 항체를 첨가하지 않은 표적 세포 및 T 세포만을 함유하는 조건에서의 살아있는, 단일 셀트레이스 파레드 표지된 세포의 절대 수) x 100.
- [0427] T-세포 증식을 회색된 셀트레이스 바이올렛 염색을 갖는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포를 게이팅함으로써 평가하였다. 확장 지수를 플로우조로부터 증식 모델링 도구를 사용하여 계산하였다. 생성 피크를 자동으로 적합시키고, 확장 지수 값을 하기 식에 따라 계산하였다:
- [0428] 확장 지수 = 세포의 총량/배양의 시작에서의 세포의 양 = $(G0 + G1 + G2 + G3 + G4 + G5 + G6)/(G0 + G1:2 + G2:4 + G3:8 + G4:16 + G5:32 + G6:64)$.
- [0429] G_n = 생성 n 피크에서의 세포의 수 ($n = 0$ 내지 6).
- [0430] 용량-반응 곡선을 그래프패드 프리즘 V7.02 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)를 사용하여 비-선형 회귀 분석 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)을 사용하여 생성하였다.
- [0431] 결과
- [0432] 도 14는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 시험관내에서 L-428 (HL), KM-H2 (HL), SUP-M2 (ALCL), 및 KI-JK (ALCL) 세포주에서 용량-의존적 T-세포 매개 세포독성을 유도하였음을 제시한다. L-428 및 KI-JK 세포에서 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의해 유도된 T-세포 매개 세포독성의 평균 IC50 농도는 표 10에 요약된다. 대조군 항체 IgG1-huCD3-FEAL, bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-b12-FEAL과 인큐베이션된 세포에서 또는 항체 없이 인큐베이션된 샘플에서 세포독성은 관찰되지 않았다.
- [0433] 도 15, 16, 17, 및 18은 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의해 유도된 L-428 및 KI-JK 세포의 T-세포 매개 세포독성이 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 증식 (도 15), 및 T-세포 활성화 마커 CD69 (도 16), CD25 (도 17) 및 PD-1 (도 18)의 발현과 연관되었음을 제시한다. 이들 실험에서 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의해 유도된 T-세포 증식 및 활성화의 평균 EC50 농도는 표 10에 요약된다.
- [0434] 따라서, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR은 시험관내에서 HL 및 ALCL 세포주에서 용량-의존적 T-세포 매개 세포독성을 유도하였으며, 이는 T-세포 증식 및 활성화와 연관되었다.
- [0435] 표 10: L-428 및 KI-JK 세포에서 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의해 유도된 T-세포 매개 세포독성 및 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 세포의 연관된 T-세포 증식 및 활성화의 EC₅₀ 농도.

종양 세포주		L-428		KI-JK	
세포독성					
	평균 IC50 (μg/mL)	0.002		0.0015	
	범위 IC50 (μg/mL)	0.001216 - 0.003439		0.0008858 - 0.001904	
T 세포 유형		CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
T 세포 증식					
PI	평균 EC50 (μg/mL)	0.0051	0.00096	0.00606	0.00213
	범위 EC50 (μg/mL)	0.003727 - 0.006534	0.0002052 - 0.002255	0.00338 - 0.007501	0.001103 - 0.002715
T 세포 활성화					
CD69	평균 CD69 EC50 (μg/mL)	0.00083	0.00121	0.00146	0.00171
	범위 CD69 EC50 (μg/mL)	0.0001221 - 0.001647	3.252E-14 - 0.002421	0.0004487 - 0.002086	4.694E-11 - 0.005097
CD25	평균 CD25 EC50 (μg/mL)	0.00261	0.00061	0.00599	0.00656
	범위 CD25 EC50 (μg/mL)	0.002164 - 0.002898	0.000298 - 0.001006	0.004483 - 0.007791	0.001901 - 0.01562
PD-1	평균 PD-1 EC50 (μg/mL)	0.00491	0.00257	0.0112	0.00696
	범위 PD-1 EC50 (μg/mL)	0.004387 - 0.005433	0.001302 - 0.003412	0.009616 - 0.01222	0.005845 - 0.009151
n 시험		3		3	

[0436]

[0437]

[0438]

실시예 10 - bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 시토카인 생산의 유도

bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의해 유도된 시토카인 및 그랜자임 B 생산을 실시예 9에 기재된 바와 같이, L-428 표적 세포 및 건강한 공여자 T 세포를 사용하여 시험관내 T 세포-매개 세포독성 실험 동안 수집된 상청액에서 평가하였다. 상청액을 -20℃에서 저장하고, 분석을 위해 해동시켰다. 14가지 상이한 시토카인 (CD40, IFN γ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, PDL-1, TNF α) 및 그랜자임 B의 농도를 알앤디 시스템스(R&D systems)에 의해 맞춤 제조된 비드-기반 다중화 면역-검정 (루미넥스)을 사용하여 측정하였다.

[0439]

결과

[0440]

증가된 농도는 주로 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 존재 하에서 L-428 세포 및 T 세포의 공동-배양물로 부터의 상청액 중의 그랜자임 B 및 시토카인 IFN γ , IL-13 및 TNF α (>2000 pg/mL)에 대해 관찰되었다. 대조군 항체 IgG1-b12-FEAL과 비교할 경우, CD40, IL-10, IL-12, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL6, 및 IP-10 시토카인 농도에 대해 보통의 증가가 관찰되었다. 대조군 항체 IgG1-b12-FEAL과 비교하여 IL-8, MCP-1, 및 PDL1의 수준은 조정 되지 않았다 (도 19).

[0441]

따라서, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 활성화는 시토카인 및 그랜자임 B의 용량-의존적 생산과 연관되었다.

[0442]

실시예 11 - 다양한 이펙터 대 표적 비에서 이펙터 세포로서 정제된 T 세포를 사용한 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성의 유도

[0443]

이중특이적 항체 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 존재 하에서 T 세포-매개 종양 세포 살해의 최적의 이펙터 대 표적 세포 비를 결정하기 위해, 시험관내 세포독성 검정을 다양한 이펙터 대 표적 세포 (E:T) 비에서 표적 세포로서 CD30-양성 종양 세포주 L-428 및 이펙터 세포로서 정제된 T 세포를 사용하여 수행하였다.

[0444]

T 세포를 종양 세포에 1:1, 2:1, 4:1 또는 8:1의 다양한 이펙터 대 표적 (E:T) 세포 비로 첨가한 것을 제외하고는, 본질적으로 실시예 9에 기재된 바와 같이 T-세포 매개 세포독성을 평가하였다.

[0445]

결과

[0446]

도 20A는 용량-의존적 T-세포 매개 세포독성이 모든 E:T 비에서 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의해 유

도되었으며, 최대 종양 세포 살해 (20% 미만의 생존 종양 세포)는 4:1 및 8:1의 E:T 비에서 관찰되었음을 제시한다. 이와 일치하게, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 증식은 모든 E:T 세포 비에서, 가장 현저하게는 4:1 및 8:1의 E:T 비에서 관찰되었다 (도 20B-C). 시험된 임의의 E:T 비에서 대조군 항체 bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR에 의해 특이적 T-세포 매개 세포독성 또는 T-세포 증식은 유도되지 않았다.

[0447] 함께, 이들 데이터는 시험관내에서 L-428 종양 세포의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-유도된 T-세포 매개 세포독성이 4:1 및 8:1의 E:T 비에서 가장 효과적이었음을 지시한다.

[0448] **실시예 12 - bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 시험관내에서의 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 증식의 동역학**

[0449] bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 존재 하에서의 T 세포-매개 종양 세포 살해의 동역학을 평가하기 위해, 시험관내 세포독성 검정을 다양한 인큐베이션 기간에서 표적 세포로서 CD30-양성 종양 세포주 L-428 및 이펙터 세포로서 정제된 T 세포를 사용하여 수행하였다.

[0450] 종양 세포 세포독성 및 T-세포 증식을 24시간, 48시간 및 72시간 후에 평가한 것을 제외하고는, 본질적으로 실시예 9에 기재된 바와 같이 T-세포 매개 세포독성을 평가하였다.

[0451] 결과

[0452] 도 21은 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 48시간 및 72시간 후에 용량-의존적 T-세포 매개 세포독성을 유도한 반면, 24시간 후에는 유의한 T-세포 매개 세포독성이 관찰되지 않았음을 제시한다. 용량-의존적 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 증식은 72시간 후에 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의해 유도된 반면, 24시간 또는 48시간 후에는 T-세포 증식이 관찰되지 않았다 (도 21B 및 C).

[0453] 함께, 이들 데이터는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 종양 세포의 T-세포 매개 세포독성 및 T-세포 증식을 시간-의존적 방식으로 유도하였음을 제시한다.

[0454] **실시예 13 - 시험관내에서의 CD30 발현 수준과 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-유도된 T-세포 매개 세포독성과의 상관관계**

[0455] 8가지 CD30 발현 종양 세포주의 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 T-세포 매개 살해를 4:1의 E:T 비를 사용하여, 실시예 9에 기재된 바와 같이 시험관내 세포독성 검정에서 결정하였다. 하기 세포주를 사용하였다: L-428, KM-H2, DEL, KI-JK, KARPAS-299, SUP-M2, NCEB-1, 및 JVM-2. 이들 종양 세포주에 대해, CD30 발현 수준을 실시예 2에 상세화된 바와 같이 정량적 유동 세포계측법에 의해 평가하였다.

[0456] 결과

[0457] 도 22는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 시험관내에서 모든 세포주에서 T-세포 매개 세포독성을 68% 내지 98%의 최대 표적 세포 살해로 유도하였음을 제시한다. bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 최대 T-세포 매개 종양 세포 살해는 CD30 발현의 수준과 유의하게 상관되었다 (도 22A).

[0458] 도 22B에서, 각각의 세포주에 대한 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 존재 하에서의 T 세포-매개 살해의 EC_{50} 을 CD30 발현 수준에 대해 플롯팅하며, 이는 음성이지만 유의하지 않은 경향을 나타낸다.

[0459] 따라서, 이들 데이터는 시험관내에서 CD30 발현 수준 및 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-유도된 최대 T-세포 매개 세포독성 사이의 양성 상관관계를 제시한다.

[0460] **실시예 14 - BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 활성화된 T 세포의 동족살해**

[0461] 활성화된- $CD30^+$ T-세포의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-유도된 T-세포 동족살해를 시험관내에서 평가하였다.

[0462] 96-웰 플레이트 (그라이너-바이오-윈, 네덜란드, 카탈로그 번호 655180)를 PBS 중 $1 \mu\text{g/mL}$ 항-인간 CD3 (클론 OKT3, 인비트로젠, 카탈로그 번호 16-0037-85)의 용액 $100 \mu\text{L}$ 로 코팅하였다. 플레이트를 37°C 에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 항체 용액을 제거한 후, 웰을 $100 \mu\text{L}$ 의 PBS로 세척하였다. T 세포를 건강한 인간 공여자 연막 (산킨, 네덜란드 암스테르담)으로부터 수득하고, 로세트셋™ 인간 T 세포 풍부화 카테일 (스탬셀 테크놀로지스, 프랑스, 카탈로그 번호 15061)을 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 분리하였다. 정제된 T 세포를

2×10^6 개 세포/mL의 농도로 철을 갖는 10% 열-불활성화된 공여자 소 혈청 (DBSI; 깁코(Gibco), 카탈로그 번호 20731-030) 및 페니실린/스트렙토마이신 (pen/strep; 론자, 카탈로그 번호 DE17-603E)으로 보충된 T-세포 배지 (25 mM HEPES 및 L-글루타민을 갖는 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute) [RPMI]-1640 배지 (론자, 카탈로그 번호 BE12-115F)에 재현탁시키고, 100 μ L의 T-세포 현탁액 (200,000개 T-세포 함유)을 항-CD3 코팅된 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 더욱이, 2 μ g/mL 항-CD28 (클론 CD28.2, 인비트로젠, 카탈로그 번호 16-0289-85) 및 0.05 μ g/mL IL-15 (썸모피서, 카탈로그 번호 PHC9151)로 보충된 100 μ L의 T 세포 배양 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 이어서 T-세포를 37°C에서 96시간 동안 인큐베이션하였다.

[0463] 96시간 후, T 세포를 수집하고, T-세포 배지에 2×10^6 개 세포/mL의 농도로 재현탁시켰다. 유동 세포계측법 분석을 수행하여 CD30 및 T-세포 활성화 마커의 발현을 측정하였다. 간략하게, 세포의 분취물을 PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 (염색 완충제)로 세척하고, 50 μ L의 1000x 희석된 FVS510 생존력 염료 (비디 바이오사이언시스, 카탈로그 번호 564406)로 염색하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 염색 완충제로 세척하고, CD30 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 333906, PE에 접합됨), T-세포 마커 CD4 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 300506, FITC에 접합됨), CD8 (1:100; 바이오레전드, 카탈로그 번호 301028, AF700에 접합됨) 및 T-세포 활성화 마커 CD69 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 310910, APC에 접합됨), CD25 (1:100; 인비트로젠, 카탈로그 번호 25-0259-42, PE-Cy7에 접합됨) 및 CD279/PD1 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 329924, BV605에 접합됨)에 대해 염색하였다. 울트라콤파트 비드 (5 μ L; 인비트로젠, 카탈로그 번호 01-2222-42)를 갖는 단일 염색된 샘플이 포함되었고, 유동 세포계측기의 보상 조절을 위해 사용되었다. 4°C에서 30분의 인큐베이션 후, 플레이트를 염색 완충제로 2회 세척하였다. 세포를 FACS 셀레스타 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 분석하고, 데이터를 플로우조 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 프로세싱하였다.

[0464] BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 활성화된 T 세포의 동족살해를 유도할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 자극된 T 세포를 96-웰 플레이트에 200,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 후속적으로, 50 μ L의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, 또는 대조군 항체, 즉, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-huCD3-FEALxb12-MDX060-FERR, 또는 IgG1-b12를 각각의 웰에 첨가하였다 (T-세포 배지에서 3배 희석 단계에서 0.003 내지 3.3 μ g/mL의 범위의 최종 농도). 플레이트를 37°C에서 48시간 동안 인큐베이션하였다.

[0465] 염색 완충제로 2회 세척한 후, 세포를 FVS510 생존력 염료로 염색하고, 결과적으로 T-세포 마커 CD4 및 CD8 T 세포 활성화 마커 CD69, CD25 및 CD279/PD1에 대해 염색하였다. 유동 세포계측 분석을 FACS 셀레스타 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 수행하고, 데이터를 플로우조 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 프로세싱하였다.

[0466] 용량-반응 곡선을 그래프패드 프리즘 V7.02 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)를 사용하여 생성하였다.

[0467] 결과

[0468] 도 23은 세포 마커 CD25 (T-세포 활성화) (A) 및 CD30 (B)이 72시간의 인큐베이션 후 각각 T 세포의 54-63% 및 21-27%에서 발현되었음을 제시한다. CD25 및 CD30의 발현은 96시간의 인큐베이션 후 추가로 유도되었다 (CD25: 80-83% 및 CD30: 27-33%). 도 23C는 증가하는 용량의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-huCD3-FEALxb12-MDX060-FERR, 또는 IgG1-b12가 활성화된 T 세포의 감소된 생존력과 연관되지 않았음을 제시한다.

[0469] 따라서, 활성화된 T 세포의 하위집단 상의 CD30 발현은 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR과의 인큐베이션 시 T 세포의 동족살해를 발생시키지 않았다.

[0470] **실시예 15 - BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 항-종양 활성과의 sCD30의 간섭**

[0471] 세포 표면 CD30의 웨딩 및 가용성 CD30 (sCD30)의 생성을 17가지 상이한 혈액 CD30⁺ 종양 세포주에서 평가하였다.

[0472] 신선한 배지에서 세포를 시딩한 후 3일에 세포 배양물로부터 수집된 25 μ L의 비희석된 상청액 중의 sCD30의 농도를 "인간 sCD30 ELISA 키트" (인비트로젠, 카탈로그 번호 BMS240)를 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 인간 CD30의 정량적 검출을 위한 ELISA 검정에 의해 측정하였다.

[0473] 결과

- [0474] 도 24A는 세포 배양 상청액 중의 sCD30의 농도를 제시한다. 제시된 바와 같이, 다양한 농도의 sCD30이 상이한 세포주로부터의 세포 배양 상청액에서 검출되었다. 도 24B는 세포 배양 상청액 중의 sCD30의 농도가 실시예 2에 이전에 기재된 바와 같이 정량적 유동 세포계측법에 의해 측정된 바와 같이 (인간 IgG 교정 키트, 바이오사이텍스, 카탈로그 번호 CP010), CD30 막 발현 수준과 유의하게 상관되었음을 제시한다.
- [0475] sCD30이 강력한 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-유도된 T-세포 매개 세포독성을 차단할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에 의한 T-세포 매개 세포독성을 상청액 (129 ng/mL) 중의 sCD30의 높은 수준을 나타낸 DEL 중앙 세포 (ALCL)에서 평가하였다. T-세포 매개 세포독성 검정을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (실시예 8). 도 24C는 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 86%의 최대 중앙 세포 살해로, 이 세포주에서 강력한 T-세포 매개 세포독성을 유도하였음을 제시하며, 이는 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 sCD30의 존재 하에서 시험관내에서 여전히 강력한 T-세포-매개 세포독성을 유도할 수 있었음을 지시한다.
- [0476] 따라서, sCD30 농도는 세포 유형 사이에 다양하였으며, 세포 표면 상의 CD30 발현의 수준과 상관되었다. 더욱이, BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR은 sCD30의 존재 하에서 시험관내에서 여전히 강력한 T-세포 매개 세포독성을 유도할 수 있었다.
- [0477] 실시예 16 - 이펙터 세포로서 환자-유래 말초 혈액 단핵 T 세포를 사용한 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 생체의 세포독성
- [0478] CD3xCD30 이중특이적 항체를 표적 세포로서 CD30-양성 중앙 세포주 및 이펙터 세포로서 1차 환자-유래 T 세포를 사용하여 생체의 세포독성 검정에서 시험하였다. T 세포의 공급원으로서, 호지킨 림프종 (HL), 비-호지킨 림프종 (NHL) 및 급성 골수성 백혈병 (AML) 환자-유래 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC, 디스커버리 라이프 사이언시스 (Discovery Life Sciences), 표 11)를 사용하여 CD3-의존적 중앙 세포 살해를 평가하였다.
- [0479] L-428 중앙 세포를 셀트레이스 파레드 (인비트로젠, 카탈로그 번호 C34564A; 최종 농도 2 μ M)로 37°C에서 15분 동안 표지하였다. 표지 후, 빙냉 DBSI의 부피의 5x를 첨가하고, RT에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 펠릿화하고, 배지에 재현탁시키고, 중앙 세포를 96-웰 플레이트 (그라이너-바이오-윈, 네덜란드, 카탈로그 번호 655180) 내로 50,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 대조군 항체 IgG1-b12-FEAL의 시리즈 희석물을 첨가하고 (1,000 내지 0.051 ng/mL의 범위의 최종 농도; 3배 희석), 플레이트를 RT에서 15분 동안 인큐베이션하였다. PBMC를 해동시키고, 카운팅하고, 배지 (RPMI1640/10% FBS/1% 페니실린-스트렙토마이신/1% 글루타메이트)에 재현탁시킨 후, 중앙 세포에 8:1의 이펙터 대 표적 (E:T) 비로 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 (염색 완충제)로 2회 세척한 후, 세포를 염색하여 CD3 (T 세포; 인비트로젠, 카탈로그 번호 48-0037), CD14 (단핵구/대식세포; 바이오레전드; 카탈로그 번호 301834), CD19 (B 세포; 바이오레전드; 카탈로그 번호 302246), CD16 (단핵구/대식세포; 비디 바이오사이언시스; 카탈로그 번호 556618), CD56 (NK 세포; 비디 바이오사이언시스; 카탈로그 번호 564849) 및 CD66b (과립구; 바이오레전드; 카탈로그 번호 305116)를 사용하여 상이한 세포 집단을 구별하였다. 세포를 추가로 T 세포 마커 CD4 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 300521, 퍼시픽 블루에 접합됨), CD8 (1:100; 비디 바이오사이언시스, 카탈로그 번호 345772, FITC에 접합됨) 및 T 세포 활성화 마커 CD69 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 310934, BV650에 접합됨), CD25 (1:100; 인비트로젠, 카탈로그 번호 25-0259-42, PE-Cy7에 접합됨) 및 CD279/PD1 (1:50; 바이오레전드, 카탈로그 번호 329930, BV605에 접합됨)에 대해 염색하였다. 울트라콤파트 비드 (5 μ L; 인비트로젠, 카탈로그 번호 01-2222-42)를 갖는 단일 염색된 샘플이 포함되었고, 유동 세포계측기의 보상 조정을 위해 사용되었다. 4°C에서 30분의 인큐베이션 후, 플레이트를 염색 완충제로 2회 세척하고, 세포를 7-AAD (염색 완충제에서 1:100 희석)로 4°C에서 10분 동안 염색하였다. 세포를 FACS 셀레스타 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 분석하고, 데이터를 플로우조 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 프로세싱하였다. 용량-반응 곡선을 그래프패드 프리즘 V7.02 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)를 사용하여 비-선형 회귀 분석 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)을 사용하여 생성하였다.
- [0480] 살아있는 표적 세포의 백분율을 하기 식을 사용하여 계산하였다:
- [0481] % 살아있는 표적 세포 = (각각의 조건에서의 살아있는, 단일 셀트레이스 파레드-표지된 세포의 절대 수/ 임의의 항체를 첨가하지 않은 표적 세포 및 T 세포만을 함유하는 조건에서의 살아있는, 단일 셀트레이스 파레드 표지된 세포의 절대 수) x 100.

[0482] 결과

[0483] 도 25A는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 72시간 후에, 건강한 대조군 공여자 및 상이한 HL 및 NHL 환자 공여자 둘 다로부터 유래된 T 세포에 의해 매개된 L-428 종양 세포의 용량-의존적 세포독성을 유도하였음을 제시한다. 세포독성은 CD69, CD25 및 PD-1의 상향조절에 의해 예시된 T-세포 활성화 및 증식과 연관되었다 (도 25 B-D). 대조군 항체 IgG1-b12-FEAL에 대해서는 T-세포 매개 세포독성이 관찰되지 않았다. 공여자 E (AML)에 대해서는 L-428 종양 세포의 T-세포 매개 세포독성이 관찰되지 않았으며, 이는 PBMC 샘플 내의 T 세포의 낮은 빈도에 기인할 수 있었다 (표 11).

[0484] 함께, 이들 데이터는 HL 및 NHL 환자로부터의 말초 혈액 T 세포가 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 존재 하에서 종양 세포주의 T-세포 매개 세포독성을 유도할 수 있음을 예시한다.

[0485] 표 11. 1차 환자 PBMC 샘플 특징.

샘플 #	코드	기원	처리 (Tx) 상태	회사	세포 생존력 (%)	T 세포의 빈도 (%)
A	100000537	호지킨, 결절성 경화증 호지킨 림프종	스테이지 IV, Tx 전	디스커버리 라이프 사이언시스	63.5	71.1
B	120328910	호지킨 림프종	Tx 전		81.7	56.1
C	17A0D69A3	호지킨, 혼합 세포종실성 호지킨 림프종	Tx 전		87.5	35.6
D	D4931CBAB	호지킨, 결절성 림프구 우위형 호지킨 림프종	스테이지 II-A, Tx 전, CD20+		63.95	59.9
E	200003963	급성 골수성 백혈병 (AML)	활성-Tx, 시험된 EBV		65.55	17.4
F	121426858	NHL, 말초 T-세포 림프종 (PTCL) - 명시되지 않음	스테이지 III, Tx 후, 처리 CHP+아드세트리스/아드리아마이신		66.2	68
HC		건강한 대조군 PBMC	N.A.	산원	86.55	48.4

[0486]

[0487] 실시예 17 - SCID 마우스에서의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 약동학 특성의 평가

[0488] 11-12주령, 암컷 종양-무함유 SCID 마우스 (C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdcscid 마우스, 엔비고(Envigo)) (그룹당 3 마리의 마우스)를 1 µg (0.05 mg/kg), 10 µg (0.5 mg/kg) 또는 100 µg (5 mg/kg)의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 단일 용량으로 정맥내로 (IV) 주사하였다. BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 마우스 단백질과 교차-반응하지 않기 때문에, 실험을 표적-매개 클리어런스의 부재 하에서 항체 클리어런스를 연구하기 위해 설정하였다.

[0489] 40 µL 혈액 샘플을 항체 투여 후 10분, 4-6시간, 24시간, 2일, 7일, 14일 및 21일에 헤파 경유 정맥 천공 또는 정맥 복재정맥 천공으로부터 수집하였다. 혈액을 K2-EDTA 함유 바이알 (사스테드(Sarstedt), 마이크로베트 (Microvette) CB300, 카탈로그 번호 16.444.100) 내로 수집하고, 10,000 g에서 10분 동안 원심분리하였다. 혈장 상청액을 표지된 에펜도르프(Eppendorf) 바이알에 옮기고, 혈장 IgG 농도 결정까지 -80℃에서 저장하였다.

[0490] 인간 IgG 농도를 총 인간 IgG 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA)을 사용하여 결정하였다. 100 µL PBS (바이오 트레이딩(BioTrading), 카탈로그 번호 K654F500PP)에서 2 µg/mL의 농도로 96-웰 마이크로론(Microlon) ELISA 플레이트 (그라이너, 독일)에 4℃에서 밤새 코팅된 마우스 항-인간 IgG-카파 클론 MH16 (CLB 산원, 네덜란드;

카탈로그 번호 M1268)를 포획 항체로서 사용하였다. 플레이트를 PBSA (0.2% 소 혈청 알부민 [BSA]을 갖는 PBS)로 실온 (RT)에서 1시간 동안 차단한 후, 샘플을 첨가하고, PBSA에서 시리즈 희석하고, 플레이트 진탕기 상에서 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 300 μ L PBST (0.05% 트윈 20으로 보충된 PBS)로 3회 세척하고, 후속적으로 RT에서 1시간 동안 염소 항-인간 IgG 이뮤노글로불린 (잭슨, 미국 펜실베이니아주 웨스트 그레이크스; 카탈로그 번호 109-035-098; 0.2% BSA로 보충된 PBST에 1:10,000)과 인큐베이션하였다. 플레이트를 300 μ L PBST로 3회 세척한 후, 광으로부터 보호된 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 카탈로그 번호 11112422001 및 11112597001)과 인큐베이션하였다. 100 μ L 2% 옥살산 (시그마-알드리치, 카탈로그 번호 33506)을 첨가함으로써 반응을 정지시키고, RT에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 흡광도를 ELx808 흡광도 마이크로플레이트 판독기 (비오텍, 미국 버몬트주 위누스키) 상에서 405 nm에서 측정하였다.

[0491] 기준 항체 인간 IgG1 λ (순수한 단백질 30C, 카탈로그 번호 BP078)로부터, 표준 곡선을 PBSTA 중 3배 희석물에서 추가로 희석되도록 생성하였다 (농도 범위: 1 mg/mL [3 μ L]). 주사된 물질을 사용하여 제2 표준 곡선을 생성하고, PBSTA 중 3배 희석물에서 추가로 희석되도록 1 mg/mL (3.6 μ L의 항체)의 농도로 5 mg/kg 용량으로부터 제조하였다.

[0492] 결과

[0493] 기준 표준으로부터, 교정 곡선을 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel)에서 4-파라미터 로지스틱 적합 곡선을 사용하여 미지물의 내삽에 의해 계산하였다. 혈장 샘플 중의 인간 IgG1 농도를 교정 곡선의 식으로부터 계산하고, 플롯팅하고 (도 26A), 곡선하 면적 (AUC)을 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 혈액 샘플링의 마지막 날 (제21일)까지의 IgG 클리어런스를 식 $D \times 1.000 / AUC$ 에 의해 결정하였으며, 여기서 D는 주사의 용량 (1 mg/kg)이다 (도 26B).

[0494] BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR은 마우스 단백질과 교차-반응하지 않으며, 따라서 약동학 특성은 다른 비-결합 야생형 인간 IgG1 분자와 대등할 것으로 예상될 것이다. 모든 용량 그룹에 대한 예상된 인간 IgG 혈장 농도는 대략 100 μ g/mL ($\sim$ 5 mg/kg), 10 μ g/mL ($\sim$ 0.5 mg/kg) 또는 1 μ g/mL ($\sim$ 0.05 mg/kg)인 것으로 계산되었다. 모든 시점에 대해, 0.05 mg/kg으로 처리된 동물로부터의 샘플은 측정가능하지 않았다.

[0495] BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 혈장 클리어런스는 보통의 인간 IgG1의 예측된 혈장 클리어런스와 대등하였다. 평균 최대 인간 IgG 혈장 농도 (C_{max})는 보통의 인간 IgG1의 예측된 C_{max} 와 대등하였다.

[0496] 따라서, BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR의 약동학 프로파일은 표적 결합의 부재 하에서 비-중량 보유 SCID 마우스에서의 보통의 인간 IgG1에 대해 예측된 것과 대등하다.

[0497] **실시예 18 - BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에의 C1q 결합의 평가**

[0498] 막-결합된 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, 또는 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 생성된 모 항체, 즉, IgG1-huCD3-FEAL 및 IgG1-CD30-MDX060-FERR에의 보체 단백질 C1q의 결합을 CD3- 또는 CD30-발현 세포 중 어느 하나를 사용하여 평가하였다.

[0499] A. CD3-발현 세포에 결합된 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에의 C1q 결합

[0500] CD3-결합된 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 IgG1-huCD3-FEAL에의 보체 단백질 C1q의 결합을 자극된 인간 $CD8^+$ T-세포를 사용하여 시험하였다. IgG1-CD52-E430G는 양성 대조군으로서 포함되었으며, 이는 CD52 항체 CAMPATH-1H에 기반한 VH 및 VL 도메인을 갖고, 세포 표면에 결합되는 경우 C1q에 효율적으로 결합하는 것으로 공지된 Fc-증진된 백본을 갖는다. 비-결합 음성 대조군 항체로서, IgG1-b12-FERR 및 IgG1-b12가 포함되었다.

[0501] 인간 $CD8^+$ T 세포를 로세트셋™ 인간 $CD8^+$ T 세포 풍부화 카테일 (스텝셀 테크놀로지스, 카탈로그 번호 15023C.2)을 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 음성 선택에 의해 건강한 자원자로부터 수득된 연막 (산원)으로부터 정제하였다 (풍부화하였다). 정제된 T 세포를 철을 갖는 10% 열-불활성화된 공여자 소 혈청 (DBSI; 킵코, 카탈로그 번호 20731-030) 및 페니실린/스트렙토마이신 (pen/strep; 론자, 카탈로그 번호 DE17-603E)으로 보충된 25 mM HEPES 및 L-글루타민 (론자, 카탈로그 번호 BE12-115F)을 갖는 T-세포 배지 (로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 [RPMI]-1640 배지에 재현탁시켰다.

[0502] 항-CD3/CD28 비드 (디나비즈(Dynabeads)™ 인간 T-활성화제 CD3/CD28; 씨모피셔 사이언티픽, 카탈로그 번호 11132D)를 PBS로 세척하고, T-세포 배지에 재현탁시켰다. 비드를 풍부화된 인간 $CD8^+$ T 세포에 1:1 비로 첨가

하고, 37℃, 5% CO₂에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 비드를 자석을 사용하여 제거하고, 세포를 PBS에서 2회 세척하고, 다시 카운팅하였다.

[0503] 활성화된 CD8⁺ T 세포에의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 IgG1-huCD3-FEAL의 결합을 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 IgG1-huCD3-FEAL (30 µg/mL), 및 R-피코에리트린 (PE)-접합된 염소-항-인간 IgG F(ab')₂ (GMB FACS 완충제에서 1:200 희석됨; 잭슨 이뮤노리서치, 카탈로그 번호 109-116-098)를 사용하여 유동 세포계측법에 의해 확인하였다.

[0504] 활성화된 CD8⁺ T 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 시딩하고 (30,000개 세포/웰), 펠릿화하고, 30 µL 검정 배지 (0.1% [w/v] 소 혈청 알부민 분획 V (BSA; 로슈, 카탈로그 번호 10735086001) 및 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 25 mM HEPES 및 L-글루타민을 갖는 RPMI-1640)에 재현탁시켰다. 후속적으로, 50 µL의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL, IgG1-b12-FERR, IgG1-CD52-E430G, 또는 IgG1-b12 (검정 배지에서 3배 희석 단계에서 1.7 x 10⁻⁴ - 30 µg/mL의 최종 농도)를 각각의 웰에 첨가하고, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 항체가 세포에 결합하는 것을 허용하였다.

[0505] C1q의 공급원으로서 인간 혈청 (20 µL/웰; 산킨, 로트 20L15-02)을 20%의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 얼음 상에서 45분 동안 인큐베이션하고, 이어서 차가운 GMB FACS 완충제로 2회 세척하고, 알로피코시아닌-접합된 마우스-항-CD8 (비디 바이오사이언시스, 카탈로그 번호 555369; GMB FACS 완충제에서 1:50 희석됨)의 존재 또는 부재 하에서 어두운 곳에서 4℃에서 30분 동안 50 µL 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)-접합된 토끼 항-인간 C1q (20 µg/mL의 최종 농도 (DAKO, 카탈로그 번호 F0254); GMB FACS 완충제에서 1:75 희석됨)와 인큐베이션하였다. 세포를 차가운 GMB FACS 완충제로 2회 세척하고, 2 mM 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA; 시그마-알드리치, 카탈로그 번호 03690) 및 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI) 생존력 염료 (1:5,000; 비디 파밍겐 (BD Pharmingen), 카탈로그 번호 564907)로 보충된 20 µL의 GMB FACS 완충제에 재현탁시켰다. 생존 세포에의 C1q 결합 (DAPI 배제에 의해 확인된 바와 같음)을 아이큐3 스크리너 (인텔리시트 코포레이션) 상에서 유동 세포계측법에 의해 분석하였다. 데이터를 아이큐 소프트웨어 (인텔리시트 코포레이션, 포어시트(ForeCyt)® 엔터프라이즈 클라이언트 에디션(Enterprise Client Edition) 6.2 [R3], 버전 6.2.652)를 사용하여 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 분석 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)을 사용하여 분석하였다.

[0506] 결과

[0507] 도 27A는 막-결합된 IgG1-CD52-E430G에의 용량-의존적 C1q 결합이 관찰된 반면, 막-결합된 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 또는 IgG1-huCD3-FEAL에의, 또는 비-결합 대조군 항체에의 C1q 결합은 관찰되지 않았음을 제시한다.

[0508] B. CD30-발현 세포에 결합된 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR에의 C1q 결합

[0509] CD30-결합된 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 IgG1-huCD30-MDX060-FERR에의 보체 단백질 C1q의 결합을 NCEB-1 외투 세포 림프종 세포를 사용하여 시험하였다. 양성 대조군으로서, IgG1-7D8-E430G (항-CD20)가 포함되었으며, 이는 불활성화 돌연변이를 함유하지 않고, C1q에 결합하는 능력을 보유한다. 비-결합 음성 대조군 항체로서, IgG1-b12-FERR이 포함되었다.

[0510] NCEB-1 세포를 0.1% 소 혈청 알부민 (BSA, 분획 V, 로슈, 카탈로그 번호 10735086001) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (김코, 카탈로그 번호 15140-122)을 함유하는 검정 배지 (RPMI-1640 (론자, 스위스, 카탈로그 번호 BE12-115F)에 2x10⁶개 세포/mL의 농도로 현탁시켰다. 종양 세포 (50 µL 중 100,000개 세포)를 96-웰 둥근 바닥 플레이트 (그라이너 바이오, 카탈로그 번호 650180)에 첨가하였다. 다음으로, 30 µL의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, 또는 대조군 항체 (검정 배지에서 희석된 3배 희석 단계에서 5.6 x 10⁻⁵ - 10 µg/mL의 최종 농도)를 각각의 웰에 첨가하고, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 항체가 세포에 결합하는 것을 허용하였다.

[0511] 세포의 절반 (40 µL의 세포 현탁액, 항체 함유)을 항체 결합을 체크하기 위해 상이한 플레이트에 플레이팅하였다. NCEB-1 세포에의 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 및 IgG1-CD30-MDX060-FERR의 결합을 R-피코에리트린 (PE)-접합된 염소-항-인간 IgG F(ab')₂ (FACS 완충제에서 1:500 희석됨; 잭슨 이뮤노리서치, 카탈로그 번호

109-116-098)를 사용하여 유동 세포계측법에 의해 확인하였다.

[0512] 인간 혈청 (10 μ L/웰; 산킨, 로트 21K04-01)을 나머지 40 μ L의 세포 현탁액 에 첨가하고 (20%의 최종 농도), 얼음 상에서 45분 동안 인큐베이션하고, 이어서 FACS 완충제로 세척하고, 어두운 곳에서 4℃에서 30분 동안 25 μ L FITC-접합된 토끼 항-C1q 항체 (20 μ g/mL의 최종 농도 (다코(DAKO), 카탈로그 번호 F0254); FACS 완충제에서 희석됨)와 인큐베이션하였다. 세포를 차가운 FACS 완충제로 세척하고, TO-PRO™-3 생존력 염색 (1:5000; 씨모피서, 카탈로그 번호 T3605)으로 보충된 30 μ L의 FACS 완충제에 재현탁시키고, 아이큐3 스크리너 (인텔리시트 코포레이션) 상에서 측정하였다. 데이터를 아이큐 소프트웨어 (인텔리시트 코포레이션, 포어시트® 엔터프라이즈 클라이언트 에디션 6.2 [R3], 버전 6.2.652)를 사용하여 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀 분석 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)을 사용하여 분석하였다.

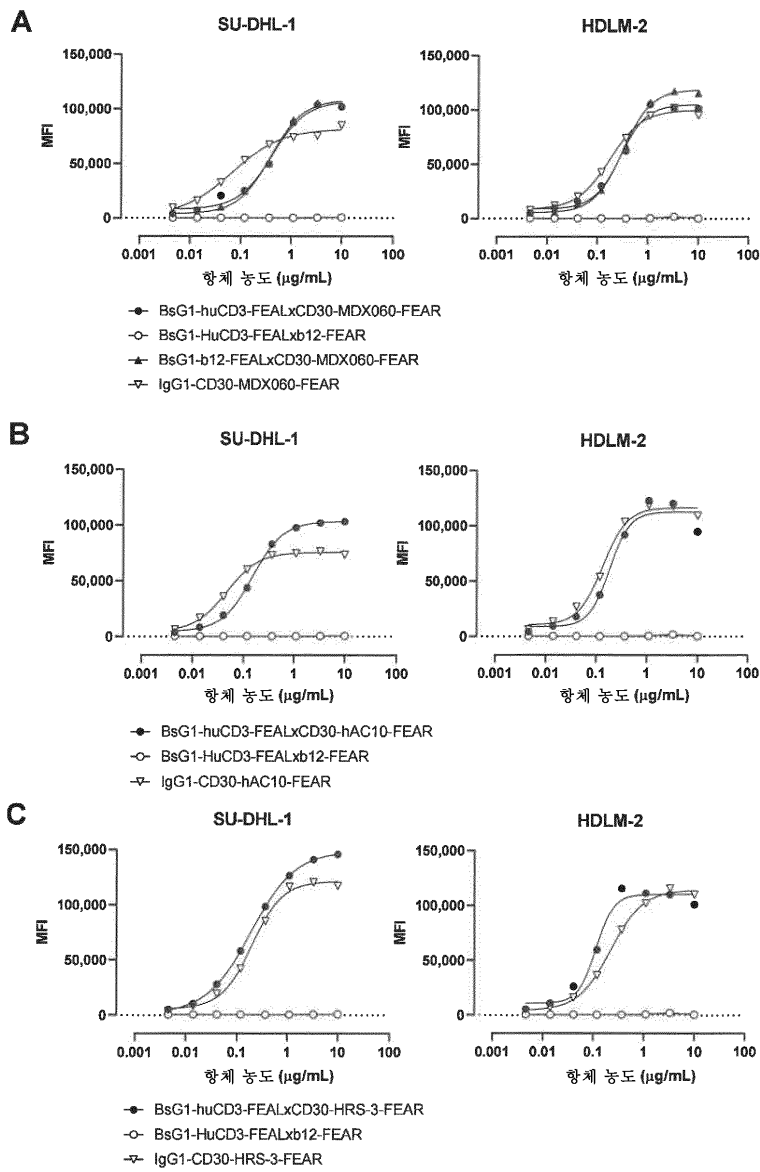
[0513] 결과

[0514] 도 27B는 막-결합된 IgG1-CD20-E430G에의 용량-의존적 C1q 결합이 관찰된 반면, 막-결합된 BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR 또는 IgG1-CD30-MDX060-FERR에의, 또는 비-결합 대조군 항체에의 C1q 결합은 관찰되지 않았음을 제시한다.

[0515] 따라서, 이들 결과는 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR이 C1q에 결합하지 않음을 입증하였으며, 이는 기능적으로 불활성인 백본을 확인시켜 주었다.

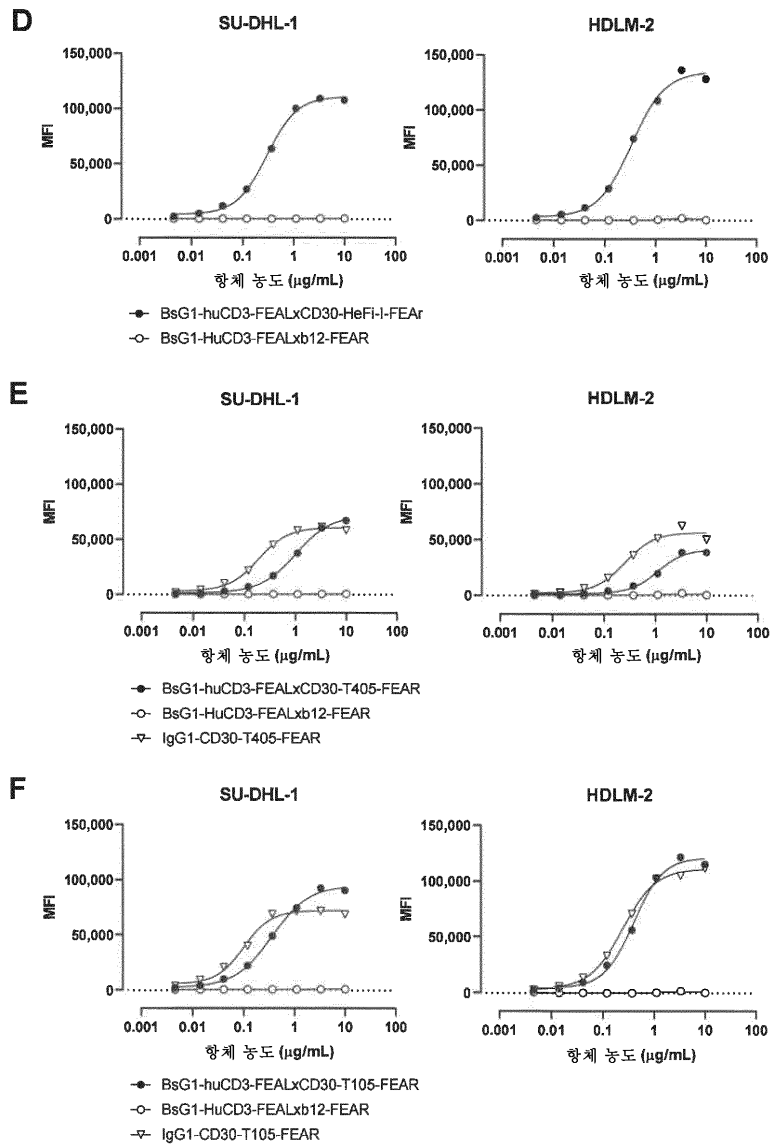
도면

도면1i



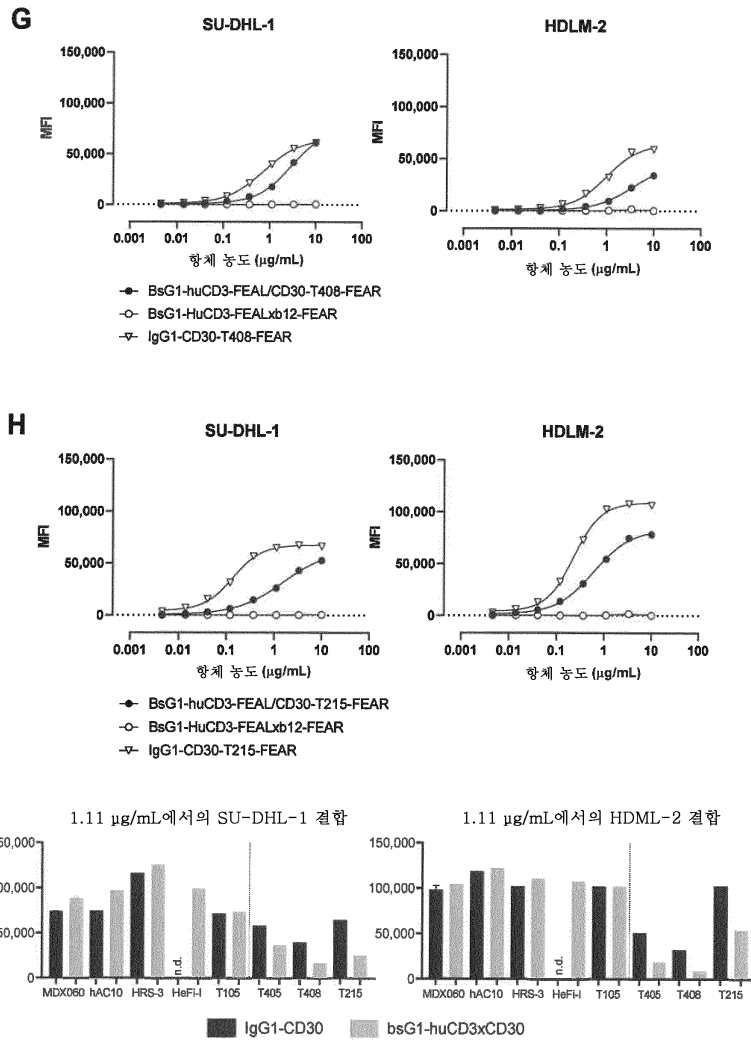
도면1ii

(계속)

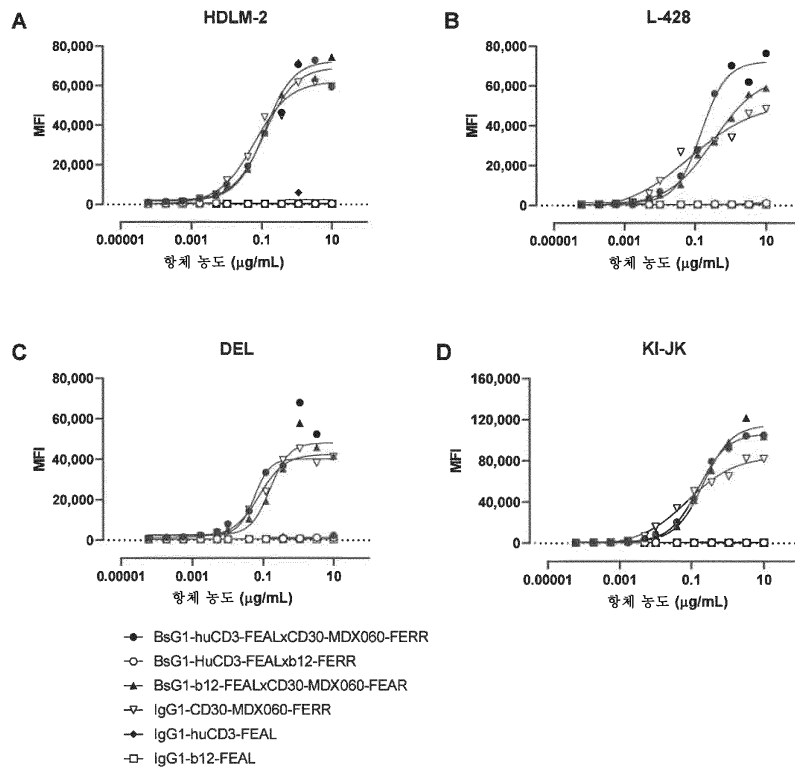


도면1iii

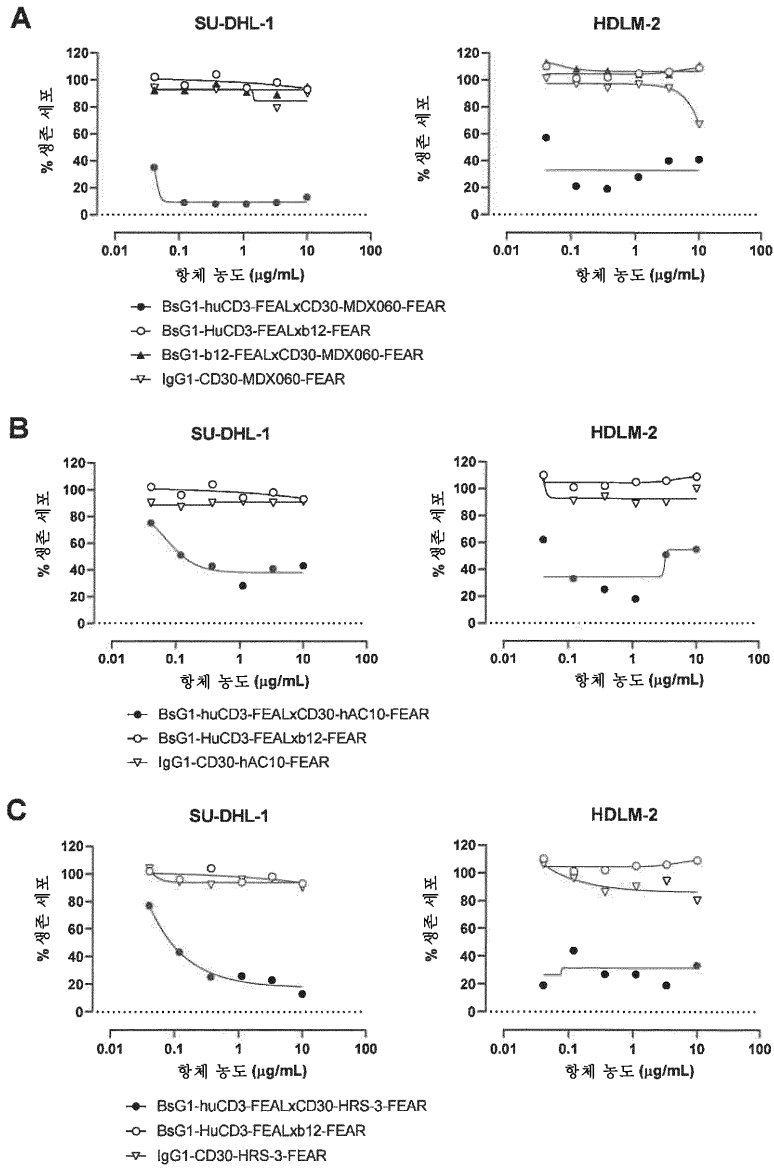
(계속)



도면2



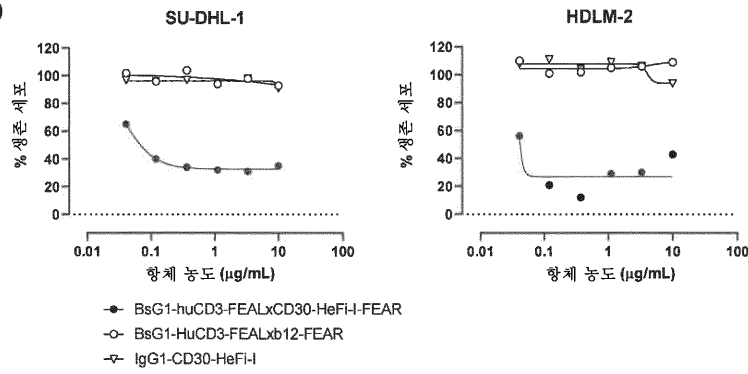
도면3i



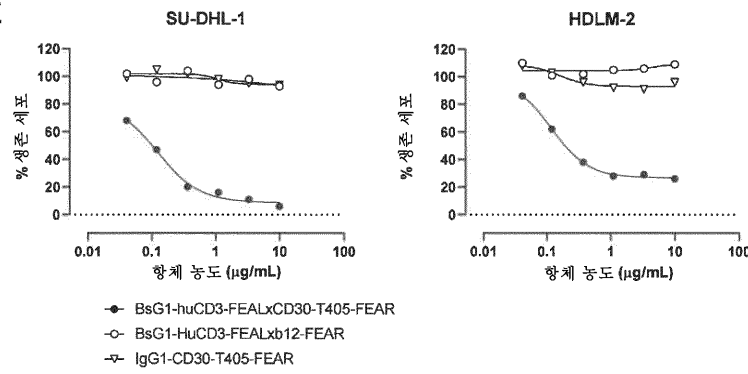
도면3ii

(계속)

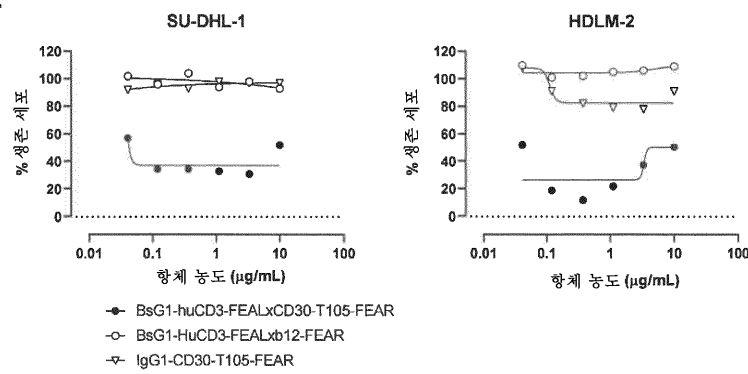
D



E

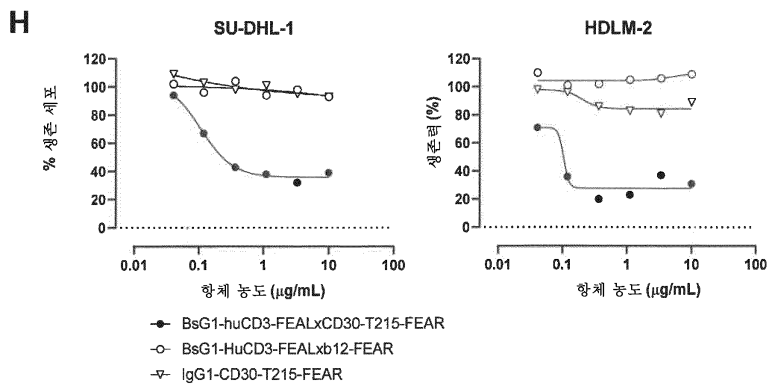
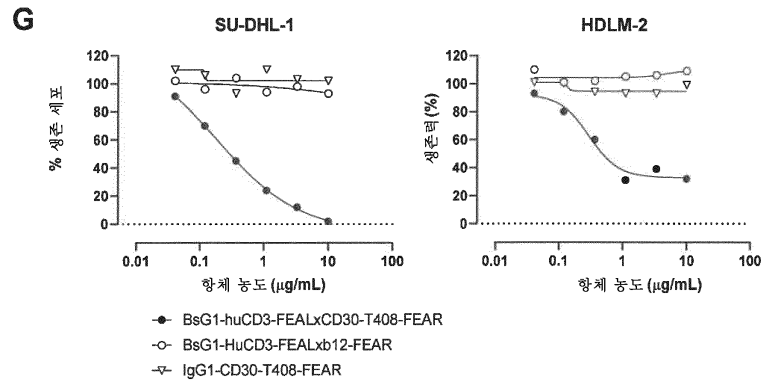


F

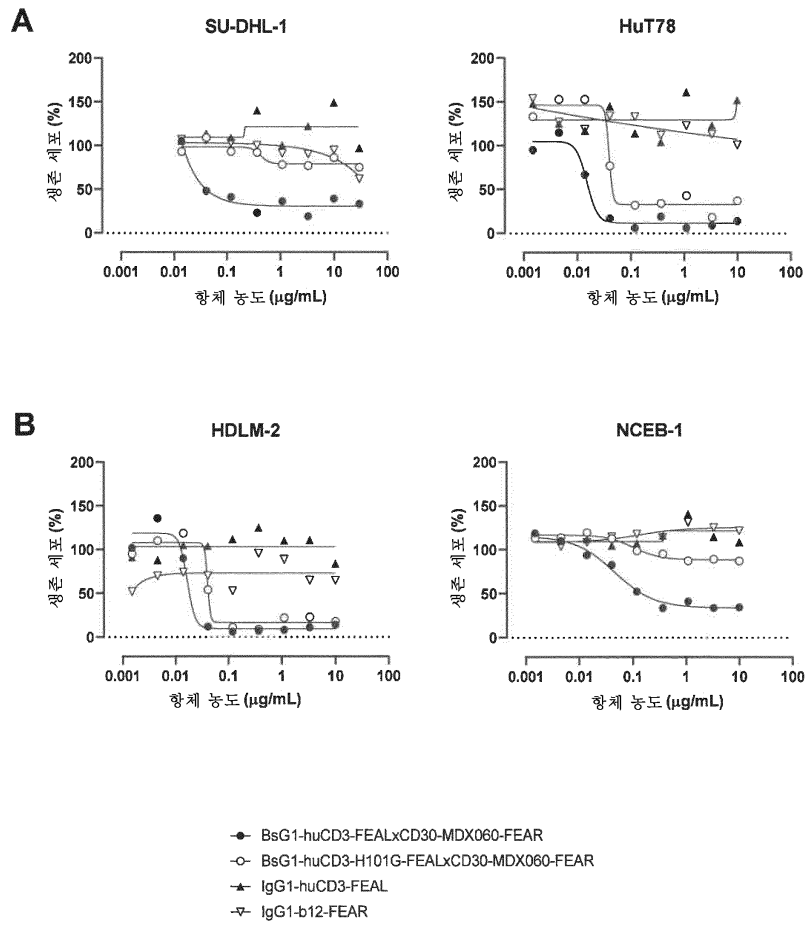


도면3iii

(계속)

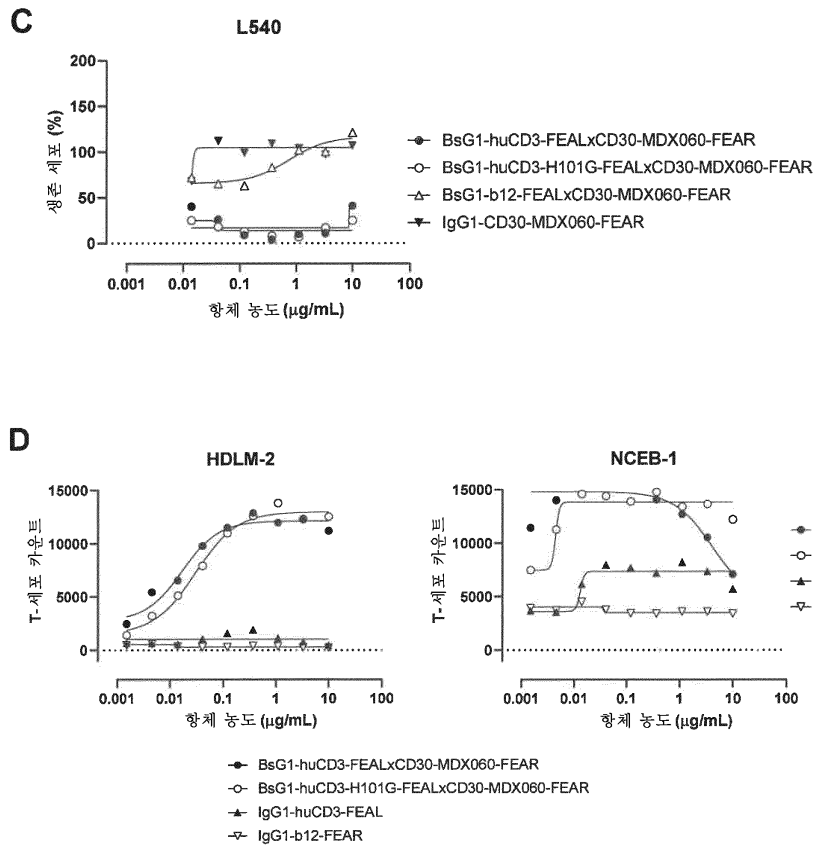


도면4i

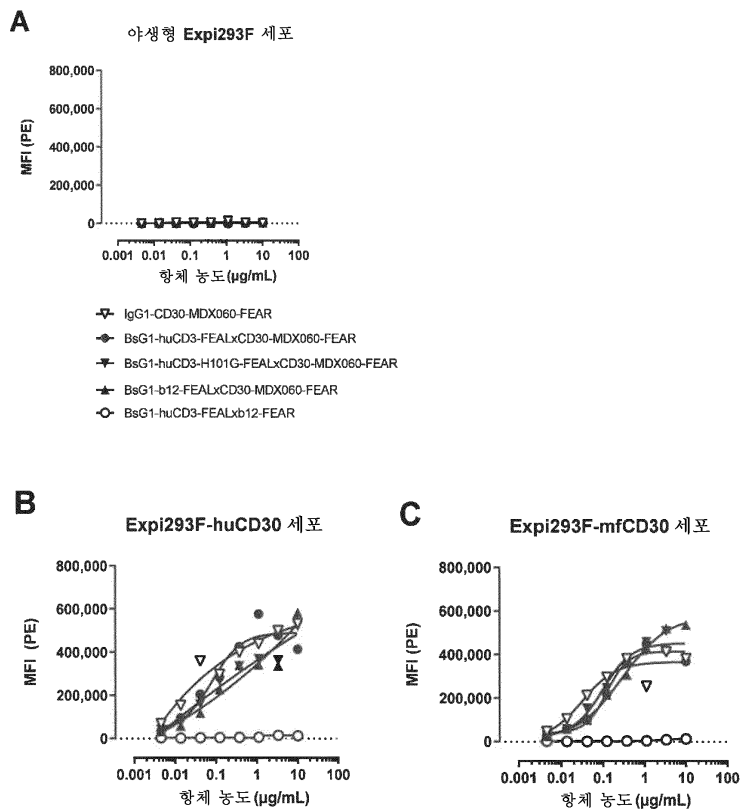


도면4ii

(계속)



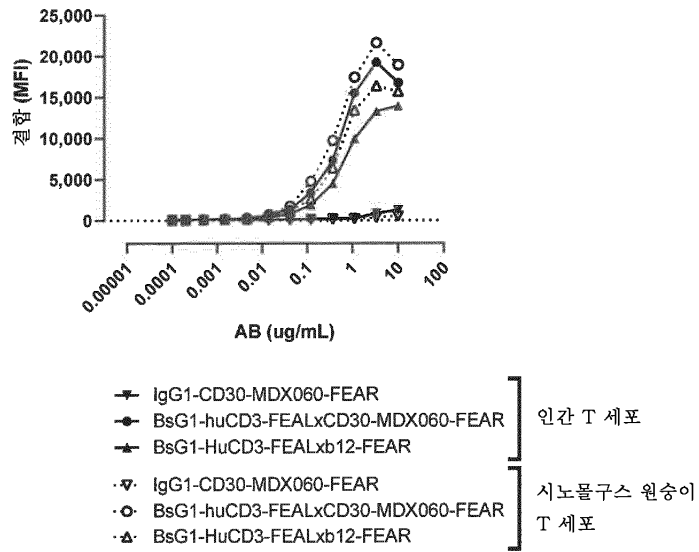
도면5i



도면5i

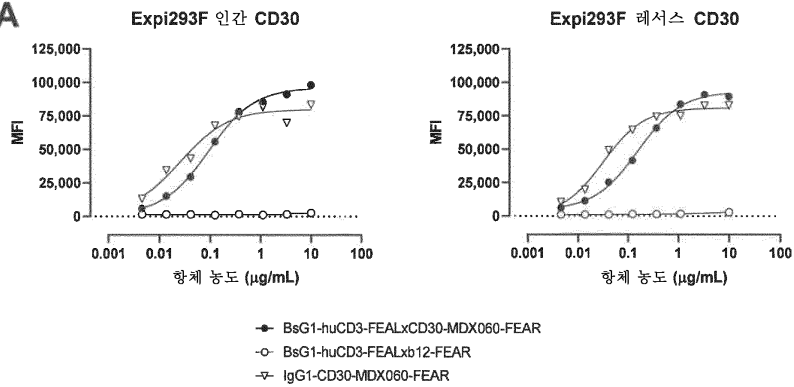
(계속)

D

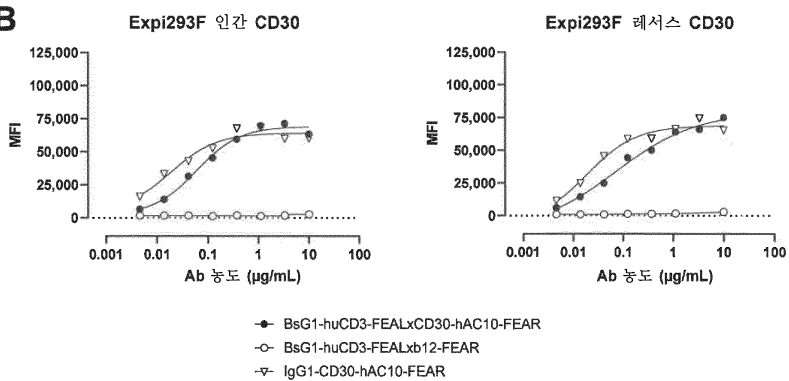


도면6i

A

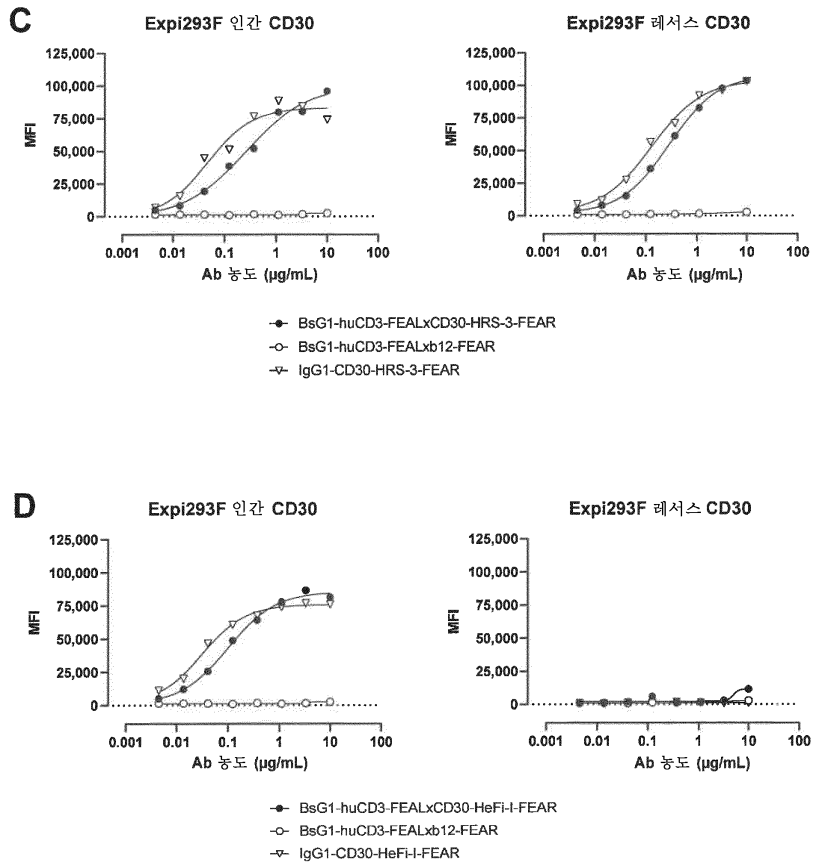


B



도면6ii

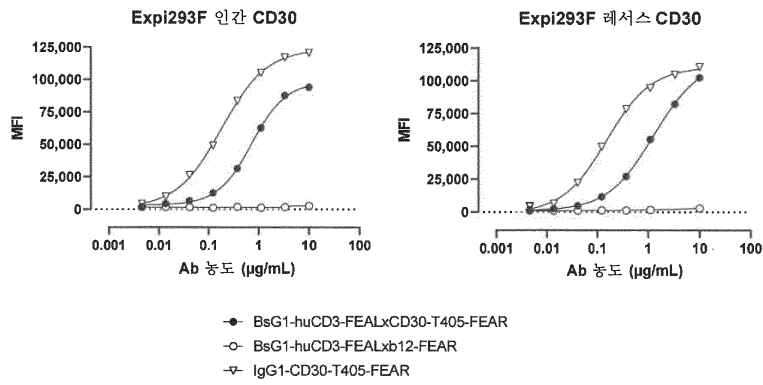
(계속)



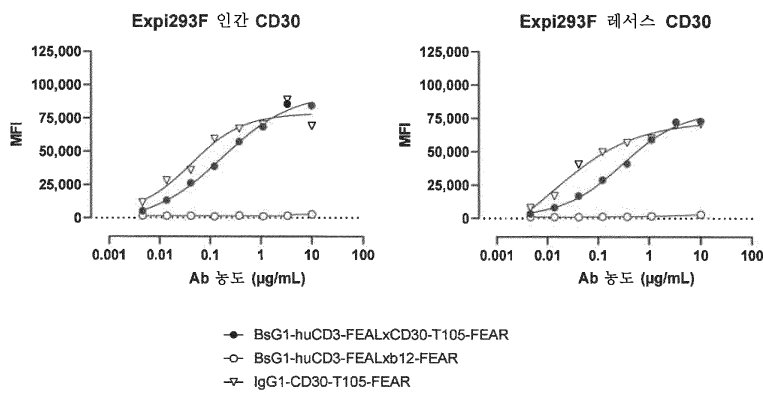
도면6iii

(계속)

E

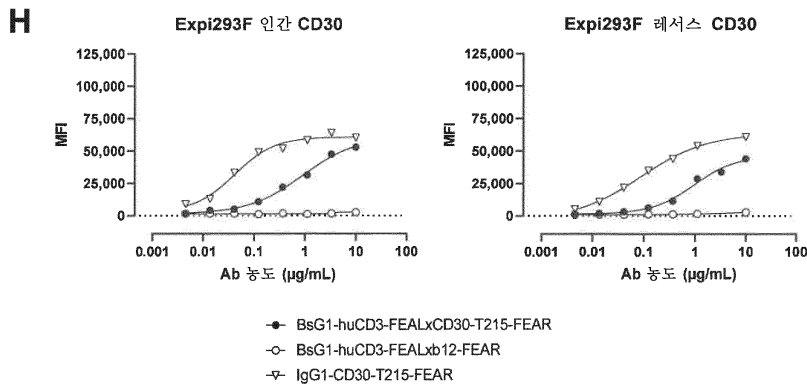
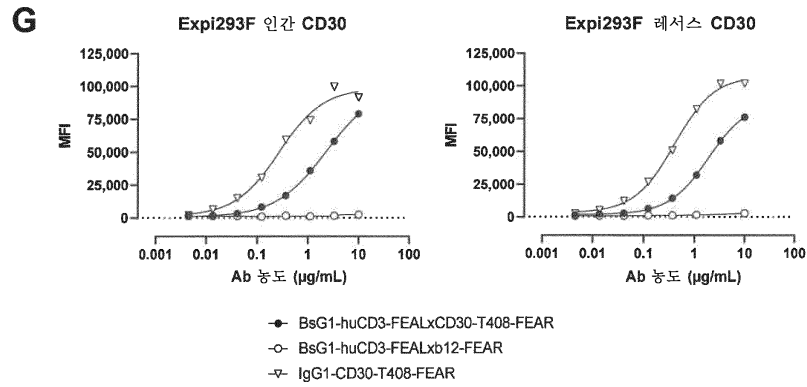


F

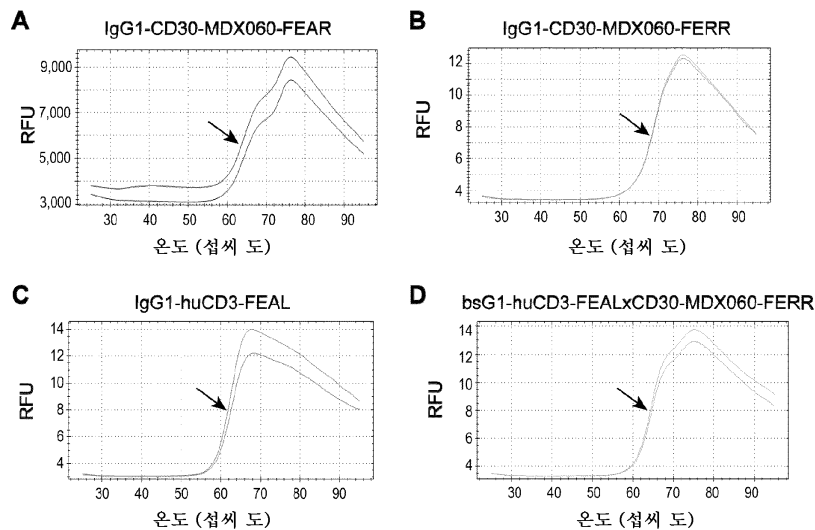


도면6iv

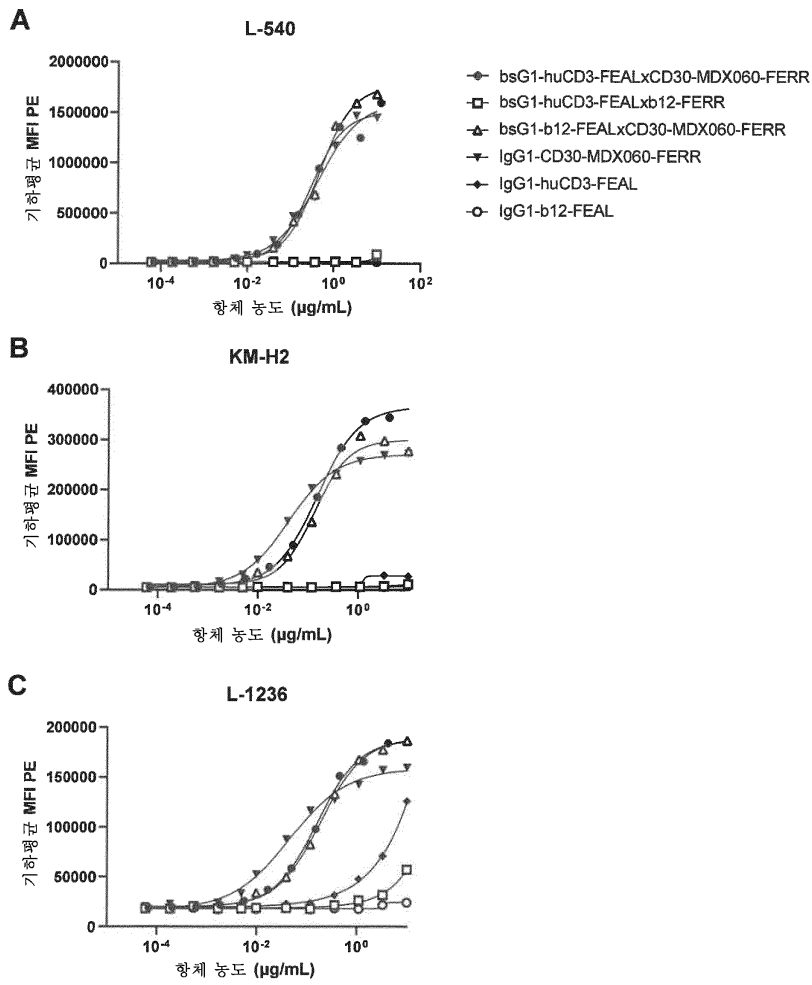
(계속)



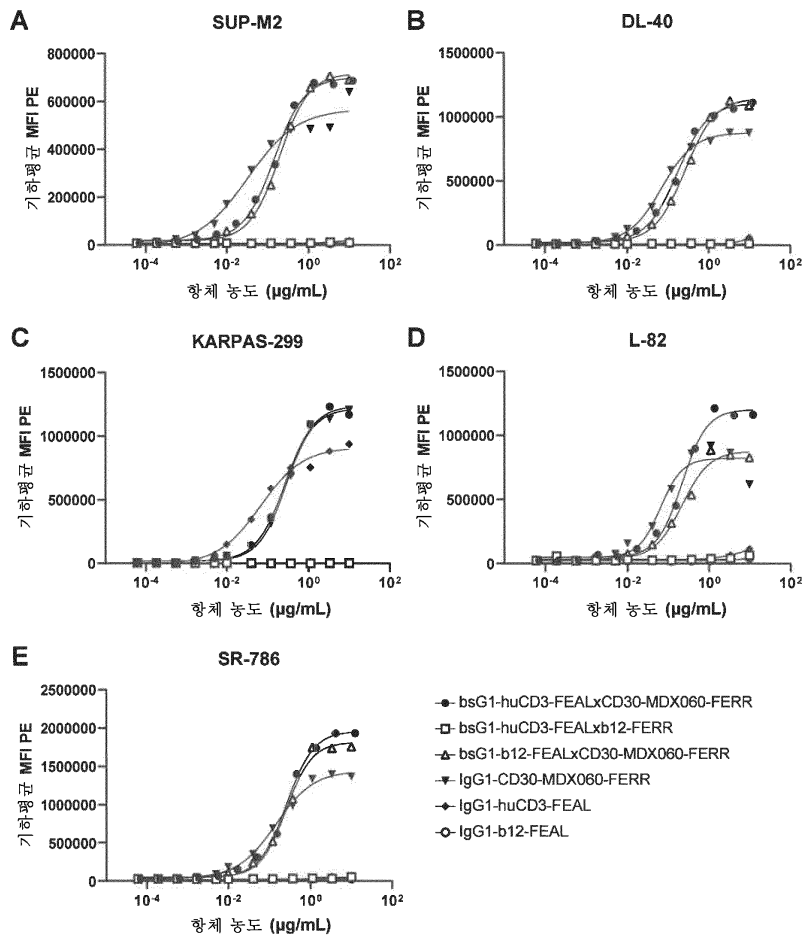
도면7



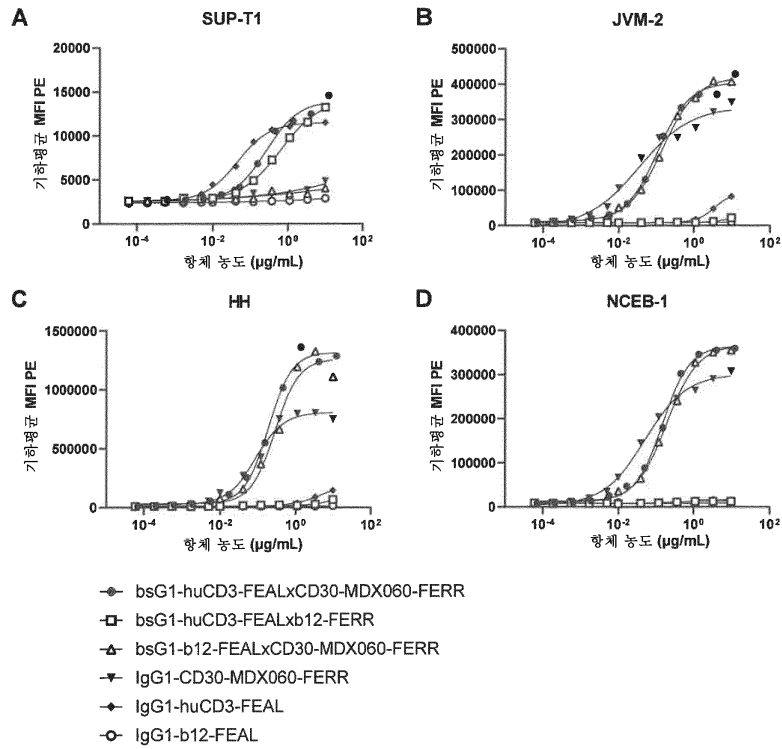
도면8



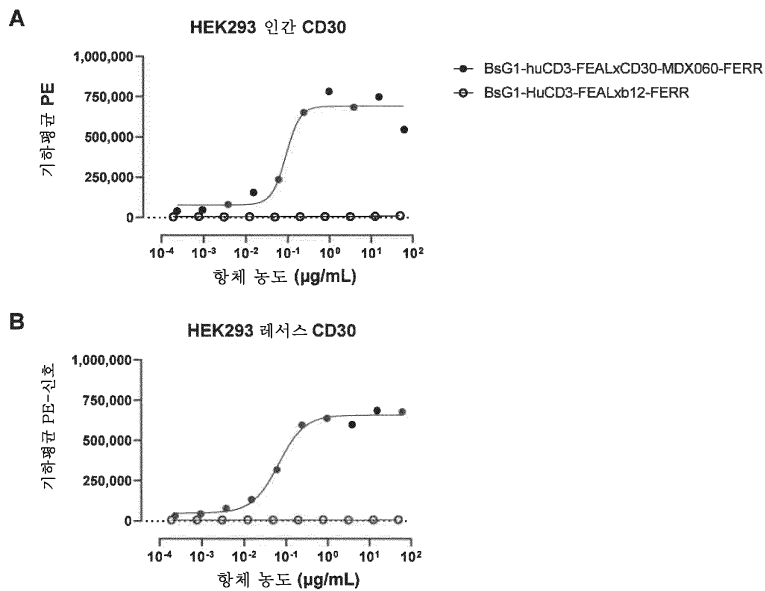
도면9



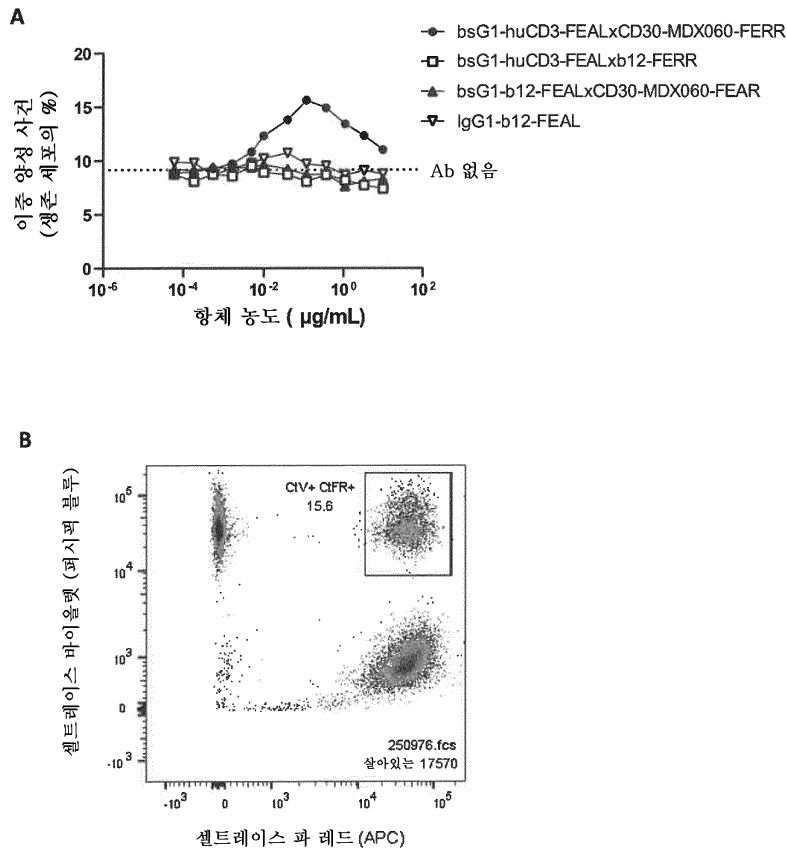
도면10



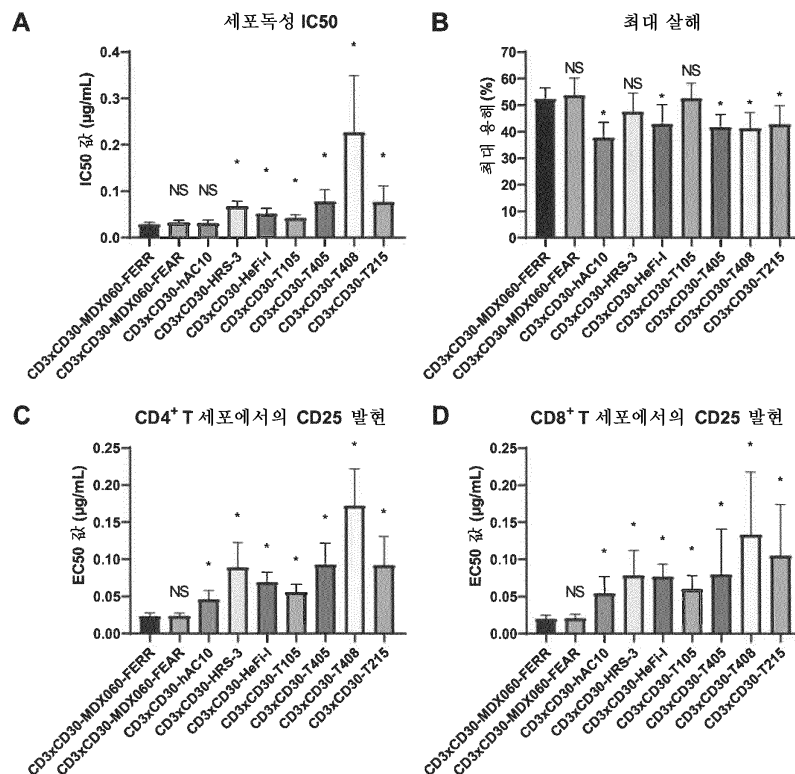
도면11



도면12

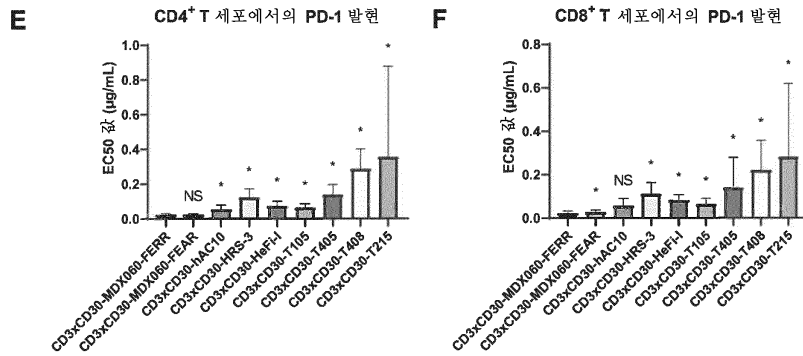


도면13i

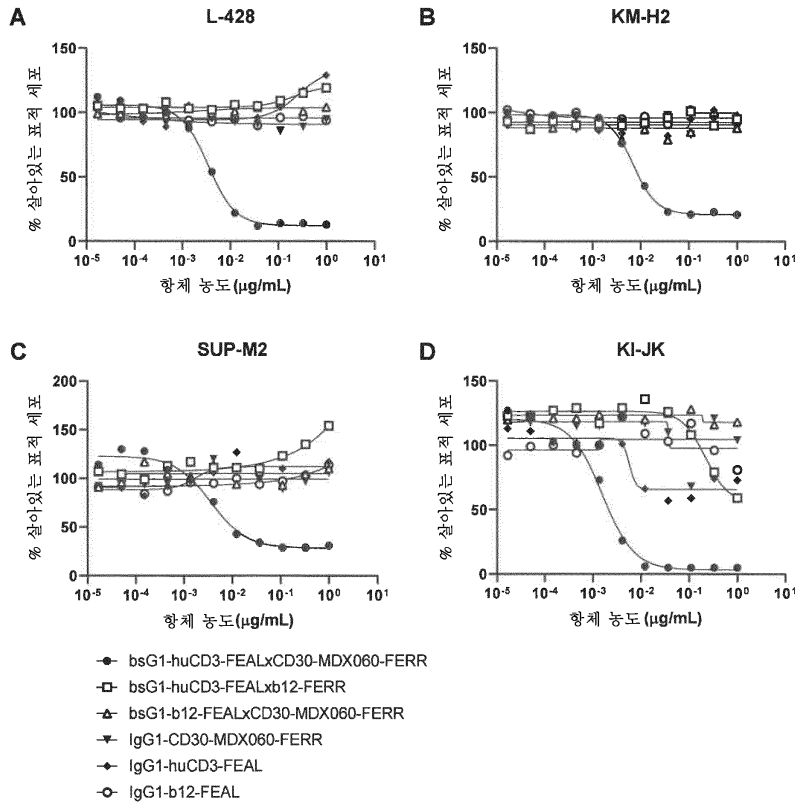


도면13ii

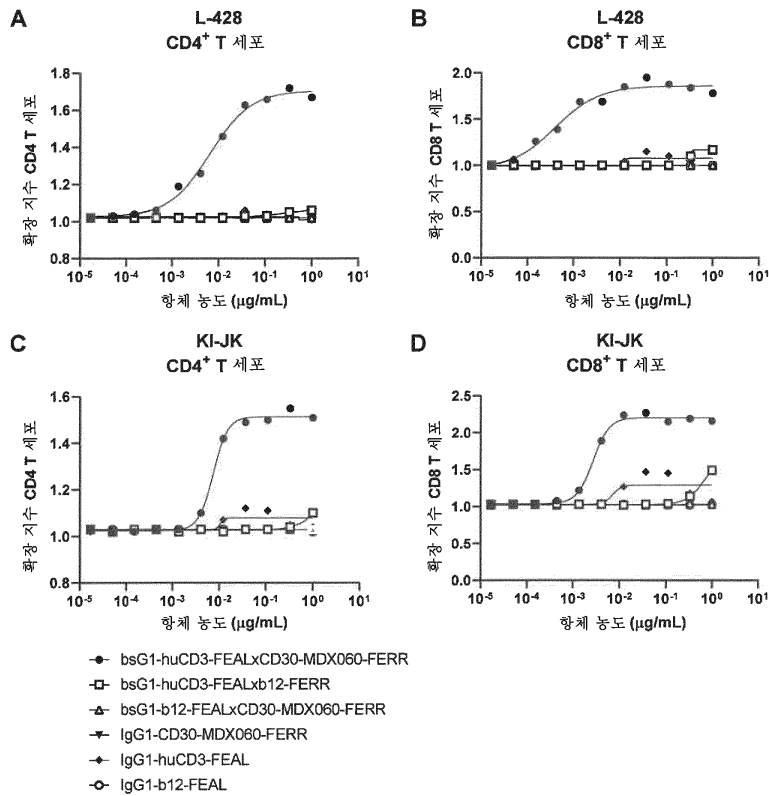
(계속)



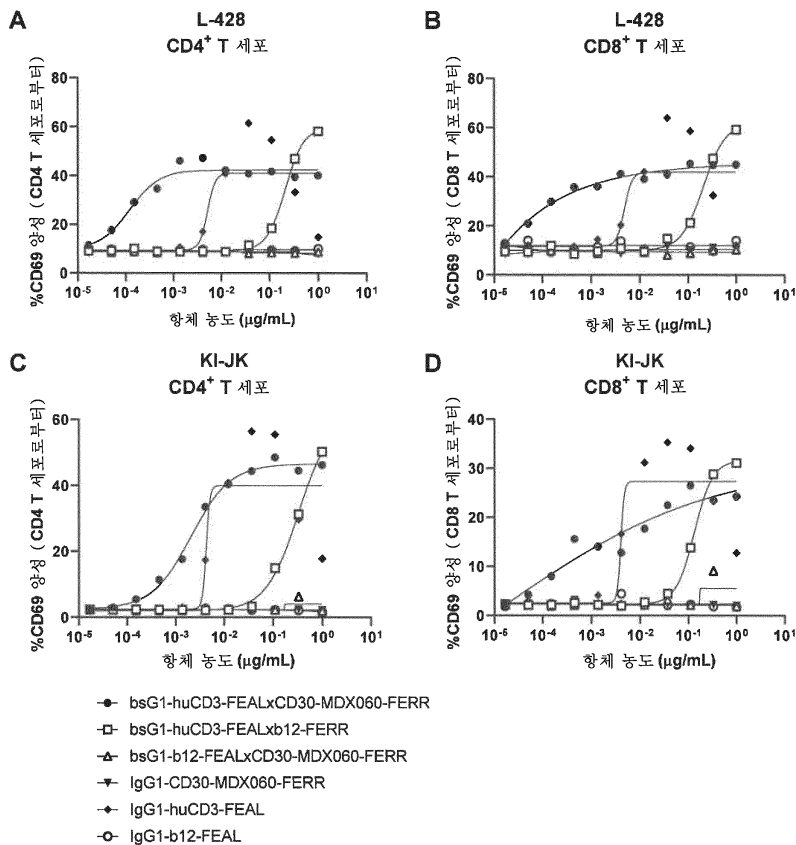
도면14



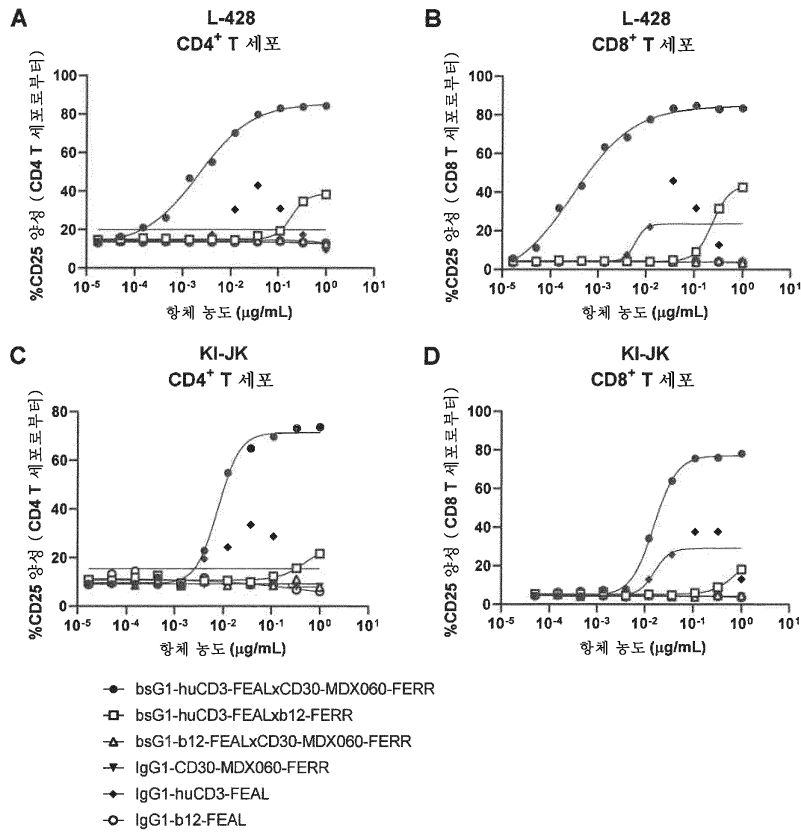
도면15



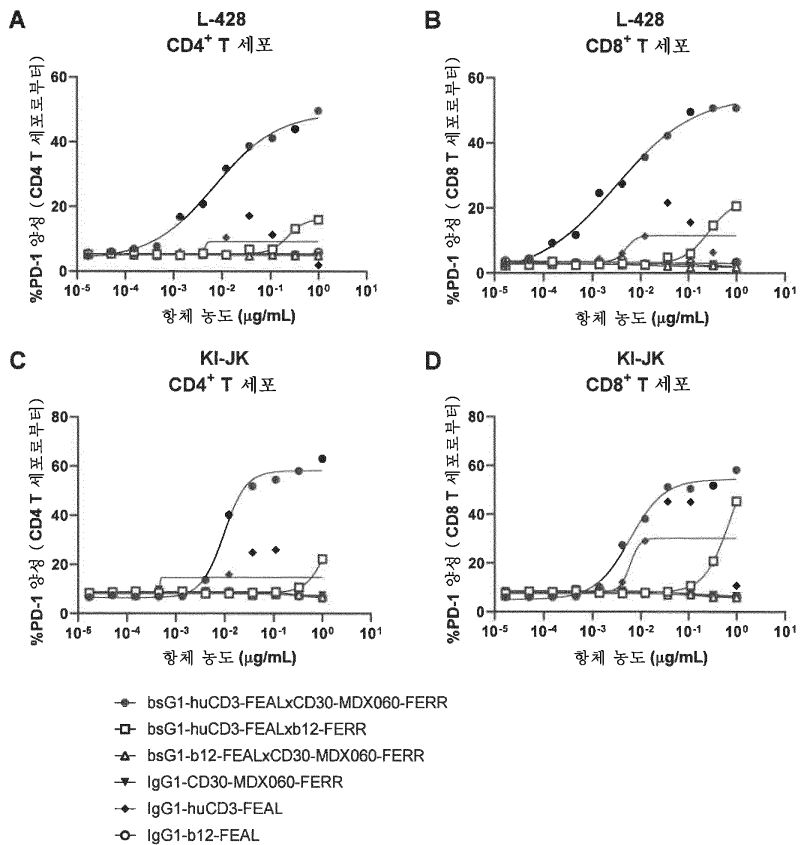
도면16



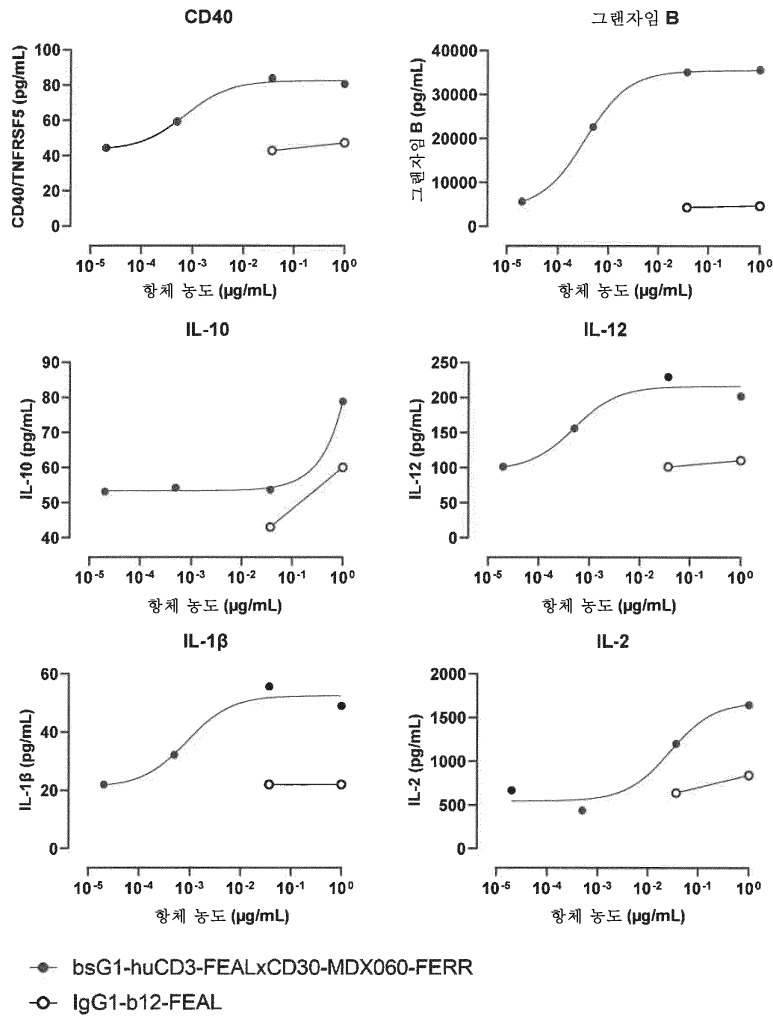
도면17



도면18

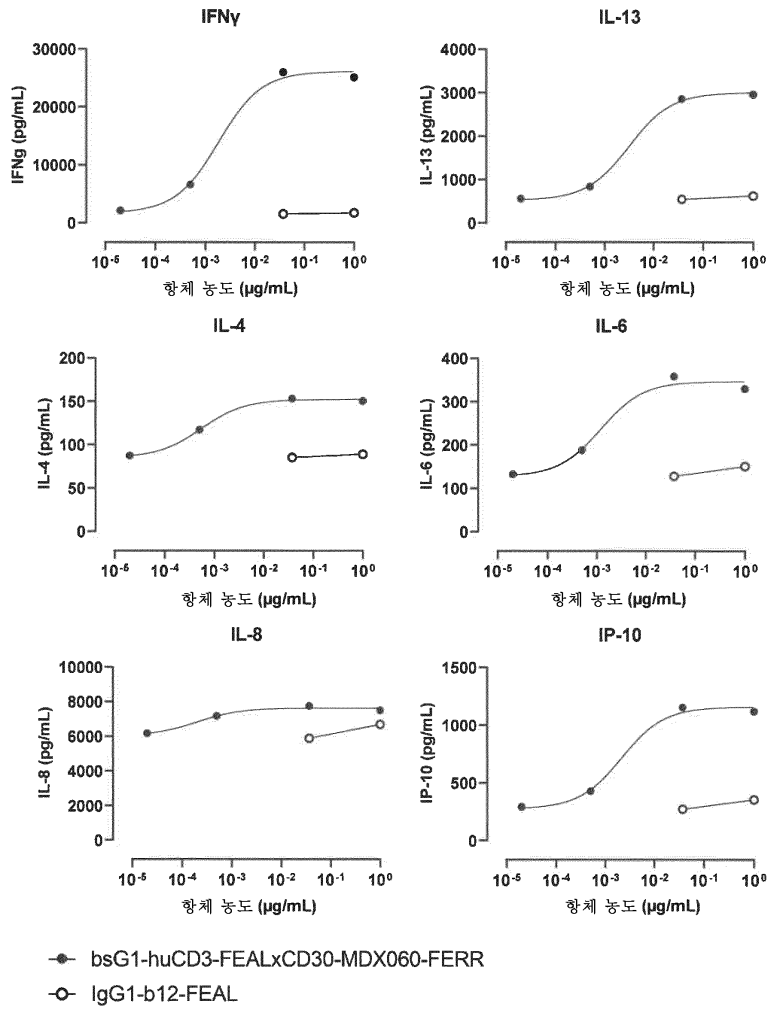


도면19i



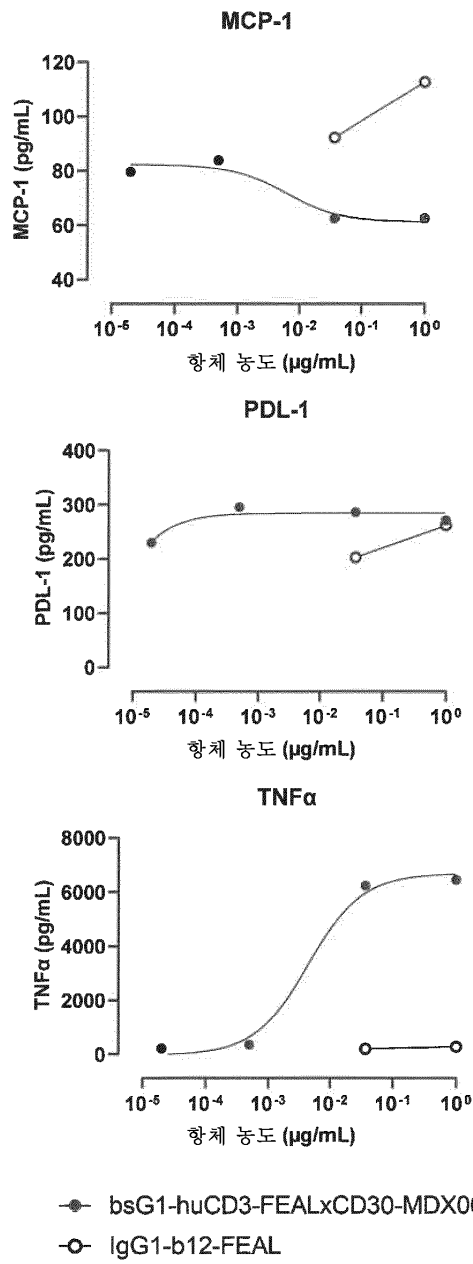
도면19ii

(계속)

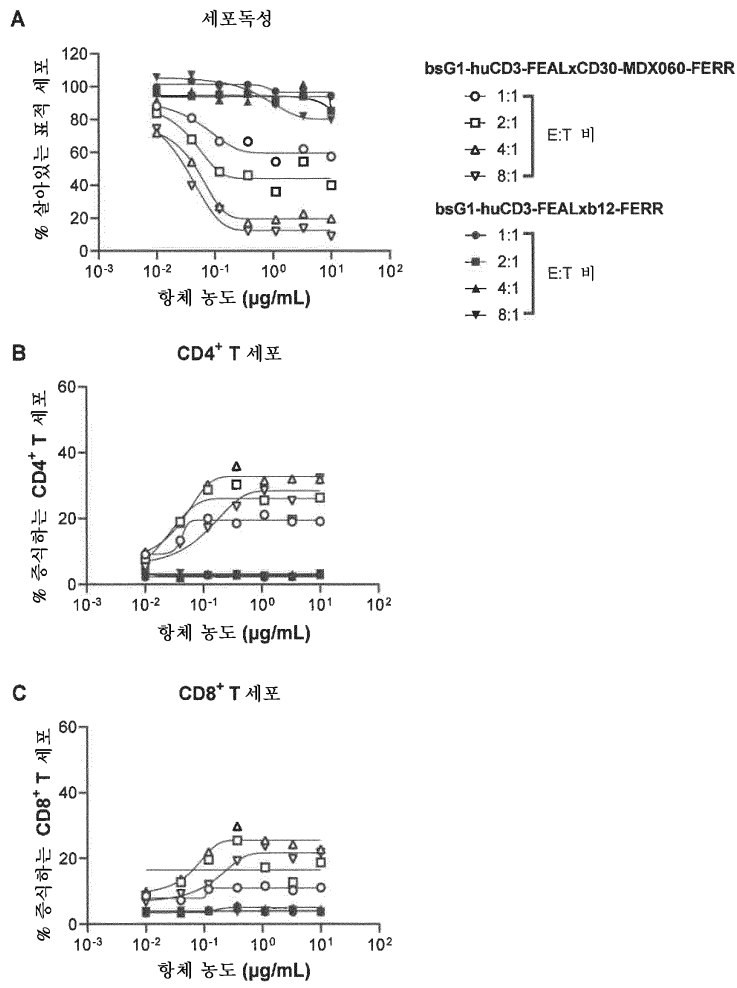


도면19iii

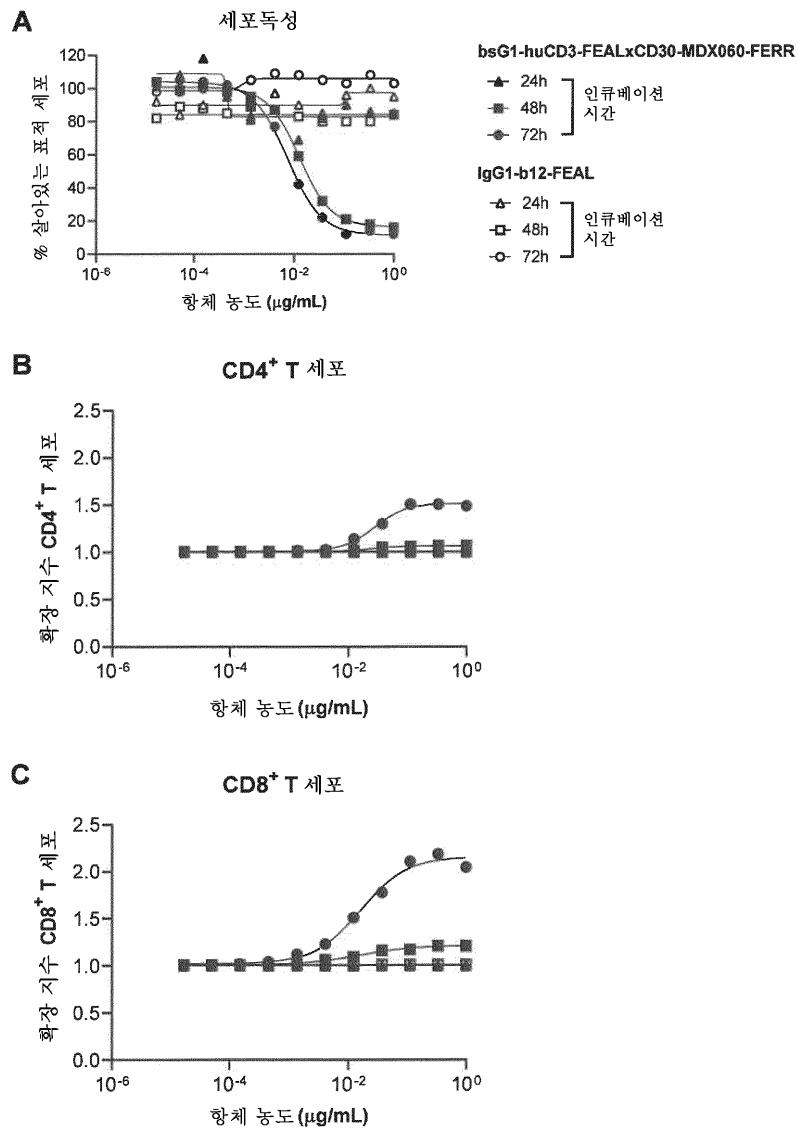
(계속)



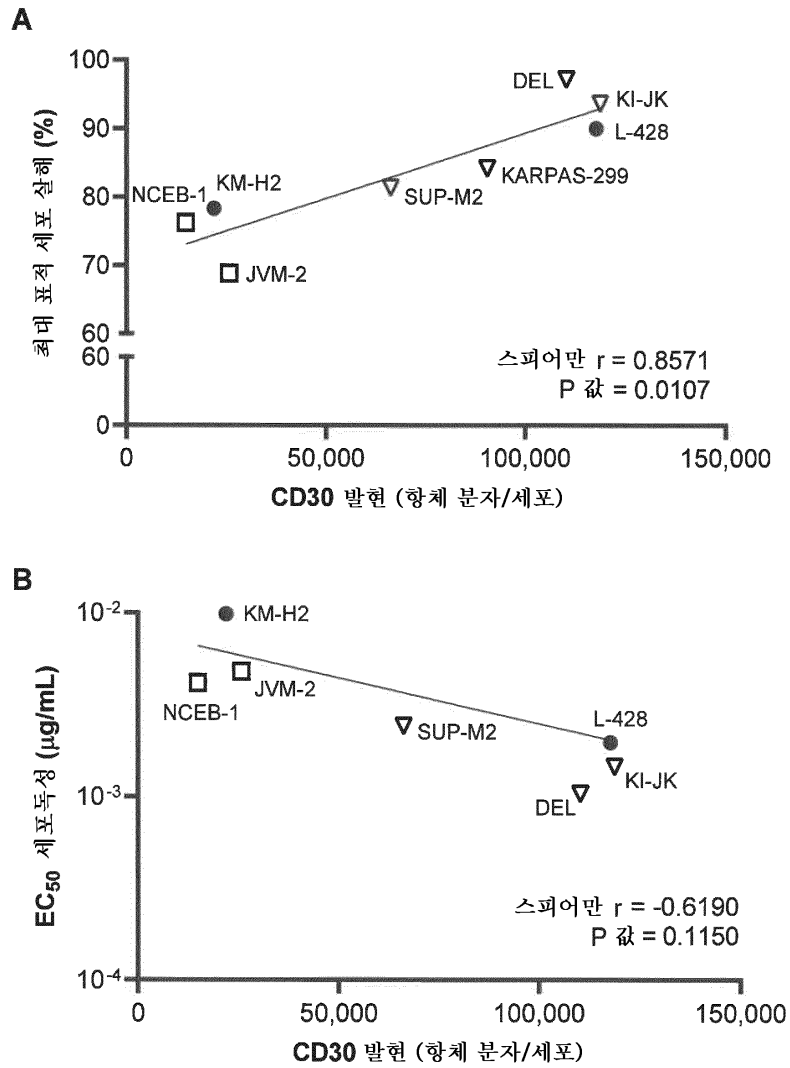
도면20



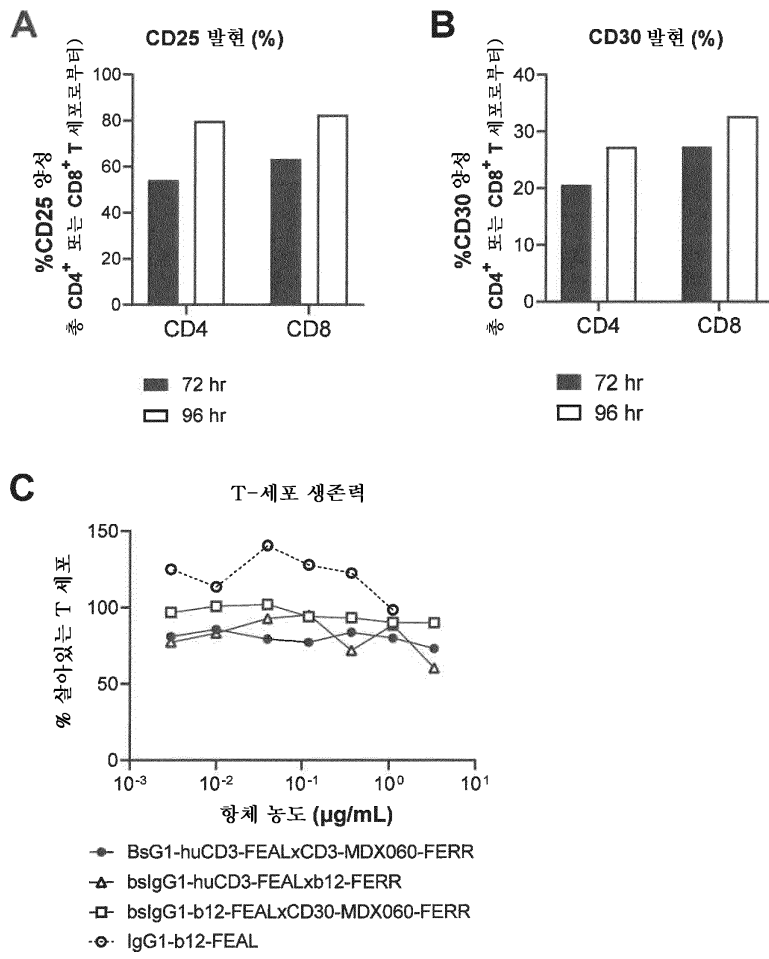
도면21



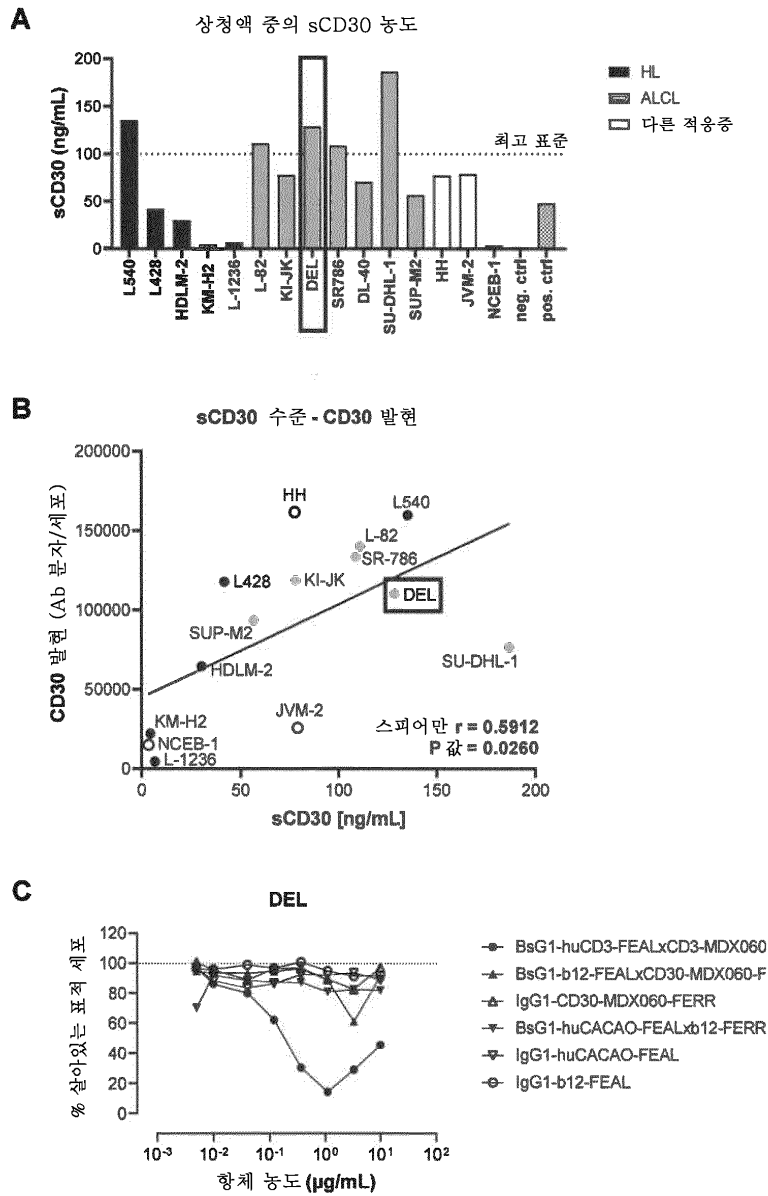
도면22



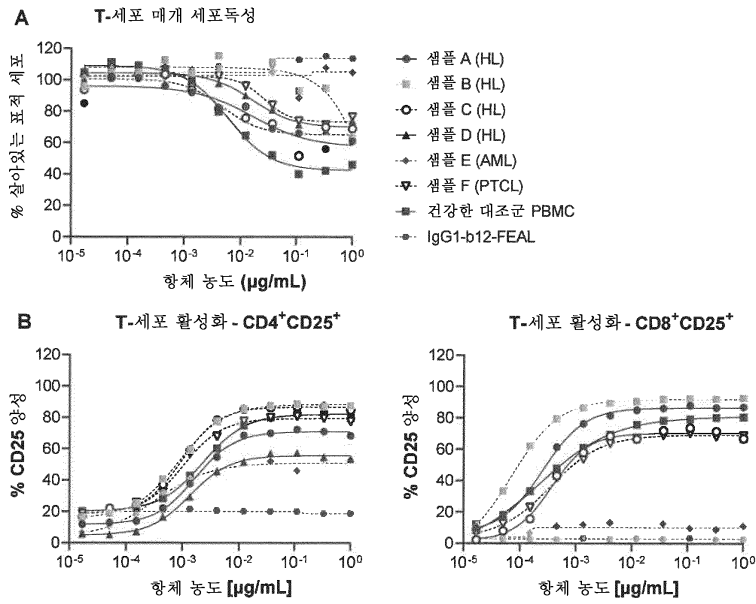
도면23



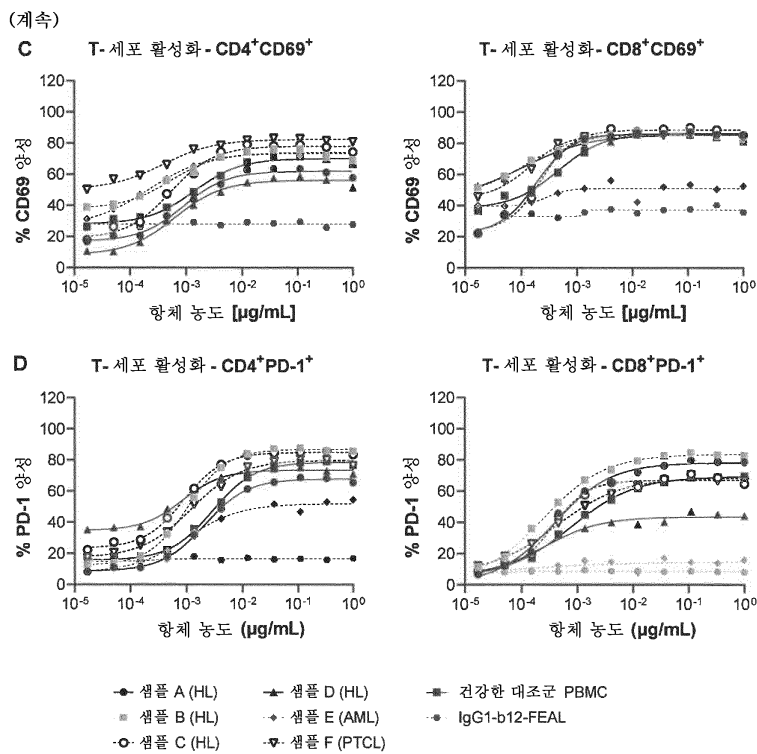
도면24



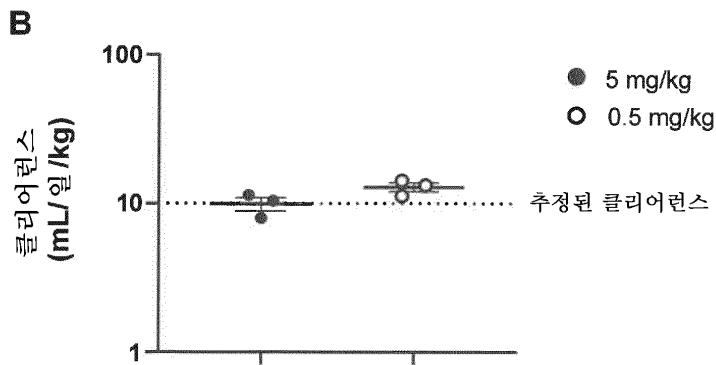
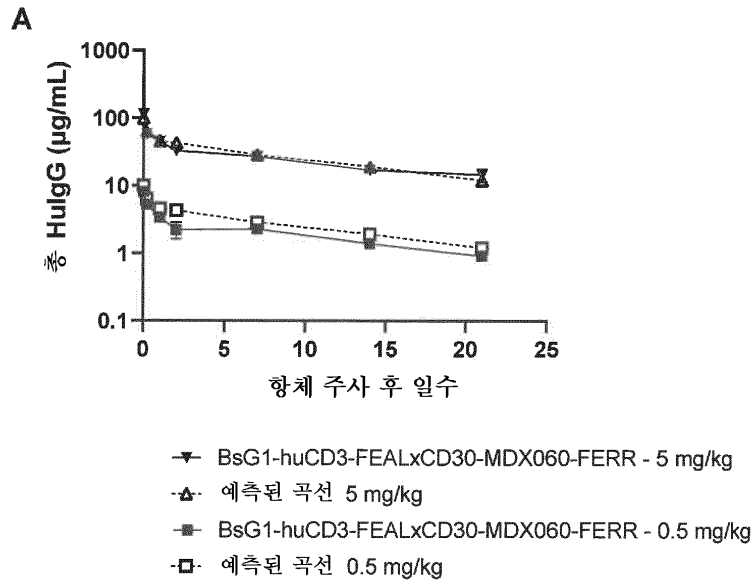
도면25i



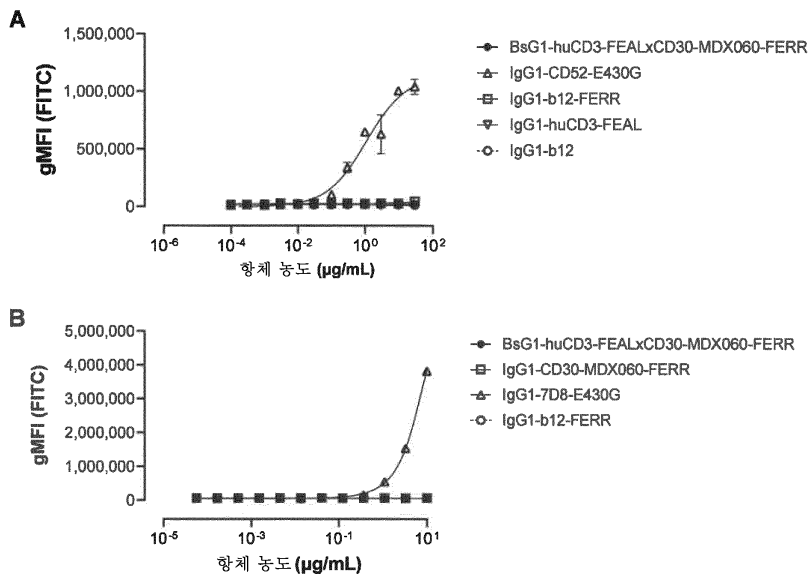
도면25ii



도면26



도면27



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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